

Efeito do silenciamento da pkr através de rna de interferência no crescimento do melanoma b16-f10.

DELGADO ANDRÉ, N.¹; SILVA, V.A.O.²; DE LUCCA, F. L.²

RESUMO

O presente trabalho utilizou a tecnologia do RNA de interferência no modelo de melanoma murino com o objetivo de investigar o papel da proteína quinase dependente de RNA sobre o crescimento tumoral. Cerca de 7×10^5 células de melanoma B16-F10 foram transfectadas com shRNAs anti-PKR e Lipofectamina por 5 horas. O efeito do silenciamento foi analisado por PCR semi-quantitativo e Western blot após 24 e 48 horas de transfecção. Para os ensaios in vivo as células B16-F10 transfectadas com vetor psiSTRIKE PKR-2 shRNA foram inoculadas pela via subcutânea em camundongos C57BL/6 e após 14 dias os camundongos foram sacrificados e o tumor removido e pesado. Nossos resultados demonstraram redução significativa da expressão do RNAm da PKR e da proteína após 48h de transfecção. A análise do peso tumoral indicou uma redução de 86% no crescimento tumoral indicando que esta quinase exerce um papel positivo na proliferação celular.

Palavras-chave: PKR, RNA de interferência, melanoma B16-F10, crescimento tumoral.

INTRODUÇÃO

Com o seqüenciamento completo do genoma humano, o enfoque da ciência passou da identificação de genes para a elucidação da sua função. O RNA de interferência (RNAi) é uma ferramenta valiosa que induz o silenciamento gênico pós-transcricional, o qual é seqüência específico e mediado por um RNA dupla fita de seqüência homóloga à do RNAm alvo¹.

O presente trabalho utilizou a tecnologia do (RNAi) no modelo de

melanoma murino com o objetivo de investigar o papel da proteína quinase dependente de RNA (PKR) sobre o crescimento tumoral das células B16-F10.

A PKR foi originalmente identificada com um componente da resposta antiviral induzida por interferon. A PKR é uma serina-treonina quinase que catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para os grupos alcoólicos presentes nos resíduos de serina e treonina². A PKR é expressa constitutivamente nas células dos mamíferos porém está presente na maioria das células em um estado latente. Vários estudos têm demonstrado que a PKR desempenha importante função na regulação de importantes processos celulares como apoptose, proliferação celular e transformação^{3,4}.

Alguns estudos têm sugerido que a PKR atua como supressor de tumor⁵. Entretanto, os resultados obtidos com animais transgênicos não confirmaram esta hipótese, além de estudos que demonstraram um aumento na expressão e atividade da PKR em vários tipos de tumores humanos, entre eles tumores de mama, melanoma e adenocarcinoma⁶⁻⁸.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi primeiramente analisado a eficiência do RNAi em silenciar a PKR em células de melanoma B16-F10 *in vitro* e, posteriormente, as células transfectadas foram inoculadas em camundongos isogênicos C57BL/6. As células de melanoma B16-F10 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, LifeTechnologies, Carlsbad, CA) e suplementadas com 10% de soro fetal inativado (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2mL L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina à 37°C e 5% CO₂. Três shRNA (short hairpin RNA) foram selecionadas para diferentes posições do cDNA da PKR murina (*GenBank Accession N° M93567*). Cada shRNA continha uma fita senso de 19 nucleotídeos, seguidos por um espaçador curto (AAGTTCTCT), uma fita anti-sense e um sinal de parada (TTTTT) para RNA polimerase III. O shRNA foi ligado ao vetor psiSTRIKE controlado pelo promotor U6 (U6 Hairpin Cloning systems, Promega, Madsion, WI). A confirmação da clonagem foi feita por digestão com enzima de restrição *Pst I*. Após obtenção do plasmídeo

¹ Universidade Federal de São João del Rei. Grupo de Atuação Docente em Bioquímica. CEP:35501-296. Divinópolis – MG. E-mail: nayara_fbq@yahoo.com.br.

² Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Departamento de Bioquímica e Imunologia. CEP: 14049-900. Ribeirão Preto - SP.

purificado, 7×10^5 células de melanoma B16-F10 foram transfectadas com 30mg de cada um dos shRNAs específicos para PKR ou shRNA controle e 30mL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e incubadas por 5 horas na presença de cloroquina, a fim de aumentar a eficiência da transfecção. Foi feita extração de RNA com Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) e de proteínas totais após 24 e 48 horas de transfecção. Foi feito PCR semi-quantitativo com iniciadores específicos e western blot a fim de se verificar o efeito do RNAi sobre a expressão de RNAm e da proteína PKR. Quantificação das bandas foi realizada pelo software ImageQuant, versão 3,3 (Molecular Dynamics, Ca, USA) e os resultados expressos em termos de porcentagem. Para os ensaios *in vivo* as células B16-F10 transfectadas com PKR-2 shRNA ou controle foram inoculadas pela via subcutânea, em camundongos C57BL/6 (4×10^5 células /animal). Após 14 dias, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e o tumor removido e pesado em balança analítica (Sartorius, modelo S4).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de PCR semi-quantitativo demonstraram uma redução significativa de 82% do RNAm da PKR após 24h (dados não mostrados) e 98% após 48h de transfecção com o plasmídeo PKR-2 shRNA quando comparado ao shRNA controle (Figura 1). Resultados de western blot mostraram redução de 39,4% no nível da proteína após 24h e 98% após 48h de transfecção (Figura 2). Beta actina foi utilizado como controle da integridade do RNAm e da proteína. Nenhum silenciamento significativo foi obtido com os outros dois shRNAs testados. Baseado nos resultados *in vitro*, as células transfectadas com PKR-2 shRNA foram inoculadas após 5 horas de transfecção via subcutânea. A análise do peso tumoral indicou uma redução de 86% no crescimento tumoral dos animais inoculados com as células transfectadas com PKR-2 shRNA quando comparadas às células transfectadas com o shRNA controle. Nossos dados indicam que o silenciamento da PKR com PKR-2 shRNA *in vitro* foi eficiente e que houve

significativa redução do crescimento do tumor primário *in vivo*, sugerindo que esta quinase exerce um papel importante na proliferação celular e desta forma, não corroborando com os dados de que a PKR seria um supressor de tumor, mas estaria envolvido na proliferação celular, de modo que novos estudos devem ser feitos na tentativa de elucidar seu mecanismo de ação.

Figura 1. Redução da expressão do RNAm da PKR em células de melanomaB16-F10 após 48 horas de transfecção com shRNA PKR-2 (A) e shRNA controle (B). O símbolo ** representa o nível de significância ($p < 0,001$).

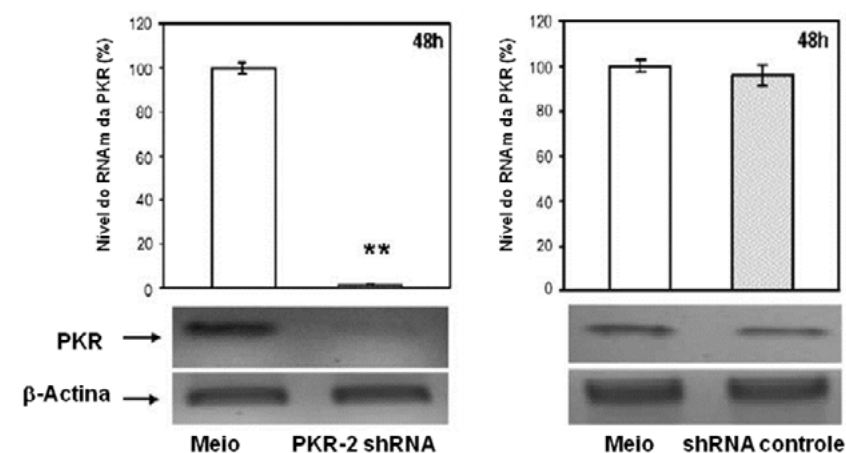


Figura 2. Nível da proteína PKR em células de melanoma B16-F10 após 24 e 48 horas de transfecção com shRNA PKR-2 (A) e shRNA controle (B). Os símbolos representam o nível de significância (* $p < 0,0$; ** $p < 0,001$).

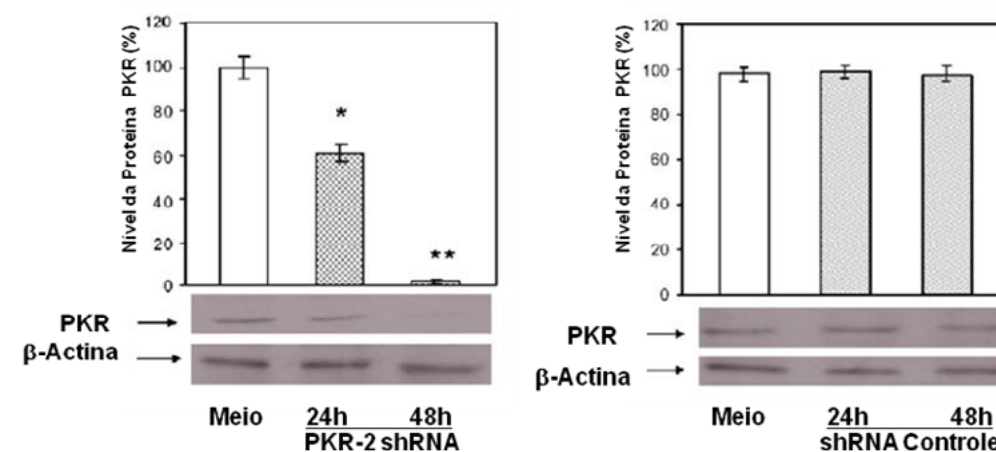
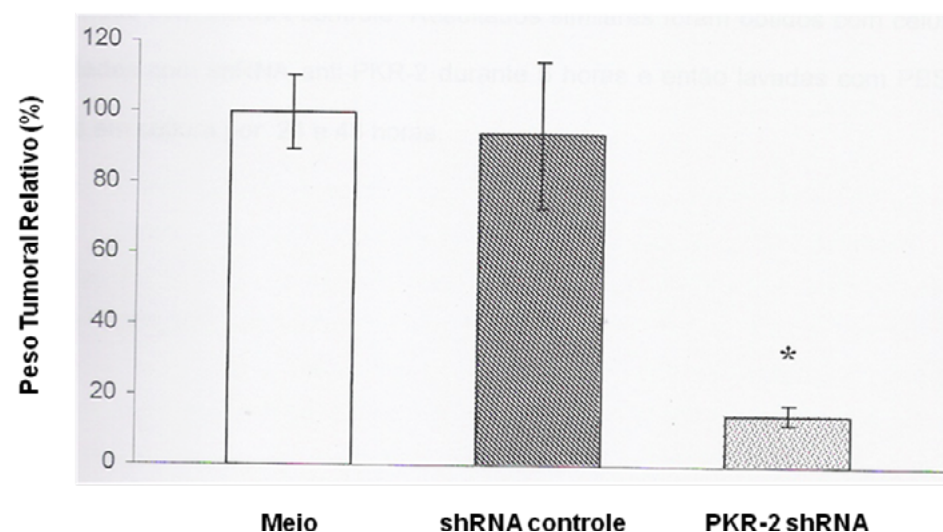


Figura 3. Efeito da transfecção das células de melanoma B16-F10 com o plasmídeo shRNA PKR-2 sobre o desenvolvimento tumoral.



CONCLUSÕES

A inoculação de células B16-F10 transfectadas com PKR-2 shRNA resultaram em inibição de 86% do crescimento tumoral. A PKR está altamente expressa e ativa em melanomas, o que pode colocar a PKR como um novo alvo para o tratamento de câncer através da tecnologia do RNA de interferência, especialmente em tumores nos quais sua expressão esteja aumentada e que apresentem alvo potencial metastático como melanoma e câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- (1) Dorsett, Y.; Tuschl, T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. **Nat. Rev. Drug. Discov.** v.3, p. 318–329, 2004.
- (2) Clemens, M.J.; Elia, A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function, **J. Interferon Cytokine Res.** v.17, p.503–52, 1997.
- (3) Watanabe, M.A.E.; Souza, L.R.; Murad, J.M.; De Lucca, F.L. Activation of the RNA-dependent protein kinase of lymphocytes by regulatory RNAs: implications for immunomodulation in HIV infection. **Curr. HIV Res.** v.3, p.329–337, 2005.
- (4) Garcia, M.A.; Gil, J.; Ventoso, I.; Guerra, S.; Domingo, E.; Rivas, C.; Esteban, M. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.70, p.1032–1060, 2006.
- (5) koromilas, A.E.; Roy, S.; Barber, G.N.; Katze, M.G.; Sonenberg, N. Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible ds RNA-dependent protein Kinase. **Science.** v.257, p.1685-1689, 1992.
- (6) Kim, S.H.; Gunnery, S.; Choe, J.K.; Mathews, M.B. Neoplastic progression in melanoma and colon cancer is associated with increased expression and activity of the interferon-inducible protein kinase, PKR. **Oncogene.** v.21, p.8741–8748, 2002.
- (7) Nussbaum, J.M.; Gunnery, S. Transcriptional upregulation of interferon-induced protein kinase, PKR, in breast cancer. **Cancer Lett.** v.196, p.207–216, 2003.
- (8) Roh, M.S.; Kwak, J.Y.; Kim, S.J.; Lee, H.W.; Kwon, H.C.; Hwang, T.H.; Choi, P.J.; Hong, Y.S. Expression of doublestranded RNA-activated protein kinase in small-size peripheral adenocarcinoma of the lung. **Pathol. Int.** v.55, p. 688– 693, 2005.

Financiamento: CAPES e FAPESP.