



Memoria del 45º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

La señalización de RAC/PAK como blanco terapéutico para diversas enfermedades

RAC/PAK signaling as a therapeutic target for diverse pathologies

Araiza Olivera, Toro, Daniela^{1*}; Mendoza Fuentes, Alan¹
y Merino Vázquez, Luis Javier¹

1. Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

*Correspondencia. Instituto de Química, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México. CP 04510, Tel. + 52 (55)5562-24612, daniela.araiza@iquimica.unam.mx

Resumen

La vía de señalización RAS/MAPK se encarga de regular una serie de procesos celulares como la proliferación, diferenciación y supervivencia. Las mutaciones somáticas de esta vía se presentan en el 30% de los diferentes tipos de cáncer como el de páncreas, colon, tiroides, pulmón y melanoma. Sin embargo cuando las mutaciones de esta vía se presentan en la línea germinal se producen síndromes causados por anomalías del desarrollo conocidas como Rasopatías. Se sabe que PAK es requerida para la activación de ERK, parte de la vía de RAS. Nosotros decidimos evaluar a PAK1 y su activador RAC1 como potenciales blancos terapéuticos en las Rasopatías y el melanoma. Utilizando al pez cebra como modelo de estudio, decidimos analizar si las consecuencias fenotípicas causadas por la sobreactivación de la vía de RAS durante el desarrollo podían ser bloqueadas por pequeñas moléculas inhibitoras de PAK. Introduciendo genes de ganancia de función tales como BRAF, KRAS y RAC1 en embriones con una sola célula de pez cebra, se produjo un fenotipo similar a las Rasopatías caracterizado por anomalías del desarrollo. Dicho fenotipo fue revertido por pequeñas moléculas inhibitoras de PAK. Por otro lado estudiamos el efecto de estos inhibidores en líneas de melanoma que presentaban mutaciones en BRAF, PREX y/o RAC1. El tratamiento con los inhibidores de PAK y RAC disminuyó la proliferación, migración y crecimiento tumoral. Estos datos sugieren que PAK1 puede ser

Abstract

The RAS/MAPK signaling pathway regulate key cellular processes, including proliferation, differentiation, and survival. Somatic mutations of the RAS pathway are found in 30% of human cancers, including pancreatic, colon, thyroid, lung and melanoma. Furthermore, germline mutations in this pathway, known as Rasopathies, cause abnormal development. As PAK have been shown to be required for the activation of ERK by Ras, we evaluated PAK1 and its activator RAC1 as potential therapeutic targets in both Rasopathies and in melanoma. Using a zebrafish model, we first asked if the phenotypic consequences of Ras pathway overactivation during development could be blocked by PAK small molecule inhibitors. Introducing gain-of-function genes such as BRAF, KRAS and RAC1 into one-cell zebrafish embryos produced a Rasopathy phenotype. These phenotypes were suppressed by a PAK-specific small molecule inhibitor. We then studied the effect of these small molecule inhibitors in melanoma cells bearing activating mutations in BRAF, PREX and/or RAC1. Treatment with PAK or RAC inhibitors decreased the migration, proliferation and tumor growth. These data suggest that PAK1 might serve as a useful therapeutic target in PREX or RAC1 driven cancers.

utilizado como un blanco terapéutico para patologías relacionadas con mutaciones en RAC1 y PAK1.

Palabras clave: Vía RAS/MAPK, rasopatías, melanoma, RAC, inhibidores.

Key words: RAS/MAPK pathway, rasopathies, melanoma, RAC, inhibitors.

Introducción

En la célula existen vías de señalización importantes que controlan diversos procesos celulares. Una de ellas es la vía RAS/MAPK (vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno), que está formada por genes que se localizan en un cromosoma distinto pero que se encargan en conjunto de procesos importantes como proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celular. Los componentes de esta vía pertenecen a la superfamilia de las proteínas G pequeñas, las cuales reciben señales extracelulares que estimulan receptores de proteínas G, citosinas, canales de calcio, integrinas, factores de crecimiento y otros péptidos que provocan la disociación del GDP de la proteína RAS y el posterior acoplamiento con GTP para que adquiera su forma activa. Proteínas como SHC, SHP2 y GRB2 reclutan factores de intercambio de nucleótido de guanina como SOS (son of sevenless) que promueve el intercambio GDP/GTP en la proteína RAS. Una vez fosforilada RAS puede interactuar con las cinasas río abajo como RAF, MEK y ERK (Fig. 1) [1].

En términos generales, el cáncer y el desarrollo normal de los seres humanos parecen ser procesos opuestos. Sin embargo, alteraciones en los genes de la vía de las RAS/MAPK pueden generar un paralelismo entre enfermedades del desarrollo y el cáncer. Actualmente los conocimientos de la regulación epigenética han permitido proponer la relación entre ambas patologías. Durante el desarrollo de los seres vivos una serie de instrucciones epigenéticas permiten que las células indiferenciadas del embrión se diferencien en tejidos específicos del organismo. Por el contrario el cáncer se debe al mal funcionamiento de dichas instrucciones, lo que conlleva a la falta continua de diferenciación de las células promoviendo así la progresión de tumores benignos a malignos [2].

A pesar de las diferencias mencionadas, las células que llevan a cabo ambos procesos pueden presentar similitudes como la metilación del DNA, modificaciones de la cromatina que caracterizan a cada patología, entre otras [2].

Es por tanto que las patologías genéticas y malignas como el cáncer pueden estar relacionadas.

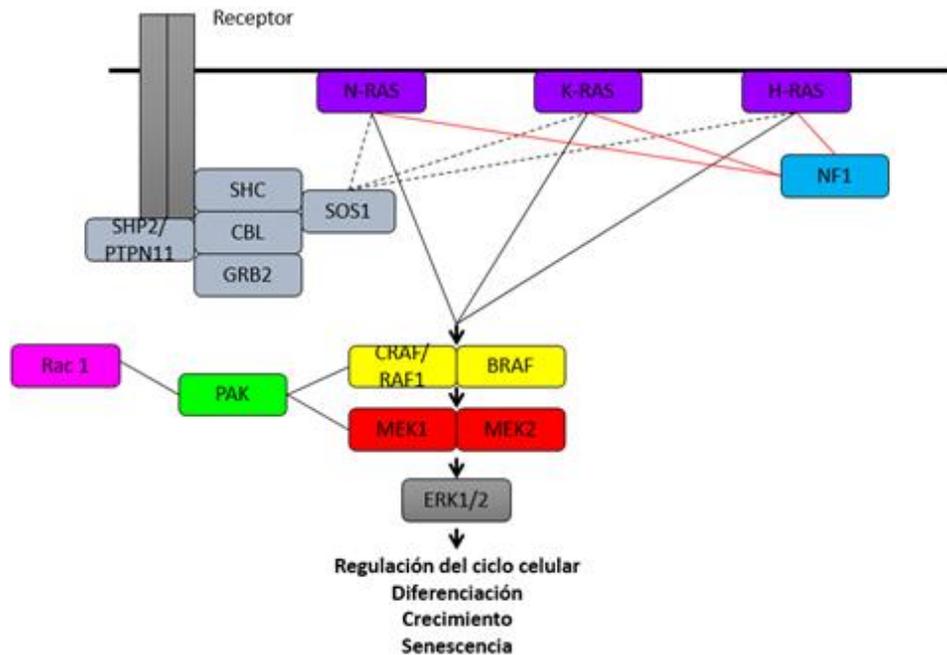


Figura 1. Vía de RAS/MAPK

Mutaciones en la vía de RAS/MAPK

Dependiendo de la etapa y el tipo de células donde se presenten alteraciones en la vía RAS/MAPK, se producirán diversas patologías. Las mutaciones de esta vía en la línea germinal generan enfermedades del desarrollo conocidas como Rasopatías. Por otro lado, las mutaciones en la línea somática pueden dar lugar a cambios celulares que conllevan a cáncer. Se sabe que alrededor del 30% de los distintos tipos de cáncer presentan mutación en alguno de los genes de esta vía.

En cuanto a las enfermedades del desarrollo, dependiendo el gen que se encuentre afectado se producirán síndromes específicos como Noonan, Costello, Neurofibromatosis 1, Leopard, Legius y el síndrome Cráneo-Facial-Cutáneo. Si bien es cierto que cada síndrome tiene características fenotípicas específicas, comparten algunas otras ya que los genes mutados forman parte de la misma vía [1-3].

Mutaciones somáticas en la vía de RAS/MAPK

Alrededor del 20-30% de los diferentes tipos de cáncer presentan alteraciones somáticas en los genes de esta vía. La prevalencia varía dependiendo del tejido; en el adenocarcinoma de páncreas se presenta en un 90%, en el de colon y tiroides un 50%, un 30% en el de pulmón y un 25% en el melanoma. El gen RAS es el que presenta mayor frecuencia de mutación, siendo la más común KRAS (85%), seguida de NRAS (15%) y HRAS (1%). Las mutaciones más comunes en este gen se producen por la inversión de los aminoácidos G12, G13 y Q61 que generan la sobreactivación intrínseca e ilimitada de las proteínas río abajo [1, 4].

Otra cinasa comúnmente mutada en el cáncer es RAF, la cual esta activada por RAS y tiene tres isoformas, BRAF es la que está más involucrada en el cáncer.

Las proteínas río abajo de ambas cinasas como MEK y ERK también pueden estar sobreexpresadas en esta enfermedad. Existen además mutaciones en proteínas efectoras alternas a esta vía envueltas en el cáncer, como RAC1 y PAK [3].

Mutaciones germinales en la vía de RAS/MAPK

Las mutaciones de ganancia de función de las proteínas de la vía de RAS/RAF/MEK/ERK en la línea germinal, provocan anomalías en el desarrollo. Dichas alteraciones en los genes de esta vía conllevan a enfermedades conocidas como Rasopatías, entre las que encontramos los Síndromes de Noonan (KRAS,

BRAF, NRAS, SOS, PTPN11, RAF1), Cardio-Facial-Cutáneo (KRAS, BRAF, MEK2), Costello (HRAS), Neurofibromatosis 1 (Neurofibromina), Legius y Leopard (BRAF, PTPN11, RAF1) [1, 5, 6].

Las manifestaciones clínicas en estos pacientes dependen del gen afectado, sin embargo al ser sus componentes parte de una misma vía a menudo superponen algunas manifestaciones como dificultades de aprendizaje, defectos cardiacos, macrocefalia, talla baja, dimorfismo facial, anomalías cutáneas y en algunos casos predisposición al cáncer [1, 2, 5, 6].

Los tumores que están relacionados frecuentemente con estos síndromes son el rhabdomioma, neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, carcinoma de vejiga, leucemia mielocítica y melanoma. Un ejemplo de la relación que existe entre las mutaciones germinales y somáticas son el síndrome de Leopard y la Neurofibromatosis, los cuales son más propensos a padecer melanoma. Recientemente se ha descrito que en este tipo de cáncer de piel 70% de los pacientes presentan mutación en el aminoácido V600E de la proteína BRAF pero también en genes como RAS y RAC1 [7].

Enfermedades relacionadas con mutaciones en PAK y RAC

RAC es una pequeña GTPasa encargada de una serie de procesos como la supervivencia, división, motilidad y es esencial para la actividad oncogénica de RAS. Cuando RAC se encuentra en su forma activa con GTP, es capaz de unirse y activar a otras proteínas como PAK [8].

PAK es una serina-treonina cinasa que se encuentra dividida en dos grupos. En el primer grupo encontramos a Pak 1, 2 y 3, de los cuales Pak1 es el que se encuentra sobreexpresado en melanoma y por tanto es sensible a los inhibidores correspondientes. PAK es una enzima encargada de regular procesos de transcripción, traducción, motilidad, supervivencia, proliferación y organización del citoesqueleto (Fig. 2) [9,10]. Las proteínas activadas por PAK son c-RAF y MEK1, nosotros hemos demostrado que la pérdida de PAK implica una disminución de la actividad de las cinasas mencionadas anteriormente, así como de la inactivación de ERK [3].

PAK al parecer tiene además otros sustratos, nosotros mostramos evidencia genética y farmacológica donde el eje PAK/MEK/ERK

aparentemente es esencial para el desarrollo de enfermedades del desarrollo y cáncer de piel [3].

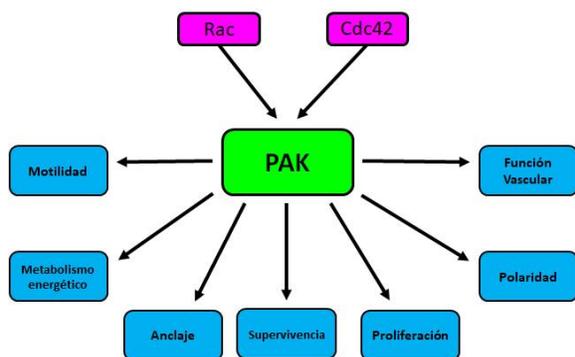


Figura 2. Procesos regulados por la cinasa p21-activada. Modificado de Kelly M.L., et al. *Cell Mol Life Sci*, 2013.

Recientemente se ha descubierto que la mutación en el gen *RAC1* participa tanto en el desarrollo de algunos tipos de cáncer como el melanoma, así como en enfermedades genéticas conocidas como Rasopatías.

RAC1 es un gen asociado a diversos procesos celulares como la proliferación y activación de la cinasa PAK, río abajo. En este trabajo se estudió el efecto causado por la inhibición de *RAC1* y PAK en la señalización de células con mutación en el gen *RAC*^{P29S} tanto en el desarrollo embrionario del pez cebra, así como en el melanoma. Al parecer pequeñas moléculas inhibitoras de *RAC1* y PAK1 son capaces de revertir el efecto en la señalización alterada en *RAC1* en las células somáticas y germinales [3].

En el melanoma se ha propuesto como posible blanco terapéutico ya que la sobreexpresión de este gen en pacientes con este tipo de cáncer de piel, genera insensibilidad y resistencia a algunos inhibidores de cinasas como *BRAF* o *NRAS* ya utilizados en la clínica. Nosotros observamos que líneas celulares mutantes de *RAC1* en melanoma son resistentes a los inhibidores de otras cinasa pero son sensibles al efecto del inhibidor de PAK [3].

En el pez cebra encontramos que la sobreexpresión de *RAC*^{P29S} genera un fenotipo similar al de las Rasopatías en humanos y puede ser bloqueada por el uso de inhibidores de MEK y PAK [3]. Lo anterior sugiere que PAK puede ser utilizado como un blanco terapéutico para el tratamiento del melanoma y enfermedades del desarrollo.

Rasopatías

Las Rasopatías son un tipo de patologías del desarrollo, causadas por mutaciones en la línea germinal [6]. Estas alteraciones se producen en genes que son esenciales para el correcto funcionamiento de la vía de señalización RAS/MAPK, por lo que los pacientes presentan características fenotípicas como estatura baja, déficit cognitivo y anomalías cardíacas, cutáneas o faciales [7].

La vía de señalización RAS/MAPK ha sido estudiada ampliamente con el fin de encontrar posibles blancos terapéuticos con alta especificidad y eficacia para tratamientos contra estos síndromes [11].

A continuación se describen brevemente estos síndromes (Fig. 3):

- Síndrome de Noonan: Es causado por mutaciones en genes como: *PTPN11*, *SOS1*, *KRAS*, *NRAS*, *SHOC2*, *RAF1*, *BRAF* y *NRAS* [1]. Los pacientes presentan características distintivas como: frente amplia, hipertelorismo, paladar alto y arqueado, fisuras palpebrales y oído de bajo ajuste y con rotación posterior. Además de defectos cardíacos congénitos, crecimiento disminuido, trastornos de coagulación y un variable retraso neurocognitivo. [5].
- Síndrome de LEOPARD: Alrededor del 85% de los individuos presentan mutaciones en el gen *PTPN11*, cuya pérdida de función afecta la actividad catalítica de SHP2 [6]. Las características de los pacientes son: lentigos, anomalías electrocardiográficas, hipertelorismo ocular, estenosis pulmonar, genitales anormales, retardo en el crecimiento y sordera neurosensorial [1,6].
- Síndrome Cardio-Facial-Cutáneo: Una característica de este síndrome es que el gen *BRAF* se encuentra mutado de novo [6,12]. Envuelve características craneofaciales distintivas (frente amplia, ojos separados, párpados caídos, orejas con implantación baja), defectos cardíacos (estenosis pulmonar, defecto del tabique auricular y cardiomiopatía hipertrófica), cutáneas (piel seca y áspera, lunares de color oscuro, palmas y plantas arrugadas y queratosis pilaris) al igual que un déficit cognitivo.
- Neurofibromatosis 1: Se debe a mutaciones en el gen *NF1* que codifica para la neurofibromina 1 (NF1) [5]. Los pacientes se caracterizan por

padecer manchas de color ocre, nódulos de Lisch en el iris y tumores fibromatosos en la piel [1].

- Síndrome de Costello: Presentan mutaciones aberrantes en el gen *HRAS* [1]. A los pacientes se les asocian características de facies gruesas,

estatura baja, anomalías cardíacas, dificultad de alimentación severa y con retraso en el desarrollo.

- Síndrome de Legius: Este síndrome se ocasiona por la mutación en el gen *SPRED1*, que ayuda a regular negativamente la vía RAS/MAPK [6, 12].

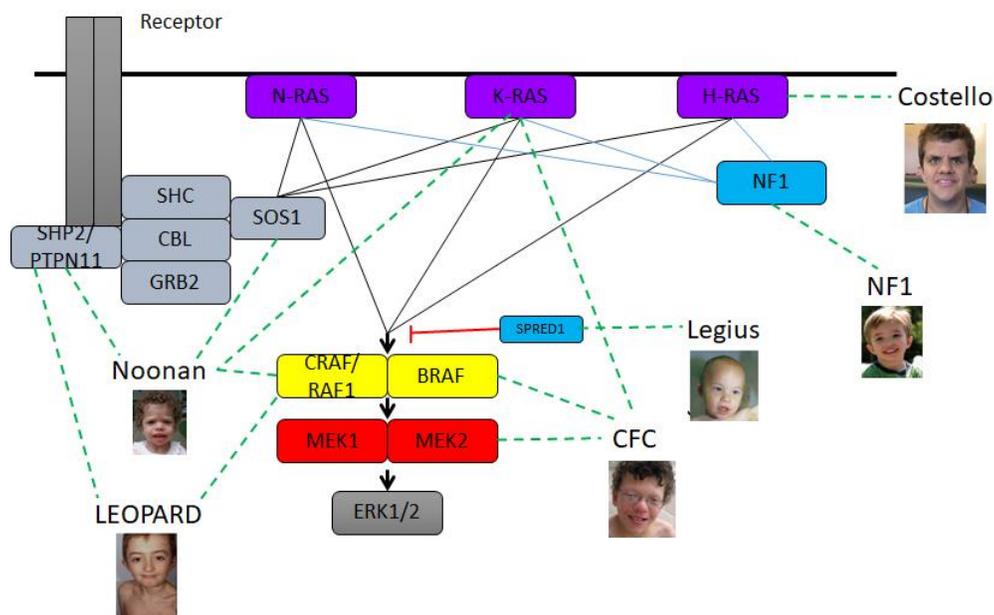


Figura 3. Enfermedades del desarrollo causadas por mutaciones en la vía de RAS/MAPK. Modificado de Tidyman W.E. Raunen K.A. Curr Opin Genet Dev. 2009

Mutaciones en RAC causantes de rasopatías

Estudios previos muestran que la sobreexpresión de genes asociados a las Rasopatías como BRAF, NRAS y MEK1 induce el desarrollo anormal del pez cebra caracterizado por la elongación horizontal del cuerpo, así como alteraciones en la formación del corazón y ojos [6, 12]. Estos cambios se acompañan además, de la activación de ERK que puede ser bloqueada por las pequeñas moléculas inhibitoras de MEK.

Ya que RAC activa a PAK y ésta controla parcialmente la vía MEK/ERK mediante la fosforilación de c-RAF y MEK1, nosotros decidimos analizar si la activación de RAC podía afectar el desarrollo embrionario del pez cebra, así como la expresión de PAK y ERK [3].

- El desarrollo embrionario y actividad de ERK a través de PAK se modifica por la expresión de RAC1^{P29S}

Para determinar si la activación de RAC afectaba el desarrollo, inyectamos en una sola célula del embrión de pez cebra RNA mensajero que codificaba BRAF^{WT} o BRAF^{V600E}, KRAS 4A^{G12V} o RAC^{P29S}. La expresión de BRAF^{WT} no tuvo efecto alguno, sin embargo todas las demás mutaciones resultaron en un desbalance en el desarrollo. Al analizar la actividad de las vías de señalización, se encontró que los mutantes de BRAF, KRAS y RAC1 tenían elevado tanto ERK como PAK (Fig. 4) [3].

RAC1 es un efector de PAK, por tanto decidimos estudiar si la inhibición farmacológica de RAC1^{P29S} afectaba el desarrollo embrionario del pez. Observamos que la inyección de RNA codificante para RAC1 resulta en el desarrollo anormal del pez cebra, caracterizado por edema pericárdico, ausencia del globo ocular y disminución en el tamaño de la cabeza en cerca del 85% de los embriones. Estas anomalías fueron parcialmente prevenidas al tratar a los embriones con una pequeña molécula inhibidora de RAC1 (NSC23766) y casi completamente revertidas al utilizar el inhibidor de PAK (Frax 1036) o el de MEK (PD325901). En contraste al utilizar un inhibidor de BRAF

(Vemurafenib) no se revirtieron los cambios en el fenotipo de estos embriones (Fig. 5) [3]. *Melanoma*

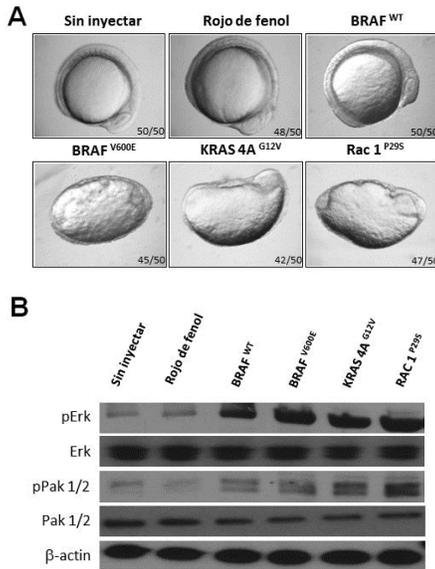


Figura 4. RAC^{P29S} genera un fenotipo similar al de las Rasopatías en el pez cebra. Se inyectó mRNA de distintos genes a una sola célula del embrión del pez. a) La expresión de BRAF^{V600E}, KRAS4A^{G12V} y RAC^{P29S} produce un fenotipo similar al de las Rasopatías a partir de las 12hpf. b) La sobreexpresión de las proteínas aumenta la actividad de p-ERK y p-PAK.

Entre los distintos tipos de cáncer de piel el más conocido por su gran agresividad y resistencia a tratamiento es el melanoma [13]. Esta neoplasia es causada por una división descontrolada de los melanocitos epidérmicos (productores de un pigmento pardo llamado melanina) y se caracteriza por una neoformación cutánea asimétrica, con bordes irregulares, color no homogéneo, diámetro mayor a 6 mm y evolución, es decir, que la forma, tamaño o color están cambiando [14].

En etapas tempranas es curable y si se detecta a tiempo se estima una supervivencia de 95 a 99 % a cinco años [15]; no obstante, sin tratamiento, el pronóstico es bajo ya que provoca metástasis.

En 2012, la incidencia y mortalidad de melanoma en México fue de 1.8 casos y 0.53 por cada 100,000 personas lo que lo ubica en la posición número 21 de incidencia y en la 23 de mortalidad en tipos de cáncer.

Los factores de riesgo para el desarrollo de melanoma han sido bien establecidos, la exposición a luz ultravioleta, rasgos claros (piel clara, cabello y color de ojos) y quemaduras de sol [16].

Una de las etiologías más aceptadas a nivel molecular por la cual se presenta el melanoma se relaciona con la activación anormal de la vía de las RAS/MAPK específicamente por una mutación en la enzima BRAF, presentándose en aproximadamente 70% de los casos de melanoma [17]. Aproximadamente 90% de esta mutación es la sustitución de la valina 600 por ácido glutámico (BRAF^{V600E}) [18]. No obstante, distintas mutaciones en RAC1 (una pequeña GTPasa monomérica de la familia Rho asociada principalmente con la transmisión de señales al citoesqueleto y, por tanto, relacionada con la adhesión celular, migración e invasión) han sido reportadas en melanoma, la más frecuente es la sustitución de la prolina 29 por una serina (P29S) [19]. En realidad, de acuerdo con las secuenciaciones del exoma realizadas por Krauthammer [20], la mutación RAC1^{P29S} fue la tercera más frecuente (oncogénicamente activa), después de BRAF y N-RAS.

Sin embargo, el papel biológico y la importancia bioquímica y clínica de RAC1^{P29S} aún no están bien definidas [21].

Usualmente, RAC1 oscila entre dos estados: inactivo (unido a GDP) y activo (unido a GTP), este último tiene la capacidad de activar a PAK cuyos

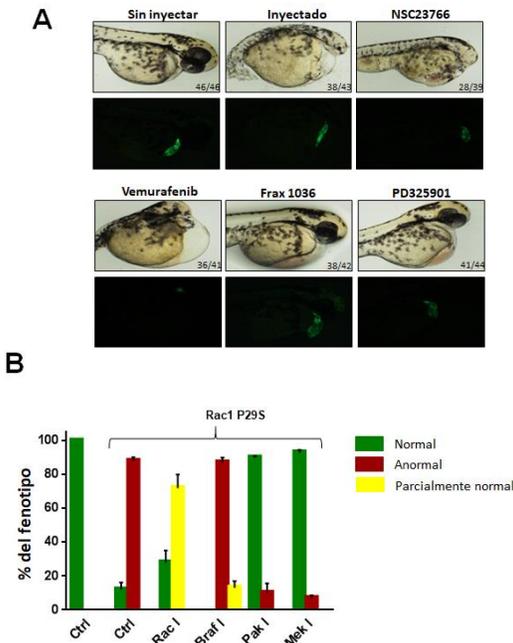


Figura 5. Pequeñas moléculas inhibitoras previenen el fenotipo similar al de las rasopatías. Peces transgénicos fueron inyectados con mRNA de RAC1. A y B) Embriones de pez cebra Tg (CMLC:GFP) fueron inyectados con RAC1^{P29S} y tratados con 1μM del inhibidor de RAC1 (NSC23766), BRAF (Vemurafenib), PAK1 (Frax.1036) o MEK (PD325901) a las 72 hpf. Tomado de Araiza-Olivera D. et al. *Oncogene* 2017.

subsecuentes sustratos son RAF en S338 y MEK en S298 [22, 23]; particularmente, el grupo 1 de PAK (que incluye a PAK1-3 y cuyos efectores son las GTPasas RAC y Cdc42) facilitan el entrecruzamiento entre los efectores de las vías de señalización de RAF/ERK y PI3K, por lo que PAK tiene la capacidad de regular la vía PI3K/AKT/mTOR; se piensa que esta vía actúa de forma no catalítica como un andamio para unir PDK1 a AKT [11, 23].

Dado que en la mayoría de los casos de melanoma está desregulada la vía MAPK, es común emplear inhibidores de los intermediarios de la misma vía dirigidos principalmente a RAF (Vemurafenib, Sorafenib y Dabrafenib) y MEK (Trametinib, AZD6244 y PDO325901) [22]; no obstante, pese a estos avances, la efectividad de los fármacos es sólo cuestión de meses ya que se presenta resistencia al tratamiento debido a que los fármacos están dirigidos únicamente a una fracción de la señalización oncogénica.

La creciente necesidad de hacer frente a la resistencia a los fármacos que tienen como blanco molecular la vía MAPK, enfoca las investigaciones al diseño de nuevas moléculas o bien, a descubrir otros blancos moleculares con el objetivo de regular las vías de señalización implicadas en el melanoma. Sobre esta última alternativa, cabe esperar que la inhibición de PAK1 pueda interferir con el potencial oncogénico de las proteínas con las cual se entrecruza.

- Mutaciones en RAC causantes de melanoma

Si bien es cierto que la principal mutación en el melanoma es la del gen BRAF, se han identificado otras mutaciones importantes como la del factor intercambiador de guanin-nucleótidos (PREX2) observado en un 14% y el de la pequeña GTPasa (RAC1) encontrado en un 4-9%. Las mutaciones más frecuentes en melanoma se encuentran en BRAF, seguida de N-RAS y RAC1^{P29S}. Este último gen se ha identificado como importante para la proliferación de melanocitos pero a la vez se ha asociado con la resistencia de los pacientes con melanoma cuya mutación se encuentra en el gen BRAF. En el melanoma maligno la mutación más frecuente de RAC1 es P29S. Las mutaciones en RAC1 han adquirido mayor importancia, ya que actualmente se están estudiando pequeñas moléculas inhibitoras de la cinasa p21-activada como posibles blancos moleculares para el tratamiento del melanoma [3].

- Respuesta de las mutantes de RAC1 a inhibidores de la señalización

En este trabajo estudiamos el efecto causado por la mutación de RAC1 sobre melanocitos derivados de pacientes. Cuatro de las líneas celulares analizadas contenían mutación de RAC1^{P29S} (YUHEF) de las cuales ésta era única y las otras tres combinadas con NRAS^{Q61K} (WM1960), KRAS^{G12D} (WM1791C), o BRAF^{V600E} (YURIF). Dos líneas celulares más tuvieron mutación en el factor intercambiador de guanin-nucleótido de RAC1 (PREX2) junto con NRAS (WM3619) o BRAF (WM3734). Finalmente líneas con mutaciones simples como BRAF (501mel o 451-Lu), NRAS (YUFIC) o sin mutaciones (YUROB) fueron también utilizadas para el estudio. Por medio de estudios de pull-down observamos que la actividad de PAK estaba claramente elevada en las células con mutación en PREX2 o RAC1, lo que apoya la teoría que sostiene que PREX2 y RAC1 forman parte de una vía junto con PAK (Fig. 6A) [3]. Posteriormente, analizamos como los inhibidores de PAK, MEK y BRAF afectaban la proliferación dependiendo de su genotipo. En todas las mutantes la tasa de proliferación fue prácticamente igual, sin embargo al ser tratadas con un inhibidor de MEK la proliferación disminuyó en todas las líneas celulares. Por otro lado al tratar las células con el inhibidor de PAK (Frax-1036) observamos que únicamente tuvo efecto sobre la mutante simple de RAC1 y la combinada con NRAS o KRAS pero en ninguna otra. Interesantemente la mutante de RAC1 junto con BRAF mostró un efecto parcial con el inhibidor de PAK. Contrario a lo que sucedió al utilizar el inhibidor de BRAF (Vemurafenib), ya que solo las mutantes propias mostraron disminución en la proliferación (Fig. 6 B, C, D, E) [3].

- La activación de RAC está fuertemente relacionada con el aumento en la motilidad.

Realizamos ensayos de migración para demostrarlo y observamos que YUHEF (mutante de RAC1) y YURIF (mutante de RAC1 y BRAF) eran muy sensibles al inhibidor de PAK. Las líneas celulares con mutación en RAC1 y PREX2 (WM1791, WM1960, WM3619 y WM3734) mostraron un efecto parcial. Mientras que las mutantes puras de BRAF (501mel y 451-Lu), NRAS (YUFIC) o WT no presentaron inhibición alguna. Por otro lado el inhibidor de MEK al parecer disminuyó en general la migración celular. En el caso del inhibidor de BRAF tuvo efecto en todas las células con mutación en BRAF, incluyendo las dobles mutantes [3].

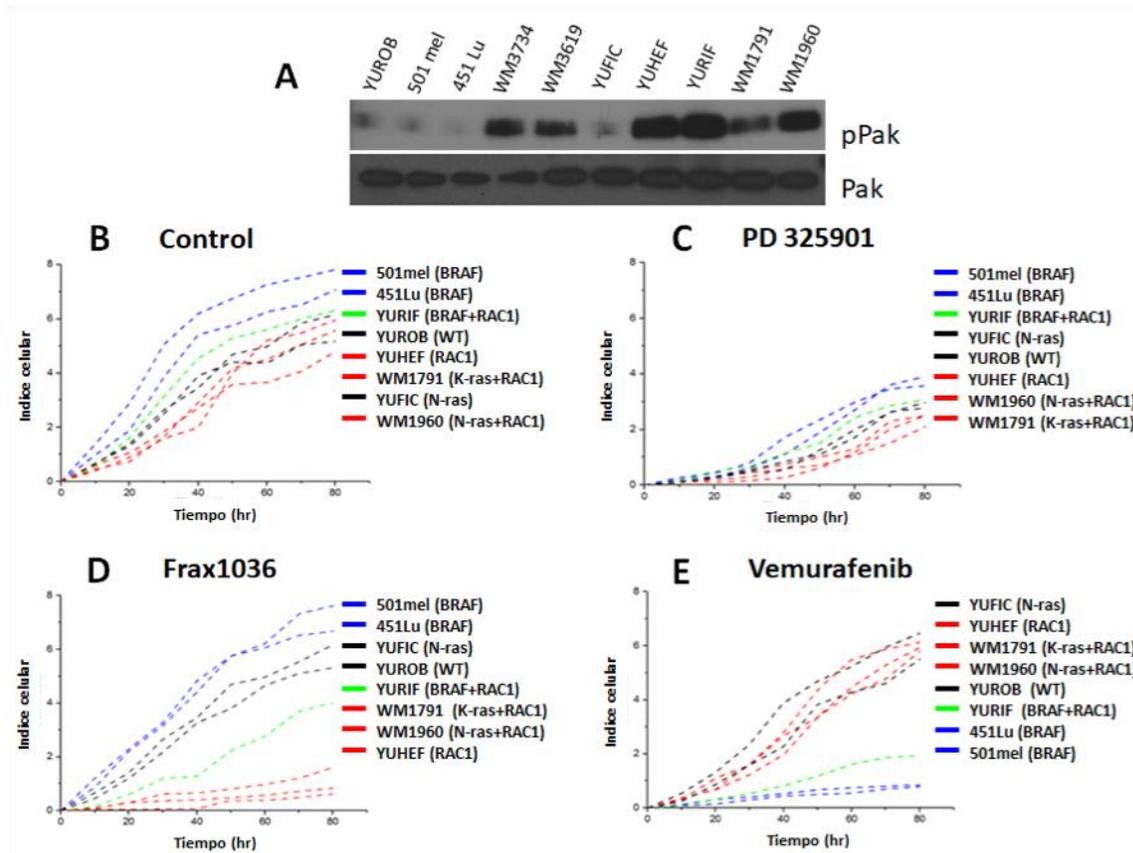


Figura 6. Efecto de inhibidores específicos sobre la proliferación de mutantes de melanoma. Se utilizaron líneas celulares con mutaciones en BRAF, NRAS y RAC1. a) Western blot para la actividad de PAK en líneas celulares. b) Las células fueron cultivadas sin o con tratamiento, c) Inhibidor de MEK PD325901 (100 nM), d) Inhibidor de PAK Frax-1036 (100 nM) ó e) Inhibidor de BRAF Vemurafenib (100 nM). Tomado de Araiza-Olivera D. et al. *Oncogene* 2017.

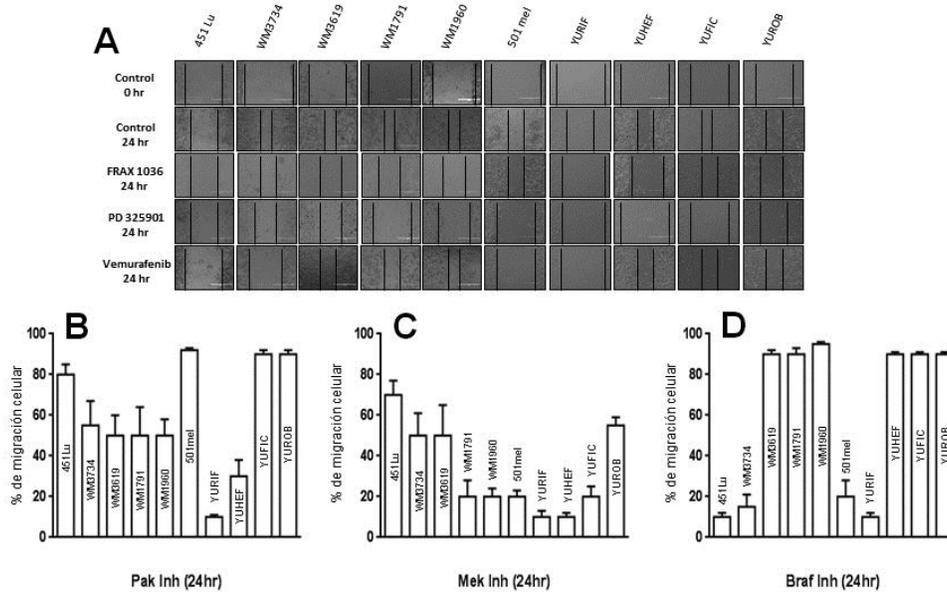


Figura 7. Inhibición de la migración en mutantes de melanoma. a) Se realizó un ensayo de cierre de la herida en cultivos confluentes. Posterior a la herida, las diferentes líneas celulares fueron tratadas con 100 nM de inhibidores de BRAF (Vemurafenib), PAK1 (Frax-1036) o MEK (PD325901). Después de 24 hrs se tomaron imágenes en un microscopio invertido. b-d) Se cuantificó el porcentaje del área libre de células y se comparó contra el control, definido como el 100% de migración. Tomado de Araiza-Olivera D. et al. *Oncogene* 2017.

- Efecto de la inhibición de PAK o BRAF en el crecimiento de xenotransplantes de melanoma.

Finalmente, para analizar el efecto de las pequeñas moléculas inhibitoras *in vivo* realizamos xenotransplantes con tres líneas celulares diferentes que incluían 501mel (BRAF^{V600E}), YURIF (BRAF^{V600E} con RAC1^{P29S}) y YUHEF (RAC1^{P29S}). Los xenotransplantes fueron inyectados de manera subcutánea en ratones desnudos y una vez establecido el tumor se comenzó con el tratamiento. Los ratones que desarrollaron tumor fueron tratados con el vehículo, Frax-1036 o Vemurafenib (30mg/kg/día). El tratamiento con Frax-1036 disminuyó levemente el crecimiento de los tumores 501mel, por otro lado en

los ratones con este mismo tipo de tumor pero tratados con Vemurafenib presentaron tumores significativamente más pequeños. También se observó que el tratamiento con Frax-1036 y Vemurafenib en tumores con células YURIF disminuyó el volumen del tumor en un 50%. Finalmente en los xenotransplantes con células YUHEF hubo una disminución importante al utilizar Frax-1036 pero casi nula con Vemurafenib. La reducción en el tamaño del tumor se asoció con la pérdida de marcadores de proliferación (PCNA y MCM2), de actividad de pPak y pERK, así como por la ganancia de marcadores apoptóticos (Caspasa 3) (Fig. 8) [3].

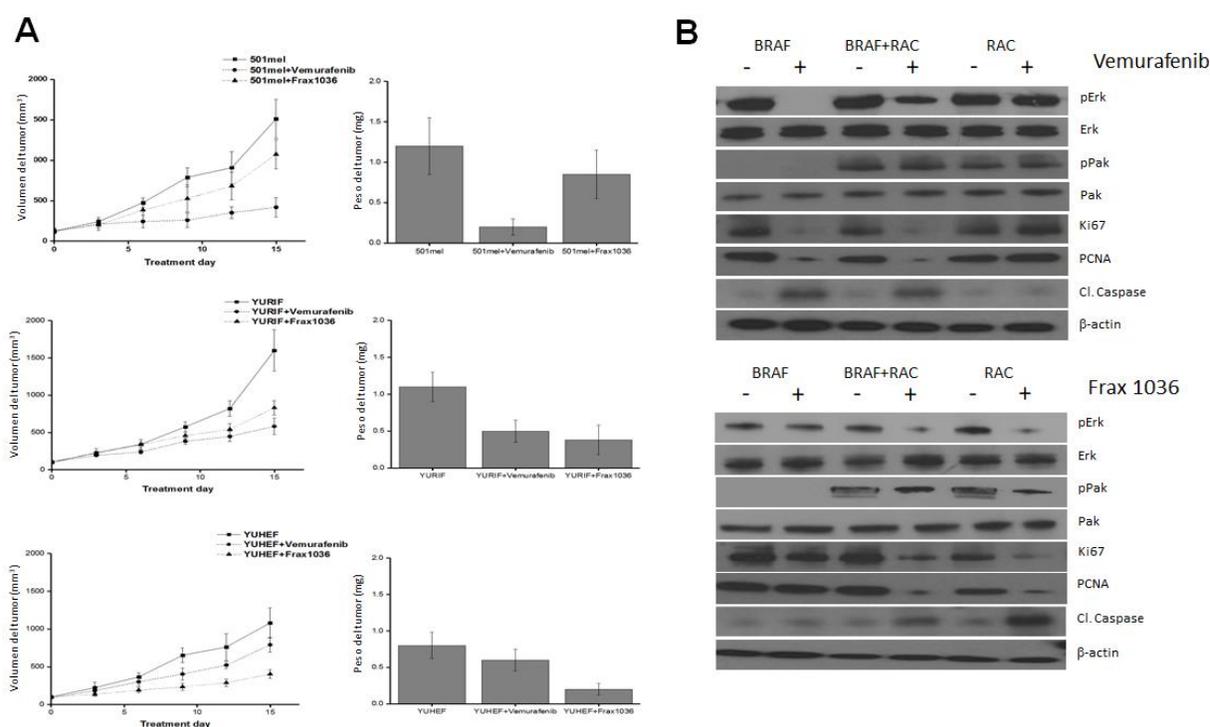


Figura 8. Efecto *in-vivo* de las pequeñas moléculas inhibitoras. Células de melanoma 501mel (BRAF), YURIF (BRAF+RAC1) y YUHEF (RAC1) fueron inyectadas de manera subcutánea en ratones desnudos. a y b) Se midió el cambio en el tamaño y peso del tumor sin y con inhibidor (Vemurafenib y Frax-1036). c) Inmunoblot con marcadores de proliferación (PCNA y MCM2) y de apoptosis. Tomado de Araiza-Olivera D. et al. *Oncogene* 2017.

Si bien es cierto, existen diferencias genéticas entre los xenotransplantes, los estudios *in vitro* y aquellos realizados en pez cebra, en general estos resultados muestran la efectividad de las pequeñas moléculas inhibitoras hacia blancos moleculares específicos.

Conclusión

La vía de las RAS/MAPK controla procesos celulares importantes, por lo que las alteraciones en

líneas somáticas y germinales repercuten el desarrollo del cáncer y enfermedades del desarrollo.

Actualmente existen pocos estudios en los que se analicen los mecanismos moleculares generados por la mutación en RAC^{P29S} en el melanoma. Este cáncer de piel es causado por exposición al sol y por mutaciones principalmente en BRAF, seguido de NRAS y en un 5-7% en RAC1. En este trabajo se evaluó el papel de la mutación RAC^{P29S} en el

melanoma, así como de los potenciales inhibidores para su tratamiento.

Por otro lado también mostramos como la sobreexpresión de RAC1 produce un fenotipo similar al de las Rasopatías en el desarrollo del pez cebra, caracterizado por elongación del eje horizontal del cuerpo acompañado de aumento en la actividad de ERK. El bloqueo de la actividad de PAK mediante las dos pequeñas moléculas inhibitoras al parecer revierte el fenotipo anormal generado por la sobreexpresión de RAC, de igual forma se previene la activación de ERK.

Referencias

- Hernández-Martín, A. y Torrelo, A. (2011) *Actas Dermosifiliográficas*. **102**, 402-416.
- Bellacosa, A. (2013) *Am J Med Genet A*. **161A**, 2788-96.
- Araiza-Olivera, D., Feng, Y., Semenova, G., Prudnikova, T.Y., Rhodes, J., Chernoff, J. (2018) *Oncogene*. **37**(7), 944-952.
- Cheng, Y., Zhang, G. y Li, G. (2013) *Cancer Metastasis Rev*. **32**, 567-84.
- Rauen, K. (2013) *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. **14**, 355-369.
- Tidyman, W., y Rauen, K. (2009) *Current Opinion In Genetics & Development*. **19**, 230-236.
- Ratner, N. y Miller, S. (2015) *Nature Reviews Cancer*. **15**, 290-301.
- Paia, S.Y., Kimb, C. y Williams, D. A. (2010) *Disease Markers*. **29**, 177-187.
- Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R. y Chernoff, J. (2014) *Nat Rev Cancer*. **14**, 13-25.
- Chow, H.Y., Jubb, A.M., Koch, J.N., Jaffer, Z.M., Stepanova, D., Campbell, D.A. (2012) *Cancer Res*. **72**, 5966-5975.
- Anastasaki, C., Rauen, K. y Patton, E. (2012) *Disease Models & Mechanisms*. **5**, 546-552.
- Halaban, R. y Krauthammer, M. (2016) *J Invest Dermatol*. **136**, 1755-9.
- Tsao, H., Chin, L., Garraway, L. y Fisher, D. (2012) *Genes & Development*. **26**, 1131-1155.
- Rigel, D., Friedman, R., Kopf, A. y Polsky, D. (2005) *Archives of Dermatology*. **141**, 1032-1034.
- Orendain-Koch, N., Ramos-Álvarez, M., Ruiz-Leal, A., Sánchez-Deñás, L., Crocker-Sandoval, A., Sánchez-Tenorio, T. e Izquierdo-Álvarez, J. (2015) *Dermatología Revista Mexicana*. **59**, 89-97.
- Garibyan, L. y Fisher, D. (2010) *Current Oncology Reports*. **12**, 319-326.
- Roberts, P. y Der, C. (2007) *Oncogene*. **26**, 3291-3310.
- Chapman, P., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J., Ascierto, P. y Larkin, J. (2011) *New England Journal Of Medicine*. **364**, 2507-2616.
- Hodis, E., Watson, I., Kryukov, G., Arold, S., Imielinski, M. y Theurillat, J. (2012). *Cell*. **150**, 251-263.
- Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B., Evans, P., Bacchiocchi, A. y McCusker, J. (2012) *Nature Genetics*. **44**, 1006-1014.
- Watson, I., Li, L., Cabeceiras, P., Mahdavi, M., Gutschner, T. y Genovese, G. (2014) *Cancer Research*. **74**, 4845-4852.
- Read, J. (2013). *Australasian Journal Of Dermatology*. **54**, 163-172.
- Baker, N., Yee Chow, H., Chernoff, J. y Der, C. (2014). *Clinical Cancer Research*. **20**, 4740-4746.



DRA. DANIELA ARAIZA OLIVERA TORO

Estudió la carrera de Médico Cirujano en la Facultad de Medicina UNAM, donde tuvo la oportunidad de realizar estancias de investigación en el Instituto de Fisiología Celular, en el Instituto Nacional de Cancerología y en el Instituto Nacional

de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran en la Ciudad de México.

En el presente trabajo se muestra la relación que existe entre las enfermedades del desarrollo y la predisposición al cáncer. Actualmente la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos donde se compartan características moleculares y clínicas de las patologías puede ser una buena estrategia para que en el futuro se utilicen las mismas moléculas para ambas condiciones, tomando en cuenta blancos moleculares específicos. Se espera que esta especificidad le confiera mayor biodisponibilidad, menor toxicidad y resistencia a los tratamientos.

de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran en la Ciudad de México.

Obtuvo el grado de Maestra y Doctora en Ciencias Bioquímicas bajo la asesoría del Dr. Salvador Uribe Carvajal en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Durante el doctorado llevó a cabo otra estancia de investigación en el London Research Institute UK con la supervisión del Dr. Thomas Surrey. Posteriormente, trabajó en una estancia postdoctoral con el Dr. Jonathan Chernoff en el Fox Chase Cancer Center, EUA.

De su trabajo científico se han publicado 9 artículos de investigación internacional y un capítulo de libro. Ha presentado su trabajo en múltiples congresos nacionales e internacionales.

Imparte clases de Bioquímica en la Facultad de Medicina, así como en el Posgrado de Ciencias

Bioquímicas, UNAM.

Actualmente se encuentra adscrita al Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química (IQ) de la UNAM, en el

marco del Programa Cátedras CONACYT.

Su laboratorio está enfocado al análisis del efecto de moléculas orgánicas e inorgánicas sintetizadas en el IQ en el metabolismo y señalización de células tumorales como posibles blancos terapéuticos.
