

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**TESIS DOCTORAL**

**Papel de Src quinasas en invasión y de mircoRNAs en  
resistencia a quimioterapia en células de melanoma**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Marta Díaz Martínez**

Director

**Joaquín Teixidó Calvo**

**Madrid, 2018**

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC  
Departamento de Medicina Celular y Molecular



---

# **Papel de Src quinasas en invasión y de microRNAs en resistencia a quimioterapia en células de melanoma**

---

Tesis Doctoral  
**Marta Díaz Martínez**

Dirigida por Joaquín Teixidó Calvo



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**

**Papel de Src quinasas en invasión y de  
microRNAs en resistencia a  
quimioterapia en células de melanoma**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Marta Díaz Martínez**

**Bajo la dirección del Doctor**

**Joaquín Teixidó Calvo**

**Madrid, 2017**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**

# **Papel de Src quinasas en invasión y de microRNAs en resistencia a quimioterapia en células de melanoma**

Este trabajo ha sido realizado por **Marta Díaz Martínez** para optar al Grado de Doctor, en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (CSIC), bajo la dirección del Dr. Joaquín Teixidó Calvo.

Fdo. Dr. Joaquín Teixidó Calvo





*-AGRADECIMIENTOS-*



En primer lugar, quería agradecer a Joaquín por ofrecerme la posibilidad de realizar la Tesis en melanoma y por dirigirme en este proyecto.

A Eva Hernando, por recibirme en su laboratorio durante mi estancia, por hacerme partícipe de sus proyectos y por sus sugerencias en el mundo de los miRNAs y la resistencia.

Gracias a Ángeles García Pardo, Santiago Rodríguez de Córdoba e Ignacio Casal, por su consejo científico y reactivos varios.

Agradecimientos a nuestros colaboradores del Blk, Isabel Mérida y Pedro Torres-Ayuso, Paloma Sánchez-Mateos y Rafa Samaniego. Así como a José Luis Rodríguez Peralto y Erica Rivero por interesarse en nuestro proyecto de resistencia.

Gracias mil a todas mis compañeras de laboratorio, por ayudarme siempre que lo he necesitado y por poner tantas sonrisas a todos estos años. Gracias infinitas Nohemí, Mónica, Lucía y Silvia. Así como a las nuevas o pasajeras incorporaciones, Patri, Paula, Roger, Anna y Celia, y a nuestra italiana favorita Sam. Gracias a todos los que pasaron por el laboratorio, Ana, Alicia, Georgina, Pablo, Sole y David. Gracias especiales a Rubén, por enseñarme el mundo del melanoma y compartir tu proyecto conmigo.

Gracias al laboratorio 142, extensión del nuestro, y parte fundamental para mí. Gracias a todas, Noemí, Elvira, Estefi, Irene, Alejandra, Rebeca, Lara, Mónica y Clara.

Gracias a la gente del laboratorio de Ignacio Casal por consejos y ayuda en momentos varios, Bea, Sofía, Eva, Rodrigo, Roi, Alberto e Irene. Gracias igualmente a la gente del laboratorio de Santiago, y muy especialmente a Emi. A Sheila, Agustín, Marta, Elena, Jesús, Lucía, Ángela, Héctor, Adrián y Josué.

Gracias especiales a Lola, por toda su implicación en el proyecto de resistencia, por enseñarme tantas cosas sobre el análisis de la secuenciación y por todos sus consejos.

Gracias también a Gema, Helga, Carol, Jesús, M<sup>a</sup> Ángeles, Adela, Patri y Miguelito por compartir momentos en el CIB.

Gracias al laboratorio de Eva Hernando, por hacerme sentir tan bien durante mi estancia y por toda su colaboración y consejos. Gracias especialmente a Lisa por implicarme en su proyecto y enseñarme sobre los miRNAs. También a Doug, Elena, Rana, Verónica, Marc, Raffi, Claudia, Bárbara, Luca, Alejandro, Praveen, Alfredo y Laura. Gracias mil a Vanessa, sin ella el lab y New York no hubieran sido lo mismo.

Gracias a mis Bios, Sara, Marian, Esti, Martus, Lucía, María, Tole, Javi y Pablo.

Gracias a Rubén por su apoyo incondicional y por estar siempre.

Gracias a mi familia, sin ellos no habría nada.

Por último, gracias a todas y todos los autores que aparecen en esta Bibliografía, cuyo conocimiento e investigaciones han contribuido a que esta Tesis sea posible.



*-ÍNDICE-*



**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
<b>I. EL MELANOMA Y SUS MECANISMOS DE INVASIÓN</b>	<b>23</b>
El melanoma	23
Las quimioquinas y sus receptores: implicación en invasión tumoral y metástasis	25
Receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas y sus efectores	26
La familia $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$	28
Las GTPasas monoméricas	30
La familia de las GTPasas Rho: implicaciones en la migración celular	31
Las proteínas RhoGAP: reguladores negativos de la actividad de las GTPasas Rho	33
<i>La subfamilia p190RhoGAP</i>	33
La familia de las Src quinasas	34
<i>Blk (-B lymphocyte kinase)</i>	37
<b>II. MELANOMA, RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA Y miRNAS</b>	<b>38</b>
Tratamiento del melanoma	38
Vemurafenib: Un inhibidor específico de BRAF V600E	39
La vía de las MAP-quinasas: implicaciones de la mutación BRAF V600E en melanoma	40
<i>La mutación BRAF V600E</i>	43
Activación de la vía de las MAP-quinasas en células BRAF <i>wild type</i> tratadas con vemurafenib	44
Mecanismos de resistencia a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas	44
<i>Alteraciones en BRAF que reactivan la vía de las MAP-quinasas</i>	46
<i>Alteraciones en otros componentes de la vía de las MAP-quinasas</i>	46
<i>Alteraciones en la vía PI3-quinasa/AKT</i>	47
<i>Alteraciones en el ciclo celular</i>	48
<i>Otras alteraciones</i>	49
MicroRNAs	50
miRNAs y cáncer: papel de miRNAs en melanoma	53
miRNAs en la resistencia a agentes quimioterapéuticos	55
<b>OBJETIVOS</b>	<b>57</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>61</b>
Líneas celulares	63
Generación de células de melanoma resistentes a inhibidores de la vía MAP-quinasas	63
Anticuerpos	64

Vectores de expresión y siRNAs	66
Purificación de proteínas recombinantes	68
Transfecciones transitorias	69
Infección retroviral y lentiviral	69
<i>Western blotting</i>	70
Inmunoprecipitación	71
Ensayos de actividad GTPasa ( <i>pull down</i> )	71
Ensayo de <i>pull down</i> con proteína purificada	72
Ensayo quinasa <i>in vitro</i>	72
Ensayo de fraccionamiento celular	73
Ensayo de invasión celular a través de Matrigel	73
Ensayos de viabilidad celular	74
Ensayos de proliferación celular	74
Ensayo de formación de colonias en <i>Soft Agar</i>	75
Ensayo de adhesión celular	75
Microscopía confocal	75
Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	75
Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR)	77
Secuenciación de RNA de pequeño tamaño ( <i>Small RNA-Seq</i> ) y análisis de datos	80
Ensayos de formación de tumores y metástasis <i>in vivo</i>	82
Análisis estadístico	82
<b>RESULTADOS</b>	<b>83</b>
I. LA VIA DE SEÑALIZACIÓN $G\alpha_{13}$ -Blk-p190RhoGAP REGULA LA ACTIVACIÓN DE RhoA Y LA INVASIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA A CXCL12	85
Implicación de Blk en la fosforilación de p190RhoGAP tras la activación de $G\alpha_{13}$	85
El silenciamiento de Blk rescata la activación de RhoA y la invasión en células que expresan $G\alpha_{13}$ activo	91
Efecto de la sobre-expresión de Blk en la fosforilación de p190RhoGAP, activación de RhoA e invasión celular	92
Efecto de la expresión ectópica de Blk en la fosforilación de p190RhoGAP y en la activación de RhoA	98
La activación de $G\alpha_{13}$ promueve la disociación del complejo $G\alpha_{13}$ -Blk y favorece la posterior asociación de Blk con p190RhoGAP	101
Blk muestra actividad quinasa <i>in vitro</i> hacia GST-p190RhoGAP	103
Blk regula la migración y diseminación pulmonar de células de melanoma	104
II. PAPEL DE miRNAs EN LA RESISTENCIA DE CÉLULAS DE MELANOMA A INHIBIDORES DE LA VIA DE LAS MAP-QUINASAS	109
Sensibilidad de las células A375 y SK-Mel-103 a los inhibidores vemurafenib, trametinib y SCH772984	109
Generación de líneas celulares de melanoma resistentes a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas	110

Caracterización de líneas celulares de melanoma resistentes a vemurafenib	111
Análisis <i>in vivo</i> de formación de tumores de las células de melanoma resistentes a vemurafenib	114
Caracterización de las vías de señalización Ras-RAF-MEK-ERK y PI3-quinasa/AKT en las células de melanoma resistentes a vemurafenib	115
Análisis de la sensibilidad de células resistentes a vemurafenib a otros inhibidores de la vía de las MAP-quinasas	118
Análisis de las propiedades invasivas y adhesivas de las células A375-VR	120
Caracterización de las células de melanoma A375-TR y A375-VR/TR	123
Caracterización de las células de melanoma resistentes a SCH772984	128
La resistencia a vemurafenib o trametinib induce alteraciones en los perfiles de expresión de miRNAs en células de melanoma	129
Análisis de la expresión de los miRNAs seleccionados en cohortes de pacientes con melanoma cutáneo	131
Validación mediante qPCR de los cambios en la expresión de miRNAs en células A375-VR	132
Análisis de la estabilidad y de la dinámica de los cambios en la expresión de los miRNAs en respuesta a vemurafenib	133
Análisis de la regulación de la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p por inhibidores de MEK1/2 y ERK1/2	135
Expresión de los miRNAs seleccionados en otras células de melanoma resistentes a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas	138
La mayor expresión de miR-211-5p en células A375-VR correlaciona con el aumento de expresión de TRPM1	140
Papel de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en la resistencia a vemurafenib en células de melanoma A375	141
Análisis de la activación de la vía de las MAP-quinasas y de PI3-quinasa/AKT en los transfectantes de miRNA	145
Análisis de la expresión de potenciales dianas de los miRNAs seleccionados	147
Análisis de la expresión de mRNAs implicados en la transición epitelio-mesénquima en células A375-VR	151
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>153</b>
I. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN $G\alpha_{13}$ -Blk-p190RhoGAP REGULA LA ACTIVACIÓN DE RhoA Y LA INVASIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA A CXCL12	155
II. PAPEL DE miRNAs EN LA RESISTENCIA DE CÉLULAS DE MELANOMA A INHIBIDORES DE LA VÍA DE LAS MAP-QUINASAS	161

Caracterización de las células de melanoma resistentes a vemurafenib y trametinib	161
Identificación y caracterización de miRNAs alterados en células de melanoma resistentes a vemurafenib	165
Papel de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en la resistencia de células de melanoma a vemurafenib	168
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>175</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>179</b>
<b>DATOS SUPLEMENTARIOS</b>	<b>213</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>221</b>
<b>Anexo I:</b> A Blk-p190RhoGAP signaling module downstream of activated Gα13 functionally opposes CXCL12-stimulated RhoA activation and cell invasion. <i>Cellular Signalling</i> . Vol. 26, nº 11 2551-2561, 2014.	225
<b>Anexo II:</b> Increased expression of miR-204-5p and miR-211-5p in response to vemurafenib provides early survival to melanoma cells. <i>En preparación</i> .	239
<b>Anexo III:</b> MicroRNA-125a promotes resistance to BRAF inhibitors through suppression of the intrinsic apoptotic pathway. <i>Pigment Cell &amp; Melanoma Research</i> . 2017. Prepublicado <i>online</i> .	243

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Progresión del melanoma	24
<b>Figura 2.</b> Señalización desencadenada tras la activación de los GPCRs	27
<b>Figura 3.</b> Ciclo de activación/inactivación de proteínas Gα <sub>12/13</sub> heterotriméricas	28
<b>Figura 4.</b> Regulación de GTPasas Rho	30
<b>Figura 5.</b> Dendrograma de la familia de GTPasas Rho	32
<b>Figura 6.</b> Dendrograma de los miembros de la familia de las Src quinasas	35
<b>Figura 7.</b> Estructura en dominios de las SFKs	35
<b>Figura 8.</b> Modelo de activación de las SFKs	36
<b>Figura 9.</b> Señalización de la vía de las MAP-quinasas	41
<b>Figura 10.</b> Mecanismos de resistencia a inhibidores de BRAF	45
<b>Figura 11.</b> Biogénesis de miRNAs	52
<b>Figura 12.</b> Análisis de la fosforilación de p190RhoGAP en células BLM y MDA-MB-231 transfectadas con Gα <sub>13</sub> wt o Gα <sub>13</sub> QL	85
<b>Figura 13.</b> Expresión de Src quinasas en células BLM y MDA-MB-231	86
<b>Figura 14.</b> Expresión de Blk en células BLM	87
<b>Figura 15.</b> Implicación de Blk en la fosforilación de p190RhoGAP tras activación de Gα <sub>13</sub>	88
<b>Figura 16.</b> El silenciamiento de c-Src no afecta a la fosforilación de p190RhoGAP en los transfectantes Gα <sub>13</sub> wt y Gα <sub>13</sub> QL	89
<b>Figura 17.</b> El silenciamiento de Blk inhibe la fosforilación de p190RhoGAP en células expuestas a LPC o CXCL12	90
<b>Figura 18.</b> El silenciamiento de Gα <sub>13</sub> no afecta a la fosforilación de p190RhoGAP inducida por CXCL12	90
<b>Figura 19.</b> El silenciamiento de Blk en células con Gα <sub>13</sub> activo rescata la	92

activación de RhoA y la invasión celular	
<b>Figura 20.</b> Generación de transfectantes con expresión de diferentes formas de Blk	93
<b>Figura 21.</b> La sobre-expresión de Blk se traduce en aumento de fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP en respuesta a la activación de $G\alpha_{13}$	94
<b>Figura 22.</b> La expresión de Blk Y501A se traduce en un incremento de la fosforilación de p190RhoGAP	95
<b>Figura 23.</b> La sobre-expresión de Blk inhibe la activación de RhoA y bloquea la invasión celular tras activación de $G\alpha_{13}$	96
<b>Figura 24.</b> El silenciamiento de p190RhoGAP rescata la invasión inhibida por la sobre-expresión de Blk	97
<b>Figura 25.</b> La sobre-expresión de una forma activa de RhoA rescata la invasión inhibida por Blk	98
<b>Figura 26.</b> Análisis de la expresión de Blk en líneas celulares de melanoma	99
<b>Figura 27.</b> Expresión ectópica de Blk en células A375 y MDA-MB-231	100
<b>Figura 28.</b> La transfección de Blk en células con baja expresión o ausencia de expresión de Blk promueve la fosforilación de p190RhoGAP y la disminución de la activación de RhoA	100
<b>Figura 29.</b> El tratamiento con pervanadato de sodio aumenta la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP	101
<b>Figura 30.</b> La activación de $G\alpha_{13}$ regula las asociaciones $G\alpha_{13}$ -Blk y Blk-p190RhoGAP	102
<b>Figura 31.</b> Asociación $G\alpha_{13}$ -Blk en células T Molt-4	103
<b>Figura 32.</b> Asociación de la proteína recombinante GST-Blk wt con $G\alpha_{13}$	103
<b>Figura 33.</b> Blk posee actividad quinasa <i>in vitro</i> hacia GST-p190RhoGAP	104
<b>Figura 34.</b> Papel de Blk en la migración <i>in vivo</i> de células de melanoma a pulmón	105
<b>Figura 35.</b> Aumento de supervivencia en ratones SCID inoculados con células de melanoma que sobre-expresan Blk	106
<b>Figura 36.</b> La sobre-expresión de Blk $\Delta$ Ct en células de melanoma inhibe el crecimiento celular	107
Figura 37. Caracterización de las mutaciones en <i>BRAF</i> y <i>NRAS</i> , y de la expresión de PTEN en las líneas celulares A375 y SK-Mel-103	109
<b>Figura 38.</b> Respuesta de las células A375 y SK-Mel-103 a inhibidores de la vía MAP-quinasas	110
<b>Figura 39.</b> Generación de líneas celulares de melanoma resistentes a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas	111
<b>Figura 40.</b> Caracterización de la viabilidad de las células A375-VR en presencia de vemurafenib	112
<b>Figura 41.</b> Estabilidad de la resistencia a vemurafenib de las células A375-VR	113
<b>Figura 42.</b> Análisis de la capacidad proliferativa de las células A375 y A375-VR en ausencia o presencia de vemurafenib	114
<b>Figura 43.</b> Análisis <i>in vivo</i> de la formación de tumores y supervivencia en ratones inoculados con células A375 o A375-VR	115
<b>Figura 44.</b> Las células resistentes a vemurafenib muestran un aumento de la activación de componentes de la vía de las MAP-quinasas	116
<b>Figura 45.</b> Las células A375-VR poseen mayor activación de Ras y muestran expresión <i>de novo</i> de una isoforma de BRAF	117

<b>Figura 46.</b> Las células A375-VR presentan mayor activación de la vía PI3-quinasa/AKT que las parentales	118
<b>Figura 47.</b> Resistencia parcial de las células A375-VR a trametinib y SCH772984	119
<b>Figura 48.</b> Las células A375-VR muestran resistencia parcial al tratamiento combinado de vemurafenib con trametinib o SCH772984	120
<b>Figura 49.</b> Bloqueo de la capacidad invasiva de las células A375-VR	121
<b>Figura 50.</b> Aumento de la activación de Rac y RhoA en las células A375-VR	122
<b>Figura 51.</b> La resistencia a vemurafenib de las células A375-VR es independiente del aumento en la activación de Rac	123
<b>Figura 52.</b> Caracterización de la viabilidad y proliferación de células A375-TR	124
<b>Figura 53.</b> Caracterización de la activación de MEK1/2 y ERK1/2 en las células A375-TR	124
<b>Figura 54.</b> Las células A375-TR poseen mayor activación de Ras que las parentales	125
<b>Figura 55.</b> Las células A375-TR presentan mayor activación de la vía de señalización PI3-K/AKT	125
<b>Figura 56.</b> Caracterización de la sensibilidad de las células A375-TR a vemurafenib y al tratamiento combinado de vemurafenib con trametinib	126
<b>Figura 57.</b> Caracterización de la capacidad invasiva y adhesiva de las células resistentes a trametinib	126
<b>Figura 58.</b> Caracterización inicial de las células SK-Mel-103-TR	127
<b>Figura 59.</b> Caracterización de la sensibilidad de las células A375-VR/TR al vemurafenib, trametinib o a su combinación	128
<b>Figura 60.</b> Caracterización de las células resistentes a SCH772984	128
<b>Figura 61.</b> Variabilidad en la alteración de la expresión de miRNAs en células resistentes a vemurafenib o trametinib	131
<b>Figura 62.</b> Expresión de los miRNAs seleccionados en pacientes con melanoma cutáneo	132
<b>Figura 63.</b> Validación de los cambios en la expresión de los miRNAs seleccionados	133
<b>Figura 64.</b> Las alteraciones en la expresión de los miRNAs de las células A375-VR son estables e independientes de la presencia de vemurafenib	133
<b>Figura 65.</b> Análisis de la dinámica en los cambios de expresión de los miRNAs tras el tratamiento de las células A375 con vemurafenib	134
<b>Figura 66.</b> Análisis de dosis-respuesta de los cambios en la expresión de miRNAs tras el tratamiento con vemurafenib	135
<b>Figura 67.</b> Análisis de la regulación de la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p por trametinib o SCH772984, y por el tratamiento combinado de vemurafenib y trametinib	136
<b>Figura 68.</b> Modificación de la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en células SK-Mel-28 tras el tratamiento con vemurafenib o la combinación vemurafenib y trametinib	137
<b>Figura 69.</b> Alteraciones en la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en células dobles resistentes a vemurafenib y trametinib	137
<b>Figura 70.</b> Análisis de la expresión de los miRNAs seleccionados en células A375-TR y A375-ER	138

<b>Figura 71.</b> Expresión de los miRNAs seleccionados en clones de células SK-Mel-239 resistentes a vemurafenib	139
<b>Figura 72.</b> Expresión de los miRNAs seleccionados en células SK-Mel-239 dobles resistentes a vemurafenib y a PD0325901	139
<b>Figura 73.</b> Aumento de la expresión del mRNA de TRPM1 en células A375-VR	140
<b>Figura 74.</b> Generación de células A375 con sobre-expresión estable de miR-204-5p o miR-211-5p, o silenciamiento de miR-140-3p	141
<b>Figura 75.</b> Las células A375 con sobre-expresión de miR-204-5p o miR-211-5p muestran resistencia a vemurafenib	142
<b>Figura 76.</b> Generación de células A375 Triple-miR y caracterización de su viabilidad frente a vemurafenib	143
<b>Figura 77.</b> Los transfectantes H-miR-204, H-miR-211 y Triple-miR muestran un aumento de viabilidad frente a trametinib o al tratamiento combinado de vemurafenib y trametinib	143
<b>Figura 78.</b> Los transfectantes Triple-miR presentan mayor viabilidad frente al tratamiento combinado de vemurafenib y SCH772984	144
<b>Figura 79.</b> Aumento de la capacidad proliferativa en presencia de vemurafenib de transfectantes con sobre-expresión de miR-204-5p o miR-211-5p, y de los transfectantes Triple-miR	145
<b>Figura 80.</b> Análisis de la activación de la vía de las MAP-quinasas en los transfectantes de miRNA	146
<b>Figura 81.</b> Análisis de la activación de la vía PI3-quinasa/AKT en los transfectantes de miRNA	146
<b>Figura 82.</b> Análisis de la expresión de BRAF en los transfectantes de miRNA	147
<b>Figura 83.</b> Análisis de la expresión de dianas comunes de miR-204-5p y miR-211-5p	148
<b>Figura 84.</b> Análisis de la expresión de efrina-B2 en los transfectantes de miRNA y en células A375-VR	149
<b>Figura 85.</b> Análisis de la expresión de potenciales dianas de miR-204-5p	149
<b>Figura 86.</b> Análisis de la expresión de dianas del miR-211-5p	150
<b>Figura 87.</b> Análisis de la expresión de dianas del miR-140-3p	150
<b>Figura 88.</b> Las células A375-VR presentan un aumento de la expresión de ZEB2 y Smad	151
<b>Figura 89.</b> Morfología de las células A375 y A375-VR y análisis de la expresión de E-cadherina	152
<b>Figura 90.</b> Modelo de la implicación de la vía $G\alpha_{13}$ -Blk-p190RhoGAP en la regulación de la activación de RhoA y de la invasión celular	158
<b>Figura 91.</b> Modelo de los eventos moleculares desencadenados tras estimulación combinada de $G\alpha_i$ y $G\alpha_{13}$ que causan inactivación de RhoA e inhibición de invasión celular	159
<b>Figura 92.</b> Modelo de la contribución de miRNAs a la adquisición de resistencia de células de melanoma a vemurafenib	168

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Anticuerpos empleados	65
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos empleados para las clonaciones de Blk en los distintos vectores	67
<b>Tabla 3.</b> Relación de siRNAs utilizados	68
<b>Tabla 4.</b> Relación de los oligonucleótidos empleados en los ensayos de RT-PCR	77
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-qPCR	78
<b>Tabla 6.</b> miRNAs diferencialmente expresados en las células A375-VR respecto de las A375, obtenidos mediante el análisis con el paquete DESeq2	129
<b>Tabla 7.</b> miRNAs diferencialmente expresados en las células A375-TR respecto de las A375, obtenidos mediante el análisis con el paquete DESeq2	215
<b>Tabla 8.</b> miRNAs diferencialmente expresados en las células SK-Mel-103-TR respecto de las SK-Mel-103, obtenidos mediante el análisis con el paquete DESeq2	218
<b>Tabla 9.</b> miRNAs diferencialmente expresados en las células A375-VR respecto de las A375, obtenidos mediante el análisis con la librería BioSAGE	130

*-ABREVIATURAS-*



**A**

ABL2	<i>Abelson tyrosine-protein kinase 2</i> , proteína tirosina quinasa 2 Abelson.
AGO	<i>Argonaute</i> , argonauta.
AMP	<i>Adenosine monophosphate</i> , adenosín monofosfato.
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> , proteína quinasa activada por AMP.
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , análisis de la varianza.
ARF	<i>Alternative reading frame</i> , marco de lectura alternativo.
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , adenosín trifosfato.

**B**

Bax	<i>Bcl2 associated X protein</i> , proteína X asociada a Bcl2.
BCEF-AM	<i>2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6')-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester</i> , 2'7'-bis (carboxietil)-5(6')-carboxifluoresceinato de acetoximetil ester.
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i> , linfoma de células B 2.
Bcl2l2	<i>Bcl2-like protein 2</i> , proteína 2 similar a Bcl2.
Blk	<i>B lymphocyte kinase</i> , quinasa de linfocitos B.
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino.
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i> , tirosina quinasa de Bruton.

**C**

cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> , adenosín monofosfato cíclico.
CCR-	<i>C-C motif chemokine receptor</i> , receptor de quimioquinas con motivo C-C.
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i> , proteína homóloga de control de división celular 42.
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> , quinasa dependiente de ciclina.
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , ADN complementario.
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i> , proteína fluorescente cian.
CHD5	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 5</i> , cromohelicasa de unión al ADN 5.
Chk	<i>Csk-homologous kinase</i> , quinasa homóloga a Csk.
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i> , proteína homóloga a C/EBP.
COT	<i>Cancer Osaka Thyroid</i> , cáncer Osaka tiroidea.
CREB	<i>cAMP response element-binding</i> , elementos de respuesta a cAMP.
CSK	<i>C-terminal Src kinase</i> , quinasa del extremo C-terminal de Src.
c-Src	<i>Cellular Src kinase</i> , quinasa celular Src.
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> , antígeno 4 de linfocito T citotóxico.
Ctrl	Control.

CXCL12	<i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i> , quimioquina ligando 12 con motivo C-X-C.
CXCR-	<i>C-X-C motif chemokine receptor</i> , receptor de quimioquinas con motivo C-X-C.

## D

DAPI	<i>4'6'-diamidino-2-phenylindole</i> , 4'6-diamidino-2-fenilindol.
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i> , region 8 crítica del síndrome DiGeorge.
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , medio de Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> , dimetil sulfóxido.
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico.
dNTPs	<i>Deoxyribonucleotide triphosphates</i> , desoxirribonucleótidos trifosfato.
DTT	<i>Dithiothreitol</i> , ditiotreitól.
DUSP	<i>Dual-specificity phosphatase</i> , fosfatasa de especificidad dual.

## E

EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , ácido etileno-diamino-tetraacético.
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , factor de crecimiento epidérmico.
EGFR	<i>EGF receptor</i> , receptor de EGF.
EGTA	<i>Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl)-N, N, N',N'-tetraacetic acid</i> , etileno-glicol-bis(β-aminoetil)-N, N, N',N'-tetra-acético.
EMT	<i>Epithelium to mesenchyma transition</i> , transición epitelio-mesénquima.
ER	<i>ERK resistant</i> , resistente a ERK.
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2</i> , quinasa regulada por señales extracelulares.

## F

FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> , quinasa de adhesión focal.
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , suero fetal bovino.
FC	<i>Fold change</i> , tasa de cambio.
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Administración de Alimentos y Medicamentos.
FDR	<i>False discovery rate</i> , tasa de descubrimiento falso.
FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2</i> , factor de crecimiento de fibroblastos 2.
FGFR2	<i>FGF receptor 2</i> , receptor 2 de FGF.

Fgr	<i>Feline Gardner-Rasheed sarcoma viral homolog</i> , homólogo del virus felino Gardner-Rasheed.
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoresceína.
FN	Fibronectina.

## G

G, fase	<i>Growth phase</i> , fase de crecimiento.
GADD	<i>Growth arrest and DNA damage inducible protein</i> , proteína inducible por parada del crecimiento y daño en el DNA.
GAP	<i>GTPase-activating protein</i> , proteína activadora de actividad GTPasa.
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GDI	<i>GDP-dissociation inhibitor</i> , inhibidor de disociación de GDP.
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i> , guanosín difosfato.
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i> , factor intercambiador de nucleótidos de guanina.
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , proteína verde fluorescente.
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> , receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas.
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> , proteína 2 de unión a receptor de factor de crecimiento.
GSK3-β	<i>Glycogen synthase kinase-3-β</i> , glucógeno sintasa quinasa 3-β.
GST	<i>Gluthation sulphur transferase</i> , transferasa de azufre a glutatión.
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i> , guanosín trifosfato.
GTPasa	Guanosina trifosfatasa.

## H

Hck	<i>Hematopoietic cell kinase</i> , quinasa de células hematopoyéticas.
HEPES	<i>4-(2-hidroxethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid</i> , ácido 4-(2-hidroxietil) piperacina-1-etanosulfónico.
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> , factor de crecimiento de hepatocitos.
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma viral homolog</i> , homólogo del virus de sarcoma de rata de Harvey.
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano.

## I

IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> , factor de crecimiento insulínico.
-----	---

IGFBP5	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 5</i> , proteína 5 de unión al factor de crecimiento insulínico.
IGF-R	<i>Insulin-like growth factor receptor</i> , receptor del factor de crecimiento insulínico.
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> , isopropil-β-D-1 tiogalactopiranosido.

## J

Jak	<i>Janus kinase</i> , quinasa janus.
JNK1	<i>c-Jun N-terminal kinase 1</i> , quinasa N-terminal de c-Jun 1.

## K

KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral homolog</i> , homólogo del virus de sarcoma de rata de Kirsten.
------	--

## L

Lck	<i>Lymphocyte cell-specific protein- tyrosine kinase</i> , proteína tirosina quinasa específica de linfocitos.
LOF	<i>Loss of function</i> , pérdida de función.
LPC	<i>Lysophosphatidylcholine</i> , lisofosfatidilcolina.
Lyn	<i>Lck/Yes novel tyrosine kinase</i> , nueva tirosina quinasa Lck/Yes.

## M

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> , proteínas quinasa activadas por mitógenos.
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i> , doble minuto murino.
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i> , quinasa de MAPK/ERK.
miRISC	<i>miRNA-containing RNA induced silencing complex</i> , complejo de silenciamiento inducido por RNA asociado a miRNA.
miRNA	microRNA.
<i>Mirsups</i>	<i>Tumor suppressor miRNAs</i> , miRNAs supresores tumorales.
MITF	<i>Microphthalmia-associated transcription factor</i> , factor de transcripción asociado con microftalmia.
MLC	<i>Myosin light chain</i> , cadena ligera de la miosina.
MMP-2	<i>Matrix metalloproteinase-2</i> , metaloproteinasas de matriz 2.

MOPS	<i>3-(N-morpholino) propanesulfonic acid</i> , ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico.
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> , diana de rapamicina en mamíferos.
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> , bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio.
MT1-MMP	<i>Membrane type 1-matrix metalloproteinase</i> , metaloproteínasa de matriz de membrana tipo-1.

## N

NEDD9	<i>Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9</i> , proteína 9 disminuída en el desarrollo de células precursoras neurales.
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i> , factor nuclear de células T activadas.
NF1	<i>Neurofibromin 1</i> , neurofibromina 1.
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> , secuenciación de nueva generación.
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral homolog</i> , homólogo de RAS viral de neuroblastoma.
NSG	<i>NOD scid gamma</i> .

## O

<i>Oncomirs</i>	<i>Oncogenic miRNAs</i> , miRNAs oncogénicos.
-----------------	---

## P

p	<i>p-value</i> , p-valor.
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en geles de poliacrilamida.
PAK	<i>p-21 activated kinase</i> , quinasa activada por p-21.
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , solución salina tamponada con fosfatos.
PDE $\delta$	<i>Phosphodiesterase <math>\delta</math></i> , fosfodiesterasa $\delta$ .
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> , factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i> , receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PDK	<i>3-Phosphoinositide-dependent protein kinase</i> , proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos.
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i> , ligando 1 de muerte programada.
PD-1	<i>Programmed death receptor-1</i> , receptor 1 de muerte programada.
PERK	<i>Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i> , quinasa de retículo endoplasmático similar a quinasa dependiente de ARN.

PI3-K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> , fosfatidilinositol 3-quinasa.
PI <sub>(3,4,5)</sub> P3	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i> , fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.
PI <sub>(4,5)</sub> P2	<i>Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i> , fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
PLC	<i>Phospholipase C</i> , fosfolipasa C.
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> , fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
POU3F2	<i>Pou domain class 3, transcription factor 2</i> , factor de transcripción 2, dominio Pou de clase 3.
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> , homólogo de fosfatasa y tensina.
PTP	<i>Protein tyrosine phosphatase</i> , proteína tirosina fosfatasa.
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> , difluoruro de polivinilideno.
Pyk2	<i>Proline-rich tyrosine kinase 2</i> , tirosina quinasa 2 rica en prolinas.
p90RSK	<i>p90 ribosomal S6 kinase</i> , p90 quinasa S6 ribosomal.

## R

Rab	<i>Ras-related in brain</i> , relacionada con Ras en cerebro.
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i> , sustrato de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras.
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> , fibrosarcoma rápidamente acelerado.
Ran	<i>Ras-related nuclear protein</i> , proteína nuclear relacionada con Ras.
RAS	<i>Rat sarcoma</i> , sarcoma de rata.
Rb	Retinoblastoma.
RBD	<i>Ras-binding domain</i> , dominio de unión a Ras.
RGS	<i>Regulators of G-protein signalling</i> , reguladores de la señalización por proteínas G.
Rho	<i>Ras homolog family</i> , familia homóloga a Ras.
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico.
RNasa	Ribonucleasa.
Rnd	<i>Rho-related GTP-binding protein</i> , proteína de unión a GTP relacionada con Rho.
ROCK	<i>Rho-kinase</i> , Rho-quinasa.
RTK	<i>Tyrosine-kinase receptor</i> , receptor tirosina quinasa.
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polimerase chain reaction</i> , transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa.
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription-polimerase chain reaction</i> , transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

## S

S, fase	<i>Synthesis phase</i> , fase de síntesis.
---------	--

SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i> , inmunodeficiencia combinada severa.
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i> , factor derivado de células estromales-1.
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecilsulfato de sodio.
SFK	<i>Src family kinases</i> , quinasas de la familia Src.
SH	<i>Src-homology domain</i> , dominio de homología con Src.
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i> , oligorribonucleótido de interferencia.
SOX4	<i>Sex determining region Y-Box 4</i> , region Y determinante del sexo-caja 4.
SOS	<i>Son of sevenless</i> , hijo de <i>sevenless</i> .
SPRED1	<i>Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1</i> , proteína 1 con dominio EVH1, relacionada con Sprouty.
Src	<i>Sarcoma tyrosine-kinase</i> , tirosina quinasa sarcoma.
Stat	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> , transductor de señal y activador de transcripción.

## T

TBP	<i>TATA-binding protein</i> , proteína de unión a TATA.
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , solución salina tamponada con Tris.
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i> , factor de crecimiento transformante $\beta$ .
TGF- $\beta$ RII	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math> receptor II</i> , receptor II del factor de crecimiento transformante $\beta$ .
TMT	Trametinib.
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> , factor de necrosis tumoral $\alpha$ .
TR	<i>Trametinib resistant</i> , resistente a trametinib.
TRBP	<i>Trans-activation-responsive RNA-binding protein</i> , proteína de unión a RNA transactivadora.
TRPM1	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily M member 1</i> , miembro 1 de la subfamilia M de canales de cationes receptor de potencial transitorio.

## U

UTR	<i>Untranslated region</i> , región no traducida.
-----	---

## V

VMF	Vemurafenib.
VR	<i>Vemurafenib resistant</i> , resistente a vemurafenib.
v-Src	<i>Viral Src</i> , Src viral.

W

WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i> , proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich.
WAVE	<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i> , proteína homóloga a verprolina de familia WASP.
WB	<i>Western blot</i> .
Wt	<i>Wild type</i> , salvaje.

Y

Yes	<i>Yamaguchi sarcoma virus homolog</i> , homólogo del virus de sarcoma Yamaguchi.
-----	---

Z

ZEB	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox</i> , homeobox de unión a caja-E de dedos de Zinc.
-----	--

*-SUMMARY-*



## Introduction

Melanoma shows high aggressiveness once metastasis begins, and therefore it is important to identify mechanisms involved in melanoma cell invasion. Chemokine-stimulated cell migration depends on signalling mediated by heterotrimeric G proteins.  $G\alpha_{12/13}$  proteins have been linked to the regulation of RhoA activity, which plays a major role in actin cytoskeleton reorganization and cell migration. Among the molecules that control RhoA is p190RhoGAP. It has been previously described that  $G\alpha_{13}$  activation in melanoma cells causes p190RhoGAP activation and subsequent inhibition of RhoA, which leads to blockade of cell invasion.

On the other hand, one of the currently used metastatic melanoma treatments is based on specific inhibitors against mutant BRAF (vemurafenib or dabrafenib). This treatment has shown remarkable effectiveness, but invariably develops resistance in the majority of patients. Mechanisms of resistance described for these inhibitors include genetic alterations, although recent studies point out the coexistence of resistances that are not due to these alterations. Consequently, and given the importance of miRNAs in oncogenic and tumor suppressor processes, we decided to determine their potential role in vemurafenib resistance of melanoma cells.

## Objectives

- Analysis of the contribution of the  $G\alpha_{13}$ -p190RhoGAP-RhoA signalling pathway to melanoma cell invasion.
- Generation of melanoma cells resistant to MAP-kinase inhibitors and characterization of mechanisms involved in the resistance.
- Analysis of miRNA roles in resistance of melanoma cells to vemurafenib.

## Methodology

For the first objective, we performed specific silencing using siRNAs or overexpression of proteins involved in  $G\alpha_{13}$ -p190RhoGAP-RhoA pathway. Subsequent analyses were performed by co-immunoprecipitation, GTPase activity assays or cell invasion experiments. Moreover, *in vivo* studies were conducted in immunodeficient mice to analyse the invasive potential of the generated transfectants.

For the second and third objectives, we generated melanoma cell lines resistant to MAP-kinases inhibitors. Their characterization has been carried out mainly through cell viability and proliferation assays, and detection of phosphorylation or protein expression by western blotting. Furthermore, RNA-Seq of small RNA was performed with resistant cells. Levels of mRNA or miRNA were detected by qPCR assays. To assess the role of miRNAs in vemurafenib resistance, we generated by lentiviral infection transfectants with stable overexpression or silencing of certain miRNAs. These transfectants were further analysed in cell viability and proliferation assays, as well as by western blotting and qPCR assays.

## Results

The results of this Thesis indicate that the Src kinase Blk is involved in p190RhoGAP tyrosine phosphorylation in cells expressing active  $G\alpha_{13}$ . In the proposed model, activation of  $G\alpha_{13}$  promotes Blk dissociation from  $G\alpha_{13}$ -Blk complexes and the subsequent binding of this kinase to p190RhoGAP, which leads to phosphorylation of this GAP. This phosphorylation correlates with an increase in RhoA-p190RhoGAP association and with decreased RhoA activity, ultimately inhibiting CXCL12-stimulated cell invasion. Likewise, data show the involvement of Blk in p190RhoGAP tyrosine phosphorylation after CXCL12 stimulation, independently of  $G\alpha_{13}$ .

Concerning the second part of the Thesis, A375 vemurafenib resistant cells (A375-VR) were shown to exhibit higher Ras activation, which correlates with increase in MAP-kinase and PI3-kinase/AKT pathway activation. In addition, these resistant cells show *de novo* expression of a BRAF isoform. Also, trametinib resistant cells (A375-TR and SK-Mel-103-TR) display larger PI3-kinase/AKT activation, but only SK-Mel-103-TR exhibit hyper-activated MAP-kinase pathway.

miRNAs sequencing of parental and A375-VR cells, as well as their subsequent validation by qPCR, showed an increase in miR-204-5p and miR-211-5p expression, and decreased miR-140-3p expression in resistant cells relative to parental ones. The alterations in the expression of these miRNAs in A375-VR cells were found to be stable, and their levels change after vemurafenib administration in BRAF V600E mutant melanoma cells, such as A375 or SK-Mel-28 cells. Moreover, treatment with other MAP-kinases inhibitors causes similar changes in the expression of miR-204-5p and miR-211-5p in A375 cells, whereas no alterations were detected after AKT or Rac inhibitor administration. Notably, transfectants overexpressing miR-204-5p or miR-211-5p show increased cell viability and proliferation in the presence of vemurafenib. In contrast, miR-140-3p silencing did not confer a viability advantage in melanoma cells exposed to this inhibitor.

Taken together, these results suggest that early tolerance to vemurafenib in A375 cells involves changes in the expression and function of miR-204-5p and miR-211-5p, which could contribute to early stages of resistance to this compound.

## Conclusions

The results of this Thesis show the relevance of Blk in the regulation of  $G\alpha_{13}$ -p190RhoGAP-RhoA signalling pathway involved in migration and invasion of melanoma cells. A better understanding of the migration process is essential in melanoma research, due to the high aggressiveness of this cancer once metastasis begins.

The identification and characterization of miRNAs miR-204-5p and miR-211-5p as molecules that contribute to vemurafenib resistance in melanoma cells, probably in early stages of resistance, could help to the design of improved therapies for metastatic melanoma treatment.

*-RESUMEN-*



## Introducción

El melanoma muestra una gran agresividad una vez iniciada la metástasis, y por ello es importante identificar los mecanismos implicados en la invasión de las células de melanoma. La migración celular estimulada por quimioquinas depende de la señalización mediada por proteínas G heterotriméricas. Las proteínas  $G\alpha_{12/13}$  han sido relacionadas con la regulación de la actividad de RhoA, la cual tiene un papel clave en la reorganización del citoesqueleto de actina y en la migración celular. Una de las moléculas que controlan la activación de RhoA es p190RhoGAP. Previamente se ha descrito que la estimulación de  $G\alpha_{13}$  en células de melanoma provoca la activación de p190RhoGAP y la posterior inhibición de RhoA, lo que causa un bloqueo de la invasión celular.

Por otra parte, uno de los tratamientos contra el melanoma metastásico utilizados actualmente se basa en la administración de inhibidores específicos frente a BRAF mutado (vemurafenib o dabrafenib). Este tratamiento ha mostrado una notable efectividad, pero genera resistencia en la mayoría de pacientes. Los mecanismos de resistencia descritos para estos inhibidores incluyen alteraciones genéticas, aunque estudios recientes apuntan a la coexistencia de resistencias que no se basan en dichas alteraciones. Por ello, dada la importancia de los miRNAs en los procesos oncogénicos y de supresión de tumores, se decidió analizar su potencial participación en la resistencia a vemurafenib de células de melanoma.

## Objetivos

- Análisis de la contribución de la vía de señalización  $G\alpha_{13}$ -p190RhoGAP-RhoA en la invasión de células de melanoma.
- Generación de células de melanoma resistentes a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas y caracterización de los mecanismos implicados en la resistencia.
- Análisis de la implicación de miRNAs en la resistencia a vemurafenib de células de melanoma.

## Metodología

Para el primer objetivo se ha realizado una aproximación experimental basada en el silenciamiento específico mediante siRNAs o sobre-expresión de proteínas implicadas en la vía de señalización  $G\alpha_{13}$ -p190RhoGAP-RhoA. El análisis posterior ha sido realizado mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, de actividad GTPasa o de invasión celular. Asimismo, se han llevado a cabo estudios *in vivo* en ratones inmunodeficientes para analizar el potencial invasivo de los transfectantes generados.

Para el segundo y tercer objetivo se han generado líneas celulares de melanoma resistentes a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas. Su caracterización ha sido realizada principalmente mediante ensayos de viabilidad, proliferación y detección de la fosforilación o expresión de proteínas mediante *western blotting*. Asimismo, se ha realizado *RNA-Seq* de RNA de pequeño tamaño con las células resistentes. Los niveles de mRNA o miRNAs

fueron detectados mediante ensayos de qPCR. Para determinar el papel de miRNAs en la resistencia a vemurafenib se generaron mediante infección lentiviral transfectantes con sobre-expresión o silenciamiento estable de determinados miRNAs. Estos transfectantes fueron posteriormente analizados en ensayos de viabilidad, proliferación, *western blotting* y qPCR.

## Resultados

Los resultados de esta Tesis muestran que la Src quinasa Blk está implicada en la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP en células de melanoma que expresan  $G\alpha_{13}$  activo. En el modelo que se propone, la activación de  $G\alpha_{13}$  promueve la disociación de Blk del complejo  $G\alpha_{13}$ -Blk y la posterior unión de esta quinasa a p190RhoGAP, lo que se traduce en fosforilación de esta GAP. A su vez, esta fosforilación correlaciona con una mayor unión RhoA-p190RhoGAP y con la disminución de la actividad de RhoA, lo que finalmente provoca la inhibición de la invasión celular estimulada por CXCL12. Asimismo, los resultados indican la participación de Blk en la fosforilación de p190RhoGAP tras estimulación con CXCL12, independientemente de  $G\alpha_{13}$ .

En relación con la segunda parte de la Tesis, las células A375 resistentes a vemurafenib (A375-VR) exhiben una mayor activación de Ras, lo que correlaciona con el aumento de la activación de la vía de señalización de las MAP-quinasas y de la vía PI3-quinasa/AKT. Asimismo, estas células resistentes muestran una expresión *de novo* de una isoforma de BRAF. Por otra parte, las células resistentes a trametinib (A375-TR y SK-Mel-103-TR) tienen en común una mayor activación de PI3-quinasa/AKT, pero sólo las células SK-Mel-103-TR tienen sobre-activada la vía de las MAP-quinasas.

La secuenciación de miRNAs en las células parentales y A375-VR, así como su posterior validación mediante qPCR, mostró un aumento en la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p, así como una disminución de los niveles de miR-140-3p en las células resistentes relativo a las parentales. Las alteraciones en la expresión de estos miRNAs en las células A375-VR son estables, y además su expresión varía tras la administración de vemurafenib en células de melanoma con mutación en BRAF V600E, como las células A375 o SK-Mel-28. Adicionalmente, el tratamiento con otros inhibidores de la vía de las MAP-quinasas genera cambios similares en la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en células A375, mientras que no se detectaron alteraciones tras la administración de inhibidores de AKT o Rac. Notablemente, los transfectantes que sobre-expresan miR-204-5p o miR-211-5p presentan un aumento de viabilidad y proliferación celular en presencia de vemurafenib. Por el contrario, el silenciamiento de miR-140-3p no se tradujo en ventajas de viabilidad en las células de melanoma expuestas a dicho inhibidor.

En conjunto, los resultados sugieren que la tolerancia temprana al vemurafenib de las células A375 implica cambios en la expresión y función de miR-204-5p y miR-211-5p, lo que podría contribuir a las primeras etapas de la resistencia a dicho fármaco.

## Conclusiones

Los resultados de la presente Tesis muestran la relevancia de Blk en la regulación de la vía  $G\alpha_{13}$ -p190RhoGAP-RhoA, la cual está implicada en la migración e invasión de células de melanoma. Una mayor comprensión de los procesos de migración es fundamental en el estudio del melanoma, debido a la alta agresividad de este cáncer una vez iniciado el proceso de metástasis.

La identificación y caracterización de los microRNAs miR-204-5p y miR-211-5p como elementos que contribuyen a la resistencia de células de melanoma a vemurafenib, probablemente en estadios iniciales de la resistencia, podrían ayudar al diseño de futuras terapias para el tratamiento del melanoma metastásico.



## *-INTRODUCCIÓN-*



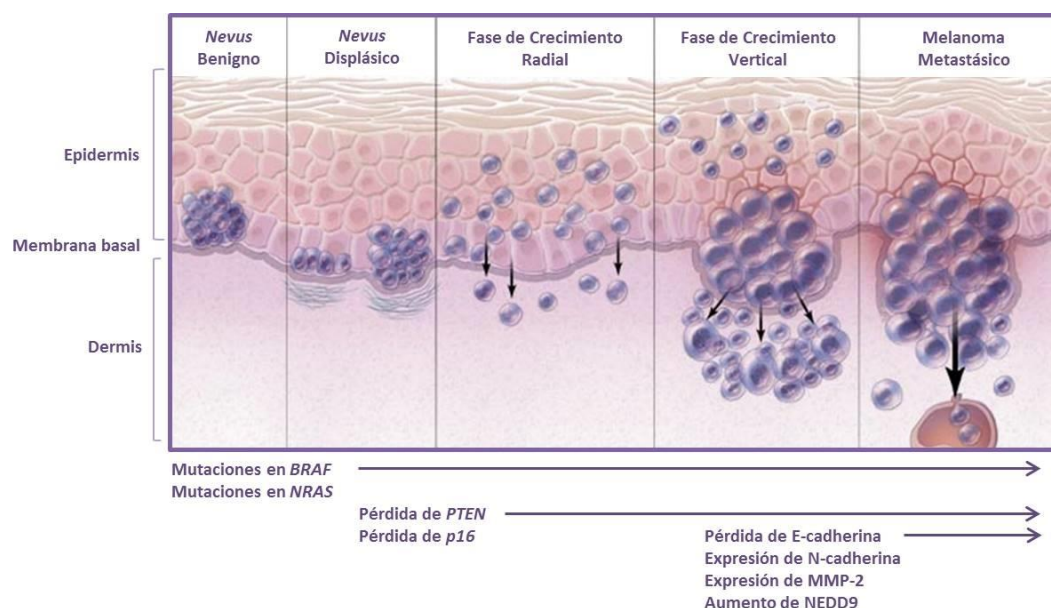
## I. EL MELANOMA Y SUS MECANISMOS DE INVASIÓN

### El melanoma

El melanoma es un cáncer que deriva de los melanocitos, células productoras de melanina que se encuentran principalmente en la epidermis, así como en el iris. Los melanocitos cutáneos tienen su origen en progenitores de la cresta neural, los cuales migran hacia la epidermis durante el desarrollo embrionario, encontrándose finalmente en la capa basal de la epidermis (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Su homeostasis está regulada por los queratinocitos epidérmicos, los cuales en respuesta a la radiación ultravioleta secretan factores que regulan la proliferación, supervivencia, diferenciación y motilidad de los melanocitos, estimulándoles para producir melanina (Slominski *et al.*, 2004). Los melanocitos tienen, por tanto, un papel clave protegiendo la piel de daños causados por la radiación ultravioleta, previniendo de este modo el cáncer de piel.

La incidencia del melanoma ha aumentado más de un 600% entre 1950 y 2000, y aunque sólo supone un 4% de los casos de cáncer de piel, es el responsable del 80% de las muertes por este tipo de cáncer (Howe *et al.*, 2001; Miller y Mihm, 2006; Tsao *et al.*, 2004). Entre los factores de riesgo que predisponen a la aparición del melanoma destaca la exposición a la luz ultravioleta y la hipersensibilidad solar, un historial familiar con casos de melanoma, así como el grado de pigmentación de la piel (Gilchrest *et al.*, 1999; Jhappan *et al.*, 2003; Miller y Mihm, 2006).

La progresión del melanoma se produce en diferentes etapas, las cuales causan cambios histológicos asociados a alteraciones moleculares (**Figura 1**). Inicialmente, tras sufrir diferentes mutaciones en el DNA, los melanocitos se transforman hacia un *nevus* displásico y dan lugar al crecimiento radial o horizontal del tumor, todavía confinado a la epidermis. Posteriormente, el *nevus* puede desarrollarse verticalmente invadiendo la dermis a través de la lámina basal del epitelio. La profundidad que alcance el tumor en la dermis se correlaciona negativamente con la supervivencia a 5 años tras la escisión quirúrgica del tumor (Breslow, 1975). Esta transición entre las fases horizontal y vertical se caracteriza por el cambio de expresión de E-cadherina por N-cadherina asociado a un aumento en la actividad transcripcional de Snail, por el aumento en la expresión de la metaloproteasa MMP-2 y por la pérdida de función del supresor tumoral PTEN (Dankort *et al.*, 2009; Ghosh y Chin, 2009). Las células invasivas pueden progresivamente infiltrar el tejido circundante mediante la degradación de la matriz extracelular, alcanzando los vasos linfáticos y extendiéndose a los ganglios linfáticos que drenan ese tejido, en el que formarán tumores secundarios. En los últimos estadios de la enfermedad, las células de melanoma pueden metastatizar a órganos distantes, fundamentalmente a pulmones, hígado, encéfalo y médula ósea (Clark *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 2009; Miller y Mihm, 2006).



**Figura 1. Progresión del melanoma.** Esquema de la progresión del melanoma y su relación con algunas de las alteraciones moleculares más frecuentes (Adaptado de Miller *et al.*, 2006).

Las mutaciones adquiridas por los melanocitos durante su malignización son responsables de la hiper-activación de diferentes vías que llevan a un aumento de la proliferación y supervivencia celular, tales como la vía de las MAP-quinasas y la vía de PI3-quinasa (PI3-K)/AKT (Lin *et al.*, 2010; Rother y Jones, 2009). Las alteraciones genéticas en *BRAF* (uno de los tres genes *RAF* en humanos, junto con *ARAF* y *CRAF*) son las mutaciones activadoras más frecuentes en melanoma, estando presentes en un 50%-70% de los tumores. De éstas, la más habitual es una mutación puntual que causa la sustitución de una valina por un ácido glutámico (*BRAFV600E*), la cual es responsable del 90% de las alteraciones en *BRAF* (Ascierto *et al.*, 2012; Davies *et al.*, 2002). Si bien esta mutación por sí sola no es capaz de causar la transformación de los melanocitos, en combinación con otras mutaciones (como la pérdida de *PTEN*) es clave para la transformación y progresión tumoral (Dankort *et al.*, 2009). Por otra parte, las mutaciones puntuales producidas en *NRAS* son asimismo frecuentes en melanoma, especialmente en los casos derivados de daño crónico por el sol, y constituyen entre un 15-30% de los tumores (Davies *et al.*, 2002; Ghosh y Chin, 2009). Las mutaciones en *NRAS* tienen como resultado sustituciones en determinados aminoácidos que causan la activación constitutiva de la señalización mediada por esta proteína. La sustitución Q61 es la más frecuente (Q61K, Q61L, Q61R), seguido de G12 (G12D, G12S) y G13 (G13D, G13R, G13V) (Ball *et al.*, 1994). Las alteraciones en la activación de la ruta PI3-K/AKT están principalmente relacionadas con mutaciones en el supresor tumoral *PTEN*, ya sea por la pérdida de función del gen debido a la delección de un alelo, o por alteraciones en los niveles de expresión (20% y 40% de los casos de melanoma analizados, respectivamente), y además suele ser concomitante con las mutaciones en *BRAF* (Dankort *et al.*, 2009; Goel *et al.*, 2006). Asimismo, se ha descrito un aumento en el número de copias de *AKT3*, así como mutaciones en receptores tirosina-quinasa tales como *EGFR*,

*FGFR2*, *PDGFR* o *MET* (Ghosh y Chin, 2009). Igualmente, se han detectado amplificaciones del gen *MITF* (10-16%), que se han relacionado inversamente con la supervivencia a 5 años (Garraway *et al.*, 2005). Además, se han descrito deleciones en los genes *CDKN2A* y *CDKN2B*. El gen *CDKN2A* codifica para dos proteínas supresoras de tumores, p16 (p16INK4a) y p14 (p14ARF), cuya pérdida se traduce en progresión del ciclo celular. Deleciones y mutaciones que conlleven la pérdida de *CDKN2A* se hallan en un 30-70% de melanomas y son especialmente frecuentes en melanomas familiares (Kamb *et al.*, 1994; Sharpless y Chin, 2003).

Para que tenga lugar una metástasis eficiente, las células invasivas necesitan reorganizar el citoesqueleto de actina y modificar sus contactos con la matriz extracelular y con las células estromales circundantes. Se ha descrito que las células de melanoma deben fluctuar entre un movimiento elongado o redondeado en función del microambiente (Orgaz y Sanz-Moreno, 2013). Entre los protagonistas que regulan la metástasis de células de melanoma está NEDD9, una proteína adaptadora que controla vías de señalización principalmente implicadas en adhesión, migración e invasión, habiéndose descrito su amplificación génica en melanoma (Kim *et al.*, 2006b). Asimismo, se ha mostrado la implicación de CXCR4 en la metástasis de melanoma, principalmente hacia pulmón (Bartolome *et al.*, 2009; Chatterjee *et al.*, 2014; Murakami *et al.*, 2002).

#### Las quimioquinas y sus receptores: implicación en invasión tumoral y metástasis

La metástasis implica una serie de etapas que sólo una minoría de células tumorales completa. Así, es necesario que se produzca la angiogénesis o desarrollo de nuevos vasos que irriguen el tumor, lo que permitirá posteriormente la intravasación de células tumorales a la circulación linfática o sanguínea para su posterior extravasación a otros tejidos. En este momento, las células deben iniciar y mantener un crecimiento para formar micrometástasis distantes, cuya proliferación es nuevamente sostenida por el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, así como por el microambiente tumoral (Chambers *et al.*, 2002). Algunos tumores muestran un patrón de metástasis específico hacia determinados órganos, lo que es debido, en parte, a la expresión de quimioquinas y sus receptores que contribuyen colectivamente a la atracción de las células tumorales a estos órganos (Muller *et al.*, 2001).

Las quimioquinas son una familia de citoquinas con propiedades quimioatrayentes que han sido tradicionalmente relacionadas con la atracción de poblaciones leucocitarias a sitios de inflamación en función de gradientes de concentración, gracias a la presencia de receptores para dichas moléculas en la membrana celular (Griffith *et al.*, 2014; Luster, 1998). Asimismo, es ampliamente aceptado que las células tumorales expresan receptores para quimioquinas específicas (Muller *et al.*, 2001; Robledo *et al.*, 2001). Concretamente, se ha demostrado que existe un patrón órgano-específico en la metástasis de células de melanoma que correlaciona con la expresión de receptores de quimioquinas en dichas células tumorales, tales como CXCR4, CXCR3, CCR7 y CCR10 (Mitchell y Mahalingam, 2014; Neagu *et al.*, 2015; Payne y Cornelius, 2002; Robledo *et al.*, 2001). La quimioquina

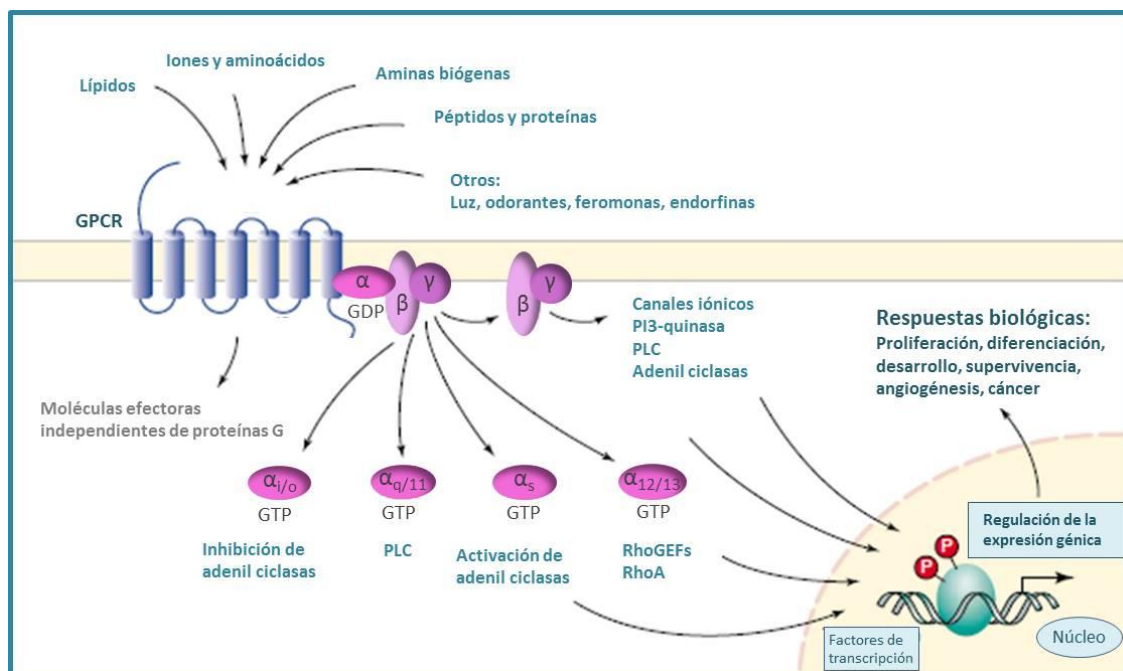
CXCL12, también denominada SDF-1, se expresa preferentemente en ganglios linfáticos, pulmón, hígado y médula ósea (Bleul *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 2001; Pablos *et al.*, 1999), y su expresión correlaciona con los principales sitios de metástasis de las células de melanoma. Su principal receptor es CXCR4 (Zou *et al.*, 1998), aunque ha sido asimismo descrito como ligando del receptor CXCR7 (Burns *et al.*, 2006). Numerosos trabajos señalan la importancia del eje CXCL12/CXCR4 en la progresión tumoral, tanto en el crecimiento del tumor primario como en la invasión y metástasis de células tumorales, habiéndose observado que CXCR4 es uno de los receptores de quimioquinas más frecuentemente expresado en células tumorales. Significativamente, la expresión de CXCR4 se correlaciona con recurrencia y mala prognosis en pacientes de melanoma (Kim *et al.*, 2006a; Scala *et al.*, 2005). La señalización dependiente de CXCL12/CXCR4 promueve la invasión y migración de células de melanoma mediante la regulación de la actividad de GTPasas Rho y la estimulación de la expresión y función de la metaloproteasa MT1-MMP (Bartolome *et al.*, 2004; Bartolome *et al.*, 2006). Los receptores de quimioquinas, como CXCR4, pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR) (Murdoch y Finn, 2000).

### Receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas y sus efectores

Los receptores GPCRs constituyen la mayor familia de moléculas de superficie implicadas en la transmisión de señales. Los miembros de esta familia no solo incluyen receptores de quimioquinas, sino que pueden ser activados por una gran variedad de ligandos, incluyendo neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento, entre otros, por lo que están implicados en múltiples procesos biológicos (Katritch *et al.*, 2013; Latek *et al.*, 2012; Pierce *et al.*, 2002). La diversidad en la señalización de los GPCRs viene regulada por la especificidad de tejido y la expresión celular, pero principalmente por la regulación de la señalización posterior.

Una vez que un ligando se une a su GPCR se inicia la transducción de señales (**Figura 2**). Esta unión implica un cambio conformacional de las regiones intracelulares del receptor lo que facilita su interacción con las proteínas G heterotriméricas (Alfonzo-Mendez *et al.*, 2016; Latorraca *et al.*, 2016). Estas proteínas se componen de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ , las cuales presentan elevada afinidad entre ellas. Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  están estrechamente asociadas, formando un heterodímero que se considera una única unidad funcional. La actividad biológica de las proteínas G viene determinada por la unión de nucleótidos de guanósín trifosfato (GTP). Cuando se produce el cambio conformacional del receptor tras la unión del ligando, se produce la interacción del receptor con la proteína G, facilitando el intercambio de guanósín difosfato (GDP) por GTP de la subunidad  $\alpha$ . La magnitud de disociación de GDP de  $G\alpha$  es muy baja (Higashijima *et al.*, 1987), y esto se ve facilitado por el cambio conformacional transmitido por el GPCR (Mahoney y Sunahara, 2016). El intercambio de nucleótidos de guanina causa la disociación de la subunidad  $\alpha$  del dímero  $\beta\gamma$ , dando lugar a dos subunidades funcionales ( $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ ), ambas con capacidad de

señalar en diferentes rutas intracelulares (Syrovatkina *et al.*, 2016), entre las que se incluyen las vías Jak/Stat, MAP-quinasas, PI3-K, fosfolipasas C y A<sub>2</sub>, y las GTPasas Rho (Ellisdon y Halls, 2016; Liu *et al.*, 2015; Marinissen y Gutkind, 2001). La señalización finaliza cuando la subunidad G $\alpha$ , con actividad GTPasa intrínseca, hidroliza el GTP a GDP, asociándose de nuevo con el dímero G $\beta\gamma$ , quedando de este modo la proteína G inactiva (Ross y Wilkie, 2000).



**Figura 2. Señalización desencadenada tras la activación de los GPCRs.** Se muestran algunos de los ligandos activadores de los GPCRs, así como la señalización posterior dependiente de proteínas G heterotrímicas y las respuestas biológicas inducidas (Adaptado de Marinissen y Gutkind, 2001).

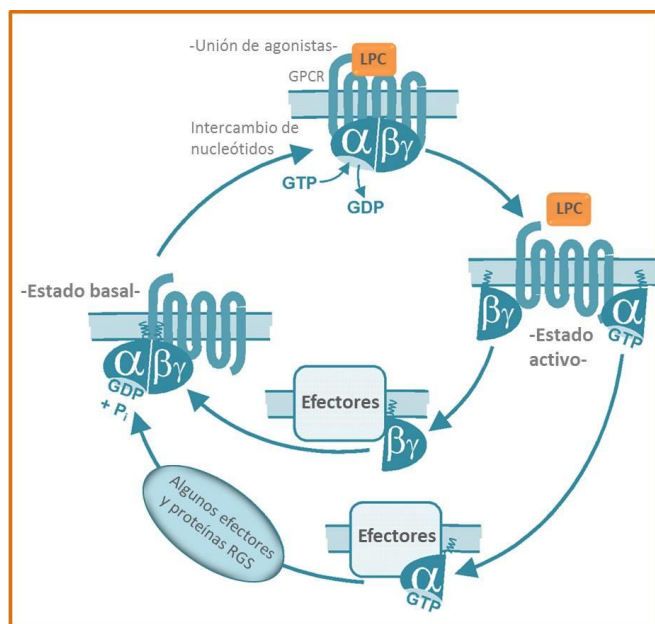
Las proteínas G se identifican por sus subunidades G $\alpha$ , lo que se basa en su similitud de secuencia y funcionalidad, agrupándose en cuatro familias: G $\alpha_s$ , G $\alpha_i$ /G $\alpha_o$ , G $\alpha_q$ /G $\alpha_{11}$ , y G $\alpha_{12}$ /G $\alpha_{13}$ . La familia G $\alpha_s$  comprende dos miembros: G $\alpha_s$  y G $\alpha_{olf}$ . La familia G $\alpha_i$ /G $\alpha_o$  incluye G $\alpha_{i1}$ , G $\alpha_{i2}$ , G $\alpha_{i3}$ , G $\alpha_o$ , G $\alpha_t$ , G $\alpha_g$  y G $\alpha_z$ . En humanos, la familia G $\alpha_q$ /G $\alpha_{11}$ , está formada por G $\alpha_q$ , G $\alpha_{11}$ , G $\alpha_{14}$  y G $\alpha_{16}$ . Finalmente, la familia G $\alpha_{12}$ /G $\alpha_{13}$  está formada por G $\alpha_{12}$  y G $\alpha_{13}$  (Syrovatkina *et al.*, 2016; Worzfeld *et al.*, 2008).

De forma concisa, la familia G $\alpha_s$  media la activación de la adenil ciclasa, lo que se traduce en un aumento de las concentraciones de cAMP intracelular. Por el contrario, los miembros de la familia G $\alpha_i$ /G $\alpha_o$  median la inhibición de varios tipos de adenil ciclasa. Los miembros de la familia G $\alpha_q$ /G $\alpha_{11}$  contribuyen a la regulación de la fosfolipasa C, mientras que la familia G $\alpha_{12}$ /G $\alpha_{13}$  se caracteriza por modular los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de Rho (RhoGEFs), y por tanto son mediadores de la regulación de RhoA (Worzfeld *et al.*, 2008).

### La familia $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$

$G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  se expresan ubicuamente y presentan alta conservación entre especies (Strathmann y Simon, 1991). Estudios iniciales en *Drosophila melanogaster* mostraron que estas proteínas tenían un importante papel en la regulación de la contracción y migración de células del surco ventral de embriones, lo que sugería un papel para estas proteínas en la regulación de la morfología y la migración celular (Parks y Wieschaus, 1991). Para la caracterización de esta familia fue fundamental la identificación de mutantes constitutivamente activos de  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ , en los cuales la sustitución de una glutamina por una leucina (Q231L para  $G\alpha_{12}$  o Q226L para  $G\alpha_{13}$ ) inhibía la actividad GTPasa intrínseca de estas proteínas (Worzfeld *et al.*, 2008). De este modo se demostró que las formas activas de  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  aumentan la formación de fibras de estrés y adhesiones focales, procesos mediados por la GTPasa RhoA, lo que, como ya se ha mencionado, mostraba que  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  regulan la activación de RhoA (Buhl *et al.*, 1995). Estudios posteriores describieron la regulación directa de RhoGEFs por  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ , concretamente la activación de p115-RhoGEF por  $G\alpha_{13}$  (Chen *et al.*, 2012; Hart *et al.*, 1998).

Algunos de los GPCR que señalizan a través de la familia  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  incluyen a G2A o GPR4, cuyo ligando es la lisofosfatidilcolina (LPC), y los receptores de esfingosina-1-fosfato, tromboxano y endotelina, entre otros (Riobo y Manning, 2005) (Figura 3). Las proteínas  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  se encuentran palmitoiladas en sus extremos amino terminales, permitiendo su interacción con la membrana plasmática y con los receptores. La tasa de intercambio GDP/GTP en las proteínas de la familia  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  es baja, lo que se traduce en una activación prolongada de la señalización (Siehler, 2009).



**Figura 3. Ciclo de activación/inactivación de proteínas  $G\alpha_{12/13}$  heterotriméricas.** Se muestra el ligando LPC como ejemplo (Adaptado de Worzfeld *et al.*, 2008).

$G\alpha_{12}$  y  $G\alpha_{13}$  comparten similitudes bioquímicas y funcionales, aunque existen diferencias funcionales entre ellas. Así, ratones *knock-out* para  $G\alpha_{13}$  mueren a día E9.5 como consecuencia de defectos vasculares (Offermanns *et al.*, 1997), mientras que los ratones *knock-out* para  $G\alpha_{12}$  son viables y fértiles, sin mostrar fenotipos distintivos (Gu *et al.*, 2002). Asimismo, ratones doble *knock-out* para  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  mueren intrauterinamente a día E8.5, y muestran defectos en el desarrollo del sistema nervioso y cardiaco, así como desregulación en la polarización de células del sistema inmune (Worzfeld *et al.*, 2008).

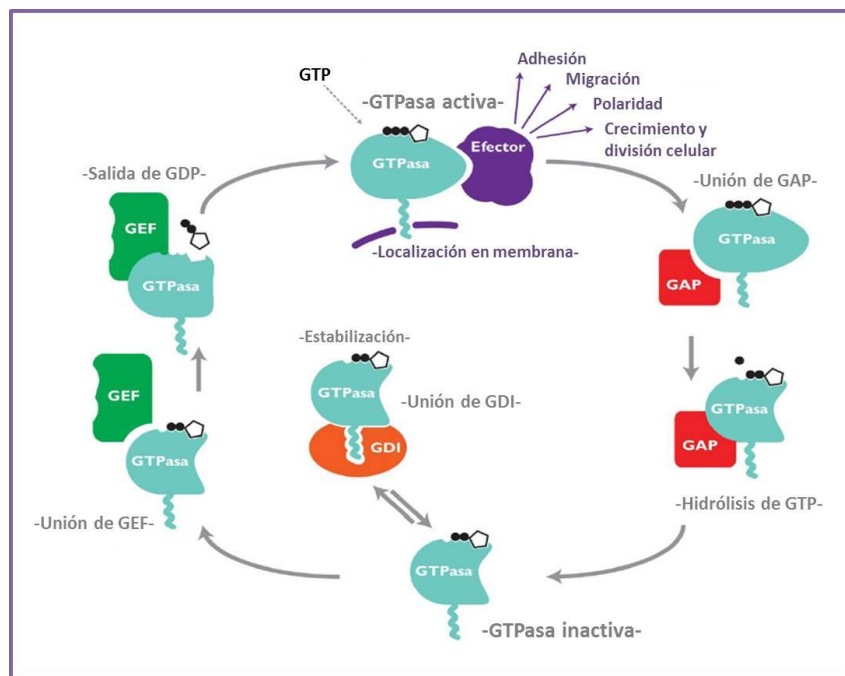
Las proteínas  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  pueden modular asimismo la función de algunas cadherinas, p120catenina, fosfatasas (PP5), fosfolipasas C y D, proteínas tirosina quinasa no receptoras como Pyk2 o Btk, y radixina, (Suzuki *et al.*, 2009; Worzfeld *et al.*, 2008). Dada la variedad de efectores y moduladores de la familia  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ , no extraña su implicación en la regulación de diferentes procesos biológicos, como la proliferación, morfología y migración celular, además de estar implicada en enfermedades cardiovasculares y cáncer (Kurose, 2003; Worzfeld *et al.*, 2008).

Una de las primeras evidencias de la implicación de  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  en cáncer fue la observación de que la sobre-expresión de formas *wild-type* de  $G\alpha_{12}$  en fibroblastos NIH-3T3 causaba características de células transformadas y promovía tumorigenicidad en ratones desnudos (Chan *et al.*, 1993). Resultados similares se observaron para  $G\alpha_{13}$ , por lo que  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  fueron propuestos como oncogenes (Xu *et al.*, 1994). Por otra parte, al contrario de lo que ocurre con miembros de la familia  $G\alpha_s$  y  $G\alpha_i$ , no se han detectado mutaciones activadoras en  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  en tumores humanos. Los altos niveles de expresión de  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  que se han detectado en varias líneas celulares de cáncer humano y en muestras humanas de tumores, podrían explicar su capacidad tumorigénica incluso en ausencia de mutaciones activadoras (Worzfeld *et al.*, 2008). Muchas de las vías moduladas por  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  que son responsables de la regulación del crecimiento celular y transformación parecen implicar a la GTPasa RhoA. Así, la estimulación de RhoA favorece la iniciación de la cascada de señalización de las MAP-quinasas inducida por  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007). Adicionalmente, se ha descrito que  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  regulan la adhesión y migración celular. En líneas celulares de cáncer de mama, la sobre-expresión de  $G\alpha_{12}$  constitutivamente activa bloquea la adhesión célula-célula mediada por E-cadherina, favoreciéndose la migración celular (Meigs *et al.*, 2002). Sin embargo, la mayor parte de los efectos pro-migratorios de  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  han sido atribuidos a la estimulación de la actividad de RhoA. Se ha descrito que la expresión de formas constitutivamente activas de  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  en células de cáncer de mama y próstata aumentan la invasión a través de la activación de RhoA, sin promover la proliferación celular (Kelly *et al.*, 2006a; Kelly *et al.*, 2006b). Por el contrario, en líneas celulares de melanoma en las que se sobre-expresan formas constitutivamente activas de  $G\alpha_{12}$  y  $G\alpha_{13}$ , o en células cuya señalización vía GPCRs acoplados a  $G\alpha_{13}$  es estimulada con LPC, se observan defectos en la activación de RhoA e inhibición de la invasión celular en respuesta a CXCL12. Además, se demostró que la metástasis de estas células estaba disminuida (Bartolome *et al.*, 2008), sugiriendo la

existencia de diferentes mecanismos de regulación de la señalización vía  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  con distintas respuestas biológicas, dependiendo del tipo de cáncer analizado.

### Las GTPasas monoméricas

Las GTPasas de pequeño tamaño son proteínas G monoméricas de 20-40 kDa que regulan una amplia variedad de respuestas biológicas, como el crecimiento y diferenciación celular, el transporte vesicular o el movimiento celular. Una de las familias más conocidas de este tipo de proteínas son las GTPasas Ras, y por ello en muchas ocasiones se habla de superfamilia de GTPasas Ras, la cual se divide a su vez en varias familias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran (Bar-Sagi y Hall, 2000). Las GTPasas presentan un motivo de unión a GDP/GTP (dominio G) que tiene una estructura y características bioquímicas conservadas entre los miembros de la superfamilia Ras, así como en la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas, anteriormente mencionadas. Las GTPasas monoméricas presentan dos conformaciones: la inactiva, en la que están unidas a GDP, y la activa unida a GTP (**Figura 4**). Estas proteínas presentan alta afinidad en su unión a GDP y GTP, pero poseen baja capacidad de hidrólisis de GTP así como de intercambio de nucleótidos GDP por GTP, siendo la disociación del GDP el paso limitante en este proceso. Estos ciclos de activación-inactivación están regulados por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), los cuales favorecen la activación de las GTPasas al facilitar la disociación de GDP, y por las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP), que inactivan a las GTPasas al acelerar la hidrólisis del GTP, estimulando la actividad GTPasa intrínseca de estas proteínas.



**Figura 4. Regulación de GTPasas Rho.** Esquema de la regulación de GTPasas Rho por proteínas GEFs, GAPs y GDIs (Adaptado de Porter *et al.*, 2016).

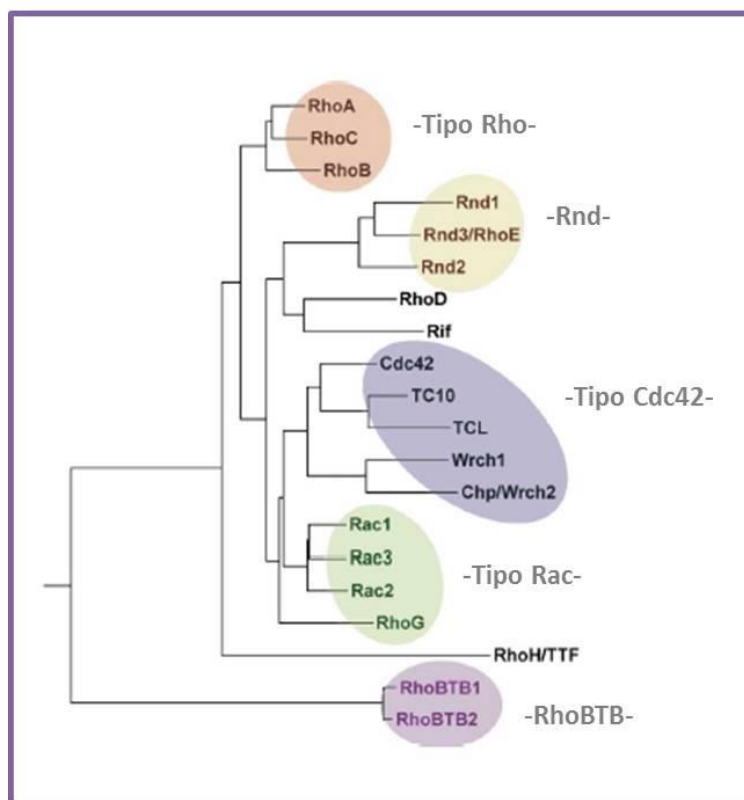
La mayoría de los miembros de las subfamilias Ras, Rho y Rab poseen en su extremo carboxilo terminal un motivo susceptible de sufrir modificaciones lipídicas (adición de un grupo farnesil o geranil geranil), lo que implica y dicta las interacciones con la membrana y con diferentes compartimentos intracelulares, siendo esto crítico para cumplir sus funciones (Cherfils y Zeghouf, 2013; Wennerberg *et al.*, 2005). Debido a esta característica, pueden ser reguladas por un tercer tipo de proteínas, los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI), capaces de enmascarar las modificaciones lipídicas que anclan a estas proteínas en las membranas, de modo que quedan secuestradas en el citosol (Cherfils y Zeghouf, 2013). Asimismo, las GDIs son capaces de regular a las GTPasas de dos formas adicionales. Por una parte, pueden actuar como inhibidoras de la disociación de GDP, manteniendo de esta forma a las GTPasas inactivas y previniendo su activación por las GEFs (Fukumoto *et al.*, 1990). Por otra parte, las GDIs son capaces de interactuar con la forma activa de la GTPasa unida a GTP, impidiendo la hidrólisis de GTP, bloqueando de este modo tanto la actividad GTPasa intrínseca de la GTPasa como la aceleración de esta actividad por las proteínas GAP, además de impedir su interacción con proteínas efectoras (DerMardirossian y Bokoch, 2005).

Las proteínas de la familia Ras regulan principalmente la expresión génica, la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Una de las vías de señalización mejor caracterizadas de esta familia es la activación de Ras tras la unión de factores de crecimiento a receptores con actividad tirosina quinasa (Cherfils y Zeghouf, 2013; Wennerberg *et al.*, 2005).

### La familia de las GTPasas Rho: implicaciones en la migración celular

La familia de GTPasas Rho (cuyo nombre deriva de *Ras homologous*) está principalmente implicada en el control de la reorganización del citoesqueleto de actina y la morfología celular, regulando de este modo la adhesión y migración celular (Bar-Sagi y Hall, 2000). Mediante su control sobre los filamentos de actina, son capaces de modular la contractibilidad celular, la formación de fibras de estrés, la generación de protusiones en la periferia celular, y la formación y estabilización de nuevas adhesiones focales. También controlan interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, así como procesos de endocitosis y exocitosis (Wennerberg *et al.*, 2005). Asimismo, juegan un importante papel en la regulación de la transcripción, progresión del ciclo celular y proliferación celular, en el desarrollo embrionario y en la reparación de heridas. Dada la importancia fisiológica de los procesos regulados por las GTPasas Rho, la pérdida de regulación de sus funciones puede hacerlas partícipes en situaciones patológicas, tales como procesos inflamatorios o tumorales, mediante alteraciones en la invasión y proliferación de células tumorales (Etienne-Manneville y Hall, 2002; Heasman y Ridley, 2008; Wennerberg *et al.*, 2005).

En base a sus funciones y secuencia, los miembros de la familia Rho se han clasificado en 5 subfamilias y 3 miembros independientes (**Figura 5**) (Burrige y Wennerberg, 2004).



**Figura 5. Dendrograma de la familia de GTPasas Rho.** (Adaptado de Burrige y Wennerberg, 2004).

Los miembros de la subfamilia Rac estimulan la formación de lamelipodios y ondulaciones de la membrana tras la interacción con sus efectores, como WASP, WAVE y las proteínas de la familia PAK. Estos efectores controlan la estabilidad de los filamentos de actina a través de la regulación de la actividad del complejo Arp2/3 (Schmidt y Hall, 2002). La activación de las proteínas de la subfamilia Cdc42 y la posterior unión a sus efectores promueve la formación de filopodios (Wennerberg *et al.*, 2005). Por su parte, la GTPasa RhoA, perteneciente a la subfamilia Rho, ejerce preferentemente sus funciones en la parte posterior de la célula, donde a través de la activación de la quinasa efectora Rho-quinasa (ROCK) favorece la fosforilación de MLC (*myosin light chain*), lo que se traduce en un aumento de la contractibilidad que contribuye a la retracción y al desplazamiento neto del cuerpo celular (Julian y Olson, 2014; Matsuoka y Yashiro, 2014; O'Connor y Chen, 2013; Parsons *et al.*, 2010).

Diversos estímulos pueden desencadenar la activación de las GTPasas Rho, entre los que se incluyen quimioquinas y factores de crecimiento como CXCL12, PDGF, EGF y TGF- $\beta$ 1 (Burrige y Wennerberg, 2004). Asimismo se ha descrito que la unión de moléculas de adhesión (cadherinas, integrinas o miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas) a sus ligandos puede regular la activación de estas GTPasas (Braga, 2002).

En el proceso de migración celular, las proteínas Rac juegan un papel clave en la extensión del frente de avance, mientras que las proteínas Rho participan principalmente en

la polaridad y retracción celular. De este modo se mantiene un equilibrio necesario para la motilidad celular y el control del recambio de las adhesiones focales. Mientras que Rac activo favorece el ensamblaje de estos complejos de adhesión al promover la polimerización de filamentos de actina, la actividad de RhoA promueve su maduración mediante la generación de tensión a través de MLC. Por el contrario, la retracción de la parte posterior de la célula mediada por RhoA induce el desensamblaje de las adhesiones focales, contribuyendo a la renovación de las mismas y facilitando el desplazamiento del cuerpo celular (O'Connor y Chen, 2013; Parsons *et al.*, 2010; Sackmann, 2015). Asimismo, elementos de las adhesiones focales como paxilina y FAK reclutan GEFs (como p190RhoGEF, CRK) y GAPs (como p120RasGAP y p190RhoGAP), regulando la actividad de las distintas GTPasas Rho, lo que se traduce en la regulación de la dinámica de estas adhesiones y por tanto de la migración celular (Goicoechea *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014; Webb *et al.*, 2002).

Las GEFs de las GTPasas Rho pueden agruparse en dos familias: las portadoras de un dominio de homología a Dbl, y las portadoras del dominio de homología a Dock (Cherfils y Zeghouf, 2013). Se ha descrito que la GEF Vav2 regula la activación de RhoA en los procesos de invasión de células de melanoma en respuesta a CXCL12 (Bartolome *et al.*, 2006). Las GAPs de las GTPasas Rho comparten todas ellas el dominio catalítico RhoGAP (Cherfils y Zeghouf, 2013).

### Las proteínas RhoGAP: reguladores negativos de la actividad de las GTPasas Rho

Las proteínas GAP se dividen en las familias RhoGAP, RanGAP, RabGAP, RasGAP y RapGAP, en función de la familia de GTPasas sobre las que ejerzan sus funciones (Cherfils y Zeghouf, 2013). Las proteínas RhoGAP están reguladas por diversos mecanismos, entre ellos fosforilación, interacción proteína-proteína, unión lipídica y degradación proteica. Están implicadas en múltiples procesos biológicos, como exocitosis y endocitosis, citoquinesis, diferenciación celular, migración, morfogénesis neuronal, angiogénesis y supresión tumoral (Tcherkezian y Lamarche-Vane, 2007). Se ha propuesto que la alteración en genes codificantes de las RhoGAP podría estar implicada en patologías como el síndrome de Bardet-Biedl y cáncer (Cherfils y Zeghouf, 2013; Porter *et al.*, 2016; Tcherkezian y Lamarche-Vane, 2007; van Buul *et al.*, 2014).

#### La subfamilia p190RhoGAP

Está compuesta por dos proteínas con alta similitud, p190-A (p190RhoGAP; originalmente p190) y p190-B. Estructuralmente, contienen un dominio GTPasa en el extremo amino terminal, seguido de cuatro dominios consecutivos tipo FF (que presentan dos residuos de fenilalanina conservados), un dominio RhoGAP en el extremo carboxilo terminal y una región rica en prolina, capaz de interactuar con dominios SH3 de otras proteínas (Tcherkezian y Lamarche-Vane, 2007). p190-B posee una región rica en prolina adicional en su extremo carboxilo terminal. Estas proteínas presentan actividad GAP *in*

*vitro* sobre Rac1, Cdc42 y RhoA (Tcherkezian y Lamarche-Vane, 2007), mostrando preferencia por RhoA (Arthur y Burridge, 2001; Biname *et al.*, 2016; Ridley *et al.*, 1993).

Las proteínas p190RhoGAP han sido implicadas en supresión tumoral (Tikoo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1997), y en migración e invasión de células cancerosas (Arthur y Burridge, 2001; Nakahara *et al.*, 1998; Zrihan-Licht *et al.*, 2000). Se ha mostrado que los ratones deficientes en p190-B muestran una disminución del tamaño corporal, defectos en la señalización mediada por insulina, menor adipogénesis y miogénesis y defectos en el desarrollo cerebral, entre otros (Chakravarty *et al.*, 2000; Matheson *et al.*, 2006; Sordella *et al.*, 2003; Tcherkezian y Lamarche-Vane, 2007). Por otra parte, p190-A es requerida para el correcto desarrollo de las glándulas mamarias y del cerebro (Heckman-Stoddard *et al.*, 2011; Matheson *et al.*, 2006).

En cuanto a su regulación, se ha mostrado que la fosforilación de p190RhoGAP en residuos de tirosina por Src quinasas juega un papel fundamental en el control de estas proteínas (Haskell *et al.*, 2001; Roof *et al.*, 1998). Así, la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP correlaciona con su actividad GAP sobre RhoA (Arthur *et al.*, 2000; Fincham *et al.*, 1999; Haskell *et al.*, 2001). Se ha descrito la interacción entre p190RhoGAP y p120RasGAP, sugiriendo la conexión entre vías de señalización de Ras y Rho (McGlade *et al.*, 1993). Específicamente, la fosforilación del residuo de tirosina 1105 (Y1105) por las Src quinasas se requiere para la unión de p190RhoGAP a p120RasGAP (Roof *et al.*, 1998). Dicha interacción contribuye a la reorientación de los filamentos de actina y a la migración direccional (Kulkarni *et al.*, 2000). Asimismo, se ha observado en células de melanoma que la fosforilación de p190RhoGAP por Src quinasas es necesaria para promover la inactivación de RhoA en respuesta a  $G\alpha_{13}$ , bloqueándose de este modo la invasión celular (Bartolome *et al.*, 2008).

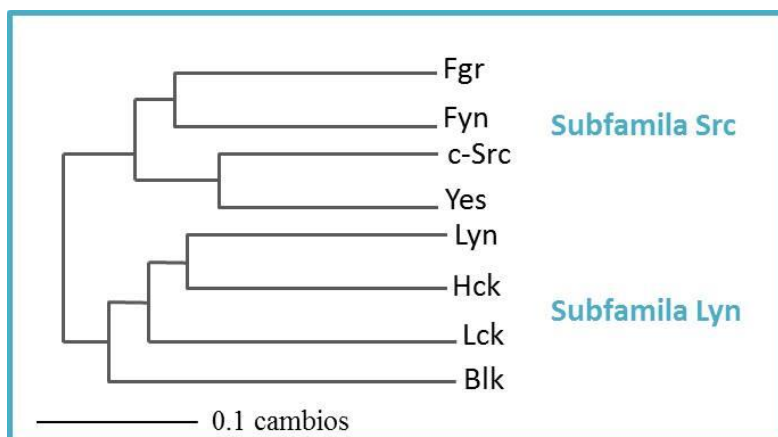
### La familia de las Src quinasas

Los orígenes de la descripción de la familia de las Src quinasas (SFK) se remonta a los estudios de Peyton Rous con pollos, en los cuales la inyección de extractos celulares de tumores de pollos en animales sanos inducía la formación de tumores (Rous, 1910). Estos extractos contenían el Virus de Sarcoma de Rous portador de la secuencia del gen *v-Src*, e inducía transformación celular. La primera secuencia de *v-Src* data de 1980 (Czernilofsky *et al.*, 1980), y la caracterización de su homólogo el proto-oncogen *c-Src* fue publicada en 1981 (Smart *et al.*, 1981). El oncogen *v-Src* se caracteriza por presentar una delección en parte de su extremo carboxilo terminal, lo que lo hace constitutivamente activo, a diferencia de *c-Src*. Posteriormente se descubrió que *c-Src* pertenecía a una familia más amplia de quinasas estructuralmente relacionadas, a la cual se llamó familia de las Src quinasas (Parsons y Parsons, 2004).

Las SFKs son proteínas no receptoras con actividad tirosina quinasa que controlan la transmisión de señales recibidas por receptores tirosina quinasa de la superficie celular, entre ellas las procedentes de receptores de factores de crecimiento y citoquinas, o de

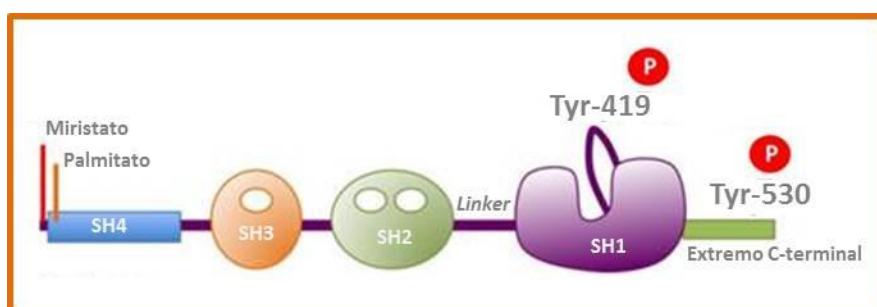
receptores de moléculas de adhesión y antígenos. Estas señales están relacionadas con procesos celulares fundamentales como el crecimiento y la supervivencia celular, la diferenciación, la morfología y migración celulares.

Las SFKs están compuestas por ocho miembros que, basados en su homología general, pueden agruparse en dos subfamilias: la subfamilia Lyn (Lyn, Hck, Lck y Blk), y la subfamilia Src (c-Src, Yes, Fyn y Fgr) (**Figura 6**) (Bradham *et al.*, 2006; O'Neill *et al.*, 2004).



**Figura 6. Dendrograma de los miembros de la familia de las Src quininas.** (Basado en Bradham *et al.*, 2006).

Todos los miembros de esta familia presentan una organización en dominios muy conservada (**Figura 7**). Su estructura posee un dominio SH3 (reconocimiento de motivos ricos en prolina), seguido de un dominio SH2 (reconocimiento de tirosinas fosforiladas), un dominio de unión o *linker*, un dominio SH1 (con actividad tirosina quinasa), y finalmente un corto dominio carboxilo terminal. Asimismo, las SFKs presentan en su extremo amino terminal un dominio SH4 (implicado en el anclaje a membrana de estas proteínas) que está siempre miristoilado y a veces palmitoilado (excepto en c-Src y Blk). La región SH4 posee un dominio característico de 50-70 residuos, divergente entre los miembros de la familia (Boggon y Eck, 2004).

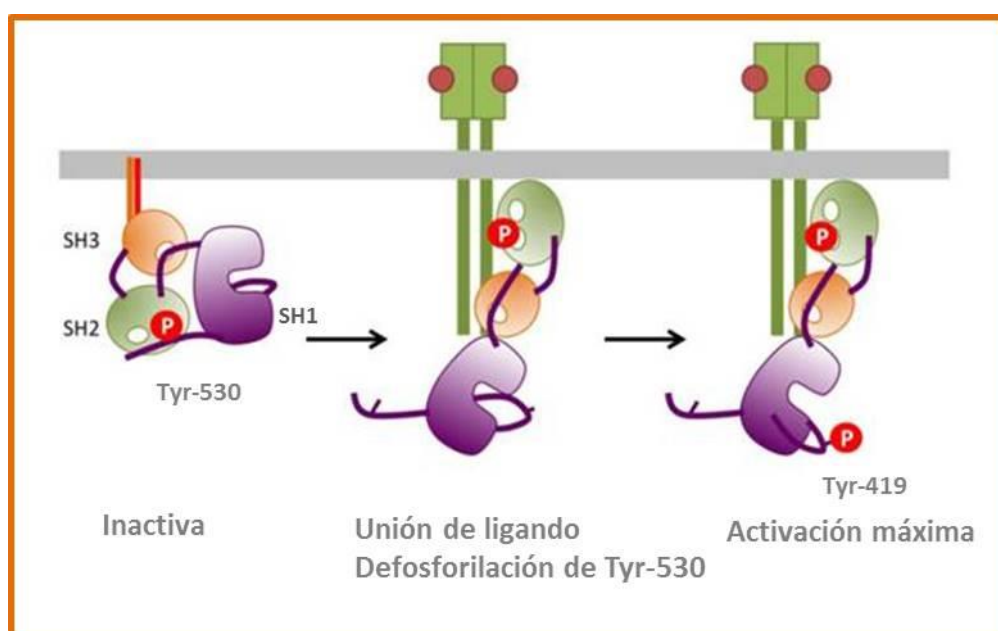


**Figura 7. Estructura en dominios de las SFKs.** Se muestran asimismo las tirosinas reguladoras de c-Src (Adaptado de Young *et al.*, 2001).

Como otras muchas proteínas quinasa, las SFKs requieren la fosforilación de un residuo en el dominio quinasa para adquirir su actividad catalítica máxima. En c-Src, este sitio de autofosforilación es la Y419 (“tirosina activadora”) (Bjorge *et al.*, 2000; Boggon y

Eck, 2004; Prakash *et al.*, 2007). Por otra parte, en su extremo carboxilo terminal se encuentra una tirosina susceptible de fosforilación (Y530 en c-Src) (Bjorge *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 1986; Prakash *et al.*, 2007), la cual es responsable de la autoinhibición de las SFKs cuando está fosforilada (“tirosina inhibitoria”). La fosforilación de este residuo lo realiza la quinasa Csk o su homólogo Chk (Chong *et al.*, 2005), lo que se traduce en el ensamblaje de los dominios SH2, SH3 y el dominio quinasa en una conformación plegada que se mantiene por íntimas interacciones entre estos dominios, generando una proteína en una conformación inactiva (Boggon y Eck, 2004). Concretamente, los estudios cristalográficos en c-Src muestran que el dominio SH2 se une al extremo carboxilo terminal fosforilado, y que el dominio SH3 puede entonces unirse al segmento de unión entre el dominio SH2 y el dominio quinasa, quedando la tirosina Y419 (“tirosina activadora”) oculta en este bolsillo (Xu *et al.*, 1997).

En el proceso de activación de las SFKs intervienen varios mediadores (Figura 8). Por una parte, tras la unión de ligandos a sus receptores tirosina quinasa de membrana, éstos se autofosforilan en varios residuos tirosina en su dominio citoplasmático, lo que permite el reconocimiento de estas tirosinas fosforiladas por los dominios SH2 de las SFKs. Esto hace que se exponga la tirosina inhibitoria Y530 a proteínas tirosina fosfatasas como la PTP $\alpha$ , permitiendo que las SFKs se desplieguen, quedando el dominio quinasa expuesto y pasen a estar completamente activas tras autofosforilación de la “tirosina activadora”.



**Figura 8. Modelo de activación de las SFKs.** Se muestra c-Src como ejemplo (Adaptado de Young *et al.*, 2001).

SFKs han sido ampliamente implicadas en procesos oncogénicos. Así, se ha descrito la sobre-expresión de Fgr y Lck en leucemias y linfomas, de c-Src en cáncer de mama, páncreas y en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, así como de Yes en melanoma maligno y cáncer de colon (Blume-Jensen y Hunter, 2001; Gelman *et al.*, 2014; Ku *et al.*, 2015; Parsons y Parsons, 2004; Veracini *et al.*, 2015). Asimismo, participan

en muchos de los procesos implicados en la invasión y metástasis, tales como la transición epitelio mesénquima, la inducción de angiogénesis, la modulación del microambiente tumoral, así como la proliferación, supervivencia, migración, invasión y adhesión celulares (Patel *et al.*, 2016).

### *Blk (-B lymphocyte kinase)*

El estudio de la quinasa Blk se inició tras su descripción en células B. Así, se demostró que la expresión de Blk ocurre en etapas tempranas del desarrollo de células B en médula ósea, y que alcanza altos niveles en células B maduras, lo que sugiere un papel de Blk en la fisiología de estos linfocitos (Wasserman *et al.*, 1995). Sin embargo, estudios en ratones deficientes en Blk no mostraron alteraciones en el desarrollo y activación de células B, ni variaciones en la respuesta inmune humoral, mostrando estos ratones viabilidad y fertilidad normales. Estos resultados serían consistentes con la redundancia funcional de Blk con otras SFKs en el desarrollo de células B (Texido *et al.*, 2000), puesto que Lyn, Fyn y Lck se expresan asimismo en este tipo celular, y todas ellas son activadas tras unión de los antígenos al receptor de células B (Burkhardt *et al.*, 1991).

Aunque se propuso inicialmente que la expresión de Blk estaba restringida a células B, estudios posteriores demostraron su expresión en varios tipos celulares. Uno de estos estudios demostró que Blk se expresa en células  $\beta$  del páncreas, en las cuales Blk induce la síntesis y secreción de insulina en respuesta a glucosa (Borowiec *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha observado que Blk se expresa en progenitores de la médula ósea y el timo, y parece ser requerida para el desarrollo de células T y para la producción de IL-17 por las células  $T\gamma\delta$  (Laird *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha descrito que Blk se regula por proteólisis mediada por ubiquitinización por E6AP (*E3 ubiquitin-protein ligase*) (Oda *et al.*, 1999). En este trabajo se mostró que las formas activas de Blk son preferentemente degradadas por el proteasoma, constituyendo éste un nuevo tipo de regulación de las SFKs, aparte de los procesos de fosforilación/desfosforilación mencionados.

En cuanto a la relación de Blk y cáncer, se ha descrito su contribución como potenciador tumoral así como de supresor de tumores. Por una parte, Blk contribuye a la transformación maligna de progenitores de células B tras la expresión de formas constitutivamente activas de esta SFK (Malek *et al.*, 1998). Asimismo, se ha mostrado la expresión de Blk en la mayoría de pacientes con linfoma cutáneo de células T (Petersen *et al.*, 2014). En este trabajo se utilizaron mutantes activos de Blk en los que la tirosina 501 (“tirosina inhibidora”) fue sustituida por una fenilalanina (Y501F), impidiendo el plegamiento de Blk en su conformación inactiva, quedando así el dominio quinasa expuesto y la tirosina Y388 (“tirosina activadora”) capaz de ser autofosforilada. Adicionalmente, se observó que la forma activa de Blk promueve la proliferación de células T malignas *in vitro* así como el crecimiento tumoral *in vivo* (Petersen *et al.*, 2014). Igualmente, existen otras evidencias de la expresión de Blk en cáncer, concretamente en la leucemia linfoblástica aguda infantil (Montero-Ruiz *et al.*, 2012). En cuanto al papel de Blk

como supresor tumoral, en un estudio en el que se utilizó el modelo BCR-ABL para inducir leucemia mieloide crónica, se observó la disminución de la expresión de Blk mediado por c-Myc y su implicación en la supresión de este tumor (Zhang *et al.*, 2012). A la vista de estos resultados, el papel de Blk en cáncer parece ser dependiente del contexto celular.

## II. MELANOMA, RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA Y miRNAS

### Tratamiento del melanoma

Cuando el melanoma se detecta en los estadios iniciales es fácilmente tratable mediante resección quirúrgica, siendo la supervivencia de los pacientes muy alta (95%). Sin embargo, una vez que el melanoma inicia su proceso de metástasis, se produce un descenso brusco de la supervivencia (Balch *et al.*, 2009). Antes de la utilización de fármacos inhibidores de la vía de las MAP-quinasas, las opciones de tratamiento para el melanoma metastásico eran muy limitadas. La única quimioterapia aprobada por la FDA era la dacarbazina, un agente alquilante que presentaba una baja tasa de respuesta clínica positiva (10% de los pacientes), y de corta duración (Crosby *et al.*, 2000).

En la última década, desde el descubrimiento en 2002 de la mutación oncogénica en *BRAF* (*BRAF* V600) (Davies *et al.*, 2002), se ha producido una explosión en la búsqueda de inhibidores específicos frente a esta forma mutante de *BRAF*. Entre éstos destaca el vemurafenib (PLX4032), el cual tuvo respuestas muy positivas en ensayos preclínicos y clínicos. Se observó que en un 80% de los pacientes tratados con vemurafenib (VMF), los tumores decrecían rápidamente de forma total o parcial, siendo además tolerable la toxicidad asociada a dicho tratamiento (Bollag *et al.*, 2010; Flaherty *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010a). En posteriores ensayos clínicos en fases más avanzadas, se observó que el 50% de los pacientes con melanoma metastásico con mutaciones en *BRAF* respondían al inhibidor, con una supervivencia media de 13 meses. Estos datos confirmaban la efectividad del vemurafenib, cuyo uso fue aprobado en clínica por la FDA en agosto del 2011, tan sólo 4 meses después de iniciarse los trámites para su aprobación (Chapman *et al.*, 2011; McArthur *et al.*, 2014; Sosman *et al.*, 2012). Aparte del vemurafenib, se han desarrollado otros inhibidores frente a *BRAF* V600E, como el dabrafenib (GSK2118436), el cual además muestra cierta actividad sobre *CRAF*. Su uso en clínica fue aprobado por la FDA en 2013 (Hauschild *et al.*, 2012).

A estos avances del tratamiento del melanoma metastásico les siguió el desarrollo de un inhibidor específico para MEK1/2, el trametinib. Se trata de un inhibidor alostérico de alta potencia y baja toxicidad, y que parecía ser efectivo en pacientes con melanoma metastásico con mutaciones en *BRAF*V600, incluso en aquellos que habían sido tratados anteriormente con VMF (Gilmartin *et al.*, 2011; Solit *et al.*, 2006). La FDA aprobó el uso del trametinib en 2013, y si bien su uso en monoterapia es limitado, la combinación de tratamientos entre el vemurafenib o dabrafenib con trametinib constituye una de las

primeras líneas de terapia usadas actualmente frente al melanoma (Girotti *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013).

Sin embargo, las respuestas clínicas a estos inhibidores son a corto plazo, y la mayoría de los pacientes acaban desarrollando resistencia y una recaída en la enfermedad en menos de un año (Bucheit y Davies, 2014; Lito *et al.*, 2013; Spagnolo *et al.*, 2014). Por tanto, a pesar de la importancia que ha supuesto en clínica el descubrimiento de estos fármacos, la necesidad de entender y superar los mecanismos de resistencia generados frente a estos inhibidores es fundamental para mejorar y alargar la vida de los pacientes.

Gracias a los trabajos dirigidos al estudio de los mecanismos de resistencia, sobre los que se profundizará más adelante, se han desarrollado otros inhibidores de la vía de las MAP-quinasas, así como de otras vías implicadas en la resistencia tumoral a la quimioterapia. Entre éstos destacan inhibidores para ERK1/2, CDK4/6, receptores tirosina quinasa (RTK) o de la vía PI3-quinasa/AKT. En este sentido, algunos de ellos se han probado como monoterapia, en combinación con los inhibidores de BRAF, o bien administrándolos tras la aparición de resistencias (Girotti *et al.*, 2014; Menzies y Long, 2014b). Por ejemplo, los estudios con SCH772984, un inhibidor de ERK1/2 competitivo de ATP, indican que se podría frenar la vía de las MAP-quinasas en tres niveles diferentes y, notablemente, se ha comprobado que dicho agente inhibe el crecimiento de células resistentes a fármacos contra BRAF y MEK (Morris *et al.*, 2013). Éste y otros inhibidores de ERK, así como otros dirigidos frente a varias dianas implicadas en resistencia a quimioterapia están siendo actualmente probados en ensayos clínicos (Girotti *et al.*, 2014; Grimaldi *et al.*, 2015; Simeone *et al.*, 2017).

Además del desarrollo de la terapia dirigida frente a dianas específicas, la inmunoterapia ha sido durante los últimos años un foco de intenso estudio en la búsqueda de nuevos tratamientos frente al melanoma metastásico (Franklin *et al.*, 2016). La inmunoterapia pretende activar las células T para que desencadenen su acción citolítica sobre las células tumorales. Entre los agentes inmunoterapéuticos últimamente desarrollados destaca el ipilimumab, un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 aprobado por la FDA en 2011 (Girotti *et al.*, 2014; Hodi *et al.*, 2003). Asimismo, anticuerpos anti-PD1, como el nivolumab y pembrolizumab (Tumeh *et al.*, 2014), han tenido mejores respuestas clínicas que el ipilimumab y con menor toxicidad asociada. Actualmente, el nivolumab y el pembrolizumab (aprobados en 2011 y 2014 por la FDA, respectivamente), son preferentemente utilizados en clínica, ya sea en monoterapia o en tratamientos combinados con el VMF o dabrafenib, o con el ipilimumab (Franklin *et al.*, 2016).

### Vemurafenib: Un inhibidor específico de BRAF V600E

Uno de los primeros inhibidores selectivos frente a BRAF fue PLX-4720 (Plexxikon, Berkeley, CA, EEUU), el cual mostraba potentes efectos inhibitorios sobre formas mutantes de BRAF *in vitro*, pero demostró ser ineficaz a nivel farmacológico en los ensayos *in vivo* (Tsai *et al.*, 2008). La reformulación del compuesto a través de una

colaboración con la compañía F. Hoffmann-La Roche (Basilea, Suiza), se tradujo en el actual compuesto PLX-4032 (vemurafenib, cuyo nombre deriva de *V600Emutated BRAF enzyme inhibition*), con mejoradas propiedades farmacocinéticas (Bollag *et al.*, 2010). Farmacocinéticamente, el vemurafenib es extremadamente rápido, y en biopsias realizadas a día 1 y 14 del tratamiento, se observó una consistente inhibición de la actividad de BRAF sobre la fosforilación de ERK1/2 (Chapman *et al.*, 2011; Flaherty *et al.*, 2010; Swaika *et al.*, 2014).

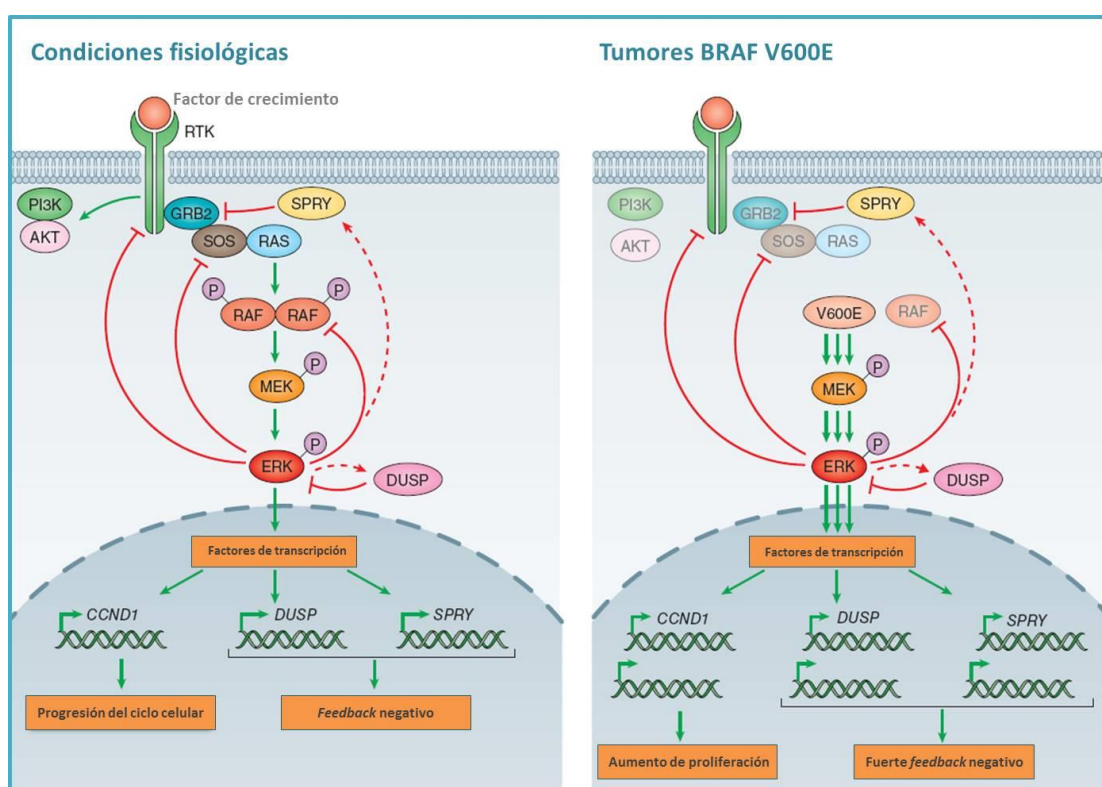
El vemurafenib es un inhibidor competitivo de ATP reversible, y para entender su mecanismo de acción es necesario conocer la estructura de BRAF. Cada protómero de BRAF contiene dos regiones de diferente tamaño unidas por una región bisagra y una hendidura cercana que conforma el sitio de unión a ATP (Bollag *et al.*, 2010). La conformación de las proteínas quinasas puede ser *DFG-in* (donde DFG se refiere a los aminoácidos aspártico-fenilalanina-glicina, que se encuentran en el bucle de activación), en la cual la fenilalanina se encuentra oculta y lejos del sitio de unión del ATP, permitiendo entonces la unión de dicho ATP. Alternativamente pueden encontrarse en la conformación *DFG-out*, en la que la fenilalanina se encuentra hacia afuera, obstruyendo el sitio de unión del ATP, por lo que en estas condiciones la quinasa no puede realizar su actividad enzimática (Hari *et al.*, 2013). En los mutantes para *BRAF*, la unión formada entre el ácido glutámico 600 (E600) y la lisina 507 mantiene el bucle de activación en la conformación *DFG-in*, lo que hace que la proteína mutante esté constitutivamente activa (Bollag *et al.*, 2012). En ensayos bioquímicos, el VMF muestra una modesta preferencia de unión a las formas mutadas de BRAF frente a las *wild type*. Sin embargo, esta preferencia se vio considerablemente incrementada en los ensayos *in vitro* con líneas celulares de melanoma, observándose que la disminución en la fosforilación de ERK1/2 ocurre en las líneas celulares mutadas en *BRAF* y no en las *BRAF wild type*. La caracterización estructural explica la diferencia en afinidad, puesto que el compuesto se une preferentemente a la conformación activa de la quinasa (*DFG-in*) y esta conformación está estabilizada por la mutación V600E (Bollag *et al.*, 2010; Bollag *et al.*, 2012). De acuerdo con esto, en los ensayos preclínicos se observó que el vemurafenib era altamente específico para las formas mutantes de *BRAF* (V600E, V600K y V600D). Sin embargo, se observó que provocaba crecimiento del tumor en modelos murinos de xenoinjerto con células tumorales *BRAF wild type*, mecanismo en el que se profundizará posteriormente (Flaherty *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010a).

### La vía de las MAP-quinasas: implicaciones de la mutación BRAF V600E en melanoma

Existen varios actores principales en la cascada de señalización de las MAP-quinasas (proteínas quinasa activadas por mitógenos). La familia de las RAF quinasas consta de tres miembros: ARAF, BRAF y CRAF, los cuales poseen actividad quinasa sobre serinas y treoninas. Las MAP2K (o MAPKK: *Mitogen-activated protein kinase kinase*) incluyen varios miembros, entre ellos MEK1 y MEK2; estas proteínas son quinasas de

actividad dual, serina-treonina y tirosina quinasa. Por último, ERK1 y ERK2 presentan ambas actividad serina-treonina quinasa (Lito *et al.*, 2013).

La señalización de esta vía se activa principalmente tras la unión de mitógenos extracelulares a receptores con actividad tirosina quinasa, que, al ser activados, se autofosforilan en determinados residuos (**Figura 9**). Esto implica el reclutamiento de proteínas adaptadoras, como GRB2 y SOS, desde el citosol a la membrana plasmática. GRB2 posee un dominio SH2, el cual reconoce los residuos de tirosina fosforilados del receptor, así como dos dominios SH3 que se unen a regiones ricas en prolina de SOS. Ésta, a su vez, activa a Ras, puesto que es un GEF específico de esta GTPasa.



**Figura 9. Señalización de la vía de las MAP-quinasas.** Se muestran las proteínas implicadas en dicha vía en condiciones fisiológicas y en tumores con mutación BRAF V600E (Adaptado de Lito *et al.*, 2013).

La estimulación de Ras tiene como resultado la posterior activación de RAF, a través de una serie de pasos que incluyen cambios conformacionales, fosforilación y dimerización. En ausencia de estímulos activadores, las quinasas RAF se encuentran en una conformación plegada, en la cual el extremo amino terminal inhibe al extremo catalítico carboxilo. Esta conformación inactiva se estabiliza por fosforilaciones en residuos clave en RAF (S365 en BRAF), los cuales sirven de anclaje para la proteína adaptadora 14-3-3, que participa en el mantenimiento de esta conformación inactiva. La defosforilación de estos residuos por fosfatasa, como la fosfatasa 2A, desplaza a la proteína 14-3-3, lo que facilita la activación de RAF. Otro proceso clave para la activación de BRAF es la interacción entre Ras-GTP con los dominios RBD de RAF localizados en su extremo amino terminal. RAF interacciona asimismo con motivos lipídicos de Ras a través de un dominio rico en cisteínas

cercano al dominio RBD. El resultado final de la unión Ras-RAF es la translocación de RAF a la membrana, y el cambio a una conformación abierta por la disrupción de la interacción de los extremos amino y carboxilo terminales. A continuación, RAF es fosforilado en residuos clave (S445 en BRAF) localizados en una región (N) cercana al extremo carboxilo terminal, que se cree es la responsable de regular la interacción autoinhibitoria con el extremo amino terminal. La fosforilación de este residuo es fundamental para adquirir su actividad quinasa y para permitir su unión a MEK. La fosforilación de determinados residuos del segmento de activación (T599 y S602 en BRAF) es también necesaria para su activación (Lito *et al.*, 2013; Matallanas *et al.*, 2011; Wellbrock *et al.*, 2004). Finalmente, la activación máxima de RAF *wild type* se consigue con la formación de homo y heterodímeros. Aunque se ha propuesto que la formación de homodímeros es el mecanismo mayoritario, sin embargo la actividad quinasa de los heterodímeros es 30 veces superior que la de los homodímeros. Estos heterodímeros estarían principalmente constituidos por BRAF y CRAF (Matallanas *et al.*, 2011; Rushworth *et al.*, 2006).

Las formas activas de RAF fosforilan dos residuos de serina en MEK1 (Ser218 y Ser222) y MEK2 (Ser222 y Ser226), lo que conduce a su activación. Asimismo, la actividad de MEK es regulada por procesos de fosforilación/defosforilación adicionales. La inactivación de MEK implica una rápida defosforilación de las mencionadas serinas llevada a cabo principalmente por la serina-treonina fosfata PP2A. Tras ser estimuladas, las proteínas MEK actúan con su actividad quinasa dual fosforilando residuos regulatorios de tirosina y treonina en las proteínas ERK, provocando su activación. Se ha propuesto que las proteínas ERK son los únicos sustratos fisiológicos de las proteínas MEK, sugiriendo que estas quinasas son componentes específicos de esta cascada de señalización (Roskoski, 2012; Shaul y Seger, 2007).

Las formas de ERK activas fosforilan en residuos serina y treonina en dominios ricos en prolina presentes en múltiples sustratos citoplasmáticos y nucleares. De este modo, ERK actúa como un regulador de la supervivencia y proliferación celular, de la adhesión y migración celulares, así como en procesos de diferenciación celular. Se han identificado más de 50 sustratos citoplasmáticos de ERK, entre los que se incluyen quinasas (p90RSK), reguladores de la apoptosis (BIM) y proteínas del citoesqueleto (paxilina), entre otros (Roux *et al.*, 2007; Shaul y Seger, 2007). Por su parte, ERK regula mediante fosforilación diversos factores de transcripción en el núcleo, incluyendo miembros de las familias TCF y ETS (Shaul y Seger, 2007). Los factores de transcripción activados se unen a los promotores de genes de respuesta inmediata o de respuesta tardía, activando su transcripción, como es el caso de *MYC*, *FOS* o *CCND1*, los cuales cumplen papeles fundamentales en la progresión del ciclo celular. Además, ERK controla la transcripción de genes que codifican para otros reguladores transcripcionales (como por ejemplo ETV1-ETV5) y fosfatasa (como PPA2B), entre otros (Lito *et al.*, 2013; Shaul y Seger, 2007).

La señalización de la vía de las MAP-quinasas está limitada por una compleja red de regulaciones negativas o *feedback*. Este *feedback* es llevado a cabo principalmente por ERK, que fosforila prácticamente a todos los componentes de la cascada RTK-Ras-MAP-quinasas. Por ejemplo, ERK fosforila a EGFR, lo que estimula el reciclaje del mismo (Li *et al.*, 2008). Asimismo, ERK o su sustrato p90RSK pueden fosforilar a SOS1, inhibiendo su actividad y causando la inactivación de Ras. Por otra parte, ERK puede fosforilar a RAF en diferentes residuos, lo que se traduce en una disminución de su actividad quinasa y en una restricción de la interacción Ras-RAF (Lito *et al.*, 2013). Adicionalmente, ERK puede inducir la expresión de genes que inhiben la activación de la vía de las MAP-quinasas, entre los que destacan las fosfatasas de especificidad dual (DUSPs) y las proteínas Sprouty. Las proteínas DUSPs defosforilan a ERK inactivándola (Amit *et al.*, 2007), y a su vez ERK puede fosforilar e inducir la degradación de DUSP1 (Brondello *et al.*, 1997), lo que añade enorme complejidad a los mecanismos de regulación de esta vía. Por su parte, las proteínas Sprouty actúan como reguladores negativos de la señalización de ERK, a través de la inhibición de la activación de Ras por los RTKs. Cuando las proteínas Sprouty están fosforiladas en una tirosina conservada, sirven de anclaje para los dominios SH2 de GRB2, impidiendo de este modo la activación de Ras, dado que GRB2 estaría secuestrado, no pudiendo servir de anclaje para SOS (Hanafusa *et al.*, 2002). Asimismo, SPRED, un miembro de la familia Sprouty regulado transcripcionalmente por ERK, puede reclutar a la membrana plasmática a NF1, que es una GAP de Ras, lo que promueve la inactivación de Ras (Kim y Bar-Sagi, 2004; Lito *et al.*, 2013).

### *La mutación BRAF V600E*

En conjunto, las alteraciones oncogénicas que implican la activación de la vía de las MAP-quinasas constituyen cerca del 90% de las mutaciones identificadas en melanoma, incluyendo no sólo las mutaciones en *BRAF* y *NRAS*, que son las más representadas, sino también las de otros miembros de la ruta. El gran número de mutaciones en esta vía explica el alto nivel de activación de MEK y ERK en la mayoría de los melanomas (Girotti *et al.*, 2014). Dada la importancia cuantitativa de la mutación BRAF V600E, es necesario explicar las consecuencias de la misma en la señalización de la vía de las MAP-quinasas.

Las células que expresan BRAF V600E presentan hiperactivación de ERK, lo que causa una elevada actividad transcripcional, cuya consecuencia es el aumento del *feedback* negativo antes citado (Pratilas *et al.*, 2009). El resultado es la disminución de la activación de Ras en la mayoría de las células con mutaciones en *BRAF*. De esta forma, se ha sugerido que BRAF V600E se encuentra fundamentalmente formando monómeros, que son capaces de señalizar, y es en esta forma monomérica cuando BRAF V600E es más sensible a la acción de inhibidores selectivos. De este modo, puesto que la señalización mediada por BRAF V600E es independiente de la dimerización, y por tanto de la regulación “*upstream*”, es capaz de resistir el efecto inhibitorio del *feedback* negativo desencadenado por la alta activación de ERK (Lito *et al.*, 2012; Lito *et al.*, 2013).

## Activación de la vía de las MAP-quinasas en células BRAF *wild type* tratadas con vemurafenib

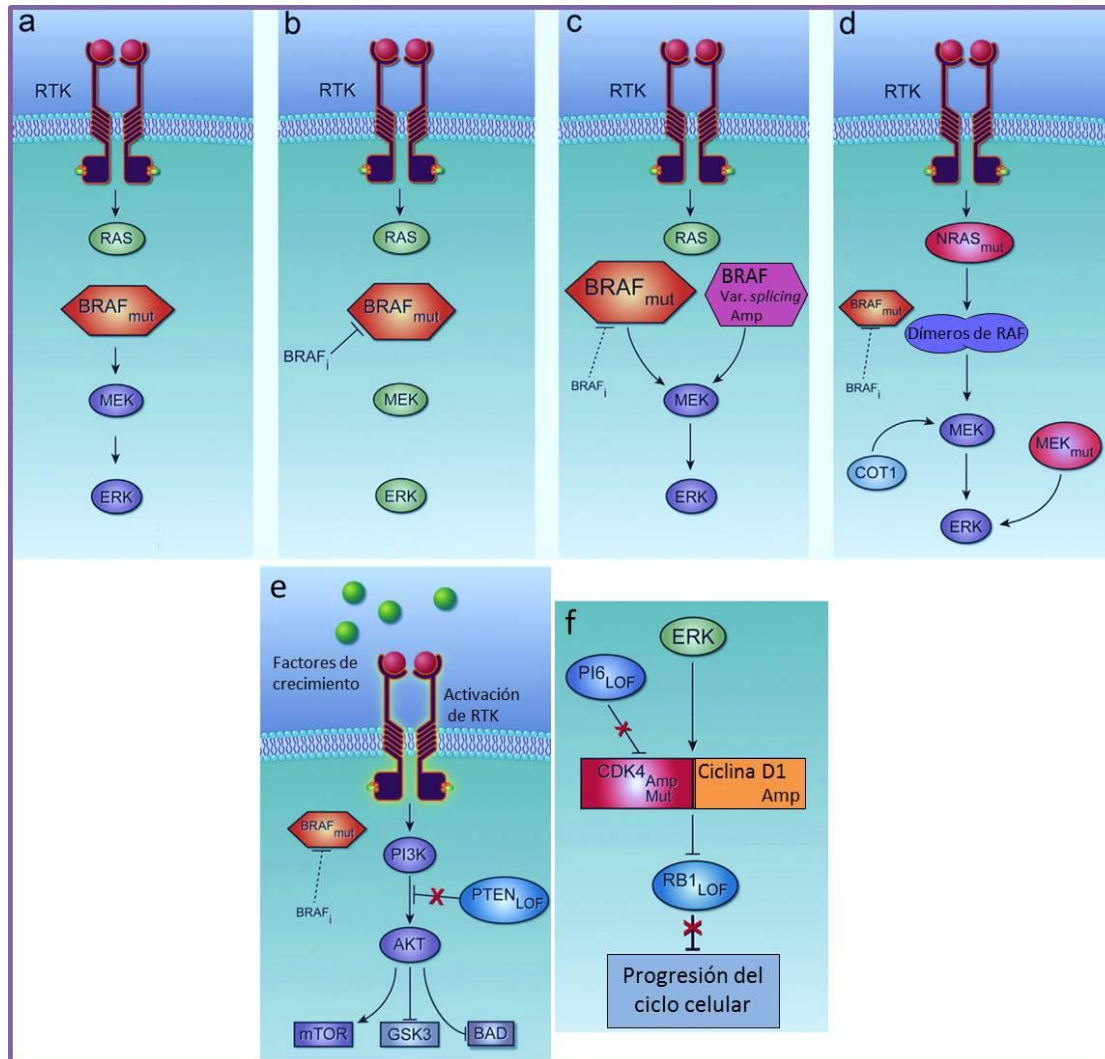
Una característica de los inhibidores de BRAF es que disminuyen la activación de ERK sólo cuando los tumores portan la mutación en *BRAF*. Por el contrario, los tumores *BRAF wild type*, incluyendo aquellos con mutaciones en *NRAS*, exhiben una activación “paradójica” de la señalización de ERK cuando se tratan con estos inhibidores. Una explicación para esta activación podría estar en la transactivación de los dímeros de RAF. Los estudios cristalográficos muestran que el VMF se une únicamente a uno de los dos protómeros que constituyen el homo o heterodímero de RAF, lo cual inhibe al protómero con el inhibidor unido, pero causa la transactivación del otro protómero. Esto podría ser debido a un cambio conformacional inducido por la unión del vemurafenib, que provoca que el otro protómero pase a adoptar una conformación *DFG-in* activa (Bollag *et al.*, 2010; Bollag *et al.*, 2012). En tumores con BRAFV600E, en los cuales Ras no está activo debido al *feedback* inhibitorio de ERK, la transactivación es mínima debido a que la dimerización de BRAF es muy baja, y por tanto la señalización de ERK puede ser inhibida cuando se administra el VMF (Poulikakos *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha demostrado que en células *BRAF wild type* con mutación en *NRAS*, el inhibidor se une preferentemente a BRAF monomérico, pero induce su unión a CRAF. De este modo, BRAF con el inhibidor unido provoca la transactivación de CRAF, por lo que estos heterodímeros activarían potentemente la cascada de señalización (Hatzivassiliou *et al.*, 2010; Heidorn *et al.*, 2010). Una implicación de esto es que los inhibidores de BRAF son más efectivos en células con bajos niveles de Ras activo, puesto que en estas condiciones BRAF se encontrará principalmente en forma monomérica, y no serán efectivos en tumores que co-expresen mutaciones en *BRAF* y *RAS*. Adicionalmente, de esto se deduce que un posible mecanismo de resistencia a dichos inhibidores en tumores BRAFV600E es la inducción de la formación de dímeros de RAF, ya sea por el aumento en la expresión de RAF *wild type* o por el aumento en la actividad de Ras (Lito *et al.*, 2013).

Uno de los principales problemas de toxicidad asociada al VMF es el desarrollo de carcinomas de células escamosas que aparecen en el 19% de los pacientes tratados (Welsh and Corrie, 2015). Se ha propuesto que la aparición de estos tumores podría deberse a la activación paradójica de la señalización de ERK en células *BRAF wild type*, puesto que la mayoría de los pacientes muestran mutaciones *NRAS* en estas lesiones (Oberholzer *et al.*, 2012). Estudios en ratones muestran que el tratamiento con inhibidores de BRAF acelera el crecimiento de células mutadas en *RAS* pre-existentes, lo que lleva a la rápida aparición de lesiones cutáneas (Su *et al.*, 2012).

## Mecanismos de resistencia a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas

La regresión de tumores BRAF V600E se observa en la mayoría de los pacientes con melanoma metastásico tratados con inhibidores de BRAF, si bien la remisión completa es rara (5% de los casos) (Chapman *et al.*, 2011; Hauschild *et al.*, 2012). La magnitud de

esta respuesta se ve limitada por mecanismos de resistencia pre-existentes y/o adquiridos, y de los pacientes que responden inicialmente, aproximadamente un 80-90% desarrollan de nuevo la enfermedad tras 12 meses, lo que ilustra la rapidez en el desarrollo de la resistencia a los inhibidores de BRAF (Kwong y Davies, 2014). En general, los mecanismos de resistencia descritos hasta la fecha implican re-activación de la vía de las MAP-quinasas, o activación de otras vías de proliferación o de supervivencia celular (**Figura 10**).



**Figura 10. Mecanismos de resistencia a inhibidores de BRAF.** (A) La hiper-activación dependiente de BRAF V600E activa a MEK y ERK constitutivamente. (B) Los inhibidores selectivos, como VMF, se unen a formas mutadas (mut) de BRAF V600E, bloqueando la activación de MEK y ERK. (C) Las amplificaciones (amp) de BRAF o variantes de *splicing* (var. *splicing*) provocan re-activación de MEK y ERK. (D) Otros mecanismos de resistencia incluyen mutaciones en *NRAS* o *MEK1*, formación de heterodímeros RAF o sobre-expresión de COT. (E) Activación de la vía PI3-quinasa por LOF (pérdida de función) de PTEN, aumento de RTKs o incremento en la producción de factores de crecimiento por el microambiente tumoral. (F) Alteraciones en el ciclo celular, como pérdida de p16, amplificación o mutación de CDK4, amplificación de ciclina D1, o pérdida de Rb1 (Adaptado de Bucheit *et al.*, 2013).

### *Alteraciones en BRAF que reactivan la vía de las MAP-quinasas*

Se han identificado pacientes de melanoma resistentes a inhibidores de BRAF con ganancia en el número de copias de *BRAF*. En este caso, la re-activación de la señalización es independiente de Ras y de CRAF (Shi *et al.*, 2014b; Shi *et al.*, 2012; Villanueva *et al.*, 2013). Se ha documentado que este mecanismo de resistencia puede ser superado en líneas celulares de melanoma aumentando la dosis del inhibidor (Shi *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha detectado la expresión de variantes aberrantes de *splicing* de BRAF que producen proteínas truncadas (p61 BRAF, la cual carece del dominio de unión a Ras). Esta variante es capaz de dimerizar en presencia del inhibidor y en ausencia de señalización de Ras, y en este caso el aumento de la dosis del inhibidor no consigue vencer la resistencia (Poulikakos *et al.*, 2011). Notablemente, la expresión de isoformas aberrantes de *splicing* también ha sido detectada en muestras de pacientes resistentes a VMF (Poulikakos *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2014b). Por el contrario, no se ha demostrado la reversión de mutaciones en *BRAF*, ni tampoco se han detectado mutaciones secundarias en *BRAF* en pacientes con melanoma resistente a VMF (Bucheit y Davies, 2014; Nazarian *et al.*, 2010).

### *Alteraciones en otros componentes de la vía de las MAP-quinasas*

La aparición de mutaciones activadoras en *NRAS* (entre ellas *NRAS* Q61) ha sido descrita en un 20% de tumores tratados con inhibidores de BRAF. Este descubrimiento fue inicialmente inesperado, puesto que la coexistencia en melanomas de mutaciones activadoras en *BRAF* y *NRAS* es muy rara (Nazarian *et al.*, 2010), aunque no resulta extraño en vista del posible mecanismo de activación paradójico de ERK. Asimismo, se han descrito mutaciones secundarias en *MEK1* (*MEK1* Q65P y *MEK1* E203K) y *MEK2* (*MEK2* C125S y *MEK2* Q60P), responsables de conferir resistencia tanto a inhibidores de BRAF como de las proteínas MEK (Emery *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2014; Trunzer *et al.*, 2013; Villanueva *et al.*, 2013; Wagle *et al.*, 2014). Otro mecanismo de resistencia descrito para esta vía es la sobre-expresión de la quinasa COT, la cual puede fosforilar directamente a MEK o ERK (Johannessen *et al.*, 2010). Por otra parte, la re-activación de la vía de las MAP-quinasas puede aparecer mediante la formación de heterodímeros adicionales de ARAF o CRAF, de los que BRAF puede o no formar parte (Villanueva *et al.*, 2010). Así, se ha observado la sobre-expresión de CRAF en líneas celulares de melanoma resistentes a un inhibidor de BRAF (Montagut *et al.*, 2008). Adicionalmente, se han descrito pérdidas de función de NF1, lo que implica aumento de la activación de Ras (Whittaker *et al.*, 2013), así como sobre-expresión de RTKs (Nazarian *et al.*, 2010). La reducción del *feedback* negativo dependiente de ERK observado en los tratamientos con los inhibidores de RAF hace que eventualmente haya una re-activación de la vía en respuesta a ligandos extracelulares, con el consiguiente aumento de Ras activo y formación de dímeros de RAF. Esto tiene como resultado el aumento de la activación de ERK que es resistente a los inhibidores de RAF, pero sensibles a inhibidores de MEK (Lito *et al.*, 2012).

### *Alteraciones en la vía PI3-quinasa/AKT*

La vía de señalización dependiente de la PI3-K juega un papel importante en proliferación, crecimiento y supervivencia celular. Esta vía se encuentra frecuentemente hiperactivada en cáncer, incluyendo el melanoma (Davies, 2012).

La PI3-K fosforila fosfoinosítidos en los grupos hidroxilo del anillo de inositol, generando fosfatidil-inositol trifosfato  $PI_{(3,4,5)}P3$  a partir de su sustrato  $PI_{(4,5)}P2$  (Davies, 2012). La PI3-quinasa presenta dos subunidades, una reguladora de 85 kDa, con dominios SH2, y otra catalítica de 110 kDa (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012). PDGF, EGF, FGF2 y CXCL12, entre otros inducen la activación de PI3-K (Coffer *et al.*, 1998; Vanhaesebroeck *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2007). Para que se produzca su activación, la PI3-K debe interactuar a través de los dominios SH2 de la subunidad reguladora con residuos fosforilados en tirosina presentes en receptores activados (Castellano y Downward, 2011; Coffer *et al.*, 1998) o en proteínas quinasas fosforiladas como FAK (Kallergi *et al.*, 2007). Asimismo, puede ser activada directamente por Ras, la cual activa la subunidad catalítica independientemente de la subunidad reguladora (Castellano y Downward, 2011). De esta forma, la subunidad catalítica se localiza junto a la membrana plasmática, donde cataliza la producción de  $PI_{(3,4,5)}P3$  (Han *et al.*, 1998; Nimnual *et al.*, 1998). La vía de señalización mediada por la PI3-K puede ser inactivada por la acción del supresor tumoral PTEN, el cual antagoniza la actividad de la PI3-K gracias a su actividad fosfatasa, disminuyendo la cantidad de  $PI_{(3,4,5)}P3$  al convertirlo en  $PI_{(4,5)}P2$  (Castellano y Downward, 2011).

Se han identificado tres genes para AKT, una quinasa regulada por PI3-K, los cuales codifican para AKT-1, AKT-2 y PKB- $\gamma$  (Datta *et al.*, 1999). Las proteínas AKT presentan un dominio PH (con homología a pleckstrina) en el extremo amino terminal, un dominio catalítico central y una región carboxilo terminal reguladora (Datta *et al.*, 1999; Vanhaesebroeck *et al.*, 2012). Los lípidos  $PI_{(3,4,5)}P3$  y  $PI_{(4,5)}P2$  pueden unirse a AKT a través de su dominio PH, lo que implica el reclutamiento de la misma a la membrana plasmática y su fosforilación en residuos específicos de serina y treonina por quinasas dependientes de  $PI_{(3,4,5)}P3$ , como PDK1 y PDK2 (mTORC2). Estos residuos fosforilados en AKT-1 son la T308 y la S473, la T309 y S474 en AKT-2. A su vez, AKT es capaz de fosforilar a sus efectores en serinas y treoninas presentes en un motivo consenso R-X-R-X-X-S/T (Castellano y Downward, 2011; Ubersax y Ferrell, 2007; Vanhaesebroeck *et al.*, 2012).

AKT está implicada en la regulación del metabolismo de la glucosa, así como en el control de la síntesis proteica, mediante la regulación del complejo mTORC1 (Engelman *et al.*, 2006; Vanhaesebroeck *et al.*, 2012). La activación de mTORC1 conlleva un aumento de la síntesis proteica debido a la fosforilación del factor de iniciación eucariótico 4E y de la proteína ribosomal S6, siendo esta última fosforilada por p70 S6 quinasa, la cual está a su vez regulada por mTORC1 (Engelman *et al.*, 2006). S6 puede ser también fosforilada por p90RSK (Roux *et al.*, 2007). Además, AKT previene la apoptosis fosforilando proteínas pro-apoptóticas como Bad y la caspasa 9 entre otras, lo que favorece la supervivencia celular. Asimismo, AKT puede activar a MDM2, lo que bloquea la apoptosis mediada por

p53 (Duronio, 2008). Por otra parte, la activación de la vía dependiente de AKT aumenta la proliferación celular, favoreciendo la entrada en ciclo celular mediante la inhibición de p21 y p27, así como GSK3- $\beta$ , lo que incrementa la actividad de la ciclina D1 (Castellano y Downward, 2011).

Muchos de los cambios que ocurren en esta vía actúan como mecanismos de resistencia a agentes quimioterápicos en cáncer. Entre éstos destacan mutaciones puntuales activadoras (*PI3K* y *AKT*) (Shao y Aplin, 2010; Shi *et al.*, 2014a), amplificaciones génicas (*ERBB2*), así como deleciones génicas o pérdida de función de reguladores negativos de la vía, como *PTEN*. La ruta PI3-K/AKT puede ser asimismo activada por un aumento de señalización, ya sea por aumento de expresión de los receptores de factores de crecimiento o por sus ligandos (Villanueva *et al.*, 2010; Xing *et al.*, 2012). Concretamente, se ha demostrado que tanto en líneas celulares de melanoma como en muestras de pacientes con resistencia adquirida a inhibidores de BRAF existe una mayor expresión de PDGF $\beta$ R, IGF-1R, EGFR y ERBB4 (Bucheit and Davies, 2014; Nazarian *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2010). Si bien la activación de estos RTKs no rescataba la actividad de la vía de las MAP-quinasas bloqueada por los inhibidores de BRAF, sí bloqueaba la apoptosis a través del aumento de actividad de la vía PI3-K/AKT (Nazarian *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011; Villanueva *et al.*, 2010). El aumento de expresión de IGF-1R parece ser un mecanismo de resistencia adquirido no sólo a inhibidores de BRAF, sino también de MEK (Gopal *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha observado que cambios en el microambiente tumoral pueden regular la vía PI3-K/AKT. De este modo, la producción de HGF por células estromales puede inducir resistencia a inhibidores de BRAF en co-cultivos de células de melanoma, debido a la activación por dicho factor de la mencionada vía en las células de melanoma (Straussman *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2012). Varios trabajos han demostrado que en líneas celulares de melanoma con mutación en *BRAF* y *PTEN* intacto, las células sufren apoptosis tras el tratamiento con inhibidores de BRAF o MEK. Sin embargo, cuando la mutación en *BRAF* se combina con pérdida de *PTEN* muestran generalmente una inhibición del crecimiento pero son resistentes a la apoptosis (Deng *et al.*, 2012; Paraiso *et al.*, 2011; Xing *et al.*, 2012). La importancia clínica de estas observaciones *in vitro* se refleja en varios estudios sobre *PTEN* en ensayos clínicos utilizando inhibidores de BRAF, en los que se observó menor supervivencia a la terapia en pacientes con deleción en el gen de *PTEN* o menor expresión de esta proteína (Nathanson *et al.*, 2013; Trunzer *et al.*, 2013).

#### *Alteraciones en el ciclo celular*

El ciclo celular es un conjunto de eventos altamente regulados y dirigidos a la división celular. La interfase del ciclo celular se divide en la fase G1, en la que se produce fundamentalmente el crecimiento celular con síntesis de proteínas y RNA; la fase S, en la que se produce la síntesis o replicación del DNA, y la fase G2, en la cual continúa la síntesis de proteínas y RNA en preparación para la mitosis. Finalmente se produce la fase M o mitosis, que incluye la cariocinesis (división nuclear) y la citocinesis (división del

citoplasma). Los principales puntos de control en la progresión del ciclo celular son la transición de la fase G1 a S, la transición de la fase G2 a la mitosis, y la transición de la metafase a anafase en mitosis. La dinámica de las interacciones entre las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) juega un papel clave en la regulación del ciclo durante la interfase. Así, CDK4/6 forma un complejo con la ciclina D1 capaz de fosforilar e inactivar a la proteína Rb. Esto permite la disociación del factor de transcripción E2F de Rb, el cual se transloca al núcleo y promueve la expresión de genes de inicio de la transición de la fase G1/S. El supresor tumoral p16 se une a CDK4/6, previniendo su interacción con la ciclina D1, e impidiendo la progresión del ciclo celular, mientras que p14 activa a p53 a través de la inhibición de su regulador negativo, MDM2. Cuando p53 está activo puede promover la parada del ciclo celular en el punto de control G1/S (Xu y McArthur, 2016).

Las alteraciones en los reguladores del ciclo celular son frecuentes en melanoma. Así, mutaciones en *P16* que causan pérdida de función son las alteraciones más frecuentes observadas en melanomas familiares (Sheppard y McArthur, 2013), seguido de mutaciones puntuales en *CDK4*, que causan resistencia a la inhibición por p16 (Sharpless y Chin, 2003). Asimismo se han detectado en melanomas cutáneos amplificaciones en *CCND1*, el gen codificante para ciclina D1 (Hodis *et al.*, 2012; Sauter *et al.*, 2002).

Diferentes estudios han mostrado que alteraciones en los reguladores del ciclo pueden estar implicadas en la resistencia a inhibidores de BRAF. Así, aunque las mutaciones en *CDK4* no afectan a la sensibilidad a estos inhibidores, la amplificación génica de ciclina D1, confiere resistencia, lo que adicionalmente se ve incrementada cuando se combina con sobre-expresión de CDK4 (Smalley *et al.*, 2008). Consistentemente, se ha demostrado que la respuesta al tratamiento con dabrafenib está significativamente reducida en pacientes con aumento del número de copias de *CCND1*, así como disminución en el número de copias de *CDKN2A* (Nathanson *et al.*, 2013).

#### *Otras alteraciones*

En un estudio con muestras de pacientes resistentes a inhibidores de BRAF se describieron mutaciones en *RAC1* (Rac1 P29S) (Van Allen *et al.*, 2014). Dicha mutación estaría principalmente asociada a resistencia intrínseca de los pacientes, ya que aquellos que eran portadores de la mutación tuvieron una peor prognosis. La presencia de la mutación en *RAC1* en pacientes de melanoma ha sido previamente descrita, tratándose de una mutación activadora que incrementa la unión de Rac1 a sus efectores, lo que conlleva un aumento de la proliferación y migración celulares (Krauthammer *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha descrito que líneas celulares de melanoma portadoras de dicha mutación son más resistentes a vemurafenib, dabrafenib y trametinib, y consecuentemente, la sobre-expresión de Rac1 P29S confería resistencia a VMF y dabrafenib (Watson *et al.*, 2014).

Por otra parte, se ha detectado amplificación de MITF en muestras de pacientes resistentes a inhibidores de BRAF, lo que podría sugerir la implicación de MITF en la resistencia (Van Allen *et al.*, 2014). Notablemente, la sobre-expresión de MITF en líneas

celulares de melanoma con la mutación BRAFV600E se tradujo en resistencia a inhibidores de BRAF, MEK y ERK (Van Allen *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha observado asimismo la pérdida de MITF en líneas celulares resistentes a vemurafenib (Muller *et al.*, 2014). Este papel dual de MITF ha sido corroborado en biopsias de pacientes resistentes, en los cuales se han descrito tanto niveles altos como bajos de MITF (Muller *et al.*, 2014).

### MicroRNAs

A pesar del gran número de estudios sobre los mecanismos de resistencia a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas, se desconocen los mecanismos de aproximadamente un 40% de los tumores resistentes (Rizos *et al.*, 2014), y no todos ellos podrían ser explicados por cambios genómicos (Hugo *et al.*, 2015). Por ello el estudio de la posible implicación de los miRNAs en resistencia podría explicar parte de las alteraciones ocurridas en dichos tumores.

Los microRNAs (miRNAs en adelante) fueron descubiertos en 1993 en un trabajo sobre el desarrollo post-embrionario en *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993), en el que se observó la presencia de transcritos de pequeño tamaño de lin-4 que parecían estar regulando negativamente los niveles de expresión de la proteína LIN-14 durante el desarrollo. Dicho estudio describió que estos transcritos contenían secuencias complementarias para una secuencia repetida en la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA de la proteína LIN-14, lo que sugería una regulación mediante la interacción complementaria RNA-RNA (Lee *et al.*, 1993). El interés en estas pequeñas moléculas de RNA se centró inicialmente en procesos relativos al desarrollo, pero posteriores estudios han demostrado que los miRNAs juegan un papel importante en múltiples procesos biológicos, incluyendo el cáncer (Oom *et al.*, 2014). Los miRNAs están implicados en la regulación de la proliferación, apoptosis, ciclo celular y diferenciación. Existe una alta especificidad en su expresión espacial (en función del tejido), así como temporal (según el momento del desarrollo) (Bartel, 2004; Sun *et al.*, 2014b; Vidigal y Ventura, 2015).

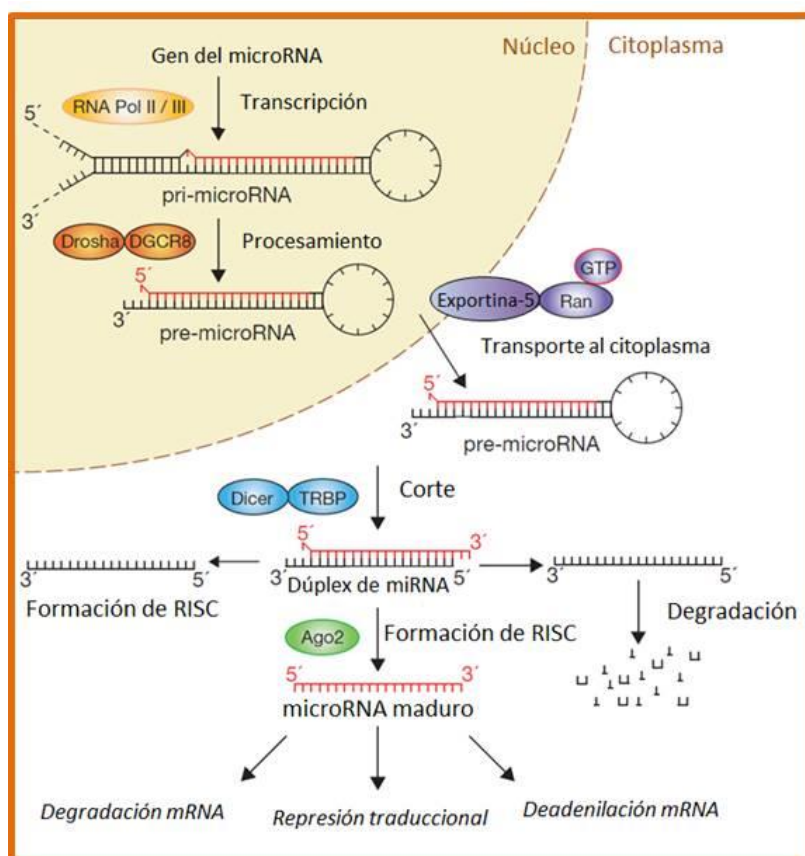
Los miRNAs son moléculas de RNA monocatenario de pequeño tamaño, que están presentes en la mayoría de los tejidos somáticos, habiéndose descrito en animales, plantas y algunos virus (Ha y Kim, 2014). La mayoría de los miRNAs se encuentran en el interior de las células, si bien se han encontrado asimismo en fluidos biológicos como miRNAs circulantes (Turchinovich *et al.*, 2012).

La mayoría de los genes de los miRNAs están en intrones de genes codificantes, aunque existen otros situados en los exones o en intrones de genes no codificantes o bien en regiones intergénicas (Rodríguez *et al.*, 2004). Las unidades transcripcionales de los miRNAs y su regulación varían según su localización. Así, los miRNAs intrónicos localizados en un gen “hospedador” son transcritos junto con el transcrito primario, estando regulados por un promotor común. Por el contrario, los miRNAs intergénicos parecen depender de su propio promotor. Asimismo, muchos miRNAs se encuentran en *clusters* probablemente representando una única unidad transcripcional como policistrones, y

teniendo por tanto patrones de expresión similares. Aún así, puede ocurrir que la transcripción de miRNAs de un mismo *cluster* esté regulado por diferentes factores de transcripción (Ha y Kim, 2014; Macfarlane y Murphy, 2010).

En humanos, los miRNAs maduros poseen generalmente 22-23 nucleótidos, y en su biogénesis participan principalmente dos RNAasas tipo III, Drosha y Dicer (**Figura 11**). En el núcleo, los genes de los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II, y en algunos casos por la III, generando una molécula de varios cientos de nucleótidos de longitud que contiene una estructura con un tallo-lazo (*stem-loop*) llamado precursor primario de miRNA (pri-miRNA). Un pri-miRNA típico consiste en una zona central (*stem*), la cual contiene la secuencia del miRNA maduro, un bucle terminal y una cadena de una sola hebra de RNA en ambos extremos. Los pri-miRNAs son procesados por el complejo microprocesador (que incluye la RNAasa III Drosha y su cofactor DGCR8), el cual produce un corte en el tallo (*stem*), lo que libera una pequeña estructura en horquilla llamada pre-miRNA, de aproximadamente 70 nucleótidos (Ha y Kim, 2014; Sun *et al.*, 2014b). El pre-miRNA es posteriormente transportado al citoplasma en un proceso mediado por la exportina-5 dependiente de RanGTP (Bohnsack *et al.*, 2004). Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es cortado por la RNasa Dicer con la participación de la proteína de unión a doble hebra de RNA, TRBP, dando lugar a un dúplex de RNA de aproximadamente 22 nucleótidos. De las dos hebras de este dúplex, la llamada hebra guía pasa a formar parte, junto con la proteína AGO y otras proteínas, del complejo efector llamado miRISC, permaneciendo estable en este complejo. Inicialmente se pensó que la otra hebra, llamada pasajera, era degradada. Sin embargo, en ocasiones la hebra pasajera no es degradada y actúa igualmente como un miRNA maduro regulando los mRNAs junto con el complejo miRISC (Bang *et al.*, 2014; Guo y Lu, 2010; Meister, 2013; Nowek *et al.*, 2016; Shan *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Se ha sugerido que la selección de una u otra hebra como hebra guía se debe en parte a la estabilidad del extremo 5' (Ha y Kim, 2014). Por otra parte, se ha propuesto que el destino de la hebra pasajera podría venir determinado por el grado de complementariedad existente dentro de la molécula del miRNA dúplex, y por tanto esta hebra sería degradada cuando hay un alto grado de complementariedad y, en caso contrario, daría lugar a un miRNA maduro funcional (Ha y Kim, 2014; Li y Yang, 2013; Sun *et al.*, 2014b).

El complejo miRISC activado permite la unión del miRNA maduro al mRNA diana. En el silenciamiento del RNA, los miRNAs funcionan como guía para el apareamiento con el mRNA diana, mientras que las proteínas AGO actúan como efectoras reclutando factores que inducen la degradación del mRNA diana, la represión de su traducción o promueven la eliminación del poly-A del mRNA, mediante el reclutamiento de factores deadenilantes, haciéndolo susceptible a la degradación (Ha y Kim, 2014).



**Figura 11. Biogénesis de miRNAs.** (Adaptado de Winter *et al.*, 2009).

Los sitios de unión de los miRNAs se localizan generalmente en la región 3'UTR del mRNA. El dominio que comprende las posiciones de los nucleótidos 2 a 7 en el extremo 5' de los miRNAs es crucial para el reconocimiento de las dianas y se conoce como “*miRNA seed*” (secuencia semilla). Se trata de una zona conservada y que ha de complementar con el mRNA diana, mientras que el resto de nucleótidos no han de ser totalmente complementarios aunque pueden asimismo contribuir al apareamiento con las bases de la diana (Bartel, 2009). Debido a esto, existe promiscuidad en la unión de los miRNAs al mRNA, ya que un mismo miRNA puede regular múltiples mRNAs diferentes. Los análisis realizados hasta ahora sugieren que la complementariedad perfecta favorece la degradación del mRNA, mientras que la imperfecta potencia la represión de la traducción (Macfarlane y Murphy, 2010). Por otra parte, diversos estudios muestran que algunos miRNAs pueden activar la traducción del mRNA al unirse a las regiones 5'UTR de sus dianas. Esto ocurriría fundamentalmente en células cuyo ciclo celular está detenido, mientras que la degradación de mRNA se produciría en células proliferantes (Vasudevan *et al.*, 2007). Notablemente, más del 60% de los genes codificantes para proteínas en humanos contienen al menos un sitio de unión conservado para miRNAs, y considerando que existen además numerosos sitios no conservados, esto implicaría que la mayoría de los genes codificantes para proteínas estarían bajo el control de los miRNAs. Adicionalmente, un

mismo mRNA puede contener múltiples sitios de unión para diferentes miRNAs, pudiendo ser así regulado en diferentes circunstancias celulares (Friedman *et al.*, 2009).

La desregulación de la biogénesis y función de los miRNAs se asocia a menudo con patologías, destacando el cáncer y desórdenes en el desarrollo del sistema nervioso. La regulación de los miRNAs tiene lugar a múltiples niveles, incluyendo su transcripción, su procesamiento por Drosha y Dicer, su interacción con proteínas AGO, diversas modificaciones de RNA como metilación, uridilación y adenilación, así como la propia tasa de renovación de los miRNAs (Ha y Kim, 2014). En relación con esto, se han detectado en melanoma variantes de *splicing* de Drosha, las cuales no pueden unirse a DGCR8, por lo que se produce un defecto en el procesamiento de los pri-miRNAs (Grund *et al.*, 2012).

Actualmente se han identificado 28645 entradas en la última base de datos de miRNAs (miRBase21), las cuales representan precursores de miRNAs. A partir de éstos se forman 35828 miRNAs maduros, documentados en 223 especies. Específicamente en humanos, 1881 secuencias corresponden a precursores de miRNAs y 2603 a miRNAs maduros ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)).

En cuanto a la nomenclatura de los miRNAs, el uso de números para designarlos es generalmente secuencial según su descubrimiento y momento de publicación. Por otra parte, el uso de tres letras al inicio del nombre hace referencia al organismo para el que se ha descrito ese miRNA; por ejemplo hsa-miR-121, donde *hsa* se refiere a *Homo sapiens*. El uso de mayúsculas o minúsculas implica que miR-121 se refiere al miRNA maduro, mientras que mir-121 puede referirse al gen o al transcrito primario. Siguiendo el mismo ejemplo, cuando existen varias secuencias idénticas de miRNAs maduros pero que son codificados por secuencias precursoras distintas y en diferente localización cromosómica, se designan como hsa-mir-121-1 y hsa-mir-121-2. Por otra parte, los sufijos de letras denotan secuencias maduras muy similares que difieren en uno o dos nucleótidos, como es el caso de hsa-miR-121a y hsa-miR-121b. Adicionalmente, en el caso de que dos miRNAs maduros se generen a partir de las hebras opuestas de un mismo precursor, puede ocurrir que haya una diferencia en la abundancia relativa de la expresión de ambos miRNAs, por lo que el producto mayoritario se nombraría miR-56, y el menos expresado producido a partir del otro brazo del precursor sería miR-56\*. Sin embargo, en muchas ocasiones los datos de expresión relativa son insuficientes o contradictorios, puesto que pueden variar en función del tejido analizado, y es por ello que en muchos casos se prefiere hablar de miR-142-5p (proviene del brazo 5') o miR-142-3p (del brazo 3') (Ambros *et al.*, 2003; [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)).

### miRNAs y cáncer: papel de miRNAs en melanoma

La primera evidencia de la implicación de los miRNAs en procesos oncogénicos fue descrita para el *cluster* miR-15/16, el cual se encontraba frecuentemente deletado en leucemia linfocítica crónica de células B (Calin *et al.*, 2002). Estos miRNAs actuaban como supresores tumorales, puesto que su expresión favorecía la inhibición de la proliferación

celular y promovía la apoptosis (Calin *et al.*, 2008; Cimmino *et al.*, 2005). Posteriormente, se ha descrito que el papel de los miRNAs en cáncer abarca desde la oncogénesis, metástasis, angiogénesis hasta la resistencia a fármacos. Los miRNAs pueden agruparse en oncogénicos (*oncomirs*), los cuales inducen la proliferación de células tumorales mediante la regulación negativa de genes supresores tumorales, mientras que los miRNAs supresores tumorales (*mirsupps*) dificultan la progresión del cáncer inhibiendo post-transcripcionalmente a los oncogenes (Li y Yang, 2013). Los genes para los *oncomirs* tienden a estar en regiones amplificadas en cáncer, mientras que los de los *mirsupps* se encuentran más frecuentemente en regiones delecionadas (Wang *et al.*, 2010), aunque existen excepciones. Así, un mismo miRNA puede actuar como *oncomir* o como *mirsupp* en diferentes tipos tumorales. Por ejemplo, mediante la sobre-expresión en modelos murinos del *cluster* miR-17-92, se describió que miR-17 junto con c-myc actuaría como acelerador del desarrollo tumoral en linfomas de células B (Danielson *et al.*, 2015; He *et al.*, 2005), pero posteriormente se ha visto que puede suprimir asimismo el crecimiento en cáncer de mama (Hossain *et al.*, 2006).

Notablemente, se ha descrito que los miRNAs pueden ser *per se* causa de procesos oncogénicos. La sobre-expresión transgénica de miR-21 en ratones condicionales lleva a la adquisición de un fenotipo de linfoma de células pre-B malignas, mientras que la inactivación del miR-21 causa la desaparición del tumor (Medina *et al.*, 2010). En otro trabajo se ha demostrado que ratones transgénicos que expresan miR-155 exhiben inicialmente una proliferación de células B pre-leucémicas, seguido de malignización de células B, sugiriendo que miR-155 induce la expansión celular que favorecería la adquisición de cambios genéticos secundarios y que llevarían a la transformación completa (Costinean *et al.*, 2006).

Una de las primeras evidencias de alteraciones relacionadas con los miRNAs en melanoma se observó en un análisis de cambios genómicos en estas lesiones tumorales, las cuales estaban enriquecidas en genes de miRNAs (Zhang *et al.*, 2006). Asimismo, los perfiles de miRNAs en líneas celulares de melanoma respecto de melanocitos o melanomas en diferentes estadios respecto de *nevi* muestran patrones alterados de la expresión de estos RNAs (Bonazzi *et al.*, 2012). Los análisis funcionales tanto *in vitro* como *in vivo* de algunos de los miRNAs desregulados en melanoma muestran su importante contribución a la complejidad molecular de estos tumores. Por una parte, estarían implicados en la regulación del ciclo celular, la proliferación y la supervivencia celular (Segura *et al.*, 2012). Así, se ha detectado una disminución en melanoma primario en comparación con los *nevi* de la expresión del miRNA-Let-7b, el cual regula la expresión de las ciclinas D1 y D3, y de CDK4 (Schultz *et al.*, 2008). Igualmente, el *cluster* miR-221/222 regula a p27 y PTEN, y la expresión de este *cluster* aumenta con la progresión de la enfermedad (Felicetti *et al.*, 2008; Garofalo *et al.*, 2009). Asimismo, la desregulación de los miRNAs en melanoma estaría también implicada en la modulación de la invasión, como es el caso de miR-211, cuya

sobre-expresión resulta en inhibición de la invasión (Boyle *et al.*, 2011; Levy *et al.*, 2010; Mazar *et al.*, 2010).

En años recientes se han llevado a cabo estudios enfocando a los miRNAs como dianas terapéuticas. En general, hay dos posibles estrategias en el uso de los miRNAs en aplicaciones terapéuticas: el uso de antagonistas (*antagomiRs*) para inhibir los miRNAs sobre-expresados en cáncer, o el uso de *mimics* para los miRNAs cuya expresión está disminuida en procesos tumorales. Estudios preliminares *in vivo* muestran un potencial terapéutico en la modulación de la expresión de miR-221/222 en melanoma, habiéndose observado que la inhibición de estos miRNAs con *antagomiRs* se traduce en la disminución del crecimiento tumoral en ratones (Felicetti *et al.*, 2008). La terapia de remplazamiento de los miRNAs se basa en el uso de miRNA *mimics*, que funcionarían como los miRNA supresores de tumores endógenos (Bader *et al.*, 2010). Las estrategias para la correcta llegada, distribución y estabilidad tanto de los *antagomiRs* como de los *mimics* son objeto actual de intenso estudio (Christopher *et al.*, 2016).

### miRNAs en la resistencia a agentes quimioterapéuticos

Se ha documentado que los miRNAs pueden estar implicados en la resistencia adquirida a varios agentes en diferentes tipos de cáncer. Por una parte, se ha visto que su expresión puede alterarse en células resistentes para variar los niveles de mRNA codificantes para proteínas transportadoras capaces de expulsar las drogas terapéuticas al exterior celular (Li y Yang, 2013). Este es el caso del miR-298, el cual es responsable, en parte, de la resistencia a doxorrubicina de células de cáncer de mama, debido a que la disminución de su expresión provoca el aumento en la expresión de su diana, el transportador glicoproteína P (Bao *et al.*, 2012). Por otra parte, los miRNAs pueden alterar la expresión de las dianas de las drogas específicas o de proteínas de las vías de señalización involucradas en la resistencia a quimioterapia. Por ejemplo, una causa de resistencia frecuente es la inactivación de PTEN, el cual es diana de múltiples miRNAs, los cuales, actuando como *oncomirs*, aumentan su expresión en los procesos de resistencia (Li y Yang, 2013; Wang *et al.*, 2012). En células de cáncer de colon resistentes a vemurafenib se ha detectado una disminución del miR-145 en comparación con las células parentales, mientras que la sobre-expresión de este miRNA aumentó la sensibilidad hacia el inhibidor *in vitro* e *in vivo* (Peng *et al.*, 2014).

En melanoma se ha observado que el miR-514a regula la expresión del supresor tumoral NF1, lo que modula la sensibilidad a inhibidores de BRAF (Stark *et al.*, 2015a). Asimismo, en un estudio con células de melanoma resistentes a VMF se detectó una disminución significativa de miR-7 en comparación con las células sensibles, y se mostró que el restablecimiento de miR-7 podía revertir la resistencia a dicho inhibidor (Sun *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha descrito que la expresión de miR-579-3p disminuye con la progresión del melanoma así como en líneas celulares resistentes a inhibidores de BRAF y MEK, lo cual podría estar basado en que este miRNA regula la expresión de BRAF y

MDM2 (Fattore *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha descrito recientemente la implicación del miR-125a en la resistencia a vemurafenib en células de melanoma. Se observó que los niveles de dicho miRNA estaban aumentados tanto en líneas celulares como en muestras de pacientes tras la adquisición de resistencia. El miR-125a actúa suprimiendo la expresión de componentes clave de la vía intrínseca de la apoptosis (BAK1 y MLK3), por lo que la evasión de la muerte celular y la mayor supervivencia permiten a las células de melanoma re-activar eventualmente la vía de las MAP-quinasas y PI3-quinasa/AKT (Koetz-Ploch *et al.*, 2017).

*-OBJETIVOS-*



- El primer objetivo ha consistido en el análisis de la contribución de la vía  $G\alpha_{13}$ -p190RhoGAP-RhoA a la invasión de células de melanoma.
- El segundo objetivo fue la generación de células de melanoma resistentes a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas, así como la caracterización de los mecanismos implicados en la resistencia.
- El tercer objetivo consistió en la identificación y caracterización de miRNAs diferencialmente expresados en células resistentes a vemurafenib, y su posible implicación en la resistencia a vemurafenib.



## *-MATERIALES Y MÉTODOS-*



### Líneas celulares

Para la primera parte de este trabajo se utilizó como modelo la línea celular de melanoma metastásico humano BLM (*BRO Lung Metastasis*), la cual deriva de la línea BRO, esta última procedente de un melanoma primario altamente agresivo (Lockshin *et al.*, 1985). Las células BLM fueron originalmente aisladas de una metástasis pulmonar tras la inoculación subcutánea de células BRO en ratones desnudos (Quax *et al.*, 1991). Asimismo, para algunos ensayos se utilizó la línea celular de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 (Cailleau *et al.*, 1978), las líneas celulares de melanoma MeWo, Mel 57, SK-Mel-37, y las líneas de linfocitos B Ramos y de linfocitos T Molt-4 y Jurkat. Para la segunda parte del trabajo, se utilizaron las líneas celulares de melanoma humano A375 (Giard *et al.*, 1973), SK-Mel-103 y SK-Mel-28 (Carey *et al.*, 1976; Fogh *et al.*, 1977). Adicionalmente, las células HEK293FT fueron empleadas para la producción de retrovirus y lentivirus. Las líneas celulares BLM, Mel 57, SK-Mel-37, MDA-MB-231, A375, SK-Mel-103, SK-Mel-147, SK-Mel-28 y HEK293FT fueron cultivadas en medio DMEM (Lonza, Verviers, Bélgica), y las células MeWo, Molt-4, Jurkat y Ramos en medio RPMI 1640 (Lonza). Ambos tipos de medios se utilizaron suplementados con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Paisley, Reino Unido), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) y 1% de glutamina (Gibco) (medio completo). Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras alcanzar una confluencia aproximada del 80-90%, las células adherentes se despegaron en los sucesivos pases utilizando tripsina/EDTA (Lonza) durante 5 minutos a 37°C. Las líneas celulares Molt-4, Jurkat y Ramos se mantuvieron a confluencias entre  $4 \times 10^5$  y  $1.2 \times 10^6$  células/ml.

Las células de melanoma BLM fueron cedidas por el Dr. G. van Muijen (University Hospital, Nijmegen, Países Bajos). Las líneas celulares A375, Mel 57 y SK-Mel-103 procedieron de la Dra. Marisol Soengas (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO, Madrid) y las células SK-Mel-37, MeWo y SK-Mel-28 por el Dr. Francisco X. Real (CNIO). Las células HEK293FT fueron cedidas por el Dr. Rafael Delgado (Hospital 12 de Octubre, Madrid). Las líneas celulares MDA-MB-231 y Molt-4 fueron adquiridas a la ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EEUU), mientras que las células Jurkat y Ramos fueron cedidas por el Dr. Francisco Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid).

### Generación de células de melanoma resistentes a inhibidores de la vía MAP-quinasas

Para la generación de células resistentes partimos de las líneas celulares A375 y SK-Mel-103. Las células A375 y SK-Mel-103 parentales fueron expuestas a dosis crecientes de los inhibidores, comenzando por concentraciones por debajo de la IC<sub>50</sub> de su actividad quinasa *in vitro* (de BRAF, MEK1/2 o ERK1/2), según instrucciones del fabricante. La concentración inicial del inhibidor vemurafenib (PLX4032, Selleckchem, Houston, TX, EEUU) fue 10 nM, del inhibidor trametinib (GSK1120212, Selleckchem) 0.3 nM, y para el inhibidor SCH772984 (Selleckchem) utilizamos 0.5 nM, manteniendo los

cultivos celulares siempre en presencia del inhibidor, el cual fue renovándose con medio fresco completo cada 72 horas. Cuando las células acumularon dos pases, la concentración del inhibidor fue aumentada, y así sucesivamente. De este modo, se generaron células resistentes durante aproximadamente 7-8 meses, consiguiéndose las líneas celulares A375 resistentes a vemurafenib a 1.3  $\mu\text{M}$  (A375-VR en adelante), A375 y SK-Mel-103 resistentes a trametinib a 40 nM y 30 nM, respectivamente (A375-TR y SK-Mel-103-TR en adelante) y A375 y SK-Mel-103 resistentes a SCH772984 a 120 nM (A375-ER y SK-Mel-103-ER en adelante). Asimismo, las células A375-VR fueron expuestas sucesivamente a concentraciones crecientes de vemurafenib hasta conseguir células resistentes a 4  $\mu\text{M}$  (A375-VR-4  $\mu\text{M}$ ). Adicionalmente, se generaron células dobles resistentes a vemurafenib y trametinib. Para ello utilizamos las células A375-VR, a las cuales se les añadió trametinib 40 nM junto con vemurafenib 1.3  $\mu\text{M}$ , obteniéndose en 3-4 semanas las células dobles resistentes (A375-VR/TR en adelante). Las líneas celulares resistentes se mantuvieron en medio de cultivo completo en presencia de los distintos inhibidores a la concentración final indicada.

Por otra parte, durante la estancia predoctoral en el laboratorio de la Dra. Eva Hernando (New York University, NY, EEUU), se contó con el RNA de la línea celular SK-Mel-239 así como de clones resistentes a inhibidores de las MAP-quinasas que habían sido previamente generados en su laboratorio. Brevemente, las células SK-Mel-239 fueron expuestas a 2  $\mu\text{M}$  de VMF durante varias semanas, aislándose seis clones resistentes que fueron expandidos y mantenidos siempre en presencia del inhibidor a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , obteniéndose de este modo seis poblaciones monoclonales resistentes (Koetz-Ploch *et al.*, 2017). Además, de la misma forma se habían generado nueve poblaciones monoclonales dobles resistentes a 1  $\mu\text{M}$  de VMF y 2  $\mu\text{M}$  de un inhibidor de MEK (PD0325901, Selleckchem) (Koetz-Ploch *et al.*, 2017).

### Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para el desarrollo del presente trabajo se presentan en la siguiente tabla (**Tabla 1**).

Anticuerpo	Especificidad	Procedencia
Anti-AKT	AKT	Cell Signalling Technology (Danvers, MA, EEUU)
Anti-Blk (C-20)	Blk	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU)
Anti-B-Raf	BRAF	BD Biosciences (San Diego, CA, EEUU)
Anti-Cdc42	Cdc42	BD Biosciences
Anti-c-Src (N-16)	c-Src	Santa Cruz Biotechnology
Anti-E-cadherina	E-cadherina	BD Biosciences
Anti-Efrina-B2	Efrina-B2	Dr. Agustín Zapata (Universidad Complutense de Madrid)
Anti-FAK (A-17)	FAK	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Fosfo-AKT	Fosfo-Ser473 de AKT	Cell Signalling Technology
Anti-Fosfo-FAK	Fosfo-Tyr397 de FAK	BD Biosciences
Anti-Fosfo-MEK1/2 (E237)	Fosfo-Ser218/Ser222 de MEK1/2	Millipore (Billerica, MA, EEUU)
Anti-Fosfo-MLC	Fosfo-Thr18/Ser19 de MLC	Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU)
Anti-Fosfo-p44/42 MAPK	Fosfo-Thr202/Tyr204 de ERK1/2	Cell Signalling Technology
Anti-Fosfo-p90RSK	Fosfo-Thr359/Ser363 de RSK	Cell Signalling Technology
Anti-Fosfo-S6 Proteína Ribosomal (D57.2.2E)	Fosfo-Ser235/236 de S6	Cell Signalling Technology
Anti-Fosfo-Tyr (P-Tyr-100)	Fosfo-Tyr	Cell Signalling Technology
Anti-GFP	GFP	Invitrogen
Anti-GST	GST	Dra. Ángeles García Pardo (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid)
Anti-G $\alpha_{13}$ (A-20)	G $\alpha_{13}$	Santa Cruz Biotechnology
HP2/9	CD44	Dr. Francisco Sánchez-Madrid
Anti-MEK-1 (C-18)	MEK1	Santa Cruz Biotechnology
Anti-MLC	MLC	Dra. Ángeles García Pardo
Anti-PTEN (138G6)	PTEN	Cell Signalling Technology
Anti-p44/42 MAPK	ERK1/2	Cell Signalling Technology

(L34F12)		
Anti-Rac1	Rac1	BD Biosciences
Anti-Ras	Ras	Dr. Ignacio Casal (Centro de Investigaciones Biológicas)
Anti-RhoA (26C4)	RhoA	Santa Cruz Biotechnology
Anti-RhoC (C-16)	RhoC	Santa Cruz Biotechnology
Anti-RhoGAP (p190) (D2D6)	p190RhoGAP	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EEUU)
Anti-RhoGDI $\alpha$ (A-20)	RhoGDI $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology
Anti-RSK	RSK	BD Biosciences
Anti-Vinculina	Vinculina	Sigma-Aldrich
Anti- $\beta$ -Actina	$\beta$ -Actina	Sigma-Aldrich

**Tabla 1. Anticuerpos empleados.** Se muestra la especificidad y la procedencia.

#### Vectores de expresión y siRNAs

Los vectores pcDNA3.1 (Invitrogen) y pMSCV-bsr (en adelante pRetro; cedido por el Dr. Reuven Agami, TheNetherlands Cancer Institute, Amsterdam, Países Bajos), con las diferentes construcciones de Blk fueron anteriormente generados en el laboratorio. Brevemente, el cDNA de Blk fue amplificado mediante RT-PCR a partir del RNA de las células Ramos usando los oligonucleótidos (1) y (2) (**Tabla 2**), de modo que se obtuvieron además dianas compatibles para las enzimas de restricción HindIII y XhoI. Este producto se subclonó en el vector pcDNA3.1 entre las dianas HindIII y XhoI (pcDNA3.1-Blk wt). Además, a partir de este vector y utilizándose las enzimas BglII y XhoI se subclonó el cDNA de Blk en el vector pRetro (pRetro-Blk wt). Para la generación del vector pcDNA3.1-Blk  $\Delta$ Ct, el cual es el resultado de delecionar 129 pb al extremo C-terminal de Blk, se partió del vector pcDNA3.1-Blk wt, el cual fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos (1) y (3) (**Tabla 2**) y el producto fue subclonado en el vector pcDNA3.1 (pcDNA3.1-Blk  $\Delta$ Ct). El vector pRetro-Blk $\Delta$ Ct se obtuvo a partir del vector pcDNA3.1-Blk  $\Delta$ Ct utilizando las enzimas BglII y XhoI.

Para la generación del vector pcDNA3.1-BlkY501A, en el cual la tirosina 501 de Blk fue mutada a una alanina, se utilizó el kit QuickChange Lightning Site-directed mutagénesis (Agilent Technologies, La Jolla, CA, EEUU) según las instrucciones del fabricante, a partir del vector pcDNA3.1-Blk wt, usándose los oligonucleótidos (4) y (5) (**Tabla 2**). El vector pECFP-N1-Blk wt fue generado a partir del plásmido pcDNA3.1-Blk wt con las enzimas de restricción HindIII y XhoI, y subclonado posteriormente en el vector pECFP-N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, EEUU) en los sitios HindIII y Sall. El codón de stop TAG de Blk fue mutado a TTG (leucina) para permitir la

transcripción de CFP fusionado a Blk (puesto que CFP se encuentra en el extremo C-terminal), usando el kit de mutagénesis anteriormente citado, utilizándose los oligonucleótidos (6) y (7) (**Tabla 2**). Para la generación del vector pGEX-A-Blk wt, el fragmento de Blk wt fue extraído del vector pcDNA3.1-Blk wt digiriendo con las enzimas HindIII y XhoI. El cDNA resultante fue sometido a PCR con los oligonucleótidos (8) y (9) (**Tabla 2**) de modo que los sitios de restricción fueron mutados a BamHI y HindIII para poder clonar este fragmento en el vector pGEX-A (Clontech Laboratories).

Los distintos vectores fueron secuenciados mediante secuenciación Sanger en el servicio de Secugen (Centro de Investigaciones Biológicas) para confirmar la clonación correcta de los fragmentos de cDNA, así como la conservación del marco de lectura y la correcta introducción de las mutaciones deseadas en los casos indicados.

Oligonucleótido	Secuencia
(1)	ACTGAAGCTTTGCCAAGGATGG
(2)	TGGGCTCGAGGCGCAGGCGGGCG
(3)	TGCTCGAGGCGCAGGCGGGCAGGTGTGGG
(4)	CACCGAGCGGCAGTTCGAGCTGCAGCC
(5)	AGGGCTGCAGCTCGAACTGCCGCTCGG
(6)	CGCGGCCGGCAAGGGCTGCAGCTCGTA
(7)	AGTACGAGCTGCAGCCCTTGCCGGCCG
(8)	TCATGGATCCGATGGGGCTGGTAAGTAGCAA
(9)	ATATAAGCTTCTAGGGCTGCAGCTCGTACTGCCG

**Tabla 2.** Oligonucleótidos empleados para las clonaciones de Blk en los distintos vectores.

El vector pGEX-2T-p190A RhoGAP-4 fue cedido por el Dr. Kozo Kaibuchi (Nagoya University, Japón). Dicho vector contiene la secuencia nucleotídica de p190RhoGAP codificante para los aminoácidos 953 a 1208. La generación de los vectores codificantes para las proteínas de fusión GFP-Gα13 *wild-type* y GFP-Gα13 QL, así como pRetro-Gα13 wt y pRetro-Gα13 QL han sido previamente descritos (Bartolome *et al.*, 2008). Los vectores codificantes para GFP-RhoA *wild-type* y GFP-RhoA G14V fueron donados por el Dr. Francisco Sánchez-Madrid. Los vectores pNGVL-VSV-G y pNGVL-gag-pol procedieron del Dr. Rafael Delgado.

Los vectores lentivirales portadores de los transcritos precursores de los miRNAs miR-204-5p y miR-211-5p (H-miR-204 y H-miR-211, en adelante), o la secuencia complementaria del miR-140-3p (Zip-miR-140, en adelante), fueron adquiridos a SystemBiosciences (Palo Alto, CA, EEUU). Los correspondientes controles negativos, portadores de secuencias inespecíficas para los pre-miRNAs o anti-miRNA (H-scrambled y Zip-scrambled, respectivamente, H-scr y Zip-scr en adelante), así como los vectores necesarios para las infecciones lentivirales, pPAX2 y pMD2G, fueron un obsequio de la Dra. Eva Hernando.

A continuación se muestran los siRNAs utilizados para silenciar la expresión de diferentes proteínas, su secuencia, bases diana sobre el RNA mensajero (mRNA) y la casa comercial donde fueron adquiridos (Tabla 3).

siRNA	Hebra sentido Hebra complementaria	Bases diana	Procedencia
<b>Blk-2</b>	UCUACGCAGUGGUCACCAAdTdT UUGGUGACCACUGCGUAGAdGdT	895-913	Ambion (Foster City, CA, EEUU)
<b>Blk-3</b>	GGUCACUCGUCACAGGAAGdTdT CUUCCUGUGACGAGUGACCdTG	292-310	Ambion
<b>Blk-4</b>	UGAUGGAAGUUGUCACUAdTdT UAAGUGACAACUCCAUCAdGdG	1233-1251	Ambion
<b>Control</b>	AUUGUAUGCGAUCGCAGACdTdT GUCUGCGAUCGCAUACAAUdTdT	-	Sigma-Aldrich
<b>c-Src</b>	GCUGUUCGGAGGCUUCAACdTdT GUUGAAGCCUCCGAACAGCdTdT	904-922	Dharmacon (Lafayette, CO, EEUU)
<b>Gα13</b>	GUUCAUGGUAUCGUGCAUGdTdT CAUGCACGAUACCAUGAACdTdT	2894-2912	Dharmacon
<b>p190RhoGAP</b>	GAACAGCGAUUUAAGCAUUU AUGCUUUAUAUCGCGUUCUU	1975-1993	Dharmacon

**Tabla 3. Relación de siRNAs utilizados.** Se muestran sus secuencias, así como las bases del mRNA diana con las que interaccionan y su procedencia.

#### Purificación de proteínas recombinantes

Los vectores pGEX-A-Blk wt y pGEX-2T-p190A RhoGAP-4, codificantes de las proteínas recombinantes GST-Blk wt y GST-p190RhoGAP, fueron transformados en bacterias competentes BL21. Tras inducción de la producción de la proteína con IPTG (0.4 mM a 28°C durante 3 y 16 horas para pGEX-A-Blk wt y pGEX-2T-p190A RhoGAP-4, respectivamente), los *pellets* celulares fueron lisados en solución de unión a GST (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Tritón X-100) junto con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche, Basel, Suiza). El lisado se congeló a -80°C para favorecer la lisis y se sometió a tres ciclos de sonicación. El extracto se incubó con *beads* de glutatión-sefarosa (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia) durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, las *beads* se lavaron tres veces con solución de unión a GST, y las proteínas se eluyeron utilizando solución de elución (10 mM glutatión reducido, 50 mM Tris-HCl pH 8, 5% glicerol) durante 15 minutos a temperatura ambiente, dializándose finalmente en solución de diálisis (5 mM Hepes pH 7.6, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 1 mM

EDTA, 10% glicerol). Las proteínas recombinantes purificadas fueron analizadas mediante *western blot* con anticuerpos específicos.

La purificación de GST control a partir del vector pGEX-A se realizó por el mismo procedimiento, induciendo con 0.4 mM IPTG a 28°C durante 3 horas.

### Transfecciones transitorias

Las células se transfectaron con el reactivo JetPRIME (Polyplus Transfection, Illkirch, Francia) en el caso de vectores para sobre-expresar proteínas o con Interferin (Polyplus Transfection) en el caso de los siRNAs. En todos los casos las células fueron sembradas el día previo a la transfección, de modo que la confluencia cuando se transfectaron fue del 60-70%. Siguiendo protocolos estipulados por los fabricantes, se transfectaron 10 µg de DNA en el caso de vectores de sobre-expresión, mientras que la concentración final de los siRNAs fue de 40 nM. La eficiencia de la transfección fue validada por *western blot* a las 48-56 horas de la transfección, en función del experimento.

### Infección retroviral y lentiviral

En el caso de las infecciones retrovirales, las células empaquetadoras HEK293FT fueron transfectadas con el reactivo JetPRIME, siguiendo las instrucciones del fabricante. Concretamente, se co-transfectaron con 3 µg de los vectores pRetro-Blk wt o pRetro-Blk ΔCt, junto con 1 µg del vector pNGVL-VSV-G (codificante de la envoltura del virus) y 5 µg del vector pNGVL-gag-pol (codificante de la cápside y polimerasa víricas). Después de 8 horas de la transfección, se reemplazó parte del medio con medio completo fresco, y tras 48 horas de producción vírica, se recogió el sobrenadante de las mencionadas células, el cual fue filtrado (filtros de 0.45 µm). Con este medio (diluido 1:2) se infectaron durante 72 horas las células BLM o los transfectantes estables *mock*, G<sub>α13</sub>wt o G<sub>α13</sub>QL previamente descritos (Bartolome *et al.*, 2008), y tras sustituir el medio de infección por medio completo fresco, se inició la selección con blasticidina (10 µg/ml; Invitrogen), durante 3 semanas. La eficiencia de la infección se testó mediante *western blot* con anticuerpos anti-Blk. En el caso de los dobles transfectantes Blk-G<sub>α13</sub>, las células fueron sometidas a diluciones límite, y tras ser expandidas fueron testadas mediante *western blot* para la sobre-expresión tanto de Blk como de G<sub>α13</sub>.

Para las infecciones lentivirales se usaron las células HEK293FT, las cuales fueron transfectadas con lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo recomendaciones del fabricante. Este tipo de infección se utilizó sobre las células A375 con los vectores lentivirales H-miR-204, H-miR-211 y Zip-miR-140, así como con los correspondientes controles negativos H-scr y Zip-scr. Brevemente, para la co-transfección se emplearon 12 µg de los vectores lentivirales deseados, 8 µg del vector pPAX2 (codificante de proteínas empaquetadoras del virus) y 4 µg del vector pMD2G (codificante de la envoltura del virus). La lipofectamina se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente en DMEM sin suero, incubándose a continuación con la combinación de vectores antes mencionados

durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió a las células HEK293FT, cuyo medio completo había sido previamente reemplazado por DMEM sin suero. Las células se mantuvieron durante 6-8 horas en este medio de transfección, tras lo cual fue sustituido por medio completo. A las 48 horas, se recogió y filtró el sobrenadante (poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ), el cual se utilizó para infectar las células A375 durante 72 horas usando polibreno (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Millipore). La eficiencia de la infección se testó mediante qPCR para los miRNAs empleados (miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p). Para la generación de las células Triple-miR, se partió de las células A375 que sobre-expresaban miR-204-5p, las cuales se co-infectaron con los virus correspondientes a los vectores H-miR-211 y Zip-miR-140, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

### Western blotting

Tras aspirar el medio de cultivo, las células fueron lisadas a 4°C directamente en sus placas de cultivo utilizando la solución GST-FISH (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1% Nonidet P-40, 10% Glicerol), o mediante la solución de lisis B (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40) suplementado con cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche). Tras 20 minutos a 4°C, los lisados se centrifugaron 15 minutos a 4°C a velocidad máxima (16000 x g). La concentración proteica de los sobrenadantes se cuantificó mediante Bradford (Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU), midiéndose las muestras a 595 nm en un espectrofotómetro. Las muestras de proteínas (entre 50-100  $\mu\text{g}$ ) se hirvieron a 100°C durante 5 minutos en solución de carga (10% SDS, 50% Glicerol, 100 mM DTT, 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.05% de azul de bromofenol), y se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (entre 8-12% dependiendo del tamaño de las proteínas a analizar) en presencia de SDS (SDS-PAGE). Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Bio-Rad Laboratories), que fueron posteriormente bloqueadas con 3% BSA en solución TBS durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 16 horas a 4°C, y tras tres lavados con 0.1% Tween-20 en TBS, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EEUU). Finalmente las membranas se volvieron a lavar tres veces con 0.1% Tween-20 en TBS, y las proteínas se visualizaron usando el sustrato quimioluminiscente Immobilon Western (Millipore) en un detector de quimioluminiscencia (Fujifilm LAS 3000 Image Reader). En algunos casos, la intensidad de las bandas resultantes fue densitometrada para su cuantificación usando el programa ImageJ.

En determinados ensayos fue necesario someter a las membranas a un proceso de *stripping* (separación de los anticuerpos unidos), incubando para ello las membranas durante 1.5 horas a temperatura ambiente con solución de *stripping* (1% Glicina, 1% SDS, 0.05% Nonidet P-40, a pH 2.2). Seguidamente, las membranas fueron lavadas tres veces

con 0.1% Tween-20 en TBS, bloqueadas de nuevo con 3% BSA en TBS e incubadas con los correspondientes anticuerpos, tal y como se ha indicado.

### Inmunoprecipitación

Para estudiar posibles asociaciones entre proteínas se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. Previamente a los distintos tratamientos, las células se mantuvieron en medio DMEM sin suero durante 4 horas, para ser despegadas a continuación con PBS-EDTA 2 mM. Los tratamientos fueron realizados con las células en suspensión a 37°C en medio DMEM sin suero, excepto el tratamiento con pervanadato de sodio (100 µM durante 1.5 horas), que fue realizado con las células adheridas. El tratamiento con la quimioquina CXCL12 (R&D Systems; 150 ng/ml) se realizó durante 20 minutos, mientras que la incubación con LPC (Sigma-Aldrich) fue de 1.5 horas (10 µmol/L). Posteriormente, las proteínas fueron solubilizadas a 4°C durante 20 minutos en la solución de lisis B ya descrita, junto con los cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasa, para ser los lisados celulares posteriormente centrifugados a 4°C durante 15 minutos. Para eliminar uniones inespecíficas, los lisados fueron pre-incubados durante 1 hora a 4°C con *beads* de proteína G-sefarosa (GE Healthcare Bio-Sciences). Tras la cuantificación mediante Bradford, 1 mg del lisado celular fue incubado con el anticuerpo específico (4-5 µg) durante 16 horas a 4°C, para posteriormente añadir la proteína G-sefarosa durante 2 horas a 4°C para permitir la unión de las *beads* con los anticuerpos. Los complejos fueron lavados 3 veces con la solución de lisis y finalmente hervidos durante 10 minutos en la solución de carga anteriormente descrita para eluir las proteínas unidas. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE y fueron analizadas por *western blotting*, teniendo en cuenta como control de carga la proteína frente a la cual se había utilizado el anticuerpo específico para inmunoprecipitar.

En el caso de las inmunoprecipitaciones con el anticuerpo anti-Blk, debido a la coincidencia del peso molecular de las cadenas pesadas del anticuerpo (55 kDa) con el tamaño de Blk (56 kDa), se utilizó como anticuerpo secundario para el *western blotting* el reactivo Rabbit TrueBlot conjugado con HRP (eBioscience, San Diego, CA, EEUU), el cual detecta preferentemente las formas no reducidas de la IgG (es decir, el anticuerpo primario empleado para la detección de la proteína por *western blotting*), frente a las formas reducidas y desnaturalizadas de la IgG (es decir, el anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar).

### Ensayos de actividad GTPasa (*pull down*)

Los vectores para las proteínas de fusión GST-C21 y GST-PAK-CD fueron cedidos por el Dr. John G. Collard (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Países Bajos), mientras que el vector GST-RAF-RBD fue proporcionado por el Dr. Johannes L. Bos (University Medical Center Utrecht, Utrecht, Países Bajos). Las proteínas de fusión fueron generadas según el procedimiento previamente descrito (Sander *et al.*, 1998). GST-C21 es

capaz de unirse a las formas activas de RhoA y RhoC, GST-PAK-CD a Rac1 y Cdc42 activos, y GST-RAF-RBD a las formas de Ras activas.

En aquellos casos en los que se realizó un tratamiento con CXCL12 o LPC, las células se mantuvieron previamente en medio DMEM sin suero durante 4 horas, tras lo cual se despegaron con PBS-EDTA 2 mM, y fueron posteriormente estimuladas en suspensión a 37°C con CXCL12 (150 ng/ml; 20 minutos), o LPC (10  $\mu$ mol/L; 1.5 horas). A continuación, las proteínas celulares fueron solubilizadas por pipeteo repetido con la solución de lisis GST-FISH previamente descrita, suplementada con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Tras 20 minutos a 4°C, los lisados se centrifugaron 15 minutos a 4°C, y la concentración proteica de los sobrenadantes se cuantificó mediante Bradford, separándose 40  $\mu$ g de proteína de cada condición como control de carga del lisado total. El lisado bacteriano que contenía las proteínas de fusión GST fue incubado durante 2 horas a 4°C con *beads* de glutatión-sefarosa, siendo éstas posteriormente lavadas a 4°C con solución GST-FISH. A continuación las proteínas de los lisados celulares (1-1.5 mg) se incubaron durante 16 horas a 4°C con las *beads* unidas ya a las proteínas de fusión, tras lo cual las *beads* fueron lavadas y centrifugadas, hirviéndose finalmente las muestras durante 10 minutos en solución de carga para eluir las proteínas “activas” que se habían unido a las proteínas de fusión. Las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS, transfiriéndose a continuación las proteínas a membranas de PVDF, e incubándose finalmente con los anticuerpos primarios correspondientes (anti-RhoA, anti-RhoC, anti-Ras, anti-Rac1 o anti-Cdc42).

#### Ensayo de *pull down* con proteína purificada

Tras despegar las células con PBS-EDTA 2 mM, éstas se lisaron en suspensión por pipeteo repetido a 4°C con la solución de lisis B descrita, incubándose los lisados durante 20 minutos a 4°C y centrifugándose a continuación a 4°C. Los sobrenadantes fueron clarificados y pre-incubados durante una hora a 4°C con *beads* de glutatión-sefarosa para evitar posteriores uniones inespecíficas. A continuación, se determinó mediante Bradford la concentración proteica de los lisados, tomándose 1 mg de estos que fueron incubados con la proteína purificada de GST o GST-Blk wt (0,5  $\mu$ g o 1  $\mu$ g) durante 1.5 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron incubadas 1.5 horas con las *beads* de glutatión-sefarosa, y tras tres lavados con la solución de lisis B, las proteínas unidas se hirvieron y eluyeron en solución de carga, siendo finalmente resueltas por SDS-PAGE y sometidas a *western blotting* con los anticuerpos anti-G $\alpha$ 13, anti-Blk y anti-GST.

#### Ensayo quinasa *in vitro*

Las células se lisaron en adhesión con solución de lisis C (50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tritón X-100, 10% Glicerol), junto con cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasas, así como  $\beta$ -glicerofosfato (2.5 mM), seguido de incubación en hielo durante 20 minutos. Los lisados fueron clarificados y preincubados

durante 1 hora a 4°C con *beads* de proteína G-sefarosa. A continuación, tras determinar la concentración proteica mediante Bradford, 2.5 mg de lisado por condición fueron incubados durante 16 horas a 4°C con 4 µg de anticuerpos anti-Blk o IgG de conejo (como control negativo; Sigma-Aldrich). Posteriormente, las muestras se incubaron con *beads* de proteína G-sefarosa durante 2 horas a 4°C, descartándose la fracción no unida. Las *beads* se lavaron tres veces en la misma solución de lisis, dos lavados con solución MOPS (25 mM pH 7.2), y un lavado final con solución quinasa (4 mM MOPS pH 7.2, 1 mM EGTA, 0.4 mM EDTA, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM β-glicerofosfato, 0.05 mM DTT), junto con los cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Tras el último lavado, se añadieron 25 µl de solución quinasa a las *beads*, junto con 1 mM ATP y 2 µg de la proteína purificada (GST-p190RhoGAP o GST, en su caso), incubándose la mezcla durante 30 minutos a 30°C en agitación. Finalmente, las proteínas fueron hervidas y eluidas en solución de carga, resueltas por SDS-PAGE y analizadas por *western blotting*.

### Ensayo de fraccionamiento celular

Las células se resuspendieron en buffer hipotónico de extracción (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 40 µg/ml digitonina, 5 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), incubándose a 4°C durante 15 minutos. Los lisados se centrifugaron 30 minutos a 4 °C, recogién dose posteriormente el sobrenadante (fracción citosólica). El *pellet* (fracción membranal) se incubó a 4°C durante 20 minutos con solución de lisis MB (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 40 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.2% Nonidet P-40, 5 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), y las suspensiones se centrifugaron 30 minutos, recogién dose a continuación el sobrenadante (fracción de membrana). Las proteínas de cada fracción se cuantificaron por el método Bradford, tomándose 50 µg de cada una, siendo éstas resueltas por SDS-PAGE seguido de *western blotting*. Se utilizaron las proteínas RhoGDIα y CD44 como controles de la fracción citosólica y de membranas, respectivamente.

### Ensayo de invasión celular a través de Matrigel

Para los ensayos de invasión celular, realizados en duplicado, las células de melanoma se despegaron con PBS-EDTA 2 mM de placas subconfluentes, siendo resuspendidas ( $3 \times 10^4$ - $6 \times 10^4$ ) en 200 µl de medio de invasión (0,5% BSA en DMEM sin suero). Posteriormente fueron depositadas en la parte superior de cámaras de invasión con filtros de 8 µm de poro (Costar Corning Life Sciences, Cambridge, MA, EEUU), los cuales habían sido previamente tapizados con 35-40 µl de una dilución 1:3 de Matrigel (BD Biosciences) en medio de invasión. Los compartimentos inferiores de la cámara de invasión se llenaron con medio de invasión en presencia o ausencia de 10% FBS, CXCL12 (150 ng/ml) o LPC (10 µmol/L). Tras 24 horas (para los ensayos con CXCL12 o LPC) o 48 horas (para los ensayos con 10% FBS) de incubación a 37°C, se retiraron las células no invasivas

y los restos de Matrigel de la parte superior de la cámara. Las células invasivas pegadas a la parte inferior del filtro se fijaron con 4% paraformaldehído en PBS, y fueron finalmente teñidas con cristal violeta y contadas utilizando un microscopio de campo claro.

### Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular en ensayos a 24-48 horas se determinó evaluando la actividad mitocondrial de la enzima succinato-deshidrogenasa. Las células de melanoma ( $5 \times 10^3$  por pocillo para ensayos de 48 horas, o  $8 \times 10^3$  para 24 horas) fueron depositadas por triplicado en placas de 96 pocillos. A las 16 horas se realizaron los tratamientos correspondientes, y tras 24 o 48 horas se añadieron 10  $\mu$ l de una solución de MTT (0.5 mg/ml en PBS) (Sigma-Aldrich), incubándose la mezcla durante 1.5 horas a 37°C. Tras eliminar el medio de los pocillos, los cristales resultantes de formazán fueron solubilizados con 200  $\mu$ l de DMSO, y la densidad óptica del color resultante se midió en un lector de placas a 540 nm (Multiskan Biochromatic).

Para los ensayos de viabilidad a 72-96 horas, se utilizó el reactivo CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega), basado en la cuantificación de ATP producido por las células metabólicamente activas mediante una reacción de luminiscencia. Las células ( $2 \times 10^3$ ) en un volumen de 100  $\mu$ l fueron cargadas en cuadruplicado en placas de 96 pocillos de fondo transparente y bordes opacos. A las 16 horas se realizaron los distintos tratamientos durante 72 o 96 horas, y tras añadir 100  $\mu$ l del reactivo CellTiter-Glo Luminescent por pocillo, las placas fueron incubadas durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, para ser finalmente analizadas en un lector de fluorescencia. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, indicativo del número de células viables.

### Ensayos de proliferación celular

Las células fueron sembradas bien en placas de 12 ( $1 \times 10^4$  células) o de 96 pocillos (50 células en los puntos vehículo y  $5 \times 10^2$  células en los puntos con tratamiento), siendo incubadas con diferentes concentraciones de los inhibidores durante los tiempos indicados en cada experimento. El medio con el inhibidor fue reemplazado cada 72 horas. El número de células viable se determinó usando el colorante vital azul tripán en los experimentos en placas de 12 pocillos. Para los ensayos en placas de 96 pocillos, las células se fijaron con 4% paraformaldehído en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual las placas (recogidas en los días indicados) se conservaron a 4°C en PBS. Posteriormente, las células fueron teñidas con cristal violeta (0.5%) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, y a continuación, éstas fueron desteñidas con sucesivos lavados en agua. Finalmente, las muestras se dejaron secar completamente y se disolvió el colorante con ácido acético 15% en agua durante 2 horas, siendo la absorbancia analizada a 620 nm en un lector de placas (Multiskan Biochromatic).

### Ensayo de formación de colonias en *Soft Agar*

Para determinar la capacidad de las células de crecer independientemente de su anclaje a matriz extracelular, éstas fueron suspendidas en geles tridimensionales de agarosa en placas de 6 pocillos. Para ello, se generó una capa inicial base, utilizando agarosa de bajo punto de fusión al 3% en PBS, que se calentó a 40°C. Posteriormente, dicha agarosa se diluyó 1:2 con DMEM al 10% de FBS y se permitió su polimerización durante 30 minutos a 37°C. Sobre esta capa, se generó un segundo gel al 0.4% que contenía el cultivo celular. Para ello se mezcló medio DMEM 10x al 0.8% de agarosa y medio DMEM 1x al 10% de FBS con las células ( $2 \times 10^4$ /ml) a 40°C, dejándose polimerizar la mezcla 30 minutos a 37°C. Las células se cultivaron durante 3 semanas, tras lo cual se procedió al lavado de los geles con PBS, y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS, tñiéndose posteriormente con una solución de cristal violeta. Finalmente se determinó el número de colonias con un diámetro superior a 50  $\mu\text{m}$  utilizando un microscopio de campo claro.

### Ensayo de adhesión celular

Se utilizaron placas de 96 pocillos (High binding, Costar, Camdridge, MA, EEUU) tapizadas durante 16 horas a 4°C con fibronectina humana (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Roche) en la solución  $\text{NaHCO}_3$  0.1M, pH 8.8. A continuación, las placas se incubaron 1 hora a 37°C, añadiéndose 0.5% BSA en  $\text{NaHCO}_3$  0.1M, pH 8.8 como solución de bloqueo e incubándose posteriormente durante 1.5 horas a 37°C. Al mismo tiempo, las células de melanoma se marcaron con BCECF-AM (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) (2.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 30 minutos a 37°C en medio DMEM 0.5% BSA. Tras despegar las células con PBS-EDTA 2mM, se añadieron por triplicado ( $2 \times 10^4$  células por punto) en un volumen de 100  $\mu\text{l}$ /pocillo. La placa se incubó a 37°C durante 20 minutos, tras lo cual se procedió a lavar los pocillos con DMEM tres veces para eliminar las células no adheridas al sustrato. Las células adheridas se lisaron con PBS-SDS 0.1%, y se midió la fluorescencia en el analizador Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

### Microscopía confocal

Las células BLM transfectadas con el vector pECFP-N1 o pECFP-N1-Blk wt fueron sembrados en placas de 6 pocillos con cubreobjetos tapizados previamente con fibronectina humana (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en  $\text{NaHCO}_3$  0.1M, pH 8.8. Tras 48 horas, las células fueron fijadas con 1% paraformaldehído en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS se añadió DAPI durante unos segundos, y se volvió a lavar con PBS. Finalmente, las muestras se montaron con Mowiol y las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Leica TCS-SP5-AOBS-UV con un objetivo 63x de inmersión de aceite.

### Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Las células fueron lisadas con el reactivo TriReagent (Sigma Aldrich), y el RNA celular fue extraído con cloroformo y precipitado con isopropanol. La cuantificación del

RNA se realizó midiendo la absorbancia del extracto a 260 nm ( $A_{260}$ ) de longitud de onda con el Nanodrop ND-1000. A partir de 2  $\mu$ g de RNA y en un volumen final de 25  $\mu$ l, se obtuvo el cDNA mediante retrotranscripción, utilizando la transcriptasa inversa M-MLV (Promega, Madison, WI, EEUU), siguiendo el protocolo del fabricante, junto con dNTPs (Roche) y hexámeros aleatorios de desoxirribonucleótidos (Thermo Fisher Scientific). Para la reacción de amplificación se empleó la Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y dNTPs, junto con los oligonucleótidos específicos (500 nM) (**Tabla 4**). La PCR de Hck, Fgr, c-Src, Yes, Fyn, Lck y Blk consistió en 1 minuto de desnaturalización inicial del cDNA a 94°C, seguido de 30 ciclos consistentes en 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación a 56°C, y 60 segundos de elongación a 72°C. Finalmente se realizó una extensión de hebras no finalizadas durante 10 minutos a 72°C. Alícuotas de cada muestra fueron amplificadas usando las mismas condiciones con los oligonucleótidos para la GAPDH humana como control de carga del cDNA.

Para los ensayos de colonización pulmonar con los transfectantes BLM, el RNA obtenido de los pulmones fue retrotranscrito a cDNA y amplificado mediante PCR anidada. Para ello, el cDNA fue amplificado con los oligonucleótidos para GAPDH (**Tabla 4**) con el siguiente protocolo: 1 minuto a 94°C, seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos de hibridación a 54°C, 1 minuto a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C. A continuación, 2  $\mu$ l de la reacción fueron nuevamente amplificados con unos oligonucleótidos para GAPDH que amplifican una región interior de la zona amplificada previamente, utilizando las mismas condiciones excepto que se usaron sólo 25 ciclos de amplificación y 56°C como temperatura de hibridación. Como control se utilizaron oligonucleótidos para  $\beta$ -actina murino (**Tabla 4**) y las mismas condiciones de PCR que las empleadas en la primera fase para GAPDH.

Para la secuenciación de las mutaciones puntuales en líneas celulares de melanoma humano, se siguió el proceso anteriormente descrito de extracción de RNA y obtención de cDNA. Para la reacción de amplificación se utilizaron oligonucleótidos específicos que incluyeran la secuencia del cDNA portador de las mutaciones a estudiar (**Tabla 4**). Para la mutación en *BRAF* se usaron los oligonucleótidos BRAF, y las condiciones de PCR siguientes: 2 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 60°C, 2 minutos a 72°C, y una incubación final de 7 minutos a 72°C. Para la mutación en *NRAS* se utilizaron los oligonucleótidos NRAS, y las condiciones de PCR: 1 minuto a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 45 segundos a 72°C. Finalmente se realizó una extensión de hebras no finalizadas durante 10 minutos a 72°C. El cDNA así amplificado se purificó en geles de agarosa usando el kit de extracción QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, EEUU), y fue secuenciado con los oligonucleótidos indicados (**Tabla 4**) mediante secuenciación por el método Sanger en el servicio de secuenciación de Secugen.

Oligonucleótido	Secuencia
<b>Blk (sentido)</b>	TTTCGTGGTGGCTCTGTATG
<b>Blk (antisentido)</b>	CAATCTGCTCCCTTCATCTG
<b>BRAF (sentido)</b>	CCATATCATTGAGACCAAATTTGAGATG
<b>BRAF (antisentido)</b>	GGCACTCTGCCATTAATCTCTTCATGG
<b>BRAF (secuenciación)</b>	TGCACAGGGCATGGATTACT
<b>c-Src (sentido)</b>	GCGGGAGAGCACCAACTAC
<b>c-Src (antisentido)</b>	CCTCAGACACCAGCACATTG
<b>Fgr (sentido)</b>	CCTGGCTTCCTTGATAGTGG
<b>Fgr (antisentido)</b>	GAACCCGTGTGGTGATGTAG
<b>Fyn (sentido)</b>	ATGGATGGGTACCTGGAATG
<b>Fyn (antisentido)</b>	CACTTGATGGGGAACCTTTC
<b>GAPDH (sentido)</b>	GGCTGAGAACGGAAGCTTGTC
<b>GAPDH (antisentido)</b>	CGGCCATCACGCCACAGTTTC
<b>GAPDH interior (sentido)</b>	TCGTGACCACCCTGACCTAC
<b>GAPDH interior (antisentido)</b>	TCACCTTGATGCCGTTCTTC
<b>Hck (sentido)</b>	ACAGCAACACACCAGGAATC
<b>Hck (antisentido)</b>	CTCGCACGGACAAAGAGTAG
<b>Lck (sentido)</b>	ACAGCTATGAGCCCTCTCAC
<b>Lck (antisentido)</b>	GACCGACAGTGAAAACGATC
<b>NRAS (sentido)</b>	GAGTACAAACTGGTGGTGGT
<b>NRAS (antisentido)</b>	TTCGTGGGCTTGTTTTGTAT
<b>NRAS (secuenciación)</b>	GACAATCCAGCTAATCCAGA
<b>Yes (sentido)</b>	AATCGCTACAGGAAAGAATGG
<b>Yes (antisentido)</b>	TCACAGTTGGACACACAGTTG
<b><math>\beta</math>-actina (murino) (sentido)</b>	CATGTACGTAGCCATCCAGGC
<b><math>\beta</math>-actina (murino) (antisentido)</b>	CTCTTTGATGTCACGCACGAT

**Tabla 4. Relación de los oligonucleótidos empleados en los ensayos de RT-PCR.**

#### Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR)

Las técnicas de RT-qPCR pueden clasificarse en dos tipos según si se utiliza un fluorocromo no específico, o sondas específicas de secuencia. En este trabajo se han realizado ambos tipos de aproximaciones.

La RT-qPCR con fluorocromos inespecíficos se basa en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente, en este caso el SYBR Green, el cual se une al DNA de doble hebra generado en los diferentes ciclos de amplificación de la PCR. La señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de la PCR en la reacción. Gracias a la lectura del aumento en la emisión de fluorescencia en cada ciclo, es posible monitorizar la reacción de producto de la PCR. Para este tipo de ensayo, tras la obtención del cDNA como se ha descrito anteriormente, la amplificación del cDNA (2.5  $\mu$ l; previamente diluido

1:4) se realizó por qPCR en el termociclador LightCycler 480 (Roche), usando los oligonucleótidos (200 nM) mostrados en la **Tabla 5** y el reactivo FastStart Essential DNA Green Master (Roche), que contiene la Taq DNA polimerasa FastStart y el fluoróforo SYBR Green I. En cada ensayo, la amplificación se realizó por triplicado, y los resultados fueron normalizados a los niveles de expresión de TBP. El protocolo de amplificación empleado fue de 5 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de amplificación de 10 segundos a 95°C (desnaturalización) y 30 segundos a 60°C (anillamiento y extensión).

Oligonucleótido	Secuencia
<b>ABL2/ARG (sentido)</b>	GCTTCTGGGCAGAGGTATGG
<b>ABL2/ARG (antisentido)</b>	ACAGCTGGCAAAGTGATCTGT
<b>Bcl2 (sentido)</b>	CCCGCGACTCCTGATTCATT
<b>Bcl2 (antisentido)</b>	AGTCTACTTCCTCTGTGATGTTGT
<b>Bcl2l2 (sentido)</b>	CTGACCCGGCTCCACG
<b>Bcl2l2 (antisentido)</b>	GGCCAGCTCCACAGACATAA
<b>CHD5 (sentido)</b>	CTACAACGATGCCTCCCAGG
<b>CHD5 (antisentido)</b>	ATTGTCGTCGTCCACTCTGC
<b>CHOP/GADD153 (sentido)</b>	TGAAAGCAGGCATCAGACCA
<b>CHOP/GADD153 (antisentido)</b>	GCAATGACTCAGCTGCCATC
<b>Cot (sentido)</b>	GCCGCAGATGCAATCTTCTTAC
<b>Cot (antisentido)</b>	TGGCTTTGCAGATACTGCGT
<b>Creb5 (sentido)</b>	TGAATTTGGAGCAGGAGAGGC
<b>Creb5 (antisentido)</b>	TGGGGTCGGAGTTTGATCTGA
<b>EFNB2 (sentido)</b>	GTGCCAGACAAGAGCCATGA
<b>EFNB2 (antisentido)</b>	CGTCTGTGCTAGAACCTGGAT
<b>IGFBP5 (sentido)</b>	GGGGTTTGCCTCAACGAAAAG
<b>IGFBP5 (antisentido)</b>	TCACGGGAGTCTCTCTCGAT
<b>IGF-2R (sentido)</b>	AGGTGAAGCCCAACGATCAG
<b>IGF-2R (antisentido)</b>	GAGATCGCCGTCTTGAAGGT
<b>JNK1 (sentido)</b>	TGAAGCAGAAGCTCCACCAC
<b>JNK1 (antisentido)</b>	GCACCTAAAGGAGAGGGCTG
<b>MITF (sentido)</b>	ATGGCAAATACGTTGCCTGTC
<b>MITF (antisentido)</b>	GTGAGCTCCCTTTTTATGTTGGG
<b>NFAT5 (sentido)</b>	GACCTAGACCTGGAATCGCC
<b>NFAT5 (antisentido)</b>	GGTGTA ACTTCAGAGAATCTCGC
<b>NUAK1/ARK5 (sentido)</b>	CAACACAGCCCTCAGATGCT
<b>NUAK1/ARK5 (antisentido)</b>	GAGGGCATCACAGTCACACA
<b>PERK (sentido)</b>	CTCAGCGACGCGAGTACC
<b>PERK (antisentido)</b>	TGATAATTACTAATGACCTGCCCG
<b>POU3F2 (sentido)</b>	ACCCGCTTTATCGAAGGCAA

<b>POU3F2 (antisentido)</b>	CCTCCATAACCTCCCCAGA
<b>PTEN (sentido)</b>	GGATTCGACTTAGACTTGACCT
<b>PTEN (antisentido)</b>	ATGTCTTTCAGCACAAAGATTGTAT
<b>Rab22a (sentido)</b>	TCAACCCAACAATAGGGGCA
<b>Rab22a (antisentido)</b>	ATTATAGCTGCAGCCGACCC
<b>Slug (sentido)</b>	GCGTTTTCCAGACCCTGGTT
<b>Slug (antisentido)</b>	CTTCTCCCCCGTGTGAGTTCT
<b>Smad3 (sentido)</b>	AACTCAAGAAGACGGGGCAG
<b>Smad3 (antisentido)</b>	TCCAGGGACCTGGGGATG
<b>Snail (sentido)</b>	CGAGTGGTTCTTCTGCGCTA
<b>Snail (antisentido)</b>	CTGCTGGAAGGTAAACTCTGGA
<b>Sox4 (sentido)</b>	GCACTAGGACGTCTGCCTTT
<b>Sox4 (antisentido)</b>	ACACGGCATATTGCACAGGA
<b>Spred1 (sentido)</b>	CAGATCGGATCACGGTGAGG
<b>Spred1 (antisentido)</b>	GTGCATAACTATTATCGTTGTCAGA
<b>TBP (sentido)</b>	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC
<b>TBP (antisentido)</b>	CACACGCCAAGAAACAGTGA
<b>TGF-<math>\beta</math>RII (sentido)</b>	GTCTATGACGAGCAGCGGG
<b>TGF-<math>\beta</math>RII (antisentido)</b>	CGTTATTAACCGACTTCTGAACGTG
<b>TRPM1 (sentido)</b>	CAGTGCTGGACTGAGGCTATT
<b>TRPM1 (antisentido)</b>	ACAGCAACACCTGTTAGAGTCTT
<b>ZEB1 (sentido)</b>	TGTGGTAGAAACAAATTCAGATTCA
<b>ZEB1 (antisentido)</b>	GCCCTTCCTTTCTGTGTCA
<b>ZEB2 (sentido)</b>	GAATAACGGTCCTGCCTCCC
<b>ZEB2 (antisentido)</b>	GCTCGATCTGCGAAGTCTTG

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-qPCR.

Por otra parte, la RT-qPCR basada en la utilización de sondas específicas, en este caso sondas Taqman, se utilizó para el análisis de expresión de los miRNAs. La tecnología de las sondas Taqman se basa en sondas portadoras de un reportero fluorescente en el extremo 5' de la sonda y un *quencher* no fluorescente en el extremo 3'. Durante la PCR, la sonda Taqman se une específicamente a su secuencia complementaria entre los sitios de unión de los oligonucleótidos sentido y antisentido. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del reportero fluorescente al *quencher* resulta en la supresión de la fluorescencia. Durante la extensión del cDNA, la Taq DNA polimerasa corta la sonda por su extremo 3', de modo que el *quencher* queda separado del reportero fluorescente, permitiendo la emisión de fluorescencia por parte de este último. La emisión de fluorescencia ocurre, por tanto, únicamente si la secuencia diana es complementaria a la sonda y es amplificada durante la PCR. De este modo, se evitan procesos de detección inespecíficos. En estos ensayos las células fueron lisadas con el reactivo QIAzol (Qiagen), y

el RNA total fue extraído con el kit miRNeasy Mini Kit (Qiagen), el cual permite enriquecer en miRNAs. A partir de dicho RNA (12.5 ng) se obtuvo cDNA a partir de los miRNAs maduros. Esto se consiguió gracias al uso de oligonucleótidos específicos para la retrotranscripción de cada miRNA analizado. Estos oligonucleótidos son portadores de un bucle que permite realizar la extensión del cDNA (Taqman MicroRNA Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Para la transcripción inversa se utilizó el producto Taqman microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), que ya incorpora la enzima MultiScribe MuLV, y se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicho proceso se llevó a cabo secuencialmente durante 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, y 5 minutos a 85°C. La PCR se realizó por triplicado y acorde a las instrucciones del fabricante, a partir del producto de la transcripción inversa (1 µl), utilizando FastStart Essential DNA Probes Master (Roche), que contiene la Taq DNA polimerasa (FastStart Taq DNA polimerasa) y oligonucleótidos específicos para la PCR (Taqman MicroRNA Assay, Applied Biosystems). El protocolo empleado para la reacción de amplificación fue el siguiente: un paso inicial de 10 minutos a 95°C (activación de la enzima), seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturalización) y 60 segundos a 60°C (anillamiento y extensión). El termociclador utilizado fue el LightCycler 480. Para analizar los niveles de expresión relativa de los microRNAs, los resultados fueron normalizados a los niveles de expresión del RNA nucleolar pequeño RNU44 (Taqman Small RNA Control, Applied Biosystems).

Para el análisis de los resultados de ambos tipos de qPCR (SYBR Green o sondas Taqman) se utilizó el método  $\Delta\Delta Ct$ . Brevemente, la diferencia entre los valores Ct ( $\Delta Ct$ ) del gen de interés respecto del gen de referencia (TBP o RNU44) es calculado por cada muestra. Después, se determina la diferencia entre los valores  $\Delta Ct$  entre la muestra tratada (por ejemplo A375-VR) y el control (A375) ( $\Delta\Delta Ct$ ). Los resultados se representan como tasa de cambio o *fold-change* del gen de interés entre las muestras ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

### Secuenciación de RNA de pequeño tamaño (*Small RNA-Seq*) y análisis de datos

El RNA (en duplicado) de las líneas celulares de melanoma fue extraído a partir de placas subconfluentes usando el reactivo mirVana miRNA Isolation kit (Thermo Fisher Scientific). La integridad del RNA fue determinada en geles de agarosa mediante el análisis de las bandas de RNA ribosómico 28S y 18S. La cuantificación y valoración del RNA se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) de longitud de onda con el Nanodrop ND-1000.

La preparación de la librería a partir del RNA obtenido, así como la secuenciación de RNA de pequeño tamaño fue llevado a cabo por la unidad de Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, mediante secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*) en el equipo Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, EEUU). El primer paso para la preparación de la librería consistió en la ligación mediante la RNA ligasa de adaptadores de DNA de hebra simple adenilados a ambos

extremos del RNA, los cuales actúan como lugares de unión para los oligonucleótidos durante las reacciones de transcripción inversa y amplificación por PCR. A continuación se realizó la retrotranscripción del RNA a cDNA y su amplificación por PCR. El diseño de los oligonucleótidos con secuencias específicas o *index* permite identificar las muestras de la librería. Finalmente se purificó el cDNA de pequeño tamaño mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes para seleccionar las moléculas del tamaño adecuado, reduciendo así la cantidad de material para ser secuenciado. Por tanto, la librería así obtenida consiste en las secuencias de interés flanqueadas por adaptadores, además de los *index* para cada muestra, incorporadas con los oligonucleótidos.

Los adaptadores poseen en sus extremos sitios de unión a un sustrato sólido o *chip*, el cual presenta cientos de miles de pequeños oligonucleótidos anclados que son capaces de unirse a las secuencias complementarias de los cDNAs a secuenciar. A continuación, se produce un proceso de amplificación de copias de los fragmentos de cDNA, y posteriormente se añaden los oligonucleótidos y nucleótidos marcados fluorescentemente necesarios para la secuenciación. En sucesivas rondas, los nucleótidos van incorporándose y produciendo la extensión del DNA, sustituyéndose tras cada ronda las moléculas que no han sido incorporadas. Cada ronda de síntesis es monitorizada y es posible determinar el nucleótido que ha sido añadido en cada punto del *chip*, pudiendo obtenerse de este modo la secuencia de las moléculas de cDNA correspondientes a los RNAs de pequeño tamaño analizados.

El análisis de los datos obtenidos en la secuenciación fue realizado en el Servicio de Bioinformática y Bioestadística del Centro de Investigaciones Biológicas por Lola Alonso Guirado. Brevemente, las secuencias de los adaptadores en 3' fueron "recortadas" empleando el *software* CutAdapt (versión 1.7.1) (Martin, 2011), así como los *index* específicos de cada muestra. Las secuencias resultantes fueron alineadas frente a secuencias de miRNAs maduros de *Homo sapiens* de la base de datos miRBase21 ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)), usando para ello el *software* Bowtie (versión 1.0.0) y el método de alineamiento global en el que se requiere un 100% de identidad entre las lecturas y las secuencias de los miRNAs conocidos (Langmead *et al.*, 2009). Las cuentas de las lecturas totales de cada muestra se normalizaron al tamaño de la librería correspondiente. El análisis de la expresión diferencial entre las muestras se realizó usando el paquete de R DESeq2 (Love *et al.*, 2014) o la librería BioSAGE (Audic y Claverie, 1997). Se consideró que existía expresión diferencial de un miRNA entre dos muestras cuando se cumplía el criterio de veces de cambio  $|\log_2\text{FoldChange}| > 0.9$  para las células A375-VR o  $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$  para las células A375-TR y SK-Mel-103-TR y que el *p-value* ajustado para tests múltiples fuera menor que 0.05. La corrección de los *p-values* para tests múltiples se hizo por FDR usando la corrección de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Yekutieli, 2001).

### Ensayos de formación de tumores y metástasis *in vivo*

Para los experimentos *in vivo* se emplearon ratones inmunodeficientes SCID y NSG. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de esterilidad, libres de patógenos, con alimento y agua *ad libitum*, y sometidos a un fotoperiodo 12/12. Todas las prácticas realizadas con los animales se hicieron siguiendo las directrices y protocolos del Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Para los estudios de colonización temprana de pulmón con células BLM, las células ( $1 \times 10^6$ ) fueron resuspendidas en 100  $\mu$ l de PBS e inoculadas en la vena de la cola de ratones SCID. Después de 24 horas, los ratones fueron sacrificados, se extrajeron los pulmones, los cuales fueron disgregados mecánicamente para ser posteriormente incubados con el reactivo TriReagent, extrayendo el RNA con cloroformo a partir de estos lisados, tal y como se ha descrito anteriormente.

Para los estudios de formación de tumores, las células ( $1 \times 10^6$ ) A375 parentales o A375-VR fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de PBS e inoculadas subcutáneamente en la región dorsolateral de los animales (9 ratones por condición). Los ratones se inspeccionaron diariamente tras la inoculación para detectar el crecimiento del tumor, tomándose medidas de dichos tumores cada 2-3 días. Los ratones fueron sacrificados a los 36 días de la inoculación, antes de que los tumores alcanzaran un volumen de 1  $\text{cm}^3$ . Además, se analizó mediante necropsia la posible presencia de metástasis en los órganos internos.

Para los estudios de supervivencia así como de formación de metástasis, los ratones SCID o NSG (entre 9-14 ratones por condición) fueron inoculados con transfectantes de las células BLM o A375 (parentales o A375-VR), respectivamente. Concretamente, las células ( $1 \times 10^6$ ) en un volumen de 100  $\mu$ l de PBS fueron inoculadas en la vena de la cola, realizándose un seguimiento diario de los animales hasta detectar la aparición de signos de metástasis pulmonar, tales como estrés respiratorio, disminución del movimiento o caquexia. Cuando se dieron alguno de estos signos, se procedió al sacrificio de los ratones, evaluándose mediante necropsia el grado de colonización metastática en los órganos internos, principalmente pulmón (células BLM y A375) e hígado (células A375). Asimismo, se obtuvieron células de las metástasis mediante ligera disgregación mecánica, las cuales fueron filtradas (40  $\mu$ m de poro) y cultivadas en medio completo durante 10-15 días. Este tiempo se considera adecuado para aislar y expandir las células de melanoma, las cuales fueron posteriormente analizadas en ensayos de invasión o viabilidad.

### Análisis estadístico

Los datos de distribución gaussiana se analizaron mediante la prueba t de student (para dos condiciones) o mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de comparación múltiple Tukey-Kramer (para más de dos condiciones). Los datos de supervivencia de ratones (datos sin distribución gaussiana) se estimaron mediante el test de Mann-Whitney. En todos los casos el nivel mínimo de significatividad fue de  $p < 0.05$ . Las diferencias significativas fueron representadas como  $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$  y  $*p < 0.05$ .

*-RESULTADOS-*

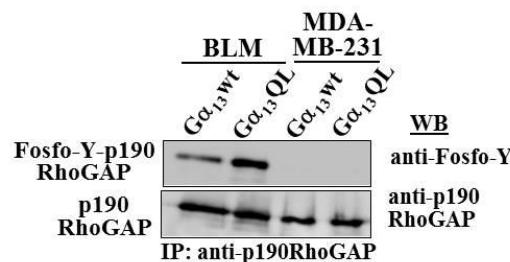


## I. LA VIA DE SEÑALIZACIÓN $G\alpha_{13}$ -Blk-p190RhoGAP REGULA LA ACTIVACIÓN DE RhoA Y LA INVASIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA A CXCL12.

La expresión de la forma constitutivamente activa de  $G\alpha_{13}$  ( $G\alpha_{13}$  QL) promueve la inhibición de la activación de RhoA y el bloqueo de invasión en las líneas celulares de melanoma humano BLM y MeWo (Bartolome *et al.*, 2008). Por el contrario, la expresión de  $G\alpha_{13}$  QL en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se traduce en activación de RhoA y aumento de invasión celular (Kelly *et al.*, 2006a). Dado que la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP se correlaciona con su actividad GAP sobre RhoA (Arthur *et al.*, 2000; Fincham *et al.*, 1999; Haskell *et al.*, 2001), estudiamos si podían existir distintos niveles de fosforilación de esta GAP que pudieran explicar las diferencias observadas en la activación de RhoA e invasión entre ambos tipos celulares.

### Implicación de Blk en la fosforilación de p190RhoGAP tras la activación de $G\alpha_{13}$

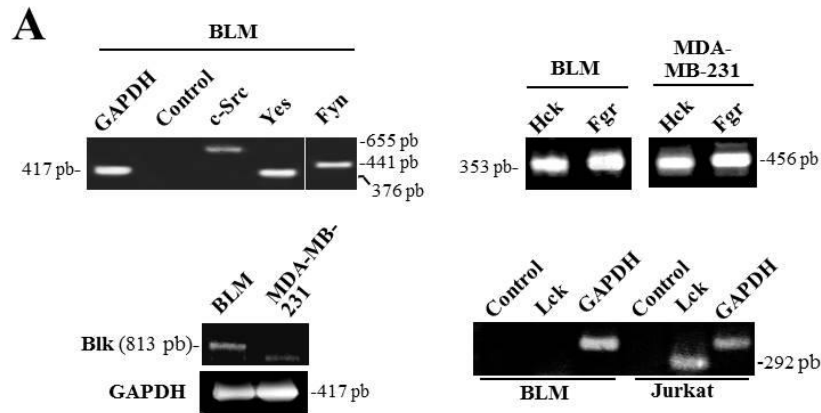
Tal y como se había descrito previamente, los niveles de fosforilación en tirosina de p190RhoGAP en las células BLM transfectadas con  $G\alpha_{13}$  QL son mayores que los de las células transfectadas con la forma *wild type* (wt, en adelante) (Bartolome *et al.*, 2008) (**Figura 12**). Por el contrario, no se detectó fosforilación de p190RhoGAP en las células MDA-MB-231 transfectadas con  $G\alpha_{13}$ wt o QL.



**Figura 12.** Análisis de la fosforilación de p190RhoGAP en células BLM y MDA-MB-231 transfectadas con  $G\alpha_{13}$  wt o  $G\alpha_{13}$  QL. Los lisados celulares fueron sometidos a inmunoprecipitación y *western blotting* con los anticuerpos indicados.

Previamente habíamos mostrado que la fosforilación de p190RhoGAP en células BLM implica a proteínas Src quinasas (Bartolome *et al.*, 2008). Entre los posibles mecanismos que pudieran explicar las diferencias observadas en la fosforilación de esta GAP entre células BLM y MDA-MB-231 estaban diferencias en la expresión o actividad de los miembros de la familia Src. Como primera aproximación, se llevaron a cabo análisis cualitativos mediante RT-PCR (**Figura 13A**), así como búsquedas bibliográficas (**Figura 13B**) para averiguar si existían diferencias en la expresión de las Src quinasas entre ambas líneas celulares. Estos análisis revelaron que la Src quinasa Blk sería una posible candidata. Así, observamos que las células BLM expresaban Blk, mientras que las células MDA-MB-231 carecían de esta quinasa. Asimismo, la expresión de Lyn y Lck en las

células MDA-MB-231 y su posible ausencia en las BLM no podían explicar las diferencias observadas en la fosforilación de p190RhoGAP (Biscardi *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 2001; Mahabeleshwar y Kundu, 2003).



**B**

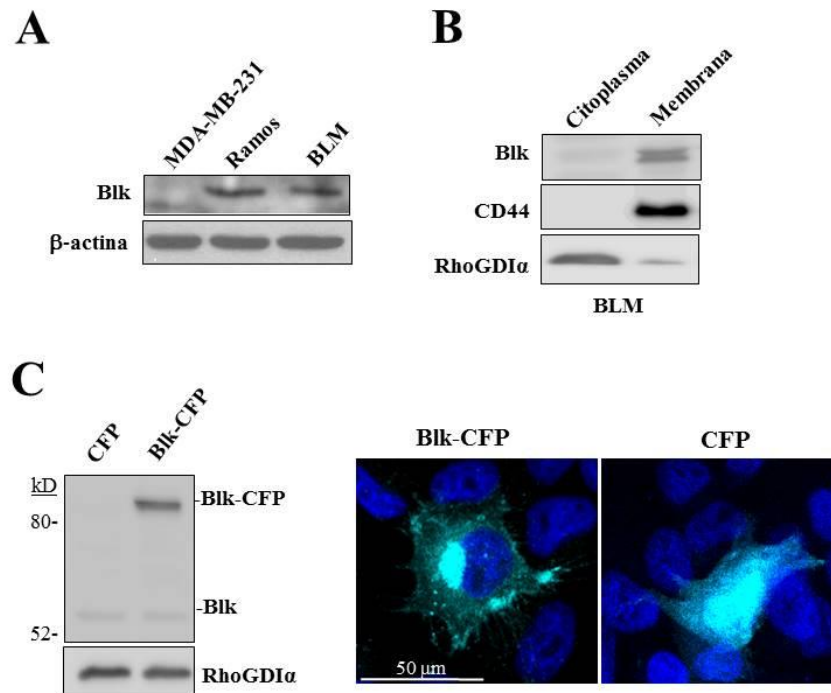
**Expresión de quinasas Src**

	<b>BLM</b>	<b>MDA-MB-231</b>
<b>c-Src</b>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>
<b>Fyn</b>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>3</sup>
<b>Yes</b>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>4</sup>
<b>Fgr</b>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
<b>Lyn</b>	ND	+ <sup>3</sup>
<b>Hck</b>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
<b>Blk</b>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
<b>Lck</b>	- <sup>1</sup>	+ <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Este trabajo; <sup>2-4</sup>Ver referencias; ND: No determinado

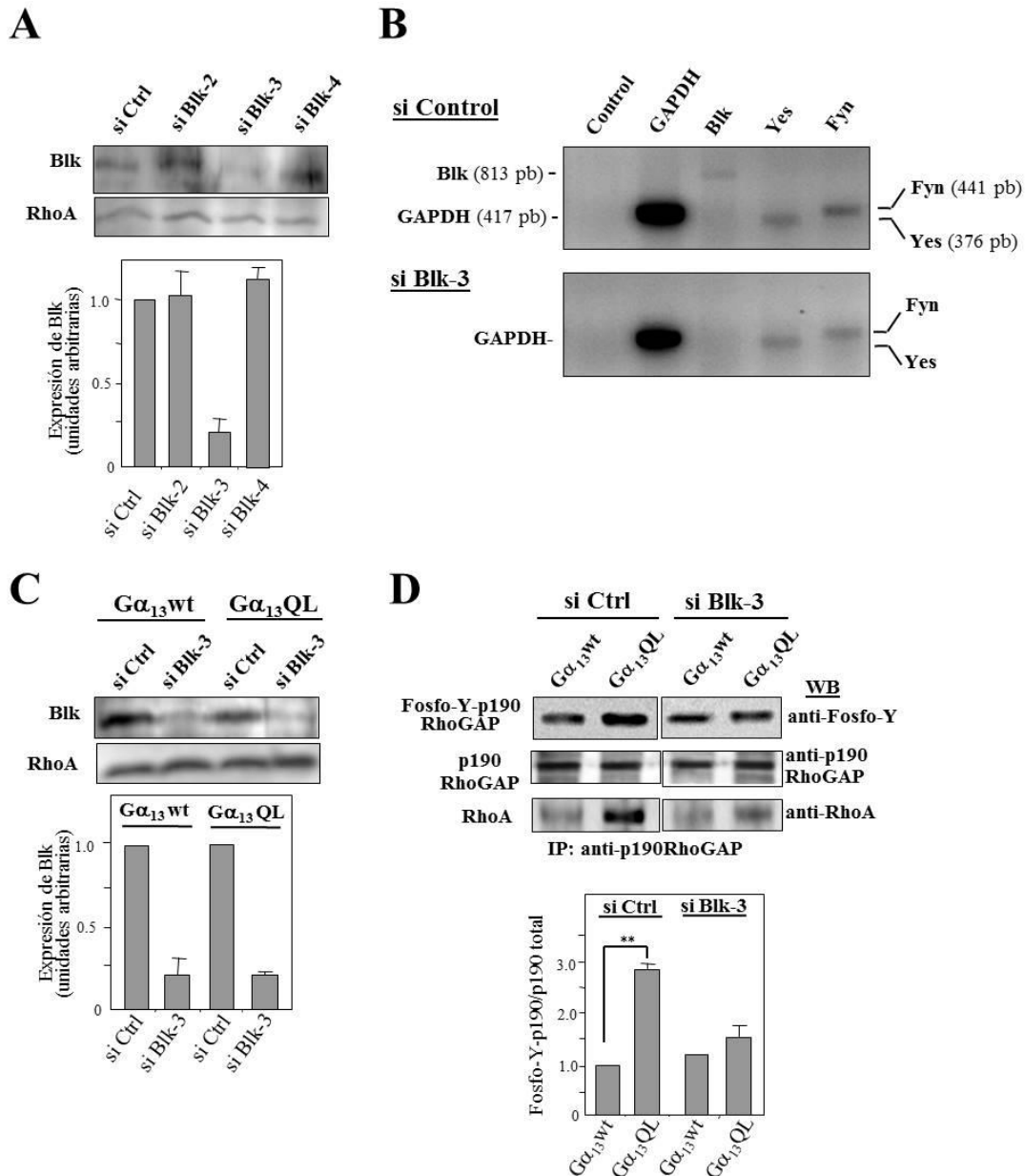
**Figura 13. Expresión de Src quinasas en células BLM y MDA-MB-231.** (A) Análisis mediante RT-PCR de las Src quinasas indicadas. Las células Jurkat fueron usadas como control positivo de la expresión de Lck. (B) Expresión de SFKs en células BLM y MDA-MB-231. (+) y (-) indican expresión o falta de expresión, respectivamente, en función de los resultados presentados en el panel A y de trabajos previos (Biscardi *et al.*, 1998<sup>2</sup>; Mahabeleshwar y Kundu, 2003<sup>3</sup>; Hansen *et al.*, 2001<sup>4</sup>).

La expresión diferencial de Blk entre ambos tipos celulares fue validada por *western blotting*, utilizando las células Ramos como control positivo de expresión de esta quinasa (Figura 14A). El análisis mediante fraccionamiento celular confirmó la expresión de Blk en las células BLM, observándose su localización mayoritaria en la fracción membranal (Figura 14B). Adicionalmente, utilizando microscopía confocal con células BLM transfectadas transitoriamente con el vector Blk-CFP pudimos corroborar la localización preferente de Blk en la membrana plasmática, además de observarse un patrón moteado y difuso en el citoplasma (Figura 14C).



**Figura 14. Expresión de Blk en células BLM.** (A) La expresión de Blk fue analizada mediante *western blotting*.  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga. (B) Fraccionamiento celular en BLM. CD44 y RhoGDI $\alpha$  fueron empleados como control de fracción membranal y citoplasmática, respectivamente. (C) Las células BLM fueron transfectadas transitoriamente con el vector pECFP-N1-Blk o el vector vacío pECFP-N1. La eficiencia de la transfección fue comprobada mediante *western blot* con anticuerpos anti-Blk o anti-RhoGDI $\alpha$  como control de carga (izquierda). Los transfectantes fueron analizados mediante microscopía confocal (derecha). El color cian corresponde a la expresión de Blk-CFP o a CFP, mientras que los núcleos fueron teñidos con DAPI.

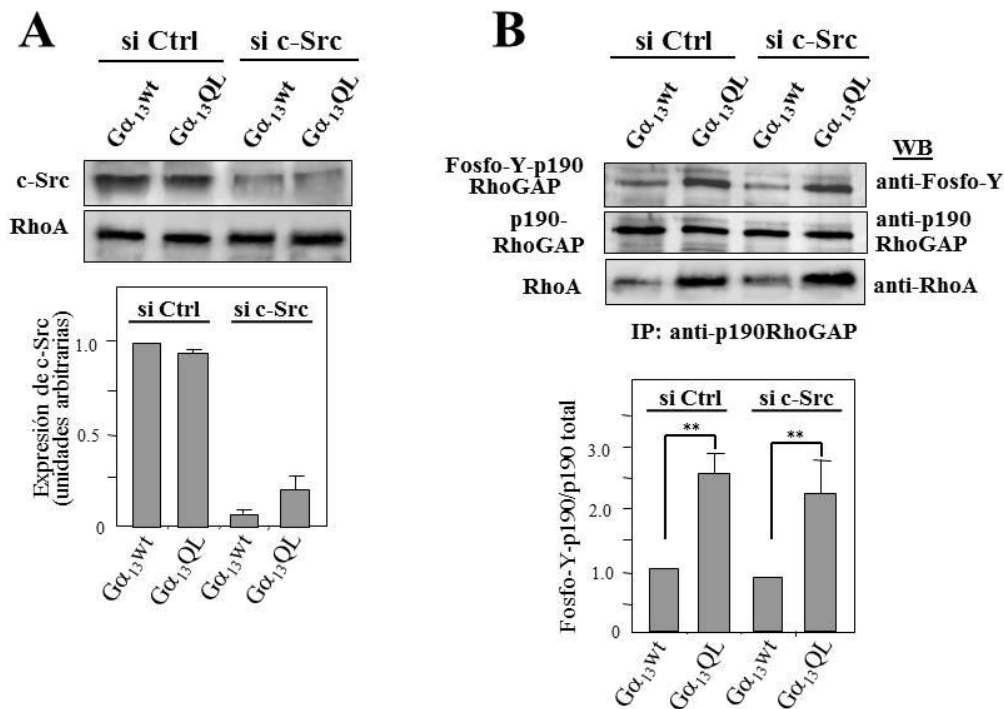
Para estudiar si Blk estaba involucrada en la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP tras la activación de  $G\alpha_{13}$ , se procedió a silenciar esta quinasa. Para ello se transfectaron tres siRNAs diferentes en las células BLM, observándose que el siRNA Blk-3 era el más eficiente en el silenciamiento de Blk (**Figura 15A**), sin afectar a la expresión de Fyn o Yes (**Figura 15B**). A continuación, deplecionamos Blk en células BLM transfectadas establemente con las formas  $G\alpha_{13}$  wt o  $G\alpha_{13}$  QL (**Figura 15C**). Análisis mediante inmuprecipitación con anticuerpos anti-p190RhoGAP y posterior *western blotting* con anticuerpos anti-fosfotirosina revelaron que la fosforilación de p190RhoGAP disminuía en las células  $G\alpha_{13}$  QL transfectadas con siRNA para Blk en comparación con los transfectantes control, obteniéndose niveles similares de fosforilación a los de los transfectantes  $G\alpha_{13}$ wt (**Figura 15D**). Por otra parte, el silenciamiento de Blk en las células  $G\alpha_{13}$ wt no tuvo efectos en la fosforilación de p190RhoGAP. Asimismo, se observó que la co-inmuprecipitación de RhoA con esta GAP disminuye en las células  $G\alpha_{13}$  QL silenciadas para Blk, en comparación con las células transfectadas con siRNA control.



**Figura 15. Implicación de Blk en la fosforilación de p190RhoGAP tras activación de Gα<sub>13</sub>.** (A y C) Transfección con siRNA Blk o control en células BLM o en los transfectantes Gα<sub>13</sub>wt y Gα<sub>13</sub> QL seguido de *western blotting*. RhoA fue utilizado como control de carga. (B) Análisis mediante RT-PCR de la expresión de Blk, Fyn y Yes en células BLM transfectadas con siRNA Blk o control. (D) Las células Gα<sub>13</sub> wt y Gα<sub>13</sub> QL fueron transfectadas con los siRNA indicados y sometidas a ensayos de inmunoprecipitación y posterior *western blotting* con los anticuerpos indicados. Se muestran asimismo las cuantificaciones densitométricas de las bandas de los geles (n=4; \*\*p<0.01).

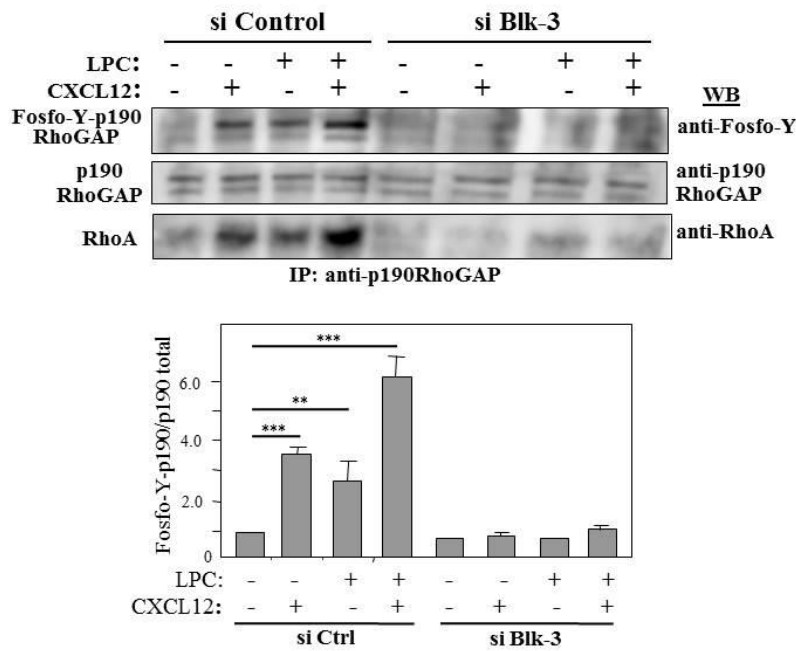
Con el fin de estudiar si los cambios en la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP ocurrían también cuando se silenciaba algún otro miembro de la familia Src, deplecionamos c-Src en los transfectantes estables Gα<sub>13</sub>wt y Gα<sub>13</sub> QL (**Figura 16A**), analizándose la fosforilación de esta GAP. No detectamos cambios en la fosforilación de p190RhoGAP en las células Gα<sub>13</sub> QL silenciadas para c-Src en comparación con los

transfectantes control, ni tampoco se observaron diferencias en la unión de RhoA a p190RhoGAP (**Figura 16B**).



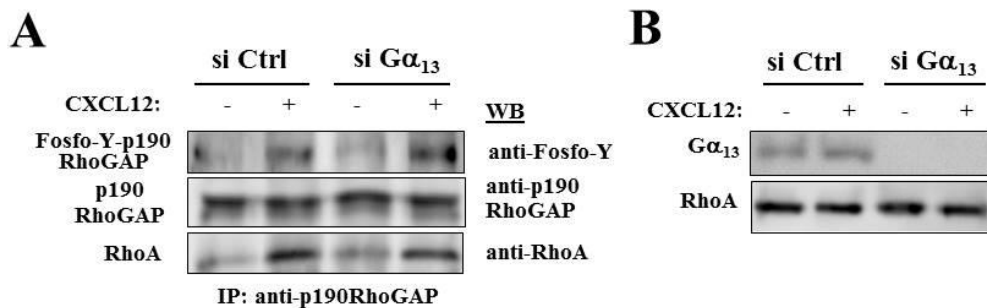
**Figura 16. El silenciamiento de c-Src no afecta a la fosforilación de p190RhoGAP en los transfectantes  $G\alpha_{13}$ wt y  $G\alpha_{13}$  QL.** (A) Transfección transitoria de células  $G\alpha_{13}$ wt y  $G\alpha_{13}$  QL con los siRNAs indicados, seguido de *western blotting* con anticuerpos anti-c-Src o anti-RhoA. (B) Los mismos transfectantes fueron testados en ensayos de inmunoprecipitación y posterior *western blotting* con los anticuerpos indicados. En ambos casos se muestra el resultado de la cuantificación de los geles (n=3), así como la desviación estándar (\*\*p<0.01).

La lisofosfatidilcolina (LPC) es un lípido bioactivo que se une a GPCRs asociados a proteínas  $G\alpha_{13}$  (Offermanns, 2003), y que promueve la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP en respuesta a activación de  $G\alpha_{13}$  (Bartolome *et al.*, 2008). Por otra parte, la unión de la quimioquina CXCL12 a su receptor CXCR4 se traduce en señalización a través de proteínas de la familia  $G\alpha_{i/o}$  (Chen *et al.*, 1998). Coincidiendo con resultados previos (Bartolome *et al.*, 2008), tanto LPC como CXCL12 estimularon la fosforilación de p190RhoGAP en células BLM transfectadas con siRNA control, y la combinación de ambos indujo aún mayor fosforilación (**Figura 17**). Este aumento de fosforilación correlacionó con la unión de esta GAP a su efector RhoA. Cuando se silenció Blk en dichas células y se trataron con CXCL12 y LPC individualmente, se observó una pérdida de fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP en comparación con las células transfectadas con siRNA control, y esta disminución se produjo incluso en las células tratadas con la combinación de quimioquina y LPC. Igualmente, la menor fosforilación correlacionó con la reducción en la unión RhoA-p190RhoGAP (**Figura 17**).



**Figura 17. El silenciamiento de Blk inhibe la fosforilación de p190RhoGAP en células expuestas a LPC o CXCL12.** Las células BLM fueron transfectadas con siRNA Blk o control, y sometidas a ensayos de inmunoprecipitación tras ser incubadas en ausencia o presencia de LPC, CXCL12 o su combinación. Se muestra la cuantificación de las bandas de los geles (n=3), junto con la desviación estándar (\*\*\*)p<0.001, \*\*p<0.01).

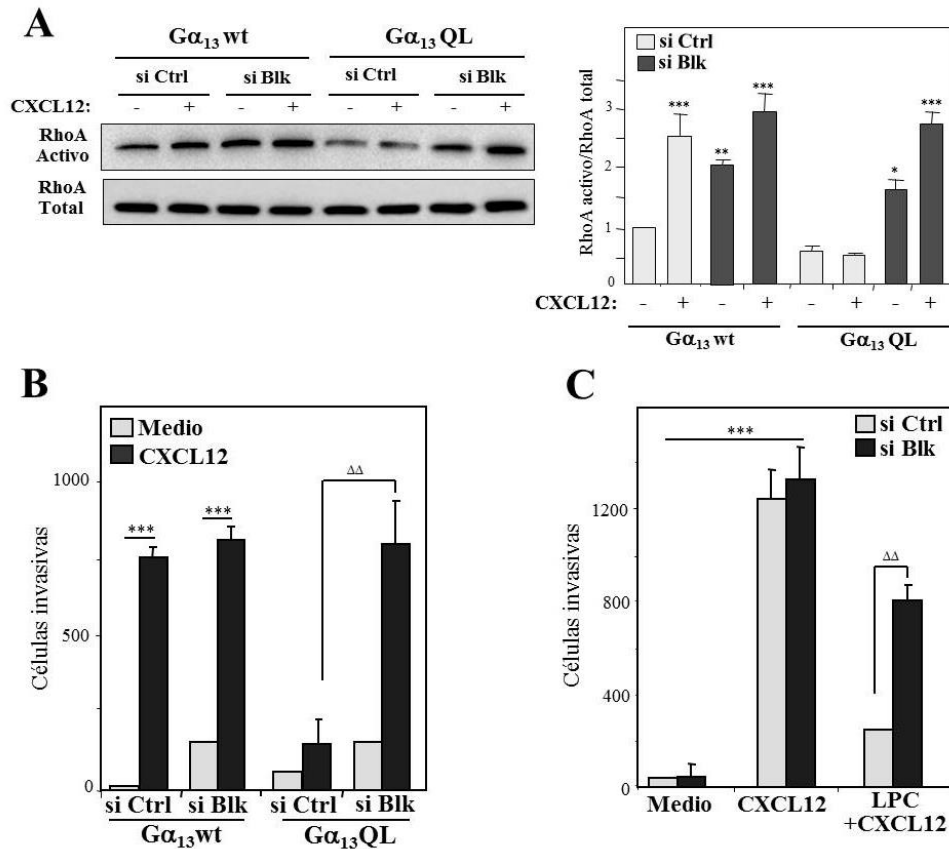
Aunque habíamos demostrado previamente que el silenciamiento de  $G\alpha_{13}$  impedía el aumento de fosforilación de p190RhoGAP en células que expresaban  $G\alpha_{13}$  activo (Bartolome *et al.*, 2008), observamos en las células parentales BLM que el aumento de fosforilación de esta GAP y su unión a RhoA en respuesta a CXCL12 se mantuvo tanto en las células transfectadas con siRNA control como en las silenciadas para  $G\alpha_{13}$  (Figura 18). Estos resultados indicarían que la señalización por CXCL12 que induce un aumento en la fosforilación de p190RhoGAP es independiente de  $G\alpha_{13}$ . Como era esperable, los niveles de expresión de  $G\alpha_{13}$  no dependían del tratamiento con la quimioquina (Figura 18B).



**Figura 18. El silenciamiento de  $G\alpha_{13}$  no afecta a la fosforilación de p190RhoGAP inducida por CXCL12.** (A) Las células BLM fueron transfectadas con los siRNA indicados, y posteriormente incubadas con o sin CXCL12 y sometidas a ensayos de inmunoprecipitación. (B) Se muestra la eficiencia de la transfección de las células empleadas en (A).

### El silenciamiento de Blk rescata la activación de RhoA y la invasión en células que expresan $G\alpha_{13}$ activo

Habíamos descrito anteriormente que la activación de  $G\alpha_{13}$  en las células BLM, ya sea mediante expresión de la forma activa  $G\alpha_{13}QL$  o por tratamiento con LPC, provoca la inactivación de RhoA y un defecto en invasión celular, lo cual estaría mediado por p190RhoGAP (Bartolome *et al.*, 2008). En ensayos de actividad GTPasa para RhoA utilizando células que expresan  $G\alpha_{13}$  activo y silenciadas para Blk, pudimos observar la recuperación de la activación de RhoA en comparación con las células transfectadas con siRNA control (**Figura 19A**). Dicha activación fue mayor cuando las células se trataron con CXCL12, debido al efecto adicional de esta quimioquina sobre la activación de RhoA independientemente de  $G\alpha_{13}$ . Asimismo, el silenciamiento de Blk en los transfectantes  $G\alpha_{13}$  wt fue suficiente para aumentar los niveles de RhoA activo en comparación con sus controles (**Figura 19A**). De acuerdo con esto, en ensayos de invasión celular hacia CXCL12 a través de matrigel, se observó un rescate de la invasión de las células  $G\alpha_{13}QL$  silenciadas para Blk en comparación con las células transfectadas con siRNA control (**Figura 19B**). Confirmando resultados previos, observamos que las células  $G\alpha_{13}QL$  transfectadas con siRNA control son muy poco invasivas, incluso en presencia de CXCL12 (**Figura 19B**) (Bartolome *et al.*, 2008). Por otro lado, la estimulación con la quimioquina indujo la invasión de las células  $G\alpha_{13}wt$ , no afectando a este proceso el silenciamiento de Blk (**Figura 19B**). De modo similar, CXCL12 promovió la invasión tanto de células BLM transfectadas con siRNA control o para Blk, mientras que dicha invasión se perdió cuando CXCL12 se combinó con LPC en células BLM transfectadas con siRNA control (**Figura 19C**), probablemente debido a la activación de  $G\alpha_{13}$ . Sin embargo, la capacidad invasiva de estas células hacia CXCL12 y LPC se recuperó, en parte, cuando se deplecionó Blk. Estos resultados sugieren que la señalización inhibitoria desencadenada por LPC al unirse a sus receptores y que es mediada por  $G\alpha_{13}$ , es más potente que la desencadenada por CXCL12, al menos en términos de invasión celular. Debido a esto y aun estando activado por LPC,  $G\alpha_{13}$  no puede transmitir la señalización inhibitoria en transfectantes silenciados para Blk, de modo que la invasión en respuesta a CXCL12 puede realizarse. En conjunto, estos datos muestran la implicación de Blk en la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP tras la estimulación de  $G\alpha_{13}$  que causa inactivación de RhoA e inhibición de invasión celular.



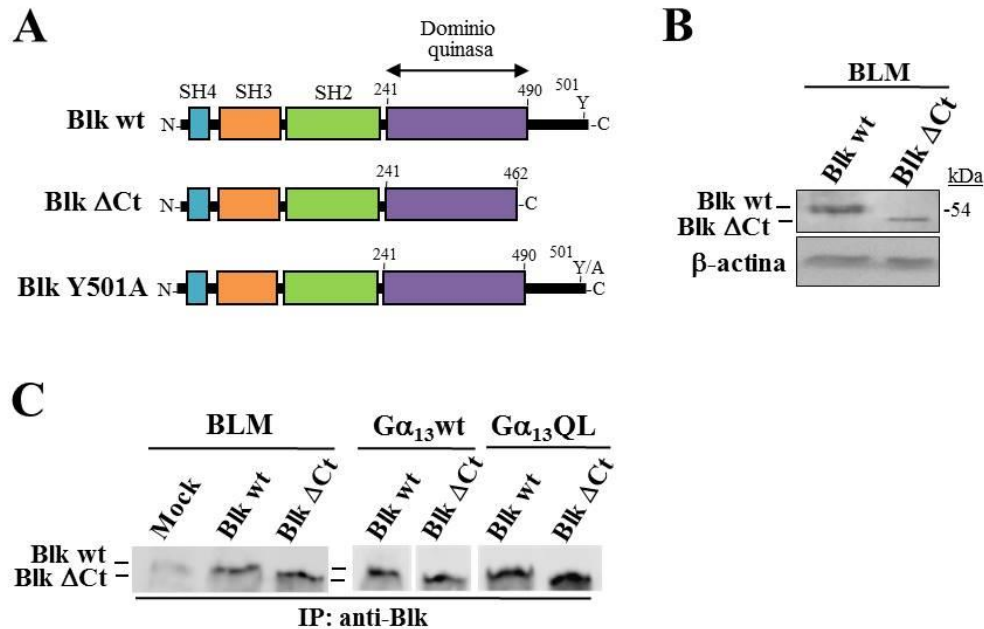
**Figura 19. El silenciamiento de Blk en células con  $G\alpha_{13}$  activo rescata la activación de RhoA y la invasión celular.** (A) Las células  $G\alpha_{13}$  wt o  $G\alpha_{13}$  QL transfectadas con siRNA control o para Blk fueron incubadas con o sin CXCL12 y sometidas a ensayos de GTPasa para RhoA. A la derecha se muestra la media y la desviación estándar de la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles (n=4; \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05). (B) Los mismos transfectantes fueron testados en ensayos de invasión (n=4). (C) La capacidad invasiva de células BLM transfectadas con siRNA control o para Blk fue determinada en ensayos de invasión hacia CXCL12 en presencia o ausencia de LPC (n=3). \*\*\*La invasión fue significativamente estimulada, p<0.001, o  $\Delta\Delta$  significativamente rescatada, p<0.01.

### Efecto de la sobre-expresión de Blk en la fosforilación de p190RhoGAP, activación de RhoA e invasión celular

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de la implicación de Blk en la señalización mediada por  $G\alpha_{13}$  se generaron vectores con diferentes construcciones de Blk para posteriormente expresar mediante transfección distintas formas de esta quinasa. Por una parte, se subclonó el Blk wt en el vector pcDNA3.1, así como una forma de Blk carente de la región carboxilo terminal (Blk  $\Delta$ Ct), la cual representaría una forma potencialmente activa de Blk dado que dicha región contiene la “tirosina inhibitoria” (Y501 para Blk) cuya fosforilación se traduce en conformación inactiva de las Src quinasas (Figura 20A) (Boggon y Eck, 2004; Petersen *et al.*, 2014; Playford y Schaller, 2004).

La transfección transitoria de los vectores Blk wt y Blk  $\Delta$ Ct en células BLM y su posterior análisis mediante *western blot* dio como resultado formas de 56 kDa y 52 kDa, correspondientes a Blk wt y Blk  $\Delta$ Ct, respectivamente (Figura 20B). Para facilitar la

posterior caracterización funcional de Blk, los cDNAs de ambas formas fueron subclonados en vectores pRetro, que se usaron para infectar tanto las células BLM como los transfectantes estables que sobre-expresaban  $G\alpha_{13}$ wt o  $G\alpha_{13}$  QL, lo que resultó en sobre-expresión de las formas de Blk en dichas células (**Figura 20C**).

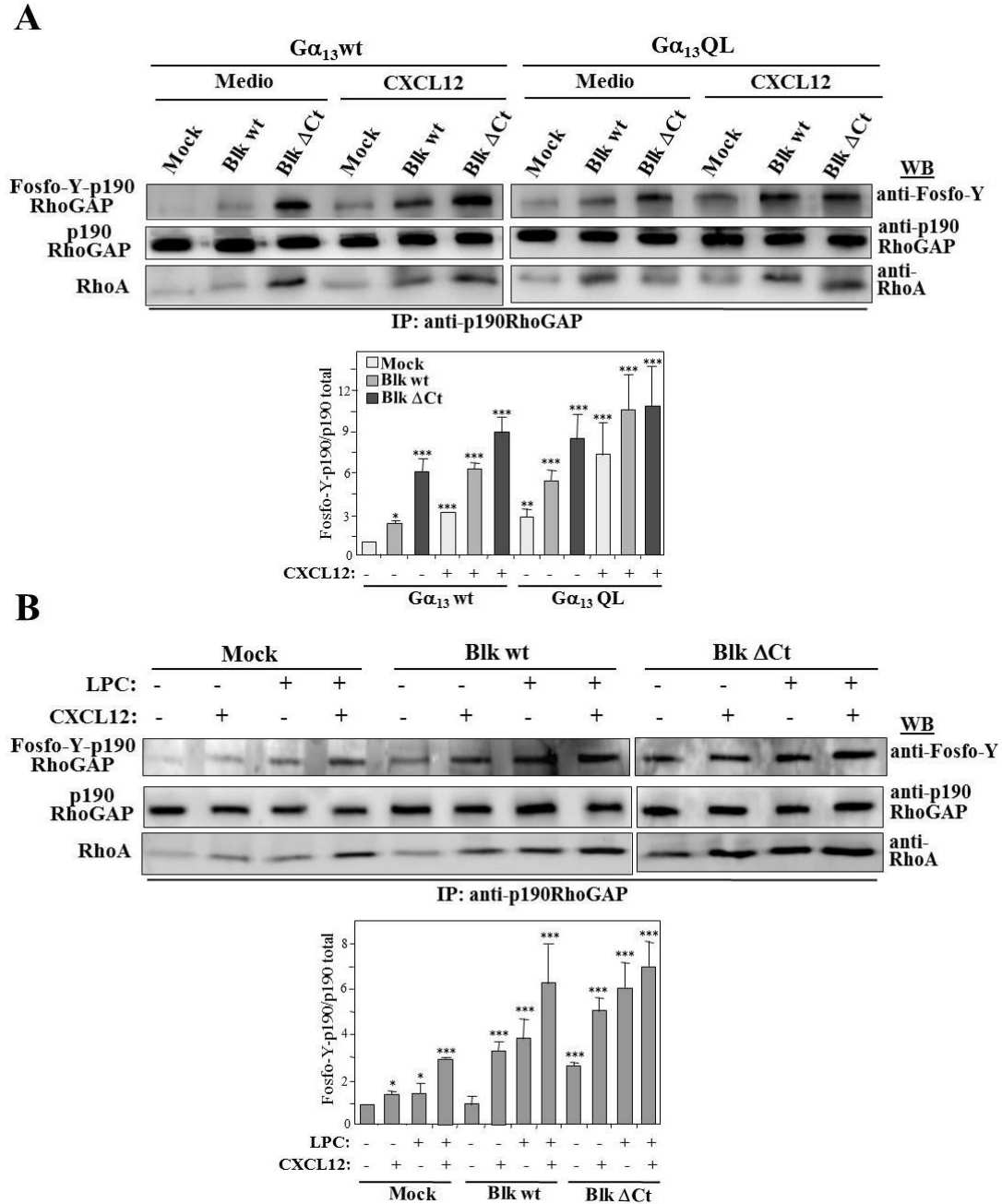


**Figura 20. Generación de transfectantes con expresión de diferentes formas de Blk.** (A) Esquema de las construcciones de Blk utilizadas en este trabajo. (B) Las células BLM fueron transfectadas transitoriamente con los vectores pcDNA3.1 Blk wt o Blk  $\Delta$ Ct seguido de *western blotting* con anticuerpos anti-Blk o anti- $\beta$ -actina. (C) Las células BLM o los transfectantes estables  $G\alpha_{13}$ wt y  $G\alpha_{13}$  QL fueron infectados retroviralmente con vectores pRetro (*mock*), pRetro-Blk wt o pRetro- Blk  $\Delta$ Ct, y los transfectantes testados en ensayos de *western blotting* tras inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Blk.

A continuación, estos dobles transfectantes  $G\alpha_{13}$ /Blk fueron incubados con CXCL12 y sometidos posteriormente a inmunoprecipitación y *western blotting* con el objetivo de analizar la fosforilación de p190RhoGAP cuando Blk estaba sobre-expresado. En todos los casos, la fosforilación de p190RhoGAP aumentó cuando se sobre-expresaba Blk wt en relación con los transfectantes control (*mock*), y dicha fosforilación se vio incrementada en presencia de CXCL12 (**Figura 21A**). Adicionalmente, la fosforilación era mayor en células  $G\alpha_{13}$  QL que en las  $G\alpha_{13}$  wt en las distintas condiciones, y notablemente superior cuando se sobre-expresaba la forma Blk  $\Delta$ Ct. Si bien es cierto que la fosforilación de p190RhoGAP en las células  $G\alpha_{13}$  QL-Blk  $\Delta$ Ct es similar a la observada en las células  $G\alpha_{13}$  QL-Blk wt cuando son estimuladas con CXCL12, esto podría deberse a que se hubieran alcanzado los niveles máximos de detección de fosforilación de p190RhoGAP.

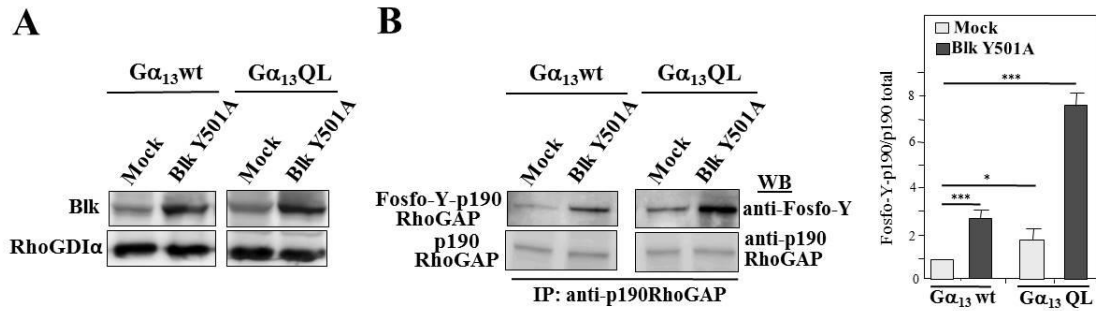
Asimismo, observamos que el grado de co-inmunoprecipitación entre p190RhoGAP y RhoA aumentaba en paralelo al nivel de fosforilación de la proteína GAP (**Figura 21A**). De modo similar a los transfectantes  $G\alpha_{13}$ , la incubación con CXCL12, LPC o ambos estímulos de células BLM que sobre-expresaban Blk wt o Blk  $\Delta$ Ct se tradujo en un

incremento de fosforilación de p190RhoGAP (**Figura 21B**). Asimismo, este incremento resultó ser mayor en las células que sobre-expresan Blk  $\Delta$ Ct. De nuevo, se pudo observar que un aumento de los niveles de fosforilación de p190RhoGAP correlacionaron con su mayor asociación a RhoA.



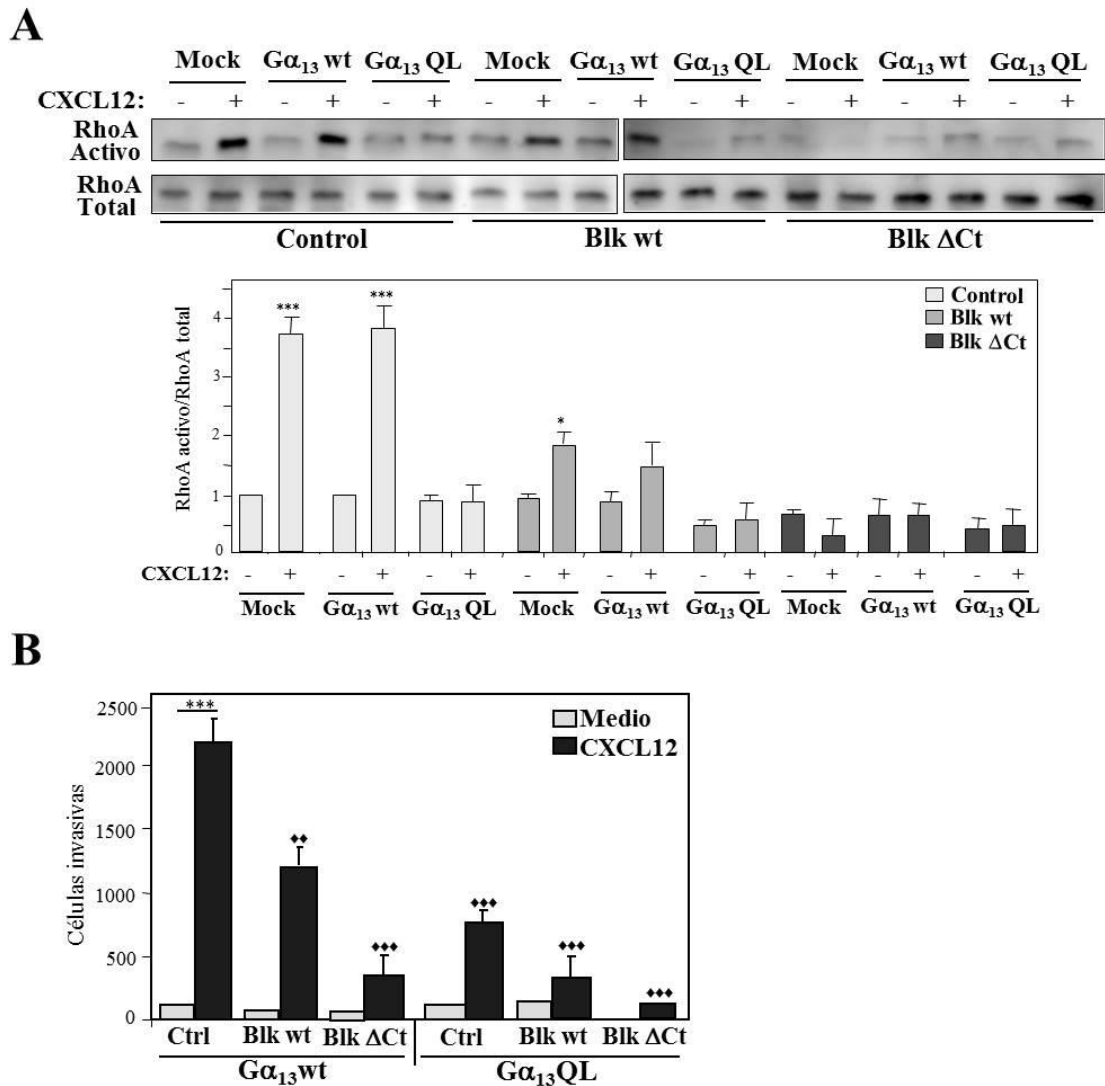
**Figura 21. La sobre-expresión de Blk se traduce en aumento de fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP en respuesta a la activación de  $G\alpha_{13}$ .** (A, B) Los distintos transfectantes estables simples o dobles fueron incubados en ausencia o presencia de CXCL12, LPC o su combinación, y posteriormente sometidos a ensayos de inmunoprecipitación y *western blotting*. Los paneles inferiores muestran la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles (n=3). Se muestra la media y la desviación estándar (\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05).

Adicionalmente, utilizamos mutagénesis dirigida sobre el cDNA de Blk wt para sustituir la “tirosina inhibitoria” por una alanina (Blk Y501A), obteniendo así otra potencial forma activa de Blk (**Figura 20A**) (Petersen *et al.*, 2014). Esta forma de Blk se transfectó transitoriamente en los transfectantes estables  $G\alpha_{13}$ wt y  $G\alpha_{13}$  QL (**Figura 22A**), lo que causó un aumento en la fosforilación de p190RhoGAP, en las células  $G\alpha_{13}$ wt y en mayor grado en las  $G\alpha_{13}$  QL (**Figura 22B**).



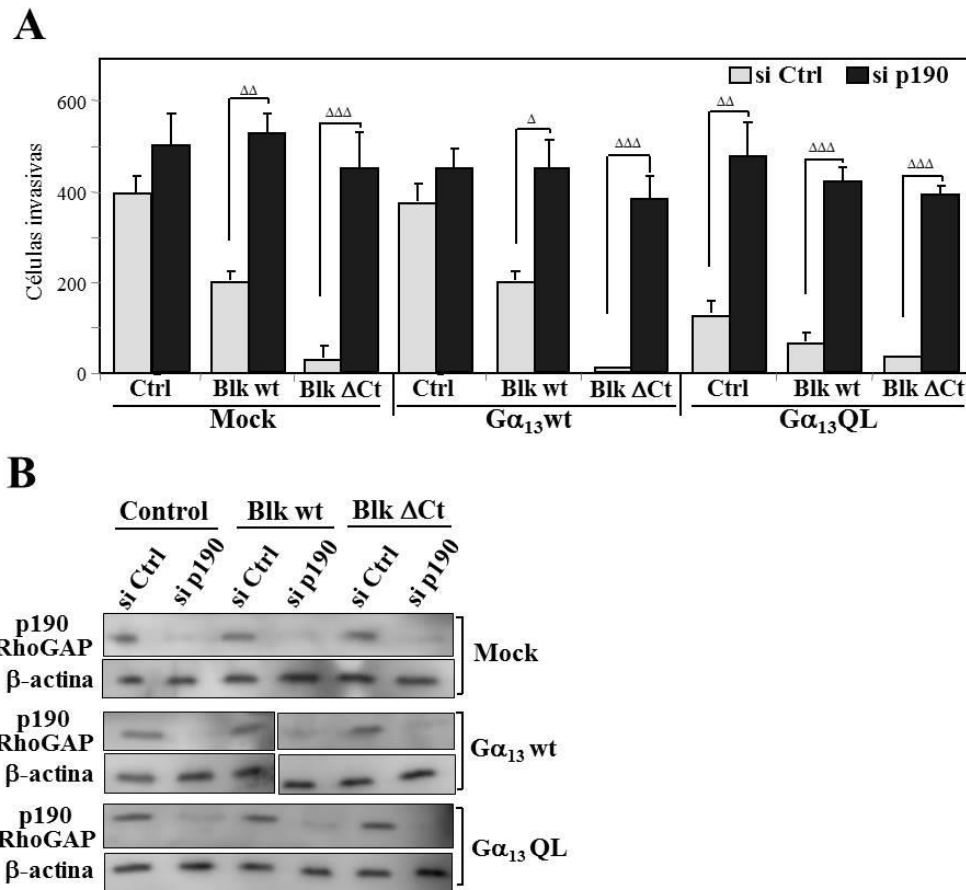
**Figura 22. La expresión de Blk Y501A se traduce en un incremento de la fosforilación de p190RhoGAP.** Las células  $G\alpha_{13}$ wt y  $G\alpha_{13}$  QL fueron transitoriamente transfectadas con Blk Y501A o el vector vacío (A), y dichos transfectantes sometidos a ensayos de inmunoprecipitación e *immunoblotting* con los anticuerpos indicados (B). A la derecha se muestra la cuantificación de las bandas de los geles resultantes (\*\*p<0.001, \*p<0.05, n=4).

Una vez demostrado que la sobre-expresión de Blk resulta en un aumento de la fosforilación de p190RhoGAP, realizamos ensayos GTPasa para determinar el grado de activación de RhoA en respuesta a CXCL12 en los dobles transfectantes  $G\alpha_{13}$ /Blk. Estos experimentos revelaron que las células que sobre-expresaban Blk wt y especialmente Blk  $\Delta$ Ct mostraban una disminución en la activación de RhoA (**Figura 23A**). Contrariamente con lo que ocurría con la recuperación de la invasión celular tras el silenciamiento de Blk (**Figura 19B**), la sobreexpresión de Blk wt y Blk  $\Delta$ Ct en transfectantes  $G\alpha_{13}$  se tradujo en una reducción de invasión hacia CXCL12 (**Figura 23B**). Esta reducción era mayor tras la sobre-expresión de Blk  $\Delta$ Ct, y fue aún más acusada cuando se combinaba la actividad de  $G\alpha_{13}$  QL con la de Blk  $\Delta$ Ct.



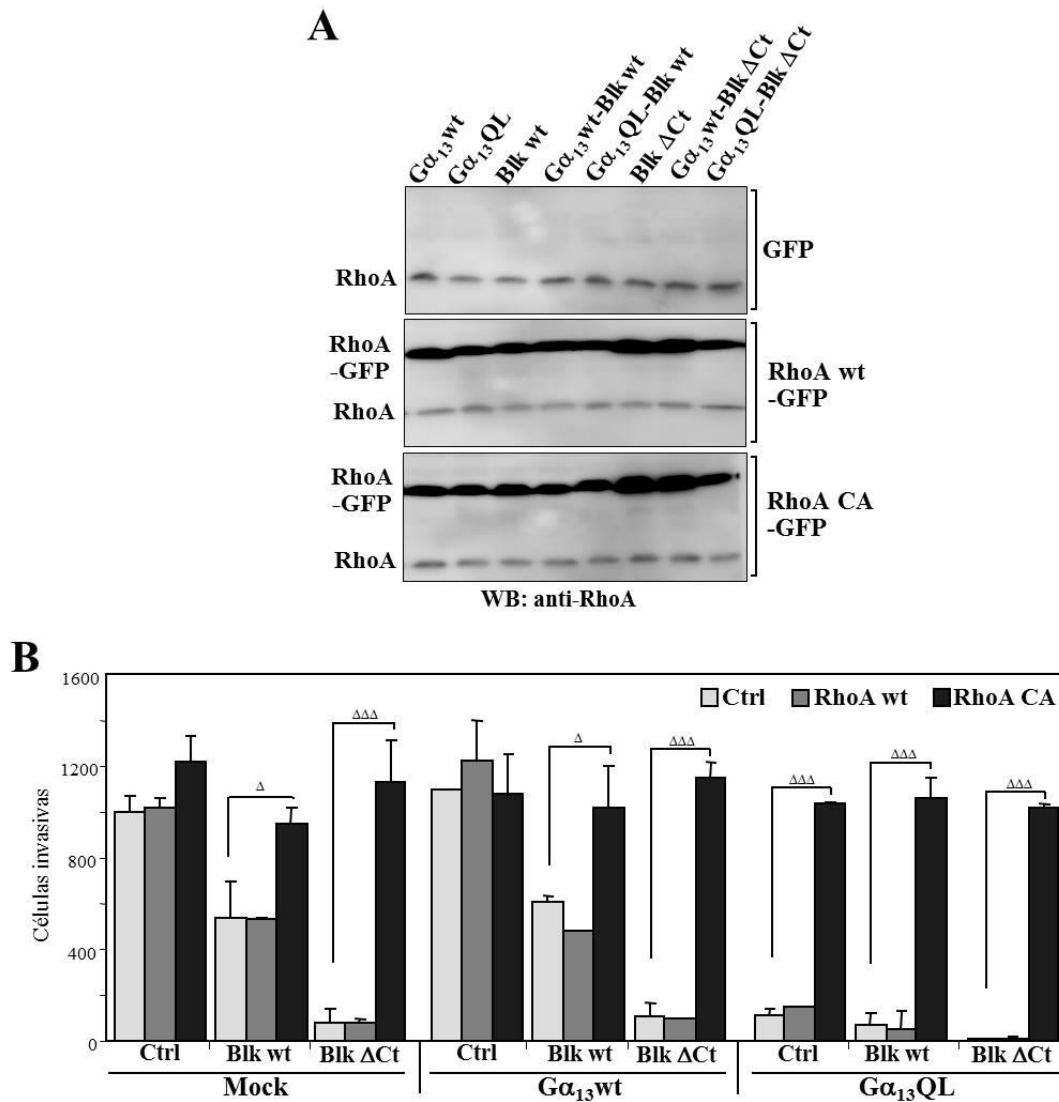
**Figura 23. La sobre-expresión de Blk inhibe la activación de RhoA y bloquea la invasión celular tras activación de  $G\alpha_{13}$ .** (A) La activación de RhoA fue analizada mediante ensayos GTPasa en los transfectantes estables simples y dobles de Blk y  $G\alpha_{13}$  tratados en presencia o ausencia de CXCL12. El panel inferior muestra el resultado de la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles (n=3; \*\*\*p<0.001, \*p<0.05). (B) Los mismos transfectantes fueron testados en ensayos de invasión hacia CXCL12. \*\*\*La invasión fue significativamente estimulada, p<0.001. \*\*\*La invasión fue significativamente inhibida respecto de los transfectantes control, p<0.001 o \*\*p<0.01.

Para comprobar si la disminución de la invasión provocada por la sobre-expresión de Blk estaba mediada por p190RhoGAP, se utilizó un siRNA para dicha GAP. El ensayo de invasión con las células dobles transfectantes para Blk y  $G\alpha_{13}$  mostró que el silenciamiento de p190RhoGAP rescataba el efecto inhibitorio generado por Blk de la invasividad celular (Figura 24A, B).



**Figura 24. El silenciamiento de p190RhoGAP rescata la invasión inhibida por la sobre-expresión de Blk.** (A) Los transfectantes estables simples y dobles de Blk y Gα<sub>13</sub> fueron transitoriamente transfectados con los siRNA indicados y su capacidad invasiva hacia CXCL12 analizada en ensayos de invasión a través de Matrigel. <sup>ΔΔΔ</sup>La invasión fue significativamente rescatada en comparación con las células transfectadas con siRNA control, p<0.001, <sup>ΔΔ</sup>p<0.01, <sup>Δ</sup>p<0.05 (n=4). (B) La eficiencia del silenciamiento de p190RhoGAP fue comprobada mediante *western blotting*.

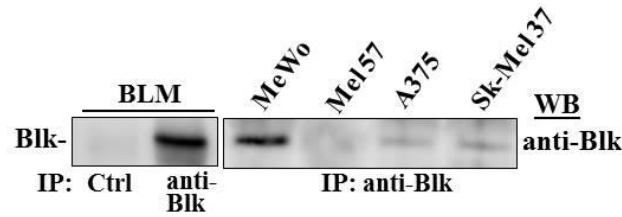
Adicionalmente, la sobre-expresión de una forma activa de RhoA (**Figura 25A**) recuperó la invasión deficiente de los transfectantes con sobre-expresión de Blk wt o Blk ΔCt, así como de las células con Gα<sub>13</sub> activado (**Figura 25B**). Todos estos datos indican que la activación de la vía Gα<sub>13</sub>-Blk-p190RhoGAP que causa inactivación de RhoA se traduce finalmente en inhibición de la invasión celular a CXCL12.



**Figura 25. La sobre-expresión de una forma activa de RhoA rescata la invasión inhibida por Blk.** Los transfectantes estables simples y dobles de Blk y  $G\alpha_{13}$  fueron transitoriamente transfectados con formas de RhoA wt, constitutivamente activa (RhoA CA) o con un vector vacío, y analizados mediante *western blotting* con anticuerpos anti-RhoA (A), o testados en ensayos de invasión hacia CXCL12 (B).  $\Delta\Delta\Delta$  La invasión fue significativamente rescatada en comparación con las células transfectadas con el vector vacío ( $p < 0.001$ ,  $\Delta p < 0.05$ ;  $n=2$ ).

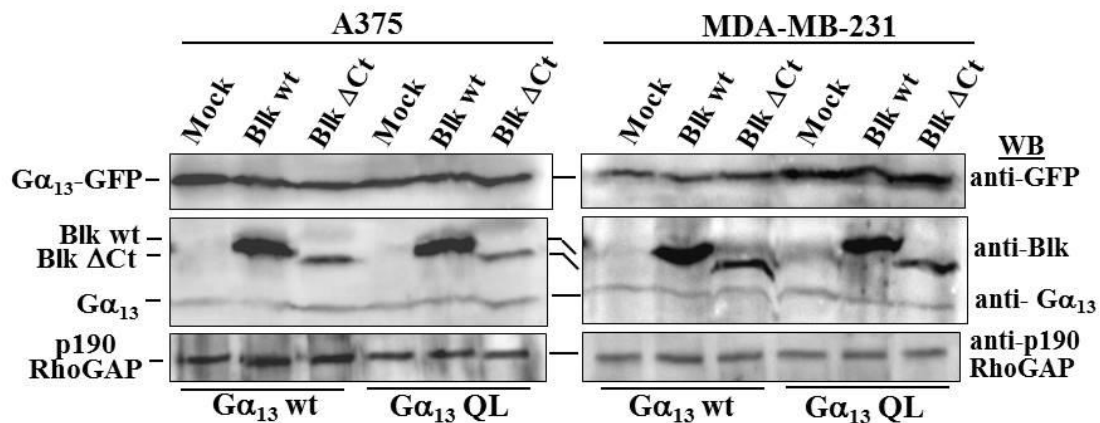
### Efecto de la expresión ectópica de Blk en la fosforilación de p190RhoGAP y en la activación de RhoA

Con el objetivo de estudiar si la expresión ectópica de Blk en células que carecían de esta Src quinasa se traducía en fosforilación de p190RhoGAP, llevamos a cabo estudios preliminares para analizar la expresión de Blk en diversas líneas celulares de melanoma. Dichos análisis revelaron que las células MeWo poseen niveles similares de expresión de Blk que las células BLM, mientras que las células SK-Mel-37 y A375 poseen baja expresión de Blk y las células Mel 57 carecen de dicha quinasa (Figura 26).



**Figura 26. Análisis de la expresión de Blk en líneas celulares de melanoma.** Las diferentes líneas de melanoma fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-Blk o anticuerpo control, seguido de *western blotting*.

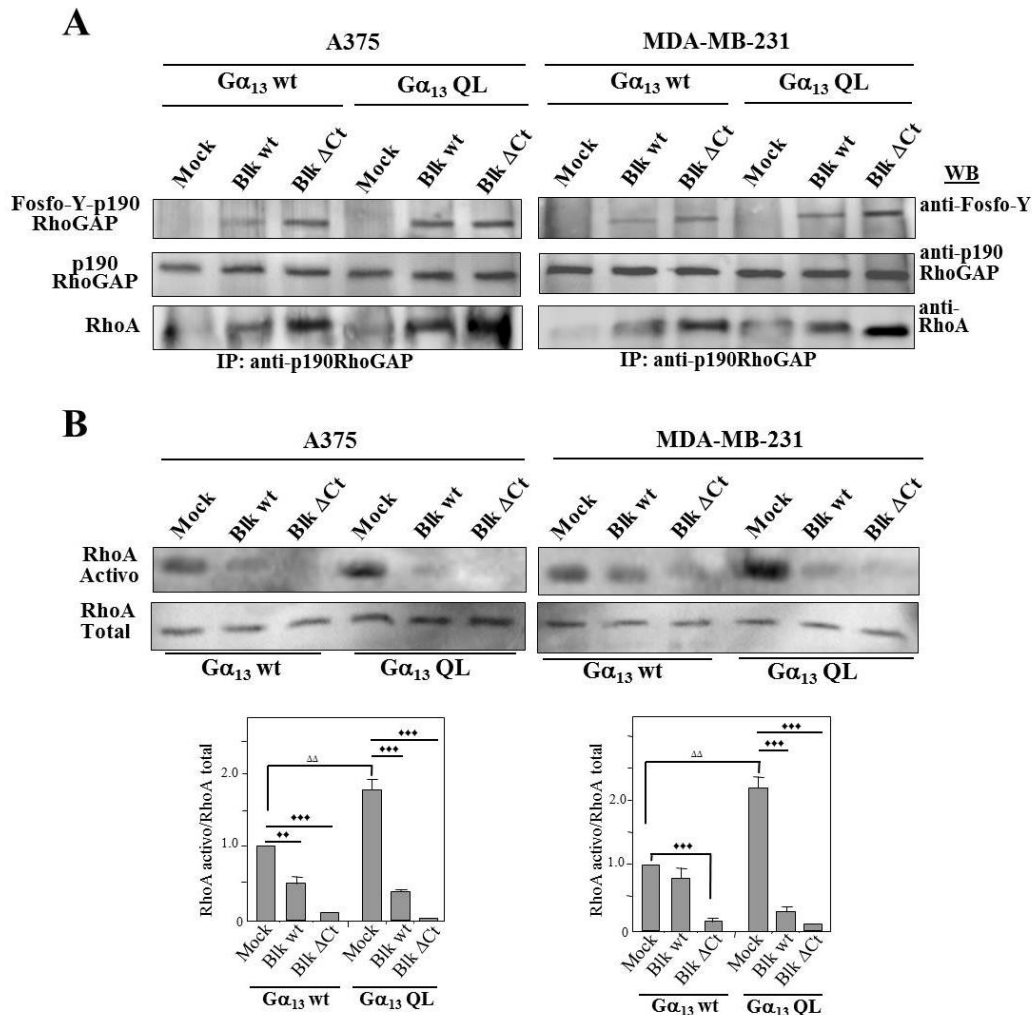
Debido a las mejores eficiencias de transfección obtenidas con las células A375 en comparación con Mel 57 (datos no mostrados), se decidió utilizar las primeras como representante de una línea celular con baja expresión de Blk. Por su parte, la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 se empleó por ser deficiente en Blk (ver figuras 13A y 14A). Las células A375 y MDA-MB-231 fueron co-transfectadas transitoriamente con vectores para sobre-expresar  $G\alpha_{13}$ wt o  $G\alpha_{13}$ QL junto con vectores que codifican para las formas Blk wt o Blk  $\Delta$ Ct (Figura 27).



**Figura 27. Expresión ectópica de Blk en células A375 y MDA-MB-231.** Las células A375 y MDA-MB-231 fueron transitoriamente transfectadas con las diferentes construcciones de Blk seguido de *western blotting* con los anticuerpos indicados.

El análisis de los transfectantes permitió observar que la fosforilación de p190RhoGAP, la cual es indetectable en las células co-transfectadas con  $G\alpha_{13}$  wt o  $G\alpha_{13}$  QL junto con el vector control (*mock*), aumentó en respuesta a la expresión de Blk wt y Blk  $\Delta$ Ct (Figura 28A). En línea con este resultado, se observó que la asociación de RhoA a p190RhoGAP fue inducida por la expresión ectópica de Blk. Asimismo, se determinó el estado de activación de RhoA en estos transfectantes, detectándose que tanto en las células A375 como en las MDA-MB-231, la expresión de Blk causó una disminución de la activación de RhoA en comparación con los transfectantes control (*mock*). Dicha disminución resultó ser todavía más acusada cuando se sobre-expresaba la forma Blk  $\Delta$ Ct (Figura 28B). Confirmando resultados anteriores (Kelly *et al.*, 2006a), la expresión de

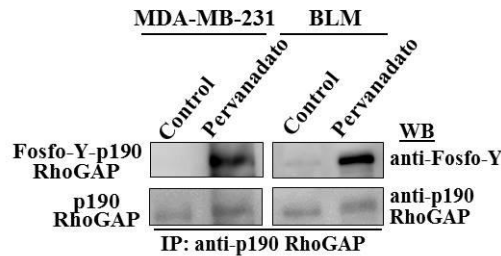
$G\alpha_{13}$ QL en las células MDA-MB-231 produjo un incremento en la activación de RhoA en comparación con la forma  $G\alpha_{13}$ wt. En contra de lo que ocurre en las células BLM, pudimos comprobar asimismo un aumento en la activación de RhoA en las células A375 que expresaban  $G\alpha_{13}$ QL (**Figura 28B**). Estos resultados confirman la implicación de Blk en la fosforilación de p190RhoGAP, lo que se traduce en posterior inactivación de RhoA.



**Figura 28.** La transfección de Blk en células con baja expresión o ausencia de expresión de Blk promueve la fosforilación de p190RhoGAP y la disminución de la activación de RhoA. Los transfectantes que se muestran en la **Figura 27** fueron sometidos a inmunoprecipitación seguido de *western blotting* con los anticuerpos indicados (n=3) (A), o analizados en ensayos de actividad GTPasa para RhoA (B). La activación de RhoA estuvo significativamente aumentada en relación con las células  $G\alpha_{13}$  wt-mock ( $\Delta\Delta p < 0.01$ ), o disminuida en comparación con  $G\alpha_{13}$  wt- o  $G\alpha_{13}$  QL-mock ( $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ; n=3).

Dado que las células MDA-MB-231 expresan otros miembros de las Src quinasas como c-Src, Fyn, Yes, Fgr, Lyn, Lck y Hck, y aun así no es posible detectar la fosforilación de p190RhoGAP, incubamos estas células con pervanadato de sodio, un inhibidor irreversible de tirosina fosfatasas. Tras incubar las células MDA-MB-231 y las BLM con este inhibidor, se inmunoprecipitó p190RhoGAP seguido de *immunoblotting* con

anticuerpos anti-fosfotirosina para analizar su estado de fosforilación. Los resultados indicaron que el tratamiento con pervanadato se traduce en fosforilación de p190RhoGAP en las células MDA-MB-231, además de aumentar los niveles de fosforilación basales de esta GAP BLM (**Figura 29**). Estos resultados sugieren que la ausencia de fosforilación de p190RhoGAP en las células MDA-MB-231 podría en parte estar basada en una alta actividad de tirosina fosfatasas en estas células.

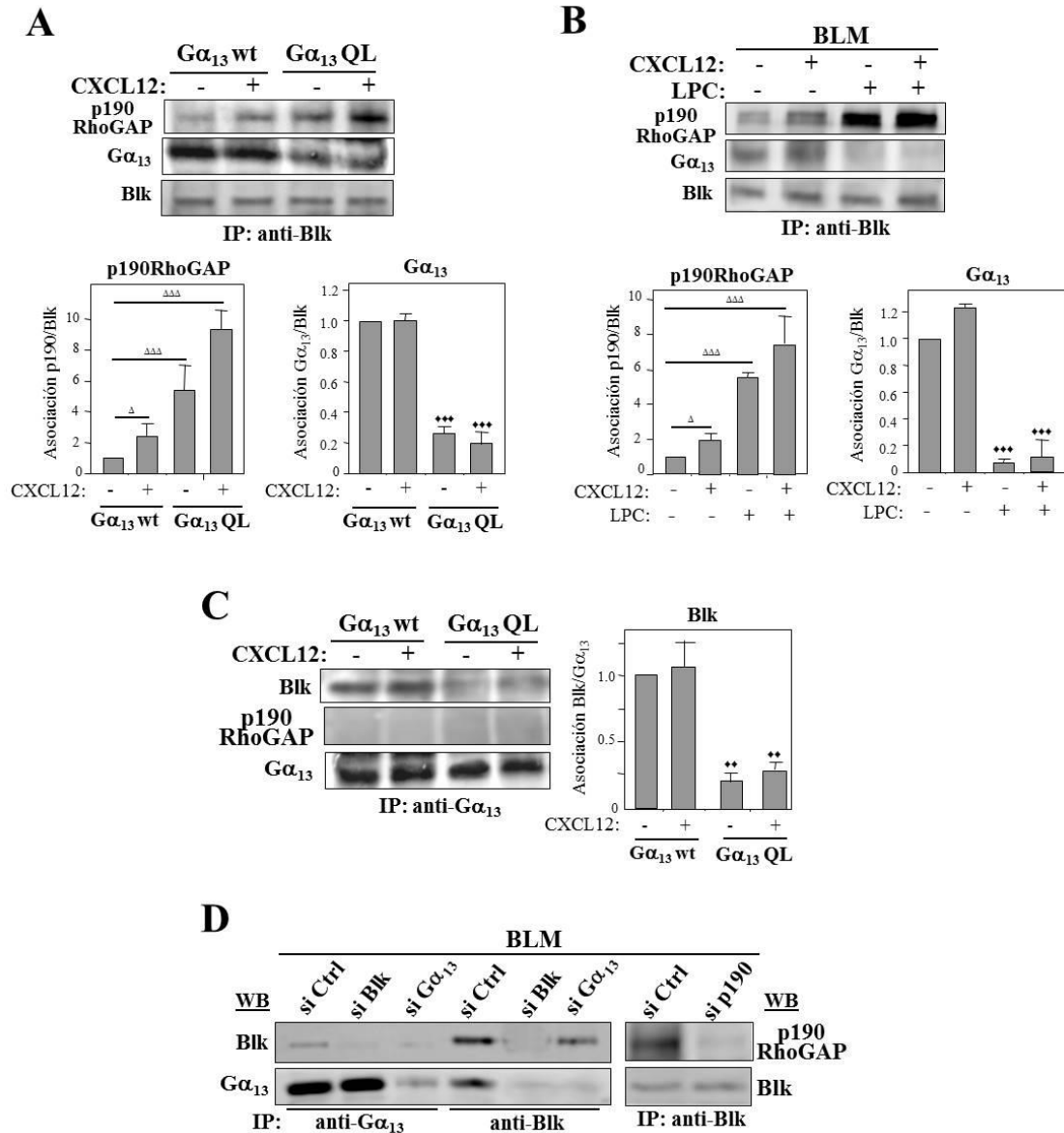


**Figura 29. El tratamiento con pervanadato de sodio aumenta la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP.** Las células MDA-MB-231 y BLM fueron incubadas con pervanadato de sodio y la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP determinada mediante inmunoprecipitación y *western blotting* (n=2).

### La activación de $G\alpha_{13}$ promueve la disociación del complejo $G\alpha_{13}$ -Blk y favorece la posterior asociación de Blk con p190RhoGAP

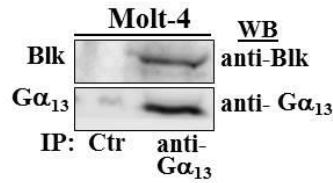
Con el objetivo de analizar posibles asociaciones de las proteínas implicadas en la vía  $G\alpha_{13}$ -Blk-p190RhoGAP tras la activación de  $G\alpha_{13}$ , se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando células que expresan  $G\alpha_{13}$  constitutivamente activo, o bien activando  $G\alpha_{13}$  con LPC. Utilizando anticuerpos anti-Blk, estos análisis mostraron la co-precipitación de p190RhoGAP con Blk en células  $G\alpha_{13}$  wt, y revelaron que dicha asociación aumenta cinco veces en las células  $G\alpha_{13}$  QL (**Figura 30A**). De modo similar, LPC y en menor grado CXCL12 incrementaron la asociación Blk-p190RhoGAP en comparación con células no tratadas (**Figura 30B**). Adicionalmente, la incubación con CXCL12 tuvo un efecto sinérgico con la activación de  $G\alpha_{13}$ , incrementando todavía más la formación del complejo Blk-p190RhoGAP.

Notablemente, los anticuerpos anti-Blk co-precipitaron asimismo  $G\alpha_{13}$  en células  $G\alpha_{13}$  wt y en células BLM parentales, mientras que el grado de la formación del complejo  $G\alpha_{13}$ -Blk disminuyó en los transfectantes  $G\alpha_{13}$ QL (**Figura 30A**). La reducción en la asociación  $G\alpha_{13}$ -Blk en las células  $G\alpha_{13}$ QL no fue debido a inhibición de la unión a causa de la mutación en  $G\alpha_{13}$ , dado que las células BLM incubadas con LPC mostraron asimismo un menor ensamblaje entre  $G\alpha_{13}$  y Blk que las células no tratadas. En apoyo de estos resultados, Blk pero no p190RhoGAP fue detectado en inmunoprecipitados de  $G\alpha_{13}$ , y el nivel de la asociación  $G\alpha_{13}$ -Blk fue nuevamente menor en los transfectantes  $G\alpha_{13}$ QL que en los  $G\alpha_{13}$  wt (**Figura 30C**). La especificidad de las asociaciones detectadas mediante co-inmunoprecipitación fue validada mediante ensayos con siRNA para Blk,  $G\alpha_{13}$  y p190RhoGAP (**Figura 30D**).



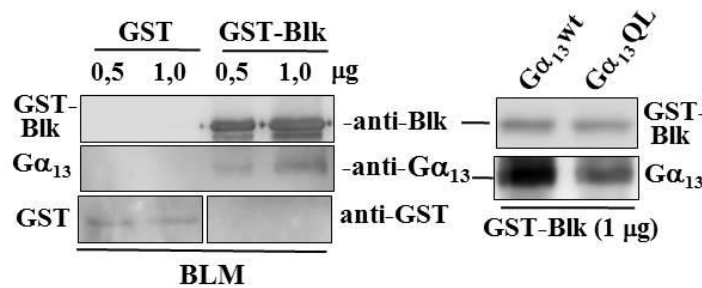
**Figura 30. La activación de  $G\alpha_{13}$  regula las asociaciones  $G\alpha_{13}$ -Blk y Blk-p190RhoGAP.** (A-C) Los transfectantes  $G\alpha_{13}$  wt y  $G\alpha_{13}$  QL o las células BLM fueron incubados en ausencia o presencia de los estímulos indicados, y posteriormente sometidos a ensayos de inmunoprecipitación e *immunoblotting* con los anticuerpos especificados. Se muestran asimismo las cuantificaciones densitométricas de los geles (n=4). La asociación estaba significativamente aumentada ( $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ ,  $\Delta p < 0.05$ ) o reducida ( $*** p < 0.001$ ,  $** p < 0.01$ ). (D) Las células BLM fueron transfectadas con los siRNAs indicados e incubadas en ausencia (izquierda) o presencia de CXCL12 y LPC (derecha), y posterior inmunoprecipitación y *western blotting* con los anticuerpos indicados.

Significativamente, el complejo Blk- $G\alpha_{13}$  no fue sólo detectado en las células de melanoma BLM, sino que los anticuerpos anti- $G\alpha_{13}$  co-precipitaron asimismo Blk en células T Molt-4 (Figura 31), sugiriendo que dicha asociación podría representar una interacción molecular más extendida.



**Figura 31. Asociación  $G\alpha_{13}$ -Blk en células T Molt-4.** La línea celular Molt-4 fue sometida a ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti- $G\alpha_{13}$  o control, seguido de *western blotting* con los anticuerpos indicados (n=2).

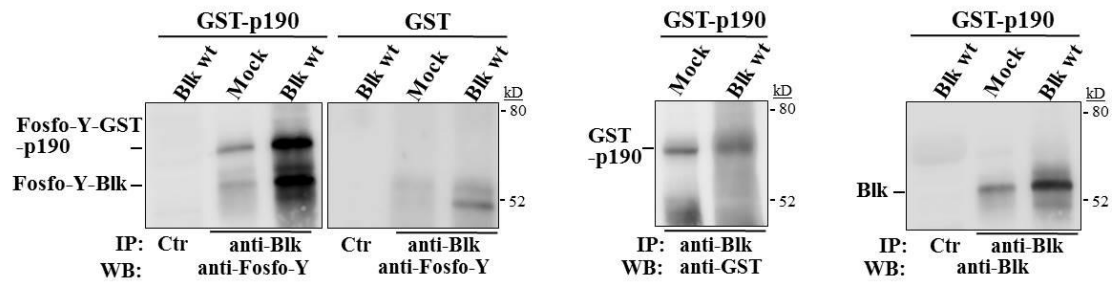
La asociación entre  $G\alpha_{13}$  y Blk en células BLM se confirmó en ensayos de *pull down* utilizando la proteína recombinante GST-Blk wt, y fue asimismo detectada en los transfectantes  $G\alpha_{13}$  wt y, en menor grado, en las células  $G\alpha_{13}$  QL (**Figura 32**). Estos resultados sugieren la existencia de dos complejos moleculares. Por una parte  $G\alpha_{13}$ -Blk y por otra Blk-p190RhoGAP-RhoA, siendo Blk la molécula encargada de transmitir las señales entre ambos módulos. En un estado basal de  $G\alpha_{13}$ , Blk estaría asociado a  $G\alpha_{13}$ , y tras la activación de  $G\alpha_{13}$ , dicha unión disminuiría, lo que favorecería el posterior aumento de la formación del complejo Blk-p190RhoGAP.



**Figura 32. Asociación de la proteína recombinante GST-Blk wt con  $G\alpha_{13}$ .** Los lisados celulares de las células BLM (izquierda) o de los transfectantes  $G\alpha_{13}$  wt y  $G\alpha_{13}$  QL (derecha) fueron incubados con las cantidades mostradas de GST o GST-Blk wt, seguido de *western blotting* con los anticuerpos indicados (n=2).

### Blk muestra actividad quinasa *in vitro* hacia GST-p190RhoGAP

La actividad tirosina quinasa de Blk sobre p190RhoGAP se analizó en ensayos quinasa *in vitro* con inmunoprecipitados de Blk de las células BLM transfectadas establemente con Blk wt o un vector vacío (*mock*), utilizando la proteína recombinante GST-p190RhoGAP como aceptor. Dicha proteína recombinante contiene los residuos 953-1208 de p190RhoGAP, por lo que incluye la tirosina Y1105, cuya fosforilación es responsable de promover la actividad GAP sobre RhoA (Haskell *et al.*, 2001; Roof *et al.*, 1998). Los resultados mostraron una débil fosforilación en tirosina de GST-p190RhoGAP en las células *mock*, la cual aumentó notablemente cuando se utilizaron células Blk wt. Se observó asimismo la fosforilación de una proteína que migra a la misma altura que la Blk inmunoprecipitada, especialmente en las células Blk wt, la cual podría corresponder a la autofosforilación de Blk en la “tirosina activadora” (**Figura 33**).



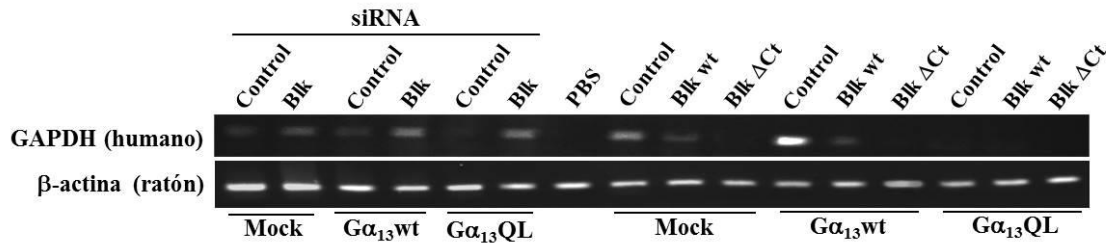
**Figura 33. Blk posee actividad quinasa *in vitro* hacia GST-p190RhoGAP.** Los transfectantes *mock* y Blk wt fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-Blk o control y sometidos a ensayos quinasa *in vitro* usando GST o la proteína recombinante GST-p190RhoGAP como aceptor, seguido de *immunoblotting* con los anticuerpos indicados (n=4).

### Blk regula la migración y diseminación pulmonar de células de melanoma

Puesto que Blk controla la invasión celular *in vitro* a través de su regulación sobre la activación de RhoA, decidimos analizar su papel en la migración *in vivo* de células de melanoma a pulmón. Para ello, los transfectantes estables  $G\alpha_{13}$ wt,  $G\alpha_{13}$  QL y *mock* en células BLM fueron transfectados transitoriamente con siRNA Blk o control. Posteriormente, estas células junto con los dobles transfectantes estables  $G\alpha_{13}$ -Blk fueron inoculadas intravenosamente en ratones SCID, y tras 24 horas, los pulmones fueron disgregados y sometidos a RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para GAPDH humano, con el objetivo de detectar la llegada de células humanas a pulmón. Asimismo, se utilizaron oligonucleótidos para  $\beta$ -actina de ratón como control de expresión de un marcador de ratón. Adicionalmente, se usaron ratones inoculados sólo con PBS como control negativo, en los cuales no se detectó amplificación del gen humano (Figura 34). En el caso de los ratones inoculados con células transfectadas con siRNAs, se observó amplificación de GAPDH, indicativo de la presencia de las células de melanoma humano en pulmón, en todos los casos excepto en aquellos ratones inyectados con las células  $G\alpha_{13}$  QL/siRNA control. Estos resultados de migración *in vivo* concuerdan con los obtenidos en las invasiones *in vitro* a través de matrigel, en los que también se observó una invasión disminuida en células  $G\alpha_{13}$  QL/siRNA control (ver Figura 19B). Por otra parte, el silenciamiento de Blk rescató la inhibición de la invasión debido a la actividad de  $G\alpha_{13}$  QL, tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 34). Además, observamos un ligero aumento de la amplificación de GAPDH humano en los pulmones de los ratones inoculados con las células  $G\alpha_{13}$ wt y *mock* transfectadas con el siRNA de Blk, respecto de dichas células transfectadas con siRNA control.

Los ensayos de RT-PCR utilizando las muestras pulmonares de los ratones inoculados con los transfectantes estables *mock*,  $G\alpha_{13}$  wt y  $G\alpha_{13}$  QL que sobre-expresaban Blk wt o Blk  $\Delta$ Ct mostraron que la expresión de la forma activa de Blk se traducía en ausencia de amplificación de GAPDH (Figura 34). Este resultado correlaciona igualmente con el bloqueo de la invasión *in vitro* de los transfectantes que expresan Blk  $\Delta$ Ct. Del

mismo modo, en los transfectantes con  $G\alpha_{13}$  activo no hubo amplificación de GAPDH humano en pulmón, y cuando Blk wt era sobre-expresado se detectó una menor amplificación de GAPDH humano comparado con las células control. Estos resultados indican que la actividad de Blk dificulta la llegada temprana de células de melanoma a pulmón, mientras que su silenciamiento favorece la diseminación tumoral al pulmón.

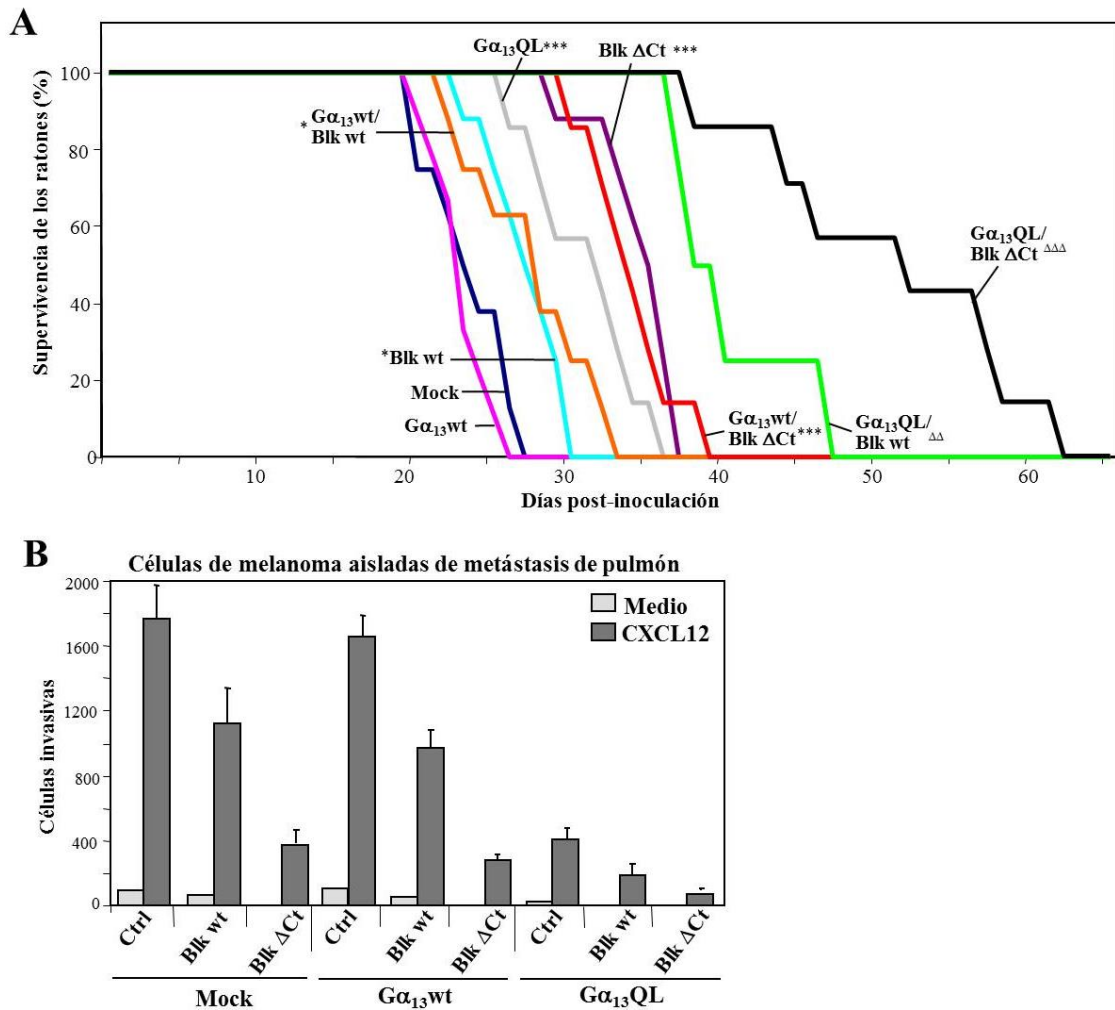


**Figura 34. Papel de Blk en la migración *in vivo* de células de melanoma a pulmón.** Ratones SCID fueron inoculados en la vena de la cola bien con los transfectantes estables  $G\alpha_{13}$  wt,  $G\alpha_{13}$  QL o *mock*, que habían sido transitoriamente transfectados con siRNA Blk o control, o bien con los dobles transfectantes estables Blk/ $G\alpha_{13}$ , utilizándose como control ratones inoculados sólo con PBS. A las 24 horas, los pulmones fueron disgregados y analizados mediante RT-PCR usando oligonucleótidos para GAPDH humano o  $\beta$ -actina murino.

A continuación se determinó la supervivencia de los ratones SCID inoculados intravenosamente con los transfectantes estables *mock*, Blk wt, Blk  $\Delta$ Ct,  $G\alpha_{13}$  wt,  $G\alpha_{13}$  QL y los dobles transfectantes  $G\alpha_{13}$ wt/Blk wt,  $G\alpha_{13}$  wt/Blk  $\Delta$ Ct,  $G\alpha_{13}$  QL/ Blk wt y  $G\alpha_{13}$  QL/Blk  $\Delta$ Ct (**Figura 35A**). Los resultados mostraron que aquellos ratones inoculados con células *mock* o  $G\alpha_{13}$ wt tuvieron menor supervivencia que cualquier otra condición. Por el contrario, la sobre-expresión de Blk wt y más aún de Blk  $\Delta$ Ct resultó en mayor supervivencia de los ratones en comparación con la inoculación de células *mock*. Cuando  $G\alpha_{13}$  wt se combinó con Blk wt se observó asimismo un incremento de la supervivencia, siendo ésta mayor todavía cuando Blk  $\Delta$ Ct era sobre-expresada. Confirmando nuestros resultados previos (Bartolome *et al.*, 2008), los ratones inoculados con las células  $G\alpha_{13}$  QL mostraron mayor supervivencia que aquellos inoculados con las células  $G\alpha_{13}$  wt o *mock*. Por último, los ratones inoculados con células  $G\alpha_{13}$  QL y que sobre-expresaban Blk wt o Blk  $\Delta$ Ct mostraron las mayores tasas de supervivencia, especialmente aquellos inoculados con células  $G\alpha_{13}$  QL/Blk  $\Delta$ Ct.

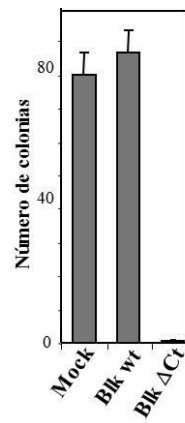
Para relacionar la supervivencia de los ratones con la capacidad invasiva de las células tumorales presentes en las metástasis, los lóbulos de los pulmones que contenían estas metástasis fueron disgregados y procesados para extraer las células de melanoma. Estas fueron cultivadas y analizadas en ensayos de invasión *in vitro* a través de matrigel. En línea con los resultados de los ensayos de invasión *in vitro*, se observó que las células que sobre-expresaban Blk, especialmente Blk  $\Delta$ Ct mostraban una disminución de su invasión hacia CXCL12, la cual además se bloqueaba en presencia de  $G\alpha_{13}$  activo (**Figura 35B**). Consecuentemente, estos resultados indican que los patrones de invasión de los

transfectantes observados previamente *in vitro* se mantenían tras haber sido inoculados y haber formado metástasis en los ratones.



**Figura 35. Aumento de supervivencia en ratones SCID inoculados con células de melanoma que sobre-expresan Blk.** (A) Curvas de supervivencia de ratones SCID inoculados intravenosamente con los transfectantes indicados. \*\*\*La supervivencia está significativamente aumentada en comparación con los ratones inoculados con los transfectantes *mock* o  $G\alpha_{13} wt$ ,  $p < 0.001$ , o  $*p < 0.05$ .  $\Delta\Delta\Delta$ La supervivencia está significativamente aumentada respecto de los ratones inoculados con los transfectantes  $G\alpha_{13} QL$ ,  $p < 0.001$ , o  $\Delta\Delta p < 0.01$ . Se muestra un resultado representativo de dos experimentos independientes usando 9-14 ratones por condición. (B) El tejido pulmonar que contenía las metástasis fue procesado para obtener células de melanoma, las cuales fueron cultivadas y posteriormente sometidas a ensayos de invasión hacia CXCL12.

Finalmente, los ensayos *in vitro* de formación de colonias en *soft agar*, mostraron una incapacidad de las células  $Blk \Delta Ct$  de formar colonias en comparación con los transfectantes  $Blk wt$  o *mock* (Figura 36). Por tanto, los resultados indican que la expresión de  $Blk$  provoca un retraso en la migración de células de melanoma a pulmón, lo que podría contribuir, junto con la menor capacidad de crecimiento de las células que expresan  $Blk$  activado, a la mayor supervivencia observada en los ratones inoculados con células que sobre-expresaban  $Blk$ .



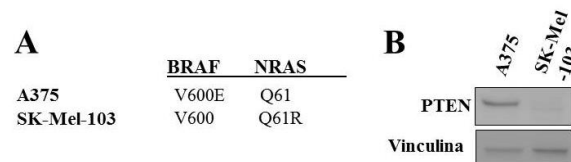
**Figura 36. La sobre-expresión de Blk  $\Delta$ Ct en células de melanoma inhibe el crecimiento celular.** Los transfectantes estables *mock*, Blk wt y Blk  $\Delta$ Ct de células BLM fueron testados en ensayos de formación de colonias en *soft agar*. Se muestra la media de la cuantificación del número de colonias (n=3).



## II. PAPEL DE miRNAs EN LA RESISTENCIA DE CÉLULAS DE MELANOMA A INHIBIDORES DE LA VÍA DE LAS MAP-QUINASAS

Sensibilidad de las células A375 y SK-Mel-103 a los inhibidores vemurafenib, trametinib y SCH772984

Como paso previo a la generación de las líneas celulares de melanoma resistentes a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas, las células parentales fueron caracterizadas para comprobar su sensibilidad a los distintos inhibidores. Puesto que vemurafenib es efectivo en células BRAF V600E (Bollag *et al.*, 2010; Flaherty *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010a), se secuenciaron las células A375 y las SK-Mel-103 para determinar si estas células poseen dicha mutación o son wt para BRAF. Además, debido a la importancia de NRAs en la señalización de la vía de las MAP-quinasas y en la respuesta a inhibidores de esta vía (Callahan *et al.*, 2012; Hatzivassiliou *et al.*, 2010; Heidorn *et al.*, 2010), se procedió asimismo a la secuenciación de una de las mutaciones más frecuentes de esta GTPasa, NRAS Q61. Los resultados confirmaron la mutación BRAF V600E en las células A375 (Nissan *et al.*, 2014), mientras que éstas expresaban NRAS wt. Asimismo, nuestros análisis confirmaron que las células SK-Mel-103 son portadoras de la mutación NRAS Q61R y son wt para BRAF (Figura 37A) (Nissan *et al.*, 2014). Por otra parte, debido a la frecuente pérdida de PTEN en melanoma (Goel *et al.*, 2006), se analizó su expresión mediante *western blot*, observándose la expresión de PTEN en las células A375 pero no en las células SK-Mel-103 (Figura 37B).

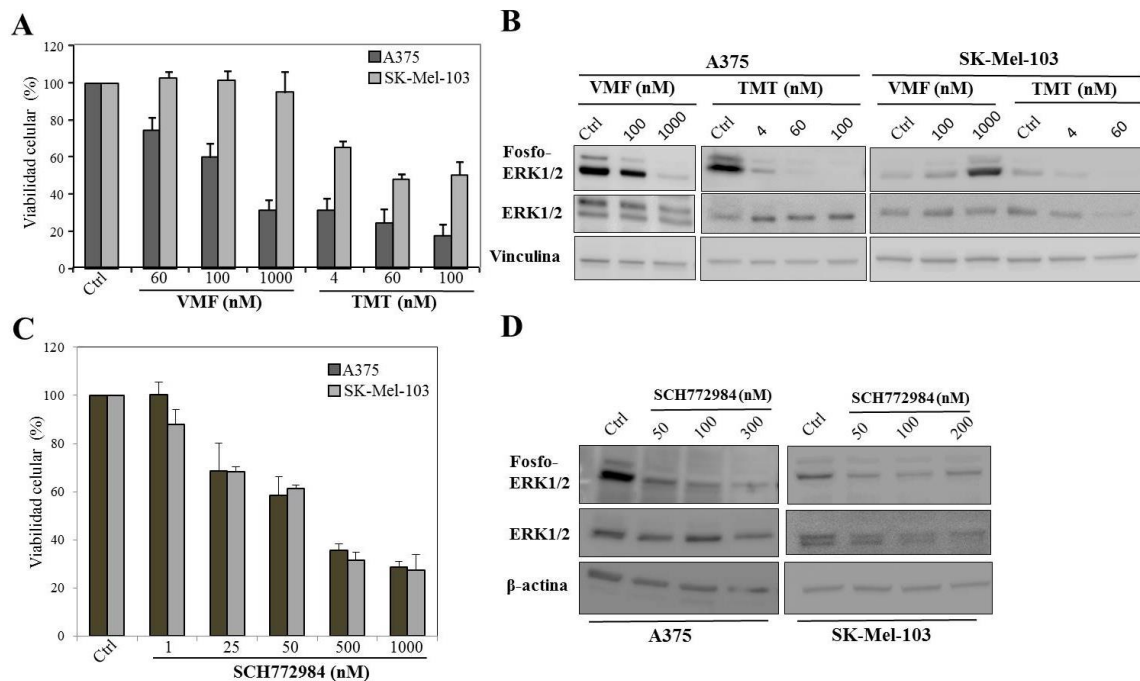


**Figura 37. Caracterización de las mutaciones en BRAF y NRAS, y de la expresión de PTEN en las líneas celulares A375 y SK-Mel-103.** (A) Resultado de la secuenciación de las mutaciones indicadas. (B) Análisis mediante *western blotting* de la expresión de PTEN. La vinculina fue empleada como control de carga.

La sensibilidad de las líneas celulares de melanoma a los inhibidores de la vía de las MAP-quinasas fue analizada mediante ensayos de viabilidad con MTT, exponiendo a las células a concentraciones crecientes de los distintos inhibidores. Los resultados indicaron que las células A375 son sensibles a vemurafenib (VMF), mientras que las células SK-Mel-103 son intrínsecamente resistentes a este inhibidor, incluso a concentraciones de 1  $\mu$ M (Figura 38A). Esto último sería debido, probablemente, a que las células SK-Mel-103 expresan BRAF wt por lo que son insensibles a vemurafenib. Asimismo, dicha resistencia podría explicarse por la activación paradójica de la vía de las MAP-quinasas en células BRAF *wild type* tratadas con VMF, lo cual había sido previamente descrito (Hatzivassiliou *et al.*, 2010). Esto podía ocurrir por la transactivación de los homodímeros de BRAF o de los heterodímeros BRAF-CRAF, estos últimos capaces de activar potentemente la

señalización posterior (Hatzivassiliou *et al.*, 2010; Heidorn *et al.*, 2010; Poulikakos *et al.*, 2010). De acuerdo con esto, cuando se analizó la activación de las MAP-quinasas tras el tratamiento con diferentes concentraciones de VMF, se observó una disminución de la fosforilación de ERK1/2 en las células A375, mientras que el tratamiento con concentraciones crecientes de VMF en la línea SK-Mel-103 causó un incremento de la fosforilación de ERK1/2 (**Figura 38B**).

Por otra parte, las células A375 y en menor grado las SK-Mel-103 eran sensibles al inhibidor de MEK1/2, trametinib (TMT) (**Figura 38A**). En ambas líneas celulares se produjo una disminución de la fosforilación de ERK1/2 tras la exposición a concentraciones crecientes de trametinib (**Figura 38B**). Asimismo, dichas células son sensibles al inhibidor de ERK1/2 (SCH772984) en ensayos de viabilidad (**Figura 38C**), y muestran una disminución de la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a concentraciones crecientes de este agente (**Figura 38D**).

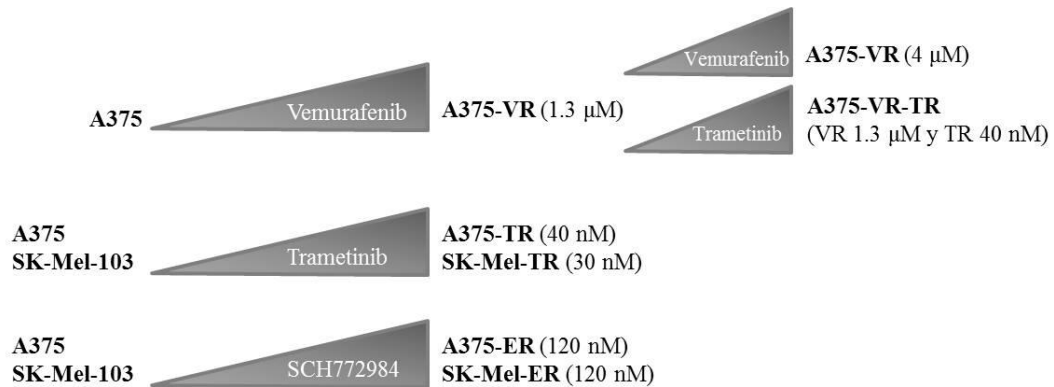


**Figura 38. Respuesta de las células A375 y SK-Mel-103 a inhibidores de la vía MAP-quinasas.** (A) Las células indicadas fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (Ctrl) o en presencia de las concentraciones mostradas de vemurafenib y trametinib, y su viabilidad analizada en ensayos de MTT (n=3). (B) Las células fueron tratadas con los inhibidores indicados durante 48 horas, seguido de *immunoblotting*. (C, D) Las células de melanoma fueron incubadas durante 48 horas con las concentraciones mostradas de SCH772984, y analizadas en ensayos de viabilidad (n=3) (C), o por *western blotting* (D).

### Generación de líneas celulares de melanoma resistentes a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas

Para la generación de las líneas celulares resistentes se expuso a las células parentales a concentraciones crecientes de los inhibidores, como se ha indicado en la sección Métodos. A partir de las células A375 y SK-Mel-103 se obtuvieron las células

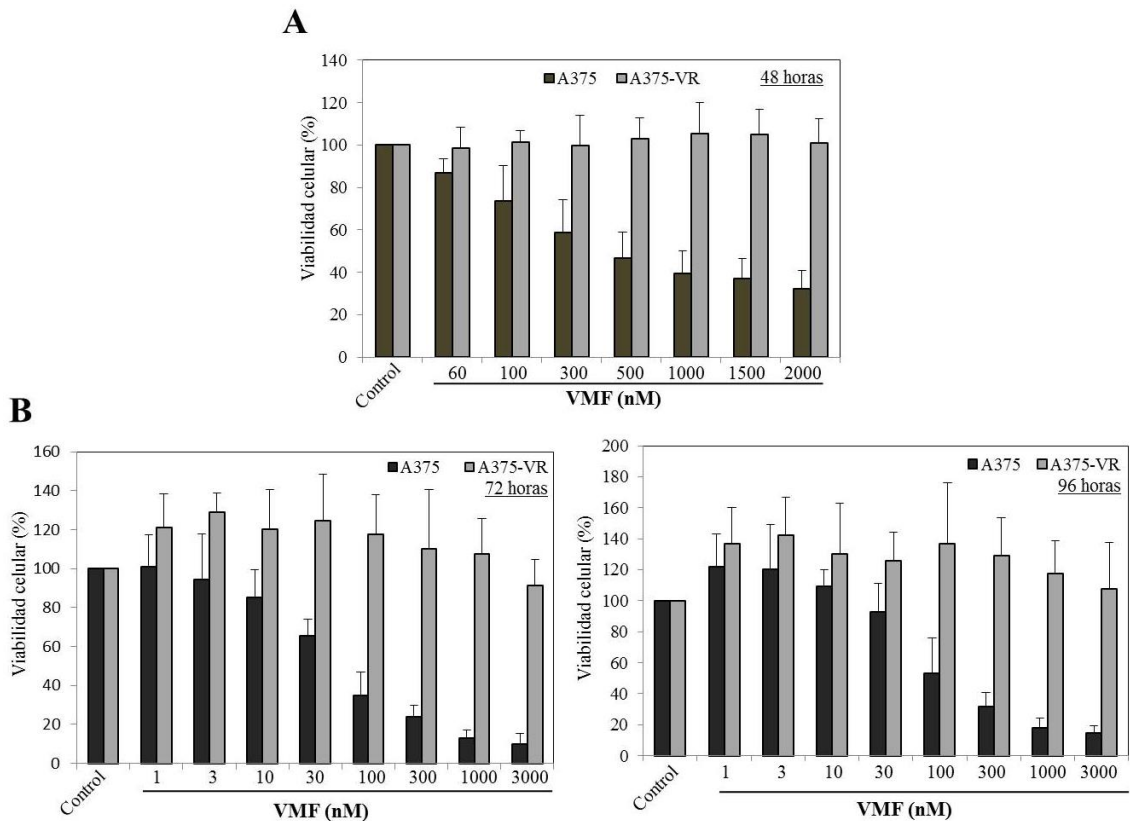
resistentes A375-VR, A375-TR, A375-ER, SK-Mel-103-TR y SK-Mel-103-ER (**Figura 39**). Además, las células A375-VR (resistentes a 1.3  $\mu\text{M}$ ) se expusieron a concentraciones mayores de VMF hasta conseguir las células resistentes A375-VR-4  $\mu\text{M}$ . Puesto que una de las primeras líneas de terapia en clínica contra el melanoma es el uso combinado de inhibidores de BRAF y trametinib (Eroglu y Ribas, 2016; Girotti *et al.*, 2014; Menzies y Long, 2014a) se generó una línea doble resistente a VMF y TMT a partir de las células A375-VR (**Figura 39**).



**Figura 39. Generación de líneas celulares de melanoma resistentes a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas.** Esquema en el que se muestran las líneas celulares de melanoma resistentes a la concentración de los inhibidores indicada.

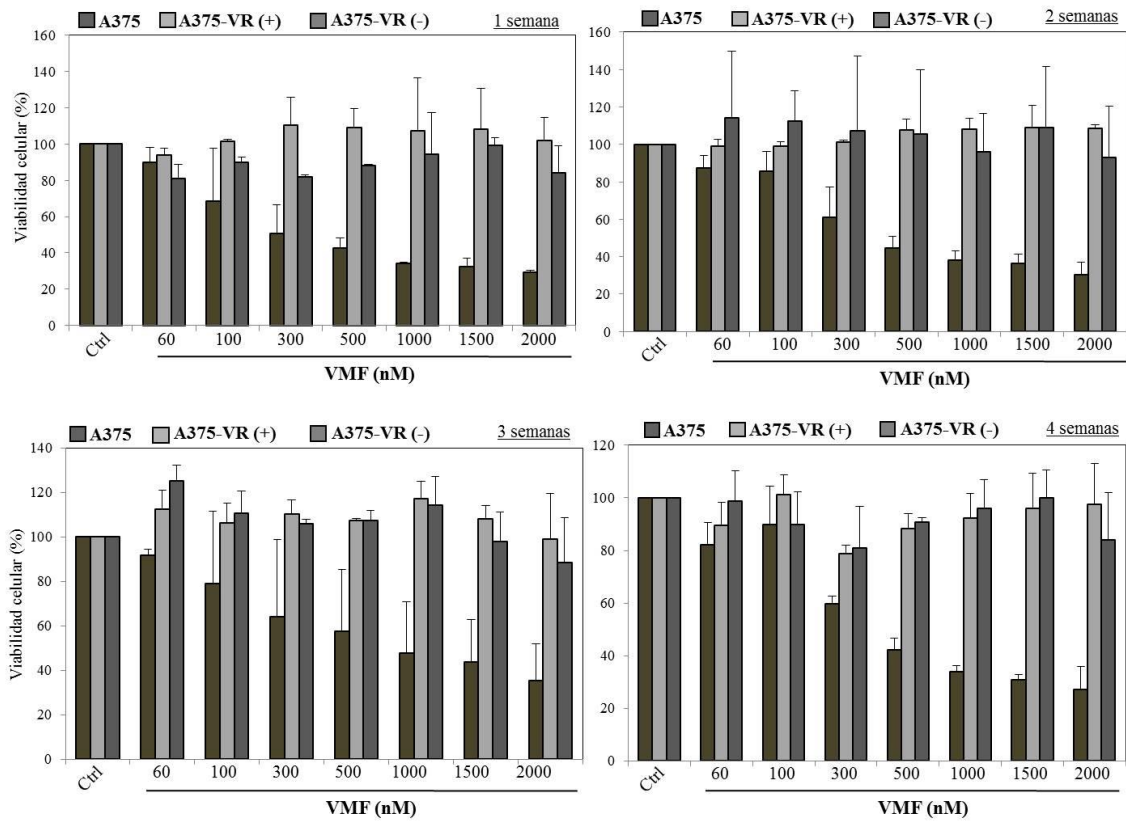
#### Caracterización de líneas celulares de melanoma resistentes a vemurafenib

Los ensayos de viabilidad a 48-96 horas de las células A375-VR mostraron su resistencia a vemurafenib, incluso a concentraciones de 3  $\mu\text{M}$  (**Figura 40A, B**).



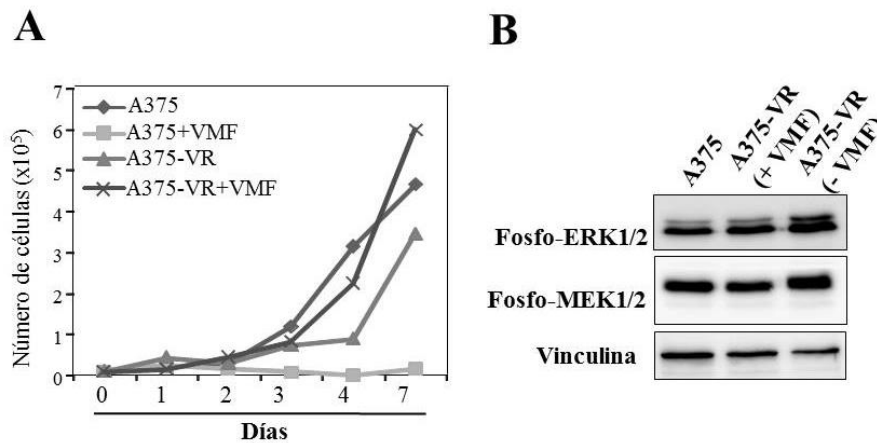
**Figura 40. Caracterización de la viabilidad de las células A375-VR en presencia de vemurafenib.** (A) Las células A375 y A375-VR fueron tratadas durante 48 horas con diferentes concentraciones de VMF y su viabilidad comprobada en ensayos de MTT (n=4). (B) Las líneas celulares indicadas fueron tratadas con VMF durante 72 o 96 horas y testadas en ensayos de viabilidad con el reactivo CellTiter-GloLuminescent (n=2).

Para determinar si la resistencia a VMF era un proceso estable o dependía de la presencia del inhibidor, las células A375-VR fueron mantenidas durante 1, 2, 3 o 4 semanas en ausencia de VMF, y tras cada semana se expuso a las células durante 48 horas a diferentes concentraciones de VMF para testar su viabilidad. Dichos experimentos mostraron que las células continuaban siendo resistentes incluso a 2  $\mu$ M de VMF tras cuatro semanas sin el inhibidor (A375-VR (-)), sin mostrar diferencias significativas en términos de resistencia con las células que habían sido mantenidas siempre en presencia del inhibidor (A375-VR (+)) (Figura 41).



**Figura 41. Estabilidad de la resistencia a vemurafenib de las células A375-VR.** Las células A375-VR fueron mantenidas con (+) o sin (-) VMF (1.3  $\mu$ M) durante 1, 2, 3 o 4 semanas, tras lo cual fueron expuestas durante 48 horas a las concentraciones indicadas de VMF, y testadas posteriormente en ensayos de viabilidad (n=2).

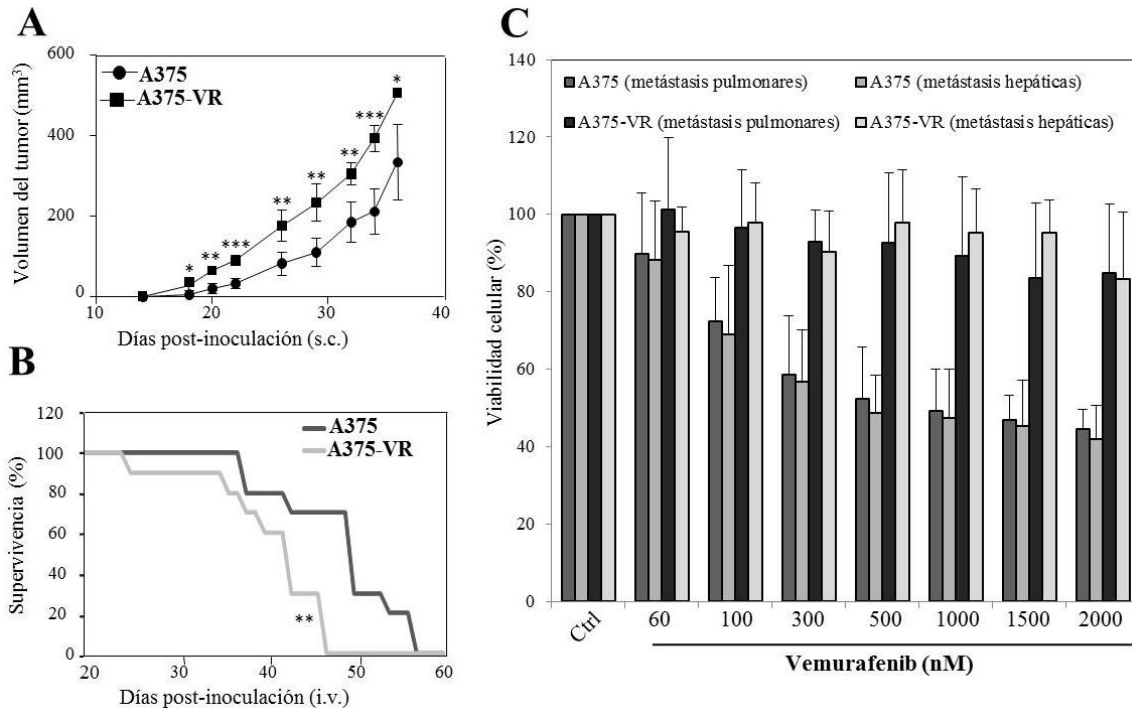
Sin embargo, experimentos de proliferación a 7 días mostraron que las células A375-VR presentan cierta adicción al inhibidor, puesto que mientras que tanto las células A375 parentales como las A375-VR mantenidas con VMF tenían tasas de proliferación similares, las células A375-VR cultivadas sin VMF mostraron una proliferación disminuida (**Figura 42A**). Sin embargo, la respuesta de adicción a VMF parece perderse a tiempos más largos, puesto que en el análisis mediante *western blot* de células A375-VR mantenidas 4 semanas sin el inhibidor se observó un aumento de fosforilación de ERK1/2 con respecto a las células A375 o A375-VR mantenidas con el inhibidor (**Figura 42B**).



**Figura 42. Análisis de la capacidad proliferativa de las células A375 y A375-VR en ausencia o presencia de vemurafenib.** (A) Las células fueron mantenidas durante los tiempos indicados en ausencia o presencia de 1.3  $\mu\text{M}$  de vemurafenib (+VMF), y posteriormente analizadas en ensayos de proliferación celular utilizando el colorante vital azul de tripán. Se muestra un experimento representativo de dos independientes. (B) Las células A375 y A375-VR fueron cultivadas durante 4 semanas en ausencia o presencia de vemurafenib (1.3  $\mu\text{M}$ ), seguido de *western blotting*.

#### Análisis *in vivo* de formación de tumores de las células de melanoma resistentes a vemurafenib

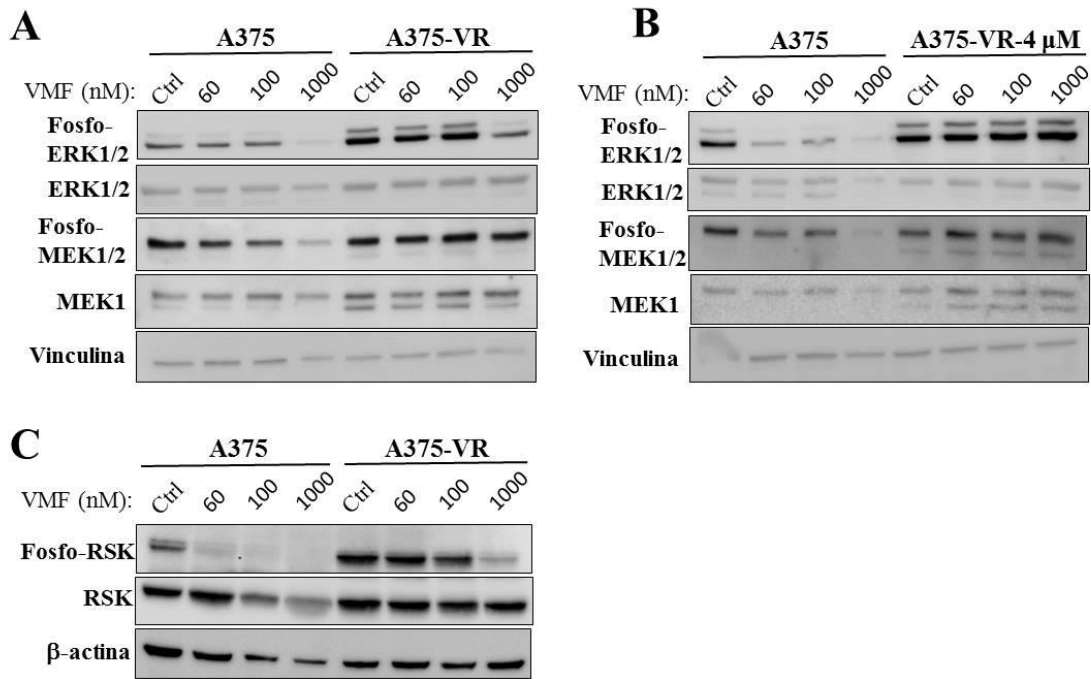
Los ensayos *in vivo* de formación de tumores en ratones inmunodeficientes NSG inoculados subcutáneamente con células A375 y A375-VR revelaron que los tumores producidos por las células resistentes aparecían antes y crecían más rápido que los producidos por las células parentales (**Figura 43A**). Los análisis de los órganos mediante necropsia no mostraron presencia de metástasis generadas por las células A375 y A375-VR (datos no mostrados). Adicionalmente, se inocularon ambos tipos celulares en la vena de la cola de ratones NSG, observándose que aquellos ratones inoculados con las células resistentes presentaban menor supervivencia que los que habían recibido las células A375 (**Figura 43B**). En este ensayo se observaron metástasis en todos los ratones, principalmente en pulmón e hígado (datos no mostrados). A continuación, se extrajeron los tumores de estas metástasis, los cuales fueron cultivados y las células sometidas a ensayos de viabilidad en presencia de vemurafenib. Los resultados mostraron que las células procedentes de las metástasis generadas por las células A375-VR continuaban siendo resistentes a VMF, mientras que las células parentales eran sensibles (**Figura 43C**).



**Figura 43. Análisis *in vivo* de la formación de tumores y supervivencia en ratones inoculados con células A375 o A375-VR.** (A) Las células fueron inoculadas subcutáneamente en ratones NSG y el tamaño de los tumores medido cada 2 días. Se usaron 9 ratones por condición (n=2). \*\*\*El volumen tumoral fue significativamente mayor en comparación con los formados por las células A375,  $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.05$ , \* $p < 0.05$ . (B) Supervivencia de ratones NSG tras inoculación intravenosa de células A375 y A375-VR. Se utilizaron 10 ratones por condición, \*\*  $p < 0.01$ . (C) Las células de melanoma fueron aisladas de metástasis pulmonares y hepáticas, y cultivadas para su posterior análisis en ensayos de viabilidad tras tratamiento durante 48 horas con las concentraciones indicadas de VMF. Se muestra la media de 6-7 ratones y la desviación estándar.

### Caracterización de las vías de señalización Ras-RAF-MEK-ERK y PI3-quinasa/AKT en las células de melanoma resistentes a vemurafenib

El análisis por *western blot* del grado de activación de proteínas de la vía de las MAP-quinasas en respuesta al tratamiento con concentraciones crecientes de VMF reveló que las células A375-VR presentaban una fosforilación sostenida tanto de ERK1/2 como de MEK1/2, y que continuó siendo detectable en presencia de 1  $\mu\text{M}$  del inhibidor (**Figura 44A**). Por el contrario, y tal y como se describe en la **Figura 38B**, en las células parentales se produce una disminución de la fosforilación de ambas quinasas a medida que aumenta la dosis de VMF. Además, la fosforilación basal de ERK1/2 es mayor en las células A375-VR que en las parentales. Igualmente, las células A375-VR-4  $\mu\text{M}$  mostraron una fosforilación sostenida de ERK1/2 y MEK1/2 en presencia del inhibidor en comparación con las células parentales (**Figura 44B**). Asimismo, el análisis de la fosforilación de una diana de ERK1/2, la quinasa p90RSK, demostró el mantenimiento de dicha fosforilación en células A375-VR en presencia de VMF, respecto de las células parentales (**Figura 44C**).

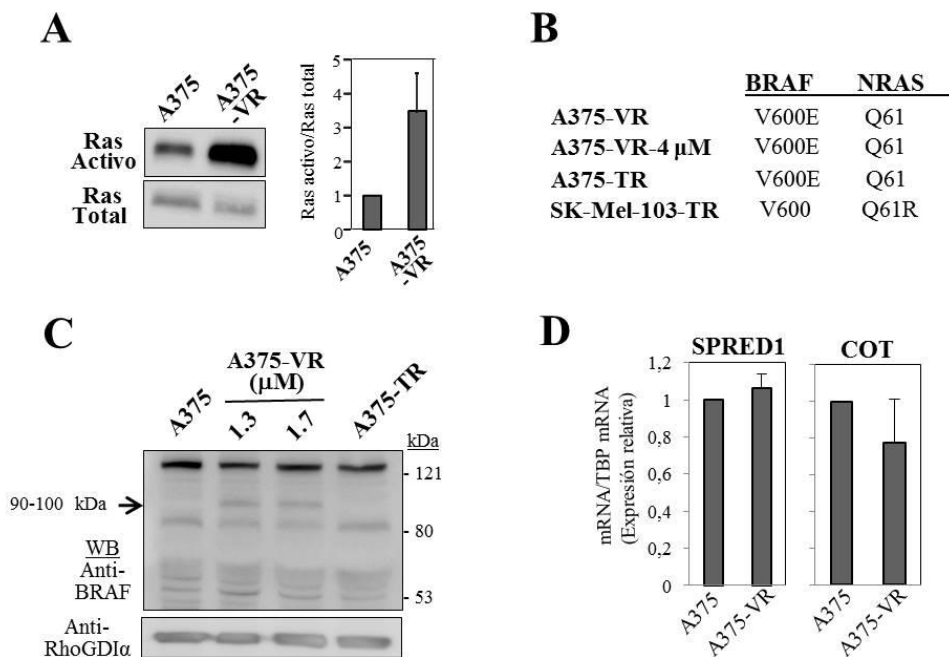


**Figura 44.** Las células resistentes a vemurafenib muestran un aumento de la activación de componentes de la vía de las MAP-quinasas. (A, B, C) Las células fueron tratadas durante 48 horas con las concentraciones indicadas de VMF y analizadas posteriormente mediante *western blotting*.

Tras observar el aumento en la activación de la vía de las MAP-quinasas en las células A375-VR, se realizaron ensayos de actividad GTPasa para Ras, dado que además había sido previamente observado un incremento en la actividad de esta GTPasa en células resistentes a vemurafenib (Nazarian *et al.*, 2010). Los resultados mostraron que las células A375-VR presentaban un aumento significativo en la activación de Ras comparado con las células parentales (**Figura 45A**), lo que podría representar uno de los mecanismos implicados en el incremento de los niveles de fosforilación detectados para MEK1/2 y ERK1/2. Experimentos de secuenciación indicaron que esta mayor activación de Ras en las células A375-VR no era debido a una mutación adquirida en *NRAS* (**Figura 45B**). Asimismo, comprobamos en dichos análisis que estas células resistentes mantenían la mutación BRAF V600E.

Adicionalmente, estudiamos si existían diferencias en la expresión de BRAF entre las células resistentes y las parentales, puesto que se ha identificado aumentos en el número de copias de *BRAF* en pacientes de melanoma resistentes a VMF (Shi *et al.*, 2012), así como expresión de variantes aberrantes de *splicing* de *BRAF* que producen proteínas truncadas capaces de dimerizar en ausencia de señalización de Ras (Poulikakos *et al.*, 2011). Los análisis mediante *western blot* detectaron la expresión *de novo* en las células A375-VR de una potencial isoforma de BRAF con un peso molecular aproximado de 90-100 kDa, la cual estaba ausente tanto en las células parentales como en las células resistentes a trametinib (**Figura 45C**). No detectamos la forma truncada de BRAF de 61 kDa que había sido descrita previamente (Poulikakos *et al.*, 2011).

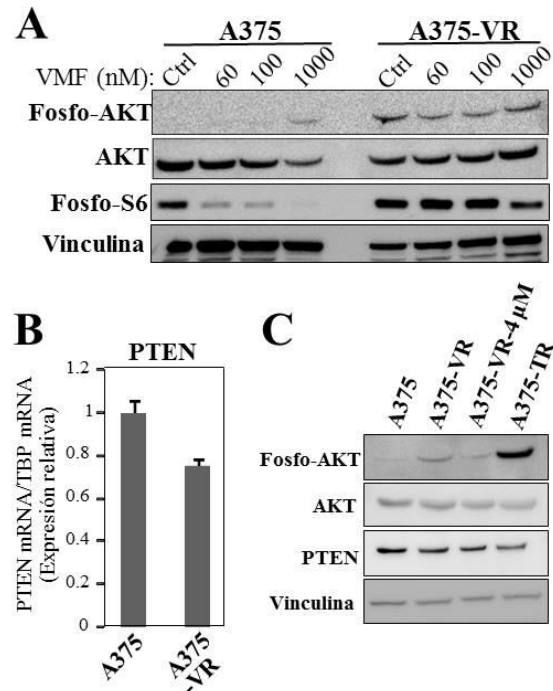
Otra posible explicación de la mayor activación de la vía de las MAP-quinasas en las células A375-VR podía deberse a alteraciones en los niveles de expresión de SPRED1, una proteína que bloquea la señalización de la vía MAP-quinasas (Hanafusa *et al.*, 2002; Kim and Bar-Sagi, 2004). Sin embargo, no se detectaron reducciones en los niveles de expresión del mRNA para SPRED1 en las células resistentes en comparación con las parentales (**Figura 45D**). Asimismo, no se observaron diferencias significativas en la expresión entre células sensibles y resistentes de la quinasa COT, cuya sobre-expresión ha sido descrita como mecanismo de resistencia a inhibidores de BRAF dado que induce la reactivación de la vía MAP-quinasas (Johannessen *et al.*, 2010) (**Figura 45D**).



**Figura 45. Las células A375-VR poseen mayor activación de Ras y muestran expresión *de novo* de una isoforma de BRAF.** (A) Ensayos de actividad GTPasa para Ras. A la derecha se muestra el resultado de la media de la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles (n=5; \*p<0.05). (B) Secuenciación de *BRAF* y *NRAS* en las células resistentes. (C) Las células fueron incubadas en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de VMF o 40 nM de TMT (A375-TR), y analizadas posteriormente mediante *immunoblotting* con anticuerpos anti-BRAF o anti-RhoGDIα como control de carga. (D) Análisis mediante qPCR de la expresión del mRNA de SPRED1 y COT (n=3).

Debido a las alteraciones descritas en la vía de PI3-K/AKT en líneas celulares resistentes a inhibidores de BRAF y en pacientes de melanoma con recaída tras el tratamiento con estos inhibidores (Nazarian *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011; Villanueva *et al.*, 2010; Xing *et al.*, 2012), analizamos a continuación el estado de activación de esta vía en las células A375-VR. Los resultados mostraron un claro aumento de la fosforilación de AKT en las células A375-VR respecto de las parentales (**Figura 46A**). Igualmente, se analizó la fosforilación de la proteína ribosomal S6, una diana “*downstream*” de la vía PI3-K/AKT, que es sustrato de la p70 S6 quinasa (Engelman *et al.*, 2006), observándose mayores niveles de fosforilación de S6 en las células A375-VR tratadas con VMF. S6

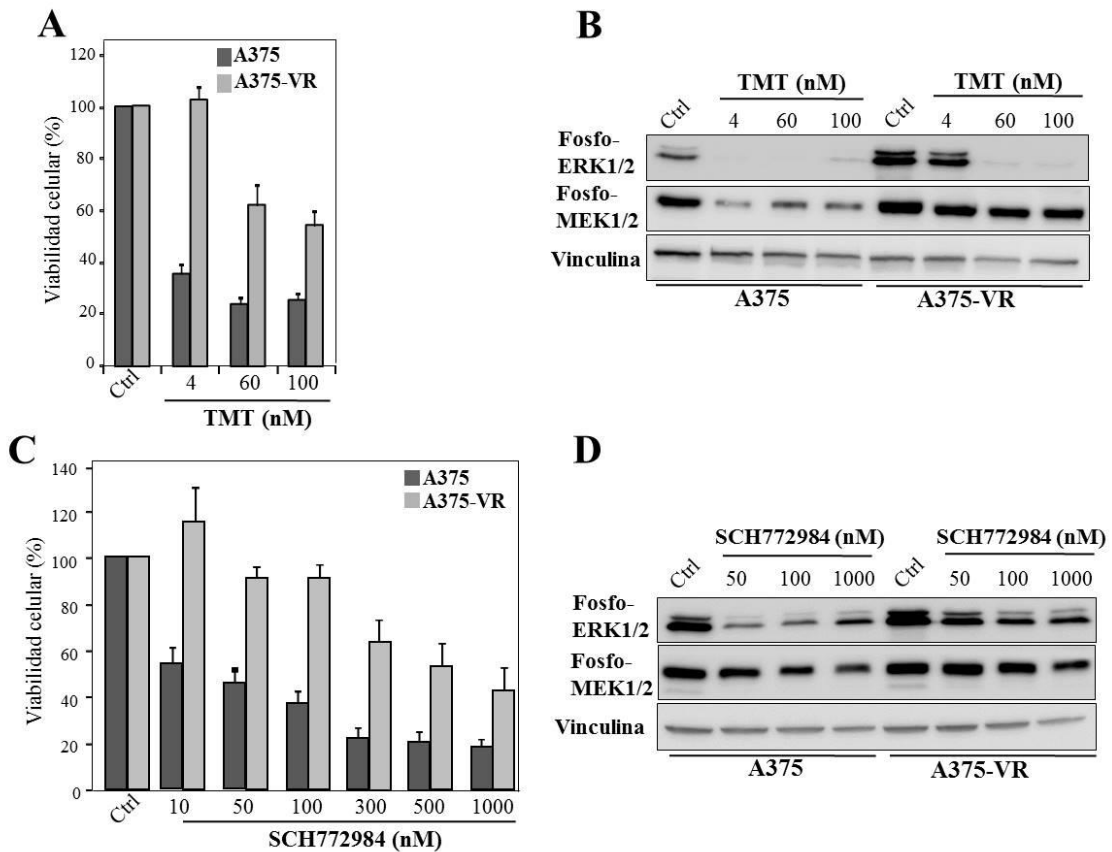
puede ser asimismo fosforilada por p90RSK (Roux *et al.*, 2007), por lo que además del aumento de la activación de la vía PI3-K/AKT, la mayor activación de p90RSK (**ver Figura 44C**) podría estar contribuyendo a elevar los niveles de fosforilación de la proteína S6 en las células A375-VR. Por otra parte, analizamos los niveles de expresión de PTEN mediante qPCR (**Figura 46B**) y *western blot* (**Figura 46C**), observándose una pequeña pero consistente reducción de la expresión de este supresor tumoral en las células resistentes a vemurafenib. Dado que esta reducción está asociada con el incremento en la fosforilación de AKT, es posible que este aumento de fosforilación pueda estar debido, en parte, a la disminución de la expresión de PTEN.



**Figura 46.** Las células A375-VR presentan mayor activación de la vía PI3-quinasa/AKT que las parentales. (A) Las células fueron tratadas durante 48 horas con VMF y posteriormente sometidas a *immunoblotting*. (B) Análisis mediante qPCR de PTEN (n=3). (C) *Western blotting* tras tratamiento con 1.3 o 4 μM de VMF de las células A375-VR o A375-VR-4 μM, respectivamente, o 40 nM de TMT (A375-TR).

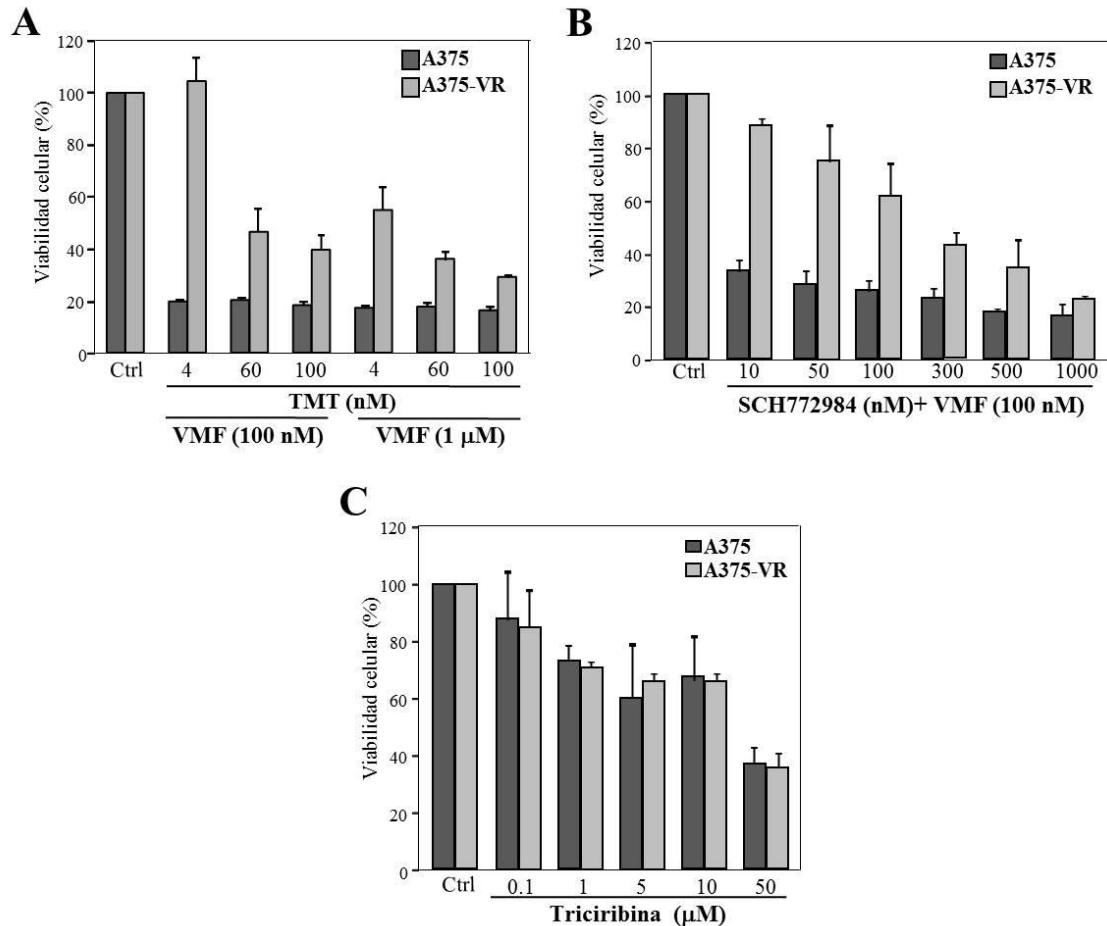
### Análisis de la sensibilidad de células resistentes a vemurafenib a otros inhibidores de la vía de las MAP-quinasas

A continuación examinamos la sensibilidad de las células A375-VR a otros inhibidores de la vía de las MAP-quinasas, observándose que dichas células eran parcialmente resistentes a trametinib (**Figura 47A**). Estos resultados correlacionaron con una activación sostenida de MEK1/2 y en menor grado de ERK1/2 en las células A375-VR (**Figura 47B**). Más aún, dichas células mostraron resistencia parcial al inhibidor de ERK1/2 a concentraciones hasta 100 nM (**Figura 47C**), la cual estuvo asimismo asociada a activación sostenida de ERK1/2 y de MEK1/2 en comparación con las células parentales (**Figura 47D**).



**Figura 47. Resistencia parcial de las células A375-VR a trametinib y SCH772984.** (A, C) Las células fueron tratadas durante 48 horas con los inhibidores indicados y su viabilidad fue testada en ensayos de MTT. Se muestra la media de tres experimentos independientes. (B, D) Tras el tratamiento durante 48 horas con TMT o SCH772984, los lisados celulares fueron analizados mediante *western blot*.

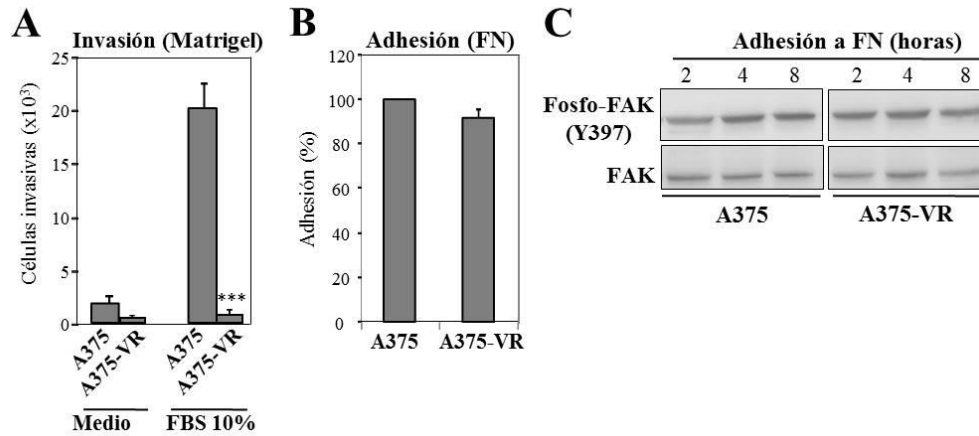
Asimismo, se realizaron ensayos de MTT enfrentando a las células parentales y resistentes a combinaciones de VMF y TMT, o VMF con SCH772984, observándose que las células A375-VR muestran resistencia parcial a la combinación de estos tratamientos (**Figura 48A, B**). Adicionalmente, se quiso comprobar la sensibilidad de las células resistentes a inhibidores de otras vías de señalización independientes de la vía de las MAP-quinasas. Para ello se expuso a las células A375 y A375-VR a concentraciones crecientes de triciribina, un inhibidor de AKT, no hallándose diferencias en su sensibilidad a este inhibidor (**Figura 48C**).



**Figura 48.** Las células A375-VR muestran resistencia parcial al tratamiento combinado de vemurafenib con trametinib o SCH772984. Las células fueron incubadas durante 48 horas con la combinación de inhibidores indicada (A, B), o con triciribina (C), y posteriormente testada su viabilidad (n=3).

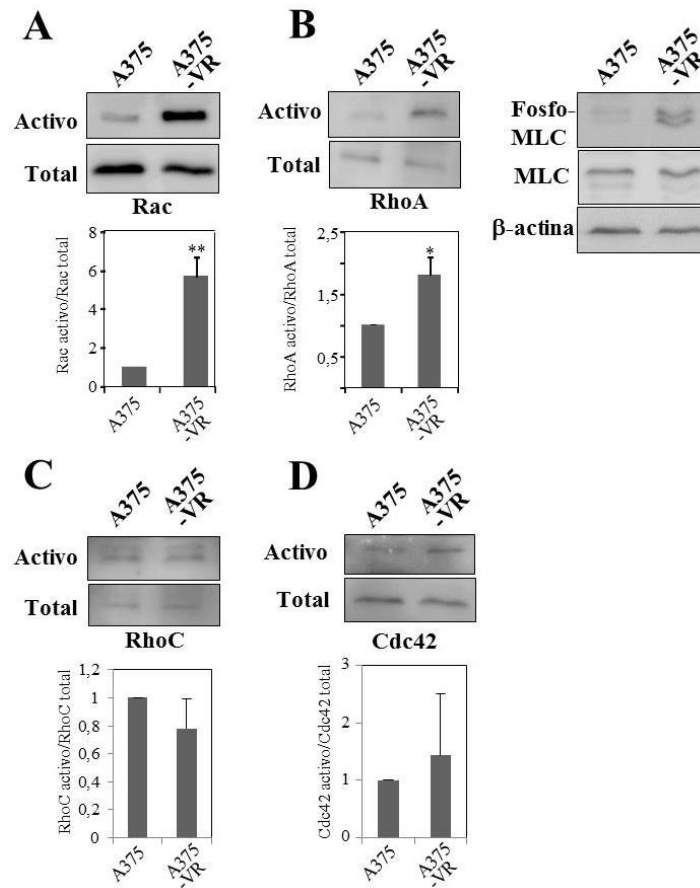
#### Análisis de las propiedades invasivas y adhesivas de las células A375-VR

Posteriormente, se compararon las capacidades invasivas y adhesivas de las células parentales y resistentes a vemurafenib. En los ensayos de invasión a través de Matrigel se observó que las células A375-VR habían perdido su capacidad invasiva en comparación con las células parentales (**Figura 49A**). Por el contrario, no se encontraron diferencias en la adhesión a fibronectina entre ambos tipos celulares (**Figura 49B**). Adicionalmente, no se detectaron cambios significativos en el grado de fosforilación en el residuo Y397 de FAK, un componente clave de las adhesiones focales, entre células A375-VR y parentales adheridas a fibronectina (**Figura 49C**).



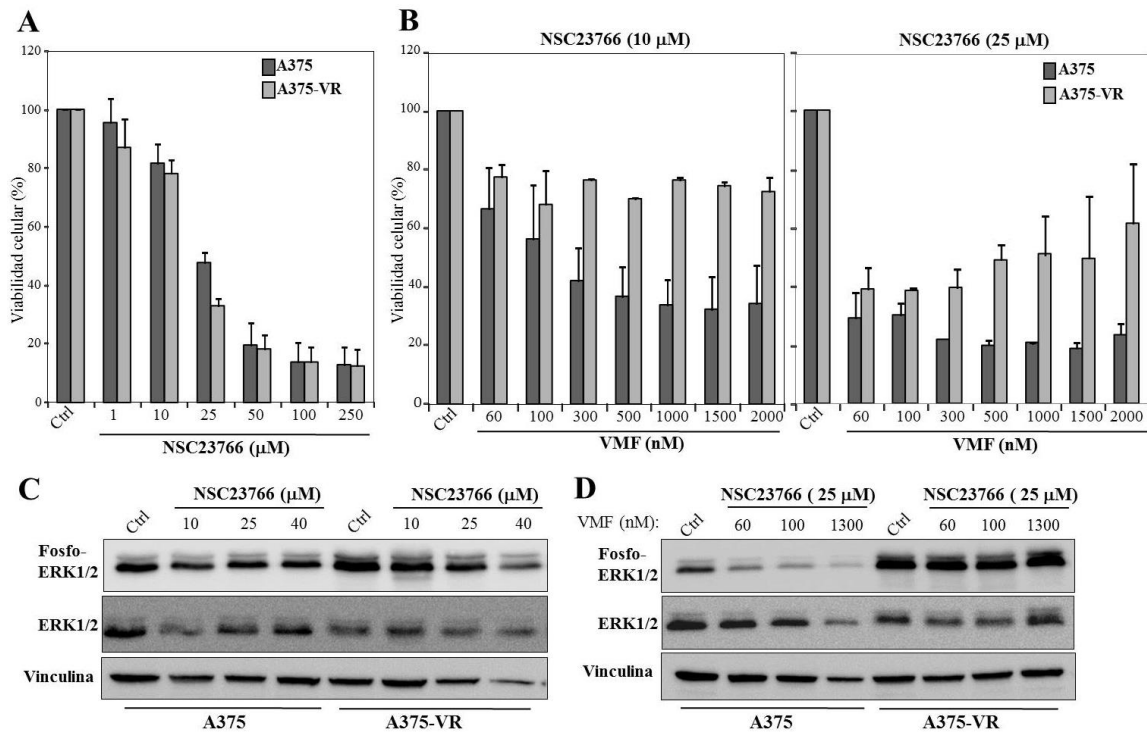
**Figura 49. Bloqueo de la capacidad invasiva de las células A375-VR.** (A) Las células fueron testadas en ensayos de invasión hacia suero. (n=4; \*\*\*p<0.001). (B) Las células fueron sometidas a ensayos de adhesión a fibronectina durante 20 minutos (n=6). (C) Las células adheridas a fibronectina durante los tiempos indicados fueron lisadas y posteriormente analizadas mediante *western blotting*.

Puesto que las GTPasas Rho regulan la invasión celular (Heasman y Ridley, 2008), se analizaron mediante ensayos GTPasa los niveles de activación de las GTPasas Rac y RhoA. Los resultados revelaron un notable incremento de la activación de Rac en las células A375-VR (**Figura 50A**), y en menor grado de RhoA comparado con las células parentales (**Figura 50B**). Correlacionando con la mayor activación de RhoA, se detectaron mayores niveles de fosforilación de MLC, uno de los sustratos de ROCK el cual es a su vez activado por RhoA (Julian y Olson, 2014; Matsuoka y Yashiro, 2014; O'Connor y Chen, 2013). Por el contrario, no hallamos diferencias significativas en la activación de las GTPasas RhoC y Cdc42 entre células parentales y A375-VR (**Figura 50C**).



**Figura 50. Aumento de la activación de Rac y RhoA en las células A375-VR.** Ensayo GTPasa para Rac (A; n=6), RhoA (B; n=6), RhoC (C; n=3) y Cdc42 (D; n=3). Asimismo se muestran los niveles de fosforilación de MLC (B, derecha). En la parte inferior de los geles se representan las medias de las cuantificaciones densitométricas de las bandas de los geles (\*\*p<0.01, \*p<0.05).

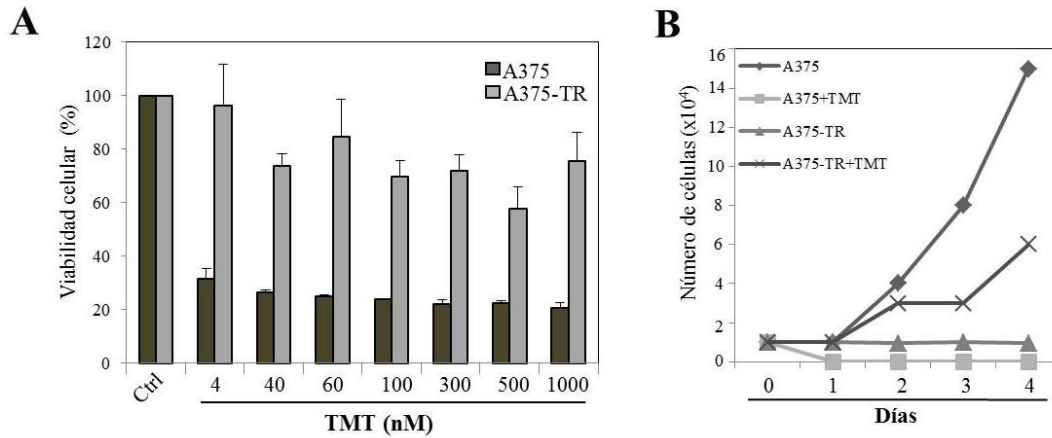
Anteriormente se había descrito que el incremento de la activación de Rac causado por la mutación P29S estaba asociado con resistencia a inhibidores de BRAF (Watson *et al.*, 2014). Para estudiar si el aumento de la activación de Rac en las células A375-VR estaba implicado en la resistencia a vemurafenib, analizamos su viabilidad en presencia del inhibidor de Rac NSC23766. Inicialmente observamos que tanto las células parentales como las resistentes presentaban una sensibilidad similar a NSC23766 (Figura 51A). A continuación, se expuso a las células a una combinación de concentraciones crecientes de VMF y dos concentraciones del inhibidor de Rac. La viabilidad de las células A375-VR en presencia de 10 o 25  $\mu$ M de NSC23766 y diferentes concentraciones de VMF se mantuvo en torno al 80% y 40%, respectivamente, lo que se correspondió con la disminución de la viabilidad cuando se trataba sólo con el inhibidor de Rac (Figura 51B). Asimismo, NSC23766 no alteró significativamente el incremento de la fosforilación de ERK1/2 mostrado por las células A375-VR relativo a las parentales (Figura 51C), ni disminuyó la fosforilación de ERK1/2 en el tratamiento combinado con vemurafenib (Figura 51D). Estos resultados indican que la resistencia a VMF observada en las células A375-VR es independiente de su mayor activación de Rac.



**Figura 51. La resistencia a vemurafenib de las células A375-VR es independiente del aumento en la activación de Rac.** Las células fueron incubadas durante 48 horas con NSC23766 y en ausencia (A, n=3) o presencia de VMF (B, n=2), y posteriormente analizada su viabilidad con el reactivo MTT. (C, D) Las células fueron expuestas durante 48 horas a las concentraciones indicadas de NSC23766 en ausencia o presencia de VMF, y a continuación analizadas mediante *western blot*.

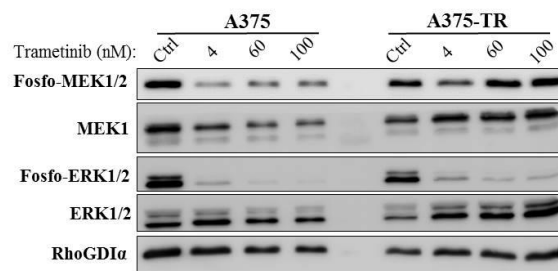
### Caracterización de las células de melanoma A375-TR y A375-VR/TR

La sensibilidad de las células A375-TR a trametinib (TMT) fue analizada mediante ensayos de viabilidad con concentraciones crecientes del inhibidor, observando que las células mantenían niveles de resistencia superiores al 70% a concentraciones de TMT de 300 nM en ensayos a 48 horas (**Figura 52A**). Por otra parte, ensayos de proliferación mostraron que las células A375-TR presentan adicción al TMT, puesto que en ausencia del inhibidor las células frenaron su crecimiento hasta niveles similares a los de las células parentales tratadas con trametinib. Además, dicho ensayo mostró que las células A375-TR en presencia de TMT proliferan más despacio que las células parentales (**Figura 52B**).



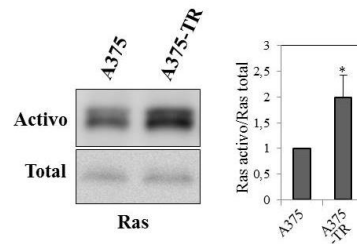
**Figura 52. Caracterización de la viabilidad y proliferación de células A375-TR.** (A) Las células fueron tratadas durante 48 horas con TMT y su viabilidad testada en ensayos de MTT (n=3). (B) Las células fueron cultivadas durante diferentes tiempos en ausencia o presencia de trametinib (40 nM; +TMT), y su capacidad proliferativa determinada utilizando azul de tripán. Se muestra un experimento representativo de dos independientes.

El análisis del estado de activación de componentes de la vía de las MAP-quinasas mostró que la fosforilación de MEK1/2 disminuía en las células A375 parentales incubadas con dosis crecientes de TMT, a diferencia del mantenimiento de esta fosforilación en las células A375-TR (Figura 53). Sin embargo, la fosforilación de ERK1/2 se reducía tanto en células parentales como en las resistentes en presencia de TMT, indicando que el inhibidor de MEK1/2 es capaz de frenar el aumento en la activación de la vía de las MAP-quinasas que ocurre “upstream” de MEK1/2.



**Figura 53. Caracterización de la activación de MEK1/2 y ERK1/2 en las células A375-TR.** Las células fueron tratadas durante 48 horas con las concentraciones indicadas de TMT, y posteriormente analizadas mediante *immunoblotting*.

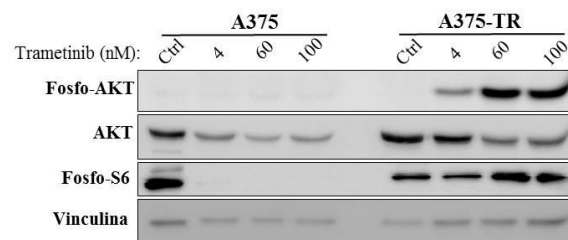
Entre las posibles causas de la mayor activación de la vía MAP-quinasas “upstream” de MEK1/2 en las células A375-TR estaba un posible aumento en la activación de Ras, lo cual fue confirmado en ensayos de GTPasa al comparar las células parentales con las resistentes (Figura 54).



**Figura 54. Las células A375-TR poseen mayor activación de Ras que las parentales.** (Izquierda) Las células fueron analizadas en ensayos de actividad GTPasa para Ras. En el panel de la derecha se muestra la cuantificación de estos ensayos (n=4; \*p<0.05).

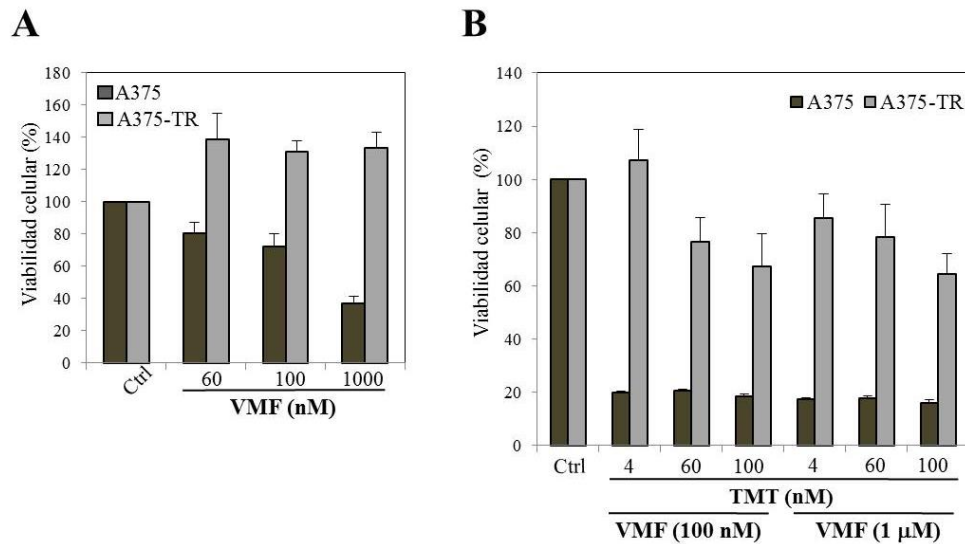
Por otra parte, el análisis de la secuenciación de las células A375-TR reveló que continuaban siendo wt para NRAS Q61, manteniendo la mutación BRAF V600E (ver **Figura 45B**). Asimismo, no se observó sobre-expresión de ninguna isoforma de BRAF en las células A375-TR (ver **Figura 45C**).

Puesto que las células continuaban siendo viables en presencia de TMT a pesar de mantener bajos niveles de activación de ERK1/2 aunque mayor activación de Ras, analizamos la activación de PI3-quinasa/AKT, la cual está implicada en respuestas de supervivencia y proliferación y representa una vía efectora *downstream* de la activación de Ras. Los resultados indicaron que las células A375-TR presentan un aumento de AKT fosforilado en respuesta al tratamiento con TMT, a diferencia de la ausencia de fosforilación en las células parentales (**Figura 55**). De acuerdo con esto, los niveles de fosforilación de la proteína S6 disminuyeron en respuesta a TMT en las células parentales, mientras que se mantuvieron en las células A375-TR. Adicionalmente, el aumento de fosforilación de AKT pareció correlacionar con una ligera disminución de la expresión de PTEN en las células A375-TR (ver **Figura 46C**).



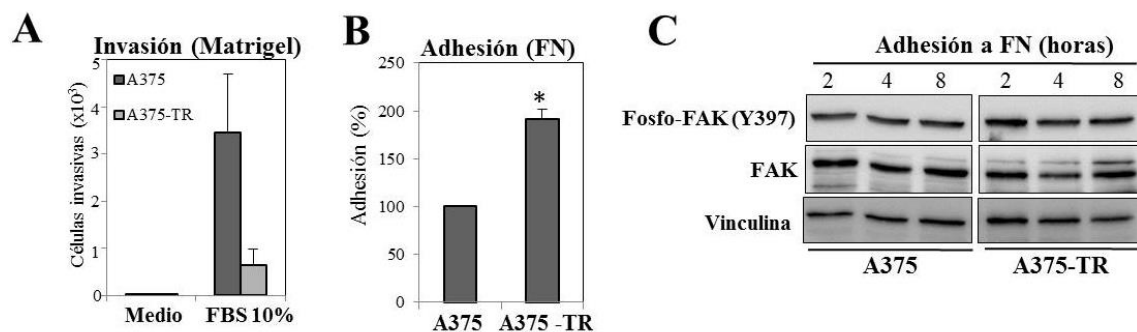
**Figura 55. Las células A375-TR presentan mayor activación de la vía de señalización PI3-K/AKT.** Las células fueron tratadas durante 48 horas con TMT para ser posteriormente analizadas mediante *western blotting*.

Además de su resistencia a TMT, las células A375-TR mostraron resistencia a VMF (**Figura 56A**), y fueron parcialmente resistentes a la combinación de vemurafenib y trametinib (**Figura 56B**).



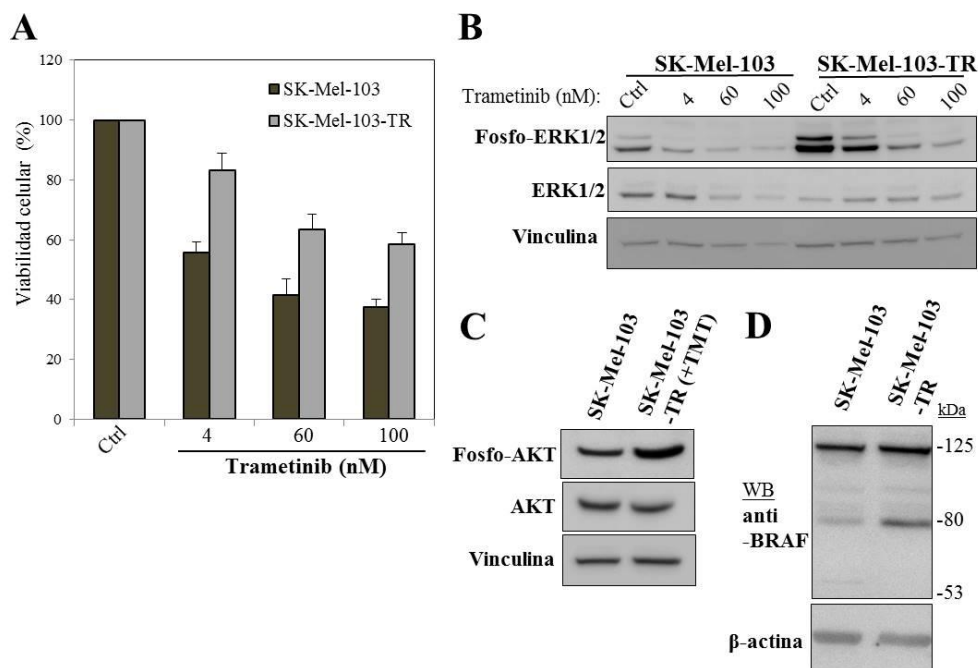
**Figura 56. Caracterización de la sensibilidad de las células A375-TR a vemurafenib y al tratamiento combinado de vemurafenib con trametinib.** Las células fueron cultivadas durante 48 horas con las concentraciones mostradas de VMF (A, n=3), o con la combinación de VMF y TMT (B, n=3), y su viabilidad testada en ensayos de MTT.

A continuación se compararon las características invasivas y adhesivas de las células A375-TR y parentales, pudiendo observarse una reducción de la invasividad de las células A375-TR con respecto a las células parentales (Figura 57A). Por otra parte, las células resistentes mostraron mayores niveles de adhesión a fibronectina que las parentales (Figura 57B), aunque no se observaron cambios significativos en la fosforilación de FAK Y397 (Figura 57C). Notablemente, el aumento de adhesión de las células A375-TR correlacionó con una morfología más extendida sobre fibronectina que las células parentales (no mostrado), lo que podría constituir uno de los mecanismos implicados en dicho aumento de adhesión.



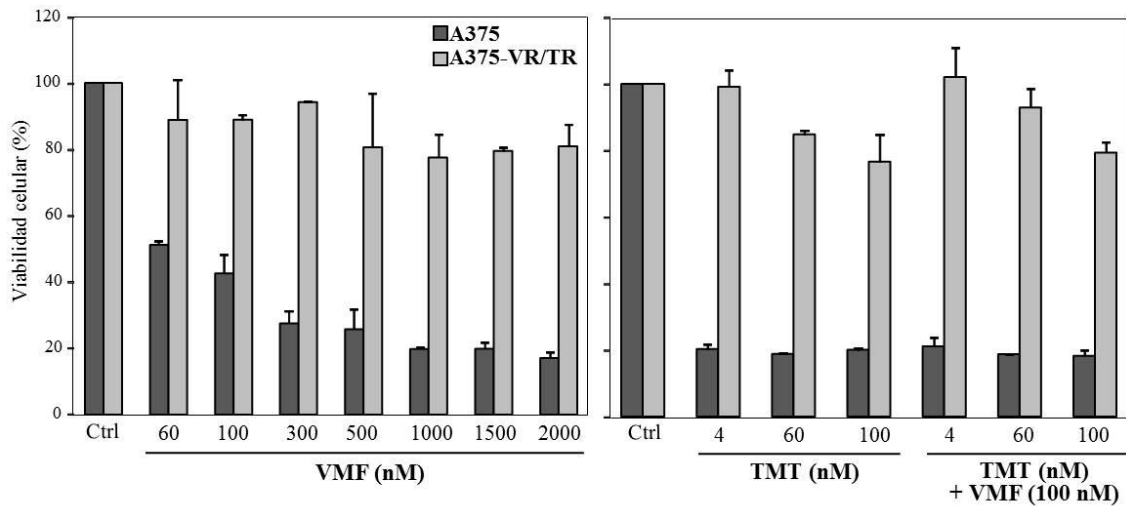
**Figura 57. Caracterización de la capacidad invasiva y adhesiva de las células resistentes a trametinib.** (A) Las células fueron testadas en ensayos de invasión a través de Matrigel. Se muestra la media de tres experimentos independientes. (B) Las células fueron sometidas a ensayos de adhesión a fibronectina (n=2; \*p<0.05). (C) Tras adhesión a fibronectina durante los tiempos indicados, las células fueron lisadas y analizadas mediante *western blotting*.

Por otra parte, se ha iniciado la generación de células SK-Mel-103 con resistencia a trametinib, obteniéndose una población celular resistente a concentraciones del inhibidor de 30 nM (ver Figura 39). Dichas células mostraron una resistencia parcial a TMT a concentraciones entre 60-100 nM (Figura 58A), lo cual estaba asociado a un mayor nivel de la fosforilación de ERK1/2 que las células parentales, tanto en condiciones basales como en presencia del inhibidor (Figura 58B). Asimismo, detectamos un aumento en la fosforilación de AKT en dichas células resistentes (Figura 58C). El análisis mediante *western blotting* de la expresión de BRAF reveló la sobre-expresión de una isoforma de 80 kD de esta quinasa (Figura 58D). Análisis de la secuenciación de *BRAF* y *NRAS* de las células SK-Mel-103-TR mostraron que seguían presentando la mutación NRAS Q61R y mantenían *BRAF* en su forma *wild type* (ver Figura 45B).



**Figura 58. Caracterización inicial de las células SK-Mel-103-TR.** (A) Ensayo de viabilidad de las células parentales y SK-Mel-103-TR durante 48 horas con concentraciones crecientes de TMT (n=3). (B-D) Análisis mediante *immunoblotting* de la activación de ERK y PI3-K/AKT (+TMT: células tratadas con 30 nM de TMT), y de la expresión de BRAF.

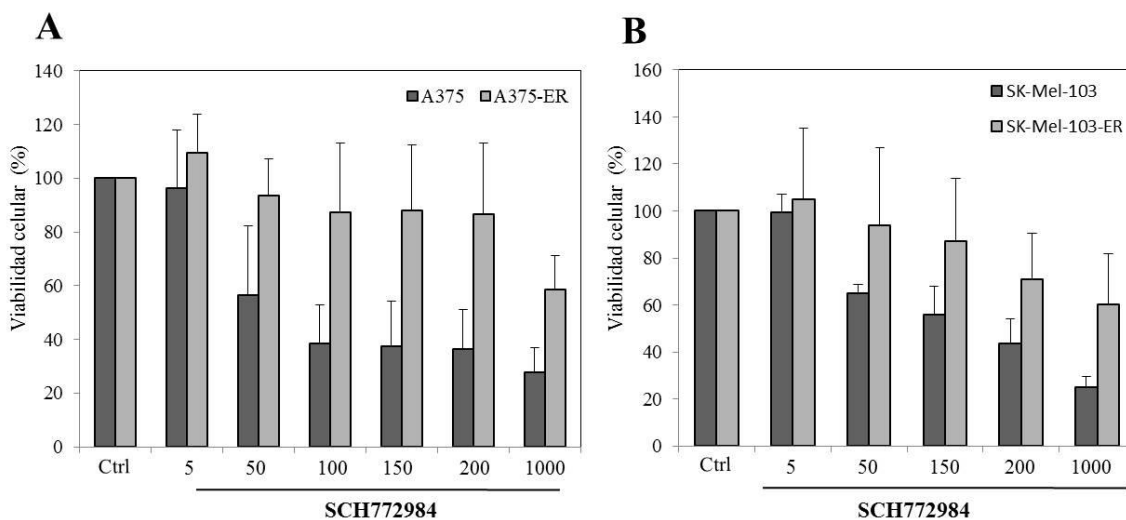
Las células A375-VR/TR (ver Figura 39) han sido hasta la fecha únicamente caracterizadas en ensayos de viabilidad, los cuales mostraron total resistencia de dichas células al tratamiento combinado con estos inhibidores, así como a los tratamientos independientes (Figura 59).



**Figura 59. Caracterización de la sensibilidad de las células A375-VR/TR al vemurafenib, trametinib o a su combinación.** Tras el tratamiento durante 48 horas con los inhibidores indicados, la viabilidad celular fue testada en ensayos de MTT (n=3).

#### Caracterización de las células de melanoma resistentes a SCH772984

Las células A375-ER y SK-Mel-103-ER (ver Figura 39) mantenidas en cultivo a concentraciones de 120 nM del inhibidor de ERK1/2, SCH772984, han sido inicialmente caracterizadas en ensayos de viabilidad durante 48 horas. Dichos ensayos mostraron total resistencia de las células A375-ER hasta concentraciones de SCH772984 de 200 nM en comparación con las parentales, así como resistencia parcial a 1  $\mu$ M del inhibidor (Figura 60A). Por su parte, las células SK-Mel-ER presentaron total resistencia entre 50-150 nM de SCH772984, y resistencia parcial a concentraciones superiores del inhibidor (Figura 60B).



**Figura 60. Caracterización de las células resistentes a SCH772984.** (A, B) Las células fueron tratadas durante 48 horas con SCH772984, y sometidas a ensayos de viabilidad (n=3).

La resistencia a vemurafenib o trametinib induce alteraciones en los perfiles de expresión de miRNAs en células de melanoma

Con el objetivo de comparar posibles diferencias en los perfiles de expresión de miRNAs en células A375-VR y A375-TR respecto de A375, así como SK-Mel-103-TR en comparación con SK-Mel-103, se realizó secuenciación de RNA de pequeño tamaño mediante *Next Generation Sequencing*. Con ello se pretendía identificar miRNAs que potencialmente pudieran contribuir a la resistencia a vemurafenib o trametinib. Las secuencias obtenidas fueron alineadas frente a los miRNAs maduros de *Homo sapiens* de la base de datos miRBase21 ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)). Para el análisis diferencial de la expresión de los miRNAs en las células resistentes respecto de las parentales obtenidos con el paquete DESeq2, se utilizó el criterio  $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 0.9$  para las células resistentes a VMF (Tabla 6), y  $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 1$  para las resistentes a TMT (Datos suplementarios, Tablas 7, 8), con un *p-value* ajustado  $< 0.05$  en ambos casos.

miRNA	Log <sub>2</sub> FoldChange	<i>p-value</i>	<i>p</i> -ajustado
hsa-miR-204-5p	0,92	3,19E-27	1,01E-24
hsa-miR-4454	-3,265	2,40E-07	2,46E-05
hsa-miR-211-5p	5,083	2,70E-06	1,66E-04
hsa-miR-140-3p	-1,150	1,57E-05	5,11E-04
hsa-miR-381-3p	-3,186	1,61E-05	5,11E-04
hsa-miR-210-3p	-0,96	1,36E-04	3,30E-03
hsa-miR-409-3p	-2,436	1,33E-03	1,89E-02
hsa-miR-411-5p	-2,710	1,27E-03	1,89E-02
hsa-miR-654-3p	-2,738	2,15E-03	2,44E-02
hsa-miR-504-5p	1,256	2,63E-03	2,64E-02
hsa-miR-509-3p	1,292	2,54E-03	2,64E-02
hsa-miR-410-3p	-2,932	3,25E-03	3,12E-02

Tabla 6. miRNAs diferencialmente expresados en las células A375-VR respecto de las A375, obtenidos mediante el análisis con el paquete DESeq2. Se utilizó el criterio  $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 0.9$  y *p-value* ajustado  $< 0.05$ . Se muestran los valores de Log<sub>2</sub>FoldChange, *p-value* y *p-value* ajustado.

Como puede observarse, las células resistentes a TMT (tanto las células A375-TR como las SK-Mel-103-TR) mostraron un alto número de miRNAs diferencialmente expresados en comparación con los cambios en miRNAs detectados en las células resistentes a vemurafenib (Tabla 6; Datos suplementarios, Tablas 7, 8). La validación de los resultados obtenidos en la secuenciación de miRNAs en las células resistentes a TMT, así como el estudio del posible papel en la resistencia a dicho inhibidor de los miRNAs cuya expresión está alterada en estas células serán abordados en futuros estudios. No obstante, en un análisis preliminar se puede comprobar que los miRNAs más diferencialmente expresados en células A375-TR respecto de las parentales son los miR-143-3p, miR-145-5p y miR-508-3p (Datos suplementarios, Tabla 7). En el caso de las células SK-Mel-103-TR, además del miR-143-3p y miR-145-5p, observamos cambios

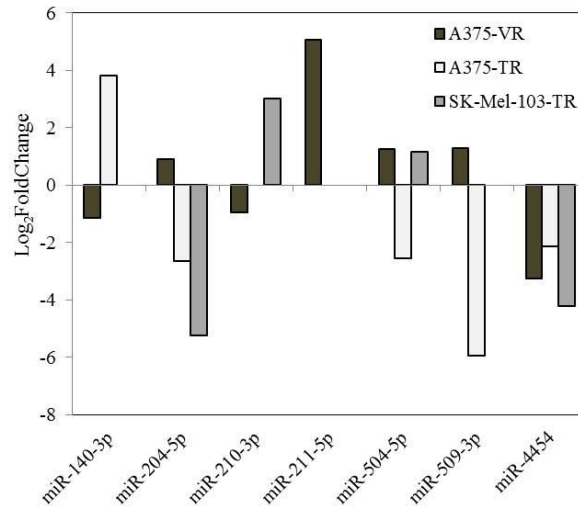
importantes de expresión de miR-363-3p y miR-20b-5p (**Datos suplementarios, Tabla 8**). Notablemente, los miRNAs miR-143-3p y miR-145-5p presentaron un aumento de expresión tanto en las células A375-TR como en las SK-Mel-103-TR.

En el caso de las células resistentes a VMF, se procedió a realizar un segundo método de análisis diferencial con la librería BioSAGE. Con este análisis se redujo el número de miRNAs que estuvieran diferencialmente expresados de modo significativo de 12 a 7, eliminándose aquellos que estaban muy poco expresados en las muestras analizadas por no ser considerados significativos con este método de análisis. Así, se determinó que miR-140-3p, miR-210-3p y miR-4454 mostraban una expresión disminuida en las células A375-VR en comparación con las A375, mientras que miR-204-5p, miR-211-5p, miR-504-5p y miR-509-3p estaban más expresados en las células resistentes a vemurafenib (**Tabla 9**).

miRNA	Log <sub>2</sub> FoldChange	p-value	p-ajustado
hsa-miR-204-5p	0,936	5,07E-149	5,53E-145
hsa-miR-211-5p	6,317	3,07E-09	2,91E-06
hsa-miR-4454	-3,501	3,43E-08	2,88E-05
hsa-miR-509-3p	1,2803	3,68E-07	2,87E-04
hsa-miR-210-3p	-0,917	5,42E-06	3,29E-03
hsa-miR-504-5p	1,248	2,60E-05	1,39E-02
hsa-miR-140-3p	-1,053	6,01E-05	2,92E-02

**Tabla 9.** miRNAs diferencialmente expresados en las células A375-VR respecto de las A375, obtenidos mediante el análisis con la librería BioSAGE. Se utilizó el criterio  $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 0.9$  y  $p\text{-value ajustado} < 0.05$ . Se muestran los valores de Log<sub>2</sub>FoldChange, p-value y p-value ajustado.

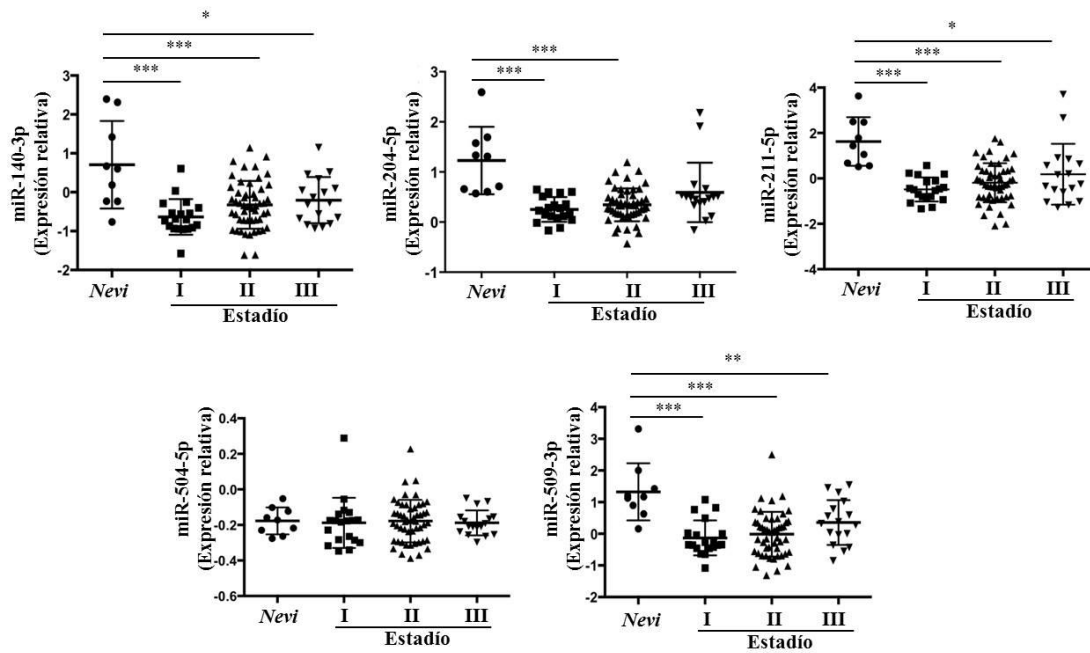
A continuación, se analizó si estos 7 miRNAs estaban asimismo diferencialmente expresados en las células resistentes a TMT, tanto en las A375-TR como las SK-Mel-103-TR. Los resultados mostraron que hay una importante variabilidad de la expresión de los miRNAs en células resistentes a vemurafenib o a trametinib (**Figura 61**). Por ejemplo, el miR-140-3p presenta una mayor expresión en las células A375-TR respecto de las A375, mientras que, como se ha mencionado más arriba, la expresión de este miRNA disminuye en las células A375-VR. Por otra parte, el miR-211-5p no estaba diferencialmente expresado en ninguna de las células resistentes a TMT, a diferencia del citado incremento de su expresión en las células A375-VR, mientras que el aumento de expresión del miR-204-5p en estas células contrasta con su disminución en las células resistentes a trametinib. Estos datos sugieren que existen diferencias importantes en los cambios en la expresión de miRNAs en células de melanoma resistentes a vemurafenib o trametinib.



**Figura 61. Variabilidad en la alteración de la expresión de miRNAs en células resistentes a vemurafenib o trametinib.** Comparación de los cambios en la expresión de los miRNAs seleccionados a partir de los datos del análisis de la secuenciación de las células resistentes a VMF o a TMT.

#### Análisis de la expresión de los miRNAs seleccionados en cohortes de pacientes con melanoma cutáneo

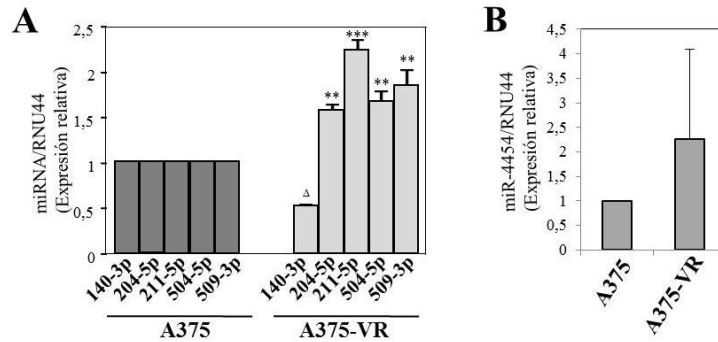
Durante la estancia pre-doctoral en el laboratorio de la Dra. Eva Hernando (New York University), se tuvo la posibilidad de realizar un análisis *in silico* de la expresión de miRNAs en una cohorte de pacientes con melanoma cutáneo en diferentes estadios de la enfermedad. Los datos de los perfiles de expresión de miRNAs habían sido anteriormente realizados mediante *microarrays* de Exiqon (Copenhague, Dinamarca), a partir de muestras de parafina de melanomas primarios (Hanniford et al., 2015). Los análisis *in silico* mostraron una disminución significativa de la expresión de miR-140-3p, miR-204-5p, miR-211-5p y miR-509-3p en las muestras de los estadios I y II (y en algunos casos en estadios III) respecto de muestras de *nevi* (Figura 62), aunque no existían cambios significativos entre los distintos estadios de la enfermedad. La expresión de miR-210-3p no fue detectada (no mostrado), por lo que fue descartado de subsiguientes estudios.



**Figura 62. Expresión de los miRNAs seleccionados en pacientes con melanoma cutáneo.** Análisis *in silico* de la expresión de miRNAs en una cohorte de pacientes de melanoma en diferentes estadios de la enfermedad (\*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ ).

### Validación mediante qPCR de los cambios en la expresión de miRNAs en células A375-VR

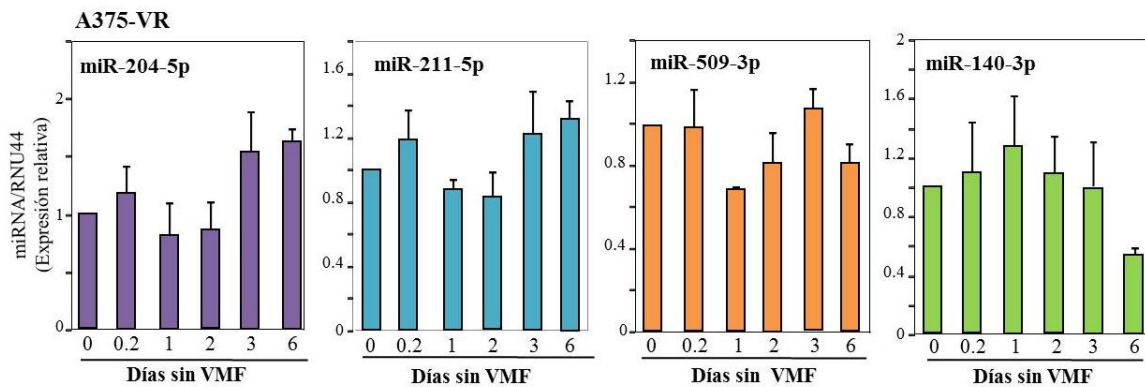
A continuación se procedió a validar mediante qPCR las alteraciones en la expresión de los miRNAs seleccionados tras los análisis con DESeq2 y BioSAGE. Los resultados obtenidos en estos ensayos validaron el aumento de expresión en las células A375-VR respecto de las A375 de miR-204-5p, miR-211-5p, miR-504-5p y miR-509-3p, así como la disminución del miR-140-3p (**Figura 63A**). Sin embargo, no pudimos reproducir la disminución de la expresión del miR-4454 que había sido detectada en la secuenciación (**Figura 63B**), por lo que fue descartado de posteriores análisis. Asimismo, excluimos al miR-504-5p de nuestros estudios dada su baja expresión en las células A375 y A375-VR.



**Figura 63. Validación de los cambios en la expresión de los miRNAs seleccionados.** (A) La expresión diferencial de los miRNAs indicados fue validada en ensayos de qPCR en células A375 y A375-VR (n=5). \*\*\*El miRNA estaba significativamente aumentado en las células A375-VR respecto de las A375,  $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ . <sup>Δ</sup>El miRNA estaba significativamente disminuido,  $p < 0.05$ . (B) Expresión del miR-4454 en células A375 y A375-VR (n=5).

### Análisis de la estabilidad y de la dinámica de los cambios en la expresión de los miRNAs en respuesta a vemurafenib

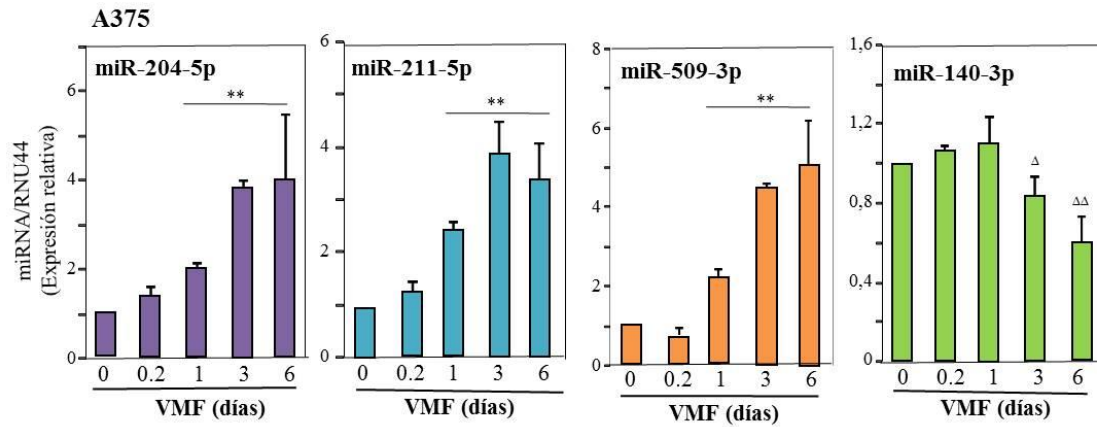
Para analizar si las alteraciones en la expresión de los miRNAs en las células A375-VR eran estables, se mantuvo a dichas células en medio completo sin el inhibidor hasta 6 días, y se analizó posteriormente la expresión de los miRNAs mediante qPCR. Los resultados mostraron que los cambios en la expresión de los miRNAs miR-204-5p, miR-211-5p, miR-509-3p y miR-140-3p se mantuvieron en ausencia de vemurafenib (**Figura 64**). Estos datos revelan la estabilidad de las alteraciones en la expresión de estos miRNAs en las células resistentes, e indican que dichos cambios son independientes de la presencia continua de vemurafenib.



**Figura 64. Las alteraciones en la expresión de los miRNAs de las células A375-VR son estables e independientes de la presencia de vemurafenib.** Las células A375-VR fueron mantenidas en ausencia de VMF durante los tiempos indicados, y posteriormente la expresión de los miRNAs fue analizada mediante qPCR (n=2).

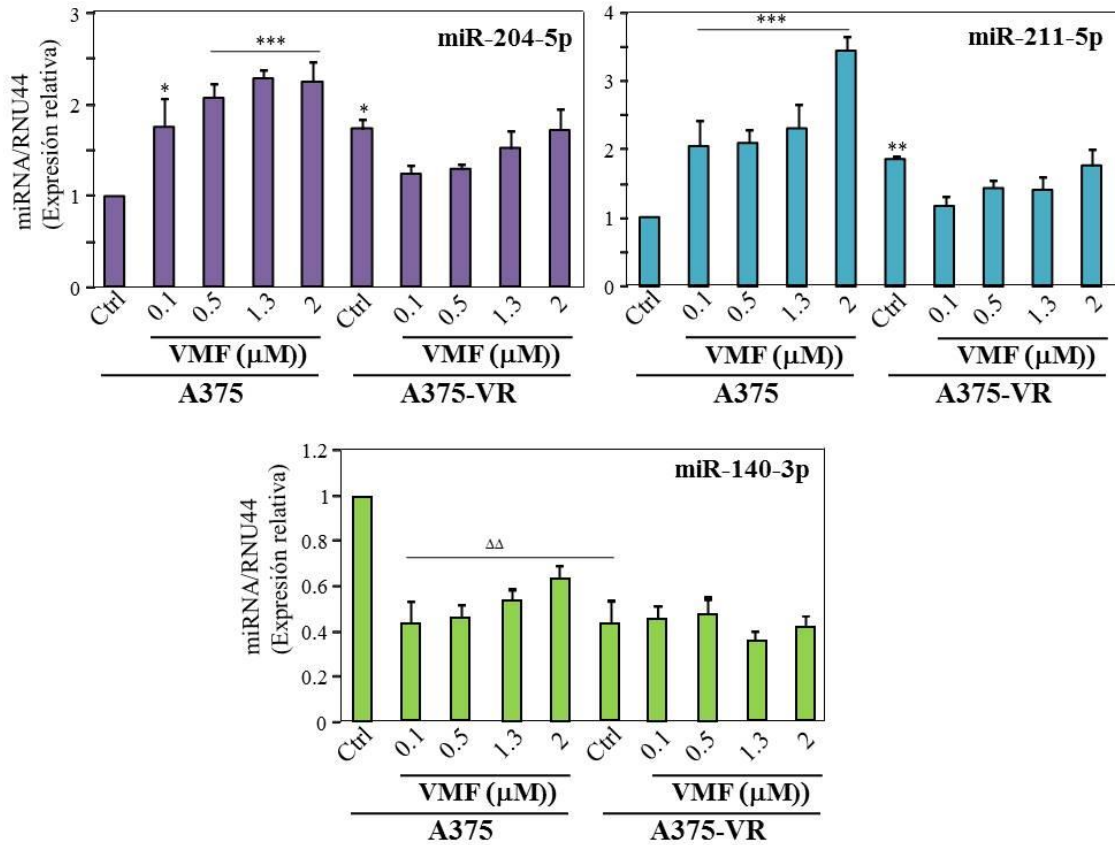
A continuación estudiamos la dinámica de los cambios de expresión de los miRNAs mediante incubación con VMF de las células parentales A375 durante diferentes tiempos y posterior análisis por qPCR. Notablemente, pudimos observar aumentos significativos en la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-509-3p tras 24 horas de

exposición a VMF, estabilizándose su expresión a los 3-6 días (**Figura 65**). Por su parte, el miR-140-3p disminuyó su expresión en respuesta a dicho inhibidor en las células A375, aunque con una cinética más lenta. En este punto, decidimos enfocar nuestros estudios sobre miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p, dejando el miR-509-3p para futuras investigaciones.



**Figura 65. Análisis de la dinámica en los cambios de expresión de los miRNAs tras el tratamiento de las células A375 con vemurafenib.** Las células parentales A375 fueron mantenidas durante los tiempos indicados en presencia de VMF (1.3  $\mu$ M), y posteriormente la expresión de los miRNAs indicados fue analizada mediante qPCR para detectar (n=2; \*\*p<0.01,  $\Delta$ p<0.01,  $\Delta$ p<0.05).

Los cambios en la expresión de los tres miRNAs seleccionados en relación con la concentración de VMF fueron analizados en experimentos de dosis-respuesta. Los resultados revelaron cambios significativos en la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p a concentraciones de 100 nM (**Figura 66**). Consistente con los resultados anteriores, la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p es mayor en las células A375-VR que en las A375, y menor en el caso del miR-140-3p, ya sea en ausencia o presencia de VMF, y no se detectaron cambios subsiguientes en las células A375-VR al aumentar la dosis del inhibidor.



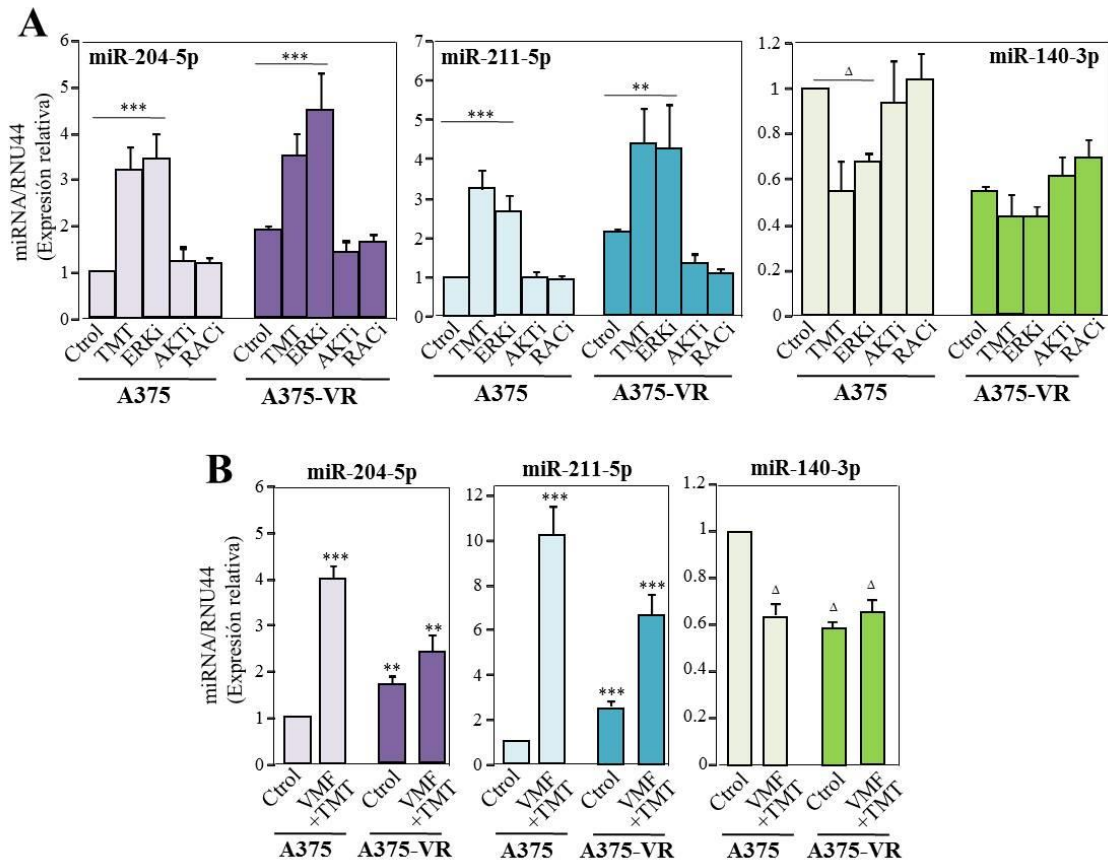
**Figura 66. Análisis de dosis-respuesta de los cambios en la expresión de miRNAs tras el tratamiento con vemurafenib.** Las células fueron expuestas durante 48 horas a las concentraciones indicadas de VMF, tras lo cual la expresión de los miRNAs fue analizada mediante qPCR (n=2; \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05, ΔΔp<0.01).

#### Análisis de la regulación de la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p por inhibidores de MEK1/2 y ERK1/2

A continuación, analizamos si los cambios observados en estos miRNAs eran específicos en respuesta a VMF u ocurrían también en presencia de otros inhibidores de la vía de las MAP-quinasas. Para ello, tanto las células A375 como las A375-VR fueron tratadas con trametinib o con el inhibidor de ERK1/2 (SCH772984). Ambos inhibidores indujeron un aumento de expresión de miR-204-5p y miR-211-5p, tanto en las células sensibles como en las resistentes a vemurafenib (Figura 67A). Sin embargo, la disminución de miR-140-3p sólo fue detectada en las células A375, pero no en las A375-VR.

Asimismo, estudiamos si los cambios en los miRNAs analizados ocurrían también en respuesta a inhibidores distintos de la vía de las MAP-quinasas. Para ello, utilizamos un inhibidor de AKT, la triciribina, y el inhibidor de Rac NSC23766, a los cuales eran sensibles tanto las células A375 como las A375-VR, como ya habíamos mostrado anteriormente (ver Figura 48C y 51A). Los resultados mostraron que el tratamiento con estos dos inhibidores no alteró los niveles de expresión de los miRNAs analizados, ni en las células parentales ni en las resistentes (Figura 67A).

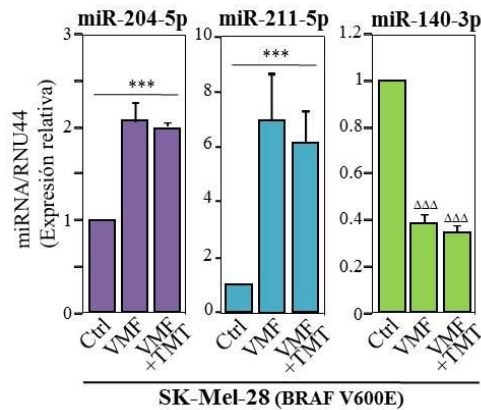
Debido a la importancia del tratamiento combinado de vemurafenib y trametinib en clínica, se expuso a las células A375 y A375-VR a ambos inhibidores, analizándose posteriormente posibles cambios en la expresión de los tres miRNAs seleccionados. Los resultados de qPCR revelaron un aumento de la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en respuesta a dicha combinación de inhibidores, tanto en las células sensibles como en las resistentes, mientras que el miR-140-3p disminuyó en las células A375, pero no en las células A375-VR (Figura 67B).



**Figura 67. Análisis de la regulación de la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p por trametinib o SCH772984, y por el tratamiento combinado de vemurafenib y trametinib.** (A) Las células fueron incubadas durante 48 horas con TMT (4 nM), SCH772984 (50 nM), triciribina (5 μM) o NSC23766 (10 μM), y la expresión de los miRNAs fue analizada posteriormente mediante qPCR (n=2). (B) Las células fueron expuestas durante 48 horas a la combinación de TMT (4 nM) y VMF (100 nM), y a continuación sometidas a ensayos de qPCR (n=2; \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, Δp<0.05).

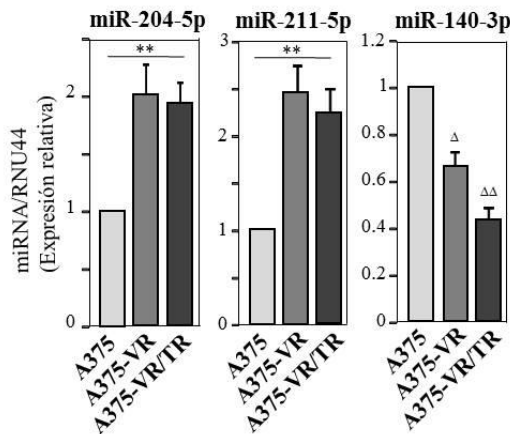
Con el fin de estudiar si otras líneas celulares de melanoma con la mutación BRAF V600E sufrían cambios en la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p al ser expuestas a VMF y a su combinación con TMT, utilizamos las células SK-Mel-28, las cuales presentan dicha mutación y son *wild type* para NRAS (Nissan *et al.*, 2014). Los análisis mediante qPCR mostraron un aumento de expresión de miR-204-5p y especialmente de miR-211-5p en dichas células incubadas con VMF, en ausencia o

presencia de TMT (**Figura 68**). Asimismo, dichos tratamientos indujeron una disminución en la expresión de miR-140-3p.



**Figura 68.** Modificación de la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en células SK-Mel-28 tras el tratamiento con vemurafenib o la combinación vemurafenib y trametinib. Las células fueron tratadas durante 48 horas con VMF (1.3  $\mu$ M) o con la combinación de VMF (100 nM) y trametinib (4 nM). La expresión de los miRNAs fue analizada posteriormente mediante qPCR (n=2; \*\*\*p<0.001,  $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001).

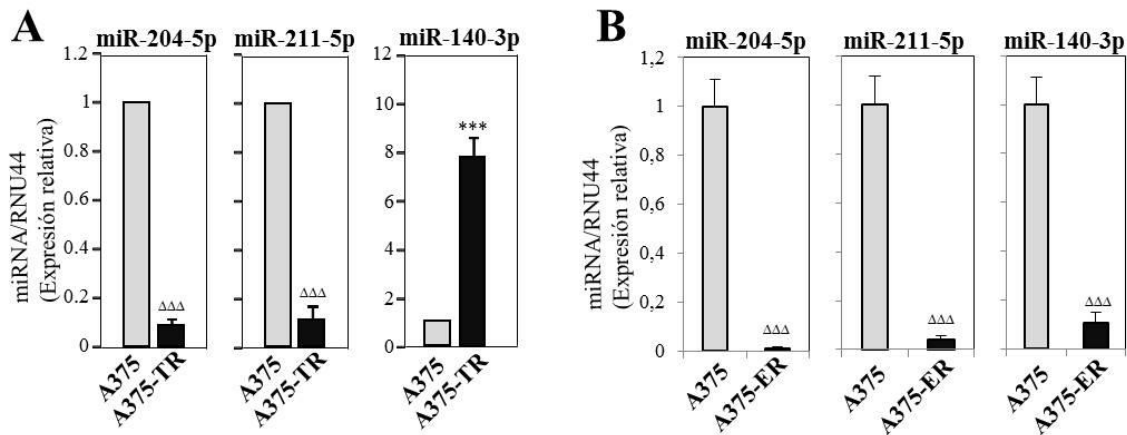
Notablemente, el aumento en la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p, y la disminución del miR-140-3p fue asimismo detectada en células dobles resistentes a vemurafenib y trametinib (A375-VR/TR) (**Figura 69**).



**Figura 69.** Alteraciones en la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en células dobles resistentes a vemurafenib y trametinib. La expresión de los miRNAs fue analizada mediante qPCR (n=2; \*\*p<0.01,  $\Delta\Delta$ p<0.01,  $\Delta$ p<0.05).

Por el contrario, cuando se analizó la expresión de los miRNAs en células A375 resistentes a TMT se observó el resultado opuesto, es decir, disminución de miR-204-5p y miR-211-5p y aumento de miR-140-3p (**Figura 70A**), validando de este modo los resultados obtenidos en la secuenciación de miRNAs para las células A375-TR (**ver Datos suplementarios, Tabla 7**). Por otra parte, resultados preliminares mostraron que las células

A375 resistentes al inhibidor de ERK presentan una disminución en la expresión de los tres miRNAs estudiados (**Figura 70B**).

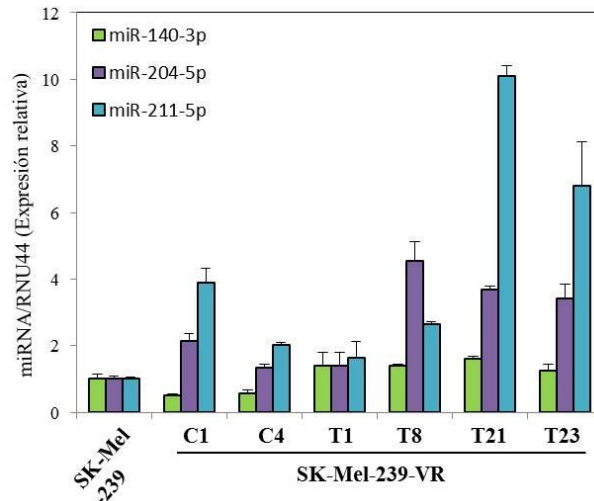


**Figura 70.** Análisis de la expresión de los miRNAs seleccionados en células A375-TR y A375-ER. La expresión de los miRNAs fue analizado mediante qPCR (n=2; \*\*\*p<0.001, ΔΔΔp<0.001).

En conjunto, estos resultados subrayan la estabilidad de los cambios en la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en respuesta a VMF. Adicionalmente, la estabilidad de estos cambios incluso en las células doble resistentes a VMF y TMT, sugiere un efecto dominante de VMF sobre TMT en la regulación de la expresión de estos miRNAs. Más aún, los datos apuntan a una fuerte correlación entre los cambios en la expresión de estos miRNAs y la vía de señalización BRAF/MEK1/2/ERK1/2, pero no con las vías PI3-K/AKT o con la señalización dependiente de Rac.

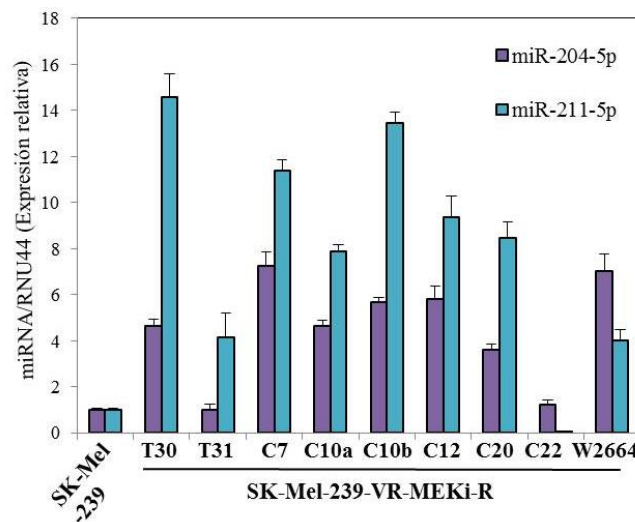
#### Expresión de los miRNAs seleccionados en otras células de melanoma resistentes a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas

En experimentos adicionales llevados a cabo en el laboratorio de la Dra. Eva Hernando (New York University), analizamos la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en otra línea celular de melanoma resistente a vemurafenib. Concretamente, a partir de las células SK-Mel-239, portadoras de la mutación BRAF V600E, se habían generado clones resistentes a 2 μM de VMF (Koetz-Ploch *et al.*, 2017). El análisis mediante qPCR reveló el aumento de expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en 4 y 5 de los 6 clones resistentes de estas células, respectivamente, y una disminución de miR-140-3p en 2 de los 6 clones resistentes (**Figura 71**). Se tomó como cambio el criterio  $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 1$  (es decir, que el miRNA se exprese el doble o la mitad en las células resistentes respecto de las parentales).



**Figura 71. Expresión de los miRNAs seleccionados en clones de células SK-Mel-239 resistentes a vemurafenib.** La expresión de los miRNAs de células SK-Mel-239 y de diferentes clones de SK-Mel-239-VR fue analizada por triplicado mediante qPCR (n=1).

Igualmente, pudimos analizar la expresión de los miRNAs en clones de SK-Mel-239 dobles resistentes a 1  $\mu$ M de vemurafenib y a 2  $\mu$ M de un inhibidor de MEK (PD0325901), tomando de nuevo como cambio de expresión el criterio  $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 1$ . De los 9 clones dobles resistentes, se observó un aumento del miR-204-5p y del miR-211-5p en 7 y 8 de ellos, respectivamente, en comparación con las células SK-Mel-239 parentales (Figura 72).



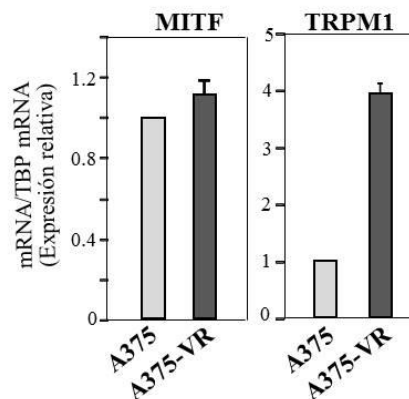
**Figura 72. Expresión de los miRNAs seleccionados en células SK-Mel-239 dobles resistentes a vemurafenib y a PD0325901.** La expresión de los miRNAs fue analizada por triplicado mediante qPCR (n=1).

Colectivamente, estos datos indican que el aumento de miR-204-5p y miR-211-5p no es un mecanismo restringido a la línea A375-VR, sino que podría constituir un mecanismo común asociado a la resistencia de células de melanoma tanto a VMF como al

tratamiento combinado de VMF y TMT. En cambio, la disminución del miR-140-3p podría representar un cambio menos frecuente.

### La mayor expresión de miR-211-5p en células A375-VR correlaciona con el aumento de expresión de TRPM1

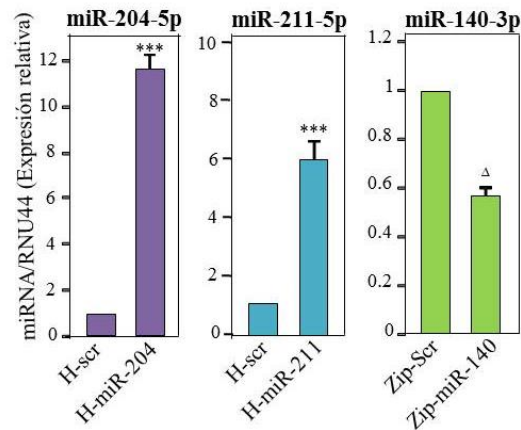
La localización cromosómica del mir-211 es 15q13.3, la cual coincide con la posición de la secuencia codificante para un miembro de la familia de TRPM, *TRPM1* (también llamado melastatina-1). Concretamente, en el intrón 6 de *TRPM1* se encuentra la secuencia del mir-211 (Levy *et al.*, 2010). La expresión de TRPM1 correlaciona generalmente de forma inversa con la agresividad del melanoma. Así, se ha descrito que la expresión de TRPM1 es alta en *nevi* benigno y displásico, variable en melanoma *in situ*, y su expresión está muy disminuida en melanomas invasivos y metastásicos (Duncan *et al.*, 2001; Duncan *et al.*, 1998). Puesto que tanto TRPM1 como miR-211 están reducidos en la mayoría de los melanomas malignos comparados con melanocitos (Duncan *et al.*, 2001; Duncan *et al.*, 1998; Kozubek *et al.*, 2013), esto sugería que ambos podían compartir un promotor común. Tras la identificación del factor de transcripción MITF como regulador transcripcional de *TRPM1* tanto en melanocitos como en melanoma (Miller *et al.*, 2004), se demostró posteriormente que la expresión de mir-211 y *TRPM1* es dependiente de MITF, de modo que tanto la melastatina-1 como miR-211 están coordinadamente regulados en melanomas (Levy *et al.*, 2010). Por tanto, en vista de la posible regulación del miR-211-5p por MITF, se analizaron mediante qPCR los niveles de expresión de mRNA tanto de MITF como de TRPM1 en las células A375 y A375-VR. Los resultados mostraron un aumento de expresión de TRPM1 en las células resistentes en comparación con las parentales, lo que estaría de acuerdo con el aumento de expresión observado para miR-211-5p en dichas células (Figura 73). No se detectaron cambios en los niveles de expresión de MITF.



**Figura 73. Aumento de la expresión del mRNA de TRPM1 en células A375-VR.** La expresión de MITF y TRPM1 fue analizada mediante qPCR en células A375 y A375-VR (n=3).

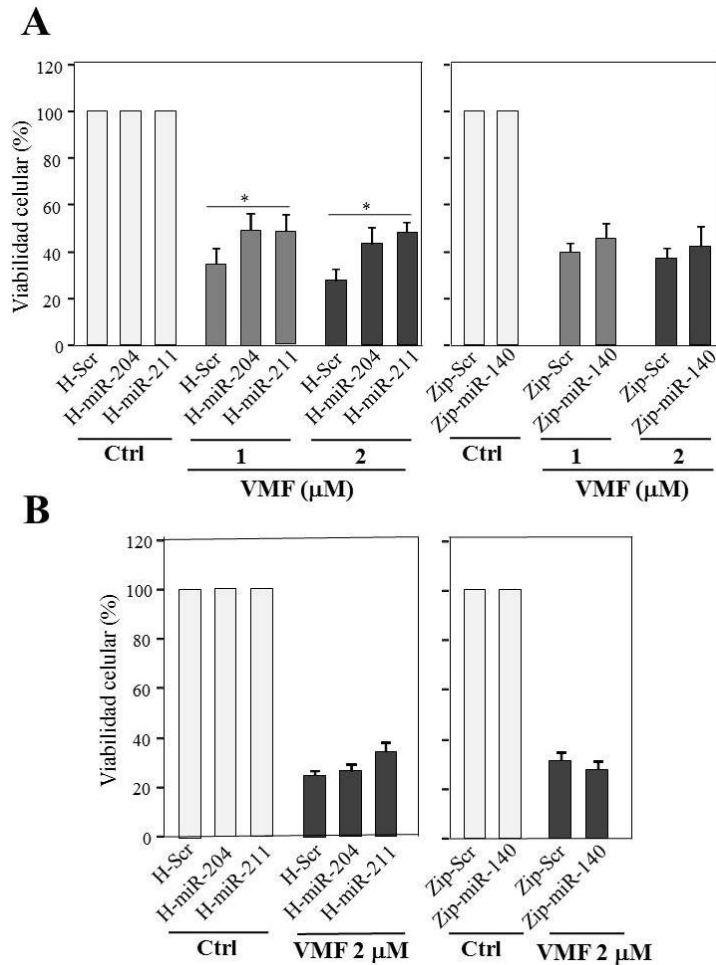
### Papel de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en la resistencia a vemurafenib en células de melanoma A375

Para estudiar la potencial implicación de estos tres miRNAs en la resistencia a VMF, se generaron mediante infección lentiviral células A375 parentales que sobre-expresaban establemente miR-204-5p o miR-211-5p, o que tenían silenciada la expresión de miR-140-3p (**Figura 74**).



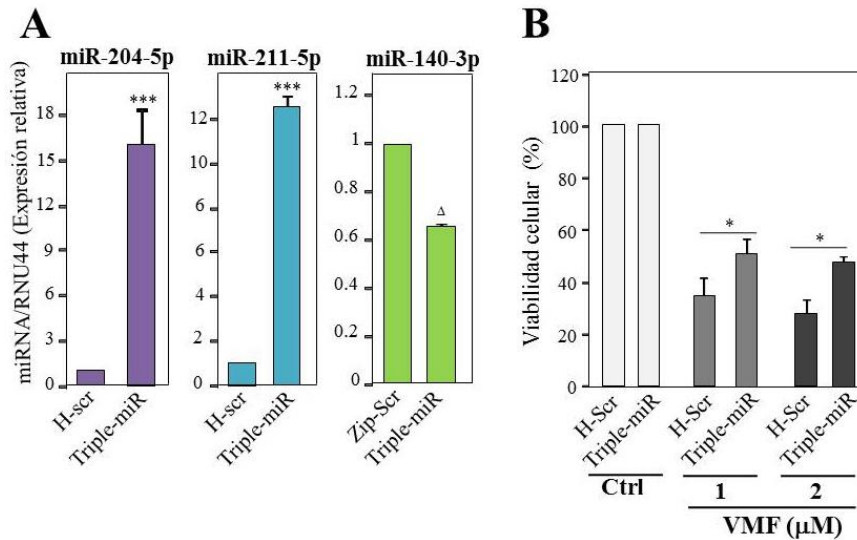
**Figura 74. Generación de células A375 con sobre-expresión estable de miR-204-5p o miR-211-5p, o silenciamiento de miR-140-3p.** Las células A375 fueron infectadas con vectores lentivirales para sobre-expresar (H-miR-) o silenciar (Zip-miR-) los miRNAs seleccionados. Los transfectantes (H-miR-204, H-miR-211 y Zip-miR-140) fueron analizados mediante ensayos de qPCR (n=3). \*\*\*Los miRNAs estaban significativamente aumentados en comparación con las células control H-scr,  $p < 0.001$ . <sup>Δ</sup>El miRNA estaba significativamente disminuido respecto de las células control Zip-scr,  $p < 0.05$ .

Estos transfectantes fueron utilizados en ensayos de viabilidad en presencia de vemurafenib, con el fin de analizar una posible implicación de estos miRNAs en el proceso de resistencia. Los resultados mostraron que las células que sobre-expresaban el miR-211-5p o el miR-204-5p aumentaron moderada, pero consistentemente, su resistencia a VMF en comparación con los transfectantes control (desde una viabilidad de 28-30% en células control H-scr, a 45-49% en los transfectantes H-miR-211 o H-miR-204) (**Figura 75A**). En cambio, no se detectaron alteraciones significativas en la viabilidad de las células silenciadas para miR-140-3p. Este incremento de resistencia de los transfectantes con sobre-expresión de miR-204-5p o miR-211-5p fue detectado en ensayos realizados en ausencia de suero, mientras que en los experimentos en los que se empleó suero (10%), tan sólo los transfectantes H-miR-211 mostraron una tendencia al aumento de la viabilidad, aunque no se obtuvieron diferencias significativas (**Figura 75B**).



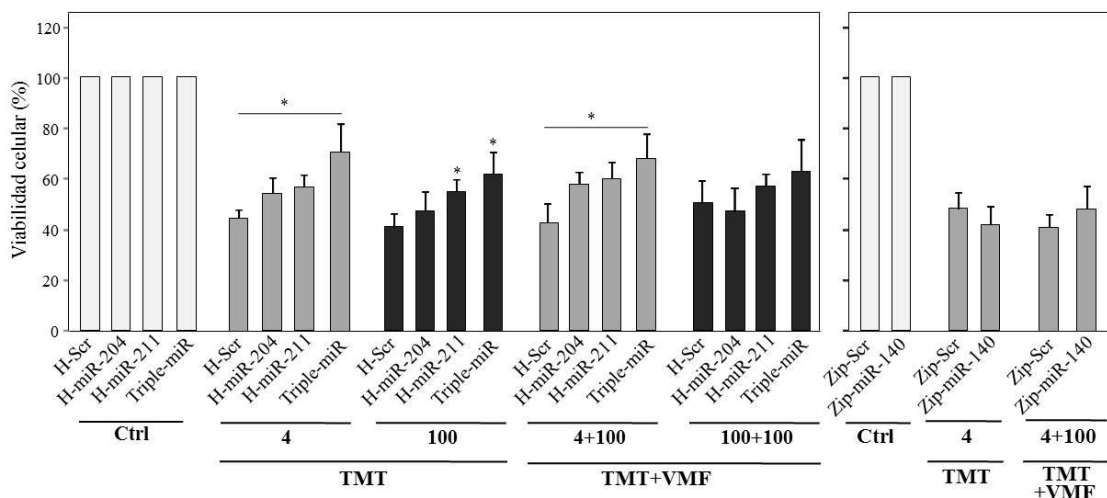
**Figura 75. Las células A375 con sobre-expresión de miR-204-5p o miR-211-5p muestran resistencia a vemurafenib.** Los transfectantes fueron expuestos a las concentraciones indicadas de VMF durante 24h en ausencia (A) o durante 48h presencia (B) de suero, y posteriormente testados en ensayos de viabilidad. (n=3-4; \*p<0.05).

Posteriormente generamos un triple transfectante, Triple-miR, a partir de las células H-miR-204 en las cuales se sobre-expresó el miR-211-5p y se silenció el miR-140-3p (**Figura 76A**). Dichos transfectantes Triple-miR fueron testados en ensayos de viabilidad en presencia de VMF, mostrando una mayor resistencia a dicho inhibidor (1-2  $\mu$ M) en relación con los transfectantes control (28% a 47% a concentraciones de VMF de 2  $\mu$ M) (**Figura 76B**). Estos resultados indican que la sobre-expresión tanto del miR-204-5p como del miR-211-5p en células A375 parentales, pero no el silenciamiento de miR-140-3p, confiere ventaja de supervivencia frente a vemurafenib.



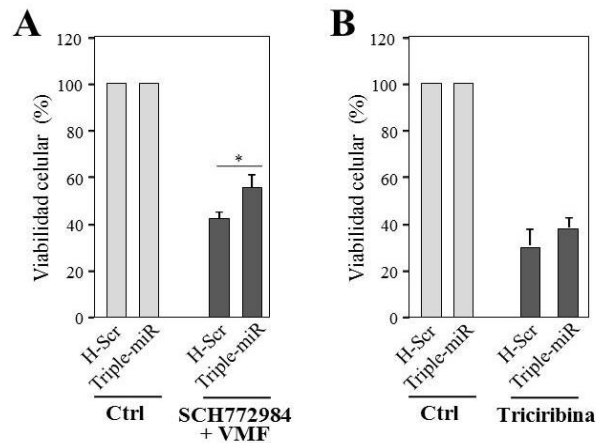
**Figura 76. Generación de células A375 Triple-miR y caracterización de su viabilidad frente a vemurafenib.** (A) Las células H-miR-204 fueron re-infectadas con vectores para sobre-expresar miR-211-5p y para silenciar miR-140-3p, y los transfectantes Triple-miR posteriormente analizados mediante qPCR (n=3; \*\*\*p<0.001,  $\Delta$ p<0.05). (B) Las células fueron tratadas durante 24h en ausencia de suero con las concentraciones indicadas de VMF, y su viabilidad comprobada en ensayos de MTT (n=4, \*p<0.05).

A continuación, los tranfectantes fueron expuestos a diferentes concentraciones de TMT, o a la combinación de VMF y TMT, observándose que las células H-miR-204, H-miR-211 y Triple-miR presentan mayor resistencia a TMT, así como a la combinación de bajas concentraciones de TMT y VMF en comparación con los transfectantes control (Figura 77). En consonancia con los resultados anteriores, los transfectantes Zip-miR-140 no incrementaron su resistencia, ni a TMT ni al tratamiento combinado.



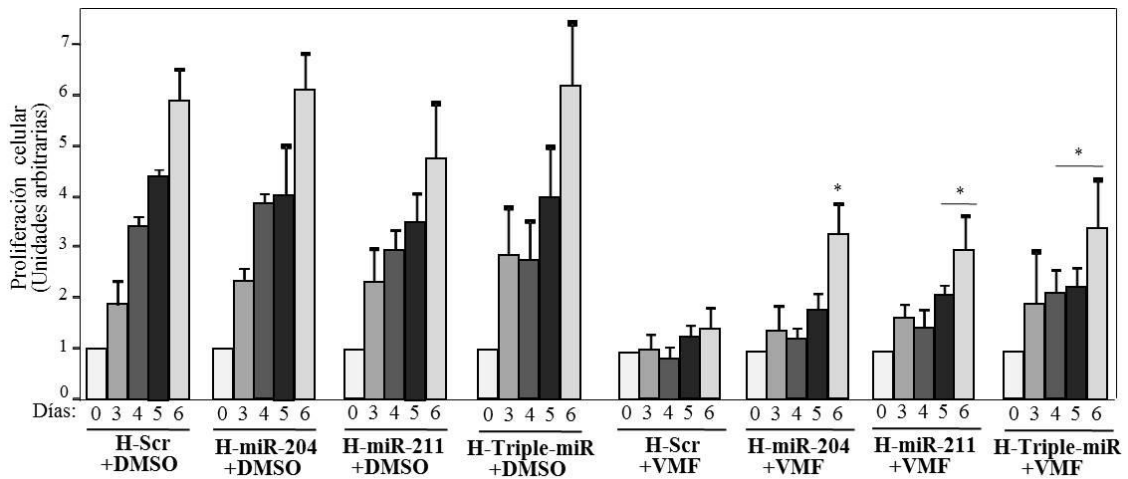
**Figura 77. Los transfectantes H-miR-204, H-miR-211 y Triple-miR muestran un aumento de viabilidad frente a trametinib o al tratamiento combinado de vemurafenib y trametinib.** Las células fueron tratadas durante 24 horas con las concentraciones indicadas de TMT o con la combinación de TMT y VMF, y posteriormente analizadas en ensayos de viabilidad (n=3, \* p<0.05).

Por el contrario, ninguno de los miRNAs analizados confirió resistencia al inhibidor de ERK1/2 SCH772984 (datos no mostrados). Cuando los transfectantes fueron analizados para el tratamiento combinado de VMF y SCH772984, sólo las células Triple-miR mostraron un moderado incremento de su viabilidad (**Figura 78A**). En cambio, ni estos transfectantes (**Figura 78B**), ni el resto de ellos (datos no mostrados) mostraron cambios significativos de su viabilidad en presencia de triciribina relativo a los transfectantes control.



**Figura 78.** Los transfectantes Triple-miR presentan mayor viabilidad frente al tratamiento combinado de vemurafenib y SCH772984. Las células fueron cultivadas durante 24 horas con SCH772984 (50 nM) y VMF (100 nM) (A), o con triciribina (5  $\mu$ M) (B), y posteriormente analizadas en ensayos de viabilidad (n=2, \*p<0.05).

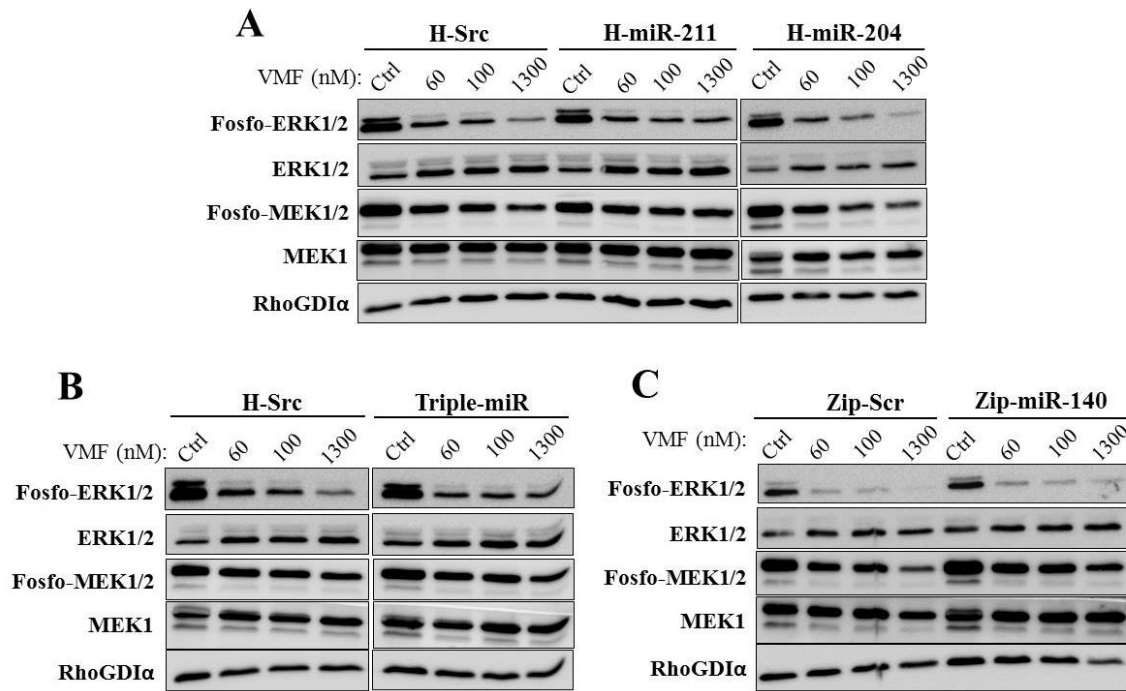
Confirmación adicional de la contribución de miR-204-5p y miR-211-5p a la resistencia a VMF surgió de ensayos de proliferación celular hasta 6 días efectuados con suero (10%), los cuales mostraron que los transfectantes H-miR-204, H-miR-211 y Triple-miR presentan un aumento significativo de su capacidad proliferativa en presencia de VMF en comparación con los transfectantes control H-scr (**Figura 79**). Por el contrario, los transfectantes Zip-miR-140 carecían de esta ventaja proliferativa en relación a sus transfectantes control Zip-scr (resultados no mostrados).



**Figura 79. Aumento de la capacidad proliferativa en presencia de vemurafenib de transfectantes con sobre-expresión de miR-204-5p o miR-211-5p, y de los transfectantes Triple-miR.** La proliferación de los transfectantes expuestos durante los tiempos indicados a VMF (100 nM) fue determinada mediante ensayos de proliferación con cristal violeta (n=2). \*La proliferación celular aumentó significativamente en comparación con las células H-scr tratadas durante los tiempos correspondientes,  $p < 0.05$ .

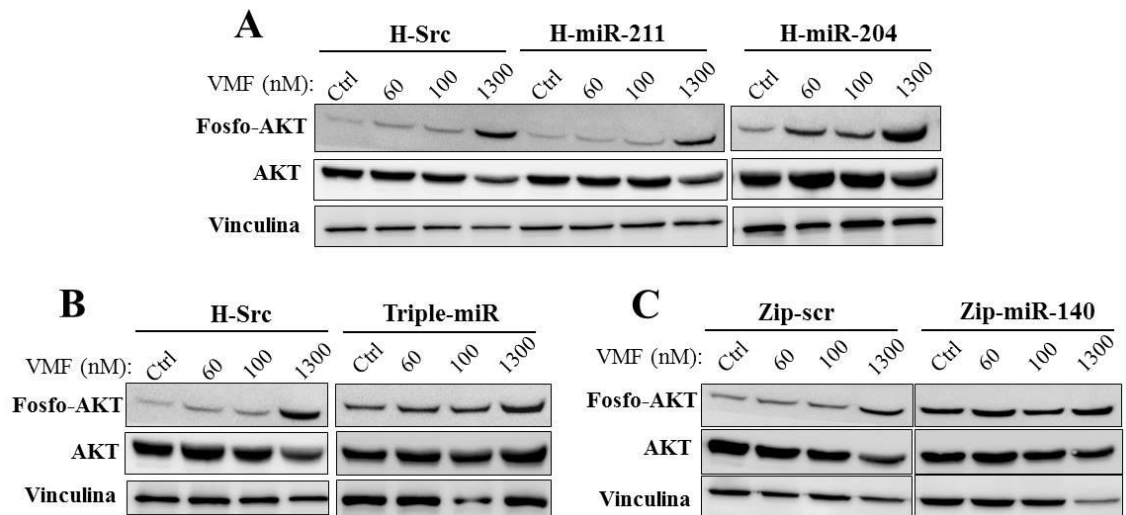
#### Análisis de la activación de la vía de las MAP-quinasas y de PI3-quinasa/AKT en los transfectantes de miRNA

En los siguientes experimentos analizamos el estado de activación de la vía de las MAP-quinasas, no observando diferencias significativas en los niveles basales de fosforilación de ERK1/2 o MEK1/2 en los distintos transfectantes de miRNA en relación con los transfectantes control (**Figura 80A-C**). La exposición de los transfectantes a VMF mostró un moderado incremento en la fosforilación de ERK1/2 en los transfectantes que sobre-expresaban miR-211-5p y en los Triple-miR a las concentraciones más altas del inhibidor (1.3  $\mu\text{M}$ ) en relación con las células control. No se detectaron alteraciones de la fosforilación de ERK1/2 o MEK1/2 en los transfectantes H-miR-204-5p o Zip-miR-140-3p. Adicionalmente, un pequeño aumento en la fosforilación de MEK1/2 fue asimismo detectado en los transfectantes miR-211-5p (**Figura 80A**).



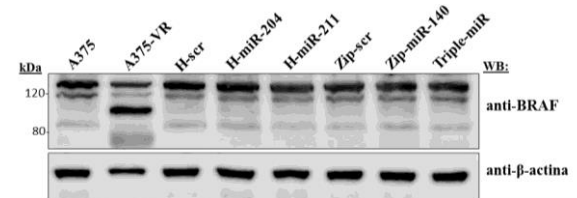
**Figura 80. Análisis de la activación de la vía de las MAP-quinasas en los transfectantes de miRNA.** (A- C) Las células fueron incubadas durante 24 horas en ausencia de suero y en presencia de las concentraciones indicadas de VMF, y posteriormente analizadas mediante *immunoblotting*. Se muestra un resultado representativo de tres independientes.

Asimismo, se examinó la posibilidad de que existieran diferencias en la activación de la vía PI3-K/AKT en respuesta al tratamiento con vemurafenib. En estos análisis, los cuales fueron realizados durante 48 horas en presencia de suero para poder detectar dicha fosforilación, se observó un aumento de fosforilación de AKT en las células Triple-miR y Zip-miR-140 en comparación con sus controles (**Figura 81A-C**).



**Figura 81. Análisis de la activación de la vía PI3-quinasa/AKT en los transfectantes de miRNA.** (A- C) Los transfectantes fueron expuestos durante 48 horas en presencia de suero a las concentraciones indicadas de VMF, y posteriormente analizados mediante *western blotting*. Se muestra un resultado representativo de tres independientes.

Por otra parte, analizamos si la isoforma de BRAF de 90-100 kDa que habíamos detectado en las células A375-VR (ver Figura 45C) se expresaba asimismo en los transfectantes de miRNA generados. El análisis mediante *western blot* reveló que ninguno de estos transfectantes expresaba dicha isoforma de BRAF (Figura 82).



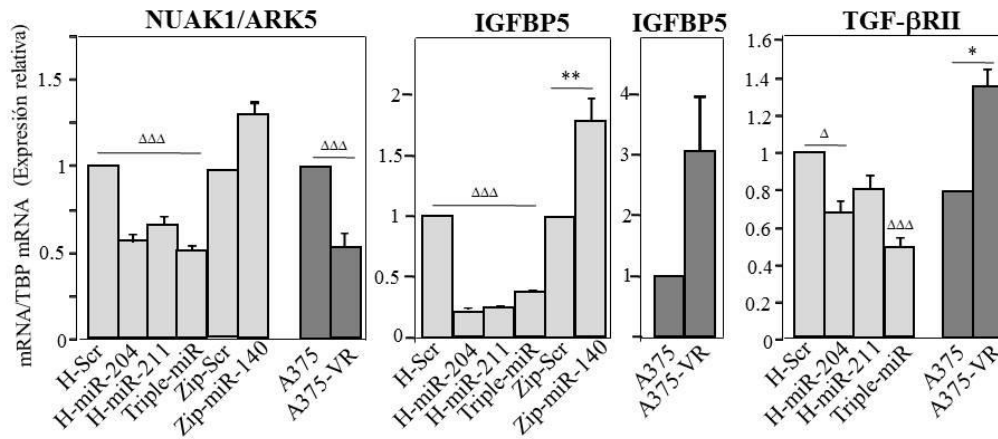
**Figura 82. Análisis de la expresión de BRAF en los transfectantes de miRNA.** Las células fueron analizadas mediante *western blotting* con los anticuerpos indicados.

### Análisis de la expresión de potenciales dianas de los miRNAs seleccionados

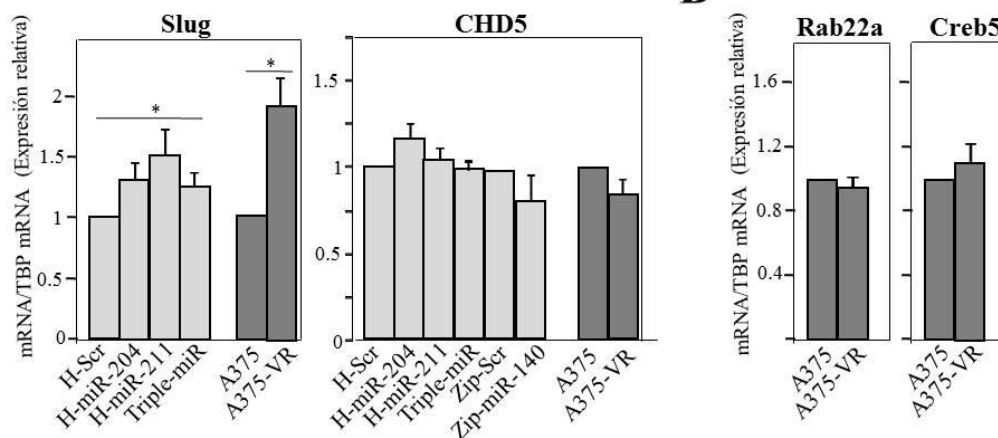
El miR-204-5p y el miR-211-5p presentan secuencias nucleotídicas muy similares en su forma madura, compartiendo la misma *seed sequence*, y difiriendo tan solo en dos nucleótidos en toda su secuencia. De acuerdo con las bases de datos para miRNAs ([www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw](http://www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw)), esta alta homología hace que ambos miRNAs tengan un número importante de dianas comunes.

Basándonos en previas publicaciones así como en bases de datos públicas, se seleccionaron dianas comunes de los miRNAs miR-204-5p y miR-211-5p. Entre éstas se incluye NUAK1/AKR5, IGFBP5, TGF- $\beta$ R2, Slug y CHD5, las cuales fueron objeto de análisis de expresión mediante qPCR. Los resultados mostraron que el mRNA de NUAK1 estaba disminuido en las células A375-VR en relación con las A375 parentales, así como en los transfectantes H-miR-204, H-miR-211 y Triple-miR (Figura 83A). En cambio, no se detectaron diferencias en la expresión de NUAK1 en los transfectantes que tenían el miR-140-3p silenciado. Aunque se observa una reducción de los mRNAs tanto de IGFBP5 como de TGF- $\beta$ R2 en los transfectantes con sobre-expresión de miR-204-5p y miR-211-5p, así como en las células Triple-miR, confirmando que representan dianas de estos miRNAs, la expresión de IGFBP5 y de TGF- $\beta$ R2 aumentó en las células A375-VR, indicando que posiblemente otros mecanismos estén regulando el aumento de expresión de estas dianas en las células resistentes. Asimismo, los transfectantes Zip-miR-140 mostraron un aumento en los niveles de expresión de IGFBP5 (Figura 83A), pese a que IGFBP5 ha sido descrito como diana de miR-140-5p, pero no de miR-140-3p. Contrariamente a lo que esperábamos, el mRNA de Slug estaba aumentado en los trasfectantes con sobre-expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y en las células Triple-miR, así como en las células resistentes a vemurafenib. No se encontraron cambios en la expresión de CHD5 para ninguno de los transfectantes, ni para las células A375-VR. Asimismo, se analizó la expresión de Rab22a y Creb5, dos dianas adicionales comunes para miR-204-5p y miR-211-5p, sin encontrarse diferencias en las células A375-VR respecto de las A375 parentales (Figura 83B).

**A**

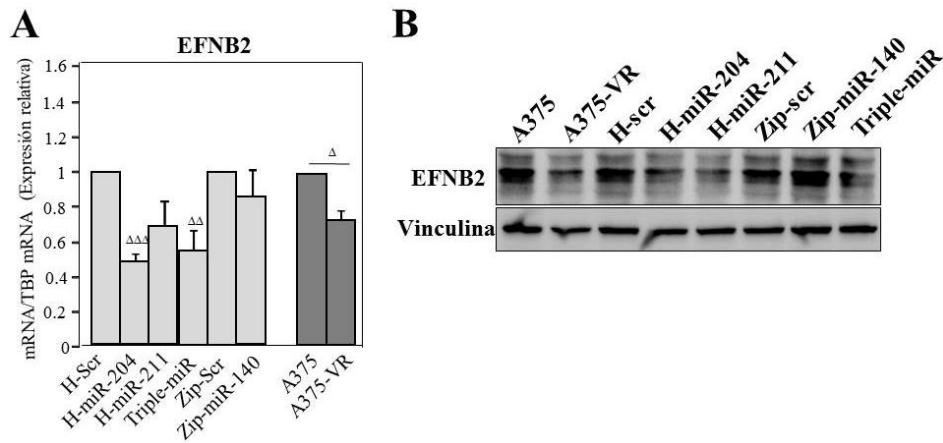


**B**



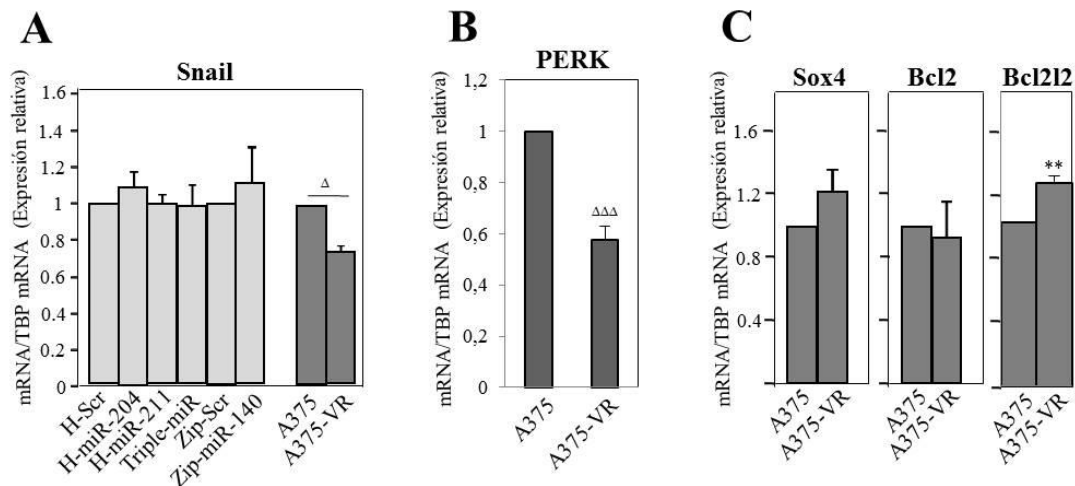
**Figura 83. Análisis de la expresión de dianas comunes de miR-204-5p y miR-211-5p.** (A, B) La expresión de los mRNAs para las dianas indicadas en los transfectantes de miRNA así como en células A375 y A375-VR fue determinada mediante qPCR (n=3, \*\*p<0.01, \*p<0.05, ΔΔΔp<0.001, Δp<0.05).

Posteriormente, se analizó la expresión de la efrina-B2 (EFNB2), una diana de miR-204-5p. Ensayos de qPCR y de *immunoblotting* revelaron que la expresión de efrina-B2 estaba disminuida en los transfectantes H-miR-204 y Triple-miR, así como en las células A375-VR, pero no en los transfectantes silenciados para miR-140-3p (**Figura 84A-B**). Aunque no se ha descrito hasta la fecha que la efrina-B2 sea una diana del miR-211-5p, observamos una disminución de los niveles tanto de mRNA como proteicos de efrina-B2 en los transfectantes H-miR-211. Una posible explicación podría estar relacionada con la similitud de las secuencias nucleotídicas entre miR-204-5p y el miR-211-5p, si bien no descartamos otras posibilidades.



**Figura 84. Análisis de la expresión de efrina-B2 en los transfectantes de miRNA y en células A375-VR.** (A) Análisis de la expresión de EFNB2 mediante qPCR (A; n=3,  $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ ,  $\Delta\Delta p < 0.01$ ,  $\Delta p < 0.05$ ) o western blot (B).

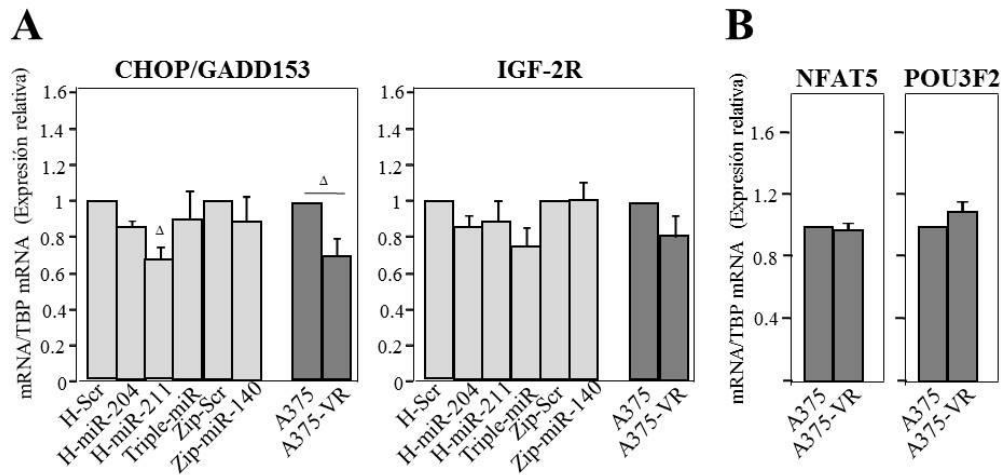
Por otra parte, observamos que la expresión de Snail, otra potencial diana del miR-204-5p, estaba reducida en las células A375-VR, pero no en los transfectantes de miRNA (Figura 85A). PERK ha sido descrito como diana de miR-204-5p (Xu *et al.*, 2016), y el análisis de su expresión mediante qPCR reveló la disminución de PERK en las células resistentes a vemurafenib (Figura 85B). Asimismo, Sox4, Bcl2 y Bcl2l2 representan dianas adicionales validadas de miR-204-5p. Mientras que la expresión de Sox4 y Bcl2 no presentaba variaciones entre las células A375-VR y las parentales, la expresión de Bcl2l2 estaba ligeramente incrementada en las células A375-VR (Figura 85C), sugiriendo que su expresión no estaría regulada en este caso por el miR-204-5p.



**Figura 85. Análisis de la expresión de potenciales dianas de miR-204-5p.** (A-C) La expresión de las dianas indicadas de miR-204-5p fue determinada mediante qPCR (n=3;  $\Delta p < 0.05$ ,  $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ).

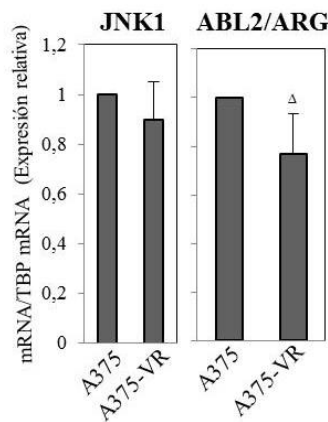
El factor pro-apoptótico CHOP/GADD153 es una conocida diana de miR-211-5p (Chitnis *et al.*, 2012). Los resultados del análisis de su expresión mediante qPCR mostraron una disminución del mRNA de CHOP en los transfectantes que sobre-expresan miR-211-5p, así como en las células resistentes a vemurafenib (Figura 86A). PERK es uno de los

principales inductores de la expresión de CHOP (Szegezdi *et al.*, 2006; Tabas and Ron, 2011), por lo que la disminución de la expresión de CHOP podría deberse tanto al aumento del miR-211-5p como a la disminución de PERK en las células resistentes. Por el contrario, la expresión de IGF-2R, el cuales asimismo diana del miR-211-5p, no resultó alterada en ninguno de los transfectantes ni en las células A375-VR (Figura 86A). Asimismo, la expresión de dos dianas adicionales del miR-211-5p, NFAT5 y POU3F2, no sufrió alteraciones en las células resistentes respecto de las sensibles (Figura 86B).



**Figura 86. Análisis de la expresión de dianas del miR-211-5p.** (A, B) La expresión de los mRNA de las dianas indicadas en los transfectantes y/o en las células A375 y A375-VR fue analizada mediante qPCR (n=3, <sup>Δ</sup>p<0.05).

Entre las dianas del miR-140-3p está JNK1 (Hafner *et al.*, 2010). Sin embargo, los experimentos de qPCR para comprobar la expresión de su mRNA no revelaron diferencias significativas entre células A375-VR y A375 (Figura 87). Adicionalmente, el mRNA para ABL2/ARG, otra posible diana de miR-140-3p, estaba moderadamente disminuido en las células A375-VR, lo que era opuesto al esperado aumento de expresión por la disminución de los niveles de miR-140-3p en estas células.

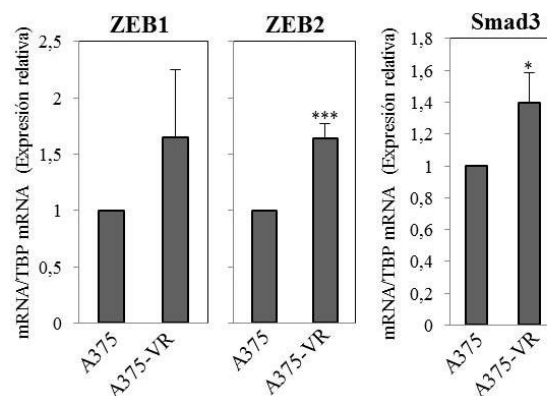


**Figura 87. Análisis de la expresión de dianas del miR-140-3p.** La expresión de JNK1 y ABL2/ARG fue analizada mediante qPCR (n=3; <sup>Δ</sup>p<0.05).

### Análisis de la expresión de mRNAs implicados en la transición epitelio-mesénquima en células A375-VR

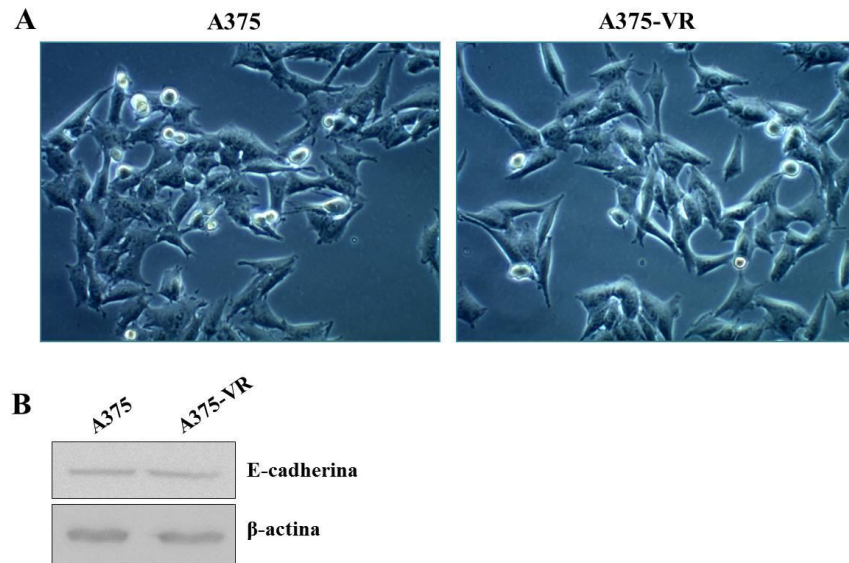
Snail y Slug son miembros de la familia Snail, la cual regula el proceso de la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Sanchez-Tillo *et al.*, 2012). Puesto que los niveles de Slug estaban incrementados en las células A375-VR, se examinó si otros factores implicados en el proceso de EMT, como las proteínas ZEB, podían tener alterada su expresión. Pudimos observar que el mRNA de ZEB2 estaba significativamente aumentado en las células A375-VR relativo a las parentales, mientras que detectamos asimismo mayor expresión de ZEB1 aunque no alcanzó niveles de significación (**Figura 88**).

Dado que la expresión de marcadores de EMT puede ser regulada, entre otros, por la señalización desencadenada por TGF- $\beta$  (Garg, 2013), y debido a que habíamos detectado mayor expresión del mRNA de TGF- $\beta$ RII en las células A375-VR que en las parentales, se analizó mediante qPCR la expresión de Smad3, uno de los componentes principales de la señalización dependiente de TGF- $\beta$  (Principe *et al.*, 2014). Los resultados mostraron asimismo un aumento de la expresión del mRNA de Smad3 en las células resistentes a vemurafenib (**Figura 88**).



**Figura 88.** Las células A375-VR presentan un aumento de la expresión de ZEB2 y Smad. Análisis mediante qPCR de la expresión de los mRNAs indicados en las células A375 y A375-VR (n=3; \*\*\*p<0.001, \*p<0.05).

El cambio de morfología celular es una de las alteraciones más notables durante la transición EMT (Garg, 2013). Sin embargo, no observamos cambios en la morfología celular (**Figura 89A**), ni tampoco se detectaron diferencias en la expresión de E-cadherina (**Figura 89B**), un marcador cuya expresión frecuentemente disminuye durante la EMT (Sanchez-Tillo *et al.*, 2012).



**Figura 89. Morfología de las células A375 y A375-VR y análisis de la expresión de E-cadherina.** (A) Se muestra una imagen representativa obtenida con un microscopio óptico de campo claro. (B) Análisis mediante *western blotting* de la expresión de E-cadherina, utilizándose  $\beta$ -actina como control de carga.

*-DISCUSIÓN-*



## I. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN $G\alpha_{13}$ -Blk-p190RhoGAP REGULA LA ACTIVACIÓN DE RhoA Y LA INVASIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA A CXCL12.

La reorganización controlada del citoesqueleto de actina necesaria para los procesos de migración e invasión celular depende en gran medida de las GTPasas Rho, cuyas actividades están reguladas por la acción de las GEFs y las GAPs (Cherfils y Zeghouf, 2013; Etienne-Manneville y Hall, 2002). Asimismo, la señalización por las proteínas de la familia  $G\alpha_{12/13}$  desencadenada tras la unión de ligandos a sus GPCRs es fundamental en esta regulación, ya que controla la activación de GEFs y GAPs (Worzfeld *et al.*, 2008). Se ha descrito previamente que la activación de  $G\alpha_{13}$  puede traducirse tanto en estimulación como en inhibición de la activación de RhoA (Bartolome *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2006a; Kelly *et al.*, 2006b). Así, resultados anteriores en células de melanoma mostraron que la activación de  $G\alpha_{13}$  provoca una inhibición de RhoA dependiente de p190RhoGAP, y que dicha inhibición se opone a la estimulación de la invasión mediada por CXCL12. Asimismo, dichos resultados apuntaban a una implicación de miembros de las Src quinasas en la fosforilación de p190RhoGAP tras la activación de  $G\alpha_{13}$  (Bartolome *et al.*, 2008).

Los resultados de la presente Tesis muestran la implicación de la Src quinasa Blk en la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP en respuesta a la activación de  $G\alpha_{13}$ . Esta conclusión se basa en los resultados obtenidos tras el silenciamiento o sobre-expresión de diferentes formas de Blk. El silenciamiento de Blk impide la fosforilación de p190RhoGAP en células de melanoma activadas en  $G\alpha_{13}$ , lo que provoca el rescate de la activación de RhoA y la invasión celular hacia CXCL12. Dado que la fosforilación en el residuo Tyr 1105 de p190RhoGAP es crucial para la actividad GAP sobre RhoA, nuestros datos sugieren que dicha tirosina representaría una de las dianas de Blk. Por el contrario, la sobre-expresión de Blk *wild type* o la forma activa Blk  $\Delta$ Ct en transfectantes  $G\alpha_{13}$  se traduce en mayor fosforilación de p190RhoGAP que en las células *mock*, lo que se correlaciona con la inactivación de RhoA y con la disminución de la invasión celular. Notablemente, la expresión ectópica de Blk en células carentes o con baja expresión de esta quinasa, como las células MDA-MB-231 o A375, respectivamente, provoca un aumento de fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP, lo que conduce a una inhibición de la activación de RhoA.

Estos resultados se refuerzan con los datos de fosforilación obtenidos en los ensayos *in vitro* quinasa usando inmunoprecipitados de Blk *wild type* junto con la proteína recombinante GST-p190RhoGAP, donde se demuestra la capacidad de Blk para mediar la fosforilación en tirosinas de esta GAP. Aunque estos datos sugieren que Blk podría fosforilar directamente a p190RhoGAP, no podemos descartar por el momento que esta quinasa pudiera activar a otra tirosina quinasa que fuera la responsable de fosforilar directamente a p190RhoGAP.

Nuestros datos muestran asimismo que Blk es capaz de asociarse a  $G\alpha_{13}$  cuando esta proteína G está en su estado basal. Esta observación estaría de acuerdo con la interacción entre  $G\alpha_{13}$  y c-Src previamente descrita en fibroblastos (Bunda *et al.*, 2009). Por el

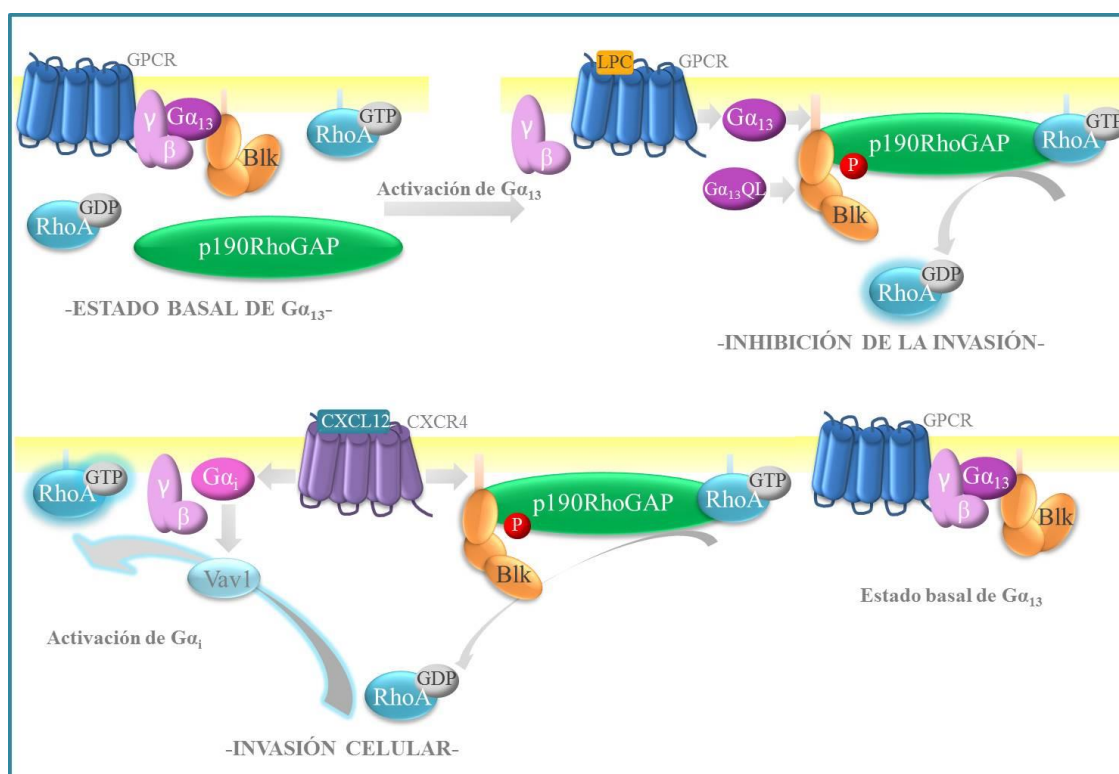
momento, desconocemos si  $G\alpha_{13}$  se une directamente a Blk, o si existen otras proteínas mediadoras de esta asociación, puesto que tanto los resultados obtenidos en los ensayos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Blk o anti- $G\alpha_{13}$  como en los ensayos de *pull down* con GST-Blk wt no descartan que pudieran existir proteínas mediadoras de esta unión. Notablemente, hemos observado que el aumento de fosforilación de p190RhoGAP dependiente de Blk tras la activación de  $G\alpha_{13}$  correlaciona con la disminución de la asociación  $G\alpha_{13}$ -Blk y con un posterior incremento de la unión de Blk a p190RhoGAP. Dado que la posible asociación de  $G\alpha_{13}$  a p190RhoGAP no se detectó en las co-inmunoprecipitaciones con anti- $G\alpha_{13}$ , esto sugeriría la existencia de dos complejos funcionales en función de la activación de  $G\alpha_{13}$ : por una parte  $G\alpha_{13}$ -Blk y por otra Blk-p190RhoGAP-RhoA.

En vista de que habíamos demostrado que el silenciamiento de  $G\alpha_{13}$  conduce a un bloqueo de la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP en respuesta a LPC (Bartolome *et al.*, 2008), estos datos junto con los presentes resultados indicarían que  $G\alpha_{13}$  en su estado basal se opone a la correcta activación de Blk. Por ello, sugerimos un modelo por el cual una población de moléculas de Blk recientemente disociada de  $G\alpha_{13}$  activo podría posteriormente formar un complejo con p190RhoGAP e inducir la fosforilación de esta GAP (**Figura 90**). Este hecho causaría la subsiguiente inactivación de RhoA y el bloqueo de la invasión celular hacia CXCL12. Desconocemos por el momento los eventos moleculares implicados en la disminución de la asociación de Blk con  $G\alpha_{13}$  activada, y si dicha disminución directamente se traduce en la generación de una conformación abierta de Blk y por tanto en la activación de esta quinasa, desde una estructura cerrada cuando está asociada a  $G\alpha_{13}$  inactiva. En conjunto, estos resultados identifican a Blk como un componente molecular *downstream* de  $G\alpha_{13}$  activada e inmediatamente *upstream* de la vía p190RhoGAP-RhoA, colectivamente representando un módulo de señalización opuesto a la invasión estimulada por CXCL12.

El efecto inhibitorio en la invasividad celular tras el aumento de la expresión o actividad de Blk, o por el contrario la estimulación de la invasión posterior al silenciamiento de Blk en transfectantes activados en  $G\alpha_{13}$  que hemos observado *in vitro*, podrían constituir mecanismos que regulan su migración y diseminación en los pulmones de los ratones SCID. De este modo, la activación de la vía de señalización  $G\alpha_{13}$ -Blk-p190RhoGAP que provoca la inactivación de RhoA, limitaría la migración y la colonización pulmonar de las células de melanoma. Asimismo, la incapacidad de las células que sobre-expresan formas activas de Blk de formar colonias en los ensayos de *soft agar* podría representar un mecanismo adicional al retraso en el crecimiento de las metástasis en pulmón observado en ratones inoculados con estas células. Estos datos asignarían a Blk un papel como supresor tumoral, en línea con la observación de que la inhibición de Blk acelera el desarrollo de leucemia mieloide crónica, mientras que su activación retrasa su progresión (Zhang *et al.*, 2012). Asimismo, puesto que RhoA es requerido, junto con Ras, durante el proceso de crecimiento independiente de anclaje (Khosravi-Far *et al.*, 1995; Sahai *et al.*, 1999), la inactivación de

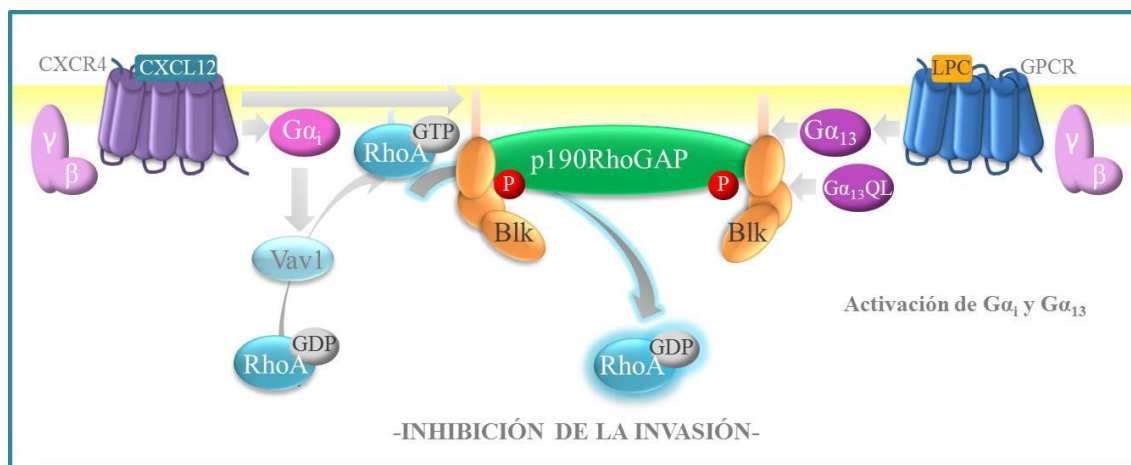
RhoA tras fosforilación de p190RhoGAP en las células Blk  $\Delta$ Ct, podría representar una explicación de la pérdida de crecimiento de estas células en dichas condiciones, y como consecuencia, una mayor supervivencia de los ratones.

Los análisis con células deplecionadas para Blk o  $G\alpha_{13}$  indicaron que esta Src quinasa puede asimismo contribuir a la fosforilación de p190RhoGAP en respuesta a CXCL12 independientemente de la señalización por  $G\alpha_{13}$  (**Figura 90**). Dado que la señalización dependiente de CXCL12/CXCR4 implica preferentemente a  $G\alpha_i$  (Broxmeyer *et al.*, 2003; Dillenburg-Pilla *et al.*, 2015) y que las proteínas  $G\alpha_i$  activadas por CXCR4 son capaces de activar proteínas de la familia Src (Busillo y Benovic, 2007), nuestros datos sugieren la presencia de distintos *pools* de Blk que actuarían sobre p190RhoGAP por diferentes mecanismos dependiendo de si la señalización es desencadenada por  $G\alpha_{13}$  o por  $G\alpha_i$ . La hipótesis de la presencia de estos *pools* de Blk, uno asociado a  $G\alpha_{13}$  y el otro a  $G\alpha_i$ , se refuerza con los resultados de co-inmunoprecipitación, en los cuales mostramos que la unión de Blk a  $G\alpha_{13}$  no se modifica en respuesta al tratamiento con CXCL12, pero sí se observa el aumento de la asociación Blk-p190RhoGAP. Es importante destacar que, incluso si CXCL12 induce la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP mediada por Blk en las células BLM, la estimulación simultánea del GEF Vav1 por la quimioquina se traduce en un incremento neto de la activación de RhoA y en una estimulación de la invasión celular (Bartolome *et al.*, 2004). Esto sugiere que la activación por CXCL12 tendría un efecto funcionalmente predominante sobre Vav1 comparado con la activación de p190RhoGAP.



**Figura 90. Modelo de la implicación de la vía  $G\alpha_{13}$ -Blk-p190RhoGAP en la regulación de la activación de RhoA y de la invasión celular.** (Arriba) Se muestra el estado basal de  $G\alpha_{13}$ , así como los eventos moleculares inducidos tras la activación de  $G\alpha_{13}$  por LPC o por la expresión de  $G\alpha_{13}$  QL que causan inactivación de RhoA y bloqueo de la invasión celular. (Abajo) Eventos moleculares que favorecen la activación de RhoA y la invasión celular mediados por la estimulación con CXCL12 independientemente de  $G\alpha_{13}$ .

Sólo cuando se induce la activación de  $G\alpha_{13}$ , vía estimulación con LPC o expresión de  $G\alpha_{13}$  QL, se genera suficiente actividad de Blk para promover los adecuados niveles de fosforilación de p190RhoGAP que causan inhibición de RhoA y de la invasión celular en respuesta a la señalización por CXCL12 (**Figura 91**). De hecho, la activación de  $G\alpha_{13}$  junto con la estimulación de CXCL12 produce la disminución de la actividad de RhoA y de la invasión, lo que indica que la señalización vía  $G\alpha_{13}$  es más potente que la inducida por CXCL12. Por tanto, estos resultados implican que el complejo Blk-p190RhoGAP constituye un punto común de la señalización tras la activación del eje CXCL12/CXCR4 y  $G\alpha_{13}$ , con un importante papel en el control de la invasión dependiente de RhoA.



**Figura 91. Modelo de los eventos moleculares desencadenados tras estimulación combinada de  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_{13}$  que causan inactivación de RhoA e inhibición de invasión celular.** La combinación de la exposición celular a CXCL12, que induce señalización vía  $G\alpha_i$ , con la activación de  $G\alpha_{13}$ , ya sea inducida por LPC o por la expresión de  $G\alpha_{13}$  QL, tiene como resultado global la inactivación de RhoA y la inhibición de la invasión celular.

Se ha demostrado que la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP en fibroblastos depende de c-Src (Haskell *et al.*, 2001; Roof *et al.*, 1998). Aunque las células BLM expresan otros miembros de la familia de las Src quinasas, incluyendo a c-Src, tal y como hemos mencionado, nuestros resultados muestran que la fosforilación de p190RhoGAP tras la activación de  $G\alpha_{13}$  depende principalmente de Blk. Notablemente, la línea celular MDA-MB-231 expresa siete miembros diferentes de la familia Src, pero no Blk, y sin embargo no se detecta fosforilación de p190RhoGAP tras la activación de  $G\alpha_{13}$ . Tan sólo cuando se expresa Blk en estas células se observa fosforilación de p190RhoGAP, asociado a una mayor unión a RhoA y a una disminución de la activación de dicha GTPasa. La importancia de Blk en la regulación de la activación de RhoA se pone de manifiesto por el hecho de que células con altos niveles de Blk, como BLM o MeWo, presentan menor activación de RhoA en células con  $G\alpha_{13}$  activo (Bartolome *et al.*, 2008). Por su parte, las células MDA-MB-231 y A375, ambas con ausencia o baja expresión de Blk, presentan mayor activación de RhoA tras la expresión de  $G\alpha_{13}$  activo. Esto sugiere que el efecto de la estimulación de  $G\alpha_{13}$  sobre el grado de activación de RhoA podría depender de los niveles de expresión de Blk, y no del tipo celular. Existen varias posibles explicaciones para estas observaciones. El árbol filogenético de la familia de las Src quinasas presenta dos grupos separados. Por una parte, c-Src, Fyn, Yes y Fgr, y por otro lado Lyn, Hck, Lck y Blk (Bradham *et al.*, 2006; O'Neill *et al.*, 2004). Notablemente, Blk es el miembro más divergente de este segundo grupo, lo que podría conferir a Blk una serie de características estructurales, espaciales o funcionales distintivas que podrían favorecer su asociación y su actividad quinasa sobre p190RhoGAP en las células BLM.

Una explicación alternativa implicaría a una potencial actividad tirosina fosfatasa que actuaría defosforilando a p190RhoGAP. Sin embargo, esto es improbable, ya que hemos detectado niveles sustanciales de fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP tras la

transfección de Blk en las células MDA-MB-231 y A375. Aun así, existe la posibilidad de que la actividad de las fosfatasa s tuviera lugar preferentemente sobre otros residuos de tirosina fosforilados por otras tirosina quinasa s en p190RhoGAP, y no sobre los residuos fosforilados por Blk expresado ectópicamente.

Una explicación más probable estaría relacionada con la regulación de la activación de las Src quinasa s por tirosina fosfatasa s y por la quinasa Csk (Boggon y Eck, 2004). El aumento en la fosforilación en tirosina s de p190RhoGAP observado en las células BLM, y la notable inducción de esta fosforilación en las células MDA-MB-231 tras el tratamiento con pervanadato de sodio sugiere que estas células conservan la maquinaria necesaria para llevar a cabo una eficiente actividad tirosina quinasa sobre dicha GAP, y que la actividad de tirosina fosfatasa s probablemente se opone a la fosforilación de p190RhoGAP dependiente de proteína s Src. Varias tirosina fosfatasa s, entre las que se incluyen PTPN2, PTPN6 y PTPN22, contribuyen a la defosforilación de la “tirosina activadora” localizada en el dominio quinasa (Tyr 419 en c-Src humano), lo que conduce a la inactivación de las SFKs (Chiang y Sefton, 2001; Maksumova *et al.*, 2005; Prakash *et al.*, 2007; van Vliet *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 1992). Por su parte, la “tirosina inactivadora” en el extremo C-terminal (Tyr 530 en c-Src humano) es fosforilada por Csk, lo cual constituye uno de los principales mecanismos que causan la inactivación de las SFKs (Chong *et al.*, 2005; Prakash *et al.*, 2007). Este proceso implica el ensamblaje de los dominios SH2, SH3 y el dominio quinasa en una conformación cerrada y auto-inhibida (Boggon y Eck, 2004). Por lo tanto, una elevada actividad de Csk y/o de tirosina fosfatasa s sobre tirosina s en el extremo C-terminal o en el dominio quinasa, respectivamente, podrían ser responsables de la falta de fosforilación en tirosina s de p190RhoGAP en las células MDA-MB-231. Asimismo, podría representar uno de los mecanismos implicados en la activación de RhoA en estas células tras la expresión de  $G\alpha_{13}$  QL (Kelly *et al.*, 2006a). En conjunto, estos datos indican que la actividad de Csk y de tirosina fosfatasa s, así como la ausencia o menor expresión de Blk podría funcionar sinérgicamente con p115RhoGEF, uno de los principales reguladores de la activación de RhoA en células que expresan  $G\alpha_{13}$  activado (Hart *et al.*, 1998; Hart *et al.*, 1996; Kozasa *et al.*, 1998; Worzfeld *et al.*, 2008), para inclinar el balance hacia la activación de RhoA.

Los resultados de la presente Tesis muestran un papel para la quinasa Blk más allá del anteriormente descrito centrado preferentemente en la biología de las células B (Burkhardt *et al.*, 1991; Samuelson *et al.*, 2012; Texido *et al.*, 2000; Wasserman *et al.*, 1995). Previamente se había mostrado la implicación de Blk en cáncer. Si bien es cierto que algunos estudios han propuesto un papel oncogénico para Blk (Malek *et al.*, 1998; Montero-Ruiz *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2014), en línea con el papel tradicionalmente asignado a otros miembros de las Src quinasa s, también se ha descrito un papel para Blk como supresor tumoral en modelos de ratón de leucemia mieloide crónica (Zhang *et al.*, 2012). Como ya hemos mencionado, la implicación de Blk en células de melanoma coincidiría con un papel como supresor tumoral, puesto que su mayor expresión o actividad correlaciona con un

bloqueo de la invasión celular *in vitro* e *in vivo* asociado a la inactivación de RhoA, y con un aumento de la supervivencia en ensayos con ratones inmunodeficientes. Estudios adicionales son necesarios para analizar el papel de Blk en la progresión del melanoma.

## II. PAPEL DE miRNAs EN LA RESISTENCIA DE CÉLULAS DE MELANOMA A INHIBIDORES DE LA VIA DE LAS MAP-QUINASAS

### Caracterización de las células de melanoma resistentes a vemurafenib y trametinib

Entender los procesos de resistencia generados durante los tratamientos de quimioterapia actualmente utilizados en clínica es fundamental para mejorar la supervivencia de los pacientes con melanoma. Aunque los mecanismos más frecuentes de resistencia en melanoma convergen en la reactivación de las vías de las MAP-quinasas y PI3-K/AKT debido a diversas alteraciones genéticas, una parte importante de las respuestas de resistencia es independiente de cambios genéticos. En base a la relevancia de los miRNAs como *oncomirs* o como *mirsupps*, en la presente Tesis se ha abordado el estudio del posible papel de miRNAs en la resistencia de células de melanoma a vemurafenib. Para ello hemos utilizado el modelo A375, una línea celular que expresa la mutación BRAF V600E, la más frecuente entre los pacientes con melanoma y que representa la diana del vemurafenib. Utilizando este modelo, se han generado células resistentes no sólo a vemurafenib, sino también a trametinib y a SCH772984. Nuestro estudio se ha centrado especialmente en la caracterización de las alteraciones en la expresión de miRNAs en las células A375-VR, aunque se ha iniciado asimismo la caracterización de las células A375-TR y SK-Mel 103-TR, de las cuales se discutirá más adelante en esta Discusión.

Las células A375-VR presentan una fuerte estabilidad en su resistencia a VMF, la cual es independiente de la presencia del inhibidor. Esta observación concuerda con los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad en respuesta a VMF con células aisladas de metástasis que se habían desarrollado en ratones NSG mantenidos en ausencia del inhibidor. Estos datos muestran que las metástasis de las células A375-VR continuaban siendo resistentes a VMF tras haber crecido en los ratones, a diferencia de la sensibilidad mostrada por las metástasis de las células A375 parentales.

En ensayos *in vitro*, las células A375-VR mostraron una moderada adicción a VMF, ya que presentaban menor tasa de proliferación al cabo de 7 días sin el inhibidor que las células parentales. Estos resultados no se correlacionaban con los ensayos *in vivo* de formación de tumores tras inoculación subcutánea de células A375 y A375-VR, en los que se observó un mayor crecimiento de los tumores de células resistentes, que se encontraban, no obstante, en ausencia de vemurafenib. Sin embargo, esto podría explicarse por las diferencias en las condiciones experimentales, puesto que en los ensayos *in vivo* existe un microambiente tumoral que podría implicar una ventaja proliferativa para las células A375-VR. Asimismo, la adicción descrita en los ensayos *in vitro* hasta día 7 en ausencia de VMF

podría ser superada tras tiempos más largos sin el inhibidor. Esto lo demostramos mediante *western blot* utilizando células incubadas durante cuatro semanas en ausencia de VMF, observándose una mayor fosforilación de ERK1/2 en las células A375-VR que en las A375 o A375-VR en presencia de VMF, lo que podría contribuir a una mayor proliferación.

Las células de melanoma resistentes a VMF presentan sobre-activación general de la vía de las MAP-quinasas, lo que coincidiría con la mayor activación de esta vía descrita en células de melanoma resistentes a dicho inhibidor (Long *et al.*, 2014; Rizos *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014b). Así, las células A375-VR presentan un aumento en la activación de Ras asociado a una mayor fosforilación de MEK1/2, de ERK1/2 y de p90RSK. Por el momento desconocemos los mecanismos implicados en el incremento en la activación de Ras. Aunque no detectamos mutación en el residuo Q61 de *NRAS* en las células A375-VR, cabe la posibilidad de que otras sustituciones en *NRAS* como G12 o G13, las cuales están frecuentemente mutadas en melanoma e inducen asimismo activación de Ras (Ball *et al.*, 1994), fueran las responsables del aumento en la activación de esta GTPasa. Asimismo, no puede descartarse una posible disminución de expresión de NF1, una GAP para Ras descrita en mecanismos de resistencia a inhibidores de BRAF (Whittaker *et al.*, 2013), o un posible aumento de la GEF SOS. Igualmente, el aumento de expresión de receptores de factores de crecimiento, descritos previamente como mecanismos de resistencia a inhibidores de BRAF, como PDGFR $\beta$  (Nazarian *et al.*, 2010), IGF-1R (Villanueva *et al.*, 2010) o EGFR (Girotti *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014a), podría contribuir a la mayor activación de Ras.

No hemos estudiado por el momento si la expresión *de novo* de la isoforma de 90-100 kDa de BRAF detectada en las células A375-VR podría contribuir al aumento en la activación de las MAP-quinasas. Este estudio sería interesante, dado que previamente se ha descrito la amplificación de *BRAF* en células resistentes a inhibidores de BRAF (Shi *et al.*, 2012), así como la expresión de la proteína truncada de BRAF p61, capaz de señalar en presencia del inhibidor (Poulikakoss *et al.*, 2011). Cabe la posibilidad de que esta isoforma de BRAF en las células A375-VR, las cuales mantienen la mutación V600E, pudiera poseer características que la hicieran insensible a vemurafenib, o bien, que el aumento de expresión total de BRAF confiriera una ventaja selectiva de viabilidad que el VMF no pudiera inhibir a la concentración utilizada. Por otra parte, no hemos detectado variaciones en los niveles de expresión de COT, una quinasa que regula positivamente la vía de las MAP-quinasas, y que ha sido implicada en resistencia de células de melanoma a inhibidores de BRAF (Johannessen *et al.*, 2010).

Además de la hiper-activación de la vía de las MAP-quinasas, las células A375-VR presentan un aumento de activación de la vía PI3-K/AKT/S6. A la mayor activación de esta vía podría contribuir el hecho de que Ras esté más activo en estas células. No hemos detectado aumentos significativos en la expresión de AKT en las células resistentes. La posible presencia de mutaciones activadoras de esta vía que pudieran participar en resistencia a VMF (Shao y Aplin, 2010; Shi *et al.*, 2014a), no ha sido todavía estudiada en nuestras células. Por otra parte, los altos niveles de fosforilación observados en S6 podrían

deberse a una acción conjunta de la vías PI3-K/AKT y MAP-quinasas, puesto que p90RSK es capaz de fosforilar a S6 (Roux *et al.*, 2007).

En conjunto, la hiper-activación de las vías de señalización de las MAP-quinasas y PI3-K/AKT posiblemente contribuyen a la supervivencia y proliferación de las células A375-VR en presencia de vemurafenib. Este proceso tiene lugar mediante la estimulación de genes dependientes de la activación de estas vías que regulan positivamente la supervivencia celular y favorecen la proliferación.

Dado que actualmente la combinación de VMF y TMT representa la fórmula terapéutica más frecuentemente utilizada en pacientes con melanoma, consideramos relevante estudiar la sensibilidad de las células A375-VR a TMT, a la combinación de VMF y TMT, así como al inhibidor de Erk1/2 SCH772984. La resistencia parcial de las células A375-VR a TMT, SCH772984 y al tratamiento combinado de estos inhibidores con VMF implica la presencia de mecanismos comunes de resistencia frente a distintos inhibidores de la vía de las MAP-quinasas, y confirma la mayor efectividad de la combinación de terapias en clínica. Dado que el tratamiento con el inhibidor de AKT denominado triciribina disminuye la viabilidad tanto de las células parentales como resistentes, esto sugiere la posible utilidad del uso de inhibidores de la vía PI3K/AKT en el tratamiento de melanoma tras resistencia a vemurafenib.

La adquisición de resistencia a VMF de las células A375 correlacionó con la pérdida de su capacidad invasiva *in vitro*, sin alterar sus propiedades adhesivas y morfológicas. Asociado a dicha pérdida de invasividad, las GTPasas Rac y RhoA, moléculas clave en la regulación de los procesos de migración, adhesión e invasión, mostraron un incremento de su activación en las células resistentes. Asimismo, estas células presentaron una mayor activación de MLC, un efector de RhoA implicado en procesos de contracción y polaridad celular. Alteraciones en la correcta regulación de las GTPasas y de sus efectores podrían representar mecanismos que explicaran la deficiente invasión de las células resistentes, puesto que una activación excesiva de Rac y RhoA podría impedir la correcta migración celular. Además, como se explicará posteriormente, el aumento de miR-211-5p en las células A375-VR podría estar contribuyendo a la menor invasión de estas células, lo cual ha sido previamente descrito (Bell *et al.*, 2014; Boyle *et al.*, 2011; Levy *et al.*, 2010).

Aunque actualmente desconocemos la base molecular del incremento en la activación de estas GTPasas en las células A375-VR, una posible explicación al aumento en la activación de Rac podría estar relacionada con el aumento de actividad de Ras. Así, Rac puede ser activada por Ras a través de la PI3-K, la cual, al incrementar la producción de fosfoinosítidos puede activar GEFs de Rac, tales como SOS y Vav (Han *et al.*, 1998; Nimnual *et al.*, 1998; Scita *et al.*, 2000). Por otra parte, resultados previos han mostrado que la transformación por Ras oncogénico se traduce en mayores niveles de RhoA-GTP a través del aumento de la señalización vía ERK1/2, lo que bloquea al inhibidor de ciclo celular p21 (Sahai *et al.*, 2001; Vial *et al.*, 2003). Asimismo, se ha demostrado en fibroblastos la

capacidad de Ras de activar a RhoA a través de la vía de las MAP-quinasas mediante la disminución de la actividad de p190RhoGAP (Chen *et al.*, 2003). A su vez, la activación de Rac puede desencadenar la activación de RhoA, lo que podría implicar la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> por Ras (Peppelenbosch *et al.*, 1995). Por tanto, dada la existencia de *crosstalk* entre las vías de las GTPasas Ras y Rho/Rac (Chen *et al.*, 2003; Han *et al.*, 1998; Nimnual *et al.*, 1998; Sahai *et al.*, 2001; Scita *et al.*, 2000), es probable que la mayor activación de estas Rho GTPasas en las células A375-VR proceda de la hiper-activación de la vía de señalización Ras-BRAF-MEK-ERK.

Rac está frecuentemente mutado en melanoma (Krauthammer *et al.*, 2012), y se ha descrito una correlación entre resistencia a VMF de células de melanoma con aumento de la activación de Rac, debido a la mutación en Rac P29S (Watson *et al.*, 2014). Aunque no hemos secuenciado Rac para detectar posibles mutaciones en esta GTPasa, la mayor activación de Rac en las células A375-TR no se ha visto asociada a respuestas de resistencia a vemurafenib.

La posibilidad de que exista alguna relación directa entre la disminución de la invasión *in vitro* en las células resistentes a VMF y su capacidad de migración y posterior metástasis *in vivo* hacia pulmón no ha sido todavía abordada. La menor supervivencia de los ratones inoculados con células A375-VR comparada con la obtenida con ratones inyectados con células parentales sugeriría que aquellas tienen mayor capacidad invasiva, contrariamente a lo observado *in vitro*. Sin embargo, la hiper-activación de la vía de las MAP-quinasas y de PI3-K/AKT en las células resistentes, junto con un microambiente tumoral permisivo en los pulmones que pudiera ser más favorable para las células A375-VR, les proporcionaría una fuerte capacidad proliferativa y de supervivencia *in vivo*, lo que podría explicar la menor supervivencia de los ratones. Alternativamente, podría favorecerse la proliferación en detrimento de la invasividad de las células resistentes. Se ha sugerido que la progresión del melanoma se debe en parte a un cambio entre el perfil transcripcional proliferativo e invasivo (Hoek *et al.*, 2008; Hoek y Goding, 2010). Esto podría estar influenciado por los miRNAs, ya que las células tumorales son más sensibles a cambios en los miRNAs que las células normales (Inui *et al.*, 2010; Mendell y Olson, 2012).

Con el objetivo futuro de identificar miRNAs específicamente inducidos en células de melanoma resistentes a trametinib, hemos obtenido células A375 y SK-Mel-103 que presentan actualmente resistencia a concentraciones de 40 nM y 30 nM de dicho inhibidor, respectivamente. La resistencia parcial a concentraciones de 1 µM de TMT en ensayos de viabilidad de células A375-TR a 48h sugiere que podremos conseguir posteriormente células resistentes a concentraciones más altas del inhibidor.

Dado que tanto las células A375-TR como las SK-Mel-103-TR han mostrado una velocidad de proliferación sustancialmente más lenta que las células parentales, nos decidimos a llevar a cabo una caracterización inicial del estado de activación de las vías de las MAP-quinasas y PI3-K/AKT. Las células A375-TR presentaron mayor fosforilación de MEK1/2 en presencia del inhibidor que las células parentales, mientras que no se detectaron

cambios en la fosforilación de ERK1/2. Es probable que la diferencia de fosforilación de ERK1/2 entre las células resistentes y parentales aumente a medida que las células soporten concentraciones crecientes de trametinib. Adicionalmente, las células A375-TR exhibieron un aumento en la activación de Ras, aunque a niveles inferiores a los observados en las células A375-VR, sin que se detectaran mutaciones en *NRAS*. El aumento de la activación de Ras podría explicar el posterior aumento de fosforilación de MEK1/2 en las células A375-TR. En cuanto a las células SK-Mel-103-TR, éstas presentaron una clara re-activación de ERK1/2 y la sobre-expresión de la forma de 80 kD de BRAF, aunque no se detectaron mutaciones en esta quinasa. Dicho aumento de expresión de BRAF podría representar un mecanismo que explicara la re-activación de la vía MAP-quinasas detectada en estas células.

El aumento en la activación de Ras y la disminución de la expresión de PTEN en las células A375-TR podría ser la base de la activación de la vía PI3-K/AKT/S6. De modo similar, observamos un aumento en la activación de esta vía en las células SK-Mel-103-TR, las cuales presentan activación intrínseca de NRas debido a la mutación Q61R. Por tanto, la re-activación común de la vía PI3-K/AKT en las células A375-TR y SK-Mel-103-TR, probablemente represente una respuesta celular que contribuya a su proliferación y supervivencia frente al trametinib. Asimismo, las células A375-TR mostraron resistencia a vemurafenib, tanto independientemente como en combinación con trametinib. Es probable que la resistencia a ambos inhibidores sea facilitada por la activación de la vía PI3-K/AKT.

El análisis de la capacidad invasiva *in vitro* de las células A375-TR mostró una disminución de su invasión con respecto a las células parentales, de modo similar a lo observado con las células A375-VR. Sin embargo, a diferencia de estas últimas, las células resistentes a TMT presentaron un aumento de adhesión a fibronectina, que correlacionó con un mayor *spreading* que las células parentales (datos no mostrados). Aunque no hemos estudiado las causas de la inhibición de la invasión, el aumento del *spreading* de las células A375-TR podría contribuir a su mayor adhesión celular, y esto a su vez, a la disminución de la invasión.

Colectivamente, los resultados muestran mecanismos comunes de resistencia de células de melanoma frente a vemurafenib y trametinib. Como ya se ha demostrado anteriormente (Long *et al.*, 2014; Rizos *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014b), la re-activación de las vías de las MAP-quinasas y PI3-K/AKT, constituyen eventos moleculares que son la base de las recaídas en pacientes con melanoma que presentan resistencia a inhibidores de la vía de las MAP-quinasas. Como hemos mencionado al inicio de esta Discusión, en esta Tesis hemos analizado el posible papel de miRNAs en la resistencia de células de melanoma, centrándonos especialmente en las células resistentes a vemurafenib.

Identificación y caracterización de miRNAs alterados en células de melanoma resistentes a vemurafenib

Tomando como control las células parentales A375, observamos que las células resistentes a trametinib muestran un número mayor de cambios en la expresión de miRNAs que las resistentes a vemurafenib. Asimismo, las células SK-Mel-103-TR presentaron una elevada tasa de alteraciones en la expresión de miRNAs relativo a las parentales. Cabe la posibilidad de que a medida que aumentemos la concentración del TMT en los cultivos de células A375-TR y SK-Mel-103-TR para incrementar la resistencia, descienda el número de miRNAs alterados por pérdida de estabilidad. La caracterización de los miRNAs cuya expresión ha cambiado en estas células resistentes a TMT será objeto de futuros estudios. Sin embargo, es importante destacar ya que ambas líneas celulares resistentes muestran un aumento en la expresión de miR-143-3p y miR-145-5p. La posible implicación de estos miRNAs en la resistencia a TMT será posteriormente estudiada.

En las células A375-VR pudimos validar el aumento de expresión de miR-204-5p, miR-211-5p, miR-504-5p y miR-509-3p, así como la disminución del miR-140-3p, aunque nuestros posteriores estudios se centraron finalmente en miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p. De estos miRNAs, sólo el miR-211-5p está expresado diferencialmente en las células resistentes a VMF con respecto a las resistentes a TMT, lo que podría indicar la especificidad de este miRNA en la resistencia a vemurafenib. Dado que las células A375 que presentan doble resistencia a VMF y a TMT (A375-VR/TR), las cuales proceden a su vez de las células A375-VR expuestas posteriormente a TMT, mantienen la alteración en la expresión de estos tres miRNAs observada en estas últimas, esto confirma la estabilidad de dichas alteraciones. Asimismo, estos datos sugieren un efecto predominante del VMF sobre TMT en la respuesta celular a los cambios en la expresión de estos miRNAs.

Significativamente, el aumento en la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p fue detectado en clones resistentes a VMF de las células de melanoma SK-Mel-239, las cuales expresan la mutación BRAF V600E, lo que refuerza la observación del cambio de expresión de estos miRNAs en la resistencia a vemurafenib. De modo similar, las células SK-Mel-239 dobles resistentes a VMF y un inhibidor de MEK mostraron un incremento en la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en la mayoría de los clones dobles resistentes. Por tanto, la mayor expresión de miR-204-5p y miR-211-5p no constituiría una respuesta sólo restringida a células A375 resistentes, sino que podría representar un mecanismo común de resistencia a VMF en células de melanoma.

El interés del estudio de los miRNAs seleccionados se valida por su expresión en muestras de pacientes con melanoma cutáneo. Coincidente con resultados de estudios previos en los que se analizó la expresión del miR-211-5p y miR-204-5p durante la progresión del melanoma (Kozubek *et al.*, 2013; Mazar *et al.*, 2010; Stark *et al.*, 2015b), hemos observado una disminución de estos miRNAs en una cohorte de pacientes en diferentes estadios de melanoma con respecto a *nevi*. Estos estudios describieron asimismo que el miR-211-5p era capaz de discriminar los melanomas invasivos de los no invasivos (Kozubek *et al.*, 2013). Hasta la fecha no se había determinado si las células de melanoma expresan miR-140-3p, por lo que nuestra observación de que este miRNA decrece en

estadios avanzados de melanoma constituye un resultado novedoso en el campo de investigación de miRNAs relacionados con melanoma. En base a los datos de expresión de estos miRNAs en *nevi* y melanoma, el aumento de expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en las células resistentes a VMF sugeriría una involución hacia estados más “benignos” de la patología. Sin embargo, el elevado número de mutaciones en melanomas avanzados genera situaciones de activación de rutas de proliferación y supervivencia distintas de los estadios iniciales del melanoma, por lo que el aumento de expresión de los citados miRNAs en las células de melanoma resistentes no puede ser enmarcado dentro del contexto de una regresión tumoral.

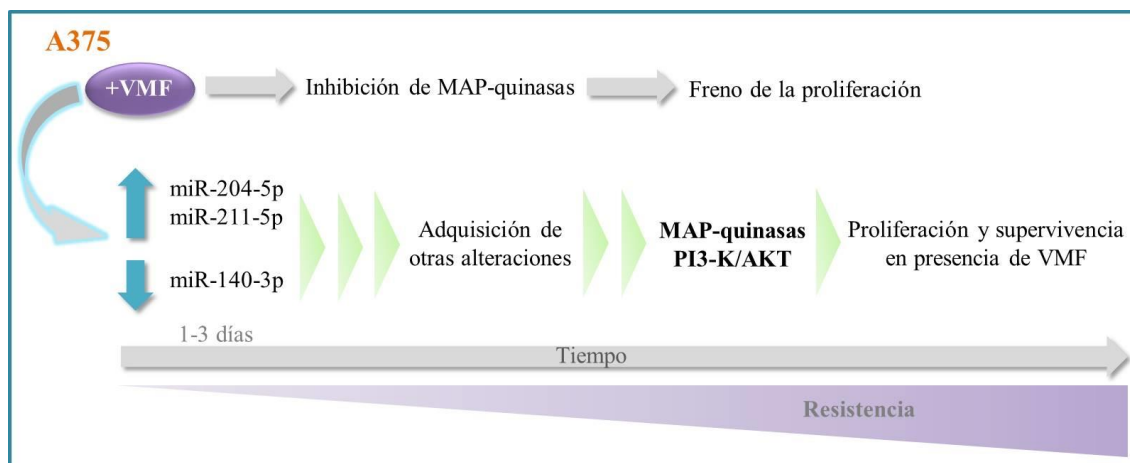
La caracterización de los cambios en la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en las células A375-VR reveló la estabilidad de dichos cambios, indicando que tienen lugar en respuesta a VMF, pero no requieren posteriormente la presencia continua del inhibidor. Utilizando células A375 parentales observamos que las alteraciones en la expresión de estos miRNAs en respuesta a VMF ocurren rápidamente en el caso de miR-204-5p y miR-211-5p, y con una cinética algo más lenta en miR-140-3p. Todo esto sugiere que los cambios en la expresión de estos miRNAs aparecen tempranamente en el proceso de generación de resistencia a VMF, y permanecen estables.

El aumento de expresión de miR-204-5p y miR-211-5p, y la reducción de los niveles del miR-140-3p no fue sólo detectado en células A375 expuestas a VMF, sino también en respuesta a TMT, a la combinación de TMT y VMF, o a SCH772984. Sin embargo, y a diferencia de las células A375-VR, los cambios en la expresión de estos miRNAs en las células incubadas con TMT o SCH772984 se perdieron tras la adquisición de resistencia a dichos inhibidores, tal y como mostraron los análisis de la expresión de estos tres miRNAs en las células A375-TR y A375-ER. Estos datos abrían la posibilidad de que miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p podrían haber contribuido inicialmente a la adquisición de resistencia de las células A375-TR y A375-ER, mientras que los cambios en la expresión de estos miRNAs se mantuvieron tras la adquisición de la resistencia a vemurafenib.

Notablemente, el aumento en la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p y la disminución de los niveles de miR-140-3p en respuesta a VMF o al tratamiento combinado de VMF y TMT fue asimismo detectado en una tercera línea celular de melanoma con mutación en BRAF V600E, SK-Mel-28, reforzando la hipótesis de que estas alteraciones en los miRNAs podrían representar un evento común cuando las células de melanoma con dicha mutación son expuestas a estos inhibidores. Dado que los cambios en la expresión de los mencionados miRNAs no fueron observados en células expuestas a inhibidores de AKT o Rac, esto sugiere una especificidad de los cambios de expresión en relación con las MAP-quinasas.

Colectivamente, todos estos datos indican que la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p se altera de forma rápida en una situación de estrés inducida por la exposición de las células de melanoma a vemurafenib (**Figura 92**). Esta respuesta celular

abre la posibilidad de que estos miRNAs pudieran estar implicados en procesos iniciales de resistencia a VMF en un momento en el que la vía de las MAP-quinasas está alterada por efecto del inhibidor, y la proliferación y supervivencia celular están en riesgo. Los cambios en la expresión de estos tres miRNAs ocurrirían con anterioridad a la aparición y estabilidad de mutaciones adquiridas que causarían la reactivación de la vía de las MAP-quinasas y la supervivencia celular en presencia de vemurafenib.



**Figura 92. Modelo de la contribución de miRNAs a la adquisición de resistencia de células de melanoma a vemurafenib.** El aumento de expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en respuesta a VMF, favorecería la inicial supervivencia celular que, junto con los posteriores cambios que promueven reactivación de la vía de las MAP-quinasas y de PI3-K/AKT, contribuirían a la adquisición de resistencia al inhibidor y a la proliferación celular.

### Papel de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en la resistencia de células de melanoma a vemurafenib

Con el objetivo de determinar la potencial implicación de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en la resistencia a VMF de las células A375-VR, sobre-expresamos miR-204-5p o miR-211-5p, o silenciamos miR-140-3p en las células parentales A375, para posteriormente analizar su sensibilidad a dicho inhibidor. Los resultados revelaron que la sobre-expresión de miR-204-5p y miR-211-5p confiere una moderada pero consistente ventaja de supervivencia y proliferación celular frente a vemurafenib. Por el contrario, no detectamos contribución del miR-140-3p a la viabilidad celular en presencia de este inhibidor. Notablemente, el incremento en viabilidad conferido por miR-204-5p y miR-211-5p se detectó asimismo tras el tratamiento con trametinib o con la combinación de vemurafenib y trametinib. Dado que los transfectantes Triple-miR mostraron asimismo una significativa resistencia frente a VMF y a la combinación de VMF y TMT en ensayos de viabilidad y proliferación, los resultados indican que la resistencia de estos transfectantes estaría proporcionada principalmente por miR-204-5p y miR-211-5p, pero no por el miR-140-3p. Ninguno de los transfectantes de miRNA proporcionó ventajas de supervivencia frente al inhibidor de AKT triciribina, lo que refuerza la asociación de los miRNAs seleccionados con la vía de las MAP-quinasas.

Aunque los ensayos de proliferación que demostraron la contribución de miR-204-5p y miR-211-5p a la resistencia frente a VMF se llevaron a cabo en presencia de suero, dado que tenían lugar a lo largo de 6 días, los experimentos de viabilidad a 24 horas que revelaron la implicación de estos dos miRNAs en la resistencia se realizaron en ausencia de suero. En cambio, cuando se añadió suero en estos últimos experimentos, la viabilidad en presencia de VMF de los transfectantes que sobre-expresan miR-211-5p aumentó mínima aunque no significativamente en comparación con las células parentales. Esto sugiere que los factores de crecimiento presentes en el suero que confieren proliferación celular e inducen respuestas anti-apoptóticas podrían estar oscureciendo la contribución a la viabilidad frente al VMF que presentan los transfectantes que sobre-expresan estos dos miRNAs.

El análisis de la activación de la vía de las MAP-quinasas en los distintos transfectantes reveló que únicamente aquellos que sobre-expresan miR-211-5p y los transfectantes triple-miR mantenían moderados aumentos de fosforilación de ERK1/2 y MEK1/2 en presencia de altas concentraciones de VMF al compararlos con las células control. Por otra parte, detectamos mayores niveles de fosforilación de AKT en las células Triple-miR y en las silenciadas para miR-140-3p que en los transfectantes control, pero no en los transfectantes con sobre-expresión de miR-204-5p o miR-211-5p.

Estos resultados sugieren que la resistencia a VMF observada en los transfectantes que sobre-expresan miR-211-5p sería independiente de la vía PI3-K/AKT, y que la mayor activación de esta vía en las células A375-VR es independiente del aumento de expresión de miR-211-5p. Adicionalmente, estos datos indican que el aumento de la activación de PI3-K/AKT en las células silenciadas para miR-140-3p no se traduce en un incremento de supervivencia en presencia de VMF. En conjunto, estos resultados sugieren que el miR-211-5p puede contribuir moderadamente a la reactivación de la vía de las MAP-quinasas en las células A375-VR, e indican que la mayor parte de esta reactivación puede proceder de alteraciones genéticas y/o de sobre-expresión de receptores tirosina quinasa que inducen la activación de esta vía. Es tentador especular que la modesta implicación de miR-211-5p a la activación de ERK1/2 en presencia de VMF pudiera contribuir al incremento de viabilidad y proliferación de estas células. Por el momento desconocemos la base molecular por lo que la sobre-expresión del miR-211-5p conduce al aumento en la activación de ERK1/2.

Las bases de datos de miRNA actualmente disponibles y las publicaciones en *PubMed* indican que miR-204-5p y miR-211-5p comparten algunas dianas comunes, lo que probablemente surge de su alta homología de secuencia, pero también mantienen dianas específicas. Nuestros análisis preliminares revelan que las células A375-VR y los transfectantes que sobre-expresan estos dos miRNAs, así como las células Triple-miR tienen en común la reducción de varias dianas compartidas, entre las que se incluyen NUA1, CHOP/GADD153 y Efrina-B2. Además, las células A375-VR muestran una

disminución en la expresión de Snail, una diana de miR-204-5p, pero no se ha observado reducción en la expresión de Snail en los transfectantes de miRNA.

NUAK1 es una quinasa relacionada con AMPK que ha sido relacionada principalmente con la supervivencia, migración y metástasis de células tumorales (Sun *et al.*, 2013), si bien algunos estudios muestran que NUAK1 posee asimismo propiedades de supresión tumoral (Hou *et al.*, 2011; Humbert *et al.*, 2010). NUAK1 puede ser fosforilada y activada en Thr 211 por el supresor de tumores LKB1 (Hou *et al.*, 2011; Lizcano *et al.*, 2004), y por Akt en el residuo Ser 600 (Suzuki *et al.*, 2003). LKB1 actúa como punto de control en condiciones de estrés energético, ya que el eje LKB1/AMPK regula el crecimiento y proliferación celular dependiendo de los niveles de ATP (Shaw *et al.*, 2004a; Shaw *et al.*, 2004b). Es importante señalar que LKB1 puede ser fosforilado en Ser 325/Ser 428 por ERK y p90RSK en líneas celulares de melanoma que presentan la mutación BRAF V600E, impidiendo que LKB1 se una y active AMPK, contribuyendo finalmente a un aumento de proliferación celular (Zheng *et al.*, 2009). En base a su estructura, regulación y homología funcional, NUAK1 representa una de las 12 quinasas que han sido descritas por su relación con AMPK (Sun *et al.*, 2013), desconociéndose actualmente si la mutación BRAF V600E podría asimismo traducirse en desacoplamiento de la interacción LKB1-NUAK1 e incremento de la proliferación celular. De acuerdo a su capacidad descrita de estimulación tumoral, y dada la reducción en la expresión de NUAK1 en las células A375-VR, en principio no se prevería su participación en la resistencia a VMF. Sin embargo, la reducción en la expresión de NUAK1 por miR-204-5p y miR-211-5p podría impedir algunas de sus potenciales propiedades supresoras tumorales, y junto con la posibilidad de desacoplamiento de la interacción LKB1-NUAK1 debido a BRAF V600E, esto podría favorecer una ventaja de proliferación celular en presencia del inhibidor. En futuros experimentos se analizará si el rescate en la expresión de NUAK1 en células A375-VR y en transfectantes que sobre-expresan miR-204-5p y miR-211-5p se traduce en sensibilización de estas células a VMF.

CHOP es un factor de transcripción pro-apoptótico cuya expresión está regulada por el miR-211-5p (Chitnis *et al.*, 2012). Este miRNA controla directamente al promotor de CHOP, favoreciendo su metilación y, por tanto, evitando su expresión y su actividad pro-apoptótica (Chitnis *et al.*, 2012). La transcripción de CHOP es inducida por ATF4 a partir de la activación de PERK, un componente clave de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR: *unfolded protein response*) (Szegezdi *et al.*, 2006; Tabas y Ron, 2011), el cual es a su vez diana de miR-204-5p (Xu *et al.*, 2016). Notablemente, se ha descrito que PERK aumenta la expresión de miR-211-5p, causando la posterior reducción de los niveles de CHOP (Chitnis *et al.*, 2012). Por tanto, miR-211-5p representa un miRNA pro-supervivencia que regula la expresión de CHOP de una manera dependiente de PERK (Chitnis *et al.*, 2012). Las células A375-VR muestran una disminución de la expresión tanto de PERK como de CHOP, asociado a niveles aumentados de miR-204-5p y miR-211-5p. Estos datos sugieren que el aumento en la expresión de miR-211-5p es independiente de

PERK, y muy probablemente mediado por MITF, un regulador clave de miR-211-5p así como de TRPM1 (Levy *et al.*, 2010; Margue *et al.*, Mazar *et al.*, 2010, Miller *et al.*, 2004). Aunque no hemos observado mayor expresión de MITF en células A375-VR que en las parentales, detectamos un incremento en la expresión de TRPM1, lo que sugiere que un aumento en la actividad de MITF sobre los promotores de mir-211-5p y *TRPM1* podría representar un mecanismo para su mayor expresión.

La disminución de la expresión del factor pro-apoptótico CHOP en células A375-VR y células A375 parentales que sobre-expresan miR-211-5p podría proporcionar una ventaja temprana a las células A375 para afrontar y recuperarse del estrés causado por el VMF, contribuyendo al control de la homeostasis celular. En estudios futuros analizaremos si la reducción en la expresión de CHOP representa un mecanismo que contribuye a la resistencia del melanoma al vemurafenib. Cabe destacar que estudios previos mostraron que los niveles proteicos de CHOP aumentan tras exposición de células de melanoma A375 a PLX4720 (Ma *et al.*, 2014), un inhibidor de BRAF V600E anterior a la aparición de VMF. En un experimento preliminar (n=1), hemos analizado los niveles proteicos de CHOP tras 48 horas de incubación de células A375 parentales y A375-VR con VMF, observando una disminución en la expresión de CHOP en las células parentales incubadas con este inhibidor, no pudiendo detectar la expresión de esta proteína en células A375-VR expuestas a vemurafenib (no mostrado). Se necesitan más trabajos para aclarar estas discrepancias experimentales.

Efrina-B2 es una diana de miR-204-5p (Mohammed *et al.*, 2016). Tanto el mRNA de efrina-B2 como su expresión proteica se redujeron en células A375-VR, así como en transfectantes que sobre-expresan miR-204-5p y en células Triple-miR. Los receptores de efrinas son proteínas tirosina quinasas que, junto con sus ligandos efrinas que se expresan en la membrana de células contiguas, juegan un papel clave en la regulación de las respuestas de adhesión-repulsión en el desarrollo neuronal, vascular y epitelial (Kania y Klein, 2016). Un número elevado de estudios ha descrito que la interacción entre las efrinas y sus receptores y su posterior señalización juegan un importante papel en la supresión de tumores, entre los que se incluyen el cáncer de mama, colorectal y próstata (Batlle *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006; Noren *et al.*, 2006). Así, la pérdida de expresión de la efrina-B2 se correlaciona con mayor malignidad del tumor en cáncer colorectal y gastrointestinal (Jubb *et al.*, 2005; Oshima *et al.*, 2008). Sin embargo, ésta no siempre es la regla, ya que se han atribuido asimismo funciones oncogénicas a las efrinas y sus receptores en cáncer de mama y de cabeza y cuello (Kaenel *et al.*, 2012; Oweida *et al.*, 2017). Dado que el sistema de las efrinas regula la adhesión y la repulsión celular, controla asimismo el proceso de invasión celular. En melanoma, el receptor de efrina-B2, denominado EphB4, promueve el crecimiento de células de melanoma que expresan dicha efrina (Yang *et al.*, 2010b), e induce migración tumoral mediante la reorganización del citoesqueleto de actina (Yang *et al.*, 2006). No hemos abordado todavía si la reducción de efrina-B2 por miR-204-5p podría contribuir a la resistencia a vemurafenib de las células A375-VR o de los transfectantes que

sobre-expresan miR-204-5p, o si esta reducción está asociada al bloqueo de la invasión exhibido por las células A375-VR.

Tanto TGF $\beta$ -RII como IGFBP5 son dianas comunes de miR-204-5p y miR-211-5p, y son importantes reguladores de la proliferación y supervivencia celular (Baxter, 2014; Principe *et al.*, 2014). Aunque la expresión de sus mRNAs estaba claramente reducida en los transfectantes que sobre-expresan miR-204-5p y miR-211-5p así como en las células Triple-miR, confirmando que representan dianas de estos miRNAs, por el contrario la expresión de TGF $\beta$ -RII y IGFBP5 mostró un aumento significativo en las células A375-VR. Estos resultados sugieren que, si bien la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p está incrementada en estas células resistentes, otros mecanismos han contrarrestado su acción sobre TGF $\beta$ -RII y IGFBP5, con el resultado final del aumento en los niveles de estas dianas.

Notablemente, el aumento en la expresión de TGF $\beta$ -RII en las células A375-VR junto con la observación de que la expresión y actividad de TGF- $\beta$  aumenta en células expuestas a VMF (Fedorenko *et al.*, 2015; Koetz-Ploch *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2014a), facilitaría una mayor señalización dependiente de esta citoquina. En relación con este punto, es importante destacar que la activación de la señalización dependiente de TGF- $\beta$  en células A375 se traduce en un aumento en la expresión de receptores para EGF y PDGF, lo cual confiere resistencia a vemurafenib (Sun *et al.*, 2014a). Asimismo, se ha demostrado recientemente que TGF- $\beta$  induce la expresión de miR-125a en células de melanoma, el cual confiere resistencia a vemurafenib (Koetz-Ploch *et al.*, 2017). El posible aumento de receptores para EGF y PDGF en nuestras células A375-VR, así como la posibilidad de que TGF- $\beta$  regule la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p, no ha sido abordado todavía, y constituye un punto importante de estudio.

Una de las respuestas celulares a TGF- $\beta$  es la inducción en la expresión de marcadores de EMT como Snail, Slug, ZEB1 y ZEB2 (Garg, 2013; Wendt *et al.*, 2012). Asociado al aumento en la expresión de TGF $\beta$ -RII y al potencial incremento en la expresión de TGF- $\beta$  en células expuestas a VMF, hemos detectado en las células A375-VR mayores niveles de mRNA para Slug, una diana común de los miR-204-5p y miR-211-5p, así como de Zeb1 y Zeb2, pero no de Snail. Los datos abren la posibilidad de que estos marcadores puedan haber sufrido variaciones en su expresión de forma TGF- $\beta$ -dependiente, pero probablemente independientemente de los cambios en los niveles de miR-204-5p y miR-211-5p.

IGFBP5 forma parte de la familia IGFBP, cuyos miembros regulan el acceso de IGF-I e IGF-II a receptores IGF-1R, y controlan asimismo la vida media de estas citoquinas (Baxter, 2014). Se ha descrito que las IGFBPs pueden ser tanto inhibidoras del crecimiento tumoral, incluido el melanoma, como promotoras de la supervivencia y proliferación celulares (Butt *et al.*, 2003; Sureshbabu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2010). Se ha demostrado anteriormente que las células de melanoma resistentes a VMF presentan sobre-expresión de IGF-1R (Villanueva *et al.*, 2010), aunque esto no ha sido analizado

todavía en nuestras células A375-VR. Notablemente, se ha mostrado que IGF-1 es expresado por fibroblastos tumorales, pero no por las mismas células de melanoma (Lewis *et al.*, 2010; Rodeck *et al.*, 1991; Satyamoorthy *et al.*, 2001), por lo que su papel en la resistencia de las células A375-VR podría ser irrelevante.

El papel de miR-204-5p y miR-211-5p en cáncer parece ser controvertido, puesto que se han identificado papeles oncogénicos y supresores tumorales para ambos. Así, se ha mostrado que la expresión exógena del miR-211-5p en cáncer colorectal incrementa la proliferación celular, crecimiento del tumor y migración celular, efectos en parte mediados por la disminución del supresor tumoral CHD5 (Cai *et al.*, 2012). Por otra parte, la expresión de este miRNA correlaciona con un aumento de oncogenicidad en carcinoma oral, mediante la represión de TCF12 (Chen *et al.*, 2016). Asimismo, la sobreexpresión de miR-204-5p y miR-211-5p en células de cáncer de mama se traduce en aumento de la proliferación celular a través de la reducción en los niveles de los supresores tumorales MX1 y TXNIP (Lee *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2013).

La implicación de miR-204-5p y miR-211-5p como supresores tumorales, tanto en melanoma como en otros tipos de cáncer ha sido igualmente descrito. Así, el miR-204-5p se ha asociado a supresión tumoral en modelos *in vivo* de hepatoma (Ge *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha descrito que el miR-211-5p suprime la proliferación de células de cáncer de ovario mediante la reducción de los niveles de ciclina D1 y CDK6 (Xia *et al.*, 2015). En el caso del melanoma, se ha mostrado que la expresión ectópica de miR-211-5p disminuye el crecimiento y la invasión celular (Bell *et al.*, 2014; Boyle *et al.*, 2011; Levy *et al.*, 2010; Margue *et al.*, 2013; Mazar *et al.*, 2010). Finalmente, el papel dual de miR-204-5p y miR-211-5p ha sido observado incluso en un mismo modelo de cáncer, y así se ha documentado que el miR-204-5p puede actuar como supresor tumoral en algunas líneas celulares de cáncer de próstata, o como oncogén en otras (Ding *et al.*, 2015). En relación con resistencia a quimioterapia, nuestros datos muestran por primera vez la relación entre miR-204-5p y miR-211-5p con resistencia a inhibidores de BRAF V600E en melanoma, y por tanto constituyen resultados novedosos y relevantes.

Aunque las células A375-VR muestran una disminución estable en la expresión del miR-140-3p, ésta no parece contribuir a la resistencia a VMF, ya que el silenciamiento de este miRNA en células parentales A375 no se tradujo en una ventaja de supervivencia frente a este inhibidor. No ha sido documentado hasta la fecha ninguna asociación entre miR-140-3p y resistencia a quimioterapia en cáncer. Como es el caso de otros miRNAs, se ha descrito tanto un papel como supresor tumoral para el miR-140-3p en cáncer de pulmón y de mama (Dong *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2015; Salem *et al.*, 2016), como un papel oncogénico en cáncer renal (Zhu *et al.*, 2016).

En resumen, los resultados de esta Tesis muestran alteraciones rápidas y estables en la expresión de los microRNAs miR-204-5p, miR-211-5p y miR-140-3p en células de melanoma expuestas a vemurafenib. Mientras que no hemos observado un papel del miR-140-3p en resistencia a VMF, el aumento de expresión de miR-204-5p y miR-211-5p habría

podido conferir una ventaja proliferativa o de supervivencia temprana en presencia de este inhibidor, que permitiría suficiente viabilidad celular para la adquisición de cambios genéticos que facilitarían la obtención de la resistencia. El mantenimiento de los perfiles de expresión de estos dos miRNAs en las células resistentes sugiere que no sólo puedan contribuir a los estadios iniciales de la resistencia, sino que también podrían favorecer el mantenimiento de dicha resistencia. Esta hipótesis se refuerza con los datos de los transfectantes estables, en los que la sobre-expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en células A375 promueve un aumento de su viabilidad y proliferación.

Finalmente, nuestros resultados pueden contribuir a una mejor comprensión global de los mecanismos de resistencia a inhibidores de las MAP-quinasas, y podrían ayudar al desarrollo de futuras terapias que incluyeran *antagomiRs* para miR-204-5p y miR-211-5p en pacientes con resistencia adquirida a vemurafenib. Dada la amplitud de mecanismos desarrollados por las células resistentes, la posible combinación de esta terapia con tratamientos de quimioterapia dirigida o inmunoterapia podría contribuir más eficientemente a alargar y mejorar la vida de los pacientes con melanoma metastásico.

*-CONCLUSIONES-*



1. La Src quinasa Blk forma un complejo con  $G\alpha_{13}$ . La asociación  $G\alpha_{13}$ -Blk se debilita tras la activación de  $G\alpha_{13}$ , lo que se traduce en aumento de la unión entre Blk y p190RhoGAP, y posterior fosforilación de la proteína GAP mediada por Blk.
2. La fosforilación de p190RhoGAP dependiente de Blk provoca la inactivación de RhoA y la inhibición de la invasión celular.
3. Blk regula la migración de células de melanoma a pulmón, lo que posteriormente influencia la diseminación de estas células y la supervivencia en ratones.
4. Se han generado células de melanoma con resistencia estable a vemurafenib (A375-VR), las cuales presentan asimismo resistencia parcial a trametinib y SCH772984. Las células A375-VR muestran mayor proliferación *in vivo* que las parentales.
5. Las células A375-VR exhiben hiper-activación de las vías de las MAP-quinasas y PI3-quinasa/AKT.
6. Las células A375-VR muestran un aumento en la expresión de miR-204-5p, miR-211-5p y miR-509-3p, así como disminución de miR-140-3p. Las alteraciones en la expresión de estos miRNAs tienen lugar en etapas tempranas de la resistencia.
7. Los cambios en la expresión de estos miRNAs tienen lugar en respuesta a diferentes inhibidores de la vía de las MAP-quinasas pero no a inhibidores de AKT o Rac.
8. La expresión ectópica de miR-204-5p y miR-211-5p en células A375 parentales, pero no el silenciamiento de miR-140-3p, confiere ventaja de viabilidad y proliferación en presencia de vemurafenib.
9. La expresión de NUA1, Efrina-B2 y CHOP, dianas de miR-204-5p y miR-211-5p, está reducida en células A375-VR y en transfectantes que sobre-expresan estos dos miRNAs.



*-BIBLIOGRAFÍA-*



## A

- Alfonzo-Mendez, M. A., Alcantara-Hernandez, R., y Garcia-Sainz, J. A. (2016). Novel Structural Approaches to Study GPCR Regulation. *International journal of molecular sciences* *18*.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., *et al.* (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA (New York, NY)* *9*, 277-279.
- Amit, I., Citri, A., Shay, T., Lu, Y., Katz, M., Zhang, F., Tarcic, G., Siwak, D., Lahad, J., Jacob-Hirsch, J., *et al.* (2007). A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nature genetics* *39*, 503-512.
- Arthur, W. T., y Burridge, K. (2001). RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Molecular biology of the cell* *12*, 2711-2720.
- Arthur, W. T., Petch, L. A., y Burridge, K. (2000). Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Current biology : CB* *10*, 719-722.
- Ascierto, P. A., Kirkwood, J. M., Grob, J. J., Simeone, E., Grimaldi, A. M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F. M., y Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of translational medicine* *10*, 85.
- Audic, S., y Claverie, J. M. (1997). The significance of digital gene expression profiles. *Genome research* *7*, 986-995.

## B

- Bader, A. G., Brown, D., y Winkler, M. (2010). The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer research* *70*, 7027-7030.
- Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., Buzaid, A. C., Cochran, A. J., Coit, D. G., Ding, S., *et al.* (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *27*, 6199-6206.
- Ball, N. J., Yohn, J. J., Morelli, J. G., Norris, D. A., Golitz, L. E., y Hoeffler, J. P. (1994). Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *The Journal of investigative dermatology* *102*, 285-290.
- Bang, C., Batkai, S., Dangwal, S., Gupta, S. K., Foinquinos, A., Holzmann, A., Just, A., Remke, J., Zimmer, K., Zeug, A., *et al.* (2014). Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* *124*, 2136-2146.
- Bao, L., Hazari, S., Mehra, S., Kaushal, D., Moroz, K., y Dash, S. (2012). Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *The American journal of pathology* *180*, 2490-2503.
- Bar-Sagi, D., y Hall, A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* *103*, 227-238.

- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
- Bartolome, R. A., Ferreiro, S., Miquilena-Colina, M. E., Martinez-Prats, L., Soto-Montenegro, M. L., Garcia-Bernal, D., Vaquero, J. J., Agami, R., Delgado, R., Desco, M., *et al.* (2009). The chemokine receptor CXCR4 and the metalloproteinase MT1-MMP are mutually required during melanoma metastasis to lungs. *Am J Pathol* 174, 602-612.
- Bartolome, R. A., Galvez, B. G., Longo, N., Baleux, F., Van Muijen, G. N., Sanchez-Mateos, P., Arroyo, A. G., y Teixido, J. (2004). Stromal cell-derived factor-1alpha promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer research* 64, 2534-2543.
- Bartolome, R. A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sanchez-Mateos, P., Bustelo, X. R., y Teixido, J. (2006). Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer research* 66, 248-258.
- Bartolome, R. A., Wright, N., Molina-Ortiz, I., Sanchez-Luque, F. J., y Teixido, J. (2008). Activated G(alpha)13 impairs cell invasiveness through p190RhoGAP-mediated inhibition of RhoA activity. *Cancer research* 68, 8221-8230.
- Battle, E., Bacani, J., Begthel, H., Jonkheer, S., Gregorieff, A., van de Born, M., Malats, N., Sancho, E., Boon, E., Pawson, T., *et al.* (2005). EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 435, 1126-1130.
- Baxter, R. C. (2014). IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nature reviews Cancer* 14, 329-341.
- Bell, R. E., Khaled, M., Netanel, D., Schubert, S., Golan, T., Buxbaum, A., Janas, M. M., Postolsky, B., Goldberg, M. S., Shamir, R., y Levy, C. (2014). Transcription factor/microRNA axis blocks melanoma invasion program by miR-211 targeting NUA1. *The Journal of investigative dermatology* 134, 441-451.
- Benjamini, Y., y Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics* 29, 1165-1188.
- Biname, F., Bidaud-Meynard, A., y Magnan, L. (2016). Cancer-associated mutations in the protrusion-targeting region of p190RhoGAP impact tumor cell migration. *214*, 859-873.
- Biscardi, J. S., Belsches, A. P., y Parsons, S. J. (1998). Characterization of human epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in human breast tumor cells. *Molecular carcinogenesis* 21, 261-272.
- Bjorge, J. D., Jakymiw, A., y Fujita, D. J. (2000). Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 19, 5620-5635.

- Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A., y Springer, T. A. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *The Journal of experimental medicine* *184*, 1101-1109.
- Blume-Jensen, P., y Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* *411*, 355-365.
- Boggon, T. J., and Eck, M. J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* *23*, 7918-7927.
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., y Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, NY)* *10*, 185-191.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P. N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Zhang, Y., Habets, G., *et al.* (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* *467*, 596-599.
- Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., y Hirth, P. (2012). Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature reviews Drug discovery* *11*, 873-886.
- Bonazzi, V. F., Stark, M. S., y Hayward, N. K. (2012). MicroRNA regulation of melanoma progression. *Melanoma research* *22*, 101-113.
- Borowiec, M., Liew, C. W., Thompson, R., Boonyasrisawat, W., Hu, J., Mlynarski, W. M., El Khattabi, I., Kim, S. H., Marselli, L., Rich, S. S., *et al.* (2009). Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 14460-14465.
- Boyle, G. M., Woods, S. L., Bonazzi, V. F., Stark, M. S., Hacker, E., Aoude, L. G., Dutton-Regester, K., Cook, A. L., Sturm, R. A., y Hayward, N. K. (2011). Melanoma cell invasiveness is regulated by miR-211 suppression of the BRN2 transcription factor. *Pigment cell & melanoma research* *24*, 525-537.
- Bradham, C. A., Foltz, K. R., Beane, W. S., Arnone, M. I., Rizzo, F., Coffman, J. A., Mushegian, A., Goel, M., Morales, J., Genevriere, A. M., *et al.* (2006). The sea urchin kinome: a first look. *Developmental biology* *300*, 180-193.
- Braga, V. M. (2002). Cell-cell adhesion and signalling. *Current opinion in cell biology* *14*, 546-556.
- Breslow, A. (1975). Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I cutaneous melanoma. *Annals of surgery* *182*, 572-575.
- Brondello, J. M., Brunet, A., Pouyssegur, J., y McKenzie, F. R. (1997). The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *The Journal of biological chemistry* *272*, 1368-1376.
- Broxmeyer, H. E., Kohli, L., Kim, C. H., Lee, Y., Mantel, C., Cooper, S., Hangoc, G., Shaheen, M., Li, X., y Clapp, D. W. (2003). Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *Journal of leukocyte biology* *73*, 630-638.

- Bucheit, A. D., y Davies, M. A. (2014). Emerging insights into resistance to BRAF inhibitors in melanoma. *Biochemical pharmacology* 87, 381-389.
- Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N., y Johnson, G. L. (1995). G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *The Journal of biological chemistry* 270, 24631-24634.
- Bunda, S., Wang, Y., Mitts, T. F., Liu, P., Arab, S., Arabkhari, M., y Hinek, A. (2009). Aldosterone stimulates elastogenesis in cardiac fibroblasts via mineralocorticoid receptor-independent action involving the consecutive activation of Galpha13, c-Src, the insulin-like growth factor-I receptor, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *The Journal of biological chemistry* 284, 16633-16647.
- Burkhardt, A. L., Brunswick, M., Bolen, J. B., y Mond, J. J. (1991). Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein-tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7410-7414.
- Burridge, K., y Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179.
- Busillo, J. M., y Benovic, J. L. (2007). Regulation of CXCR4 signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1768, 952-963.
- Butt, A. J., Dickson, K. A., McDougall, F., y Baxter, R. C. (2003). Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 278, 29676-29685.

## C

- Cai, C., Ashktorab, H., Pang, X., Zhao, Y., Sha, W., Liu, Y., y Gu, X. (2012). MicroRNA-211 expression promotes colorectal cancer cell growth in vitro and in vivo by targeting tumor suppressor CHD5. *PloS one* 7, e29750.
- Cailleau, R., Olive, M., y Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro* 14, 911-915.
- Calin, G. A., Cimmino, A., Fabbri, M., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Shimizu, M., Taccioli, C., Zanesi, N., Garzon, R., Aqeilan, R. I., *et al.* (2008). MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5166-5171.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., *et al.* (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15524-15529.
- Callahan, M. K., Rampal, R., Harding, J. J., Klimek, V. M., Chung, Y. R., Merghoub, T., Wolchok, J. D., Solit, D. B., Rosen, N., Abdel-Wahab, O., *et al.* (2012). Progression of RAS-mutant leukemia during RAF inhibitor treatment. *The New England journal of medicine* 367, 2316-2321.
- Carey, T. E., Takahashi, T., Resnick, L. A., Oettgen, H. F., y Old, L. J. (1976). Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral

- immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *73*, 3278-3282.
- Castellano, E., y Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & cancer* *2*, 261-274.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., *et al.* (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 13944-13949.
- Clark, W. H., Jr., Elder, D. E., Guerry, D. t., Epstein, M. N., Greene, M. H., y Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human pathology* *15*, 1147-1165.
- Coffer, P. J., Jin, J., y Woodgett, J. R. (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Biochemical journal* *335* ( Pt 1), 1-13.
- Cooper, J. A., Gould, K. L., Cartwright, C. A., y Hunter, T. (1986). Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* *231*, 1431-1434.
- Costinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., y Croce, C. M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 7024-7029.
- Crosby, T., Fish, R., Coles, B., y Mason, M. D. (2000). Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *The Cochrane database of systematic reviews*, Cd001215.
- Czernilofsky, A. P., Levinson, A. D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Tischer, E., y Goodman, H. M. (1980). Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed amino acid sequence for gene product. *Nature* *287*, 198-203.
- Chakravarty, G., Roy, D., Gonzales, M., Gay, J., Contreras, A., y Rosen, J. M. (2000). P190-B, a Rho-GTPase-activating protein, is differentially expressed in terminal end buds and breast cancer. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* *11*, 343-354.
- Chambers, A. F., Groom, A. C., y MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews Cancer* *2*, 563-572.
- Chan, A. M., Fleming, T. P., McGovern, E. S., Chedid, M., Miki, T., y Aaronson, S. A. (1993). Expression cDNA cloning of a transforming gene encoding the wild-type G alpha 12 gene product. *Molecular and cellular biology* *13*, 762-768.
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., *et al.* (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine* *364*, 2507-2516.
- Chatterjee, S., Behnam Azad, B., y Nimmagadda, S. (2014). The intricate role of CXCR4 in cancer. *Advances in cancer research* *124*, 31-82.

- Chen, J. C., Zhuang, S., Nguyen, T. H., Boss, G. R., y Pilz, R. B. (2003). Oncogenic Ras leads to Rho activation by activating the mitogen-activated protein kinase pathway and decreasing Rho-GTPase-activating protein activity. *The Journal of biological chemistry* 278, 2807-2818.
- Chen, W. J., Jayawickreme, C., Watson, C., Wolfe, L., Holmes, W., Ferris, R., Armour, S., Dallas, W., Chen, G., Boone, L., *et al.* (1998). Recombinant human CXC-chemokine receptor-4 in melanophores are linked to Gi protein: seven transmembrane coreceptors for human immunodeficiency virus entry into cells. *Molecular pharmacology* 53, 177-181.
- Chen, Y. F., Yang, C. C., Kao, S. Y., Liu, C. J., Lin, S. C., y Chang, K. W. (2016). MicroRNA-211 Enhances the Oncogenicity of Carcinogen-Induced Oral Carcinoma by Repressing TCF12 and Increasing Antioxidant Activity. *Cancer research* 76, 4872-4886.
- Chen, Z., Guo, L., Hadas, J., Gutowski, S., Sprang, S. R., y Sternweis, P. C. (2012). Activation of p115-RhoGEF requires direct association of Galpha13 and the Dbl homology domain. *The Journal of biological chemistry* 287, 25490-25500.
- Cherfils, J., y Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews* 93, 269-309.
- Chiang, G. G., y Sefton, B. M. (2001). Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 276, 23173-23178.
- Chitnis, N. S., Pytel, D., Bobrovnikova-Marjon, E., Pant, D., Zheng, H., Maas, N. L., Frederick, B., Kushner, J. A., Chodosh, L. A., Koumenis, C., *et al.* (2012). miR-211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERK-dependent manner. *Molecular cell* 48, 353-364.
- Chong, Y. P., Mulhern, T. D., y Cheng, H. C. (2005). C-terminal Src kinase (CSK) and CSK-homologous kinase (CHK)--endogenous negative regulators of Src-family protein kinases. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 23, 233-244.
- Christopher, A. F., Kaur, R. P., Kaur, G., Kaur, A., Gupta, V., y Bansal, P. (2016). MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspectives in clinical research* 7, 68-74.

## D

- Danielson, L. S., Reavie, L., Coussens, M., Davalos, V., Castillo-Martin, M., Guijarro, M. V., Coffre, M., Cordon-Cardo, C., Aifantis, I., Ibrahim, S., *et al.* (2015). Limited miR-17-92 overexpression drives hematologic malignancies. *Leukemia research* 39, 335-341.
- Dankort, D., Curley, D. P., Cartlidge, R. A., Nelson, B., Karnezis, A. N., Damsky, W. E., Jr., You, M. J., DePinho, R. A., McMahon, M., y Bosenberg, M. (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature genetics* 41, 544-552.
- Datta, S. R., Brunet, A., y Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development* 13, 2905-2927.

- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* *417*, 949-954.
- Davies, M. A. (2012). The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer journal (Sudbury, Mass)* *18*, 142-147.
- Deng, W., Gopal, Y. N., Scott, A., Chen, G., Woodman, S. E., y Davies, M. A. (2012). Role and therapeutic potential of PI3K-mTOR signaling in de novo resistance to BRAF inhibition. *Pigment cell & melanoma research* *25*, 248-258.
- DerMardirossian, C., y Bokoch, G. M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in cell biology* *15*, 356-363.
- Dillenburg-Pilla, P., Patel, V., Mikelis, C. M., Zarate-Blades, C. R., Doci, C. L., Amornphimoltham, P., Wang, Z., Martin, D., Leelahavanichkul, K., Dorsam, R. T., *et al.* (2015). SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/Galphai/mTORC1 axis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *29*, 1056-1068.
- Ding, M., Lin, B., Li, T., Liu, Y., Li, Y., Zhou, X., Miao, M., Gu, J., Pan, H., Yang, F., *et al.* (2015). A dual yet opposite growth-regulating function of miR-204 and its target XRN1 in prostate adenocarcinoma cells and neuroendocrine-like prostate cancer cells. *Oncotarget* *6*, 7686-7700.
- Dong, W., Yao, C., Teng, X., Chai, J., Yang, X., y Li, B. (2016). MiR-140-3p suppressed cell growth and invasion by downregulating the expression of ATP8A1 in non-small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* *37*, 2973-2985.
- Duncan, L. M., Deeds, J., Cronin, F. E., Donovan, M., Sober, A. J., Kauffman, M., y McCarthy, J. J. (2001). Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *19*, 568-576.
- Duncan, L. M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L. M., Woolf, E. A., Tepper, R. I., y Shyjan, A. W. (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer research* *58*, 1515-1520.
- Duronio, V. (2008). The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *The Biochemical journal* *415*, 333-344.

## E

- Ellisdon, A. M., y Halls, M. L. (2016). Compartmentalization of GPCR signalling controls unique cellular responses. *Biochemical Society transactions* *44*, 562-567.
- Emery, C. M., Vijayendran, K. G., Zipser, M. C., Sawyer, A. M., Niu, L., Kim, J. J., Hatton, C., Chopra, R., Oberholzer, P. A., Karpova, M. B., *et al.* (2009). MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 20411-20416.

- Engelman, J. A., Luo, J., y Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews Genetics* 7, 606-619.
- Eroglu, Z., y Ribas, A. (2016). Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *Therapeutic advances in medical oncology* 8, 48-56.
- Etienne-Manneville, S., y Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.

## F

- Fattore, L., Mancini, R., Acunzo, M., Romano, G., Lagana, A., Pisanu, M. E., Malpicci, D., Madonna, G., Mallardo, D., Capone, M., *et al.* (2016). miR-579-3p controls melanoma progression and resistance to target therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E5005-5013.
- Fedorenko, I. V., Wargo, J. A., Flaherty, K. T., Messina, J. L., y Smalley, K. S. (2015). BRAF Inhibition Generates a Host-Tumor Niche that Mediates Therapeutic Escape. *The Journal of investigative dermatology* 135, 3115-3124.
- Felicetti, F., Errico, M. C., Bottero, L., Segnalini, P., Stoppacciaro, A., Biffoni, M., Felli, N., Mattia, G., Petrini, M., Colombo, M. P., *et al.* (2008). The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res* 68, 2745-2754.
- Fincham, V. J., Chudleigh, A., y Frame, M. C. (1999). Regulation of p190 Rho-GAP by v-Src is linked to cytoskeletal disruption during transformation. *Journal of cell science* 112 (Pt 6), 947-956.
- Flaherty, K. T., Puzanov, I., Kim, K. B., Ribas, A., McArthur, G. A., Sosman, J. A., O'Dwyer, P. J., Lee, R. J., Grippo, J. F., Nolop, K., y Chapman, P. B. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363, 809-819.
- Fogh, J., Fogh, J. M., y Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* 59, 221-226.
- Franklin, C., Livingstone, E., Roesch, A., Schilling, B., y Schadendorf, D. (2016). Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*.
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., y Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 19, 92-105.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A., y Takai, Y. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* 5, 1321-1328.

## G

- Garg, M. (2013). Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World journal of stem cells* 5, 188-195.
- Garofalo, M., Di Leva, G., Romano, G., Nuovo, G., Suh, S. S., Nganheu, A., Taccioli, C., Pichiorri, F., Alder, H., Secchiero, P., *et al.* (2009). miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer cell* 16, 498-509.
- Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., Milner, D. A., Granter, S. R., Du, J., *et al.* (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436, 117-122.
- Ge, Y., Yan, X., Jin, Y., Yang, X., Yu, X., Zhou, L., Han, S., Yuan, Q., y Yang, M. (2015). MiRNA-192 [corrected] and miRNA-204 Directly Suppress lncRNA HOTTIP and Interrupt GLS1-Mediated Glutaminolysis in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS genetics* 11, e1005726.
- Gelman, I. H., Peresie, J., Eng, K. H., y Foster, B. A. (2014). Differential requirement for Src family tyrosine kinases in the initiation, progression, and metastasis of prostate cancer. *Molecular cancer research : MCR* 12, 1470-1479.
- Ghosh, P., y Chin, L. (2009). Genetics and genomics of melanoma. *Expert review of dermatology* 4, 131.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., y Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 51, 1417-1423.
- Gilchrist, B. A., Eller, M. S., Geller, A. C., y Yaar, M. (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *The New England journal of medicine* 340, 1341-1348.
- Gilmartin, A. G., Bleam, M. R., Groy, A., Moss, K. G., Minthorn, E. A., Kulkarni, S. G., Rominger, C. M., Erskine, S., Fisher, K. E., Yang, J., *et al.* (2011). GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 989-1000.
- Girotti, M. R., Pedersen, M., Sanchez-Laorden, B., Viros, A., Turajlic, S., Niculescu-Duvaz, D., Zambon, A., Sinclair, J., Hayes, A., Gore, M., *et al.* (2013). Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer discovery* 3, 158-167.
- Girotti, M. R., Saturno, G., Lorigan, P., y Marais, R. (2014). No longer an untreatable disease: how targeted and immunotherapies have changed the management of melanoma patients. *Molecular oncology* 8, 1140-1158.
- Goel, V. K., Lazar, A. J., Warneke, C. L., Redston, M. S., y Haluska, F. G. (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 126, 154-160.

- Goicoechea, S. M., Awadia, S., y Garcia-Mata, R. (2014). I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell adhesion & migration* 8, 535-549.
- Goldsmith, Z. G., and Dhanasekaran, D. N. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26, 3122-3142.
- Gopal, Y. N., Deng, W., Woodman, S. E., Komurov, K., Ram, P., Smith, P. D., y Davies, M. A. (2010). Basal and treatment-induced activation of AKT mediates resistance to cell death by AZD6244 (ARRY-142886) in Braf-mutant human cutaneous melanoma cells. *Cancer research* 70, 8736-8747.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., y Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851-857.
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., y Luster, A. D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology* 32, 659-702.
- Grimaldi, A. M., Simeone, E., Festino, L., Vanella, V., Palla, M., y Ascierto, P. A. (2015). Novel mechanisms and therapeutic approaches in melanoma: targeting the MAPK pathway. *Discovery medicine* 19, 455-461.
- Grund, S. E., Polycarpou-Schwarz, M., Luo, C., Eichmuller, S. B., y Diederichs, S. (2012). Rare Drosha splice variants are deficient in microRNA processing but do not affect general microRNA expression in cancer cells. *Neoplasia (New York, NY)* 14, 238-248.
- Gu, J. L., Muller, S., Mancino, V., Offermanns, S., y Simon, M. I. (2002). Interaction of G alpha(12) with G alpha(13) and G alpha(q) signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9352-9357.
- Guo, D. L., Zhang, J., Yuen, S. T., Tsui, W. Y., Chan, A. S., Ho, C., Ji, J., Leung, S. Y., y Chen, X. (2006). Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours. *Carcinogenesis* 27, 454-464.
- Guo, L., y Lu, Z. (2010). The fate of miRNA\* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PloS one* 5, e11387.

## H

- Ha, M., y Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 509-524.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A. C., Munschauer, M., *et al.* (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 141, 129-141.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R. D., Krishna, U. M., Falck, J. R., White, M. A., y Broek, D. (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279, 558-560.

- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., y Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nature cell biology* 4, 850-858.
- Hanniford, D., Zhong, J., Koetz, L., Gazieli-Sovran, A., Lackaye, D. J., Shang, S., Pavlick, A., Shapiro, R., Berman, R., Darvishian, F., *et al.* (2015). A miRNA-Based Signature Detected in Primary Melanoma Tissue Predicts Development of Brain Metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 4903-4912.
- Hansen, R. K., Parra, I., Hilsenbeck, S. G., Himmelstein, B., y Fuqua, S. A. (2001). Hsp27-induced MMP-9 expression is influenced by the Src tyrosine protein kinase *yes*. *Biochemical and biophysical research communications* 282, 186-193.
- Hari, S. B., Merritt, E. A., y Maly, D. J. (2013). Sequence determinants of a specific inactive protein kinase conformation. *Chemistry & biology* 20, 806-815.
- Hart, M. J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C., y Bollag, G. (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science* 280, 2112-2114.
- Hart, M. J., Sharma, S., elMasry, N., Qiu, R. G., McCabe, P., Polakis, P., y Bollag, G. (1996). Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase. *The Journal of biological chemistry* 271, 25452-25458.
- Haskell, M. D., Nickles, A. L., Agati, J. M., Su, L., Dukes, B. D., y Parsons, S. J. (2001). Phosphorylation of p190 on Tyr1105 by c-Src is necessary but not sufficient for EGF-induced actin disassembly in C3H10T1/2 fibroblasts. *Journal of cell science* 114, 1699-1708.
- Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B. J., Anderson, D. J., Alvarado, R., Ludlam, M. J., Stokoe, D., Gloor, S. L., Vigers, G., *et al.* (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464, 431-435.
- Hauschild, A., Grob, J. J., Demidov, L. V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C. U., Miller, W. H., Jr., Kaempgen, E., *et al.* (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 380, 358-365.
- He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., y Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828-833.
- Heasman, S. J., y Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 690-701.
- Heckman-Stoddard, B. M., Vargo-Gogola, T., Herrick, M. P., Visbal, A. P., Lewis, M. T., Settleman, J., y Rosen, J. M. (2011). P190A RhoGAP is required for mammary gland development. *Developmental biology* 360, 1-10.
- Heidorn, S. J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J. S., Springer, C. J., Pritchard, C., y Marais, R. (2010). Kinase-dead

- BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* *140*, 209-221.
- Higashijima, T., Ferguson, K. M., Sternweis, P. C., Smigel, M. D., y Gilman, A. G. (1987). Effects of Mg<sup>2+</sup> and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *The Journal of biological chemistry* *262*, 762-766.
- Hodi, F. S., Mihm, M. C., Soiffer, R. J., Haluska, F. G., Butler, M., Seiden, M. V., Davis, T., Henry-Spires, R., MacRae, S., Willman, A., *et al.* (2003). Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 4712-4717.
- Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J. P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., *et al.* (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* *150*, 251-263.
- Hoek, K. S., Eichhoff, O. M., Schlegel, N. C., Dobbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., y Dummer, R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer research* *68*, 650-656.
- Hoek, K. S., y Goding, C. R. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment cell & melanoma research* *23*, 746-759.
- Hossain, A., Kuo, M. T., y Saunders, G. F. (2006). Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Molecular and cellular biology* *26*, 8191-8201.
- Hou, X., Liu, J. E., Liu, W., Liu, C. Y., Liu, Z. Y., y Sun, Z. Y. (2011). A new role of NUA1: directly phosphorylating p53 and regulating cell proliferation. *Oncogene* *30*, 2933-2942.
- Howe, H. L., Wingo, P. A., Thun, M. J., Ries, L. A., Rosenberg, H. M., Feigal, E. G., y Edwards, B. K. (2001). Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *Journal of the National Cancer Institute* *93*, 824-842.
- Hugo, W., Shi, H., Sun, L., Piva, M., Song, C., Kong, X., Moriceau, G., Hong, A., Dahlman, K. B., Johnson, D. B., *et al.* (2015). Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell* *162*, 1271-1285.
- Humbert, N., Navaratnam, N., Augert, A., Da Costa, M., Martien, S., Wang, J., Martinez, D., Abbadie, C., Carling, D., de Launoit, Y., *et al.* (2010). Regulation of ploidy and senescence by the AMPK-related kinase NUA1. *The EMBO journal* *29*, 376-386.

## I

- Inui, M., Martello, G., y Piccolo, S. (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* *11*, 252-263.

---

## J

- Jhappan, C., Noonan, F. P., y Merlino, G. (2003). Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 22, 3099-3112.
- Johannessen, C. M., Boehm, J. S., Kim, S. Y., Thomas, S. R., Wardwell, L., Johnson, L. A., Emery, C. M., Stransky, N., Cogdill, A. P., Barretina, J., *et al.* (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 468, 968-972.
- Jubb, A. M., Zhong, F., Bheddah, S., Grabsch, H. I., Frantz, G. D., Mueller, W., Kavi, V., Quirke, P., Polakis, P., y Koeppen, H. (2005). EphB2 is a prognostic factor in colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 5181-5187.
- Julian, L., y Olson, M. F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases* 5, e29846.

---

## K

- Kaenel, P., Mosimann, M., y Andres, A. C. (2012). The multifaceted roles of Eph/ephrin signaling in breast cancer. *Cell adhesion & migration* 6, 138-147.
- Kallergi, G., Agelaki, S., Markomanolaki, H., Georgoulas, V., y Stournaras, C. (2007). Activation of FAK/PI3K/Rac1 signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 20, 977-986.
- Kamb, A., Shattuck-Eidens, D., Eeles, R., Liu, Q., Gruis, N. A., Ding, W., Hussey, C., Tran, T., Miki, Y., Weaver-Feldhaus, J., *et al.* (1994). Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature genetics* 8, 23-26.
- Kania, A., y Klein, R. (2016). Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 17, 240-256.
- Katritch, V., Cherezov, V., y Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annual review of pharmacology and toxicology* 53, 531-556.
- Kelly, P., Moeller, B. J., Juneja, J., Booden, M. A., Der, C. J., Daaka, Y., Dewhirst, M. W., Fields, T. A., y Casey, P. J. (2006a). The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 8173-8178.
- Kelly, P., Stemmler, L. N., Madden, J. F., Fields, T. A., Daaka, Y., y Casey, P. J. (2006b). A role for the G12 family of heterotrimeric G proteins in prostate cancer invasion. *J Biol Chem* 281, 26483-26490.
- Khosravi-Far, R., Solski, P. A., Clark, G. J., Kinch, M. S., y Der, C. J. (1995). Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Molecular and cellular biology* 15, 6443-6453.

- Kim, H. J., y Bar-Sagi, D. (2004). Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 441-450.
- Kim, J., Mori, T., Chen, S. L., Amersi, F. F., Martinez, S. R., Kuo, C., Turner, R. R., Ye, X., Bilchik, A. J., Morton, D. L., y Hoon, D. S. (2006a). Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome. *Annals of surgery* 244, 113-120.
- Kim, K. B., Kefford, R., Pavlick, A. C., Infante, J. R., Ribas, A., Sosman, J. A., Fecher, L. A., Millward, M., McArthur, G. A., Hwu, P., *et al.* (2013). Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, 482-489.
- Kim, M., Gans, J. D., Nogueira, C., Wang, A., Paik, J. H., Feng, B., Brennan, C., Hahn, W. C., Cordon-Cardo, C., Wagner, S. N., *et al.* (2006b). Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* 125, 1269-1281.
- Kim, M. Y., Oskarsson, T., Acharyya, S., Nguyen, D. X., Zhang, X. H., Norton, L., y Massague, J. (2009). Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 139, 1315-1326.
- Koetz-Ploch, L., Hanniford, D., Dolgalev, I., Sokolova, E., Zhong, J., Diaz-Martinez, M., Bernstein, E., Darvishian, F., Flaherty, K. T., Chapman, P. B., *et al.* (2017). MicroRNA-125a promotes resistance to BRAF inhibitors through suppression of the intrinsic apoptotic pathway. *Pigment cell & melanoma research*.
- Kong, X. M., Zhang, G. H., Huo, Y. K., Zhao, X. H., Cao, D. W., Guo, S. F., Li, A. M., y Zhang, X. R. (2015). MicroRNA-140-3p inhibits proliferation, migration and invasion of lung cancer cells by targeting ATP6AP2. *International journal of clinical and experimental pathology* 8, 12845-12852.
- Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M. J., Sternweis, P. M., Singer, W. D., Gilman, A. G., Bollag, G., y Sternweis, P. C. (1998). p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science* 280, 2109-2111.
- Kozubek, J., Ma, Z., Fleming, E., Duggan, T., Wu, R., Shin, D. G., y Dadrás, S. S. (2013). In-depth characterization of microRNA transcriptome in melanoma. *PloS one* 8, e72699.
- Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B. H., Evans, P., Bacchiocchi, A., McCusker, J. P., Cheng, E., Davis, M. J., Goh, G., Choi, M., *et al.* (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nature genetics* 44, 1006-1014.
- Ku, M., Wall, M., MacKinnon, R. N., Walkley, C. R., Purton, L. E., Tam, C., Izon, D., Campbell, L., Cheng, H. C., y Nandurkar, H. (2015). Src family kinases and their role in hematological malignancies. *Leukemia & lymphoma* 56, 577-586.
- Kulkarni, S. V., Gish, G., van der Geer, P., Henkemeyer, M., y Pawson, T. (2000). Role of p120 Ras-GAP in directed cell movement. *The Journal of cell biology* 149, 457-470.
- Kurose, H. (2003). Galpha12 y Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life sciences* 74, 155-161.

Kwong, L. N., y Davies, M. A. (2014). Targeted therapy for melanoma: rational combinatorial approaches. *Oncogene* 33, 1-9.

## L

Laird, R. M., Laky, K., y Hayes, S. M. (2010). Unexpected role for the B cell-specific Src family kinase B lymphoid kinase in the development of IL-17-producing gammadelta T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 185, 6518-6527.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., y Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* 10, R25.

Latek, D., Modzelewska, A., Trzaskowski, B., Palczewski, K., y Filipek, S. (2012). G protein-coupled receptors--recent advances. *Acta biochimica Polonica* 59, 515-529.

Latorraca, N. R., Venkatakrishnan, A. J., y Dror, R. O. (2016). GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chemical reviews*.

Lee, H., Lee, S., Bae, H., Kang, H. S., y Kim, S. J. (2016). Genome-wide identification of target genes for miR-204 and miR-211 identifies their proliferation stimulatory role in breast cancer cells. *Scientific reports* 6, 25287.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., y Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

Levy, C., Khaled, M., Iliopoulos, D., Janas, M. M., Schubert, S., Pinner, S., Chen, P. H., Li, S., Fletcher, A. L., Yokoyama, S., *et al.* (2010). Intronic miR-211 assumes the tumor suppressive function of its host gene in melanoma. *Molecular cell* 40, 841-849.

Lewis, D. A., Travers, J. B., Somani, A. K., y Spandau, D. F. (2010). The IGF-1/IGF-1R signaling axis in the skin: a new role for the dermis in aging-associated skin cancer. *Oncogene* 29, 1475-1485.

Li, H., y Yang, B. B. (2013). Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta pharmacologica Sinica* 34, 870-879.

Li, X., Huang, Y., Jiang, J., y Frank, S. J. (2008). ERK-dependent threonine phosphorylation of EGF receptor modulates receptor downregulation and signaling. *Cellular signalling* 20, 2145-2155.

Lin, K., Baritaki, S., Militello, L., Malaponte, G., Bevelacqua, Y., y Bonavida, B. (2010). The Role of B-RAF Mutations in Melanoma and the Induction of EMT via Dysregulation of the NF-kappaB/Snail/RKIP/PTEN Circuit. *Genes & cancer* 1, 409-420.

Lito, P., Pratilas, C. A., Joseph, E. W., Tadi, M., Halilovic, E., Zubrowski, M., Huang, A., Wong, W. L., Callahan, M. K., Merghoub, T., *et al.* (2012). Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell* 22, 668-682.

Lito, P., Rosen, N., y Solit, D. B. (2013). Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nature medicine* 19, 1401-1409.

- Liu, Q., Huang, J., Zhou, N., Zhang, Z., Zhang, A., Lu, Z., Wu, F., y Mo, Y. Y. (2013). LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor suppressor. *Nucleic acids research* 41, 4976-4987.
- Liu, Y., Yang, Y., Ward, R., An, S., Guo, X. X., Li, W., y Xu, T. R. (2015). Biased signalling: the instinctive skill of the cell in the selection of appropriate signalling pathways. *The Biochemical journal* 470, 155-167.
- Lizcano, J. M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., Hawley, S. A., Udd, L., Makela, T. P., Hardie, D. G., y Alessi, D. R. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO journal* 23, 833-843.
- Lockshin, A., Giovanella, B. C., De Ipolyi, P. D., Williams, L. J., Jr., Mendoza, J. T., Yim, S. O., y Stehlin, J. S., Jr. (1985). Exceptional lethality for nude mice of cells derived from a primary human melanoma. *Cancer research* 45, 345-350.
- Long, G. V., Fung, C., Menzies, A. M., Pupo, G. M., Carlino, M. S., Hyman, J., Shahheydari, H., Tembe, V., Thompson, J. F., Saw, R. P., *et al.* (2014). Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nature communications* 5, 5694.
- Love, M. I., Huber, W., y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15, 550.
- Luster, A. D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England journal of medicine* 338, 436-445.

## M

- Ma, X. H., Piao, S. F., Dey, S., McAfee, Q., Karakousis, G., Villanueva, J., Hart, L. S., Levi, S., Hu, J., Zhang, G., *et al.* (2014). Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *The Journal of clinical investigation* 124, 1406-1417.
- Macfarlane, L. A., y Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current genomics* 11, 537-561.
- Mahabeleshwar, G. H., y Kundu, G. C. (2003). Tyrosine kinase p56lck regulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha following hypoxia/reoxygenation. *The Journal of biological chemistry* 278, 52598-52612.
- Mahoney, J. P., y Sunahara, R. K. (2016). Mechanistic insights into GPCR-G protein interactions. *Current opinion in structural biology* 41, 247-254.
- Maksumova, L., Le, H. T., Muratkhodjaev, F., Davidson, D., Veillette, A., y Pallen, C. J. (2005). Protein tyrosine phosphatase alpha regulates Fyn activity and Cbp/PAG phosphorylation in thymocyte lipid rafts. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 175, 7947-7956.

- Malek, S. N., Dordai, D. I., Reim, J., Dintzis, H., y Desiderio, S. (1998). Malignant transformation of early lymphoid progenitors in mice expressing an activated Blk tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7351-7356.
- Margue, C., Philippidou, D., Reinsbach, S. E., Schmitt, M., Behrmann, I., y Kreis, S. (2013). New target genes of MITF-induced microRNA-211 contribute to melanoma cell invasion. *PloS one* 8, e73473.
- Marinissen, M. J., y Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends in pharmacological sciences* 22, 368-376.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10-12.
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., y Kolch, W. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes & cancer* 2, 232-260.
- Matheson, S. F., Hu, K. Q., Brouns, M. R., Sordella, R., VanderHeide, J. D., y Settleman, J. (2006). Distinct but overlapping functions for the closely related p190 RhoGAPs in neural development. *Developmental neuroscience* 28, 538-550.
- Matsuoka, T., y Yashiro, M. (2014). Rho/ROCK signaling in motility and metastasis of gastric cancer. *World journal of gastroenterology* 20, 13756-13766.
- Mazar, J., DeYoung, K., Khaitan, D., Meister, E., Almodovar, A., Goydos, J., Ray, A., y Perera, R. J. (2010). The regulation of miRNA-211 expression and its role in melanoma cell invasiveness. *PloS one* 5, e13779.
- McArthur, G. A., Chapman, P. B., Robert, C., Larkin, J., Haanen, J. B., Dummer, R., Ribas, A., Hogg, D., Hamid, O., Ascierto, P. A., *et al.* (2014). Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *The Lancet Oncology* 15, 323-332.
- McGlade, J., Brunkhorst, B., Anderson, D., Mbamalu, G., Settleman, J., Dedhar, S., Rozakis-Adcock, M., Chen, L. B., y Pawson, T. (1993). The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J* 12, 3073-3081.
- Medina, P. P., Nolde, M., y Slack, F. J. (2010). OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 467, 86-90.
- Meigs, T. E., Fedor-Chaiken, M., Kaplan, D. D., Brackenbury, R., y Casey, P. J. (2002). Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin. *The Journal of biological chemistry* 277, 24594-24600.
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature reviews Genetics* 14, 447-459.
- Mendell, J. T., y Olson, E. N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 148, 1172-1187.

- Menzies, A. M., y Long, G. V. (2014a). Dabrafenib and trametinib, alone and in combination for BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20, 2035-2043.
- Menzies, A. M., y Long, G. V. (2014b). Systemic treatment for BRAF-mutant melanoma: where do we go next? *The Lancet Oncology* 15, e371-381.
- Miller, A. J., Du, J., Rowan, S., Hershey, C. L., Widlund, H. R., y Fisher, D. E. (2004). Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. *Cancer research* 64, 509-516.
- Miller, A. J., y Mihm, M. C., Jr. (2006). Melanoma. *The New England journal of medicine* 355, 51-65.
- Miller, N. L., Kleinschmidt, E. G., y Schlaepfer, D. D. (2014). RhoGEFs in cell motility: novel links between Rgnef and focal adhesion kinase. *Current molecular medicine* 14, 221-234.
- Mitchell, B., y Mahalingam, M. (2014). The CXCR4/CXCL12 axis in cutaneous malignancies with an emphasis on melanoma. *Histology and histopathology* 29, 1539-1546.
- Mohammed, C. P., Rhee, H., Phee, B. K., Kim, K., Kim, H. J., Lee, H., Park, J. H., Jung, J. H., Kim, J. Y., Kim, H. C., *et al.* (2016). miR-204 downregulates EphB2 in aging mouse hippocampal neurons. *Aging cell* 15, 380-388.
- Montagut, C., Sharma, S. V., Shioda, T., McDermott, U., Ulman, M., Ulkus, L. E., Dias-Santagata, D., Stubbs, H., Lee, D. Y., Singh, A., *et al.* (2008). Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer research* 68, 4853-4861.
- Montero-Ruiz, O., Alcantara-Ortigoza, M. A., Betancourt, M., Juarez-Velazquez, R., Gonzalez-Marquez, H., y Perez-Vera, P. (2012). Expression of RUNX1 isoforms and its target gene BLK in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research* 36, 1105-1111.
- Morris, E. J., Jha, S., Restaino, C. R., Dayananth, P., Zhu, H., Cooper, A., Carr, D., Deng, Y., Jin, W., Black, S., *et al.* (2013). Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer discovery* 3, 742-750.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
- Muller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., Kong, X., Possik, P. A., Cornelissen-Steijger, P. D., Geukes Foppen, M. H., *et al.* (2014). Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nature communications* 5, 5712.
- Murakami, T., Maki, W., Cardones, A. R., Fang, H., Tun Kyi, A., Nestle, F. O., y Hwang, S. T. (2002). Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res* 62, 7328-7334.

Murdoch, C., y Finn, A. (2000). Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95, 3032-3043.

## N

Nakahara, H., Mueller, S. C., Nomizu, M., Yamada, Y., Yeh, Y., y Chen, W. T. (1998). Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *The Journal of biological chemistry* 273, 9-12.

Nathanson, K. L., Martin, A. M., Wubbenhorst, B., Greshock, J., Letrero, R., D'Andrea, K., O'Day, S., Infante, J. R., Falchook, G. S., Arkenau, H. T., *et al.* (2013). Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 4868-4878.

Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R. C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M. K., Attar, N., Sazegar, H., *et al.* (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973-977.

Neagu, M., Constantin, C., y Longo, C. (2015). Chemokines in the melanoma metastasis biomarkers portrait. *Journal of immunoassay & immunochemistry* 36, 559-566.

Nimnual, A. S., Yatsula, B. A., y Bar-Sagi, D. (1998). Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 279, 560-563.

Nissan, M. H., Pratilas, C. A., Jones, A. M., Ramirez, R., Won, H., Liu, C., Tiwari, S., Kong, L., Hanrahan, A. J., Yao, Z., *et al.* (2014). Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer research* 74, 2340-2350.

Noren, N. K., Foos, G., Hauser, C. A., y Pasquale, E. B. (2006). The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway. *Nature cell biology* 8, 815-825.

Nowek, K., Sun, S. M., Dijkstra, M. K., Bullinger, L., Dohner, H., Erkeland, S. J., Lowenberg, B., y Jongen-Lavrencic, M. (2016). Expression of a passenger miR-9\* predicts favorable outcome in adults with acute myeloid leukemia less than 60 years of age. *Leukemia* 30, 303-309.

## O

O'Connor, K., y Chen, M. (2013). Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* 4, 141-147.

O'Neill, F. J., Gillett, J., y Foltz, K. R. (2004). Distinct roles for multiple Src family kinases at fertilization. *Journal of cell science* 117, 6227-6238.

Oberholzer, P. A., Kee, D., Dziunycz, P., Sucker, A., Kamsukom, N., Jones, R., Roden, C., Chalk, C. J., Ardlie, K., Palessandolo, E., *et al.* (2012). RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors.

Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 30, 316-321.

Oda, H., Kumar, S., y Howley, P. M. (1999). Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9557-9562.

Offermanns, S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in biophysics and molecular biology* 83, 101-130.

Offermanns, S., Mancino, V., Revel, J. P., y Simon, M. I. (1997). Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Galpha13 deficiency. *Science* 275, 533-536.

Oom, A. L., Humphries, B. A., y Yang, C. (2014). MicroRNAs: novel players in cancer diagnosis and therapies. *2014*, 959461.

Orgaz, J. L., y Sanz-Moreno, V. (2013). Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis. *Pigment cell & melanoma research* 26, 39-57.

Oshima, T., Akaike, M., Yoshihara, K., Shiozawa, M., Yamamoto, N., Sato, T., Akihito, N., Nagano, Y., Fujii, S., Kunisaki, C., *et al.* (2008). Overexpression of EphA4 gene and reduced expression of EphB2 gene correlates with liver metastasis in colorectal cancer. *International journal of oncology* 33, 573-577.

Oweida, A., Bhatia, S., Hirsch, K., Calame, D., Griego, A., Keysar, S., Pitts, T., Sharma, J., Eckhardt, G., Jimeno, A., *et al.* (2017). Ephrin-B2 overexpression predicts for poor prognosis and response to therapy in solid tumors. *Molecular carcinogenesis* 56, 1189-1196.

## P

Pablos, J. L., Amara, A., Bouloc, A., Santiago, B., Caruz, A., Galindo, M., Delaunay, T., Virelizier, J. L., y Arenzana-Seisdedos, F. (1999). Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *The American journal of pathology* 155, 1577-1586.

Paraiso, K. H., Xiang, Y., Rebecca, V. W., Abel, E. V., Chen, Y. A., Munko, A. C., Wood, E., Fedorenko, I. V., Sondak, V. K., Anderson, A. R., *et al.* (2011). PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer research* 71, 2750-2760.

Parks, S., y Wieschaus, E. (1991). The *Drosophila* gastrulation gene *concertina* encodes a G alpha-like protein. *Cell* 64, 447-458.

Parsons, J. T., Horwitz, A. R., y Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 633-643.

Parsons, S. J., y Parsons, J. T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23, 7906-7909.

Patel, A., Sabbineni, H., Clarke, A., y Somanath, P. R. (2016). Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis. *Life sciences* 157, 52-61.

- Payne, A. S., y Cornelius, L. A. (2002). The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *The Journal of investigative dermatology* 118, 915-922.
- Peng, W., Hu, J., Zhu, X. D., Liu, X., Wang, C. C., Li, W. H., y Chen, Z. Y. (2014). Overexpression of miR-145 increases the sensitivity of vemurafenib in drug-resistant colo205 cell line. *Tumour biology : the journal of the International Society for Onco developmental Biology and Medicine* 35, 2983-2988.
- Peppelenbosch, M. P., Qiu, R. G., de Vries-Smits, A. M., Tertoolen, L. G., de Laat, S. W., McCormick, F., Hall, A., Symons, M. H., y Bos, J. L. (1995). Rac mediates growth factor-induced arachidonic acid release. *Cell* 81, 849-856.
- Petersen, D. L., Krejsgaard, T., Berthelsen, J., Fredholm, S., Willerslev-Olsen, A., Sibbesen, N. A., Bonefeld, C. M., Andersen, M. H., Francavilla, C., Olsen, J. V., *et al.* (2014). B-lymphoid tyrosine kinase (Blk) is an oncogene and a potential target for therapy with dasatinib in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Leukemia* 28, 2109-2112.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., y Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 639-650.
- Playford, M. P., y Schaller, M. D. (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23, 7928-7946.
- Porter, A. P., Papaioannou, A., y Malliri, A. (2016). Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* 7, 123-138.
- Poulikakos, P. I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M. T., *et al.* (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480, 387-390.
- Poulikakos, P. I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K. M., y Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464, 427-430.
- Prakash, O., Bardot, S. F., y Cole, J. T. (2007). Chicken sarcoma to human cancers: a lesson in molecular therapeutics. *The Ochsner journal* 7, 61-64.
- Pratilas, C. A., Taylor, B. S., Ye, Q., Viale, A., Sander, C., Solit, D. B., y Rosen, N. (2009). (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 4519-4524.
- Principe, D. R., Doll, J. A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H. G., Bartholin, L., Pasche, B., Lee, C., y Grippo, P. J. (2014). TGF-beta: duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 106, djt369.

## Q

- Quax, P. H., van Muijen, G. N., Weening-Verhoeff, E. J., Lund, L. R., Dano, K., Ruiters, D. J., y Verheijen, J. H. (1991). Metastatic behavior of human melanoma cell lines in nude mice correlates with urokinase-type plasminogen activator, its type-1 inhibitor, and urokinase-mediated matrix degradation. *The Journal of cell biology* 115, 191-199.

## R

- Ridley, A. J., Self, A. J., Kasmi, F., Paterson, H. F., Hall, A., Marshall, C. J., y Ellis, C. (1993). rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *The EMBO journal* *12*, 5151-5160.
- Riobo, N. A., y Manning, D. R. (2005). Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family. *Trends in pharmacological sciences* *26*, 146-154.
- Rizos, H., Menzies, A. M., Pupo, G. M., Carlino, M. S., Fung, C., Hyman, J., Haydu, L. E., Mijatov, B., Becker, T. M., Boyd, S. C., *et al.* (2014). BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *20*, 1965-1977.
- Robledo, M. M., Bartolome, R. A., Longo, N., Rodriguez-Frade, J. M., Mellado, M., Longo, I., van Muijen, G. N., Sanchez-Mateos, P., y Teixido, J. (2001). Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *The Journal of biological chemistry* *276*, 45098-45105.
- Rodeck, U., Melber, K., Kath, R., Menssen, H. D., Varello, M., Atkinson, B., y Herlyn, M. (1991). Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes. *The Journal of investigative dermatology* *97*, 20-26.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., y Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research* *14*, 1902-1910.
- Roof, R. W., Haskell, M. D., Dukes, B. D., Sherman, N., Kinter, M., y Parsons, S. J. (1998). Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Molecular and cellular biology* *18*, 7052-7063.
- Roskoski, R., Jr. (2012). MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications* *417*, 5-10.
- Ross, E. M., y Wilkie, T. M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annual review of biochemistry* *69*, 795-827.
- Rother, J., y Jones, D. (2009). Molecular markers of tumor progression in melanoma. *Current genomics* *10*, 231-239.
- Rous, P. (1910). A transmissible avian neoplasm (sarcoma of the common fowl.). *The Journal of Experimental Medicine* *12*, 696-705.
- Roux, P. P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M. K., Cohen, M. S., Taunton, J., Sonenberg, N., y Blenis, J. (2007). RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *The Journal of biological chemistry* *282*, 14056-14064.
- Rushworth, L. K., Hindley, A. D., O'Neill, E., y Kolch, W. (2006). Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Molecular and cellular biology* *26*, 2262-2272.

---

S

- Sackmann, E. (2015). How actin/myosin crosstalks guide the adhesion, locomotion and polarization of cells. *Biochimica et biophysica acta* *1853*, 3132-3142.
- Sahai, E., Ishizaki, T., Narumiya, S., y Treisman, R. (1999). Transformation mediated by RhoA requires activity of ROCK kinases. *Current biology : CB* *9*, 136-145.
- Sahai, E., Olson, M. F., y Marshall, C. J. (2001). Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *The EMBO journal* *20*, 755-766.
- Salem, O., Erdem, N., Jung, J., Munstermann, E., Worner, A., Wilhelm, H., Wiemann, S., y Korner, C. (2016). The highly expressed 5'isomiR of hsa-miR-140-3p contributes to the tumor-suppressive effects of miR-140 by reducing breast cancer proliferation and migration. *17*, 566.
- Samuelson, E. M., Laird, R. M., Maue, A. C., Rochford, R., y Hayes, S. M. (2012). Blk haploinsufficiency impairs the development, but enhances the functional responses, of MZ B cells. *Immunology and cell biology* *90*, 620-629.
- Sanchez-Tillo, E., Liu, Y., de Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., Darling, D. S., Dean, D. C., Castells, A., y Postigo, A. (2012). EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *69*, 3429-3456.
- Sander, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., y Collard, J. G. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of cell biology* *143*, 1385-1398.
- Satyamoorthy, K., Li, G., Vaidya, B., Patel, D., y Herlyn, M. (2001). Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. *Cancer research* *61*, 7318-7324.
- Sauter, E. R., Yeo, U. C., von Stemm, A., Zhu, W., Litwin, S., Tichansky, D. S., Pistritto, G., Nesbit, M., Pinkel, D., Herlyn, M., y Bastian, B. C. (2002). Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer research* *62*, 3200-3206.
- Scala, S., Ottaiano, A., Ascierto, P. A., Cavalli, M., Simeone, E., Giuliano, P., Napolitano, M., Franco, R., Botti, G., y Castello, G. (2005). Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* *11*, 1835-1841.
- Scita, G., Tenca, P., Frittoli, E., Tocchetti, A., Innocenti, M., Giardina, G., y Di Fiore, P. P. (2000). Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *The EMBO journal* *19*, 2393-2398.
- Schmidt, A., y Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & development* *16*, 1587-1609.

- Schultz, J., Lorenz, P., Gross, G., Ibrahim, S., y Kunz, M. (2008). MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell research* 18, 549-557.
- Segura, M. F., Greenwald, H. S., Hanniford, D., Osman, I., y Hernando, E. (2012). MicroRNA and cutaneous melanoma: from discovery to prognosis and therapy. *Carcinogenesis* 33, 1823-1832.
- Shan, S. W., Fang, L., Shatseva, T., Rutnam, Z. J., Yang, X., Du, W., Lu, W. Y., Xuan, J. W., Deng, Z., y Yang, B. B. (2013). Mature miR-17-5p and passenger miR-17-3p induce hepatocellular carcinoma by targeting PTEN, GalNT7 and vimentin in different signal pathways. *Journal of cell science* 126, 1517-1530.
- Shao, Y., y Aplin, A. E. (2010). Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. *Cancer research* 70, 6670-6681.
- Sharpless, E., y Chin, L. (2003). The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 22, 3092-3098.
- Shaul, Y. D., y Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1213-1226.
- Shaw, R. J., Bardeesy, N., Manning, B. D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R. A., y Cantley, L. C. (2004a). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer cell* 6, 91-99.
- Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., DePinho, R. A., y Cantley, L. C. (2004b). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3329-3335.
- Sheppard, K. E., y McArthur, G. A. (2013). The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 5320-5328.
- Shi, H., Hong, A., Kong, X., Koya, R. C., Song, C., Moriceau, G., Hugo, W., Yu, C. C., Ng, C., Chodon, T., *et al.* (2014a). A novel AKT1 mutant amplifies an adaptive melanoma response to BRAF inhibition. *Cancer discovery* 4, 69-79.
- Shi, H., Hugo, W., Kong, X., Hong, A., Koya, R. C., Moriceau, G., Chodon, T., Guo, R., Johnson, D. B., Dahlman, K. B., *et al.* (2014b). Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer discovery* 4, 80-93.
- Shi, H., Kong, X., Ribas, A., y Lo, R. S. (2011). Combinatorial treatments that overcome PDGFRbeta-driven resistance of melanoma cells to V600E-BRAF inhibition. *Cancer research* 71, 5067-5074.
- Shi, H., Moriceau, G., Kong, X., Lee, M. K., Lee, H., Koya, R. C., Ng, C., Chodon, T., Scolyer, R. A., Dahlman, K. B., *et al.* (2012). Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nature communications* 3, 724.

- Siehl, S. (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *British journal of pharmacology* 158, 41-49.
- Simeone, E., Grimaldi, A. M., Festino, L., Vanella, V., Palla, M., y Ascierto, P. A. (2017). Combination Treatment of Patients with BRAF-Mutant Melanoma: A New Standard of Care. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*.
- Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S., y Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological reviews* 84, 1155-1228.
- Smalley, K. S., Lioni, M., Dalla Palma, M., Xiao, M., Desai, B., Egyhazi, S., Hansson, J., Wu, H., King, A. J., Van Belle, P., *et al.* (2008). Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Molecular cancer therapeutics* 7, 2876-2883.
- Smart, J. E., Oppermann, H., Czernilofsky, A. P., Purchio, A. F., Erikson, R. L., y Bishop, J. M. (1981). Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 6013-6017.
- Solit, D. B., Garraway, L. A., Pratilas, C. A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J. M., She, Y., Osman, I., *et al.* (2006). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 439, 358-362.
- Sordella, R., Jiang, W., Chen, G. C., Curto, M., y Settleman, J. (2003). Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* 113, 147-158.
- Sosman, J. A., Kim, K. B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A. C., Weber, J. S., McArthur, G. A., Hutson, T. E., Moschos, S. J., Flaherty, K. T., *et al.* (2012). Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *The New England journal of medicine* 366, 707-714.
- Spagnolo, F., Ghiorzo, P., y Queirolo, P. (2014). Overcoming resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutated metastatic melanoma. *Oncotarget* 5, 10206-10221.
- Stark, M. S., Bonazzi, V. F., Boyle, G. M., Palmer, J. M., Symmons, J., Lanagan, C. M., Schmidt, C. W., Herington, A. C., Ballotti, R., Pollock, P. M., y Hayward, N. K. (2015a). miR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAFi sensitivity in melanoma. *Oncotarget* 6, 17753-17763.
- Stark, M. S., Klein, K., Weide, B., Haydu, L. E., Pflugfelder, A., Tang, Y. H., Palmer, J. M., Whiteman, D. C., Scolyer, R. A., Mann, G. J., *et al.* (2015b). The Prognostic and Predictive Value of Melanoma-related MicroRNAs Using Tissue and Serum: A MicroRNA Expression Analysis. *EBioMedicine* 2, 671-680.
- Strathmann, M. P., y Simon, M. I. (1991). G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5582-5586.

- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z. R., Du, J., Davis, A., Mongare, M. M., Gould, J., Frederick, D. T., *et al.* (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487, 500-504.
- Su, F., Viros, A., Milagre, C., Trunzer, K., Bollag, G., Spleiss, O., Reis-Filho, J. S., Kong, X., Koya, R. C., Flaherty, K. T., *et al.* (2012). RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *The New England journal of medicine* 366, 207-215.
- Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G. J., Prahallad, A., Robert, C., Haanen, J., Blank, C., Wesseling, J., Willems, S. M., *et al.* (2014a). Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508, 118-122.
- Sun, V., Zhou, W. B., Majid, S., Kashani-Sabet, M., y Dar, A. A. (2014b). MicroRNA-mediated regulation of melanoma. *The British journal of dermatology* 171, 234-241.
- Sun, X., Gao, L., Chien, H. Y., Li, W. C., and Zhao, J. (2013). The regulation and function of the NUA family. *Journal of molecular endocrinology* 51, R15-22.
- Sun, X., Li, J., Sun, Y., Zhang, Y., Dong, L., Shen, C., Yang, L., Yang, M., Li, Y., Shen, G., *et al.* (2016). miR-7 reverses the resistance to BRAFi in melanoma by targeting EGFR/IGF-1R/CRAF and inhibiting the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways. *Oncotarget*.
- Sureshbabu, A., Okajima, H., Yamanaka, D., Tonner, E., Shastri, S., Maycock, J., Szymanowska, M., Shand, J., Takahashi, S., Beattie, J., *et al.* (2012). IGFBP5 induces cell adhesion, increases cell survival and inhibits cell migration in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of cell science* 125, 1693-1705.
- Suzuki, A., Kusakai, G., Kishimoto, A., Lu, J., Ogura, T., Lavin, M. F., y Esumi, H. (2003). Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein. *The Journal of biological chemistry* 278, 48-53.
- Suzuki, N., Hajicek, N., y Kozasa, T. (2009). Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *Neuro-Signals* 17, 55-70.
- Swaika, A., Crozier, J. A., y Joseph, R. W. (2014). Vemurafenib: an evidence-based review of its clinical utility in the treatment of metastatic melanoma. *Drug design, development and therapy* 8, 775-787.
- Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., y Huang, X. Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of molecular biology* 428, 3850-3868.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., y Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* 7, 880-885.

## T

- Tabas, I., y Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature cell biology* 13, 184-190.
- Tcherkezian, J., y Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biology of the cell* 99, 67-86.

- Texido, G., Su, I. H., Mecklenbrauker, I., Saijo, K., Malek, S. N., Desiderio, S., Rajewsky, K., y Tarakhovsky, A. (2000). The B-cell-specific Src-family kinase Blk is dispensable for B-cell development and activation. *Molecular and cellular biology* 20, 1227-1233.
- Tikoo, A., Czekay, S., Viars, C., White, S., Heath, J. K., Arden, K., y Maruta, H. (2000). p190-A, a human tumor suppressor gene, maps to the chromosomal region 19q13.3 that is reportedly deleted in some gliomas. *Gene* 257, 23-31.
- Trunzer, K., Pavlick, A. C., Schuchter, L., Gonzalez, R., McArthur, G. A., Hutson, T. E., Moschos, S. J., Flaherty, K. T., Kim, K. B., Weber, J. S., *et al.* (2013). Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, 1767-1774.
- Tsai, J., Lee, J. T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N. K., *et al.* (2008). Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3041-3046.
- Tsao, H., Atkins, M. B., y Sober, A. J. (2004). Management of cutaneous melanoma. *The New England journal of medicine* 351, 998-1012.
- Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., *et al.* (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515, 568-571.
- Turchinovich, A., Weiz, L., y Burwinkel, B. (2012). Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends in biochemical sciences* 37, 460-465.

## U

- Ubersax, J. A., y Ferrell, J. E., Jr. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 530-541.

## V

- Van Allen, E. M., Wagle, N., Sucker, A., Treacy, D. J., Johannessen, C. M., Goetz, E. M., Place, C. S., Taylor-Weiner, A., Whittaker, S., Kryukov, G. V., *et al.* (2014). The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer discovery* 4, 94-109.
- van Buul, J. D., Geerts, D., y Huveneers, S. (2014). Rho GAPs and GEFs: controlling switches in endothelial cell adhesion. *Cell adhesion & migration* 8, 108-124.
- van Vliet, C., Bukczynska, P. E., Puryer, M. A., Sadek, C. M., Shields, B. J., Tremblay, M. L., y Tiganis, T. (2005). Selective regulation of tumor necrosis factor-induced Erk signaling by Src family kinases and the T cell protein tyrosine phosphatase. *Nature immunology* 6, 253-260.

- Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., y Hawkins, P. (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 195-203.
- Vasudevan, S., Tong, Y., y Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931-1934.
- Veracini, L., Grall, D., Schaub, S., Beghelli-de la Forest Divonne, S., Etienne-Grimaldi, M. C., Milano, G., Bozec, A., Babin, E., Sudaka, A., Thariat, J., y Van Obberghen-Schilling, E. (2015). Elevated Src family kinase activity stabilizes E-cadherin-based junctions and collective movement of head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget* 6, 7570-7583.
- Vial, E., Sahai, E., y Marshall, C. J. (2003). ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer cell* 4, 67-79.
- Vidigal, J. A., y Ventura, A. (2015). The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends in cell biology* 25, 137-147.
- Villanueva, J., Infante, J. R., Krepler, C., Reyes-Urbe, P., Samanta, M., Chen, H. Y., Li, B., Swoboda, R. K., Wilson, M., Vultur, A., *et al.* (2013). Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. *Cell reports* 4, 1090-1099.
- Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J. T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A. K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P. A., Kee, D., *et al.* (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer cell* 18, 683-695.

## W

- Wagle, N., Van Allen, E. M., Treacy, D. J., Frederick, D. T., Cooper, Z. A., Taylor-Weiner, A., Rosenberg, M., Goetz, E. M., Sullivan, R. J., Farlow, D. N., *et al.* (2014). MAP kinase pathway alterations in BRAF-mutant melanoma patients with acquired resistance to combined RAF/MEK inhibition. *Cancer discovery* 4, 61-68.
- Wang, D., Qiu, C., Zhang, H., Wang, J., Cui, Q., y Yin, Y. (2010). Human microRNA oncogenes and tumor suppressors show significantly different biological patterns: from functions to targets. *PloS one* 5.
- Wang, D. Z., Nur, E. K. M. S., Tikoo, A., Montague, W., y Maruta, H. (1997). The GTPase and Rho GAP domains of p190, a tumor suppressor protein that binds the M(r) 120,000 Ras GAP, independently function as anti-Ras tumor suppressors. *Cancer research* 57, 2478-2484.
- Wang, J., Ding, N., Li, Y., Cheng, H., Wang, D., Yang, Q., Deng, Y., Yang, Y., Li, Y., Ruan, X., *et al.* (2015). Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) functions as a tumor suppressor in human melanoma cells. *Oncotarget* 6, 20636-20649.
- Wang, Y. S., Wang, Y. H., Xia, H. P., Zhou, S. W., Schmid-Bindert, G., y Zhou, C. C. (2012). MicroRNA-214 regulates the acquired resistance to gefitinib via the PTEN/AKT pathway in EGFR-mutant cell lines. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 13, 255-260.

- Wasserman, R., Li, Y. S., y Hardy, R. R. (1995). Differential expression of the blk and ret tyrosine kinases during B lineage development is dependent on Ig rearrangement. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 155, 644-651.
- Watson, I. R., Li, L., Cabeceiras, P. K., Mahdavi, M., Gutschner, T., Genovese, G., Wang, G., Fang, Z., Tepper, J. M., Stemke-Hale, K., *et al.* (2014). The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer research* 74, 4845-4852.
- Webb, D. J., Parsons, J. T., y Horwitz, A. F. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nature cell biology* 4, E97-100.
- Welsh, S. J., y Corrie, P. G. (2015). Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma. *Therapeutic advances in medical oncology* 7, 122-136.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., y Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 875-885.
- Wendt, M. K., Tian, M., y Schiemann, W. P. (2012). Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF-beta-induced EMT during cancer progression. *Cell and tissue research* 347, 85-101.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., y Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science* 118, 843-846.
- Whittaker, S. R., Theurillat, J. P., Van Allen, E., Wagle, N., Hsiao, J., Cowley, G. S., Schadendorf, D., Root, D. E., y Garraway, L. A. (2013). A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer discovery* 3, 350-362.
- Wilson, T. R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Chan, E., Peng, J., Lin, E., Wang, Y., Sosman, J., *et al.* (2012). Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 487, 505-509.
- Worzfeld, T., Wettschureck, N., y Offermanns, S. (2008). G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease. *Trends in pharmacological sciences* 29, 582-589.

## X

- Xia, B., Yang, S., Liu, T., y Lou, G. (2015). miR-211 suppresses epithelial ovarian cancer proliferation and cell-cycle progression by targeting Cyclin D1 and CDK6. *Molecular cancer* 14, 57.
- Xing, F., Persaud, Y., Pratilas, C. A., Taylor, B. S., Janakiraman, M., She, Q. B., Gallardo, H., Liu, C., Merghoub, T., Hefter, B., *et al.* (2012). Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF. *Oncogene* 31, 446-457.
- Xu, G., Chen, J., Jing, G., Grayson, T. B., y Shalev, A. (2016). miR-204 Targets PERK and Regulates UPR Signaling and beta-Cell Apoptosis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 30, 917-924.

Xu, N., Voyno-Yasenetskaya, T., y Gutkind, J. S. (1994). Potent transforming activity of the G13 alpha subunit defines a novel family of oncogenes. *Biochemical and biophysical research communications* 201, 603-609.

Xu, W., Harrison, S. C., y Eck, M. J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595-602.

Xu, W., y McArthur, G. (2016). Cell Cycle Regulation and Melanoma. *Current oncology reports* 18, 34.

Xu, X. L., Lee, T. C., Offor, N., Cheng, C., Liu, A., Fang, Y., Jhanwar, S. C., Abramson, D. H., y Cobrinik, D. (2010). Tumor-associated retinal astrocytes promote retinoblastoma cell proliferation through production of IGFBP-5. *The American journal of pathology* 177, 424-435.

## Y

Yang, H., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Go, Z., Iyer, R., Kolis, S., Zhao, S., Lee, R., Grippo, J. F., *et al.* (2010a). RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer research* 70, 5518-5527.

Yang, N. Y., Lopez-Bergami, P., Goydos, J. S., Yip, D., Walker, A. M., Pasquale, E. B., y Ethell, I. M. (2010b). The EphB4 receptor promotes the growth of melanoma cells expressing the ephrin-B2 ligand. *Pigment cell & melanoma research* 23, 684-687.

Yang, N. Y., Pasquale, E. B., Owen, L. B., y Ethell, I. M. (2006). The EphB4 receptor-tyrosine kinase promotes the migration of melanoma cells through Rho-mediated actin cytoskeleton reorganization. *The Journal of biological chemistry* 281, 32574-32586.

Yang, X., Du, W. W., Li, H., Liu, F., Khorshidi, A., Rutnam, Z. J., y Yang, B. B. (2013). Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion. *Nucleic acids research* 41, 9688-9704.

## Z

Zhang, H., Bajraszewski, N., Wu, E., Wang, H., Moseman, A. P., Dabora, S. L., Griffin, J. D., y Kwiatkowski, D. J. (2007). PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *The Journal of clinical investigation* 117, 730-738.

Zhang, H., Peng, C., Hu, Y., Li, H., Sheng, Z., Chen, Y., Sullivan, C., Cerny, J., Hutchinson, L., Higgins, A., *et al.* (2012). The Blk pathway functions as a tumor suppressor in chronic myeloid leukemia stem cells. *Nature genetics* 44, 861-871.

Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M. S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T. L., Barchetti, A., Ward, M. R., *et al.* (2006). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9136-9141.

- Zheng, B., Jeong, J. H., Asara, J. M., Yuan, Y. Y., Granter, S. R., Chin, L., y Cantley, L. C. (2009). Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Molecular cell* 33, 237-247.
- Zheng, X. M., Wang, Y., y Pallen, C. J. (1992). Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature* 359, 336-339.
- Zhu, J., Ma, X., Zhang, Y., Ni, D., Ai, Q., Li, H., y Zhang, X. (2016). Establishment of a miRNA-mRNA regulatory network in metastatic renal cell carcinoma and screening of potential therapeutic targets. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.
- Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., y Littman, D. R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.
- Zrihan-Licht, S., Fu, Y., Settleman, J., Schinkmann, K., Shaw, L., Keydar, I., Avraham, S., y Avraham, H. (2000). RAFTK/Pyk2 tyrosine kinase mediates the association of p190 RhoGAP with RasGAP and is involved in breast cancer cell invasion. *Oncogene* 19, 1318-1328.

## Páginas web

[www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)

[www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw](http://www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)



*-DATOS SUPLEMENTARIOS-*



A continuación se presentan las **Tablas 7 y 8**, referentes a los resultados obtenidos tras el análisis de la expresión diferencial de los miRNAs en las células A375 y SK-Mel-103 resistentes a trametinib respecto de sus parentales.

miRNA	Log <sub>2</sub> FoldChange	<i>p</i> -value	<i>p</i> -ajustado
hsa-miR-199a-3p	4,376	5,61E-253	2,56E-250
hsa-miR-199b-3p	4,411	1,20E-242	2,73E-240
hsa-miR-143-3p	11,593	8,14E-204	1,24E-201
hsa-miR-199a-5p	4,769	3,90E-185	4,45E-183
hsa-miR-204-5p	-2,631	9,79E-160	8,95E-158
hsa-miR-221-3p	-2,182	2,16E-149	1,65E-147
hsa-miR-28-3p	1,860	6,42E-149	4,19E-147
hsa-miR-181a-2-3p	3,156	1,15E-130	6,55E-129
hsa-miR-100-5p	-1,822	1,13E-121	5,72E-120
hsa-miR-181a-5p	1,542	7,43E-105	3,39E-103
hsa-miR-140-5p	3,433	1,76E-102	7,30E-101
hsa-miR-146a-5p	-5,612	2,99E-87	1,14E-85
hsa-miR-181b-5p	1,589	3,71E-87	1,31E-85
hsa-miR-181a-3p	1,661	1,64E-80	5,34E-79
hsa-miR-27b-3p	1,340	2,49E-79	7,59E-78
hsa-miR-378a-3p	-1,261	4,93E-79	1,41E-77
hsa-miR-9-5p	-1,982	2,17E-75	5,85E-74
hsa-miR-125b-5p	-1,547	9,66E-74	2,45E-72
hsa-miR-140-3p	3,816	2,13E-71	5,11E-70
hsa-miR-148a-3p	1,530	7,71E-65	1,76E-63
hsa-miR-100-3p	-1,631	1,42E-54	2,95E-53
hsa-miR-30a-3p	2,199	1,07E-49	2,12E-48
hsa-miR-450b-5p	3,771	9,85E-47	1,80E-45
hsa-miR-149-5p	2,881	9,53E-41	1,68E-39
hsa-miR-145-5p	10,958	1,27E-36	2,14E-35
hsa-miR-532-5p	-1,620	1,37E-36	2,23E-35
hsa-miR-20a-5p	-1,320	3,68E-34	5,80E-33
hsa-miR-424-5p	3,597	8,84E-33	1,35E-31
hsa-miR-30a-5p	1,722	1,39E-32	2,05E-31
hsa-miR-27b-5p	2,219	2,10E-32	2,99E-31
hsa-miR-17-5p	-1,458	3,00E-30	4,16E-29
hsa-miR-214-3p	5,001	4,13E-28	5,24E-27
hsa-miR-155-5p	-5,450	7,89E-28	9,74E-27
hsa-miR-615-3p	3,231	2,33E-25	2,73E-24
hsa-miR-584-5p	-1,399	2,99E-25	3,42E-24
hsa-miR-501-3p	-1,209	3,00E-24	3,27E-23
hsa-miR-574-3p	2,199	1,38E-23	1,47E-22
hsa-miR-340-5p	-1,118	5,99E-22	6,08E-21
hsa-miR-508-3p	-8,122	5,20E-20	4,95E-19
hsa-miR-125b-1-3p	-1,157	8,25E-19	7,69E-18

hsa-miR-660-5p	-1,828	6,49E-18	5,93E-17
hsa-miR-671-3p	1,487	1,11E-17	9,90E-17
hsa-miR-424-3p	4,103	1,70E-15	1,49E-14
hsa-miR-500a-3p	-1,384	2,00E-15	1,72E-14
hsa-miR-199b-5p	2,312	2,92E-14	2,43E-13
hsa-miR-450a-5p	3,757	7,05E-14	5,65E-13
hsa-miR-214-5p	4,404	2,18E-13	1,72E-12
hsa-miR-148a-5p	1,312	3,88E-13	3,01E-12
hsa-miR-30d-5p	-1,169	4,35E-13	3,32E-12
hsa-miR-30c-2-3p	2,615	5,77E-13	4,33E-12
hsa-miR-30c-5p	1,299	1,25E-12	9,23E-12
hsa-miR-28-5p	1,484	1,37E-12	9,92E-12
hsa-miR-873-3p	-5,997	2,15E-12	1,54E-11
hsa-miR-548k	-1,465	5,17E-12	3,63E-11
hsa-miR-708-3p	-5,773	1,17E-11	8,06E-11
hsa-miR-193a-3p	-1,424	1,18E-11	8,06E-11
hsa-miR-193b-3p	1,454	3,93E-11	2,57E-10
hsa-miR-708-5p	-5,103	5,99E-11	3,86E-10
hsa-miR-514a-3p	-6,332	8,32E-11	5,21E-10
hsa-miR-873-5p	-5,607	5,29E-10	3,27E-09
hsa-miR-509-3p	-5,952	8,83E-10	5,31E-09
hsa-miR-190a-5p	4,992	2,78E-09	1,61E-08
hsa-miR-129-5p	4,370	9,39E-09	5,30E-08
hsa-miR-145-3p	6,154	1,37E-08	7,64E-08
hsa-miR-362-5p	-2,029	1,68E-08	9,23E-08
hsa-miR-29b-3p	-1,368	1,99E-08	1,08E-07
hsa-miR-30d-3p	-1,252	2,45E-08	1,32E-07
hsa-miR-193a-5p	-1,423	1,93E-07	9,71E-07
hsa-miR-129-1-3p	5,659	2,30E-07	1,14E-06
hsa-miR-222-3p	-2,059	2,80E-07	1,38E-06
hsa-miR-196b-5p	1,166	1,63E-06	7,69E-06
hsa-miR-181d-5p	3,155	2,66E-06	1,23E-05
hsa-miR-143-5p	5,401	2,71E-06	1,24E-05
hsa-miR-513c-5p	-4,937	3,57E-06	1,61E-05
hsa-miR-381-3p	-4,260	4,08E-06	1,83E-05
hsa-miR-18a-5p	-1,147	7,26E-06	3,16E-05
hsa-miR-3681-5p	-4,897	7,36E-06	3,17E-05
hsa-miR-504-5p	-2,555	9,02E-06	3,85E-05
hsa-miR-373-3p	-4,637	2,23E-05	9,33E-05
hsa-miR-23b-3p	1,310	2,45E-05	1,02E-04
hsa-miR-338-3p	-3,154	2,49E-05	1,02E-04
hsa-miR-548e-3p	-1,545	5,15E-05	2,10E-04
hsa-miR-181c-5p	2,496	6,62E-05	2,68E-04
hsa-miR-409-3p	-3,843	7,16E-05	2,87E-04
hsa-miR-320b	1,738	7,34E-05	2,92E-04
hsa-miR-582-3p	-1,076	1,04E-04	3,95E-04

hsa-miR-4454	-2,115	2,01E-04	7,53E-04
hsa-miR-378c	-1,723	2,09E-04	7,76E-04
hsa-miR-509-3-5p	-4,184	2,38E-04	8,65E-04
hsa-miR-411-5p	-3,509	3,15E-04	1,13E-03
hsa-miR-3180	1,083	3,25E-04	1,14E-03
hsa-miR-3605-3p	-2,603	3,25E-04	1,14E-03
hsa-miR-641	-1,475	3,77E-04	1,30E-03
hsa-miR-654-3p	-3,599	4,04E-04	1,38E-03
hsa-miR-17-3p	-1,405	5,05E-04	1,71E-03
hsa-miR-548h-5p	3,470	1,12E-03	3,67E-03
hsa-miR-3180-5p	1,624	1,24E-03	4,02E-03
hsa-miR-664a-3p	2,071	1,47E-03	4,70E-03
hsa-miR-3145-5p	-3,653	1,92E-03	6,10E-03
hsa-miR-195-5p	2,545	2,01E-03	6,33E-03
hsa-miR-1269a	2,380	2,12E-03	6,63E-03
hsa-miR-514a-5p	-3,560	2,29E-03	7,11E-03
hsa-miR-3145-3p	-3,563	2,60E-03	8,04E-03
hsa-miR-4652-5p	-3,709	2,71E-03	8,30E-03
hsa-miR-222-5p	-1,143	2,92E-03	8,89E-03
hsa-miR-548ba	-3,495	2,94E-03	8,89E-03
hsa-miR-3613-3p	-3,026	3,08E-03	9,25E-03
hsa-miR-486-5p	1,797	3,10E-03	9,25E-03
hsa-miR-542-5p	3,418	3,22E-03	9,56E-03
hsa-miR-502-3p	-1,056	4,02E-03	1,18E-02
hsa-miR-503-3p	3,074	4,06E-03	1,19E-02
hsa-miR-2276-3p	-3,312	4,15E-03	1,21E-02
hsa-miR-221-5p	-1,945	5,01E-03	1,45E-02
hsa-miR-508-5p	-3,260	5,97E-03	1,67E-02
hsa-miR-410-3p	-2,737	6,42E-03	1,79E-02
hsa-miR-615-5p	2,986	6,67E-03	1,85E-02
hsa-miR-26b-3p	1,537	1,07E-02	2,88E-02
hsa-miR-4661-5p	-2,745	1,16E-02	3,10E-02
hsa-miR-5699-3p	-2,482	1,29E-02	3,41E-02
hsa-miR-139-5p	-2,850	1,33E-02	3,49E-02
hsa-miR-4662a-5p	-2,897	1,34E-02	3,49E-02
hsa-miR-618	-2,966	1,35E-02	3,49E-02
hsa-miR-188-3p	-2,786	1,38E-02	3,56E-02
hsa-miR-551b-3p	-2,996	1,44E-02	3,69E-02
hsa-let-7a-2-3p	-1,714	1,51E-02	3,85E-02
hsa-miR-584-3p	-2,817	1,54E-02	3,90E-02
hsa-miR-497-5p	1,845	1,61E-02	4,05E-02
hsa-miR-513b-5p	-2,914	1,86E-02	4,63E-02

**Tabla 7.** miRNAs diferencialmente expresados en las células A375-TR respecto de las A375, obtenidos mediante el análisis con el paquete DESeq2. Se utilizó el criterio  $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 1$  y  $p$ -value ajustado  $< 0.05$ . Se muestran los valores de  $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ ,  $p$ -value y  $p$ -value ajustado.

miRNA	Log <sub>2</sub> FoldChange	<i>p-value</i>	<i>p-ajustado</i>
hsa-miR-143-3p	7,850	7,70E-162	3,87E-159
hsa-miR-27b-3p	1,575	9,70E-105	2,44E-102
hsa-miR-29a-3p	-2,005	9,59E-104	1,61E-101
hsa-miR-9-5p	-2,222	2,81E-100	3,54E-98
hsa-miR-99b-5p	1,632	1,24E-87	1,25E-85
hsa-miR-146a-5p	3,498	1,20E-75	1,01E-73
hsa-miR-30a-3p	-2,653	3,07E-75	2,21E-73
hsa-let-7i-5p	-1,081	4,14E-73	2,60E-71
hsa-miR-7974	-3,259	3,14E-68	1,76E-66
hsa-let-7e-5p	1,552	7,15E-60	3,60E-58
hsa-miR-125b-1-3p	-2,046	4,14E-58	1,89E-56
hsa-miR-21-3p	-1,318	5,95E-58	2,49E-56
hsa-miR-100-3p	-1,637	5,07E-55	1,96E-53
hsa-miR-125b-5p	-1,217	5,87E-48	2,11E-46
hsa-miR-98-5p	1,356	1,72E-34	5,40E-33
hsa-miR-561-5p	-1,434	5,83E-33	1,72E-31
hsa-miR-192-5p	1,416	1,17E-32	3,26E-31
hsa-miR-92a-3p	-1,223	1,83E-32	4,86E-31
hsa-miR-30a-5p	-1,773	3,73E-31	8,93E-30
hsa-miR-210-3p	3,193	4,72E-26	1,03E-24
hsa-miR-29b-3p	-2,598	2,02E-25	4,07E-24
hsa-miR-363-3p	-8,706	1,13E-21	2,18E-20
hsa-miR-204-5p	-5,240	4,55E-21	8,48E-20
hsa-miR-19b-3p	-1,046	8,42E-20	1,46E-18
hsa-miR-708-3p	-4,157	2,64E-18	4,42E-17
hsa-miR-145-5p	6,652	1,03E-17	1,67E-16
hsa-miR-381-3p	-3,560	2,37E-17	3,73E-16
hsa-miR-708-5p	-4,187	5,77E-17	8,30E-16
hsa-miR-20b-5p	-7,866	3,93E-14	5,07E-13
hsa-miR-24-3p	1,428	4,54E-14	5,70E-13
hsa-miR-30c-2-3p	-2,716	9,85E-14	1,21E-12
hsa-miR-486-5p	2,889	3,10E-13	3,72E-12
hsa-miR-34c-5p	1,183	1,92E-12	2,25E-11
hsa-miR-409-3p	-3,734	4,35E-12	4,97E-11
hsa-miR-140-5p	1,372	8,23E-12	9,20E-11
hsa-miR-532-5p	-1,162	2,65E-11	2,84E-10
hsa-miR-183-5p	1,067	4,93E-11	5,17E-10
hsa-miR-193b-3p	1,592	8,71E-11	8,94E-10
hsa-miR-584-5p	-1,243	2,47E-10	2,49E-09
hsa-miR-4454	-4,197	5,46E-10	5,39E-09
hsa-miR-424-5p	1,503	7,74E-09	7,21E-08
hsa-miR-106a-5p	-5,734	1,68E-08	1,51E-07
hsa-miR-15b-3p	-1,658	2,71E-07	2,31E-06
hsa-miR-548k	1,081	7,69E-07	6,24E-06

hsa-miR-421	1,209	8,57E-07	6,85E-06
hsa-miR-411-5p	-2,294	9,37E-07	7,37E-06
hsa-miR-766-3p	4,2424	2,01E-06	1,51E-05
hsa-miR-873-5p	-3,093	5,22E-06	3,75E-05
hsa-miR-210-5p	3,0328	6,10E-06	4,32E-05
hsa-miR-654-3p	-2,824	9,12E-06	6,37E-05
hsa-miR-23b-3p	1,838	2,32E-05	1,53E-04
hsa-miR-149-5p	1,016	2,72E-05	1,78E-04
hsa-miR-1180-3p	-3,027	3,68E-05	2,35E-04
hsa-miR-410-3p	-3,190	5,04E-05	3,13E-04
hsa-miR-873-3p	-1,904	5,82E-05	3,57E-04
hsa-miR-92a-1-5p	-1,390	9,20E-05	5,51E-04
hsa-miR-455-3p	1,459	1,54E-04	9,02E-04
hsa-miR-424-3p	1,462	1,72E-04	9,82E-04
hsa-miR-126-5p	-2,604	2,54E-04	1,42E-03
hsa-miR-17-3p	-1,290	5,21E-04	2,70E-03
hsa-miR-548h-5p	3,849	5,37E-04	2,76E-03
hsa-miR-450b-5p	1,029	6,55E-04	3,33E-03
hsa-miR-18a-3p	-1,432	8,24E-04	4,14E-03
hsa-miR-365b-3p	1,334	1,66E-03	8,19E-03
hsa-miR-331-3p	1,084	1,71E-03	8,36E-03
hsa-miR-3065-3p	3,160	1,85E-03	8,88E-03
hsa-miR-1248	-3,609	2,15E-03	1,02E-02
hsa-miR-129-5p	1,910	2,62E-03	1,22E-02
hsa-miR-20b-3p	-3,694	2,69E-03	1,24E-02
hsa-miR-135b-5p	-1,302	3,48E-03	1,58E-02
hsa-miR-488-3p	-3,544	4,14E-03	1,85E-02
hsa-miR-125b-2-3p	-2,329	4,65E-03	2,03E-02
hsa-miR-29b-1-5p	-1,058	5,84E-03	2,49E-02
hsa-miR-153-3p	3,250	7,53E-03	3,08E-02
hsa-miR-1296-5p	1,212	7,49E-03	3,08E-02
hsa-miR-504-5p	1,177	1,17E-02	4,53E-02
hsa-miR-1284	3,110	1,21E-02	4,64E-02

Tabla 8. miRNAs diferencialmente expresados en las células SK-Mel-103-TR respecto de las SK-Mel-103, obtenidos mediante el análisis con el paquete DESeq2. El criterio empleado fue  $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 1$  y  $p\text{-value}$  ajustado  $< 0.05$ . Se muestran los valores de  $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ ,  $p\text{-value}$  y  $p\text{-value}$  ajustado.



*-ANEXOS-*



## Publicaciones de la autora relacionadas con el trabajo de tesis:

- Bartolomé RA\*, **Díaz-Martínez M\***, Coló GP, Arellano-Sánchez N, Torres-Ayuso P, Kleinovink JW, Mérida I, Teixidó J. A Blk-p190RhoGAP signaling module downstream of activated Gα13 functionally opposes CXCL12-stimulated RhoA activation and cell invasion. *Cellular Signalling*. Vol. 26, nº 11 2551-2561, 2014.....**ANEXO I**
- **Díaz-Martínez M**, Benito-Jardón L, Alonso L, Koetz-Ploch L, Hernando E, Teixidó J. Increased expression of miR-204-5p and miR-211-5p in response to vemurafenib provides early survival to melanoma cells. En preparación..... **ANEXO II**

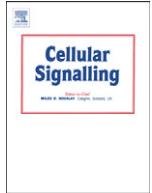
## Publicaciones en las que ha colaborado la autora:

- Koetz-Ploch L, Hanniford D, Dolgalev I, Sokolova E, Zhong J, **Díaz-Martínez M**, Bernstein E, Darvishian F, Flaherty KT, Chapman PB, Tawbi H, Hernando E. MicroRNA-125a promotes resistance to BRAF inhibitors through suppression of the intrinsic apoptotic pathway. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2017. Prepublicado *online*; doi: 10.1111/pcmr.12578 .....**ANEXO III**



*-ANEXO I-*





## A Blk–p190RhoGAP signaling module downstream of activated $G\alpha_{13}$ functionally opposes CXCL12-stimulated RhoA activation and cell invasion



Rubén A. Bartolomé<sup>a,1</sup>, Marta Díaz-Martínez<sup>a,1</sup>, Georgina P. Coló<sup>a,2</sup>, Nohemí Arellano-Sánchez<sup>a</sup>, Pedro Torres-Ayuso<sup>b</sup>, Jan Willem Kleinovink<sup>a,3</sup>, Isabel Mérida<sup>b</sup>, Joaquin Teixidó<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), 28049 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 April 2014

Received in revised form 30 June 2014

Accepted 8 July 2014

Available online 13 July 2014

#### Keywords:

Heterotrimeric G proteins

GTPase

Chemokines

Src

Cell invasion

### ABSTRACT

Activation of the GTPase RhoA linked to cell invasion can be tightly regulated following  $G\alpha_{13}$  stimulation. We have used a cellular model displaying  $G\alpha_{13}$ -dependent inhibition of RhoA activation associated with defective cell invasion to the chemokine CXCL12 to characterize the molecular players regulating these processes. Using both RNAi transfection approaches and protein overexpression experiments here we show that the Src kinase Blk is involved in  $G\alpha_{13}$ -activated tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP, which causes RhoA inactivation and ultimately leads to deficient cell invasion. Characterization of molecular interplays between  $G\alpha_{13}$ , Blk and p190RhoGAP revealed that Blk binds  $G\alpha_{13}$ , and that Blk-mediated p190RhoGAP phosphorylation upon  $G\alpha_{13}$  activation correlates with weakening of  $G\alpha_{13}$ -Blk association connected to increased Blk–p190RhoGAP assembly. These results place Blk upstream of the p190RhoGAP–RhoA pathway in  $G\alpha_{13}$ -activated cells, overall representing an opposing signaling module during CXCL12-triggered invasion. In addition, analyses with Blk- or  $G\alpha_{13}$ -knockdown cells indicated that Blk can also mediate CXCL12-triggered phosphorylation of p190RhoGAP independently of  $G\alpha_{13}$ . However, even if CXCL12 induces the Blk-mediated GAP phosphorylation, the simultaneous stimulation of the guanine-nucleotide exchange factor Vav1 by the chemokine, as earlier reported, leads to a net increase in RhoA activation. Therefore, when  $G\alpha_{13}$  is concurrently stimulated with CXCL12 there appears to be sufficient Blk activity to promote adequate levels of p190RhoGAP tyrosine phosphorylation to inactivate RhoA and to impair cell invasiveness.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cell migration and invasion control development and cell differentiation, and play important roles in tumor progression. Rho GTPases are the main regulators of cell migration, which is based on their control of actin cytoskeleton dynamics [1,2]. Rho GTPase activity is modulated by guanine-nucleotide exchange factors (GEFs), which activate Rho GTPases by stimulating the exchange of bound GDP by GTP; by GTPase activating proteins (GAPs), which inhibit Rho GTPases by inducing GTP hydrolysis; and by guanine nucleotide-dissociation inhibitors, which

bind to and inactivate Rho GTPases in the cytosol [3–6]. GEFs and GAPs are multidomain proteins which engage distinct signaling pathways, thus controlling different cellular processes including protein transport, spindle formation and cellular differentiation and proliferation, in addition to their regulation of the actin cytoskeleton [4,6].

The GAPs have been divided into RhoGAP, RanGAP, RabGAP, RasGAP and RapGAP families. Up to 70 RhoGAP members have been identified in humans, displaying important roles in cell migration, vesicular transport, cytokinesis and cell differentiation. The activity of these proteins can be regulated by phosphorylation, lipid binding, protein–protein interaction and proteolytic degradation (reviewed in [7]). The p190RhoGAP member displays GAP activity towards RhoA [8,9], a process which depends on its Src-dependent tyrosine phosphorylation and on its interaction with p120RasGAP [10,11]. p190RhoGAP is involved in cell migration and cytokinesis [12,13], and it has been proposed to have a role as tumor suppressor [14,15].

Cell migration is stimulated by chemokines, which exert their functions upon binding to heterotrimeric guanine nucleotide-binding (G) protein-coupled receptors (GPCRs) [16–18]. The chemokine-receptor pair CXCL12–CXCR4 is required for hematopoiesis and nervous

\* Corresponding author at: Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 8373112; fax: +34 91 5360432.

E-mail address: [joaquin@cib.csic.es](mailto:joaquin@cib.csic.es) (J. Teixidó).

<sup>1</sup> These authors equally contributed to this work.

<sup>2</sup> Present address: Max Planck Institute of Biochemistry, Department of Molecular Medicine, Martinsried, Germany.

<sup>3</sup> Present address: Department of Immuno-Hematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands.

system development [19–22], and contributes to tumor cell invasion [23–28]. CXCL12 induces tyrosine phosphorylation of the GEFs Vav1 and Vav2 in melanoma cells, leading to the activation of the Rho GTPases Rac1 and RhoA and to the stimulation of cell invasion [29].

Heterotrimeric G proteins sense and transmit signaling from extracellular proteins, lipids, and amines, thus controlling a vast repertoire of cellular processes [30,31]. These G proteins consist of a  $\alpha$  subunit and a complex formed by  $\beta$  and  $\gamma$  subunits. Upon G protein interaction with engaged membrane receptors, GTP–G $\alpha$  dissociates from the G $\beta\gamma$  complex, and then binds to different effector proteins, leading to the activation of distinct signaling pathways. The GTPase activity inherent to G $\alpha$  limits G protein activation, as GTP hydrolysis causes re-association of GDP–G $\alpha$  and G $\beta\gamma$ .

The G protein family encompasses the G $_i$ , G $_s$ , G $_{q/11}$  and G $_{12/13}$  subfamilies [30–33], whose members regulate different signaling pathways. The G $_{12/13}$  subfamily consists of two  $\alpha$  subunits, G $\alpha_{12}$  and G $\alpha_{13}$ , which display ubiquitous expression and similar receptor coupling [33–35]. Receptors coupled to G $\alpha_{12/13}$  include G2A, which binds to lysophosphatidylcholine (LPC), and sphingosine-1-phosphate, thromboxane and endothelin receptors [34]. Moreover, G $\alpha_{12}$  and G $\alpha_{13}$  have similar biochemical and functional properties, though functional differences exist. Thus, G $\alpha_{13}$  knock-out mice die at E9.5 as a consequence of vascular defects, whereas G $\alpha_{12}$ -null counterparts are viable and show no distinct phenotypes [36,37]. In addition, G $\alpha_{13}$ /G $\alpha_{12}$  double knock-out mice display defects in the development of the nervous system, and an important role for G $_{12/13}$  proteins in platelet activation and immune cell polarization and migration has been reported (reviewed in [33]).

G $_{12/13}$  proteins are the main regulators of the activity of RhoGTPases. Thus, RhoA activation and subsequent actin reorganization were early reported to be controlled by G $\alpha_{12/13}$  stimulation [38]. Extensive work has shown that the GEF p115RhoGEF is a key mediator of Rho activation upon G $\alpha_{12/13}$  stimulation [33,35,39,40].

G $\alpha_{13}$ -dependent RhoA activation regulates cell invasion, as expression of active G $\alpha_{12/13}$  in breast carcinoma and prostate cancer cell lines leads to RhoA activation linked to upregulation of cell invasion [41–43]. Of note, melanoma cell lines expressing constitutively mutant active forms of G $\alpha_{12}$  and G $\alpha_{13}$  that lack GTPase activity, or cells exposed to stimuli that act through G $\alpha_{13}$ -coupled receptors, display defective RhoA activation associated with inhibition of cell invasion in response to CXCL12 [43]. Furthermore, Src kinase-dependent tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP was shown to be needed for G $\alpha_{13}$ -promoted RhoA inactivation and for blockade of cell invasion [43].

Together, these data reveal the existence of differential modulation of the G $\alpha_{13}$ -dependent signaling that can cause either inhibition or stimulation of RhoA activation linked to distinct invasion responses. In the present work we have further dissected the G $\alpha_{13}$ -dependent signaling pathway that causes RhoA inactivation and deficient cell invasion.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cells, antibodies and reagents

The human melanoma cell lines BLM, Mel 57, A375 and SK-Mel 37, as well as human breast cancer MDA-MB-231 cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (BioWhittaker, Verviers, Belgium). BLM-G $\alpha_{13}$ wt and BLM-G $\alpha_{13}$ QL stable transfectants have been previously reported [43]. The melanoma cell line MeWo, B lymphocyte Ramos cells, and Jurkat and Molt-4 T cells were cultured in RPMI 1640/10% FBS. Antibodies against G $\alpha_{13}$ , c-Src, RhoA, p-Tyr and Blk were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies to p190RhoGAP and  $\beta$ -actin were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), anti-GFP from Molecular Probes (Eugene, OR) and anti-GST from Millipore (Billerica, MA). CXCL12 was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN) and lysophosphatidylcholine from Sigma-Aldrich.

### 2.2. Vectors, mutagenesis and RNA interference

Full length Blk cDNA (NM\_001715.2) was amplified by RT-PCR using mRNA from Ramos B cells and the oligonucleotides 5'-ACTGAAGCTTTG CCAAGGATGG-3' (oligo 1) and 5'-TGGGCTCGAGGCGCAGCGGGCG-3'. The product was subcloned into the pcDNA3.1 vector between HindIII and XhoI sites. Sequencing confirmed conservation of codon reading frames and that no mutations had been introduced. Blk  $\Delta$ Ct in pcDNA3.1 was generated by deletion of the last 129 bp of the Blk C-terminus. For this, pcDNA3.1-Blk wt was PCR-amplified using the oligos (1) and 5'-CCCAGACACCTGCCGCTCGCCTCGAGCA-3', and the product subcloned into pcDNA3.1. A Blk Tyr501 to Ala substitution was generated at using the QuickChange Lightning Site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, La Jolla, CA). The full Blk coding sequence from pcDNA3.1-Blk wt was also subcloned into the pGEX-A vector. The pGEX-A-Blk wt as well as the pGEX-2T-p190A RhoGAP-4 vector (gift from Dr. Kozo Kaibuchi, Nagoya University, Japan) were transformed and fusion proteins purified with glutathione sepharose beads (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden). Vectors coding for GFP-fused forms of wild-type G $\alpha_{13}$ , constitutively active G $\alpha_{13}$ QL, wild-type RhoA and activated G14V-RhoA have been described [43]. Control, p190RhoGAP and G $\alpha_{13}$  siRNA have been previously functionally characterized [43]. We used three pre-designed Blk siRNA (Blk-2, -3 and -4, corresponding to s1995, 156 and s1996, respectively; Ambion, Foster City, CA), and ON-TARGET plus SMARTpool for human c-Src siRNA (Dharmacon, Lafayette, CO).

### 2.3. Transfections and retroviral gene transfer

Cells were transiently transfected with vectors using jetPRIME (Polyplus Transfection, Illkirch, France), or with siRNA using either XtremeGENE (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) or Interferin (Polyplus Transfection), according to the manufacturer's instructions, and transfectants tested 24–48 h post-transfection. Blk wt and Blk  $\Delta$ Ct were excised from pcDNA3.1 and subcloned into the pRETRO-bsd vector using BglII and XhoI sites. These constructs as well as pRETRO-bsd control were co-transfected with pNGV-VSV-G and pNGV-gag-pol vectors into 293FT packaging cells. After 48 h, conditioned medium was used to infect mock, G $\alpha_{13}$ wt or G $\alpha_{13}$  QL stable transfectants which were subjected to limiting-dilution cell cloning. Clones were assessed by immunoblotting to test for Blk and G $\alpha_{13}$  overexpression.

### 2.4. Immunoprecipitation, western blotting and pull-down assays

For immunoprecipitation, we followed the reported method [43]. Briefly, cell lysates were sequentially incubated with antibodies and protein G-sepharose beads, and bound proteins resolved by SDS-PAGE, followed by western blotting and detection by chemiluminescence (LAS 3000 Image Reader). Densitometry of the resulting bands was performed using ImageJ software. RhoA GTPase activity assays were performed as described [25]. In brief, detached cells were incubated with CXCL12 and/or LPC, and upon lysis, aliquots from cell extracts were either kept for total lysate controls or incubated with GST-C21 fusion protein in the presence of glutathione-agarose beads. After elution, bound proteins were immunoblotted with anti-RhoA antibodies. For pull-down assays using GST-Blk wt, cell lysates were sequentially incubated with purified GST-Blk wt and with glutathione sepharose beads. Bound proteins were eluted and subjected to immunoblotting as above.

### 2.5. Invasion and in vitro kinase assays

Invasions were performed as earlier reported [27]. Briefly, cells were loaded on the upper compartments of invasion chambers coated with Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA), whereas the lower compartments were filled with invasion medium with or without CXCL12 or

LPC. Invasive cells were fixed, stained and counted under a microscope. For in vitro kinase assays using radioactive ATP, sepharose-bound immunoprecipitated Blk was incubated in kinase buffer with poly(Glu.Tyr), as indicated by the manufacturer (Sigma Aldrich), and with 10  $\mu$ Ci/reaction of  $^{32}$ P-ATP (3000 Ci/mmol; Hartmann Analytic, Braunschweig, Germany). Reactions were terminated by spotting 20  $\mu$ l of the mixture onto phosphocellulose P81 paper (Millipore), which was washed with 5% phosphoric acid solution.  $^{32}$ P-ATP incorporation was measured in a scintillation beta counter. For in vitro cold kinase assays, protein G-sepharose beads containing immunoprecipitated Blk were sequentially washed with lysis, MOPS and kinase buffers. Beads were then incubated at 30 °C for 30 min under agitation with the GST-p190RhoGAP fusion protein in kinase buffer containing 1 mM ATP. Samples were resolved by SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-p-Tyr antibodies.

## 2.6. Statistical analyses

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey–Kramer multiple comparison test. For continuous variable data without Gaussian distribution, we performed a Mann–Whitney test. In all analyses the minimum acceptable level of significance was  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Blk involvement in p190RhoGAP tyrosine phosphorylation following $G\alpha_{13}$ activation

Tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP correlates with its GAP activity on RhoA [9,44,45]. As expression of constitutively active  $G\alpha_{13}$  (Q226L;  $G\alpha_{13}QL$ ) can lead to either inhibition of RhoA activation in BLM and MeWo melanoma cell lines [43], or to the activation of this GTPase in MDA-MB-231 breast carcinoma cells [41,43], we hypothesized that the degree of the GAP phosphorylation in these two cell types may be different. Therefore, we used BLM and MDA-MB-231 cells as models to study the mechanistic basis for these opposed responses. As reported [43], p190RhoGAP tyrosine phosphorylation was higher in BLM transfectants expressing  $G\alpha_{13}QL$  than in  $G\alpha_{13}wt$  counterparts (Fig. 1A). Instead, no tyrosine phosphorylation of this GAP was detected in MDA-MB-231  $G\alpha_{13}$  transfectants (Fig. 1A).

p190RhoGAP tyrosine phosphorylation in BLM- $G\alpha_{13}$  transfectants involves Src kinase activity [43]. Among several factors that could account for the presence or absence of the GAP phosphorylation in BLM and MDA-MB-231 cells, respectively, a distinct Src kinase expression or activity was contemplated. As a first approach, we qualitatively analyzed Src kinase expression in these cells. Together with previously published data on Src kinase expression in MDA-MB-231 cells, our expression analyses revealed that the Src kinase Blk was differentially expressed in BLM compared with MDA-MB-231 cells (Supplementary Fig. S1A–E). Immunoblotting assays confirmed that, similarly to our positive control Ramos B cells, BLM cells express Blk, whereas this kinase was absent in MDA-MB-231 cells (Fig. 1B). Cell fractionation and confocal microscopy analyses showed that Blk was distributed to the cell membrane, and also displayed a speckled cytosolic appearance (Supplementary Fig. S1F, G).

We then knocked down Blk in BLM cells to study its potential role in  $G\alpha_{13}$ -stimulated p190RhoGAP tyrosine phosphorylation. Among three different Blk siRNA tested, the Blk-3 siRNA was the most efficient at reducing Blk (Fig. 1C, left), but not Fyn or Yes expression (not shown) in parental BLM cells. Notably, depletion of Blk in  $G\alpha_{13}QL$  transfectants lowered their p190RhoGAP tyrosine phosphorylation to levels shown by  $G\alpha_{13}wt$  cells (Fig. 1C, middle and right). Instead, c-Src knocking down did not significantly affect the increase in p190RhoGAP phosphorylation seen in  $G\alpha_{13}QL$  transfectants (Fig. 1D). Lysophosphatidylcholine (LPC) is a bioactive lipid that binds  $G\alpha_{13}$ -associated GPCRs [46] and that promotes  $G\alpha_{13}$ -dependent p190RhoGAP tyrosine phosphorylation [43].

LPC, as well as CXCL12 stimulated a robust phosphorylation of p190RhoGAP that was prevented by Blk silencing (Fig. 1E). Moreover, higher GAP phosphorylation by combined LPC and CXCL12 was reversed to basal levels in Blk knockdown cells. Remarkably, the increased p190RhoGAP–RhoA co-precipitations seen in  $G\alpha_{13}$ -activated control siRNA transfectants were down-modulated following Blk depletion (Fig. 1C, right; 1E). While we previously observed that  $G\alpha_{13}$  knockdown blocks the enhanced p190RhoGAP tyrosine phosphorylation in  $G\alpha_{13}$ -activated cells [43],  $G\alpha_{13}$  silencing experiments indicated that CXCL12-stimulated phosphorylation of this GAP is independent of  $G\alpha_{13}$  (Fig. 1F).

### 3.2. Blk knockdown rescues RhoA activation and cell invasion in $G\alpha_{13}$ -activated cells

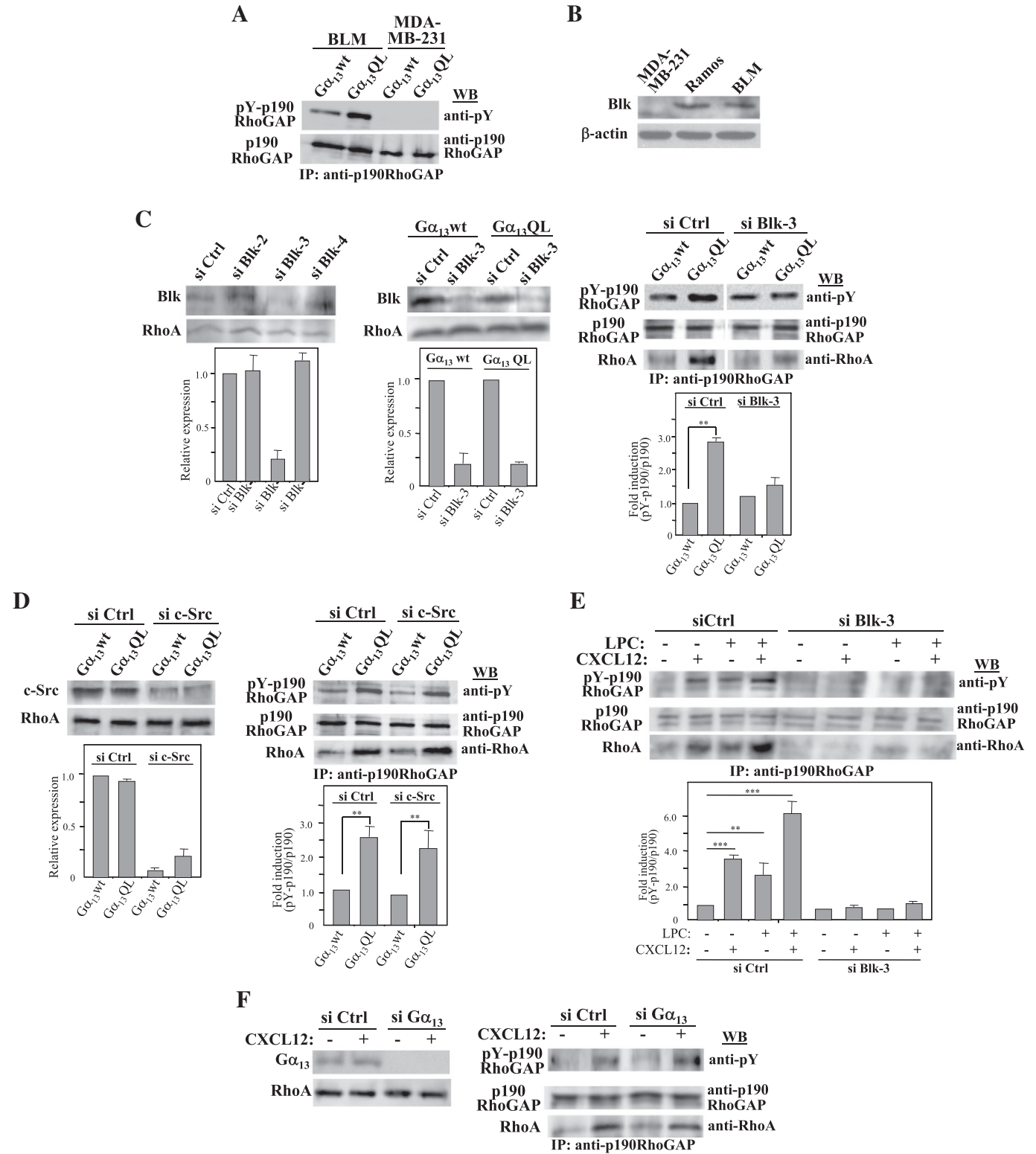
$G\alpha_{13}QL$  expression in BLM cells or exposure to LPC leads to p190RhoGAP-mediated RhoA inactivation and defective cell invasiveness [43]. Remarkably, Blk depletion in  $G\alpha_{13}QL$  transfectants fully rescued their RhoA activation by CXCL12, and it was already sufficient to increase the levels of active RhoA in  $G\alpha_{13}wt$  cells in comparison with control siRNA transfectants (Fig. 2A). Of note, the deficient invasiveness to CXCL12 as a result of  $G\alpha_{13}QL$  expression or to cell exposure to LPC was significantly rescued upon knocking down Blk (Fig. 2B, left and right). These data indicate that  $G\alpha_{13}$ -dependent tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP causing RhoA inactivation and impairment in cell invasion involves Blk function.

### 3.3. Blk overexpression upregulates p190RhoGAP tyrosine phosphorylation leading to inhibition of RhoA activation and impairment of cell invasion

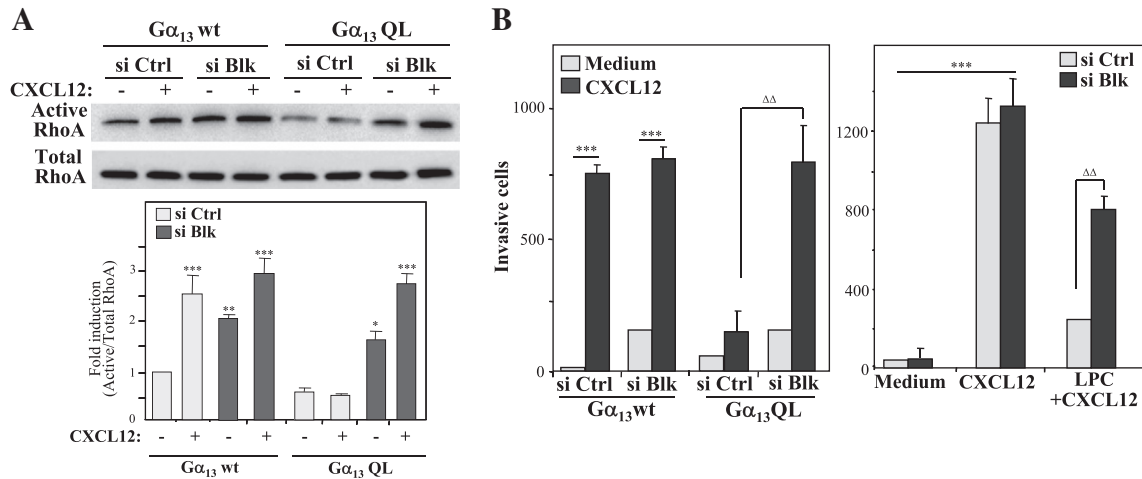
To further characterize the Blk implication in  $G\alpha_{13}$ -dependent responses, the Blk cDNA was first subcloned into the pcDNA3.1 vector (Supplementary Fig. S2A). In addition, we also subcloned a Blk form lacking a portion of the C-terminal Blk region (Blk  $\Delta$ Ct) that encompasses the regulatory Y501 residue, a Src kinase common C-terminal amino acid whose phosphorylation results in catalytically inactive Src [47,48]. Thus, the Blk  $\Delta$ Ct form represents a potentially active Blk. Transient transfection of Blk wt and Blk  $\Delta$ Ct in parental BLM cells led to the expected expression of 56 kD and 52 kD Blk forms, respectively (Supplementary Fig. S2B). To facilitate subsequent functional Blk characterization, the Blk wt and  $\Delta$ Ct forms were inserted into pRetro vectors, which were used to infect either BLM cells or stable BLM- $G\alpha_{13}$  transfectants, resulting in stable Blk wt and Blk  $\Delta$ Ct overexpression (Fig. 3A).

Remarkably, BLM- $G\alpha_{13}$  transfectants overexpressing Blk wt displayed higher p190RhoGAP tyrosine phosphorylation than mock counterparts, and a further enhancement in phosphorylation was detected in Blk  $\Delta$ Ct transfectants (Fig. 3B). Exposure to CXCL12 resulted in additional increment of the GAP phosphorylation, although no further increased phosphorylation was detected in  $G\alpha_{13}QL$ -Blk  $\Delta$ Ct transfectants, possibly due to saturated phosphorylation levels. Moreover, BLM cells overexpressing Blk or Blk  $\Delta$ Ct showed an upregulated GAP phosphorylation following LPC, CXCL12 or LPC/CXCL12 incubations (Fig. 3C). In addition, transfection of a Blk form carrying a Tyr501 to Ala mutation (Y501A; see Supplementary Fig. S2A) also led to higher p190RhoGAP tyrosine phosphorylation than mock cells (Fig. 3D). Correlating with enhanced p190RhoGAP tyrosine phosphorylation, we found that p190RhoGAP–RhoA association was stronger in  $G\alpha_{13}$ -activated and CXCL12-exposed Blk wt or Blk  $\Delta$ Ct transfectants than in mock counterparts (Fig. 3B, C).

Of note, Blk wt, and specially Blk  $\Delta$ Ct overexpression in  $G\alpha_{13}$  transfectants led to inhibition of RhoA activation (Fig. 4A). Opposite to the rescue of cell invasion upon Blk depletion (see Fig. 2B), overexpression of Blk wt and Blk  $\Delta$ Ct in  $G\alpha_{13}$  transfectants led to defective cell invasion towards CXCL12 (Fig. 4B). Using a siRNA for p190RhoGAP whose transfection was previously shown to specifically rescue RhoA activation [43], we show that this deficient invasion is based on



**Fig. 1.** Blk depletion reverses the enhanced p190rhoGAP tyrosine phosphorylation in Gα<sub>13</sub>-activated cells. (A) Cells were subjected to immunoprecipitation with anti-p190RhoGAP antibodies followed by immunoblotting with the indicated antibodies. (B) Cells were tested for Blk expression by western blotting. Protein control loading was assessed with anti-β-actin antibodies. (C, top) BLM (left) or Gα<sub>13</sub>wt and Gα<sub>13</sub>QL cells (middle) were transfected with control or with the indicated Blk siRNA, and transfectants tested by western blotting. Total protein loading was assessed with anti-RhoA antibodies. (Right) Gα<sub>13</sub>wt and Gα<sub>13</sub>QL cells were transfected with control or Blk siRNA, and transfectants subjected to immunoprecipitation and western blotting with the indicated antibodies. (Bottom) Bars represent densitometric quantification of gel bands showing the mean of four independent experiments, and error bars represent the standard error (SD) of the mean (\*\*p < 0.01). (D) Gα<sub>13</sub>wt and Gα<sub>13</sub>QL cells were transfected with c-Src or control siRNA, and transfectants analyzed as in (C) (n = 3). (E, top) Parental BLM cells were transfected with Blk-3 or control siRNA, and transfectants either left untreated or incubated without (–) or with (+) LPC and/or CXCL12. (Bottom) Densitometric quantification of gel bands shows the mean ± SD of three independent experiments. (\*\*\*) p < 0.001, \*\* p < 0.01. (F) BLM cells were transfected with Gα<sub>13</sub> or control siRNA and transfectants tested by immunoblotting (left), or subjected to immunoprecipitation with anti-p190RhoGAP antibodies followed by western blotting with antibodies for the displayed proteins (right). A representative result out of three independent experiments is shown.



**Fig. 2.** Blk knockdown rescues RhoA activation and cell invasion in Gα<sub>13</sub>-activated cells. (A, top) Gα<sub>13</sub>wt or Gα<sub>13</sub>QL cells transfected with control or Blk-3 siRNA were incubated with CXCL12 and tested in Rho GTPase assays. (Bottom) Bars depict densitometric quantification of gel bands showing the mean ± SD of four independent experiments. RhoA activation was significantly increased compared to Gα<sub>13</sub>wt-si Ctrl transfectants (\*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05). (B, left) Same transfectants were subjected to invasion assays to CXCL12 or medium alone. (Right) Parental BLM cells were tested in invasion assays towards CXCL12 in the absence or presence of LPC. \*\*\*Invasion was significantly stimulated, p < 0.001. ΔΔInvasion was significantly rescued, p < 0.01. All invasion experiments were done with duplicate samples (left panel, n = 4; right panel, n = 3).

p190RhoGAP function, as it was reversed by p190RhoGAP knocking down (Fig. 4C; and Supplementary Fig. S3A). Importantly, overexpression of active forms of RhoA recovered the Blk-mediated defective invasion (Fig. 4D; and Supplementary Fig. S3B), collectively indicating that the activation of the Gα<sub>13</sub>-Blk-p190RhoGAP pathway which causes RhoA inactivation ultimately leads to inhibition of cell invasion to CXCL12.

#### 3.4. Blk transfection into cells lacking Blk leads to p190RhoGAP tyrosine phosphorylation and RhoA inactivation

In addition to BLM, Blk was highly expressed in MeWo melanoma cells, whereas very low expression was seen in melanoma A375 and SK-Mel37, and lack of Blk expression was observed in Mel57 cells (Supplementary Fig. S4A). Based on higher Blk transfection efficiency obtained with A375 compared to Mel57 cells (not shown), we chose A375 and Blk-negative MDA-MB-231 cells (see Fig. 1B), to analyze the Blk de novo function in cells with low or no expression of this kinase (Supplementary Fig. S4B). Of note, while p190RhoGAP tyrosine phosphorylation was not detected following transfection with Gα<sub>13</sub>wt or Gα<sub>13</sub>QL together with control vector (Mock) in these cell lines, this phosphorylation as well as p190RhoGAP/RhoA association was triggered in Blk wt and Blk ΔCt co-transfected cells (Fig. 5A). Contrary to BLM cells, expression of active Gα<sub>13</sub> (mock-Gα<sub>13</sub>QL) in A375 or MDA-MB-231 cells resulted in higher CXCL12-stimulated RhoA activation than mock-Gα<sub>13</sub>wt transfectants (Fig. 5B). Notably, Blk wt or Blk ΔCt transfection together with Gα<sub>13</sub>wt or Gα<sub>13</sub>QL caused a significant decrease in RhoA activation (Fig. 5B), thus correlating with their observed increase in p190RhoGAP/RhoA association. These results confirm the involvement of Blk in p190RhoGAP tyrosine phosphorylation that favors subsequent inhibition of RhoA activation.

Yet, it is surprising that no p190RhoGAP tyrosine phosphorylation can be detected in MDA-MB-231 cells in spite of their expression of c-Src, Fyn, Yes, Fgr, Lyn and Hck Src kinases (see Supplementary Fig. S1E). An insight into the lack of this GAP phosphorylation came from experiments using cells exposed to sodium pervanadate, an irreversible inhibitor of protein tyrosine phosphatases. Remarkably, incubation with this inhibitor led to substantial p190RhoGAP phosphorylation in these cells, and it further increased this phosphorylation in BLM cells (Fig. 5C), thus suggesting that elevated tyrosine

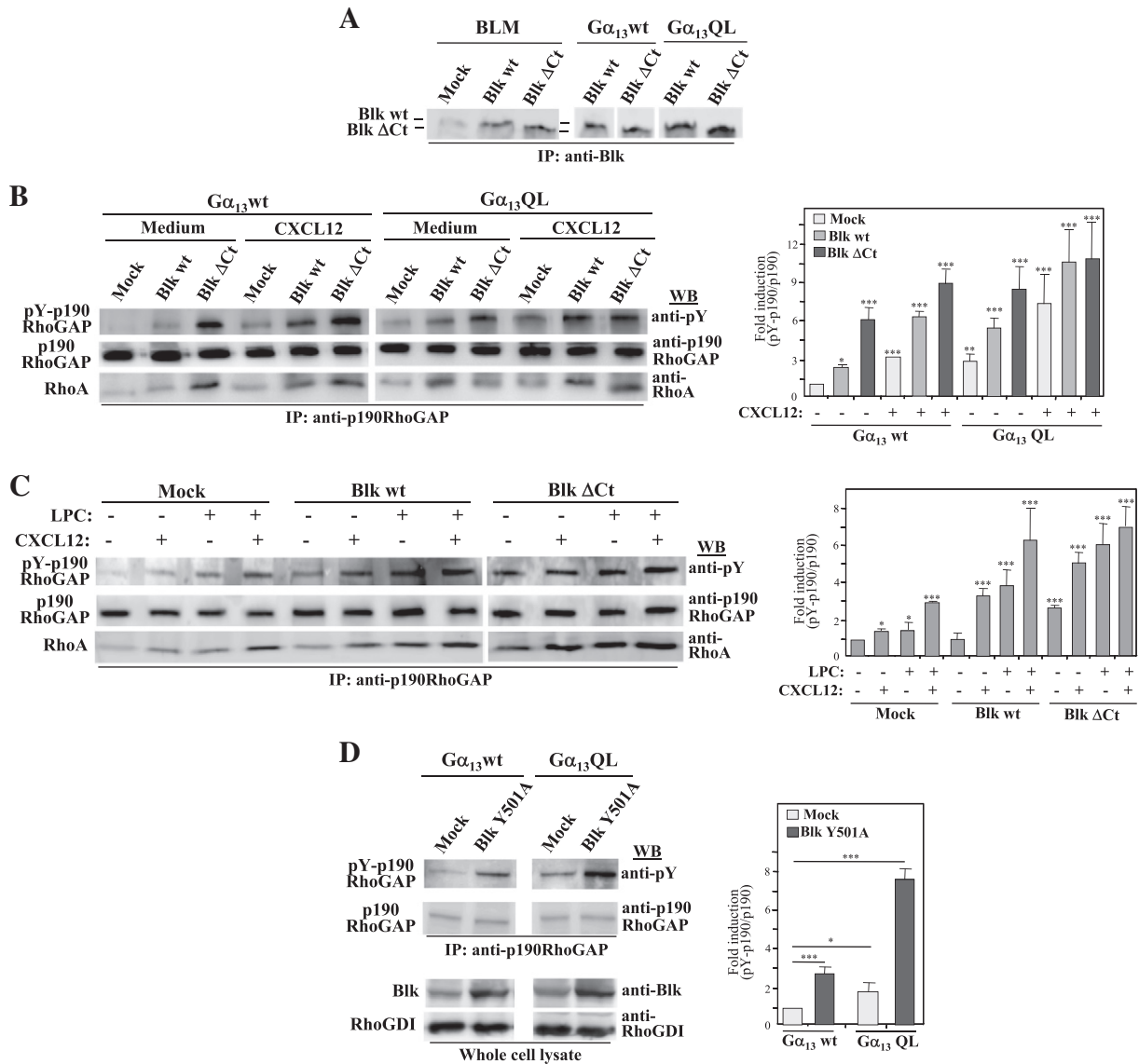
phosphatase activity might be one of the mechanisms behind the lack of the GAP tyrosine phosphorylation in MDA-MB-231 cells.

#### 3.5. Gα<sub>13</sub> activation promotes Gα<sub>13</sub>-Blk dissociation linked to assembly between Blk and p190RhoGAP

We next analyzed potential molecular interplays between Gα<sub>13</sub>, Blk and p190RhoGAP following Gα<sub>13</sub> activation. Immunoprecipitation analyses with anti-Blk antibodies revealed that Blk co-precipitates with p190RhoGAP in BLM-Gα<sub>13</sub>wt transfectants, and that co-precipitation augmented five-fold in BLM-Gα<sub>13</sub>QL counterparts (Fig. 6A, left). Similarly, LPC and to a lesser extent CXCL12 also significantly enhanced Blk-p190RhoGAP association compared to untreated cells (Fig. 6A, right). Moreover, CXCL12 synergized with Gα<sub>13</sub> activation to further upregulate Blk-p190RhoGAP complex formation.

Interestingly, anti-Blk antibodies also pulled down Gα<sub>13</sub> in Gα<sub>13</sub>wt transfectants and parental BLM cells, and Gα<sub>13</sub>-Blk co-precipitation was notably decreased in Gα<sub>13</sub>QL transfectants (Fig. 6A, left). Reduced Gα<sub>13</sub>-Blk association in Gα<sub>13</sub>QL cells was not the result of intrinsic binding restraints due to the Gα<sub>13</sub> mutation, as LPC-incubated cells also displayed lower Gα<sub>13</sub>-Blk assembly than untreated cells (Fig. 6A, right). Supporting these results, Blk but not p190RhoGAP (not shown), was found in anti-Gα<sub>13</sub> immunoprecipitates, and the level of Gα<sub>13</sub>-Blk association was again lower in Gα<sub>13</sub>QL than in Gα<sub>13</sub>wt transfectants (Fig. 6B). This association was not only detected in BLM cells, as anti-Gα<sub>13</sub> antibodies also co-precipitated Blk together with Gα<sub>13</sub> in Molt-4 human T cells (Fig. 6C), suggesting that it might represent a common molecular interaction. While CXCL12 enhanced the assembly between Blk and p190RhoGAP, no major differences were found in Gα<sub>13</sub>-Blk association in chemokine-incubated Gα<sub>13</sub> transfectants or BLM cells (Fig. 6A, B). Specificity of Blk-p190RhoGAP and Gα<sub>13</sub>-Blk co-immunoprecipitations was assessed by siRNA-mediated knocking down of Blk, p190RhoGAP and Gα<sub>13</sub> (Fig. 6D).

Further evidence for Gα<sub>13</sub>-Blk association came from pull-down assays which showed that GST-Blk specifically bound to Gα<sub>13</sub> from BLM cell lysates (Fig. 6E, left). Moreover, GST-Blk bound to higher extent Gα<sub>13</sub> from Gα<sub>13</sub>wt than from Gα<sub>13</sub>QL transfectants (Fig. 6E, right). Together, these results indicate that Gα<sub>13</sub> assembles with Blk, and that Gα<sub>13</sub>-Blk association weakens upon Gα<sub>13</sub> activation, which might favor Blk subsequent association with p190RhoGAP.

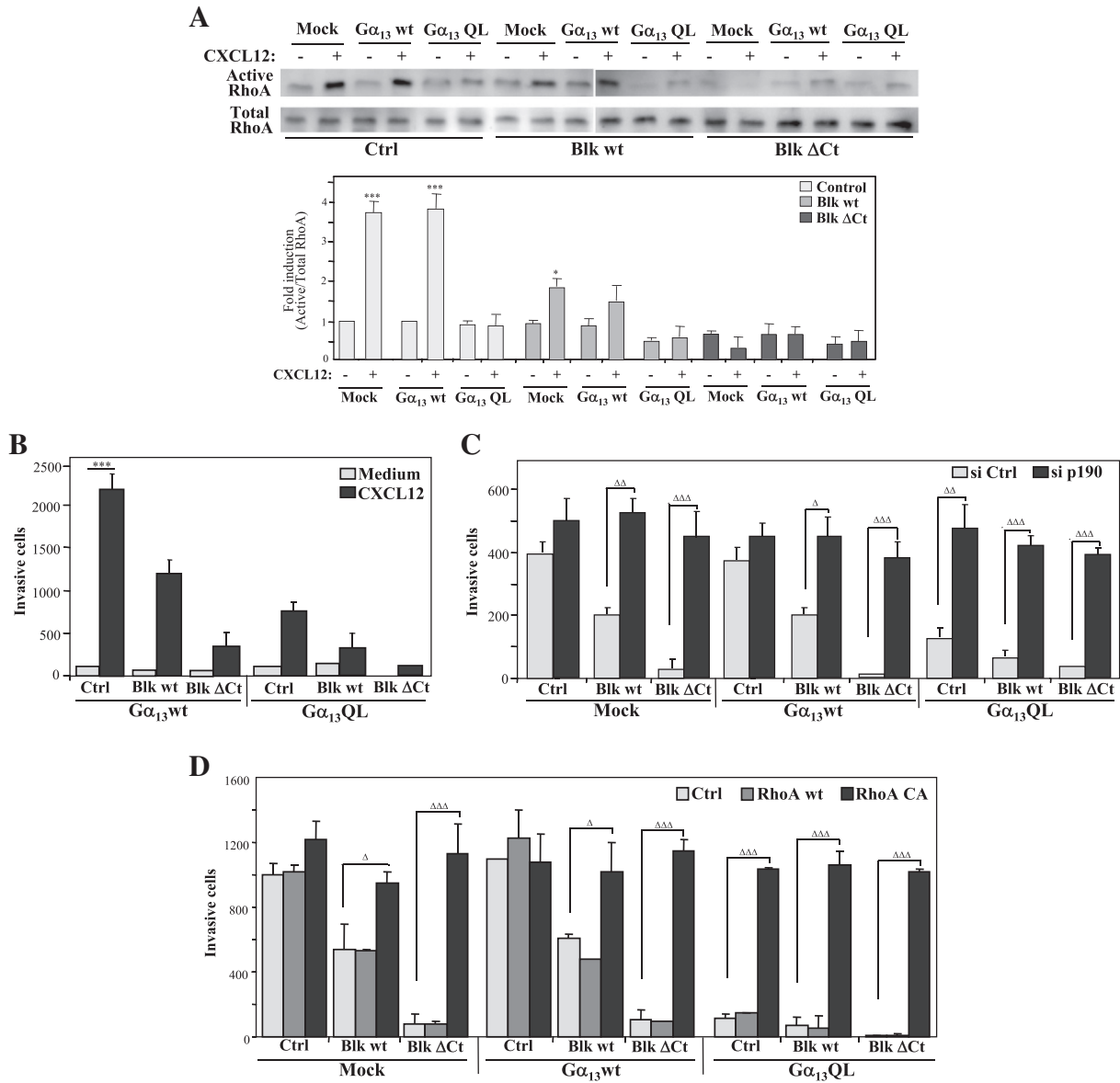


**Fig. 3.** Blk overexpression upregulates p190RhoGAP tyrosine phosphorylation following  $G\alpha_{13}$  activation. (A) BLM or  $G\alpha_{13}$ wt and  $G\alpha_{13}$ QL stable transfectants were retrovirally infected with empty vector (Mock), or with Blk wt or Blk  $\Delta$ Ct pRetro vectors, and subsequently tested by immunoprecipitation with anti-Blk antibodies followed by immunoblotting with antibodies to Blk or p190RhoGAP. (B, left) Stable single or double transfectants were incubated with or without CXCL12, and cells subjected to immunoprecipitation with anti-p190RhoGAP antibodies followed by immunoblotting with the displayed antibodies. (Right) Densitometric quantification of gel bands showing the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP was significantly increased compared to  $G\alpha_{13}$ wt-Mock transfectant phosphorylation. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . (C) BLM cells transfected with Blk wt, Blk  $\Delta$ Ct or empty vector were exposed to CXCL12 and/or LPC, and tested as in (B). p190RhoGAP tyrosine phosphorylation was significantly increased compared to phosphorylation of transfectants incubated without CXCL12 and LPC (\*\*\*)  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ). (D)  $G\alpha_{13}$ wt and  $G\alpha_{13}$ QL stable transfectants were transiently transfected with Blk Y501A or with empty vector, and cells subjected to immunoprecipitation and western blotting (top), or cell lysates directly tested by immunoblotting (bottom). Tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP was significantly increased compared to  $G\alpha_{13}$ wt-Mock transfectant phosphorylation. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ ,  $n = 4$ .

### 3.6. Immunoprecipitated Blk displays *in vitro* kinase activity towards GST-p190RhoGAP

Blk-dependent tyrosine kinase activity targeting p190RhoGAP was tested in Blk immunoprecipitates from Blk wt and mock transfectants using *in vitro* kinase assays with GST-fused p190RhoGAP containing residues 953–1208 [49] as acceptor. This region includes the Tyr1105 amino acid whose phosphorylation activates the GAP activity on RhoA [9,10]. The results revealed a weak but specific tyrosine phosphorylation of GST-p190RhoGAP using mock immunoprecipitates that was notably enhanced when we used Blk wt counterparts (Fig. 7A, left and middle panels). In addition, we detected tyrosine phosphorylation of a protein co-migrating in SDS-PAGE with immunoprecipitated Blk, especially in

Blk wt transfectants, which could correspond to autophosphorylated Blk (Fig. 7A, left and right panels). Kinase assays using immunoprecipitated Blk from mock,  $G\alpha_{13}$ wt and  $G\alpha_{13}$ QL transfectants revealed no statistically significant changes in  $^{32}$ P-ATP incorporation into the substrate poly Glu-Tyr (Fig. 7B). Moreover, similar levels of GST-p190RhoGAP tyrosine phosphorylation were detected using Blk immunoprecipitates from  $G\alpha_{13}$ wt and  $G\alpha_{13}$ QL transfectants, and again, a potential Blk autophosphorylation was observed (Fig. 7C). These results indicate that the sole expression of activated  $G\alpha_{13}$  does not render Blk with higher kinase activity, raising the possibility that increased Blk-p190RhoGAP association in  $G\alpha_{13}$ -stimulated cells might represent a mechanism leading to enhancement in Blk-dependent tyrosine kinase activity on p190RhoGAP.



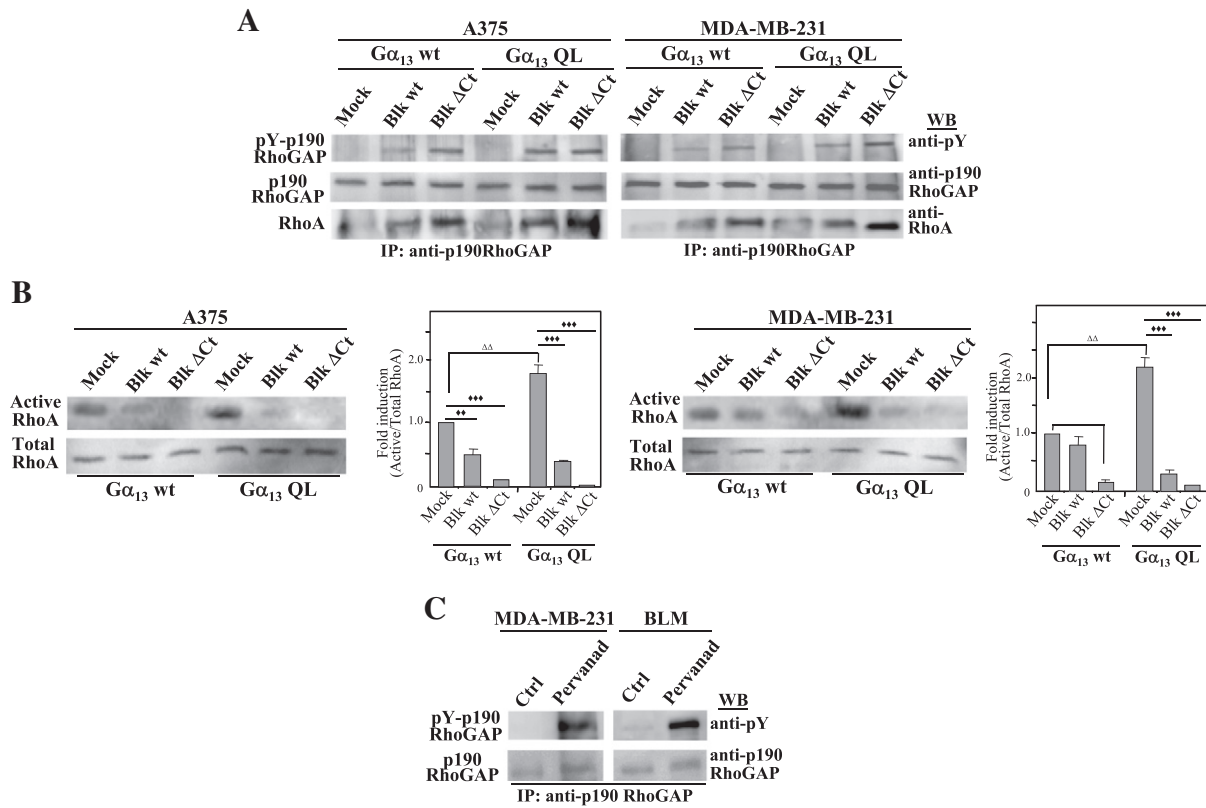
**Fig. 4.** Blk overexpression inhibits RhoA activation and impairs cell invasion in response to Gα<sub>13</sub> activation. Stable single or double Gα<sub>13</sub> and Blk transfectants were tested in RhoA GTPase assays in response to CXCL12 (A, top), or subjected to invasion assays towards CXCL12 (B). (A, bottom) Bars represent densitometric quantification of gel bands showing the mean of three independent experiments, and error bars represent the SD of the mean. RhoA activation was significantly increased compared to Mock-control activation (\*\*\*) p < 0.001, \* p < 0.05). Same transfectants were transiently transfected either with p190RhoGAP or control siRNA (C), or with RhoA wt, RhoA CA or control vectors (D), and cells analyzed in invasion assays to CXCL12. \*\*\*Invasion was significantly stimulated, p < 0.001. \*\*\*Invasion was significantly inhibited compared to control transfectant invasion, p < 0.001, \*\*p < 0.01. ΔΔΔInvasion was significantly rescued, p < 0.001, ΔΔp < 0.01, Δp < 0.05. All invasion experiments were done with duplicate samples (B, n = 4; C, n = 4; D, n = 2).

**4. Discussion**

Either stimulation or inhibition of RhoA activation has been shown to result from Gα<sub>13</sub> activation [41–43]. Gα<sub>13</sub>-dependent inhibition of RhoA activation mediated by stimulation of p190RhoGAP tyrosine phosphorylation opposes melanoma cell invasion to CXCL12 [43]. Using both RNAi transfection approaches and protein overexpression experiments here we show that the Src kinase Blk is involved in Gα<sub>13</sub>-activated p190RhoGAP tyrosine phosphorylation that causes RhoA inactivation. Thus, Blk knockdown inhibits the GAP phosphorylation in Gα<sub>13</sub>-stimulated cells and leads to rescue of RhoA activation and recovery of cellular invasion towards CXCL12. On the contrary, Gα<sub>13</sub> transfectants overexpressing either Blk wt or Blk ΔCt displayed higher p190RhoGAP phosphorylation than mock counterparts, which correlated with RhoA inactivation and with impairment of cell invasion. Evidence for the functional implication of the p190RhoGAP–RhoA

module in these Blk-overexpressing transfectants was based on the fact that p190RhoGAP knockdown or expression of active RhoA led to rescue of invasiveness to CXCL12 from the inhibitory actions of the activation of upstream Gα<sub>13</sub>–Blk signaling. Importantly, Blk wt or Blk ΔCt expression in Blk-negative MDA-MB-231 Gα<sub>13</sub> transfectants strongly stimulated the GAP tyrosine phosphorylation and inhibited RhoA activation. Moreover, in vitro kinase assays using immunoprecipitated Blk from Blk-overexpressing BLM cells and a GST–p190RhoGAP fusion protein, confirmed the ability of this Src kinase to induce tyrosine phosphorylation of this GAP protein.

Furthermore, we show that Blk is capable of binding Gα<sub>13</sub>, a finding in line with the reported Gα<sub>13</sub>–c-Src interaction detected in cardiac fibroblasts [50]. Interestingly, we found that the enhanced Blk-mediated p190RhoGAP tyrosine phosphorylation upon Gα<sub>13</sub> activation correlated with weakening of the Gα<sub>13</sub>–Blk association, which was linked to an increase in Blk–p190RhoGAP assembly. As Gα<sub>13</sub> depletion



**Fig. 5.** Blk transfection into Blk-low A375 or Blk-negative MDA-MB-231 cells promotes p190RhoGAP tyrosine phosphorylation and RhoA inactivation. (A) Cells were transiently co-transfected with Gα<sub>13</sub>wt or Gα<sub>13</sub>QL, and with control (Mock), Blk wt or Blk ΔCt vectors, and transfectants immunoprecipitated and immunoblotted with antibodies to the displayed proteins. A representative result out of three independent experiments is shown. (B) Transfectants were subjected to Rho GTPase assays. RhoA activation was significantly increased (<sup>ΔΔ</sup>p < 0.01), or decreased (<sup>\*\*\*</sup>p < 0.001, <sup>\*\*</sup>p < 0.01) (n = 3). (C) Cells were incubated with sodium pervanadate (100 μM, 1.5 h) and subsequently tested by immunoprecipitation and western blotting.

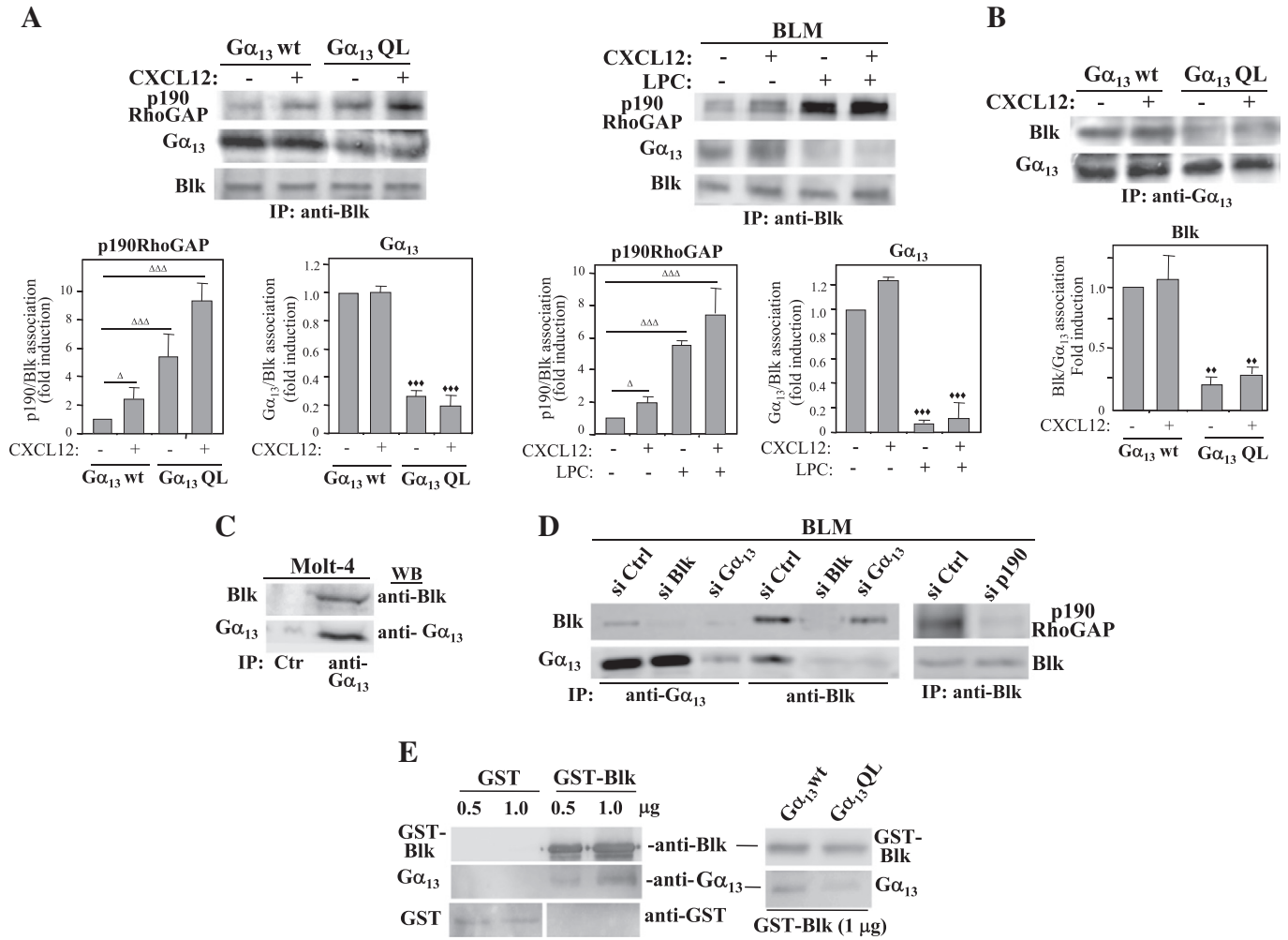
results in blockade of LPC-induced tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP [43], along with the present results a model can be proposed whereby a Blk population recently dissociated from activated Gα<sub>13</sub> could subsequently bind to and trigger phosphorylation of p190RhoGAP. Then, the phosphorylated GAP would be able to inhibit RhoA activation and cell invasion in response to CXCL12. Therefore, our in vitro kinase data with Gα<sub>13</sub>wt and Gα<sub>13</sub>QL transfectants strongly suggest that the enhancement in Blk-mediated tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP is not the result of Blk kinase activation caused by Gα<sub>13</sub> stimulation, but rather it is likely the mentioned increase in Blk-p190RhoGAP association that might facilitate the enhanced GAP phosphorylation. Together, these results add Blk upstream of the p190RhoGAP-RhoA pathway as a kinase downstream of Gα<sub>13</sub>-activation, overall representing an opposing signaling module during CXCL12-triggered invasion.

Notably, analyses with Blk- or Gα<sub>13</sub>-knockdown cells indicated that Blk can also mediate the CXCL12-triggered phosphorylation of p190RhoGAP independently of Gα<sub>13</sub>. As CXCR4-dependent signaling mainly involves Gα<sub>i</sub>, the data points to the existence of different cellular Blk pools acting on p190RhoGAP via distinct mechanisms depending on whether Gα<sub>13</sub> or Gα<sub>i</sub> are activated. While our results indicate that Gα<sub>13</sub>- and Gα<sub>i</sub>-stimulated p190RhoGAP tyrosine phosphorylation involves Blk, depletion of this kinase did not reduce the GAP phosphorylation below basal levels in non-stimulated cells, suggesting the involvement of alternative tyrosine kinases.

It is noteworthy that even if CXCL12 induces Blk-mediated phosphorylation of p190RhoGAP in BLM cells, the simultaneous stimulation of the GEF Vav1 by the chemokine, leads to a net increase in RhoA activation and stimulation of cell invasion [27]. Only when Gα<sub>13</sub> is concurrently stimulated with CXCL12/CXCR4, there appears to be sufficient Blk activity to promote the adequate levels of the GAP tyrosine

phosphorylation to inhibit RhoA activation and to impair cell invasiveness to CXCL12. Therefore, these data strongly suggest that the Blk-p190RhoGAP signaling complex constitutes a common point from Gα<sub>i</sub> and Gα<sub>13</sub> activation with important roles in the control of RhoA-mediated cell invasion. Although we have previously shown that Gα<sub>13</sub> depletion does not alter the activation of RhoA in cells expressing wild type Gα<sub>13</sub> [43], the strength of Vav-RhoA activation triggered by CXCL12-CXCR4 might obscure any possible implication of Gα<sub>13</sub> in CXCL12-stimulated RhoA activation, as proposed for T cells [51].

The tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP in fibroblasts has been shown to depend on c-Src [9,10]. It is intriguing that, in spite of the expression of additional Src kinases in BLM cells, including c-Src, the phosphorylation of p190RhoGAP following Gα<sub>13</sub> activation preferentially involves Blk. Moreover, Blk-negative MDA-MB-231 cells express six distinct Src kinases, and only when Blk is transfected, a clear p190RhoGAP tyrosine phosphorylation is detected. There are several possible explanations for these observations. As Blk is the most divergent member inside the Src kinase phylogenetic tree, this might provide Blk with distinct structural, spatial and/or functional properties which could favor its association with and tyrosine kinase function on p190RhoGAP. An alternative explanation involves potential tyrosine phosphatase activity dephosphorylating p190RhoGAP. However, direct dephosphorylation of p190RhoGAP seems unlikely, as substantial levels of p190RhoGAP tyrosine phosphorylation following Blk transfection in MDA-MB-231 and A375 cells were detected. A more plausible explanation relates to the known regulation of Src protein activation by the activity of tyrosine phosphatases and the kinase Csk [47,52]. The enhanced p190RhoGAP tyrosine phosphorylation seen in BLM cells, and the remarkable induction of this phosphorylation in MDA-MB-231 cells upon treatment with sodium pervanadate suggest that these cells conserve the kinase machinery needed for efficient p190RhoGAP



**Fig. 6.** Gα<sub>13</sub> activation regulates Blk-Gα<sub>13</sub> and Blk-p190RhoGAP associations. (A, top) Gα<sub>13</sub>wt and Gα<sub>13</sub>QL transfectants (left), or parental BLM cells exposed to LPC or medium alone (right), were incubated without (-) or with (+) CXCL12, and subjected to immunoprecipitation and immunoblotting with antibodies to the indicated proteins. (Bottom) Bars represent densitometric quantification of gel bands showing the mean ± SD of four independent experiments. Co-precipitation was significantly augmented (<sup>ΔΔΔ</sup>p < 0.001, <sup>Δ</sup>p < 0.05), or reduced (<sup>\*\*\*</sup>p < 0.001). (B, top) Gα<sub>13</sub>wt and Gα<sub>13</sub>QL transfectants incubated with or without CXCL12 were subjected to immunoprecipitation and western blotting. (Bottom) Co-precipitation was significantly reduced compared to untreated Gα<sub>13</sub>wt cells. (<sup>\*\*</sup>p < 0.01; n = 4). (C) Molt-4 T cells were tested by immunoprecipitation and western blotting with the antibodies shown. (D) BLM cells were transfected with the indicated siRNA, and incubated in the absence (left) or presence of LPC and CXCL12 (Right), and transfectants tested by immunoprecipitation and western blotting. (E) BLM (left), or Gα<sub>13</sub>wt and Gα<sub>13</sub>QL cell lysates (right) were incubated with different amounts of GST or GST-Blk, followed by immunoblotting with the indicated antibodies.

tyrosine phosphorylation, and that tyrosine phosphatase activities probably oppose Src-dependent phosphorylation of this GAP.

Several tyrosine phosphatases including PTPN2, PTPN6 and PTPN22 have been reported to de-phosphorylate the positive regulatory Tyr residue located on the kinase domain (Tyr419 in human c-Src), which leads to Src inactivation [53–56]. The negative regulatory Tyr at the Src C-terminal region (Tyr530 in human c-Src) is phosphorylated by Csk, which is a main mechanism causing Src kinase inactivation [57–59], a process involving the assembly of the SH2, SH3 and kinase domains into a closed autoinhibited conformation [60,61]. Therefore, high Csk and/or tyrosine phosphatase activity on the C-terminal or kinase domain Tyr residues, respectively, might account for the lack of p190RhoGAP tyrosine phosphorylation in MDA-MB-231 cells, and could represent one of the mechanisms involved in the observed RhoA activation response in these cells expressing Gα<sub>13</sub> QL. Furthermore, Csk and tyrosine phosphatase activities might act synergistically with p115RhoGEF, a main regulator of RhoA activation upon Gα<sub>13</sub> stimulation [33,35,39,40], to tip the balance towards the activation of this GTPase.

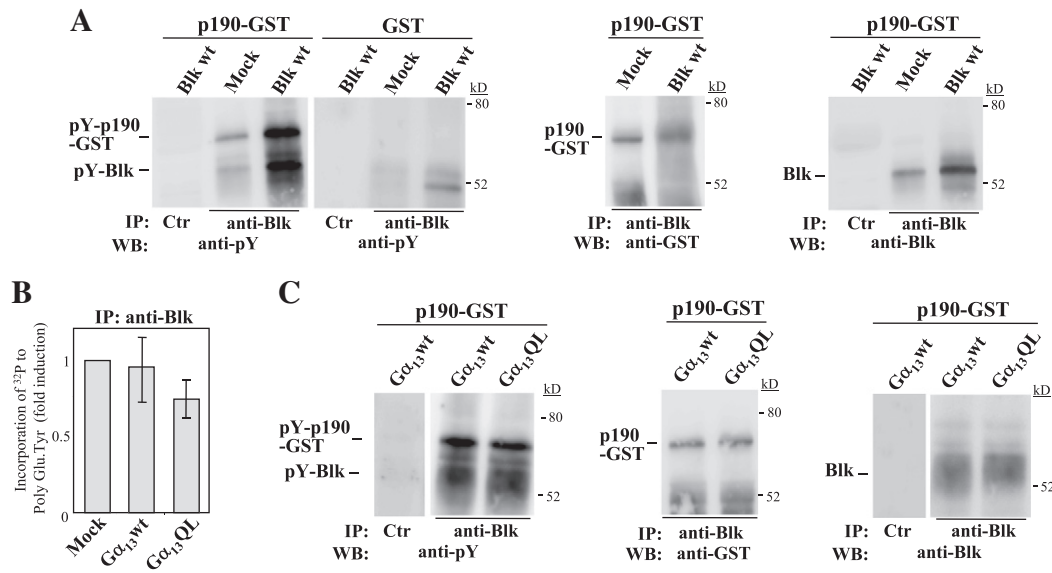
In conclusion, in addition to its implication as a tyrosine kinase during B-cell receptor signaling [62–64], the present results provide

evidence of the functional relevance of Blk on the regulation of RhoA activation and cell invasion.

### 5. Conclusions

The Src kinase Blk is involved in Gα<sub>13</sub>-activated p190RhoGAP tyrosine phosphorylation, which causes RhoA inactivation and ultimately leads to defective cell invasion to CXCL12. Characterization of molecular interplays between Gα<sub>13</sub>, Blk and p190RhoGAP revealed that Blk binds Gα<sub>13</sub>, and that Blk-mediated p190RhoGAP tyrosine phosphorylation upon Gα<sub>13</sub> activation correlates with weakening of Gα<sub>13</sub>-Blk association and with increased Blk-p190RhoGAP assembly. Furthermore, our data indicated that Blk can also mediate CXCL12-triggered phosphorylation of p190RhoGAP independently of Gα<sub>13</sub>. The results reveal that only when Gα<sub>13</sub> is concurrently stimulated with CXCL12 there appears to be sufficient Blk activity to promote adequate levels of p190RhoGAP tyrosine phosphorylation to inhibit RhoA activation and to impair cell invasiveness to the chemokine.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.07.008>.



**Fig. 7.** Immunoprecipitated Blk displays in vitro kinase activity towards GST-p190RhoGAP. (A) Mock and Blk wt transfectants were immunoprecipitated with anti-Blk or control antibodies, and subjected to in vitro kinase assays using either GST-p190 or control GST fusion proteins. Immunoblotting was subsequently performed using the indicated antibodies ( $n = 4$ ). (B) Mock,  $G\alpha_{13}$ wt and  $G\alpha_{13}$ QL transfectants were tested in in vitro kinase assays using poly (Glu.Tyr) and  $^{32}$ P-ATP ( $n = 5$ ). (C) Transfectants were processed and assayed as in (A) ( $n = 3$ ).

### Author contributions

JT, RAB, MD-M and IM conceived and designed the experiments; RAB, MD-M, GPC, NA-S, PT-A and JWK performed experiments; RAB, MD-M, GPC and JT analyzed data; JT wrote the paper.

### Acknowledgments

This work was supported by grants SAF2011-24022 from Ministerio de Economía y Competividad (MEC), RETICS RD06/0020/0011 and RD12/0036/0061 from Ministerio de Sanidad (MS), and P2010/BMD-2314 from Comunidad de Madrid to J.T.; and by grants BFU2010-599 21138 from MEC and RD36/0012/0059 from MS to I.M.

### References

- [1] A.B. Jaffe, A. Hall, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 (2005) 247–269.
- [2] S.J. Heasman, A.J. Ridley, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 690–701.
- [3] K.L. Rossman, C.J. Der, J. Sondek, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 167–180.
- [4] J.L. Bos, H. Rehmann, A. Wittinghofer, *Cell* 129 (2007) 865–877.
- [5] R. Garcia-Mata, E. Boulter, K. Burrridge, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 493–504.
- [6] J. Cherfils, M. Zeghouf, *Physiol. Rev.* 93 (2013) 269–309.
- [7] J. Tcherkezian, N. Lamarche-Vane, *Biol. Cell.* 99 (2007) 67–86.
- [8] A.J. Ridley, A.J. Self, F. Kasmi, H.F. Paterson, A. Hall, C.J. Marshall, C. Ellis, *EMBO J.* 12 (1993) 5151–5160.
- [9] M.D. Haskell, A.L. Nickles, J.M. Agati, L. Su, B.D. Dukes, S.J. Parsons, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 1699–1708.
- [10] R.W. Roof, M.D. Haskell, B.D. Dukes, N. Sherman, M. Kinter, S.J. Parsons, *Mol. Cell Biol.* 18 (1998) 7052–7063.
- [11] J. McGlade, B. Brunkhorst, D. Anderson, G. Mbamalu, J. Settleman, S. Dedhar, M. Rozakis-Adcock, L.B. Chen, T. Pawson, *EMBO J.* 12 (1993) 3073–3081.
- [12] W.T. Arthur, K. Burrridge, *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 2711–2720.
- [13] L. Su, J.M. Agati, S.J. Parsons, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 571–582.
- [14] A. Tikoo, S. Czepak, C. Viars, S. White, J.K. Heath, K. Arden, H. Maruta, *Gene* 257 (2000) 23–31.
- [15] D.Z. Wang, E.K.M.S. Nur, A. Tikoo, W. Montague, H. Maruta, *Cancer Res.* 57 (1997) 2478–2484.
- [16] D. Rossi, A. Zlotnik, *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 217–242.
- [17] A.E. Proudfoot, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 106–115.
- [18] S.J. Allen, S.E. Crown, T.M. Handel, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 787–820.
- [19] T. Nagasawa, S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani, T. Kishimoto, *Nature* 382 (1996) 635–638.
- [20] T. Sugiyama, H. Kohara, M. Noda, T. Nagasawa, *Immunity* 25 (2006) 977–988.
- [21] Q. Ma, D. Jones, P.R. Borghesani, R.A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R.T. Bronson, Y.A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 9448–9453.
- [22] Y.R. Zou, A.H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, D.R. Littman, *Nature* 393 (1998) 595–599.
- [23] A. Muller, B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M.E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S.N. Wagner, J.L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui, A. Zlotnik, *Nature* 410 (2001) 50–56.
- [24] R.S. Taichman, C. Cooper, E.T. Keller, K.J. Pienta, N.S. Taichman, L.K. McCauley, *Cancer Res.* 62 (2002) 1832–1837.
- [25] M.M. Robledo, R.A. Bartolome, N. Longo, J.M. Rodriguez-Frade, M. Mellado, I. Longo, G.N. van Muijen, P. Sanchez-Mateos, J. Teixido, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 45098–45105.
- [26] T. Murakami, W. Maki, A.R. Cardones, H. Fang, A. Tun Kyi, F.O. Nestle, S.T. Hwang, *Cancer Res.* 62 (2002) 7328–7334.
- [27] R.A. Bartolome, B.G. Galvez, N. Longo, F. Baleux, G.N. Van Muijen, P. Sanchez-Mateos, A.G. Arroyo, J. Teixido, *Cancer Res.* 64 (2004) 2534–2543.
- [28] R.A. Bartolome, S. Ferreira, M.E. Miquilena-Colina, L. Martinez-Prats, M.L. Soto-Montenegro, D. Garcia-Bernal, J.J. Vaquero, R. Agami, R. Delgado, M. Desco, P. Sanchez-Mateos, J. Teixido, *Am. J. Pathol.* 174 (2009) 602–612.
- [29] R.A. Bartolome, I. Molina-Ortiz, R. Samaniego, P. Sanchez-Mateos, X.R. Bustelo, J. Teixido, *Cancer Res.* 66 (2006) 248–258.
- [30] K.L. Pierce, R.T. Premont, R.J. Lefkowitz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 639–650.
- [31] M.J. Marinissen, J.S. Gutkind, *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 368–376.
- [32] S.R. Neves, P.T. Ram, R. Iyengar, *Science* 296 (2002) 1636–1639.
- [33] T. Wozfeld, N. Wettschureck, S. Offermanns, *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (2008) 582–589.
- [34] N.A. Riobo, D.R. Manning, *Trends Pharmacol. Sci.* 26 (2005) 146–154.
- [35] P. Kelly, P.J. Casey, T.E. Meigs, *Biochemistry* 46 (2007) 6677–6687.
- [36] S. Offermanns, V. Mancino, J.P. Revel, M.I. Simon, *Science* 275 (1997) 533–536.
- [37] J.L. Gu, S. Muller, V. Mancino, S. Offermanns, M.I. Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 9352–9357.
- [38] A.M. Buhl, N.L. Johnson, N. Dhanasekaran, G.L. Johnson, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 24631–24634.
- [39] M.J. Hart, X. Jiang, T. Kozasa, W. Roscoe, W.D. Singer, A.G. Gilman, P.C. Sternweis, G. Bollag, *Science* 280 (1998) 2112–2114.
- [40] T. Kozasa, X. Jiang, M.J. Hart, P.M. Sternweis, W.D. Singer, A.G. Gilman, G. Bollag, P.C. Sternweis, *Science* 280 (1998) 2109–2111.
- [41] P. Kelly, B.J. Moeller, J. Juneja, M.A. Booden, C.J. Der, Y. Daaka, M.W. Dewhirst, T.A. Fields, P.J. Casey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 8173–8178.
- [42] P. Kelly, L.N. Stemmler, J.F. Madden, T.A. Fields, Y. Daaka, P.J. Casey, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 26483–26490.
- [43] R.A. Bartolome, N. Wright, I. Molina-Ortiz, F.J. Sanchez-Luque, J. Teixido, *Cancer Res.* 68 (2008) 8221–8230.
- [44] W.T. Arthur, L.A. Petch, K. Burrridge, *Curr. Biol.* 10 (2000) 719–722.
- [45] V.J. Fincham, A. Chudleigh, M.C. Frame, *J. Cell Sci.* 112 (Pt 6) (1999) 947–956.
- [46] S. Offermanns, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 83 (2003) 101–130.
- [47] T.J. Boggon, M.J. Eck, *Oncogene* 23 (2004) 7918–7927.
- [48] M.P. Playford, M.D. Schaller, *Oncogene* 23 (2004) 7928–7946.
- [49] K. Mori, M. Amamo, M. Takefuji, K. Kato, Y. Morita, T. Nishioka, Y. Matsuura, T. Murohara, K. Kaibuchi, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 5067–5076.
- [50] S. Bunda, Y. Wang, T.F. Mitts, P. Liu, S. Arab, M. Arabkhar, A. Hinek, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 16633–16647.
- [51] W. Tan, D. Martin, J.S. Gutkind, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 39542–39549.
- [52] Y.P. Chong, K.K. Ia, T.D. Mulhern, H.C. Cheng, *Biochim. Biophys. Acta* 1754 (2005) 210–220.
- [53] X.M. Zheng, Y. Wang, C.J. Pallen, *Nature* 359 (1992) 336–339.
- [54] J.F. Cloutier, A. Veillette, *EMBO J.* 15 (1996) 4909–4918.

- [55] G.G. Chiang, B.M. Sefton, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 23173–23178.
- [56] C. van Vliet, P.E. Bukczynska, M.A. Puryer, C.M. Sadek, B.J. Shields, M.L. Tremblay, T. Tiganis, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 253–260.
- [57] J.A. Cooper, K.L. Gould, C.A. Cartwright, T. Hunter, *Science* 231 (1986) 1431–1434.
- [58] S. Nada, M. Okada, A. MacAuley, J.A. Cooper, H. Nakagawa, *Nature* 351 (1991) 69–72.
- [59] J.E. Thomas, P. Soriano, J.S. Brugge, *Science* 254 (1991) 568–571.
- [60] W. Xu, S.C. Harrison, M.J. Eck, *Nature* 385 (1997) 595–602.
- [61] J.C. Williams, A. Weijland, S. Gonfloni, A. Thompson, S.A. Courtneidge, G. Superti-Furga, R.K. Wierenga, *J. Mol. Biol.* 274 (1997) 757–775.
- [62] K. Saijo, C. Schmedt, I.H. Su, H. Karasuyama, C.A. Lowell, M. Reth, T. Adachi, A. Patke, A. Santana, A. Tarakhovsky, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 274–279.
- [63] A.L. Burkhardt, M. Brunswick, J.B. Bolen, J.J. Mond, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 7410–7414.
- [64] T. Tretter, A.E. Ross, D.I. Dordai, S. Desiderio, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 1863–1873.

*-ANEXO II-*



**Increased expression of miR-204-5p and miR-211-5p in response to vemurafenib provides early survival to melanoma cells**

Marta Díaz-Martínez<sup>1</sup>, Lucía Benito-Jardón<sup>1</sup>, Lola Alonso<sup>2</sup>, Lisa Koetz-Ploch<sup>3</sup>, Eva Hernando<sup>3</sup> and Joaquin Teixidó<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), 28040 Madrid, Spain;

<sup>2</sup>Bioinformatics and Biostatistics Unit. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), 28040 Madrid, Spain;

<sup>3</sup>Department of Pathology, NYU School of Medicine, NYU Langone Medical Center, New York, NY.

Corresponding author: Joaquin Teixidó. Centro de Investigaciones Biológicas, Department of Cellular and Molecular Medicine. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Phone 34-91-8373112; Fax 34-91-5360432; e-mail: joaquin@cib.csic.es

This work was supported by grants SAF2014-53059-R and RD12/0036/0061 to J.T



*-ANEXO III-*



DR. EVA HERNANDO (Orcid ID : 0000-0003-1023-0312)

Received Date : 10-Mar-2016

Revised Date : 15-Dec-2016

Accepted Date : 16-Jan-2017

Article type : Original Article

Manuscript Category: Signaling & Cell biology (SCB)

**Title:** MicroRNA-125a promotes resistance to BRAF inhibitors through suppression of the intrinsic apoptotic pathway

**Running title:** MicroRNA-125a promotes resistance to BRAF inhibitors

**Authors:**

Lisa Koetz-Ploch<sup>1,2</sup>, Douglas Hanniford<sup>1,2</sup>, Igor Dolgalev<sup>3</sup>, Elena Sokolova<sup>1,2</sup>, Judy Zhong<sup>2,4</sup>, Marta Díaz-Martínez<sup>5</sup>, Emily Bernstein<sup>6</sup>, Farbod Darvishian<sup>1,2</sup>, Keith T. Flaherty<sup>7</sup>, Paul B. Chapman<sup>8</sup>, Hussein Tawbi<sup>9</sup> and Eva Hernando<sup>1,2,\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup> Department of Pathology;

<sup>2</sup> NYU Interdisciplinary Melanoma Cooperative Group;

<sup>3</sup> Genomics Technology Center;

<sup>4</sup> Division of Biostatistics, Department of Environmental Medicine;

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/pcmr.12578

This article is protected by copyright. All rights reserved.

NYU School of Medicine, NYU Langone Medical Center, New York, NY

<sup>5</sup> Centro Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain

<sup>6</sup> Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY

<sup>7</sup> Massachusetts General Hospital, Harvard University, Boston, MA

<sup>8</sup> Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY

<sup>9</sup> MD Anderson Cancer Center, Houston, TX

\* to whom correspondence should be addressed:

Eva Hernando, Tel: 212-263-9054, Fax: 212-263-8211

eva.hernando@med.nyu.edu

**Key words:** melanoma, BRAF inhibitor, resistance, microRNA, apoptosis

## Summary

Melanoma patients with *BRAF*<sup>V600E</sup>-mutant tumors display striking responses to BRAF inhibitors (BRAFi); however, almost all invariably relapse with drug-resistant disease. Here we report that microRNA-125a (*miR-125a*) expression is upregulated in human melanoma cells and patient tissues upon acquisition of BRAFi resistance. We show that *miR-125a* induction confers resistance to *BRAF*<sup>V600E</sup> melanoma cells to BRAFi by directly suppressing pro-apoptotic components of the intrinsic apoptosis pathway, including BAK1 and MLK3. Apoptotic suppression and prolonged survival favor reactivation of the MAPK and AKT pathways by drug-resistant melanoma cells. We demonstrate that *miR-125a* inhibition suppresses the emergence of resistance to BRAFi and, in a subset of resistant melanoma cell lines, leads to partial drug re-sensitization. Finally, we show that *miR-125a* upregulation is mediated by TGFβ signaling. In conclusion, the identification of this novel role for *miR-125a* in BRAFi resistance exposes clinically relevant mechanisms of melanoma cell survival that can be exploited therapeutically.

## Significance

Emergence of resistance to BRAFi therapy is a prevalent problem in the treatment of patients with metastatic BRAF<sup>V600E</sup> mutant melanoma. We document TGFβ-mediated upregulation of *miR-125a* as a pro-survival mechanism that favors the acquisition of BRAFi resistance. Our data support the possibility to target *miR-125a* or its upstream regulators to limit the emergence of BRAFi resistance in melanoma. Moreover, as a pro-survival mechanism, *miR-125a* upregulation could contribute to development of resistance to other therapeutic agents, thus our findings might be applicable to the broader cancer field.

## Introduction

Melanoma is the leading cause of death from skin cancer, with incidence that continues to rise (Ferlay et al., 2015). Somatic, activating mutations in *BRAF*, predominantly *V600E*, occur in ~40-50% of cutaneous malignant melanomas (Akbari et al., 2015, Krauthammer et al., 2015); and BRAF inhibitors (BRAFi) have become important therapeutic agents in the treatment of metastatic BRAF<sup>V600E</sup> melanoma (Bollag et al., 2010, Chapman et al., 2011, Flaherty et al., 2010, Sosman et al., 2012). Initial responses to BRAFi are exceptional with metastatic tumors that routinely vanish in clinical imaging of treated patients; however, tumor cells are not completely eradicated and resistance of melanoma cells to these inhibitors occurs in nearly all patients, resulting in progression with treatment refractory disease. Numerous molecular mechanisms involved in the acquisition of BRAFi resistance have been reported. Most resistance mechanisms involve reactivation of the MAPK pathway, commonly through *NRAS* mutation (Nazarian et al., 2010), *BRAF* splicing changes (Poulikakos et al., 2011) or amplification (Shi et al., 2012), but also through less frequent alterations, such as *MEK1/2* mutation (Emery et al., 2009), COT hyperactivation (Johannessen et al., 2010), or RTK/EGF receptor upregulation (Girotti et al., 2013). Alternatively, the PI3K/AKT pathway (i.e. *PTEN* loss (Paraiso et al., 2011), AKT hyperactivation (Shao and Aplin, 2010), *NF1* loss (Whittaker et al., 2013), PIP3 loss (Ye et al., 2013), IGF1R upregulation (Villanueva et al., 2010)) or additional mechanisms (Haq et al., 2013b, Hilmi et al., 2008, Smith et al., 2014, Straussman et al., 2012, Shen et al., 2016) become hyper-activated in BRAFi-resistant melanoma. In addition to these described mechanisms, up to 40% of BRAFi-resistant tumors harbor unknown mechanisms of resistance (Rizos et al., 2014, Johnson et al., 2015), and not all can be explained by genetic/genomic changes (Hugo et al., 2015).

Common BRAFi resistance mechanisms, which reactivate MAPK or activate PI3K signaling, are typically thought to be acquired molecular alterations as opposed to selection of pre-existing tumor clones (Lackner et al., 2012). Development of such mechanisms likely requires activation of cellular survival pathways to evade BRAFi-induced cell death until permanent resistance mechanisms are acquired.

The involvement of non-genomic alterations in the acquisition of BRAFi resistance has not been fully explored. MicroRNA (miRNA), which are modulators of gene expression and molecular pathways, play central roles in a variety of normal and pathological cellular processes (Lujambio and Lowe, 2012). A few recent studies show involvement of miRNA in BRAFi resistance of melanoma. Vergani et al. demonstrate that a set of three miRNA (*miR-34a*, *miR-100* and *miR-125b*) confers BRAFi resistance downstream of the chemokine CCL2 (Vergani et al., 2016), whereas Liu et al. identify *miR-200c* as a sensitizer of melanoma cells to BRAFi treatment (Liu et al., 2015). *miR-514a* may contribute to BRAFi resistance, as its expression promotes survival of melanoma cells treated with BRAFi (Stark et al., 2015); however, evidence of *miR-514a* modulation in clinical samples or models of BRAFi resistance has not been reported. Finally, Sun et al. found *miR-7* downregulation in a model of BRAFi resistance and reported that its re-expression sensitized resistant cells to BRAFi treatment (Sun et al., 2016).

We hypothesized that specific miRNA can directly confer BRAFi resistance or contribute to the establishment of other resistance mechanism(s) that lead to MAPK and/or PI3K/Akt activation. To identify miRNA candidates that may contribute to BRAFi resistance in melanoma, we performed miRNA expression profiling of BRAFi resistant cell clones and their respective parental cells. *miR-125a* was consistently overexpressed upon acquisition of resistance to BRAF inhibition. Upregulation of *miR-125a* was also observed in clinical BRAFi-treated tumors relative to paired, pre-treatment tumor samples, further supporting its potential contribution to BRAFi therapeutic resistance. Mechanistically, we show that *miR-125a* facilitates BRAFi resistance by suppressing the intrinsic apoptotic pathway. Our findings support the possibility to use anti-miRNA based approaches to prevent or overcome BRAFi resistance.

## Results

### ***MiR-125a* is overexpressed in BRAFi resistant melanoma**

To identify miRNA that may contribute to BRAFi resistance, we conducted miRNA expression profiling of *BRAF*<sup>V600E</sup> mutant SK-MEL-239 cells (BRAFi sensitive cells) treated with DMSO or Vemurafenib (Vem) for 24h, and a panel of BRAFi-resistant cell clones generated through prolonged exposure to 2 $\mu$ M Vemurafenib (Poulikakos et al., 2011). As previously reported, resistant clones universally reactivated the MAPK pathway (Fig. 1A) and exhibited higher IC50 values compared to their parental counterpart (Fig. 1B). We conducted expression profiling of 800 miRNA by Nanostring of 5 BRAFi-resistant clones, DMSO-treated SK-MEL-239 cells, and SK-MEL-239 cells treated with Vemurafenib for 24 hours (Table S1). We observed *miR-125a-5p* consistently upregulated in all BRAFi-resistant clones analyzed (n=5, Fig. 1C), a finding confirmed by RT-qPCR (Fig. S1A). *MiR-125a-5p* induction was observed in multiple additional resistant SK-MEL-239 clones (Fig. 1D) and other resistant cell lines (Fig. S1B), as well as in BRAFi plus MEK inhibitor (MEKi) double resistant cell clones (Fig. S1C). Importantly, we evaluated *miR-125a* expression in 22 paired human melanoma clinical samples acquired pre-treatment and after BRAFi treatment. We observed *miR125a-5p* levels to be upregulated in 8 of 22 (36%) tumor samples while on therapy with BRAFi (Fig. 1E), supporting the potential relevance of *miR-125a* induction to development of therapeutic resistance to BRAFi in melanoma patients.

### ***MiR-125a* suppresses apoptosis in the presence of BRAFi and promotes BRAFi resistance**

We sought to determine if *miR-125a* upregulation functionally contributes to the acquisition of resistance to BRAFi by melanoma cells. We stably overexpressed *miR-125a* in SK-MEL-239 cells by lentiviral transduction (Fig. S2). *MiR-125a* overexpressing cells displayed increased viability in the presence of Vemurafenib at all tested doses (Fig. 2A). Moreover, *miR-125a* overexpression allowed melanoma cells to grow in the presence of BRAFi (Fig. 2B). Interestingly, we observed that this resistance phenotype was not immediately accompanied by reactivation of the MAPK or AKT pathways (week1, Fig. 2C), but resulted in enhanced reactivation of those pathways at later time points (weeks 2-4, Fig. 2C). Since Vemurafenib exerts its anti-tumor effect predominantly by triggering apoptosis (Lee et al., 2010), we examined the role of *miR-125a* on apoptosis induction of Vemurafenib-treated melanoma cells. Ectopic expression of *miR-125a* in Vemurafenib-treated cells significantly decreased the number of Annexin<sup>+</sup> apoptotic cells (Fig. 2D) and suppressed PARP cleavage

(Fig. 2E). Moreover, *miR-125a* overexpression also conferred increased resistance to the combined treatment of BRAFi plus MEKi (Fig. S3A, B). Collectively, these data indicate that *miR-125a* aids melanoma cell survival in the presence of BRAFi and promotes BRAFi resistance, likely through suppression of apoptosis.

### ***MiR-125a* inhibition suppresses the emergence of resistance to BRAFi and partially restores sensitivity to BRAFi in a subset of resistant cell lines**

Because *miR-125a* promotes melanoma cell survival during BRAFi treatment and its up-regulation is maintained in BRAFi-resistant cells, we hypothesized that its inhibition may delay or prevent the emergence of resistance to BRAFi, suppress growth and survival of resistant cells, and/or re-sensitize resistant cells to BRAF inhibition. We stably downregulated *miR-125a* with a lentiviral vector expressing an antisense sequence (Fig. S4A). *MiR-125a* suppression in BRAFi-sensitive parental SK-MEL-239 cells did not have an effect on their viability *in vitro* (Fig. S4B, S4C), but yielded a significant reduction in the emergence of BRAFi resistant colonies after prolonged exposure to Vemurafenib (Fig. 3A).

Next, we examined if the *miR-125a* upregulation in established BRAFi resistant cell clones is required to maintain resistance to BRAFi. Interestingly, *in vitro*, some resistant cell clones were partially re-sensitized to BRAF inhibition by *miR-125a* depletion (Fig. 3B, left panels), by increasing Vemurafenib induced apoptosis (Fig. 3B, right panels); however, other resistant clones, which also overexpress *miR-125a*, were not re-sensitized to BRAF inhibition by *miR-125a* suppression (Fig. 3C). *In vivo*, we observed that *miR-125a* depletion suppressed tumor growth, irrespective of Vemurafenib treatment, of a BRAFi resistant clone (Fig. 3D) that, *in vitro*, was 're-sensitized' to BRAF inhibition by *miR-125a* depletion (see Fig. 3B). In addition, *miR-125a* inhibition partially restored BRAFi sensitivity to non-clonal resistant A375 cells *in vitro*, further supporting the role of *miR-125a* in maintenance of BRAFi resistance (Fig. S4D). Collectively, these findings highlight that *miR-125a* is important for establishment and, in some cases, for maintenance of BRAFi resistance in melanoma, suggesting these cells have become partially addicted to *miR-125a* for their proliferation.

### ***MiR-125a* suppresses the apoptotic program in BRAFi treated melanoma cells. BAK1 and MLK3 are direct *miR-125a* targets**

To elucidate *miR-125a* effectors involved in BRAFi resistance, we performed RNA sequencing of SK-MEL-239 cells overexpressing *miR-125a* or a scrambled control, in the presence of Vemurafenib or vehicle. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of deregulated

genes ( $p < 0.05$ ) in Vemurafenib-treated *miR-125a* overexpressing cells versus Vemurafenib treated scramble control cells revealed apoptosis as the main differentially regulated gene category ( $p < 0.00001$ ) (Fig 4A, upper graph). Since miRNA are negative regulators of gene expression we conducted GO analysis (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) specifically for genes downregulated by *miR-125a* overexpression, which again identified 'apoptotic regulation' among the most significantly affected programs ( $p < 0.003$ ) (Fig. 4A, lower graph). In order to identify direct targets, which might mediate *miR-125a* pro-survival effects in the presence of BRAFi, we overlapped the list of 1999 downregulated genes ( $p < 0.05$ ,  $FC < 0.8$ ) with a combined list of 2018 putative targets from three publicly available databases (TargetScan (Friedman et al., 2009), Starbase (Li et al., 2014), and miRWalk (Dweep et al., 2011)). Within the overlapping list of 503 putative targets downregulated by *miR-125a* overexpression in the presence of Vemurafenib were several components of the intrinsic pro-apoptotic pathway (*TXNIP*, *MLK2*, *MLK3*, *BIK1*, *BAK1*, *TP53*; Fig. 4B). Validation through Western Blot analysis revealed regulation of MLK3 and BAK1 by *miR-125a* (Fig.4C), which was particularly evident upon BRAFi treatment. 3'UTR luciferase reporter assays confirmed that *miR-125a* directly targets both MLK3 and BAK1 (Fig. 4D). Accordingly, resistant clones showed increased MLK3 and BAK1 protein levels after *miR-125a* inhibition (Fig. 4E). Interestingly, *miR-125a*-induced repression of MLK3 did not affect the apoptotic JNK/p38 pathway, which MLKs are known to regulate (Fig. S5A).

Individual and combined silencing of BAK1 and MLK3 in SK-MEL-239 cells was unable to mimic the ability of *miR-125a* to promote BRAFi resistance (Fig. S5B-C), suggesting that *miR-125a* effects require the combined suppression of multiple apoptosis suppressors. However, in resistant cells sensitized to BRAFi through *miR-125a* inhibition, depletion of either BAK1 or MLK3 restored BRAFi resistance (Fig. 4F, Fig S5D). To examine whether downregulation of BAK1 and/or MLK3 correlated with resistance to BRAFi therapy in clinical samples, we analyzed their expression in a previously published profile (Rizos et al., 2014) of paired biopsies isolated pre-treatment and at disease progression (BRAFi-resistance) from 21 metastatic melanoma patients. There was evidence of downregulation (relative to the patient-matched pre-treatment samples) of *BAK1* or *MLK3* in 6 (~29%) and 10 (~43%) of 21 patients, respectively (Fig. S5E). These findings support that *BAK1* and *MLK3* downstream of *miR-125a* might be involved in clinical resistance to BRAFi therapy. Overall, these results suggest that regulation of pro-apoptotic targets might critically mediate *miR-125a* effects on melanoma cell resistance to BRAFi.

## **MiR-125a expression is regulated by TGFβ signaling**

*MiR-125a* expression was induced after short-term Vemurafenib exposure of SK-MEL-239 cells (Fig. S6A) and rapidly returned to basal levels after drug removal (Fig. S6B), suggesting that it is likely regulated by transient, reversible mechanisms. To examine if this regulation occurs transcriptionally, we tested the effect of Vemurafenib on the expression of the *miR-125a* primary transcript, which includes *miR-125a*, *miR-99* and *let-7b*, and found it upregulated in resistant clones (Fig. S6C). Surprisingly, of the miRNA expressed in this cluster, only mature *miR-125a* was found significantly upregulated (Fig. S6D), suggesting that differential processing may add further specificity to the induction of *miR-125a* expression by BRAF inhibition.

To identify potential upstream regulators of *miR-125a* expression, we correlated *miR-125a* with coding mRNA abundance from a previously published gene expression profiling of a panel of melanoma cell lines (Rose et al., 2011). Strikingly, the most highly correlated mRNA was TGFβ1 ( $r^2 = 0.8$ ,  $p < 0.00001$ ) (Fig 4G), which has previously been implicated in acquisition of BRAFi resistance (Sun et al., 2014). Moreover, *in silico* analysis of the *miR-125a* promoter region revealed three putative binding sites of the TGFβ induced gene EGR-1 (Chen et al., 2006) and one putative Smad binding site. Treatment of BRAFi sensitive melanoma cells with recombinant TGFβ1 protein induced *miR-125a* expression (Fig 4H). Importantly, TGFβ signaling is induced upon Vemurafenib treatment (Fig. 4I, left panel, Fig S7), and treatment with the TGFβ receptor I inhibitor Galunisertib suppressed *miR-125a* induced by BRAF inhibition (Fig. 4I, right panel). Overall, our data indicate that TGFβ signaling contributes to *miR-125a* induction in response to BRAF inhibition.

## **Discussion**

A major hurdle for targeted therapy in melanoma remains the widespread development of BRAFi resistance. Whereas most of the described resistance mechanisms are based on genomic alterations, the contributions of non-genomic alterations to resistance are only beginning to be explored (Hugo et al., 2015). Delineating the molecular mechanisms involved in the acquisition and maintenance of BRAFi resistance may provide valuable insights into novel therapeutic strategies to more effectively treat patients with *BRAF*<sup>V600E</sup>-mutant melanoma. Here, in a model that recapitulates clinical BRAFi resistance (Poulikakos et al., 2011) and additional cell line models, we consistently observed upregulation of *miR-125a* in BRAFi-resistant clones. Moreover, *miR-125a* was upregulated in human clinical melanoma samples from patients treated with BRAFi compared to their pre-treatment

biopsies. In addition to these observations, we experimentally demonstrated that *miR-125a* expression favors acquisition of BRAFi resistance by suppressing the induction of apoptosis via direct targeting of the intrinsic apoptotic pathway. Finally, we demonstrate that TGF $\beta$  signaling is required for *miR-125a* induction during BRAFi treatment. Collectively, our data document a critical role of *miR-125a* supporting the acquisition of BRAFi resistance in melanoma.

*MiR-125a* is a member of the *miR-10* family, which also includes two homologs, *hsa-miR-125b-1*, *hsa-miR-125b-2*, with which *miR-125a* shares an identical seed region. *MiR-125* homologs play crucial roles in many different cellular and molecular processes, such as differentiation, proliferation, apoptosis, and regulation of matrix-metalloproteases (Bi et al., 2012, Xu et al., 2012, Balakrishnan et al., 2012, Bousquet et al., 2008, Sun et al., 2013, Ge et al., 2011).

For the different *miR-125* homologs, contrasting properties have been reported in different cancer types; they may contribute to the initiation and progression of cancers by acting as either tumor suppressors or oncogenes (Cowden Dahl et al., 2009, Jiang et al., 2011, Jiang et al., 2010). The opposing properties of the *miR-125* homologs in different solid tumors demonstrate that they can have context-dependent functions in cancer pathogenesis, progression and treatment resistance. The underlying direct target mediators and molecular mechanisms in different cell contexts require further investigation.

Although *miR-125a* has not yet been described as a mediator of acquired BRAFi resistance of melanoma cells, previous studies have documented the ability of *miR-125b* to increase resistance of cancer cell models to anticancer agents (Sun et al., 2013, Zhou et al., 2010). For instance, Sun et al. demonstrated a role for *miR-125b* in Taxol resistance in breast cancer (Sun et al., 2013). Moreover, recently, Vergani et al. reported that *miR-125b* (and other miRNAs) was upregulated in response to CCL2 induction during development of BRAFi resistance in melanoma (Vergani et al., 2016). Similar to our findings for *miR-125a*, *miR-125b* blocked apoptotic induction, though the molecular mechanisms downstream of this phenotype are not yet elucidated. They did not observe *miR-125a* upregulation in their model of BRAFi resistance used for miRNA profiling, nor did we observe *miR-125b* induction in our models. It is tempting to speculate that context-dependent increase of one of the *miR-125* homologs is required in the early stages of BRAFi treatment.

To our knowledge, our study provides the first evidence of *miR-125a* promoting therapeutic resistance in melanoma. Importantly, our findings identify a targetable step that may improve the efficacy of BRAF inhibition and/or BRAFi/MEKi combination therapy by blocking a cell survival pathway activated early in the treatment of metastatic *BRAF* mutant melanoma patients.

The prevalent *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation provides melanoma cells with enhanced proliferation and survival signals. The therapeutic effects of BRAF inhibition stem from the activation of intrinsic apoptosis mechanisms. Our data suggest a mechanism of BRAFi mediated cell death evasion, carried out by *miR-125a* and its direct targeting of the pro-apoptotic factors MLK3 and BAK1. MLKs commonly modulate apoptosis through the JNK/p38 pathway. In this study, we demonstrate that downregulation of the specific member MLK3 by *miR-125a* plays a role in resistance through increasing cell viability in a JNK/p38-independent manner. A possibility is that the low expression of MLK3 provides a survival advantage through the inactivation of the intrinsic apoptotic pathway via AMPK regulation (Luo et al., 2015) or other related factors. BAK1 functions as a pro-apoptotic regulator by localizing to mitochondria and accelerating the release of cytochrome c (Westphal et al., 2014). Downregulation of BAK1 by *miR-125a* therefore leads to a decrease in mitochondrial apoptotic signaling, effectively resulting in increased cell survival. Thus, the direct suppression of apoptosis by *miR-125a* provides a mechanism by which melanoma cells may evade BRAF inhibition. This general survival benefit enacted by *miR-125a* may permit tumor cells to acquire secondary, 'permanent' resistance mechanisms resulting in eventual reactivation of the MAPK and AKT pathways. Therefore, *miR-125a* upregulation likely coexists with other mechanisms of resistance, playing a supporting role for cell survival. This is supported by our observation that *miR-125a* inhibition suppressed tumor growth of BRAFi resistant cells independent of BRAFi treatment. Whether *miR-125a* upregulation favors a particular subsequent resistance mechanism remains an area of active investigation.

Since miRNA can have pleiotropic effects, suppression of apoptosis might not be the only mechanism by which *miR-125a* contributes to resistance to BRAFi. Cells overexpressing the miRNA and treated with BRAFi exhibited phenotypic changes, such as lipid-like accumulations (data not shown), suggesting that alterations in cell metabolism might also be involved. In support of this notion, IPA analysis of genes modulated by *miR-125a* overexpression in the presence of BRAFi revealed 'Cholesterol metabolism' among the top dysregulated categories. As cholesterol availability is altered in cancer cells and influences oncogenic networks (Ura et al., 1994), investigating metabolic reprogramming of melanoma cells in relation to BRAFi resistance may provide further valuable insight.

Accordingly, recent work has identified a metabolic shift towards oxidative phosphorylation as another response of melanoma cells to BRAFi (Haq et al., 2013a).

Due to *miR-125a* targeting of pro-apoptotic factors, uncovering upstream *miR-125a* regulators in human tissues will likely provide relevant therapeutic avenues and is an area that warrants further investigation. In our system, the quick and reversible change in *miR-125a* expression levels upon BRAFi modulation suggests that it results from transcriptional and/or post-transcriptional mechanisms (rather than genetic amplification or mutation). We observed that TGF $\beta$  signaling, induced by Vemurafenib treatment, contributes to the regulation of *miR-125a* expression and therefore to resistance. Previous reports have linked activated TGF $\beta$  signaling to the acquisition of BRAFi resistance (Sun et al., 2014) and *miR-125a* induction may critically contribute to those effects.

While the upregulation of *miR-125a* provides a mechanism for drug resistance, the ability to target this miRNA opens the possibility to interfere with development of resistance. Indeed, depletion of this miRNA during BRAFi treatment *in vitro* led to a decreased emergence of resistant clones and partially re-sensitized a subset of BRAFi resistant cells. These findings suggest potential benefit of establishing clinical approaches for miRNA suppression in combination with BRAFi or BRAFi/MEKi therapy in the treatment of *BRAF*<sup>V600E</sup> melanoma. Thus, the identification of *miR-125a*'s involvement in BRAFi resistance elucidates clinically relevant mechanisms of melanoma cell survival and has important therapeutic implications.

## Methods

**Cells and cell culture** — SK-MEL-239 parental and some Vemurafenib-resistant cell lines (single clones) were a kind gift of Dr. Poulikos Poulikakos and Dr. Emily Bernstein. Vemurafenib-resistant A375R and 451LuR cells (pooled clones) cells were derived from their respective parental cell lines by treatment with 1 $\mu$ M Vemurafenib for several weeks. A375 and 451Lu cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), resistant single clones were derived from the SK-MEL-239 cell line through prolonged treatment with 2 $\mu$ M Vemurafenib (single resistance) or 1 $\mu$ M Vemurafenib + 2 $\mu$ M PD0325901 (double resistance) in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin. The resistant cell lines were cultured in the presence of 1 $\mu$ M Vemurafenib. For TGF $\beta$  experiments cells were treated with human TGF $\beta$ 1 protein (R&D Systems) or TGF $\beta$  receptor I inhibitor (Galunisertib, Selleckchem).

Cell line authentication by short tandem repeat (STR) analysis was performed for SK-MEL-239 at ATCC and confirmed that these cells didn't match with any of the cell lines deposited in the cell bank (this cell line isn't present in any of the main cell line repositories and thus there is no 'baseline' STR profile from which to compare). STR profiling is ongoing for A375 and 451Lu. Cell lines were previously analyzed by morphologic assessment and gene expression profiling for lineage-specific gene expression (TYR, TRYP1, DCT, TRYP1B, MITF, EDNRB, KIT) by microarray.

**MiRNA expression profiling** — Total RNA was extracted from SK-MEL-239 cells and derived resistant clones using QIAzol reagent (Qiagen). 100ng RNA per sample was used for miRNA profiling using the NanoString nCounter expression assay of 800 human miRNAs according to manufacturer's protocol (Nanostring nCounter® miRNA Expression Assay User Manual). Raw expression values were normalized to those of the 100 highest expressed miRNAs and expression profiles were compared to the sensitive parental cells applying a differential expression cut-off of 2-fold. Student's t-test analysis was conducted and miRNAs with p-values <0.05 were selected for further analyses.

**Pre-miRNA or anti-miRNA stable transduction** — Lentiviral vectors carrying miRNA precursors (H miRNA) and antisense miRNA sequences (Zip miRNA) were purchased from Dharmacon. Pre-miR- and anti-miR-scramble sequences were used as negative controls. Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used for transfection of 293T cells with pre-miRNAs or Zip miRNAs for virus production. 48h after transfection virus was collected and titrated. Infection of melanoma cells was performed for 6h using 4µg/ml polybrene.

**Oligonucleotide transient transfection** — miRIDIAN oligonucleotides mimics, anti-miRNAs or the SMARTpool siRNAs (mixture of 4 siRNA provided as a single reagent) (all Dharmacon) were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's protocol. Transfection efficiency was monitored using Block-iT Fluorescent Oligo (Invitrogen).

**Real-time quantitative PCR** — Total RNA was isolated from cultured cells using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen). MiRNA and pri-miRNA expression analysis was performed using miRNA-specific TaqMan MicroRNA Assay Kits (Applied Biosystems). 12.5ng of total RNA were reverse-transcribed using the corresponding RT primer and the TaqMan

microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). PCR was performed on 1.33µl of RT products by adding Taqman PCR primers and Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems). RNU44 small RNA was used for normalization of input RNA/cDNA levels.

*MLK3* and *BAK1* mRNA expression analysis was performed by synthesizing cDNA from 1µg of total RNA using Reverse Transcriptase cDNA Synthesis kit (Applied Biosystems). For quantitative PCR, cDNA was mixed with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and various sets of gene-specific primers and then subjected to RT-PCR quantification by using the iQ5 real time PCR system (Bio-Rad). The sequences of the primers used were as follows: *MLK3* 5' primer (5'-ATGCCACTCGACTTCAAGCA-3') and 3' primer (5'-GACGTTTCTCCTCCGGTCAA-3'), *BAK1* 5' primer (5'-CGGCAGAGAATGCCTATGAGT-3') and 3' primer (5'-AAACAGGCTGGTGGCAATCTT-3'). *GAPDH* was used for normalization of input RNA/cDNA.

**FACS analysis** — Cells were pretreated with Annexin V Pacific Blue (BioLegend) and Propidium Iodide (PromoKine) and analyzed with a BD LSR II (BD Biosciences) and FACS Express Software (De Novo Software). After an initial gating on forward-versus-side scatter plots, apoptotic cells were identified through gating for the AnnexinV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> and AnnexinV<sup>+</sup> cells.

**Western blotting** — Cell lysates were harvested using a commercial cell lysis buffer (Cell Signaling) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche). Cell lysates (25-30µg) were resolved in Tris-/glycine or Bis-Tris SDS/PAGE gels (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose or PVDF membranes (Invitrogen). Membranes were blocked with 5% non-fat milk or 5% BSA in TBS-T for 60min and probed with primary antibodies overnight at 4°C for BIK (Abcam), MLK2 (Abcam), MLK3 (Abcam), Tubulin (Sigma), TXNIP (VDUP-1) (Invitrogen), BAK1, TP53, JNK, pJNK (Thr183/Tyr185), p38, p-p38 (Thr180/Tyr182), ERK, pERK (Thr202/Tyr204), AKT, pAKT (Ser473) (all Cell Signaling). Membranes were exposed to HRP- or fluorescence-conjugated secondary antibodies (1:10,000) in TBS-T with 1% blocking agent for 60min. Following extensive washing with TBS-T, western membranes were digitally imaged (fluorescent, Licor) or developed with the ECL Western blotting detection kit (HRP, Merck Millipore) and exposed on film (Denville Scientific).

**Luciferase assay** — A plasmid containing the luciferase cDNA conjugated to the 3'UTR of *MLK3* was purchased from SwitchGear. A plasmid containing the luciferase cDNA conjugated to the 3'UTR of *BAK1* was purchased from GeneCopeia. HEK293T cells were seeded into a 96-well plate and co-transfected with 3'UTR reporter vectors and indicated amounts of miRIDIAN *miR-125a* or miR-182 mimics or mimic negative control (Dharmacon). Luciferase activity was measured using the Dual Glo Luciferase Assay System (Promega). Renilla luciferase activity was normalized to corresponding firefly luciferase activity and plotted as a percentage of the control.

**Cell viability assay** — Cells were seeded into a 96-well plate and treated with indicated concentrations of Vemurafenib (Plexxikon) (0.001 $\mu$ M-100 $\mu$ M). 96h after treatment cell viability was measured using the CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) according to manufacturer's instructions.

**Short-term proliferation assay** — Cells were seeded into a 96-well plate and treated with 2 $\mu$ M Vemurafenib (Plexxikon) for indicated times. Cells were then fixed using 1% glutaraldehyde and stained with crystal violet. Dye was then solubilized using 15% acetic acid and read at OD590.

**Long-term proliferation assay** — Cells were seeded in triplicate into 6 well plates and treated with DMSO or 2 $\mu$ M Vemurafenib (Plexxikon) for the indicated time points. At each time point cells were counted and cell numbers were referred to initial seeding at day 0.

**In vivo xenograft experiment with resistant cells** —  $1 \times 10^6$  cells (resistant clone 4 transduced with Zscr or Z125a) were injected in 1 flank/mouse of 20 mice per group. Tumors began to form at 1 week after injection. Drug treatment was initiated at 100mm<sup>3</sup> tumor volume. 10 mice per group were injected with 25mg/kg Vemurafenib or DMSO through intraperitoneal injection twice per day for 24 days.

**Clinical specimens** — Patients with BRAF<sup>V600</sup>-mutant metastatic melanoma were treated with a BRAFi. After obtaining appropriate Institutional Review Board approved protocol, 7 $\mu$ m formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) sections were received from tumors biopsied before treatment or at the time of progression.

**FFPE RNA Isolation** — Human metastatic melanoma areas were identified through H&E staining by an experienced pathologist (Dr. Farbod Darvishian). Tumor areas were micro-dissected using a precision scalpel. Depending on tumor size, 3 to 5 sections per sample, each 7 $\mu$ M thick were used per RNA extraction. RNA was extracted using the QIAGEN miRNeasy FFPE Tissue Kit (Qiagen) according to manufacturers protocol.

**RNA sequencing** — Total RNA was extracted using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen). Total RNA quality and quantity were determined using Agilent 2100 Bioanalyzer and Nanodrop ND-1000. Expression profiling of the duplicate experimental sample groups (SK-MEL-239 cells with lentiviral scramble or *miR-125a* constructs after 7 days of DMSO or 2 $\mu$ M Vemurafenib treatment) was performed using Illumina HiSeq 2500 System. Samples were subject to PolyA selection using oligo-dT beads and the resulting RNA samples were then used as input for library construction according to the manufacturer's instructions (Illumina TruSeq RNA Sample Prep Kit v2). RNA libraries were then sequenced on the Illumina HiSeq2500 using paired end sequencing with v4 technology.

**RNA sequencing data analysis** — Sequencing results were demultiplexed and converted to FASTQ format using Illumina Bcl2FastQ software. Paired-end reads were aligned to the human genome (build hg19/GRCh37) using the splice-aware STAR aligner (Dobin et al., 2013). PCR duplicates were removed using the Picard toolkit (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). HTSeq package (Anders et al., 2015) was utilized to generate counts for each gene based on how many aligned reads overlap its exons. These counts were then used to test for differential expression using negative binomial generalized linear models implemented by the DESeq2 R package (Love et al., 2014).

The functional annotations of the gene lists were performed using the NIH web based tool DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Huang da et al., 2009) and/or Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, <http://www.broadinstitute.org/gsea/>) (Subramanian et al., 2008).

**Statistical methodologies** — Unless otherwise indicated, mean values  $\pm$  SD are representative of one of three independent experiments. Statistical significance was determined by Student's t test (GraphPad Prism Software). Of note, \*P < 0.05; \*\*P < 0.001; and \*\*\*P < 0.0001, \*\*\*\*P < 0.00001.

## Acknowledgements

We thank Adriana Heguy and members of the New York University Cancer Institute Genome Technology Center (GTC) for microRNA profiling, RNA sequencing and analysis, as well as the services of the NYU Experimental Pathology Core Facilities. We are grateful to Dr. Poulikos Poulidakos and to Taniya Panda (Icahn School of Medicine at Mount Sinai) for generating and providing us with some of the resistant SK-MEL-239 clones, and to members of the Hernando lab for discussions and technical assistance. This work was funded by NIH-NCI R01CA155234 grant.

## Conflict of Interest

The authors disclose no potential conflicts of interest.

## References:

AKBANI, R., NG, P. K., WERNER, H. M., SHAHMORADGOLI, M., ZHANG, F., JU, Z., LIU, W., YANG, J. Y., YOSHIHARA, K., LI, J., LING, S., SEVIOUR, E. G., RAM, P. T., MINNA, J. D., DIAO, L., TONG, P., HEYMACH, J. V., HILL, S. M., DONDELINGER, F., STADLER, N., BYERS, L. A., MERIC-BERNSTAM, F., WEINSTEIN, J. N., BROOM, B. M., VERHAAK, R. G., LIANG, H., MUKHERJEE, S., LU, Y. & MILLS, G. B. 2015. Corrigendum: A pan-cancer proteomic perspective on The Cancer Genome Atlas. *Nat Commun*, 6, 4852.

ANDERS, S., PYL, P. T. & HUBER, W. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31, 166-9.

BALAKRISHNAN, A., STEARNS, A. T., PARK, P. J., DREYFUSS, J. M., ASHLEY, S. W., RHOADS, D. B. & TAVAKKOLIZADEH, A. 2012. Upregulation of proapoptotic microRNA mir-125a after massive small bowel resection in rats. *Ann Surg*, 255, 747-53.

BI, Q., TANG, S., XIA, L., DU, R., FAN, R., GAO, L., JIN, J., LIANG, S., CHEN, Z., XU, G., NIE, Y., WU, K., LIU, J., SHI, Y., DING, J. & FAN, D. 2012. Ectopic expression of MiR-125a inhibits the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting MMP11 and VEGF. *PLoS One*, 7, e40169.

BOLLAG, G., HIRTH, P., TSAI, J., ZHANG, J., IBRAHIM, P. N., CHO, H., SPEVAK, W., ZHANG, C., ZHANG, Y., HABETS, G., BURTON, E. A., WONG, B., TSANG, G., WEST, B. L., POWELL, B., SHELLOOE, R., MARIMUTHU, A., NGUYEN, H., ZHANG, K. Y., ARTIS, D. R., SCHLESSINGER, J., SU, F., HIGGINS, B., IYER, R., D'ANDREA, K., KOEHLER, A., STUMM, M., LIN, P. S., LEE, R. J., GRIPPO, J., PUZANOV, I., KIM, K. B., RIBAS, A., MCARTHUR, G. A., SOSMAN, J. A., CHAPMAN, P. B., FLAHERTY, K. T., XU, X.,

NATHANSON, K. L. & NOLOP, K. 2010. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, 467, 596-9.

BOUSQUET, M., QUELEN, C., ROSATI, R., MANSAT-DE MAS, V., LA STARZA, R., BASTARD, C., LIPPERT, E., TALMANT, P., LAFAGE-POCHITALOFF, M., LEROUX, D., GERVAIS, C., VIGUIE, F., LAI, J. L., TERRE, C., BEVERLO, B., SAMBANI, C., HAGEMEIJER, A., MARYNEN, P., DELSOL, G., DASTUGUE, N., MECUCCI, C. & BROUSSET, P. 2008. Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *J Exp Med*, 205, 2499-506.

CHAPMAN, P. B., HAUSCHILD, A., ROBERT, C., HAANEN, J. B., ASCIERTO, P., LARKIN, J., DUMMER, R., GARBE, C., TESTORI, A., MAIO, M., HOGG, D., LORIGAN, P., LEBBE, C., JOUARY, T., SCHADENDORF, D., RIBAS, A., O'DAY, S. J., SOSMAN, J. A., KIRKWOOD, J. M., EGGERMONT, A. M., DRENO, B., NOLOP, K., LI, J., NELSON, B., HOU, J., LEE, R. J., FLAHERTY, K. T., MCARTHUR, G. A. & GROUP, B.-S. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 364, 2507-16.

CHEN, S. J., NING, H., ISHIDA, W., SODIN-SEMRL, S., TAKAGAWA, S., MORI, Y. & VARGA, J. 2006. The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression. *J Biol Chem*, 281, 21183-97.

COWDEN DAHL, K. D., DAHL, R., KRUICHAK, J. N. & HUDSON, L. G. 2009. The epidermal growth factor receptor responsive miR-125a represses mesenchymal morphology in ovarian cancer cells. *Neoplasia*, 11, 1208-15.

DOBIN, A., DAVIS, C. A., SCHLESINGER, F., DRENKOW, J., ZALESKI, C., JHA, S., BATUT, P., CHAISSON, M. & GINGERAS, T. R. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29, 15-21.

DWEEP, H., STICHT, C., PANDEY, P. & GRETZ, N. 2011. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform*, 44, 839-47.

EMERY, C. M., VIJAYENDRAN, K. G., ZIPSER, M. C., SAWYER, A. M., NIU, L., KIM, J. J., HATTON, C., CHOPRA, R., OBERHOLZER, P. A., KARPOVA, M. B., MACCONAILL, L. E., ZHANG, J., GRAY, N. S., SELLERS, W. R., DUMMER, R. & GARRAWAY, L. A. 2009. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 20411-6.

FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D. M., FORMAN, D. & BRAY, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136, E359-86.

FLAHERTY, K. T., PUZANOV, I., KIM, K. B., RIBAS, A., MCARTHUR, G. A., SOSMAN, J. A., O'DWYER, P. J., LEE, R. J., GRIPPO, J. F., NOLOP, K. & CHAPMAN, P. B. 2010. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363, 809-19.

FRIEDMAN, R. C., FARH, K. K., BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19, 92-105.

GE, Y., SUN, Y. & CHEN, J. 2011. IGF-II is regulated by microRNA-125b in skeletal myogenesis. *J Cell Biol*, 192, 69-81.

GIROTTI, M. R., PEDERSEN, M., SANCHEZ-LAORDEN, B., VIROS, A., TURAJLIC, S., NICULESCU-DUVAZ, D., ZAMBON, A., SINCLAIR, J., HAYES, A., GORE, M., LORIGAN, P., SPRINGER, C., LARKIN, J., JORGENSEN, C. & MARAIS, R. 2013. Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov*, 3, 158-67.

HAQ, R., SHOAG, J., ANDREU-PEREZ, P., YOKOYAMA, S., EDELMAN, H., ROWE, G. C., FREDERICK, D. T., HURLEY, A. D., NELLORE, A., KUNG, A. L., WARGO, J. A., SONG, J. S., FISHER, D. E., ARANY, Z. & WIDLUND, H. R. 2013a. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer Cell*, 23, 302-15.

HAQ, R., YOKOYAMA, S., HAWRYLUK, E. B., JONSSON, G. B., FREDERICK, D. T., MCHENRY, K., PORTER, D., TRAN, T. N., LOVE, K. T., LANGER, R., ANDERSON, D. G., GARRAWAY, L. A., DUNCAN, L. M., MORTON, D. L., HOON, D. S., WARGO, J. A., SONG, J. S. & FISHER, D. E. 2013b. BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 4321-6.

HILMI, C., LARRIBERE, L., GIULIANO, S., BILLE, K., ORTONNE, J. P., BALLOTTI, R. & BERTOLOTTI, C. 2008. IGF1 promotes resistance to apoptosis in melanoma cells through an increased expression of BCL2, BCL-X(L), and survivin. *J Invest Dermatol*, 128, 1499-505.

HUANG DA, W., SHERMAN, B. T. & LEMPICKI, R. A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4, 44-57.

HUGO, W., SHI, H., SUN, L., PIVA, M., SONG, C., KONG, X., MORICEAU, G., HONG, A., DAHLMAN, K. B., JOHNSON, D. B., SOSMAN, J. A., RIBAS, A. & LO, R. S. 2015. Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell*, 162, 1271-85.

JIANG, F., LIU, T., HE, Y., YAN, Q., CHEN, X., WANG, H. & WAN, X. 2011. MiR-125b promotes proliferation and migration of type II endometrial carcinoma cells through targeting TP53INP1 tumor suppressor in vitro and in vivo. *BMC Cancer*, 11, 425.

JIANG, L., HUANG, Q., ZHANG, S., ZHANG, Q., CHANG, J., QIU, X. & WANG, E. 2010. Hsa-miR-125a-3p and hsa-miR-125a-5p are downregulated in non-small cell lung cancer and have inverse effects on invasion and migration of lung cancer cells. *BMC Cancer*, 10, 318.

JOHANNESSEN, C. M., BOEHM, J. S., KIM, S. Y., THOMAS, S. R., WARDWELL, L., JOHNSON, L. A., EMERY, C. M., STRANSKY, N., COGDILL, A. P., BARRETINA, J., CAPONIGRO, G., HIERONYMUS, H., MURRAY, R. R., SALEHI-ASHTIANI, K., HILL, D. E., VIDAL, M., ZHAO, J. J., YANG, X., ALKAN, O., KIM, S., HARRIS, J. L., WILSON, C. J., MYER, V. E., FINAN, P. M., ROOT, D. E., ROBERTS, T. M., GOLUB, T., FLAHERTY, K. T., DUMMER, R., WEBER, B. L., SELLERS, W. R., SCHLEGEL, R., WARGO, J. A., HAHN, W. C. & GARRAWAY, L. A. 2010. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*, 468, 968-72.

JOHNSON, D. B., MENZIES, A. M., ZIMMER, L., EROGLU, Z., YE, F., ZHAO, S., RIZOS, H., SUCKER, A., SCOLYER, R. A., GUTZMER, R., GOGAS, H., KEFFORD, R. F., THOMPSON, J. F., BECKER, J. C., BERKING, C., EGBERTS, F., LOQUAI, C., GOLDINGER, S. M., PUPO, G. M., HUGO, W., KONG, X., GARRAWAY, L. A., SOSMAN, J. A., RIBAS, A., LO, R. S., LONG, G. V. & SCHADENDORF, D. 2015. Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *Eur J Cancer*, 51, 2792-9.

KRAUTHAMMER, M., KONG, Y., BACCHIOCCHI, A., EVANS, P., PORNPUTTAPONG, N., WU, C., MCCUSKER, J. P., MA, S., CHENG, E., STRAUB, R., SERIN, M., BOSENBERG, M., ARIYAN, S., NARAYAN, D., SZNOL, M., KLUGER, H. M., MANE, S., SCHLESSINGER, J., LIFTON, R. P. & HALABAN, R. 2015. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet*, 47, 996-1002.

LACKNER, M. R., WILSON, T. R. & SETTLEMAN, J. 2012. Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies. *Future Oncol*, 8, 999-1014.

LEE, J. T., LI, L., BRAFFORD, P. A., VAN DEN EIJNDEN, M., HALLORAN, M. B., SPROESSER, K., HAASS, N. K., SMALLEY, K. S., TSAI, J., BOLLAG, G. & HERLYN, M. 2010. PLX4032, a potent inhibitor of the B-Raf V600E oncogene, selectively inhibits V600E-positive melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23, 820-7.

LI, J. H., LIU, S., ZHOU, H., QU, L. H. & YANG, J. H. 2014. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res*, 42, D92-7.

LIU, S., TETZLAFF, M. T., WANG, T., YANG, R., XIE, L., ZHANG, G., KREPLER, C., XIAO, M., BEQIRI, M., XU, W., KARAKOUSIS, G., SCHUCHTER, L., AMARAVADI, R. K., XU, W., WEI, Z., HERLYN, M., YAO, Y., ZHANG, L., WANG, Y., ZHANG, L. & XU, X. 2015. miR-200c/Bmi1 axis and epithelial-mesenchymal transition contribute to acquired resistance to BRAF inhibitor treatment. *Pigment Cell Melanoma Res*, 28, 431-41.

LOVE, M. I., HUBER, W. & ANDERS, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15, 550.

LUJAMBIO, A. & LOWE, S. W. 2012. The microcosmos of cancer. *Nature*, 482, 347-55.

LUO, L., JIANG, S., HUANG, D., LU, N. & LUO, Z. 2015. MLK3 phosphorylates AMPK independently of LKB1. *PLoS One*, 10, e0123927.

NAZARIAN, R., SHI, H., WANG, Q., KONG, X., KOYA, R. C., LEE, H., CHEN, Z., LEE, M. K., ATTAR, N., SAZEGAR, H., CHODON, T., NELSON, S. F., MCARTHUR, G., SOSMAN, J. A., RIBAS, A. & LO, R. S. 2010. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*, 468, 973-7.

PARAISO, K. H., XIANG, Y., REBECCA, V. W., ABEL, E. V., CHEN, Y. A., MUNKO, A. C., WOOD, E., FEDORENKO, I. V., SONDAK, V. K., ANDERSON, A. R., RIBAS, A., PALMA, M. D., NATHANSON, K. L., KOOMEN, J. M., MESSINA, J. L. & SMALLEY, K. S. 2011. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res*, 71, 2750-60.

POULIKAKOS, P. I., PERSAUD, Y., JANAKIRAMAN, M., KONG, X., NG, C., MORICEAU, G., SHI, H., ATEFI, M., TITZ, B., GABAY, M. T., SALTON, M., DAHLMAN, K. B., TADI, M., WARGO, J. A., FLAHERTY, K. T., KELLEY, M. C., MISTELI, T., CHAPMAN, P. B., SOSMAN, J. A., GRAEBER, T. G., RIBAS, A., LO, R. S., ROSEN, N. & SOLIT, D. B. 2011. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*, 480, 387-90.

RIZOS, H., MENZIES, A. M., PUPO, G. M., CARLINO, M. S., FUNG, C., HYMAN, J., HAYDU, L. E., MIJATOV, B., BECKER, T. M., BOYD, S. C., HOWLE, J., SAW, R., THOMPSON, J. F., KEFFORD, R. F., SCOLYER, R. A. & LONG, G. V. 2014. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. *Clin Cancer Res*, 20, 1965-77.

ROSE, A. E., POLISENO, L., WANG, J., CLARK, M., PEARLMAN, A., WANG, G., VEGA, Y. S. D. M. E. C., MEDICHERLA, R., CHRISTOS, P. J., SHAPIRO, R., PAVLICK, A., DARVISHIAN, F., ZAVADIL, J., POLSKY, D., HERNANDO, E., OSTRER, H. & OSMAN, I. 2011. Integrative genomics identifies molecular alterations that challenge the linear model of melanoma progression. *Cancer Res*, 71, 2561-71.

SHAO, Y. & APLIN, A. E. 2010. Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. *Cancer Res*, 70, 6670-81.

SHEN, C. H., KIM, S. H., TROUSIL, S., FREDERICK, D. T., PIRIS, A., YUAN, P., CAI, L., GU, L., LI, M., LEE, J. H., MITRA, D., FISHER, D. E., SULLIVAN, R. J., FLAHERTY, K. T. & ZHENG, B. 2016. Loss of cohesin complex components STAG2 or STAG3 confers resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Nat Med*, 22, 1056-61.

SHI, H., MORICEAU, G., KONG, X., LEE, M. K., LEE, H., KOYA, R. C., NG, C., CHODON, T., SCOLYER, R. A., DAHLMAN, K. B., SOSMAN, J. A., KEFFORD, R. F., LONG, G. V., NELSON, S. F., RIBAS, A. & LO, R. S. 2012. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun*, 3, 724.

SMITH, M. P., SANCHEZ-LAORDEN, B., O'BRIEN, K., BRUNTON, H., FERGUSON, J., YOUNG, H., DHOMEN, N., FLAHERTY, K. T., FREDERICK, D. T., COOPER, Z. A., WARGO, J. A., MARAIS, R. & WELLBROCK, C. 2014. The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNFalpha. *Cancer Discov*, 4, 1214-29.

SOSMAN, J. A., KIM, K. B., SCHUCHTER, L., GONZALEZ, R., PAVLICK, A. C., WEBER, J. S., MCARTHUR, G. A., HUTSON, T. E., MOSCHOS, S. J., FLAHERTY, K. T., HERSEY, P., KEFFORD, R., LAWRENCE, D., PUZANOV, I., LEWIS, K. D., AMARAVADI, R. K., CHMIELOWSKI, B., LAWRENCE, H. J., SHYR, Y., YE, F., LI, J., NOLOP, K. B., LEE, R. J., JOE, A. K. & RIBAS, A. 2012. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*, 366, 707-14.

STARK, M. S., BONAZZI, V. F., BOYLE, G. M., PALMER, J. M., SYMMONS, J., LANAGAN, C. M., SCHMIDT, C. W., HERINGTON, A. C., BALLOTTI, R., POLLOCK, P. M. & HAYWARD, N. K. 2015. miR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAFi sensitivity in melanoma. *Oncotarget*, 6, 17753-63.

STRAUSSMAN, R., MORIKAWA, T., SHEE, K., BARZILY-ROKNI, M., QIAN, Z. R., DU, J., DAVIS, A., MONGARE, M. M., GOULD, J., FREDERICK, D. T., COOPER, Z. A., CHAPMAN, P. B., SOLIT, D. B., RIBAS, A., LO, R. S., FLAHERTY, K. T., OGINO, S., WARGO, J. A. & GOLUB, T. R. 2012. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, 487, 500-4.

SUBRAMANIAN, S., LUI, W. O., LEE, C. H., ESPINOSA, I., NIELSEN, T. O., HEINRICH, M. C., CORLESS, C. L., FIRE, A. Z. & VAN DE RIJN, M. 2008. MicroRNA expression signature of human sarcomas. *Oncogene*, 27, 2015-26.

SUN, C., WANG, L., HUANG, S., HEYNEN, G. J., PRAHALLAD, A., ROBERT, C., HAANEN, J., BLANK, C., WESSELING, J., WILLEMS, S. M., ZECCHIN, D., HOBOR, S., BAJPE, P. K., LIEFTINK, C., MATEUS, C., VAGNER, S., GRERNRUM, W., HOFLAND, I., SCHLICHER, A., WESSELS, L. F., BEIJERSBERGEN, R. L., BARDELLI, A., DI NICOLANTONIO, F., EGGERMONT, A. M. & BERNARDS, R. 2014. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature*, 508, 118-22.

SUN, X., LI, J., SUN, Y., ZHANG, Y., DONG, L., SHEN, C., YANG, L., YANG, M., LI, Y., SHEN, G., TU, Y. & TAO, J. 2016. miR-7 reverses the resistance to BRAFi in melanoma by targeting EGFR/IGF-1R/CRAF and inhibiting the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways. *Oncotarget*.

SUN, Y. M., LIN, K. Y. & CHEN, Y. Q. 2013. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol*, 6, 6.

URA, H., OBARA, T., NISHINO, N., TANNO, S., OKAMURA, K. & NAMIKI, M. 1994. Cytotoxicity of simvastatin to pancreatic adenocarcinoma cells containing mutant ras gene. *Jpn J Cancer Res*, 85, 633-8.

VERGANI, E., DI GUARDO, L., DUGO, M., RIGOLETTO, S., TRAGNI, G., RUGGERI, R., PERRONE, F., TAMBORINI, E., GLOGHINI, A., ARIENTI, F., VERGANI, B., DEHO, P., DE CECCO, L., VALLACCHI, V., FRATI, P., SHAHAJ, E., VILLA, A., SANTINAMI, M., DE BRAUD, F., RIVOLTINI, L. & RODOLFO, M. 2016. Overcoming melanoma resistance to vemurafenib by targeting CCL2-induced miR-34a, miR-100 and miR-125b. *Oncotarget*, 7, 4428-41.

VILLANUEVA, J., VULTUR, A., LEE, J. T., SOMASUNDARAM, R., FUKUNAGA-KALABIS, M., CIPOLLA, A. K., WUBBENHORST, B., XU, X., GIMOTTY, P. A., KEE, D., SANTIAGO-WALKER, A. E., LETRERO, R., D'ANDREA, K., PUSHPARAJAN, A., HAYDEN, J. E., BROWN, K. D., LAQUERRE, S., MCARTHUR, G. A., SOSMAN, J. A., NATHANSON, K. L. & HERLYN, M. 2010. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell*, 18, 683-95.

WESTPHAL, D., KLUCK, R. M. & DEWSON, G. 2014. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ*, 21, 196-205.

WHITTAKER, S. R., THEURILLAT, J. P., VAN ALLEN, E., WAGLE, N., HSIAO, J., COWLEY, G. S., SCHADENDORF, D., ROOT, D. E. & GARRAWAY, L. A. 2013. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov*, 3, 350-62.

XU, N., ZHANG, L., MEISGEN, F., HARADA, M., HEILBORN, J., HOMEY, B., GRANDER, D., STAHL, M., SONKOLY, E. & PIVARCSI, A. 2012. MicroRNA-125b down-regulates matrix metalloproteinase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion. *J Biol Chem*, 287, 29899-908.

YE, Y., LI, Q., HU, W. L., TSENG, H. Y., JIN, L., ZHANG, X. D., ZHANG, L. J. & YANG, S. 2013. Loss of PI(4,5)P2 5-Phosphatase A Contributes to Resistance of Human Melanoma Cells to RAF/MEK Inhibitors. *Transl Oncol*, 6, 470-81.

ZHOU, M., LIU, Z., ZHAO, Y., DING, Y., LIU, H., XI, Y., XIONG, W., LI, G., LU, J., FODSTAD, O., RIKER, A. I. & TAN, M. 2010. MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *J Biol Chem*, 285, 21496-507.

## Figure legends:

### Fig. 1: Increased *miR-125a* levels in BRAFi resistant melanoma cells and human tissues

**A.** Western Blot of pERK (Thr202/Tyr204) and ERK in parental SK-MEL-239 cells (par), parental cells treated with 2 $\mu$ M Vemurafenib for 24h and five resistant clones kept on 1 $\mu$ M Vemurafenib (representative of n=3). **B.** IC50 curves of SK-MEL-239 cells and five resistant clones using increasing amounts of Vemurafenib (0.001 $\mu$ M-100 $\mu$ M) (representative of n=3) **C.** Average *miR-125a-5p*, *miR-125b* and *miR125a-3p* measurements (normalized to untreated SK-MEL-239 cells (par)), as detected by the nCounter NanoString platform, of parental SK-MEL-239 cells treated with Vemurafenib (n = 2) or resistant clones (n = 5 independent clones). Error bars represent standard deviation of biological replicates. Statistical analysis performed by Student's T test. **D.** Fold change of *miR-125a-5p* expression (by RT-qPCR) in a panel of additional SK-MEL-239-derived resistant clones (n = 16) compared to untreated parental SK-MEL-239 cells. Error bars represent standard deviation of technical replicates. **E.** Fold change of *miR-125a-5p* (by RT-qPCR) in 22 human melanoma tissue samples post-Vemurafenib treatment compared to their respective paired pre-treated sample (dotted line).

### Fig. 2: Ectopic expression of *miR-125a* confers resistance to SK-MEL-239 cells through evasion of apoptosis

**A.** Viability of scrambled- (Hscr) or *miR-125-* (H125a) transduced SK-MEL-239 cells using increasing Vemurafenib concentrations measured after 4 days of drug treatment. **B.** Long term growth of Hscr or H125a SK-MEL-239 cells treated with DMSO or 2 $\mu$ M Vemurafenib for 4 weeks (left panel). Optical density of crystal violet staining after 4 weeks of Vemurafenib treatment (right panel). **C.** Western Blots for pERK (Thr202/Tyr204), ERK, pAKT (Ser473) and AKT of protein extracts from Hscr and H125a SK-MEL-239 cells treated with DMSO or 2 $\mu$ M Vemurafenib (week1-4). **D.** Apoptotic cells detected through FACS analysis of AnnexinV/PI staining after one week of DMSO or 2 $\mu$ M Vemurafenib treatment of Hscr and H125a SK-MEL-239 cells. **E.** Western Blot of cleaved PARP in Hscr and H125a SK-MEL-239 cells after one week of DMSO or 2 $\mu$ M Vemurafenib treatment. The results in **A** are an average of three independent experiments, **B-E** are representative of three independent experiments  $\pm$  standard deviation (SD). \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.0001, \*\*\*\*P<0.00001.

**Fig. 3: Inhibition of *miR-125a* suppresses emergence of resistance and partially restores BRAFi sensitivity of some resistant clones**

**A.** Number of colonies formed by SK-MEL-239 cells transduced with Zip scr and Zip 125a constructs and treated with 2 $\mu$ M Vemurafenib for 6 weeks (average of quintuplicates). **B.** Viability curves of resistant clones transduced with Zip scr and Zip 125a and treated with increasing Vemurafenib concentrations (0.001 $\mu$ M-100 $\mu$ M) for 4 days (left panel). Tables indicate IC<sub>50</sub> value and area under the curve (AUC). Photo inserts of crystal violet staining of Zip scr (upper circle) or Zip 125a (lower circle) transduced resistant clones after 8 days (clone 4) or 10 days (clone 3) of treatment with 2 $\mu$ M Vemurafenib. Apoptosis detected through FACS analysis of AnnexinV/PI staining after 8 days (clone 4) or 10 days (clone 3) in Zip scr and Zip 125a resistant clones treated with DMSO or 2 $\mu$ M Vemurafenib (right panel). **C.** Viability curves of resistant clones transduced with Zip scr and Zip 125a and treated with increasing Vemurafenib concentrations for 4 days. **D.** Tumor growth curves mock- (DMSO) or vemurafenib-treated (vem) BRAFi-resistant SK-MEL-239 clone transduced with Zip scr or Zip 125a. For every assay in **A-C**, a representative experiment of a triplicate is shown along with SD. AUC: area under the curve, clone3: p $\leq$ 0.05, clone 4, 1, 2: n.s. \*P $\leq$ 0.05, \*\*P $<$ 0.001.

**Fig. 4: Downstream targets and upstream regulators of *miR-125a***

**A.** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of deregulated genes (upper graph) and DAVID pathway analysis of downregulated genes (lower graph) based on RNA sequencing data of Hscr or H125a SK-MEL-239 cells treated with 2 $\mu$ M Vemurafenib for 1 week. **B.** Heatmap of apoptosis-related genes in Hscr and H125a cells treated with DMSO or 2 $\mu$ M Vemurafenib. In bold are predicted targets of *miR-125a*. **C.** Western Blot of predicted *miR-125a* apoptotic targets in Hscr and H125a cells treated with DMSO or 2 $\mu$ M Vemurafenib for one week. Results are representative of three independent experiments. Loading control (Tubulin) is shown for each blot performed (below experimental protein(s)) **D.** Luciferase activity of 293T cells transfected with 3'UTR luciferase construct of BAK1 and MLK3 and miR-scr, *miR-125a* or miR-182 mimic. Results show the average of three independent experiments  $\pm$  SD. \*P $<$ 0.05, \*\*\*P $<$ 0.0001. **E.** Western Blot of BAK1 and MLK3 in a resistant clone transduced with Zip scr or Zip 125a and treated with Vemurafenib for one week. Results are representative of three independent experiments. **F.** Viability curves of a resistant clone transduced with Zip scr or Zip 125a and transfected with 100nM siBAK1 or siMLK3 for 4 days and treated with increasing Vemurafenib concentrations. IC<sub>50</sub> and AUC values are indicated for each condition (0.001 $\mu$ M-100 $\mu$ M). **G.** Heatmap of transcription factors that show positive correlation with *miR-125a* expression in melanoma cell lines, based on gene

expression profiling (GSE22306). **H.** *MiR-125a* levels in SK-MEL-239 cells treated with 5ng/ml recombinant TGF $\beta$ 1. **I.** *SNAI1* mRNA (left panel) and *miR-125a* levels (right panel) in SK-MEL-239 cells treated with 2 $\mu$ M Vemurafenib with or without indicated concentrations of Galunisertib, a TGF $\beta$  I receptor inhibitor, for indicated times compared to untreated parental cells (dashed line). The results in **D** are an average of three independent experiments, **F**, **H-I** are representative of three independent experiments  $\pm$  SD. \*P<0.05, \*\*\*P<0.0001.

Figure 1

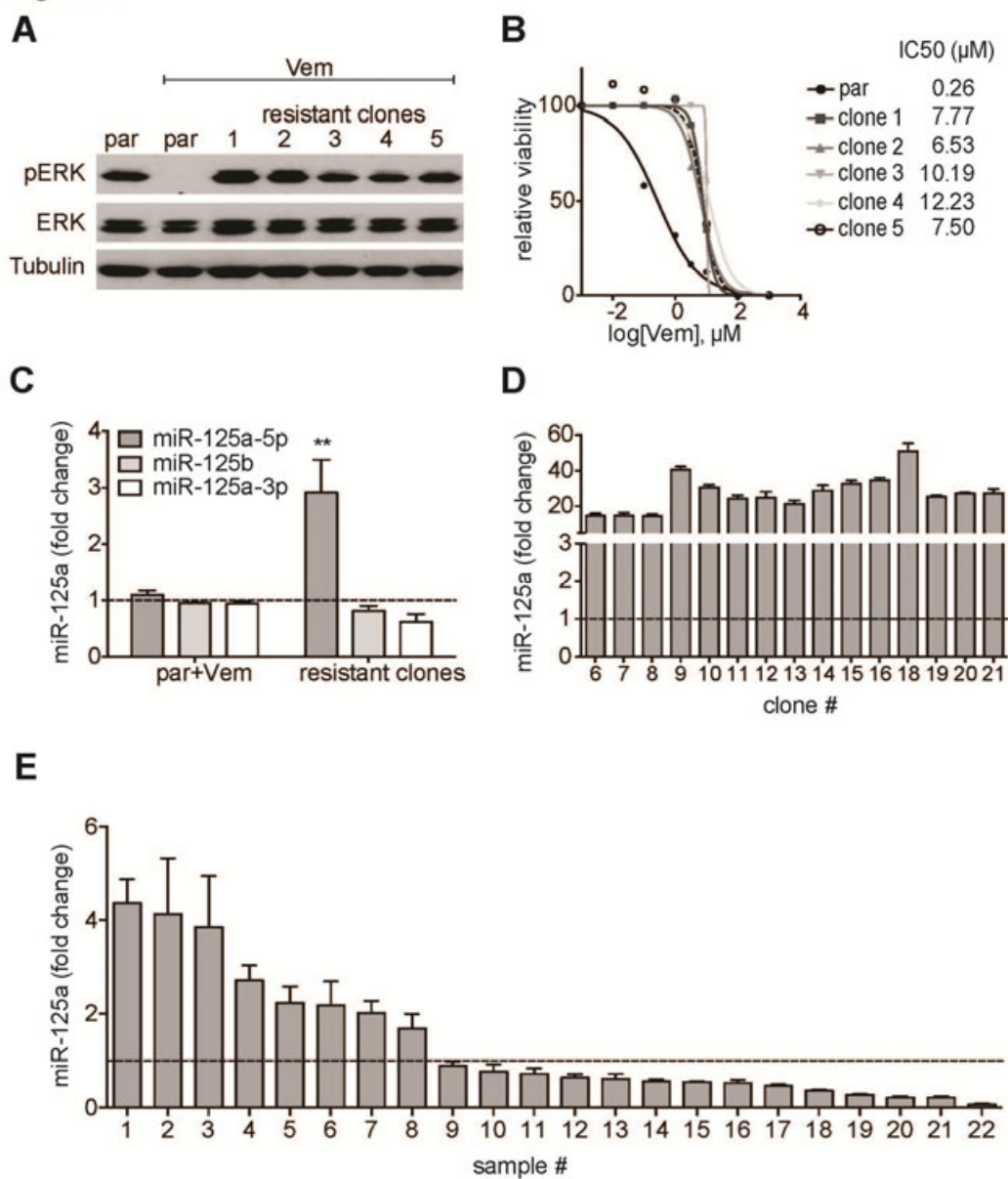
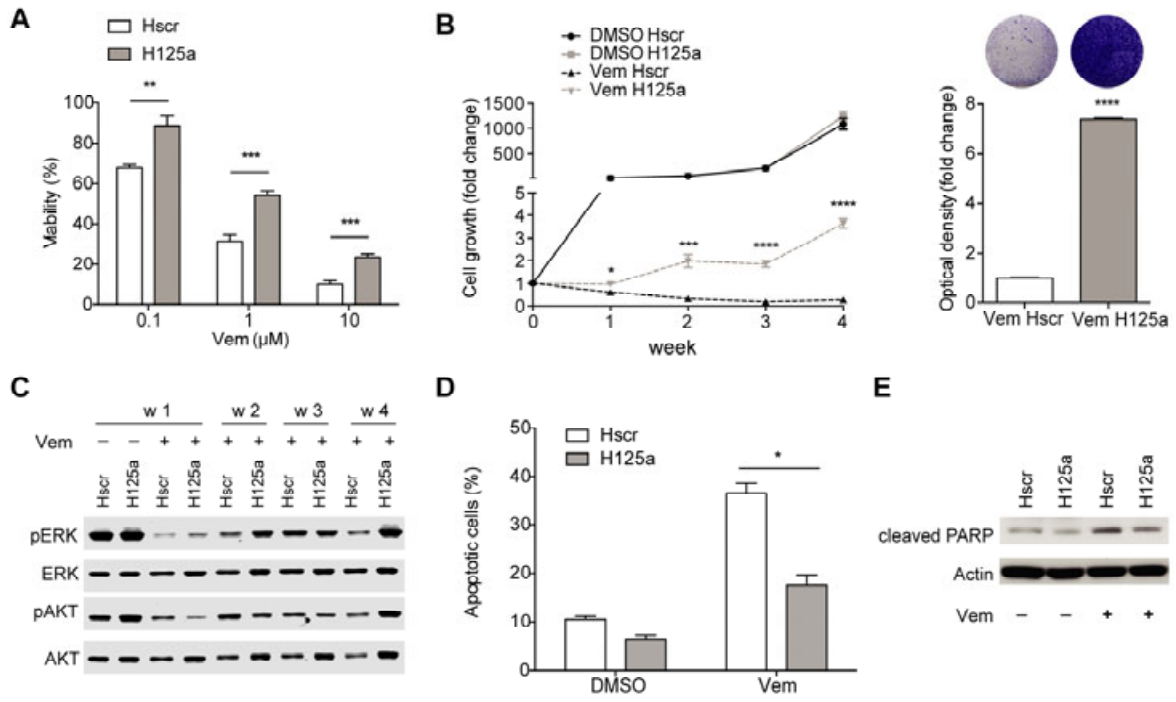


Figure 2



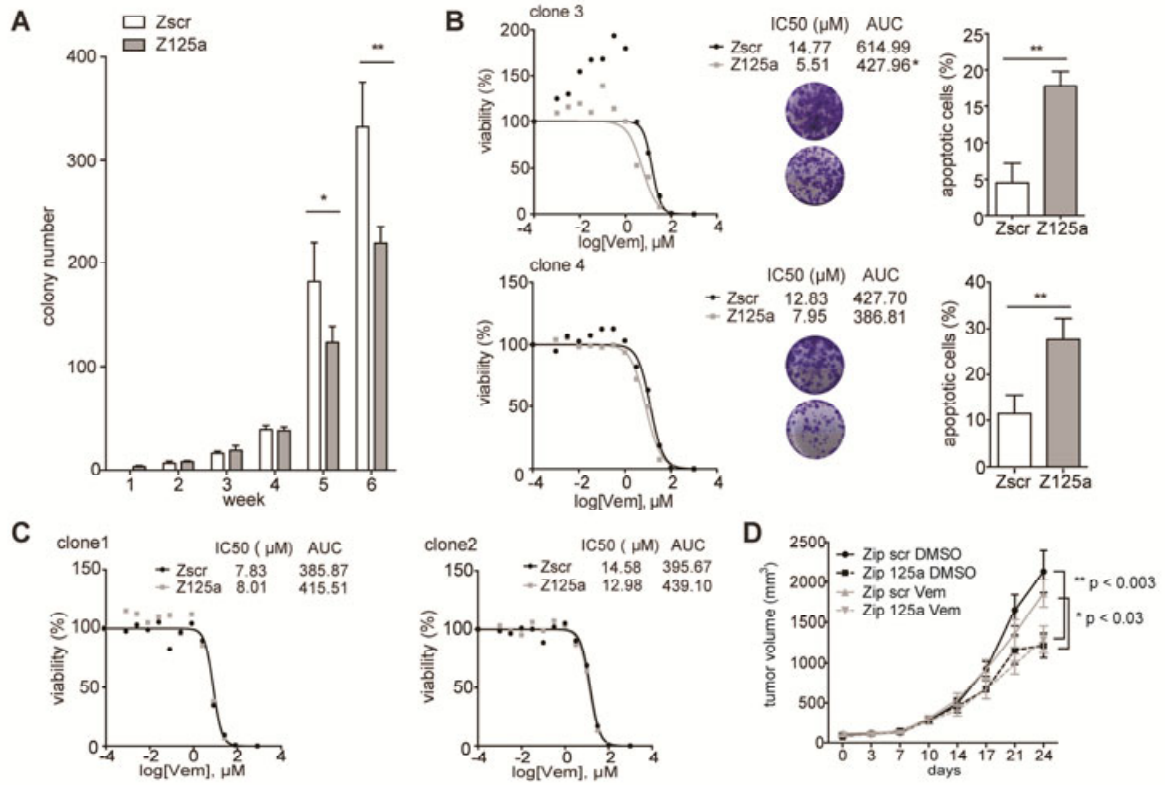


Figure 4

