

EL COACTIVADOR DE RECEPTORES NUCLEARES RAC3 TIENE UN ROL PROTECTOR DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DISTINTOS ESTIMULOS

GEORGINA P. COLO¹, MARIA F. RUBIO¹, CECILIA V. ALVARADO¹, MONICA A. COSTAS¹

¹Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, IDIM-CONICET, Universidad de Buenos Aires

Resumen RAC3 pertenece a la familia de coactivadores de receptores nucleares p160, y se encuentra sobre-expresado en varios tumores. Demostramos previamente que RAC3 es coactivador del factor de transcripción anti-apoptótico NF- κ B. En este trabajo investigamos su rol en la apoptosis inducida por H₂O₂ en una línea celular no tumoral derivada de riñón embrionario humano (HEK293), y por el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL) en una línea de leucemia mieloide crónica humana (K562), naturalmente resistente a la muerte por este estímulo. Observamos que las células tumorales K562 poseen niveles altos de RAC3 comparados con las células no tumorales HEK293. La sobreexpresión normal de coactivador o por transfección, inhibe la apoptosis mediante una disminución de la activación de caspasas, translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) al núcleo, aumento de la actividad de NF- κ B y las quinasas AKT y p38 y disminución de la quinasa ERK. Lo opuesto fue observado por disminución de RAC3 mediante la técnica de ARN interferente (RNAi) en K562, aumentando así la apoptosis inducida por TRAIL. Estas evidencias sugieren que una sobreexpresión de RAC3 contribuye al desarrollo de tumores, participando en las cascadas que controlan la muerte celular por mecanismos no estrictamente dependientes de hormonas esteroideas y/o de acetilación, constituyendo ésto un posible blanco de ataque para el tratamiento de tumores.

Palabras clave: apoptosis, NF- κ B, coactivadores de receptores nucleares

Abstract *RAC3 nuclear receptor coactivator has a protective role in the apoptosis induced by different stimuli.* RAC3 belongs to the family of p160 nuclear receptors coactivators and it is over-expressed in several tumors. We have previously shown that RAC3 is a NF- κ B coactivator. In this paper, we investigated the role of RAC3 in cell-sensitivity to apoptosis, using H₂O₂ in the human embryonic kidney cell line (HEK293), and tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in a human chronic myeloid leukemia cell line (K562) naturally resistant to TRAIL. We observed that the tumoral K562 cells have high levels of RAC3 if compared with the non-tumoral HEK293 cells. The normal or transfected coactivator over-expression inhibits apoptosis through a diminished caspase activity and AIF nuclear translocation, increased NF- κ B, AKT and p38, and decreased ERK activities. In contrast, inhibition of RAC3 by siRNA induced sensitivity of K562 to TRAIL-induced apoptosis. Such results suggest that over-expression of RAC3 contributes to tumor development through molecular mechanisms that do not depend strictly on acetylation and/or steroid hormones, which control cell death. This could be a possible target for future tumor therapies.

Key words: apoptosis, NF- κ B, nuclear receptor coactivators

En los últimos años se han identificado una creciente familia de moléculas, llamadas coactivadores con la capacidad de regular la actividad de los receptores nucleares en la transcripción. Muchos de estos receptores son utilizados por hormonas esteroideas y su actividad depende de los niveles y tipo de coactivador presente en

cada tejido. Ejercen su acción no por unión directa al ADN, sino a los receptores nucleares y aportando actividades enzimáticas, tal como acetilación de histonas, colaborando en el relajamiento de la cromatina y facilitando la iniciación de la transcripción¹.

Los coactivadores de receptores esteroideos (SRC) de la familia p160 incluyen a SRC-1, TIF-2 y RAC3. Estas moléculas se encuentran en cantidades limitantes en células normales y se ha visto que están sobreexpresadas en ciertos tumores. En especial, RAC3 se encontró sobreexpresado en carcinoma de endometrio, carcinoma gástrico, cáncer de próstata y mamario estrógeno-dependiente. En este último caso contribuiría a un aumento de la actividad proliferativa de estos tumores en

Recibido: 4-V-2007

Aceptado: 8-VIII-2007

Dirección postal: Dra. Mónica A. Costas, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Combatiente de Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina.

Fax: (54-11) 4523-8947

e-mail: mcostas@lanari.fmed.uba.ar

respuesta a estrógenos y actualmente es considerado un marcador tumoral en este tipo de cáncer^{2,3}.

Se ha demostrado que los coactivadores de la familia p160, originalmente descrita por su actividad sobre receptores nucleares, también son coactivadores del factor de transcripción activado por citoquinas, NF- κ B^{4,5} el cual, entre otras funciones, tiene un rol anti-apoptótico^{3,6}.

Estas observaciones resultaron sumamente importantes, dado que sugieren la participación de coactivadores en el desarrollo de tumores no sólo vía la acción de hormonas esteroides, sino también en distintos tejidos y a través de otras cascadas de señales. Dado que una inhibición de apoptosis contribuye al desarrollo tumoral y siendo NF- κ B un factor anti-apoptótico que interacciona

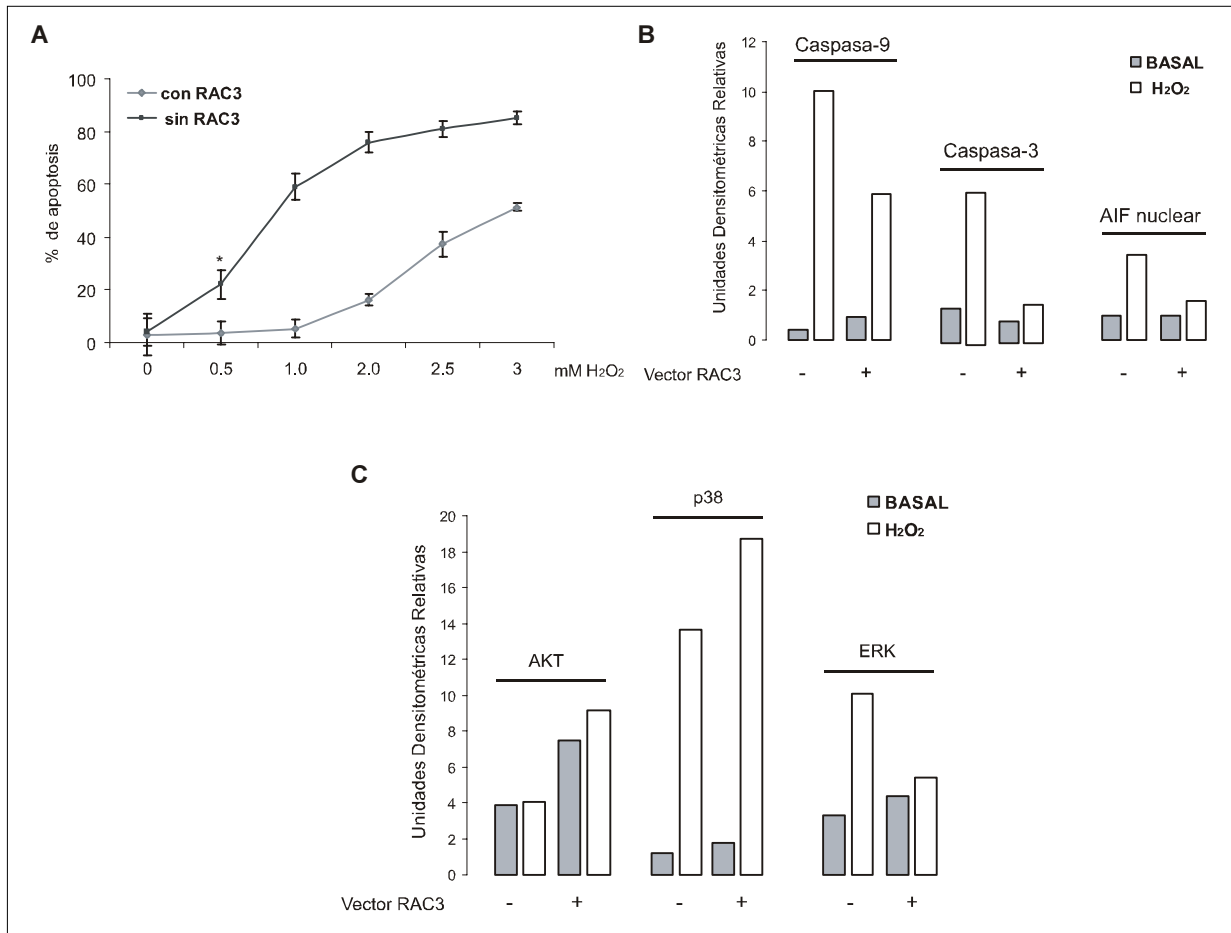


Fig. 1.- La sobreexpresión de RAC3 en HEK293 disminuye la apoptosis inducida por H₂O₂. A. Las células HEK293 fueron transfectadas transcientemente (con una eficiencia mayor al 90%). Se estimularon con distintas dosis de H₂O₂ por 24 horas. Se tiñeron las células con cristal violeta y se midió la absorbancia a 570 nm. Resultados similares fueron obtenidos por el uso de los reactivos para la determinación de apoptosis marca Bicolor. Se analizaron los datos con el test de Tukey y resultó **p*<0.001 respecto a cultivos sin RAC3 para la dosis mas baja de H₂O₂. B. Mediante la técnica de Western blot (transferencia de las proteínas separadas por electroforesis a membrana de nitrocelulosa y reconocimiento del péptido de interés por interacción con el anticuerpo específico) se estudió la activación de caspasa-9, caspasa-3 y la translocación de AIF al núcleo, en HEK293 que poseen niveles bajos de RAC3 (sin RAC3) comparados con niveles altos del coactivador (con RAC3), estimuladas por 24 horas con 1 mM de H₂O₂. Se analizaron las bandas con el programa NIH Imagen (determina la intensidad de las bandas por integración del área de puntos), relativizándolas contra un control anti-tubulina y se graficaron las unidades densitométricas relativas (UDR) correspondientes. C. Las células HEK293 transfectadas transcientemente (de manera no estable, sin selección de clones expresando constitutivamente RAC3) con el vector de expresión RAC3 o vector vacío, fueron estimuladas por 60 minutos con 1 mM de H₂O₂. Utilizando la técnica de Western blot con anticuerpos específicos anti-quinasa total y/o fosforilada, se analizó la actividad de AKT, p38 y ERK. En el gráfico de barras se muestran las unidades densitométricas relativas (UDR) correspondientes a las quinasas activas (fosforiladas). Se analizaron las bandas con el programa NIH ImageJ, relativizándolas contra un control anti-tubulina y la quinasa total correspondiente.

con coactivadores p160, se estudió la participación de estas moléculas en su acción protectora de la muerte celular cuando inducimos apoptosis en distintas líneas celulares.

Estudiamos la acción de RAC3 en las dos vías apoptóticas conocidas; utilizamos H_2O_2 para inducir la vía mitocondrial en HEK293 (células de riñón embrionario humano) que poseen cantidades limitantes de coactivadores p160, y la vía de membrana fue activada por un miembro de la familia de receptores con dominios de muerte, como el de TNF: el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL) en K562 (células de leucemia crónica humana), que normalmente son resistentes a la apoptosis inducida por esta señal.

Observamos que la sobreexpresión transiente (transfección con un vector de expresión constitutiva de RAC3 por el método cloruro de calcio, con 90% de eficiencia) de RAC3 en la línea celular HEK293 aumenta la actividad del factor de transcripción anti-apoptótico NF- κ B y disminuye en un $80 \pm 3\%$ la sensibilidad a la apoptosis en presencia de H_2O_2 con respecto a células transfectadas con vector vacío (Fig. 1A).

En esta cascada mitocondrial participan las caspasas -9 y -3, así como la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF). Mediante técnicas de Western blot observamos una disminución de la actividad de caspasa-9 y caspasa-3 en 42 y 75% respectivamente y de la translocación al núcleo de AIF, que disminuye 54% respecto a células transfectadas con vector vacío (Fig. 1B).

La familia de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) juega un rol central en la regulación de la proliferación, ciclo celular, diferenciación y apoptosis⁷. Dentro de esta familia se encuentran ERK, activada predominantemente por mitógenos, JNK y p38, activadas preferentemente por citoquinas pro-inflamatorias y estrés oxidativo. El rol de estas quinasas en apoptosis es controvertido y depende del tipo celular y contexto de señales^{8,9}. Por otro lado, la vía de los inosítoles PI3K/AKT es crucial en la proliferación celular e inhibición de apoptosis y su activación constitutiva está implicada en distintas neoplasias¹⁰.

Medimos la actividad de las MAPK, observando un aumento del 125% de AKT, del 37% de p38 a los 60 minutos en las células que sobreexpresan RAC3 respecto de las células transfectadas con vector vacío (Fig. 1C). Estas observaciones estarían de acuerdo con trabajos previos, donde se observó que una sobreexpresión de RAC3 podría estar regulando el tamaño y crecimiento celular de manera independiente a los esteroides, a través del aumento de la actividad de AKT¹¹.

Del mismo modo medimos la activación de ERK, observando una disminución del 44% de la actividad en las células que sobreexpresan RAC3, lo que está de acuerdo con otros trabajos que relacionan la activación de ERK como pro-apoptótica (Fig. 1C).

Sorpresivamente, en la línea leucémica K562 descrita como resistente a TRAIL¹² observamos que posee niveles altos del coactivador RAC3, lo cual ha sido descrito en otros tumores, pero es algo realmente inesperado y novedoso en células leucémicas.

Utilizamos la técnica de ARN interferente (RNAi) para bajar los niveles endógenos del coactivador RAC3. Observamos que en clones estables de K562 llevando el RNAi y por consiguiente con niveles bajos de RAC3 (determinado por Western blot), tratadas con TRAIL 25 ng/ml, aumenta la apoptosis en un $60 \pm 2\%$ respecto al tipo salvaje (Fig. 2A). Determinamos los niveles de caspasas-

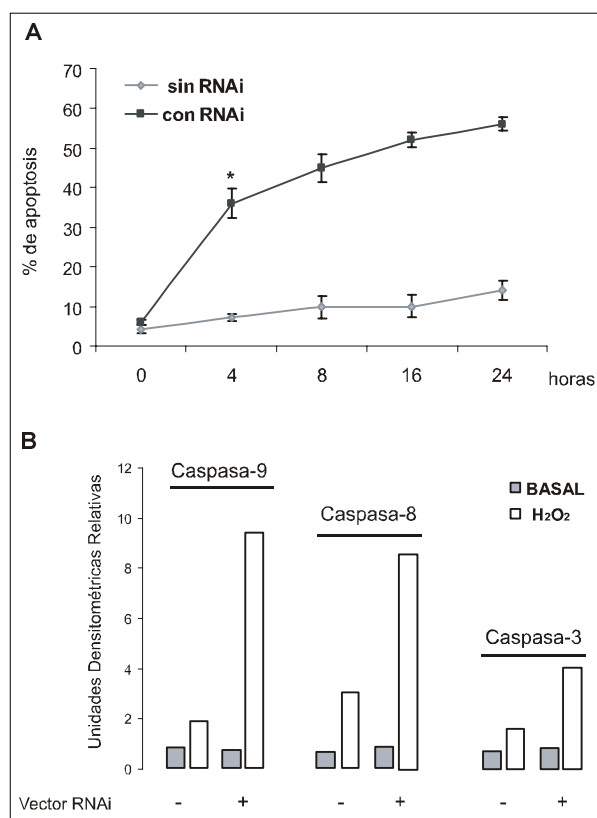


Fig. 2.— La disminución de RAC3 en células con altos niveles del coactivador, las sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL. A. Se hicieron clones estables con RNAi en K562 que disminuyeron los niveles de RAC3 endógeno. Se estimularon con TRAIL 25 ng/ml a distintos tiempos. Se midió el % células apoptóticas teñidas con DIOC6 por citometría de flujo. El análisis de datos por test de Tukey resulta para la diferencia más pequeña de * $p < 0.001$ respecto a cultivos tipo salvaje con altos niveles de RAC3, transfectados con un vector vacío sin RNAi. B. El diagrama de barras muestra las UDR (obtenidas como se explica en la Fig. 1B) correspondientes a las bandas obtenidas mediante la técnica de Western blot anti caspasa-9, -8 y -3 en K562, que poseen niveles altos de RAC3 (sin RNAi) comparados con niveles bajos del coactivador (con RNAi), estimuladas por 24 horas con TRAIL 25 ng/ml.

8, -9 y -3, observando un aumento de la activación del 80, 65 y 60% respectivamente (Fig. 2B). Del mismo modo, también se observó una disminución de la activación de AKT y ERK.

Estos resultados estarían indicando que RAC3 cumple un rol importante inhibiendo la apoptosis de distintas líneas celulares ante distintos estímulos no sólo aumentando la actividad anti-apoptótica de NF- κ B, sino regulando directa o indirectamente la acción de quinazas y agonizando el efecto pro-apoptótico de AIF, contribuyendo así a la tumorigénesis.

Las evidencias aquí planteadas sugieren que una sobreexpresión de RAC3 (al no estar vinculado únicamente a receptores hormonales, sino también a otros factores de transcripción como NF- κ B), podría contribuir al desarrollo tumoral por otros mecanismos no estrictamente dependientes de hormonas esteroides y/o acetilación de histonas, aumentando la actividad proliferativa vía AKT y disminuyendo la sensibilidad a apoptosis mediante la interacción con el factor de transcripción anti-apoptótico NF- κ B.

El hecho de que una línea leucémica se vuelva sensible a la inducción de apoptosis simplemente a través de una reducción de un coactivador, refuerza la idea de que RAC3 podría constituir un blanco de acción en el desarrollo futuro de terapias antitumorales, más allá del cáncer de mama.

Agradecimientos: Este trabajo se ha desarrollado con fondos provenientes de CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Bibliografía

1. Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, et al. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 1997; 389: 194-8.
2. Anzick S, Kononen J, Walker R, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997; 277: 965-8.
3. 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.
4. Werbajh S, Nojek I, Lanz R, Costas MA. RAC-3 is a NF- κ B coactivator. *FEBS Letters* 2000; 485: 195-99.
5. Na S, Lee S, Han S, Choi H, Im S, Lee J. SRC-1 interacts with the p50 subunit and coactivates the NF- κ B-mediated transactivations. *J Biol Chem* 1998; 273: 10831-34.
6. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002; 109: 81-96.
7. Su B, Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 402-11.
8. Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 49-54.
9. Franco DL, Nojek IM, Molinero L, Coso OA, Costas MA. Osmotic stress sensitizes naturally resistant cells to TNF-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1090-98.
10. Martelli AM, Nyakern M, Tabellini G, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutic implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 20: 911-28.
11. Zhou G, Hashimoto Y, Kwak I, Tsai SY, Tsai M-J. Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 7742-55.
12. Hao XS, Hao JH, Liu FT, Newland AC, Jia L. Potential mechanisms of leukemia cell resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8: 601-7.