

III. Regulación de la expresión génica del receptor de los linfocitos T en leucemia linfoblástica aguda humana

Vicente Madrid-Marina, Oscar Peralta Zaragoza, Jorge Olvera Salinas, Rocío Aguilar Gaytan, Miguel Ángel Meza Martínez

Departamento de Inmunopatología, Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Av. Universidad No. 655, Cuernavaca, Morelos, 62508, México

(Recibido, diciembre 15, 1992; aceptado, febrero 2, 1993)

Resumen

Los niveles de RNAm del receptor de antígenos de los linfocitos T (RcT) son regulados en respuesta a distintas señales de transducción en células linfoblásticas leucémicas humanas. La activación de la PKC por TPA aumenta los niveles de RNAm del RcT α y del RcT β ; mientras que el aumento de $[Ca^{++}]$; aumenta la expresión de los niveles de RNAm del RcT τ . Nuestros resultados sugieren que existen dos diferentes señales de transducción en la regulación de la expresión de los genes del RcT.

Palabras claves: Expresión génica-Linfocitos T-Leucemia linfoblástica

Summary

mRNA levels of the T cell antigen receptor (TcR) are regulated in response to different transduction signals in human lymphoblastic leukemia cells. PKC activation by TPA increases the mRNA levels of TcR α and TcR β . Whereas the increase of cytosolic calcium increases the expression of mRNA levels of TcR τ . Our results suggest that there are two different signals in the regulation on TcR gene expression.

Key words: Gene expression-T cells-Lymphoblastic leukemia

Introducción

Los estudios epidemiológicos recientes demuestran que las leucemias y los linfomas representan un importante problema de salud pública en México; el 43% de los tumores malignos en niños corresponden a leucemias y linfomas y el 17% en adultos, siendo la leucemia linfoblástica aguda (LLA) una de las más frecuentes¹. Las células LLA poseen un fenotipo inmaduro, están secuestradas en estadios tempranos de la diferenciación de los linfocitos, en su mayoría preservan un patrón de expresión génica y su fenotipo puede ser alterado por estímulos externos²⁻⁶.

Por otra parte, se han identificado dos isotipos del receptor de antígenos de los linfocitos T (RcT): 1) El RcT-gamma/delta, presente en pequeños porcentajes de linfocitos T periféricos y en células dendríticas, y 2) el RcT-alfa/beta, presente en la mayoría de los linfocitos T⁷⁻¹⁰. Los RcT aparecen en ese orden

durante el desarrollo ontogénico y forman complejos independientes con la molécula CD3. El RcT-gamma/delta se expresa en una población que carece de moléculas accesorias CD4, CD8¹¹⁻¹⁶. La expresión de los RcTs es regulada diferencialmente en el desarrollo y maduración de los linfocitos T durante los rearrreglos génicos. Tempranamente, la expresión del gamma-delta es abundante en el timo, disminuye con el desarrollo y, en adultos, se limita a una pequeña población de linfocitos T^{7,17,18}. Se considera que la determinación de las señales intracelulares que regulan la expresión génica durante la diferenciación intratímica facilitará el entendimiento de: a) la expresión diferencial del RcT, b) la selección clonal y c) los procesos de generación de leucemias^{19,20}.

Durante los rearrreglos de los RcT y de las Igs las células linfoides están sobreexpresadas en células

leucémicas (LLA). Esto debido a la participación de la maquinaria recombinante del R α T y de las Igs durante las translocaciones cromosómicas oncogénicas. En la leucemia de linfocitos T las transformaciones oncogénicas frecuentemente involucran translocaciones de los genes alfa/delta del R α T al locus 3' del oncogen C-myc, resultando en una regulación alterada del oncogen por los elementos potenciadores (enhancers) del R α T alfa/delta. Por lo tanto, nuestro objetivo es estudiar las señales y eventos intracelulares involucrados en la corregulación de la expresión génica de las cadenas del R α T.

Métodos y materiales

Las células de leucemia linfoblástica aguda (línea celular JURKAT) se mantuvieron en medio RPMI1640, con 10% de suero bovino fetal, 5% de CO₂, a 37°C, y a una densidad celular de 5.0x10⁶ cel/ml. La sonda de la región constante del R α T- τ es inserto BamHI-EcoRI del plásmido HG-Po6. El R α T α y β son insertos de los plásmidos C α HpaII y CB2 BglIII (obtenidas del laboratorio del Dr. T. Mak, Ontario Cancer Institute, Toronto).

Extracción de RNA y análisis por slot blot. El RNA se extrajo en isotiocianato de guanidinio de acuerdo a Chomczynsky y Sacchi²¹. Se cuantificó el RNA en un espectrofotómetro Beckman DU-40. Se fraccionaron 10 μ g de RNA por electroforesis desnaturante en gel de agarosa al 0.9% y formaldehído 0.66M, de acuerdo al método de Lehrach et al²², y se transfirieron a membranas de nylon, según procedimiento de Thomas²³; se secaron a temperatura ambiente y se hornearon al vacío a 80°C. Las membranas se prehibridaron durante toda la noche a 42°C en formamida al 50%, SSC 4X (1X SSC=0.15M de NaCl más 0.15M de citrato de sodio, pH 7.0), solución de Denhart 5X (1X de solución Denhart=200 μ g/ml de ficoll, 200 μ g/ml de polivinilpirrolidona y 200 μ g/ml de albúmina de suero bovino), fosfato de sodio 50 mM pH 6.5, duodecil sulfato de sodio (SDS) 1% y 200 μ g/ml de DNA de esperma desnaturado de arenque. La hibridación se realizó por 16 horas a 42°C, adicionando las sondas marcadas con dCTP (32-P-alfa). Posteriormente, las membranas se lavaron por 2 horas con 3 cambios de SSC 0.1X, NaPO₄ 50 mM, pH 6.5 y SDS 1.0%, a 68°C, y se expusieron a películas radiográficas a -70°C. La cantidad igual de RNA de las diferentes muestras experimentales se confirmó midiendo la densidad óptica.

Resultados

Análisis del slot blot del R α T-gamma en células Jurkat. Los eventos de transducción de señal y la generación de segundos mensajeros tienen un efecto directo en el nivel de expresión de los genes involucrados en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Estos eventos pueden ser mimetizados por una manipulación farmacológica adecuada, como el éster de forbol (TPA) que activa a la proteína cinasa C (PKC), y el ionóforo de calcio (ionomicina) que aumenta la [Ca⁺⁺]_i. Las células leucémicas Jurkat se incubaron en ausencia y presencia de TPA, ionomicina, la combinación de ambos, con fitohemaglutinina (PHA) y con interleucina-2 (IL-2). En estas células la expresión del R α T-gamma aumenta tanto con ionomicina como con TPA, así como en presencia de PHA, siendo el nivel de expresión del R α T-gamma más marcado con ionomicina y PHA (Fig. 1). Ambos agentes movilizan calcio intracelular, por lo que estos resultados sugieren que el nivel de expresión de RNAm del R α T-gamma es modulado por los niveles de [Ca⁺⁺]_i.

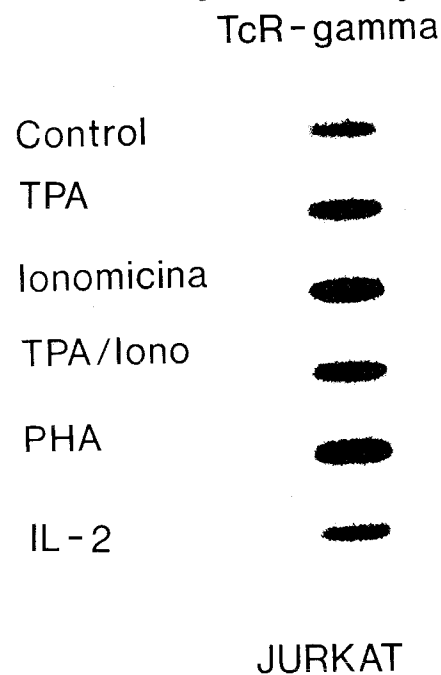


Fig. 1. Análisis del slot blot del R α T-gamma en células Jurkat. Las células leucémicas T Jurkat fueron incubadas en ausencia (línea 1) y en presencia de TPA (línea 2), ionomicina (línea 3), TPA/Ionomicina (línea 4), PHA (línea 5) e IL-2 (línea 6), a 37°C durante 4 horas en medio RPMI. El RNA total se extrajo y fue transferido a membranas de nylon como se describe en métodos.

Análisis por slot blot del R α T-gamma/beta en células Jurkat. Como ya se mencionó, la movilización de la [Ca⁺⁺]_i regula la expresión génica del R α T-alfa/beta. De tal manera que estudiamos la expresión de los genes que codifican para R α T-alfa/beta mediante

TPA, ionomicina e IL-2, en células de la línea Jurkat. La expresión del RNAm del RcT-alfa y beta aumenta en células tratadas con TPA, así como con el tratamiento simultáneo de TPA/Ionomicina. Sin embargo, la expresión del RNAm de estos genes no se ve afectada por el tratamiento con ionomicina. El tratamiento con PHA aumenta los niveles del RNAm del RcT-alfa/beta.

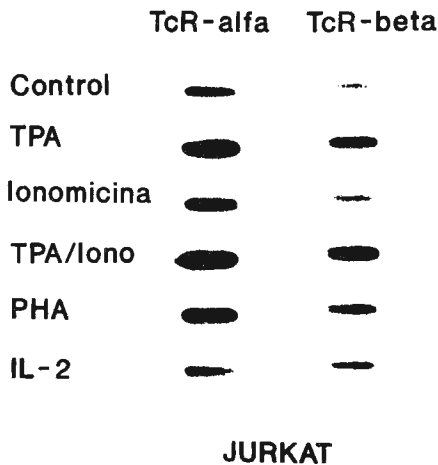


Fig. 2. Análisis por slot blot del RcT-alfa/beta en células Jurkat. Las células linfoblásticas Jurkat de estirpe T se incubaron en ausencia (carril 1) y en presencia de TPA (carril 2), ionomicina (carril 3), TPA/ionomicina (carril 4), PHA (carril 5), e IL-2 (carril 6). El RNA total se aisló como se describe en métodos. Diez microgramos de RNA por carril se transfirieron a membranas de nylon de acuerdo al método. Las membranas se hibridaron con la sonda apropiada como se indica. Las membranas se expusieron a autorradiografía por 72 horas.

Los niveles de RNAm de los RcTs alfa y beta aumentan por el éster de forbol TPA (Fig. 2), lo que sugiere que la activación de la PKC juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica del RcT alfa/beta.

Por otro lado, estos resultados demuestran que los moduladores de $[Ca^{++}]_i$, tales como ionomicina y PHA (Fig. 1), regulan los niveles del RNAm del RcT gamma; por lo tanto, estos hallazgos sugieren que el aumento de la concentración citoplásmica de calcio regula la expresión génica del RcT gamma.

Discusión

Los factores de crecimiento y de diferenciación regulan la expresión génica mediante la unión a receptores específicos en la superficie de las células, los que a su vez activan a la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol. Los productos son el diacilglicerol y el inositol 1,4,5 trifosfato, que, respectivamente, activan PKC y movilizan calcio de reservorios intracelulares²⁴. Estas señales actúan sinérgicamente

regulando la expresión génica²⁵. En otros casos, la activación de PKC y el aumento de $[Ca^{++}]_i$ actúan en forma independiente como señales intracelulares. Nuestros resultados muestran un efecto antagonista en la regulación de la expresión génica del RcT-gamma por la acción de TPA y ionomicina en las células Jurkat, lo cual enfatiza la independencia de las señales de transducción. Esta interacción poco usual entre la activación de PKC y el aumento de $[Ca^{++}]_i$ es característica de los linfocitos T inmaduros o, alternativamente, es específica para la regulación de la expresión génica de los RcTs. Nuestros datos apoyan la hipótesis de que los efectos distintos, de activación de PKC y aumento de $[Ca^{++}]_i$, son específicos en la regulación de la expresión de los RcTs.

En este trabajo nos planteamos la hipótesis de que los linfocitos T inmaduros en el timo son las células que responden a estas señales de transducción, iniciadas por TPA y los moduladores de $[Ca^{++}]_i$, durante la diferenciación de los linfocitos T, y el estudio se llevó a cabo en la línea celular Jurkat, que son células de leucemia linfoblástica aguda, que se encuentran detenidas en estadios tempranos de la diferenciación. Los resultados descritos son consistentes con esta hipótesis y, por lo tanto, consideramos que la subpoblación blanco de linfocitos T que responden a la regulación de la expresión de los RcTs producida por la activación de PKC y aumento del $[Ca^{++}]_i$ son los linfocitos T inmaduros.

Los linfocitos T τ/δ maduros responden a antígenos de micobacterias. Estos pueden ser estimulados con el PPD de *Mycobacterium tuberculosis* que contiene la proteína de choque térmico desnaturada de 65 kD (HSP65) y con la HSP65 purificada. Recientemente, se emplearon péptidos pequeños, que corresponden a diferentes porciones de la HSP65 de micobacteria, para identificar el epítipo antigénico de los linfocitos T gamma/delta. El epítipo estimulador se superpone con el reconocido por clones de linfocitos T alfa/beta artrtrigénicos²⁶. Estos hallazgos sugieren que los linfocitos T gamma/delta tienen un papel en las enfermedades autoinmunes e implica que estas células reconocen a sus ligandos por mecanismos similares a los linfocitos T alfa/beta; esto es, en forma de pequeños fragmentos de proteínas unidos a moléculas de la superficie de las células presentadoras de antígenos. De esta manera, la determinación de señales intracelulares que controlan la expresión génica del RcT- α/β y del RcT γ/τ durante la diferenciación intratímica ayudará al entendimiento de la expresión diferencial de los heterodímeros, de la selección clonal y, quizá, de la patogenia de las

enfermedades autoinmunes sistémicas y de las enfermedades leucémicas.

En conclusión, podemos señalar que existen eventos celulares distintos en la regulación de la expresión génica de los distintos isotipos del receptor de los linfocitos T. Mientras las señales generadas a través de la activación de la PKC regulan la expresión del R α T alfa/beta, las señales que aumentan los niveles de calcio regulan la expresión del R γ T gamma.

Nuestros hallazgos justifican el estudio de la regulación transcripcional de los genes del R α T y de

los proto-oncogenes involucrados en estas entidades patológicas. También, nos permitirán regular exógenamente la expresión de estos genes mediante fármacos o bien con péptidos generados con tecnología de DNA recombinante y brindar una mejor oportunidad terapéutica a pacientes con estas enfermedades. Finalmente, se considera que estos resultados contribuirán a un mejor entendimiento de los eventos celulares y moleculares que participan durante la diferenciación de los linfocitos; así como para entender el proceso de generación de leucemias humanas.

Referencias

1. Registro Nacional del Cancer. Dirección General de Epidemiología, SSA, México, 1986.
2. Colema SV, Hutton JJ. En *Methods in Haematology. Assembly and expression of variable-region genes.* *Annu Rev Immunol* 1986;4:339.
3. Reinherz E, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF. Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Nat Acad Sci USA* 1980;77:1588-92.
4. Nagasawa K, Chechick BE, Gelfand EW, Sengupta S, Letarte M, Mak TW. Modulation of human T-cell differentiation markers by 12-0-tetradecanoyl phorbol acetate. *Thymus* 1981;3:307-18.
5. Delia D, Greaves MF, Newman RA, Sutherland DR, Minowada J, Kung P, Goldstein G. Modulation of T leukaemic cell phenotypes with phorbol ester. *Int J Cancer* 1982;29:23-31.
6. Okamura J, Gelfand EW, Letarte M. Response of non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cells by phorbol ester. *Cancer Res* 1984;44:1246-51.
7. Madrid-Marina V, Martínez-Valdez H, Cohen A. Phorbol ester induced changes in adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase, and terminal deoxynucleotidyl transferase mRNA levels in human leukemic cells. *Cancer Res* 1990;50:2891-4.
8. Martínez-Valdez H, Takihara Y, Champagne E, Minden M, Mak TW, Cohen A. Differential regulation of τ/δ T cell receptor gene expression by phorbol esters and Ca^{++} -ionophores in the lymphoblastic leukemia cell line DND41. Enviado a publicación, 1993.
9. Meuer SL, Acuto O, Hercent T, Schlossman SF, Reinherz EL. *Ann Rev Immunol*, 1984;2:23-50.
10. Brenner MB, McLean J, Dyalinas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, Seidman SG, Ip S, Rosen F, Krangel MS. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 1986;322:145-9.
11. Stingl G, Gunter KC, Tschanchler E, Yamada H, Lechler RI, Yokoyama WM, Steiner G, Germin RN, Shevach EM. Thy-1⁺ dendritic epidermal cells belong to the T-cell lineage *Proc Nat Acad Sci USA* 1987;84:2430-4.
12. Strominger JL. Developmental biology of T cell receptor. *Science* 1989;244:943-50.
13. Kuziel WA. Regulation of T-cell receptor τ -chain RNA expression in murine Thy-1⁺ dendritic epidermal cells. *Nature* 1987;328:263-6.
14. Kisielow P, Leiserson W, von Boehmer H. Differentiation of thymocytes in fetal organ culture: Analysis of phenotypic changes accompanying the appearance of cytolytic and IL 2-producing cells. *J Immunol* 1984;133:1117-23.
15. Fowlkes BJ, Edison L, Mathieson BJ, Chused TM. Early T lymphocytes. Differentiation in vivo of adult intrathymic precursor cells. *J Exp Med* 1985;162:802-22.
16. Scollay R, Shortman K. Identification of early stages of T lymphocytes development in the thymus cortex and medulla. *J Immunol* 1985;134:3632-42.
17. Raulet DH, Garman RD, Saito H, Tonegawa S. Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 1985;314:103-7.
18. Snodgras HR, Dembic Z, Steinmetz M, von Boehmer H. Expression of T-cell antigen receptor genes during fetal development in the thymus. *Nature* 1985;315:232-3.
19. Martínez-Valdez H, Thompson E, Cohen A. Phorbol esters and calcium ionophores differentially regulate the transcription of τ -T-cell antigen receptor gene in human thymocytes. *J Biol Chem* 1988;263:4043-6.

20. Martínez-Valdez H, Thompson E, Cohen A. Coordinate transcriptional regulation of α and β chains of the T-cell antigen receptors by phorbol esters and cyclic-AMP in human thymocytes. *J Biol Chem* 1988;263:9561-4.
21. Chomczynsky P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-60.
22. Lehrch J, Diamond D, Wosney J, Boedtke H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions. A critical examination. *Biochem* 1977;16:4763.
23. Thomas P. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5201.
24. Imboden JD, Shoback DM, Pattison G, Stobo JD. Cholera toxin inhibits the T-cell antigen receptor mediated increases in inositol triphosphate and the cytosolic free Ca^{++} . *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;85:6900.
25. Rozengurt E. Early signals in the mitogenic response. *Science* 1986;234:161-6.
26. Born W, Hall L, Dallas A, Boymel J, Shinnick T, Young D, Brennan P, O'Brien R. Recognition of a peptide antigen by heat shock-reactive τ/δ T lymphocytes. *Science*, 1990;249:67-9.