

CLONACIÓN DEL GEN 633 Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UNA NUEVA DELESIÓN SIL- 633

Amaru R^I; Rambaldi A^{II}; Biondi A^{III}

^IUniversidad Mayor de San Andrés, Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Funcionales. Unidad de Biología Celular, Bolivia

^{II}Universidad Milano- Bicocca, Instituto Tettamanti, Laboratorio Paolo Belli, Italia

^{III} Universidad Milano- Bicocca, Instituto Tettamanti, Laboratorio Paolo Belli, Italia

RESUMEN

Se identificó un nuevo gen asociado a una nueva delección durante la pesquisa para la identificación de la delección de Tal 1. La paciente 633 presentó una banda de 5.5 kb, diferente a las descritas por estudios anteriores. Posteriormente con la técnica 3'RACE se identificó dos nuevas secuencias unidas al exon 1b del gen Sil, el primero fue llamado 633 isoforma A y el segundo 633 isoforma B, ambos genes fueron amplificados a partir de una librería-cDNA. Con L-DNA-PCR y Nested L-DNA-PCR; posteriormente se determinó la nueva delección entre los genes Sil y 633. Además se determinó la localización del gen 633 sobre el locus 1p32 realizando experimentos en YAC-DNA.

Palabras clave: *Sil, Tal1, 633, LLA-T, gen, delección, clonación.*

ABSTRACT

During the screening with southern blot for Tal 1 deletion, 633 patient presented a band of 5.5 kb, differently to described by previous studies. 3' RACE was identified two new sequences joined to exon 1b of the Sil gene: 633 gene isoform A and 633 isoform B, both genes were amplified from a Library-cDNA. L-DNA-PCR and Nested L-DNA-PCR, was determined the new break point and the new deletion Sil-633. The location of the 633 gene was determined on the locus 1p32.

Keywords: *Sil, Tal1, 633, T-ALL, gene, deletion, cloning.*

INTRODUCCION

La identificación y la clonación de los genes que intervienen en el mecanismo de regulación de la proliferación y diferenciación celular de las leucemias posibilitaron nuevas alternativas terapéuticas con bases moleculares concretas. Por ejemplo los genes BCR y ABL que intervienen en la traslocación t(9;22), forman una proteína quimérica BCR-ABL con actividad tirocinkinasa causante de la leucemia mieloide crónica ^(1,2,3); la identificación de este daño molecular posibilitó la producción de una proteína inhibidora de la tirocinkinasa BCR-ABL, el imatinib (Glivec) utilizado actualmente en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica ⁽⁴⁾. El gen TAL-1 (T-cell acute leukemia) es vital para la hematopoyesis, esta localizado en el locus 1 p32 y constituido por 8 exones ^(5,6) que codifican dos isoformas de proteínas con dominio de helix-loop-helix ^(7,8). El gen SIL (SCL interrupting locus) es responsable de la regulación de la embriogénesis, esta localizado en el locus 1p32 con 18 exones (9) que codifican una proteína reguladora ⁽¹⁰⁾. La delección del gen TAL1 es una delección molecular "no random" de 90 Kb presentes en el 20% de leucemias linfoblásticas agudas -T ⁽¹¹⁾, que forma un RNA quimérico SIL-Tal 1 ⁽¹²⁾. Fueron reportados diferentes tipos de delecciones del TAL1 ^(13,14,15) mediadas por el sistema RSS (recombination signal sequences) ⁽¹⁶⁾. En el presente trabajo se describe la caracterización molecular del gen 633 y una nueva delección SIL-633.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudió material genético de la paciente 633 con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda T.

Extracción de DNA

Las células mononucleadas de la médula ósea fueron utilizadas para la extracción del DNA con la técnica clásica de digestión con proteinasa k (0.2 mg/ml) incubado a 37 °C por 12 h, luego separados con fenol- cloroformio y precipitado en etanol. Las muestras de DNA se conservaron en solución TE a 4°C hasta su procesamiento.

Extracción de RNA

La extracción del RNA se realizó a partir de células mononucleadas con el método guanidío-isotiocianato ⁽¹⁷⁾, cuantificado por espectrofotómetro UV y cualificado en gel de agarosa al 1%. Las muestras se conservaron en agua libre de RNA asa y congelados a -20°C.

Southern blot

Diez µg de DNA de alto peso molecular fueron digeridas con Hind-III, EcoR-I, y Bgl-II (BRL, USA); separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, seguido de desnaturalización con solución alcalina y transferida a membrana Gene Screen (GeneScreenPlus-USA). La hibridación se realizó con las sondas SILDB y TALBD2 (concedido por el Prof. JJ van Dongen, Holanda) marcando con 32P y autoradiografiado de acuerdo a métodos descritos ⁽¹⁸⁾.

Northern blot

Diez µg de RNA fueron separadas en gel de Formaldehyde-agarose y transferidos a membrana genescreen (GeneScreenplus, USA), seguido de desnaturalización y fijados en calor. La hibridación se realizó con la sonda 633 (segmento del gen 633) marcado con 32P⁽¹⁹⁾.

DNA-PCR

El DNA-PCR se realizó utilizando 0.1 ng de DNA con Kits de Perkin Elmer (USA) y primers específicos: sildb, tahdbi, tal1db2, tal1db3, tal1db4 y tal1db5. La amplificación se realizó con un ciclo a 94°C por 3min; 35 ciclos a 94°C por 30 seg, a 64°C por 60 seg y 72°C por 60 seg; y un ciclo a 72°C por 10 minutos. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

3' RACE-PCR (Rapid Amplification of 3' cDNA Ends)

La primera amplificación del cDNA fue realizado con el primer 5' GCGACCCCAACGTCCCAGAG (exon 1 del gen SIL) y el primer 3' (oligo adaptador del kit), amplificado con 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, a 60°C por 30 seg. y 72°C por 60 seg. El producto fue fraccionado en gel de agarosa al 1% y purificado con el kit geneclean (BIO 101, USA)

La segunda amplificación fue realizado con primer 5' TCCTACCTGCAACAGACCT3 (exon 1b del gen SIL) y primer 3'(oligo adaptador AP1 del kit). El producto de la segunda amplificación fue subclonado en vector pMos (Amersham, Buckinghamshire), posteriormente secuenciado por técnica manual y automática.

L-DNA-PCR (Long DNA- PCR)

La primera amplificación del L-DNA-PCR se realizó con primer 5' GCGACCCCAACGTCCCAGAG (exon 1 del gen SIL) y primer 3" TGCAGCCTTGATCTCCT GCAGTC (N3R633 obtenido de la secuencia identificada con el 3'RACE).

El producto del PCR fue amplificada por segunda vez empleando 5'primer Sildb (Breit et al, 1993)) y el primer 3" TTTGTAGAGACAGAGCCTCCCTA (N3R633N3). Ambas amplificaciones fueron realizadas con 12 ciclos a 94°C por 15 seg, a 56°C por 30 seg, a 72°C por 3 min; y 20 ciclos a 94°C por 30 seg, a 56°C por 30 seg, a 72°C por 3 min. El producto fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, posteriormente subclonado en pBluscript en dos clones: BP5 de 2Kb y BP6 de 3.4 Kb, la digestión se realizó con NdeI, EcoR-I, Bg I-I I y Pst-I.

Screening de librería de cDNA

A partir de la librería de cDNA de Clontech fue amplificado el gen 633 isoforma A con 5' primer CCTTCTTGAAGACTTCATAGCAGGCCAAGC (3R7-5') y primer 3' GTTCAAGTCCTGTGG ACCCCCG (N3R633-3'); para la isoforma B con primer 5' CCTTCTTGAAGACTT CATAGCAGGCCAAGC (3R7-5) y primer 3" GAGAAGGAGTCTCGCTCTATCGC (3R6-3'); ambas isoformas fueron amplificadas con: un ciclo a 94°C por 1 min; 5 ciclos a 94°C por 30 seg, a 70°C por 30 seg; 30 ciclos a 94°C por 30 seg, a 68°C por 4 min.

El SemiNested PCR para ambas isoformas se realizó con primer 5' TTTGAGAGGGA GGATCACTTGAGCCCAGGA (3R8-5) y los primer 3' los mismos de la primera amplificación para ambas isoformas; la amplificación se realizó con un ciclo a 94°C por 5 min, 40 ciclos a 94°C por 30 seg, a 60°C por 30 seg, a 72°C por 1 min; y un ciclo a 72°C por 10 min.

Screening de la librería YAC

Screening de la librería YAC (DIBIT, Milano, Italy) se realizó con PCR usando primer 5' GCATGTGAGTCAGAAAGTTAGTA (YN-5') y primer 3' GGCAGAGTTTTTCGGGG-GTCCACA (BP-Z3'). Se amplificó con un ciclo de 94°C por 4 min; 30 ciclos a 94°C por 30 seg, a 68°C por 30 seg, y a 68°C por 4 min.

Secuencia del DNA

Los diferentes segmentos clonados en plásmido fueron secuenciadas manualmente con el Kit-secuencing de Promega y posteriormente fueron clonados por método automático. El primer usado para la secuencia del gen quimérico Sil-633 fue: Sil exon 1b 5' y para la secuencia del gen 633 se emplearon los siguientes primers: Sil exon 1b5', N3R633-5', N3R633N-3' y N3R633-3' ^(20,21).

RESULTADOS

Identificación de una nueva recombinación SIL- 633

Durante el screening con southern blot el paciente 633 presentó una banda de 5.5 kb, diferente a las descritas por estudios anteriores (Figura 1). El resultado anterior fue confirmado con un segundo experimento.

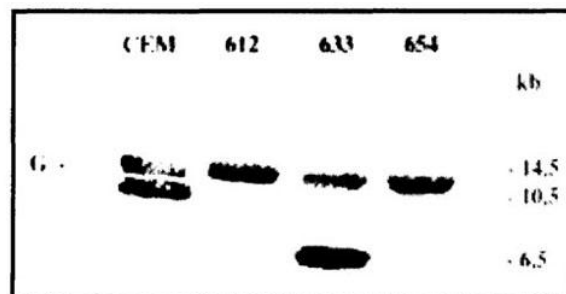


FIGURA 1. Southern blot de la línea celular CEM (control positivo para delección del gen Tal1 tipo 1), las muestras 612 y 645 son normales y la 633 presenta una banda no descrita en anteriores estudios.

Identificación de una nueva secuencia nucleotídica unida al gen SIL

Con la técnica 3'RACE se identificó dos nuevas secuencias unidas al exon 1b del gen Sil, el primero fue llamado 633 isoforma A y el segundo 633 isoforma B (Figura 2)

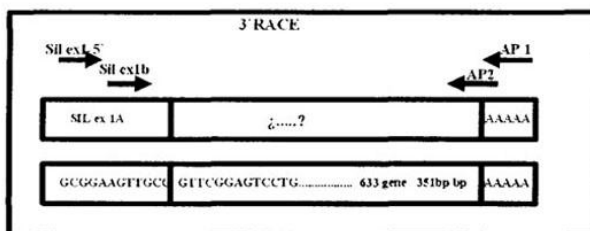


FIGURA 2. Identificación de una nueva secuencia nucleotídica unida al gen Sil (exon 1a).

Identificación del gen 633 isoforma A y B en librería de cDNA

De la librería Clontech (cDNA) se amplificó el gen 633 isoforma A (190 bp) y 633 isoforma B (240bp), además de una banda desconocida a 120 bp. (Figura 3)

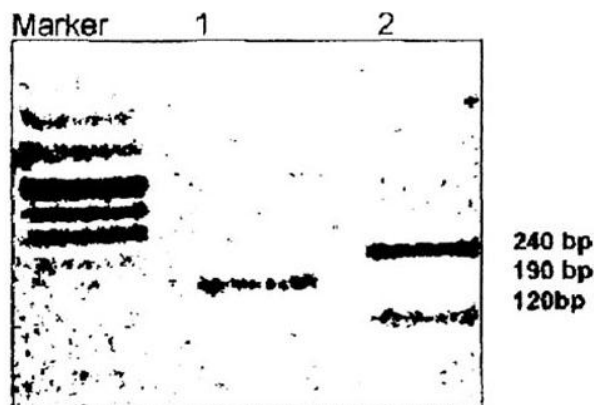


Figura 3. Amplificación gen 633 isoforma A (línea 1) e isoforma B (línea 2) B a partir de la librería comercial cDNA.

Caracterización genómica de la nueva delección SIL-633

Con L-DNA-PCR y Nested L-DNA-PCR, se amplificó el DNAdel paciente 633 obteniéndose una banda de 5.4 Kb, posteriormente subclonado en dos fragmentos: BP5 y BP6. En la secuencia de BP5 se identificó el exon 1b del gen Sil, el intron 1b del Sil, el nuevo breakpoint y el intron del gen 633. En la secuencia de BP6 se identificó el intron del gen 633 y el exon del gen 633. (Figura 4)

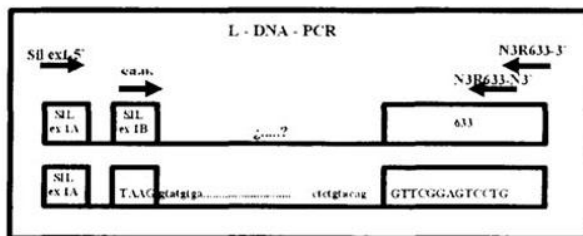


Figura 4. Esquema de la caracterización genómica de una nueva recombinación Sil-633.

Identificación de la localización del gen 633

En los clones 810E8 y 810G12 de la librería YAC-DNA genómico, se amplificó el gen 633, junto a los genes Sil y Tal 1; los tres genes fueron negativos para los clones 820D11, 952E4 Y810E12; confirmándose la localización del gen 633 en el locus 1p32 entre el aen Sil y Tal1 (Figura 5)

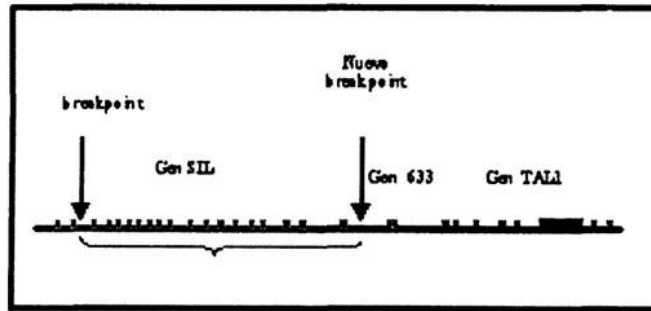


Figura 5. Localización del gen 633 sobre el locus 1p32. El gen 633 esta ubicada entre los genes Sil y Tal1.

DISCUSION

Con los resultados de southern blot y PCR se identificó un nuevo break point en la región del intron comprendida entre los genes Sil y 633 a 16 kb del gen Tal1. La amplificación del cDNA del paciente 633 demostró que el primer exon del gen Sil tiene como patner una nueva secuencia; para demostrar la real existencia de este gen se realizó un northern blot usando como sonda el gen 633 y se observó una banda de 300 bp; además se amplificó el gen 633 a partir de la librería comercial (cDNA) Clonotech. La nueva delesi3n Sil-633 esta comprendida entre el intron del exon 1b del gen Sil y el intron del gen 633, la delesi3n corresponde aproximadamente a 70 Kb.

AGRADECIMIENTOS

A la Asociación Paolo Belli de Italia, Laboratorio Paolo Belli de Italia, Instituto Tettamanti de la Universidad Milano-Bicocca.

REFERENCIAS

1. Goldman JM, Melo JV. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344: 1084-6.
2. Kolibaba KS, Druker BJ. Protein tyrosine kinases and cáncer. *Bi chim Bi phys Acta* 1997;1333:F217-F248.
3. Druker BJ, Lydon NB. Lessons learned from the development of an ABL lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 1995;85: 1151- 68.
4. Savage D, Antman K. Imatinib mesylate a new oral targeted therapy. *N Engl J Med*, 2002; 346: 683-693.
5. Begley CG, Nakahara K. Chromosomal traslocation in a human leukemic stem cell line disrupts the T-cell antigen receptor deta- chain diversity región and result in a previously unreport fus3n transcrip. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86: 1477-1488.
6. Aplan PD, Kirsch IR. The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Molecular Cell Biology*, 1990; 10:6426-6435.
7. Chen Q, Baer R. The TAL gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix- loop-helix protein. *EMBO Journal*, 1990; 9: 415-424.
8. Visvader J, Adams JM. Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix-loop-helix genes within the hemopoietic system. *Oncogene*, 1991; 6: 187-194.
9. Aplan PD, Kirsch IR. Structural characterisation of SIL, a gene frequently disrupted in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Molecular Cell Biology*, 1991; 11: 5462-5469.
10. Collazo-García N, Aplan PD. Cloning and characterization of a murine SIL gene. *Genomics*, 1995; 30: 506-513.
11. Brown L, Baer R. Site-specific recombination of the tal-1 gene is a common occurrence in human T cell leukemia. *EMBO Journal*, 1990; 9: 3343-3351.
12. Aplan PD, Kirsch IR. Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Blood*, 1992; 79: 1327-1333.
13. Breit TM, van Dongen JJ. Site-specific deletions involving the tal-1 and sil genes are restricted to cells of the T cell receptor alpha/beta lineage. *Journal of Experimental Medicine*, 1993; 177: 965-977.
14. Delabesse E, Macintyre EA. Simultaneous SIL-TAL1 RT- PCR detection of all tal(d) deletions and identification of novel tal(d) variants. *British Journal of Haematology*, 1997; 99: 901-907.
15. Van Dongen JJ, Rambaldi A, Dotti G et al. Standardized RT- PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*, 1999; 13: 1901-1928.
16. Jonsson OG, Smith RG. Rearrangements of the tal-1 locus as clonal markers for T cell acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Investigations*, 1991; 87: 2029-2035.
17. Davis LG, Battey JF. Basic methods in Molecular biology. Elsevier Science Publishing, New York, 1986.
18. Biondi A, Rambaldi A. Detection of ALL-1/AF4 fus3n transcript by reverse transcription polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring of acute leukemias with the t(4;11) traslocation. *Blood*, 1994; 82 : 330-335.
19. Golay J, Capucci A, Ansura M, Castellano M, et al. *Blood*, 199; 77: 149-158.
20. Caslini C, Amaru R, Biondi A, Rambaldi A. Identification of two novel isoforms of the ZNF162 gene: a growing family of signal transduction and activator of RNA proteins. *Genomics*. 1997; 42:268-77.
21. Rambaldi A, Amaru R. Molecular characterization of a new recombination of the SIL/TAL1 locus in a child with T cell acute lymphoblastic leukemia. *British Journal of Haematology* 2002; 118:1011-1018.