

AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE RHOB POR RADIACIÓN EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ESTE GEN SUPRESOR DE TUMORES EN LAS DISTINTAS LÍNEAS.

¹Notcovich C., ³Sánchez Crespo R., ²Delgado González D., ¹³Molinari B., ¹²³Duran H.

¹Comisión Nacional de Energía Atómica, ²CONICET, ³UNSAM

Mail: notcovich@cnea.gov.ar

1 Introducción

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que resulta de la transformación maligna de los melanocitos. Estas son las células que producen la melanina, sustancia que da a la piel su color (Miller, AJ. y col., 2006). Cuando el melanoma es detectado a tiempo hay aproximadamente un 95% de probabilidad de cura, mientras que en estadíos más avanzados se estima un 95% de muerte luego de transcurridos unos cinco años(Leitner, 2006). Esto lo convierte en uno de los tipos de cáncer de piel más agresivos. Hasta el momento no existe un tratamiento que haya logrado tratar con éxito el melanoma avanzado. Si bien este tumor es menos frecuente que otros tipos principales de cáncer de piel, es mucho más metastásico.

Las modalidades de tratamiento de cáncer actuales incluyen el uso de agentes radio y quimioterapéuticos que dañan al ADN. De ahí que el estudio de las vías por las cuales las células tumorales responden al daño al ADN, permitirá comprender cómo los tumores reaccionan ante la terapia, y de esta manera, sortear posibles mecanismos de resistencia.

Los miembros de la familia de las RhoGTPasas han sido originalmente asociados a un rol dinámico en la regulación del citoesqueleto de actina y transporte de vesículas. Sin embargo, desde hace más de 10 años las proteínas de la familia Rho han despertado el interés de los investigadores en cáncer. Esto se debe a evidencias que demuestran que estas proteínas son capaces de modular procesos como proliferación, supervivencia, apoptosis, etc. (Prendergast, G, 2001). En este sentido, RhoB presenta un rol diferente al del resto de esta familia. Mientras que RhoA, Rac1 y Cdc42 promueven oncogénesis, invasión y metástasis, (Khosravi-Far y col., 1995, Pruitt, K. y col. 2001, Westwick, J. K., 1997) RhoB presenta una función de gen supresor de tumores (Chen, Z. y col., 2000, Delarue, F. L., 2001, Du, W y col., 1999). Por ejemplo RhoB, pero no RhoA, inhibe la proliferación, induce apoptosis e inhibe el crecimiento de tumores en un modelo de ratones nude (Chen, Z. y col., 2000, Du, W y col., 1999). Por otro lado, RhoB estaría involucrado en el proceso de apoptosis inducida por estrés. Se ha demostrado que RhoB se induce por agentes físicos

(UV y radiación γ) y químicos (H₂O₂ y cisplatino) (Fritz, G. y col. 1995, Fritz, G. y col., 1997). Además, consistentemente con su actividad supresora de tumores, se ha observado en biopsias de pacientes, para tumores de pulmón, cabeza y cuello, y cerebro, una disminución dramática en los niveles de expresión de RhoB conforme los tumores se vuelven más agresivos (Adnane, J, 2002, Forget, M. A., 2002., Mazieres, A. T y col., 2004).

En nuestro laboratorio, hemos caracterizado anteriormente diferentes líneas celulares de melanoma respecto de radiosensibilidad, y hemos demostrado que existe una correlación entre la radiosensibilidad intrínseca de células de melanoma humano y la muerte celular por apoptosis.

Como objetivo para el presente trabajo, nos propusimos analizar la expresión de RhoB en diferentes líneas celulares de melanoma humano en relación a una línea proveniente de melanocitos, y evaluar el efecto de la radiación gamma sobre la expresión de RhoB.

2 Materiales y Métodos

2.1 Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares humanas MEL-J, SB2 y A375, provenientes de un melanoma metastásico, cutáneo primario y maligno cutáneo respectivamente, y la línea celular PIG1 proveniente de melanocitos.

Las células se cultivaron en condiciones estándar con los medios correspondientes a cada línea celular,

A375 y SB2: medio MEL constituido por, DMEM:F12 (1:1) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), streptomicina - penicilina, 5 mg/ml de insulina, 1,76 mg/mL de ácido ascórbico, 15 mg/mL de ácido pirúvico y 30 mg/mL de galactosa.

MEL-J: medio constituido por DMEM:F12 (1:1), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), streptomicina-penicilina, 2,5 μ g/mL de insulina, 25 μ g/mL de transferina y 10 ng/mL de EGF (epidermal growth factor).

PIG1: Medio M254 (Gibco)

La manipulación de las células se llevó a cabo en condiciones estrictas de esterilidad, en campanas de flujo laminar y crecidas en estufa gaseada con 5% de CO₂ y a 37°C.

Irradiación: Las distintas líneas celulares fueron irradiadas con una fuente gamma de ¹³⁷Cs (CEBIRSA, Buenos Aires, Argentina) hasta alcanzar dosis de 2 Gy.

2.2 Extracción de RNA

Las células crecidas hasta una confluencia del 70% en placas de 10 cm², fueron lavadas con PBS y se procedió a la extracción de ARN con Trizol (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido fue cuantificado espectrofotométría UV, por su absorbancia a 260 nm. La calidad del ARN se evaluó mediante una corrida electroforética en gel de agarosa.

Transcripción reversa: Para la obtención de ADNc a partir de ARN mensajero se realizó una reacción de transcripción reversa partiendo de 2.5 μ g de ARN mediante el uso del kit Superscript II (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Una vez obtenido el ADNc se realizó una PCR utilizando los siguientes primers: RHOBforward primer 5'-TCGTGTTTCAGTAAGGACGAG -3'y reverse primer 5'-ACTTCTCGGGGATGTTCTC-3'. GAPDH Se utilizó el siguiente programa: Desnaturalización a 94°C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos a 94 °C 45 segundos, 50 °C por 45 segundos y extensión de 72 °C 45 segundos. El producto de la PCR fue resuelto en un gel de agarosa al 1%. La expresión relativa de cada gen se calculó como la relación de la intensidad de la banda de RhoB y la de GAPDH para la misma muestra.

3 Resultados y discusión

3.1 Expresión de RhoB en distintas líneas celulares de melanoma.

Teniendo en cuenta que en distintos tumores la expresión de RhoB disminuye al aumentar el grado de avance del tumor, evaluamos por RT-PCR los niveles de expresión relativos en nuestro modelo de estudio. Para ello se realizó una PCR de cDNA obtenidos a partir de RNAm de las líneas celulares A375, SB2, MELJ y PIG., y a continuación los productos de reacción resueltos en una electroforesis en gel de agarosa.

En la figura 1 (a) se observa que en las células provenientes de melanocitos, la expresión de RhoB es significativamente mayor a la de las 3 líneas tumorales. El análisis densitométrico de las bandas del gel (figura 1 b) revela una disminución en la expresión de RhoB en las líneas tumorales de aproximadamente un 70% respecto de la línea normal.

3.2 Efecto de la radiación sobre la expresión de RhoB

Es sabido que la proteína RhoB tiene una vida media de aproximadamente 2 horas, y que esta proteína es inducible por una exposición a una gran variedad de estímulos, entre ellos la radiación (de Cremoux P y col., 1994, Jahner D, 1991, Engel ME, 1998). A fin de evaluar el efecto de la radiación sobre la expresión de RhoB en las células de melanoma, a las 4 horas de irradiar las células a 4 Gy, se extrajo el ARN y se realizó un RT-PCR semicuantitativa. El gel de agarosa mostrado en la figura 2 (a) permite observar el comportamiento de RhoB ante la irradiación en las células tumorales en estudio. La figura 2(b) muestra el análisis denitométrico del gel. En las 3 líneas celulares se produce la inducción de RhoB.

A fin de evaluar diferencias en el nivel de inducción de RhoB producida entre las diferentes líneas, se analizó y comparó el aumento de cada línea irradiada respecto de su control no irradiado. Este resultado se observa en la figura 2 (c) que muestra para las líneas celulares A375 y SB2 una inducción mayor que para MELJ.

Este último análisis se correlaciona con los resultados obtenidos anteriormente por este grupo, en donde se indicaba que la línea celular MELJ, la más radioresistente, presentaba un menor porcentaje de muerte por apoptosis. En este caso presenta resultados en el mismo sentido, induciendo RhoB en menor medida que el resto, y expresando bajos niveles basales de dicha proteína.

En conclusión, hemos demostrado por primera vez en melanoma que RhoB, al igual que en otros tipos de tumores, presenta una menor expresión en células tumorales que en su contraparte normal. Por otro lado, la inducción en la expresión de RhoB en las células irradiadas podría estar asociada con el proceso de apoptosis inducida por radiación. La modulación de RhoB podría constituir una nueva herramienta que permita la sensibilización del melanoma radioresistente.

4 Referencias

Adnane, J., C. Muro-Cacho, L. Mathews, S. M. Sebti, and T. Munoz-Antonia. 2002. Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 8:2225–2232.

Chen, Z., J. Sun, A. Pradines, G. Favre, J. Adnane, and S. M. Sebti. 2000. Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J. Biol. Chem.* 275:17974–17978.

Delarue, F. L., B. S. Taylor, and S. M. Sebti. 2001. Ras and RhoA suppress whereas RhoB enhances cytokine-induced transcription of nitric oxide synthase-2 in human normal liver AKN-1 cells and lung cancer A-549 cells. *Oncogene* 20:6531–6537.

deCremoux P, Gauville C, Closson V, Linares G, Calvo F, et al. (1994) EGF modulation of the ras-related rhoB gene expression in human breast-cancer cell lines. *Int J Cancer* 59: 408–415.

Du, W., P. F. Lebowitz, and G. C. Prendergast. 1999. Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB. *Mol. Cell. Biol.* 19:1831–1840.

Engel ME, Datta PK, Moses HL (1998) RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation. *J Biol Chem* 273:9921–9926.

Forget, M. A., R. R. Desrosiers, M. Del, R. Moundjian, D. Shedid, F. Berthelet, and R. Beliveau. 2002. The expression of rho proteins decreases with human brain tumor progression: potential tumor markers. *Clin. Exp. Metastasis* 19:9–15.

Fritz, G., and B. Kaina. 1997. RhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTP-binding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 272:30637–30644.

Fritz, G., B. Kaina, and K. Aktories. 1995. The ras-related small GTP binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J. Biol. Chem.* 270:25172–25177.

Jahner D, Hunter T (1991) The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol* 11: 3682–3690.

Khosravi-Far, R., P. A. Solski, G. J. Clark, M. S. Kinch, and C. J. Der. 1995. Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol. Cell. Biol.* 15:6443–6453.

Leitner RMC. Epidemiología del melanoma cutáneo. *Rev Argent Dermatol* 2006; 87: 86-97.

Mazieres, A. T., G. Daste, C. Muro-Cacho, D. Berchery, V. Tillement, A. Pradines, S. M. Sebti, and G. Favre. 2004. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin. Cancer Res.* 10:2742–2750.

Miller, AJ.; Mihm, MC. Mechanisms of disease: Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 355: 51–65 (2006)

Prendergast GC 2001 Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nature Reviews. Cancer* 1 162–168.

Pruitt, K., and C. J. Der. 2001. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett.* 171:1–10.

Westwick, J. K., Q. T. Lambert, G. J. Clark, M. Symons, L. Van Aelst, R. G. Pestell, and C. J. Der. 1997. Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol. Cell. Biol.* 17:1324–1335.

5 Figuras

FIGURA 1

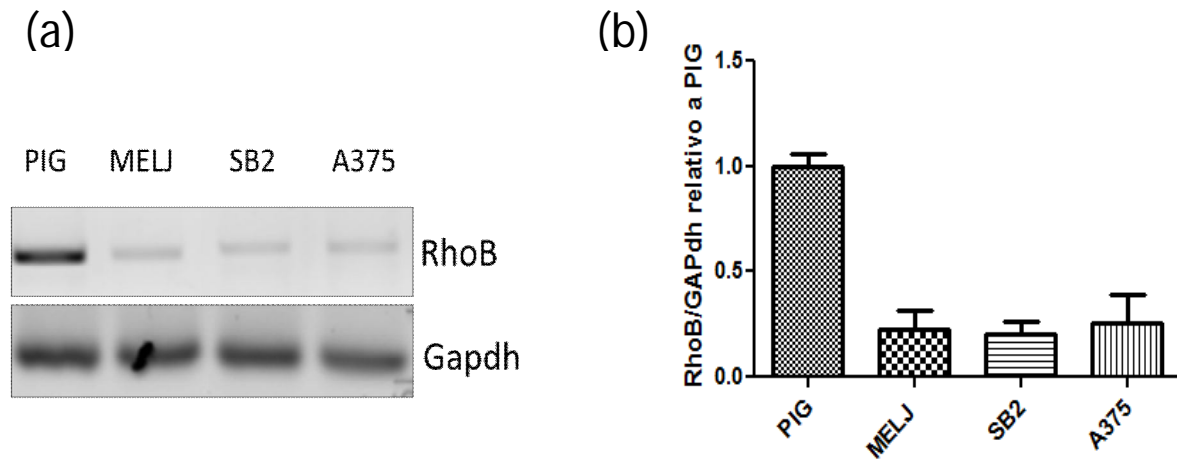


Figura 1. Expresión de RhoB en distintas líneas celulares de melanoma. RT-PCR de ADNc obtenido de las distintas líneas celulares en estudio. (a) Electroforesis en gel de agarosa y su respectivo análisis densitométrico (b).

FIGURA 2

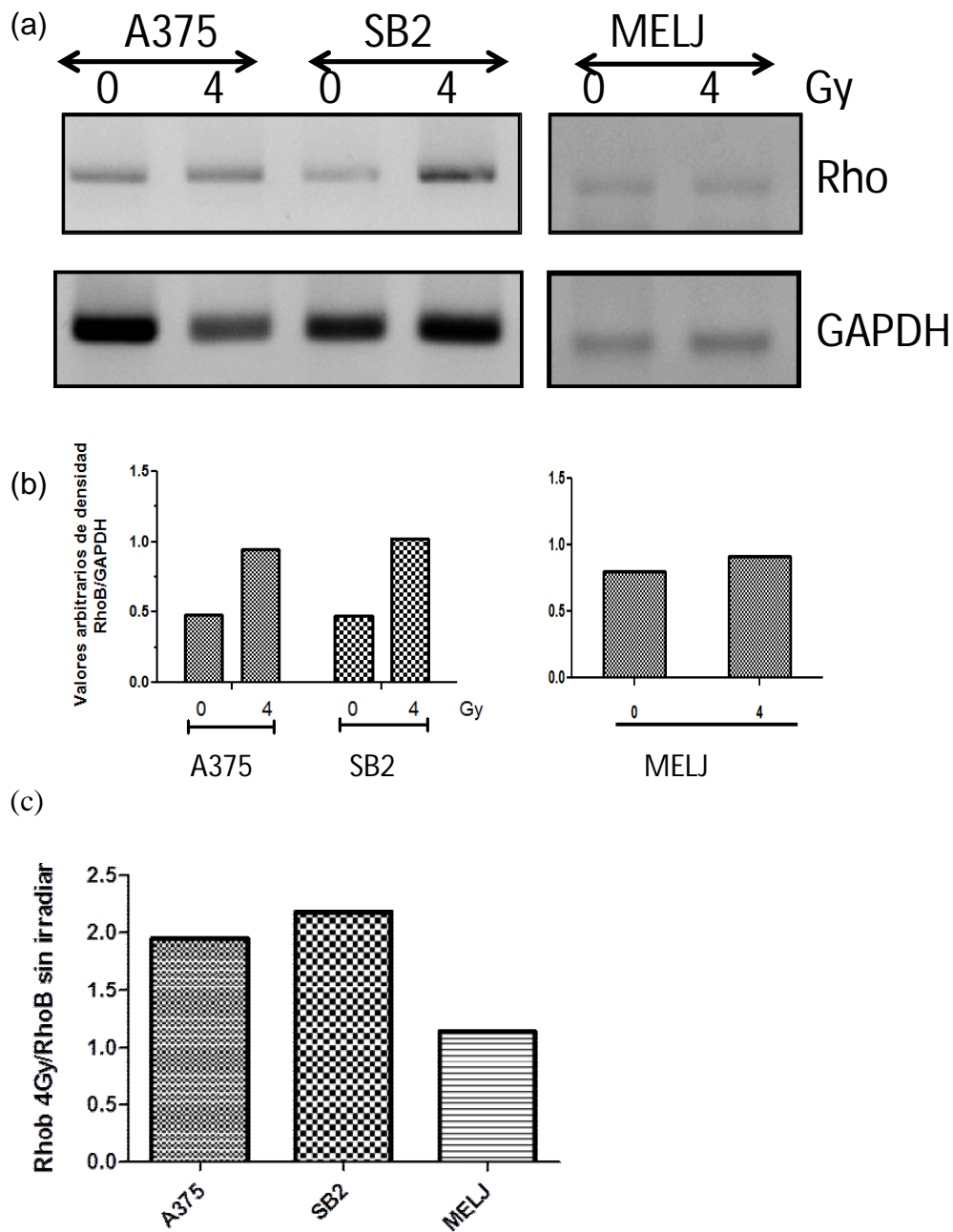


Figura 2. Efecto de la radiación sobre la expresión de RhoB en las distintas líneas tumorales. RT-PCR de ADNc obtenido de las líneas tumorales, irradiadas y no irradiadas. (a) Electroforesis en gel de agarosa y, (b) su respectivo análisis densitométrico. (c) Análisis de las veces de aumento de cada línea celular irradiada respecto de su control.

RADIATION OF DIFFERENT HUMAN MELANOMA CELL LINES INCREASED EXPRESSION OF RHOB. LEVEL OF THIS TUMOR SUPPRESSOR GENE IN DIFFERENT CELL LINES.

Previous results of our group show that a correlation exists between intrinsic radiosensitivity of human melanoma cells and cell death by apoptosis. RhoB is a small GTPase that regulates cytoskeletal organization. Besides, is related to the process of apoptosis in cells exposed to DNA damage as radiation. Also, RhoB levels decrease in a wide variety of tumors with the tumor stage, being considered a tumor suppressor gene due to its antiproliferative and proapoptotic effect. The aim of this study was to analyze the expression of RhoB in different human melanoma cell lines in relation to melanocytes, and evaluate the effect of gamma radiation on the expression of RhoB. We used the A375, SB2 and Meljcell lines, and the derived from melanocytes Pig1. It was found for all three tumor lines RhoB expression levels significantly lower than those of Pig1 ($p < 0.05$), as assessed by semiquantitative RT-PCR. When tumor cells were irradiated to a dose of 2Gy induction was observed at 3 hours RhoB irradiation. RhoB expression increased in all lines relative to non-irradiated control, showing a greater induction ($p < 0.05$) for the more radiosensitive line SB2, consistent with apoptosis in response to radiation. The results allow for the first time in melanoma demonstrate that RhoB, as well as in other tumor types, has a lower expression in tumor cells than their normal counterparts. Moreover, induction in the expression of RhoB in irradiated cells may be associated with the process of radiation-induced apoptosis. The modulation of RhoB could be a new tool to sensitize radioresistant melanoma.