

LA SOBREEXPRESION DE RAC3 ES UNA SEÑAL TRANSFORMANTE Y PROLIFERATIVA QUE CONTRIBUYE AL DESARROLLO TUMORAL

CECILIA V. ALVARADO^{1*}, SABRINA MICENMACHER^{1*}, MARINA RUIZ GRECCO¹, MARIA F. RUBIO¹,
NICOLAS FERNANDEZ LARROSA¹, MONICA A. COSTAS^{1,2}

¹Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires e IDIM-CONICET, Buenos Aires, ²Investigador Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Buenos Aires

*Ambos autores comparten primera autoría

Resumen RAC3 fue caracterizado originalmente como un coactivador de receptores nucleares que se encuentra en cantidades limitantes en células normales, aunque sobreexpresado en tumores y es además coactivador de NF- κ B. Si bien se desconocen los mecanismos involucrados en el aumento de su expresión, se sabe que induce resistencia a apoptosis. En este trabajo se investigó si RAC3 podría contribuir al desarrollo tumoral por otros mecanismos y si la citoquina TNF- α , que se encuentra en alto título en pacientes con cáncer, podría favorecer el aumento en la expresión de RAC3. Se observó que el aumento en la expresión de coactivador por transfección de células no tumorales de riñón embrionario humano HEK293 no solo aumenta significativamente la proliferación en presencia de suero, sino además en ausencia de factores de crecimiento. También se indujo la transformación celular dando un fenotipo con crecimiento independiente de anclaje similar a lo observado para células tumorales. El tratamiento de las células HEK293 en cultivo con TNF- α indujo un aumento en los niveles proteicos de RAC3 respecto de las células sin estímulo y este efecto fue inhibido por pretratamiento con un inhibidor específico de la activación de NF- κ B, indicando que la activación de este factor de transcripción está involucrada en la acción de la citoquina. Se concluye que RAC3, además de su acción anti-apoptótica, es un factor transformante que promueve la proliferación y el crecimiento independiente de anclaje, cuyos niveles podrían ser aumentados en la tumorigénesis, probablemente vía las citoquinas inflamatorias involucradas en la respuesta anti-tumoral.

Palabras clave: coactivadores de receptores nucleares, RAC3, desarrollo tumoral, apoptosis, transformación

Abstract *RAC3 overexpression is a transforming and proliferative signal that contributes to tumoral development.* RAC3 has been firstly characterized as a nuclear receptor coactivator that is found in limited amounts in normal cells, but is over-expressed in tumors and is also an NF- κ B coactivator. Although the mechanisms involved in its over-expression are not clear, it is well known that it enhances resistance to apoptosis. In this work, we investigated if there are any additional mechanisms by which RAC3 may contribute to tumor development and if TNF- α , an inflammatory cytokine that is found at high levels in cancer could increase RAC3 levels. We found that enhancement of RAC3 levels by transfection of HEK293 cells with a RAC3 expression vector induces a significant increase of cell proliferation not only in the presence, but also in the absence of serum growth factors. Moreover, the cells were transformed showing an anchorage independent growth, similar to that observed in tumoral cells. The treatment of HEK293 cells with TNF- α induced an increase in the protein levels of RAC3 and this was blocked by an NF- κ B specific inhibitor, suggesting that this transcription factor is involved in the cytokine effect. We conclude that RAC3, in addition to its anti-apoptotic action, is a transforming factor that promotes the proliferation and growth independent of anchorage, and that its levels could be elevated by the action of inflammatory cytokines that are involved in the anti-tumoral response.

Key words: nuclear receptor coactivators, NF- κ B, transcription factors, tumor development, RAC3

Además de diversos procesos fisiológicos que controlan el desarrollo tumoral, existen mecanismos moleculares

por los cuales se determina el destino de una célula. Estos mecanismos permiten la proliferación de las células que el organismo detecta como sanas o normales o bien, ante daños genómicos que no pudieron ser reparados y el riesgo de expansión de estos errores, las células son eliminadas por apoptosis o entran en estado de senescencia replicativa. El correcto funcionamiento de estos mecanismos es el que garantiza el estado de salud del individuo.

Recibido: 16-VII-2010

Aceptado: 5-X-2010

Dirección postal: Dra. Mónica A. Costas, Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, IDIM-CONICET, Combattente de Malvinas 3150, Cuerpo II, Piso 1, 1427, Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4523-8947 e-mail: mcostas@lanari.fmed.uba.ar

Si bien la falla en uno de estos procesos no es condición suficiente para el desarrollo de un tumor, es sabido que una proliferación aumentada o sin control, puede aumentar el número de mutaciones en los sucesivos ciclos, llevando a la expansión de clones resistentes a apoptosis o incapaces de entrar en senescencia y que más tarde podrán adquirir nuevas mutaciones generando además la capacidad de irrigarse, invadir, migrar y colonizar otros tejidos.

RAC3 (*Receptor Associated Coactivator 3*) es una molécula de 160 KDa que pertenece a la familia de coactivadores de receptores nucleares conocida como p160¹. Originalmente fue descrita por su capacidad de asociarse a receptores de hormonas esteroideas, tales como el receptor de estrógenos (ER) aumentando su actividad en el control de la expresión de genes blanco de la hormona, como la Ciclina D1². El aumento en la respuesta a esteroides puede llevar a un aumento en la proliferación celular.

Posteriormente se demostró que esta molécula se encontraba en altos niveles en tumores de mama y ovario, aumentando la respuesta a estrógenos y progestágenos². En el año 2000, nuestro grupo demostró que RAC3 es además un coactivador del factor de transcripción activado por citoquinas el NF- κ B, el cual, además de su rol en sistema inmune, contribuye a la proliferación celular y tiene un rol protector de apoptosis³.

No tardó en investigarse si RAC3 podría estar elevado en otros tipos de tumores, contribuyendo a su evolución a través de mecanismos hormono-independientes. Así fue que se lo encontró elevado en tumores hepáticos y gástricos^{4,5}. Mas aún, nuestro grupo demostró que niveles aumentados de RAC3 podían contribuir a la proliferación de células de tumor de mama ER positivas por mecanismos dependientes de NF- κ B⁶.

Posteriormente investigamos si, además de la proliferación, niveles aumentados de RAC3 podrían contribuir al desarrollo tumoral aumentando la resistencia a apoptosis. Demostramos que esta hipótesis era correcta en distintas líneas celulares^{7,8} incluyendo células leucémicas y, además, que esta condición podía revertirse inhibiendo la expresión génica de RAC3, aumentando en consecuencia la respuesta a drogas quimioterapéuticas⁹.

De acuerdo con trabajos publicados en los últimos años respecto de esta molécula, existe un consenso en su denominación de oncogén⁴. Sin embargo, aún no han sido esclarecidos qué mecanismos controlan los niveles de RAC3, dado que su aumento no siempre se debe a una amplificación génica y tampoco se sabe en qué etapa del desarrollo de un tumor se produce este cambio.

Por esta razón, en este trabajo se investigó si el aumento en los niveles de RAC3 tiene un rol transformante y puede contribuir a un aumento de la tasa proliferativa en células no dependientes de hormonas esteroideas.

Dado que aún se desconoce qué mecanismos están involucrados en el control de sus niveles de expresión y que en general no se trata de amplificación génica, también se investigó si una citoquina inflamatoria, capaz de activar a NF- κ B, podría participar en el aumento de los niveles de expresión de RAC3.

Para estos estudios se trabajó con la línea celular HEK293, que corresponde a células no tumorales de riñón embrionario humano. De acuerdo con estudios previos del grupo y como ocurre en todas las células normales del organismo, los niveles de expresión de RAC3 son casi indetectables en esta línea.

Con el objeto de analizar el efecto de altos niveles de expresión de RAC3 respecto de una expresión normal, las células fueron transfectadas con un vector de expresión de la proteína RAC3, que lleva el ADN copia de esta molécula bajo el control de un promotor de expresión constitutiva. Dado que el vector también expresa un gen de resistencia a antibiótico eucariota (G418), se seleccionaron clones estables con distintos niveles de expresión de RAC3 (Fig. 1A). Se estudió la proliferación de estos clones y de las células tipo salvaje en distintas condiciones de cultivo: con niveles normales de suero fetal bovino (10%) que aporta los factores de crecimiento o bien, con solo un 0.1%. Como se observa en la Fig. 1B, en condiciones óptimas de cultivo todas las células proliferaron en el transcurso de los días, aunque la tasa más alta a 72 y 96 h corresponde al clon de máxima expresión de RAC3.

Cuando estos ensayos se hicieron en condiciones subóptimas de cultivo, como era de esperar, las células tipo salvaje fueron incapaces de proliferar. Sin embargo, los clones sobreexpresando RAC3 fueron capaces no solo de sobrevivir sino de crecer en ausencia de un adecuado suministro de factores de crecimiento (Fig. 1B).

En consecuencia, la sola sobreexpresión de este coactivador es una señal suficiente para aumentar la respuesta proliferativa de células en las que no se ha efectuado ninguna otra modificación o se haya alterado la expresión de otro oncogén y que inicialmente eran no tumorales.

Si bien estos resultados ya sustentan la idea de que RAC3 podría ser un factor transformante, también analizamos si estas células que normalmente crecen formando una monocapa y son incapaces de crecer independientes de anclaje, podían adquirir nuevas propiedades por la sobreexpresión de RAC3.

Se analizó entonces la capacidad de formar colonias en *soft* agar de las células tipo salvaje, así como de los clones con distintos niveles de expresión de RAC3.

Luego de 30 días de cultivo, las placas fueron observadas al microscopio y las colonias cuantificadas. La Fig. 1C muestra un campo representativo de células tipo salvaje, otro del clon L con máximo nivel de expresión de RAC3 y un control positivo que corresponde a células de

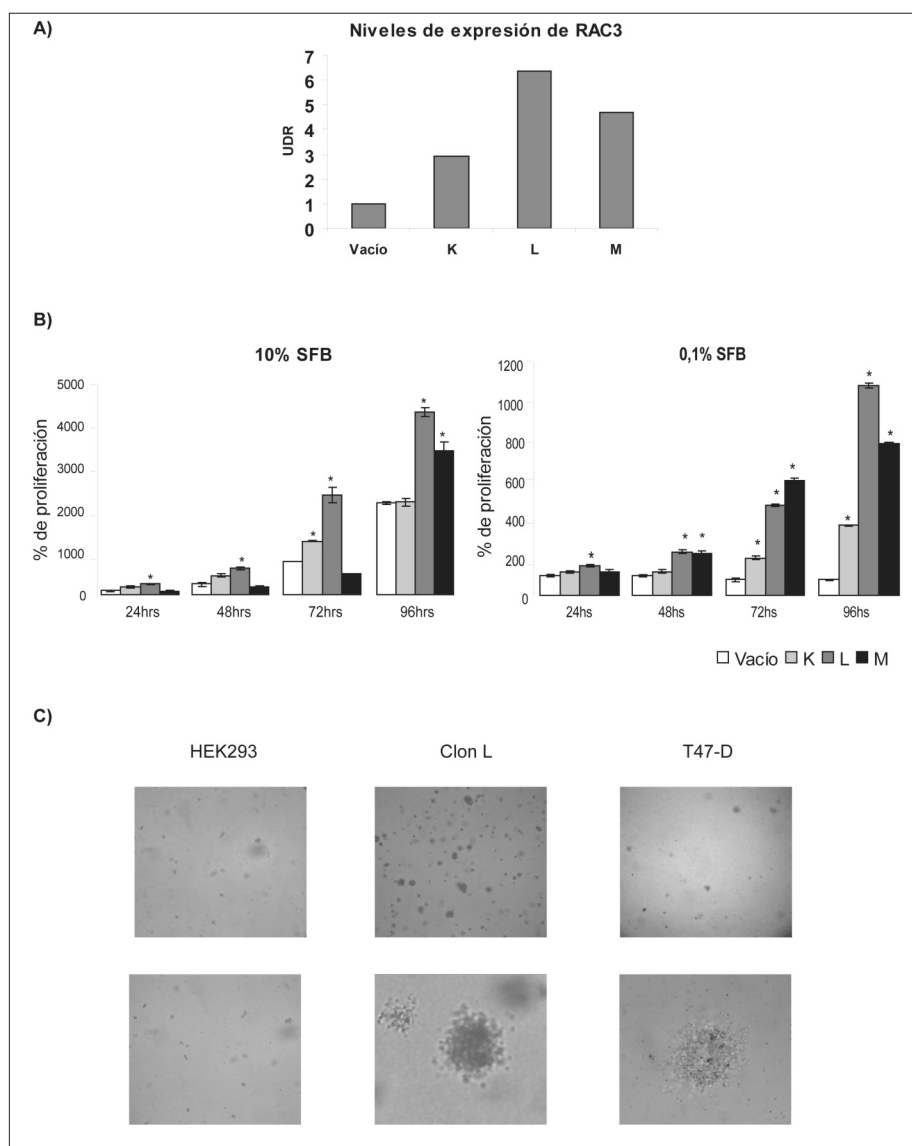


Fig. 1.- Rol proliferativo y transformante de RAC3. A) El diagrama de barras muestra la diferencia en los niveles de expresión de RAC3 entre los clones seleccionados y las células tipo salvaje. Las UDR (unidades densitométricas relativas) fueron calculadas como el cociente entre la lectura densitométrica (programa ImageJ) de las bandas de RAC3 y Tubulina observadas en Western blot de extractos proteicos de células tipo salvaje y clones con distintos niveles de expresión de RAC3 seleccionados post transfección estable (resistencia a G418). B) Ensayo de proliferación de células HEK293 tipo salvaje y clones sobreexpresando distintos niveles de RAC3 crecidas en medio DMEM 10 o 0.1% de suero fetal bovino. La supervivencia celular se determinó por tinción de las monocapas con cristal violeta y lectura de absorbancia a 570 nm. El diagrama de barras corresponde a la media de cuatro valores \pm DS expresado como porcentaje de proliferación respecto del tiempo cero de cultivo., * $p < 0.001$ respecto del crecimiento de células tipo salvaje en el período respectivo. El tiempo de duplicación para cada tipo celular fue: WT: 22 ± 2 h, K: 12.25 ± 1 h, L: 8.97 ± 1 h y M: 22 ± 2 hs B) Imágenes correspondientes a las colonias formadas en soft agar. Panel superior: campo abarcando varias colonias. Panel inferior: visualización de una colonia para el clon L y las células tumorales control positivo.

tumor mamario humano T47D, que sobreexpresa RAC3 y cuya capacidad de crecer en *soft* agar es conocida. De acuerdo con nuestras observaciones, la sobreexpresión de RAC3 fue capaz de inducir la transformación celular hacia un perfil con características tumorales, dando lugar a la formación de colonias en los 3 clones estudiados similar a lo observado en las placas control positivo, no

observándose diferencias significativas entre clones, y ninguna colonia en las células tipo salvaje.

De estos resultados puede concluirse que la sobreexpresión de RAC3 es una señal transformante.

Si bien la sobreexpresión de RAC3 acompaña a un gran número de tumores y de distintos orígenes y nuestros resultados previos y actuales sugieren que ese aumento

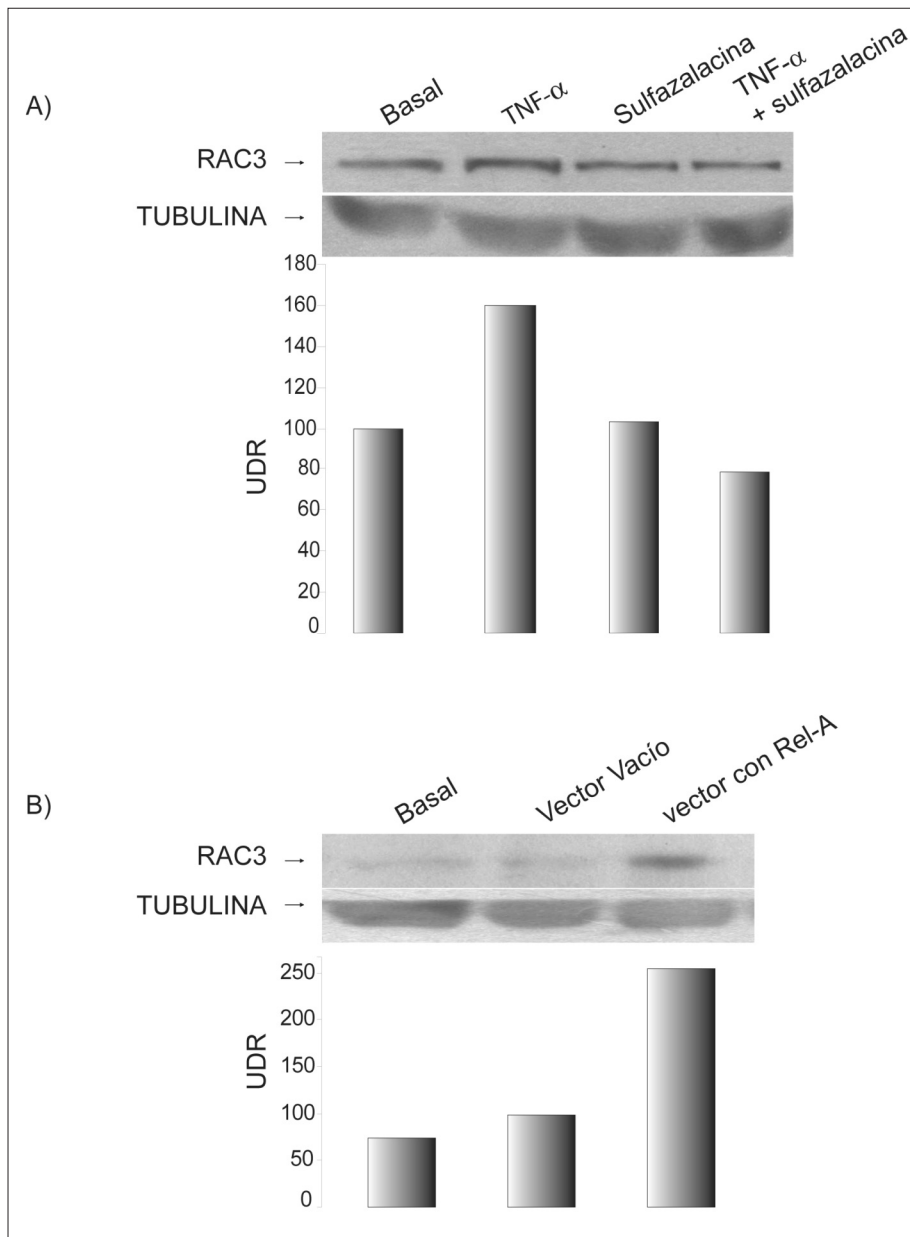


Fig. 2.- Control de la expresión de RAC3. A.) Panel superior: Western blot de extractos proteicos de células HEK293, revelado con anticuerpos para la detección de RAC3 y Tubulina (Santa Cruz, USA). Estimulación de células HEK293 con TNF- α 20ng/ml en ausencia o presencia de sulfazalacina 250 μ M por 24 h. Panel inferior: el diagrama de barras corresponde a las UDR de la lectura de RAC3 relativa a los valores de Tubulina (control de expresión constitutiva). Los resultados corresponden a un experimento representativo de 5 realizados en los cuales: B) Panel superior: Western blot para detección de RAC3 y Tubulina en extractos de células HEK293 sin transfectar o luego de transfectadas por 24 h con vector vacío o con vector llevando el ADNc para expresión de Rel-A. Panel inferior: el diagrama de barras corresponde a las UDR determinadas como en A. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados. TNF- α produjo un aumento de $121 \pm 46\%$ respecto del basal ($p < 0.0103$), SZ + TNF- α produjo una disminución de $62 \pm 13\%$ respecto de TNF- α ($p < 0.0014$) y la transfección con Rel-A un aumento de $176 \pm 58.6\%$ respecto de basal ($p < 0.0072$), test de Tukey

estaría favoreciendo una resistencia a apoptosis, un aumento en la proliferación y un crecimiento menos dependiente de factores de crecimiento, aún resta determinar si estas células humanas inyectadas a ratones *nude* son

capaces de generar un tumor y éste es un objetivo futuro de nuestro laboratorio.

Otro aspecto importante a considerar como futura estrategia en terapias antitumorales, es lograr la inhibi-

ción farmacológica de una sobreexpresión de RAC3. Sin embargo, para ello resulta imprescindible conocer las señales que controlan su expresión y si esto es un evento temprano en el origen de un tumor, o bien, consecuencia de la respuesta fisiológica del organismo al tratar de combatir células transformadas.

TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) es una citoquina inflamatoria habitualmente elevada en el suero de pacientes con cáncer y aumentada localmente en el entorno tumoral. Si bien fue originalmente caracterizada por su rol en la necrosis de tumores, es sabido que muy pocas células son naturalmente sensibles a la muerte por TNF- α , ya sea por necrosis o apoptosis, a menos que se utilicen agentes sensibilizadores¹⁰⁻¹². Más aún, TNF- α es un activador de NF- κ B que puede promover la proliferación de tumores⁶. Dado que NF- κ B utiliza a RAC3 como coactivador, se planteó la hipótesis de que TNF- α , a través de NF- κ B podría modular los niveles de expresión de RAC3.

Para estos estudios, cultivos de células HEK293 fueron incubados en presencia o ausencia de TNF- α a una dosis de 10 ng/ml por 24 h y luego se determinaron los niveles de RAC3 por Western blot. Como se observa en la Fig. 2A, el tratamiento con TNF- α produjo un aumento significativo en los niveles de RAC3.

Con el objeto de determinar si la activación de NF- κ B podría estar involucrada en este aumento, en otros ensayos se preincubó a las células durante 30 minutos previos al agregado de TNF- α con sulfazalacina¹³, que es un inhibidor específico de la activación de NF- κ B. Tal como se observa en la Fig. 2A, el efecto de TNF- α fue inhibido significativamente por el inhibidor del factor de transcripción, demostrando que la activación de NF- κ B está involucrada en el aumento de RAC3 por TNF- α .

Dado que NF- κ B es un dímero y siendo Rel-A una proteína miembro de esta familia y más abundantemente distribuida en distintos tipos celulares, se quiso confirmar la participación de este factor en el aumento de la expresión de RAC3. Para ello, las células fueron transfectadas con un vector de expresión constitutiva de Rel-A, o bien con vector vacío (plásmido sin DNA copia de Rel-A) y se analizaron los niveles de RAC3 por Western blot a las 24 h post transfección. Como se muestra en la Fig. 2B, la sola sobreexpresión del monómero Rel-A induce un aumento significativo de la expresión de RAC3 si se compara con células llevando el vector vacío.

Estos resultados demuestran que NF- κ B es capaz de inducir el aumento de los niveles de RAC3. El hecho de que este factor de transcripción juega un rol importante en tumorigénesis y suele estar constitutivamente activado o sus niveles aumentados en numerosos tipos tumorales^{14, 15}, es particularmente sugerente en cuanto al aumento de RAC3 asociado a desarrollo tumoral.

De acuerdo con los resultados aquí presentados, podemos concluir que RAC3, más allá de un coactivador,

es un oncogén que no requiere de una mutación en su secuencia, sino que la sola sobreexpresión es una señal suficiente para inducir la transformación celular, aumentando la tasa proliferativa, la independencia de factores de crecimiento, la independencia de anclaje y la resistencia a apoptosis, siendo todas características que contribuyen al desarrollo tumoral. Si bien los mecanismos moleculares por los cuales se producen estos cambios aún no han sido esclarecidos, es probable que no estén restringidos a su rol como molécula que acetila histonas en el núcleo celular favoreciendo la expresión génica. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que RAC3 tiene un rol citoplasmático, modificando la actividad de quinasas y el transporte de moléculas asociadas a citoesqueleto⁷.

Nuestras observaciones sugieren que un aumento temprano en los niveles de RAC3 podría favorecer el desarrollo tumoral a través de diversos mecanismos y que la activación de NF- κ B por una citoquina inflamatoria podría llevar al aumento en la expresión de este coactivador. Probablemente, el desarrollo de un modelo de estudio *in vivo* tomando como base estos conocimientos permita el diseño de fármacos de acción local y específica para la inhibición de RAC3 y su rol en tumorigénesis.

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado con fondos provenientes de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Conflictos de interés: No existen conflictos de interés respecto de los contenidos de este trabajo.

Bibliografía

- Li H, Gomes PJ, Chen JD. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8479-84.
- Anzick S, Kononen J, Walker R, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997; 277: 965-8.
- Werbajh S, Nojek I, Lanz R, Costas MA. RAC-3 is a NF- κ B coactivator. *FEBS Letter* 2000; 485: 195-9.
- Yan J, Tsai SY, Tsai MJ. SRC-3/AIB1: transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 387-94.
- Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, et al. Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer* 2000; 89: 217-23.
- Rubio MF, Werbajh S, Cafferata EG, et al. TNF-alpha enhances estrogen-induced cell proliferation of estrogen-dependent breast tumor cells through a complex containing nuclear factor-kappa B. *Oncogene* 2006; 25: 1367-77.
- Colo GP, Rubio MF, Nojek IM, et al. The p160 nuclear receptor co-activator RAC3 exerts an anti-apoptotic role through a cytoplasmic action. *Oncogene* 2008; 27: 2430-44.
- Colo GP, Rubio MF, Alvarado CV, Costas MA. RAC3 nuclear receptor co-activator has a protective role in the

- apoptosis induced by different stimuli. *Medicina (Buenos Aires)* 2007; 67: 465-8.
9. Colo GP, Rosato RR, Grant S, Costas MA. RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* 2007; 581: 5075-81.
 10. Costas MA. Life and death of the cell: intracellular signals. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 281-4.
 11. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996; 274: 784-7.
 12. Franco DL, Nojek IM, Molinero L, Coso OA, Costas MA. Osmotic stress sensitizes naturally resistant cells to TNF-alpha-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1090-8.
 13. Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid R. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998; 101: 1163-74.
 14. Gilmore TD, Koedood M, Piffat KA, White DW. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* 1996; 13: 1367-78.
 15. Lin A, Karin M. NF-κB in cancer: a marked target. *Cancer Biology* 2003; 13: 107-14.