

Identificación y análisis de mutaciones del gen humano
Krüppel-like KLF6 en células de cáncer de mama

por
Nahuel Romero

Para optar al título de Magister en Biología Molecular Médica

Director: Dr. Nicolás Koritschner



Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET)

Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

INDICE

Resumen	3
Introducción	4
Objetivo	10
Descripción del proyecto	10
Resultados	11
Conclusiones	19
Materiales y Métodos	20
Agradecimientos	26
Referencias	27
Apéndices	30
Apéndice A	30
Apéndice B	32
Apéndice C	34

RESUMEN

El factor de transcripción humano Krüppel-like (KLF6) es capaz de unirse a regiones reguladoras de genes efectores y modular la transcripción del RNA mensajero de los mismos. KLF6 se induce durante eventos normales de proliferación y diferenciación como el desarrollo de mamíferos y la regeneración tisular, mientras que su expresión aberrante está asociada con la formación de tumores. Resultados previos de nuestro laboratorio permitieron identificar genes efectores de la acción de KLF6 directamente involucrados en la patogénesis, agresividad y metástasis de numerosas neoplasias como el cáncer de mama. Recientemente se han descrito numerosas mutaciones que afectan al gen KLF6 en distintos procesos tumorales. Sin embargo, no existían evidencias de mutaciones del gen KLF6 en carcinomas de mama. Para investigar los mecanismos moleculares de este proceso tumoral era necesario establecer un sistema experimental que permitiera estudiar la expresión y localización subcelular de KLF6 en células de tumores de mama cultivadas in vitro y en tejidos afectados. Para validar los resultados se consideró necesario conocer el genotipo del gen KLF6 en células derivadas de cáncer de mama. Para tal fin se cultivaron las líneas celulares, MCF7, T47D y MDA-MB435, obtenidas de dos laboratorios diferentes; para después purificar RNA mensajero, sintetizar el DNA complementario (cDNA) y secuenciar diferentes clones. El análisis de al menos seis clones por cada línea celular permitió determinar que existen variaciones alélicas para la línea MCF7, las cuales se encontraron repetidas en células provenientes de distintos laboratorios, 664 A>C (T212P), 394 A>G (T122A), 346 T>C (S106P), 268 A>G (L80E). Para las líneas T-47D provenientes del Lab1 se encontró 507 T>C (S159S) y para las provenientes del Lab2: 299 T>C (L90P). Estos resultados son interesantes ya que el cambio en la treonina 212 por prolina (i.e., un aminoácido polar a uno no-polar) implicaría un cambio conformacional importante en la estructura secundaria de la proteína, lo cual podría afectar su función. Asimismo, esta transversión encontrada en el aminoácido 212, es la primera descrita para el dominio de unión al DNA ("zinc finger"). Finalmente, las mutaciones identificadas en este trabajo abren nuevas posibilidades para profundizar los estudios que asignan a KLF6 un rol importante como gen supresor de tumores.

INTRODUCCIÓN

La característica fundamental de los eucariotas superiores es el periodo de vida definido, una propiedad que se extiende a la célula somática individual, cuyo crecimiento y división están altamente regulados. Los controles que regulan la multiplicación celular en diversas ocasiones se alteran. La célula en la que esto ocurre comienza a crecer y a dividirse en forma descontrolada, al margen de las necesidades del organismo de más células de este tipo. Cuando esta célula tiene descendencia propensa a proliferar sin responder a la regulación, el resultado es un clon capaz de expandirse en forma indefinida.

Todos los tipos de tumores están causados por alteraciones en el ADN. El ADN está expuesto a mutágenos y sufre errores durante su replicación, lo cual resulta en cambios progresivos en la secuencia nucleotídica (mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones). Ocasionalmente, una de estas mutaciones somáticas altera la función de un gen crítico, proporcionando así una ventaja en el crecimiento o proliferación de esa célula y la aparición de un clon expandido con un fenotipo transformado. Mutaciones adicionales en otros genes relevantes y sus consecuentes ciclos de expansión clonal (“multistep process”) producen células que invaden y provocan metástasis en tejidos circundantes (Fig. 1).

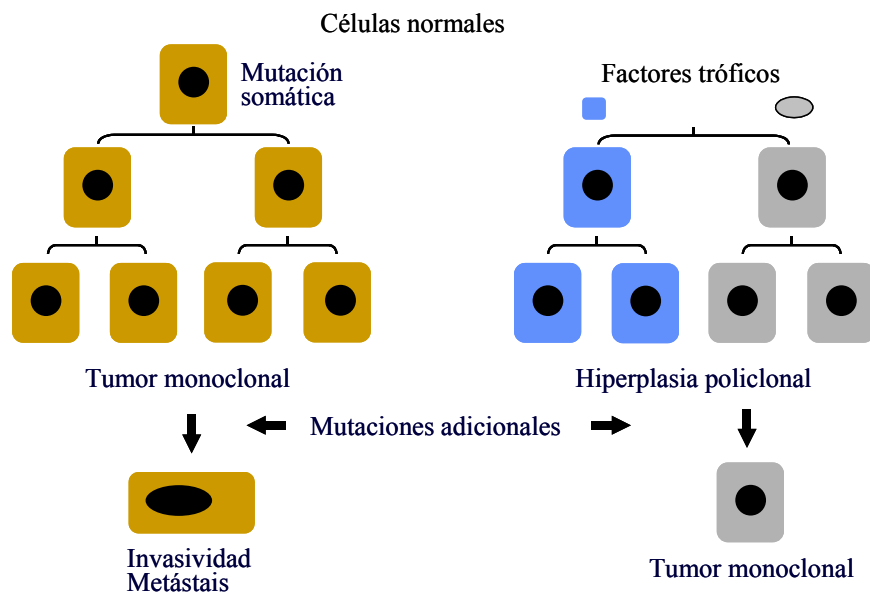


Fig .1. Expansión clonal de los tumores

Las células cancerígenas emergen así, como variantes que han perdido su control normal de crecimiento. Su habilidad para crecer en localizaciones inapropiadas o propagarse indefinidamente puede ser letal para el organismo individual en el que se produce.

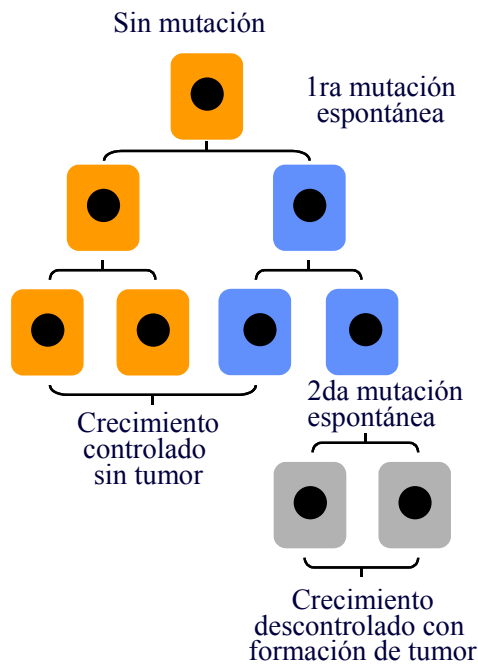
La mayoría de los tumores surgen como resultado de múltiples acontecimientos. El requisito de múltiples acontecimientos refleja el hecho de que las células normales poseen múltiples mecanismos para regular su crecimiento y diferenciación. Para sobrepasar estos controles podrían requerirse diversas alteraciones de manera independiente o concurrente.

Entre estas alteraciones se encuentra la activación de oncogenes o la desactivación de genes supresores de tumor.

Los oncogenes fueron inicialmente identificados como genes transportados por virus que causan la transformación de sus objetivos celulares. Los genes celulares se denominan protooncogenes, y en ciertos casos su mutación o activación aberrante en la célula se asocia con la formación del tumor. Los oncogenes se enmarcan en diferentes grupos, representando diferentes tipos de actividades que van desde las proteínas de membrana hasta los factores de transcripción. La generación de un oncogen representa una ganancia de función en la que un protooncogen celular se inactiva inapropiadamente. Esto puede involucrar un cambio mutacional en la proteína, o su activación constitutiva, sobreexpresión, o falla en la interrupción de la expresión en el momento adecuado.

Los genes supresores de tumor se producen mediante deleciones u otras mutaciones de inactivación que conducen a la aparición de tumores. Estos representan pérdida de función en genes que normalmente imponen algún tipo de restricción en el ciclo celular, la liberación de estas restricciones conduce a la génesis de tumores (Fig. 2). En la Fig. 2 se representa el modelo de "two-hit" de Knudson donde uno de los alelos sufre una primera mutación espontánea (en algunos casos puede ser hereditaria) y en segundo término se produce otra alteración en el alelo restante, inactivando de esta manera los dos alelos funcionales y generando un gen supresor de tumor.

Fig. 2. Modelo de Knudson



En conclusión, los oncogenes se identifican por cambios genéticos que representan una ganancia de función asociada con la adquisición de ciertas propiedades proliferativas. Un oncogen podría derivarse de un protooncogen por medio de mutaciones que afectan a su función o nivel de expresión. Los genes supresores de tumor se identifican por mutaciones de pérdida de función que permiten el aumento de la proliferación celular. Las mutaciones pueden eliminar la función del supresor de tumor o crear una versión dominante negativa.

Todos los organismos sufren cierto número de mutaciones como consecuencia de sus procesos celulares normales o de interacciones al azar con el entorno que las rodea. Estas mutaciones reciben el nombre de espontáneas; la frecuencia con la que se producen depende de cada organismo.

Las mutaciones son fenómenos poco frecuentes y por supuesto, las que provocan un daño genético producen selecciones adversas a lo largo de la evolución. Por tanto, es difícil obtener de la población natural un amplio número de mutaciones espontáneas para su estudio.

Cualquier par de bases de ADN puede sufrir mutaciones. Una mutación puntual es la que recae sobre un único par de bases, y puede deberse a cualquiera de estos dos fenómenos:

(i) Modificaciones químicas del ADN que cambian directamente una base por otra diferente.

(ii) Disfunciones durante el mecanismo de replicación del ADN, que provocan la inserción/delección de una base anómala en una cadena de polinucleótidos durante la síntesis del ADN.

Las mutaciones puntuales pueden dividirse en dos grupos en función de la naturaleza de las bases sustituidas:

- La transición es la forma más frecuente, y consiste en la sustitución de una pirimidina por otra, o de una purina por otra.
- La transversión es menos frecuente, y consiste en la sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa.

Durante mucho tiempo se pensó que las mutaciones puntuales eran los acontecimientos básicos de los cambios en los genes. Sin embargo, en la actualidad se sabe que con bastante frecuencia ocurren inserciones y deleciones de fragmentos mayores a un nucleótido.

La fuente de la que proviene dicho material genético son los elementos de transposición, secuencias de ADN capaces de desplazarse de un lugar a otro. La inserción suelen abolir la actividad del gen. En la zona en la que ha tenido lugar una inserción suelen producirse posteriormente fenómenos de delección de la misma o de los fragmentos adyacentes. Una mutación puntual puede volver a la secuencia original mediante una mutación compensadora en cualquier otro lugar del gen. La inserción de material adicional se puede revertir mediante la delección de dicho material. La delección de parte de un gen es un fenómeno irreversible. En ocasiones se producen mutaciones en otros genes con el fin de compensar los efectos de la mutación ocurrida en el gen original.

Generalmente, el cáncer surge debido a la acumulación de mutaciones que incluyen a oncogenes, genes supresores de tumor y genes reparadores de ADN. Es así entonces que la formación de una célula cancerosa requiere que se liberen los frenos del crecimiento celular (genes supresores de tumor) a la misma vez que se activen los aceleradores para el crecimiento celular (oncogenes).

El gen humano Krüppel-like factor 6, originalmente denominado Core Promoter Binding Protein (CPBP/KLF6, aislado e identificado por Koritschoner et al., 1997), codifica a un factor de transcripción capaz de interactuar con regiones de DNA que son frecuentes en promotores de genes eucariotas y de este modo regular la síntesis de RNA mensajero.

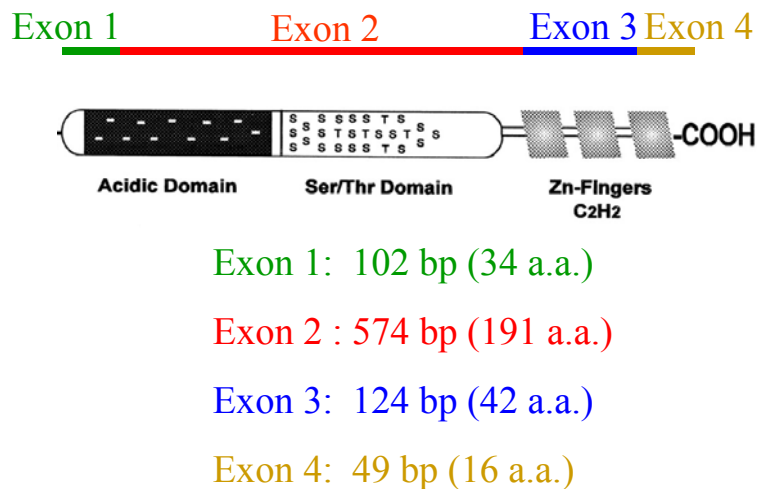


Fig. 3. Representación esquemática del gen humano KLF6 y su producto proteico. Se indican los exones con sus correspondientes números de nucleótidos y los respectivos dominios proteicos codificados.

KLF6 se induce durante eventos normales de proliferación y diferenciación como el desarrollo de mamíferos y la regeneración tisular, mientras que su expresión aberrante está asociada con la formación de tumores.

Se determinó que KLF6 modula la expresión de numerosos genes involucrados en el embarazo (PSG, Pregnancy-Specific Glycoproteins), la reparación y regeneración tisular (TGF β , Transforming Growth Factor β y sus respectivos receptores, TGF β R), como así también a genes virales, como los del virus HIV (Koritschoner et al., 1997; Ratzu et al., 1998; Suzuki et al., 1998; Kim et al. 1998, Inuzuka et al., 1999; Turner and Crossley, 1999). Mas recientemente se identificó a KLF6 como un gen supresor de tumor debido a la ocurrencia natural de mutaciones en ambos alelos que originan pérdida de función (Narla et al., 2001, Reeves et al. 2004). En estos

artículos se propuso un mecanismo que asigna un rol esencial a KLF6 sobre la regulación del gen p21 cuyo producto actúa como proteína inhibidora del ciclo celular.

La versión “wild type” de KLF6 es capaz de activar el gen p21 reprimiendo el ciclo celular mientras que mutaciones que anulan funcionalmente a KLF6 hacen que ésta no imprima el freno molecular y la célula prolifere de manera anormal causando el tumor. Estas observaciones indican que KLF6 cumple un papel fundamental en el control del ciclo celular y aquellos cambios que afecten su expresión podrían ejercer modificaciones en las tasas de proliferación y en el potencial de diferenciación celular. Por lo tanto, los estudios acerca de la actividad de KLF6 en células en cultivo y sus consecuencias sobre otros genes, serían de suma importancia para comprender los mecanismos moleculares involucrados en la proliferación y/o apoptosis de células humanas en situaciones normales y patológicas.

El factor de transcripción Krüppel-like 6 (CPBP/KLF6), se expresa en numerosos tejidos humanos aunque en distintos niveles. En este contexto, evidencias recientes obtenidas por ensayos de inmunohistoquímica e inmunoblot indicaron que KLF6 se expresa efectivamente en tumores de mama y líneas derivadas de carcinomas mamarios (e.g. MCF7, MDA-MB435,T47D).

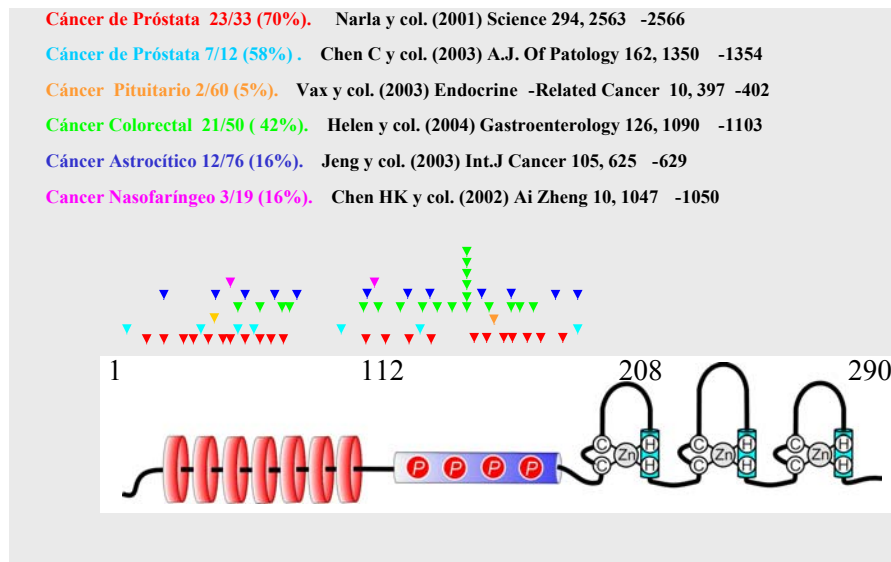


Fig.4. Mutaciones descritas para el gen KLF6.

Los diferentes colores indican las posiciones de las mutaciones relacionadas a los distintos tipos de cáncer.

El gen KLF6 consta de 4 exones, pero más del 90% de las variaciones alélicas descritas se ubican en el exon 2 (574 pb) (Reeves y col, 2004; Narla y col., 2001; Vax y col., 2003; Muhlbauer y col., 2003; Chen y col., 2003) (Fig. 4).

OBJETIVO

Identificar y caracterizar las posibles variaciones de secuencia para el exon 2 del gen humano Krüppel-like factor 6 (KLF6) en células de cáncer de mama.

DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Se cultivaron las líneas celulares obtenidas de dos laboratorios diferentes (Lab1 y Lab2) para después purificar el RNA mensajero y se sintetizó el DNA complementario (cDNA) utilizando la enzima Transcriptasa Reversa (M-MLV) de diferentes marcas comerciales. El cDNA purificado y cuantificado fue usado como molde para amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el exon 2 del gen KLF-6, usando DNA Pol. distintas. Una vez que los productos de PCR fueron verificados se los clonó y amplificó en bacterias. Se amplificaron 6 clones por cada línea celular y 6 para el control positivo (plásmido que contenía el cDNA completo de KLF6 cuya secuencia fue idéntica con la publicada en el banco de datos como wild type). Una vez que se eligieron 6 clones por cada línea celular, se procedió a purificar los plásmidos. El paso siguiente fue cuantificar el DNA para después por digestiones con enzimas de restricción poder conocer el peso molecular y la orientación de cada fragmento inserto en el vector. Por último se secuenciaron los fragmentos y los resultados fueron comparados con los existentes en las bases de datos, utilizando el software OMIGA (Oxford Molecular). Para confirmar los resultados se repitió todo el procedimiento.

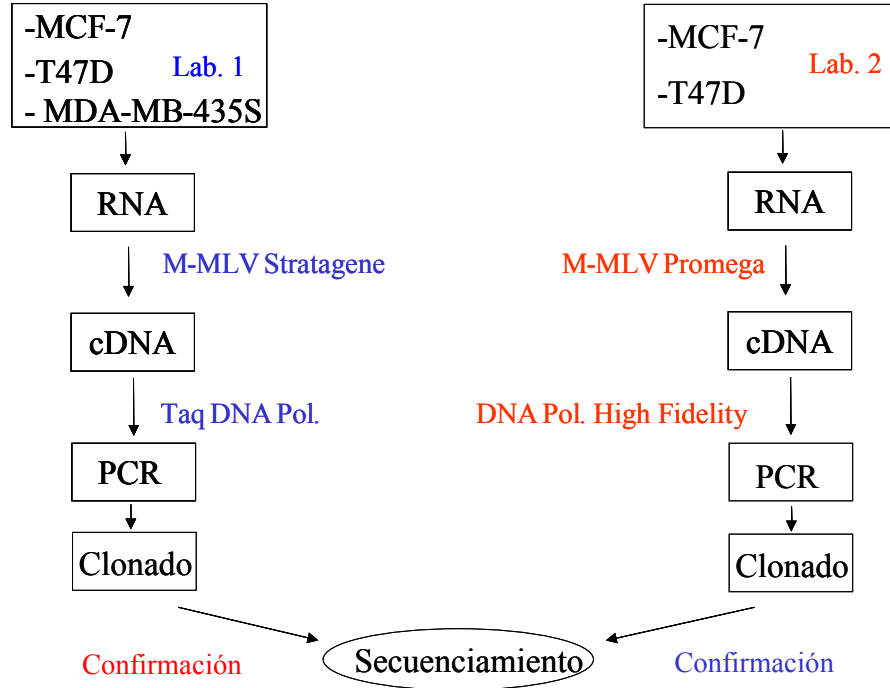


Fig. 5. Diagrama del proyecto.

RESULTADOS

Amplificación y clonado del fragmento de cDNA de KLF6

Se cultivaron tres líneas celulares de cáncer de mama (Materiales y Métodos). Se purificó el RNA total mediante protocolos estándar. El RNA fue cuantificado por espectrofotometría a 260nm/280nm dando cocientes superiores a 1,6 y obteniendo en promedio por placa 12 ug de RNA. A partir del RNA total se sintetizó cDNA, que fue cuantificado por espectrofotometría, obteniendo en promedio 50 ug de cDNA. El cDNA fue amplificado por PCR y analizado en un gel de agarosa al 1,2% dando bandas únicas del peso molecular esperado (669bp).

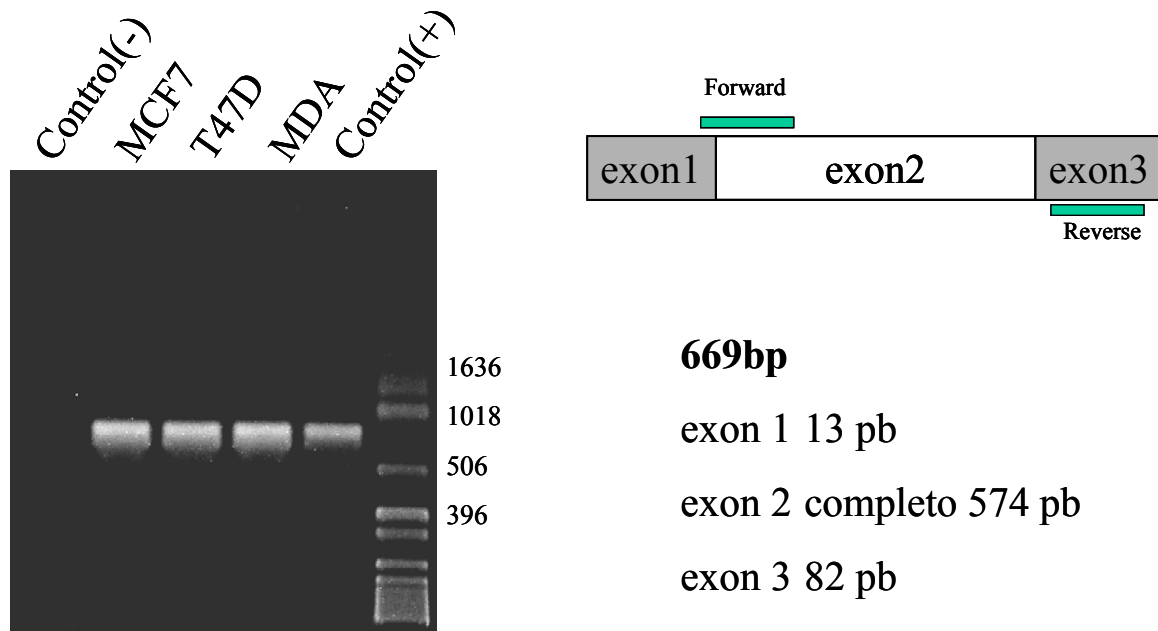


Fig. 6. PCR del cDNA del gen humano KLF6.

Panel izquierdo: fotografía de un gel de agarosa que muestra los productos de PCR específicos del cDNA KLF6. Panel derecho: esquema de las regiones amplificadas por PCR.

El producto de PCR fue cuantificado por absorbancia y clonado en vectores apropiados para luego ser introducidos en bacterias competentes. La transformación de las bacterias fue superior al 90%.

Se amplificaron 6 colonias, positivas (blancas) para el inserto, por línea celular, y 6 para el control positivo, luego se purificó el vector de cada una de las 24 colonias.

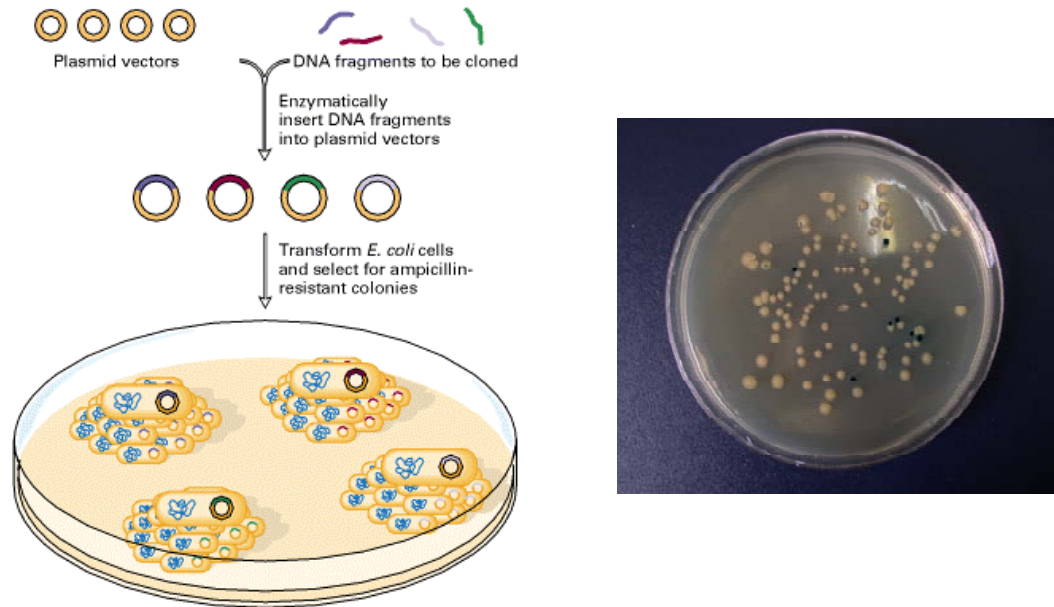


Fig. 7. Esquema de la transformación de bacterias con plásmidos que confieren resistencia a antibióticos (Panel izquierdo). En el panel derecho se muestra una fotografía de un experimento típico de transformación en *E. Coli* Top 10 (Invitrogen) empleando los productos de ligación del fragmento de PCR y el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen).

Este plásmido (pCR 2.1-TOPO) posee flanqueando el sitio de clonado sitios para distintas enzimas de restricción. Se analizaron los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, tanto en el plásmido como en el fragmento amplificado de 669b. Para verificar el tamaño de los fragmentos clonados se utilizó la enzima Eco-RI, que no posee sitios de corte en el exon 2 del gen KLF-6 y sí en el plásmido flanqueando el producto de PCR insertado. Los clones positivos para KLF-6 debían dar 2 fragmentos, uno de 686 bp, correspondiendo al producto clonado de 669bp y 17bp del sitio de corte, y otro de 3214 bp.del plásmido.

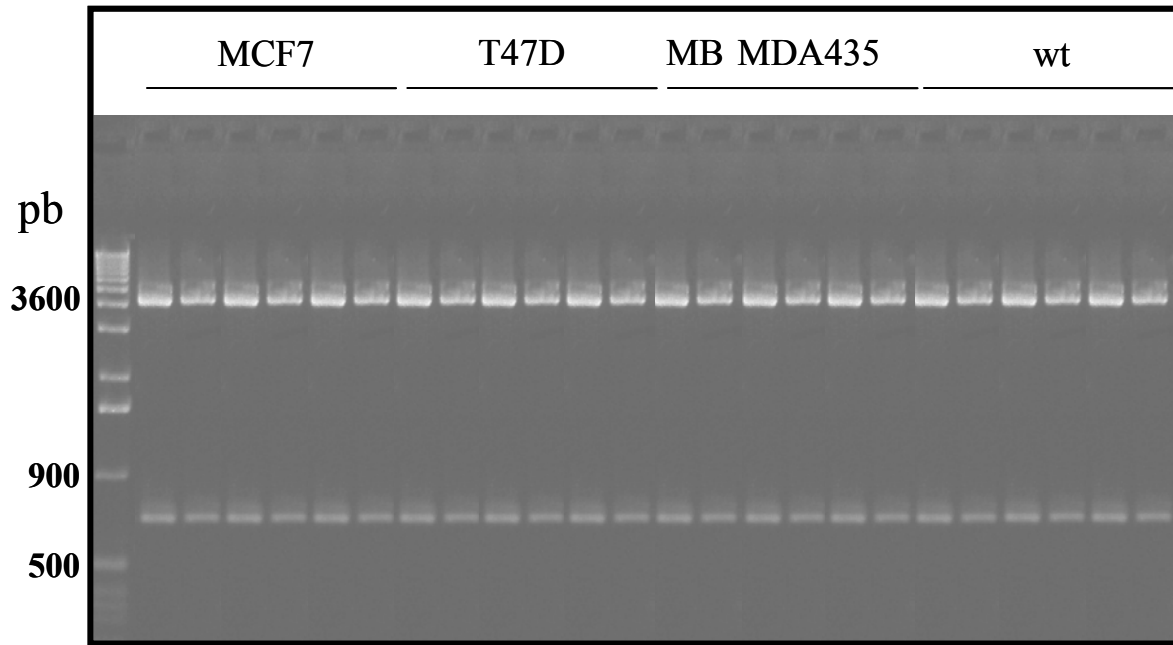


Fig. 8. Análisis de restricción de los plásmidos conteniendo fragmentos de cDNA de KLF6. Los DNA purificados se digirieron con la enzima *EcoRI*, se resolvieron los fragmentos en un gel de agarosa y se visualizaron por medio de tinción con bromuro de etidio.

El próximo paso fue digerir los vectores con la enzima *EcoRV*. El exon 2 del gen KLF-6 posee un único sitio de corte para esta enzima, y el plásmido también uno, de modo que para aquellos clones cuyo fragmento tuviese una orientación 5'→3' los dos fragmentos resultantes de la digestión debían tener 533 bp y 3367 bp. Para la orientación 3'→5' los dos fragmentos debían ser de 172 bp y 3728 bp. El hecho de cortar con una segunda enzima de restricción, permitió asegurar que el inserto de los vectores correspondía al gen de KLF-6 y poder conocer la orientación de los mismos, para luego simplificar las lecturas de la secuencia.

Los DNA correspondientes a cada clon se enviaron a un laboratorio de referencia para secuenciar ambas cadenas (Macrogen). Con el fin de confirmar los resultados obtenidos se repitió todo el procedimiento utilizando transcriptasa reversa y DNA polimerasa distintas para cada muestra de RNA derivada de las líneas celulares.

Análisis de las secuencias del gen KLF6 provenientes de células de cáncer de mama

Células MCF-7

En las líneas MCF-7 de distintos laboratorios se encontró una transversión en 3 alelos diferentes en la adenina 664 por citosina, produciendo un cambio en la treonina 212 por prolina (T 212 P) (Fig. 9 y 10). Este cambio de un aminoácido polar a uno no polar, implicaría un cambio conformacional importante en la estructura secundaria de la proteína. Para profundizar en este aspecto se realizó un análisis por medio de un programa de computación específico que permite dilucidar cambios en la estructura (ExPASy Proteomics Tools). El resultado del cambio de (T 212 P) implica una desestabilización en el primer "zinc finger" de los tres que posee esta proteína. Esta transversión encontrada en el aminoácido 212, es la primera descrita para el dominio de unión al DNA ("zinc finger"), ya que todas las publicadas se encuentran en el dominio de transactivación.

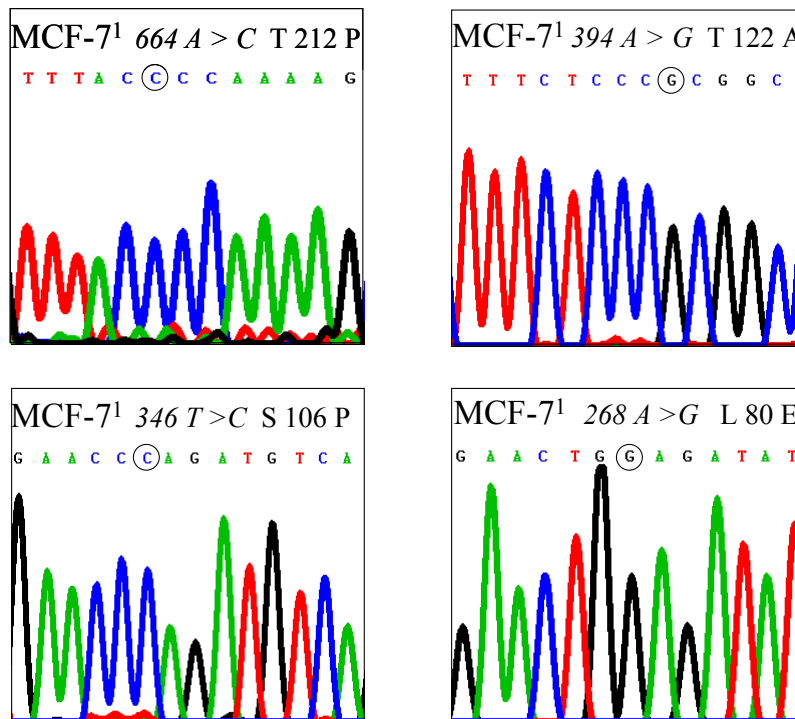


Fig. 9. Secuencias del gen KLF6 proveniente de células MCF7.

Se muestran los electroferogramas de cuatro reacciones de secuenciamiento diferentes donde se detectaron los cambios que se indican en cada panel. MCF7¹: el superíndice indica el laboratorio de origen.

El mismo resultado pudo obtenerse en las muestras de células provenientes de otro laboratorio (Fig. 10)

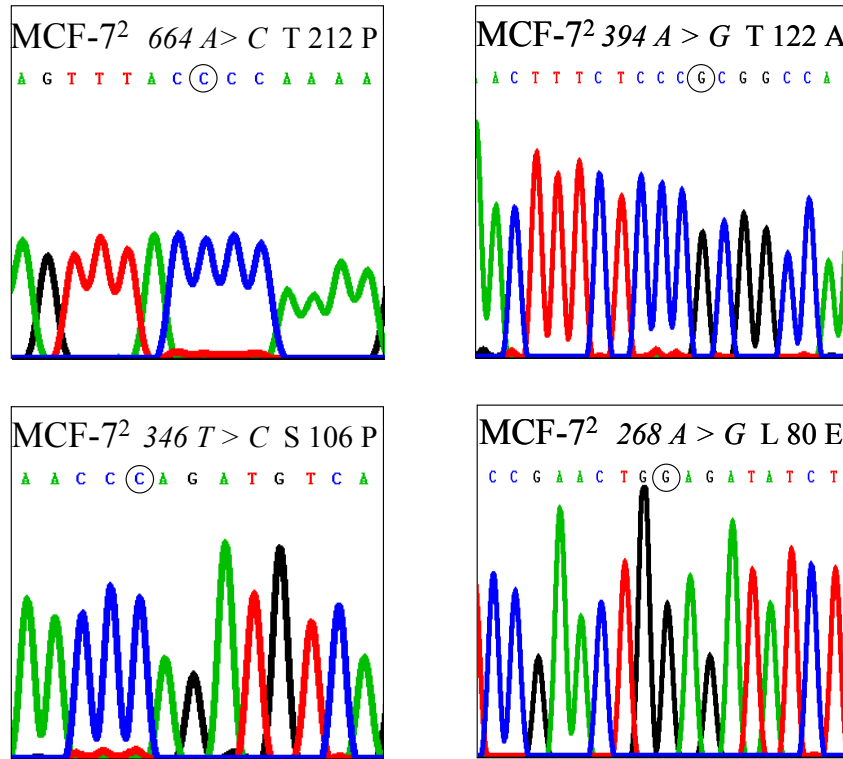


Fig. 10. Secuencias del gen *KLF6* proveniente de células MCF7.

Se muestran los electroferogramas de cuatro reacciones de secuenciación diferentes donde se detectaron los cambios que se indican en cada panel. MCF7²: el superíndice indica el laboratorio de origen.

Además de las mutaciones descritas anteriormente, en varios de los clones se identificaron otras variaciones de secuencia que aparecieron en el mismo clon. Los clones 1¹, 4¹, 5¹, 5² y 6² (el superíndice indica el laboratorio de origen) presentaron la transversión 664 mas la transición de timina 346 a citosina, produciendo un cambio en la proteína en la serina 106 a prolina. Por otra parte, los clones 3¹, 6^{1a}, 6^{1b} (este caso es una confirmación), 6² y 2², poseían la transversión 664 mas la transición de la adenina 394 a guanina, produciendo un cambio en la proteína en la treonina 122 a alanina. Los clones 5¹, 2¹, 2², 3², 1² y 5² presentaron además de la transversión 664, una transición en la adenina 268, produciendo un cambio en la proteína en la lisina 80 que cambia a glutámico. Es importante destacar que estas mutaciones se repitieron para las dos

muestras de RNA provenientes de líneas celulares de dos laboratorios diferentes. (Apéndice A). Los datos de secuencia encontrados concuerdan con el modelo de tetraploidía descrito para las células MCF7. En este modelo uno de los alelos es wild type, y los otros tres comparten la misma mutación en 664 A>C además de las mutaciones (346 T>C; 394 A>G y 268 A>G) en cada uno de los tres alelos restantes en forma individual. En las dos líneas MCF-7¹ y MCF7² se encontraron las mismas variaciones alélicas, las que se resumen en la Fig. 11

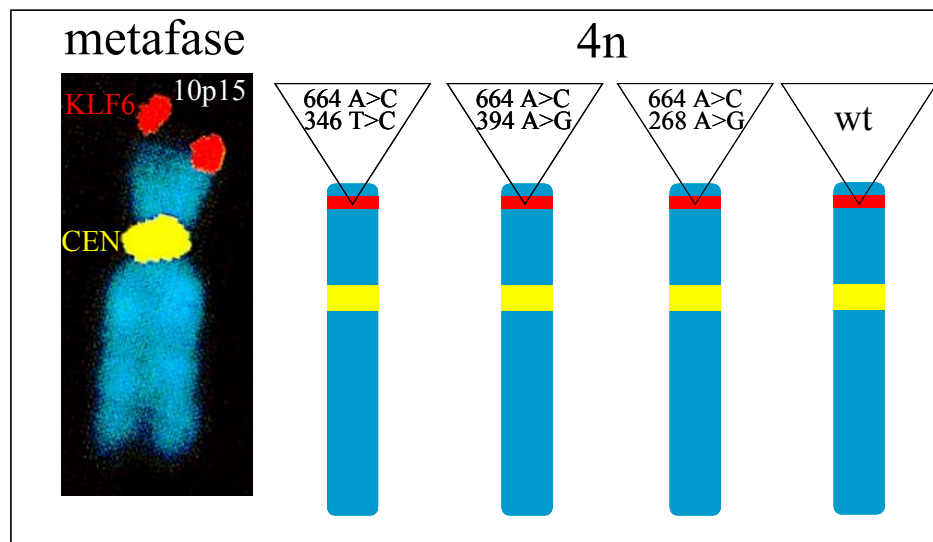


Fig 11. Modelo hipotético de la coexistencia de diferentes mutaciones en células MCF-7. Se muestra la localización cromosómica del gen humano KLF6 en 10p15. En caso de tetraploidía podrían existir el alelo wt y tres variantes alélicas que comparten la mutación 664 A>C y cada una de esta variantes posee una mutación adicional diferente (346 T>C; 394 A>G y 268 A>G).

Células T-47D

En la línea T-47D del laboratorio 1 se encontró una transición en la timina 507 que pasa a citosina, sin producir cambio en la secuencia de la proteína, al codificar para el mismo aminoácido (serina 159). Para la muestra del laboratorio 2 se encontró una transición en la timina 299 que pasa a citosina, produciendo un cambio en la proteína en la leucina 90 que pasa a prolina. Esta transición produciría un cambio importante en la estructura de la proteína y además coincide con un posible sitio de fosforilación.

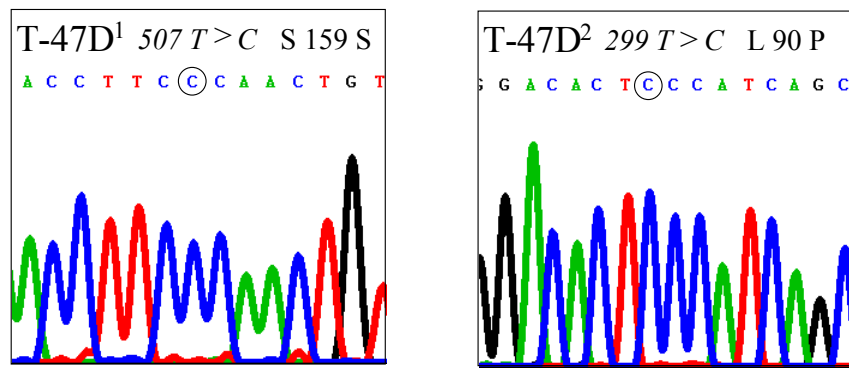


Fig. 12. Secuencias del gen KLF6 proveniente de células T-47D.

Se muestran los electroferogramas de reacciones de secuenciación diferentes donde se detectaron los cambios que se indican en cada panel. T-47D¹ y T-47D²: el superíndice indica el laboratorio de origen.

Este trabajo nos muestra que KLF6 se encuentra mutado en 3 alelos de las líneas MCF-7 independientemente del laboratorio de origen. Por otra parte, en la línea T47D no se detectaron las mismas variaciones alélicas en las células provenientes de dos laboratorios diferentes. Una posible explicación sería que las mutaciones en la línea T47D de distintos laboratorios hayan surgido de mutaciones adicionales en sitios diferentes. (Apéndice B)

MDA-MB-435

El análisis en la línea MDA-MB-435 se realizó sólo en una muestra de cDNA (Apéndice C). La confirmación de estos resultados aguardan su desarrollo en el futuro cercano.

CONCLUSIONES

El cáncer es causado por mutaciones, pero existen dos diferencias claves entre el cáncer y otras enfermedades genéticas. La primera es que las mutaciones que se observan en el cáncer se producen, sobre todo, en células somáticas, mientras que otras enfermedades genéticas sólo son causadas por mutaciones en la línea germinativa. Sin embargo, algunos individuos han heredado mutaciones genéticas que los predisponen a desarrollar tipos específicos de cáncer. La segunda es que el cáncer no es consecuencia de una mutación aislada, sino, más bien, de la acumulación de entre 3 y 20 mutaciones, según el tipo de cáncer, en genes que regulan la multiplicación celular normal.

Las células cultivadas de tumores en lugar de tejido normal muestran cambios en algunas o en todas sus propiedades. Principalmente sufren cambios cromosomales de manera que no son verdaderos diploides. Una célula transformada crece de forma mucho menos restringida. Ha reducido la dependencia de suero, no necesita adherirse a una superficie sólida y se apilan en una masa compacta de células en lugar de crecer como una monocapa superficial. Además las células pueden formar tumores cuando se inyectan en los animales de experimentación adecuados.

Ciertos acontecimientos convierten células normales en células transformadas y proporcionan modelos para los procesos implicados en la formación del tumor. Normalmente, múltiples cambios genéticos son necesarios para crear un cáncer, y algunas veces los tumores incrementan su virulencia como resultado de series progresivas de cambios. Por supuesto que cualquier línea celular establecida aporta sólo una aproximación del control in vivo pero mediante la comparación de las líneas celulares transformadas con células normales, se trata de identificar las bases genéticas para la formación del tumor y poder comprender así los procesos fenotípicos que están involucrados en la conversión.

Si bien con la simple descripción de éstas variaciones alélicas, no es posible saber qué efectos finales producen en la función de la proteína, estos resultados alientan a seguir estudiando este posible gen supresor de tumores que al mutar desencadenaría un crecimiento descontrolado en las células.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

MCF-7: Esta línea proviene de tejido de glándula mamaria humana con adenocarcinoma de efusión pleural. Retiene diversas características de epitelio mamario diferenciado incluyendo receptores estrogénicos citoplasmáticos y la capacidad de formar tumefacciones. Contiene el oncogen Tx-4. Los números de cromosomas de la línea germinal variaron desde hipertriploide a hipotetraploide. El cromosoma 20 es nulisómico, mientras que el X es disómico. Su tiempo de división es de 29 horas.

T-47D: La línea fue aislada de una efusión pleural obtenida de una paciente femenina de 54 años con una infiltración ductal de carcinoma de mama. La parte epitelial diferenciada (T-47D) contiene receptores para el 17 beta estradiol, otros esteroides y calcitonina. Es una línea celular hipotriploide, con 65 cromosomas en el 50% y poliploidía en un 0.8%. Su tiempo de división es de 32 horas.

MDA-MB-435S: Es una cepa que evolucionó de una línea parental aislada en 1976 por R.Cailleau y Col. de una efusión pleural de una mujer de 31 años con adenocarcinoma de mama metastásico ductal. En un estudio reciente de cDNA microarrays la línea parentesa (MDA-MB-435) DE MDA-MB-435S coincidió con las líneas celulares provenientes de melanoma. Los autores sugieren que estos hallazgos reflejan un patrón de expresión neuroendócrina vistos en algunos adenocarcinomas de mama o indican que la línea fue establecida de células de un melanoma oculto co-existente. Es aneuploide (xx), con la mayor parte de los conteos cromosomales de 55 a 60. Los cromosomas 6, 11, y 22 están ausentes. Mientras que el 7, 13, 18 y 21 están en copia simple, el resto es diploide salvo el 2 que es triploide.

Cultivo Celular

Las células fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (cat.11995-065-GIBCO) adicionado con 0.01mg/ml de Insulina al 90%, 2mM de L-Glutamina, 10% de suero fetal bovino, Penicilina (100u/ml) y Estreptomina (100ug/ml) (1). Para remover las células se usó tripsina (0,25%) y el medio fue cambiado de 2 a 3 veces por semana. La estufa de cultivo se mantuvo a 37°C en 5% de CO₂.

Purificación de RNA total

Se agregó 1 ml de reactivo de Trizol (cat.15596-026 Gibco) a cada placa de 3,5 cm de diámetro, lisando las células por completo. El lisado fue incubado por 5 min. a 20°C para permitir la disociación completa de los complejos núcleo-proteínas, posteriormente se centrifugaron a 12000 G por 15 minutos a 4°C. Luego de la centrifugación la muestra quedó separada en una fase fenol-cloroformo rojiza, una interfase y una solución acuosa superior incolora. El RNA quedó en la fase acuosa. La fase acuosa fue separada y se precipitó el RNA por medio del agregado de 0.5 ml de alcohol isopropílico. Las muestras se incubaron a 20°C por 10 minutos y luego se las centrifugó a 10.000 G por 10 minutos a 4°C. El RNA formó un pellet gelatinoso en el fondo del tubo. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75% mezclando con vortex y centrifugando a 7.000 G por 5 minutos a 4°C. Por último se secó el pellet y se lo disolvió en agua libre de RNasa. Para obtener una buena purificación del RNA obtenido se utilizó el Kit SV Total RNA Isolation System (Promega).

Síntesis de cDNA

Para la síntesis del cDNA, se mezclaron 3 ug de RNA total y 20 ul de agua mili-Q en un tubo eppendorf y se calentó la solución a 65°C por 3 minutos, luego se enfrió sobre hielo durante 1 minuto para remover las estructuras secundarias. Se centrifugó por 5 minutos a 3000 G y se agregó 3 ul de hexa-primers (0.5uM), 4 ul de buffer de reacción y 2 ul de RNAsin (10U/ul). Se calentó a 65°C durante 15 minutos y se enfrió sobre hielo 1 minuto, se centrifugó durante 5 minutos a 3000 G y se agregó 1ul de una mezcla de los 4dNTPs (c/u 20 mM), 3 U de M-MLV

Reverse Transcriptase STRATAGENE.Cat. 200401 para las líneas (1) y 1.5ul de M-MLV – PROMEGA Cat.M1701 para las líneas (2). Luego se incubó a 37°C por 2 horas.

Primers

El gen de KLF-6 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 10, se diseñó un par de primers que hibridaran el exon 2 completo y parte del exon 3 para no amplificar cromosoma 10 de DNA genómico. Se utilizó para tal fin el software OMIGA (Oxford Molecular) y de todos los posibles se eligió el par: Forward 5'GTACTGGCAACAGACCTGCCTAGA 3' y Reverse 5'TTTCGGAAGTGCCTGG 3' que amplificaba 669 bp del cromosoma 10 (exon 2 completo, 13 nucleótidos del exon 1 y 82 nucleótidos del exon 3).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

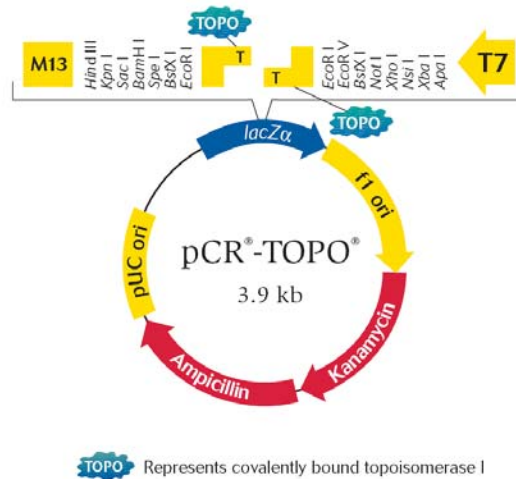
Para la reacción de PCR se usó 100 ng de cDNA, 5 ul de Buffer de PCR (Invitrogen) , dNTP [0.2mM], MgSO₄ [2mM], Primer [0.5µM], 3 unidad de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen- Taq DNA Polymerase. Cat. 11615-010) para las líneas (1) y (Invitrogen Taq DNA Polymerase High Fidelity.Cat. 11304-011) para las líneas (2) en un volumen final de reacción de 50 ul. Además de los tubos correspondientes a cada línea celular, se procesó un control negativo sin DNA, y un control positivo con 50 ng de plásmido que tenía insertado el gen de KLF-6, cuya secuencia fue idéntica a la wild tipe. El termociclador (MJ Research.Inc PTC-100) se programó a 95°C por 5 minutos para lograr una buena separación de las cadenas, y luego se realizaron 30 ciclos de 93°C por 1 minuto, 52°C por 45 segundos y 72°C por 2 minutos. Por último se dejó 10 minutos a 72°C para lograr una completa elongación de los fragmentos amplificados.

El paso siguiente fue introducir los productos de la amplificación en un vector de clonado (Pcr2.1, Invitrogen.cat K4500-01) cuya eficiencia para fragmentos de 750bp es superior al 95%.

Clonado

La Taq Polimerasa tiene una actividad transferasa terminal que agrega una deoxiadenuina única a los extremos 3' de los productos de PCR, esto no sucede con la Taq Proofreading por lo que los productos de PCR posterior a la amplificación fueron incubados 15 minutos a 72°C con la Taq Polimerasa Recombinante.(cat. 11615-010 Invitrogen). El vector linealizado de este kit tiene

residuos terminales de deoxitimidina 3' y la enzima Topoisomerasa I acoplada a dichos extremos. Esto permite a los insertos de PCR ligarse eficientemente con el vector. Para clonar 15 ng del vector se utilizaron 80 ng del producto de PCR, y 4 ul de solución salina. Los tubos fueron agitados suavemente a temperatura ambiente durante 20 minutos, y luego se pasaron a hielo.



Una vez insertados los fragmentos en el vector se transformaron bacterias E. Coli químicamente competentes (genotipo DH5α-T1). Para esto a 34 ul de bacterias se le agregó 20 ng del vector con el inserto, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y luego se colocó 30 segundos en un baño a 42°C, para permeabilizar las bacterias, e inmediatamente después se puso en hielo y a cada tubo se le agregó 200 ul de medio SOC. Una vez colocado el medio a las bacterias, se incubaron 1 hora a 37°C en un Shaker a 180 rpm para asegurar una buena transformación. Se prepararon placas de cultivo con medio sólido que contenían cada una 0.3g de NaCl, 0.3g de Tripteína, 0.15g de Extracto de Levadura, 0.45g de Agar-Agar, 3mg de ampicilina y 1,2mg de kanamicina en un volumen final de agua destilada de 30ml. Una vez que se solidificaron se agregó a cada placa 70 ul de Xgal. Se agregó 30 ul y 60 ul de las bacterias transformadas para cada línea en distintas placas. Se incubaron luego las placas a 37°C durante 24 horas. El paso siguiente fue seleccionar aquellos clones que fueron transformados. Para esto el vector le confiere a la bacteria resistencia a los antibióticos ampicilina y kanamicina y además posee en el sitio de

clonado el gen LacZ, éste gen codifica una enzima (β -galactosidasa) que degrada los β -galactósidos como el X-gal dando un precipitado de color azul. Los vectores que insertaron algún fragmento interrumpían dicho gen y las colonias no podían degradar el sustrato X-gal por lo que quedaron blancas y pudieron ser fácilmente detectadas de las azules que no insertaron ningún fragmento. Se eligieron 6 colonias blancas de cada línea celular cuidando que estuvieran bien aisladas, y se las repicó a cada una en 6ml de medio líquido compuesto por 0.06g de NaCl, 0.06g de Tripteína, 0.03g de Extracto de Levadura, 600 ug de ampicilina y 240 ug de kanamicina. Incunbando a 37°C por 24 horas en un shaker a 180 rpm.

Purificación de ADN

Una vez obtenido un crecimiento abundante de las bacterias, se purificaron utilizando el kit QIAprep Spin (Qiagen-Cat. 27990) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para confirmar la purificación, se sembraron 5ul en un gel de agarosa al 1,2% y se observó que todos los tubos tenían el plásmido puro. La contaminación con proteínas se analizó por absorbancia a 260 nm (DNA) y 280 nm (proteínas) dando en promedio una relación de absorbancia 260/280 superior a 1,8 indicando una baja contaminación con proteínas. Para la cuantificación del DNA se utilizó la relación: 1 densidad óptica (DO_{260nm}) = 50 ug/ml de DNA.

Análisis con enzimas de restricción

Se cortaron 2 ug de cada clon, con 4 unidades la enzima Eco-RI (Invitrogen, cat. 15202-013) y 4ul de Buffer. Dejando incubar las muestras a 37°C por una hora. Para la enzima Eco-RV (New England Biolabs, cat.R0195S) se utilizó 2 ug de cada clon y 6 unidades de enzima, con 5 ul de buffer específico. Las muestras fueron incubadas a 37°C por 2 horas.

Secuenciación

Los clones fueron secuenciados en un laboratorio de referencia (Macrogen Inc, Corea del Sur), en ambas cadenas utilizando los primers universales T7-forward (5'CCCTATAGTGAGTCGTATTA3') y M13-reverse (5'CAGGAAACAGCTATGAC3'). Los resultados de las secuencias fueron analizados utilizando el software OMIGA (Oxford Molecular) comparando con la secuencia “wild type” de la base de datos: <http://www.gdb.org> código de acceso AFOO1461.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis N. Koritschoner por trasmitirme todo su conocimiento y haberme orientado y guiado cada vez que fue necesario. Por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis y abrirme el camino para que pueda continuar en esto.

A su grupo de trabajo D. D' Astolfo y R. Gehrau por colaborar en mi formación. Y a todos los integrantes del laboratorio que de una u otra forma me supieron ayudar.

A M. Dankert por iniciarme en este fantástico mundo de la investigación y a J. L. Daniotti, sin él no hubiese tenido la suerte de conocer a mi director.

A Petr Bartunek por la provisión de valiosos reactivos. Agradezco el apoyo recibido a través del estipendio asociado a la Beca Ramón Carrillo-Arturo Oñativia-Ministerio de Salud de la Nación. Este trabajo fue realizado mediante el aporte de Fundación Antorchas (Subsidio N° 14022-10 otorgado a N. Koritschoner).

REFERENCIAS

- Brennan, P. J., Kumogai, T., Berezov, A., Murali, R. and Greene, M., (2000) *Oncogene* 19, 6093-6101.
- Chen, C., Hyytinen, E-R., Sun, X., Helin, H., Koivisto, P., Frierson H., Vessella, R. and Dong J. (2003) *A. j. of Pathology* 162, 13491354.
- El Rouby S, Newcomb EW.. (1996) *Oncogene* 12: 2623-2630.
- Donehoewr, L. A. et al. (1992). *Nature* 365, 215-221
- Dumur, C., Koritschoner, N., Flury, A., Panzetta-Dutari, G., Bocco, J. and Patrito, L. (1998) *Biol. Reprod.* 59, 621-625.
- Dumur, C., Almenara, J., Durand, S., Flury, A., Koritschoner, N. and Patrito L. (2001) *Int. J. Oncol.* 19: 1161-1167.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1989). *Cell* 57, 1083-1093.
- Inuzuka H, Wakao H, Masuho Y, Muramatsu M, Tojo H, Nanbu-Wakao R..(1999) *Biochim Biophys Acta.* 1447:199-207
- Harari, D. and Yarden, Y. (2000) *Oncogene* 19, 6102-6114.
- Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P. and Marshall, C. J. (1992). *Cell* 71, 335-342
- Kim Y, Ratzu V, Choi S-G, Lalazar A, Theiss G, Dang Q, Kim S-J, Friedman SL.. (1998) *J Biol Chem*; 273: 33750-33758.
- Kojima, S., Hayashi, S., Shimokado K., Suzuki, Y., Shimada, J., Crippa, M., and Friedman, S:L. (2000) *Blood* 95, 1309-16.
- Koritschoner N, Panzetta-Dutari GM, Bocco JL, Dumur CI, Flury A, Patrito LC. (1996) *Eur J Biochem*; 236: 365-372.
- Koritschoner N, Bocco JL, Panzetta-Dutari GM, Dumur CI, Flury A, Patrito LC. (1997) *J Biol Chem*; 272: 9573-9580.
- Koritschoner, N., Bartunek, P., Knospel, S., Blendinger, G. and Zenke, M. (1999). *Oncogene* . 18:5904-14.
- Koritschoner, N., Madruga. J., Knospel, S., Blendinger, G., Anzinger, B., Zenke, M. and Bartunek, P. (2001a) *Cell Growth Differ.* 12:563-572.

- Koritschoner, N., Alvarez-Dolado, M., Kurz, S. Heikenwalder, M., Hacker, C., Vogel, F., Muñoz, A. and Zenke, M. (2001b) *EMBO Rep.* 2: 499-504.
- Kremer, J.P., Reisbach, G., Nerl, C. and Dormer, P. (1992) *Br. J. Haematol.* 80, 480-487.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., Massy, M., Bernier, M, Stryckmans, P. (1997) *Br. J. Haematol.* 97, 612-620.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Bernier, M, Stryckmans, P. and Bron, D. (1998) *Leuk. Lymphoma* 31, 99-106.
- Levine, A.J., Momand, J., and Finlay, C. A. (1991) *Nature* 351, 453-456
- Levine, A. J. (1997). *Cell* 88, 323-331
- Lyakhov, D.L., He, B., Zhang, X., Studier, F.W., Dunn, J.J.,and McAllister, W.T. (1998) *J. Mol. Biol.* 280: 201-213.
- Madruga, J., Koritschoner, N., Diebold, S. Kurz, S and Zenke, M. (1999). *J. Cell Sci.* 112, 1685-96
- Marshall, C. J. (1991). *Cell* 64, 313-326.
- Meyerson, M. et al (1997). *Cell* 90, 785-795
- Muhlbauer, K-R., Grone, H-J., Ernst, T., Grone, E., Tschada, R., Hergenbahn, M., Hollstein M. (2003) *Br. J. Cancer.* 89, 687-690
- Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL. (2001) *Science.* 294: 2563-2566.
- Prieto, C; Bocco, JL. and Koritschoner N.P. (2001) *Manuscrito en preparación.*
- Ratziu V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, Jensen S, Friedman SL. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA;* 16: 9500-9505.
- Reeves H., Narla G., Ogunbiyi O., Haq A., Katz A., Benzeno S., Hod E., Harpaz N., Goldberg S., Tal-Kremer S., Eng F., Arthur J.P., Martignetti J., and Scott L. Friedman (2004) *Gastroenterology* 126, 1090-1103.
- Seto, E. Et al. (1992).*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89, 12028-12032
- Slamon, D.J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987) *Science* 235, 177-182
- Slavin, D.; Sapin, V., Lopez-Diaz, F., Jacquemin, P., Koritschoner, N.P., Dastugué, B., Davidson, I.; Chatton, B.; and Bocco, J.L. (1999). *Biol. Reprod.* 61, 1586-91.
- Slavin, D, Koritschoner, N.P., and Bocco, J.L. (2002). *Manuscrito en preparación.*

Suzuki T, Yamamoto T, Kurabayashi M, Nagai R, Yazaki Y, Horikoshi M. (1998) *J Biochem (Tokyo)*; 2: 389-395.

Turner J, Crossley M. (1999) *Trends Biochem Sci* 24:236-40

Yu, D. and Hung, M. (2000) *Oncogene* 19, 6115-6121.

Vax, V., Gueorguiev, M., Dedov, I., Grossman A., korbonits, M., (2003)
Endocrine-Related Cancer 10,397-402.

Línea MCF-7 (Lab. 1) 1°	Sustitución de Nucleótido	Cambio en la proteína
Clon 1	664 A C 346 T C	T 212 P S 106 P
Clon 3	664 A C 394 A G	T 212 P T 122 A
Clon 5	664 A C 268 A G	T 212 P L 80 E
Clon 6	664 A C 394 A G	T 212 P T 122 A
Clon 2-4 : wt		

Tablas 1-4

Lab1, Lab2-origen de las líneas.

1°-

RT-MMLV^{Stratagene}

PCR^{Taq polimerasa}

2°-

RT-MMLV^{Promega}

PCR^{DNA pol High fidelity}

Línea MCF-7 (Lab. 1) 2°	Sustitución de Nucleótido	Cambio en la proteína
Clon 2	664 A C 268 A G	T 212 P L 80 E
Clon 4	664 A C 346 T C	T 212 P S 106 P
Clon 5	664 A C 346 T C	T 212 P S 106 P
Clon 6	664 A C 394 A G	T 212 P T 122 A
Clon 1-3 : wt		

Línea MCF-7 (Lab. 2) 1°	Sustitución de Nucleótido	Cambio en la proteína
Clon 2	664 A C 268 A G	T 212 P L 80 E
Clon 3	664 A C 268 A G	T 212 P L 80 E
Clon 5	664 A C 346 T C	T 212 P S 106 P
Clon 6	664 A C 394 A G	T 212 P T 122 A
Clon 1-4 : wt		

Línea MCF-7 (Lab. 2) 2°	Sustitución de Nucleótido	Cambio en la proteína
Clon 1	664 A C 268 A G	T 212 P L 80 E
Clon 2	664 A C 394 A G	T 212 P T 122 A
Clon 5	664 A C 268 A G	T 212 P L 80 E
Clon 6	664 A C 346 T C	T 212 P S 106 P
Clon 3-4 : wt		

Línea T-47-D (Lab. 1) 1°	Sustitución de Nucleótido	Cambio en la proteína
Clon 1	507 T C	S 159 S
Clon 4	507 T C	S 159 S
Clon 6	507 T C	S 159 S
Clon 2-3-5: wt		

Línea T-47-D (Lab. 2) 1°	Sustitución de Nucleótido	Cambio en la proteína
Clon 1	299 T C	L 90 P
Clon 3	299 T C	L 90 P
Clon 5	299 T C	L 90 P
Clon 2-4-6: wt		

Línea T-47-D (Lab. 1) 2°	Sustitución de Nucleótido	Cambio en la proteína
Clon 1	507 T C	S 159 S
Clon 2	507 T C	S 159 S
Clon 3	507 T C	S 159 S
Clon 5	507 T C	S 159 S
Clon 4-6: wt		

Línea T-47-D (Lab. 2) 2°	Sustitución de Nucleótido	Cambio en la proteína
Clon 3	299 T C	L 90 P
Clon 4	299 T C	L 90 P
Clon 1-2-5-6:wt		

Tablas 5-8

Lab1, Lab2-origen de las líneas.

1°-

RT-MMLV^{Stratagene}

PCR^{Taq polimerasa}

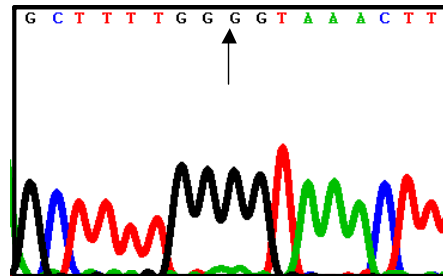
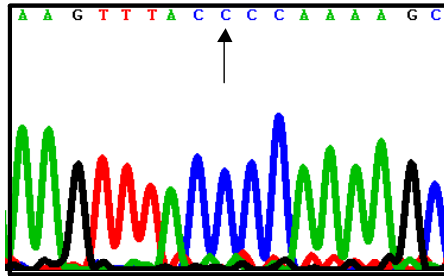
2°-

RT-MMLV^{Promega}

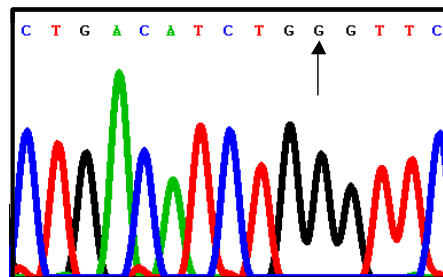
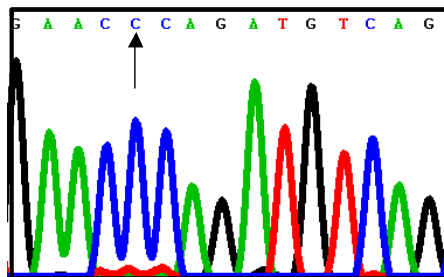
PCR^{DNA pol High fidelity}

MCF-7

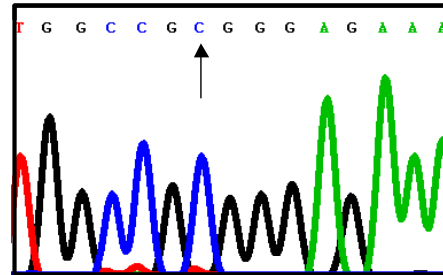
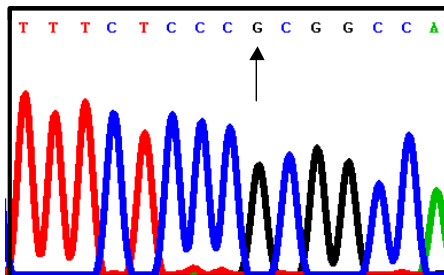
664 A→C T 212 P
TTACACCAA Thr(T) Treonina
TTAC**C**CAA Pro(P) Prolina



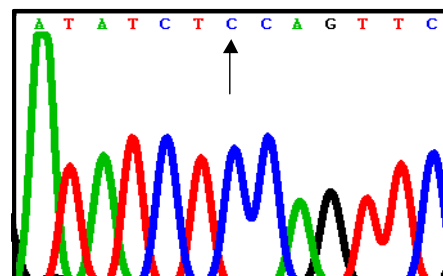
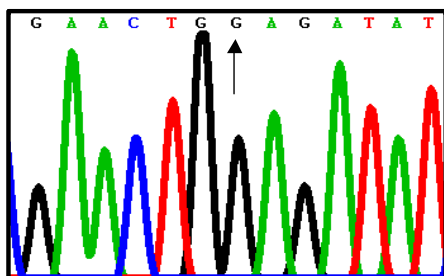
346 T→C S 106 P
GAACTCAGA Ser(S) Serina
GAA**C**CCAGA Pro (P) Prolina



394 A→G T 122 A
TCCCACGG Thr (T) Treonina
TCCC**G**CGG Ala (A) Alanina

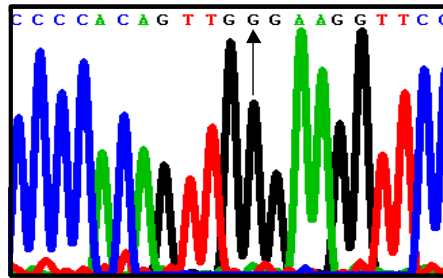
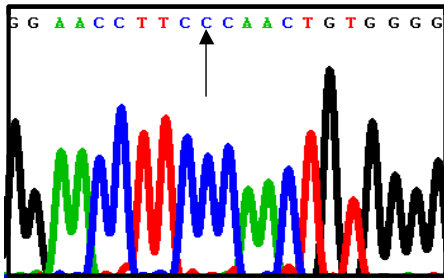


268 A→G L 80 E
GAACTGAAGA Lys (L) Lisina
GAACTG**G**AAGA Glu (E) Glutámico

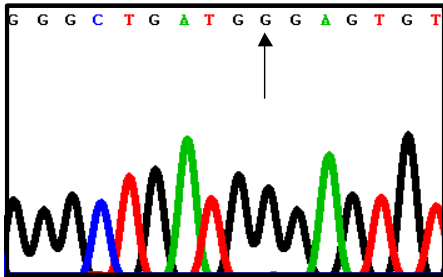
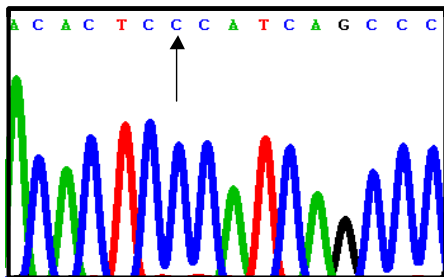


T-47D

507 T→C S 159 S
CTTCTCAA Ser(S) Serina
CTT**CC**CAA Ser(S) Serina



299 T→C L 90 P
A**C**TCTCATC Leu (L) Leucina
ACT**CC**CATC Pro (P) Prolina



Resumen de las variaciones alélicas encontradas para las líneas MCF-7 y T-47D, los gráficos corresponden a los electroferogramas de ambas cadenas secuenciadas, (Forward y Reverse).

Línea MDA-MB-435 (Lab. 1) 1°	Sustitución de Nucleótido	Cambio en la proteína
Clon 2	203 A G	D 58 G
Clon 4	319 T C	Y 97 H
Clon 5	180 T C	V 50 V
Clon 1-3-6 : wt		

Línea MDA-MB-435 (Lab. 1) 2°	Sustitución de Nucleótido	Cambio en la proteína
Clon 1	283 C A	P 85 T
Clon 4	467 C T	S 146 F
Clon 2-3-5-6 : wt		