

# EL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS COMO DIANA TERAPÉUTICA EN EL CÁNCER DE PIEL TIPO MELANOMA

*FATTY ACIDS METABOLISM AS A THERAPEUTIC  
TARGET OF MELANOMA SKIN CANCER*

**MARTA REDONDO MUÑOZ**

**Tesis Doctoral**

Director: Imanol Arozarena Martinicorena

Co-Director: Florencio Marzo Pérez

Pamplona, 2023

upna

Universidad Pública de Navarra  
Nafarroako Unibertsitate Publikoa





***A mis padres***



---

**- ¿Cuánto tiempo es para siempre?  
- A veces, sólo un segundo.**

**Lewis Carrol  
Alicia en el país de las maravillas**



# ***AGRADECIMIENTOS***





Todavía no me creo que tras todos estos años en Navarrabiomed haya llegado el momento de escribir estas líneas. Se dice que cuando algo pasa muy rápido es porque estás a gusto, porque lo estás disfrutando y, la verdad, así ha sido. Aunque hacer una tesis a veces resulta difícil, jamás me arrepentiré de haberme adentrado en esta “aventura” porque la gran mayoría de las cosas con las que me quedo son positivas. Me gustaría ser más original y no decir la mítica frase de “es una etapa que te hace crecer no solo como científica sino también como persona” pero claramente es así. De todas formas, nada de esto hubiese sido tan maravilloso sin la gente con la que me he rodeado, tanto fuera como dentro del labo.

La primera persona a la que le tengo que agradecer infinidad de cosas es Imanol. En primer lugar, gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo. Entré a Navarrabiomed con un contrato de 11 meses y, si no es por ti, esta tesis no hubiese podido hacerse. Te agradezco enormemente tu preocupación porque no me faltase financiación hasta conseguir la beca, siempre te has dejado la piel por mantener a tu equipo. Gracias por confiar siempre en mí, por apoyarme y animarme cuando algún experimento no salía bien o no era del todo “mono” ;). Gracias por enseñarme a ser científica. Contigo he aprendido he aprendido todo a nivel experimental, a ser más crítica y también a asumir que *data is data* ;). Gracias por ser el cerebro de mi artículo y de mi tesis, ha sido un proceso duro pero muy muy gratificante para los dos. También estoy muy agradecida por tu apoyo a nivel personal, por tu preocupación y tus palabras de ánimo cada vez que lo he necesitado (incluso cuando creía que no se me notaba, pero ya me tenías muy calada...☺). Siempre me has ofrecido tu ayuda con la discreción de no entrometerte demasiado en temas personales, pero dejándome claro que si te necesitaba, estabas ahí, y es algo que desde aquí te quiero agradecer. Y como todo no han sido dramas, también quiero recordar los buenos ratos en las comidas de empresa, las del labo, esos gin tonics bien puestos y todas las risas que nos hemos echado aunque fueran a costa de unos cuantos vaciles... ;) gracias por todo!!

Por supuesto, siempre estaré infinitamente agradecida con mis chicas de Señalización. Esta experiencia ha sido maravillosa en gran parte gracias a vosotras. Paula, siempre dispuesta a ayudar y a dar los mejores consejos... No he conocido persona más metódica y organizada que tú, eres un claro ejemplo de lo que es trabajar bien en un laboratorio,

he aprendido mucho de ti. Aparte de eso, eres una persona súper generosa, atenta y admiro cómo encuentras siempre una solución para todo, da gusto tenerte al lado. Siempre recordaré esos buenos ratos de charleta, las juergas, el congreso en Santiago mano a mano tomando “caldito” y tus bailes de taburete pandémicos con un buen akelarre!! ;)

Irene, mi compi de batalla... gracias por haber estado siempre ahí escuchándome, por tus consejos y tu forma de hacerme ver más claras las cosas cuando solo veía un amasijo de dudas. Ha sido un lujo compartir contigo esta etapa predoc y enfrentarnos juntas a todo lo que se nos ponía por delante. Como siempre decíamos, hemos hecho dos tesis: una científica y otra personal ;). Gracias por todas esas horas de charla en las que nos hemos apoyado la una a la otra, por hacer más amenas las horas de poyata o de cultivos, por todas las risas, por nuestras conversaciones sobre cremitas y maquillaje y por los caminos solucionando el mundo bajando a venta Andrés ;)... Mil gracias!!

Raquel, pese a que hayas entrado hace poquito, espero que disfrutes de formar parte del labo de Señalización, no es fácil encontrar grupos de trabajo como este. Estoy segura que te va a ir muy bien!

Y por último, mi Anita. Tu ayuda en el labo ha sido crucial, me has apoyado muchísimo cuando la carga de trabajo me desbordaba y siempre te lo agradeceré (con after eight que sé que es lo que más te gusta... 😊). Y aunque lo anterior es muy importante, lo que realmente tengo que agradecerte es en términos personales. Como siempre te he dicho, no sé qué hubiera hecho sin ti, porque me salvaste a nivel personal. Llegaste en un momento bastante complicado para mí y gracias a eso y por ser como eres, mi vida en Pamplona cambió... desde entonces soy mucho más feliz (corazones, corazones, corazones, XD). Eres una persona maravillosa, graciosa como tú sola con ese arte que te caracteriza, generosa y sobre todo buena persona y amiga. Me has apoyado absolutamente en todo lo que he necesitado y siempre has estado ahí en las buenas y en las no tan buenas, que es realmente cuando valoras a quien tienes alrededor. Nunca te voy a olvidar y ya sabes que aquí tienes a una navarrica para siempre.

También me gustaría agradecerle a Claudia el trabajazo inmenso que ha hecho en este proyecto y en el artículo. Te agradezco cada detalle que sé que has tenido que hacer en

las gráficas de la revisión y la de horas y horas que hay detrás. Eres una referencia como científica y admiro enormemente el cariño y la pasión con la que trabajas.

Siguiendo con el artículo, me gustaría agradecer a Salva, Berta y especialmente a Javi por toda su dedicación e implicación. Desde el primer día que os propusimos esta historia, la recibisteis con todas las ganas y os habéis esforzado muchísimo. Sin vosotros, y aprovecho para incluir aquí al resto de las personas que también han colaborado, ni el artículo ni esta tesis hubiese sido posible. Muchas gracias!!

Siguiendo por Nabarrabiomed, gracias a nuestro vecino de labo, Iñaki, por tus chistes malísimos que nos han hecho reír tanto y amenizar unos cuantos ratitos. Gracias a las Proteos, sois un amor de chicas y siempre estáis dispuestas a ayudar (y a prestarnos anticuerpos... XD). Gracias al grupo de Patogénesis microbiana, Cristalografía, Inmunomodulación, OncoTraslacional, Oncohemato, Biobanco, Cardiología y Neuroepigénética. Tod@s habéis formado parte de esto y una simple sonrisa por los pasillos, saludo o mini conversación sobre qué tal nos iba han sido siempre un soplo de aire fresco.

No me puedo olvidar de Maribel. Siempre sonriente, dicharachera y de buen humor. Admiro lo profesional que eres, tu fortaleza y que siempre tengas buenas palabras para tod@s. Espero que algún día me chives cómo haces para recordar todos los nombres y cumpleaños... ;) Eres un pilar fundamental en NB y el nexo común entre todos los grupos.

Aquí tampoco me puede faltar la Mari!! Haces por nosotras mucho más de lo que crees. Gracias por las risas que nos hemos echado con tus historietas, con los cotilleos y por abrirte conmigo como lo has hecho. Encontrarte por el pasillo me ha hecho desconectar por un rato de aquél experimento que me ha torcido el día o de cualquier problema que me rondara por la cabeza. Desde fuera pareces una mujer dura, pero tienes un fondo muy bonito y un corazón muy grande.

Continúo con mi gente de los cafés, sois la mejor compañía que se puede tener para hacer ese break. Ibone, eres un amor de chica, súper sensata y dulce. Fabri, gracias por las risas y contagiarnos tu positividad, eres de las personas más generosas que conozco, atento siempre al mínimo detalle. Saioa, gracias por esas conversaciones en las que me has hecho reflexionar por cosas que quizás una no se para a pensar. Eres una tía súper

auténtica y con una personalidad que admiro. Intentaré seguir aprendiendo una palabra de euskera a la semana... ;) Leti, la persona más dulce de Navarrabiomed, gracias por decirme siempre cosas tan bonitas, por hacer que me las crea, por tener una sonrisa permanente y por transmitirme tanta paz. Y junto a ellos, también me gustaría nombrar a los que ya no están en NB pero siguen siendo fieles a las quedadas y partidos de pelota, Olast, Mikel y Arkaitz. Sois unos tíos encantadores, salir con vosotros es buen rollo asegurado y muchas risas.

Saliendo de las paredes de NB, me gustaría agradecer el apoyo que siempre he tenido por parte de mis tesoros de la uni, Julia y Mikaela. Sois el ejemplo más claro que tengo de amistad verdadera. No tengo la suerte de veros a diario, pero aunque pasen los años siempre habéis estado ahí y sin que nada cambie entre nosotras. Os quiero mucho chicas!!!

De la uni paso al máster con mis chicos David y Darío. Ya han pasado 6 años desde que nos conocimos y es increíble cómo se puede mantener la amistad con personas con las que sólo has compartido menos de un año de tu vida. Sois lo mejor que me llevo de Barcelona.

Si hablo de amistad tengo que volver a nombrar a mi Anita pero también a mi paya. Paz, sé que estas harta de que hablemos de la edad pero eres la única persona que conozco con la que no noto esa diferencia de años. Eres una tía increíble, inteligente y con un corazón enorme. Me siento muy afortunada por haberte conocido y porque formes parte de mi círculo personal. Como le he dicho antes a tu vecina de Sevilla, aquí tienes a una navarrica para siempre. También tengo que nombrar en este párrafo a Pablito, mi mallorquín favorito. Gracias por ser tan generoso, por tener siempre ese buen rollo, por invitarnos a tu isla y por todos los momentos que hemos vivido y que espero que sigamos sumando. Os quiero mucho *Team de los viernes!*

Me gustaría seguir agradeciendo por estar siempre ahí como hermano mayor a mi tato, Asier. Gracias por protegerme desde pequeña, sé que aunque lo haces a tu manera siempre has estado ahí y siempre lo vas a estar. Gracias por interesarte cada vez que nos vemos por “mis células”, por la tesis y por cuando publico el artículo. Gracias también por ofrecerme a la mejor cuñada del mundo. Ainhoa, para mí eres como una hermana. Siempre con una sonrisa dispuesta a ayudarme en todo lo que está en tu mano, eres

pura vitalidad. Gracias a los dos por acogerme en vuestra casa los primeros meses cuando empecé con esta aventura. Y por supuesto, gracias por darme a una de las mejores cosas que tengo en mi vida, mi brujita Ariana. No sé cómo una personita tan pequeña puede dar tanta alegría y hacer que se te olviden todos los problemas. Ir a verte fue muchos días una vía de escape para hacer que un día gris terminase lleno de color, como los arcoíris que tanto te gusta pintar. Os quiero mucho!!

Gracias a mi abuela Ángeles, por todo tu amor durante toda mi vida, el cariño de una abuela es especial. Gracias por intentar entender qué es lo que hago en el trabajo, por estar siempre atenta y por tu inmensa generosidad. Sé que no va contigo verbalizar el cariño que nos tienes pero no te hace falta porque lo demuestras día a día. Me gustaría también mirar hacia arriba y mandar un beso enorme a mi abuelo Pedro, a mi abuela Pilar y a mi abuelo Guillermo, sé que allí donde estéis os sentís muy orgullosos de mí.

Agradezco también el cariño que recibo siempre de mis tíos, tías, primos y primas. Sois una parte fundamental de mi vida, gracias por todo.

Aunque te conozco de hace relativamente poco, eres el que más me ha aguantado en este proceso final, Iñaki. Gracias por darme tanto en tan poco tiempo, por alegrarte por cada mínima cosa que consigo, por todo el cariño, por animarme cuando he flojeado durante este proceso, por valorarme y por ser como eres. Apareciste cuando por fin conseguí pisar suelo firme después de un largo tramo de arenas movedizas, como si la vida tuviese un regalo preparado para mí y no me puedo sentir más afortunada y feliz. Mil gracias por todo, te quiero!!

Para terminar, gracias a mis pilares maestros, mis padres. Gracias por darme una educación impoluta, por permitirme estudiar lo que he querido y donde he querido con lo que eso suponía. Gracias por apoyarme siempre en cada decisión que he tomado y por cogerme de la mano cuando ha habido consecuencias, habéis sido mi apoyo incondicional. Sois las únicas personas que realmente han sufrido a mi lado cuando las cosas se me torcieron un poco y estaré eternamente agradecida por ello, también os pido perdón porque sé que lo habéis pasado mal. No tengo vida suficiente para agradecer todo lo que habéis hecho y hacéis por mí. Gracias infinitas, os quiero mucho!!



---

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por:

- Departamento de Universidad, Innovación y Transformación Digital del Gobierno de Navarra mediante la “Ayuda para la contratación de doctorandos y doctorandas por empresas, centros de investigación y centros tecnológicos: Doctorados industriales 2020”.





# ***ABSTRACT/RESUMEN***



Cutaneous melanoma is the most lethal skin cancer, but the availability of novel targeted therapies for patients with BRAF mutations and immunotherapies based on immune checkpoint inhibitors has significantly improved its clinical outcome. Nevertheless, the effectiveness of these treatments is challenged by limitations in sustained responses and relapse due to the development of drug resistance.

Resistance of melanoma to targeted therapy and immunotherapy is linked to metabolic rewiring. Here, we show that increased fatty acid oxidation (FAO) during prolonged BRAF inhibitor (BRAFi) treatment contributes to acquired therapy resistance in mice. Targeting FAO using the FDA and EMA-approved anti-anginal drug ranolazine delays tumor recurrence with acquired BRAFi resistance.

Single-cell RNAseq analysis reveals that ranolazine diminishes the abundance of the therapy resistant NGFR<sup>high</sup> neural crest stem cell subpopulation. Moreover, by rewiring the methionine salvage pathway, ranolazine enhances melanoma immunogenicity through increased antigen presentation and interferon signalling. Combination of ranolazine with anti-PD-L1 antibodies strongly improves survival by increasing anti-tumour immune responses.

Altogether, we show that ranolazine increases the efficacy of targeted melanoma therapy through its effects on FAO and the methionine salvage pathway. Importantly, our study suggests that ranolazine could sensitize BRAFi-resistant tumours to immunotherapy. Since ranolazine has very mild side effects, it might constitute a therapeutic option to improve the two main strategies currently used to treat metastatic melanoma.



El melanoma cutáneo es el tipo de cáncer de piel más letal pero la disponibilidad de nuevas terapias dirigidas para los pacientes con mutaciones en el oncogén BRAF y las inmunoterapias basadas en los inhibidores de los *checkpoints* inmunes, han mejorado significativamente las respuestas clínicas. No obstante, la efectividad de estos tratamientos está comprometida debido a que las respuestas no son duraderas y a las recaídas debidas a la adquisición de resistencia los tratamientos.

La resistencia del melanoma a las terapias dirigidas e inmunoterapias está asociada con la reprogramación metabólica. En este trabajo, mostramos como un aumento en la oxidación de ácidos grasos (FAO) durante el tratamiento prolongado con BRAFi en ratones, contribuye a la adquisición de resistencia a la terapia. La inhibición de la FAO mediante el fármaco Ranolazina, aprobado por la FDA y la EMA para tratar la angina de pecho, retrasa la progresión de tumores resistentes a BRAFi.

El análisis por *Single-cell RNAseq* revela que la Ranolazina disminuye la abundancia de la subpoblación de células madre de la cresta neural resistente a terapias por una alta expresión de NGFR. Además, mediante la reprogramación de la ruta de recuperación de la metionina, la Ranolazina aumenta la inmunogenicidad del melanoma a través del aumento en la presentación de antígenos y una mayor señalización de las rutas del interferón. Por esto, combinar Ranolazina con anticuerpos anti-PD-L1 mejora considerablemente la supervivencia mediante un aumento de la respuesta inmunitaria anti-tumoral.

En conjunto, este trabajo muestra que la Ranolazina aumenta la eficacia de las terapias dirigidas en melanoma por su impacto en la FAO y la ruta de recuperación de la metionina. Además, sugiere que la Ranolazina hace que los tumores resistentes a BRAFi sean más sensibles a las inmunoterapias. Por todo ello, ya que la Ranolazina presenta efectos adversos muy leves, podría establecerse una opción terapéutica que mejoraría las dos estrategias principales utilizadas a día de hoy para el tratamiento del melanoma metastásico.



# ***ÍNDICE***





AGRADECIMIENTOS .....	7
ABSTRACT/RESUMEN.....	17
ÍNDICE .....	23
ABREVIATURAS .....	29
INTRODUCCIÓN .....	37
1. CÁNCER DE PIEL .....	39
1.1. MELANOMA.....	40
1.1.1. TIPOS DE MELANOMA.....	41
1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL MELANOMA CUTÁNEO .....	43
1.1.3. FACTORES DE RIESGO.....	44
1.1.4. PROGRESIÓN DEL MELANOMA.....	48
1.1.5. ESTADIAJE Y ESTRATIFICACIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO .....	50
1.1.6. GENÉTICA DEL MELANOMA CUTÁNEO .....	52
1.1.7. SEÑALIZACIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO .....	53
1.1.8. TRATAMIENTO DEL MELANOMA CUTÁNEO.....	57
1.1.8.1. Terapias Dirigidas.....	58
Inhibidores de BRAF (BRAFi).....	59
Resistencia a inhibidores de BRAF .....	60
Terapia combinada de Inhibidores de BRAF y MEK .....	63
Tolerancia farmacológica y resistencia adquirida.....	65
1.1.8.2. Inmunoterapia .....	67
Mecanismos de resistencia a inmunoterapias.....	71
1.1.9. PLASTICIDAD FENOTÍPICA DEL MELANOMA .....	73
2. METABOLISMO Y MELANOMA .....	79
2.1. GLUCÓLISIS Y CICLO TCA .....	80
2.2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS.....	83
OBJETIVOS .....	89
MATERIALES Y MÉTODOS.....	93
1. CULTIVO CELULAR .....	95
1.1. LINEAS CELULARES.....	95
1.2. ENSAYO DE FORMACION DE COLONIAS CONVENCIONAL .....	96
1.3. ENSAYO DE FORMACION DE COLONIAS CON RESISTENCIA ADQUIRIDA A MAPKí..	97
2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA .....	98
2.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL .....	98

2.2.	RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) .....	99
2.3.	PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR) .....	100
2.4.	ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO: <i>SINGLE CELL RNAseq</i> .....	102
2.4.1.	Análisis scRNAseq de A375 .....	103
2.4.2.	Análisis scRNAseq del estroma inmune tumoral .....	105
3.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS .....	107
3.1.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	107
3.2.	WESTERN BLOT .....	108
3.3.	INMUNOFLUORESCENCIA .....	109
3.4.	CITOMETRÍA DE FLUJO .....	111
4.	ANÁLISIS METABOLICOS .....	111
4.1.	ANÁLISIS DEL FLUJO METABOLICO .....	111
4.2.	ANÁLISIS DE METABOLÓMICA Y LIPIDÓMICA .....	113
4.2.1.	Preparación de las muestras .....	114
4.2.2.	Análisis de Datos .....	114
4.3.	ANÁLISIS DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS) .....	115
4.4.	ANÁLISIS DEL CONSUMO DE GLUCOSA CELULAR .....	116
5.	EXPERIMENTOS IN VIVO .....	117
5.1.	EXPERIMENTO IN VIVO CON A375 Y TERAPIAS DIRIGIDAS (BRAFi) .....	118
5.2.	EXPERIMENTO IN VIVO CON CÉLULAS 5555 E INMUNOTERAPIAS .....	119
6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	120
RESULTADOS .....		121
1.	Validación del modelo in vitro de adquisición de resistencia a BRAFi en células de melanoma con BRAF <sup>V600E</sup> .....	123
2.	La FAO es relevante durante la adquisición de resistencia a BRAFi .....	126
3.	Análisis lipidómico de las células A375VR .....	130
4.	Análisis metabólico de las células A375VR .....	133
5.	Relevancia de la FAO en tumores de melanoma y ensayos in vivo .....	138
6.	Análisis Single-Cell RNAseq (scRNAseq): estados transcripcionales de melanoma en las células A375, A375VR y A375 VR_RANO .....	147
7.	Análisis Single-Cell RNAseq (scRNAseq): efecto de la Ranolazina en la resistencia adquirida a BRAFi .....	155
8.	Estudio de la modulación de la Ranolazina sobre el metabolismo de la metionina .....	159
9.	Efecto de la Ranolazina con independencia del BRAFi en las células de melanoma BRAF <sup>V600E</sup> .....	166
10.	Efecto de la Ranolazina en el microambiente tumoral .....	171
DISCUSIÓN .....		177

CONCLUSIONES.....	191
BIBLIOGRAFÍA .....	195
PUBLICACIONES .....	221



# ***ABREVIATURAS***



**2DG:** 2-deoxiglucosa

**2DG6P:** 2-Deoxiglucosa-6-fosfato

---

**A**

---

**A:** Antimicina A

**ABCDs:** Transportador de casete de unión a ATP, clase D

**ACAD:** Acil-CoA Dehidrogenasa

**ACOXs:** Acil-coenzima A oxidasa

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**AJCC:** American Joint Committee on Cancer. Comité Americano del Cáncer.

**AKT:** Proteína quinasa B (PKB)

**AMPK:** Proteína quinasa activada por AMP

**AP-1:** Proteína Activadora 1

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ARNr:** ARN ribosómico

**ATCC:** American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)

**ATF4:** Factor de Transcripción Activador 4

**ATP:** Adenosín Trifosfato

---

**B**

---

**β2M:** beta 2-microglobulina

**BCA:** Ácido bicinconínico

**BRAF:** v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (homólogo B del oncogén viral v-Raf de sarcoma murino)

**BRAFi:** Inhibidores de BRAF

**BRAF<sup>V600E</sup>:** Gen BRAF con mutación V600E, sustitución de Valina por Ácido glutámico en posición 600

**BSA:** Bovine Serum Albumin. Albúmina de Suero Bovino

**BTLA:** Atenuador de Linfocitos B y T

---

**C**

---

**CDK4:** Quinasa 4 dependiente de ciclina

**CDKN2A:** Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A. Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina

**ChE:** Éster de colesterol

**CK:** Ciclo de Krebs

**CPT1:** Carnitina Palmitoiltransferasa 1

**CPT2:** Carnitina Palmitoiltransferasa 2

**CSD:** Chronically Sun Damaged. Daño solar crónico

**CTLA-4:** Antígeno-4 Asociado a Linfocitos T Citotóxico

**CV:** Cristal Violeta

**CXCL2:** Quimiocina Ligando 2

**CXCR2:** Receptor 2 de quimiocina CXC

---

**D**

---

**DCA:** Dicloroacetato

**DCF:** 2',7'-diclorofluoresceína

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**DG:** Diglicéridos

**DMEM:** Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

**DUSP6:** Fosfatasa dual específica 6

---

**E**

---

**ECAR:** Extracellular Acidification Rate (Ratio de Acidificación Extracelular)

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic Acid (Acido Etileno Diamino Tetracético)

**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico)

**EMA:** Agencia Europea de Medicamentos

**ERK:** Extracellular-signal-Regulated Kinases. Quinasas reguladas por señal extracelular

**ETO:** Etomoxir

**ETC:** Cadena Transportadora de Electrones

---

**F**

---

**FADH<sub>2</sub>:** Flavin Adenin Dinucleótido

**FAK:** Quinasa de Adhesión Focal

**FAMMM:** Familiar, atypical multiple mole melanoma syndrome (Síndrome de Melanoma Familiar con Lunares Atípicos Múltiples)

**FAO:** Oxidación de Ácidos Grasos

**FAs:** Fatty Acids. Ácidos grasos

**FAS:** Síntesis de Ácidos grasos

**FASN:** Fatty Acid Synthase. Ácido Graso Sintasa

**FCCP:** carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona

**FcR:** Receptor Fc

**FDA:** Food and Drug Administration. Administración de Alimentos y Medicamentos.

---

**G**

---

**G6PDH:** Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

**GAPDH:** Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

**GFP:** Proteína Verde Fluorescente

**Gluc:** Glucosa

**GO:** Gene Ontology (Ontología Génica)

**GRO:** Growth-Regulated Oncogene. Oncogén regulado por crecimiento.

---

**H**

---

**Hex2Cer:** Hexosil-2-ceramidas

**HGF:** Factor de Crecimiento Hepático

**HIF1 $\alpha$ :** Subunidad alfa del Factor 1 Inducible por Hipoxia

**HRP:** Horseradish Peroxidase-labeled Antibodies. Anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano

---

**I**

---

**IARC:** International Agency for Research on Cancer (Agencia internacional para la investigación del cáncer)

**IF:** Inmunofluorescencia

**IFNA:** Interferon alpha

**IFNG:** Interferon gamma



**IGF-1R:** Insulin-like growth factor 1 receptor. Receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina

**IL-1:** Interleucina 1

---

**K**

---

**KEGG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto)

**KIT:** KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase. Proto-oncogen KIT, receptor tirosin-quinasa

---

**L**

---

**LAG3:** Gen de Activación Linfocitaria 3

**LDH:** Lactato Deshidrogenasa

**LPC:** Lisofosfatidilcolina

**Luc:** Luciferasa

---

**M**

---

**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinases. Proteínas quinasa activadas por mitógenos

**MAT2A:** Metionina adenosiltransferasa 2A

**MCR1:** Receptor de melanocortina 1

**MCT4:** Transportador monocarboxilado-4

**MEK:** Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases. Quinasas de Proteína quinasa activada por mitógenos

**MEKi:** Inhibidores de MEK

**MET:** Receptor del Factor de Crecimiento Hepático, MET proto-Oncogén, Receptor Tirosin-Quinasa

**MG:** Monoglicérido

**MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**MHC-I:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I

**MHC-II:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II

**MITF:** Factor de Transcripción Asociado a Microftalmia

**MTA:** Metil-thioadenosina

**MTAP:** Metil-thioadenosina fosforilasa

**mTOR:** Mammalian Target of Rapamycin. Diana de Rapamicina en mamíferos.

**mTORC1:** Complejo 1 de mTOR

**mTORC2:** Complejo 2 de mTOR

**MTRP:** metil-thioribosa fosfato

**MYC:** Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis aviar

---

**N**

---

**NAC:** N-Acetil Cisteína

**NADH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido

**NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

**NCSC:** Neural Crest Stem Cell. Células madre de la cresta neural  
**NF-1:** Neurofibromin 1

**NFkB:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NGS:** Normal Goat Serum (Suero Normal de Cabra)

**NRAS:** Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (homólogo del oncogen viral RAS de neuroblastoma)

---

**O**

---

**OCR:** Oxygen Consumption Rate (Ratio de Consumo de Oxígeno)

**OXPHOS:** Fosforilación Oxidativa

---

**P**

---

**P:** células persister

**PBS:** Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino)

**PC:** Fosfatidilcolina

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la ADN polimerasa)

**PD-1:** Receptor Programado de Muerte Celular 1

**PDGFR:** Platelet-derived growth factor receptor. Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas

**PDH:** Piruvato Deshidrogenasa

**PDK1:** Piruvato Deshidrogenasa 1

**PD-L1:** Ligando del Receptor Programado de Muerte Celular 1

**PE:** Fosfatidiletanolamina

**PI3K:** Phosphoinositide-3 kinase. Fosfoinositol-3 quinasa

**PIP<sub>3</sub>:** Phosphatidylinositol 3-phosphate. Fosfatidilinositol-3 fosfato

**PPAR:** Receptores activados por proliferadores peroxisomales

**PRMT5:** Proteína arginina N-metiltransferasa 5

**PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

---

**R**

---

**R:** Rotenona

**RANO:** Ranolazina

**Rb:** Retinoblastoma

**RCF:** Fuerza Centrífuga Relativa

**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno

**RT:** Retrotranscripción o transcripción reversa

**RTK:** Receptor Tyrosine-Kinase. Receptor Tirosina-Quinasa

**RT-PCR:** Real-Time Reverse Transcription PCR (Transcripción Reversa – Reacción en cadena de la ADN polimerasa)

---

**S**

---

**SAM:** S-adenosinmetionina

**SBF:** Suero Bovino Fetal

**SCN5A:** canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.5

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

**SEM:** Error estándar de la media

**SMC:** Starved-like melanoma cells. Células de melanoma con privación de nutrientes

**SMS:** Espermina sintasa

**SN:** Número de serie

**T**

---

**T o TRAM:** Trametinib

**TBS-T:** Solución de Tris Salino con Tween 20

**TCA:** Ciclo de ácidos Tricarboxílicos

**TCR:** Receptor de Células T

**TERT:** Retrotranscriptasa Reversa de la Telomerasa

**TG:** Triglicérido

**TIGIT:** Receptor de inmunoglobulina de célula T y dominio ITIM

**TIM3:** Receptor 3 de mucina de Inmunoglobulinas de células T

**TNF:** Factor de Necrosis Tumoral

**TNM:** Tamaño del tumor, Nº ganglios linfáticos afectados, Metástasis. Sistema de estadiaje

**U**

---

**UHPLC-MS:** Cromatografía Líquida de Ultra Alta Presión-Espectrometría de Masas

**UMI:** Unique Molecular Identifier (Identificador Molecular Único)

**UV:** Ultravioleta

**V**

---

**V o VEM:** Vemurafenib

**VR:** Células Resistentes a Vemurafenib

**VR\_RANO:** Células Resistentes a Vemurafenib tratadas con Ranolazina

**VEGF:** Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

**W**

---

**WB:** Western Blot

**WHO:** World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)



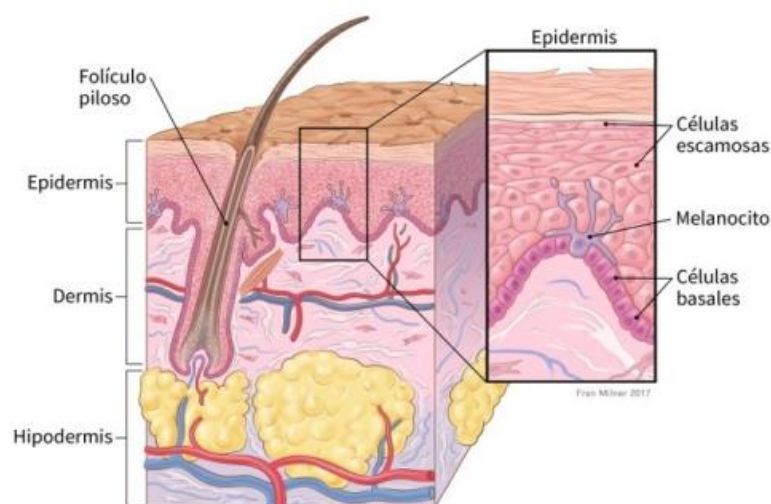
# ***INTRODUCCIÓN***



## 1. CÁNCER DE PIEL

El cáncer de piel es un crecimiento anormal de las células de la piel que generalmente está causado por los rayos ultravioleta (UV) procedentes del sol. Existen diferentes tipos de cáncer de piel en función de su origen, que son:

- Carcinoma de células basales: es el tipo de cáncer de piel más común (alrededor de 8 de cada 10 casos) y generalmente se ocasiona por una exposición prolongada al sol. Su origen está en la capa celular basal, que es la parte inferior de la epidermis (**Figura 1**). Las células basales se dividen constantemente para reemplazar las células escamosas que se desprenden de la superficie de la piel. A medida que estas células se desplazan hacia la epidermis se vuelven más planas y, con el tiempo, se convierten en células escamosas. Este tipo de cáncer de piel suele crecer lentamente y no es frecuente su diseminación a otras partes del cuerpo. Si no se trata, puede extenderse hacia las áreas cercanas e invadir el hueso u otros tejidos debajo de la piel (American Cancer Society, [www.cancer.org](http://www.cancer.org)).



**Figura 1. Representación esquemática de las capas de la piel.** (Fuente: American Cancer Society, [www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

- Carcinoma de células escamosas: es el segundo tipo de cáncer de piel más común (2 de cada 10 casos). Se origina en las células planas de la parte externa de la epidermis que se desprenden constantemente a medida que las nuevas células

se forman (**Figura 1**). Cuando estas células crecen de manera descontrolada, pueden convertirse en cáncer de piel de células escamosas. Suele aparecer en las zonas más expuestas al sol como la cara, los labios, las orejas y el dorso de las manos. Generalmente pueden extirparse por completo pero es más propenso que el carcinoma de células basales a invadir capas más profundas de la piel y propagarse a otras partes del cuerpo ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

- Melanoma: este tipo de cáncer de piel es mucho menos frecuente que los dos anteriores pero, si no se trata, es más propenso a crecer y a propagarse. Se origina a partir de un crecimiento descontrolado de los melanocitos que son unas células localizadas principalmente en la base de la epidermis (**Figura 1**) ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

### 1.1. MELANOMA

En la epidermis humana hay aproximadamente 1500 melanocitos por  $\text{mm}^2$ , lo que supone en promedio unos 3 billones de melanocitos (Kanitakis J., 2002). Por ello, los melanocitos representan una población minoritaria en la capa celular basal de la epidermis y, además, se dividen con una frecuencia muy baja (menos de dos veces al año) (Jimbow K. et al., 1975). Su función principal es la síntesis de un pigmento llamado melanina con el objetivo de proteger a los keratinocitos vecinos del daño en su ADN inducido por la radiación UV del sol (Costin G.-E. & Hearing, V. J., 2007). Tanto la proliferación de los melanocitos como la síntesis de melanina son estimulados por daño en el ADN ocasionado por la radiación UV (Cui, R. et al., 2007). Cuando la proliferación de los melanocitos se descontrola, por diversos factores que serán explicados más adelante, se desarrollan neoplasias melanocíticas que en algunos casos progresarán a melanoma.

No obstante, los melanocitos no son exclusivos de la epidermis. En la piel, también se encuentran en los folículos pilosos donde contribuyen con la coloración del pelo (Mort, R. L. et al., 2015). Además, los melanocitos están presentes en el tracto uveal de los ojos, así como en las meninges o en el tracto anogenital. Las neoplasias formadas a partir de



estos melanocitos son distintas en cuanto a clínica, histopatología y genética con respecto a las neoplasias cutáneas (Bastian, B. C., 2014).

Las neoplasias melanocíticas benignas cutáneas también se llaman *naevus*, o *naevi* en plural, mientras que las malignas se conocen como melanomas. Si bien algunos melanomas pueden desarrollarse a partir de un *naevi* precursor, la mayoría de ellos no muestran una asociación a los mismos (Bastian, B. C., 2014).

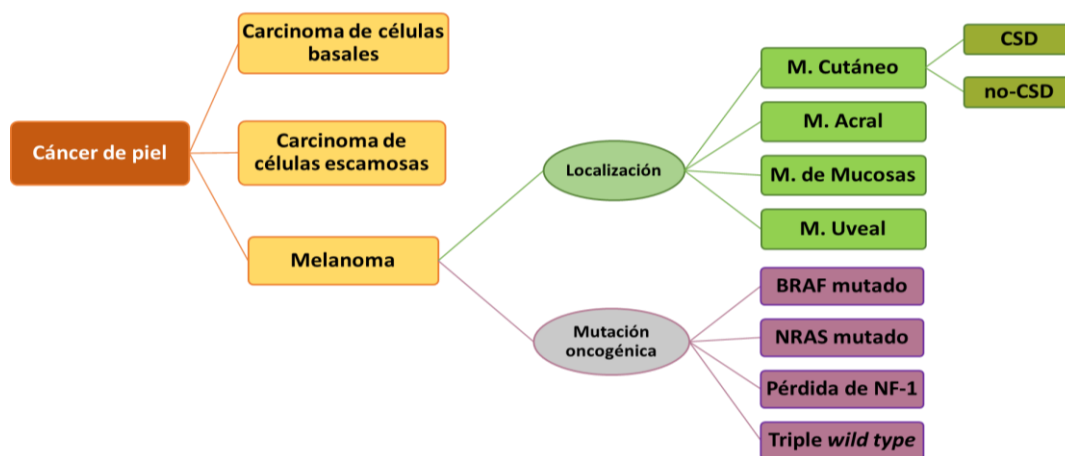
### 1.1.1. TIPOS DE MELANOMA

Históricamente, el melanoma se ha clasificado en distintos subtipos en base al tejido donde se origina el tumor primario (**Figura 2**). Los principales subtipos son:

- Melanoma cutáneo: es el más común y aparece en zonas de la piel con presencia de pelo (piel no glabra). A su vez, se diferencian dos grupos según aparezca en zonas de la piel donde la exposición al sol es prolongada, ocasionando daño solar crónico (CSD) o zonas donde la exposición es más intermitente y no se da daño solar crónico (no-CSD).
- Melanoma acral: se origina en piel sin pelo, o glabra, como la palma de las manos, la planta de los pies o la base de las uñas.
- Melanoma de mucosas: es el subtipo más raro y se origina a partir de los melanocitos presentes en las mucosas internas.
- Melanoma uveal: se origina a partir de los melanocitos presentes en el tracto uveal de los ojos.

Las características de estos subtipos han sido muy bien establecidas tanto epidemiológica, clínica como histopatológicamente. Así pues, también han sido bien caracterizados en cuanto a alteraciones moleculares y genéticas (mutaciones). Las mutaciones surgen, en parte, como consecuencia de la radiación UV del sol, siendo la más predominante la sustitución de Citosinas por Timinas (Rabbie, R. et al., 2019).

Más recientemente, sólo en base a las alteraciones genéticas de diferentes oncogenes prevalentes en melanoma, se estableció otra clasificación de cuatro subtipos que son: BRAF mutado, NRAS mutado, pérdida de NF-1 y triple *wild type* (Hayward, NK. et al., 2017 y Cancer Genome Atlas Network, 2015) (**Figura 2**). Estos subtipos no tienen asociada una histopatología típica ni un tejido de origen, aunque sí se han visto importantes tendencias. Por ejemplo, casi todos los melanomas uveales y la mayoría de acrales y de mucosa pertenecen al grupo triple *wild type* (Hayward, NK. et al., 2017) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema resumen de los diferentes tipos de cáncer de piel y tipos de melanoma en función de su clasificación.

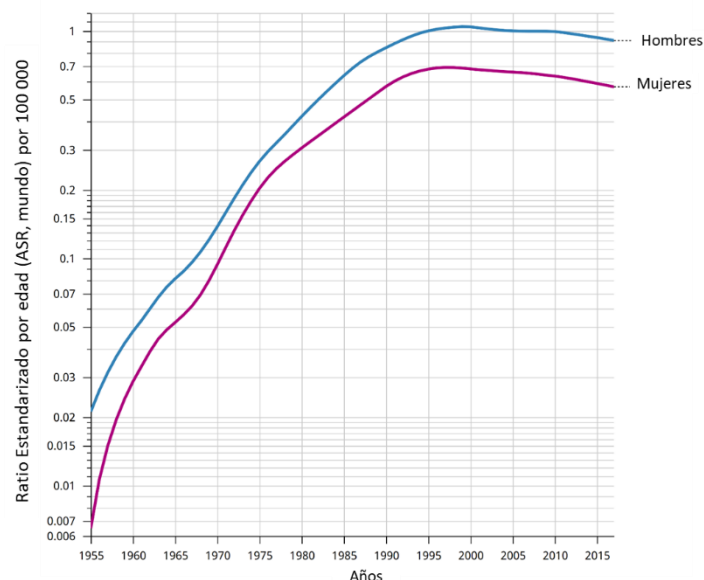
EL **melanoma cutáneo** se puede dividir en dos subtipos basados en el grado de exposición de la piel a la radiación UV, CSD y no-CSD (**Figura 2**). Se diferencian en su localización anatómica de origen, la edad, la carga mutacional y el tipo de alteración oncogénica (Curtin, J. A. et al., 2005 y Maldonado, J. L. et al., 2003).

Los melanomas CSD surgen en zonas de la piel que muestran signos macro y microscópicos de elastosis solar (degeneración de las fibras elásticas de la dermis), como consecuencia de haber recibido radiación UV durante un largo periodo. Así pues, aparecen en zonas como la cabeza y el cuello. Además, es frecuente en adultos mayores de 55 años y presentan una alta carga mutacional asociada a los oncogenes NF-1, NRAS, BRAF (no V600E) o KIT (Bastian, B. C., 2014).

Por el contrario, los melanomas no-CSD normalmente aparecen en zonas de la piel expuestas al sol de manera intermitente como el tronco o las extremidades. Se da en individuos de edad más temprana y no presentan marcas de elastosis solar. Están asociados a una carga mutacional más moderada y, predominantemente, se observa la mutación del oncogén BRAF<sup>V600E</sup>, que consiste en la sustitución de una valina por un ácido glutámico en la posición 600 de la serina/treonina quinasa BRAF (Bastian, B. C., 2014).

### 1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL MELANOMA CUTÁNEO

La incidencia del melanoma a nivel mundial en el año 2020 fue de 3,4 casos por cada 100 000 habitantes, lo que en total supone casi 350 000 casos. La incidencia más elevada se encuentra en Oceanía con 30.1 casos por cada 100 000 habitantes, seguido de Norteamérica con 16.1 y Europa con 11,4 casos por cada 100 000 habitantes. En Europa, las incidencias más elevadas se encuentran en los países nórdicos (con un máximo de 29,7 casos de 100 000 habitantes) mientras que en España, ésta es de 6,8 casos por 100 000 habitantes (WHO 2020, Globocan 2020, IARC 2020).



**Figura 3. Gráfico de mortalidad asociada a melanoma en España a lo largo del tiempo (ratio ASR mundial por 100 000 habitantes) en ambos sexos.** En azul se representa la mortalidad para los hombres y en morado para las mujeres. Fuente: WHO, IARC.

Pese a suponer el 10% de todas las neoplasias de piel, el melanoma representa el 90% de las muertes asociadas a tumores cutáneos (Garbe, C. et al., 2016). En España, la mortalidad asociada a este tipo de cáncer ha ido en aumento a lo largo de los años siendo más elevada en hombres que en mujeres (**Figura 3**). No obstante, la incidencia es mayor en mujeres (7,6 casos por 100 000 habitantes) que en hombres (6,1 casos por 100 000 habitantes) (WHO, Globocan 2020).

### 1.1.3. FACTORES DE RIESGO

Los distintos tipos de cáncer tienen diferentes factores de riesgo que aumentan la predisposición a padecerlos. En el caso del melanoma son los siguientes:

#### *Exposición a la luz ultravioleta*

La exposición a los rayos ultravioleta (UV) es el factor de riesgo primordial para la mayoría de los melanomas. La luz solar es la fuente principal de la radiación ultravioleta pero también las lámparas solares y las camas de bronceado favorecen la incidencia de melanoma. La luz UV artificial puede jugar un papel importante en el desarrollo del melanoma ya que la cantidad de radiación UV-A de una sesión de cama de bronceado es significativamente mayor que la recibida en actividades de exterior o incluso en la exposición directa al sol. Tal es así, que en un estudio se ha visto que el riesgo de padecer melanoma aumenta en un 75% cuando los individuos menores de 35 años han usado camas de bronceado (International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer, 2007).

El riesgo a padecer melanoma correlaciona directamente tanto con la exposición a radiación UV como con las quemaduras solares. Así pues, la exposición solar de la piel tiene como consecuencia efectos mutagénicos asociados a exposición UV claramente descritos actualmente en melanoma, como por ejemplo las mutaciones en el gen supresor tumoral p53 (Ouhtit A. et al., 1998).

## Lunares

Un lunar (también conocido como *naevus* melanocítico o *naevi* en plural) es una proliferación benigna de melanocitos, que tienen una probabilidad muy baja de progresar a melanoma (Shain, A. H. y Boris C. Bastian, 2016). La población caucásica tiene de media unos 25 *naevi* en la piel de aproximadamente 2 mm de diámetro (Holly E. A. et al., 1987 y English J. S. et al., 1988). Aparecen durante las dos primeras décadas de vida y tienden a desaparecer después de la sexta década (Zalaudek I. et al., 2011). Aunque un *naevus* individual no es probable que progrese a melanoma, su alta prevalencia les hace contribuidores de una porción considerable de melanomas. De hecho, el número total de *naevi* melanocíticos en el cuerpo de un individuo es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de melanoma y éste aumenta de forma lineal conforme aumenta el número de *naevi* (Snels DG. et al., 1999).

Hay lunares atípicos (*naevus* displásicos) que se parecen ligeramente a los lunares normales, pero suelen ser más grandes y presentan una forma o color anormal. Estos lunares son un factor de riesgo adicional para el desarrollo del melanoma ya que hay estudios que han demostrado que se notifica la presencia de un *naevus* displásico preexistente en hasta un 25% de los pacientes con melanoma (Zalaudek I. et al., 2020). Su presencia puede aumentar hasta diez veces el riesgo de padecer melanoma (Gandini S. et al., 2005). Los lunares pueden aparecer tanto en la piel expuesta a la luz solar como en la piel que por lo general está cubierta.

## Tipo de piel o Fototipos de la piel

Lo que determina el color de la piel es la densidad, cantidad y distribución de la melanina ya que el número de melanocitos es el mismo entre las personas de todas las etnias (Zaidi Z., 2017). Así pues, existen diferentes tipos de piel o también denominados fototipos de la piel. Estos fototipos fueron clasificados por el dermatólogo Thomas Fitzpatrick en 1975 basándose no solo en el color de la piel sino en la capacidad de bronceado y en su sensibilidad a las quemaduras solares por la exposición a la radiación UV. Los fototipos establecidos por Fitzpatrick son los siguientes (Zaidi Z., 2017):

- I: personas con pelo rubio o pelirrojo, ojos claros y piel muy pálida o blanca. Se queman con mucha facilidad al exponerse al sol y no se broncean.
- II: personas con piel pálida o blanca, ojos claros y pelo rubio o pelirrojo. También se queman con facilidad pero pueden broncearse muy levemente.
- III: personas con pelo rubio o castaño claro, ojos verdes o marrones y un tono de piel claro pero que puede broncearse y apenas sufren quemaduras solares.
- IV: personas con pelo castaño oscuro, ojos marrones y piel morena clara. No suelen quemarse y se broncean con facilidad.
- V: personas con la piel moderadamente morena, ojos oscuros y pelo negro. Se broncean con muchísima facilidad y es muy raro que se quemen.
- VI: personas con la piel muy oscura o negra al igual que sus ojos y cabello. Es prácticamente imposible que se quemen.

El riesgo a desarrollar melanoma es más elevado en los fototipos I a III, que son más sensibles a la radiación UV, y mucho menos frecuente en los fototipos de pieles más oscuras (IV-VI) (Maranda EL. et al., 2016; Gloster HM Jr. et al., 2006).

### *Factores genéticos*

El riesgo de padecer melanoma es mucho más elevado cuando se presentan antecedentes familiares. Se estima que entre un 5-10% de los melanomas tiene procedencia familiar (Rossi M. et al., 2019). Análisis genéticos en pacientes con el llamado síndrome de melanoma familiar con lunares atípicos múltiples (FAMMM) han identificado que mutaciones en los genes CDKN2A (inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina) y CDK4 (quinasa 4 dependiente de ciclina) están asociadas a melanoma familiar. Se ha descrito que el 20-40% de los melanomas familiares están causados por mutaciones en CDKN2A suponiendo un 0,2-1% de todos los melanomas (Begg CB. et al., 2005). Adicionalmente, el melanoma familiar está asociado con la aparición *de novo* del *naevus* displásico y no de un *naevus* benigno pre-existente (Duffi K. et al., 2012).

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la pigmentación de la piel está estrechamente relacionada con el riesgo a padecer melanoma. El receptor de

melanocortina 1 (MC1R), es un receptor de superficie de los melanocitos que por su unión con la hormona estimulante de melanocitos ( $\alpha$ -MSH) activa la producción de melanina. El receptor MC1R puede presentar polimorfismos que reducen la actividad del receptor y son los que dan lugar al pelo rojo o a una piel clara (Naysmith L. et al., 2004 y Valverde P. et al., 1995), menor pigmentación, tienen mayor sensibilidad a la radiación UV y, por lo tanto, riesgo más elevado de padecer melanoma (Frandsberg PA. et al., 1998).

#### *Otros factores de riesgo*

Los pacientes que han desarrollado previamente melanoma tienen un riesgo mayor de volver a padecer un melanoma secundario, de tal forma que un 2,8% de los pacientes padecen melanoma secundario a los 5 años y un 3,6% a los 10 años desde el diagnóstico del primer melanoma (Goggins WB. et al., 2003).

También, se han descrito asociaciones entre melanoma y otras comorbilidades como por ejemplo los pacientes inmunodeprimidos que han sido trasplantados de un órgano. Estos pacientes presentan un riesgo mayor de padecer melanoma y, además, se observa recurrencia en aquellos que tuvieron melanoma primario reseado antes del trasplante. Hay estudios que dicen que el riesgo de desarrollar melanoma en los individuos trasplantados es más del doble que en la población general (Green AC. et al., 2015).

Además, aquellos pacientes que presentan otras neoplasias cutáneas como el carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas o micosis fungoide, tienen un mayor riesgo de desarrollar melanoma y por tanto de morir a consecuencia de la enfermedad (Marghoob AA. et al., 1995; Kahn HS. et al., 1998).

Otro de los factores de riesgo importante en melanoma es la edad. La edad a la que los individuos se exponen al sol o sufren quemaduras solares es determinante. El melanoma es más probable que se presente en personas de edad avanzada, aunque también afecta a personas jóvenes. De hecho, el melanoma es uno de los cánceres más comunes en personas menores de 30 años, especialmente mujeres (Mitchell TC. et al., 2020). Los niños y adolescentes expuestos al sol de forma intermitente tienen un mayor riesgo (Holman CD. et al., 1984). Específicamente, aquellos niños que han experimentado 5 o

más episodios de quemaduras severas tienen duplicado el riesgo a desarrollar melanoma (White E. et al., 1994).

#### 1.1.4. PROGRESIÓN DEL MELANOMA

El melanoma puede surgir *de novo*, es decir, de forma espontánea en la piel o también a partir de una lesión precursora pre-existente (*naevus* común o *naevus* displásico). Esto puede ir en línea con que, junto a ciertas mutaciones, exista un modelo de progresión lineal de tal forma que partiendo de un *naevus* común o displásico se desarrolle un melanoma (Shain AH. et al., 2016). Hay estudios que sugieren que sólo el 20-30% de los melanomas se desarrollan a partir de una lesión precursora mientras que un 70-80% aparecen de forma espontánea o *de novo* (Cymerman, RM. et al., 2016; Pampena, R. et al., 2017 y Martín-Gorgojo, A. et al., 2018).

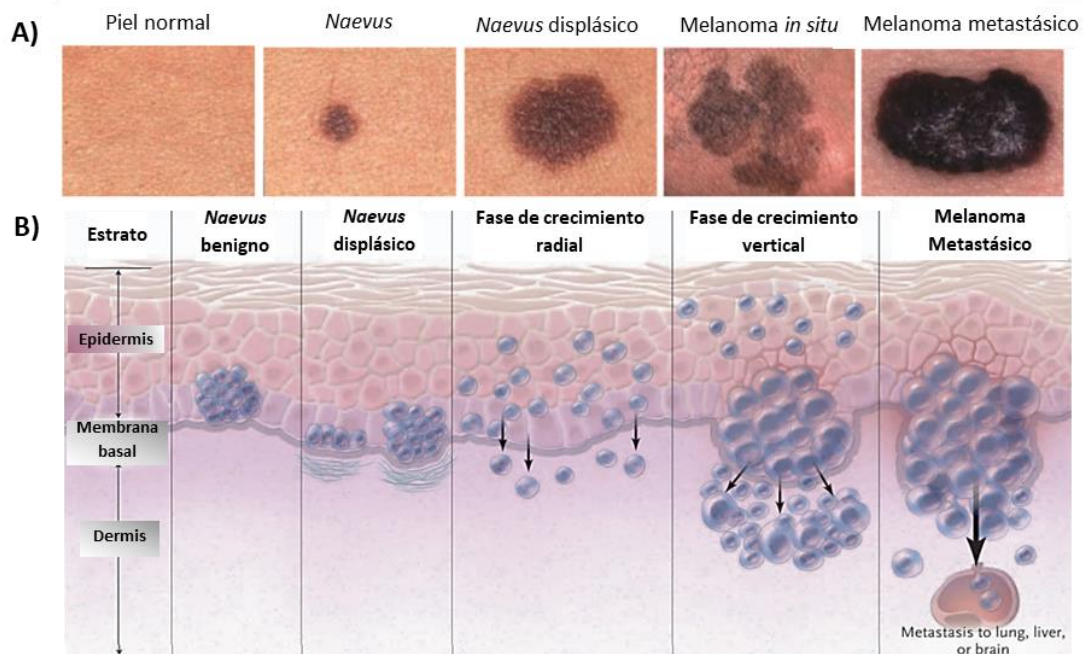
El modelo de progresión lineal de melanoma fue descrito por Wallace H. Clark en 1984 donde estableció las diferentes etapas que transcurren durante la progresión partiendo de los melanocitos hasta las células de melanoma (Clark, WH. et al., 1984 y Haenssle H.A. et al., 2016) (**Figura 4**).

La primera etapa es la formación del *naevus*, una proliferación y agregación benigna de melanocitos en la membrana basal de la epidermis. Suelen ser inducidos por mutaciones activadoras en los oncogenes BRAF y NRAS (Miller, A.J. et al., 2006). Algunos de ellos, o bien entran en un estado de senescencia o bien pueden mostrar un patrón de crecimiento irregular, formando los llamados *naevus* displásicos (**Figura 4**), los cuales ya se consideran lesiones pre-cancerosas (Clark, WH. et al., 1984). No obstante, éstos también pueden surgir como una nueva lesión sin necesidad de existir un precursor (Varrone, F. y Caputo, E., 2020). Este estado de progresión está caracterizado por la disrupción de la ruta p16<sup>INK4</sup>-retinoblastoma (Rb), donde CDKN2A (p16<sup>INK4</sup>) está inactivado como consecuencia de ciertas mutaciones (Hassussian, C.J. et al., 1994 y Lee, J.H. et al., 1996), lo que provoca que no se bloquee el ciclo celular.

A partir de este momento, los melanocitos que forman el *naevus displásico* entran en una fase de proliferación continua y descontrolada, la cual da lugar al melanoma *in situ*,



que ya se considera tumor maligno (**Figura 4**). A partir de este momento, el melanoma puede progresar, en primer lugar, por una fase de crecimiento radial donde prolifera a lo largo de la epidermis (Greene, MH, et al., 1984). A esta fase le sigue la denominada fase de crecimiento vertical, la cual permite a las células de melanoma proliferar hacia capas más profundas y penetrar en la unión epidermis-dermis o incluso en la dermis (**Figura 4**). En este punto, las células de melanoma muestran un fenotipo inmortal debido a la activación de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT) (Sviderskaya, E. V. et al., 2003). Durante la fase de crecimiento vertical, también se hacen efectoras mutaciones que reprimen la apoptosis lo cual les permite sobrevivir en la ausencia de queratinocitos, como la pérdida de PTEN (supresor tumoral) o la sobreexpresión de varias quinasas (Bennett, D. C., 2003). Una vez que las células de melanoma salen del epitelio de la epidermis y llegan al tejido mesenquimal subyacente, como la dermis o la submucosa, se considera melanoma invasivo (Shain AH. et al., 2016). En este momento, el riesgo que los pacientes con melanoma invasivo tienen de desarrollar metástasis y morir correlaciona con la profundidad de invasión en la piel (Balch CM. et al., 2009).



**Figura 4. Progresión del melanoma desde un *naevus* benigno hasta el establecimiento del melanoma metastásico. A)** Imágenes clínicas de un *naevus*, un *naevus* displásico, melanoma *in situ*, melanoma invasivo y melanoma metastásico. **B)** Representación esquemática de las capas de la piel y la progresión a melanoma metastásico. (Fuente: A) Adaptada de Shain, A. H. et al., 2016; B) Adaptada de Miller, A.J. et al., 2006).

Finalmente, las células de melanoma en la dermis pueden interactuar con otros tipos celulares posibilitando su acceso a los vasos linfáticos y sanguíneos, entrando así en la etapa final de la progresión. La etapa final de la progresión es el establecimiento del melanoma metastásico donde las células de melanoma salen del tumor primario y alcanzan otras localizaciones distales de la piel u otros órganos como el cerebro, el hígado o los pulmones donde se pueden desarrollar las metástasis distales responsables del 90% de las muertes (Damsky, W. E. et al., 2010 y Miller, A.J. et al., 2006) (**Figura 4**).

Como se ha indicado anteriormente, aunque este modelo está establecido de manera general para describir la melanomagénesis, hay evidencias de que este proceso no es resultado de una progresión lineal de alteraciones en los *naevus* a través de las diferentes fases, si no que el melanoma metastásico puede originarse a partir de cada una de las fases sin necesidad de transcurrir por todas ellas (Varrone, F. y Caputo, E., 2020).

### 1.1.5. ESTADIAJE Y ESTRATIFICACIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO

En clínica, con el objetivo de realizar un correcto estadiaje de las neoplasias en los pacientes, se utiliza el sistema TNM desarrollado por la AJCC (American Joint Committee on Cancer) en 1977, con sucesivas ediciones (AJCC, [www.cancerstaging.org](http://www.cancerstaging.org)). Este sistema es de utilidad para el manejo clínico, la decisión terapéutica, la evaluación tras el tratamiento o pronóstico y la unificación de criterios para proyectos de investigación y transmisión de datos entre centros sanitarios (AJCC, [www.cancerstaging.org](http://www.cancerstaging.org)).

Así pues, como su nombre indica, se divide en tres clasificaciones determinadas por las letras T, N y M. La primera (T) se refiere al tamaño del tumor primario, la N hace referencia a la afectación de los ganglios linfáticos y la M a las metástasis establecidas.

Este sistema se aplica a tumores de cualquier origen anatómico pero en el caso del melanoma cutáneo, el estadiaje y la estratificación se realiza como se muestra en la

**Tabla 1.**

TNM del AJCC para el melanoma (8.ª ed)			
<b>T</b>	<b>TX</b>	Tumor primario no puede ser determinado (tras curetaje...)	
	<b>T0</b>	Sin evidencia de tumor primario	
	<b>Tis</b>	melanoma <i>in situ</i>	
	<b>T1</b>	≤ 1 mm	a (< 0,8 sin ulceración)
			b (< 0,8 mm con ulceración o 0,8-1 mm con o sin ulceración)
	<b>T2</b>	> 1 mm-2 mm	a (sin ulceración) b (con ulceración)
	<b>T3</b>	> 2 mm-4 mm	a (sin ulceración)
b (con ulceración)			
<b>T4</b>	> 4 mm	a (sin ulceración)	
		b (con ulceración)	
<b>N</b>	<b>NX</b>	Afectación ganglionar no puede determinarse (extirpación previa por otro motivo, hábito corporal...)	
	<b>N0</b>	Ausencia de afectación ganglionar clínica/radiológica	
	<b>N1</b>	<b>N1a:</b> micrometástasis en un ganglio linfático (clínicamente oculto)	
		<b>N1b:</b> ganglio linfático clínicamente detectado	
		<b>N1c:</b> metástasis en tránsito, satélites o microsatélites sin afectación ganglionar	
	<b>N2</b>	<b>N2a:</b> micrometástasis en 2 o 3 ganglios (clínicamente ocultos)	
<b>N2b:</b> metástasis en 2 o 3 ganglios linfáticos			
<b>N3</b>	<b>N2c:</b> metástasis en un ganglio (oculta o clínica) y metástasis en tránsito, satélites o microsatélites		
	<b>N3a:</b> 4 o más micrometástasis en ganglios linfáticos		
	<b>N3b:</b> 4 o más metástasis en ganglios linfáticos, al menos una de ella clínicamente evidente o presencia de conglomerado adenopático		
<b>M</b>	<b>M0</b>	Sin evidencia de metástasis ganglionares	
	<b>M1</b>	<b>M1a:</b> metástasis a distancia en piel, tejidos blandos (incluyendo músculo) y/o ganglios linfáticos no regionales	
		- M1a(0): LDH normal	
- M1a(1): LDH elevada			
<b>M1b:</b> metástasis pulmonares con/sin M1a			
- M1b(0): LDH normal			
- M1b(1): LDH elevada			
<b>M1c:</b> metástasis a distancia en órganos distintos del SNC con/sin M1a y M1b			
- M1c(0): LDH normal			
- M1c(1): LDH elevada			
<b>M1d:</b> metástasis al SNC con/sin M1a, M1b o M1c			
- M1d(0): LDH normal			
- M1d(1): LDH elevada			

**Tabla 1. Clasificación TNM para melanoma cutáneo.** Fuente: Adaptación de Cañueto, J. y Román-Curto, C., 2017 y AJCC 8ª edición, 2017 (LDH: Lactato Deshidrogenasa).

Una vez determinada la clasificación en cada apartado, se unifica la información para determinar un estadio concreto de la enfermedad, de menor a mayor grado de progresión (Estadio I - Estadio IV). Esta clasificación se realiza como muestra la siguiente

**Tabla 2:**

Sistema de estadificación TNM del AJCC para el melanoma (8.ª ed.)			
Tis	N0	M0	Estadio 0
T1a-T1b	N0	M0	Estadio IA
T2a	N0	M0	Estadio IB
T2b-T3a	N0	M0	Estadio IIA
T3b-T4a	N0	M0	Estadio IIB
T4b	N0	M0	Estadio IIC
T0	N1b/1c	M0	Estadio IIIB
T0	N2b/2c, N3b/3c	M0	Estadio IIIC
T1a/b-T2a	N1a, N2a	M0	Estadio IIIA
T1a/b-T2a	N1b/1c, N2b	M0	Estadio IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	Estadio IIIB
T1a/T3a	N2c/N3a,b,c	M0	Estadio IIIC
T3b/T4a	N1-N3	M0	Estadio IIIC
T4b	N1a-N2c	M0	Estadio IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	Estadio IIID
Cualquier T, Tis	Cualquier N	M1	Estadio IV

**Tabla 2. Sistema de estadije para el melanoma cutáneo.** Fuente: Adaptación de Cañueto, J. y Román-Curto, C., 2017 y AJCC 8ª edición, 2017).

### 1.1.6. GENÉTICA DEL MELANOMA CUTÁNEO

El melanoma cutáneo tiene la mayor carga de mutaciones somáticas comparado con el resto de subtipos de melanoma. Además, esas mutaciones tienen una clara procedencia de la radiación UV ya que se caracteriza por las transiciones de Citosinas por Timinas, como se ha descrito en apartados anteriores (Rabbie, R. et al., 2019). Sin embargo, en aproximadamente el 50% de los melanomas cutáneos la radiación UV no parece ser tan relevante ya que presentan una mutación concreta en el codón 600 del oncogén BRAF, la mutación V600E, descrita anteriormente en el apartado “Tipos de melanoma” (Cancer Genome Atlas Network). Las mutaciones en BRAF se dan en etapas tempranas de la melanogénesis ya que se observan con la misma frecuencia en *naevi* que en tumores primarios o en melanoma metastásico (Pollok, PM. et al., 2003). Debido a que la mayoría de los *naevi* no son proliferativos y pueden permanecer estáticos durante décadas, estas frecuencias tan similares de BRAF mutado sugieren que los *naevi* tienen que adquirir mutaciones adicionales que desencadenen la proliferación y los convierta en malignos (Miller, A.J. et al., 2006). Así pues, hay estudios que demuestran que la mutación de BRAF junto a la inactivación del supresor tumoral p53 causan la malignidad de los melanocitos (Patton, EE. et al., 2005).

Otro 30% de los melanomas cutáneos presentan mutaciones en la GTPasa NRAS, (principalmente en el codón Q61), y muy raramente en KRAS o HRAS; otro 10-15% tienen NF-1 mutado y el resto son triple *wild type* o KIT-mutado (Rabbie, R. et al., 2019). Los melanomas que aparecen en la piel expuesta al sol de forma intermitente sin daño solar crónico (no-CSD), por lo general presentan la mutación BRAF<sup>V600E</sup> mientras que los CSD engloban a todos los demás con el resto de mutaciones nombradas. Normalmente, los tumores con BRAF<sup>V600E</sup> tienden a tener menos mutaciones somáticas que las observadas en los otros, que son posiblemente menos potentes, como la pérdida de NF-1 o la activación de NRAS, KIT y BRAF no-V600E (Shain, A. H. y Boris C. Bastian, 2016).

Adicionalmente, hay otras mutaciones recurrentes en otros genes como CDKN2A, TP53, ARID2 y PTEN (Hayward, NK. et al., 2017 y Cancer Genome Atlas Network, 2015). La mutación en CDKN2A o PTEN puede ser solo uno de los pasos moleculares de la progresión del melanoma pero no está del todo claro en qué momento de la misma

ocurren. Los melanomas que presentan la pérdida del gen CDKN2A en la línea germinal (en melanoma familiar) sugieren que esta alteración genética incrementa la probabilidad de que los *naevi* displásicos se conviertan en malignos o de que aumente el riesgo de desarrollar melanoma sin la existencia de un precursor.

Por otro lado, más del 50% de los melanomas cutáneos avanzados tienen mutaciones en el promotor de TERT (Horn, S. et al., 2013), las cuales se han asociado a un acortamiento de los telómeros y a peor supervivencia (Rabbie, R. et al., 2019).

El factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), es específico de melanocitos y se une a diferentes promotores de distintos genes involucrados en la diferenciación celular, proliferación, síntesis de melanina, entre otras funciones. En un 10% de melanomas primarios y también en melanoma metastásico, MITF se encuentra amplificado (Garraway, LA. et al., 2005). Algunos estudios proponen que los melanomas cutáneos que expresan MITF están bien diferenciados y tienen una prognosis favorable (Jonsson, G. et al., 2010) mientras que otros con poca expresión de MITF presentan un fenotipo invasivo y son intrínsecamente resistentes a ciertas terapias (Muller, J. et al., 2014). Así pues, se ha visto una gran heterogeneidad de la expresión de MITF en tumores de melanoma (Wellbrock, C. y Arozarena, I., 2015). Este tema será desarrollado más adelante en el capítulo “Plasticidad fenotípica del melanoma cutáneo”.

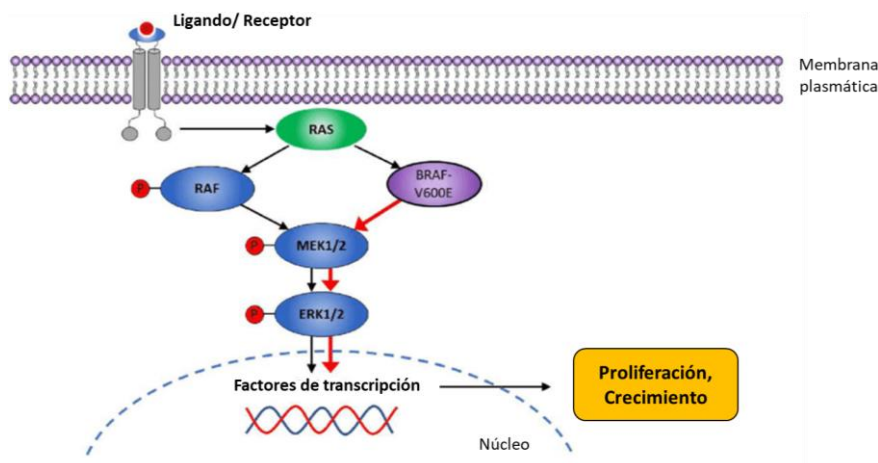
### 1.1.7. SEÑALIZACIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO

Una de las rutas de señalización más relevantes en melanoma cutáneo es la ruta de las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*). A través de esta ruta, los estímulos externos recibidos por las células se convierten en diferentes respuestas, propias de procesos celulares básicos como la expresión génica, proliferación, apoptosis, metabolismo, diferenciación, motilidad y supervivencia (**Figura 5**). Las MAPK se expresan en todas las células eucariotas, están evolutivamente muy conservadas y se agrupan en tres familias distintas: ERKs, JNKs y p38/SAPKs (Widmann, C. et al., 1999).

La familia ERKs (*Extracellular-signal-Regulated Kinases*) se subdivide en dos grupos, las clásicas ERKs que consisten principalmente en un dominio quinasa como ERK1 y ERK2; y

las ERKs más grandes (como ERK5) que contienen un dominio quinasa con un extremo carboxi-terminal mucho más extenso (Zhang, Y. y Dong, C., 2007). Las clásicas ERK1/2 responden principalmente a factores de crecimiento y mitógenos que promueven por medio de la cascada de señalización de las MAPK, proliferación y crecimiento celular (McKay, MM., 2007 y Shaul, YD, 2007).

La ruta de las MAPK se inicia con la activación por la unión de factores de crecimiento o diferenciación a receptores de membrana tirosin-quinasa (RTKs) o pequeñas GTPasas como Ras. Estos receptores activan mediante fosforilación de manera secuencial a otras quinasas de la familia RAF (BRAF o CRAF), que activan a MEK1/2 (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases*) (Morrison, DK., 2012). MEK1/2 activa mediante fosforilación a ERK1/2 que, en el citoplasma, fosforila diversos genes diana como MITF y también es capaz de trasladarse al núcleo para activar factores de transcripción que promueven la proliferación y la progresión del ciclo celular (Miller, A.J. et al., 2006) (Figura 5).



**Figura 5. Esquema de la ruta de las MAPK-ERK.** Flechas en negro: comportamiento de la ruta en células normales. Flechas en rojo: comportamiento de la ruta en células de melanoma BRAF<sup>V600E</sup>. Fuente: Adaptación de Roider, T. et al., 2018.

En melanoma, la mutación V600E de BRAF encontrada en el 50% de los casos, ocasiona una ganancia de función que provoca que la ruta de las MAPK se encuentre hiperactivada de manera constitutiva y con independencia de la activación de Ras (Shtivelman, E. et al., 2014). Por otro lado, en el 15% de los casos, la ruta también puede verse activada por mutaciones somáticas en NRAS. Las mutaciones de BRAF y NRAS son exclusivas la una de la otra, es decir, no hay células que presenten ambas quinasas

mutadas. De una forma u otra, la hiperactivación constitutiva de la ruta de las MAPK estimula el crecimiento de las células de melanoma (Welsh, CF. et al., 2001; Brunet, A. et al. 1999 y Lin, AW. et al., 1998) convirtiéndose en la principal ruta de señalización del melanoma cutáneo.

Otra ruta de señalización importante en cáncer es la ruta PI3K/AKT (**Figura 6**). Esta ruta es crítica en la regulación de procesos biológicos esenciales que son cruciales para la agresividad y el comportamiento de las células tumorales.

PI3K es una enzima formada por dos subunidades, una reguladora (p85) y otra catalítica (p110), que se activa por la unión de factores de crecimiento a diferentes reguladores como los receptores RTKs, RAS, contactos célula-célula, entre otros (**Figura 6**). PI3K activado fosforila las moléculas de fosfatidilinositol en la membrana plasmática a nivel del grupo 3'-OH formando fosfatidilinositol-3 fosfato (PIP<sub>3</sub>). Estos fosfolípidos atraen hacia la membrana a proteínas como AKT la cual es fosforilada en dos residuos altamente conservados, Thr308 (por PDK1) y en Ser473 (por el complejo mTORC2), lo cual activa completamente su función catalítica (Davies, M.A. y Kwong, L.N., 2013). La principal diana de AKT es mTOR, que es un regulador central de la ruta PI3K/AKT y del cáncer en general (Liu, P. et al., 2009) (**Figura 6**). mTOR ejerce un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular controlando la disponibilidad de nutrientes, energía celular, niveles de oxígeno y señales mitogénicas (Liu, P. et al., 2009 y Laugier, F., et al., 2015).

Como otras muchas rutas, la señalización de PI3K/AKT tiene reguladores que controlan su activación. El principal regulador de PI3K es el supresor tumoral PTEN, que funciona como antagonista de la actividad de PI3K por su actividad fosfatasa con la que convierte PIP<sub>3</sub> en PIP<sub>2</sub>. La pérdida de PTEN resulta en una activación constitutiva de AKT, lo cual está estrechamente relacionado con el desarrollo tumoral (Stahl, J.M. et al., 2003) (**Figura 6**).

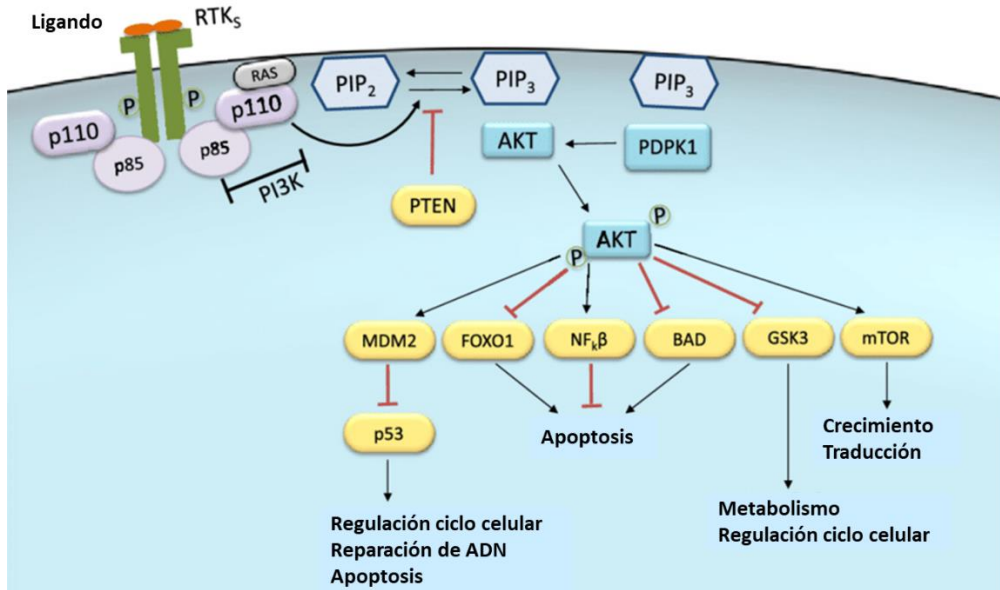


Figura 6. Esquema de la ruta PI3K/AKT. Fuente: Adaptado de Dantonio, P.M. et al., 2018

En melanoma, la ruta PI3K/AKT es activada de diversas maneras. Las dos más comunes son la activación por la mutación de NRAS (15-20%) y la pérdida de expresión de PTEN (20-30%) (Hocker, T. y Tsao, H., 2007) (Figura 7). Al igual que las mutaciones de BRAF y NRAS, las mutaciones de NRAS y PTEN son mutuamente excluyentes. La pérdida de PTEN comúnmente se observa en melanomas con BRAF mutado resultando en una activación concurrente de la ruta de MAPK y de la ruta PI3K/AKT (Goel, VK. et al., 2006; Tsao, H. et al., 2004 y Tsao, H. et al., 2000) (Figura 7).

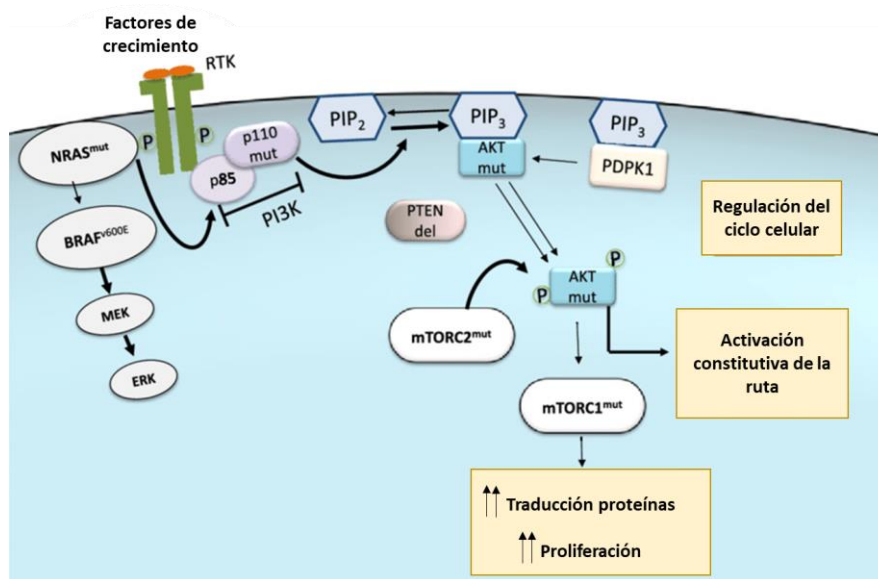


Figura 7. Esquema resumen de las rutas MAPK y PI3K/AKT en las células de melanoma. Fuente: Adaptado de Dantonio, P.M. et al., 2018



Las mutaciones en PI3K se presentan en aproximadamente un 3% de los melanomas metastásicos (Hachiya, A. et al., 2001) mientras que AKT se encuentra amplificado en el 43-60% de los melanomas (no familiares), lo cual se asocia con la progresión de la enfermedad, metástasis y el desarrollo de resistencia a las terapias (Madhunapantula, S.R.V. et al., 2017 y Kong, Y. et al., 2016).

### **1.1.8. TRATAMIENTO DEL MELANOMA CUTÁNEO**

Actualmente, las opciones de tratamiento disponibles para el melanoma son cirugía, inmunoterapia, terapia dirigida, quimioterapia y radiación (American Cancer Society, [www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

Los melanomas en estadios 0, I y II generalmente se tratan por resección quirúrgica realizando una escisión amplia (cirugía para extraer el melanoma y un margen de piel normal circundante). Es recomendable realizar una biopsia del ganglio centinela cercano para descartar que se haya propagado. Si en la biopsia no hay células tumorales, no es necesario realizar ningún tratamiento más, aunque es importante llevar un seguimiento riguroso del paciente. Si por el contrario, se encuentran células tumorales en la biopsia ganglionar, se extirpan todos los ganglios cercanos a esa área. Si el tumor está ya establecido en el ganglio, podría recomendarse la administración de un tratamiento adyuvante con terapia dirigida o inmunoterapia (American Cancer Society, [www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

Para los melanomas en estadio III, se realiza la escisión amplia y extirpación de los ganglios además de suministrar un tratamiento adyuvante (terapia dirigida o inmunoterapia), quimioterapia y radioterapia en las zonas donde se extirparon los ganglios (American Cancer Society, [www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

Para los pacientes diagnosticados en estadio IV, los tumores en la piel o los ganglios pueden ser extirpados con cirugía o tratados con radioterapia. Las metástasis en los órganos internos pueden extirparse siempre que sea posible, según el número y la localización por cirugía. Aquellas que no sea posible la cirugía, pueden tratarse con

radiación, inmunoterapia, terapia dirigida o quimioterapia (American Cancer Society, [www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

En los últimos años, la inmunoterapia y las terapias dirigidas han demostrado ser los tratamientos más eficaces (American Cancer Society, [www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

#### 1.1.8.1. Terapias Dirigidas

Antes del descubrimiento de la mutación activadora en BRAF, el melanoma metastásico era considerado uno de los cánceres con peor pronóstico. Los regímenes de quimioterapia clásica y la dacarbazina ofrecían pequeñas oportunidades terapéuticas en clínica para el manejo de esta variante mortal de cáncer de piel.

En 2002, en un estudio realizado por el Instituto Sanger, se identificaron mutaciones en BRAF en aproximadamente el 60% de los melanomas (Davies, H. et al., 2002). A partir de este descubrimiento, se realizó un gran trabajo científico para determinar el rol que BRAF y la ruta de las MAPK tenían en la iniciación y progresión del melanoma.

A día de hoy, se sabe que BRAF está mutado en aproximadamente el 50% de los melanomas (*Cancer Genome Atlas Network*) y, mediante la activación de la ruta de las MAPK, es el principal regulador del desarrollo del melanoma. En aproximadamente el 70-88% de las mutaciones en BRAF es un cambio de Valina a Ácido Glutámico (V600E) (*Cancer Genome Atlas Network*; Long, GV. et al., 2011 y Menzies, AM. et al., 2012) aunque también se han descrito otros cambios en la posición 600, mucho menos frecuentes, como de valina a lisina (V600K) en un 11-20%, de Valina a Glicina (V600R) en el 2-5% y de Valina a Metionina (V600M) en un 1-4% (*Cancer Genome Atlas Network*; Long, GV. et al., 2011 y Lovly, CM. et al., 2012). Además, existen otras mutaciones en BRAF que no ocurren en la posición 600 de la Valina, llamadas en inglés *non-V600*, y que se encuentran en aproximadamente el 5% de los melanomas, comúnmente encontradas en los codones 466, 469, 597 y 601 (Maldonado, JL. et al., 2003).

Así pues, tanto por el descubrimiento de la alta prevalencia de las mutaciones en BRAF como por la importancia de la ruta de las MAPK en el desarrollo del melanoma, se

desarrollaron las denominadas terapias dirigidas. Estas terapias consisten en inhibir químicamente BRAF mutado y MEK, bloqueando así la ruta de las MAPK, la proliferación celular y el crecimiento tumoral (Patel H. et al., 2020).

### ***Inhibidores de BRAF (BRAFi)***

El primer fármaco desarrollado para inhibir específicamente a BRAF fue Vemurafenib (PLX4032). Vemurafenib es un inhibidor reversible con afinidad específica por el bolsillo de unión del ATP del mutante constitutivamente activo de BRAF, BRAF<sup>V600E</sup>, donde se une al sitio activo del dominio quinasa bloqueando la unión del ATP (Bollag, G. et al., 2010 y Waizenegger, IC. et al., 2016). Los ensayos clínicos realizados con vemurafenib (fase III con pacientes con mutaciones V600E, V600K y V600D) resultaron en 13,6 y 6,7 meses de supervivencia general y de supervivencia libre de progresión, respectivamente (Hauschild, A. et al., 2012). Posteriormente, otro inhibidor de BRAF mutado, Dabrafenib (GSK2118436), mostró similares efectos clínicos (Banzi, M. et al., 2016).

La eficacia observada con estos fármacos cambió el tratamiento de los pacientes con melanoma. Sin embargo, en seguida se cuestionó su idoneidad a largo plazo debido a la aparición de otras afectaciones de la piel como el desarrollo de carcinoma de células escamosas, además de otros efectos secundarios variados (Hauschild, A. et al., 2012 y Mc Arthur, GA. et al., 2014).

Además, a pesar de observar buenos resultados en las respuestas iniciales, el problema principal de los BRAFi es que al cabo de un año los pacientes ya no responden al tratamiento y sufren recaídas (Hauschild, A. et al., 2012 y Long, GV. et al, 2016). Adicionalmente, alrededor del 20% de los pacientes con mutaciones activadoras de BRAF presentan resistencia intrínseca y no responden a los BRAFi (Sosman, JA. et al., 2012; Hauschild, A. et al., 2012 y Turajlic, S. et al., 2014). Por ello, tanto la resistencia innata a estos fármacos como la adquisición de resistencia, limitan la efectividad clínica de esta terapia.

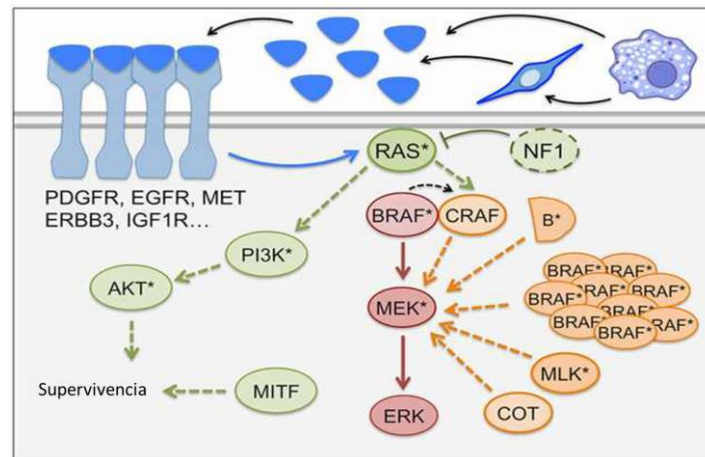
### **Resistencia a inhibidores de BRAF**

Dentro de los mecanismos de resistencia por los cuales las células de melanoma son capaces de evadir el efecto antiproliferativo de las terapias con BRAFi, se encuentra la reactivación de la ruta de las MAPK. Por otro lado, también se han descrito algunos mecanismos capaces de escapar a la citotoxicidad ocasionada por BRAFi independientes de una reactivación de la ruta de MAPK (Arozarena, I. y Wellbrock, C. 2017) (**Figura 8**).

#### *Reactivación de la ruta MAPK*

En un análisis de pacientes con melanoma que han recaído, se encontró que en el 70% de los casos, diferentes mecanismos permitían a las células de melanoma *bypassear* la inhibición de BRAF manteniendo la activación de MEK con independencia de BRAF, lo que termina finalmente en la activación de ERK (Shi, H. et al., 2014 y Van Allen, EM. et al., 2014).

La sobre-expresión de NRAS así como mutaciones activadoras de NRAS o la pérdida de la GTPasa NF1, permiten la activación de MEK con independencia de BRAF (Nazarian, R. et al., 2014 y Whittaker, SR. et al., 2013). Además, en los pacientes con recaídas también se observó que MEK aumentaba su actividad gracias a la estimulación de diversos receptores tirosin-quinasa (RTKs) como EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), IGF-1R (*Insulin-like growth factor 1 receptor*) o PDGFR (*Platelet-derived growth factor receptor*) (Nazarian, R. et al., 2014; Girotti, MR. et al., 2013 y Villanueva, J. et al., 2010) (**Figura 8**). Con respecto a las quinasas RAF, se ha observado que la sobre-expresión de CRAF, amplificaciones del gen BRAF y BRAF truncado (como consecuencia de *splicing* alternativo), permiten mantener la activación de ERK en presencia de los BRAFi (Poulikakos, PI. et al., 2011 y Shi, H. et al., 2012) (**Figura 8**). Por debajo de BRAF, la sobre-expresión o mutaciones de MEK o de alguno de sus activadores como CRAF, COT, MLK, entre otros, también se han descrito como mecanismos reactivadores de la ruta (**Figura 8**).



**Figura 8. Mecanismos de resistencia a los inhibidores de BRAF.** En azul, señalización procedente del estroma tumoral para la reactivación de ERK por medio de MEK (naranja) o potenciando la señalización de supervivencia celular (verde). Fuente: Adaptado de Arozarena, I. y Wellbrock, C. 2017.

#### *Mecanismos de resistencia a BRAFi independientes de la reactivación de la ruta de MAPK*

Además de la reactivación de ERK a través de la ruta RAS-CRAF-MEK-ERK, se ha descrito la activación paralela de la ruta PI3K/AKT inducida mediante la activación de RAS (**Figura 8**). Esto contribuye a limitar la citotoxicidad resultante de la inhibición con BRAFi (Villanueva, J. et al., 2010 y Straussman, R. et al., 2012). La activación de la ruta de PI3K parece ser un mecanismo de evasión de muerte celular mediante la regulación de la expresión de reguladores de apoptosis como BCL2 o BIM (Straussman, R. et al., 2012; Paraiso, KH. et al., 2011 y Wilson, TR. et al., 2012).

Otro regulador de genes de supervivencia antiapoptóticos como BCL2A1 y BCL2 es el factor de transcripción MITF, regulador clave del linaje melanocítico y de la biología del melanoma (Haq, R. et al., 2013 y Wellbrock, C. y Arozarena, I., 2015). Altos niveles de MITF permiten que las células de melanoma evadan la muerte celular por BRAFi (también inhibidores de MEK, MEKi) incluso cuando la ruta de las MAPK se encuentra completamente bloqueada (Müller, J. et al., 2014 y Smith, MP. et al., 2013). La amplificación del gen de MITF se encuentra en un pequeño porcentaje de melanomas avanzados (Van Allen, EM. et al., 2014). Además, los niveles de MITF aumentan por el tratamiento con los inhibidores de BRAF y MEK por medio de la ruta de las MAPK, mediante una reorganización del control de la transcripción de MITF (Smith, MP. et al.,

2016). Esta reorganización aparece en las fases iniciales del tratamiento del paciente con MAPKi ya que el 80% de los melanomas analizados en esta etapa muestran una inducción significativa de la expresión de MITF lo que permite a las células de melanoma entrar en una fase llamada fase de tolerancia farmacológica (Smith, MP. et al., 2016).

Otra forma de resistencia está relacionada con el aumento en la señalización de los receptores RTK, que se correlaciona con una alta expresión del receptor RTK AXL (Müller, J. et al., 2014 y Konieczkowski, DJ. et al., 2014). Pese a no ser frecuente encontrar células de melanoma dependientes de RTK antes del tratamiento con BRAFi, un ~50% de los melanomas con recidivas presentan una expresión elevada de AXL (Triosh, I. et al., 2016). Curiosamente, en las células de melanoma, niveles altos de AXL van acompañados de niveles bajos de MITF definiendo así el fenotipo MITF<sup>low</sup>/AXL<sup>high</sup>. Este fenotipo no sólo proporciona mayor invasividad y resistencia innata frente a los BRAFi sino que también confiere un estado más de-diferenciado a las células de melanoma (Müller, J. et al., 2014).

El rol de MITF en la respuesta a los inhibidores de MAPK de las células de melanoma es complejo. Por un lado, la presencia de MITF es un marcador de sensibilidad al tratamiento con MAPKi pero, cuando su expresión está aumentada, confiere resistencia. Por otro lado, niveles bajos de MITF acompañados de altos niveles de AXL, protegen a las células de melanoma frente a la citotoxicidad inducida por los BRAFi. En conjunto, parece que la capacidad de respuesta que las células de melanoma van a tener a los inhibidores de BRAF se encuentra entre dos “estados de MITF” diferentes (Wellbrock, C. y Arozarena, I., 2015).

### *Resistencia a BRAFi por mecanismos celulares no autónomos*

Los tumores son heterogéneos ya que no sólo están formados por células tumorales sino que también incluyen células del estroma que pueden impactar de forma positiva o negativa en el crecimiento del tumor, en el potencial metastásico y en la respuesta a las terapias (**Figura 8**). Por ejemplo, los fibroblastos del tumor pueden proteger a las células de melanoma de la inhibición de BRAF mediante la secreción paracrina del Factor de Crecimiento Hepático (HGF). Así los fibroblastos del estroma pueden restablecer la actividad de ERK por medio de CRAF y la estimulación del receptor del factor de

crecimiento hepático MET (MET proto-Oncogén, receptor tirosin-quinasa) en las células tumorales (Straussman, R. et al., 2012) (**Figura 8**). Estos fibroblastos también pueden proporcionar resistencia mediante la modificación de la matriz extracelular, lo que a su vez induce la activación de la quinasa de Adhesión Focal (FAK) mediada por integrinas (Hirata, E. et al., 2015).

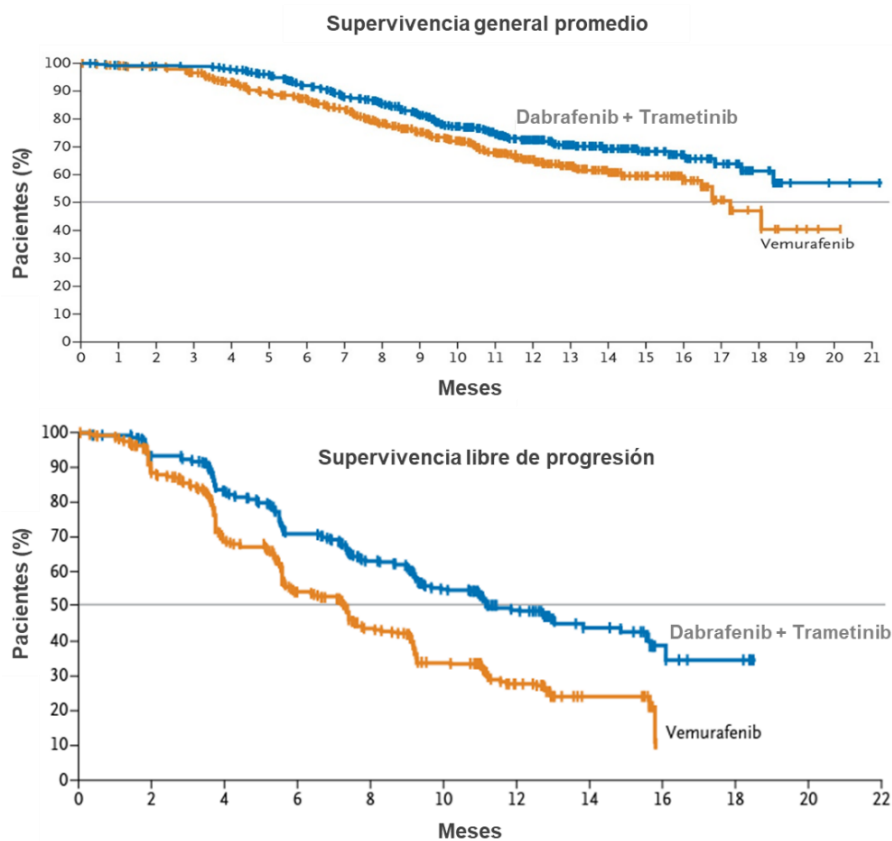
Además de fibroblastos, en un tumor también se pueden encontrar macrófagos que, secretando el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), pueden activar la ruta de NFkB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) en las células de melanoma, aumentando la expresión de MITF y permitiendo evadir la citotoxicidad ocasionada por los BRAFi (Smith, MP. et al., 2014). Además, los macrófagos son también capaces de producir VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular), que puede reactivar ERK con la presencia de los BRAFi (Wang, T. et al., 2015) (**Figura 8**). A su vez, los macrófagos y fibroblastos pueden actuar de manera conjunta en “nichos inflamatorios” donde los macrófagos secretan IL-1 (Interleucina 1), que estimula la producción de la citocina GRO (*Growth-Regulated Oncogene*) por parte los fibroblastos. GRO activa la ruta de CXCR2 (Receptor 2 de la quimiocina CXC) en las células de melanoma protegiéndolas de las terapias basadas tanto en BRAFi como la combinación de inhibidores contra BRAF y MEK (Young, HL. et al., 2017) (**Figura 8**).

### ***Terapia combinada de Inhibidores de BRAF y MEK***

MEK es el único efector conocido de BRAF y pronto se descubrió que los melanomas con mutaciones en BRAF eran significativamente más sensibles a la inhibición de MEK que aquellos con mutaciones en NRAS, los cuales presentan una activación de PI3K que facilitaba la supervivencia (Haass, NK. et al., 2008 y Solit, DB. et al., 2006).

Los inhibidores de MEK (MEKi) como Selumetinib (AZD6244), Binimetinib (MEK162) o Trametinib han mostrado por sí solos eficacia clínica en pacientes con melanoma BRAF mutado (Ascierto, PA. et al., 2013; Catalanotti, F. et al., 2013; Flaherty, KT. et al., 2012; Kirkwood, JM. et al., 2012; Patel, SP. et al., 2013 y Robert, C. et al., 2013). Sin embargo, esa eficacia era insuficiente lo que ha impedido el uso de MEKi como única terapia. No

obstante, la combinación de BRAFi y MEKi ha mostrado tener resultados muy satisfactorios en pacientes con BRAF mutado, tanto es así, que entre 2014 y 2015 se aprobó por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) el uso combinatorio de Trametinib-Dabrafenib y Cobimetinib-Vemurafenib y, tras proporcionar ambas combinaciones beneficios clínicos evidentes (**Figura 9**), se aprobó como terapia estándar para el melanoma avanzado con BRAF mutado (Daud, A. et al., 2017 y Galván-Banqueri, M. et al., 2016). En el caso de la combinación Trametinib-Dabrafenib, la supervivencia promedio general a los 12 meses fue de un 72% en comparación a la monoterapia con vemurafenib, que fue de un 65%. Además, la supervivencia libre de progresión con esta combinación fue de 11,4 meses mientras que la terapia sólo con vemurafenib de 7,3 meses (Robert, C. et al., 2015) (**Figura 9**).



**Figura 9. Resultados de la supervivencia de los pacientes en el ensayo clínico donde estudiaron la combinación de Dabrafenib con Trametinib en comparación a Vemurafenib en monoterapia.** Arriba, Supervivencia promedio y abajo, supervivencia libre de progresión de los pacientes tratados con la combinación BRAFi y MEKi (Dabrafenib y Trametinib, respectivamente) en azul, en comparación a la monoterapia con BRAFi (Vemurafenib) en naranja. Fuente: Adaptado de Robert, C. et al., 2015.



Además, la combinación de BRAFi y MEKi proporcionan beneficios clínicos adicionales ya que el desarrollo de carcinoma de células escamosas y otras afecciones observadas en pacientes tratados con BRAFi disminuye significativamente (Sanlorenzo, M., et al., 2014), aumentando también así la calidad de vida de los pacientes (Grob, JJ. et al., 2015 y Schadendorf, D. et al., 2015).

### ***Tolerancia farmacológica y resistencia adquirida***

A pesar de los resultados observados con la terapia dirigida combinada, la mayoría de los pacientes sufren recidivas de la enfermedad debido al desarrollo de mecanismos de resistencia similares a los comentados anteriormente para BRAFi. La aparición de amplificaciones de BRAF, variantes diferentes de BRAF como resultado del *splicing* alternativo y mutaciones en MEK1/2 han sido descritas como mecanismos de resistencia cruzada tanto en monoterapia como terapia combinada que implican la reactivación de la ruta de MAPK (Villanueva, J. et al., 2013 y Wagle, N. et al., 2014). Así, durante la primera fase del tratamiento, la sobre-expresión de MITF, que confiere resistencia a los inhibidores de BRAF y MEK se detecta hasta en el 80% de los pacientes en tratamiento (Smith, MP. et al., 2016).

Una visión común de la resistencia adquirida es que inicialmente, la presencia de inhibidores de BRAF y MEK induce una reorganización de la ruta de las MAPK permitiendo que los tumores desarrollen tolerancia a estos fármacos. Después de esto, la capacidad de respuesta del tumor a los inhibidores eventualmente cambia hacia un programa de resistencia permanente, mediante la selección de clones mutantes o el establecimiento de nuevas mutaciones en respuesta a la presión ejercida por el bloqueo de las MAPK (Arozarena, I. y Wellbrock, C., 2017).

En relación con esto, se ha descrito que en células de melanoma tratadas con la combinación de BRAFi/MEKi existe una subpoblación de células que son capaces de sobrevivir a este tratamiento, pero pueden recuperar la sensibilidad inicial cuando son cultivadas en ausencia de éstos fármacos (Shen, S. et al., 2020). A estas células con tolerancia reversible a los MAPKi se les conoce como células “*persisten*”. El estado de

tolerancia reversible permite a las células *persistir* sobrevivir a ese impacto inicial de los fármacos antes de evolucionar, a causa de la presión farmacológica, hacia el desarrollo de mutaciones genéticas que confieren la resistencia adquirida permanente a dichos fármacos (Shen, S. et al., 2020).

Por otro lado, ya se ha descrito que el desarrollo de los tumores depende de rutas de señalización oncogénicas que les permiten iniciar y mantener su crecimiento, así como para evadir el ataque anti-tumoral por parte del sistema inmunitario. De hecho, hay estudios que sugieren que estas rutas de señalización oncogénica pueden alterar dichas respuestas anti-tumorales (Spranger, S. et al., 2018). En línea con esto, se ha visto que la ruta de las MAPK está implicada en la evasión inmune en tumores de melanoma *naive* para terapias dirigidas (Lui, C. et al., 2013; Koya, RC. et al., 2012 y Ott, PA. et al., 2013). Sin embargo, a pesar de presentar la ruta de las MAPK hiperactivada, la mayoría de los melanomas que son *naive* para el tratamiento con MAPKi son respondedores a las inmunoterapias (Larkin, J. et al., 2019), sugiriendo que la hiperactivación de la ruta de las MAPK no suprime de forma directa la inmunidad anti-tumoral.

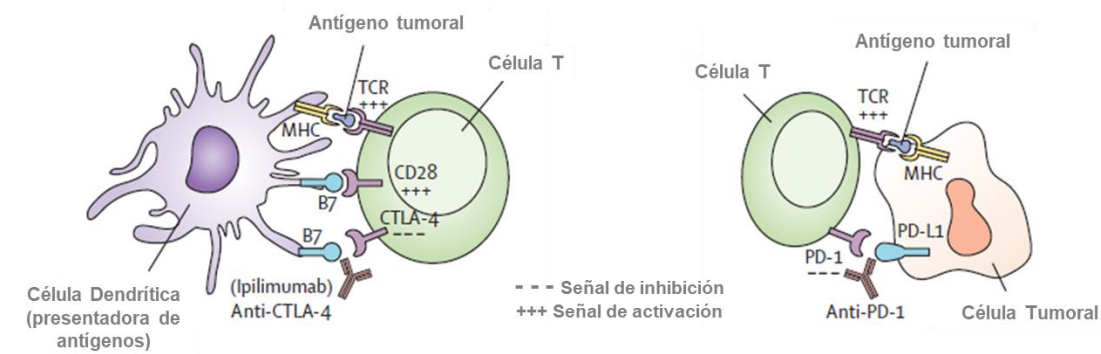
Así pues, se ha visto que cuando los melanomas adquieren resistencia a las terapias dirigidas, también lo hacen para las inmunoterapias (Haas, L. et al., 2021). En este estudio también se propone que esta “resistencia cruzada” está dirigida por la ruta de las MAPK, la cual se encuentra reactivada regulando la resistencia en la mayoría de los melanomas con resistencia adquirida. Más en detalle, vieron que la ruta de las MAPK reactivada tiene como consecuencia un cambio transcripcional que aumenta la expresión de factores de transcripción que activan la señalización de las MAPK, como los del complejo AP-1 (Proteína Activadora 1). Además, mediante un estudio de la accesibilidad de la cromatina vieron que hay nuevas regiones regulatorias de genes más accesibles a los efectores del complejo de factores de transcripción AP-1, efectores en la ruta de MAPK. Este cambio transcripcional lleva a la evasión inmune y a una respuesta a inmunoterapias completamente alterada en los tumores resistentes a terapias dirigidas comparados con tumores *naive* (Haas, L. et al., 2021).

### 1.1.8.2. Inmunoterapia

El microambiente tumoral está infiltrado por numerosos tipos de células inmunes tanto de la respuesta innata como adaptativa, cuyas funciones se encuentran frecuentemente suprimidas por diversos mecanismos (Thorsson, V. et al., 2018 y Binnewies, M. et al., 2018). Las células tumorales por su parte, disminuyen la actividad de los receptores inmunes que estimulan la respuesta inmunitaria mientras que, por otro lado, aumentan la actividad de aquellos receptores que inhiben dicha respuesta (He, X. et al., 2020).

Estos receptores inhibidores de la respuesta inmune han sido identificados y muy estudiados en los últimos tiempos y son, entre otros, los siguientes: PD-1 (receptor de muerte celular programada), CTLA-4 (Antígeno-4 asociado a linfocitos T citotóxicos), LAG3 (Gen de Activación Linfocitaria 3), TIM3 (Receptor 3 de mucina de Inmunoglobulinas de células T), TIGIT (Receptor de inmunoglobulina de célula T y dominio ITIM) y BTLA (Atenuador de linfocitos B y T). Estos receptores se han denominado puntos de control inmune o también son más conocidos como “*checkpoints* inmunes”. Ya que los *checkpoints* inmunes son receptores de membrana, pueden ser fácilmente bloqueados por anticuerpos que impiden la unión ligando-receptor, evitando así la supresión de la actividad de los linfocitos T (He, X. et al., 2020).

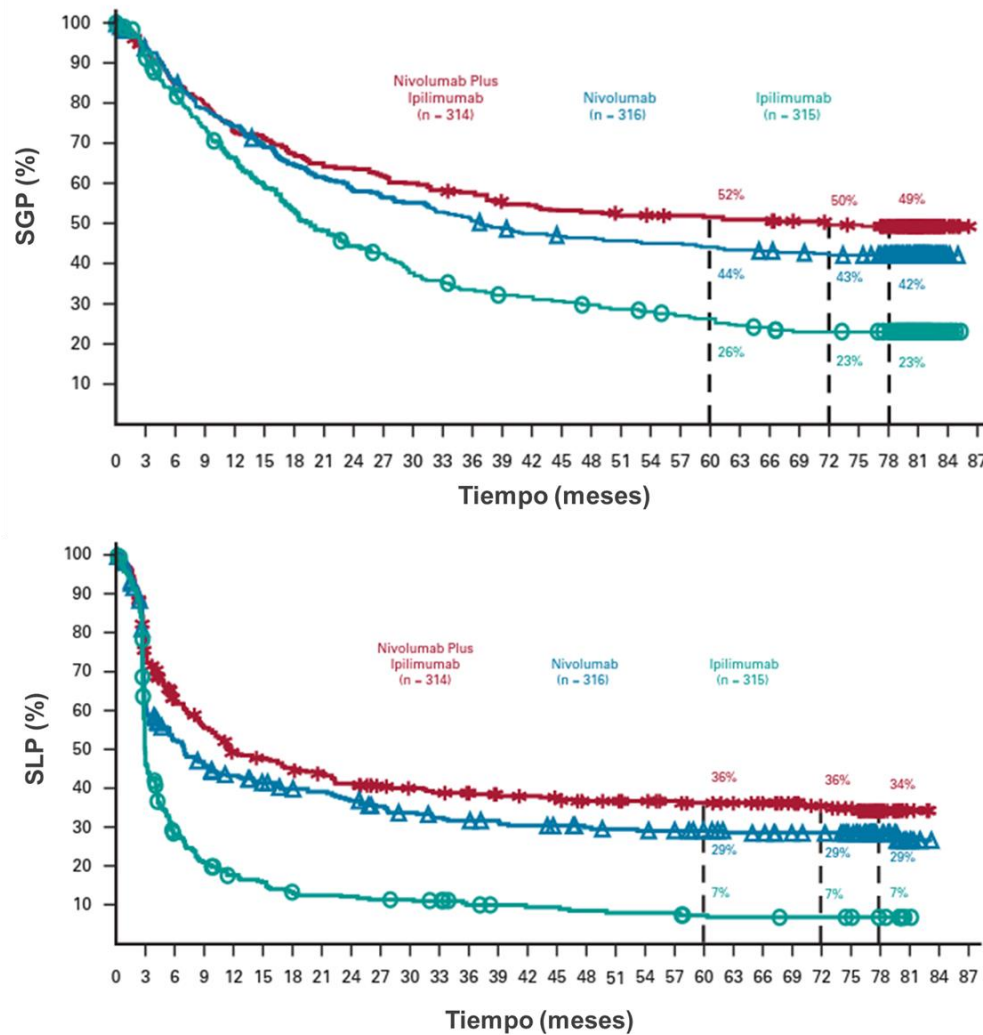
Así pues, en base a este fundamento, se desarrollaron los “inhibidores de *checkpoint* inmunes”. Hasta la fecha, el uso de anticuerpos que bloquean la unión de PD-1 (localizado en la superficie de los linfocitos) con su ligando, PD-L1 (localizado en la membrana de las células tumorales) (**Figura 10**), ha sido el que mejores resultados ha mostrado (Ribas, A. et al., 2018) primero en monoterapia y, posteriormente, en combinación con anticuerpos anti-CTLA-4 (Wolchok, JD. et al., 2013) (**Figura 11**).



**Figura 10: Representación de la inactivación de las células T mediante la unión de CTLA-4 con sus ligandos B7 (izquierda) o la unión de PD1 con PD-L1 (derecha).** Fuente: Adaptada de Carlino, MS. et al., 2021).

Hasta la fecha, se han aprobado tanto por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) como por la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) seis inhibidores de *checkpoints* inmunes que bloquean la unión PD-1/PD-L1. Tres de ellos son inhibidores de PD-1 (nivolumab, pembrolizumab y cemiplimab) y los otros tres son inhibidores de PD-L1 (atezolizumab, durvalumab y avelumab) (Chocarro de Erauso, L. et al., 2020). Con respecto a los inhibidores de CTLA-4, ipilimumab, fue el primero en ser aprobado por la FDA y, actualmente, se usa en combinación con nivolumab para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico (Larkin, J. et al., 2019).

En el ensayo clínico CheckMate 067 fue donde se evaluó la eficacia de la combinación de Nivolumab junto a Ipilimumab en comparación a la monoterapia con cada uno de ellos, mediante el análisis de la supervivencia general promedio (SGP) de los pacientes de melanoma metastásico así como la supervivencia libre de progresión (SLP). Además, se incluyeron los resultados asociados a toxicidad y efectos adversos (Wolchok, JD. et al., 2022). La supervivencia promedio con el tratamiento en combinación, a los 5 años fue del 52% mientras que a los 6,5 años (78 meses) era del 49%. LA SGP fue del 44% y 43%, respectivamente, para nivolumab como agente único y de 26% y 23% para ipilimumab (**Figura 11**). La SLP, por su parte, resultó en el 34% de los pacientes para el tratamiento en combinación a los 6,5 años siendo del 29% y 7% para nivolumab e ipilimumab, respectivamente, en monoterapia (Wolchok, JD. et al., 2022) (**Figura 11**).



**Figura 11. Resultados de la supervivencia de los pacientes en el ensayo clínico CheckMate 067 en fase III donde estudiaron la combinación de Nivolumab e Ipilimumab en comparación a la monoterapia de ambos.** Arriba, Supervivencia general promedio (SGP) y abajo, supervivencia libre de progresión (SLP) de los pacientes tratados con la combinación Nivolumab (anti-PD1) e Ipilimumab (anti-CTLA-4) (en rojo) en comparación a la monoterapia con Nivolumab (azul) o Ipilimumab (verde). Fuente: Adaptado de Wolchok, JD. et al., 2022.

CTLA-4 por su parte, es otro inhibidor de puntos de control inmune importante en melanoma. También se encuentra en la superficie de las células T regulando su activación. CTLA-4 compete con CD28, otro receptor de superficie de las células T, para interactuar con sus ligandos, CD80 y CD86, conocidos más comúnmente como ligandos B7 (**Figura 10**). Cuando CTLA-4 se une con los ligandos B7, que normalmente se encuentran en las células presentadoras de antígenos, se produce una respuesta inmunosupresora terminando con la inhibición de la activación de los linfocitos T

mediante la endocitosis de CD80 y CD86 (Stamper, CC. et al., 2001 y Qureshi, OS. et al., 2011). Normalmente, la activación de las células T requiere de una co-estimulación con la interacción de CD28 y los ligandos B7, junto a la del TCR (Receptor de células T) con el MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad). Sin embargo, CTLA-4 tiene una afinidad más elevada por los ligandos B7, lo que le hace ser un buen inhibidor de puntos de control inmune (Rowshanravan, B. et al., 2001) (**Figura 10**). CTLA-4 también se expresa en las células tumorales (Chan, DV. et al., 20114) por lo que éstas aprovechan este sistema de inmunosupresión para evitar una respuesta inmunitaria sobre ellas. Fue a consecuencia de este hallazgo por lo que se desarrolló la terapia anti-CTLA-4. Actualmente, hay tres anticuerpos anti-CTLA-4 en fases preclínicas y clínicas para el tratamiento del melanoma que son: Tremelimumab, Ipilimumab (Yervoy) y BCD-145. Como ya se ha mencionado antes, Ipilimumab ya está aprobado por la FDA para su uso en combinación con anticuerpos anti-PD-1 (Nivolumab) (Patel, H. et al., 2020).

A pesar de la gran eficacia que se ha observado con la inmunoterapia, durante los ensayos clínicos (**Figura 11**), se han visto numerosos casos de toxicidad asociada al tratamiento. El 95% de los pacientes con melanoma metastásico, tratados con la combinación anti PD-1/PD-L1 y -anti-CTLA-4, presentaron eventos adversos asociados a la inmunoterapia, siendo en el 55% de los casos eventos adversos graves (Haanen, J. et al., 2017).

Por otra parte, la secuencia o el orden de tratamiento para los pacientes de melanoma con mutación en BRAF con terapia dirigida e inmunoterapia no está bien establecida. Empezar con un tratamiento u otro es efectivo independientemente del orden, pero es necesario investigar más sobre la respuesta a estas terapias y realizar más ensayos clínicos para establecer la secuencia terapéutica más efectiva (Ackerman, A. et al., 2014 y Johnson, D.B. et al., 2017). No obstante, hay estudios donde se ha observado que realizar primero el tratamiento con inmunoterapias (nivolumab + ipilimumab) y después con terapia dirigida (Dabrafenib + Trametinib) es más efectivo que el orden inverso. Así pues, la supervivencia general promedio a los dos años con la secuencia inmunoterapia-terapia dirigida fue del 71,8% mientras que la de la secuencia terapia dirigida-inmunoterapia fue del 51,5% (Atkins, MB. et al., 2023).

Por otro lado, hay casos donde la carga tumoral del paciente puede estar comprometiendo su supervivencia y se recurre en primer lugar al tratamiento con terapias dirigidas debido a que su respuesta inicial es mucho más rápida que la de las inmunoterapias (Patel, H. et al., 2020).

### ***Mecanismos de resistencia a inmunoterapias***

El tratamiento con inmunoterapias para el bloqueo de PD1/PD-L1 ha demostrado tener respuestas más duraderas y mejor toleradas por los pacientes en comparación a otras terapias tradicionales. Sin embargo, aproximadamente el 50% de los pacientes con melanoma metastásico no responde al tratamiento (Eggermont, AMM. et al., 2018). Esto es debido a que esos pacientes presentan resistencia intrínseca o primaria a la terapia. Por otra parte, hay un porcentaje de pacientes que inicialmente responden bien al tratamiento, pero terminan progresando debido al desarrollo de mecanismos de resistencia adquirida (Pitt, JM. et al., 2016; Restifo, NP. et al., 2016; Sharma, P. et al., 2017 y O'Donnell, JS. et al., 2019). Por todo ello, la predicción de respuesta a estas terapias dependerá por un lado de factores intrínsecos al tumor así como de factores extrínsecos asociados al paciente (Chocarro de Erauso, L. et al., 2020).

### ***Factores intrínsecos del tumor***

Los factores intrínsecos asociados al tumor, que pueden dar lugar tanto a la resistencia primaria a inmunoterapias anti-PD1/PD-L1 como a la resistencia adquirida, conforman un escenario genético y de señalización que previene la infiltración de células inmunitarias en el microambiente tumoral (Escors, D. 2014).

La resistencia a inmunoterapias frecuentemente se asocia con:

- Tumores poco antigénicos: la pérdida de antigenicidad es el mecanismo de escape más común en muchos tipos de tumores (Escors, D., 2014). Esto principalmente está causado por la inmunoección tumoral, un proceso con el que el sistema inmunitario ejerce una fuerte presión selectiva sobre las células tumorales más inmunogénicas (Schreiber, RD. et al., 2011). Por ello, el

reconocimiento de antígenos específicos del tumor por parte de las células T efectoras es crucial para la inmunoección tumoral (DuPage, M. et al., 2012). De esta forma, las células T efectoras eliminarán las células tumorales más inmunogénicas controlando así la progresión del tumor durante cierto tiempo (Restifo, NP. et al., 2016 y Sharma, P. et al., 2017). Sin embargo, aquellas células tumorales con una menor inmunogenicidad serán capaces de proliferar. Estas células se caracterizan por tener una menor expresión de antígenos tumorales así como una disminución de la expresión de moléculas involucradas en el proceso de presentación de antígenos como MHC-I (Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I) y beta-microglobulina ( $\beta$ 2M) (Gubin, MM. et al., 2014). En este contexto, las inmunoterapias no funcionarán debido a que no habrá una respuesta endógena de las células T contra el tumor (Chocarro de Erauso, L. et al., 2020).

- Sobreexpresión de PD-L1: las células tumorales que aumentan la expresión de PD-L1 no solo inactivarán a las células T que expresen PD1 sino que aumentarán su resistencia a la apoptosis mediada por el interferón (Gato-Canas, M. et al., 2017 y Jalali, S. et al., 2019). Además, PD-L1 también puede estimular el crecimiento de las células tumorales mediante la activación de la ruta AKT/mTOR, autofagia y glucólisis (Chang, CH. et al., 2015; Clark, CA. et al., 2016; Gupta, HB. et al. 2016). Adicionalmente, la expresión de PD-L1 en las células tumorales es suficiente para la evasión inmune y la inhibición de la citotoxicidad de las células T CD8 (Juneja, VR. et al., 2017). En resumen, el aumento de expresión de PD-L1 está asociado a progresión tumoral, proliferación, invasión, señalización anti-apoptótica e inhibición de las células T mediante la unión PD1/PD-L1 (Escors, D. et al., 2018).
- Carga mutacional del tumor: el nivel de carga mutacional de los tumores puede ser un marcador predictivo de la respuesta a inmunoterapias. Así pues, los tumores con una carga mutacional elevada, como algunos tipos de melanoma, tendrán una mayor expresión de neoantígenos y será más inmunogénico (Alexandrov, LB. et al, 2013 y Yuan, J. et al., 2016), lo que se asocia con una mejor respuesta a las inmunoterapias (Gubin, MM. et al., 2014). Por el contrario, los



tumores que presenten una carga mutacional baja, podrán evadir el ataque del sistema inmunitario. Asociado a la elevada carga mutacional, es frecuente encontrar mutaciones en las rutas de reparación del ADN (Le, DT. et al., 2015) lo que provoca una deficiencia en dicho proceso que predice la respuesta al bloqueo de PD1 en diversos tipos de cáncer (Le, DT. et al., 2015 y Le, DT. et al., 2017).

#### *Factores extrínsecos del tumor*

Es importante destacar que además de las características intrínsecas al tumor, la resistencia o la respuesta de los tumores a las inmunoterapias también depende de factores extrínsecos asociados al sistema inmunitario. Estos factores consisten en células T exhaustas de forma irreversible, sobre-expresión de moléculas *checkpoint* inmunes y sus ligandos, diferenciación y expansión de poblaciones celulares inmunosupresoras así como la producción de citoquinas y metabolitos inmunosupresores en el microambiente tumoral (Fridman, WH. et al., 2017; Sharma, P. et al., 2017 y Fares, CM. et al., 2019). Uno de los biomarcadores pronóstico más importante es la cuantificación de infiltración linfocitaria en el microambiente tumoral (cuantificación de cada tipo celular, densidad y localización) (O'Donnell, JS. et al., 2019). Así, las inmunoterapias serán más efectivas en los pacientes que presenten una infiltración linfocitaria tumoral mayor (Taube, JM. et al., 2012 y Bindea, G. et al., 2013). Por el contrario, la expansión de poblaciones celulares inmunosupresoras de forma sistémica o la infiltración de éstas en el estroma tumoral, contribuye con la resistencia extrínseca a estas terapias. Además, la producción de citoquinas inmunosupresoras por parte de las células T reguladoras influirá en la respuesta a las inmunoterapias (Viehl, CT., et al., 2006; Sakaguchi, S. et al., 2008; Arce, F. et al., 2011).

#### **1.1.9. PLASTICIDAD FENOTÍPICA DEL MELANOMA**

La progresión del melanoma hacia un estado invasivo está unido a alteraciones genéticas. Esto sugiere que los cambios en la expresión génica y, por lo tanto, en los programas transcripcionales juegan un papel importante en dicha progresión. Análisis

de expresión génica realizados en células de melanoma en cultivo han establecido la existencia de dos grandes programas transcripcionales. Estos programas se expresan en diferentes poblaciones celulares y se definen como “fenotipo proliferativo” y “fenotipo invasivo” (Cheli, Y. et al, 2012; Falletta, P. et al., 2017; Ferguson, J. et al., 2017; Kim, I. S. et al, 2017 y Landsberg, J. et al, 2012).

El fenotipo proliferativo se define como una población celular caracterizada por tener una alta tasa de proliferación en cultivo y por la expresión de MITF y la de sus genes diana, los cuales regulan el ciclo celular y la pigmentación. Por otro lado, el fenotipo invasivo se define como una población celular que presenta incrementada su capacidad invasiva, vinculada a la expresión de MITF y expresión de marcadores mesenquimales (Hoek, KS. et al., 2008). Estos fenotipos no están definidos por alteraciones genéticas concretas y los cambios en la actividad transcripcional pueden reprogramar un fenotipo u otro. Así pues, los transcriptomas de cada fenotipo están controlados por reguladores transcripcionales distintos como MITF y AXL (Hoek, K. S. et al., 2006; Verfaillie, A. et al., 2015 y Widmer, D. S. et al., 2012). En consecuencia, dependiendo del balance entre la expresión y/o la actividad de estos reguladores transcripcionales, las células serán capaces de adaptarse, o lo que es lo mismo, tendrán plasticidad fenotípica (Arozarena, I y Wellbrock, C., 2019).

Los cambios transcripcionales se inducen a través de rutas de señalización activadas por factores extracelulares por lo que el microambiente tumoral juega un papel muy importante en la plasticidad fenotípica de las células. Además, otros tipos de células no tumorales presentes en el microambiente tumoral, así como las condiciones metabólicas, como el oxígeno o la disponibilidad de nutrientes, pueden modificar los fenotipos y dirigirlos de proliferativo a invasivo, y viceversa (Cheli, Y. et al, 2012; Ferguson, J. et al., 2017; Kim, I. S. et al, 2017 y Landsberg, J. et al, 2012). Estos efectos microambientales pueden explicar la heterogeneidad fenotípica, inter-tumoral e intra-tumoral, observada frecuentemente en melanoma. De hecho, análisis histológicos de biopsias de melanoma revelaron distinta expresión de MITF, marcador principal del fenotipo proliferativo; y del receptor AXL, marcador del fenotipo invasivo (Sensi, M. et al., 2011) dentro de los mismos tumores. Esta heterogeneidad también puede verse a nivel de RNA, donde una población de células proliferativas presenta un programa

transcripcional de MITF<sup>alto</sup> (MITF<sup>high</sup> en adelante) y otra de células invasivas con AXL<sup>alto</sup> (AXL<sup>high</sup> en adelante) (Tirosh, I. et al., 2016). Por ello, estos dos marcadores comúnmente se identifican como poblaciones MITF<sup>high</sup>-AXL<sup>low</sup> y MITF<sup>low</sup>-AXL<sup>high</sup>.

En general, las “firmas” genéticas de los fenotipos proliferativo e invasivo describen parte de los estados en los que se encuentran las células de melanoma durante las distintas fases de la progresión del melanoma cutáneo (Verfaillie, A. et al., 2015; Tirosh, I. et al., 2016 y Cancer Genome Atlas Network). De esta forma, el fenotipo proliferativo sería el responsable del crecimiento inicial del tumor y, un cambio al fenotipo invasivo daría la capacidad a las células para invadir y diseminarse (Hoek, KS. et al., 2008). Una vez en el lugar donde se ha establecido la metástasis, un nuevo cambio en las células hará que recuperen el fenotipo proliferativo para promover de nuevo el crecimiento del tumor. Sin embargo, este proceso no parece ser tan simple ya que se observa heterogeneidad fenotípica tanto en metástasis individuales (Tirosh, I. et al., 2016) como en células circulantes (Khoja, L. et al., 2014 y Yu, M. et al., 2013). Probablemente, en esta situación de heterogeneidad puede que influya una comunicación entre las células de los distintos fenotipos, lo que puede resultar en acciones cooperativas que promueven el proceso metastásico mientras que a la vez mantienen la heterogeneidad (Chapman, A. et al., 2014).

Más recientemente, con los avances en las tecnologías genómicas y los análisis de *single-cell*, se ha podido definir mejor la relación entre los fenotipos y sus programas transcripcionales tanto en progresión tumoral como en respuesta a terapias dirigidas (Rambow, F. et al., 2018 y Tsoi, J. et al., 2018) reforzando la importancia que esto tiene en melanoma, especialmente en el campo de las terapias. Así pues, la secuenciación masiva de tumores permite diferenciar si domina un fenotipo u otro mientras que los análisis de *single-cell* revelan que ambos fenotipos pueden coexistir en un mismo tumor, contribuyendo así a la heterogeneidad intra-tumoral (Tirosh, I. et al., 2016 y Ennen, M. et al., 2017). En línea con esto, debido a que las recaídas de los pacientes se deben a pequeñas subpoblaciones celulares que presentan tolerancia a los fármacos (MAPKi en este caso) o lo que también se conoce como enfermedad mínima residual, Rambow analizó (Rambow, F. et al., 2018) mediante *Single-Cell RNA seq* las células procedentes de tumores de melanoma durante las distintas fases de tratamiento con MAPKi. El

objetivo de ese estudio fue analizar la diversidad de los estados transcripcionales y la transición desde un estado a otro durante la respuesta a los MAPKi. El resultado de este análisis fue la caracterización de cuatro subpoblaciones celulares con estados transcripcionales distintos:

- Subpoblación "pigmentada": las células de esta subpoblación se caracterizan por presentar una actividad mediada por MITF muy elevada y expresan marcadores génicos de diferenciación y pigmentación, como TRPM1, GPR143 y MLPH. Esta subpoblación se encontraba enriquecida en las fases iniciales del tratamiento (Rambow, F. et al., 2018).
- Subpoblación "invasiva": esta subpoblación celular se asocia con la expresión de marcadores asociados con firmas génicas de la transición epitelio-mesénquima (EMT), como SLIT2, BGN o TNC. Estas células presentan niveles bajos de MITF y sorprendentemente su presencia disminuye progresivamente conforme avanzan las fases del tratamiento, lo que indica que la tolerancia farmacológica no está dirigida por el cambio del fenotipo proliferativo al invasivo (al menos en el modelo de trabajo de este estudio) (Rambow, F. et al., 2018).
- Subpoblación "NCSC" (Células madre de la cresta neural): estas células se caracterizan por una alta expresión de marcadores de células madre de la cresta neural, donde se incluyen NGFR, AQP1 o GFRA2. Al igual que la subpoblación invasiva, también presentan una actividad mediada por MITF casi indetectable. Sin embargo, al contrario que las células de la subpoblación invasiva, la subpoblación NCSC presenta altos niveles de expresión y de actividad transcripcional del marcador específico de la cresta neural, SOX10. La proporción de estas células aumenta conforme avanza la exposición a los fármacos (Rambow, F. et al., 2018).
- Subpoblación "SMC" (*Starved-like melanoma cells*): se trata de una subpoblación celular con una actividad de MITF intermedia y que expresa altos niveles de genes como CD36, SLC7A8, SLC12A7 o DLX5. Estas células a su vez expresan un set de genes cuya expresión aumenta en las células con baja disponibilidad de nutrientes. Esta subpoblación se ve enriquecida principalmente en la fase inicial

del tratamiento y en menor grado en la fase de tolerancia. Las células de la subpoblación SMC son claramente diferentes a otras que también presentan niveles intermedios de MITF, las cuales presentan una firma génica proliferativa clásica y se encuentran antes de iniciar el tratamiento y en la fase final donde ya se da resistencia a los MAPKi (Rambow, F. et al., 2018).

MITF parece ser el conductor de la transición hacia el fenotipo invasivo ya que, sólo cuando la expresión de este gen es suprimida, las células pueden realizar la transición de proliferativas al fenotipo invasivo (Carreira, S. et al., 2006). Aunque el fenotipo proliferativo requiere la actividad transcripcional de MITF, su expresión en células invasivas no necesariamente induce el cambio a fenotipo proliferativo. Parece que el cambio de fenotipo invasivo a proliferativo requiere de cambios adicionales, como modificaciones epigenéticas, para que MITF dirija la transcripción de genes encargados de la proliferación y la diferenciación (Carreira, S. et al., 2006 y Wellbrock, C. y Marais, R., 2005).

Por otro lado, hay evidencias que sugieren que la plasticidad fenotípica es el centro de desarrollo de la resistencia a las terapias, no solo de terapias dirigidas sino que también de la inmunoterapia (Rambow, F. et al., 2018 y Hugo, W. et al., 2016) haciendo que sea todavía más complejo poder curar el melanoma.

En cuanto a las terapias dirigidas, está ya establecido que el melanoma se adapta cuando es tratado con inhibidores de MAPK. Estudios de células en cultivo *in vitro* han revelado que, durante esta adaptación y a lo largo del tiempo, emergen poblaciones celulares con transcriptomas distintos. En las fases iniciales muestran mayor diferenciación melanocítica (MITF<sup>high</sup>), seguido de una de-diferenciación y de la aparición de células en un estado de “ciclo lento”, que recuerdan a las células de la cresta neural, de donde proceden los melanocitos durante el desarrollo embrionario (Fallahi- Sichani, M. et al., 2017; Shaffer, S. M. et al., 2017 y Su, Y. et al., 2017). En las fases iniciales, hasta el 78% de los pacientes tratados con MAPKi presentan un aumento de células MITF<sup>high</sup> (Rambow, F. et al., 2018 y Smith, MP. et al., 2016), que pueden dar lugar a un estado de tolerancia farmacológica, porque la supervivencia mediada por la señalización de MITF puede contrarrestar la muerte celular inducida por los MAPKi (Smith, MP. et al., 2016 y

Smith, MP. et al., 2013). En paralelo, aumentan las poblaciones celulares que han adquirido el estado de-diferenciado e invasivo y coexisten con las primeras en un mismo tumor (Rambow, F. et al., 2018). Este estado de las células correlaciona a su vez con el aumento de receptores tirosin-quinasa (RTKs) como NGFR (Rambow, F. et al., 2018), PDGFR (Nazarian, R. et al., 2010), EGFR (Sun, C. et al., 2014) y AXL (Tirosh, I. et al., 2016; Konieczkowski, DJ. et al., 2014 y Muller, J. et al., 2014), entre otros. Este aumento de los RTKs proporciona a las células la supervivencia por medio de rutas de señalización independientes a las MAPK, por lo tanto, estas células son resistentes a los MAPKi (Konieczkowski, DJ. et al., 2014 y Muller, J. et al., 2014). Esto explica que el 70% de los melanomas recurrentes presenten alta expresión del receptor AXL (Boshuizen, J. et al, 2018), resultando en tumores resistentes con un programa transcripcional regulado por AXL (Tirosh, I. et al., 2016). En consonancia con esto, el 50% de los melanomas recurrentes tienen la expresión de MITF reducida (Smith, MP. et al., 2016).

En cuanto a la inmunoterapia, como se ha detallado anteriormente, hay pacientes que no responden a la terapia con anticuerpos anti-PD-1 y se consideran tumores resistentes (Hugo, W. et al., 2016). Esta resistencia al bloqueo de PD-1 presenta similitudes a la resistencia de MAPKi, como por ejemplo la expresión de AXL, entre otros. También, se ha descrito que el cambio transcripcional que promueve la resistencia a los anticuerpos anti-PD-1 se estabiliza por modificaciones epigenéticas (Verfaillie, A. et al., 2015 y Lauss, M. et al., 2015). Las respuestas a la inmunoterapia son más duraderas pero las resistencias adquiridas a este tratamiento pueden ser un problema. Las numerosas poblaciones celulares y la complejidad de las comunicaciones célula-célula involucradas en una respuesta inmune efectiva, hace que sea muy difícil señalar mecanismos únicos responsables de la resistencia (Sharma, P. et al., 2017).

Por otra parte, como se ha indicado al comienzo de este apartado, la presencia de otros tipos celulares y otros factores del microambiente tumoral pueden influenciar en la disponibilidad de oxígeno y nutrientes. Esto también contribuye a que las células adapten su fenotipo a las diferentes condiciones para poder crecer y sobrevivir. Aquellas zonas del tumor donde no hay una vascularización funcional, las condiciones para las células son de hipoxia y de baja disponibilidad de nutrientes. El ratio de consumo de oxígeno, está estrechamente unido a la producción de energía a partir de los nutrientes,

por lo que la disponibilidad de éstos resulta crucial para la regulación de los fenotipos en las células de melanoma.

Tanto es así que, cuando la disponibilidad de glucosa es baja, el flujo glucolítico se reduce provocando una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto hace que se induzca el Factor de Transcripción Activador 4 (ATF4) que reprime la transcripción de MITF provocando el establecimiento del fenotipo MITF<sup>low</sup>-AXL<sup>high</sup>, que es ineficiente para la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Ferguson, J. et al., 2017 y Vazquez, F., et al., 2013). En general, esto sugiere que la limitación de oxígeno y nutrientes conduce a las células a adoptar un fenotipo de “ciclo lento” que es más probable que ayude a superar las duras condiciones del microambiente tumoral. Además, en el contexto de privación de nutrientes, las células de melanoma expresan niveles más elevados del transportador de ácidos grasos, CD36 (Rambow, F. et al., 2018). Esto sugiere que en estas condiciones prima la necesidad de aumentar el consumo de ácidos grasos. En diversos estudios, se ha visto que CD36 regula la capacidad metastásica de varios tipos de cáncer, incluido melanoma (Pascual, G. et al., 2017). De esta manera, los ácidos grasos podrían estar “alimentando” la progresión del melanoma pero, hasta el momento, se desconoce el papel del metabolismo de los ácidos grasos en células de melanoma en estado de “ciclo lento”.

## 2. METABOLISMO Y MELANOMA

El melanoma es metabólicamente heterogéneo y es capaz de adaptar su programación metabólica con el objetivo de utilizar diferentes fuentes de energía para facilitar su progresión y el establecimiento de metástasis. Sin embargo, el metabolismo de un tumor es complejo y se dan “fenotipos metabólicos” que reflejan tanto las propiedades intrínsecas de las células tumorales como las interacciones entre ellas mismas y el microambiente tumoral (Fischer, GM. et al., 2018).

El metabolismo central del carbono lo conforman principalmente las siguientes rutas metabólicas: glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) o también denominado Ciclo de Krebs (CK) (Pavlova, NN. y

Thompson, CB., 2016). En las células sanas, en condiciones normales de oxígeno y nutrientes, una molécula de glucosa transcurre por el proceso de glucólisis en el citosol para producir piruvato, ATP y NADH (Lehninger, AL. et al., 2013). Posteriormente, ya en la matriz mitocondrial, ocurre la descarboxilación del piruvato por medio de la Piruvato Deshidrogenasa (PDH) donde se obtiene Acetyl-CoA. Este Acetyl-CoA se introduce en el Ciclo de Krebs donde se obtiene NADH y FADH<sub>2</sub> cuyos electrones serán utilizados en la Cadena Transportadora de Electrones (ETC), que responde transportando protones a través de la membrana mitocondrial, para la realización de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) donde se obtiene ATP. El gradiente electroquímico generado posibilita la síntesis de ATP, utilizando oxígeno como último aceptor de electrones y produciendo agua (Lodish, HF., 2000).

### 2.1. GLUCÓLISIS Y CICLO TCA

Como muchos otros tipos de cáncer, las altas tasas proliferativas de las células de melanoma requieren la metabolización de gran cantidad de glucosa. Sin embargo, el piruvato obtenido de esta glucólisis no se introduce en la mitocondria sino que se produce lactato por medio de la fermentación láctica, aún en presencia de oxígeno. Este proceso se denomina glucólisis aerobia, más conocido como el Efecto Warburg, en honor a su descubridor Otto Warburg (Warburg, O., 1928 y Scott, DA. et al., 2011). Estas altas tasas de consumo de glucosa en células tumorales proliferativas pueden suministrar el ATP necesario para la supervivencia y para la síntesis de componentes estructurales celulares básicos (Jose, C. et al., 2011). Un estudio reveló que, en condiciones de oxígeno óptimas, sólo el 25% del piruvato entraba en la mitocondria de las células de melanoma donde pasaba a Acetyl-CoA. Además, el citrato, que es uno de los intermediarios del ciclo TCA, era transportado al citosol donde se cataboliza en Acetyl-CoA y oxalacetato. Este Acetyl-CoA o bien se dirigía a la síntesis de ácidos grasos, que es crítica para la proliferación de las células, o bien se utilizaba para la acetilación de histonas en reacciones de regulación epigenética. El oxalacetato a su vez es convertido en malato, obteniéndose en esta reacción NADPH, antioxidante necesario

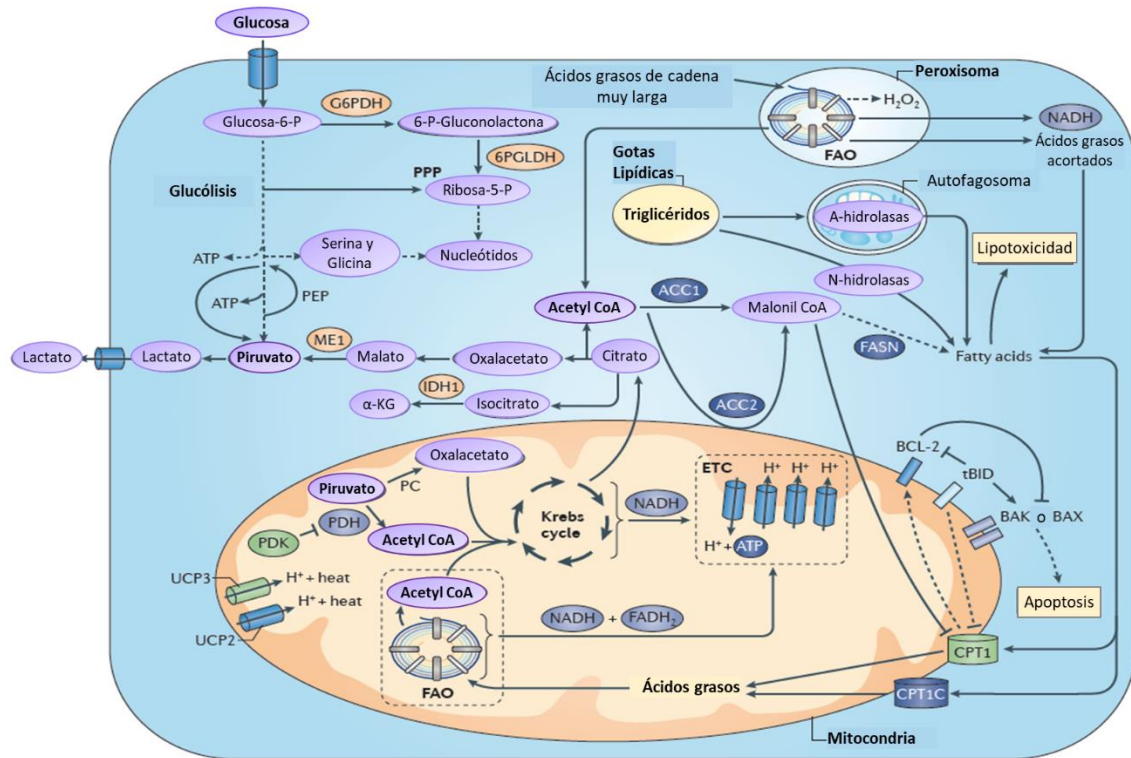


para combatir los ROS presentes en las células de melanoma (DeBerardinis, RJ, y Chandel, NS. 2016 y Ratnikov, BI. et al., 2017) (**Figura 12**).

Por otra parte, la glucólisis también es precedente de la ruta de las pentosas fosfato en las células de melanoma. A partir de esta ruta se forman las pentosas que serán utilizadas para la síntesis de nucleótidos y NADPH (Lehninger, AL. et al., 2013) (**Figura 12**).

Esta reprogramación metabólica ocurre como consecuencia de las mutaciones en los oncogenes y las alteraciones presentes en las rutas de señalización. Así pues, el efecto Warburg en el melanoma está dirigido por la activación de rutas de señalización intrínsecas, concretamente por la ruta de las MAPK. La activación de la ruta de las MAPK aumenta la transcripción del Factor Inducible por Hipoxia 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) y de MYC (Oncogén viral homólogo de mielocitomatosis aviar) (Kumar, SM. et al., 2007 y Parmenter, TJ. et al., 2014). Además, la ruta de las MAPKs induce la forma activa de HIF1 $\alpha$  por su unión con HIF1 $\beta$ , promoviendo así la glucólisis. HIF1 $\alpha$  activa una enzima inhibidora de PDH evitando que el piruvato se introduzca en el ciclo TCA para ser usado en OXPHOS (Kim, JW. et al., 2006). La ruta de las MAPK también promueve el efecto Warburg por medio de la inhibición de MITF, regulador y promotor de OXPHOS en las células tumorales (Haq, R. et al., 2013). En definitiva, la ruta de las MAPK, en las células de melanoma, promueve la glucólisis y reduce OXPHOS.

Por otro lado, la ruta PI3K-AKT también promueve el metabolismo de la glucosa en las células de melanoma ya que la fosforilación de AKT dirige la señalización mediada por mTOR, el cual promueve la transcripción y actividad de HIF1 $\alpha$  (Hudson, CC. et al., 2002 y Land, SC. y Tee, AR., 2007).



**Figura 12. Representación del metabolismo en una célula tumoral.** Fuente: Adaptado de Carracedo, A. et al., 2011.

Del piruvato obtenido como producto final de la glucólisis, y con el objetivo de mantener los niveles de NAD<sup>+</sup>, se obtiene lactato que es secretado al microambiente tumoral por MCT4 (Transportador monocarboxilado 4) (Dimmer, KS. et al., 2000) (**Figura 12**). A su vez, HIF1 $\alpha$  y MYC inducen la expresión de MCT4 para promover la secreción de lactato que, mediante la reducción del pH, altera drásticamente el microambiente tumoral facilitando la angiogénesis, promoviendo metástasis y suprimiendo el sistema inmune (Romero-García, S. et al., 2016) (**Figura 12**).

Como se ha indicado antes, la proporción de glucosa oxidada, es decir, el piruvato que entra en el ciclo TCA es reducido. En este caso, para compensar los niveles de NADPH obtenidos en el ciclo TCA, la glutamina pasa a ser clave. Para ello, ésta se transforma en glutamato el cual entra al ciclo TCA como  $\alpha$ -ketoglutarato (Carracedo, A. et al., 2013). En la mayoría de las situaciones, el potencial de las células tumorales para crecer y sobrevivir estará limitado por los niveles de NADPH citosólico. Por ello, la reprogramación metabólica tiene que abastecer eficientemente las cantidades necesarias de NADP reducido. El NADPH tiene dos funciones principales. Por un lado,

proporciona poder redox para contrarrestar el estrés oxidativo, que es crucial para la supervivencia de todas las células tumorales en condiciones de estrés metabólico. Y por otro lado, es co-enzima de enzimas anabólicas por lo que es clave en la síntesis de compuestos estructurales para la célula, sustentando así el crecimiento y la proliferación.

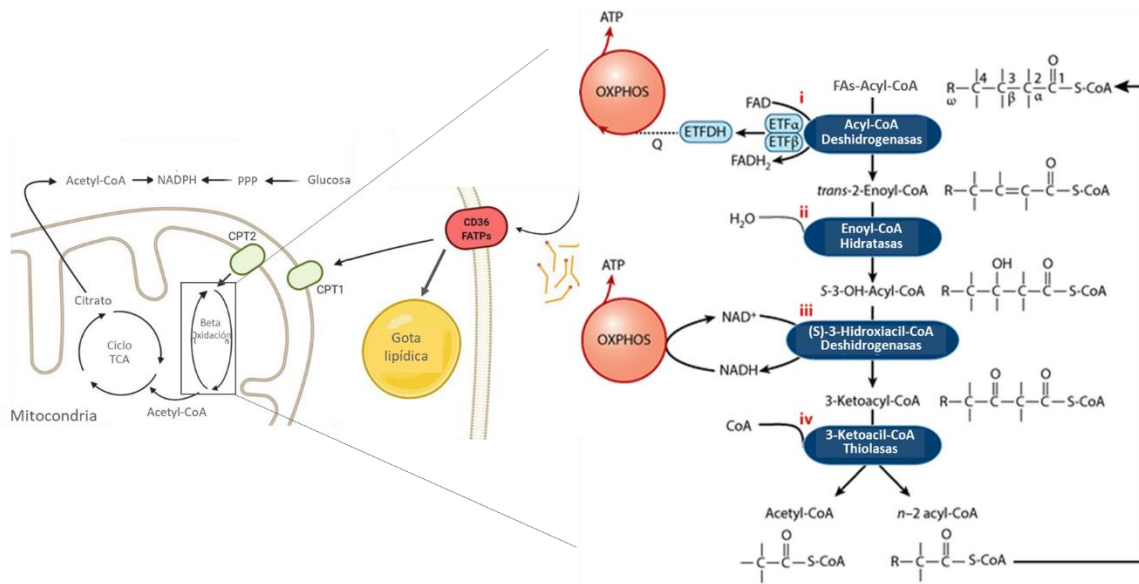
## 2.2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS

Además de la glucosa y la glutamina, los ácidos grasos (FAs, del inglés “fatty acids”) son una fuente de energía muy relevante para las células tumorales. Los FAs pueden ser incorporados del medio extracelular o pueden ser obtenidos por la hidrólisis de triglicéridos, acumulados en gotas lipídicas en el citoplasma celular (Carracedo, A. et al., 2013) (**Figura 12**). La síntesis de FAs *de novo* se requiere para la síntesis de membrana y, por consiguiente, para la proliferación y el crecimiento celular. La síntesis de FAs es un proceso anabólico que comienza con la conversión de Acetyl-CoA en malonil-CoA por la enzima Acetyl-CoA carboxilasa. El malonil-CoA es el principal precursor de los FAs que son elongados por la Ácido Graso Sintasa, FASN. Posteriormente, elongasas y desaturasas realizan modificaciones adicionales a los FAs (Lehninger, AL. et al., 2013).

Por otro lado, el catabolismo de FAs es realizado por un proceso llamado  $\beta$ -Oxidación u oxidación de ácidos grasos (FAO, del inglés). Los FAs proporcionan el doble de ATP que los carbohidratos y seis veces más cuando se comparan ácidos grasos almacenados con respecto a glucógeno, que sería la reserva equivalente de carbohidratos. A su vez, los FAs son el nutriente que preferentemente se usa para almacenaje, en forma de triglicéridos o tejido adiposo, en condiciones de abundancia de nutrientes (Carracedo, A. et al., 2013)

El proceso de  $\beta$ -Oxidación, o FAO en adelante, ocurre en la matriz mitocondrial y está compuesto por series cíclicas de cuatro reacciones de tal manera que por cada ciclo se da un acortamiento de dos carbonos de los FAs, correspondientes a una molécula de Acetyl-CoA, NADH y FADH<sub>2</sub> (**Figura 13**). El último ciclo será cuando el ácido graso lo formen cuatro carbonos de los cuales se obtendrán dos moléculas de Acetyl-CoA. El

NADH y FADH<sub>2</sub> generado serán utilizados en la ETC para la producción de ATP (Carracedo, A. et al., 2013).



**Figura 13. Transporte y metabolismo de los ácidos grasos en la célula.** A la izquierda, representación del transporte de los ácidos grasos (FAs) a la matriz mitocondrial mediante los transportadores CPT1/2 y su metabolismo mediante beta oxidación (FAO), detallada a la izquierda. El Acetyl-CoA generado de la FAO va al ciclo TCA y el citrato obtenido pasa a NADPH en el citoplasma. Fuente: Adaptación de Corn, KC. et al., 2020 y Houten, SM. et al., 2016).

El Acetyl-CoA generado en la FAO entra en el ciclo TCA, y junto al oxalacetato, generan citrato que es exportado al citoplasma (**Figura 13**). Una vez allí, puede transcurrir por dos reacciones enzimáticas que generarán NADPH. Este NADPH citosólico procedente de la FAO es crucial para que las células tumorales contrarresten el estrés oxidativo (Chiarugi, A. et al., 2012 y Carracedo, A. et al., 2013) (**Figura 13**).

Cuando las células tumorales se encuentran bajo estrés metabólico, la FAO les sirve como sustento para mantener los niveles de ATP y NADPH (Schafer, ZT. et al., 2009, Zaugg, K. et al., 2011 y Jeon, SM. et al., 2012). Se ha visto que la disponibilidad de NADPH es controlada por la ruta de AMPK (proteína quinasa activada por AMP) de tal manera que mantiene el equilibrio entre el consumo de NADPH por la síntesis de FAs y la producción de ésta por la oxidación de FAs. AMPK promueve la FAO a través de la inhibición de Acetyl-CoA carboxilasa (enzima de la síntesis de FAs) (Mihaylova, MM. y Shaw, RJ., 2011) y potencialmente a través de la regulación de la señalización de PPAR (Receptores activados por proliferadores peroxisomales) (Diradourian, C. et al., 2005).

Aunque la ruta de AMPK se cree que es supresora tumoral, su actividad es esencial para que las células tumorales detecten ambientes estresantes y para responder a ellos activando el metabolismo catabólico que aumentará las reservas de ATP y NADPH (Carracedo, A. et al., 2013).

Aunque se llegó a establecer que la FAO y la FAS son incompatibles, es decir, no pueden producirse a la vez en una misma célula, actualmente se está unificando la idea de que la FAO es una ruta esencial para las células tumorales y que la síntesis de FAs (FAS) a su vez es esencial para crecer y proliferar. Esto está determinado por la Acetyl-CoA carboxilasa que, en función de los niveles de Acetyl-CoA o malonil-CoA promueve la activación de una ruta o de la otra. Sin embargo, la FAO contribuye a la acumulación de Acetyl-CoA en el citoplasma que es necesario para iniciar la FAS, por lo que FAS y FAO podrían estar dándose soporte la una de la otra (Caro, P. et al., 2012).

Hay datos que sugieren que las células de-diferenciadas tienen mayor requerimiento por la FAO (Carracedo, A. et al., 2013), lo cual resulta interesante en el contexto del fenotipo invasivo observado en melanoma. Esto puede ser plausible ya que estas células quiescentes o de-diferenciadas tienen tasas proliferativas menores por lo que requieren una menor síntesis de membrana. Así pues, esto estaría indicando que estas células encuentran un beneficio crucial para su supervivencia en la FAO. A su vez, esta dependencia a la FAO resulta interesante ya que puede hacerles vulnerables bajo una alternativa terapéutica con la FAO como diana.

Así pues, hay dos enzimas que pueden ser claves como dianas terapéuticas. Una es CPT1 (Carnitina Palmitoiltransferasa 1), limitante para realizar la FAO ya que es la encargada de internalizar los FAs a la matriz mitocondrial. Los inhibidores de CPT1 como Etomoxir, inhibidor de la isoforma CPT1A (Lopaschuk, GD. et al., 1989), que en pacientes ha resultado en hepatotoxicidad (Holubarsch, CJ. et al., 2007), tiene prometedores efectos anti-tumorales en ratones (Samudio, I. et al., 2010). En un estudio se observó que inhibir la FAO con Etomoxir en combinación con un inhibidor de glucólisis (DCA, dicloroacetato) en ratones bajo el tratamiento con MAPKi, reducía significativamente el crecimiento de los tumores de células de melanoma con BRAF<sup>V600E</sup> (Aloia, A. et al., 2019). Por otro lado, se ha visto que, en determinados tipos de cáncer, la FAO es un requerimiento para

mantener la producción de ATP en condiciones de estrés metabólico. Así pues, Zaugg, K. *et al.* identificaron una isoforma atípica de CPT1, CPT1C, como potencial oncogén (Zaugg, K. *et al.*, 2011). CPT1 se encarga de conjugar los FAs con carnitina para que puedan ser trasladados al interior de la mitocondria para la FAO. La isoforma CPT1C se expresa normalmente en tejido cerebral, sin embargo, estos autores encontraron que se expresaba en células tumorales promoviendo la FAO, la producción de ATP y el crecimiento tumoral, posibilitando así la recuperación de las células ante el estrés metabólico.

La otra enzima interesante como diana es 3-ketoacil-CoA tiorilasa, que cataliza la última reacción de cada ciclo de la FAO. En este caso, aunque no está claramente demostrado, estaría el inhibidor Ranolazina, que está a día de hoy aprobado por la FDA para el tratamiento de la angina de pecho crónica (Nash, DT. Y Nash, SD., 2008).

Por otro lado, además de la beta oxidación mitocondrial, la FAO también puede tener lugar en el peroxisoma. Aunque ambos orgánulos pueden dar lugar a la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, tienen características distintas. En primer lugar, como se ha indicado anteriormente, el transporte de los ácidos grasos por la membrana mitocondrial requiere de un sistema de intercambio con carnitina mediante los transportadores de membrana CPT1 y CPT2 (Carnitina palmitoiltransferasas 1 y 2, respectivamente). CPT1A/B están localizados en la membrana externa mitocondrial y son el factor limitante para la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. Sin embargo, para internalizar los FAs en el peroxisoma, se requiere de transportadores dependientes de ATP, ABCDs (Transportador de casete de unión a ATP, clase D). En segundo lugar, en el primer paso de la FAO mitocondrial está involucrada la flavoenzima Acil-CoA Dehidrogenasa (ACADs) mientras que en el peroxisoma es la flavoenzima ACOXs (acil-coenzima A oxidasa), la cual es el factor limitante de la FAO del peroxisoma. Esta FAO peroxisomal puede ser inhibida por un fármaco llamado Thioridazina (THIO) (Shen, S. *et al.*, 2020). En un estudio reciente, se ha visto que el uso de la FAO del peroxisoma mediada por ACOX1 por parte de células *persister* de melanoma con BRAF mutado se asocia con peores respuestas a BRAFi/MEKi, posiblemente por la activación de PPAR alfa (Shen, S. *et al.*, 2020). Además, combinando thioridazina con los BRAFi/MEKi se redujo la aparición de resistencia (Shen, S. *et al.*, 2020).

En resumen, el estudio de la FAO en el contexto del metabolismo del cáncer puede ofrecer nuevas y prometedoras oportunidades terapéuticas, junto a una mayor comprensión del metabolismo de las células tumorales.





# ***OBJETIVOS***



Dado que la reprogramación metabólica en las células tumorales parece tener un papel importante en cuanto a la respuesta a las terapias, el objetivo general que se plantea para esta tesis es estudiar en detalle la biología de las células de melanoma, enfocándonos en la reprogramación metabólica hacia el metabolismo de los ácidos grasos y su papel en la respuesta a terapias dirigidas.

Para llevar a cabo este objetivo general, se determinan los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer un modelo *in vitro* de resistencia adquirida a inhibidores de BRAFi en células de melanoma con la mutación BRAF<sup>V600E</sup> que permita estudiar el efecto del BRAFi en la reprogramación metabólica.
2. Analizar si la oxidación de ácidos grasos (FAO) es relevante durante el desarrollo y establecimiento de la resistencia adquirida a BRAFi.
3. Estudiar la relevancia de la FAO en tumores de melanoma mediante ensayos *in vivo* y comprobar si mejora la respuesta a los BRAFi en combinación con el inhibidor de FAO Ranolazina.
4. Estudiar en detalle el transcriptoma de las células con resistencia adquirida a BRAFi tratadas con y sin Ranolazina mediante *Single-Cell RNAseq*.
5. Validar los resultados obtenidos en el estudio *Single-Cell RNAseq* mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.



# ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## 1. CULTIVO CELULAR

### 1.1. LINEAS CELULARES

Las líneas celulares de melanoma humano A375 y WM9 y de melanoma murino YUMM1.7 fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La línea celular de melanoma humano 501mel fue cedida por Steven Rosenberg (NCI, Bethesda, MD, USA) y la de melanoma murino 5555 fue cedida por Richard Marais (Universidad de Manchester, UK). Las líneas celulares murinas 5555 y YUMM1.7 se establecieron de ratones macho mientras que la línea FCT1 fue establecida a partir de tumores de ratones hembra con el perfil TyrCreERT2/BRAFCA/Ptenfl/+ condicionado por tratamiento con tamoxifeno. Las líneas humanas A375 y 501mel proceden de pacientes femeninas mientras las WM9 de un paciente masculino. Todas las líneas celulares fueron caracterizadas por última vez en 2021. Las células fueron expandidas lo suficiente como para generar un lote de viales criopreservados en nitrógeno líquido antes del comienzo del estudio.

Las líneas celulares mencionadas se cultivaron en medio DMEM-GlutaMAX (Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeco, Gibco, 1965026) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco, 10500064) y penicilina-estreptomicina 10000 U/mL (Gibco, 15140122). Estas células adherentes fueron subcultivadas cada 2-3 días mediante tratamiento con tripsina/EDTA (Gibco, 25200056).

Todas las líneas celulares se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar a 37°C de temperatura, 95% de humedad, 21% de O<sub>2</sub> y 5% de presión de CO<sub>2</sub>. Todos los procedimientos se realizaron en campanas de flujo laminar de seguridad Clase II (nivel de seguridad biológica 2; Class II Biohazard Safety Cabinet, ESCO).

## 1.2. ENSAYO DE FORMACION DE COLONIAS CONVENCIONAL

Para la realización de los ensayos de proliferación se sembraron 5000 células en 2 mL de medio de cultivo por pocillo en placas de 6 pocillos (Sarstedt, 833920005). Las células fueron separadas mediante tripsina (Gibco, 25200056) y se determinó la cantidad de células en una cámara de Neubauer (0,01 mm, Paul Marienfeld). Transcurridas 24 horas de la siembra, se modificaron las condiciones del medio de cultivo y/o se añadieron los fármacos en estudio (**Tabla 3**). Tras varios días de cultivo, según la duración del ensayo y en base a la confluencia del pocillo control, las células, lavadas previamente con PBS 1X, fueron fijadas y teñidas con 1 mL de una solución de formalina al 4% y Cristal Violeta (CV) (sigma, 61135) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras realizar 3 lavados con agua de grifo por inmersión y su posterior secado, las células fijadas y teñidas fueron disueltas con 2-3 mL de una solución en agua destilada de 25mM Tris-HCl pH 7,4 y 1%SDS durante 1 hora a 37°C de temperatura. Tras la incubación, por medio del lector multimodal Synergy H1 (BioTek, SN: 160408C) se determinó el valor de absorbancia a una longitud de onda de 590 nm en cada pocillo, que es proporcional a la cantidad de CV de cada pocillo y, por consiguiente, a la cantidad de células. Todos los ensayos de formación de colonias se realizaron en triplicado.

Fármaco	Abreviat ura	Vehículo	Función	Referencia
<b>Vemurafenib</b>	VEM o BRAFi	DMSO	Inhibidor de BRAF <sup>EV600E</sup>	MedChemExpress HY-12057
<b>Etomoxir</b>	ETO	DMSO	Inhibidor de CPT1	MedChemExpress HY-50202A
<b>Ranolazina</b>	RANO	DMSO	Inhibidor de FAO mitocondrial	MedChemExpress HY-17401
<b>Thioridazina</b>	THIO	AGUA	Inhibidor de FAO en peroxisoma	Sigma-Aldrich T9025
<b>S-Adenosinmetionina</b>	SAM	DMSO	Agente metilador	Selleckchem S5109
<b>GSK3326595</b>	PRMT5i	DMSO	Inhibidor de PRMT5	Selleckchem S8664
<b>Trametinib</b>	TRAM o MEKi	DMSO	Inhibidor de MEK	Selleckchem S2673

**Tabla 3. Fármacos y reactivos utilizados en los ensayos de formación de colonias.**



### 1.3. ENSAYO DE FORMACION DE COLONIAS CON RESISTENCIA ADQUIRIDA A MAPKi

Los ensayos de resistencia adquirida se realizaron mediante un protocolo de formación de colonias diseñado específicamente para el establecimiento de colonias resistentes a MAPKi: a BRAFi (Vemurafenib) por un lado, y a la combinación de BRAFi y MEKi (Vemurafenib y Trametinib, respectivamente), por otro.

Las células de melanoma fueron sembradas en placas de 6 pocillos en una proporción de 25000 células/pocillo. Transcurridas 24 horas, se trataron con una dosis elevada (5  $\mu$ M) de Vemurafenib durante 7 días. Posteriormente, se redujo la dosis a 0.5  $\mu$ M), refrescando el medio de cultivo y el fármaco a la dosis mencionada cada 7 días durante 4 semanas más aproximadamente, hasta el momento en el que las colonias fueron alcanzando la confluencia del pocillo. En paralelo, se añadieron los inhibidores de la oxidación de ácidos grasos Ranolazina, Etomoxir o Thioridazina y su correspondiente vehículo una vez por semana (**Tabla 4**). Para el análisis de la proliferación celular, las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta y posteriormente cuantificadas tal y como se describe en el apartado anterior “Ensayo de Formación de Colonias Convencional”. Además, para realizar el resto de análisis, las células de cada una de las condiciones de tratamiento fueron expandidas en cultivo, manteniendo la presencia de los MAPKi en el medio de cultivo. Así pues, se obtuvieron las dos poblaciones celulares principales de este estudio llamadas A375VR, células A375 con la resistencia adquirida a Vemurafenib completamente establecida, y A375 VR\_RANO, células A375 igualmente resistentes a vemurafenib pero tratadas en combinación con Ranolazina durante el proceso de adquisición de resistencia.

En la **Tabla 4** se indican las condiciones de tratamiento tanto para el ensayo de resistencia adquirida a BRAFi y MEKi en A375 como para el resto de líneas celulares donde también se ha realizado. Todos los ensayos de formación de colonias de resistencia adquirida a MAPKi se realizaron en triplicado.

Línea Celular	MAPKi	Dosis Inicial (P)	Dosis Final (S2-S4)	FAOi	Dosis FAOi
A375	VEM	5 µM	0.5 µM	RANO	100 µM
A375	VEM	5 µM	0.5 µM	ETO	100 µM
A375	VEM	5 µM	0.5 µM	THIO	2 µM
A375	VEM+TRAM	VEM 5 µM TRAM 10 nM	VEM 0,5 µM TRAM 1 nM	RAN	100 µM
501mel	VEM	10 µM	1 µM	RANO	50 y 100 µM
5555	VEM	10 µM	1 µM	RANO	50 y 100 µM
YUMM1.7	VEM	10 µM	1 µM	RANO	50 y 100 µM
FCT1	VEM	5 µM	0.5 µM	RANO	50 µM

Tabla 4. Dosis utilizadas en los ensayos de resistencia adquirida para los fármacos y líneas celulares indicados.

## 2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

### 2.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Con el objetivo de estudiar la expresión de los diferentes genes de interés en las líneas celulares o en los tejidos mediante PCR a tiempo real, se purificó el ARN de las células, a partir del cual se sintetizó ADN complementario (ADNc) mediante la reacción de retrotranscripción (RT).

Para el aislamiento del ARN se lisaron las células con 750 µL de una solución monofásica de tiocianato de guanidina y fenol, Trizol® (sigma, 93289) durante 5 minutos a temperatura ambiente mediante pipeteo vigoroso. Posteriormente, se añadieron 200 µL de cloroformo (Merck, 1.02445), se mezcló mediante inversión y se dejó actuar 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron las muestras a 12000 x g a 4°C durante 10 minutos obteniéndose tres fases bien definidas: una fase acuosa superior donde se encuentra el ARN, una interfase en la que se localiza el ADN y una fase inferior orgánica que contenía los restos de Trizol, lípidos, solventes orgánicos y las proteínas desnaturizadas. Esta separación de fases permite transferir aquella donde se encuentra el ARN (fase acuosa superior) a nuevos tubos tratados con dietilpicrocarbonato (DEPC) (Sarstedt, 72706200), descartando el resto de fases. A continuación, para precipitar los ácidos nucleicos, se añadieron 500 µL de isopropanol (Merk, 1.09634.1000) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se centrifugó a 12000 x g a 4°C durante 10 minutos y, descartando el

sobrenadante obtenido, se añadió 1 mL de etanol al 75% continuando con otra centrifugación a 12000 x g a 4°C durante 5 minutos para lavar el precipitado. Por último, se descartó el sobrenadante minuciosamente, se dejó secar el pellet durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en agua libre de nucleasas (Invitrogen, 10977035).

Posteriormente, para la eliminación de posibles restos de ADN genómico, a cada muestra se le añadió 5 µL de tampón de reacción de ADNasa-I y 1 µL de enzima ADNasa-I (Invitrogen, 18068015) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. De esta manera, se digirió cualquier resto de ADN mono o bicatenario que haya podido quedar en las muestras tras la purificación de ARN. Tras la incubación, se añadieron 5 µL de una solución de EDTA 25mM disuelto en agua libre de nucleasas y se incubó durante 10 minutos a 65°C para detener la reacción enzimática. Transcurrido este tiempo, se atemperaron las muestras en hielo y se procedió a determinar la concentración y pureza del ARN aislado mediante la cuantificación de la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Thermo Scientific, SN: H504).

En el caso del aislamiento de RNA procedente de tumores, el protocolo fue exactamente el mismo que para las líneas celulares solo que se partió de un pequeño fragmento de tumor previamente congelado. Posteriormente, el tejido tumoral fue homogeneizado en Trizol® con la ayuda de un rotor *Pellet Pestle Cordless Motor* (Kontes) y, una vez disgregado de forma homogénea, se procedió con el procedimiento detallado anteriormente.

## 2.2. RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

La retrotranscripción o transcripción reversa se realizó en un termociclador (Bio-Rad) donde, partiendo del ARN obtenido de la purificación, se obtiene ADN complementario de cadena simple (ADNc). Para ello, de cada una de las muestras se tomó el volumen correspondiente a 500 ng de ARN añadiendo agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 5 µL. A esta mezcla se le añadieron los componentes del PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa, RR037A) que consistió en 2 µL del tampón de reacción 5X (Prime Script

Buffer 5X), 0,5 µL de la enzima retrotranscriptasa (Prime Script RT Enzyme Mix), 0,5 µL de cebadores oligo(dT)s y 2 µL de hexanucleótidos aleatorios (random 6 mers) sumando un volumen final de 10 µL para cada muestra.

Las muestras fueron sometidas a los siguientes ciclos de temperatura: 15 minutos a 37°C seguido de 5 segundos a 85°C. Una vez terminada la reacción, cada muestra fue diluida en agua libre de nucleasas en proporción 1:10.

### **2.3. PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)**

Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o a tiempo real (qRT-PCR) se analizó la expresión de los distintos genes a estudiar. Esta tecnología se basa en la amplificación específica del ADNc del gen de interés en cada muestra monitorizando a su vez cada uno de los ciclos de la reacción. La PCR se llevó a cabo utilizando el equipo Quantstudio 12K FLEX (Life Technologies, SN: 285880070) y la herramienta de detección basada en el fluoróforo SYBR Green (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, Applied Biosystems, A25742), capaz de intercalarse en la doble cadena de ADN, producto de la amplificación por PCR, y emitir fluorescencia como resultado. Así pues, el aumento de señal de fluorescencia emitida será directamente proporcional a la cantidad de ADN amplificado.

La PCR se realizó por triplicado en placas de 96 pocillos (Sarstedt, 721979202) donde cada pocillo contenía 10 ng de ADNc (que corresponde con 2 µL del producto diluido de la RT) mezclados con 1 µL de cada cebador (sentido y anti-sentido) (**Tabla 5**) a una concentración final de 0,3 µM, 1 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL de SYBR Green haciendo un volumen final de 10 µL por pocillo.

Las condiciones de tiempo y temperatura llevados para la amplificación son: dos minutos a 50°C seguido de 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguido de un minuto a 60°C; tras ello, 15 segundos a 95°C, un minuto a 60°C y 15 segundos a 95°C para finalizar.

Gen	Secuencia Sentido (5'-3')	Secuencia Anti-Sentido (5'-3')
<b><i>Homo sapiens</i></b>		
<b>DUSP6</b>	CCGCAGGAGCTATACGAGTC	CGTAGAGCACCCTGTGTGCG
<b>MITF</b>	CCGTCTCTACTGGATTGGT	TACTTGGTGGGGTTTCGAG
<b>AXL</b>	AACCTTCAACTCCTGCCTTCTCG	CAGCTTCTCCTTCAGCTCTTAC
<b>NGFR</b>	CTTCTGGGGGTGTCCCTT	ACTCACCGCTGTGTGTGTA
<b>CPT1A</b>	GACGTGGGAAAATAAGCAGTC	ACATCGGCCGTGTAGTAGAGAT
<b>CD36</b>	TCCACAGGAAGTGATGATGAAC	TGCAGGAAAGAGACTGTGTTGT
<b>PPARGC1A</b>	CAGGCTGGCAGTGTGCTG	CTGCACCCTTGAGTCCACC
<b>PPARA</b>	GTCACACAACGCTATCCGTTT	AGGCATTGTAGATGTGCTTGG
<b>ACOX1</b>	GGTTTAAAAATTTTGTGCACCGAGG	CGAAGGTGAGTCCATGACCC
<b>ACADS</b>	CACGCCTTTCACCAGTGGTGAC	GGCATTGGTGTATCCAGGCTTTG
<b>EHHADH</b>	ATAGGATTGCCACGCGAGAG	TGCTAAAATACGTCTTCTGAGGT
<b>GLUT3</b>	TCCACGCTCATGACTGTTTC	GCCTGGTCCAATTTCAAAGA
<b>HK2</b>	GAGTTTGACCTGGATGTGGTTGC	CCTCCATGTAGCAGGCATTGCT
<b>GPI</b>	CTGGTAGACGGCAAGGATGTGA	TCCGTGATGGTCTTGCCTGTGT
<b>ENO1</b>	AGTCAACCAGATTGGCTCCGTG	CACAACCAGGTCAGCGATGAAG
<b>PKM2</b>	ATGGCTGACACATTCCTGGAGC	CCTTCAACGTCTCCACTGATCG
<b>NLRC5</b>	AGTGGCTCTTCCGCTTGGACAT	CGGAACCCTAAGAAGTGGCTG
<b>TAP1</b>	GCAGTCAACTCCTGGACCACTA	CAAGGTTCCACTGCTTACAGC
<b>B2M</b>	CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT	CCAATCAAATGCGGCATCTTCA
<b>PSMB9</b>	CGAGAGGACTTGTCTGCACATC	CACCAATGGCAAAGGCTGTGCG
<b>IFNA</b>	AGAAGGCTCCAGCATCTCTGT	TGCTGGTAGAGTTCGGTGCAGA
<b>IFNB</b>	CTTGGATTCTACAAAGAAGCAGC	TCCTCCTTCTGGAAGTGTGCA
<b>IFNG</b>	TGATGGCTGAACTGTCGCCAGC	ACTGGGATGCTCTTCGACCTCG
<b>PD-L1</b>	TGCCGACTACAAGCGAATTAAGT	CTGCTTGTCCAGATGACTTCGG
<b>18S</b>	GCAATTATCCCATGAACG	GGGACTTAATCAACGCAAGC
<b><i>Mus musculus</i></b>		
<b>Pd-l1</b>	TGCGGACTACAAGCGAATCACG	CTCAGCTTCTGGATAACCCTCG
<b>Ifna1</b>	GGATGTGACCTTCTCAGACTC	ACCTTCTCTGCGGGAATCCAA
<b>Ifnb1</b>	GCCTTTGCCATCCAAGAGATGC	ACACTGTCTGCTGGTGGAGTTC
<b>Ifng</b>	CAGCAACAGCAAGGCGAAAAGG	TTCCGCTTCTGAGGCTGGAT
<b>Nlrc5</b>	ACCAATGCACGTCTCCGGGGTA	TGGGTTATGGTGGGCAGGAGGG
<b>Tap1</b>	GACTCCTTGCTCTCACTCAGT	AACGCTGTACCGTTCAGGAT
<b>B2m</b>	ACAGTTCACCCGCTCACATT	TAGAAAGACCAGTCTTGTGTAAG
<b>Psmb9</b>	TACCGTGAGGACTTGTAGCGC	GGCTGTGCAATTAGCATCCCTC
<b>Cd4</b>	GAGTTCACAGAAAGATCAC	AAGGCGAACCTCTCTAA
<b>Cd8</b>	CCATGAGGGACACGAATAATAA	GAGTTCACCTTCTGAAGGACTG
<b>Cd3g</b>	CAGTCAAGAGCTTCAGACAAG	GATGGCTGTACTGGTCATATTC
<b>Cd45</b>	CCCTTCTTCTGCCTCAAAGT	GTGGATAACACACCTGGATGAT
<b>18S</b>	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	TCTTGCAAATGCTTTCGC

**Tabla 5. Secuencias de los cebadores** utilizados en las RT-qPCR tanto para genes de la especie humana (*Homo sapiens*) como de ratón (*Mus musculus*).

Para realizar una cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés se utilizaron diferentes genes a modo de control endógeno como, en este caso, 18S ARNr (ARN ribosómico) (**Tabla 5**) corrigiendo de esta forma la variación en el ADNc de los genes de interés. El cálculo de la expresión relativa de ARNm se realizó utilizando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que consiste en calcular la diferencia de los promedios obtenidos en la amplificación del gen de interés y del gen de control endógeno. Los datos se presentaron como potencia de base 2, representando el número de veces de cambio en la expresión (también denominado *Fold change*) del gen en estudio con respecto a la expresión de ese mismo gen en la muestra control, que será siempre 1.

#### **2.4. ANALISIS TRANSCRIPTÓMICO: SINGLE CELL RNAseq**

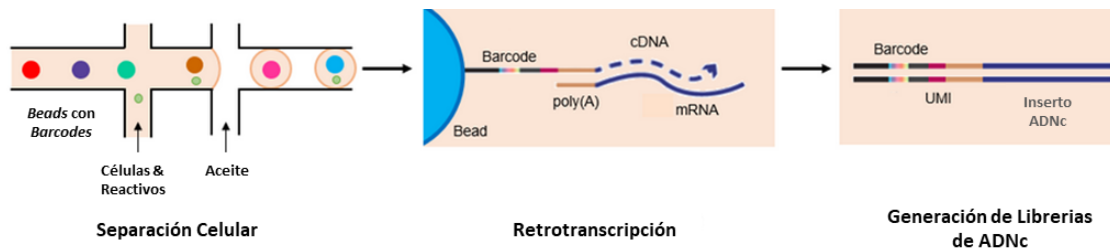
Para analizar más en detalle el transcriptoma de las células de melanoma A375 parentales y cuando han adquirido resistencia al inhibidor de BRAF, vemurafenib, en presencia y ausencia de Ranolazina (A375VR y A375VR\_RANO), se llevó a cabo un estudio de secuenciación del ARN a nivel de célula única, o también conocido como *Single Cell RNAseq* (scRNAseq, en adelante).

A lo largo de este estudio, esta técnica ha sido aplicada también en las células inmunes (CD45+) procedentes del estroma tumoral de los tumores subcutáneos generados con células 5555 en ratones tratados durante 17 días con antiPD-L1 en presencia y ausencia de RANO (ver apartado 5. Experimentos in vivo).

Estos ensayos han sido realizados en colaboración con el CNAG-CRG de Barcelona para el procesamiento y secuenciación de las muestras, y con la Unidad de Bioinformática del IRB de Barcelona para el análisis y procesamiento de los datos obtenidos en la secuenciación.

Para llevar a cabo la técnica de scRNAseq, se aíslan y encapsulan las células a analizar de forma individual de tal forma que cada una de ellas queda embebida en una gota que contiene unas esferas (*beads*) de hidrogel con diferentes “etiquetas” o *barcodes* en su superficie, así como los reactivos necesarios para la retrotranscripción (**Figura 14**). Posteriormente, se realiza una lisis celular que libera las moléculas de ARNm las cuales

se unen mediante la cola poli-A a la cola poli-T presente en las *beads*. Seguidamente, tiene lugar la retrotranscripción de tal forma que cada transcrito queda codificado con el *barcode* de la célula que procede y, además, de una secuencia única identificadora para cada transcrito llamada UMI (*Unique Molecular Identifier*). Este *pool* de ADNc es amplificado generándose así las librerías de secuenciación que posteriormente serán procesadas y analizadas (**Figura 14**).



**Figura 14.** Representación esquemática del protocolo a seguir para la preparación de las librerías de secuenciación por *Single Cell RNAseq*.

#### 2.4.1. Análisis scRNAseq de A375

Como se ha mencionado arriba, se llevó a cabo un estudio scRNAseq en las poblaciones celulares A375 parentales, A375VR y A375 VR\_RANO, procesándose dos réplicas de cada una de las poblaciones con el equipo *Chromium Next GEM Single Cell 3' Kit v3.1* (10X Genomics). Para ello, se generaron las librerías de las poblaciones de tal forma que cada una de las células queda marcada con una etiqueta única de oligonucleótidos que permite identificarla de forma específica. Cada una de las lecturas de secuenciación o “*read*” fueron alineadas con *refdata-gex-GRCh38-2020-A* utilizando el software *CellRanger* versión 4.0.0. Los posteriores análisis de los datos obtenidos se realizaron con *Seurat* (versión v4.1.1).

Para el análisis se tuvieron en cuenta únicamente los resultados de secuenciación de las células con un contenido de lectura mitocondrial menor al 20%, con un mínimo de 1000 *reads* y los de células donde se detectaron entre 100 y 20000 genes. Así pues, fueron descartados los datos que mostraban dobletes celulares y resultados negativos. También fueron descartados los datos de las lecturas ribosomales que supusieron el 10% del total de los *reads* celulares.

Para el establecimiento de los clústeres y los UMAP, es decir, para agrupar las células con un perfil transcriptómico similar, se usaron los primeros 10 componentes principales de cada set de datos mediante la función de Seurat *FindClusters* (resolución = 1.2). Además, para todas las células, se calcularon las “puntuaciones” de sus firmas génicas mediante la expresión promedio de los genes que las constituyen. Para identificar los genes diferencialmente más expresados se utilizó la función de Seurat *FindAllMarkers* con los siguientes parámetros: *min.pct* = 0.25 y *logfc.threshold* = 0.25, y considerando como clases de identidad los clústeres de Seurat o los tratamientos del estudio. Para algunas de las funciones biológicas, las células con alta expresión se destacaron como células por encima del percentil 90 en la distribución de las puntuaciones de las firmas génicas que se han observado en todo el conjunto de datos obtenido. Los genes marcadores fueron obtenidos de las poblaciones con mayor expresión usando la función de Seurat *FindMarkers* (*min.pct* = 0.2, *logfc.threshold* = 0.2), considerando sólo los primeros 200 genes con la expresión diferencial más alta. Estos sets, diferencialmente expresados, fueron probados para analizar el enriquecimiento biológico con test hipergeométricos usando las bases de datos de firmas génicas como *Hallmarks*, *Gene Ontology* (GO), *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) así como otras previamente publicadas. Los valores de significancia (*p-values*) fueron corregidos por comparaciones múltiples usando la herramienta *Benjamini–Hochberg*.

Los análisis realizados en este estudio (a partir de los datos normalizados y de la integración para el enriquecimiento biológico) se hicieron de forma independiente con dos sets de datos de las distintas poblaciones. Por un lado, se compararon los datos de las tres poblaciones celulares analizadas (A375 parentales, A375VR y A375 VR\_RANO) y, por otro, sólo las poblaciones VR frente a las VR\_RANO. En cada uno de los resultados explicados más adelante se especificará a qué tipo de análisis comparativo se ha recurrido.



#### 2.4.2. Análisis scRNAseq del estroma inmune tumoral

Como se ha mencionado al comienzo de este apartado, también se llevó a cabo el análisis por scRNAseq de las células obtenidas del estroma tumoral procedente de los tumores formados por las células 5555 en ratones tratados con antiPD-L1 en ausencia o presencia de Ranolazina durante 17 días. Este procedimiento se llevó a cabo en colaboración con el equipo de la Dra. Berta Sánchez-Laorden.

Para ello, tras el sacrificio de los animales, se obtuvieron los tumores generados por la inyección subcutánea de las células de melanoma de ratón con BRAF mutado 5555 tal y como se indica en el apartado 5.2. Experimento *in vivo* con células 5555 e inmunoterapias. Con ayuda de un bisturí se disgregó mecánicamente una porción de tumor de 100 mg aproximadamente en medio DMEM frío, sin suero bovino fetal ni antibióticos y en hielo. Con la finalidad de disgregar más eficientemente el tejido tumoral, se añadió 0.25 mg/mL de Liberasa DH (Merck, 54010544001), 0.55 mg/mL de Dispasa II (Merck, 4942078001) y 150 U/mL de ADNasa (Roche, 11284932001) en un volumen final de solución de 1 mL. Esta mezcla fue incubada durante 30 minutos a 37 °C y después se homogeneizó pasando la mezcla a través de jeringas de calibre ascendente hasta alcanzar el calibre de 25G. Tras ello, se centrifugaron las muestras a 400 x g durante 5 minutos a 4 °C y, posteriormente, se añadió el tampón de lisis de células rojas 1X (Biolegend, 420301) durante 5 minutos a temperatura ambiente, permitiendo lisar los eritrocitos sin apenas afectar a los leucocitos. Seguidamente, la suspensión celular fue filtrada mediante filtros con un tamaño de poro de 40 µM. Tras centrifugar de nuevo a 300 x g a 4 °C durante 5 minutos, el *pellet* celular obtenido se resuspendió en el tampón para FACS (1% FBS estéril y filtrado, 2mM EDTA y 25mM HEPES en PBS 1X) donde se añadió también el anticuerpo TruStain FcX™ PLUS (Biolegend, 156604) en proporción 1:50 y fue incubado durante 10 minutos en hielo y protegido de la luz. Este anticuerpo se une de forma específica a un epítipo común para CD16 y CD32, que son los llamados receptores Fc (FcR) de IgG de baja afinidad y se encuentran en la superficie de ciertas células inmunitarias como los linfocitos B, monocitos, macrófagos, células NK, granulocitos, mastocitos y células dendríticas. A estos receptores FcR se unen complejos anticuerpo-antígeno desencadenando la

activación de la respuesta inmune. El uso de este anticuerpo es útil para bloquear uniones inespecíficas de inmunoglobulinas a los receptores Fc.

Así pues, tras el bloqueo, se procedió con la incubación del anticuerpo de interés, en este caso, anti CD45-PE (Biolegend, 103106) en proporción 1:100 y también se realizó la tinción nuclear con 1µg/mL de DAPI, incubando 30 minutos en hielo y protegido de la luz. La unión de este anticuerpo en la suspensión celular de los lisados tumorales permitió la identificación y separación por FACS de forma específica de los leucocitos. Finalmente, transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas dos veces con el tampón de FACS centrifugando a 300 x g a 4 °C durante 5 minutos.

A continuación, las muestras fueron procesadas por el FACS de tal forma que las células CD45-PE+ fueron separadas en tubos individuales (15000 células por tubo) según el grupo de tratamiento del que procedían, antiPD-L1 o antiPD-L1 + RANO. Tanto la integridad celular como la cantidad de células fueron comprobadas en cada condición mediante *Trypan Blue* (Lonza, 17-942E), que permite identificar las células vivas y las muertas en un microscopio de campo claro usando una cámara Neubauer.

Las células vivas positivas para CD45-PE se encapsularon en gotas formando así las librerías utilizando el kit comercial de Reactivos para *Single Cell* siguiendo las instrucciones del fabricante (10X Genomics, PN-1000269, versión v.3.1).

Las librerías generadas fueron secuenciadas utilizando el equipo secuenciador Illumina NovaSeq 6000 obteniéndose unas 40000 lecturas por célula. Estas lecturas de secuenciación fueron alineadas a refdata-cellranger-mm10-3.0.0 usando CellRanger versión 4.0.0. Al igual que en el apartado anterior, todos los análisis realizados posteriormente se hicieron con el software Seurat R en la versión v4.1.1. De igual forma, en este caso, sólo se tuvieron en cuenta para los análisis aquellas células con un contenido de lecturas mitocondriales menor al 20% y con un mínimo de 2000 lecturas. Las lecturas ribosomales, que supusieron un 19% de todas las lecturas celulares, también fueron descartadas para los análisis. Los 15 primeros componentes principales de los sets de datos obtenidos se usaron para establecer los UMAP y generar los clústeres de células con la función de Seurat *FindClusters* (resolución 1.2). Los diferentes

clústeres de Seurat fueron caracterizados por la expresión de genes marcadores de los distintos tipos celulares usando las bases de datos de *Enrichr* y *Panglao DB*.

### 3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

#### 3.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las células se recogieron por centrifugación de 5 minutos a 1500 rpm formando un *pellet* que, tras eliminar el sobrenadante, se lavó con PBS 1X. Al *pellet* se le añadió entre 100 y 150  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis RIPA (2.5M NaCl, 0,5 EDTA, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 1%, SDS 1%, pH 8.0) suplementado con inhibidores de proteasas, Aprotinina (1:1000) y Leupeptina (1:500), e inhibidores de fosfatasa phosSTOP (Roche, 4906845001). La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos para lograr la lisis celular, mezclándola mediante vortex cada 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 12000 x g (RCF) durante 10 minutos y a 4°C de temperatura para precipitar el material no solubilizado. Los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación contienen el extracto proteico de las células, los cuales se trasvasaron a nuevos tubos.

La concentración de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinónico (BCA) Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23227). Este compuesto forma un complejo púrpura intenso que absorbe luz a 562 nm de tal forma que la absorbancia del compuesto será directamente proporcional a la concentración de proteína. Para ello, se incubó 5  $\mu\text{L}$  de muestra de extracto proteico con BCA durante 30 minutos a 37°C y se cuantificó la intensidad colorimétrica de las muestras mediante la medición de la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro (lector de placas Epoch, Biotek SN: 1412178; software GEN5). Para determinar la concentración de proteína en las muestras, se realizó una recta patrón con los valores de absorbancias obtenidos de concentraciones crecientes conocidas (0,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de muestras de albúmina de suero bovino (BSA). Así pues, en base a la recta patrón obtenida se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos en las mediciones de las muestras calculando así la concentración de cada una ellas.

### 3.2. WESTERN BLOT

Una vez cuantificados los extractos proteicos, se toma el volumen de muestra correspondiente a 40 µg de proteína y se le añade una cuarta parte de tampón de carga. La mezcla se incuba durante 5 minutos a 95°C para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente, las proteínas son separadas por peso molecular mediante SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) utilizando una fuente de alimentación (BioRad HC Power Pac) y tampón de electroforesis (20 mM Tris, 0.2 M glicina, 0.1% SDS y pH 8.3). Esta técnica se basa en la utilización de geles de poliacrilamida (BioRad, 1610158), que contienen SDS para conferir carga negativa a las proteínas, por lo que éstas se separan en función de su peso molecular al aplicar una diferencia de voltaje. Se realizaron geles de acrilamida de 1,5 mm de grosor compuestos por dos porciones. Por un lado, una porción concentradora (con un 4,5 % de acrilamida) y una porción separadora en la que el porcentaje de acrilamida depende del peso molecular de las proteínas a detectar (8-15%), ya que cuanto mayor sea el porcentaje de acrilamida más pequeño será el poro, permitiendo así la detección de proteínas más pequeñas.

Posteriormente, una vez que las proteínas se han separado por tamaños, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, 1620112), la cual tiene carga positiva por lo que, junto a la carga negativa de las proteínas y aplicando una diferencia de potencial, éstas migran y quedan inmovilizadas en la membrana. Este proceso se realizó mediante electrotransferencia húmeda basada en una corriente eléctrica y empleando un tampón de transferencia (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 1% SDS, 20% metanol y pH 8.6) durante 75 minutos a un amperaje constante de 350 mA. La eficacia de la transferencia se comprobó con la tinción de las proteínas transferidas en la membrana con Rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich, P7170). A continuación, para bloquear las partes de la membrana que no han unido proteínas y evitar así la unión inespecífica de los anticuerpos que se usarán más adelante, se incubó la membrana con una solución de Tris-salino (20mM Tris, 150mM NaCl) con 0.01% Tween-20 (Sigma-Aldrich, P5927-500) (TBS-T) con 5% de leche en polvo (Nestle, 44089868) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

Tras el bloqueo, se incubaron las membranas de nitrocelulosa con los diferentes anticuerpos primarios en una solución de TBS-T con 1,5% de BSA (Sigma-Aldrich, A2153) a 4°C en agitación durante 15-18 horas, según las especificaciones de sus hojas técnicas (**Tabla 6**).

Transcurrido el tiempo de incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 6**) durante una hora, a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) fueron preparados a una dilución 1:2000 en TBS-T y 5% de leche en polvo. Tras la incubación, se realizaron tres lavados de las membranas durante 10 minutos con TBS-T.

Para la detección de las proteínas se utilizó el sistema de quimioluminiscencia Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher, 32106), que está basado en la oxidación del luminol por parte de la peroxidasa de los anticuerpos secundarios. La señal lumínica emitida de la reacción fue detectada con el equipo ChemiDoc MP System (Bio-Rad) y el software Image Lab (Bio-Rad) con el que se obtuvieron y analizaron las imágenes obtenidas.

Anticuerpo	Especie	Dilución uso	Referencia
<b>Anticuerpos primarios</b>			
<b>pJAK1 (Y1034/1035)</b>	Conejo	1:500	Cell Signaling, 74129T
<b>pJAK1 (Y1022/1023)</b>	Conejo	1:500	Cell Signaling, 3331S
<b>pSTAT1 (Y701)</b>	Conejo	1:500	Cell Signaling, 7649T
<b>pSTAT3 (S727)</b>	Conejo	1:500	Cell Signaling, 9134T
<b>ERK2</b>	Ratón	1:1000	Santa Cruz, sc-1647
<b>Anticuerpos secundarios</b>			
<b>Anti-conejo IgG, HRP-linked</b>	Conejo	1:2000	VWR-GE Healthcare, NA934
<b>Anti-ratón IgG, HRP-linked</b>	Ratón	1:2000	VWR-GE Healthcare, NA931

**Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el análisis de proteínas mediante Western Blot.**

### 3.3. INMUNOFLUORESCENCIA

El análisis de expresión de las proteínas CD8a y CD335 mediante inmunofluorescencia en los tumores obtenidos de los ratones tratados durante 16 días con antiPD-L1 en

presencia y ausencia de Ranolazina fue realizado en colaboración con el equipo de la Dra. Berta Sánchez-Laorden (CSIC, Alicante).

Para ello, los tejidos fueron fijados con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15-18 horas y, tras ello, se lavaron tres veces con PBS 1X. Posteriormente, con el objetivo de proteger los tejidos de la congelación, se trataron con sacarosa en concentraciones crecientes hasta el 30%. Después, se incluyeron en el compuesto Tissue-Tek® O.C.T.™ (Tissue-Tek, 127217), que es un medio de inclusión formado por glicoles y resinas hidrosolubles que proporcionan una matriz adecuada en la muestra para su posterior corte en el criotomo. Una vez se incluyeron las muestras en lo que se llamará a partir de ahora “bloques OCT”, fueron congeladas a -80 °C hasta su procesamiento. Los bloques OCT se cortaron en secciones de 8 µm mediante un criotomo (Leica CM1860 UV) y se procedió al montaje en porta-objetos Superfrost (Fisher Scientific, 12-550-15). Posteriormente, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario se realizó el bloqueo de las muestras mediante la incubación durante una hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo (3% BSA, 1% de suero normal de cabra (NGS) y 0.1% Tween 20). Transcurrido ese tiempo, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios en una solución de 1% BSA y 0.1% Tween 20 durante 15-18 horas a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron CD8a-FITC (Biolegend, Ref 100705) y CD335-FITC (Biolegend, Ref 137605).

Tras la incubación del anticuerpo primario y numerosos lavados con 0.1% Tween 20 en PBS 1X, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario AF488 anti-Rat (Thermo Fisher, A11006) y se realizó la tinción de núcleos con DAPI en una solución con 1% BSA y 0.1% Tween 20 durante una hora y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido esto y, tras realizar lavados, se procedió al montaje de las secciones utilizando el medio de montaje Dako Fluorescence Mounting Medium (Thermo Fisher, S3023).

Para realizar las imágenes en alta resolución, se utilizó un microscopio confocal LSM880-Airyscan (Zeiss) y la técnica de Airyscan de alta resolución. Por otro lado, para realizar las imágenes de las muestras de tejido completo se utilizó el escáner de portaobjetos Axioscan 7 (Zeiss) y el software Arivis 4D software (Zeiss) para su posterior cuantificación. El porcentaje de células positivas resultó de la relación entre el número

de células positivas para CD8a y CD335 y el número total de células con la tinción nuclear DAPI.

### 3.4. CITOMETRÍA DE FLUJO

La expresión de proteínas, tanto de superficie como intracelulares, se analizó también mediante la técnica de citometría de flujo. Para ello, las células de melanoma A375VR y VR\_RANO una vez recogidas y lavadas con PBS 1X, fueron marcadas con anticuerpos conjugados con un fluorocromo, de manera que al unirse a la proteína de interés, emitirá una señal fluorescente captada y cuantificada por el citómetro. Las proteínas analizadas mediante dichos anticuerpos conjugados fueron PD-L1 (Biolegend, Clon 29E.2.A3 Ref. 329708) con fluorocromo APC y B2M marcado con FITC (Biolegend, Clon 2M2, Ref. 316304). Para realizar el marcaje, las células se incuban con los anticuerpos con la proporción 1:50 en un volumen final de 50 µl durante 10 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS 1X y, tras centrifugación, el *pellet* celular fue resuspendido en un volumen de 100 µl de PBS 1X para proceder a su análisis mediante el citómetro de flujo. El posterior análisis de los resultados obtenidos se realizó con el software FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

## 4. ANALISIS METABOLICOS

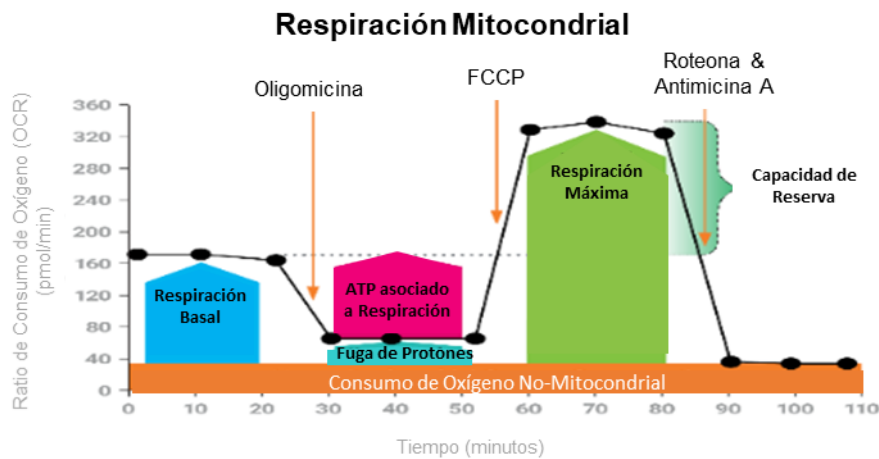
### 4.1. ANALISIS DEL FLUJO METABOLICO

Para estudiar en detalle cómo los fármacos inhibidores de la oxidación de ácidos grasos estaban afectando metabólicamente a las células se utilizó la técnica basada en la tecnología *Seahorse*. En concreto, esta técnica permite analizar la tasa de consumo de oxígeno de las células (OCR) lo que representa los niveles de respiración mitocondrial, así como la producción de ATP y la tasa de acidificación extracelular o también conocido como ECAR, que refleja las tasas de glucólisis de las células (**Figura 15**). Estos ensayos se realizaron en el Servicio de Metabolismo Celular del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA, Pamplona).

Las células fueron sembradas en una densidad de 10000 células por pocillo en las placas Seahorse XFp (Agilent, 103727-100) en 80  $\mu$ L de medio DMEM y en presencia de Vemurafenib a 0,5  $\mu$ M. Transcurridas 24 horas, se realizó un cambio de medio añadiendo a cada pocillo el medio Seahorse XF DMEM con pH 7.4. A continuación, se realizó una incubación de 45 minutos a 37°C y 0% CO<sub>2</sub> y se añadió o bien Etomoxir a una concentración de 20  $\mu$ M o bien Ranolazina (a las concentraciones indicadas en el apartado de Resultados), incubando durante 15 minutos más, completando así una hora de incubación previa a la monitorización de los distintos parámetros con el analizador de flujo extracelular Seahorse XFp (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA).

Los niveles basales de OCR y ECAR se registran por el analizador al inicio del ensayo antes de añadir mediante inyecciones secuenciales cuatro compuestos que darán lugar al perfil de flujo metabólico, posibilitando ver diferencias entre los tratamientos o las condiciones a estudiar (**Figura 15**). En primer lugar, se añade 1  $\mu$ M de Oligomicina (Sigma-Aldrich, 75351) la cual bloquea la cadena transportadora de electrones (ETC) y la fosforilación oxidativa mediante su unión a la enzima ATP sintasa, correspondiente al complejo V de la ETC. Este bloqueo de la ETC hace que disminuya la OCR y permite calcular qué porción de la respiración mitocondrial basal se invierte en producir ATP. El siguiente compuesto es el FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona), añadido a 1  $\mu$ M (Sigma-Aldrich, C2920). Se trata de un agente que colapsa el gradiente de protones alterando el potencial de membrana mitocondrial, haciendo que el flujo de electrones a través de la ETC se desbloquee y que el consumo de oxígeno por parte del complejo IV llegue a niveles máximos. El valor de OCR máxima resultante de ello permite calcular, junto a la respiración basal, la capacidad que las células tienen para responder a incrementos de la demanda energética o a un estrés metabólico (*spare capacity* o capacidad de reserva) (**Figura 15**). La tercera inyección se corresponde a una mezcla de 0,5  $\mu$ M Rotenona (Sigma-Aldrich, 557368), inhibidor del complejo I de la ETC, y de 0,5  $\mu$ M Antimicina A (Sigma-Aldrich, A8674), inhibidor del complejo III. Esta combinación hace que la respiración mitocondrial se bloquee completamente permitiendo calcular la respiración no mitocondrial dirigida por procesos localizados fuera de la mitocondria (**Figura 15**).





**Figura 15. Perfil de OCR obtenido mediante la tecnología *Seahorse*.** Representación del perfil de flujo metabólico obtenido al analizar el Ratio de Consumo de Oxígeno (OCR) en un ensayo de Seahorse, tras la administración de los diferentes compuestos moduladores de la ETC. Fuente: Adaptado de Guía de Usuario del Kit Seahorse XF (103015-100).

Adicionalmente, se puede añadir un quinto compuesto, 2-DG a 125 mM (Sigma-Aldrich, D8375), que tendrá efecto en el parámetro ECAR. 2-DG es un compuesto análogo a la glucosa y compite con ésta por su unión a la hexoquinasa, que es la enzima que lleva a cabo la primera reacción de la glucólisis, inhibiendo la ruta. Esto tiene como resultado un descenso del ECAR lo que confirma que el ECAR detectado en el ensayo es debido a la glucólisis llevada a cabo en las células y no a otras fuentes de acidificación extracelular.

Tanto los datos de OCR como los de ECAR son normalizados con respecto a la cantidad de proteína en cada pocillo, la cual es determinada mediante el método Bradford (Bio-Rad, 5000001).

#### 4.2. ANÁLISIS DE METABOLÓMICA Y LIPIDÓMICA

Con el objetivo de caracterizar en detalle el estado metabólico de las células de melanoma en el contexto de resistencia adquirida a BRAFi en combinación con la inhibición de la FAO por Ranolazina, se llevó a cabo un estudio del metaboloma y el lipidoma de las células A375 parentales junto a las VR y VR\_RANO. Estos análisis fueron realizados en colaboración con el grupo del Dr. Angelo D'Alessandro, en la Universidad de Colorado, EEUU.

Así pues, estos análisis de metabolómica y de lipidómica consisten en estudiar de forma muy detallada todos los metabolitos o especies lipídicas, respectivamente, presentes en una población celular y así poder inferir las vías o rutas metabólicas que las relacionan. Los metabolitos o especies lipídicas celulares son identificadas y cuantificadas mediante espectrometría de masas.

#### **4.2.1. Preparación de las muestras**

Para preparar las muestras, se preparó una suspensión celular de cada una de las poblaciones a estudiar con aproximadamente 4 millones de células. Tras lavar con PBS 1X y centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm, el *pellet* resultante fue congelado a -80 °C hasta su procesamiento.

Los *pellets* congelados de cada una de las muestras, se resuspendieron a una densidad de 2 millones de células/mL en una solución en agua de Metanol y Acetonitrilo en proporción MeOH:MeCN:H<sub>2</sub>O (5:3:2, v:v:v) para el análisis metabolómico. En el caso del análisis lipidómico, se realizó a la misma densidad celular pero éstas fueron resuspendidas en 100% Metanol. Ambas suspensiones celulares se sometieron a agitación vigorosa durante 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 18,213 x g durante 10 minutos a 4°C de tal forma que el material insoluble se localizó en el fondo de los tubos y, el sobrenadante obtenido, fue transferido a nuevos tubos a partir de los cuales se realizó el análisis mediante UHPLC-MS (Cromatografía Líquida de Ultra Alta Presión y Espectrometría de Masas).

#### **4.2.2. Análisis de Datos**

El sistema de Cromatografía Líquida Vanquish UHPLC (Thermo Fisher, VQDUO-DUALLC) se acopló al Espectrómetro de Masas Q Exactive (Thermo Fisher, 0725500) para el análisis de las Oxilipinas, que son unos metabolitos secundarios con estructuras y actividades biológicas diversas que se originan de la oxidación de ácidos grasos, principalmente del ácido linoleico y linoléico. Para el análisis metabolómico, el sistema de cromatografía citado arriba se acopló al Espectrómetro de Masas Orbitrap Exploris 120 (Thermo Fisher, BRE725531).

Los metabolitos fueron separados a través de las columnas Kinetex SB-C18 de 1.7  $\mu\text{m}$  con dimensiones 2.1 x 150 mm (Phenomenex, 00F-4475-AN) usando un gradiente de fase reversa durante 5 minutos tal y como se describió previamente (Nemkov, T. et. al., 2019). Para las oxilipinas, las muestras fueron procesadas durante 7 minutos de gradiente a través de las columnas Acquity UPLC BEH de 1.7  $\mu\text{m}$  y dimensiones 2.1 x 100 mm (Waters, 17600864). El procesamiento de las muestras fue en orden aleatorio y se incluyeron replicados técnicos para asegurar la calidad del ensayo.

El procesamiento de todos los datos de metabolitos obtenidos se realizó con el software El-Maven (Elucidata) y se utilizó la base de datos KEGG para la asignación e integración. La asignación e integración de los lípidos se llevó a cabo usando la herramienta LipidSearch v 5.0 (Thermo Fisher).

### 4.3. ANALISIS DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)

Para analizar el impacto de la Ranolazina en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células de melanoma, se utilizó el kit comercial *DCFDA/H<sub>2</sub>DCFDA-Cellular ROS Assay Kit* (Abcam, ab113851). Para ello, se sembraron 25000 células A375VR por pocillo en placas negras con fondo claro de 96 pocillos y, transcurridas 24 horas se procedió al tratamiento con Ranolazina y análisis de la producción siguiendo el protocolo como indica el fabricante.

En resumen, el siguiente día de la siembra celular, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con 100  $\mu\text{L}$ /pocillo del Buffer 1X del kit. Una vez retirado el Buffer 1X, se añadió una solución de DCFDA a 20  $\mu\text{M}$  preparada justo antes de ser utilizada y se incubó durante 45 minutos a 37 °C y en oscuridad. DCFDA es una sonda fluorogénica que, por difusión, se introduce en las células donde es de-acetilada mediante esterasas que la transforman en un compuesto no fluorescente. Este compuesto es posteriormente oxidado por los ROS presentes en las células, formándose 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). DCF es un compuesto altamente fluorescente que será detectado después por el espectrómetro de fluorescencia.

Así pues, tras la incubación con la sonda DCFDA, se realizó un lavado con el Buffer 1X y posteriormente se añadió el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Ranolazina así como de TBHP a 100  $\mu\text{M}$ , que es un inductor de la producción de ROS por lo que se usó como control positivo. Una vez añadidos los fármacos, se incubaron durante un total de 4 horas y se procedió a realizar la lectura de la fluorescencia mediante un espectrómetro lector de placas Synergy H1 (BioTek, SN: 160408C) a una longitud de onda emisión/excitación de 485/535 nm. Así pues, la cantidad de fluorescencia detectada será directamente proporcional a la cantidad de ROS presente en las células A375VR.

#### **4.4. ANALISIS DEL CONSUMO DE GLUCOSA CELULAR**

Por otro lado, para ver los niveles basales de captación de glucosa por parte de las células A375VR comparadas con las VR\_RANO, se empleó el kit comercial *Glucose Uptake-Glo Assay Kit* (Promega, J1341) mediante el cual se determina la captación de glucosa por la detección de la molécula 2-Deoxiglucosa-6-fosfato (2DGP).

En placas negras con fondo claro de 96 pocillos se sembraron 25000 células VR o VR\_RANO por pocillo. Al día siguiente, siguiendo el protocolo del fabricante, se realizó un lavado con 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de PBS 1X para eliminar los restos de glucosa presente en el medio de cultivo. Posteriormente, se añadió 50  $\mu\text{L}$ /pocillo de una solución de 1 mM 2-deoxiglucosa (2DG) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El compuesto 2DG se internaliza en las células y rápidamente es defosforilado como si fuera glucosa. Sin embargo, las enzimas que normalmente metabolizan la Glucosa-6-fosfato no son capaces de hacerlo cuando se trata de 2DG-6-fosfato (2DG6P). Esto provoca que este analito se acumule en el interior de las células.

Transcurrido el tiempo de incubación del 2DG, se añadió 25  $\mu\text{L}$ /pocillo de *Stop Buffer* que consiste en una solución de detergente ácida que provoca la lisis celular, parando así el consumo de glucosa y degradando las moléculas de NADPH presente en las células. Tras ello, se añadió 25  $\mu\text{L}$ /pocillo del Buffer de Neutralización que presenta un pH elevado lo que hace que se neutralice la mezcla donde se encuentra el lisado celular. Seguidamente, se añadió 100  $\mu\text{L}$ /pocillo del Reactivo de Detección 2DG6P atemperado

y se incubó durante 5 horas a temperatura ambiente. El reactivo de detección contiene glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), NADP<sup>+</sup>, Reductasa, *Ultra-Glo™* Luciferasa Recombinante y proluciferina. De esta forma, G6PDH oxida a 2DG6P formando 6-fosfodeoxigluconato y simultáneamente reduce NADP<sup>+</sup> a NADPH. La reductasa utiliza ese NADPH para convertir la proluciferina en luciferina y poder así cuantificar mediante un lector de placas Synergy H1 (BioTek, SN: 160408C) la señal luminiscente, que será proporcional a la concentración de 2DG6P y, por consiguiente, a un mayor consumo de glucosa por parte de las células.

## 5. EXPERIMENTOS IN VIVO

En este trabajo se han desarrollado dos tipos de experimentos *in vivo* principalmente. Por un lado, se realizó la inyección subcutánea de las células de melanoma humano con BRAF<sup>V600E</sup>, A375, en ratones inmunodeprimidos FOXn1<sup>nu</sup>/ FOXn1<sup>nu</sup> para ser tratados con el inhibidor de BRAF, Vemurafenib, y con Ranolazina. Y, por otro lado, se inyectaron las células de melanoma de ratón 5555 con la mutación en BRAF<sup>V600E</sup> en ratones inmunocompetentes, C57BL/6J, para comprobar si la combinación de RANO y antiPD-L1 mejora la respuesta a inmunoterapias.

Ambos experimentos se llevaron a cabo tanto en ratones machos como hembras y, además, se realizaron en diferentes instalaciones y en colaboración con diferentes grupos de investigación. Así pues, el experimento con las células A375 en ratones hembra fue realizado en colaboración con el grupo de Oncología Celular del Instituto de Investigación Biodonostia de San Sebastián, donde el Dr. Ander Matheu es investigador principal. Los estudios *in vivo* con células A375 en ratones macho los llevamos a cabo en el grupo de Señalización en Cáncer en las instalaciones del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA, Pamplona). Por otro lado, los experimentos *in vivo* con las células de melanoma murino 5555, tanto para machos como hembras, fueron realizados en colaboración con el equipo de la Dra. Berta Sánchez-Laorden del Instituto de Neurociencias CSIC en San Juan de Alicante.

Así pues, todos los protocolos y procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética correspondiente a cada centro de trabajo: Comité de Ética de experimentación animal del Instituto de Investigación Biodonostia, Comité de Ética para la experimentación animal de la Universidad de Navarra (Referencia 077-19 y 064-22), el Servicio de Ganadería y Bienestar Animal del Gobierno de Navarra y el Comité de Ética del CSIC así como el Comité de Bienestar Animal del Instituto de Neurociencias CSIC-UMH de Alicante.

### **5.1. EXPERIMENTO IN VIVO CON A375 Y TERAPIAS DIRIGIDAS (BRAFi)**

El objetivo de este ensayo es estudiar el efecto del tratamiento con Ranolazina en combinación con inhibidores de BRAF, en este caso Vemurafenib, en ratones inmunodeprimidos FOXn1<sup>nu</sup>/ FOXn1<sup>nu</sup> adquiridos de Charles River para la generación de tumores xenografiados de melanoma humano mediante la inyección subcutánea de células A375 con la mutación BRAF<sup>V600E</sup>. El procedimiento de este ensayo se realizó de forma exacta tanto en el ensayo con machos como en el de hembras, pese a realizarse en centros de investigación diferentes. En ambos casos, los ensayos se realizaron en el animalario en condiciones convencionales de bioseguridad 2 con enriquecimiento ambiental. Todos los ratones fueron colocados en las jaulas para cada grupo de tratamiento de forma aleatoria. En el caso de los ratones macho, se mantenían en jaulas individuales si se observaban comportamientos dominantes.

Para llevar a cabo la generación de los tumores A375, se inyectaron subcutáneamente 4 millones de células, resuspendidas en 0,1 mL de PBS, en el flanco izquierdo y derecho de cada ratón, los cuales tenían unas 8 semanas de edad. El volumen de los tumores de A375 se midió de forma periódica con un calibre y, una vez que los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 60 mm<sup>3</sup>, los ratones se separaron en grupos de 7 para establecer los diferentes grupos de tratamiento.

Al comienzo del ensayo, se establecieron los grupos Control tratados con el vehículo (PBS), Ranolazina (50mg/kg) (MedChemExpress, HY-17401) y Vemurafenib (25mg/kg) (MedChemExpressHY-12057). Los tratamientos fueron administrados por vía

intraperitoneal con dosis diarias durante 5 días seguido de dos días sin tratamiento. El grupo de Vemurafenib presentaba el doble de animales ya que, siguiendo el diseño experimental, cuando se observó que estos tumores dejaban de responder, es decir, que comenzaban a adquirir resistencia al fármaco, se incluyó el grupo de tratamiento con la combinación Vemurafenib + RANO. Así pues, la mitad de los ratones del grupo Vemurafenib fueron tratados con RANO mientras que la otra mitad continuó con el tratamiento de Vemurafenib + Vehículo. Todos los tratamientos fueron suministrados como se ha indicado anteriormente a lo largo de 50 días, midiendo el volumen tumoral cada tres días. Los ratones fueron sacrificados cumpliendo con la regulación de Bienestar Animal y los tumores fueron recolectados e inmediatamente congelados para posteriormente extraer ARN y realizar los análisis de expresión génica.

## 5.2. EXPERIMENTO IN VIVO CON CÉLULAS 5555 E INMUNOTERAPIAS

A la vista de los resultados *in vitro* con la Ranolazina y su efecto inmunogénico en las células tumorales, se llevó a cabo un ensayo *in vivo* con el objetivo de estudiar si combinar este inhibidor de la FAO con anticuerpos antiPD-L1 podría mejorar la respuesta a esta inmunoterapia. Como se ha indicado al inicio del apartado 5, este ensayo se ha realizado tanto en ratones machos como en hembras siguiendo el mismo protocolo experimental en ambos casos.

El ensayo consistió en inyectar de forma subcutánea 5 millones de células de melanoma de ratón 5555 con BRAF<sup>V600E</sup> en el flanco derecho de ratones inmunocompetentes, C57BL/6J, de unas 7-8 semanas de edad que fueron adquiridos de Charles River. Tras la inyección, los ratones fueron monitorizados diariamente hasta aproximadamente el día 6 post-inyección (6DPI), momento en el que los tumores podían ser palpables, aproximadamente con un tamaño de 70 mm<sup>3</sup>. Posteriormente, los animales fueron divididos en grupos de 5 ratones formando los distintos grupos de tratamiento: el grupo control tratado diariamente con el vehículo (PBS), el grupo tratado con Ranolazina (150 mg/kg) (MedChemExpress, HY-17401) el día 6DPI y 300 mg/kg desde el día 7 post-inyección hasta el final del experimento), el grupo tratado con antiPD-L1 (10mg/kg) (BioxCel, PD-L1 B7-H1, BE0101) y el grupo tratado con la combinación RANO + antiPD-

L1 a las dosis indicadas. En el caso de la RANO, ésta fue administrada diariamente por vía oral mientras que los anticuerpos antiPD-L1 se administraron por inyección intraperitoneal cada 3 tres días con un total de 8 dosis, después de las cuales se detuvieron los tratamientos monitorizando los ratones hasta el final del experimento.

El final del experimento fue marcado por el cumplimiento de las normas de Bienestar Animal de tal forma que los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 1500 mm<sup>3</sup>. El crecimiento de los tumores fue monitorizado por la medición del volumen tumoral mediante un calibre cada 3 días, a partir del 6DPI.

Los tumores fueron extraídos de los ratones en el momento del sacrificio separando, en la medida que el tamaño del tumor permitía, un fragmento para la extracción de ARN que era inmediatamente congelado, y el resto fue fijado con formalina para hacer histología.

## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados mostrados en el presente trabajo han sido analizados mediante la herramienta *GraphPad Prism* versión 7.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU). Los datos obtenidos se representan por la media  $\pm$  error estándar (SEM), siendo n el número de experimentos realizados en cada ensayo, con un mínimo de tres experimentos independientes. Las diferencias de los promedios representados en los gráficos de barras fueron comparadas mediante el test estadístico *t de Student* o ANOVA de un criterio para distribuciones normales. En el caso de los análisis para las curvas de supervivencia Kaplan-Meier se utilizó el test de *log-rank*, las correlaciones de Pearson para los análisis de co-expresión y ANOVA de dos criterios para los análisis del crecimiento tumoral. La significación estadística se indica con asteriscos según los diferentes grados de significancia: \* significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* muy significativo ( $p < 0,01$ ) y \*\*\* altamente significativo ( $p < 0,001$ ).

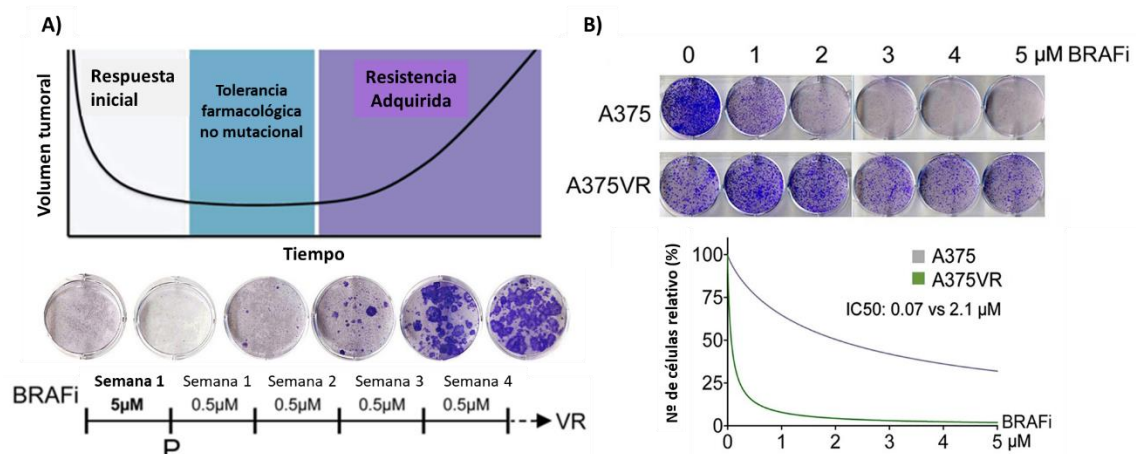


# ***RESULTADOS***



### 1. Validación del modelo *in vitro* de adquisición de resistencia a BRAFi en células de melanoma con BRAF<sup>V600E</sup>

Con el objetivo de estudiar el efecto de los BRAFi en la reprogramación metabólica, no sólo en las células que han sobrevivido al impacto inicial del fármaco sino también durante el transcurso del proceso de adquisición de resistencia, se diseñó un ensayo de formación de colonias o CFA, del inglés. Para ello, las células de melanoma humano con la mutación V600E en BRAF, A375, fueron tratadas con una dosis elevada, 5  $\mu\text{M}$ , del BRAFi Vemurafenib (VEM) durante 7 días. De esta forma, sólo las células *persisten* (P) serán las que sobrevivan (**Figura 16-A**). Posteriormente, las células P resultantes fueron tratadas con una dosis inferior de VEM (0,5  $\mu\text{M}$ ) durante 4 semanas más, momento en el que las colonias resistentes al BRAFi ya han sido establecidas (**Figura 16-A**). Estas células A375 resistentes a VEM se mantuvieron en cultivo en presencia del fármaco, se amplificaron y se obtuvieron así las células A375VR (VR) (**Figura 16-B**).



**Figura 16. Ensayo de formación de colonias de resistencia adquirida con células A375 BRAF<sup>V600E</sup> y BRAFi (Vemurafenib).** **A)** Representación gráfica de la respuesta tumoral a los BRAFi observada en clínica, similar al resultado obtenido en el ensayo de formación de colonias con resistencia adquirida a Vemurafenib tras la tinción con Cristal Voileta (abajo). **B)** Arriba, ensayo de formación de colonias convencional con las células A375 parentales y A375VR bajo el tratamiento con Vemurafenib en dosis ascendentes (0-5  $\mu\text{M}$ ). Abajo, representación gráfica del número de células relativo (%) del CFA representado arriba, para el cálculo del IC<sub>50</sub> entre las células A375 parentales y las VR.

Como muestra la **Figura 16-A** durante la primera semana de tratamiento con la dosis elevada de VEM, se observó una respuesta inicial donde las células A375 más sensibles a BRAFi mueren y sólo aquellas que fueron capaces de tolerar la presión del fármaco

permanecen, es decir, las células *persisten*. Posteriormente, se observa como al disminuir la dosis del fármaco fueron surgiendo las primeras colonias que, mientras iban proliferando, dieron lugar a la aparición de otras nuevas. Finalmente, en la semana 4, una vez que las células alcanzaron la confluencia en la superficie del pocillo fueron, por un lado, fijadas y teñidas con Cristal Violeta y, por otro, expandidas en cultivo en presencia de VEM a 0.5  $\mu\text{M}$ , obteniéndose así la línea celular A375VR (VR).

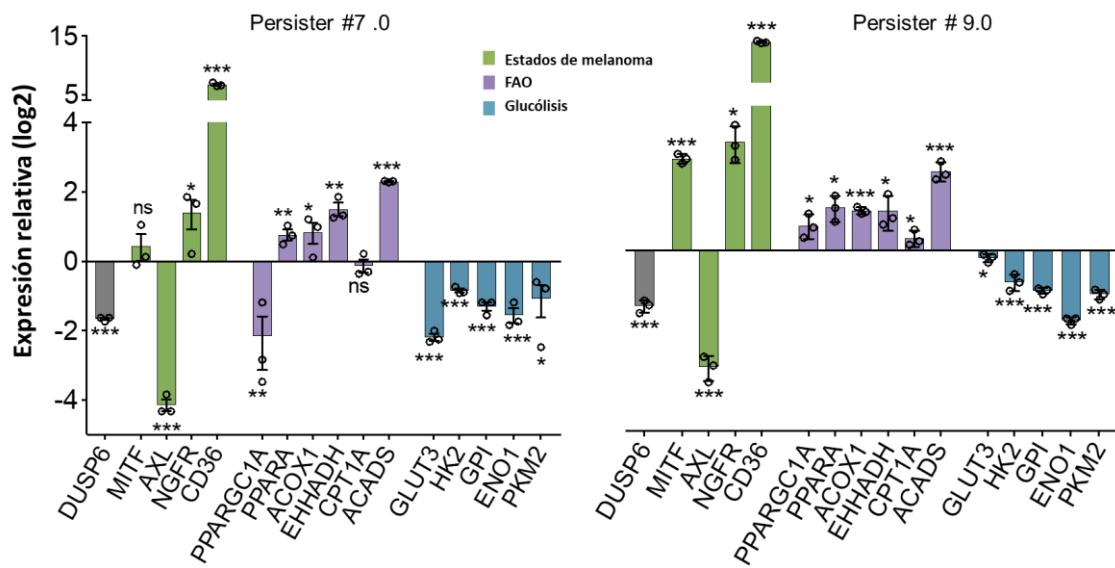
Para verificar que las células A375VR mantenían la resistencia adquirida a VEM, se realizó con ellas un ensayo de formación de colonias convencional utilizando las células A375 parentales como control. Para ello, ambas líneas celulares fueron tratadas con dosis ascendentes de VEM (0-5  $\mu\text{M}$ ) utilizando el vehículo DMSO como control. Una vez alcanzada la confluencia celular en el pocillo control (aproximadamente 7 días), las células fueron fijadas y teñidas con Cristal Violeta y cuantificadas como se indica en el apartado 1.2. de Materiales y Métodos “Ensayo de formación de colonias convencional”. El resultado, tal y como muestra la **Figura 16-B**, fue que las células A375VR mantenían su resistencia al BRAFi (IC50: 2,1  $\mu\text{M}$ ) en comparación a las A375 parentales donde se observa una sensibilidad al fármaco mayor (IC50: 0,07  $\mu\text{M}$ ).

Para continuar con la validación del modelo *in vitro* de adquisición de resistencia, se analizó el nivel de expresión de diversos genes descritos con anterioridad en la literatura, en las células *persisten* obtenidas de dos de los ensayos de resistencia adquirida realizados (nombrados como #7.0 y #9.0) (**Figura 17**).

En primer lugar, se confirmó que la inhibición de BRAF es efectiva por la disminución de expresión de DUSP6 (fosfatasa dual específica 6), que se activa en respuesta a la señalización de ERK por la activación de la ruta de las MAPK (Buffet, C. et al., 2017).

En segundo lugar, se analizaron algunos de los genes representativos de los distintos estados transcripcionales de melanoma cuya expresión varía en respuesta a los MAPKi, aportando a las células tolerancia farmacológica, tal y como se ha descrito en el apartado de Introducción. Estos genes son MITF, AXL, NGFR y CD36 (Rambow, F. et al., 2020). Todos ellos se comportaron de acuerdo a lo ya descrito de tal forma que, tras el tratamiento con el BRAFi, los niveles de expresión de MITF, NGFR y CD36 en las células

*persister* estaban aumentados en comparación a las A375 parentales, mientras que los de AXL estaban disminuidos (**Figura 17**).



**Figura 17. Análisis de expresión génica de los genes indicados en las células *persister* de los ensayos de formación de colonias con resistencia adquirida a BRAFi (#7.0 y #9.0).** Análisis por RT-qPCR de los genes indicados en las células A375 *persister* en comparación con las A375 parentales. Los genes analizados se clasifican en tres grupos: estados transcripcionales de melanoma (Estados en melanoma, en verde), genes implicados en la oxidación de ácidos grasos (FAO) mitocondrial y del peroxisoma (en morado) y genes reguladores de la ruta de glucólisis (azul). Expresión relativa (log2) calculada con el gen de expresión endógena 18S (n=3 réplicas).

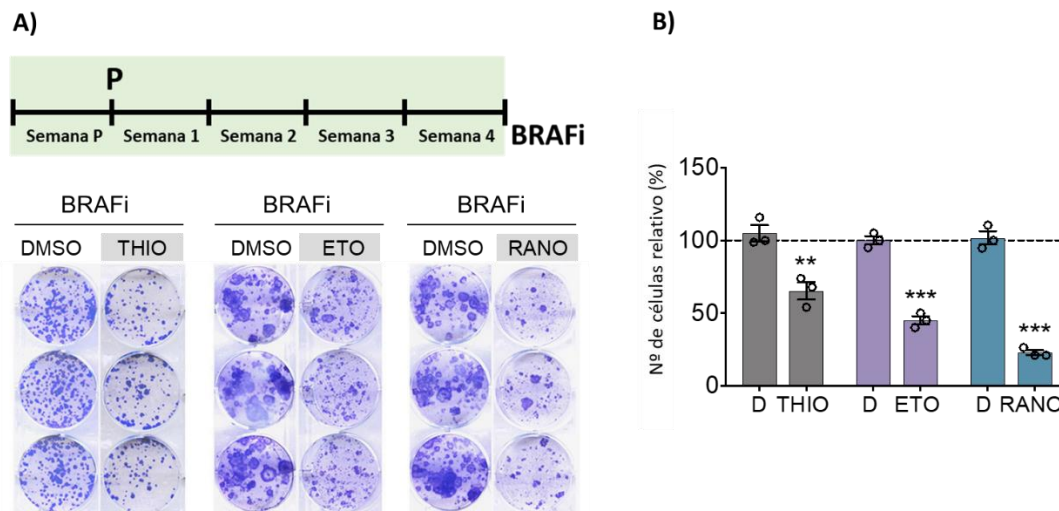
En tercer lugar, se analizó la expresión de diversos genes involucrados en la oxidación de los ácidos grasos (FAO) tanto en el peroxisoma, ACOX1 y EHHADH, como en la mitocondria, CPT1A y ACADS, además de los reguladores transcripcionales PPARGC1A y PPARA. En general, todos ellos presentaron una inducción en su expresión (**Figura 17**) lo que indica que las células de melanoma recurren a la FAO tanto mitocondrial como del peroxisoma en la respuesta inicial al BRAFi, en línea con lo ya descrito (Aloia, A. et al., 2019; Parmenter, T.J. et al., 2014; Haq, R. et al., 2013; Zhang, G. et al., 2016 y Shen, S. et al., 2020). BRAFi inhibe la ruta de glucólisis en las células de melanoma, empujándolas a recurrir a la FAO (Parmenter, T.J. et al., 2014). De acuerdo con esto, el último grupo de genes analizados fueron aquellos que forman parte del proceso de glucólisis como GLUT3, HK2, GPI, ENO1 y PKM2. Todos ellos presentaban niveles de expresión reducidos en las células *persister* (**Figura 17**) confirmando la inactivación de esta ruta en nuestro modelo *in vitro*.

Se observa como algunos de los genes mostraron niveles de expresión diferentes entre el experimento #7.0 y el #9.0, reflejando así la plasticidad que las células de melanoma tienen, incluso dentro de una misma línea celular, en la regulación de la expresión de estos marcadores en respuesta a los MAPKi (Su, Y. et al., 2017 y Yang, C. et al., 2021).

### **2. La FAO es relevante durante la adquisición de resistencia a BRAFi**

Como se ha mencionado anteriormente, está descrito que la FAO es importante en la respuesta inicial a los MAPKi, ya que estos inhiben la glucólisis y las células necesitan recurrir a otros nutrientes, como los ácidos grasos, para mantener su viabilidad y superar así la presión de los inhibidores. Sin embargo, no se ha estudiado en detalle cómo de involucrada está la FAO durante el proceso de adquisición de resistencia a los MAPKi. Para ello, se incluyó en el diseño del protocolo de los ensayos de formación de colonias con resistencia adquirida, diferentes regímenes de tratamiento utilizando tres inhibidores de la FAO. Por un lado, Thioridazina (THIO) que es un inhibidor de la FAO en el peroxisoma (Van den Branden, C. et al., 1985); Etomoxir (ETO), inhibidor de CPT1A (Lopaschuk, GD. et al., 1989), que es el transportador de la membrana mitocondrial que introduce los ácidos grasos a la matriz mitocondrial y Ranolazina (RANO) que inhibe la FAO en la mitocondria (McCormack, JG. et al., 1998).

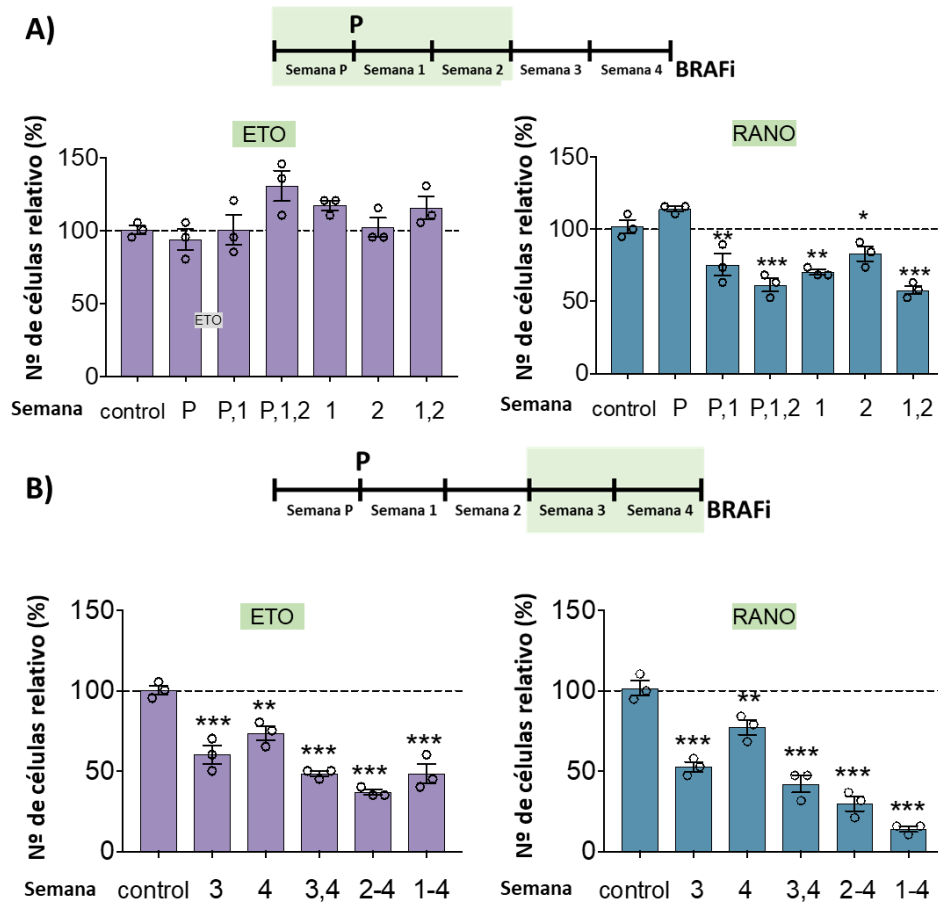
De esta forma, adicionalmente al tratamiento con BRAFi, las células A375 fueron tratadas con los inhibidores de FAO cada una de las semanas en las que se divide el ensayo de resistencia adquirida, renovando los fármacos semanalmente hasta la confluencia de las células control tratadas con el vehículo DMSO. El resultado de este ensayo fue que los tres fármacos reducían significativamente el establecimiento de colonias A375 resistentes a BRAFi (**Figura 18**) indicando que la FAO es relevante para las células de melanoma A375 durante el establecimiento de la resistencia adquirida al BRAFi.



**Figura 18. Ensayo de resistencia adquirida a BRAFi (VEM) en células A375 tratadas con Thioridazina (THIO), Etomoxir (ETO) y Ranolazina (RANO) desde la primera semana hasta el final del experimento. A)** Arriba, esquema de los tratamientos realizados en el ensayo de resistencia adquirida. Abajo, colonias de A375 con resistencia adquirida a VEM tratadas con THIO (2  $\mu$ M), ETO (100  $\mu$ M) y RANO (100  $\mu$ M) durante cinco semanas. **B)** Cuantificación relativa del número de células (%) del ensayo de resistencia adquirida representado en A) para cada uno de los tratamientos con los inhibidores de FAO respecto al tratamiento con el vehículo DMSO (D) como control (n=3 réplicas biológicas).

Adicionalmente, como la FAO ha sido previamente relacionada con la fase inicial de tolerancia farmacológica a BRAFi (Aloia, A. et al., 2019 y Shen, S. et al., 2020), se esperaba que la inhibición de ésta en las primeras semanas de nuestro ensayo de adquisición de resistencia en A375 podría ser más efectiva. A partir de este momento, los tratamientos se realizaron sólo con RANO ya que es un fármaco aprobado por la FDA y podría tener mayor potencial traslacional, y con ETO como control porque ha sido previamente usado en este contexto (Aloia, A. et al., 2019). De esta forma, los regímenes de tratamiento se centraron sólo en las tres primeras semanas del ensayo, tanto en cada una de las semanas por separado como de forma acumulada (desde la P hasta la 2). Como muestra la **Figura 19**, el tratamiento con ETO no fue efectivo al añadirlo en las primeras semanas del ensayo mientras que la RANO redujo significativamente el establecimiento de colonias resistentes. Además, este análisis también se realizó tratando en la etapa final del experimento, es decir, en las semanas 3 y 4 tanto de forma individual como acumulada. El resultado obtenido en este caso fue que tanto ETO como RANO reducían significativamente el crecimiento de las colonias resistentes (**Figura 19-**

B) indicando que la FAO no sólo es importante en las etapas iniciales de respuesta a los MAPKi sino también en la etapa final donde se da la adquisición de resistencia.

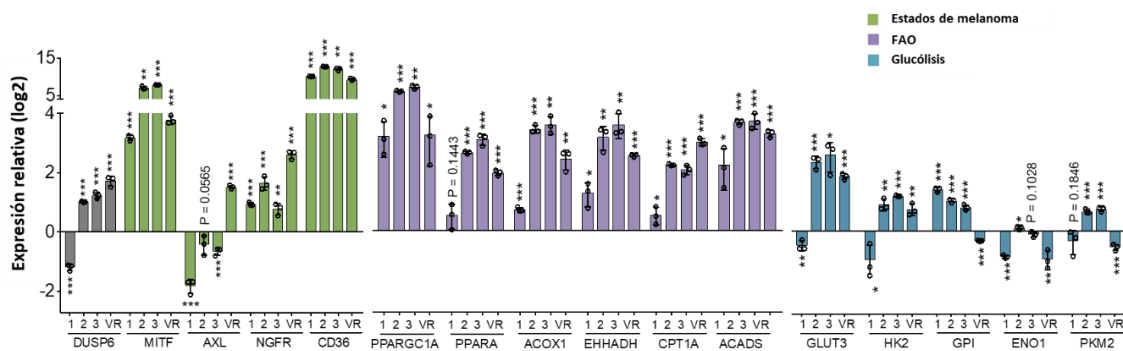


**Figura 19. Cuantificación relativa (%) del número de células del ensayo de resistencia adquirida a BRAFi (VEM) tratadas con Etomoxir (ETO, izquierda) y Ranolazina (RANO, derecha) en A) la etapa inicial del ensayo, desde la semana P hasta la semana 2 añadiendo ETO y RANO a 100  $\mu$ M semanalmente de forma individual y acumulada y B) añadiendo los inhibidores de FAO en la etapa final del ensayo, semana 3 y 4. Cálculo del porcentaje respecto al control tratado con el vehículo DMSO (n=3 réplicas biológicas).**

Estos resultados sugieren que la FAO es relevante y está aumentada durante todo el transcurso del tratamiento con BRAFi y, por tanto, durante todo el proceso de adquisición de resistencia al mismo. Por ello, se analizaron en nuestro modelo experimental los genes enumerados en el apartado anterior y que se clasificaban en estados de melanoma, FAO y glucólisis (**Figura 20**). Así, se analizó la expresión de los mismos mediante RT-qPCR en las células obtenidas a partir de cada semana posterior a la semana P, es decir, aquellas células que eran tratadas con la dosis baja de VEM (0.5



$\mu\text{M}$ ) en la semana 1, 2, 3 y 4 así como las células A375VR, las cuales fueron obtenidas tras el cultivo posterior y ya presentan establecida la resistencia adquirida al BRAFi.

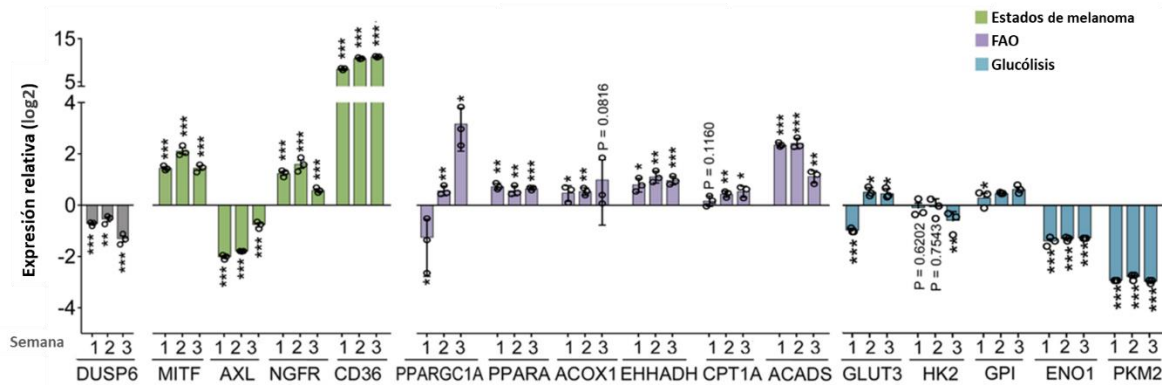


**Figura 20.** Análisis de expresión génica por RT-qPCR de los genes indicados en las células obtenidas de la semana 1, 2 y 3 tratadas con VEM 0.5  $\mu\text{M}$  y las células VR del ensayo de formación de colonias con resistencia adquirida a BRAFi (#9.0). Expresión relativa (log2) calculada en comparación con las A375 parentales y con el gen de expresión endógena 18S (n=3 réplicas).

Tal y como muestra la **Figura 20** por el análisis de expresión de DUSP6, la ruta de las MAPKi se encontraba reactivada a partir de la semana 2 ya que su expresión se aumenta de forma significativa y esto se mantiene hasta el final del experimento y en las células VR.

Además, respecto a los estados de melanoma y los diferentes genes que los representan, todos ellos mostraron un comportamiento de acuerdo con lo descrito. MITF, NGFR y CD36 se mantenían inducidos durante todo el transcurso del tratamiento, mientras que AXL presentó niveles bajos. En cuanto a los genes involucrados en la FAO mitocondrial y del peroxisoma, todos ellos muestran una inducción generalizada que se mantiene a lo largo de todas las semanas del experimento estudiadas, así como en las células VR (**Figura 20**), lo cual indicaba que la FAO es un proceso relevante para las células de melanoma bajo el tratamiento con BRAFi y en el establecimiento de la resistencia adquirida. Por otro lado, los marcadores de glucólisis en general se encontraban con niveles bajos de expresión, pero éstos son revertidos aproximadamente a las dos semanas de haber obtenido las células *persisten* (**Figura 20**). Sin embargo, mientras que estos marcadores de glucólisis muestran heterogeneidad entre los experimentos #7.0 y #9.0, la expresión de los reguladores de FAO durante la adquisición de resistencia al BRAFi es constante en ambos (**Figura 20 y 21**). También, es

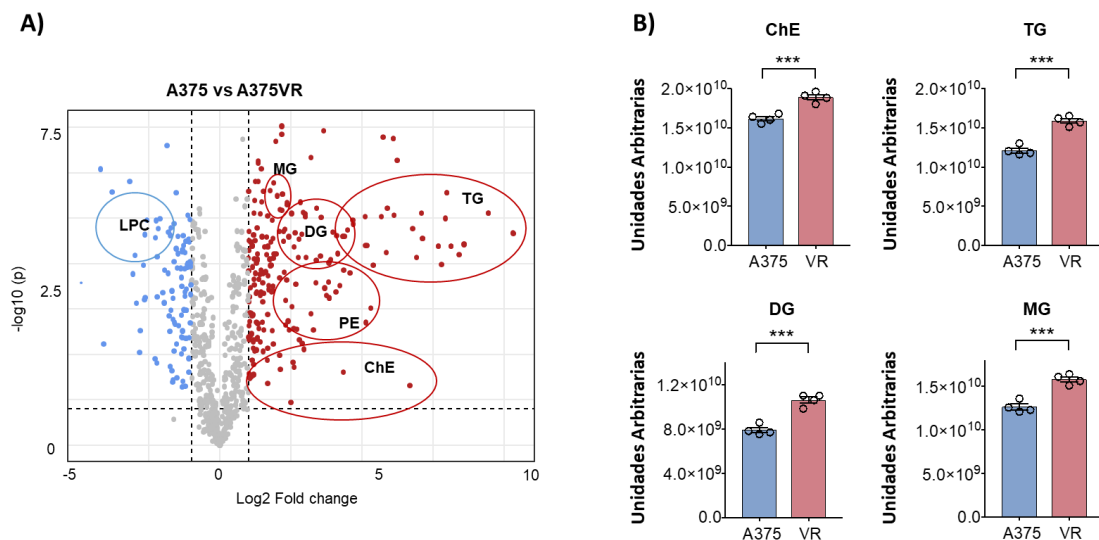
conveniente destacar que algunos de los reguladores de glucólisis tienen una expresión reducida en las células VR como GPI, ENO1 y PKM2 contradiciendo la reactivación de la glucólisis descrita para las células con resistencia adquirida, sin embargo, esto no ocurre en los genes de FAO los cuales se mantienen con una expresión elevada (**Figura 20 y 21**), sugiriendo un aumento del metabolismo lipídico en las células A375VR, resistentes a BRAFi.



**Figura 21. Análisis de expresión génica por RT-qPCR de los genes indicados en las células obtenidas de la semana 1, 2 y 3 tratadas con VEM 0.5  $\mu$ M del ensayo de formación de colonias con resistencia adquirida a BRAFi (#7.0).** Expresión relativa (log2) calculada en comparación con las A375 parentales y con el gen de expresión endógena 18S (n=3 réplicas).

### 3. Análisis lipídico de las células A375VR

Debido a la importancia que el metabolismo y, especialmente, el metabolismo lipídico parece tener en las células de melanoma durante el proceso de resistencia adquirida a BRAFi, se realizó un análisis lipídico de las células A375VR comparando con el lipidoma de las células A375 parentales. Este análisis confirmó que las células VR presentan un metabolismo lipídico alterado con un incremento en diferentes tipos de ácidos grasos y lípidos (**Figura 22**), de acuerdo con lo observado previamente sobre la relevancia que la FAO tiene en las células *persisten* (Shen, S. et al., 2020).

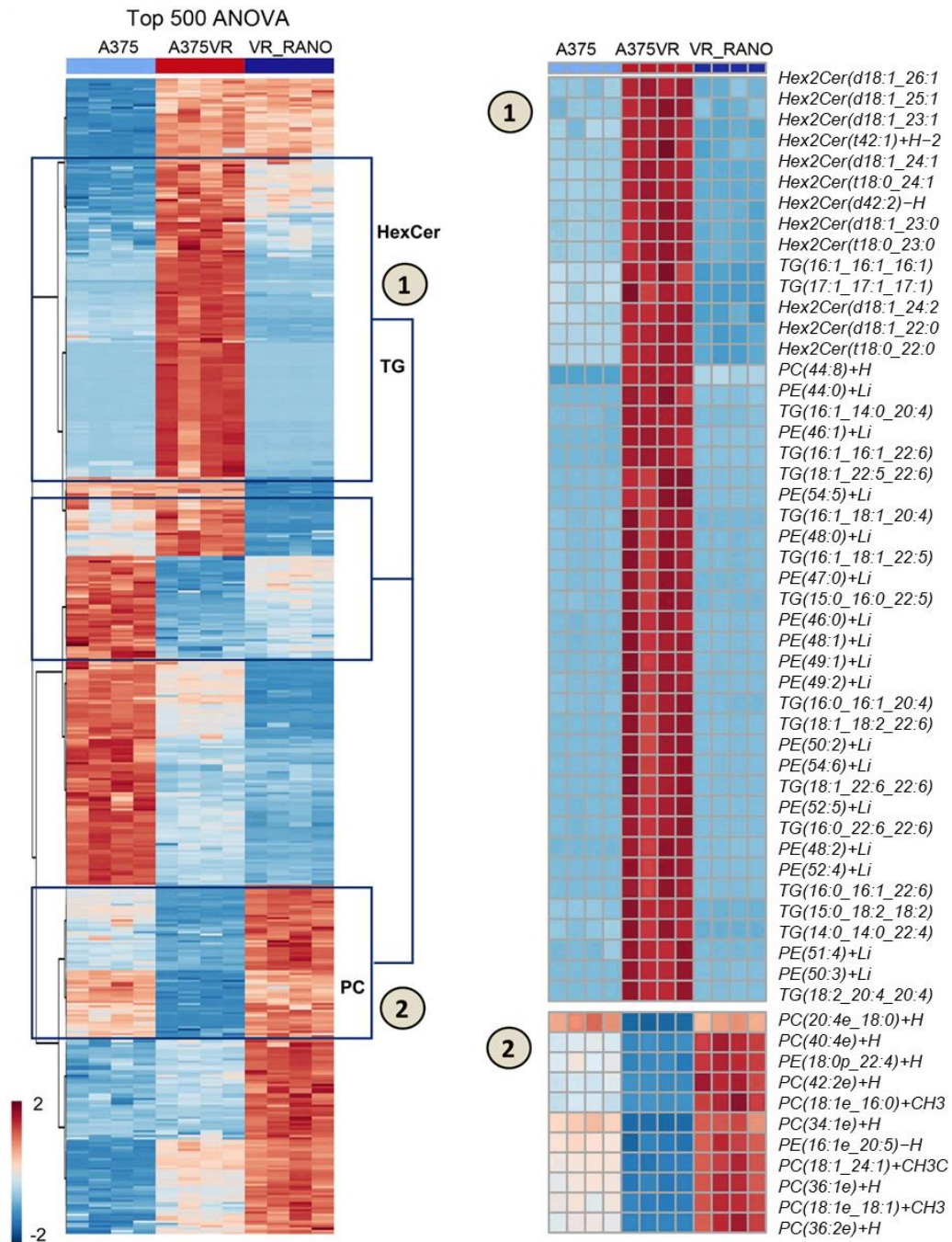


**Figura 22. Estudio lipidómico de las células A375VR en comparación con las A375 parentales.** **A)** Representación gráfica de *Volcano* de las diferencias obtenidas (*Fold change*) entre las células VR y A375 parentales. En el eje X se localizan los valores de *Fold change* y en el eje Y los valores de significancia (p). En rojo se muestran los tipos lipídicos con una abundancia diferencialmente mayor en las células VR en comparación a las A375 parentales y en azul las de menor. **B)** Representación en gráficos de barras para mostrar las diferencias entre cuatro tipos lipídicos distintos: ChE (éster de colesterol), TG (triglicéridos), MG (monoglicéridos), DG (diglicéridos) y LPC (Lisofosfatidilcolina).

Como indica la **Figura 22**, las células VR presentan una mayor cantidad de moléculas lipídicas como éster de colesterol (ChE), monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) y triglicéridos (TG) sugiriendo que estas células recurren en mayor medida al metabolismo lipídico en comparación con las células parentales.

Al incluir en el estudio lipidómico las células VR RANO, las células resultantes del cultivo tras el tratamiento con Ranolazina junto al BRAFi durante el desarrollo de la resistencia adquirida en el ensayo de colonias, se observan perfiles lipídicos muy diferentes entre las células parentales, VR y las VR RANO (**Figura 23**).

Analizando los tres perfiles lipídicos, se identifican dos clústeres bien diferenciados. Por un lado, el clúster compuesto principalmente por ceramidas (Hex2Cer), triglicéridos (TG) y fosfatidiletanolaminas (PE), que se encuentran principalmente aumentados en las células VR mientras que apenas están presentes en las células parentales y VR\_RANO. El segundo clúster, está compuesto por fosfatidilcolinas (PC) principalmente y se encuentra más enriquecido en las células VR RANO (**Figura 23**).

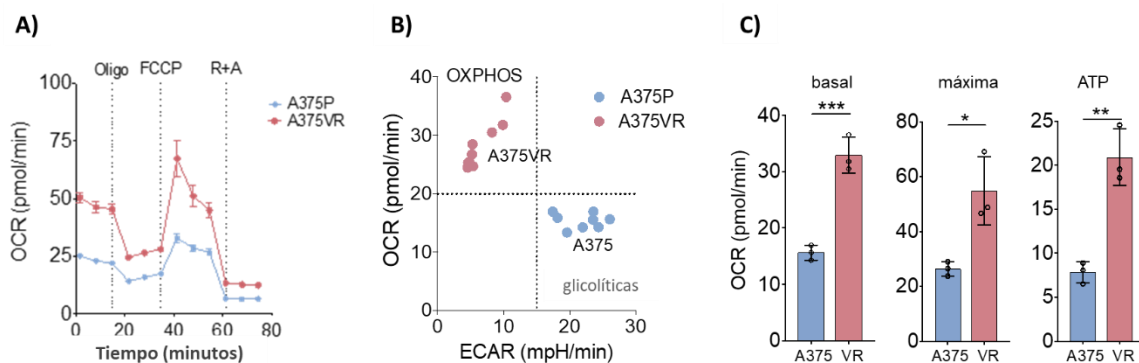


**Figura 23. Análisis lipidómico comparativo entre las tres poblaciones celulares A375 parentales, A375VR y A375 VR-RANO.** A la izquierda se representa en *Heatmap* las 500 especies lipídicas más significativamente diferenciadas (analizadas por ANOVA) en las tres poblaciones coloreado como se indica en la leyenda siendo rojo las especies de mayor abundancia y en azul las de menor. A la derecha, se identifican dos clústeres diferenciados por el aumento o descenso de especies lipídicas en las tres poblaciones. Arriba, se indican las de mayor presencia en las células VR: Hexosil-2-ceramidas (Hex2Cer), TG (triglicéridos) y fosfatidil-etanolaminas (PE) y abajo las de las VR\_RANO: fosfatidil-colinas (PC) (n=4 réplicas biológicas).

Así pues, el BRAFi promueve cambios en el lipidoma de las células VR aumentando la presencia de una gran cantidad de especies lipídicas, observado al comparar su lipidoma con el de las células parentales. Esto explicaría la relevancia que el metabolismo lipídico tiene en estas células. La Ranolazina por su parte revierte muchos de los cambios inducidos por el BRAFi en las células resistentes a BRAFi y, además, se enriquece en otras especies lipídicas (PC) muy poco representadas en las VR (**Figura 23**).

#### 4. Análisis metabólico de las células A375VR

Dada la importancia que el metabolismo de lípidos parece tener en las células VR, se completó el estudio metabólico mediante el análisis de la respiración mitocondrial en estas células utilizando la tecnología *Seahorse*.



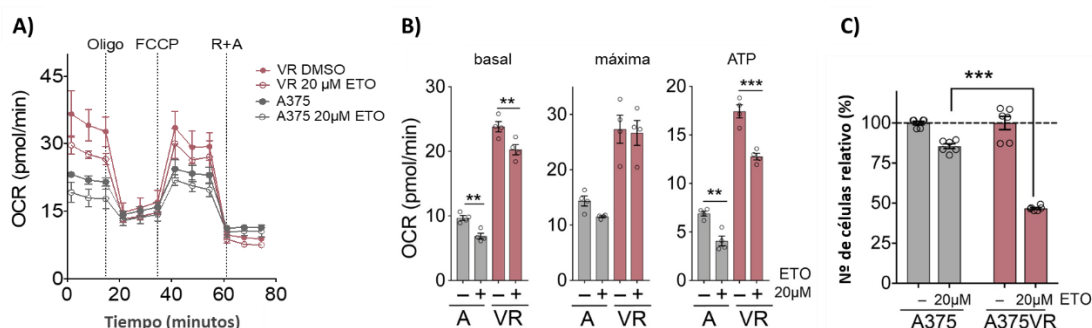
**Figura 24. Análisis del flujo metabólico mediante la tecnología *Seahorse* en las células VR y A375 parentales.** **A)** Perfil del OCR (Ratio de Consumo de Oxígeno) en las células A375 (azul) y A375 VR (rojo) tras la adición secuencial de Oligomicina (oligo), FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona) y R+A (Rotenona + Antimicina A). **B)** Representación del OCR basal respecto al ECAR (Ratio de Acidificación Extracelular) basal en las células A375 parentales (azul) y VR (rojo). **C)** OCR en representación de la respiración basal, máxima y producción de ATP en las células A375 y A375 VR (n=3 réplicas biológicas).

Como se observa en la **figura 24-A**, el consumo de oxígeno, representado como OCR, se encontró más elevado en las células VR comparado con las A375 parentales indicando una mayor respiración mitocondrial. Además, enfrentando los ratios de OCR frente al ECAR, el cual indica la tasa glucolítica medida por la acidificación del medio, las A375 parentales resultaron tener un perfil bioenergético mucho más glucolítico que las VR. Éstas mostraron de nuevo una mayor tasa de OXPHOS. Las VR muestran un aumento en

la actividad mitocondrial ya que tanto la respiración basal como la máxima, así como la producción de ATP eran significativamente elevadas (**Figura 24-B, C**).

Por otra parte, para analizar más en detalle cómo el inhibidor del transporte mitocondrial de FAs, Etomoxir, y el de la FAO mitocondrial, Ranolazina, impactaban en la respiración mitocondrial se realizaron los correspondientes análisis utilizando la misma tecnología *Seahorse* para analizar los perfiles bioenergéticos de las células VR y A375 parentales bajo el tratamiento con los mismos.

La inhibición del transportador mitocondrial CPT1A mediante Etomoxir (ETO: 20  $\mu$ M, 1 hora) resultó en una reducción de la respiración basal mitocondrial, así como de la producción de ATP tanto en las células VR como en las A375 parentales comparado con el vehículo, DMSO, como control (**Figura 25-A, B**). Sin embargo, cuando se tratan diariamente con ETO 20  $\mu$ M, esto tiene un leve impacto en la proliferación de las células parentales, mientras el crecimiento celular de las A375VR se ve significativamente reducido (**Figura 25-C**). Esto indica una vez más la relevancia que la FAO mitocondrial tiene en estas células.

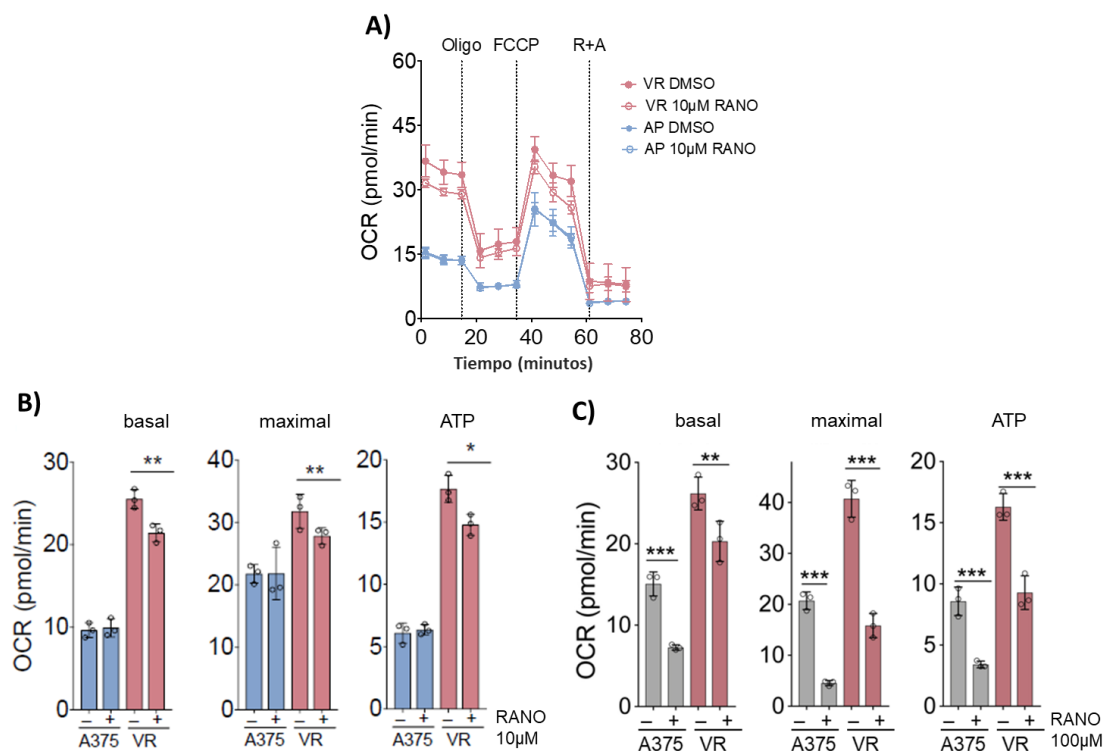


**Figura 25. Análisis del flujo metabólico mediante la tecnología *Seahorse* en las células VR y A375 parentales tratadas con Etomoxir 20  $\mu$ M.** **A)** Perfil del OCR (Ratio de Consumo de Oxígeno) en las células A375 VR (rojo) y A375 parentales (gris) en ausencia y presencia de ETO 20  $\mu$ M durante 1h con la adición secuencial de Oligomicina (oligo), FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona) y R+A (Rotenona + Antimicina A). **B)** OCR en representación de la respiración basal, máxima y producción de ATP en las células A375 y A375 VR tratadas con ETO 20  $\mu$ M durante 1h. **C)** Proliferación relativa (%) de las células A375 y VR con dosis diarias de ETO 20  $\mu$ M respecto al tratamiento control con el vehículo DMSO (n=3 réplicas biológicas).

La diana específica de Etomoxir (CPT1A) está bien establecida (Lopaschuk, GD. et al., 1989), sin embargo, la diana de la ranolazina, considerado un inhibidor de la FAO mitocondrial en el contexto del metabolismo lipídico, no está bien definida (Kaplan, A.

et al., 2022 y McCormack, J. G. et al., 1996). La Ranolazina, es un fármaco actualmente aprobado por la FDA para el tratamiento de angina de pecho crónica que bloquea selectivamente la corriente tardía de sodio en los miocitos cardiacos actuando sobre el canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.5 (SCN5A) (Kaplan, A. et al., 2022). Aun así, tal y como muestran los resultados de la lipidómica indicados anteriormente, el tratamiento con Ranolazina revierte en las células A375VR la mayor parte de los cambios inducidos en el lipidoma por el BRAFi (**Figura 23**).

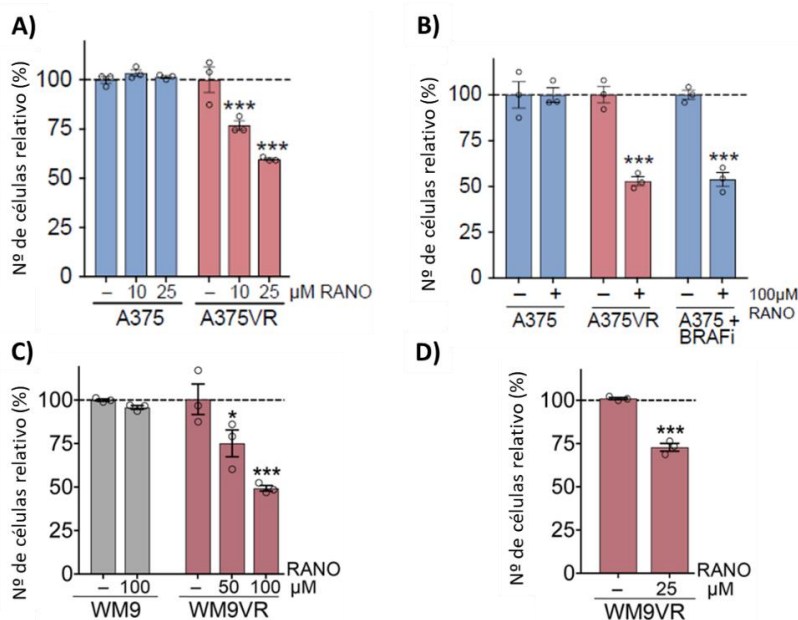
Por todo ello, se analizó el perfil bioenergético mediante *Seahorse* en las células VR y A375 parentales bajo el tratamiento durante 1 hora con Ranolazina a 10 y 100  $\mu\text{M}$ , usando el vehículo DMSO como control (**Figura 26**).



**Figura 26. Análisis del flujo metabólico mediante la tecnología *Seahorse* en las células VR y A375 parentales tratadas con Ranolazina 10  $\mu\text{M}$ .** **A)** Perfil del OCR (Ratio de Consumo de Oxígeno) en las células A375 VR (rojo) y A375 parentales (gris) en ausencia y presencia de RANO 10  $\mu\text{M}$  durante 1h con la adición secuencial de Oligomicina (oligo), FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona) y R+A (Rotenona + Antimicina A). **B)** OCR en representación de la respiración basal, máxima y producción de ATP en las células A375 y A375 VR tratadas con RANO 10  $\mu\text{M}$  durante 1h y **C)** 100  $\mu\text{M}$  durante 1h. (n=3 réplicas biológicas).

La Ranolazina (RANO) a 10  $\mu\text{M}$  inhibe de forma eficaz la corriente de sodio en los miocitos (Antzelevitch, C. et al., 2004) pero no tiene efecto en el consumo de oxígeno de las células A375 parentales (**Figura 26-A, B**). Sin embargo, en las células VR, la respiración mitocondrial presentó niveles significativamente más reducidos con esta dosis de RANO tanto a nivel basal, como las tasas máximas y la producción de ATP (**Figura 26-B**). Esto indica que, aunque la diana específica en este contexto no esté determinada, se reduce selectivamente la respiración mitocondrial en células donde la inhibición de BRAF induce un aumento de FAO. Adicionalmente, cuando la RANO se añade en la dosis utilizada en los ensayos de resistencia adquirida al BRAFi, 100  $\mu\text{M}$ , se mantiene la reducción en la respiración mitocondrial basal, máxima y en la producción de ATP no solo en las células VR sino también en las A375 parentales (**Figura 26-C**) al igual que ocurría con el tratamiento con ETO 20  $\mu\text{M}$  (**Figura 25-B**).

En cuanto a la proliferación de las células bajo el tratamiento con RANO, cuando ésta se añade diariamente a 10  $\mu\text{M}$ , se reduce significativamente la propagación de las células VR pero no en las A375 parentales, siendo todavía más evidente utilizando una dosis a 25  $\mu\text{M}$  (**Figura 27-A**).



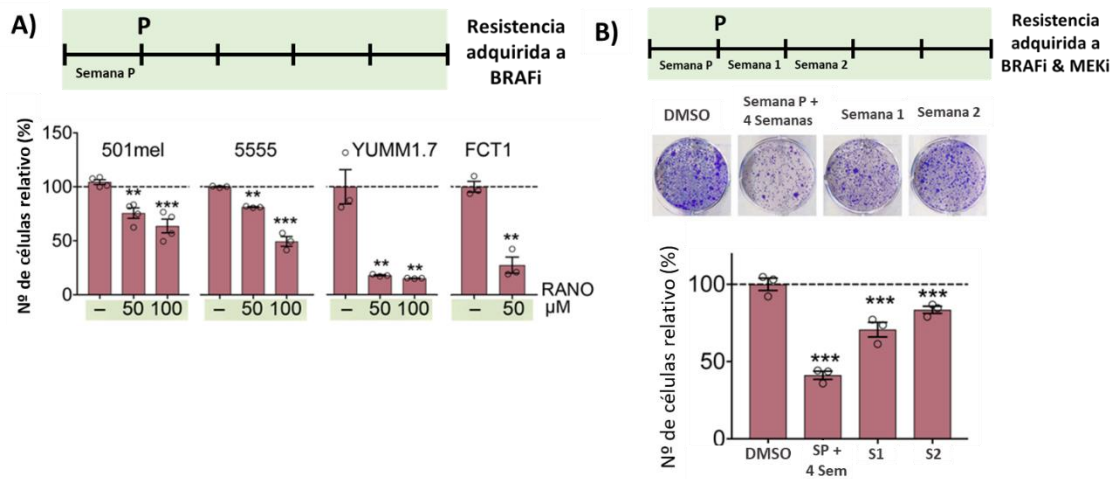
**Figura 27. Representación de la proliferación celular bajo el tratamiento con ETO y RANO.** Cuantificación relativa (%) de las células A375 parentales (azul) y VR (rojo) con **A)** dosis diarias de RANO 10 y 25  $\mu\text{M}$  con DMSO como control y **B)** dosis semanales de 100  $\mu\text{M}$  y VEM 0,5  $\mu\text{M}$  (BRAFi) con DMSO como control. **C)** Cuantificación relativa (%) de las células WM9 parentales (gris) y WM9VR (rojo) con dosis semanales de RANO 50 y 100  $\mu\text{M}$  con DMSO como control. **D)** Cuantificación relativa (%) de las células WM9VR (rojo) con dosis diarias de RANO 25  $\mu\text{M}$  con DMSO como control. (n=3 replicados biológicos).



Por otra parte, cuando se añade RANO 100  $\mu\text{M}$  semanalmente al igual que en los ensayos de resistencia adquirida del inicio, la proliferación de las A375 parentales se mantiene igual que con la dosis de 10 o 25  $\mu\text{M}$  ya que no se ven afectadas, mientras que el crecimiento de las VR se ve significativamente reducido. Adicionalmente, cuando además de la RANO también se trata a las células parentales con el BRAFi (VEM 0,5  $\mu\text{M}$ ), la proliferación celular también se encontró, al igual que en las VR, significativamente reducida (**Figura 27-B**).

Todo ello en conjunto sugiere que, la energía obtenida de la fosforilación oxidativa en las células A375 parentales glucolíticas, contribuye en menor medida a la proliferación celular. Sin embargo, la adición del BRAFi, el cual inhibe glucólisis, potencia la sensibilidad de las células A375 a la RANO (**Figura 27-B**). El efecto selectivo de la RANO en las células A375VR sobre las parentales, así como el retraso en el establecimiento de colonias resistentes a BRAFi, también se observó en otras líneas celulares de melanoma humano con la mutación en BRAF<sup>V600E</sup>, como WM9 (**Figura 27-C, D**). En las células WM9VR, obtenidas de un ensayo de adquisición de resistencia similar al descrito para las A375VR, tanto la dosis semanal de RANO (50 y 100  $\mu\text{M}$ ) comparado con las parentales (**Figura 27-C**), como la dosis diaria a 25  $\mu\text{M}$  (**Figura 27-D**), reducen significativamente la proliferación celular comparado con el control tratado con el vehículo DMSO.

Por último, los ensayos de resistencia adquirida a los BRAFi también se hicieron en otras líneas celulares de melanoma portadoras de la mutación en BRAF tanto humanas, 501mel, como murinas, 5555, YUMM1.7 y FCT1 (ver las concentraciones utilizadas y condiciones de cada uno de los ensayos en la **Tabla 4** del apartado 1.3. de Materiales y Métodos). El resultado obtenido en todas ellas fue similar al observado para las A375 (**Figura 28**), ya que la RANO retrasó el establecimiento de colonias resistentes a BRAFi especialmente en las líneas celulares de melanoma de ratón.



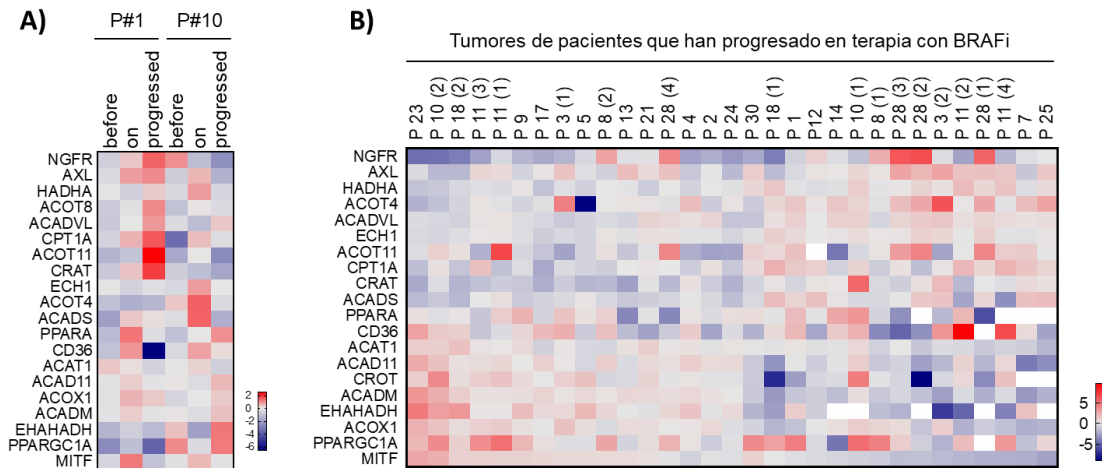
**Figura 28. Ensayos de resistencia adquirida a MAPKi. A)** Ensayo de resistencia adquirida a BRAFi (VEM) en las líneas celulares 501mel (humana), 5555, YUMM1.7 y FCT1 (murinas) tratadas con RANO a 50 y 100 µM desde el comienzo del ensayo renovando el fármaco semanalmente. **B)** Ensayo de resistencia adquirida a BRAFi (VEM) y MEKi (Trametinib) en las células A375 tratadas con RANO 100 µM comenzando el tratamiento en la semana P (SP), semana 1 (S1) o semana 2 (S2) renovando los fármacos semanalmente. Arriba, esquema del tratamiento por semanas y resultado del ensayo tras la fijación y tinción de las células con Cristal Violeta. Abajo, cuantificación del número de células relativo (%) respecto al control tratado con el vehículo DMSO. (n=3 réplicas biológicas)

Ya que en clínica el tratamiento con terapias dirigidas consiste en la combinación de inhibidores de BRAF y MEK, se realizó el mismo ensayo de resistencia adquirida diseñado para el BRAFi en las células A375, pero esta vez añadiendo también Trametinib (TRAM) (ver las concentraciones utilizadas y las condiciones del ensayo en la **Tabla 4** del apartado 1.3. de Materiales y Métodos). El resultado obtenido fue que la RANO reducía de forma significativa el establecimiento de colonias resistentes a BRAFi+MEKi en las tres condiciones estudiadas, siendo más eficaz cuando el tratamiento comenzó en la primera semana (semana P) (**Figura 28-B**), momento en el que se establecen las células *persisten*.

### 5. Relevancia de la FAO en tumores de melanoma y ensayos in vivo

Los datos obtenidos hasta el momento indicaban que el incremento de la FAO ocurre como un evento mantenido durante el desarrollo de la resistencia adquirida a MAPKi. Por ello, mediante el análisis de diferentes *datasets* públicos de expresión génica como

GSE61992 (Zheng, GX. et al., 2017) y GSE50509 (Butler, A. et al., 2018), se analizaron las diferencias de expresión de diferentes genes de FAO entre los tumores de pacientes antes y después de haber sido tratados con MAPKi, así como una vez progresaron.

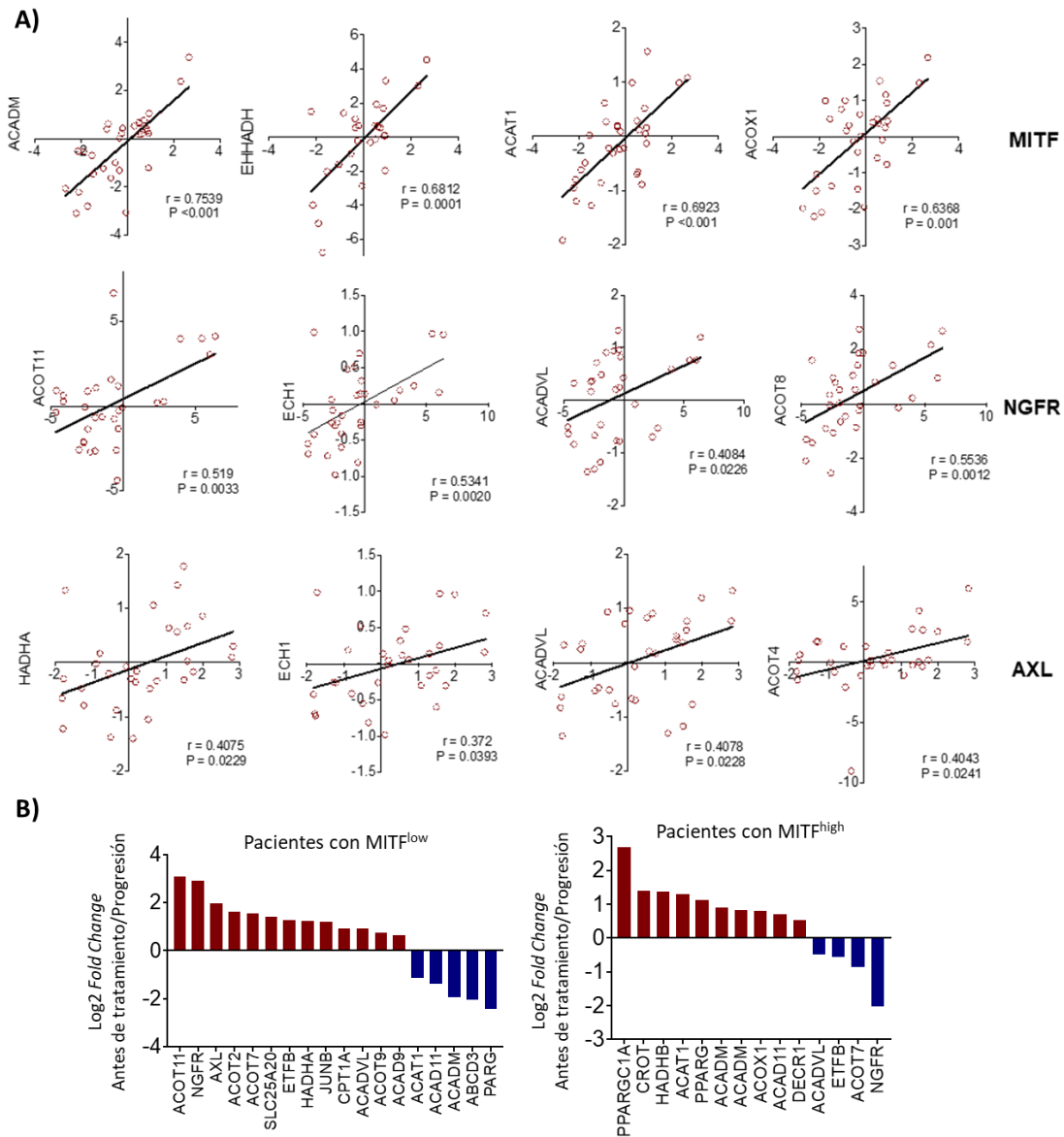


**Figura 29. Análisis comparativo de expresión génica en tumores de pacientes que han progresado en tratamiento con BRAFi. A)** Análisis de expresión de los genes indicados en muestras de tumores de dos pacientes (P1 y P10) antes, durante y en el momento de progresión bajo el tratamiento con MAPKi (GSE61992). **B)** Análisis de expresión de los genes indicados en 31 muestras de tumores de 21 pacientes (GSE50509) comparando las muestras de antes del tratamiento con las del momento de progresión bajo el tratamiento con BRAFi. El número de tumores en aquellos pacientes con más de un tumor se indica entre paréntesis.

Como se observa en la **Figura 29**, los tumores tienen una elevada expresión de diversos genes involucrados en la FAO no solo en la fase inicial del tratamiento (**Figura 29-A**) sino también cuando han progresado (**Figura 29-A, B**). Los genes de FAO analizados están involucrados tanto en la FAO mitocondrial como en la FAO del peroxisoma. Además, se muestra la expresión de los genes MITF y AXL los cuales determinan según sus patrones de expresión la predominancia de fenotipos celulares asociados a resistencia a los MAPKi como son  $AXL^{high}/MITF^{low}$  o  $AXL^{low}/MITF^{high}$ . En la **Figura 29-B** se puede observar como aquellos tumores con un fenotipo u otro de resistencia presentan un aumento de expresión en distintos genes, pero todos asociados a FAO.

Por otro lado, también se incluyó en este análisis la expresión de NGFR, principal marcador de la subpoblación NCSC previamente descrita en la introducción, la cual está definida como la causante de las recidivas de los pacientes tratados con terapias dirigidas e inmunoterapias (Rambow, F. et al., 2018). Aquellos tumores con una elevada

expresión de este marcador correlacionaban con alta expresión de varios de los genes de FAO analizados (**Figura 29-B**).



**Figura 30. Análisis comparativo de expresión de genes asociados a FAO con genes asociados a resistencia a MAPKi en tumores de pacientes que han progresado. A)** Análisis de correlación de Pearson de los *Fold change* de la expresión entre los genes reguladores de FAO indicados y los marcadores MITF, AXL y NGFR, en los tumores de pacientes que han progresado al tratamiento con MAPKi comparado con las muestras de antes del tratamiento (GSE50509). **B)** Expresión en *Fold Change* (log<sub>2</sub>) de los genes indicados en los grupos de pacientes estratificados por alta o baja expresión de MITF.

Analizando más en detalle la expresión de los tres marcadores asociados a resistencia a MAPKi citados arriba, MITF, AXL y NGFR, y la expresión de los diferentes genes asociados a FAO mediante el análisis de correlación de Pearson, se observó que una mayor

expresión de MITF correlaciona de forma muy significativa con una mayor expresión de ACADM, EHHADH, ACAT1 y ACOX1 (r de Pearson= 0,7539, 0,06812, 0,6923 y 0,6368, respectivamente). NGFR correlaciona muy significativamente con ACOT11 (r=0,519), ECH1 (r=0,5341), ACADVL (r=0,4084) y ACOT8 (r=0,5536) y AXL correlaciona significativamente con HADHA, ECH1, ACADVL y ACOT4 (r= 0,4075, 0,375, 0,4078 y 0,4043, respectivamente) (**Figura 30-A**).

Adicionalmente, y en línea con lo mostrado en la **Figura 29-B**, si se analizan las diferencias de expresión (*Fold change*) en las muestras de los tumores que han progresado antes y después de ser tratados con BRAFi pero, en este caso, separando a los pacientes con tumores de alta o baja expresión de MITF, vemos como genes asociados a la FAO muestran un aumento significativo en su expresión, aunque son distintos entre ambos grupos (**Figura 30-B**).

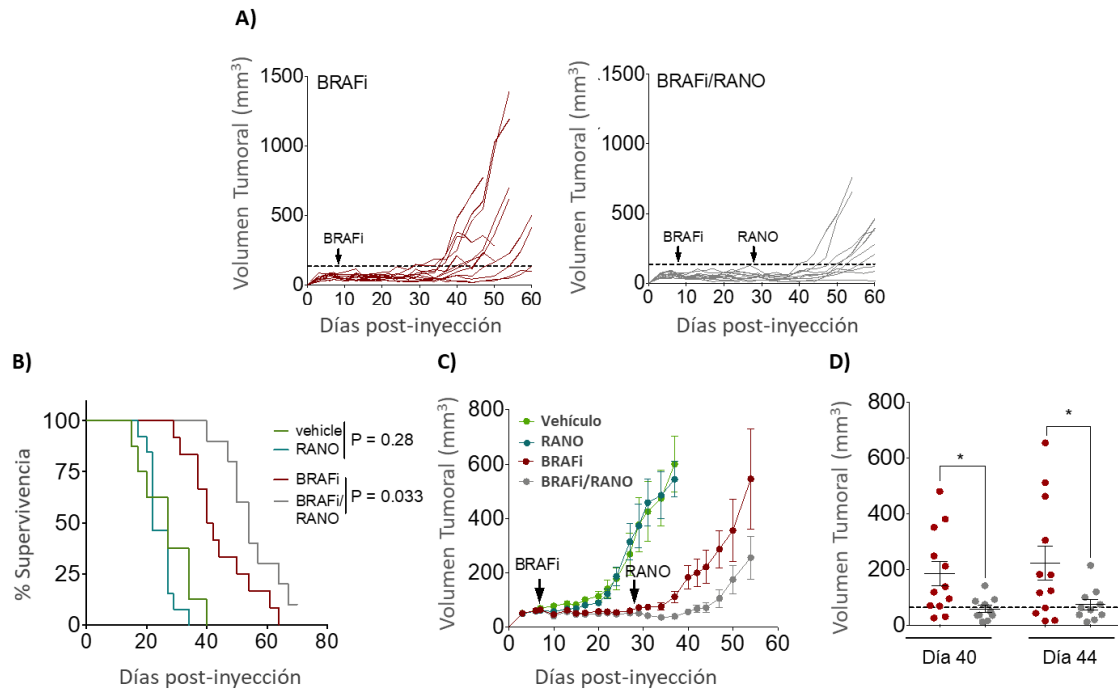
Por todo el conjunto de los resultados *in vitro* e *in silico* obtenidos, que parecen reflejar lo observado en clínica en pacientes con melanoma, se quiso estudiar la eficacia *in vivo* de la RANO en combinación con BRAFi en un modelo animal.

Para la realización de estos ensayos, tal y como se detalla en el apartado 5.1 Experimento *in vivo* con A375 y terapias dirigidas (BRAFi, VEM), se utilizaron ratones machos y hembras inmunodeprimidos, FOXn1<sup>nu</sup>/ FOXn1<sup>nu</sup>, en los que se inyectaron de forma subcutánea las células A375. Cuando comenzaron a surgir los tumores, los ratones fueron separados en tres grupos de tratamiento: Control (PBS), RANO y VEM. El grupo VEM presentaba el doble de animales porque una vez que los tumores dejaron de responder al tratamiento por la adquisición de resistencia al BRAFi, se comenzó con el tratamiento en combinación con RANO en la mitad de ellos, mientras que la otra mitad continuó sólo con VEM.

El tratamiento de combinación con BRAFi/RANO redujo significativamente el crecimiento de tumores que desarrollaban resistencia a VEM (**Figura 31-A, C, D**) y aumentando la supervivencia libre de progresión (**Figura 31-B**).

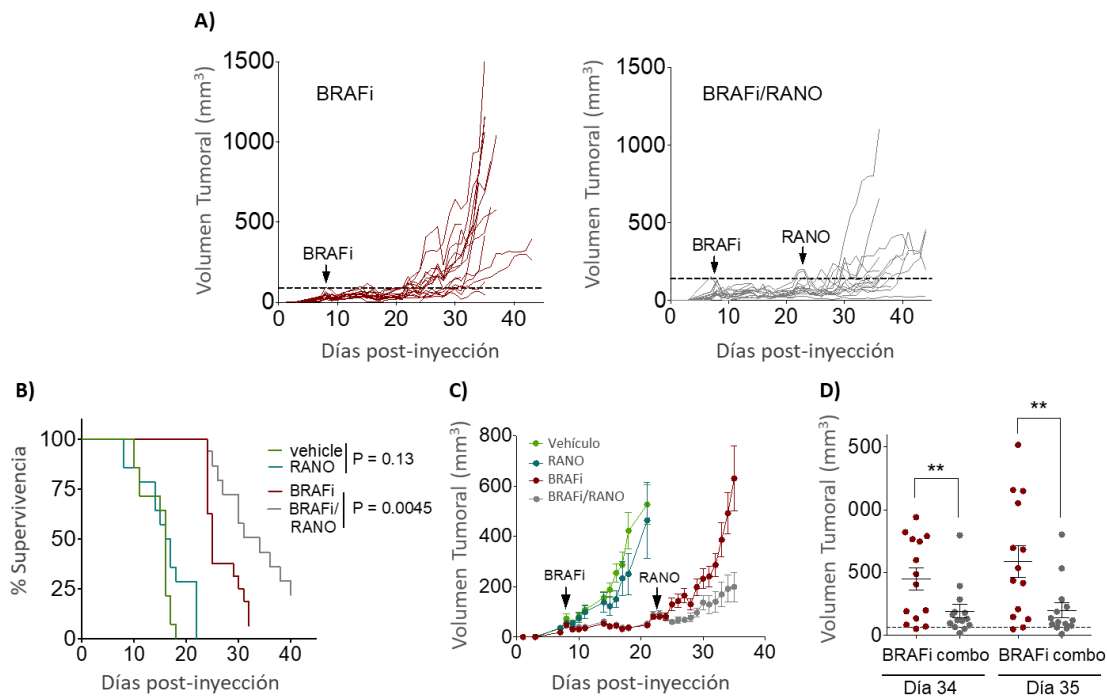
En relación con esto, en un trabajo anterior mostraron que tras tres semanas de tratamiento con ETO, aumentaba el crecimiento de los tumores de A375 en ratones

(Aloia, A. et al., 2019). Sin embargo, en nuestros ensayos el crecimiento de los tumores no se vio alterado por el tratamiento con RANO durante cuatro semanas en comparación al grupo control (**Figura 31-C**).



**Figura 31. Ensayo *in vivo* con células A375 en ratones hembra inmunodeprimidos tratados con VEM y RANO. A)** Curvas de crecimiento representando cada tumor de forma individual en los ratones hembra tratados con BRAFi (izquierda) desde el día 7 post-inyección (flecha) y la combinación BRAFi/RANO (derecha), que comenzó 28 días post-inyección (flecha). Se considera progresión de los tumores cuando el volumen tumoral duplica el del día 7 post-inyección (línea discontinua). **B)** Curvas Kaplan-Meier de la supervivencia libre de progresión (%) de los ratones hembra tratados como indica. **C)** Curvas de crecimiento tumoral promedio de los ratones hembra tratados como se indica (n=12 tumores por grupo, excepto RANO que es n=14 tumores). **D)** Volumen tumoral a tiempo final de los tumores de ratones hembra en el día 40 y 44 post-inyección tratados con BRAFi o BRAFi/RANO (combo).

En la **Figura 31** se muestran los resultados del ensayo *in vivo* realizado en ratones hembra, pero como se ha mencionado anteriormente, este ensayo también se realizó siguiendo estrictamente el mismo protocolo con ratones macho. El resultado en este caso fue similar ya que de nuevo la combinación BRAFi/RANO retrasaba el crecimiento de los tumores en comparación al tratamiento con sólo BRAFi (**Figura 32-A, C, D**) y se mejoraba significativamente la supervivencia de los ratones (**Figura 32-B**).

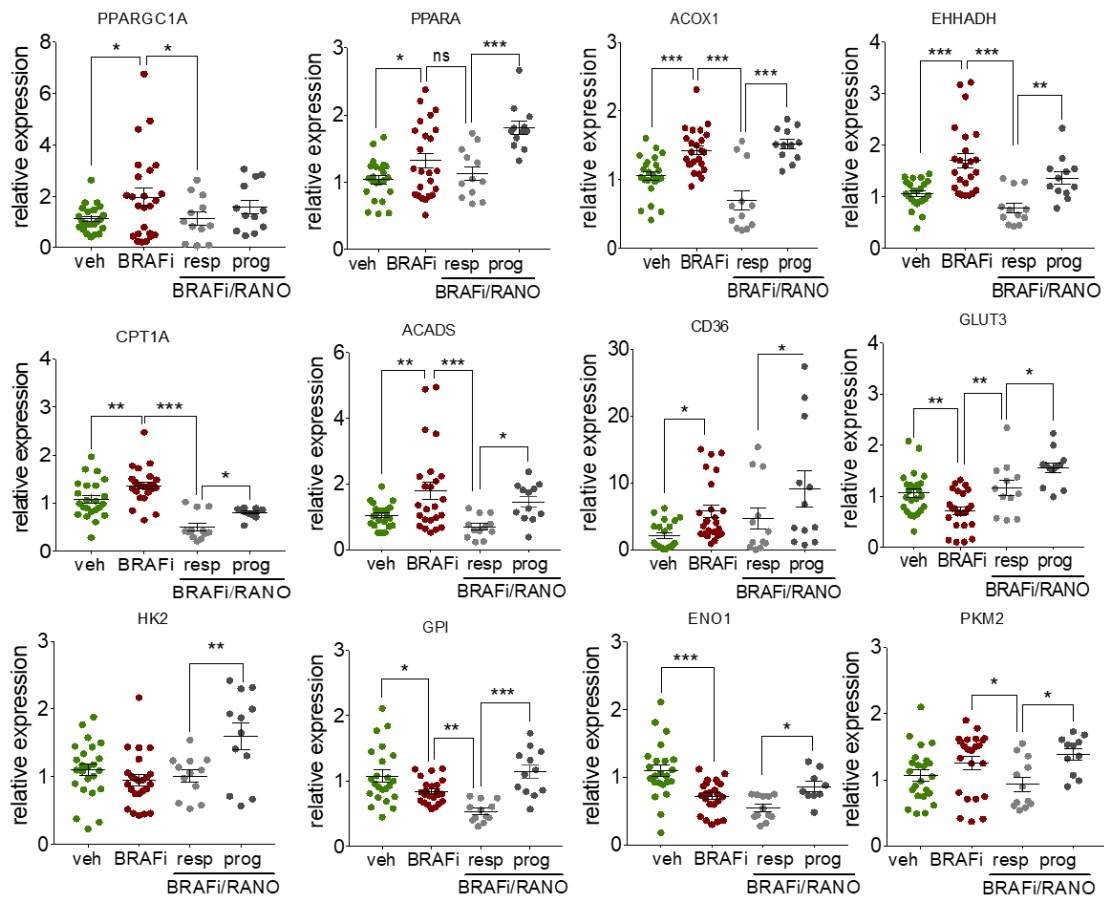


**Figura 32. Ensayo *in vivo* con las células A375 en ratones macho inmunodeprimidos tratados con VEM y RANO. A)** Curvas de crecimiento representando cada tumor de forma individual en los ratones macho tratados con BRAFi (izquierda) desde el día 8 post-inyección (flecha) y la combinación BRAFi/RANO (derecha), que comenzó 23 días post-inyección (flecha). Se considera progresión de los tumores cuando el volumen tumoral duplica el del día 8 post-inyección (línea discontinua). **B)** Curvas Kaplan-Meier de la supervivencia libre de progresión (%) de los ratones macho tratados como indica. **C)** Curvas de crecimiento tumoral promedio de los ratones macho tratados como se indica (n=13 tumores control, 14 tumores en RANO y BRAFi/RANO y 16 en BRAFi). **D)** Volumen tumoral a tiempo final de los tumores de ratones macho en el día 34 y 35 post-inyección, tratados con BRAFi o BRAFi/RANO (combo).

De los tumores obtenidos en los ensayos *in vivo* se aisló ARNm de todos los grupos de tratamiento para realizar análisis de expresión de diferentes genes. Ya que tanto en pacientes como en las células VR se observó un aumento de la expresión de genes involucrados en FAO, también se quiso analizar la expresión de estos genes en los tumores del ensayo mediante RT-qPCR.

En este análisis génico se vio que los tumores que progresaron bajo el tratamiento con BRAFi mostraban niveles más altos de expresión de los genes reguladores de FAO en comparación al tratamiento con el vehículo (**Figura 33**). Sin embargo, los tumores que mantuvieron su crecimiento inhibido por el tratamiento en combinación con RANO (resp, **Figura 33**) generalmente presentaban revertido ese aumento de expresión. Por el contrario, si se analiza la expresión de estos genes en los tumores que progresaron con

BRAFi/RANO (prog, **Figura 33**) se observa como de nuevo la expresión de los genes reguladores de FAO se encuentra aumentada.

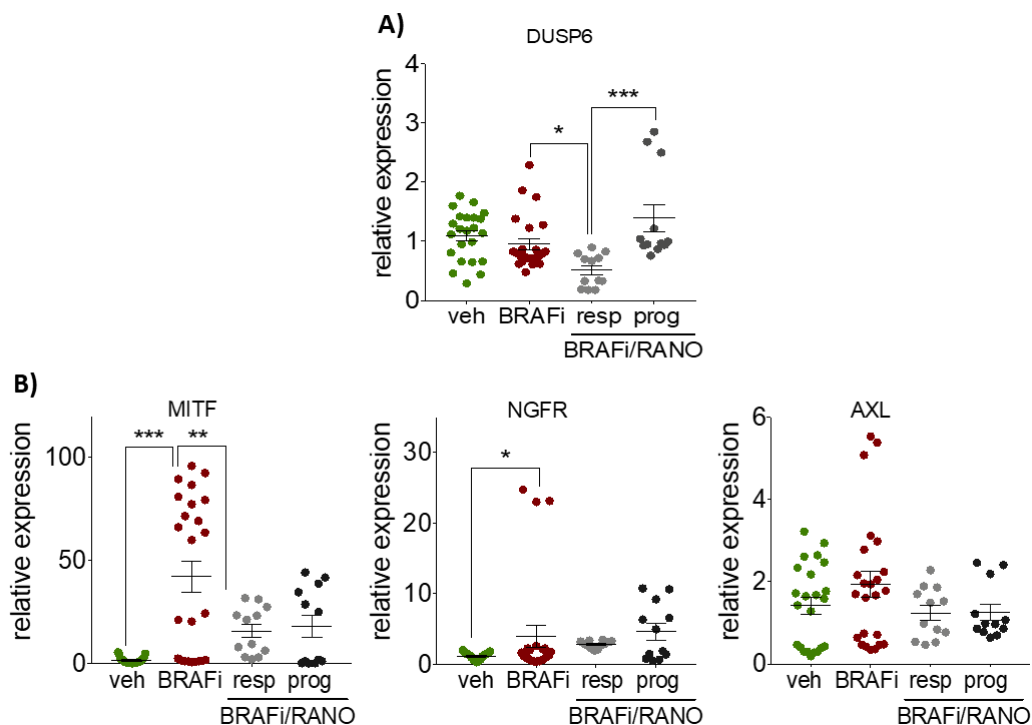


**Figura 33. Análisis de expresión mediante qPCR de los tumores A375 del ensayo *in vivo* realizado con ratones hembra tratados como se indica. Grupo control y BRAFi con 8 tumores y para el grupo BRAFi/RANO, 4 tumores respondedores (resp) y 4 que progresaron (prog). Expresión relativa (log2) calculada respecto al grupo control (veh) y con el gen de expresión endógena 18S (n=3 réplicas).**

Además de los genes reguladores de FAO (PPARGC1A, PPARA, ACOX1, EHHADH, CPT1A, ACADS y CD36) también se incluyeron en el análisis genes reguladores de glucólisis como GLUT3, HK2, GPI, ENO1 y PKM2. Algunos de ellos presentan una expresión levemente reducida en los tumores que han progresado y han sido tratados con BRAFi mientras que los tratados con la combinación BRAFi/RANO y han progresado (prog, **Figura 33**) parecen tener esa reducción revertida. Los tumores respondedores (resp, **Figura 33**) al tratamiento en combinación no muestran una tendencia clara.



Por otro lado, para analizar en detalle el estado de activación de la ruta de las MAPK en estos tumores se analizaron los niveles de expresión de DUSP6. Los tumores que progresaron al tratamiento con BRAFi mostraban una reactivación de la ruta de las MAPK ya que la expresión de DUSP6 está aumentada (**Figura 34-A**). Sin embargo, los tumores que respondieron al tratamiento con BRAFi/RANO mantenían de forma eficaz la ruta inactiva ya que los niveles de expresión de DUSP6 son bajos y, por el contrario, los tumores que progresaron tenían la expresión de DUSP6 totalmente recuperada (**Figura 34-A**).



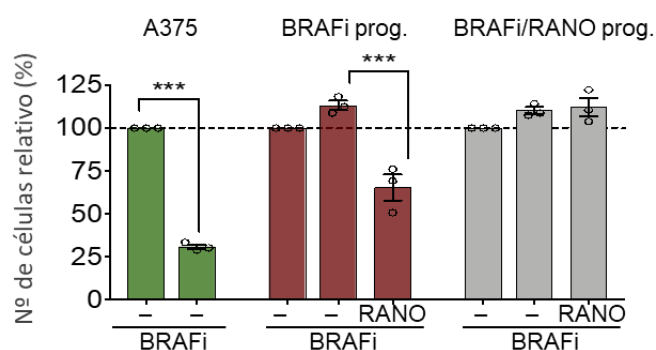
**Figura 34. Análisis por qPCR de DUSP6, MITF, NGFR y AXL en los tumores de los ratones hembra del ensayo *in vivo* tratados como se indica. A)** Análisis de la expresión relativa de DUSP6 en los tumores. **B)** Análisis de expresión relativa de MITF, NGFR y AXL en los tumores. Expresión relativa (log2) calculada respecto al grupo control (veh) y con el gen de expresión endógena 18S. (n=3 réplicas)

En general, estos resultados sugieren que los tumores que han reactivado la ruta de las MAPK pueden sobrellevar el tratamiento con BRAFi y progresar al igual que los que progresaron con la combinación de tratamiento BRAFi/RANO, los cuales además han reactivado glucólisis e inducido la expresión de genes reguladores de FAO.

Por otra parte, los tumores que progresaron con el BRAFi presentaron heterogeneidad en relación a los marcadores de los distintos estados transcripcionales conocidos en

melanoma ya que parecen presentar diferentes poblaciones con una mayor o menor expresión de genes como MITF, NGFR o AXL (**Figura 34-B**). Cabe destacar que, mientras que los tumores respondedores bajo el tratamiento con BRAFi/RANO (resp) presentaron cambios más moderados en cuanto a la expresión de estos marcadores, los tumores que progresaron mostraron un leve re-establecimiento semejante a lo observado en los tratados con BRAFi (**Figura 34-B**).

Adicionalmente, los tumores procedentes de los ratones tratados con BRAFi y BRAFi/RANO que progresaron fueron procesados y cultivados *in vitro* para establecer líneas celulares con el objetivo de realizar ensayos de proliferación. Así, utilizando las células A375 parentales como control, las células establecidas a partir de los tumores mencionados se trataron con VEM 0,5  $\mu$ M y RANO 100  $\mu$ M y el vehículo DMSO como control hasta alcanzar la confluencia en el pocillo, momento en el que las células se fijaron y tiñeron con Cristal Violeta.



**Figura 35. Cuantificación relativa del número de células relativo (%) del ensayo de formación de colonias con el cultivo celular de los tumores que progresaron con BRAFi o BRAFi/RANO del ensayo *in vivo* tratados con BRAFi en ausencia (DMSO, -) o presencia de RANO. Análisis relativo con respecto al tratamiento control DMSO (n=3 réplicas biológicas).**

Como muestra la **Figura 35**, líneas celulares de ambos tipos de tumores, BRAFi y BRAFi/RANO, mostraron resistencia al tratamiento con BRAFi en comparación a la sensibilidad observada en las A375 parentales utilizadas como control. Sin embargo, el tratamiento con RANO en las células procedentes de los tumores que progresaron con BRAFi, presentaron una proliferación significativamente menor, indicando una mayor sensibilidad a la inhibición de la FAO. Por el contrario, las células procedentes de los

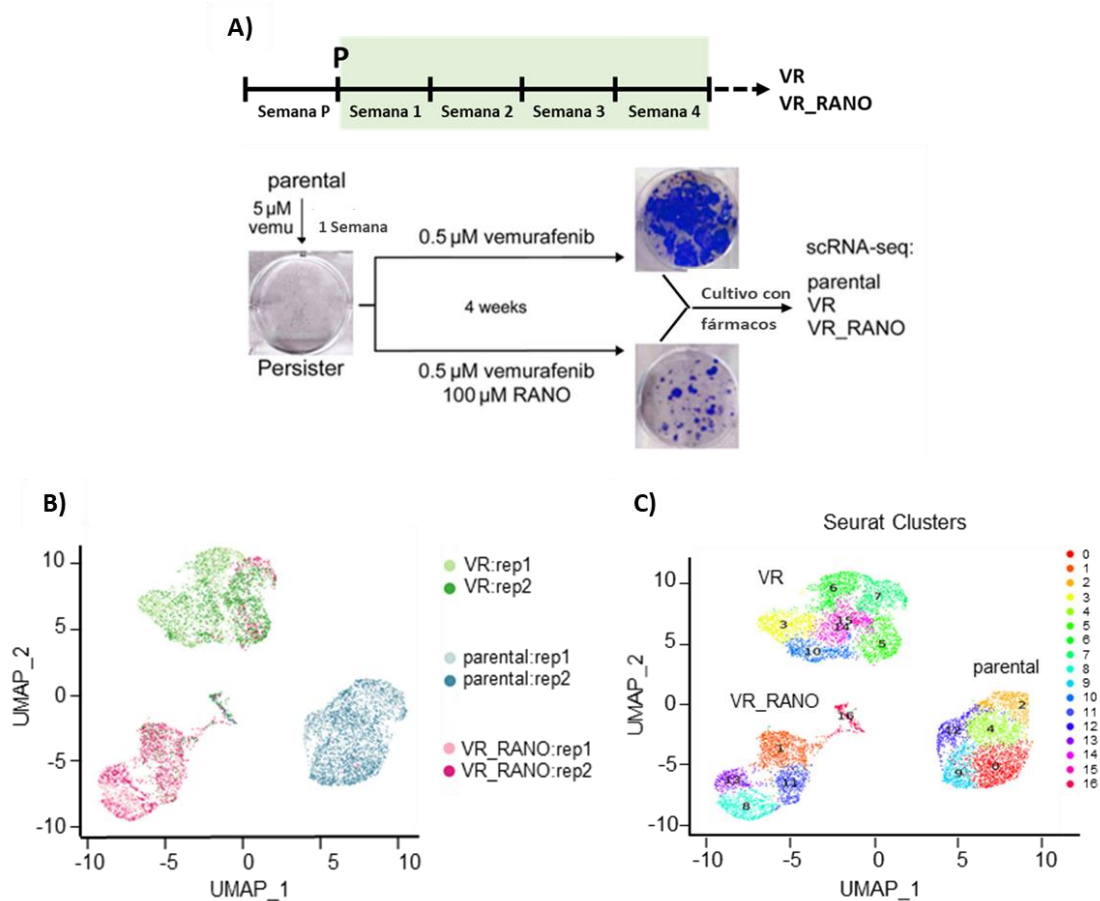
tumores BRAFi/RANO que progresaron mostraron resistencia al tratamiento con RANO *in vitro*.

En definitiva, la FAO es un proceso clave no sólo en la respuesta inicial a los MAPKi o en la adquisición de resistencia a los mismos, sino que también es necesaria para la progresión tumoral provocando las recaídas en los pacientes.

#### **6. Análisis *Single-Cell RNAseq* (*scRNAseq*): estados transcripcionales de melanoma en las células A375, A375VR y A375 VR\_RANO**

Para entender más en detalle como la RANO modula la adquisición de resistencia a BRAFi a nivel molecular, se realizó un estudio de *Single-Cell RNAseq* (*scRNAseq*) en las células A375 parentales, en las células VR procedentes del ensayo de adquisición de resistencia tratadas sólo con VEM y en las células VR\_RANO procedentes del mismo ensayo, pero tratadas además de con VEM con RANO (**Figura 36-A**).

La representación bidimensional de cada uno de los transcriptomas de las células procedentes de dos réplicas experimentales identifica tres compartimentos diferentes correspondientes casi en su totalidad a la población celular A375 parentales, VR y VR\_RANO (**Figura 36-B**). Adicionalmente, cada una de las poblaciones fue caracterizada con diferentes clústeres de Seurat específicos sumando un total de 16 clústeres repartidos entre las tres poblaciones (**Figura 36-C**).

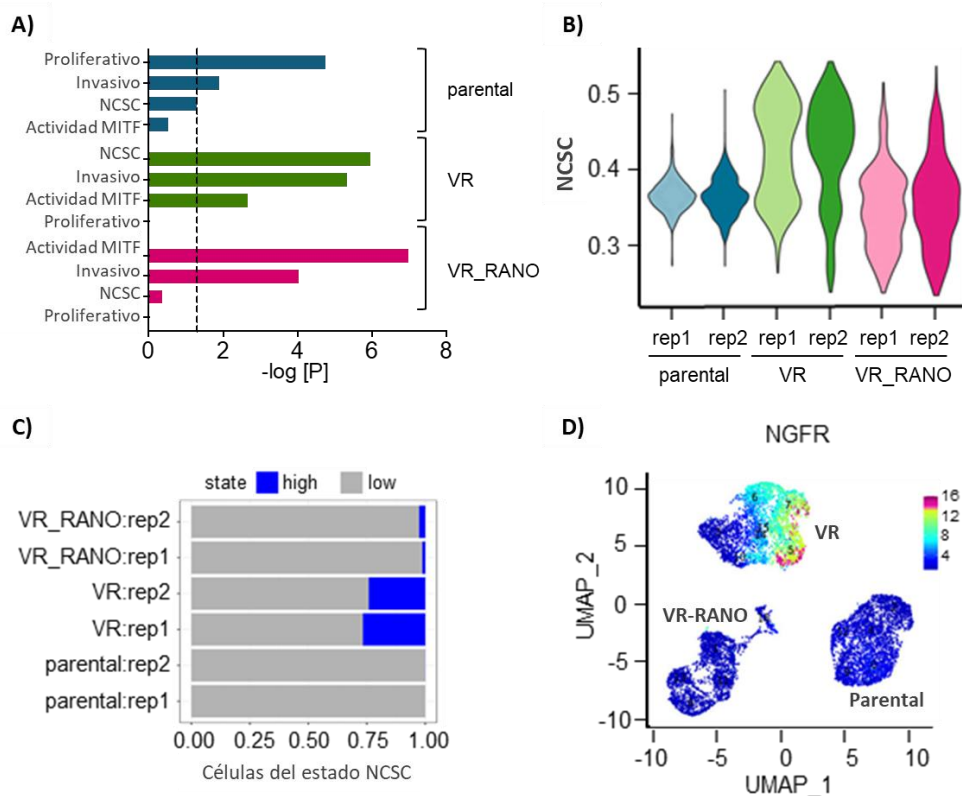


**Figura 36. Estudio *Single-Cell RNAseq* (scRNAseq) en las células A375 parentales, A375VR y VR\_RANO. A)** Esquema del procedimiento de obtención de las células VR y VR\_RANO a partir del ensayo de formación de colonias con resistencia adquirida a BRAFi. **B)** Representación UMAP en los colores indicados tras el análisis de los transcriptomas de 10 133 células procedentes de dos experimentos distintos (rep1 y rep2) de cada una de las tres poblaciones celulares. **C)** Representación UMAP de la distribución de los clústeres de Seurat por colores y números, identificados en el análisis de las tres poblaciones celulares: parental, VR y VR\_RANO.

El análisis de cada una de las células de forma individual permite establecer si la RANO impacta en los distintos estados transcripcionales conocidos en melanoma, mencionados en apartados anteriores (Rambow, F. et al., 2018). Así, podemos saber si la RANO impacta en la modulación de las actividades metabólicas y, con ello, si esto puede influir finalmente en el proceso de resistencia adquirida al BRAFi. Para ello, las tres poblaciones fueron caracterizadas mediante análisis de enriquecimiento (test hipergeométrico) que comparaban los genes marcadores más expresados con aquellos descritos previamente por Rambow (Rambow, F. et al., 2018) para cada estado transcripcional de melanoma. El resultado fue que el estado proliferativo, invasivo, el de actividad mediada por MITF y el NCSC estaban enriquecidos en cada población celular de una forma determinada (**Figura 37-A**).

Como muestra la **Figura 37-A**, el estado más representativo de la población de células parentales es el proliferativo aunque también presenta células del estado invasivo. En cuanto a las células resistentes a BRAFi (VR), el estado NCSC, el invasivo y el de actividad mediada por MITF son los estados significativamente más enriquecidos (**Figura 37-A**). En el caso de las células VR\_RANO, el estado que predomina es el de actividad de MITF seguido por el invasivo y, lo más interesante que resultó de este análisis fue que el estado más representado en las células VR, el NCSC, en las células VR\_RANO no está enriquecido significativamente (**Figura 37-A, B, C**).

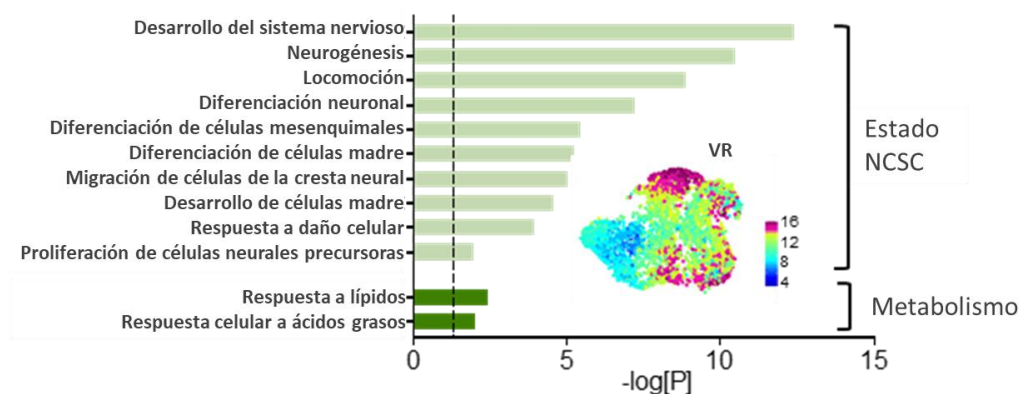
Adicionalmente, este hallazgo también se observa mediante el análisis de expresión del principal gen marcador del estado NCSC, el gen NGFR, donde sus niveles de expresión más elevados se encuentran en la población VR (**Figura 37-D**).



**Figura 37. Análisis de los estados transcripcionales de melanoma descritos por Rambow en las tres poblaciones celulares A375 parental, VR y VR\_RANO.** **A)** Análisis de enriquecimiento en base a los estados transcripcionales descritos por Rambow de acuerdo a los genes marcadores de mayor expresión de cada grupo. Expresión significativa delimitada por la línea discontinua ( $P=0,05$ ). **B)** Representación en gráficos de violín para el análisis de expresión asociado a la firma génica del estado NCSC (NCSC *signature*) en las poblaciones de estudio. **C)** Representación de las células en base a su expresión de la firma génica correspondiente al estado NCSC en las poblaciones celulares analizadas. Alta expresión en azul y baja expresión en gris. **D)** Representación UMAP de la expresión del marcador del estado NCSC, NGFR, en las poblaciones celulares analizadas.

En conjunto, mediante este análisis se confirmó que el tratamiento con RANO en las células de melanoma durante la adquisición de resistencia al BRAFi prácticamente elimina la subpoblación celular en principio responsable de conferir resistencia no solo a los MAPKi sino también a las inmunoterapias (Boshuizen, J. et al, 2020).

Seguidamente, se quiso estudiar en detalle los mecanismos que explicarían la presencia del estado NCSC en la población de células VR. Para ello, se identificó un programa de expresión génica central de los genes más altamente correlacionados con la firma génica del estado NCSC y se realizó un análisis de enriquecimiento contra funciones biológicas conocidas (*Gene Ontology Biological Processes, GOBP*) (**Figura 38**).

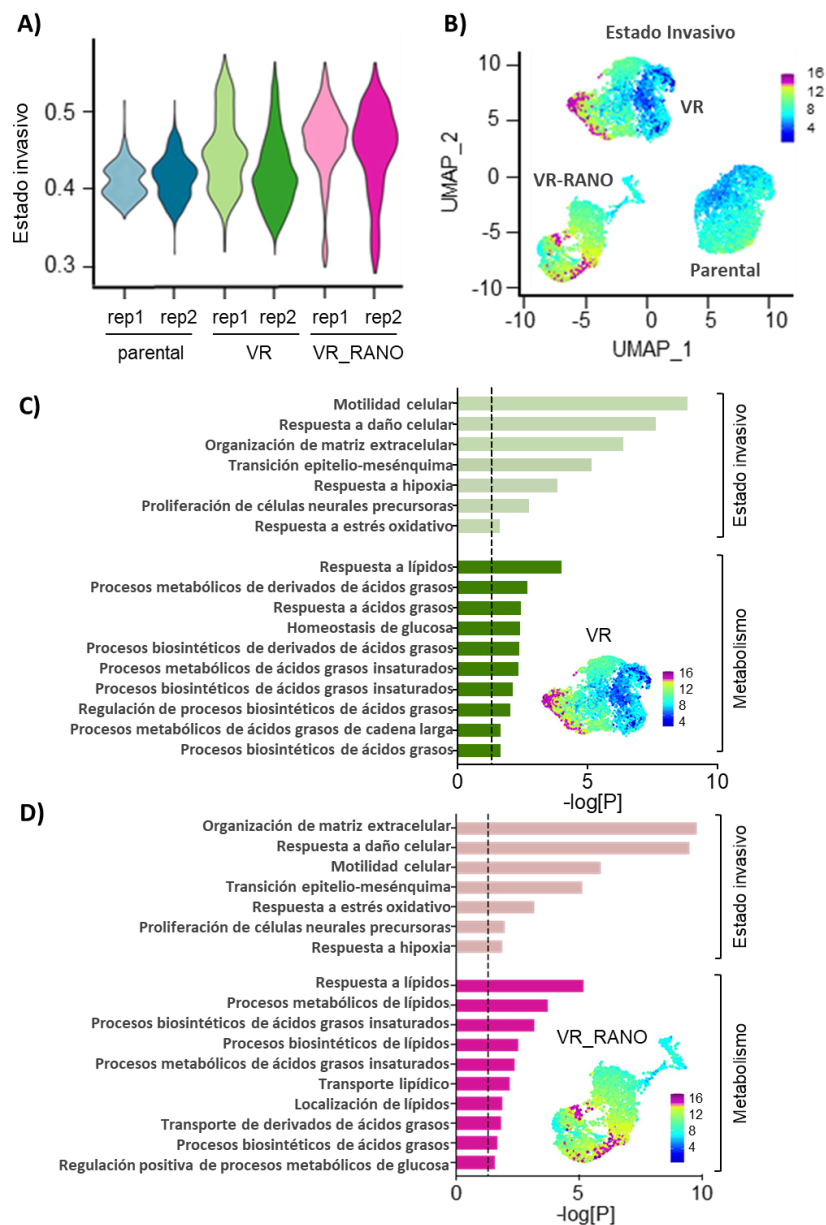


**Figura 38. Enriquecimiento de funciones biológicas mediante *Gene Ontology* en la subpoblación NCSC de las células VR.** Representación de las funciones biológicas enriquecidas significativamente en la subpoblación NCSC de las células VR que correlacionan con los 200 genes más expresados de esta firma génica. A la derecha, un gráfico UMAP de la población VR y la expresión asociada a la firma NCSC. La línea discontinua representa la significancia ( $P=0,05$ ).

Esta subpoblación NCSC de las células VR resultó asociada a funciones biológicas relacionadas con el desarrollo, diferenciación y migración de células madre de la cresta neural, entre otras. En cuanto a las funciones biológicas enriquecidas relacionadas con metabolismo, las células VR del estado NCSC presentaban únicamente un enriquecimiento en funciones del metabolismo de ácidos grasos (**Figura 38**). El enriquecimiento de otras rutas metabólicas que se detectaron no resultó significativo lo que podría explicar que las células VR sean particularmente tan sensibles a la RANO.

En cuanto a la firma génica del estado Invasivo, éste estaba representado en las células parentales pero cobraba mucha más relevancia en las poblaciones VR y VR\_RANO

(Figura 39-A, B). Como era de esperar, el programa central de expresión génica de este estado se asocia a funciones biológicas o GO relacionadas con migración y con la proliferación de células neurales precursoras. Además, también se observó que las rutas metabólicas enriquecidas eran las de biosíntesis de ácidos grasos lo cual fue observado en ambas poblaciones celulares, VR y VR\_RANO (Figura 39-C, D).



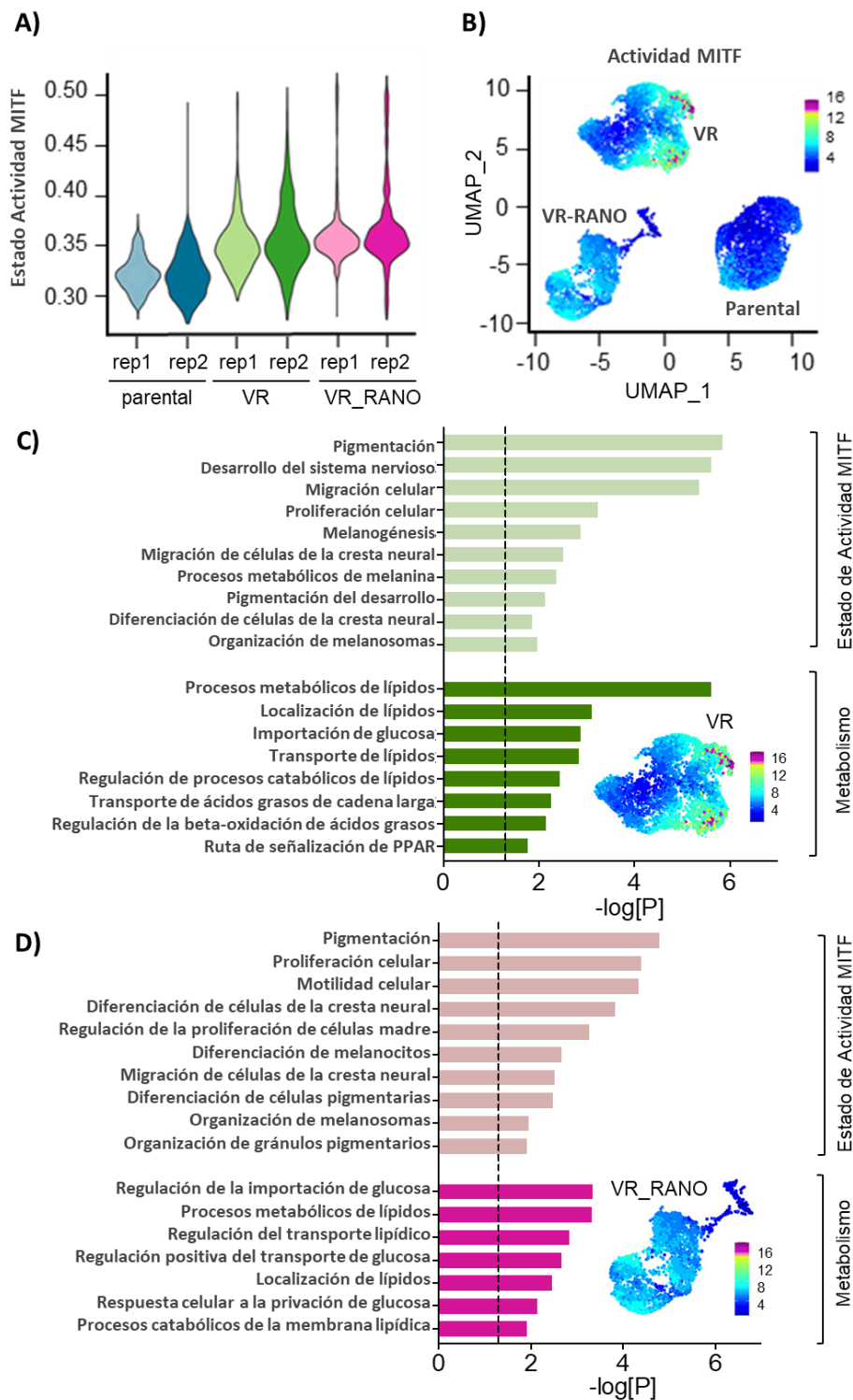
**Figura 39. Análisis del estado transcriptómico Invasivo en las poblaciones celulares VR y VR\_RANO.** Representación en gráficos de violín (A) y representación UMAP (B) de la expresión de la firma génica Invasiva en las tres poblaciones celulares de estudio. C) Representación de las funciones biológicas enriquecidas significativamente en la subpoblación Invasiva de las células VR (C) y VR\_RANO (D) que correlacionan con los 200 genes más expresados de esta firma génica. A la derecha, un gráfico UMAP de la población representada y la expresión asociada a la firma génica Invasiva. La línea discontinua representa la significancia ( $P=0,05$ ).

Al igual que el estado invasivo, el de actividad mediada por MITF estaba enriquecido de forma significativa tanto en la población VR como en la VR\_RANO, cuando se compara con las células parentales, donde no fue significativo (**Figura 37-A y Figura 40-A, B**). El metabolismo de ácidos grasos también domina en el estado de actividad mediada por MITF de la población celular VR. Sin embargo, en este caso, las funciones metabólicas más enriquecidas están asociadas al catabolismo de lípidos, FAO y señalización de PPAR (**Figura 40-C**). Así pues, esto último está completamente en línea con una alta actividad de MITF, el cual regula la fosforilación oxidativa a través de PPARGC1A en las células de melanoma con BRAF mutado (Haq, R. et al., 2013).

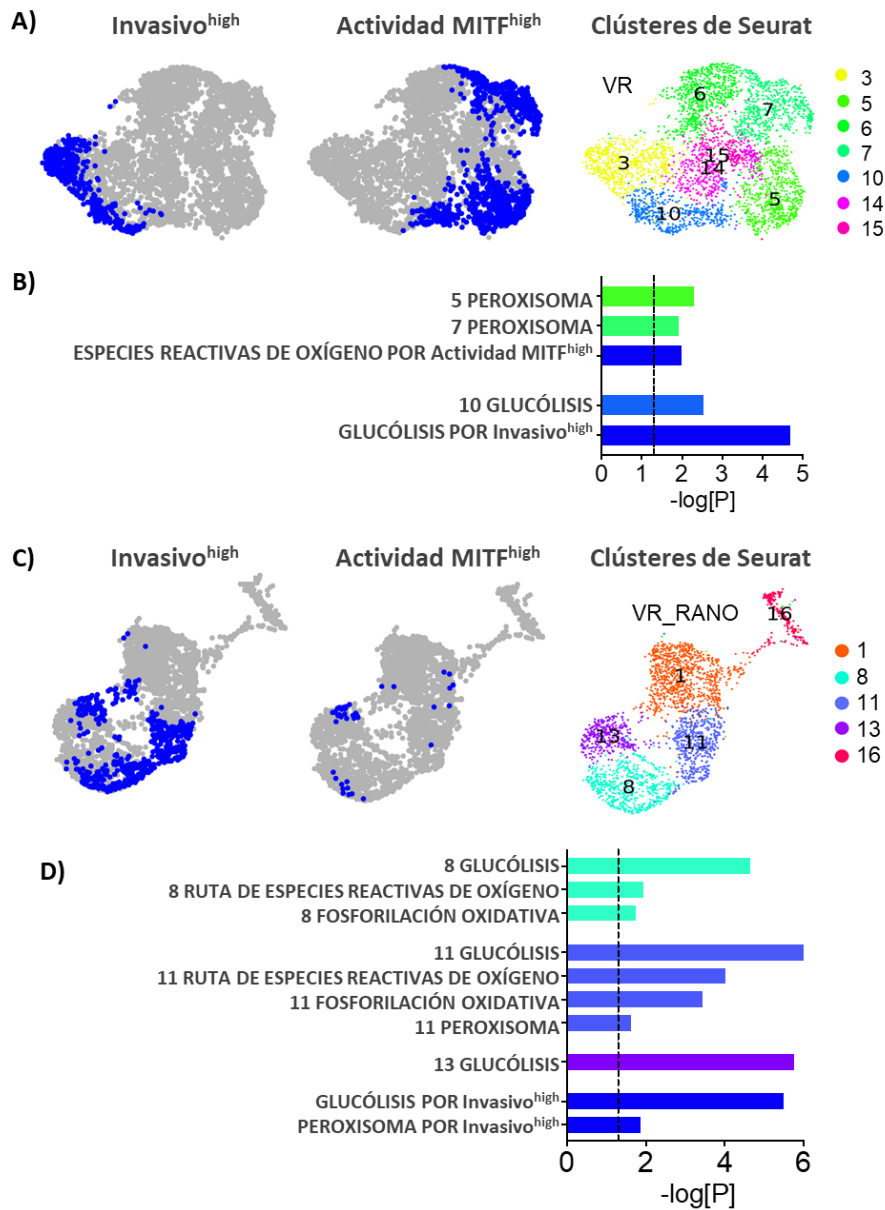
Por otro lado, las rutas metabólicas asociadas con el estado de Actividad MITF de la población VR\_RANO presentaban menos enriquecimiento en el metabolismo de ácidos grasos pero, sin embargo, hay funciones relacionadas con la captación y transporte de glucosa con una alta relevancia estadística (**Figura 40-D**).

Si se analiza cómo se distribuyen las células en la población VR en función de su expresión de MITF, que determina el estado de actividad mediada por MITF, se observó que el grupo de células que representa el estado invasivo es casi exclusivo del de actividad de MITF (**Figura 39-B y Figura 40-B**).





**Figura 40. Análisis del estado transcriptómico Actividad mediada por MITF en las poblaciones celulares VR y VR\_RANO.** Representación en gráficos de violín (A) y representación UMAP (B) de la expresión de la firma génica Actividad de MITF en las tres poblaciones celulares de estudio. C) Representación de las funciones biológicas enriquecidas significativamente en la subpoblación Actividad de MITF de las células VR (C) y VR\_RANO (D) que correlacionan con los 200 genes más expresados de esta firma génica. A la derecha, un gráfico UMAP de la población representada y la expresión asociada a la firma génica Actividad de MITF. La línea discontinua representa la significancia ( $P=0,05$ ).



**Figura 41. Distribución de los estados Invasivo<sup>high</sup> y de Actividad MITF<sup>high</sup> en la población celular VR. A) y C) Representación de la distribución de los Clústeres de Seurat de la población celular VR (A) y VR\_RANO (C) coloreados en azul en función de la expresión más alta del estado invasivo (Invasivo<sup>high</sup>) o de actividad MITF alta (Actividad MITF<sup>high</sup>) basado en el percentil 90 de todo el set de datos. B) y D) Análisis de enriquecimiento de los *Hallmarks* de cada clúster de la población VR (B) y VR\_RANO (D) basado en los genes marcadores para los estados Invasivo<sup>high</sup> y Actividad MITF<sup>high</sup> mediante la base de datos MsigDB. Significancia en B) y D) representada por la línea discontinua (P=0.05).**

Particularmente, esto es todavía más notorio cuando se seleccionan las subpoblaciones de células VR con una mayor expresión de los genes que representan estos estados, células que se incluyen en lo que se denominó estado Invasivo<sup>high</sup> o estado de Actividad MITF<sup>high</sup>. Las células VR del estado Invasivo<sup>high</sup> están principalmente contenidas en los

clústeres 5 y 7 (**Figura 41-A**) y presentan un enriquecimiento en *hallmarks* asociados al peroxisoma y a la producción de especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, el clúster 10 y las células del estado Invasivo<sup>high</sup> están enriquecidos en genes marcadores de glucólisis (**Figura 41-B**).

En general, esto sugiere que en las células VR hay dos poblaciones celulares diferenciadas que coexisten, donde el metabolismo de ácidos grasos parece ser crucial para su estado metabólico. De esta forma, en una subpoblación correspondiente con el estado Invasivo, domina el anabolismo o síntesis de ácidos grasos y, por otro lado, la subpoblación de actividad mediada por MITF está dominada por el catabolismo de ácidos grasos.

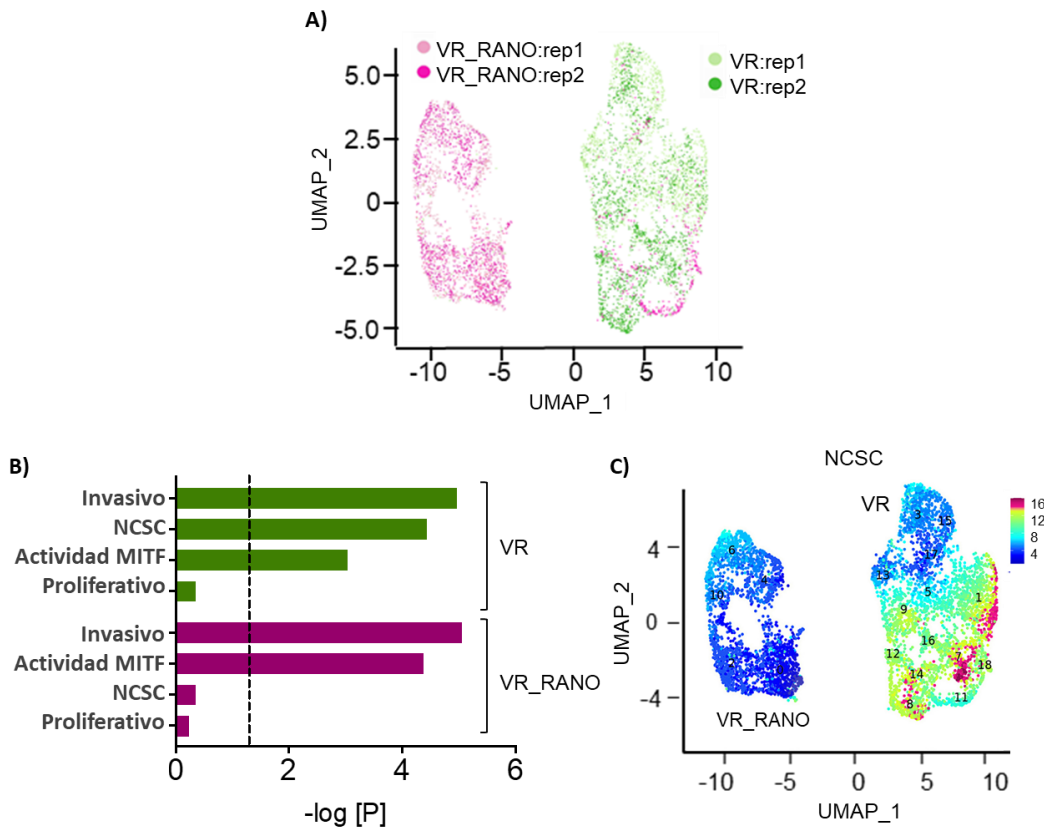
Respecto a la población VR\_RANO, la firma génica del estado de Actividad MITF está expresada de forma más general en un nivel intermedio cuando se compara con la población VR (**Figura 40-A, B**). De esta forma, mientras que las células del estado Invasivo<sup>high</sup> pueden verse fácilmente en la población VR\_RANO, las del estado Actividad MITF<sup>high</sup> son difícilmente detectables (Figura RES-26C). El análisis de *hallmarks* enriquecidos en esta población VR\_RANO mostró aumento en rutas asociadas con glucólisis, fosforilación oxidativa y ROS en las células del estado Invasivo<sup>high</sup>, co-localizadas en los clústeres 8, 11 y 13 (**Figura 41-C, D**).

En conclusión, el tratamiento con RANO durante la adquisición de resistencia al BRAFi establece en las células de melanoma poblaciones celulares que utilizan el anabolismo de ácidos grasos, la glucólisis y la fosforilación oxidativa para cumplir con la demanda energética.

### **7. Análisis Single-Cell RNAseq (scRNAseq): efecto de la Ranolazina en la resistencia adquirida a BRAFi**

Para entender en detalle como la RANO afecta a la respuesta de las células de melanoma al BRAFi, los análisis fueron enfocados para determinar las diferencias únicamente entre las poblaciones VR y VR\_RANO. En primer lugar, la representación bidimensional del

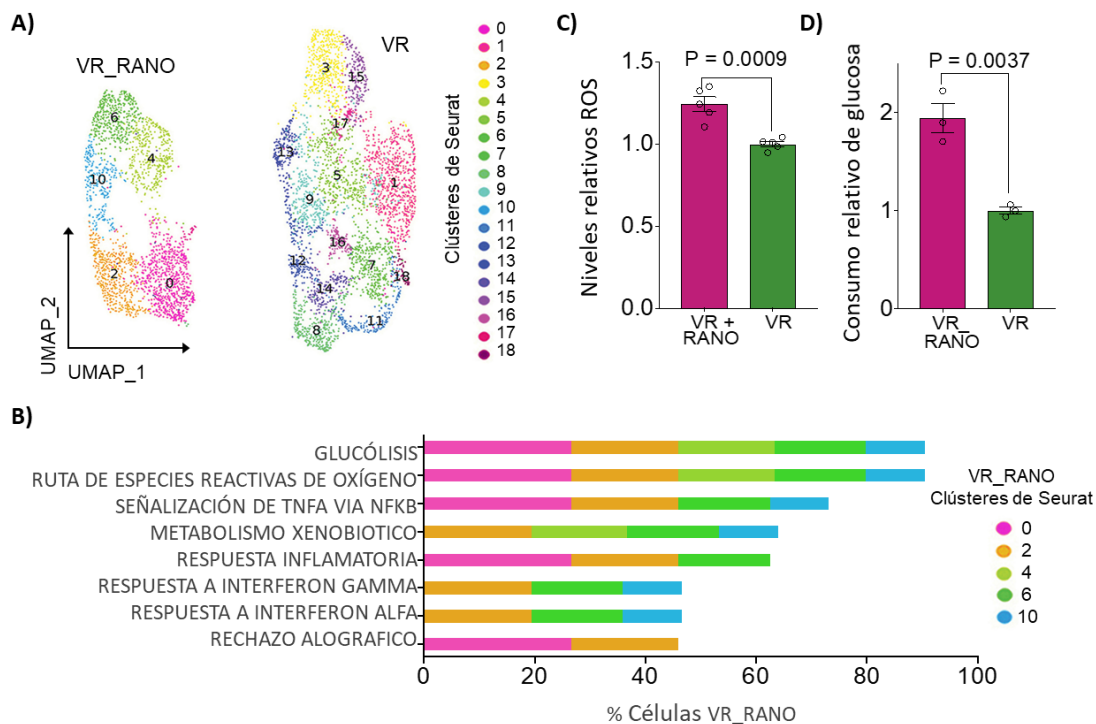
análisis transcriptómico muestra dos compartimentos bien diferenciados, correspondientes a cada población celular estudiada (**Figura 42-A**).



**Figura 42. Comparación de los transcriptomas de las células VR y VR\_RANO analizados por scRNAseq. A)** Representación UMAP de 6 457 células coloreadas según su tratamiento (VR o VR\_RANO) y la réplica de experimento (rep1 y rep2). **B)** Análisis de enriquecimiento en base a los estados transcripcionales descritos por Rambow de acuerdo a los genes marcadores de mayor expresión de cada grupo. Expresión significativa delimitada por la línea discontinua ( $P=0,05$ ). **C)** Representación UMAP de las células VR y VR\_RANO coloreadas según los niveles de expresión de la firma génica del estado NCSC.

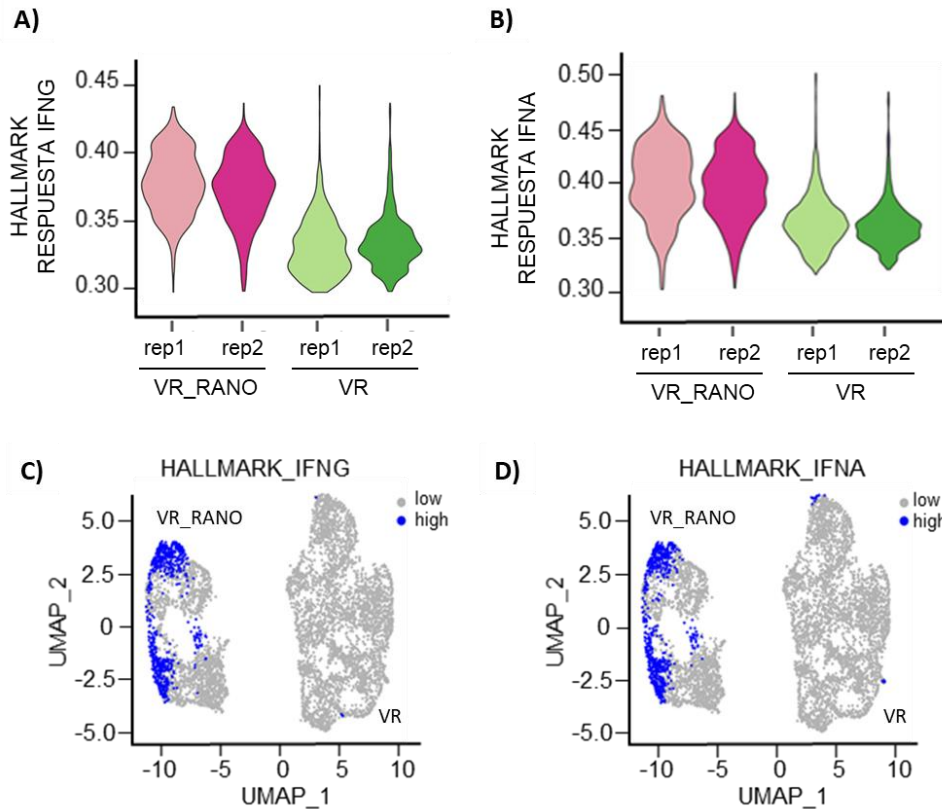
Como muestra la **Figura 42-B, C**, se confirmó de nuevo que la firma génica del estado NCSC no tiene una representación significativa en las células VR\_RANO mientras que en las VR es la segunda más significativa. Además, cada población celular está compuesta por diferentes clústeres específicos (**Figura 43-A**) y el análisis de enriquecimiento de cada clúster de forma individual identifica *hallmarks* asociados a glucólisis y ROS en todos los clústeres de las células VR\_RANO, que son el clúster 0, 2, 4, 6 y 10 (**Figura 43-B**).

Adicionalmente, para validar esto último, se analizó mediante kits comerciales la producción de ROS por parte de las células VR en ausencia y presencia de RANO, así como el consumo de glucosa en las células VR\_RANO en comparación a las células VR. (Figura 43-C, D).



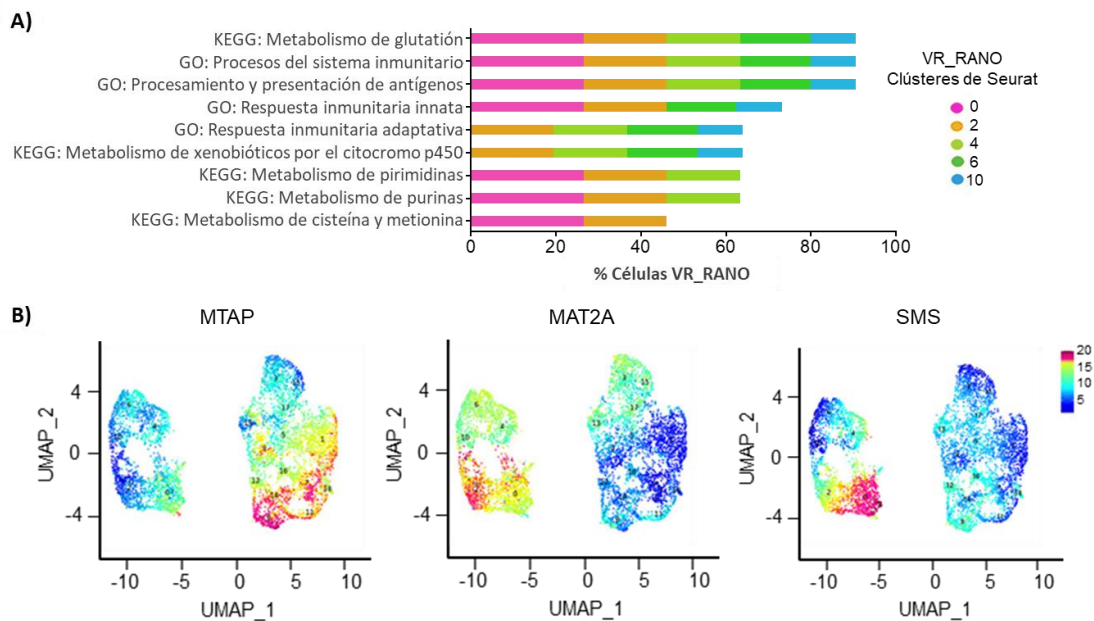
**Figura 43. Análisis de los clústeres de Seurat en las poblaciones celulares VR y VR\_RANO. A)** Representación UMAP de las 6457 células analizadas y distribuidas en distintos clústeres identificados por números y colores en las células VR y VR\_RANO. **B)** Análisis de enriquecimiento usando los genes marcadores de cada clúster y la base de datos de *Hallmarks* MSigDB. Sólo se indican los clústeres con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . El porcentaje de células VR\_RANO distribuidas en los respectivos clústeres se indican en cada *hallmark*. **C)** Cuantificación relativa de los niveles de ROS en las células VR con la ausencia o presencia de RANO 100 µM durante 4 horas de tratamiento. **D)** Cuantificación relativa de la captación o consumo de glucosa en las células VR y VR\_RANO.

Uno de los resultados más interesantes que se observó en los clústeres de las células VR\_RANO fue el enriquecimiento de *hallmarks* asociados con inmunidad, como las rutas de señalización de TNF $\alpha$ , de interferones alpha y gamma, así como de respuesta inflamatoria y rechazo alógrafico (Figura 43-B). De acuerdo con esto, se analizó en detalle la expresión de los genes involucrados en la ruta del interferón alpha (IFNA) y gamma (IFNG) en las células VR y VR\_RANO. Como era de esperar las células VR\_RANO expresan niveles de expresión más elevados en comparación con las VR (Figura 44).



**Figura 44. Análisis de expresión de los hallmarks de respuesta a interferones alpha (IFNA) y gamma (IFNG) entre las células VR y VR\_RANO.** Representación en gráficos de violín de las diferencias de expresión de IFNG (A) e IFNA (B) entre las réplicas (rep1 y rep2) de las células VR y VR\_RANO. **C) y D)** Representación UMAP de las células VR y VR\_RANO en función de su expresión alta (*high*, azul) o baja (*low*, gris) basada en el percentil 90 de las firmas génicas de la señalización de IFNG (C) e IFNA (D).

Adicionalmente, también se observaron cambios asociados a respuesta inmunitaria en el análisis mediante la base de datos *Gene Ontology* (GOBP). Así, se daba un enriquecimiento de genes asociados a presentación de antígenos y respuesta inmunitaria innata y adaptativa en los clústeres de las células VR\_RANO (**Figura 45-A**). También, utilizando la base de datos KEGG, se vio que el tratamiento con RANO induce un enriquecimiento de rutas asociadas a glutatión, así como al metabolismo de las purinas y pirimidinas (**Figura 45-A**), lo cual está asociado con el ciclo de la metionina. Este ciclo forma parte del “metabolismo de la cisteína y metionina”, el cual a su vez se encuentra significativamente enriquecido en las células VR\_RANO (**Figura 45-A**).



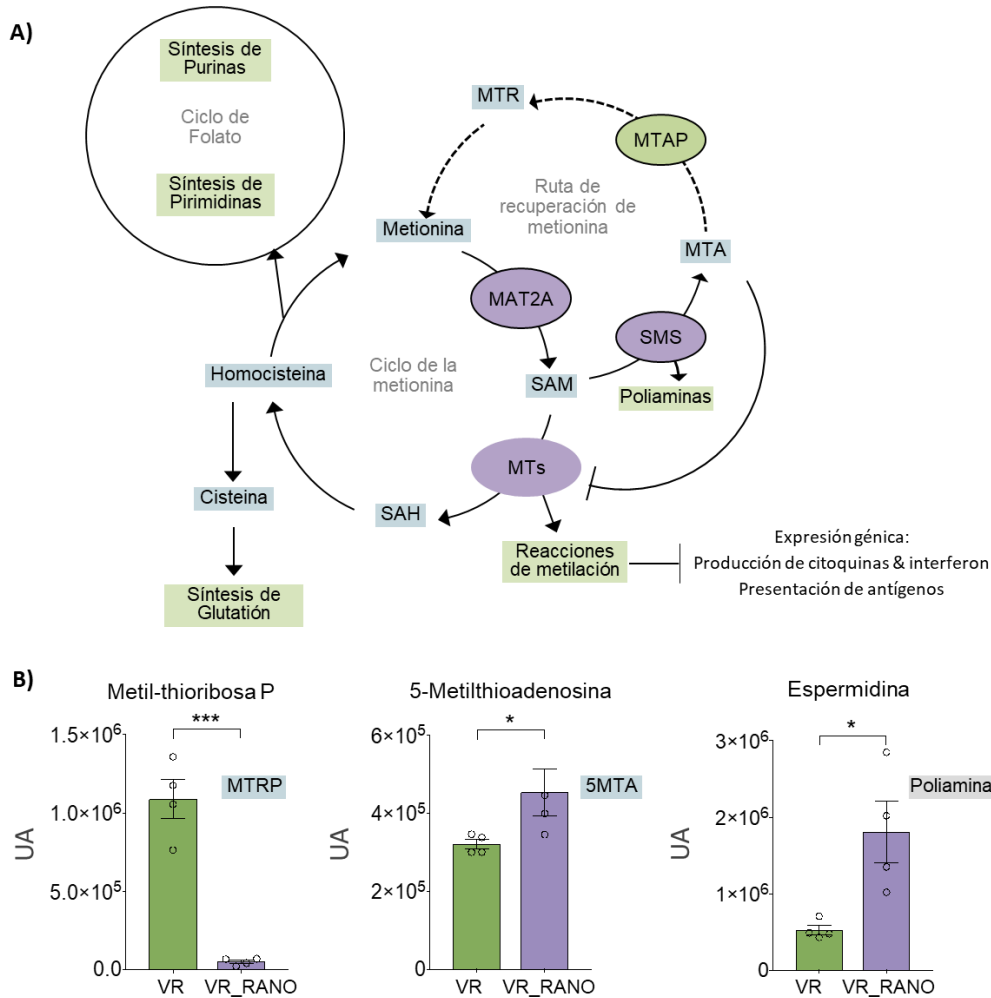
**Figura 45. A)** Análisis de enriquecimiento de *hallmarks* usando los genes marcadores de cada clúster y las bases de datos GOBP y KEGG *Pathway*. Sólo se indican los clústeres con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . El porcentaje de células VR\_RANO distribuidas en los respectivos clústeres se indican en cada *hallmark*. **B)** Representación UMAP de los niveles de expresión para las enzimas MTAP, MAT2A y SMS en las células VR y VR\_RANO.

En línea con el metabolismo de la cisteína y la metionina, se encontró que enzimas clave que actúan tanto en el ciclo de la metionina (MAT2A) como en la ruta de recuperación de ésta (SMS y MTAP) tenían diferentes patrones de expresión entre las células VR y VR\_RANO (**Figura 45-B**). En concreto, la expresión de MTAP y MAT2A se comportaba de forma inversa, de tal forma que se encontraron subpoblaciones celulares con niveles reducidos de MTAP y muy inducidos de MAT2A en la población VR\_RANO con respecto a la VR (**Figura 45-B**).

### 8. Estudio de la modulación de la Ranolazina sobre el metabolismo de la metionina

El metabolismo de la metionina es crucial para procesos celulares como las reacciones de metilación, la síntesis de glutatión y el ciclo de folato (Sanderson, SM. et al, 2019). Además de su captación del medio extracelular y su síntesis a partir de la homocisteína, las células pueden “reciclar” la metionina mediante la ruta de recuperación de la

metionina (*Methionine salvage pathway*). Así, en esta ruta de recuperación, MTAP (metil-thioadenosina fosforilasa) sintetiza la metionina a partir de MTA (metil-thioadenosina), que es un subproducto de SAM (S-adenosilmetionina) dependiente de la síntesis de poliamina, de la que SMS (espermina sintasa) forma parte. SAM además es producido por MAT2A (Metionina adenosiltransferasa 2A) a partir de la metionina (Figura 46-A).



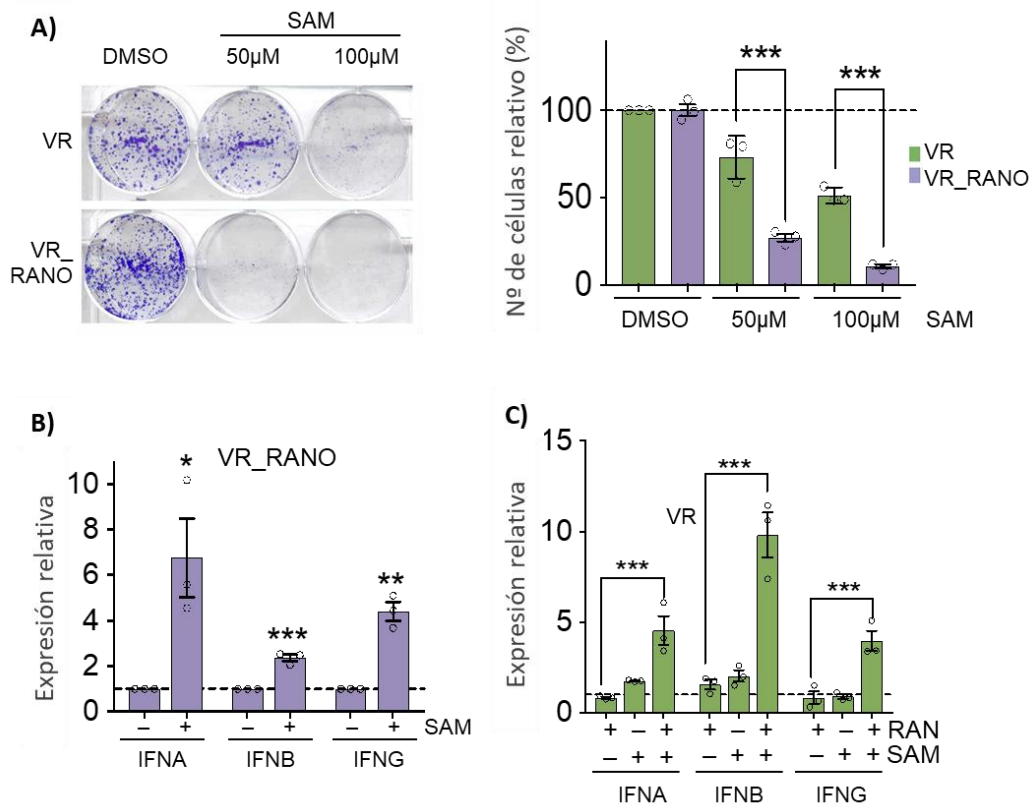
**Figura 46. Metabolismo de la metionina. A)** Esquema representativo de las rutas del metabolismo de la metionina asociado al ciclo de Folato y la síntesis de Glutación. Se indican los genes inducidos (MAT2A y SMS, en morado) y de baja expresión (MTAP, en verde) en las células VR\_RANO. **B)** Análisis de metabolómica muestran una reducción del metabolito metil-ribosa fosfato (MTRP) y un aumento de 5-metiladenosina (5MTA) y de espermidina en las células VR\_RANO comparado con las VR (unidades arbitrarias, UA).



En el análisis realizado por scRNAseq se observó que tanto MAT2A como SMS presentaban niveles de expresión más elevados en las células VR\_RANO en comparación con las VR y, por otro lado, los niveles de MTAP se encontraron reducidos (**Figura 45-B**). En línea con esto, se realizó un estudio de metabolómica, en cual se observó que las células VR\_RANO presentaban una reducción en la cantidad de MTRP (metil-thioribosa fosfato) y un aumento de los niveles de MTA y espermidina, en comparación con las células VR (**Figura 46-B**). Estas alteraciones metabólicas sugieren que un aumento de la expresión de SMS en las células VR\_RANO lleva a una mayor producción de MTA el cual se acumula debido a la reducción de expresión de MTAP.

Para estudiar más en detalle esto, se realizó un ensayo de formación de colonias con las células VR y VR\_RANO las cuales fueron tratadas de forma exógena con SAM a 50 y 100  $\mu$ M. La idea de este ensayo es comprobar si el tratamiento con SAM lleva a las células VR\_RANO, que presentan bajos niveles de MTAP, al aumento y acumulación de MTA. Es importante señalar que MTA puede actuar como un competidor natural de SAM e inhibir a las metiltransferasas del ciclo de la metionina (**Figura 46-A**). Esta inhibición puede desencadenar alteraciones epigenéticas que acaban en una reducción de la proliferación celular (Sanderson, SM. et al, 2019; Coppola, A. et al., 2020 y Zsigrai, S. et al., 2020). De acuerdo con esto, el ensayo de formación de colonias con la adición de SAM resultó en que las células VR\_RANO que expresan bajos niveles de MTAP fueron significativamente más sensibles que las células VR (**Figura 47-A**).

Considerando la correlación observada entre los reguladores del metabolismo de la metionina y las rutas de señalización del interferón en las células VR\_RANO (**Figura 43-45**), se analizó si SAM, mediante la acumulación de MTA, podía alterar la epigenética e impactar en la expresión de los interferones. Para ello, tras tratar a las células VR\_RANO con SAM 50  $\mu$ M durante 8 horas, se analizaron los niveles de expresión de IFNA, IFNB e IFNG mediante RT-qPCR dando como resultado una inducción significativa de los tres genes en comparación al tratamiento control con el vehículo DMSO (**Figura 47-B**).

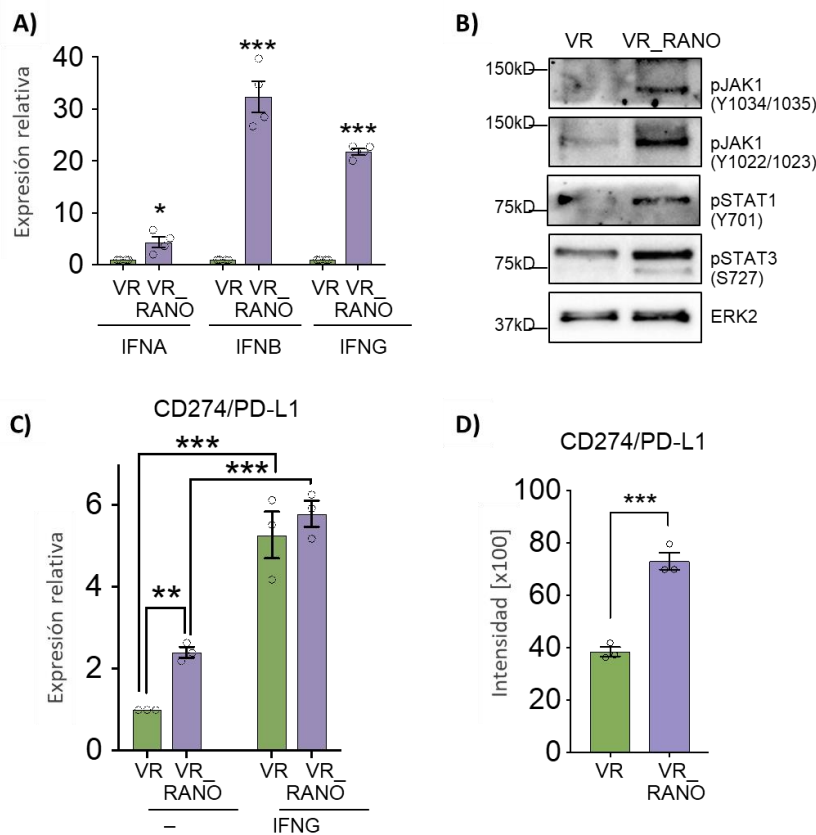


**Figura 47. Efecto de SAM en las células VR y VR\_RANO.** **A)** Ensayo de formación de colonias con las células VR y VR\_RANO tratadas con SAM a 50 y 100 µM. A la izquierda resultado de la proliferación celular tras la fijación y tinción con Cristal Violeta. A la derecha, cuantificación mediante la disolución en SDS-Tris del número de células relativo (%) calculado respecto al tratamiento control (DMSO) de cada línea celular. **B)** Análisis de expresión de los genes indicados mediante RT-qPCR en las células VR\_RANO tratadas con SAM 50 µM durante 8 horas. **C)** Análisis de expresión de los genes indicados mediante RT-qPCR en las células VR tratadas con SAM en combinación con RANO (n=3 réplicas biológicas).

Adicionalmente, también se realizó el mismo análisis de expresión, pero en este caso en las células VR, tratadas con SAM de igual forma que las VR\_RANO y además en ausencia y presencia de RANO 100 µM. La adición de SAM por sí solo en las células VR supuso una leve inducción de los interferones no significativa, sin embargo, al combinarlo con RANO éstos se indujeron muy significativamente (**Figura 47-C**).

También, se analizaron los niveles de expresión basales de los tres interferones comparando los de las células VR y VR\_RANO, donde los niveles de MTA son altos (**Figura 46-B**). La expresión basal de IFNA, IFNB e IFNG fueron significativamente más altos en las células VR\_RANO que en las células VR (**Figura 48-A**), lo cual correlaciona con una

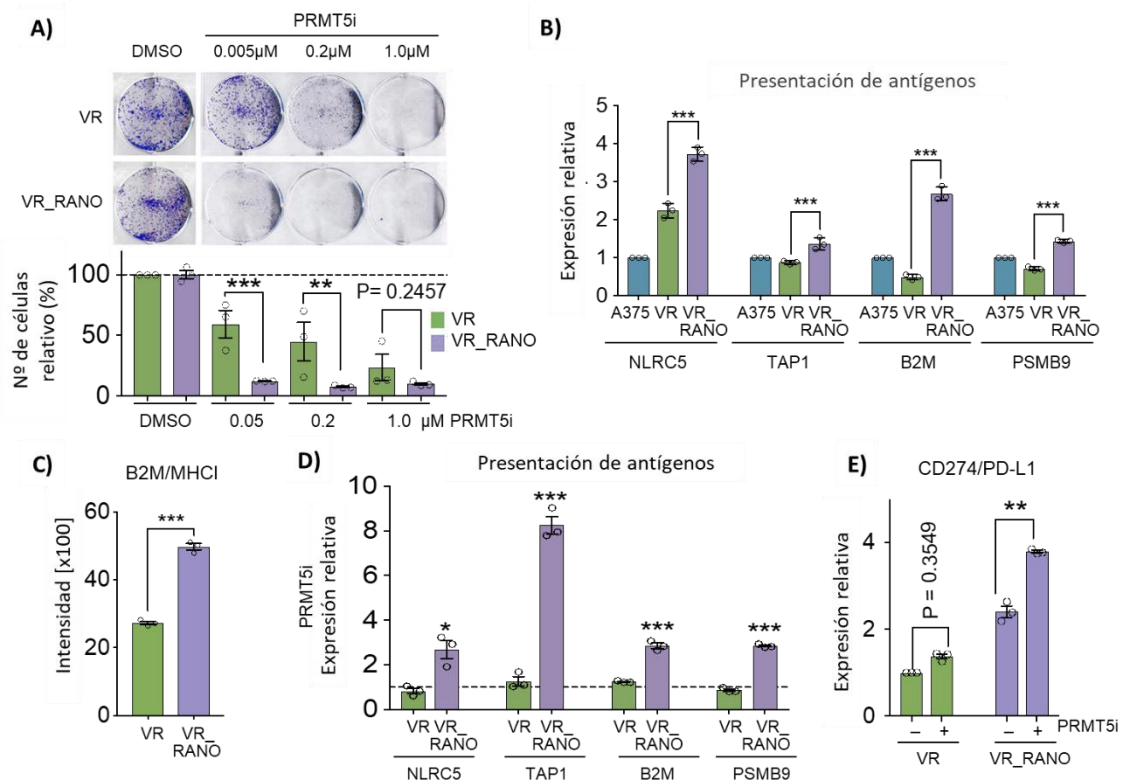
señalización de las rutas de interferón más elevada, detectable por el aumento en la fosforilación de JAK1, STAT1 y STAT3 utilizando la técnica de Western Blot (**Figura 48-B**).



**Figura 48. Análisis de expresión y activación de la ruta del interferón en las células VR y VR\_RANO.** **A)** Análisis de expresión relativa basal de IFNA, IFNB e IFNG en las células VR y VR\_RANO mediante RT-qPCR. Se utiliza como gen de expresión endógena el 18S. **B)** Análisis de la activación de la ruta de interferón mediante la detección por Western blot de la fosforilación en los residuos indicados de JAK1 (130 kDa), STAT1 (84 kDa) y STAT3 (86 kDa) en las células VR y VR\_RANO. ERK2 (42 kDa) fue utilizado como control de carga. **C)** Análisis de expresión de PD-L1 (CD274) mediante RT-qPCR en las células VR y VR\_RANO con la presencia o ausencia de IFNg (10 µg/mL) durante 24 horas. Expresión relativa (log2) calculada con el gen de expresión endógena 18S. **D)** Análisis de expresión de PD-L1 (CD274) mediante citometría de flujo en las células VR y VR\_RANO. (n=3 réplicas biológicas)

Finalmente, ya que la activación de la ruta de interferones aumenta la expresión del punto de control inmune, PD-L1 (García-Díaz, A. et al., 2017), se analizaron los niveles de expresión del mismo en las dos poblaciones celulares. Los niveles de PD-L1 se encontraron significativamente más elevados en las células VR\_RANO en comparación a las VR, tanto si era analizado mediante RT-qPCR (**Figura 48-C**) como por citometría de flujo (**Figura 48-D**).

En las células tumorales es frecuente encontrar co-deleción del gen de MTAP junto a CDKN2A, lo cual resulta en la inhibición, mediante MTA, de la metiltransferasa PRMT5 (proteína arginina N-metiltransferasa 5) y esto sensibiliza a las células tumorales a los inhibidores de PRMT5 (Kryukov, GV. Et al., 2016; Marjon, K. et al., 2016 y Mavrakis, KJ. et al., 2016). Como se observa con SAM, las células VR\_RANO fueron significativamente más sensibles al tratamiento con el inhibidor de PRMT5 (GSK3326595) (**Figura 49**), lo que sugiere que PRMT5 se encuentra inhibido en estas células.



**Figura 49. Análisis del efecto por la inhibición de PRMT5 en las células VR\_RANO en comparación a las VR.** **A)** Ensayo de formación de colonias con las células VR y VR\_RANO con el inhibidor de PRMT5 (PRMT5i) GSK3326595 en dosis crecientes desde 0,05 hasta 1 μM con DMSO como control. Arriba, resultado de la proliferación celular tras la fijación y tinción con Cristal Violeta. Abajo, cuantificación mediante la disolución en SDS-Tris del número de células relativo (%) calculado respecto al tratamiento control (DMSO) de cada línea celular. **B)** Análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR en las células VR y VR\_RANO de los genes indicados, involucrados en la presentación de antígenos, expresión relativa (log2) calculada con el gen de expresión endógena 18S. **C)** Análisis de expresión de B2M mediante citometría de flujo en las células VR y VR\_RANO. **D)** Análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR en las células VR y VR\_RANO tratadas con el PRMT5i (0,2 μM) durante 24h. Expresión relativa (log2) de los genes indicados calculada con respecto al tratamiento control (DMSO), con valor 1 y marcado por la línea discontinua, y 18S como gen de expresión endógena. **E)** Análisis de expresión relativa de PD-L1 mediante RT-qPCR en las células VR y VR\_RANO tratadas con el PRMT5i (0,2 μM) durante 24h. Expresión relativa (log2) calculada con el gen de expresión endógena 18S. (n=3 réplicas biológicas).

PRMT5 suprime la expresión de NLRC5 (Kim, H. et al., 2020), que es el regulador principal de los genes que forman parte del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y cuya función principal consiste en el proceso de presentación de antígenos (Cho, S., et al., 2021 y Meissner, TB. et al., 2010). Ya que se observó que PRMT5 está inhibido en las células VR\_RANO y que éstas a su vez tienen un enriquecimiento en *hallmarks* asociados con la presentación de antígenos, se analizó la expresión de diferentes genes involucrados en dicho proceso como NLRC5 y sus dianas: TAP1, B2M y PSMB9. La expresión de todos ellos resultó estar significativamente inducida en las células VR\_RANO con respecto a las células VR, tanto en el análisis por RT-qPCR (**Figura 49-B**) como por citometría de flujo en el caso de B2M (**Figura 49-C**).

La expresión de estos genes asociados con la presentación de antígenos y regulados por NLRC5, presumiblemente mediante la reducción de PRMT5, podría ser todavía mayor al tratar las células VR y VR\_RANO con el inhibidor de PRMT5 (PRMT5i en adelante). Para ello se analizó mediante RT-qPCR la expresión de dichos genes en ambas poblaciones celulares tratadas durante 24 horas con el PRMT5i a 0,2  $\mu$ M. En todos los genes analizados se observa una inducción significativamente mayor en las células VR\_RANO tratadas con PRMT5i en comparación a las VR tratadas de la misma forma (**Figura 49-D**). Esto podría confirmar que efectivamente PRMT5 está involucrado en la regulación de los genes asociados con la presentación de antígenos en las células de melanoma resistentes a BRAFi y tratadas con RANO.

Adicionalmente, también se ha descrito que PRMT5 regula directamente la expresión de PD-L1 (Hu, R. et al., 2021) por lo que la expresión de éste fue también analizada en las células VR y VR\_RANO en ausencia y presencia de PRMT5i a 0,2  $\mu$ M durante 24 horas, confirmando que este inhibidor induce de forma específica y significativa la expresión de PD-L1 en las células VR\_RANO (**Figura 49-E**).

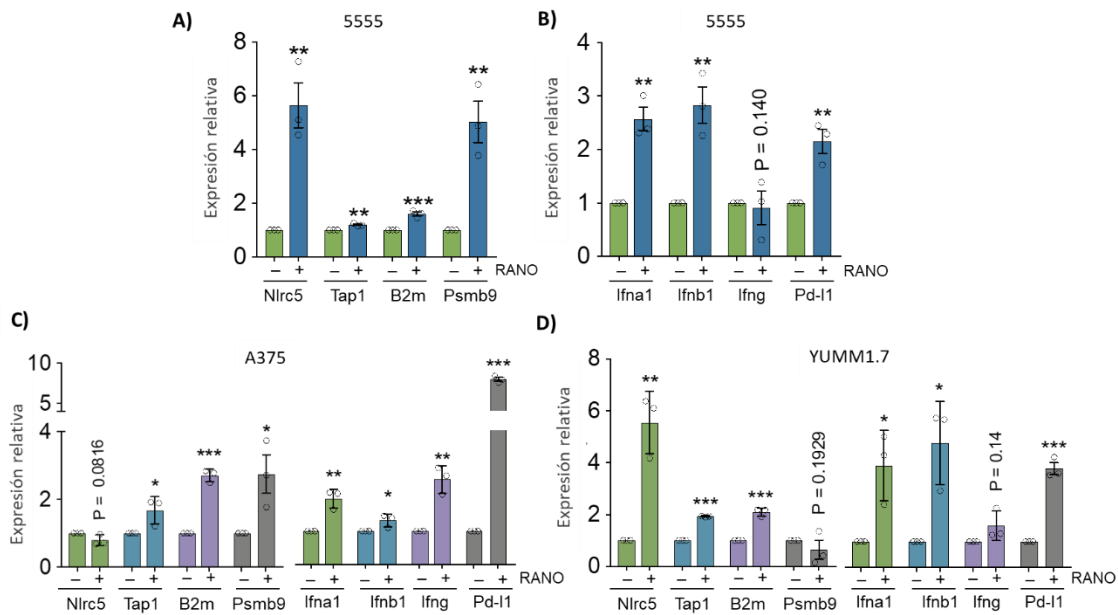
Como se ha indicado en apartados previos, la RANO es un fármaco aprobado por la FDA y la EMA, lo que le da carácter traslacional. Esto es importante porque según los resultados obtenidos en este trabajo, este fármaco podría estar teniendo un impacto en la inmunidad tumoral mediante la inducción de la presentación de antígenos, el aumento en la señalización de la ruta de interferones y la inducción de la expresión de

PD-L1. Por todo ello, esta modulación de la inmunidad tumoral podría hacer a los tumores más inmunogénicos, detectables por el sistema inmune y quizás predecir una mejor respuesta a inmunoterapias.

### **9. Efecto de la Ranolazina con independencia del BRAFi en las células de melanoma BRAF<sup>V600E</sup>**

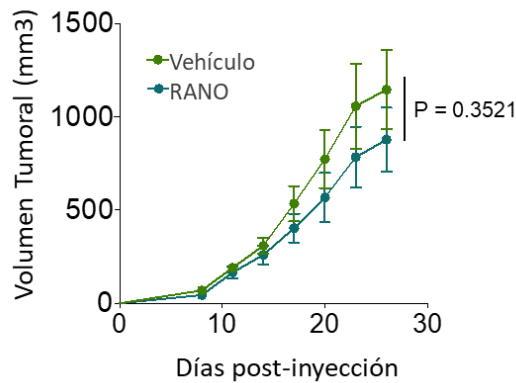
Ya que los resultados obtenidos sugieren que la RANO está impactando en los tumores confiriéndoles un fenotipo más inmunogénico, lo siguiente que se estudió fue si este efecto es específico de la RANO con independencia del BRAFi y, por lo tanto, fuera del contexto de resistencia adquirida al mismo.

Para comprobar esto se cultivaron las células de melanoma humano A375 y las de melanoma murino con la mutación BRAF<sup>V600E</sup>, 5555 y YUMM1.7 en presencia de RANO (100 µM) durante aproximadamente 12 días. Posteriormente, se analizaron mediante RT-qPCR la expresión de los genes involucrados en la presentación de antígenos (NLRC5, TAP1, B2M y PSMB9) así como la expresión de IFNA, IFNB, IFNG y PD-L1. De forma general, estos genes se inducían significativamente en las tres líneas celulares (**Figura 50**), confirmando que la RANO induce el fenotipo inmunogénico como agente único en la ausencia de BRAFi tanto en células humanas como murinas.



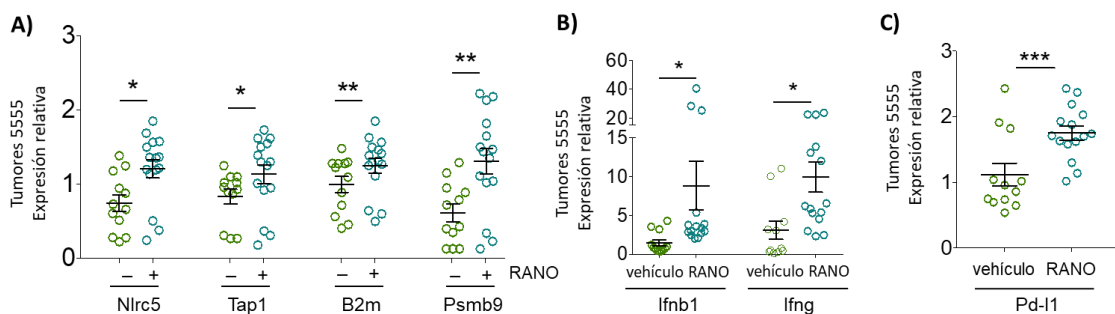
**Figura 50. Análisis de expresión génica por RT-qPCR de las células de melanoma BRAF<sup>V600E</sup> humanas y murinas cultivadas con RANO. A)** Análisis de expresión relativa para los genes indicados en las células de melanoma de ratón 5555, **B)** A375 y **C)** YUMM1.7 cultivadas con RANO 100 μM durante 12 días. Expresión relativa (log2) calculada con respecto al tratamiento control DMSO (-) y el gen de expresión endógena 18S. (n=3 réplicas biológicas)

Tras esta confirmación, se procedió a estudiar si esta modulación inmune en las células tumorales inducida por RANO podría darse no solo en ensayos *in vitro* sino también *in vivo*. Para ello, se realizó un ensayo *in vivo* inyectando subcutáneamente las células de melanoma de ratón con la mutación en BRAF<sup>V600E</sup>, 5555, en ratones inmunocompetentes C57BL/6J. Posteriormente, los ratones fueron tratados con RANO y su vehículo (PBS) como grupo control. El tamaño tumoral de los ratones tratados con RANO resultó en una leve pero no significativa reducción (**Figura 51**) sin tener un impacto en el peso de los animales (**Figura 53-B**).



**Figura 51.** Representación del volumen tumoral a lo largo de los días tras la inyección subcutánea de las células 5555 en ratones macho C57BL/6 tratados con RANO 300 mg/kg diariamente (azul) o el vehículo PBS (verde) durante 29 días. n=5 ratones por grupo.

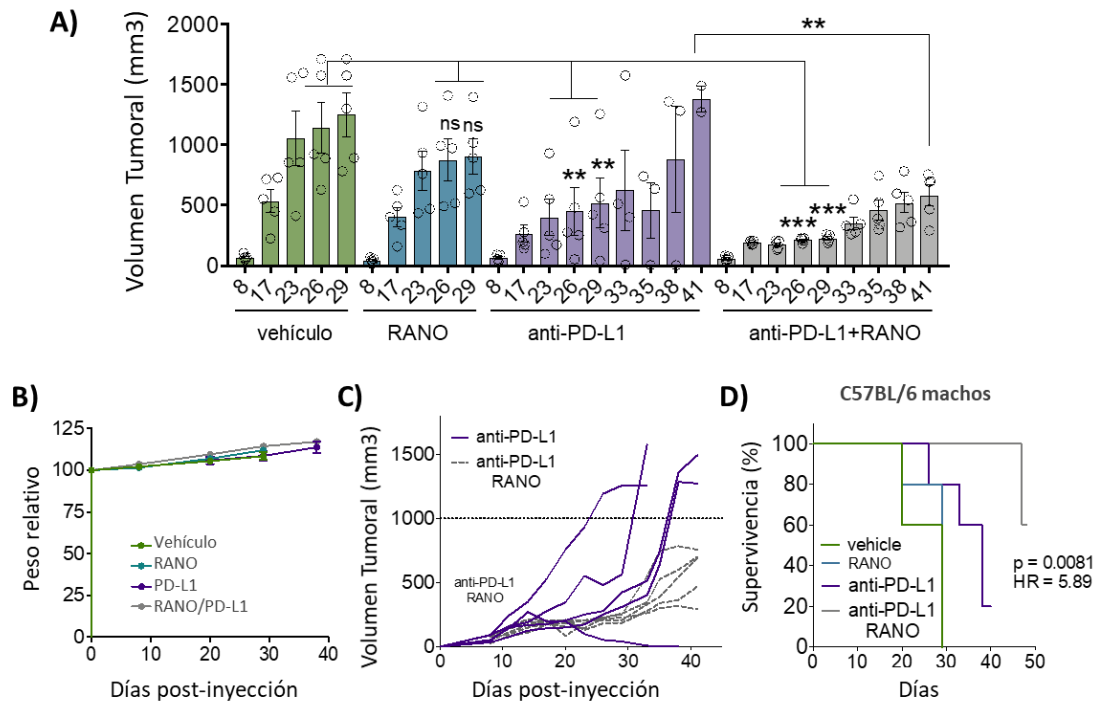
Adicionalmente, con los tumores obtenidos en este ensayo se aisló ARNm y se analizó mediante RT-qPCR la expresión de los genes asociados con la presentación de antígenos, interferones y PD-L1. Los niveles de expresión de estos genes estaban significativamente inducidos en los tumores tratados con RANO en comparación con los tumores del grupo control (**Figura 52**), indicando que la RANO es efectiva en inducir el fenotipo inmunogénico *in vivo*.



**Figura 52.** Análisis de expresión génica por RT-qPCR de los tumores 5555 generados en ratones macho C57BL/6 tratados con RANO 300 mg/kg (azul) o el vehículo PBS (verde) durante 29 días. **A)** Expresión relativa de los genes involucrados en la presentación de antígenos, **B)** interferones beta y gamma y **C)** PD-L1. Expresión relativa (log2) calculada respecto al tratamiento con el vehículo y el gen de expresión endógena 18S. (n=3 réplicas biológicas de 4 tumores control y 5 tumores de tratamiento con RANO).



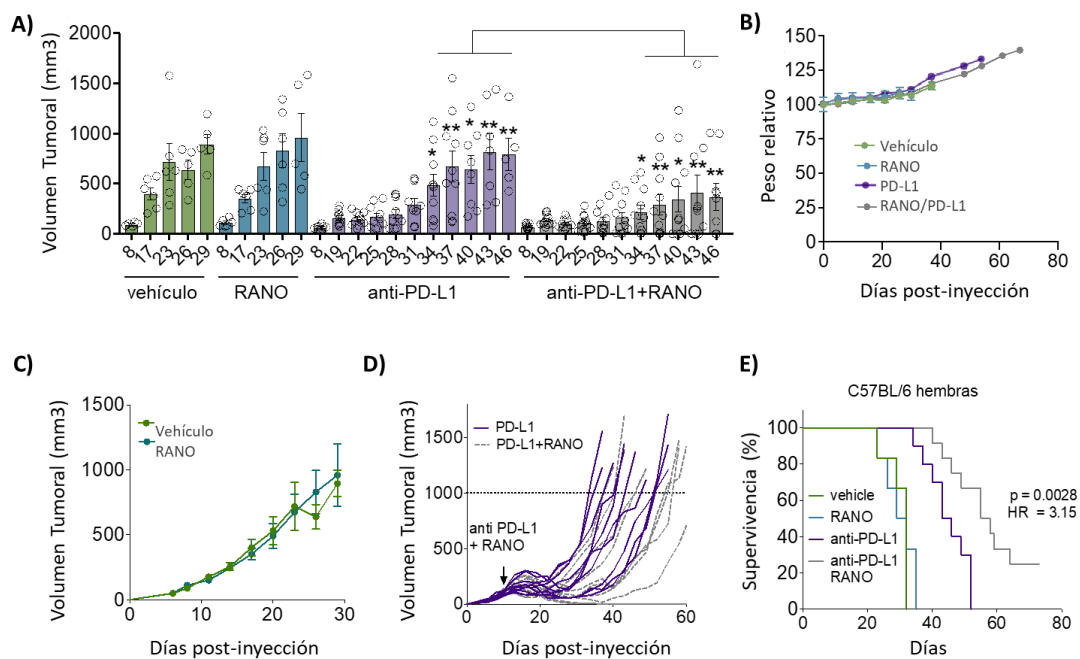
Una vez confirmado esto, lo siguiente que se realizó fue comprobar *in vivo* si la RANO podía sensibilizar a las células de melanoma al tratamiento con inmunoterapias, en concreto, anticuerpos anti-PD-L1. Para ello, al igual que en el ensayo anterior, se inyectaron células 5555 en ratones C57BL/6J y fueron tratados con anticuerpos anti-PD-L1 en la ausencia o presencia de RANO. De esta forma, se determinan cuatro grupos de tratamiento: control (vehículo), RANO, anti-PD-L1 y RANO/anti-PD-L1.



**Figura 53. Ensayo *in vivo* con las células de melanoma murino 5555 inyectadas en ratones C57BL/6 machos y tratados con vehículo, RANO (300 mg/kg, diario), anti-PD-L1 (10 mg/kg, cada 3 días) y la combinación RANO/anti-PD-L1. A)** Representación del tamaño tumoral a lo largo del ensayo en los cuatro grupos de tratamiento (n=5 ratones en cada grupo). **B)** Peso de los animales a lo largo del ensayo. **C)** Volumen de cada tumor individual en los grupos tratados con anti-PD-L1 y RANO/PD-L1. Comienzo del tratamiento el día 6 post-inyección, indicado con una flecha. **D)** Supervivencia representada por curvas de Kaplan-Meier de los ratones a lo largo del ensayo comparando los cuatro grupos de tratamiento. Exceder 1000 mm<sup>3</sup> de tamaño tumoral fue considerado final de experimento (sacrificio del animal), marcado en C) por una línea.

El resultado de este ensayo *in vivo* se recoge en la **Figura 53**, y como se observa en la **Figura 53-A** y en el ensayo *in vivo* previo, el tratamiento con RANO por sí solo redujo levemente el tamaño del tumor pero de forma no significativa, sin alterar el peso de los animales (**Figura 53-B**). Por otro lado, el tratamiento con anti-PD-L1 en monoterapia,

como era de esperar, tiene una respuesta significativa en la reducción del tamaño tumoral pero ésta es variable a lo largo del tiempo. Sin embargo, su combinación con RANO potencia su respuesta, siendo más estable y mantenida en el tiempo. Además, se observa como los tumores tratados con anti-PD-L1 comienzan a progresar aproximadamente a los 30 días desde el comienzo del tratamiento, mientras el tamaño tumoral de los tratados con la combinación RANO/PD-L1 se mantenía significativamente reducido en ese periodo de tiempo del ensayo (**Figura 53-A, C**). Adicionalmente, otro resultado importante de este ensayo fue que la supervivencia de los animales mejoró significativamente cuando eran tratados con la combinación de tratamiento RANO/PD-L1 en comparación con la monoterapia con anti-PD-L1 (**Figura 53-D**).



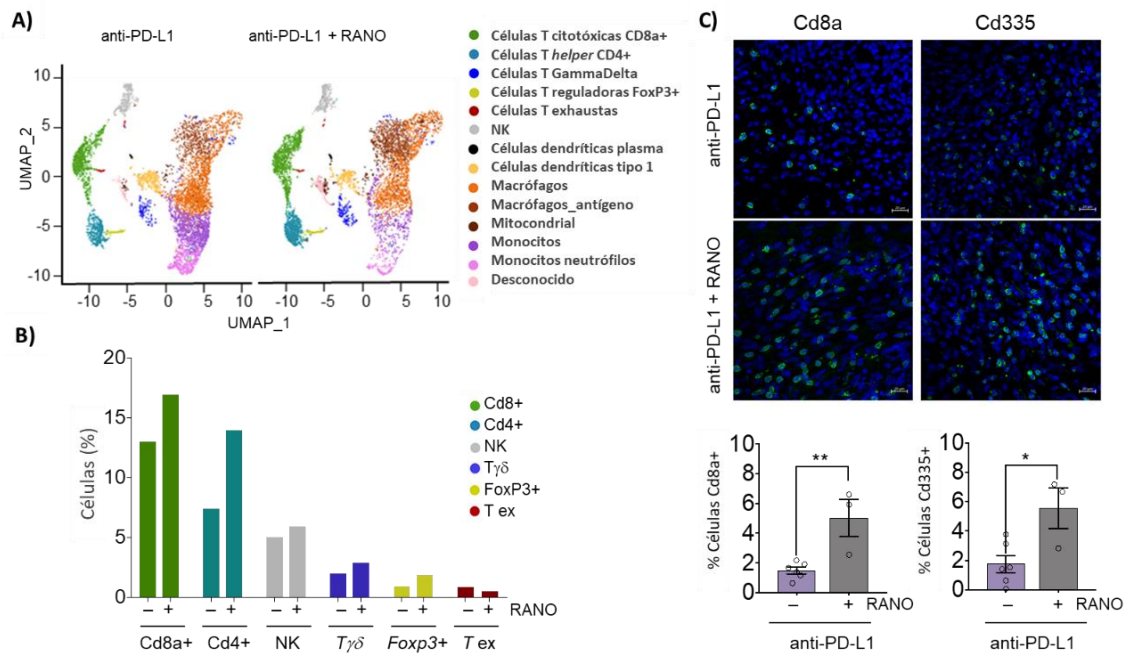
**Figura 54. Ensayo *in vivo* con las células de melanoma murino 5555 inyectadas en ratones C57BL/6 hembras y tratados con vehículo, RANO (300 mg/kg, diario), anti-PD-L1 (10 mg/kg, cada 3 días) y la combinación RANO/anti-PD-L1. A) Representación del tamaño tumoral a lo largo del ensayo en los cuatro grupos de tratamiento (n=6 ratones en cada grupo). B) Peso de los animales a lo largo del ensayo. C) Volumen tumoral a lo largo del ensayo de los ratones tratados con vehículo y RANO (300 mg/kg, diario). D) Volumen de cada tumor individual en los grupos tratados con anti-PD-L1 (n=10 tumores) y RANO/PD-L1 (n=11 tumores). Comienzo del tratamiento el día 6 post-inyección, indicado con una flecha. E) Supervivencia representada por curvas de Kaplan-Meier de los ratones hembra a lo largo del ensayo comparando los cuatro grupos de tratamiento. Exceder 1000 mm<sup>3</sup> de tamaño tumoral fue considerado final de experimento (sacrificio del animal), marcado en C) por una línea.**

Todas estas observaciones también fueron confirmadas en ratones hembra, realizando otro ensayo *in vivo* siguiendo estrictamente el mismo protocolo que para los ratones macho (**Figura 54**).

Finalmente, teniendo en cuenta el conjunto de todos los resultados obtenidos, se puede confirmar que la RANO proporciona a las células tumores un fenotipo inmunogénico que posibilita obtener una mejor respuesta al tratamiento con inmunoterapia basada en anticuerpos anti-PD-L1.

### **10. Efecto de la Ranolazina en el microambiente tumoral**

Hasta el momento se ha estudiado en detalle como la RANO afecta a la inmunogenicidad de las células tumorales pero también nos preguntamos si podría tener además un impacto en el microambiente tumoral cuando los tumores son tratados con terapia anti-PD-L1. Para aclarar esto, se realizó un ensayo *in vivo* inyectando las células 5555 en ratones C57BL/6 macho los cuales fueron tratados de igual manera con vehículo, RANO y anti-PD-L1 en ausencia y presencia de RANO durante 17 días. Es en este momento del tratamiento cuando los tumores todavía están respondiendo a las terapias con anti-PD-L1 y a su combinación con RANO y también cuando la diferencia del tamaño tumoral entre ambos grupos ya ha alcanzado la significancia. Se aislaron las células inmunes infiltradas en estos tumores, mediante la detección CD45+, y se llevó a cabo un estudio scRNAseq.



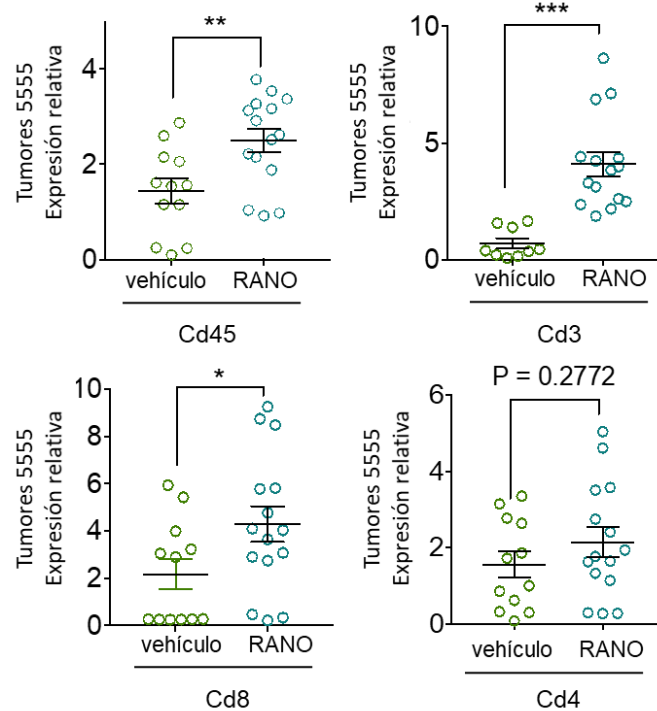
**Figura 55. Estudio *Single-cell RNAseq* (scRNAseq) de las células inmunes procedentes de los tumores generados con células 5555 en ratones macho C57BL/6 tratados con anti-PD-L1 y RANO/antiPD-L1 durante 17 días. A)** Representación UMAP de las distintas poblaciones de células inmunes CD3+/CD45+ en ambos grupos de tratamiento y diferenciadas por los colores indicados. Cada población celular fue identificada usando firmas génicas específicas de linaje. **B)** Porcentaje de las poblaciones linfocitarias identificadas en el infiltrado tumoral comparando los tumores tratados con anti-PD-L1 o RANO/ anti-PD-L1. **C)** Análisis de expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia para CD8 y CD335 en los tumores tratados como se indica durante 16 días.

En este estudio se identificó un aumento notable de células T citotóxicas Cd8+ así como células T helper Cd4+ y un ligero incremento de células NK (Figura 55-A, B). Además, mediante la técnica de inmunofluorescencia se analizaron los niveles de CD8+ y CD335+, viéndose un aumento significativo en los tejidos de los tumores tratados con la terapia combinada en comparación a la monoterapia con anti-PD-L1 durante 16 días (Figura 55-C), corroborando el aumento de las células T Cd8+ y las células NK observado en el estudio scRNAseq.

Este resultado sugiere que la RANO, mediante el aumento de la inmunogenicidad de las células de melanoma, potencia la infiltración inmune en los tumores cuando se usa en combinación con anti-PD-L1.

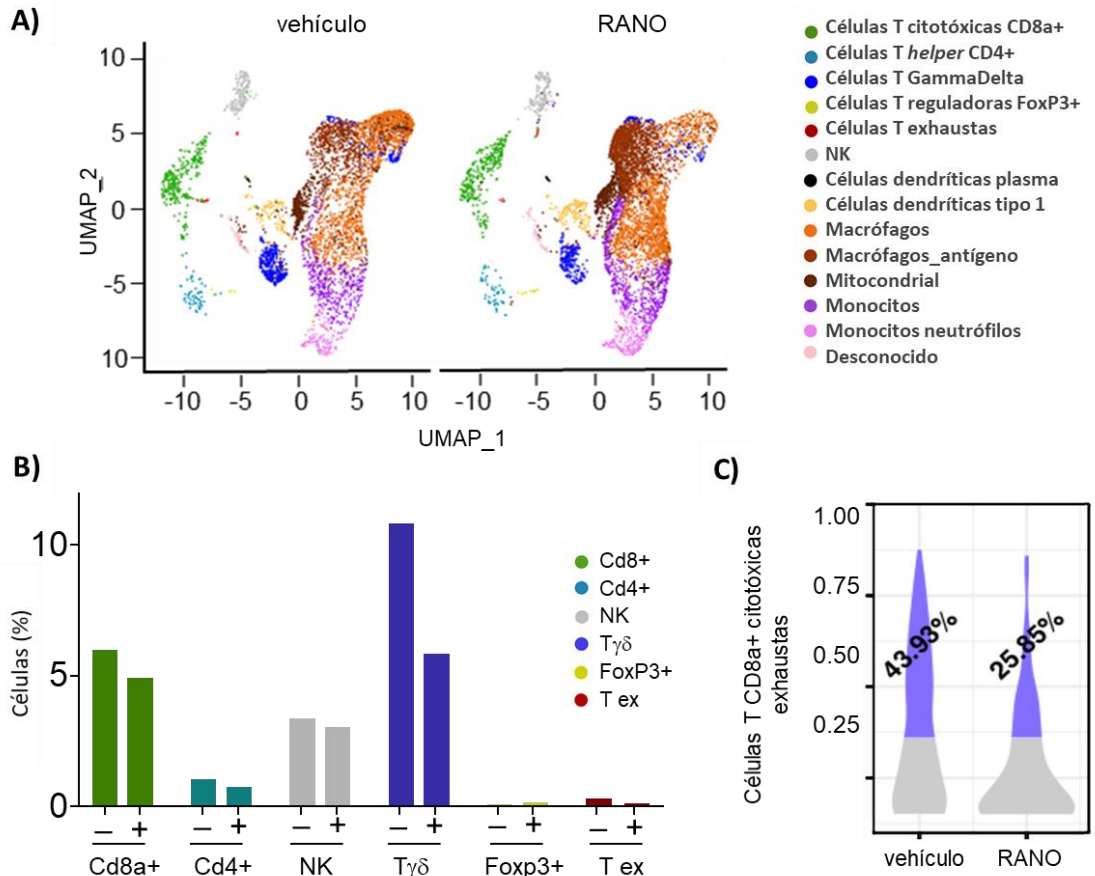
En línea con esto, en los tumores de este ensayo tratados únicamente con RANO y su vehículo (a día 21 de tratamiento) se analizó la expresión de diferentes marcadores

inmunes mediante aislamiento de su ARNm y RT-qPCR. En este análisis de expresión se vio que Cd45, Cd3 y Cd8 presentan una inducción significativa de sus niveles de expresión en los tumores tratados con RANO en comparación al control. Cd4 mostró una tendencia similar pero no resultó estadísticamente significativo (**Figura 56**).



**Figura 56. Análisis de expresión génica por RT-qPCR** de los genes indicados en los tumores 5555 generados en ratones macho C57BL/6 tratados con RANO 300 mg/kg (azul) o el vehículo PBS (verde) durante 21 días. Expresión relativa (log<sub>2</sub>) calculada respecto al tratamiento con el vehículo y el gen de expresión endógena 18S. (n=3 réplicas)

Si se analiza los datos obtenidos en el ensayo de scRNAseq comparando los grupos control y RANO en el día 13 de tratamiento, no se observa que aumente la cantidad de células T Cd8+ o Cd4+ ni tampoco las células NK, las cuales más bien tienden a reducirse (**Figura 57-A, B**).



**Figura 57. Estudio scRNAseq de las células inmunes procedentes de los tumores generados con células 5555 en ratones macho C57BL/6 tratados con RANO y su vehículo durante 13 días.** **A)** Representación UMAP de las distintas poblaciones de células inmunes aisladas por la expresión de CD3+/CD45+ en ambos grupos de tratamiento y diferenciadas por los colores indicados. Cada población celular fue identificada usando firmas génicas específicas de linaje. **B)** Porcentaje de las poblaciones linfocitarias identificadas en el infiltrado tumoral comparando los tumores tratados con y sin RANO. **C)** Representación en gráficos de violín del enriquecimiento de la firma génica de células T Cd8+ citotóxicas exhaustas en las células de los tumores tratados con y sin RANO (se muestra el porcentaje celular asociado a esa firma génica en cada población).

Sin embargo, si analizamos en detalle estas dos poblaciones celulares y comparamos sus transcriptomas con una firma génica asociada a células T CD8a+ citotóxicas exhaustas (**Tabla 7**), se observa como las células inmunes infiltradas en los tumores tratados con RANO presentan una menor cantidad de células que presentan esta firma génica, 25,85%, frente a las células del grupo control que presenta un 43,93% de células exhaustas (**Figura 57-C**).

Gen	Referencia
<b>Pdcd1</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5731479/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5731479/</a>
<b>Ctla4</b>	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11244047/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11244047/</a>
<b>Havcr2</b>	<a href="https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-019-0752-8">https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-019-0752-8</a>
<b>Lag3</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5617435/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5617435/</a>
<b>Btla</b>	<a href="https://aacrjournals.org/cancerres/article/72/4/887/577961/CD8-T-Cells-Specific-for-Tumor-Antigens-Can-Be">https://aacrjournals.org/cancerres/article/72/4/887/577961/CD8-T-Cells-Specific-for-Tumor-Antigens-Can-Be</a>
<b>Cd244</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104769/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104769/</a>
<b>Cd160</b>	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25255144/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25255144/</a>
<b>Entpd1</b>	<a href="https://www.nature.com/articles/s43856-022-00163-y">https://www.nature.com/articles/s43856-022-00163-y</a>
<b>Tigit</b>	<a href="https://journals.aai.org/jimmunol/article/186/3/1338/84916/Cutting-Edge-TIGIT-Has-T-Cell-Intrinsic-Inhibitory">https://journals.aai.org/jimmunol/article/186/3/1338/84916/Cutting-Edge-TIGIT-Has-T-Cell-Intrinsic-Inhibitory</a>
<b>Eomes</b>	<a href="https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02981/full">https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02981/full</a>
<b>Tim3</b>	<a href="https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1009731107">https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1009731107</a>

**Tabla 7. Genes utilizados para el análisis de la firma génica** de las células T CD8+ exhaustas y la referencia en la que se apoya cada uno de ellos.

Estos datos se obtuvieron analizando las células en el día 13 de tratamiento por lo que el tratamiento con RANO podría estar contribuyendo con un aumento de células Cd8+ en etapas más tardías.

En definitiva, estos resultados sugieren que el aumento de la infiltración de las células inmunes al estroma tumoral y la reducción de células Cd8+ exhaustas son consecuencia de la actividad de la RANO, mejorando así la respuesta al tratamiento con la inmunoterapia de anticuerpos anti-PD-L1.





# ***DISCUSIÓN***



El cáncer de piel tipo melanoma representa sólo un 10% de todas las neoplasias de piel, pero provoca más del 80% de las muertes relacionadas con estos tumores cutáneos gracias a su extrema capacidad para metastatizar en órganos distantes respecto al tumor primario de la piel (pulmón, hígado o cerebro) y a su elevada resistencia a terapias (Arozarena, I y Wellbrock, C., 2019). El tratamiento del melanoma es sencillo cuando se encuentra en etapas iniciales ya que consiste en la resección quirúrgica de las lesiones circunscritas a la epidermis. Una vez que se establecen las metástasis, las opciones terapéuticas disminuyen drásticamente (Arozarena, I y Wellbrock, C., 2019 y Trojaniello C, et al., 2021).

Según la clasificación del melanoma en función de las mutaciones genéticas, el 50% de los melanomas presentan mutaciones activadoras en el oncogén BRAF (siendo la mutación más prevalente la sustitución de una valina por ácido glutámico en la posición 600, V600E) mientras que en otro 15-20% se encuentran mutaciones en la GTPasa NRAS (sustitución Q61L principalmente). Fue a raíz de este descubrimiento cuando se profundizó en detalle en el estudio de BRAF y la ruta de las MAPK en el melanoma metastático. Esto llevó al desarrollo de terapias dirigidas contra BRAF mutado y MEK (quinasa activada por BRAF en la ruta de las MAPK), que consiste en la administración de fármacos que inhiben de forma específica a estas quinastas. La aplicación de estas terapias en clínica ha resultado en respuestas muy significativas, pero su eficacia es transitoria ya que aproximadamente antes de un año la mayoría de los pacientes recidiva (Arozarena, I y Wellbrock, C., 2019).

Más recientemente la aprobación de las inmunoterapias para su uso en clínica, mediante la administración de anticuerpos que bloquean los puntos de control o *checkpoints* inmunes, ha revolucionado el tratamiento del melanoma metastático. Gracias a estas terapias las respuestas son más duraderas, hasta en un 60% de los casos (Trojaniello C, et al., 2021 y Rohatgi, A. et al., 2021). Estas inmunoterapias utilizan anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de PD-1 con su ligando, PD-L1, o también a CTLA4 y su unión con los ligandos B7. Al bloquear esta unión se evita la inactivación de los linfocitos y por tanto se amplifica la respuesta de las células T contra el tumor, permitiendo que las células T citotóxicas y los macrófagos reconozcan y ataquen a las células tumorales de forma más efectiva.

A pesar de su éxito, aproximadamente la mitad de los pacientes no responde a estas terapias o desarrollan mecanismos de resistencia (Rohatgi, A. et al., 2021). Algunos de estos mecanismos de resistencia consisten en una disminución en la expresión o presentación de neo-antígenos tumorales, ausencia de infiltración tumoral de poblaciones celulares inmunes y/o presencia de poblaciones inmunosupresoras, expresión de *checkpoints* inmunes alternativos (LAG3, TIM) y ausencia de señalización y secreción de IFN gamma y de otras citoquinas pro-inflamatorias (Rohatgi, A. et al., 2021).

### ***Rol de la oxidación de ácidos grasos en el desarrollo de resistencia adquirida a vemurafenib***

En este estudio nos hemos centrado inicialmente en la relación entre el catabolismo de ácidos grasos (FAO) y la respuesta de las células de melanoma a los tratamientos de primera línea. Hemos mostrado que más allá de la respuesta inicial a BRAFi, lo que incluye una reprogramación metabólica intensa (Alkaraki, A. et al., 2021; Parmenter, T.J. et al., 2014 y Shen, S. et al., 2020), la FAO es relevante para la supervivencia celular una vez que las células han adquirido resistencia al BRAFi. Más allá de las observaciones *in vitro*, inhibir la FAO con Ranolazina retrasa el crecimiento de tumores con resistencia adquirida a vemurafenib y mejora la supervivencia libre de progresión en ratones. Además, también se ha observado un aumento de la expresión de numerosos genes reguladores de la FAO, tanto mitocondrial como del peroxisoma, en células de melanoma que han adquirido resistencia a BRAFi *in vitro* y también en los tumores que han progresado, generados en modelos animales en ensayos *in vivo*.

A día de hoy, en la práctica clínica los pacientes son tratados en combinación con inhibidores de BRAF y de MEK mientras que nuestro modelo de resistencia adquirida se basa sólo en BRAFi. Dicho esto, en las células A375 observamos que la inhibición de FAO con Ranolazina también retrasa la adquisición de resistencia a combinaciones de vemurafenib (BRAFi) y trametinib (MEKi), aunque las dinámicas son algo distintas a las observadas con sólo vemurafenib. Con sólo BRAFi observamos que el tratamiento con RANO es más efectivo cuando las células ya han recuperado la expresión de DUSP6, marcador de activación de la vía BRAF/MEK/ERK. Por el contrario, con la combinación de BRAFi/MEKi parece que las etapas iniciales de respuesta a los MAPKi también son

dependientes de la FAO. Por ello, parece claro que en el caso de estudiar *in vivo* el potencial de la RANO para mejorar las respuestas BRAF/MEKi, sería más adecuado administrar RANO desde el inicio del tratamiento con la combinación de terapias dirigidas.

Adicionalmente, y todavía más importante, la inducción de los genes reguladores de la FAO también se ha observado en tumores de pacientes que han progresado bajo el tratamiento con MAPKi, lo que confirma la relevancia clínica de nuestros resultados. En cualquier caso, es importante tener en cuenta que estos tumores presentan cierta heterogeneidad intra-tumoral, debido a la co-existencia de subpoblaciones celulares con estados transcripcionales diferentes, los cuales pueden tener un impacto en la respuesta a las terapias (Arozarena, I. & Wellbrock, C. 2019; Boshuizen, J. et al., 2018 y Krepler, C. et al, 2017).

Sorprendentemente, hemos visto que el aumento en la expresión de los genes reguladores de la FAO en los tumores de los pacientes que han progresado correlaciona con los marcadores de los distintos estados transcripcionales de melanoma asociados con resistencia adquirida a terapias (AXL<sup>high</sup>/MITF<sup>low</sup> y AXL<sup>low</sup>/MITF<sup>high</sup>), lo que implica una relevancia general del metabolismo de los lípidos en la progresión tumoral asociada a la adquisición de resistencia a las terapias.

### ***Efecto de la Ranolazina en los estados transcripcionales de las células de melanoma asociados a enfermedad mínima residual***

Cuando las células de melanoma se someten al tratamiento con BRAFi en combinación con RANO se observa un retraso en el crecimiento de las células que han adquirido resistencia. Las células resultantes de ello, VR y VR\_RANO, muestran heterogeneidad transcripcional en cuanto a los diferentes estados transcripcionales descritos en melanoma por Rambow et.al. en 2018. En dicho trabajo, se determinó que las recaídas de los pacientes son debidas a la presencia de pequeñas subpoblaciones celulares del tumor que presentan tolerancia a los fármacos, o lo que también se conoce como enfermedad mínima residual. Así pues, mediante scRNAseq de las células procedentes de tumores de melanoma durante las distintas fases de tratamiento con MAPKi, Rambow, F. et al. estudiaron la diversidad de los distintos estados transcripcionales y la

transición desde un estado a otro durante la respuesta a los MAPKi. De esta forma, caracterizaron cuatro subpoblaciones celulares o estados transcripcionales que son: pigmentado, invasivo, NCSC (*Neural Crest Stem Cell*) y SMC (*Starved-like Melanoma Cells*). En línea con esto, determinaron que la población NCSC es la principal responsable de la progresión tumoral y por tanto de las recaídas de los pacientes. También, en este trabajo realizaron un estudio detallado de la expresión de MITF, y por tanto su actividad, y de cómo ésta evoluciona durante las fases de tratamiento con MAPKi en las cuatro subpoblaciones celulares identificadas.

En esta tesis se ha visto que nuestro modelo *in vitro* de adquisición de resistencia a BRAFi recapitula el modelo de enfermedad residual de melanoma descrito en el trabajo de Rambow de 2018 (Rambow, F. et al., 2018).

La RANO disminuye la aparición de las células con la firma génica asociada al estado NCSC, el cual por la expresión del marcador NGFR, se ha considerado el estado más refractario no solo para las terapias dirigidas sino también para las inmunoterapias (Rambow, F. et al., 2018 y Boshuizen, J. et al., 2020). El estado NCSC ha sido descrito de forma similar como “células madre neurales quiescentes” (Rambow, F. et al., 2018), y además está descrito que las células madre neurales adultas requieren de gran cantidad de FAO para poder mantener la quiescencia (Knobloch, M. et al., 2017). Por otro lado, en las células madre pluripotentes, la glucólisis estimula la proliferación e inhibe la diferenciación (Moussaieff, A. et al., 2015) mientras que, en las células de la cresta neural, ésta promueve la delaminación y la migración (Bhattacharya, D. et al., 2020). En la subpoblación correspondiente con el estado transcripcional NCSC presente en las células VR, las funciones biológicas dominantes observadas en el análisis de enriquecimiento son la diferenciación celular junto a la migración y la proliferación. Sin embargo, el análisis GSEA también detecta funciones biológicas asociadas con la respuesta al metabolismo de lípidos y ácidos grasos, pero no hay un enriquecimiento de funciones asociadas a glucólisis. Esto sugiere que el metabolismo de ácidos grasos mantiene el estado NCSC en las células con resistencia adquirida a BRAFi, lo que también explicaría por qué las células de melanoma con este estado transcripcional son tan sensibles a la RANO.

Por otro lado, el tratamiento con RANO junto al BRAFi (células VR\_RANO), aumenta la expresión asociada al estado transcripcional invasivo, atenuando la expresión del estado de actividad de MITF. De esta manera se establecen células con un estado de actividad de MITF intermedia y un mayor estado invasivo.

### ***Efectos de la Ranolazina en la reorganización del metabolismo de la metionina y en la inmunogenicidad de las células de melanoma***

Nuestros datos indican que las células VR\_RANO se caracterizan metabólicamente por utilizar glucólisis y la fosforilación oxidativa. Esto sugiere que la RANO reprograma a las células VR mediante la inhibición de la FAO, llevándolas hacia la oxidación de la glucosa y promoviendo la entrada de piruvato en el ciclo TCA. Hay estudios donde se ha visto que, en corazones de ratón tratados con RANO, aumentaba la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa o PDH (McCormack, JG. et al., 1996 y Clarke, B. et al., 1996), por lo que quizás éste podría ser el mecanismo por el que la RANO ejerce su reprogramación hacia el metabolismo de la glucosa.

En cuanto al aumento de la fosforilación oxidativa, en las células VR\_RANO se ha detectado una mayor producción de ROS, lo que puede desencadenar el aumento de la síntesis de glutatión y, en consecuencia, la activación del metabolismo de la metionina (Sanderson, SM. et al., 2019). Además, es importante destacar que la RANO también impacta en el metabolismo de la metionina afectando directamente la expresión de MTAP, MAT2A y SMS tal y como se vio en el análisis scRNAseq de las células VR\_RANO. Por otro lado, cabe destacar que el mecanismo molecular o de señalización específico que conecta los efectos de la RANO y el metabolismo de la metionina sigue siendo una incógnita. Por ello, a futuro sería muy interesante entender en detalle cómo se da este proceso.

Se ha visto que las células VR\_RANO tuvieron respuestas más sensibles al tratamiento con SAM y al inhibidor de PRMT5 (PRMT5i), lo que implica una reducción de la actividad de MTAP mediada por RANO, la acumulación del subproducto de SMS, MTA, y la inhibición de PRMT5 (Kryukov, GV. et al, 2016; Marjon, K. et al., 2016; Mavrakis, KJ. et al., 2016 y Stevens, AP. et al., 2008). De hecho, tal y como se vio en el estudio

metabólico, los niveles del producto de la enzima MTAP, MTR, estaban muy reducidos en las células VR\_RANO, así como los de MTA se encontraban aumentados.

En línea con esto, la RANO también aumenta la expresión de ciertos genes suprimidos por la actividad de PRMT5, como NLRC5 (Kim, H. et al, 2020), que es el regulador principal de los genes asociados al complejo MHC de clase I (TAP1, B2M y PSMB9), cuya función principal es la presentación de antígenos (Cho, SX. et al, 2021 y Meissner, TB. et al., 2010). La RANO también induce la expresión de los interferones de tipo 1, IFNA e IFNB, así como la de PD-L1, como ya se había observado previamente en células de melanoma con la expresión de PRMT5 silenciada (Kim, H. et al, 2020). Sin embargo, no se puede descartar que existan otras metil-transferasas que sean reguladas por SAM y que actúen en paralelo o de forma solapada con PRMT5. De igual manera, observamos que la respuesta de las células VR a la RANO o a SAM a corto plazo replica algunas de las características de las células VR\_RANO, pero no da lugar exactamente al mismo fenotipo. Las células VR\_RANO fueron generadas mediante el tratamiento con RANO durante el proceso de adquisición de resistencia a vemurafenib, pero ya no volvieron a recibir RANO mientras fueron expandidas para experimentos subsiguientes. A pesar de ello, los cambios fenotípicos descritos en los análisis por scRNAseq, como la expresión de interferones, de la maquinaria de presentación de antígenos, etc. se mantuvieron de forma estable. Esto sugiere que se pueden haber dado cambios epigenéticos que estabilicen la reorganización del metabolismo de la metionina y, en consecuencia, el fenotipo inmunogénico. De hecho, resultados preliminares (no mostrados) de un análisis proteómico realizado por el grupo del Dr. D'Alessandro sugieren que las células tratadas con RANO han sufrido cambios significativos en este sentido, ya que el análisis diferencial de los proteomas de las células VR y VR\_RANO muestran un enriquecimiento significativo de procesos de remodelación de la cromatina dependientes de RANO. PRMT5 y otras metilasas como DNMT1 o EZH2 actúan a nivel epigenético para regular la expresión génica de STING (STimulator of INterferon Genes) en respuesta a niveles de SAM. Cuando es activo, STING induce la expresión de interferón, PD-L1 y el complejo MHC-I (Otegui, N. et al, 2023). A su vez, la señalización de STING puede ser regulada por la vía la quinasa STK11 y AMPK, enzimas clave en la detección del estado energético de la célula (Otegui, N. et al, 2023). Dado el efecto de la RANO como regulador de la



plasticidad metabólica de las células de melanoma, sería interesante estudiar si la RANO modula el eje STK11/AMPK como paso previo a la reorganización del metabolismo de la metionina.

El tratamiento con RANO en combinación con anticuerpos anti-PD-L1 hace que cambie la inmunogenicidad de los tumores de melanoma *in vivo*, ya que se observó un aumento de la infiltración linfocitaria tumoral, particularmente de los linfocitos T CD8+ citotóxicos. Esta observación va en línea con el hecho de que, en un estudio realizado en melanoma, la supresión de PRMT5 hace que aumente la infiltración de las células T *in vivo* (Kim, H. et al, 2020). Este aumento en la infiltración linfocitaria tumoral resulta muy interesante ya que la RANO podría también estar actuando en el microambiente tumoral. Además, se ha descrito que la inhibición de PRMT5 en las células T hace que disminuya la cantidad de éstas en sangre periférica (Inoue, M. et al., 2018). También, la inhibición de PRMT5 en las células T suprime su proliferación y la producción de IFNG (Snyder, KJ. et al., 2020), lo que se traduciría en un menor efecto antitumoral. Nuestros datos sugieren que la RANO inhibe las actividades supresoras de PRMT5 y no solo aumenta la expresión de IFNG intra-tumoral y la abundancia de células T, sino que también reduce la cantidad de células T CD8+ exhaustas. Así pues, la RANO podría estar teniendo distintos efectos ya que, en las células tumorales, inhibe a PRMT5 indirectamente por la reprogramación metabólica y este mecanismo podría ser diferente a la inhibición directa. Estos datos de nuevo indican la necesidad de estudiar en detalle el/los mecanismos de acción de la RANO, así como diseccionar sus efectos tanto a corto como a largo plazo en distintas subpoblaciones celulares del microambiente tumoral.

### ***Reorganización metabólica en el microambiente inmune***

La reprogramación metabólica desde un metabolismo glucolítico hacia uno lipídico, muy frecuente en tumores metastásicos, también afecta al microambiente inmune (Broadfield LA, et al., 2021). Tanto es así que la capacidad antitumoral de las células dendríticas, los macrófagos, los linfocitos T CD8 y las células NK es dependiente de un metabolismo glucolítico. En un ambiente rico en ácidos grasos, estas células inmunes pasan a utilizar los lípidos como su principal fuente de energía y pierden potencia

inmune. Por otro lado, la capacidad inmunosupresora de las células mieloides supresoras necesita de un metabolismo lipídico cuyo bloqueo, en consecuencia, inhibiría su rol pro-tumoral (Broadfield LA, et al., 2021).

A día de hoy, se ha descrito que ciertas rutas metabólicas, incluyendo la FAO, regulan la diferenciación y la activación de las células T (Sun, N. et al., 2022). Se cree que el catabolismo de ácidos grasos puede favorecer la capacidad antitumoral de las células T CD8 ya que se ha visto, en un estudio realizado en ratones, un efecto sinérgico al combinar el tratamiento de anticuerpos anti-PD1 junto con agonistas de PPARA (Chamoto, K. et al., 2017 y Zhang, Y. et al., 2017). Sin embargo, es importante destacar que, mecánicamente, el agonista de PPARA (bezafibrato) aumenta la FAO contribuyendo a mejorar la supervivencia de las células T citotóxicas, pero también aumenta la fosforilación oxidativa y la glucólisis. Esto lleva a un aumento en la proliferación de las células T *naïve* y a una mejor función efectora de los linfocitos T citotóxicos (Chowdhury, PS., et al., 2018). El aumento de la fosforilación oxidativa y el metabolismo de lípidos también correlacionan con mejores respuestas al tratamiento con anti-PD1 en pacientes, lo que va unido a una mayor presentación de antígenos y expresión de PD-L1 (Harel, M. et al. 2019). Esto último puede reproducirse en ensayos *in vitro* mediante el uso de dicloroacetato (DCA), que induce la fosforilación oxidativa mediante la activación indirecta de PDH y promoviendo la oxidación de glucosa. En los resultados de esta tesis se ha observado que tanto la fosforilación oxidativa como la glucólisis se ven aumentados en las células de melanoma a consecuencia del tratamiento con RANO en combinación con el BRAFi. Por ello, obtener un efecto similar en las células T podría explicar la mejora en la respuesta a los anti-PD-L1, el aumento de la infiltración linfocitaria tumoral y, en definitiva, una mejor respuesta anti-tumoral. En cualquier caso, para poder confirmar esto se requiere de un estudio detallado del efecto de la RANO en las células inmunes.

En conjunto, la fosforilación oxidativa parece ser el talón de Aquiles para la proliferación y activación de las células T, siendo la FAO una de las rutas metabólicas que la alimenta, así como la glucólisis por la cual se obtiene piruvato que es descarboxilado por PDH para que el Acetil-CoA resultante se introduzca al ciclo TCA y a la cadena transportadora de electrones donde se da dicho proceso.

### **Mecanismo de acción de la ranolazina: diana terapéutica**

Como hemos mencionado en varias ocasiones todavía no conocemos los genes concretos cuya actividad se ve afectada por la RANO. Las dianas específicas descritas hasta el momento de este fármaco son unos canales de sodio dependientes de voltaje (Nav1.5) de la familia SNC como SNC5A y SNC7A que, principalmente, se encuentran en las células cardíacas. Según nuestros datos (no mostrados), no parecen estar expresadas en las células de melanoma. A pesar de la evidencia que se aporta en este estudio, sigue siendo cierto que no conocemos la/s diana/s directas de la RANO por las cuales este fármaco regula la respuesta a terapias dirigidas o inmunoterapias. Un proyecto interesante sería dilucidar los posibles genes diana de la RANO para bloquear su expresión de forma dirigida y estudiar la contribución de cada gen a la respuesta a MAPKi y/o inmunoterapias. Aparte de la 3-ketoacil-CoA tiorilasa, otros posibles candidatos serían las enzimas de la familia piruvato deshidrogenasa quinasa, PDK1-4. Estas enzimas pueden fosforilar a PDH en tres residuos distintos de serina (232, 293 y 300) inhibiendo su actividad (Rardin MJ. et al., 2009). Sin embargo, también una aproximación más global (“*unbiased*”) como la realización de un análisis por lipidómica/metabolómica a distintos tiempos tras la administración de RANO nos podría dar una perspectiva más profunda y detallada de los efectos directos e indirectos de este compuesto.

En resumen, en este trabajo se ha proporcionado el racional científico para proponer combinar Ranolazina con BRAFi retrasando el establecimiento de la resistencia adquirida y, además, nuestros datos sugieren que la adaptación de las células a la Ranolazina durante el tratamiento con BRAFi puede llevar a los tumores a un fenotipo inmunogénico que predice una mejor respuesta a inmunoterapias.

### **Otras aplicaciones de la ranolazina en oncología**

Durante su desarrollo, este trabajo se ha retroalimentado con los resultados del proyecto de tesis doctoral de Irene Lasheras-Otero donde se propone el uso de Ranolazina y Thioridazina para prevenir el desarrollo de metástasis hematógenas, derivadas de células circulantes de tumores (Lasheras-Otero, I. et. al., 2022). Curiosamente una de las respuestas celulares a la falta de adhesión más ampliamente descritas es el bloqueo de la proliferación y la disminución de la glucólisis. Ambos efectos

son similares a la respuesta a MAPKi de las células de melanoma con BRAF mutado, donde también se da una activación de catabolismo de ácidos grasos que permite mantener la viabilidad celular. En el trabajo de la Dra. Lasheras-Otero se demostró que, en las células de melanoma en condiciones de cultivo en suspensión, se produce una reorganización del metabolismo de los ácidos grasos que hace a las células dependientes de la FAO. Así, inhibidores de la FAO como la Ranolazina reducían la viabilidad de las células en suspensión *in vitro* y de la formación de metástasis *in vivo*, lo que llevaba a sugerir el uso adyuvante de estos fármacos para prevenir el desarrollo de enfermedad metastásica (Lasheras-Otero et al, 2022).

Por otro lado, tanto los inhibidores de BRAF/MEK como las inmunoterapias se están estudiando en el contexto de adyuvancia (Jing, M. et al., 2022). En melanomas de grado II y III, sin enfermedad metastásica radiológica las terapias dirigidas aumentan la supervivencia libre de progresión (Hauschild, A. et al., 2012 y Banzi, M. et al., 2016). De igual manera, el tratamiento adyuvante con anticuerpos contra PD-1 produce claros efectos clínicos en la aparición de metástasis distales mejorando su supervivencia. Además, la inmunoterapia en pacientes de melanoma con enfermedad ganglionar clínicamente detectable también ha mostrado resultados muy prometedores (Lee, R. et al., 2023). Sin embargo, el beneficio global sigue siendo muy bajo ya que el riesgo de aparición de efectos adversos y toxicidades asociadas a estas terapias todavía es elevado. Actualmente, sigue siendo crítica la necesidad de desarrollar nuevas terapias o identificar biomarcadores que permitan estratificar a los pacientes para que sean tratados de una forma más eficiente.

Dadas las evidencias presentadas por el presente estudio y el de la Dra. Irene Lasheras sería interesante estudiar el potencial clínico de las combinaciones de Ranolazina con terapias dirigidas o inmunoterapias en el contexto de adyuvancia.

Además, una de las grandes preguntas que surgen de este estudio es si la RANO sería efectiva en otros contextos tumorales o terapéuticos. Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, sugieren que así podría ser ya que observamos que líneas celulares de glioblastoma multiforme responden a ponatinib, un inhibidor multiquinasa con dianas como SRC, PDGFRA o PDGFRB, induciendo la expresión de genes

involucrados en el metabolismo lipídico. Entre estos genes, se encuentran también reguladores de la FAO por lo que es posible que el modelo de regulación de la respuesta a terapias dirigidas por la FAO seas extensible a otros tipos tumorales. Por otro lado, un estudio reciente mostró que la RANO podría modular el microambiente inmune en tumores murinos de próstata disminuyendo el crecimiento tumoral, aunque no se llegó a combinar la RANO con ningún agente inmunoterápico (Guth, A. et al, 2020).

### Conclusiones finales

Los resultados obtenidos en este estudio tienen una evidente relevancia traslacional. Quizás el aspecto más interesante de nuestro estudio sea la capacidad de la RANO para inducir un fenotipo inmunogénico en las células que han adquirido resistencia a BRAFi. Trabajos previos como el de Haas, L. et al., han mostrado que la resistencia a terapias dirigidas en melanoma se acompaña de un microambiente tumoral “frío”, con menor infiltración inmunitaria y consecuentemente resistente a inmunoterapias (Haas, L. et al., 2021). Por otro lado, cada vez es más evidente que a la hora de decidir el orden de tratamiento con terapias dirigidas o inmunoterapias, los datos sugieren que las respuestas son mejores al utilizar primero la inmunoterapia (Atkins, MB. et al., 2023). En base a nuestros resultados es posible que la RANO permita que aquellos pacientes que requieren que el tratamiento inicial sea con terapias dirigidas debido a la necesidad de reducir el volumen tumoral, puedan beneficiarse después de la administración de inhibidores de *checkpoint* inmunes. Al ser la RANO un fármaco aprobado por la FDA y la EMA para su uso en pacientes, la transferencia de este conocimiento a la práctica clínica podría realizarse con relativa celeridad.



# ***CONCLUSIONES***





1. El modelo *in vitro* de adquisición de resistencia a BRAFi diseñado para las células de melanoma mantiene de forma constante la resistencia establecida a BRAFi y es representativo de los modelos de *persistencia* celular y de enfermedad residual de melanoma previamente descritos en la literatura.
2. La FAO, mitocondrial y de peroxisoma, es esencial no sólo en las etapas iniciales de respuesta al BRAFi sino también para el establecimiento de la resistencia adquirida.
3. El tratamiento con inhibidores de FAO mitocondrial y de peroxisoma, como Thioridazina, Etomoxir y Ranolazina, en combinación con el BRAFi retrasa la aparición de colonias resistentes a BRAFi.
4. El lipidoma de las células A375 resistentes al BRAFi (VR) presenta una mayor cantidad de especies lipídicas que el de las células parentales. El tratamiento con Ranolazina durante la adquisición de resistencia (células VR\_RANO) revierte los cambios del BRAFi y establece un lipidoma menos enriquecido en especies lipídicas.
5. Los análisis de los perfiles bioenergéticos y los ensayos de proliferación con Etomoxir y Ranolazina apoyan la importancia de la FAO mitocondrial en la proliferación de las células resistentes a BRAFi (VR).
6. La FAO es relevante para la progresión tumoral en los pacientes de melanoma tratados con MAPKi y además la expresión de genes reguladores de FAO correlaciona con los fenotipos celulares asociados a resistencia a MAPKi.
7. El tratamiento en combinación de BRAFi y Ranolazina redujo *in vivo* el crecimiento de los tumores resistentes a BRAFi y aumentó la supervivencia libre de progresión.
8. El análisis por *Single-Cell RNAseq* de las células VR y VR\_RANO muestra diferencias transcripcionales claras reflejadas en el enriquecimiento de diferentes clústeres entre ellas.

9. El tratamiento con Ranolazina disminuye la subpoblación celular NCSC en las células resistentes a BRAFi, la cual es responsable de la resistencia a terapias y las recidivas de los pacientes.
10. Las células VR presentan dos poblaciones celulares diferenciadas que coexisten donde el metabolismo de ácidos grasos es crucial (catabolismo y anabolismo), mientras que las VR\_RANO presentan más flexibilidad metabólica, enfocada en anabolismo de lípidos, glucólisis y fosforilación oxidativa.
11. El tratamiento con Ranolazina aumenta la señalización de rutas relacionadas con la respuesta inmunitaria como las del interferón y presentación de antígenos en las células resistentes al BRAFi.
12. La Ranolazina inhibe a PRMT5 modulando así la regulación de genes asociados a la presentación de antígenos, la expresión de PD-L1 y la producción de interferones, aumentando la inmunogenicidad de las células de melanoma resistentes a BRAFi.
13. La Ranolazina, con independencia del BRAFi, promueve en las células de melanoma tanto humano como murino el fenotipo inmunogénico y, además, la combinación con anticuerpos anti-PD-L1 *in vivo* reduce el tamaño tumoral y mejora la supervivencia.
14. El tratamiento *in vivo* con Ranolazina en combinación con anticuerpos anti-PD-L1, aumenta la infiltración tumoral de linfocitos T CD8 citotóxicos, CD4 *helper* y células NK.
15. Las células T CD8 citotóxicas que correlacionan con un perfil de células inmunes exhaustas son menos abundantes en los tumores tratados únicamente con Ranolazina en los ensayos *in vivo*.

# ***BIBLIOGRAFÍA***



## A

Ackerman, A.; Klein, O.; McDermott, D.F.; Wang, W.; Ibrahim, N.; Lawrence, D.P.; Gunturi, A.; Flaherty, K.T.; Hodi, F.S.; Kefford, R.; et al. Outcomes of patients with metastatic melanoma treated with immunotherapy prior to or after BRAF inhibitors. *Cancer* 2014, 120, 1695–1701

Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S. A., Behjati, S., Biankin, A. V., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415–421. doi: 10.1038/nature12477

Alkaraki, A., McArthur, G. A., Sheppard, K. E. & Smith, L. K. Metabolic Plasticity in Melanoma Progression and Response to Oncogene Targeted Therapies. *Cancers (Basel)* 13, doi:10.3390/cancers13225810 (2021).

Aloia A, Müllhaupt D, Chabbert CD, Eberhart T, Flückiger-Mangual S, Vukolic A, Eichhoff O, Irmisch A, Alexander LT, Scibona E, Frederick DT, Miao B, Tian T, Cheng C, Kwong LN, Wei Z, Sullivan RJ, Boland GM, Herlyn M, Flaherty KT, Zamboni N, Dummer R, Zhang G, Levesque MP, Krek W, Kovacs WJ. A Fatty Acid Oxidation-dependent Metabolic Shift Regulates the Adaptation of BRAF-mutated Melanoma to MAPK Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2019 Nov 15;25(22):6852-6867. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0253.

American Cancer Society. Treating Melanoma Skin Cancer. Available online: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/by-stage.html>

American Joint Committee on Cancer (AJCC), *Cancer Staging Manual*. 8th edition. 2017

Antzelevitch, C. et al. Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation* 110, 904-910, doi:10.1161/01.CIR.0000139333.83620.5D (2004)

Arce, F., Breckpot, K., Stephenson, H., Karwacz, K., Ehrenstein, M. R., Collins, M., et al. (2011). Selective ERK activation differentiates mouse and human tolerogenic dendritic cells, expands antigen-specific regulatory T cells, and suppresses experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 84–95. doi: 10.1002/art.30099

Arozarena I, Wellbrock C. Overcoming resistance to BRAF inhibitors. *Ann Transl Med* 2017;5(19):387

Arozarena, I. & Wellbrock, C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer* 19, 377–391 (2019)

Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013;14:249-56

Atkins MB, Lee SJ, Chmielowski B, Tarhini AA, Cohen GI, Truong TG, Moon HH, Davar D, O'Rourke M, Stephenson JJ, Curti BD, Urba WJ, Brell JM, Funchain P, Kendra KL, Ikeguchi AP, Jaslowski A, Bane CL, Taylor MA, Bajaj M, Conry RM, Ellis RJ, Logan TF, Laudi N, Sosman JA, Crockett DG, Pecora AL, Okazaki IJ, Reganti S, Chandra S, Guild S, Chen HX, Streicher HZ, Wolchok JD, Ribas A, Kirkwood JM. Combination Dabrafenib and Trametinib Versus Combination Nivolumab and Ipilimumab for Patients With Advanced BRAF-Mutant Melanoma: The DREAMseq Trial-ECOG-ACRIN EA6134. *J Clin Oncol*. 2023 Jan 10;41(2):186-197. doi: 10.1200/JCO.22.01763

## B

---

Balch, C. M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol*. 27, 6199–6206 (2009).

Banzi M, De Blasio S, Lallas A, et al. Dabrafenib: a new opportunity for the treatment of BRAF V600-positive melanoma. *Onco Targets Ther* 2016;9:2725-33

Bastian, B. C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu. Rev. Pathol*. 9, 239–271 (2014)

Begg CB, Orlow I, Hummer AJ, et al. Lifetime risk of melanoma in CDKN2A mutation carriers in a population-based sample. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1507–15.

Bennett, D.C. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* 2003, 22, 3063–3069.

Bevona, C.; Goggins, W.; Quinn, T.; Fullerton, J.; Tsao, H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch. Dermatol*. 2003, 139, 1620-1624

Bhattacharya, D., Azambuja, A. P. & Simoes-Costa, M. Metabolic Reprogramming Promotes Neural Crest Migration via Yap/Tea Signaling. *Dev Cell* 53, 199-211 e196, doi:10.1016/j.devcel.2020.03.005 (2020)

Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A. C., et al. (2013). Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 39, 782–795. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.003

Binnewies, M. et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med*. 24, 541–550 (2018)

Bollag G, Hirth P, Tsai J, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 2010;467:596-9

Boshuizen, J. et al. Cooperative targeting of melanoma heterogeneity with an AXL antibody- drug conjugate and BRAF/MEK inhibitors. *Nat. Med*. 24, 203–212 (2018)

Boshuizen, J. et al. Reversal of pre-existing NGFR-driven tumor and immune therapy resistance. *Nat Commun* 11, 3946, doi:10.1038/s41467-020-17739-8 (2020)

Broadfield LA, et al. Lipid metabolism in cancer: New perspectives and emerging mechanisms. *Dev Cell*. 2021 May 17;56(10):1363-1393

Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 1999;18:664-74

Buffet C, Hecale-Perlemoine K, Bricaire L, Dumont F, Baudry C, Tissier F, Bertherat J, Cochand-Priollet B, Raffin-Sanson ML, Cormier F, Groussin L. DUSP5 and DUSP6, two ERK specific phosphatases, are markers of a higher MAPK signaling activation in BRAF mutated thyroid cancers. *PLoS One*. 2017 Sep 14;12(9):e0184861. doi: 10.1371/journal.pone.0184861

Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* 36, 411-420, doi:10.1038/nbt.4096 (2018)

## C

Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 2015; 161: 1681–1696

Canueto, J., Román-Curto, C. Los nuevos sistemas de estadificación del AJCC incorporan novedades en el cáncer cutáneo. *Actas Dermosifiliogr*. 2017

Carlino MS, Larkin J, Long GV. Immune checkpoint inhibitors in melanoma. *Lancet*. 2021 Sep 11;398(10304):1002-1014. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01206-X

Caro, P. et al. Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 22, 547–560 (2012)

Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: Fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13:227–232

Carreira, S. et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev*. 20, 3426–3439 (2006)

Catalanotti F, Solit DB, Pulitzer MP, et al. Phase II trial of MEK inhibitor selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in patients with BRAFV600E/K-mutated melanoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:2257-64

Chamoto, K. et al. Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E761-E770, doi:10.1073/pnas.1620433114 (2017)

Chan, D. V.; Gibson, H. M.; Aufiero, B. M.; Wilson, A. J.; Hafner, M. S.; Mi, Q. S.; Wong, H. K. Differential CTLA-4 expression in human CD4+ versus CD8+ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4+ proliferation. *Genes Immunity* 2014, 15, 25–32  
Chang, C. H., Qiu, J., O'Sullivan, D., Buck, M. D., Noguchi, T., Curtis, J. D., et al. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 162, 1229–1241. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.016

Chapman, A. et al. Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion. *Cell Rep.* 8, 688–695 (2014).  
Cheli, Y. et al. Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene* 31, 2461–2470 (2012)

Chiarugi, A., Dolle, C., Felici, R. & Ziegler, M. The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nature Rev. Cancer* 12, 741–752 (2012)

Cho, S. X. et al. MHC class I transactivator NLRC5 in host immunity, cancer and beyond. *Immunology* 162, 252–261, doi:10.1111/imm.13235 (2021)

Chocarro de Erauso L, Zuazo M, Arasanz H, Bocanegra A, Hernandez C, Fernandez G, Garcia-Granda MJ, Blanco E, Vera R, Kochan G, Escors D. Resistance to PD-L1/PD-1 Blockade Immunotherapy. A Tumor-Intrinsic or Tumor-Extrinsic Phenomenon? *Front Pharmacol.* 2020 Apr 7;11:441. doi: 10.3389/fphar.2020.00441

Chowdhury, P. S., Chamoto, K., Kumar, A. & Honjo, T. PPAR-Induced Fatty Acid Oxidation in T Cells Increases the Number of Tumor-Reactive CD8(+) T Cells and Facilitates Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Immunol Res* 6, 1375–1387, doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0095 (2018)

Clark, C. A., Gupta, H. B., Sareddy, G., Pandeswara, S., Lao, S., Yuan, B., et al. (2016). Tumor-Intrinsic PD-L1 Signals Regulate Cell Growth. *Pathog. Autophagy Ovarian Cancer Melanoma Cancer Res.* 76, 6964–6974. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0258

Clark, W. H., Jr.; Elder, D. E.; Guerry, D. t.; Epstein, M. N.; Greene, M. H.; Van Horn, M. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol.* 1984, 15, 1147–1165  
Clarke, B., Wyatt, K. M. & McCormack, J. G. Ranolazine increases active pyruvate dehydrogenase in perfused normoxic rat hearts: evidence for an indirect mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 28, 341–350, doi:10.1006/jmcc.1996.0032 (1996)

Coppola, A. et al. S-Adenosylmethionine Inhibits Cell Growth and Migration of Triple Negative Breast Cancer Cells through Upregulating MiRNA-34c and MiRNA-449a. *Int J Mol Sci* 22, doi:10.3390/ijms22010286 (2020)

Costin, G.-E. & Hearing, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 21, 976–994 (2007)

Corn KC, Windham MA, Rafat M. Lipids in the tumor microenvironment: From cancer progression to treatment. *Prog Lipid Res.* 2020 Nov;80:101055. doi: 10.1016/j.plipres.2020.101055.



Cui, R. et al. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128, 853–864 (2007)

Curtin, J. A. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* 353, 2135–2147 (2005).

Cymerman, R.M.; Shao, Y.; Wang, K.; Zhang, Y.; Murzaku, E.C.; Penn, L.A.; Osman, I.; Polsky, D. De Novo vs Nevus-Associated Melanomas: Differences in Associations With Prognostic Indicators and Survival. *Gynecol. Oncol.* 2016, 108, djw121.

## D

Damsky, W.E.; Rosenbaum, L.E.; Bosenberg, M. Decoding melanoma metastasis. *Cancers* 2010, 3, 126–163

Dantonio, P.M., Klein, M.O., Freire, M.R.V.B., Araujo, C.N., Chiacetti, A.C. and Correa, R.G. (2018) Exploring major signaling cascades in melanomagenesis: a rationale route for targeted skin cancer therapy. *Biosci. Rep.* 38 (5)

Daud A, Gill J, Kamra S, et al. Indirect treatment comparison of dabrafenib plus trametinib versus vemurafenib plus cobimetinib in previously untreated metastatic melanoma patients. *J Hematol Oncol* 2017;10:3

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54

Davies, M.A.; Kwong, L.N. Navigating the therapeutic complexity of PI3K pathway inhibition in melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2013, 19, 5310–5319

DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv.* 2016; 2:e1600200

Diradourian, C., Girard, J. & Pegorier, J. P. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie* 87, 33–38 (2005)

Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Broer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J.* 2000; 350(Pt 1): 219–227

Duffy, K. & Grossman, D. The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era: Part I. Historical, histologic, and clinical aspects. *J. Am. Acad. Dermatol.* 67, 1.e1–1.e16 (2012)

DuPage, M., Mazumdar, C., Schmidt, L. M., Cheung, A. F., and Jacks, T. (2012). Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature* 482, 405–409. doi: 10.1038/nature10803

E

---

Eggermont AMM, Crittenden M, and Wargo J (2018). Combination Immunotherapy Development in Melanoma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 38, 197–207

English, J. S. et al. Site-specific melanocytic naevus counts as predictors of whole body naevi. *Br. J. Dermatol.* 118, 641–644 (1988)

Ennen, M. et al. MITF- high and MITF- low cells and a novel subpopulation expressing genes of both cell states contribute to intra- and intertumoral heterogeneity of primary melanoma. *Clin. Cancer Res.* 23, 7097–7107 (2017)

Escors, D. (2014). Tumour immunogenicity, antigen presentation and immunological barriers in cancer immunotherapy. *New J. Sci.* 2014, pii: 734515. doi: 10.1155/2014/734515

Escors, D., Gato-Canas, M., Zuazo, M., Arasanz, H., Garcia-Granda, M. J., Vera, R., et al. (2018). The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells. *Signal Transduct. Target Ther.* 3, 26. doi: 10.1038/s41392-018-0022-9

F

---

Fallahi- Sichani, M. et al. Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de- differentiated state. *Mol. Syst. Biol.* 13, 905 (2017)

Falletta, P. et al. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes Dev.* 31, 18–33 (2017)

Fares, C. M., Van Allen, E. M., Drake, C. G., Allison, J. P., and Hu-Lieskovan, S. (2019). Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade: Why Does Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Not Work for All Patients? *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 39, 147–164. doi: 10.1200/EDBK\_240837

Ferguson, J., Smith, M., Zudaire, I., Wellbrock, C. & Arozarena, I. Glucose availability controls ATF4mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. *Oncotarget* 8, 32946–32959 (2017)

Fischer, G.M.; Vashisht Gopal, Y.N.; McQuade, J.L.; Peng, W.; DeBerardinis, R.J.; Davies, M.A. Metabolic strategies of melanoma cells: Mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018, 31, 11–30

Flaherty KT, Robert C, Hersey P, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2012;367:107-14

Frandsberg PA, Doufexis M, Kapas S, Chhajlani V. Human pigmentation phenotype: a point mutation generates nonfunctional MSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:490-2

Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautes-Fridman, C., and Kroemer, G. (2017). The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 717–734. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.101

## G

Galván-Banqueri M, Ubago-Perez R, Molina-Lopez T. The relative clinical efficacy of trametinib-dabrafenib and cobimetinib-vemurafenib in advanced melanoma: an indirect comparison. *J Clin Pharm Ther* 2016;41:285-9

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Metaanalysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005;41(1):28–44.

Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, et al.: Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline-Update. *Eur J Cancer* 2016, 63:201– 217

Garcia-Diaz, A. et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* 19, 1189-1201, doi:10.1016/j.celrep.2017.04.031 (2017).

Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005; 436: 117–122

Gato-Canas, M., Zuazo, M., Arasanz, H., Ibanez-Vea, M., Lorenzo, L., Fernandez-Hinojal, G., et al. (2017). PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep.* 20, 1818–1829. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.075

Girotti MR, Pedersen M, Sanchez-Laorden B, et al. Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov* 2013;3:158-67

Gloster HM Jr, Neal K. Skin cancer in skin of color. *J Am Acad Dermatol.* 2006;55(5):741-60; quiz 761-4. DOI: 10.1016/j.jaad.2005.08.063. PMID: 17052479.

Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006; 126:154–160

Goggins WB, Tsao H. A population-based analysis of risk factors for a second primary cutaneous melanoma among melanoma survivors. *Cancer* 2003;97(3):639–43.

Green AC, Olsen CM. Increased risk of melanoma in organ transplant recipients: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(8):923-7. DOI:10.2340/00015555-2148. PMID: 26012553

Greene, M. H., Elder, D. E., Guerry, D., Epstein, M. N., Greene, M. H., & Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*, 15(12), 1147–1165. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(84\)80310-X](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(84)80310-X)

Grob JJ, Amonkar MM, Karaszewska B, et al. Comparison of dabrafenib and trametinib combination therapy with vemurafenib monotherapy on health-related quality of life in patients with unresectable or metastatic cutaneous BRAF Val600-mutation-positive melanoma (COMBI-v): results of a phase 3, open-label, randomised trial. *Lancet Oncol* 2015;16:1389-98

Gubin, M. M., Zhang, X., Schuster, H., Caron, E., Ward, J. P., Noguchi, T., et al. (2014). Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515, 577–581. doi: 10.1038/nature13988

Gupta, H. B., Clark, C. A., Yuan, B., Sareddy, G., Pandeswara, S., Padron, A. S., et al. (2016). Tumor cell-intrinsic PD-L1 promotes tumor-initiating cell generation and functions in melanoma and ovarian cancer. *Signal Transduct. Target Ther.* 1, pii: 16030. doi: 10.1038/sigtrans.2016.30

Guth A, Monk E, Agarwal R, Bergman BC, Zemski-Berry KA, Minic A, Jordan K, Schlaepfer IR. Targeting Fat Oxidation in Mouse Prostate Cancer Decreases Tumor Growth and Stimulates Anti-Cancer Immunity. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 18;21(24):9660. doi: 10.3390/ijms21249660

## H

---

Haanen J, Carbone F, Robert C et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017; 28: iv119-iv142

Haas L, Elewaut A, Gerard CL, Umkehrer C, Leiendecker L, Pedersen M, Krecioch I, Hoffmann D, Novatchkova M, Kuttke M, Neumann T, da Silva IP, Witthock H, Cuendet MA, Carotta S, Harrington KJ, Zuber J, Scolyer RA, Long GV, Wilmott JS, Michielin O, Vanharanta S, Wiesner T, Obenauf AC. Acquired resistance to anti-MAPK targeted therapy confers an immune-evasive tumor microenvironment and cross-resistance to immunotherapy in melanoma. *Nat Cancer.* 2021 Jul;2(7):693-708. doi: 10.1038/s43018-021-00221-9.

Haass NK, Sproesser K, Nguyen TK, et al. The mitogenactivated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) induces growth arrest in melanoma cells and tumor regression when combined with docetaxel. *Clin Cancer Res* 2008;14:230-9

Hachiya, A., Kobayashi, A., Ohuchi, A., Takema, Y. and Imokawa, G. (2001). The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* 116, 578–586

Haenssle, H.A.; Mograby, N.; Ngassa, A.; Buhl, T.; Emmert, S.; Schön, M.P.; Rosenberger, A.; Bertsch, H.P. Association of Patient Risk Factors and Frequency of Nevus-Associated Cutaneous Melanomas. *JAMA Dermatol.* 2016, 152, 291–298

Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, Frederick DT, Hurley AD, Nellore A, Kung AL, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer Cell.* 2013; 23:302–315

Haq R, Yokoyama S, Hawryluk EB, et al. BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:4321-6

Harel, M. et al. Proteomics of Melanoma Response to Immunotherapy Reveals Mitochondrial Dependence. *Cell* 179, 236-250 e218, doi:10.1016/j.cell.2019.08.012 (2019).

Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2012;380:358-65

Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* 2017; 545: 175–180

He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res.* 2020 Aug;30(8):660-669. doi: 10.1038/s41422-020-0343-4

Hirata E, Girotti MR, Viros A, et al. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer Cell* 2015;27:574-88

Hocker T, Tsao H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat.* 2007; 28:578–588

Hoek, K. S. et al. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res.* 19, 290–302 (2006)

Hoek, K. S. et al. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res.* 68, 650–656 (2008)

Holly, E. A., Kelly, J. W., Shpall, S. N. & Chiu, S. H. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17, 459–468 (1987)

Holman CD, Armstrong BK. Cutaneous malignant melanoma and indicators of total accumulated exposure to the sun: an analysis separating histogenetic types. *J Natl Cancer Inst.* 1984;73:75–82.

Holubarsch, C. J. et al. A double-blind randomized multicentre clinical trial to evaluate the efficacy and safety of two doses of etomoxir in comparison with placebo in patients with moderate congestive heart failure: the ERGO (etomoxir for the recovery of glucose oxidation) study. *Clin. Sci. (Lond.)* 113, 205–212 (2007)

Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 2013; 339: 959–961

Houten SM, Violante S, Ventura FV, Wanders RJ. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:23-44. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105045

Hu, R. et al. PRMT5 Inhibition Promotes PD-L1 Expression and Immuno-Resistance in Lung Cancer. *Front Immunol* 12, 722188, doi:10.3389/fimmu.2021.722188 (2021)

Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol*. 2002; 22:7004–7014

Hugo, W. et al. Genomic and transcriptomic features of response to anti- PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Cell* 165, 35–44 (2016)

Hussussian, C.J.; Struewing, J.P.; Goldstein, A.M.; Higgins, P.A.; Ally, D.S.; Sheahan, M.D.; Clark, W.H., Jr.; Tucker, M.A.; Dracopoli, N.C. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat. Genet.* 1994, 8, 15–21

## I

---

Inoue, M. et al. Arginine methylation controls the strength of gammac-family cytokine signaling in T cell maintenance. *Nat Immunol* 19, 1265-1276, doi:10.1038/s41590-018-0222-z (2018)

## J

---

Jalali, S., Price-Troska, T., Bothun, C., Villasboas, J., Kim, H. J., Yang, Z. Z., et al. (2019). Reverse signaling via PD-L1 supports malignant cell growth and survival in classical Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J*. 9, 22. doi: 10.1038/s41408-019-0185-9

Jeon, S. M., Chandel, N. S. & Hay, N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* 485, 661–665 (2012)

Jimbow, K., Roth, S. I., Fitzpatrick, T. B. & Szabo, G. Mitotic activity in non-neoplastic melanocytes in vivo as determined by histochemical, autoradiographic, and electron microscope studies. *J. Cell Biol*. 66, 663–670 (1975)

Jing M, Cai Y, Shi J, Zhang X, Zhu B, Yuan F, Zhang J, Xiao M, Chen M. Adjuvant Treatments of Adult Melanoma: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2022 Jun 17;12:926242. doi: 10.3389/fonc.2022.926242

Johnson, D.B.; Pectasides, E.; Feld, E.; Ye, F.; Zhao, S.; Johnpulle, R.; Merritt, R.; McDermott, D.F.; Puzanov, I.; Lawrence, D.; et al. Sequencing treatment in BRAFV600 mutant melanoma: Anti-pd-1beforeandafterBRAF inhibition. *J. Immunother*. 2017, 40, 31–35

Jonsson G, Busch C, Knappskog S, et al. Gene expression profiling based identification of molecular subtypes in stage IV melanomas with different clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3356–3367

Jose C, Bellance N, Rossignol R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1807:552–561

Juneja, V. R., McGuire, K. A., Manguso, R. T., LaFleur, M. W., Collins, N., Haining, W. N., et al. (2017). PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 214, 895–904. doi: 10.1084/jem.20160801

## K

Kahn HS, Tatham LM, Patel AV, Thun MJ, Heath CW Jr. Increased cancer mortality following a history of nonmelanoma skin cancer. *JAMA*. 1998;280:910–912. DOI: 10.1001/jama.280.10.910.PMID: 9739976

Kanitakis, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* 12, 390–399; quiz 400–401 (2002)

Kaplan, A. et al. Role of ranolazine in heart failure: From cellular to clinic perspective. *Eur J Pharmacol* 919, 174787, doi:10.1016/j.ejphar.2022.174787 (2022)

Khoja, L. et al. Prevalence and heterogeneity of circulating tumour cells in metastatic cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 24, 40–46 (2014)

Kim, H. et al. PRMT5 control of cGAS/STING and NLRC5 pathways defines melanoma response to antitumor immunity. *Sci Transl Med* 12, doi:10.1126/scitranslmed.aaz5683 (2020)

Kim, I. S. et al. Microenvironment- derived factors driving metastatic plasticity in melanoma. *Nat. Commun.* 8, 14343 (2017)

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006; 3:177–185

Kirkwood JM, Bastholt L, Robert C, et al. Phase II, open-label, randomized trial of the MEK1/2 inhibitor selumetinib as monotherapy versus temozolomide in patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2012;18:555-67

Knobloch, M. et al. A Fatty Acid Oxidation-Dependent Metabolic Shift Regulates Adult Neural Stem Cell Activity. *Cell Rep* 20, 2144-2155, doi:10.1016/j.celrep.2017.08.029 (2017)

Kong, B.Y.; Carlino, M.S.; Menzies, A.M. Biology and treatment of BRAF mutant metastatic melanoma. *Melanoma Manag.* 2016, 3, 33–45

Kong, Y., Si, L., Li, Y., Wu, X., Xu, X., Dai, J. et al. (2016) Analysis of mTOR gene aberrations in melanoma patients and evaluation of their sensitivity to PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors. *Clin. Cancer Res.* 22, 1018–1027

Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, et al. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov* 2014;4:816-27

Koya RC, et al. BRAF Inhibitor Vemurafenib Improves the Antitumor Activity of Adoptive Cell Immunotherapy. *Cancer Research.* 2012; 72: 3928–3937

Krepler, C. et al. A Comprehensive Patient-Derived X 881 enograft Collection Representing the Heterogeneity of Melanoma. *Cell Rep* 21, 1953-1967, doi:10.1016/j.celrep.2017.10.021 (2017)

Kryukov, G. V. et al. MTAP deletion confers enhanced dependency on the PRMT5 arginine methyltransferase in cancer cells. *Science* 351, 1214-1218, doi:10.1126/science.aad5214 (2016)

Kumar SM, Yu H, Edwards R, Chen L, Kazianis S, Brafford P, Acs G, Herlyn M, Xu X. Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in melanoma. *Cancer Res.* 2007; 67:3177–3184

## L

---

Land SC, Tee AR. Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem.* 2007; 282:20534–20543

Landsberg, J. et al. Melanomas resist T cell therapy through inflammation- induced reversible dedifferentiation. *Nature* 490, 412–416 (2012)

Larkin J, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2019; 381: 1535–1546

Lasheras-Otero I, Feliu I, Maillo A, Moreno H, Redondo-Muñoz M, Aldaz P, Bocanegra A, Olias-Arjona A, Lecanda F, Fernandez-Irigoyen J, Santamaria E, Larrayoz IM, Gomez-Cabrero D, Wellbrock C, Vicent S, Arozarena I. The Regulators of Peroxisomal Acyl-Carnitine Shuttle CROT and CRAT Promote Metastasis in Melanoma. *J Invest Dermatol.* 2023 Feb;143(2):305-316.e5. doi: 10.1016/j.jid.2022.08.038

Laugier, F., Finet-Benyair, A., Andr´e, J., Rachakonda, P.S., Kumar, R., Bensussan, A. et al. (2015) RICTOR involvement in the PI3K/AKT pathway regulation in melanocytes and melanoma. *Oncotarget* 6, 28120–28131

Lauss, M. et al. Genome- wide DNA methylation analysis in melanoma reveals the importance of CpG methylation in MITF regulation. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1820–1828 (2015)



- Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., et al. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl. J. Med.* 372, 2509–2520. doi: 10.1056/NEJMoa1500596
- Le, D. T., Durham, J. N., Smith, K. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Aulakh, L. K., et al. (2017). Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357, 409–413. doi: 10.1126/science.aan6733
- Lee, J.H.; Miele, M.E.; Hicks, D.J.; Phillips, K.K.; Trent, J.M.; Weissman, B.E.; Welch, D.R. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, 88, 1731–1737
- Lee R, Mandala M, Long GV, Eggermont AMM, van Akkooi ACJ, Sandhu S, Garbe C, Lorigan P. Adjuvant therapy for stage II melanoma: the need for further studies. *Eur J Cancer.* 2023 Aug;189:112914. doi: 10.1016/j.ejca.2023.05.003
- Lehninger, AL., Nelson, DL., Cox, MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* New York: W.H. Freeman; 2013
- Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/ MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998;12:3008-19
- Liu C, et al. BRAF Inhibition Increases Tumor Infiltration by T cells and Enhances the Antitumor Activity of Adoptive Immunotherapy in Mice. *Clinical Cancer Research.* 2013; 19: 393–403.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M. and Zhao, J.J. (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 627–644
- Lodish, HF. *Molecular Cell Biology.* New York: W.H. Freeman; 2000. p. 1084p. G-17p. I-36
- Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2011; 29:1239–1246
- Long GV, Weber JS, Infante JR, et al. Overall Survival and Durable Responses in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib. *J Clin Oncol* 2016;34:871-8
- Lopaschuk, G. D. & Spafford, M. Response of isolated working hearts to fatty acids and carnitine palmitoyltransferase I inhibition during reduction of coronary flow in acutely and chronically diabetic rats. *Circ Res* 65, 378-387, doi:10.1161/01.res.65.2.378 (1989).
- Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS One.* 2012; 7:e35309

**M**

---

Madhunapantula, S.R.V. and Robertson, G.P. (2017) Targeting protein kinase-b3 (akt3) signaling in melanoma. *Expert Opin. Ther. Targets* 21, 273–290,

Maldonado, J. L. et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J. Natl Cancer Inst.* 95, 1878–1890 (2003)

Maranda EL, Ayache A, Cortizo J, Patel MA, Patel J, Jimenez J. Historical Identification of Melanoma-Dark, Deep, and Deadly. *JAMA Dermatol.* 2016;152(6):654. DOI: 10.1001/jamadermatol.2015.4906. PMID: 27276350.

Marghoob AA, Slade J, Salopek TG. Basal cell and squamous cell carcinomas are important risk factors for cutaneous malignant melanoma. Screening implications. *Cancer.* 1995;75:707–714. DOI: 10.1002/1097-0142(19950115)75:2+<707::AID-CNCR2820751415>3.0.CO;2-W

Marjon, K. et al. MTAP Deletions in Cancer Create Vulnerability to Targeting of the MAT2A/PRMT5/RIOK1 Axis. *Cell Rep* 15, 574-587, doi:10.1016/j.celrep.2016.03.043 (2016)

Martín-Gorgojo, A.; Nagore, E. Melanoma Arising in a Melanocytic Nevus. *Acta Dermosifiliogr.* 2018, 109, 123–132

Mavrakis, K. J. et al. Disordered methionine metabolism in MTAP/CDKN2A-deleted cancers leads to dependence on PRMT5. *Science* 351, 1208-1213, doi:10.1126/science.aad5944 (2016)

McArthur GA, Chapman PB, Robert C, et al. 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. *Lancet Oncol* 2014;15:323-32

McCormack, J. G., Barr, R. L., Wolff, A. A. & Lopaschuk, G. D. Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic, ischemic, and reperfused ischemic rat hearts. *Circulation* 93, 135-142, doi:10.1161/01.cir.93.1.135 (1996)

McCormack, J. G., Stanley, W. C. & Wolff, A. A. Ranolazine: a novel metabolic modulator for the treatment of angina. *Gen Pharmacol* 30, 639-645, doi:10.1016/s0306-3623(97)00301-7 (1998)

McKay, MM., Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene.* 2007 May 14; 26(22):3113-21

Meissner, T. B. et al. NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13794-13799, doi:10.1073/pnas.1008684107 (2010)

Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, et al. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012; 18:3242–3249

Mihaylova, M. M. & Shaw, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biol.* 13, 1016–1023 (2011)

Miller, A.J.; Mihm, M.C., Jr. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2006, 355, 51-65

Mitchell TC, Karakousis G, Schuchter L. Chapter 66: Melanoma. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE, eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier; 2020.

Morrison, D.K. MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012, 4, a011254

Mort, R. L., Jackson, I. J. & Patton, E. E. The melanocyte lineage in development and disease. *Development* 142, 620–632 (2015)

Moussaieff, A. et al. Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells. *Cell Metab* 21, 392-402, doi:10.1016/j.cmet.2015.02.002 (2015)

Müller J, Krijgsman O, Tsoi J, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 2014;5:5712

## N

Nash, D. T. & Nash, S. D. Ranolazine for chronic stable angina. *Lancet* 372, 1335–1341 (2008)

Naysmith L, Waterston K, Ha T, et al. Quantitative measures of the effect of the melanocortin 1 receptor on human pigmentary status. *J Invest Dermatol* 2004;122:423-8

Nazarian R, Shi H, Wang Q, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF (V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010;468:973-7

## O

O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L., and Smyth, M. J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 151–167. doi:10.1038/s41571-018-0142-8

Otegui N, Houry M, Arozarena I, Serrano D, Redin E, Exposito F, Leon S, Valencia K, Montuenga L, Calvo A. Cancer Cell-Intrinsic Alterations Associated with an Immunosuppressive Tumor Microenvironment and Resistance to Immunotherapy in Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023 Jun 6;15(12):3076. doi: 10.3390/cancers15123076.

Ott PA, Bhardwaj N. Impact of MAPK Pathway Activation in BRAF(V600) Melanoma on T Cell and Dendritic Cell Function. *Front Immunol.* 2013; 4: 346

Ouhtit A, Nakazawa H, Armstrong BK, et al. UVRadiation-Specific p53 mutation frequency in normal skin as a predictor of risk of basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:523–31.

**P**

---

Pampena, R.; Kyrgidis, A.; Lallas, A.; Moscarella, E.; Argenziano, G.; Longo, C. A meta-analysis of nevus-associated melanoma: Prevalence and practical implications. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2017, 77, 938–945.e4

Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW, et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res* 2011;71:2750-60

Parmenter TJ, Kleinschmidt M, Kinross KM, Bond ST, Li J, Kaadige MR, Rao A, Sheppard KE, Hugo W, Pupo GM, et al. Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. *Cancer Discov.* 2014; 4:423–433

Patel, H.; Yacoub, N.; Mishra, R.; White, A.; Yuan, L.; Alanazi, S.; Garrett, JT. Current advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2020 Feb; 12(2): 482

Patel SP, Lazar AJ, Papadopoulos NE, et al. Clinical responses to selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) based combination therapy stratified by gene mutations in patients with metastatic melanoma. *Cancer* 2013;119:799-805

Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* 2005;15:249-54

Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.* 2016; 23:27– 47

Pitt, J. M., Marabelle, A., Eggermont, A., Soria, J. C., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2016). Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. *Ann. Oncol.* 27, 1482–1492. doi: 10.1093/annonc/mdw168

Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33:19-20

Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 2011;480:387-90

**Q**

---

Qureshi, O.S.; Zheng, Y.; Nakamura, K.; Attridge, K.; Manzotti, C.; Schmidt, E.M.; Baker, J.; Jeffery, L.E.; Kaur, S.; Briggs, Z. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: A molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 2011, 332, 600–603

## R

Rabbie, R.; Ferguson, P.; Molina-Aguilar, C.; Adams, D.J.; Robles-Espinoza, C.D. Melanoma subtypes: Genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *J. Pathol.* 2019, 247, 539–551

Rambow, F. et al. Toward minimal residual disease- directed therapy in melanoma. *Cell* 174, 843–855 (2018)

Rardin MJ, Wiley SE, Naviaux RK, Murphy AN, Dixon JE. Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Anal Biochem.* 2009 Jun 15;389(2):157-64. doi: 10.1016/j.ab.2009.03.040

Ratnikov BI, Scott DA, Osterman AL, Smith JW, Ronai ZA. Metabolic rewiring in melanoma. *Oncogene.* 2017; 36:147–157

Restifo, N. P., Smyth, M. J., and Snyder, A. (2016). Acquired resistance to immunotherapy and future challenges. *Nat. Rev. Cancer* 16, 121–126. doi:10.1038/nrc.2016.2

Ribas, A. & Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 359, 1350–1355 (2018)

Robert, C., Dummer R, Gutzmer R, et al. Selumetinib plus dacarbazine versus placebo plus dacarbazine as first line treatment for BRAF-mutant metastatic melanoma: a phase 2 double-blind randomised study. *Lancet Oncol* 2013;14:733-40

Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, Lichinitser M, Dummer R, Grange F, Mortier L, Chiarion-Sileni V, Drucis K, Krajsova I, Hauschild A, Lorigan P, Wolter P, Long GV, Flaherty K, Nathan P, Ribas A, Martin AM, Sun P, Crist W, Legos J, Rubin SD, Little SM, Schadendorf D. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med.* 2015 Jan 1;372(1):30-9. doi: 10.1056/NEJMoa1412690

Rohatgi A. and Kirkwood JM. Beyond PD-1: The next frontier for immunotherapy in melanoma. *Frontiers in Oncology.* 2021. Mar 1;11:640314

Roider T, Falini B and Dietrich S. Recent advances in understanding and managing hairy cell leukemia. *F1000Research* 2018, 7(F1000 Faculty Rev):509

Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, Sanchez-Garcia FJ. Lactate contribution to the tumor microenvironment: Mechanisms, effects on immune cells and therapeutic relevance. *Front Immunol.* 2016; 7:52

Rossi M, Pellegrini C, Cardelli L, Ciciarelli V, Di Nardo L, Fagnoli MC. Familial Melanoma: Diagnostic and Management Implications. *Dermatol Pract Concept.* 2019;9(1):10-16. DOI: 10.5826/dpc.0901a03. PMID: 30775140; PMCID: PMC6368081.

Rowshanravan, B.; Halliday, N.; Sansom, D. CTLA-4: A moving target in immunotherapy. *Blood* 2018, 131, 58–67 Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008).

Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775–787. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009

**S**

---

Samudio, I. et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J. Clin. Invest.* 120, 142–156 (2010)

Sanderson SM, Gao X, Dai Z, Locasale JW. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nat Rev Cancer.* 2019 Nov;19(11):625-637. doi: 10.1038/s41568-019-0187-8.

Sanlorenzo M, Choudhry A, Vujic I, et al. Comparative profile of cutaneous adverse events: BRAF/MEK inhibitor combination therapy versus BRAF monotherapy in melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2014;71:1102-9. e1

Schadendorf D, Amonkar MM, Stroyakovskiy D, et al. Health-related quality of life impact in a randomised phase III study of the combination of dabrafenib and trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with BRAF V600 metastatic melanoma. *Eur J Cancer* 2015;51:833-40

Schafer, Z. T. et al. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature* 461, 109–113 (2009)

Schreiber, R. D., Old, L. J., and Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570. doi: 10.1126/science.1203486

Scott DA, Richardson AD, Filipp FV, Knutzen CA, Chiang GG, Ronai ZA, Osterman AL, Smith JW. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: Beyond the warburg effect. *J Biol Chem.* 2011; 286:42626–42634

Sensi, M. et al. Human cutaneous melanomas lacking MITF and melanocyte differentiation antigens express a functional Axl receptor kinase. *J. Invest. Dermatol.* 131, 2448–2457 (2011)

Shaffer, S. M. et al. Rare cell variability and drug- induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* 546, 431–435 (2017)

Shain, A.H.; Bastian, B.C. From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer* 2016, 16, 345–358

Sharma, P., Hu- Lieskovan, S., Wargo, J. A. & Ribas, A. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* 168, 707–723 (2017)

Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug; 1773(8):1213-26

Shen S, Faouzi S, Souquere S, Roy S, Routier E, Libenciuc C, André F, Pierron G, Scoazec JY, Robert C. Melanoma Persister Cells Are Tolerant to BRAF/MEK Inhibitors via ACOX1-Mediated Fatty Acid Oxidation. *Cell Rep.* 2020 Nov 24;33(8):108421. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108421.

Shi H, Moriceau G, Kong X, et al. Melanoma wholeexome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplificationmediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun* 2012;3:724

Shi H, Hugo W, Kong X, et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov* 2014;4:80-93

Shtivelman, E. et al. Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget.* 5, 1701–1752 (2014)

Smith MP, Ferguson J, Arozarena I, et al. Effect of SMURF2 targeting on susceptibility to MEK inhibitors in melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:33-46

Smith MP, Sanchez-Laorden B, O'Brien K, et al. The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNFalpha. *Cancer Discov* 2014;4:1214-29

Smith MP, Brunton H, Rowling EJ, et al. Inhibiting Drivers of Non-mutational Drug Tolerance Is a Salvage Strategy for Targeted Melanoma Therapy. *Cancer Cell* 2016;29:270-84

Snels DG, Hille ET, Gruis NA, et al. Risk of cutaneous malignant melanoma in patients with nonfamilial atypical nevi from a pigmented lesions clinic. *J Am Acad Dermatol* 1999;40(5 Pt 1):686–93

Snyder, K. J. et al. PRMT5 regulates T cell interferon response and is a target for acute graft-versus-host disease. *JCI Insight* 5, doi:10.1172/jci.insight.131099 (2020)

Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006;439:358-62

Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 2012;366:707-14

Spranger S, Gajewski T. Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18: 139–147

Stahl, J.M., Cheung, M., Sharma, A., Trivedi, N.R., Shanmugam, S. and Robertson, G.P. (2003) Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res.* 63, 2881–2890

Stamper, C.C.; Zhang, Y.; Tobin, J.F.; Erbe, D.V.; Ikemizu, S.; Davis, S.J.; Stahl, M.L.; Seehra, J.; Somers, W.S.; Mosyak, L. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* 2001, 410, 608–611

Stevens, A. P., Dettmer, K., Wallner, S., Bosserhoff, A. K. & Oefner, P. J. Quantitative analysis of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine in melanoma cells by liquid chromatography-stable isotope ratio tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 876, 123-128, doi:10.1016/j.jchromb.2008.10.038 (2008)

Straussman R, Morikawa T, Shee K, et al. Tumour microenvironment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 2012;487:500-4

Su, Y. et al. Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, 13679–13684 (2017)

Sun, C. et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508, 118–122 (2014)

Sun, N., Tian, Y., Chen, Y., Guo, W. & Li, C. Metabolic rewiring directs melanoma immunology. *Front Immunol* 13, 909580, doi:10.3389/fimmu.2022.909580 (2022)

Sviderskaya, E.V.; Gray-Schopfer, V.C.; Hill, S.P.; Smit, N.P.; Evans-Whipp, T.J.; Bond, J.; Hill, L.; Bataille, V.; Peters, G.; Kipling, D.; et al. p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence, apoptosis, and immortalization: Possible implications for melanoma progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, 95, 723–732

## T

---

Taube, J.M., Anders, R. A., Young, G. D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T. L., et al. (2012). Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci. Transl. Med.* 4, 127ra37. doi: 10.1126/scitranslmed.3003689

Thorsson, V. et al. The immune landscape of cancer. *Immunity* 48, 812–830 (2018)

Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by singlecell RNA-seq. *Science* 2016;352:189-96

Trojaniello C, et al. Therapeutic Advancements Across Clinical Stages in Melanoma, With a Focus on Targeted Immunotherapy. *Front Oncol.* 2021 Jun 10;11:670726

Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, Haluska FG. Relative Reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 Alterations in Cutaneous Melanoma Cell Lines. *Cancer Res.* 2000; 60:1800–1804

Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic Interaction Between NRAS and BRAF Mutations and PTEN//MMAC1 Inactivation in Melanoma. *J Investig Dermatol.* 2004; 122:337– 341

Tsoi, J. et al. Multi-stage differentiation defines melanoma subtypes with differential vulnerability to drug-induced iron-dependent oxidative stress. *Cancer Cell* 33, 890–904 (2018) Turajlic S, Furney SJ, Stamp G, et al. Whole-genome sequencing reveals complex mechanisms of intrinsic resistance to BRAF inhibition. *Ann Oncol* 2014;25:959-67



---

**V**

---

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocytostimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 1995;11:328-30.

Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov* 2014;4:94-109.

Varrone, F.; Caputo, E. The miRNAs Role in Melanoma and in Its Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb; 21(3): 878

Vazquez, F. et al. PGC1 $\alpha$  expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell* 23, 287–301 (2013)

Verfaillie, A. et al. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat. Commun.* 6, 6683 (2015)

Viehl, C. T., Moore, T. T., Liyanage, U. K., Frey, D. M., Ehlers, J. P., Eberlein, T. J., et al. (2006). Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells promotes a tumorspecific immune response in pancreas cancer-bearing mice. *Ann. Surg. Oncol.* 13, 1252–1258. doi: 10.1245/s10434-006-9015-y

Villanueva J, Vultur A, Lee JT, et al. 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* 2010;18:683-95

Villanueva J, Infante JR, Krepler C, et al. Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. *Cell Rep* 2013;4:1090-9

**W**

---

Wagle N, Van Allen EM, Treacy DJ, et al. MAP kinase pathway alterations in BRAF-mutant melanoma patients with acquired resistance to combined RAF/MEK inhibition. *Cancer Discov* 2014;4:61-8

Waizenegger IC, Baum A, Steurer S, et al. A Novel RAF Kinase Inhibitor with DFG-Out-Binding Mode: High Efficacy in BRAF-Mutant Tumor Xenograft Models in the Absence of Normal Tissue Hyperproliferation. *Mol Cancer Ther* 2016;15:354-65

Wang T, Xiao M, Ge Y, et al. BRAF Inhibition Stimulates Melanoma-Associated Macrophages to Drive Tumor Growth. *Clin Cancer Res* 2015;21:1652-64

Warburg O. THE CHEMICAL CONSTITUTION OF RESPIRATION FERMENT. *Science.* 1928 Nov 9;68(1767):437-43. doi: 10.1126/science.68.1767.437

Wellbrock, C. & Marais, R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J. Cell Biol.* 170, 703–708 (2005)

Wellbrock C, Arozarena I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015; 28: 390–406

Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol* 2001;3: 950-7

White E, Kirkpatrick CS, Lee JA. Case–control study of malignant melanoma in Washington State. I. Constitutional factors and sun exposure. *Am J Epidemiol.* 1994;139:857–868. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a117092. PMID: 8166136.

Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E, et al. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov* 2013;3:350-62

Widmann, Christian, Spencer Gibson, Matthew B. Jarpe, and Gary L. Johnson. Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiol. Rev.* 79: 143–180, 1999

Widmer, D. S. et al. Systematic classification of melanoma cells by phenotype- specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, 343–353 (2012)

Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 2012;487:505-9

Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013; 369: 122–33

Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, Cowey CL, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, Ferrucci PF, Smylie M, Butler MO, Hill A, Márquez-Rodas I, Haanen JBAG, Guidoboni M, Maio M, Schöffski P, Carlino MS, Lebbé C, McArthur G, Ascierto PA, Daniels GA, Long GV, Bas T, Ritchings C, Larkin J, Hodi FS. Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* 2022 Jan 10;40(2):127-137. doi: 10.1200/JCO.21.02229

## Y

---

Yang, C., Tian, C., Hoffman, T. E., Jacobsen, N. K. & Spencer, 831 S. L. Melanoma subpopulations that rapidly escape MAPK pathway inhibition incur DNA damage and rely on stress signalling. *Nat Commun* 12, 1747, doi:10.1038/s41467-021-21549-x (2021).

Young HL, Rowling EJ, Bugatti M, et al. An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *J Exp Med* 2017;214:1691-710

Yu, M. et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 339, 580–584 (2013)

Yuan, J., Hegde, P. S., Clynes, R., Foukas, P. G., Harari, A., Kleen, T. O., et al. (2016). Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* 4, 3. doi: 10.1186/s40425-016-0107-3

## Z

Zaidi Z. Skin of colour: Characteristics and disease. *J Pak Med Assoc.* 2017 Feb;67(2):292-299. PMID: 28138188.

Zalaudek, I. et al. Frequency of dermoscopic nevus subtypes by age and body site: a cross-sectional study. *Arch. Dermatol.* 147, 663–670 (2011)

Zalaudek I, Conforti C, Guarneri F, et al. Clinical and dermoscopic characteristics of congenital and noncongenital nevus-associated melanomas. *J Am Acad Dermatol.* 2020;83(4):1080-1087.DOI: 10.1016/j.jaad.2020.04.120. PMID: 32360715

Zaugg, K. et al. Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev.* 25, 1041–1051 (2011)

Zhang, Y. and Dong, C. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Nov; 64(21):2771-89

Zhang, Y. et al. Enhancing CD8(+) T Cell Fatty Acid Catabolism within a Metabolically Challenging Tumor Microenvironment Increases the Efficacy of Melanoma Immunotherapy. *Cancer Cell* 32, 377-391 e379, doi:10.1016/j.ccell.2017.08.004 (2017)

Zhang, G. et al. Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *J Clin Invest* 126, 1834-1856, doi:10.1172/JCI82661 (2016)

Zheng, G. X. et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun* 8, 14049, doi:10.1038/ncomms14049 (2017)

Zsigrai, S. et al. S-Adenosylmethionine Treatment of Colorectal Cancer Cell Lines Alters DNA Methylation, DNA Repair and Tumor Progression-Related Gene Expression. *Cells* 9, doi:10.3390/cells9081864 (2020).



# ***PUBLICACIONES***





# Cooperative behaviour and phenotype plasticity evolve during melanoma progression

Emily J. Rowling<sup>1</sup> | Zsofia Miskolczi<sup>1</sup> | Raghavendar Nagaraju<sup>1</sup> | Daniel J. Wilcock<sup>1</sup> | Ping Wang<sup>2</sup> | Brian Telfer<sup>3</sup> | Yaoyong Li<sup>4</sup> | Irene Lasheras-Otero<sup>5</sup> | Marta Redondo-Muñoz<sup>5</sup> | Andrew D. Sharrocks<sup>4</sup> | Imanol Arozarena<sup>5</sup> | Claudia Wellbrock<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Manchester Cancer Research Centre, Division of Cancer Sciences, Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester, UK

<sup>2</sup>Bioinformatics Core Facility, Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester, UK

<sup>3</sup>Division of Pharmacy and Optometry, Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester, UK

<sup>4</sup>Division of Molecular and Cellular Function, Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester, UK

<sup>5</sup>Navarrabiomed, Complejo Hospitalario de Navarra (CHN), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Universidad Pública de Navarra (UPNA), Pamplona, Spain

## Correspondence

Claudia Wellbrock, Division of Cancer Sciences, FBMH, The University of Manchester, Michael Smith Building, Oxford Road, Manchester M13 9PT, UK.  
Email: claudia.wellbrock@manchester.ac.uk

## Funding information

Cancer Research UK, Grant/Award Number: C11591/A16416; Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Number: CP15/00176; Wellcome Trust, Grant/Award Number: 103857/Z/14/Z

## Abstract

A major challenge for managing melanoma is its tumour heterogeneity based on individual co-existing melanoma cell phenotypes. These phenotypes display variable responses to standard therapies, and they drive individual steps of melanoma progression; hence, understanding their behaviour is imperative. Melanoma phenotypes are defined by distinct transcriptional states, which relate to different melanocyte lineage development phases, ranging from a mesenchymal, neural crest-like to a proliferative, melanocytic phenotype. It is thought that adaptive phenotype plasticity based on transcriptional reprogramming drives melanoma progression, but at which stage individual phenotypes dominate and moreover, how they interact is poorly understood. We monitored melanocytic and mesenchymal phenotypes throughout melanoma progression and detected transcriptional reprogramming at different stages, with a gain in mesenchymal traits in circulating melanoma cells (CTCs) and proliferative features in metastatic tumours. Intriguingly, we found that distinct phenotype populations interact in a cooperative manner, which generates tumours of greater “fitness,” supports CTCs and expands organotropic cues in metastases. Fibronectin, expressed in mesenchymal cells, acts as key player in cooperativity and promotes survival of melanocytic cells. Our data reveal an important role for inter-phenotype communications at various stages of disease progression, suggesting these communications could act as therapeutic target.

## KEYWORDS

fibronectin, melanoma, MITF, phenotype cooperativity, phenotype plasticity

## 1 | INTRODUCTION

Intra-tumour heterogeneity, reflected in the co-existence of different cancer cell phenotypes within a tumour, is an inherent property of cancer. It is thought that transcriptional reprogramming

establishes these phenotypes and dynamic reprogramming occurs throughout tumour progression. Epithelial–mesenchymal transition (EMT), which generates invasive epithelial-derived phenotypes, is the most established concept of these dynamics.

-----  
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Pigment Cell & Melanoma Research* published by John Wiley & Sons Ltd

In melanoma, which is not of epithelial origin, plasticity between cells of so-called “proliferative” and “invasive” phenotypes had therefore been proposed as equivalent to EMT (Hoek et al., 2008). These two phenotype subpopulations are not defined by particular genetic lesions, but can be identified in melanoma tumours by their specific “proliferative” and “invasive” gene expression signatures (Rambow et al., 2018; Widmer et al., 2012). However, single cell analysis has identified melanoma cells simultaneously expressing genes corresponding to the “proliferative” or “invasive” signatures (Ennen et al., 2017; Tirosh et al., 2016), suggesting the existence of additional “transition” states. Indeed, recent studies revealed that the so-called “proliferative” and “invasive” states are rather part of a series of melanoma cell subpopulations that transcriptionally relate to distinct melanocyte lineage development states (Rambow et al., 2018; Tsoi et al., 2018). Hence, we proposed a melanoma “phenotype plasticity model,” in which transcriptional reprogramming can occur along a differentiation/de-differentiation gradient ranging from a melanocytic to a mesenchymal, neural crest-like phenotype (Arozarena & Wellbrock, 2019). The respective transcriptional states are identifiable by classifiers such as MITF for the melanocytic phenotype, and SMADs, NFκB, AP1 and TEADs as upstream regulators of the mesenchymal phenotype transcriptome.

MITF is a melanocyte lineage-specific transcription factor that rules the expression of pigmentation, but also cell cycle regulator genes; hence, so-called MITF<sup>high</sup> melanocytic phenotype cells are considered to be proliferative (Wellbrock & Arozarena, 2015). Low MITF expression correlates with de-differentiation, and the MITF<sup>low</sup> mesenchymal phenotype is stated to be invasive, because cells of this phenotype tend to show increased ability to invade matrigel in response to FCS (Carreira et al., 2006; Verfaillie et al., 2015; Widmer et al., 2012). This behaviour is probably due to the distinct expression of FCS-responsive receptors induced by SMADs, TEADs or AP1 in the mesenchymal phenotype (Arozarena & Wellbrock, 2019; Miskolczi et al., 2018; Rambow et al., 2015). Thus, discrete biological properties have been assigned to the different melanoma cell phenotypes, and this categorization has been extrapolated to aid the definition of tumour phenotypes. However, intra-tumour heterogeneity leads to the co-existence of these phenotypes (Tirosh et al., 2016; Verfaillie et al., 2015), and phenotype heterogeneity can lead to cooperative behaviour during tumour development (Tabassum & Polyak, 2015). We showed recently that cooperative interactions between melanoma phenotypes impact on melanoma cell invasion (Chapman et al., 2014), but how communications between these phenotypes contribute to melanoma growth and progression is unknown.

To fully dissect the contribution of phenotype plasticity and cooperativity in melanoma, we analysed the impact of heterogeneity on melanocytic and mesenchymal phenotypes during individual steps of melanoma development and progression.

## 2 | METHODS

For more detailed information, see Supporting Information Materials and Methods.

### Significance

Different melanoma cell phenotypes co-exist within heterogeneous tumours, and apart from affecting responses to therapies, they drive distinct steps of melanoma progression; hence, understanding phenotype behaviour is imperative for better prognostic assessments. While phenotype plasticity based on transcriptional reprogramming has been studied extensively, little is known about phenotype interactions in heterogeneous tumours. We demonstrate here that inter-phenotype communications contribute to phenotype plasticity, and result in cooperative behaviour, which accelerates tumour growth and supports melanoma cell dissemination and metastasis. We reveal an important role for inter-phenotype communications at various stages of disease progression, suggesting these communications could act as therapeutic target.

### 2.1 | Cell lines

WM266-4 cells were bought from the American Type Culture Collection, and 501mel cells were a gift from Steve Rosenberg (NCI, MD); all were obtained in 2008. WM266-4-GFP, 501mel-mCherry and WM266-4-GFP FN-kD have been previously described (Chapman et al., 2014) and had been generated with the Block-iT Pol II miR RNAi expression vector kit (Invitrogen). All cell lines were authenticated in house by short tandem repeat profiling in 2018. These cell lines were grown in DMEM/10% FCS (PAA) as described previously (Wellbrock & Schartl, 2000).

### 2.2 | Animal work

Animal procedures involving animals were ethically approved and carried out under licence in accordance with the UK Home Office Animals (Scientific Procedures) Act (1986) and guidelines of the Committee of the National Cancer Research Institute for the Welfare and Use of Animals in Cancer Research (Workman et al., 2010). Subcutaneous xenografts were established in NSG mice by injecting cells in serum-free DMEM subcutaneously. Mice were weighed and tumours measured until they reached 1,000 mm<sup>3</sup>. Tumours, liver and lungs were harvested and fixed in formalin for immunohistochemistry. For the imaging studies, the indicated number of cells in PBS was implanted i.v.

### 2.3 | Statistical analysis

If not indicated otherwise, data represent the results for assays performed in triplicate, with error bars to represent errors from



the mean. Statistics were performed using GraphPad Prism version 8.00 for Mac OS, GraphPad Software, San Diego, California USA. If not indicated otherwise, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test was used for bar graph analyses and the mixed effects model to analyse tumour growth over time. Where indicated, values are mean  $\pm$  SEM. \* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ .

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | High FN1 expression in the mesenchymal phenotype accelerates the onset of melanoma growth

To assess the behaviour of different phenotypes, we chose melanocytic 501mel cells and mesenchymal WM266-4 cells. Both cell lines have been widely used to study melanoma plasticity (Carreira et al., 2006; Cheli et al., 2011; Miskolczi et al., 2018; Ohanna et al., 2011; Strub et al., 2011), and because the respective transcriptional states linked to MITF in melanocytic 501mel cells or related to SMADs and AP1 in mesenchymal WM266-4 cells are maintained when in culture (Figure S1a), they represent reliable models for each individual transcriptional phenotype.

In line with their melanocytic phenotype, 501mel cells are identified by the Hoek (Widmer et al., 2012) as well as the Verfallie (Verfaillie et al., 2015) "proliferative" signature, whereas mesenchymal WM266-4 cells are significantly enriched in "invasive" signature genes (Figure S1b–d). Expression of GFP or mCherry did not change the respective phenotypes with regard to their functional behaviour, or melanocytic or mesenchymal features (Figure 1a,b and Figure S1c,d). Thus, these cell lines demonstrate all characteristics of the respective melanocytic/proliferative or mesenchymal/invasive phenotypes of which MITF expression levels serve as classifier (see Figure 1b).

In line with previous observations (Caramel et al., 2013; Cheli et al., 2011; Rambow et al., 2015; Wardwell-Ozgo et al., 2014), the onset of growth of melanocytic 501mel tumours was delayed compared to mesenchymal WM266-4 tumours (Figure 1c and Figure S2a). Expression of MITF and its target genes linked to differentiation and proliferation was up-regulated in all growing tumours compared to the initially injected cells (Figure 1d and Figure S2b), which is in line with the requirement of MITF for tumour growth (Simmons, Pierce, Al-Ejeh, & Boyle, 2017). Intriguingly, the expression of human fibronectin (FN1) was also increased (Figure 1d), suggesting that it is also favourable for tumour growth.

Immunohistochemistry (IHC) analysis using a fibronectin antibody with reactivity to mouse and human revealed a similar staining intensity in 501mel and WM266-4 tumours despite a significant lower mRNA expression of human FN1 in 501mel tumours (Figure 1e,f). However, murine Fn1 expression was elevated in 501mel tumours (Figure 1g), and this correlated with an abundance of cells positive for the cancer-associated fibroblast (CAF) marker  $\alpha$ SMA (Figure 1f). We found that mouse Fn1 could serve as adhesion substrate and activate adhesion signalling in 501mel cells (Figure

S2c,d), supporting the idea that fibronectin derived from murine CAFs might aid tumour growth. This idea was further corroborated by findings with WM266-4 cells in which FN1 was depleted by RNAi; the loss of FN1 profoundly delayed tumour growth (Figure 1h and Figure S2e). However, tumours that eventually started growing contained abundant  $\alpha$ SMA-positive CAFs correlating with increased host Fn1 expression (Figure 1i,j). At the cellular level, fibronectin supported melanoma cell aggregation (Figure S2f,g) and protected WM266-4 cells from apoptosis, which was also seen for low FN1 expressing 501mel cells (Figure S2h,i).

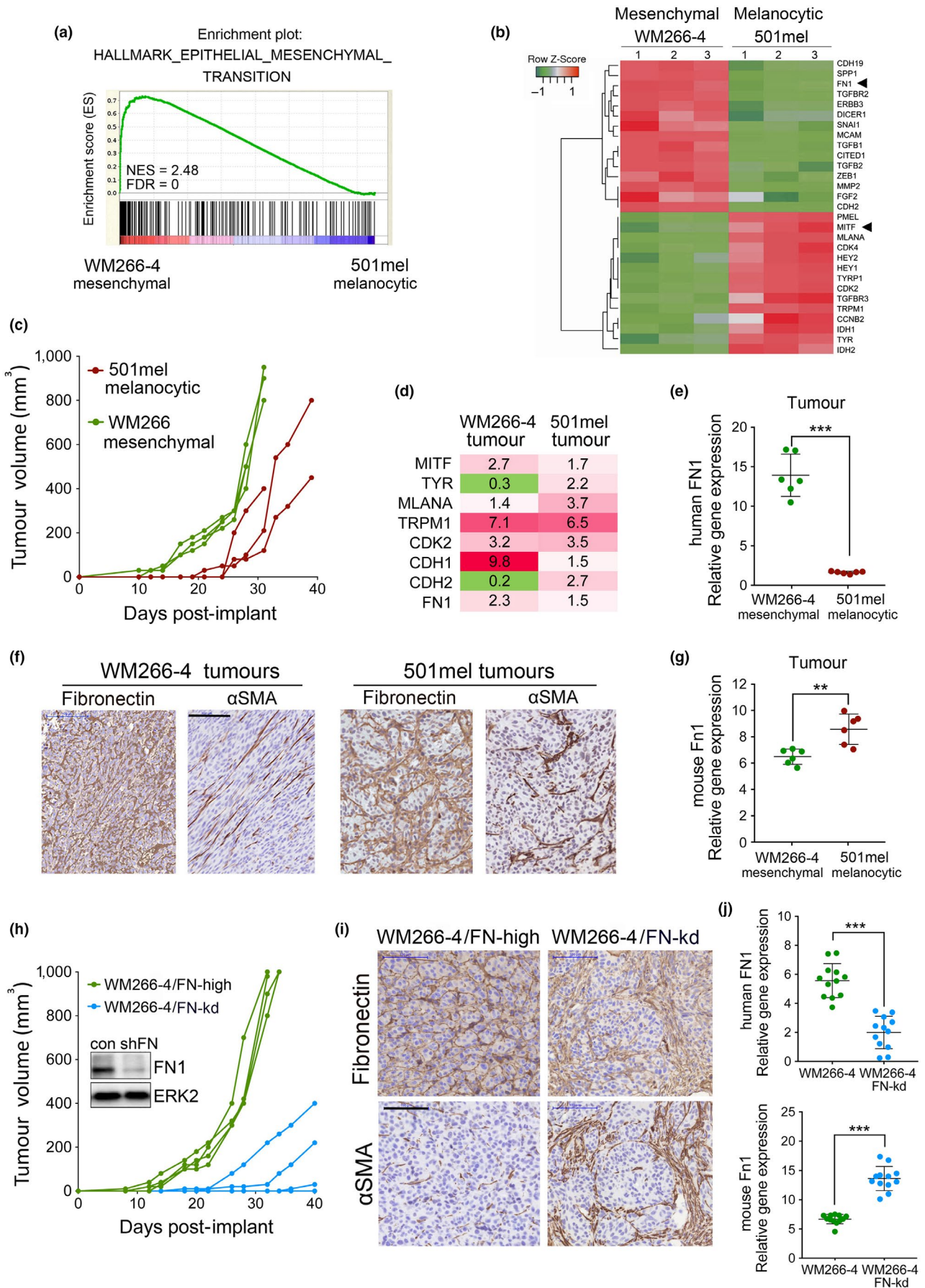
#### 3.2 | Mesenchymal, but also melanocytic phenotype cells are sufficient to seed metastases

We confirmed (Eccles et al., 2008; Mills et al., 2002) that mesenchymal WM266-4 cells efficiently seed the lung after tail vein injection, however melanocytic 501mel cells seeded the liver instead (Figure 2a–b). While due to this organotropism previous studies might have missed the metastatic potential of 501mel cells, it should be mentioned that compared to others (Ohanna et al., 2011; Tichet et al., 2015), we used NSG mice for these experiments, which suggests a possible contribution of the immune environment in defining the metastatic potential of 501mel cells.

Expression of MITF and its target gene CDK2 was increased in both, lung and liver metastases (Figure 2c), which agrees with the fact that MITF is required for metastasis outgrowth (Simmons et al., 2017). On the other hand, FN1 expression was down-regulated (Figure 2c), and with 501mel cells expressing hardly detectable basal levels of FN1 (Figure S2g), this strongly suggested that cell-derived FN1 is not a relevant factor for metastatic seeding of the liver by 501mel cells. On the other hand, using WM266-4 FN-kd cells revealed that WM266-4-derived FN1 is required for their ability to establish lung metastasis (Figure 2d). Lung and liver weights (Figure 2e) reflected that both phenotypes were able to produce experimental metastasis and that WM266-4 cells required FN1 to seed the lung.

#### 3.3 | Melanocytic phenotype cells cooperate with mesenchymal phenotype cells in tumour growth in a FN-dependent manner

To assess how phenotype heterogeneity affects melanoma growth, we analysed xenografts grown by either WM266-4 or 501mel cells or a heterogeneous mixture of both cell lines; due to the high proliferative activity of 501mel cells, we chose a ratio of 25%–75% WM266-4 cells. Tumour growth onset of heterogeneous tumours was not affected when compared to WM266-4 tumours (Figure 3a), but heterogeneous tumours grew significantly faster (Figure 3b and Figure S3) and had reached a greater volume at 29 days than WM266-4 tumours (Figure 3a). Heterogeneous tumours containing WM266-4 FN-kd showed delayed tumour

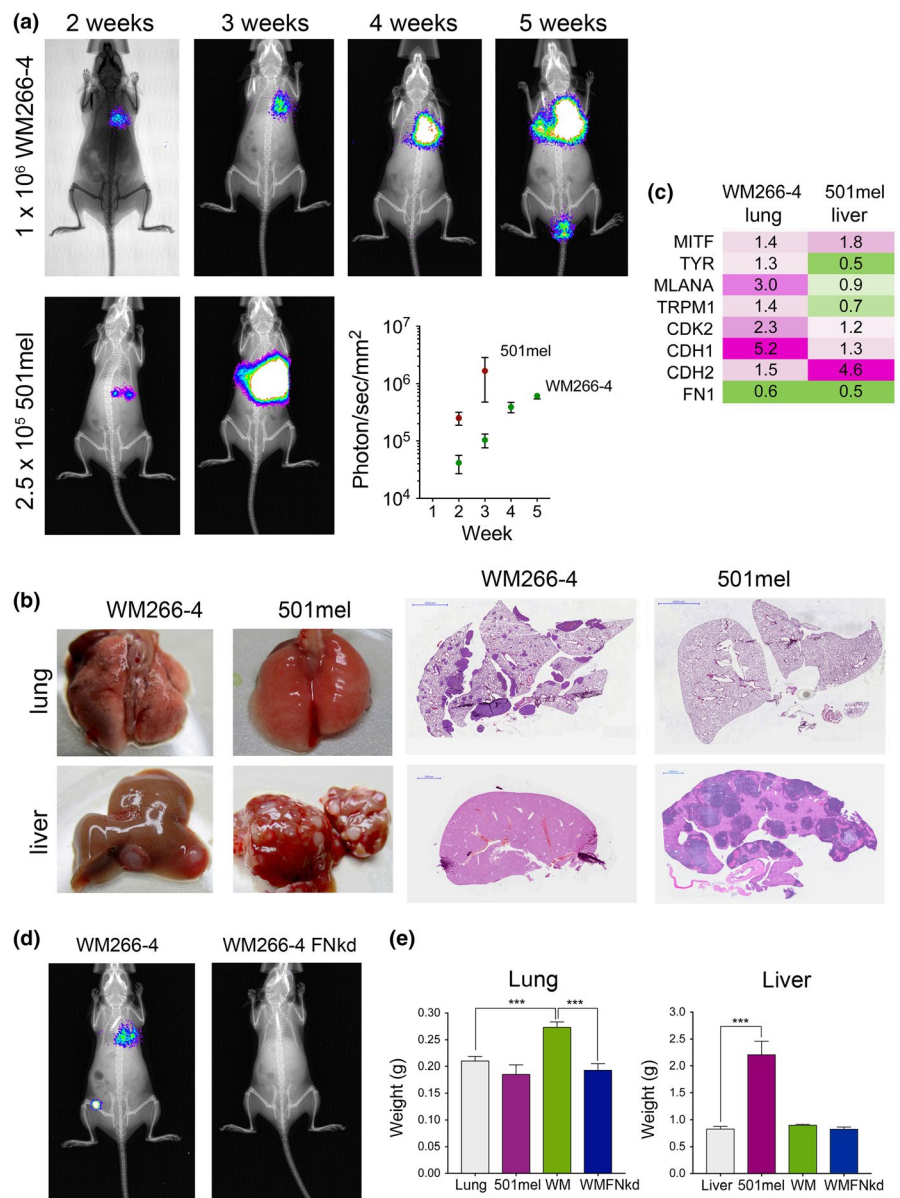


**FIGURE 1** FN1 accelerates the onset of melanoma growth. (a) GSEA plot of EMT Hallmark (Liberzon et al., 2015) for 501mel-mCherry and WM266-4-GFP cells. (b) Expression heatmap showing gene subset with the highest up- and down-regulation in 501mel-mCherry versus WM266-4-GFP cells. (c) Tumour volumes over 31 days in mice ( $n = 3$  mice/group) injected with 501mel-mCherry and WM266-4-GFP cells. (d) Fold change in mRNA expression in indicated tumours when compared to cell lines. (e) qRT-PCR analysis of human FN1 expression in indicated tumours. (f) IHC for fibronectin and  $\alpha$ SMA in indicated tumours. Scale bar: 100  $\mu$ m. (g) qRT-PCR analysis of mouse Fn1 expression as in (e). (h) Tumour volumes over a period of 40 days in mice ( $n = 4$  mice/group) injected with WM266-4-GFP or WM266-4 FN-kd-GFP cells. Expression of FN1 in both cell lines was analysed by Western blotting. ERK2 served as loading control. (i) IHC for fibronectin and  $\alpha$ SMA in WM266-4-GFP tumours (day 32) and WM266-4 FN-kd-GFP tumours (day 40). Scale bar: 100  $\mu$ m. (j) qRT-PCR analysis of human FN1 and mouse Fn1 expression in the respective tumours. \*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ , for GSEA: FDR < 0.0001

growth onset (Figure 3b), indicating that FN1 is also important for growth in heterogeneous tumours, which was also reflected in tumour-free survival (Figure 3c).

Heterogeneous tumours were composed of red 501mel and green WM266-4 subpopulations growing in clusters, but occasionally, particularly at tumour edges, the subpopulations intermixed (Figure 3d). Fibronectin co-localized with WM266-4-GFP cells was enriched between the populations and also detectable in areas

where 501mel-mCherry cells grew (Figure 3d). A more detailed analysis of tumour composition analysing GFP- or mCherry-mRNA expression revealed that although initially injected at 25%, 501mel cells made up 50% of heterogeneous tumours when they reached  $\sim 1000$  mm<sup>3</sup> (Figure 3e). Even more striking, in tumours that contained FN1-deficient WM266-4 cells, 501mel cells outgrew the incompatible WM266-4 FN-kd cell population (Figure 3e). At the cellular level, there was no proliferative advantage when 501mel



**FIGURE 2** Mesenchymal and melanocytic melanoma cells seed metastases. (a) Representative images of in vivo bioluminescence imaging in NSG mice injected i.v. with luciferase expressing WM266-4-GFP or 501mel-mCherry cells. Quantitation of imaging signals of serial images is shown ( $n = 4$  mice/group). (b) Photographs and H&E staining of livers and lungs isolated from mice described in (a). Scale bar: 2000  $\mu$ m. (c) qRT-PCR analysis of indicated genes and in indicated cell lines and corresponding metastases. The mean fold change ( $n = 3$ ) is indicated, cut-off  $p < .05$ . (d) Representative images of in vivo bioluminescence imaging of metastases in NSG mice injected IV with luciferase expressing WM266-4-GFP or WM266-4 FN-kd-GFP cells ( $n = 3$  mice/group). (e) Lung and liver weights from mice injected with the indicated cell lines ( $n = 3$  mice/group). Normal lungs and livers served as control. One-way ANOVA, \*\*\* $p < .001$

cells were co-cultured with WM266-4 cells (Figure 3f), but there was a significant effect on survival in heterogeneous melanoma spheres and this effect was dependent on the ability of WM266-4 cells to express FN1 (Figure 3g).

### 3.4 | Cooperativity in heterogeneous tumours results in “phenotype adaptation” compatible with enhanced tumour growth

Bulk RNA sequencing (RNA-seq) has revealed that “invasive,” “neural crest stem cell-like” and “pigmented” phenotypes co-exist within a tumour and can be identified by their respective expression signatures (Rambow et al., 2018). Following this approach, we assessed the impact of cooperativity on individual phenotype populations during tumour growth.

In “homogenous” WM266-4 and 501mel tumours, the phenotype corresponding to each cell line was retained (Figure 4a and see Figure S1b). Unsupervised clustering of RNA-seq data from “homogeneous” and “heterogeneous” tumours distinguished the different tumour groups and identified 3 clusters, which in heterogeneous tumours were linked to expression patterns of 501mel (501mel<sup>high</sup>, 501mel<sup>low</sup>) and WM266-4 (WM266-4<sup>high</sup>) tumours, respectively (Figure 4b). However, “heterogeneous” tumours also expressed two clusters with uniquely down-regulated (hetero<sup>low</sup>) and up-regulated (hetero<sup>high</sup>) genes, respectively. The group of down-regulated genes comprised only 69 genes amongst them were *JARID1D* (*KDM5D*) and *SNAI2*. The cluster of uniquely up-regulated genes was enriched in established “invasive-phenotype” markers like *AXL*, *SOX9*, *TGFB* and *NGFR* (Figure 4b). Indeed, heterogeneous tumours were enriched for EMT and Verfaillie “invasive” signatures even relative to WM266-4 tumours (Figure S4a,b), but MITF expression was higher than in WM266-4 tumours (Figure 4c).

To assess specific changes in the mesenchymal WM266-4 populations, we FACS-sorted these from homogeneous or heterogeneous tumours and found that MITF expression was similar under both conditions (Figure S4c,d). Nevertheless, EMT, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  and inflammatory response signatures were enriched in WM266-4 cells in a heterogeneous setting (Figure 4d). Thus, the presence of melanocytic phenotype 501mel cells had stimulated a further up-regulation of mesenchymal features in WM266-4 cells, which is also reflected in enrichment for the Verfaillie “invasive” and reduction of the “proliferative” signature (Figure 4d).

In isolated 501mel cells, the Verfaillie “proliferative” signature was up-regulated, but intriguingly the subpopulation had also acquired hallmarks of EMT and TGF $\beta$  signalling and was enriched for the Verfaillie “invasive” signature (Figure 4e). Thus, while maintaining characteristics of the melanocytic phenotype, 501mel cells had also gained mesenchymal features in the presence of WM266-4 cells. This gain in mesenchymal features was correlated with an up-regulation of AP1 complex factors such as JUN, FOS and FOSL1 as well as TEAD1, whereas MITF expression was unchanged (Figure S4e).

In heterogeneous tumours, both phenotype subpopulations had down-regulated oxidative phosphorylation (Figure 4d,e, and Figure S4a,b), suggesting a change in metabolic activity compatible with enhanced tumour growth. Individual contributions of the two phenotypes in “heterogeneous” tumours resulted in major changes in cell–cell junctions and ECM interactions with increased expression of *FN1*, *TNC* and matrix re-modellers, and alterations in the repertoire of collagens and adhesion receptors (Figure 4f and Tables S1–S3).

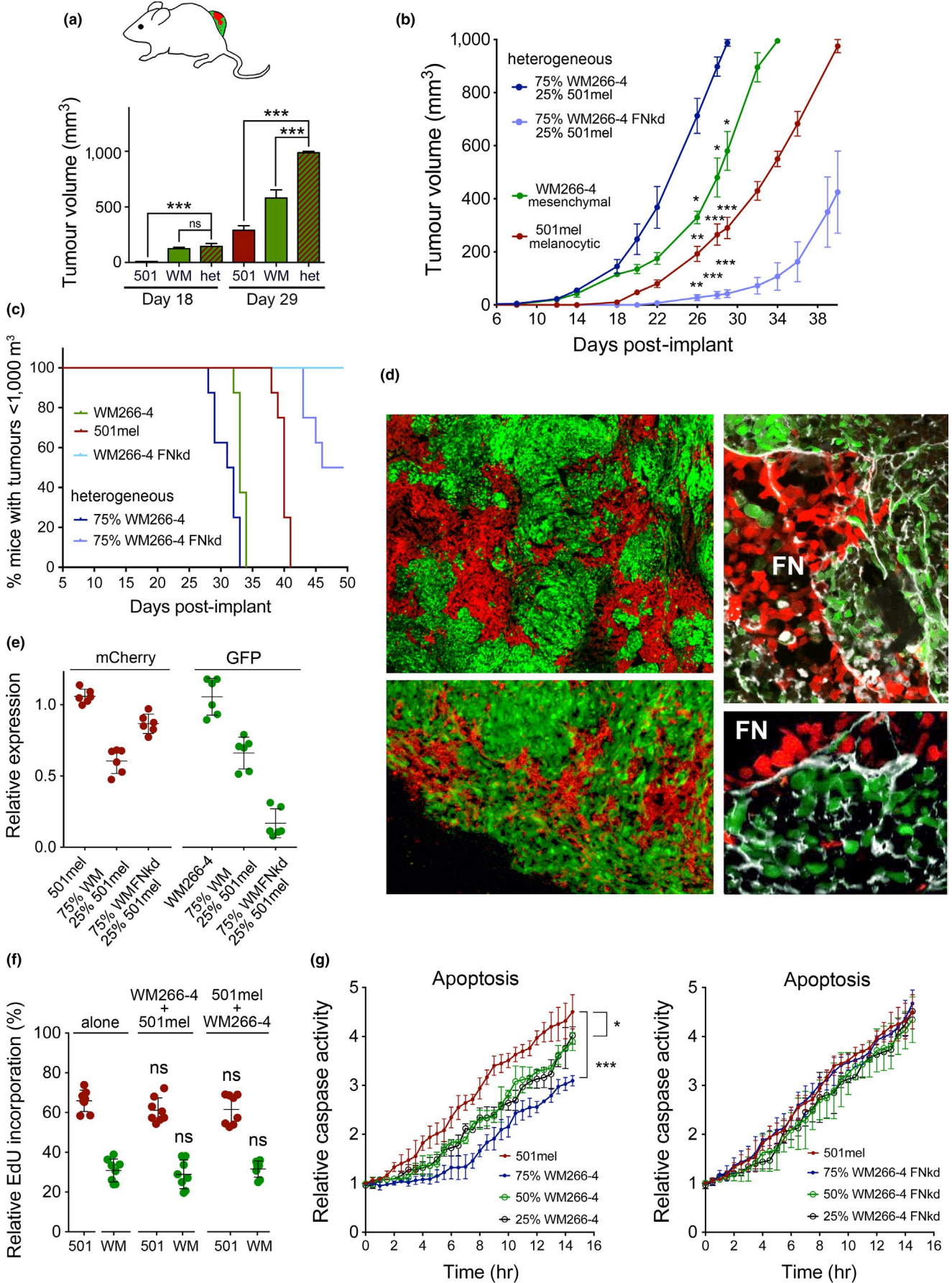
Overall, transcriptional plasticity in both phenotype subpopulations within heterogeneous tumours resulted in up-regulation of functional programmes that established tumours of greater “fitness” with enhanced growth and reduced cell death linked to increased ECM dynamics and cell adhesion. Because we have analysed a pool and not single cells, we are not able to distinguish between general transcriptional changes in all cells of one subpopulation or specific changes in just some cells. The latter however appears more likely, because close interaction between the different phenotypes does not occur throughout the whole tumour (see Figure 3d).

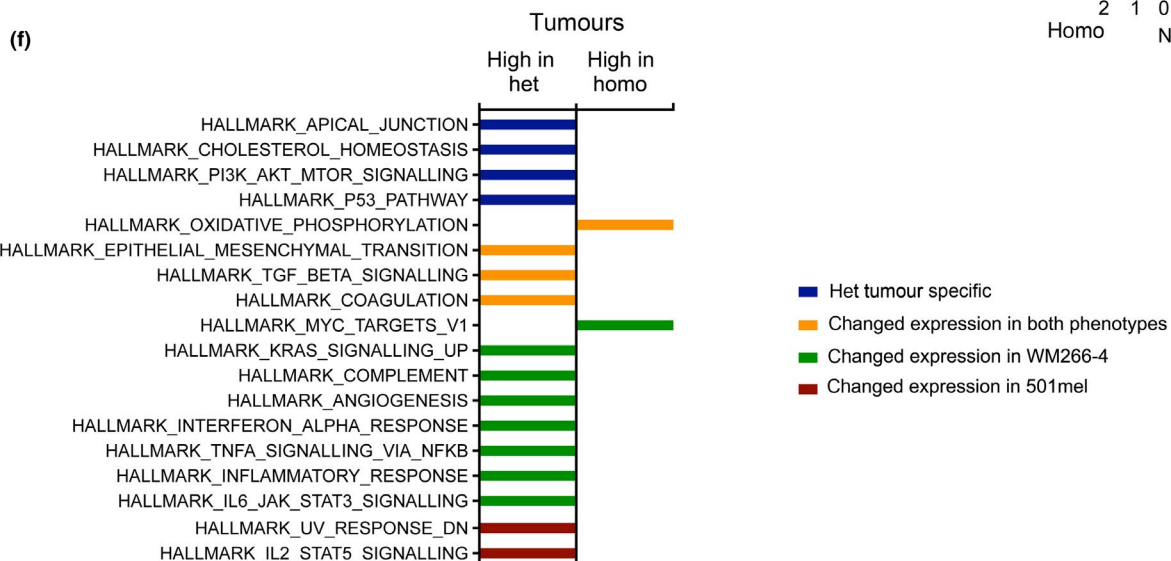
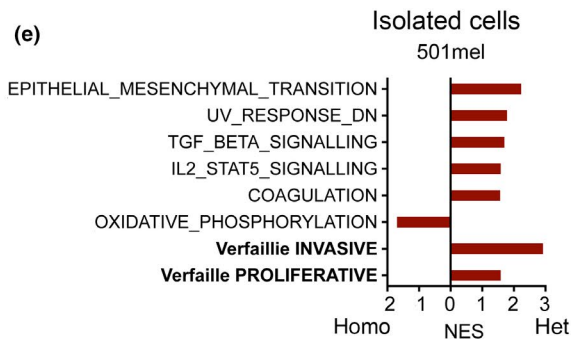
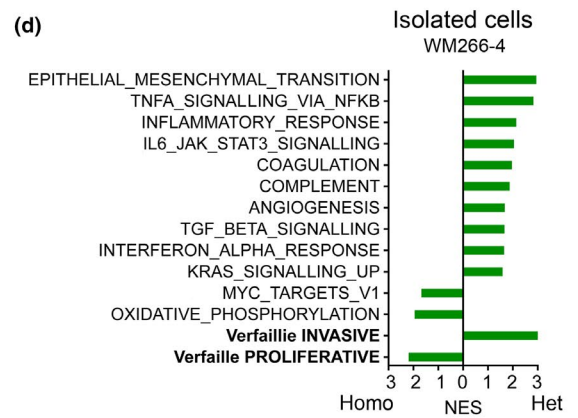
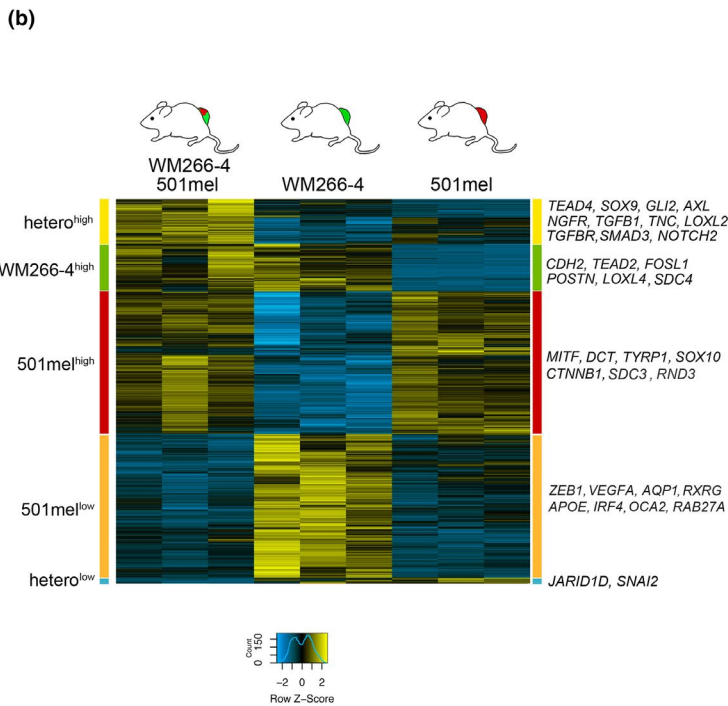
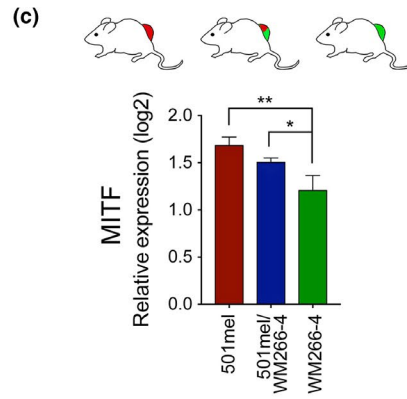
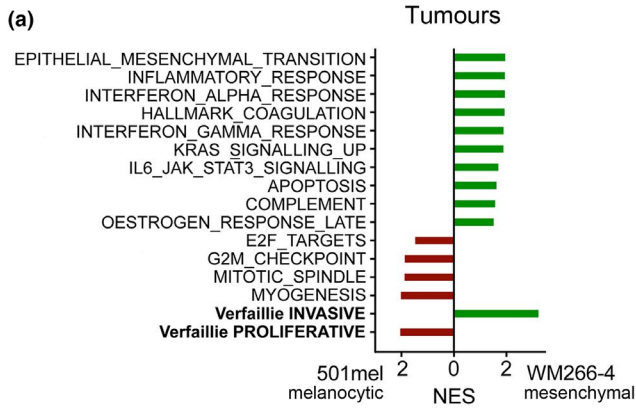
### 3.5 | Fibronectin-mediated cooperativity enhances CTC persistence

Because we found that WM266-4 cells can provide a survival advantage for 501mel cells partly linked to adhesion signalling (Figure 3g), we argued that this might also be relevant for circulating melanoma cells (CTCs). We confirmed that WM266-4 cells were more resistant to anoikis and provided a survival advantage to 501mel cells, which was partly dependent on FN1 expression (Figure 5a,b). Furthermore, 501mel cells adhered stronger to WM266-4 cells than to themselves, and this was abolished in the absence of FN1 (Figure 5c).

We next injected 501mel cells i.v. either alone or with WM266-4 cells and after 24h analysed blood for the presence of melanoma

**FIGURE 3** Cooperativity between phenotypes occurs in a FN-dependent manner. (a) Tumour volumes at days 18 and 29 in mice ( $n = 4$  mice/group) injected with 501mel-mCherry or WM266-4-GFP cells. (b) Tumour volumes over a period of 40 days in mice ( $n = 4$  mice/group) described in (a). Statistics are comparing heterogeneous 501mel-mCherry/WM266-4-GFP tumours with the indicated tumours. (c) Tumour-free survival. (d) Direct fluorescence imaging of frozen tumour sections derived from mice injected with 501mel-mCherry or WM266-4-GFP cells. Sections were stained for fibronectin expression using a pan-fibronectin antibody. (e) qRT-PCR analysis of GFP and mCherry expression in tumours from mice injected with 501mel-mCherry or WM266-4-GFP cells either alone or in combination as indicated. (f) EdU incorporation into 501mel-mCherry or WM266-4-GFP cells when either co-cultured with themselves or with each other (either 501mel or WM266-4 cells in insert). (g) Relative NucView<sup>®</sup> 488-caspase activity over time was measured in aggregated 501mel-mCherry cells in the presence of increasing amounts WM266-4-GFP or WM266-4 FN-kd-GFP cells using the Incucyte imaging system. \* $p < .05$ ; \*\*\* $p < .001$ ; \*\*\* $p < .001$



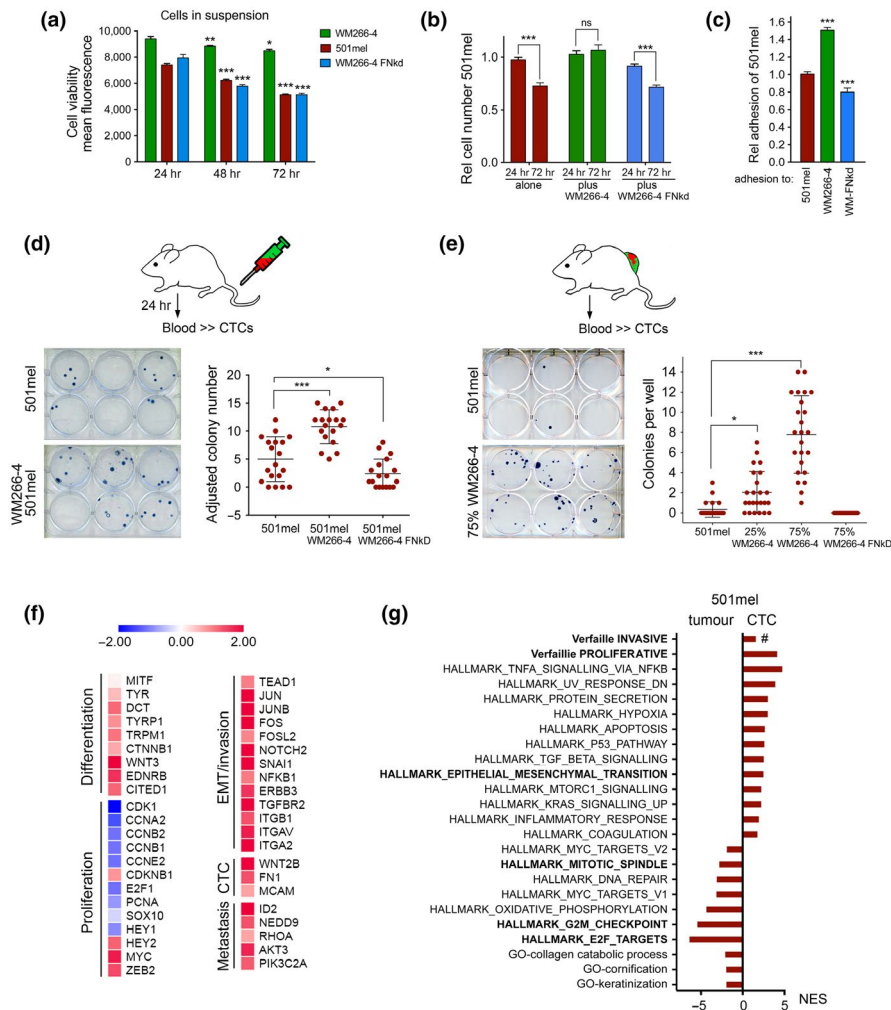


**FIGURE 4** Cooperativity in heterogeneous tumours results in “phenotype adaptation”. (a) Functional characteristics of 501mel-mCherry or WM266-4-GFP tumours revealed by GSEA using the Verfaillie “invasive” and “proliferative” signature and the MSigDB hallmark gene set collection (Liberzon et al., 2015). (b) Hierarchical clustering heatmap of 6,176 genes that are differentially expressed between 501mel-mCherry, WM266-4-GFP and heterogeneous tumours. (c) qRT-PCR analysis of MITF expression in the indicated tumours. (d) Functional characteristics of WM266-4-GFP cells sorted either from homogeneous WM266-4 tumours or from heterogeneous tumours revealed by GSEA. (e) Functional characteristics of 501mel-mCherry cells sorted either from homogeneous 501mel tumours or from heterogeneous tumours revealed by GSEA. (f) Functional characteristics of heterogeneous tumours. Unique characteristics of heterogeneous tumours are in blue. Transcriptional changes induced in both subpopulations are in orange. Hallmarks of heterogeneous tumours derived from changes in expression in WM266-4 cells (green), and 510mel cells (red) are also indicated.  $**p < .01$ ;  $***p < .001$ . For GSEA analysis: FDR < 0.05

cells by colony formation. In this experimental approach, only 501mel cells grew as colonies, as WM266-4 cells were highly inefficient to initiate a colony from a single cell (data not shown). We found that the presence of WM266-4 cells significantly increased

the number of 501mel colonies, but WM266-4 FN-kd cells were unable to do so (Figure 5d).

In tumour-bearing mice, we found a dose-dependent increase in colonies formed from circulating 501mel cells under heterogeneous



**FIGURE 5** Fibronectin-mediated cooperativity enhances CTC persistence. (a) Quantification of cell viability of 501mel-mCherry, WM266-4-GFP or WM266-4 FN-kd-GFP cells in suspension. (b) Relative cell number of 501mel-mCherry cells under anoikis conditions (plates coated with 3% agarose) either alone or co-cultured with WM266-4-GFP or WM266-4 FN-kd-GFP cells. (c) Relative adhesion of mCherry or GFP expressing 501mel to indicated cells. (d) Quantification of 501mel CTCs isolated from mice ( $n = 3$  mice/group) 24 h after IV injection with the indicated cell lines (either 100% or 50% 501mel-mCherry cells in heterogeneous injections). The number of colonies formed from mice injected with 50% cells has been adjusted to 100%. (e) Quantification of 501mel CTCs isolated from mice ( $n = 4$  mice/group). Blood was isolated from mice with 501mel-mCherry tumours at day 38, for heterogeneous tumours at day 28 and for WM266-4 FN-kd-GFP tumours at day 50. (f) Heatmap of fold induction of gene expression in CTCs compared to tumours. (g) Functional characteristics of 501mel-mCherry CTCs and 501mel-mCherry tumours revealed by GSEA using the MSigDB hallmark and Gene Ontology (GO) term gene set collection, as well as the Verfaillie proliferative and invasive signatures

conditions (Figure 5e). This could be due to the fact that in heterogeneous tumours, 501mel cells had acquired features of EMT (see Figure 4e). For tumours grown with 501mel and WM266-4 FN-kd cells, CTCs were below the detection level which might be due to a lower number of 501mel cells present in these tumours or that WM266-4 FN-kd cells had an inhibitory effect on 501mel cell dissemination.

We were intrigued to detect CTCs from homogeneous 501mel tumours, because *in vitro* 501mel cells are weakly invasive (Arozarena et al., 2011; Carreira et al., 2006). Reasons for this altered behaviour *in vivo* could be that 501mel cell invasion is supported by the host microenvironment, and indeed, we found that mouse fibronectin has the potential to enhance 501mel cell invasion *in vitro* (Figure S5). In addition, we argued that phenotype plasticity in homogenous 501mel tumours could enable 501mel cells to access the circulation. To address this, we isolated 501mel CTCs from tumour-bearing mice and performed RNA-seq. The isolated CTCs displayed up-regulation of *FN1* (and its integrin receptors), as well as *WNT2* and *MCAM* (Figure 5f), all previously implicated in CTCs (Rapanotti et al., 2017; Yu et al., 2012).

Overall, the CTCs derived from melanocytic 501mel cells displayed features of a mesenchymal phenotype in which TGF $\beta$ , TNFA/NFKB and the inflammatory response signatures were enriched (Figure 5g). Intriguingly however, enrichment of the Verfaillie “invasive” signature did not reach significance (FDR  $q = 0.055489495$ ) (Figure 5g), and 501mel CTCs remained negative for *AXL* and *WNT5A*, the most established markers of the “invasive” signature. On the other hand, down-regulation of a large group of keratins characteristic for EMT was observed, and CTCs had up-regulated an EMT signature (Figure 5g and Table S4). This suggests that melanoma cells can feature an EMT/mesenchymal phenotype without having to adopt all characteristics of the “invasive” signature. Indeed, while the expression of EMT upstream regulators like TEAD1 and AP1 factors FOS, JUNB and JUN was up-regulated in CTCs, MITF expression was unchanged (Figure 5f).

501mel CTCs also displayed down-regulation of cell cycle progression genes such as *CDK1*, *CCNA* and *CCNB*, and signatures related to E2F targets, G2M checkpoint and mitotic spindle were down-regulated (Figure 5f,g). This suggested reduced proliferative activity in 501mel CTCs, yet they showed a significant enrichment for the Verfaillie “proliferative” signature. An explanation for this could be that genes linked to melanocyte differentiation (see Figure 5f) and possibly other cell cycle-independent genes contained within the “proliferative” signature were actually up-regulated in CTCs.

### 3.6 | Phenotype cooperativity expands organotropic cues

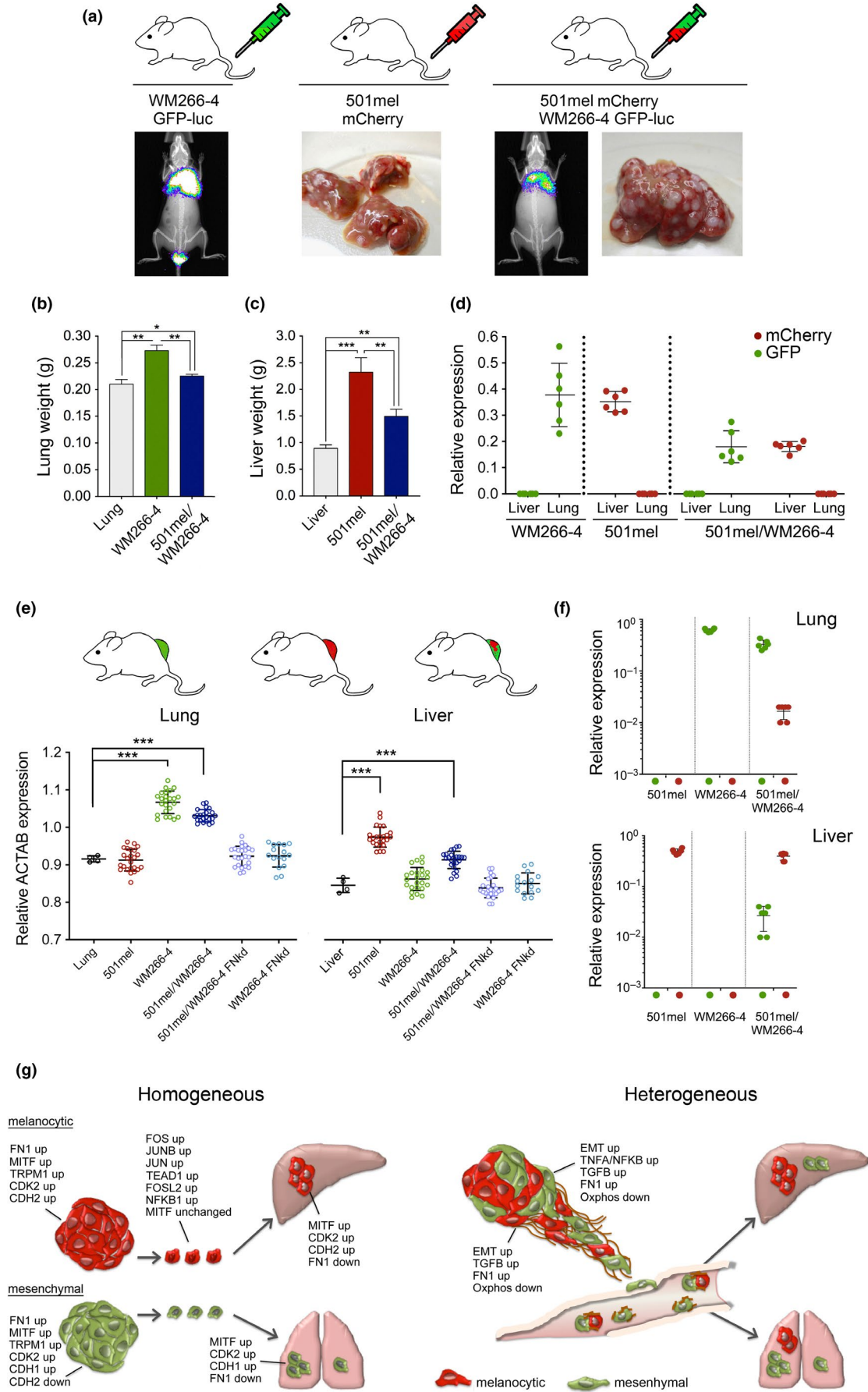
Finally, we wanted to assess whether cooperativity also occurs during the establishment and growth of metastases. For this, we injected mice with luciferase expressing WM266-4-GFP cells and luciferase-negative 501mel-mCherry cells. We could detect lung metastasis when WM266-4 cells were injected alone and co-injected with 501mel cells (Figure 6a). Likewise, we could detect liver metastases in mice injected with 501mel cells in both settings (Figure 6a). Because in the co-injection only 50% of each subpopulation was present, the luciferase signal from WM266-4 cells in the lung was significantly stronger in the homogeneous than in the heterogeneous setting, and this was also reflected in the lung weight (Figure 6a,b). Similarly, the liver weight of co-injected mice lay in between that of control and singly injected mice (Figure 6c). Analysis of lungs and livers for the presence of GFP or mCherry signals revealed that no cooperativity had occurred during the immediate steps of metastasis. Instead, the two subpopulations had followed their organotropic cues in order to seed metastasis (Figure 6d).

In the tail vein experiment, heterogeneity only occurs for a limited time after cells have been injected, but when both subpopulations reach an organ and one population encounters an environment that is inappropriate for it to seed and grow, then a selection occurs and heterogeneity is lost for the remaining time of the experiment. We therefore wondered, whether in mice that had grown heterogeneous tumours over a longer period of time cooperativity might be visible, because under these conditions, heterogeneous subpopulations of cells should be disseminated constantly throughout the experiment.

We first analysed mice that had developed homogeneous 501mel or WM266-4 tumours as well as mice with heterogeneous tumours for the presence of human ACTAB expression, and could confirm expression in livers of mice with 501mel and in lungs of mice with WM266-4 tumours (Figure 6e). In mice bearing heterogeneous tumours, we detected ACTAB signals in the lung and in the liver (Figure 6e). We then analysed these organs for the presence of GFP and mCherry expressing cells, and found GFP signals in the lungs of mice with WM266-4 as well as heterogeneous tumours, and mCherry signals in the livers of mice with 501mel or heterogeneous tumours (Figure 6f). Most strikingly though, in the mice that had developed heterogeneous tumours we could also detect signals for mCherry in the lung and GFP in the liver (Figure 6f), indicating that the constant release of heterogeneous circulating melanoma cells

**FIGURE 6** Phenotype cooperativity expands organotropic cues. (a) NSG mice (3 mice/group) were injected IV with either luciferase expressing WM266-4-GFP or 501mel-mCherry cells or a 50/50% mix. Mice were imaged for *in vivo* bioluminescence at week 5 after injection, and livers were extracted. Representative images are shown. (b) Lung, (c) liver weights from mice injected as in (a). Normal lungs and livers served as control. (d) qRT-PCR analysis of GFP and mCherry expression in lungs and livers from mice defined in (a). (e) qRT-PCR analysis for human ACTAB expression in lungs and livers from tumour-bearing mice ( $n = 3$  mice/group) induced by 501mel-mCherry or WM266-4-GFP or WM266-4 FN-Kd-GFP cells either alone or in combination. (f) qRT-PCR analysis of GFP and mCherry expression in lungs or livers from mice described in (e). (g) Model depicting transcriptional changes and cooperative effects in homogeneous melanocytic 501mel-mCherry or mesenchymal WM266-4-GFP and heterogeneous tumours during melanoma progression. \* $p < .05$ ; \*\* $p < .001$ ; \*\*\* $p < .001$





led to an expansion of organotropism and the cells could now successfully seed a previously incompatible tissue environment.

#### 4 | DISCUSSION

Increasing evidence indicates that tumours act as “communities,” whereby cooperative behaviour between individual phenotypes can contribute to tumour progression (Tabassum & Polyak, 2015). We showed previously that melanocytic MITF<sup>high</sup> and mesenchymal MITF<sup>low</sup> melanoma cells cooperate to drive invasion of melanoma in vivo (Chapman et al., 2014). For this, we chose a melanocytic MITF<sup>high</sup> cell line and a mesenchymal MITF<sup>low</sup> cell line, whereby MITF expression levels serve as classifier for these phenotypes. Comparison between these distinct cell lines is preferable to comparison of in vitro generated sub-clones from an individual cell line in which MITF expression levels have been manipulated. This is because in vitro, in the absence of signalling from the tumour microenvironment, each phenotype-specific epigenetic background is incompatible with sustained genetic manipulation of MITF expression. As such, ectopically over-expressed MITF cannot induce differentiation and proliferation in mesenchymal MITF<sup>low</sup> cells such as RPMI-7951 or WM266-4, and RNAi-mediated MITF depletion in 501mel cells result in DNA damage and induction of senescence rather than establishing a mesenchymal state (Carreira et al., 2006; Cheli, Ohanna, Ballotti, & Bertolotto, 2010; Lauss et al., 2015; Strub et al., 2011; Vachtenheim, Novotna, & Ghanem, 2001; Wellbrock & Marais, 2005).

We show here that phenotype cooperativity can lead to earlier onset and faster growth of tumours. This cooperativity was partly dependent on cell-derived FN1, which protects melanoma cells from anoikis (Boisvert-Adamo & Aplin, 2006) and appears to provide a survival advantage for melanoma cells independent of their phenotype. We found that FN1 also impacted on the persistence of CTCs and is important for survival of cells in suspension, possibly by providing a “platform” for activating adhesion signalling (Boisvert-Adamo & Aplin, 2006). Several studies have assessed the functional role of FN1 in melanoma cells in vitro and the role of niche and plasma fibronectin in the context of melanoma metastasis (von Au et al., 2013; Garmy-Susini et al., 2010; Malik et al., 2010; Pasqualini, Bourdoulous, Koivunen, Woods, & Ruoslahti, 1996), but we reveal a new role for melanoma cell-derived FN1, which due to cooperative effects accelerates the growth of heterogeneous tumours and enhances melanoma cell dissemination by acting on CTCs. In line with this, fibronectin is up-regulated in pancreatic CTCs, where it is involved in anoikis protection (Yu et al., 2012). Furthermore, similar to melanoma (Khoja et al., 2014), CTC clusters are found in breast cancer, and their existence is dependent on the presence of plakoglobin, emphasizing the relevance of cell–cell adhesions (Aceto et al., 2014).

Cooperative behaviour can induce alterations in the metastatic potential of cancer cells. For instance, non-metastatic breast cancer clones can cooperate to establish metastasis, which they are unable to do as individual clonal populations (Marusyk et al., 2014). Likewise, SCLC neuroendocrine and non-neuroendocrine phenotypes are required for metastasis (Calbo et al., 2011). In our setting, both

phenotypes were able to establish metastasis, but in a heterogeneous setting, their specific organotropic cues were expanded (Figure 6g). We do not know, whether the two phenotypes seeded individual secondary tumours or gave rise to heterogeneous metastases, but the idea of multiple distinct cell populations derived from a primary melanoma being able to act as founders of individual metastases is supported by findings from phylogenetic analyses (Sanborn et al., 2015).

The phenomenon of expanded organotropism could be due to changes in the metastatic niche and/or due to changes in the transcriptional state in heterogeneous CTCs. While we could not test the latter in heterogeneous CTC populations (the more complex sorting process resulted in poor RNA quality), we found high expression levels of SPARC, FN1 and TNC in 501mel cells from heterogeneous tumours when compared to cells from homogeneous tumours, and importantly, all three factors have been implicated in lung metastasis of melanoma (Fukunaga-Kalabis et al., 2010; Tichet et al., 2015).

Possibly negative selection due to the lung-specific immune environment contributes to the exclusion of 501mel cells. 501mel cells are widely used as the gold-standard for non-tumorigenic and non-metastatic melanoma cells (Ohanna et al., 2011; Tichet et al., 2015). Indeed, they grow very ineffectively and are non-metastatic in athymic nude mice, but we find that these properties are dramatically changed in an NSG background. Interestingly, factors secreted from senescent cells (Ohanna et al., 2011) or overexpression of SPARC (Tichet et al., 2015) enable 501mel cells to establish lung metastasis in nude mice, but whether these factors change the immune recognition of 501mel cells has not been assessed.

While there is increasing evidence for cooperativity at different stages, not much is known about the effect of phenotype communications on the dynamics of transcriptional states. We found that in heterogeneous tumours, the melanocytic and mesenchymal phenotypes adapt through phenotype plasticity with an overall trend of acquiring more mesenchymal features. In tumours, this resulted in melanocytic phenotype cells that still expressed high levels of MITF, but had up-regulated EMT and invasive signatures and corresponding transcription factors such as TEAD1 and AP1 factors (summarized in Figure 6g). Our findings agree with gene expression analyses in melanoma that revealed a gradient of phenotypes (Tirosch et al., 2016) and cell states simultaneously expressing both signatures (Ennen et al., 2017). For epithelial cancers, a recent study in transgenic mice identified subpopulations that represent individual epithelial to mesenchymal transition states, which supports the idea that EMT occurs in a gradual manner (Pastushenko et al., 2018). We recently proposed a “phenotype plasticity model” in which a differentiated melanocyte and an un-differentiated neural crest stem cell-like state are epigenetically stable extremes (Arozarena & Wellbrock, 2019). In this model, complete switching from one to the other phenotype would require considerable “activation energy” and may therefore occur with very low frequency. Our data suggest that during melanoma growth and progression, phenotype adaptation occurs, whereby crucial transcriptional regulators of one phenotype are up-regulated, while characteristics of the other phenotype are still maintained.

Understanding the dynamics and identifying drivers of the most relevant “transition” state(s) is crucial whether we want to improve our possibilities to predict tumour progression. Moreover, therapeutic intervention inevitably impacts on these dynamics and selects for certain cell states. We and others have shown that blocking drivers of relevant heterogeneous phenotypes can improve the outcome of targeted therapy in melanoma (Obenauf et al., 2015; Smith et al., 2017), and our data presented here suggest that blocking FN1-mediated interactions can interfere with melanoma at various stages of disease progression.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Andrew Hayes and the University of Manchester Genomics Technology Core Facility, Roger Meadows (Bioimaging Facility), Grace Bako and Peter Walker (Histology Facility), Mike Jackson (FACS Facility) and the University of Manchester Biomedical Services Facility (BSF). The MSCV-IRES-Luciferase-GFP retrovirus plasmid was kindly provided by Salvador Aznar Benitah (IRB, Barcelona, Spain). CW acknowledges support by Cancer Research UK (CRUK) [grant number C11591/A16416], ADS acknowledges support by the Wellcome Trust [grant number 103857/Z/14/Z], and IA is supported by a Miguel Servet contract CP15/00176 from the “Instituto de Salud Carlos III-FEDER.”

## CONFLICT OF INTEREST

All authors declare no potential conflict of interest.

## ORCID

Imanol Arozarena  <https://orcid.org/0000-0001-6349-2442>  
 Claudia Wellbrock  <https://orcid.org/0000-0002-3825-6381>

## REFERENCES

- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., ... Maheswaran, S. (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, 158(5), 1110–1122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>
- Arozarena, I., Bischof, H., Gilby, D., Belloni, B., Dummer, R., & Wellbrock, C. (2011). In melanoma, beta-catenin is a suppressor of invasion. *Oncogene*, 30(45), 4531–4543. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.162>
- Arozarena, I., & Wellbrock, C. (2019). Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nature Reviews Cancer*, 19(7), 377–391. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0154-4>
- Boisvert-Adamo, K., & Aplin, A. E. (2006). B-RAF and PI-3 kinase signaling protect melanoma cells from anoikis. *Oncogene*, 25(35), 4848–4856. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209493>
- Calbo, J., van Montfort, E., Proost, N., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Meuwissen, R., & Berns, A. (2011). A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small cell lung cancer. *Cancer Cell*, 19(2), 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.021>
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G. J., Richard, G., Wierincx, A., ... Tulchinsky, E. (2013). A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell*, 24(4), 466–480. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.018>
- Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K. S., ... Goding, C. R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes & Development*, 20(24), 3426–3439. <https://doi.org/10.1101/gad.406406>
- Chapman, A., Fernandez del Ama, L., Ferguson, J., Kamarashev, J., Wellbrock, C., & Hurlstone, A. (2014). Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion. *Cell Reports*, 8(3), 688–695. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.045>
- Cheli, Y., Guiliano, S., Botton, T., Rocchi, S., Hofman, V., Hofman, P., ... Ballotti, R. (2011). Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene*, 30(20), 2307–2318. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.598>
- Cheli, Y., Ohanna, M., Ballotti, R., & Bertolotto, C. (2010). Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 23(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00653.x>
- Eccles, S. A., Massey, A., Raynaud, F. I., Sharp, S. Y., Box, G., Valenti, M., ... Workman, P. (2008). NVP-AUY922: A novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Research*, 68(8), 2850–2860. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5256>
- Ennen, M., Keime, C., Gambi, G., Kieny, A., Coassolo, S., Thibault-Carpentier, C., ... Davidson, I. (2017). MITF-High and MITF-low cells and a novel subpopulation expressing genes of both cell states contribute to intra- and intertumoral heterogeneity of primary melanoma. *Clinical Cancer Research*, 23(22), 7097–7107. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0010>
- Fukunaga-Kalabis, M., Martinez, G., Nguyen, T. K., Kim, D., Santiago-Walker, A., Roesch, A., & Herlyn, M. (2010). Tenascin-C promotes melanoma progression by maintaining the ABCB5-positive side population. *Oncogene*, 29(46), 6115–6124. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.350>
- Garmy-Susini, B., Avraamides, C. J., Schmid, M. C., Foubert, P., Ellies, L. G., Barnes, L., ... Varner, J. A. (2010). Integrin alpha4beta1 signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cancer Research*, 70(8), 3042–3051. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3761>
- Hoek, K. S., Eichhoff, O. M., Schlegel, N. C., Dobbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., ... Dummer, R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Research*, 68(3), 650–656. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2491>
- Khoja, L., Shenjere, P., Hodgson, C., Hodgetts, J., Clack, G., Hughes, A., ... Dive, C. (2014). Prevalence and heterogeneity of circulating tumour cells in metastatic cutaneous melanoma. *Melanoma Research*, 24(1), 40–46. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000025>
- Lauss, M., Haq, R., Cirenajwis, H., Phung, B., Harbst, K., Staaf, J., ... Jönsson, G. (2015). Genome-wide DNA methylation analysis in melanoma reveals the importance of CpG methylation in MITF regulation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 135(7), 1820–1828. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.61>
- Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdottir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P., & Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Systems*, 1(6), 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>
- Malik, G., Knowles, L. M., Dhir, R., Xu, S., Yang, S., Ruoslahti, E., & Pilch, J. (2010). Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion. *Cancer Research*, 70(11), 4327–4334. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3312>
- Marusyk, A., Tabassum, D. P., Altmann, P. M., Almendro, V., Michor, F., & Polyak, K. (2014). Non-cell-autonomous driving of tumour growth supports sub-clonal heterogeneity. *Nature*, 514(7520), 54–58. <https://doi.org/10.1038/nature13556>
- Mills, L., Tellez, C., Huang, S., Baker, C., McCarty, M., Green, L., ... Bar-Eli, M. (2002). Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Research*, 62(17), 5106–5114.

- Miskolczi, Z., Smith, M. P., Rowling, E. J., Ferguson, J., Barriuso, J., & Wellbrock, C. (2018). Collagen abundance controls melanoma phenotypes through lineage-specific microenvironment sensing. *Oncogene*, 37(23), 3166–3182. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0209-0>
- Obenauf, A. C., Zou, Y., Ji, A. L., Vanharanta, S., Shu, W., Shi, H., ... Massagué, J. (2015). Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature*, 520(7547), 368–372. <https://doi.org/10.1038/nature14336>
- Ohanna, M., Giuliano, S., Bonet, C., Imbert, V., Hofman, V., Zangari, J., ... Bertolotto, C. (2011). Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- $\kappa$ B-associated secretome (PNAS). *Genes & Development*, 25(12), 1245–1261. <https://doi.org/10.1101/gad.625811>
- Pasqualini, R., Bourdoulous, S., Koivunen, E., Woods, V. L. Jr, & Ruoslahti, E. (1996). A polymeric form of fibronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types. *Nature Medicine*, 2(11), 1197–1203. <https://doi.org/10.1038/nm1196-1197>
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., ... Blanpain, C. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, 556(7702), 463–468. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0040-3>
- Rambow, F., Job, B., Petit, V., Gesbert, F., Delmas, V., Seberg, H., ... Larue, L. (2015). New functional signatures for understanding melanoma biology from tumor cell lineage-specific analysis. *Cell Reports*, 13(4), 840–853. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.037>
- Rambow, F., Rogiers, A., Marin-Bejar, O., Aibar, S., Femel, J., Dewaele, M., ... Marine, J.-C. (2018). Toward minimal residual disease-directed therapy in melanoma. *Cell*, 174(4), 843–855.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.025>
- Rapanotti, M. C., Campione, E., Spallone, G., Orlandi, A., Bernardini, S., & Bianchi, L. (2017). Minimal residual disease in melanoma: Circulating melanoma cells and predictive role of MCAM/MUC18/MelCAM/CD146. *Cell Death Discovery*, 3, 17005. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.5>
- Sanborn, J. Z., Chung, J., Purdom, E., Wang, N. J., Kakavand, H., Wilmott, J. S., ... Cho, R. J. (2015). Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(35), 10995–11000. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508074112>
- Simmons, J. L., Pierce, C. J., Al-Ejeh, F., & Boyle, G. M. (2017). MITF and BRN2 contribute to metastatic growth after dissemination of melanoma. *Scientific Reports*, 7(1), 10909. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11366-y>
- Smith, M. P., Rowling, E. J., Miskolczi, Z., Ferguson, J., Spoerri, L., Haass, N. K., ... Wellbrock, C. (2017). Targeting endothelin receptor signalling overcomes heterogeneity driven therapy failure. *EMBO Molecular Medicine*, 9(8), 1011–1029. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607156>
- Strub, T., Giuliano, S., Ye, T., Bonet, C., Keime, C., Kobi, D., ... Davidson, I. (2011). Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene*, 30(20), 2319–2332. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.612>
- Tabassum, D. P., & Polyak, K. (2015). Tumorigenesis: It takes a village. *Nature Reviews Cancer*, 15(8), 473–483. <https://doi.org/10.1038/nrc3971>
- Tichet, M., Prod'Homme, V., Fenouille, N., Ambrosetti, D., Mallavialle, A., Cerezo, M., ... Tartare-Deckert, S. (2015). Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nature Communications*, 6, 6993. <https://doi.org/10.1038/ncomms7993>
- Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S. M., Wadsworth, M. H., Treacy, D., Trombetta, J. J., ... Garraway, L. A. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*, 352(6282), 189–196. <https://doi.org/10.1126/science.aad0501>
- Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K. M., Lay, J., ... Graeber, T. G. (2018). Multi-stage differentiation defines melanoma subtypes with differential vulnerability to drug-induced iron-dependent oxidative stress. *Cancer Cell*, 33(5), 890–904 e895. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.017>
- Vachtenheim, J., Novotna, H., & Ghanem, G. (2001). Transcriptional repression of the microphthalmia gene in melanoma cells correlates with the unresponsiveness of target genes to ectopic microphthalmia-associated transcription factor. *The Journal of Investigative Dermatology*, 117(6), 1505–1511. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01563.x>
- Verfaillie, A., Imrichova, H., Atak, Z. K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., ... Aerts, S. (2015). Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nature Communications*, 6, 6683. <https://doi.org/10.1038/ncomms7683>
- von Au, A., Vasel, M., Kraft, S., Sens, C., Hackl, N., Marx, A., ... Nakchbandi, I. A. (2013). Circulating fibronectin controls tumor growth. *Neoplasia*, 15(8), 925–938. <https://doi.org/10.1593/neo.13762>
- Wardwell-Ozgo, J., Dogruluk, T., Gifford, A., Zhang, Y., Heffernan, T. P., van Doorn, R., ... Scott, K. L. (2014). HOXA1 drives melanoma tumor growth and metastasis and elicits an invasion gene expression signature that prognosticates clinical outcome. *Oncogene*, 33(8), 1017–1026. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.30>
- Wellbrock, C., & Arozarena, I. (2015). Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 28(4), 390–406. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12370>
- Wellbrock, C., & Marais, R. (2005). Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *Journal of Cell Biology*, 170(5), 703–708.
- Wellbrock, C., & Scharlt, M. (2000). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a complex of p59fyn and the receptor tyrosine kinase Xmrk is involved in malignant transformation of pigment cells. *European Journal of Biochemistry*, 267(12), 3513–3522.
- Widmer, D. S., Cheng, P. F., Eichhoff, O. M., Belloni, B. C., Zipser, M. C., Schlegel, N. C., ... Hoek, K. S. (2012). Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 25(3), 343–353. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2012.00986.x>
- Workman, P., Aboagye, E. O., Balkwill, F., Balmain, A., Bruder, G., Chaplin, D. J., ... Eccles, S. A. (2010). Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer*, 102(11), 1555–1577. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605642>
- Yu, M., Ting, D. T., Stott, S. L., Wittner, B. S., Oszolak, F., Paul, S., ... Haber, D. A. (2012). RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis. *Nature*, 487(7408), 510–513. <https://doi.org/10.1038/nature11217>






## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Rowling EJ, Miskolczi Z, Nagaraju R, et al. Cooperative behaviour and phenotype plasticity evolve during melanoma progression. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2020;00:1–14. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12873>

## Article

# Identification of a Dexamethasone Mediated Radioprotection Mechanism Reveals New Therapeutic Vulnerabilities in Glioblastoma

Paula Aldaz <sup>1,2</sup>, Jaione Auzmendi-Iriarte <sup>3</sup>, Maika Durántez <sup>1,2</sup>, Irene Lasheras-Otero <sup>1,2</sup>, Estefania Carrasco-Garcia <sup>3,4</sup>, M. Victoria Zelaya <sup>2,5</sup>, Laura Bragado <sup>2,6</sup>, Ana Olías-Arjona <sup>1,2</sup>, Larraitz Egaña <sup>3,7</sup>, Nicolás Samprón <sup>3,7</sup>, Idoia Morilla <sup>1,2,8</sup>, Marta Redondo-Muñoz <sup>1,2</sup>, Mikel Rico <sup>2,9</sup> , Massimo Squatrito <sup>10</sup>, Marta Maria-Alonso <sup>2,11,12</sup> , Joaquín Fernández-Irigoyen <sup>2,13,14</sup>, Enrique Santamaria <sup>2,13,14</sup> , Iñaki M. Larráyoiz <sup>15</sup>, Claudia Wellbrock <sup>1,2</sup> , Ander Matheu <sup>3,4,16</sup> and Imanol Arozarena <sup>1,2,\*</sup> 



**Citation:** Aldaz, P.; Auzmendi-Iriarte, J.; Durántez, M.; Lasheras-Otero, I.; Carrasco-Garcia, E.; Zelaya, M.V.; Bragado, L.; Olías-Arjona, A.; Egaña, L.; Samprón, N.; et al. Identification of a Dexamethasone Mediated Radioprotection Mechanism Reveals New Therapeutic Vulnerabilities in Glioblastoma. *Cancers* **2021**, *13*, 361. <https://doi.org/10.3390/cancers13020361>

Academic Editor: Donat Kögel  
Received: 9 November 2020  
Accepted: 14 January 2021  
Published: 19 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Cancer Signalling Unit, Navarrabiomed, Complejo Hospitalario de Navarra (CHN), Universidad Pública de Navarra (UPNA), 31008 Pamplona, Spain; paula.aldaz.donamaria@navarra.es (P.A.); maidurdel@gmail.com (M.D.); irene.lasheras.otero@navarra.es (I.L.-O.); ana.olias.arjona@navarra.es (A.O.-A.); idoia.morilla.ruiz@navarra.es (I.M.); marta.redondo.munoz@navarra.es (M.R.-M.); claudiawellbrock97@gmail.com (C.W.)
- <sup>2</sup> Health Research Institute of Navarre (IdiSNA), 31008 Pamplona, Spain; mv.zelaya.huerta@navarra.es (M.V.Z.); laura.bragado.alvarez@navarra.es (L.B.); mikel.rico.oses@navarra.es (M.R.); mmalonso@unav.es (M.M.-A.); joaquin.fernandez.irigoyen@navarra.es (J.F.-I.); enrique.santamaria.martinez@navarra.es (E.S.)
- <sup>3</sup> Cellular Oncology Group, Biodonostia Health Research Institute, 20014 San Sebastian, Spain; Jaione.auzmendi@biodonostia.org (J.A.-I.); estefania.carrasco@biodonostia.org (E.C.-G.); larraitz.eganaotano@osakidetza.eus (L.E.); nicolas.sampron@me.com (N.S.); ander.matheu@biodonostia.org (A.M.)
- <sup>4</sup> CIBER de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERfes), 28029 Madrid, Spain
- <sup>5</sup> Pathological Anatomy Department, CHN, IdiSNA, 31008 Pamplona, Spain
- <sup>6</sup> Department of Radiophysics and Radiological Protection, CHN, 31008 Pamplona, Spain
- <sup>7</sup> Biodonostia University Hospital, 20014 San Sebastian, Spain
- <sup>8</sup> Department of Oncology, CHN, IdiSNA, 31008 Pamplona, Spain
- <sup>9</sup> Radiotherapy Oncology Department, CHN, 31008 Pamplona, Spain
- <sup>10</sup> Seve-Ballesteros Foundation Brain Tumor Group, Cancer Cell Biology Program, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), 28029 Madrid, Spain; msquatrito@cnio.es
- <sup>11</sup> Program in Solid Tumours and Biomarkers, Foundation for Applied Medical Research, 31008 Pamplona, Spain
- <sup>12</sup> Department of Pediatrics, University Hospital of Navarre, 31008 Pamplona, Spain
- <sup>13</sup> Clinical Neuroproteomics Unit, Navarrabiomed, CHN, UPNA, IdiSNA, 31008 Pamplona, Spain
- <sup>14</sup> Proteored-ISCIH, Proteomics Platform, Navarrabiomed, CHN, UPNA, IdiSNA, 31008 Pamplona, Spain
- <sup>15</sup> Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Neurodegeneration Area, Biomarkers and Molecular Signaling Group, 26006 Logroño, Spain; ilarrayoz@riojasalud.es
- <sup>16</sup> IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48013 Bilbao, Spain
- \* Correspondence: iarozarm@navarra.es

**Simple Summary:** The standard of care for patients with newly diagnosed glioblastoma (GBM) comprises surgery followed by radio- and chemotherapy. In addition, dexamethasone is used to manage the development of inflammation within the brain in general, and particularly during treatment. The effects of dexamethasone on patient survival however remain controversial because several clinical studies suggest that dexamethasone could potentially restrict effective radiotherapy. With the idea to improve GBM therapy, we set out to identify small molecule inhibitors that could improve the killing of GBM cells when applied together with radiotherapy. We have identified a novel dexamethasone-induced mechanism that can directly protect GBM cells from radiotherapy and thus may contribute to the adverse effects observed in the clinic. Strikingly, this mechanism also sensitises GBM cells to tyrosine kinase inhibitors, thus encouraging the revision of the use of these inhibitors for the treatment of GBM, potentially in an adjuvant setting.

**Abstract:** (1) Background: Despite the indisputable effectiveness of dexamethasone (DEXA) to reduce inflammation in glioblastoma (GBM) patients, its influence on tumour progression and radiotherapy

response remains controversial. (2) Methods: We analysed patient data and used expression and cell biological analyses to assess effects of DEXA on GBM cells. We tested the efficacy of tyrosine kinase inhibitors in vitro and in vivo. (3) Results: We confirm in our patient cohort that administration of DEXA correlates with worse overall survival and shorter time to relapse. In GBM cells and glioma stem-like cells (GSCs) DEXA down-regulates genes controlling G2/M and mitotic-spindle checkpoints, and it enables cells to override the spindle assembly checkpoint (SAC). Concurrently, DEXA up-regulates Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) signalling, which stimulates expression of anti-apoptotic regulators BCL2L1 and MCL1, required for survival during extended mitosis. Importantly, the protective potential of DEXA is dependent on intact tyrosine kinase signalling and ponatinib, sunitinib and dasatinib, all effectively overcome the radio-protective and pro-proliferative activity of DEXA. Moreover, we discovered that DEXA-induced signalling creates a therapeutic vulnerability for sunitinib in GSCs and GBM cells in vitro and in vivo. (4) Conclusions: Our results reveal a novel DEXA-induced mechanism in GBM cells and provide a rationale for revisiting the use of tyrosine kinase inhibitors for the treatment of GBM.

**Keywords:** glioblastoma; dexamethasone; PDGFR; mitosis checkpoint; sunitinib

## 1. Introduction

Glioblastoma (GBM) remains among the cancers with poorest prognosis with a median overall survival of only 15 months after diagnosis [1]. Recent efforts to understand the genetics of GBM have improved our knowledge of the molecular events leading to gliomagenesis and mutations; amplifications or deletions of genes such as *IDH1*, *NF1*, *PTEN*, *P53*, *RB1*, *PDGFRA* or *EGFR* have been identified [2,3]. Genome-wide analyses of large patient cohorts have revealed clinically relevant GBM subtypes such as classical, proneural or mesenchymal, which correlate with particular tumour microenvironments and have prognostic implications [3–5].

Radiotherapy is the standard of care for GBM after surgical resection, but the vast majority of patients relapse due to intrinsic or acquired resistance. Acquired resistance to radiotherapy is thought to rely on the deregulation of DNA repair mechanisms, cell cycle progression and survival pathways in GBM cells, but also on signals from the stroma, including a hypoxic extracellular environment [6]. In addition, sub-populations of undifferentiated glioblastoma stem-like cells (GSCs) that show increased resistance to radiotherapy are thought to cause tumour relapse [6].

Almost all patients with brain tumours receive corticosteroids at some point in the course of their disease [7]. Corticosteroids help control increased intra-cranial pressure based on peritumoral vasogenic edema, which contributes significantly to morbidity and occurs in >60% of GBM patients; the incidence of edema is further increased by brain surgery, radiotherapy and adjuvant chemotherapy [7]. The gluco-corticoid dexamethasone (DEXA) is the most commonly used corticosteroid for Central Nervous System-affected cancer patients with edema-associated neurological manifestations, and over 70% of patients receive DEXA while undergoing multimodal radio/chemotherapy [7]. DEXA targets macrophages and lymphocytes thus blocking the production of pro-inflammatory cytokines, modulating innate and adaptive immunity and reducing inflammation. However, several clinical studies suggest that DEXA could potentially restrict effective radio- as well as chemotherapy as they have made the observation that low steroid use during radio/chemotherapy correlated with better survival [8–13]. While clinicians consider acting on these challenges, there are currently no real alternatives for the management of intracranial hypertension or brain edema in GBM patients.

Despite improvements being made with standard of care therapies, the prognosis of patients with GBM remains poor. Molecular targeting important players in GBM could be an alternative to tackle this disease, and receptor tyrosine kinases (RTKs) such as EGFR and Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha (PDGFRA) have been considered as targets

in trials using small molecule inhibitors, because apart from harbouring mutations, the corresponding genes are frequently amplified [2,3]. Support for the relevance of these RTKs for GBM comes from mice genetically engineered to experience deregulated PDGFR or EGFR signalling in an adequate genetic background, as this promotes gliomagenesis [14–16].

Despite these encouraging clinical and pre-clinical data, so far there is no breakthrough coming from RTK targeting trials, probably because, apart from restrictions for some inhibitors to crossing the blood-brain-barrier, there have been limitations through small sample size as well as great heterogeneity in disease and prior therapy.

With the idea to improve GBM therapy, we set out to identify small molecule inhibitors that could improve the killing of GBM cells when applied concomitant to radiotherapy with the possibility that they can also function as single agent in post-radiation maintenance. We discovered that DEXA could directly act as radio-protective factor by up-regulating a PDGFR signalling cascade in GBM cells. Importantly, this DEXA induced signalling-switch produces a general vulnerability not only in GBM cells but also in GSCs towards Food and Drug Administration (FDA)-approved tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as sunitinib.

## 2. Results

### 2.1. Dexamethasone Protects from Radiotherapy and Reduces Survival in GBM Patients

To identify mechanisms of radio-protection in GBM we analysed the effect of FDA-approved drugs on the survival of T98G cells after a single high dose of radiation (Figure 1A). Intriguingly, this identified 13 members of the family of glucocorticoids (Figure 1B). Amongst the identified glucocorticoids was dexamethasone (DEXA), which is of major clinical relevance for GBM patients [7]. We therefore assessed the effect of DEXA on our patient cohort of 285 stage IV glioma patients registered at the Donostia University Hospital in San Sebastian, Spain (for details see Figure S1). DEXA administration correlated with significantly shorter overall survival after surgery, and this effect was also seen in the cohort of patients who had received radiotherapy after surgery (Figure 1C,D). Moreover, the time to relapse after radiotherapy was significantly shorter in DEXA-treated patients (Figure 1E). Our findings are supported by previous observations [10,12,17,18] and highlight the relevance of the controversial role of DEXA, but importantly the mechanism by which DEXA can induce radio-protection of GBM is unclear.

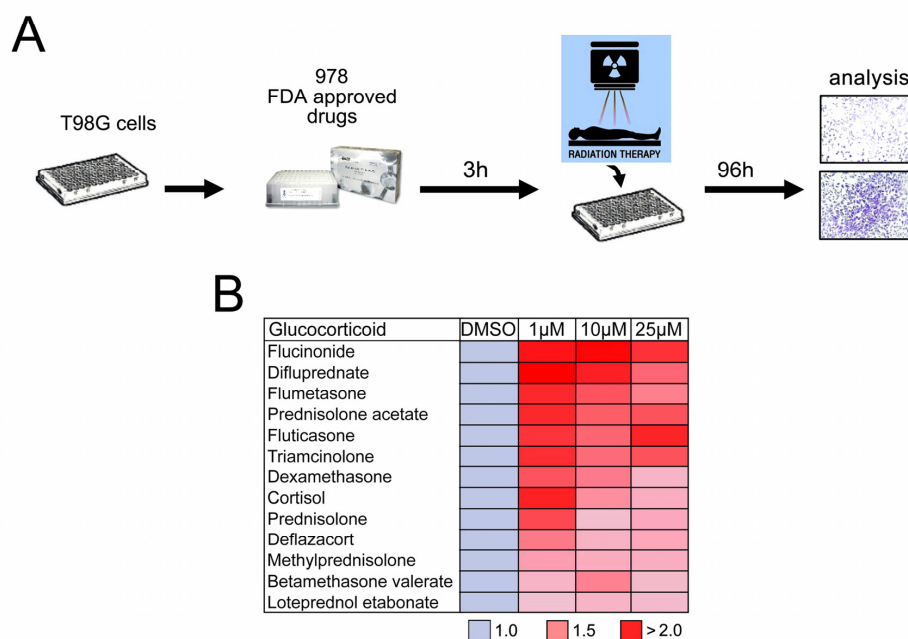
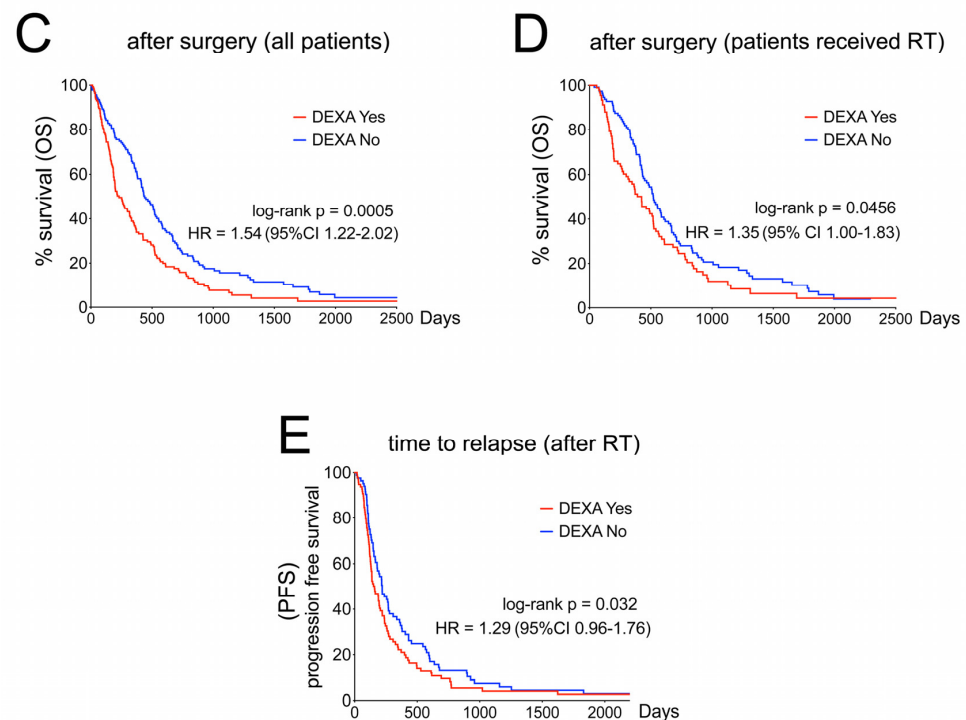


Figure 1. Cont.

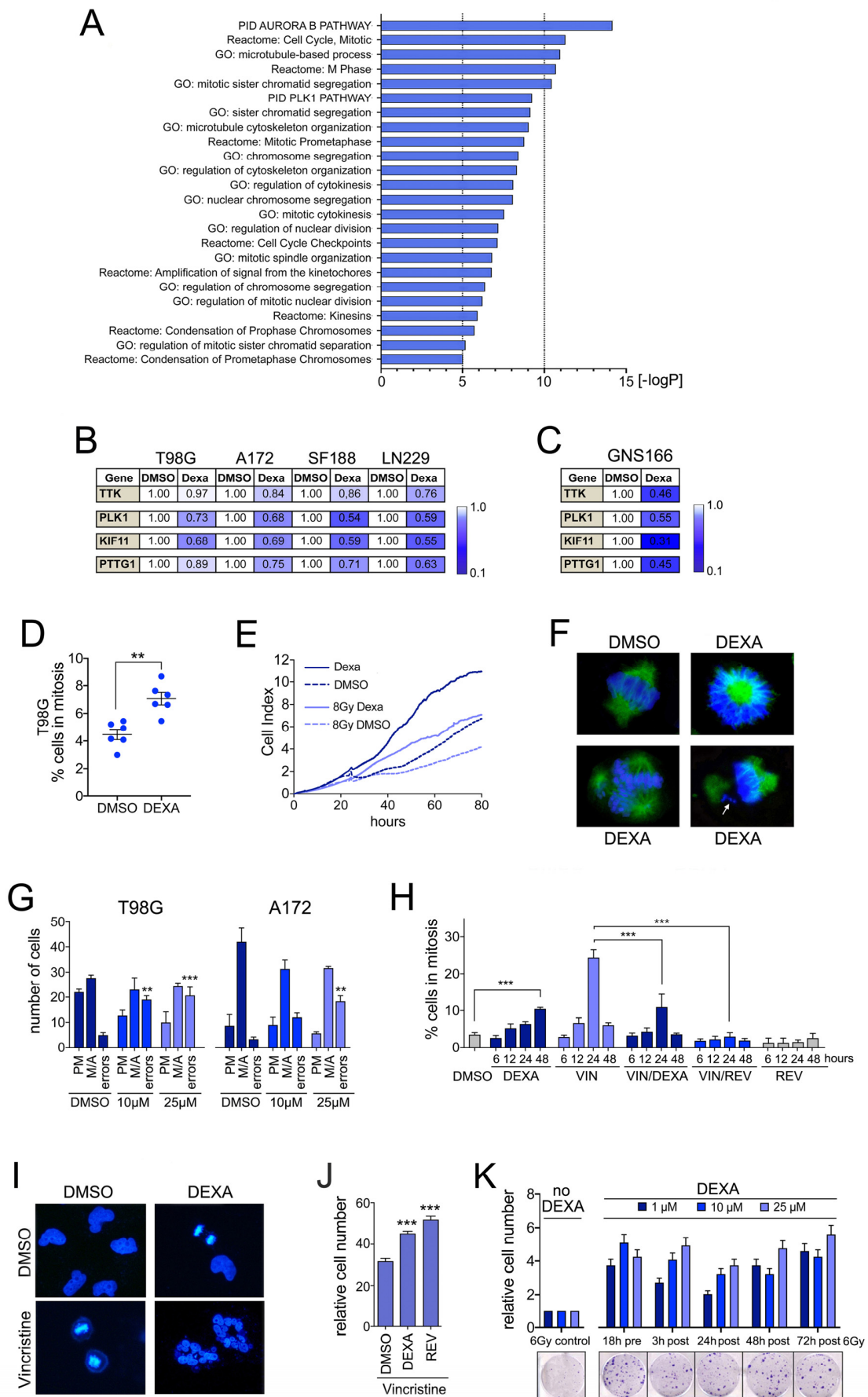


**Figure 1.** Dexamethasone protects from radiotherapy and reduces survival in glioblastoma (GBM) patients. **(A)** Schematic showing workflow of the FDA approved drug screen. T98G cells were treated with a library of 978 FDA approved drugs at 10  $\mu$ M, exposed to a single dose of 12 Gy and 96 h later analysed for survival using crystal violet staining. **(B)** 26 drugs selected in the first screen were re-screened at concentrations of 1, 10 and 25  $\mu$ M using 6 Gy. Thirteen glucocorticoids identified in this second screen are shown. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was set = 1. **(C)** Kaplan-Meier analysis of the Biodonostia patient cohort. Differences in overall survival for patients receiving no corticosteroids ( $n = 141$ ) or dexamethasone ( $n = 144$ ) are shown. Hazard ratio and p (log-rank) are indicated. **(D)** Kaplan-Meier analysis of the Biodonostia cohort of patients who underwent radiotherapy ( $n = 207$ ). Differences in overall survival for patients receiving basal ( $n = 93$ ) or no ( $n = 114$ ) dexamethasone are shown. Hazard ratio and p (log-rank) are indicated. **(E)** Kaplan-Meier analysis for progression free survival after radiotherapy for patients receiving no ( $n = 114$ ) or basal dexamethasone ( $n = 93$ ). Hazard ratio and p (log-rank) are indicated.

## 2.2. Dexamethasone Suppresses Genes Required for Accurate Mitosis Control

To reveal the effects of DEXA on GBM cell function, we performed RNAseq on T98G cells (Table S1). Pathway analysis of significantly down-regulated transcripts revealed a profound effect of DEXA on genes controlling G2/M transition, mitosis and cytokinesis (Figure 2A). Analysis of essential regulators of the G2/M and spindle assembly checkpoints (PLK1, TTK/MPS1), mitotic spindle dynamics (KIF11) and sister chromatid separation (PTTG1/securin) confirmed their down-regulation in a panel of glioblastoma cell lines (Figure 2B). Reduced expression of these genes was independent of DEXA concentrations or treatment times (not shown) and was also observed in the human glioma stem-cell line GNS166 (Figure 2C). Thus, the down-regulation of mitosis-control genes appears to be a universal response of GBM cells to DEXA.





**Figure 2.** Dexamethasone (DEXA) suppresses mitosis control genes and overrides the spindle assembly checkpoint (SAC).

(A) Functional characteristics of T98G cells treated with 25  $\mu\text{M}$  DEXA for 18 h revealed by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using Gene Ontology (GO) term, Reactome and Pathway Interaction Dataset (PID) gene set collections. (B) qRT-PCR analysis for TKK, PLK1, KIF11 and PTTG1 in the indicated cell lines represented as mean fold change of triplicates treated with DEXA for 18 h relative to DMSO. (C) qRT-PCR analysis for the indicated genes in GNS166 cells as in (B). (D) % T98G cells in mitosis, quantified ( $n = 3$  experiments) 48 h after addition of 25  $\mu\text{M}$  DEXA. (E) iCELLigence™ proliferation analysis of T98G cells either non-radiated or radiated with 8Gy in the absence or presence of 10  $\mu\text{M}$  DEXA. (F) T98G cells either untreated (DMSO) or treated with 25  $\mu\text{M}$  DEXA for 48 h were analysed with anti- $\alpha$ -tubulin and stained with Hoechst 33258 and imaged. (G) Mitotic errors (monopolar or tripolar spindle, lagging chromosomes, chromosome bridges) per 50 mitotic cells were quantified. Data represent the mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ). (H) T98G cells treated with 5 nM vincristine with or without 25  $\mu\text{M}$  DEXA were stained for phospho-H3 and quantified at the indicated times. Treatment with 1  $\mu\text{M}$  reversine (REV) served as control. (I) T98G cells treated with 5 nM vincristine with or without 25  $\mu\text{M}$  DEXA for 48 h were stained with Hoechst 33258 and imaged. (J) T98G cells were treated as in (H) and analysed for colony formation (mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ); DMSO treated cells were set 100% and 1  $\mu\text{M}$  reversine (REV) served as positive control. (K) Cell number quantification of T98G cells radiated with 6 Gy either in the absence (control) or in the presence of DEXA. Thus, 10  $\mu\text{M}$  DEXA was added to the cells either prior (pre) or after (post) radiation as indicated. Control cells were set 1,  $n = 3$ . Images represent examples. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

In the The Cancer Genome Atlas (TCGA) GBM patient cohort [4] mitosis-control genes are highly expressed in ~20% of tumours, where they display striking co-expression (Figure S2A). However, the majority of tumours exhibit low expression of the respective genes (Figure S2A). Pitter and co-workers, who had made similar observations [18], proposed that with most patients receiving DEXA, low expression of cell cycle-regulator genes might reflect a tumour response to the corticoid. Supporting this notion, tumours from lower grade glioma patients [19], who also frequently receive DEXA besides radiotherapy, display a similar expression pattern for the respective mitosis-control genes (Figure S2B).

It was also suggested that the down-regulation of cell cycle-regulator genes explains DEXA's negative effect on patient survival, because it would result in reduced proliferation thus allowing glioma cells to escape radiotherapy-induced toxicity [18]. Indeed, low expression of a "DEXA mitosis down" signature is significantly linked to poor overall survival and faster relapse (Figure S2C–F). Intriguingly however, exactly the opposite is observed in lower grade gliomas (Figure S2G). Notably, these survival data are independent of the mutation status of *IDH1*, which is mutated in 78% of patients in the lower grade glioma cohort and 6% of the GBM cohort [4,19]. Overall, this suggests that the situation is more complex and that the outcome of reduced mitosis-control gene expression is distinct in GBM cells, where this appears to support GBM progression.

### 2.3. Dexamethasone Drives Proliferation by Overriding Cell Cycle Checkpoints

Concomitant with the reduced expression of G2/M checkpoint genes, DEXA significantly increased the mitotic index in a panel of GBM cell lines (Figure 2D and Figure S3A). This was however not linked to a mitotic arrest because DEXA treated GBM cells continued dividing (Figure 2E and Figure S3B). Nevertheless, we found that cells driven into mitosis by DEXA displayed an increased amount of mitotic errors ranging from mono- or tripolar spindles, to unaligned or lagging chromosomes and chromosome bridges (Figure 2F,G, Figure S3C).

Under controlled conditions such mitotic errors will activate the spindle assembly checkpoint (SAC) resulting in an extended mitotic arrest, and if the error cannot be resolved, the default response is death in mitosis [20]. This might occur in non-transformed MCF-10A cells, where DEXA, despite increasing the mitotic index, severely reduces the number of dividing cells (Figure S3A,B). However, cancer cells frequently override the SAC, allowing them to divide with aneuploidy or return to interphase without completing cell division, thus leading to polyploidy [21,22]. The fact that DEXA-treated GBM cells continued to

divide despite an increase in mitotic errors suggested that the SAC was compromised, and that DEXA may have the potential to override the SAC.

To test this idea, we treated cells with low concentrations of the microtubule-destabilising agent vincristine, which led to a profound increase in cells in mitosis within 24 h and a reduction in viable cells (Figure 2H,I, Figure S3D,E). As positive control we used reversine, an MPS1 (TTK) inhibitor [23] that induces SAC override and polyploidy [24]. Reversine alone severely suppressed the number of cells in mitosis (Figure 2H), caused the formation of multi-nucleated cells (Figure S3D) and reduced the number of viable cells (Figure S3E), the latter suggesting that post mitotic apoptosis was triggered. Reversine was able to override the vincristine induced mitotic arrest, and this was accompanied by the appearance of multinucleated cells (Figure 2H and Figure S3D). Most importantly, DEXA also reduced the number of cells in vincristine-induced mitotic arrest; it induced the formation of multinucleated cells and increased the number of cells that survived vincristine treatment (Figure 2H–J). At the molecular level we found that the localisation of BUB1 and CENPF at kinetochores was reduced in the presence of DEXA (Figure S3F) further corroborating that DEXA compromises the SAC.

The ability of DEXA to override the SAC would suggest that it is able to support the continued division of cells, even if they have encountered radiation-induced DNA damage. Indeed, confirming our observations made in the screen with T98G cells (Figure 1), DEXA was stimulating cell division in several GBM cell lines even when they had been radiated (Figure 2E and Figure S3B). Most importantly however and in line with the ability of DEXA to override the checkpoint that produces a mitotic arrest, its positive effect on the propagation of radiated cells also occurred when administered sometime after cells had been irradiated (Figure 2K).

#### 2.4. Dexamethasone Up-Regulates PDGFR Mediated Survival Signalling

Overriding the SAC allows DNA damage to be translated into chromosome abnormalities, but for continued proliferation with chromosome abnormalities appropriate survival signalling is required [20,22].

To identify what enables GBM cells to continue to proliferate in the presence of DEXA, we analysed our T98G RNAseq-data. This revealed significant enrichment of receptor tyrosine kinase (RTK) and particularly PDGFR signalling in DEXA treated cells (Figure 3A). Indeed, we observed a modest up-regulation of components of the PDGFR signalling module, including the ligand PDGFB in response to DEXA, although this varied amongst different GBM cell lines (Figure 3B,C). Moreover, treatment with DEXA led to an increase in the auto-phosphorylation of PDGFRA and PDGFRB (Figure 3D), which can occur in homo- and heterodimers [25]. Phosphorylation of Y572 in PDGFRA and/or Y579 in PDGFRB creates binding sites for SRC family kinases (SFKs) including SRC, FYN and YES as well as STAT5 [25] and we found phosphorylation (i.e. activation) of both after 18 h of DEXA treatment in T98G and A172 cells (Figure 3E).

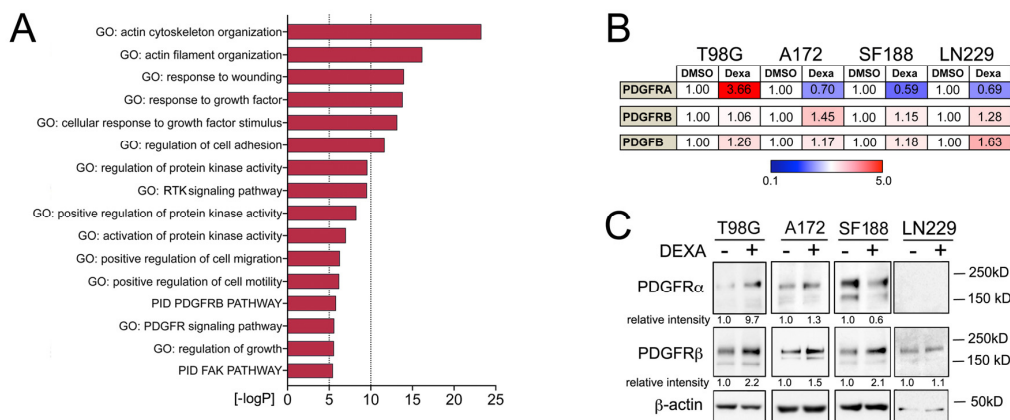
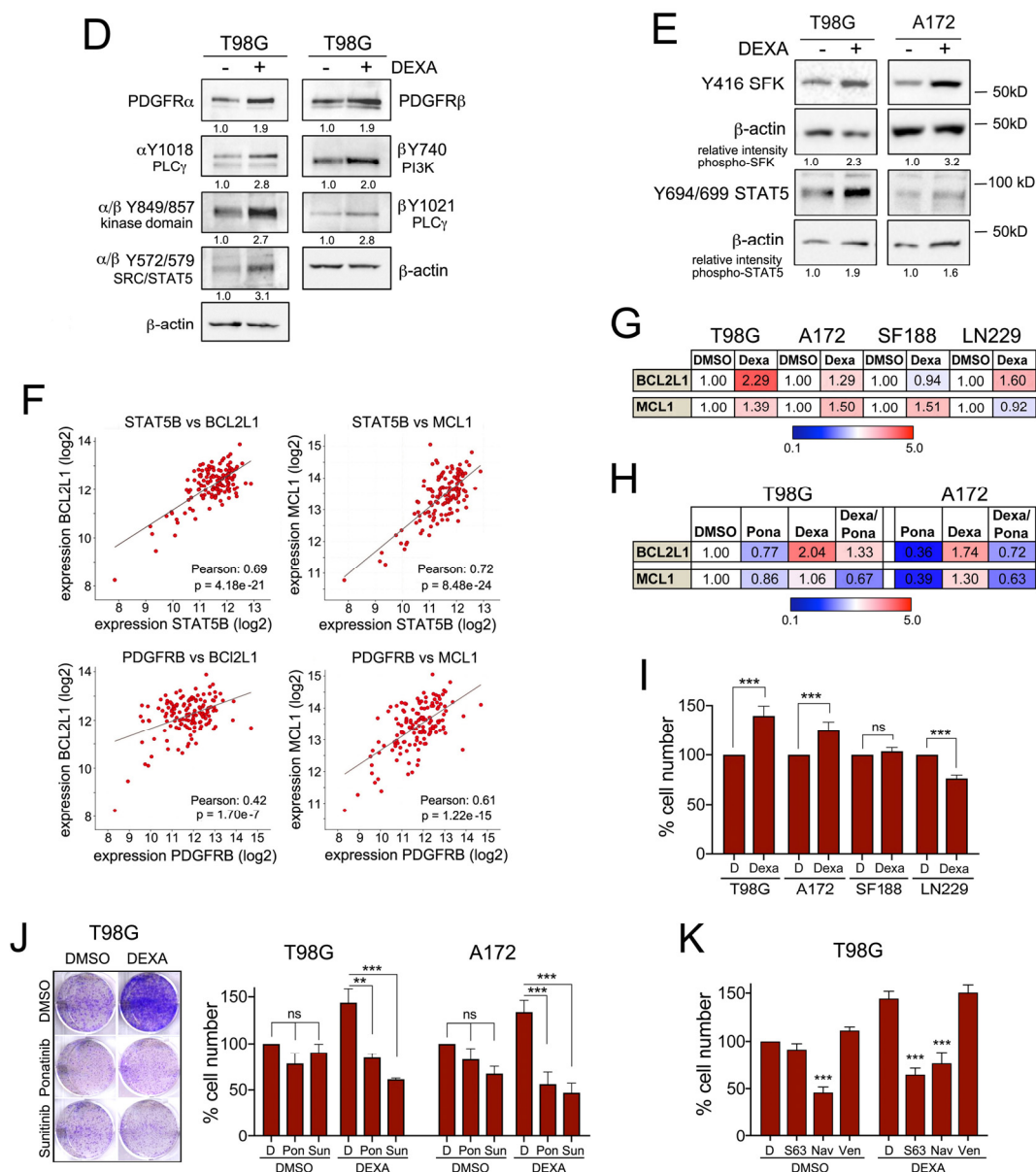


Figure 3. Cont.



**Figure 3.** Dexamethasone induces PDGFR mediated survival signalling. (A) Functional characteristics of T98G cells treated with 25  $\mu$ M DEXA for 18 h revealed by GSEA using GO term and PID gene set collections. (B) qRT-PCR analysis for PDGFRA, PDGFRB and PDGFB in the indicated cell lines represented as mean fold change of triplicates treated with DEXA for 18 h relative to DMSO. (C) Western blot analysis for PDGFRA and PDGFRB in the indicated cell lines either untreated or treated with DEXA for 18 h. Beta-actin served as loading control. (D) Western blot analysis for PDGFRA, PDGFRB and the indicated phospho-specific antibodies in T98G cells either untreated or treated with DEXA for 18 h. The lysate of one experiment was run on several lanes per blot, which were probed in parallel. Beta-actin serves as loading control and representative controls are shown. (E) Western blot analysis for phospho-SFK (using a phospho SRC antibody) and phospho-STAT5 in the indicated cell lines either untreated or treated with DEXA for 18 h. Beta-actin served as loading control. (F) Co-expression analysis of the indicated genes from the TCGA Glioblastoma dataset. (G) qRT-PCR analysis for BCL2L1 and MCL1 in the indicated cell lines represented as mean fold change of triplicates treated with DEXA for 18 h relative to DMSO. (H) qRT-PCR analysis as in (G). Cells were treated with DEXA in the absence or presence of 200 nM ponatinib for 18 h. (I) Quantification of the relative cell number of the indicated cell lines grown in the absence or presence of 25  $\mu$ M DEXA. Data represent the mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ). (J) Quantification of the relative cell number of the indicated cell lines grown with or without 25  $\mu$ M DEXA in the absence or presence of 25 nM or 100 nM ponatinib (Pon) or 1  $\mu$ M or 3  $\mu$ M sunitinib (Sun). Data represent mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ). (K) Quantification of the relative cell number of T98G cells grown with or without 25  $\mu$ M DEXA in the absence or presence of 5  $\mu$ M S63845 (S63), 1  $\mu$ M navitoclax (Nav) or 5  $\mu$ M venetoclax (Ven). Data represent mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

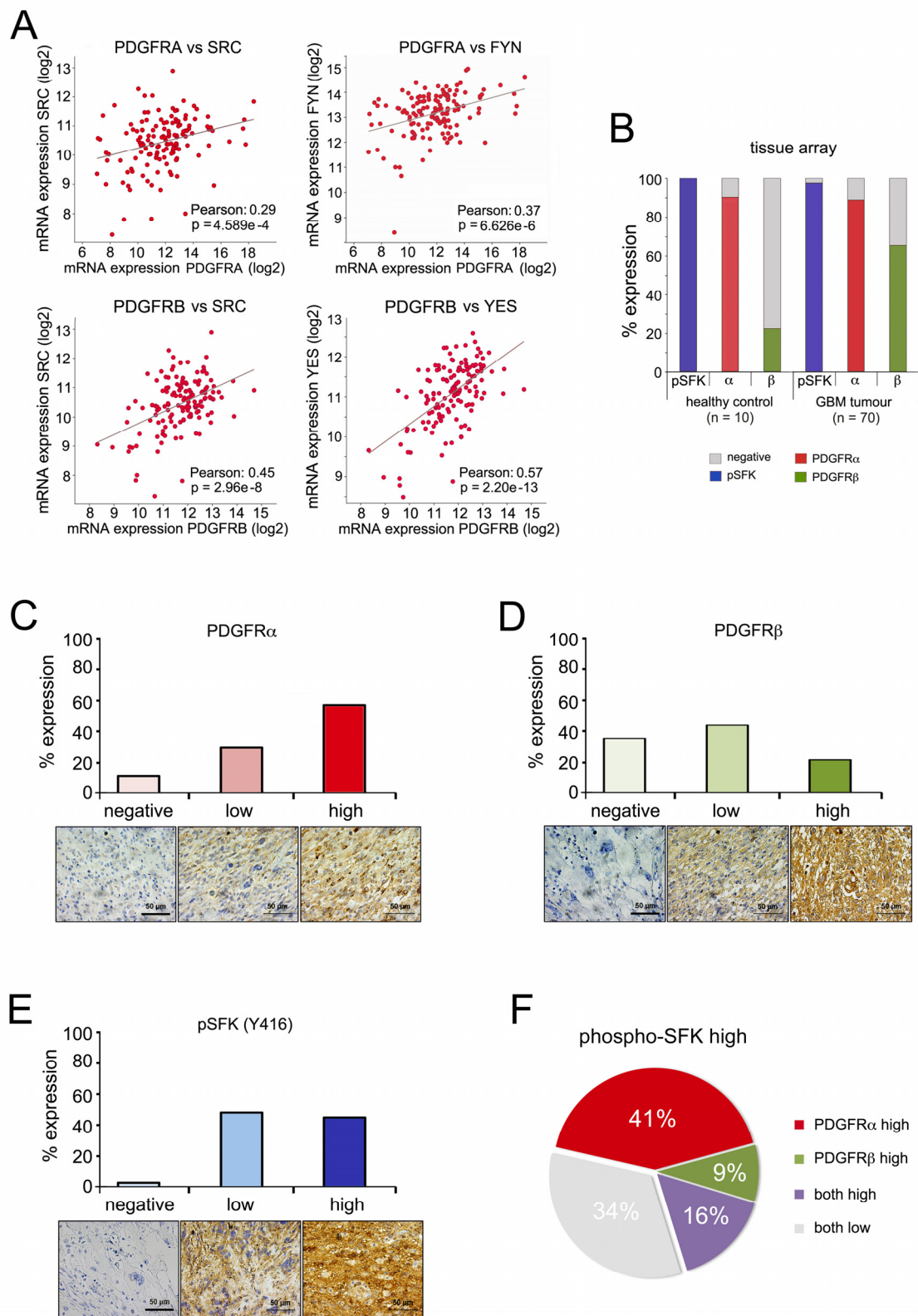
The activation of SRC and STAT signalling downstream of RTKs can induce survival signalling through BCL2L1 or MCL1 [26,27]. In fact, STAT5B can be activated by SFKs and mediate survival signalling in glioblastoma cells through direct activation of the *BCL2L1* promoter [28]. Moreover, STAT5B can drive tumour progression in a PDGFRB-driven glioma model and this involves increased BCL2L1 expression [29]. In the TCGA GBM patient cohort [4] STAT5B and the expression of SRC, FYN and YES are strongly correlated with the expression of BCL2L1, but also with MCL1 (Figure 3F and Figure S4A). Importantly, PDGFRB expression is also significantly correlated with STAT5B, BCL2L1 and MCL1 expression (Figure 3F and Figure S4A,B). In line with our previous observations, DEXA stimulated the mRNA expression of both, BCL2L1 and MCL1 in T98G and A172 cells (Figure 3G). In SF118 and LN229 cells it only induced MCL1 or BCL2L1, respectively (Figure 3G), which was correlated with inefficient activation of SRC and STAT5 (not shown). In T98G and A172 cells, the DEXA induced BCL2L1 and MCL1 expression was reduced by the potent PDGFRB inhibitor ponatinib (Figure 3H), demonstrating that ponatinib can block DEXA-induced signalling.

Inactivation of BCL2L1 and MCL1 during prolonged mitosis has been considered the priming event in mitotic death signalling [20]. With DEXA reducing mitotic control through the SAC, increased expression of BCL2L1 and MCL1 could enable cells to survive with mitotic errors. As such, the balance between lowering the activity of the SAC and enhancing survival signalling could contribute to the net effect of DEXA on GBM cell growth, which indeed is notoriously variable amongst different GBM cell lines [13]. We found that DEXA induces colony formation in T98G and A172 cells, in which both BCL2L1 and MCL1 are up-regulated, but no significant effect was seen in SF118 cells and DEXA was inhibitory in LN-229 cells (Figure 3I).

The relevance of PDGFR signalling for long-term growth was corroborated by the fact that the DEXA-induced colony formation of T98G and A172 cells was suppressed by ponatinib and another PDGFR inhibitor, sunitinib (Figure 3J). Moreover, the DEXA-induced growth effect was also abolished by the MCL1 inhibitor S63845 and the pan BCL2 family inhibitor navitoclax, which also inhibits BCL2L1 (Figure 3K). Furthermore, no inhibition was seen with the BCL2 specific inhibitor venetoclax (Figure 3K), emphasizing the specific role of BCL2L1 in DEXA mediated survival signalling.

#### 2.5. PDGFR Expression and SRC Kinase Activation Correlate in High-Grade Gliomas

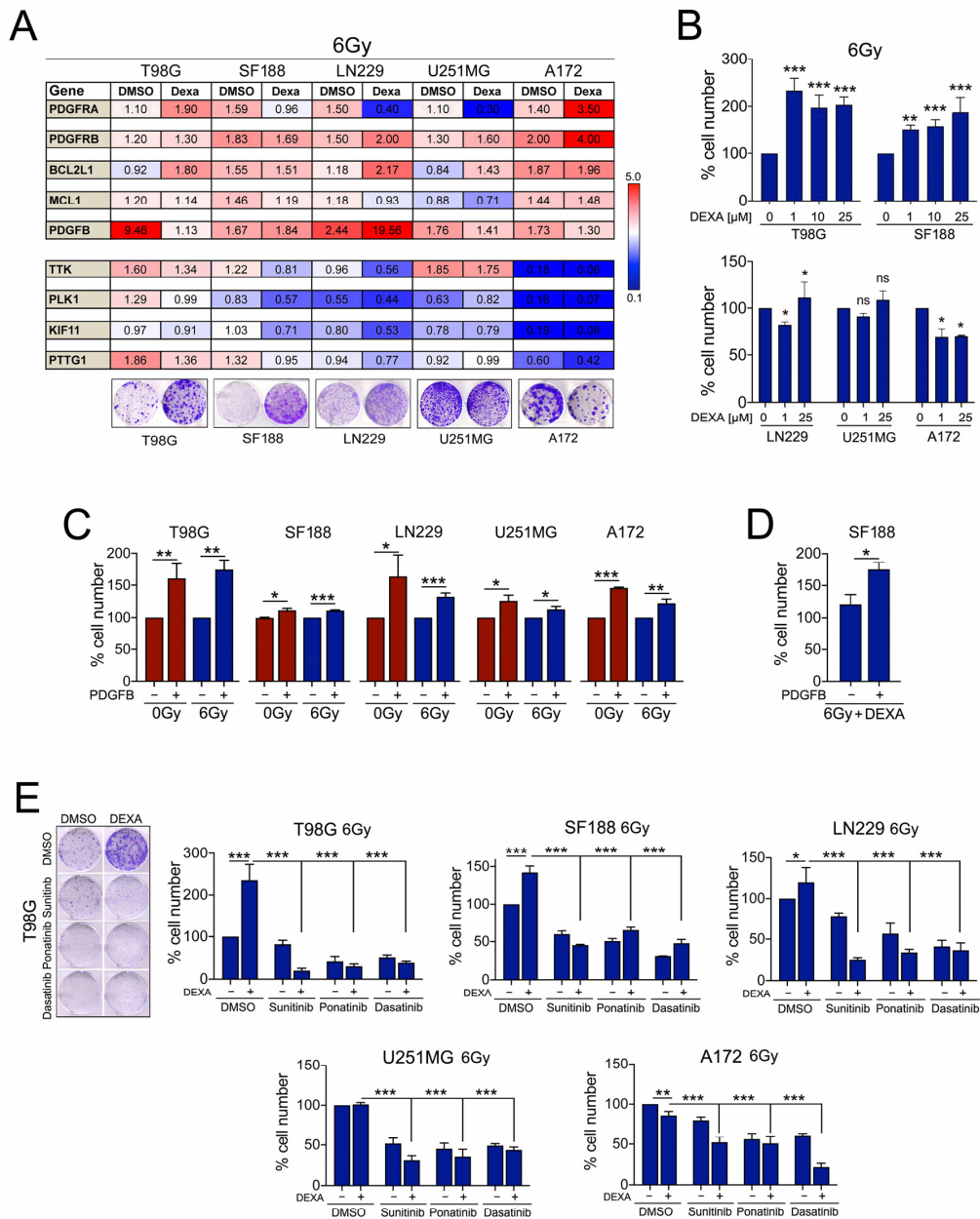
We next assessed whether the pathway relevant for DEXA-induced long-term growth was activated in human glioblastoma. We focused on SFKs, because reliable antibodies against the activated forms (phospho-SFK) are available. As seen for STAT5B (Figure S4A), both PDGFRA and PDGFRB significantly correlate with the expression of SRC, FYN and YES in the TCGA patient cohort (Figure 4A and Figure S4C). Analysis of a tissue microarray (TMA) identified both PDGFRA expression and basal SFK phosphorylation as detectable in the majority of normal glial cells in healthy brain tissue as well as in GBM tumours (Figure 4B). On the other hand, whereas PDGFRB expression was only seen in 22% of normal glial cells, in GBM tumours its expression was increased and detectable in 65% (Figure 4B). PDGFRA and PDGFRB displayed high expression in 59% and 22% of samples, respectively (Figure 4C,D), whereas high SFK phosphorylation was seen in approximately half of all tumours (Figure 4E). In these “phospho-SFK high” tumours 66% also expressed high PDGFRA or PDGFRB or both (Figure 4F), supporting a scenario in which PDGFR signalling contributes to SRC/SFK activation in high-grade gliomas.



**Figure 4.** PDGFR and SRC kinase co-expression in high-grade gliomas. **(A)** Co-expression analysis of the indicated genes from the TCGA Glioblastoma dataset. **(B)** Overall expression of pSKF (using a phospho-SRC antibody), PDGFRA and PDGFRB in a TMA containing 70 stage 4 Glioblastoma and 10 healthy cerebrum tissue samples. **(C)** Quantification of relative PDGFRA expression in TMA GBM samples; scale bar, 50  $\mu$ m. **(D)** Quantification of relative PDGFRB expression in TMA GBM samples; scale bar, 50  $\mu$ m. **(E)** Quantification of relative pSKF expression in TMA GBM samples; scale bar, 50  $\mu$ m. **(F)** Quantification of relative expression of PDGFRA and PDGFRB in high pSKF tumour samples.

### 2.6. Tyrosine Kinase Inhibition Overcomes Dexamethasone-Mediated Radioprotection

We next wished to analyse the impact of DEXA-induced PDGFR signalling on radiated cells. Intriguingly, radiation alone led to up-regulation of PDGFR, its ligand PDGFB, BCL2L1 and MCL1, albeit with some variations (Figure 5A).



**Figure 5.** DEXA and PDGFB act as radio-protective factors and tyrosine kinase inhibitors (TKIs) inhibit this protection. (A) qRT-PCR analysis for the indicated genes in different GBM cell lines treated with 25 μM DEXA for 18 h before radiation with 6 Gy. RNA expression was analysed 24 h later. Data are represented as mean fold change of triplicates treated relative to non-radiated DMSO control cells (=1). A colony formation assay is shown as example for the radio-protective effect of DEXA in radiated cells. (B) Quantification of cell numbers in the indicated cell lines radiated with 6 Gy in the absence or presence of the indicated concentrations of DEXA as described above. Data represent the mean ± SEM (n ≥ 3). (C) Quantification of cell numbers in the indicated cell lines either non-radiated or radiated with 6 Gy in the absence or presence of recombinant PDGFBB. Data represent the mean ± SEM (n ≥ 3). (D) Quantification of cell numbers of SF188 cells radiated with 6 Gy and treated with DEXA in the absence or presence of recombinant PDGFBB. Data represent the mean ± SEM (n ≥ 3). (E) Quantification of cell numbers in the indicated cell lines radiated with 6 Gy in the absence or presence of DEXA and the indicated inhibitors. Data represent mean ± SEM (n ≥ 3). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

The effect of radiation on mitosis-control genes was diverse with up-regulation in T98G cells and strong down-regulation in A172 cells (Figure 5A). DEXA generally induced a similar profile in transcriptional changes to what we had seen in non-radiated cells with up-regulation of PDGFRs, BCL2L1 and MCL1 but down-regulation of mitosis-control genes (Figure 5A). As with non-radiated cells, this impacts on the balance between reduced mitosis control and increased survival signalling. Accordingly, the radioprotection capacity of DEXA varied with radio-protective effects seen in T98G, SF188 and LN229 cells but an inhibitory effect in A172 cells, in which DEXA strongly down-regulated mitosis and cell division related genes (Figure 5A,B).

As we had observed up-regulation of PDGFR and its ligand, we assessed the radio-protective capacity of PDGFR signalling in the absence of DEXA by exposing GBM cells to recombinant PDGFB. We found that PDGFB was not only generally pro-proliferative but also protects radiated cells (Figure 5C), supporting the relevance of PDGFR signalling in the context of radiation. Intriguingly, in radiated SF188 cells, the effect of PDGFB alone was much weaker than what we had previously observed with DEXA (Figure 5B). We therefore pre-treated radiated SF188 cells with DEXA and this significantly increased the radio-protective effect of PDGFB (Figure 5D), further supporting the idea that DEXA “primes” glioblastoma cells towards PDGFR mediated growth and survival signalling.

To analyse whether inhibiting PDGFR signalling could overcome the radio-protective effect of DEXA, we used the tyrosine kinase inhibitors (TKIs) ponatinib and sunitinib, which have a high affinity for PDGFR, as well as dasatinib, which also inhibits SFKs. All three inhibitors were effective in GBM cells (Figure S5A) and significantly inhibited GBM cell colony formation after radiation, even when DEXA provided a radio-protective effect (Figure 5E).

### 2.7. Dexamethasone Sensitizes Glioblastoma Cells to Sunitinib

In some radiated GBM cell lines, we saw an enhanced response to ponatinib and dasatinib in the presence of DEXA (Figure 5E). However, with sunitinib a significant increase in the inhibitory effect was seen in all cell lines when DEXA was present (Figure 6A). Moreover, this effect was independent of radiation and was also observed in non-radiated cells (Figure 6A), which suggested that DEXA induced signalling generally sensitizes GBM cell lines to sunitinib.

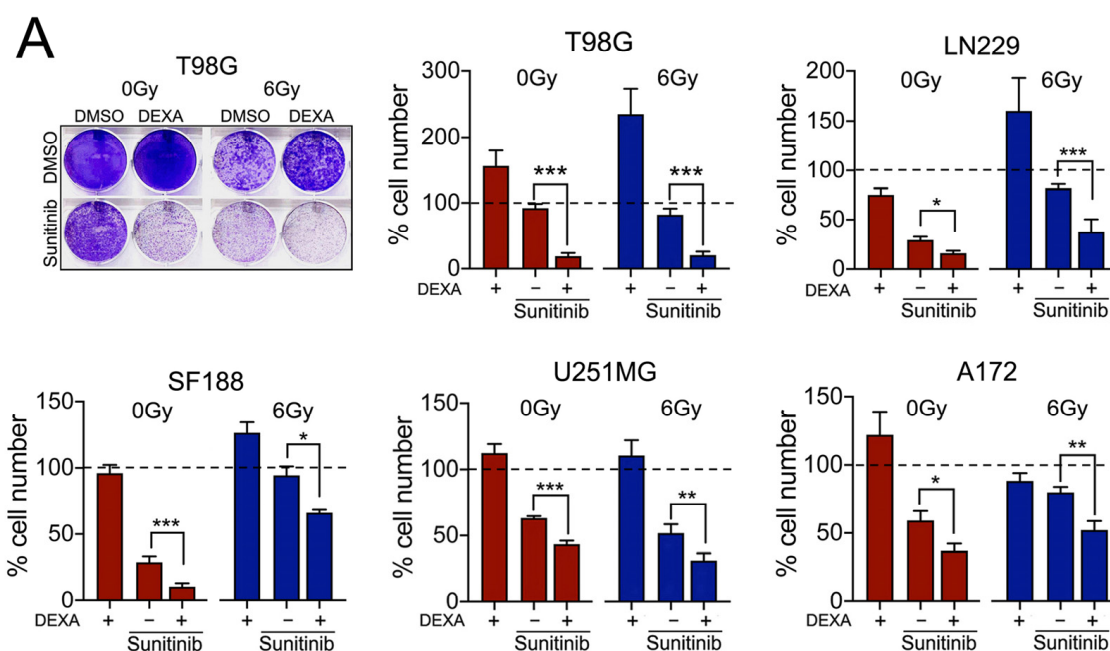
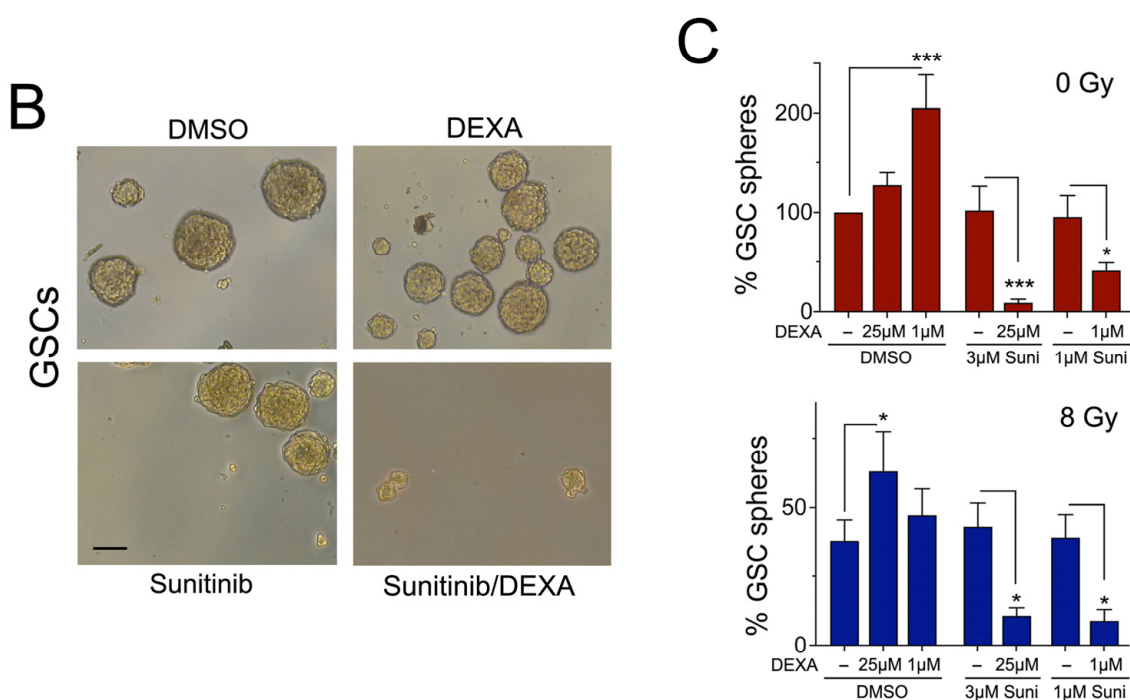


Figure 6. Cont.





**Figure 6.** Dexamethasone sensitizes glioblastoma cells to sunitinib. (A) Quantification of cell numbers in T98G cells either non-radiated or radiated with 6 Gy in the absence or presence of DEXA and sunitinib. Data represent mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ). (B) Images depicting neurospheres formed by GSCs under the indicated conditions. (C) Quantification of sphere formation by GSCs cultured in stem cell medium under non-adherent conditions either non-radiated or radiated with 8 Gy in the absence or presence of DEXA or sunitinib (Sun). Data represent mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

While GBM cell lines provide vital information with regard to drug responses, it is GSCs that are thought to be the source of therapeutic resistance and tumour recurrence after surgery, and they are considered a critical target in a successful therapy approach [30]. When we analysed GSCs derived from mice overexpressing PDGFA but lacking TP53 and NF1, we found that independent of radiation the basal neurosphere formation capacity was not sensitive to sunitinib (Figure 6B,C).

However, DEXA, which was not only promoting neurosphere formation in non-radiated and radiated GSCs, also profoundly sensitized these GSCs to the inhibitory effect of sunitinib (Figure 6B,C). This further supports the idea that DEXA induced signalling establishes a vulnerability for sunitinib in glioblastoma cells.

DEXA reduces the development of cerebral edema in GBM patients by blocking the production of pro-inflammatory cytokines, which otherwise affect blood-brain-barrier (BBB) functionality. As microglial cells and astrocytes play an important role in this scenario, we wished to examine the effect of the DEXA/sunitinib combination treatment on these cells. DEXA suppressed the expression of the pro-inflammatory cytokines IL1B and TNFA in LPS/IFN $\gamma$  activated microglial cells, and sunitinib increased this response (Figure S5B). A similar situation occurred with IL10 (Figure S5B), but no effect was seen with the marker of the M2a alternative activated phenotype, ARG1 (Figure S5B). In astrocytes, the DEXA/sunitinib combination suppressed LPS/IFN $\gamma$ -induced IL1 $\beta$  but not TNF $\alpha$  expression (Figure S5C). The expression of IL10 and ARG-1, both suppressed by LPS/IFN $\gamma$ , was recovered by DEXA/sunitinib treatment.

### 2.8. Dexamethasone Induces a Therapeutic Vulnerability for Sunitinib In Vivo

To assess whether the DEXA induced vulnerability occurs in vivo, we used U251MG cells, because they are relatively resistant to sunitinib, dasatinib and ponatinib (see Figure S5A), but display significant synergy when treated with DEXA and sunitinib

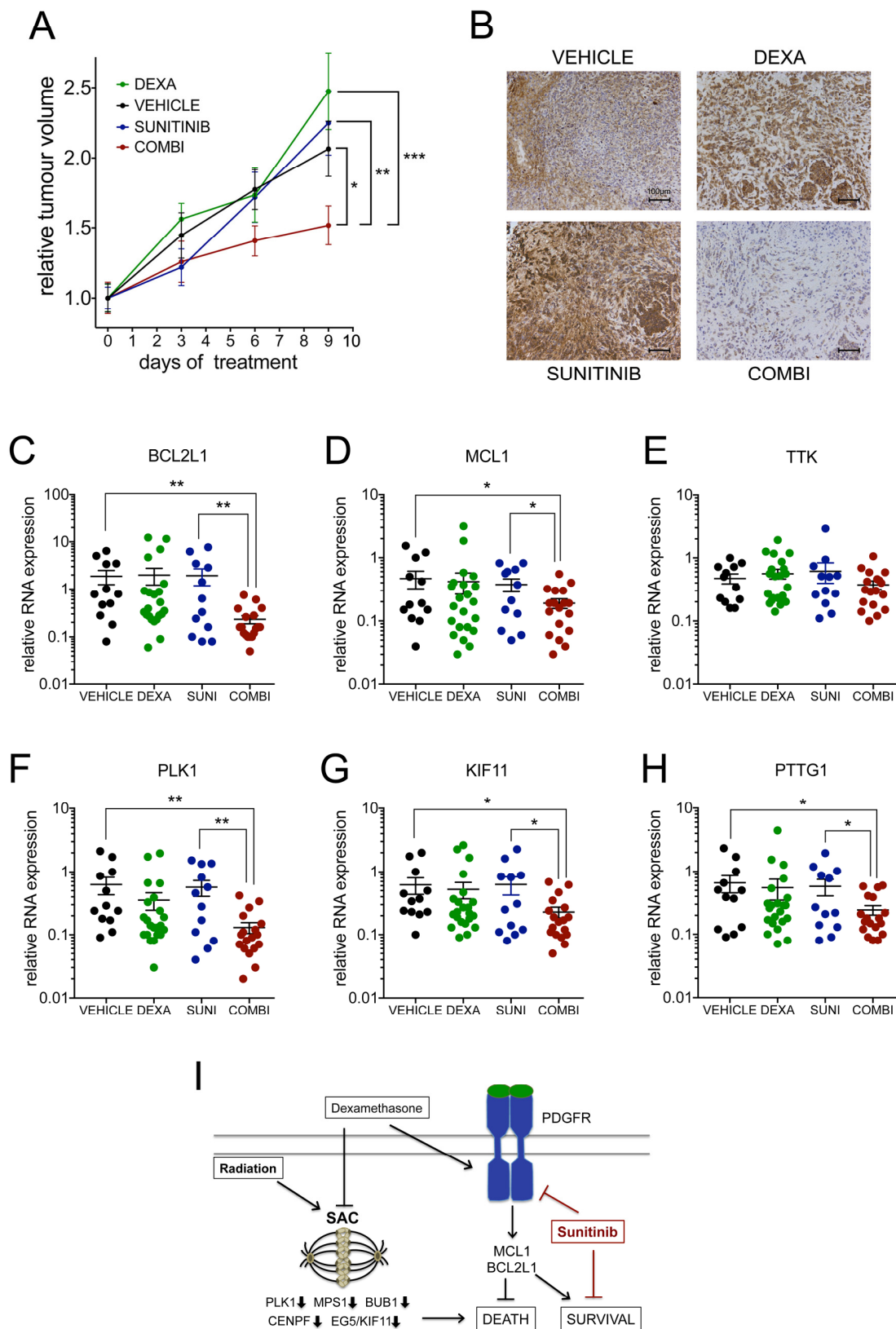
(see Figure 6A). Similar to what is seen in radiated cells (see Figure 5A) DEXA treatment of non-radiated U251MG cells also suppresses PLK1, KIF11 and PTTG1 expression, but TTK expression is induced by DEXA in these cells (Figure S6A). BCL2L1 and MCL1 expression are induced in U251MG cells by DEXA, which correlates with a pro-proliferative effect *in vitro* (Figure S6B).

For the *in vivo* treatment, we chose a dose of 0.3 mg/kg DEXA once daily in order to minimize effects on weight loss (Figure S6C) as this effect had been described previously [31,32]. At this dose DEXA maintained tumour growth, but we did not observe a significantly increased mean tumour volume (Figure 7A). This suggested that we either did not reach concentrations high enough to detect the pro-proliferative effect, or that DEXA-induced effects on the tumour microenvironment counteracted proliferation. Importantly however, under conditions where sunitinib was entirely ineffective in reducing tumour volume, the additional presence of DEXA led to a significant reduction in tumour growth (Figure 7A), demonstrating that the sensitization of GBM cells by DEXA observed *in vitro* also occurs *in vivo*.

We used phospho-SRC/SFK to monitor effects on downstream signalling activated by DEXA. Basal phosphorylation in control mice varied from very low to medium intensity (Figure 7B, Figure S6D,E). DEXA induced an increase in phospho-SRC signal, but strikingly this was also seen with sunitinib (Figure 7B and Figure S6D,E). Such an increase in phosphorylation has been observed previously with imatinib and ponatinib and was suggested to be based on compensatory signalling induced by these TKIs when used as single agents at low/ineffective concentrations [33,34]. Importantly however, when used in combination with DEXA sunitinib led to a striking reduction in phospho-SRC signal (Figure 7B and Figure S6D,E).

Despite the increase in phospho-SRC signal in DEXA treated tumours, we did not detect a significant increase in BCL2L1 and MCL1 expression (Figure 7C,D). This suggests that the DEXA-induced signaling was only sufficient to maintain the expression of survival signalling, which is in line with the lack of increased growth. Nevertheless, although not reaching significance, there was a trend of reduced expression of PLK1, KIF11, PTTG1 and TTK (the latter otherwise induced by DEXA in U251MG cells (see Figure S6A) in DEXA treated tumours (Figure 7E–H). More importantly, the DEXA/sunitinib combination induced a significant decrease in mRNA expression of survival and mitosis-control genes (Figure 7C–H). Thus, while DEXA alone did not produce significant changes in all assessed parameters, adding sunitinib to DEXA treated tumours led to a significant repression of survival and mitosis-control genes, and reduction in tumour growth. This suggests that DEXA had primed the tumour cells to signal in a sunitinib-dependent manner.

In summary, we identified a mechanism in which DEXA compromises the SAC by reducing the amount of relevant players such as PLK1, MPS1, BUB1 and CENPF, and concomitantly promotes PDGFR signalling, which contributes to survival (see Figure 7I). As such, DEXA drives GBM cell growth into dependency of signalling that can be inhibited by sunitinib.



**Figure 7.** Dexamethasone sensitizes to sunitinib in vivo. (A) Mean tumour volumes  $\pm$  SEM of mice ( $n \geq 6$  mice/group) treated as indicated: sunitinib (40 mg/kg/qd), DEXA (0.3mg/kg/qd). (B) IHC for phospho-SRC/SFK in the indicated tumours; scale bar 100  $\mu$ m. (C–H) qRT-PCR analysis for the indicated genes of tumours from mice treated as described in (A). Data are from two experimental repeats of  $n = 6$ –11 tumours per group represented as scatter dot blot; the mean  $\pm$  SEM is indicated. (I) Model of DEXA induced signalling that creates vulnerability for sunitinib. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3. Discussion

Dexamethasone is the corticosteroid of choice used in the management of cerebral edema in GBM treatment, but several clinical studies found that low steroid use during radio/chemotherapy correlated with better survival [8–12]. Similar observations were made in a PDGFB-driven mouse model [18] and the interference of DEXA with the microenvironment including the immune-microenvironment has been linked to its negative impact on radiotherapy [12,18,35,36].

We show here that DEXA can have a direct radio-protective effect on human GBM cells as well as GSCs *in vitro*. However, this did not happen in all GBM cell lines, and in fact in A172 cells DEXA sensitised to radiation. This variability is reminiscent of the fact that DEXA can be pro-proliferative or anti-proliferative in glioblastoma cells *in vitro*, an effect we did observe and that has been described previously [13]. Even *in vivo*, DEXA was found to be anti-proliferative in PDGFB-driven gliomas [18], but to be pro-proliferative in GSC-derived orthotopic xenografts [37]. One explanation for this variability could be that the cellular background *i.e.* the genetic make-up of individual glioblastoma cells impacts on the DEXA induced transcriptional changes and signalling.

Nevertheless, we found that independently of the mutation/amplification/deletion status of major GBM classifiers such as EGFR, PDGFRA or NF1, DEXA consistently suppressed G2/M transition/SAC related genes in GBM cell lines as well as in GSCs, and the same trend was observed in radiated cells. We identified a mitosis-control gene signature similar to Pitter and co-workers [18] and low expression of these signature genes correlated with poor prognosis in GBM. Intriguingly, in lower grade glioma and in other cancers such as lung, colon and breast cancer (not shown) low expression of these signature genes correlates with better prognosis, implying that the response to reduced mitosis-control is distinct in GBM when compared to other cancer types.

We found that DEXA can propagate GBM cell growth even after radiation, suggesting that the ability of DEXA to override the SAC allows for continued proliferation despite DNA damage. However, for continuous proliferation to occur cells also need to activate survival signalling [20].

After radiation p53-dependent post-mitotic responses induce cell cycle arrest, followed by apoptosis or senescence [38], but apart from A172 in which DEXA sensitized cells to radiation, the glioma cell lines we used express mutated TP53. In addition, DEXA up-regulated BCL2L1 and MCL1, the two major regulators of survival during an extended mitotic arrest as well as in post-mitotic apoptosis [20]. Importantly, this up-regulation varied amongst the cell lines and might not have always been strong enough to warrant survival. Nevertheless, in A172 cells BCL2L1 and MCL1 were induced, yet DEXA sensitised the cells to radiation. This could be partly due to the fact that p53 activity is maintained in A172 cells, however DEXA also severely suppressed mitosis regulation genes in this line. Thus, an appealing hypothesis emanating from our data is that the balance between down-regulation of mitosis-regulators and up-regulation of BCL2L1 and MCL1 is linked to the pro-proliferative and radio-protective activities of DEXA. Addressing this hypothesis however remains subject of future studies.

While DEXA suppressed mitosis control it concomitantly up-regulated PDGFR signalling in GBM cells. PDGFR inhibition in GBM cell lines universally triggers a G2/M arrest [39] and in a PDGFRA/PDGFA driven glioblastoma mouse model chronic activation of PDGFRA facilitates microtubule dynamics during mitosis [40], suggesting a role for PDGFR in driving GBM cells towards mitosis. Thus, the DEXA induced activation of PDGFR signalling is in line with the increase of cells in mitosis we observed.

We detected phosphorylation of SFKs and STAT5, both acting downstream of PDGFRs [25], in response to DEXA. STAT5B-phosphorylation has been linked to poor survival in GBM, and in an EGFRvIII-driven GBM mouse model SFK mediated STAT5B activation regulates expression of AURKA and BCL2L1 [28], expression of both is induced by DEXA.

We demonstrate that using TKIs not only overcomes DEXA mediated pro-proliferative and radio-protective activities, but also that DEXA sensitises GBM cells and GSCs to sunitinib. DEXA supports GSCs neuro-sphere formation of radiated GSCs, suggesting that DEXA can support resistance to radiotherapy in GBM. Crucially, sunitinib can overcome the DEXA mediated radiotherapy resistance in GSCs, where it also profoundly sensitized the cells to the TKI. Moreover, we detected a similar sensitisation by DEXA to sunitinib *in vivo*, further emphasizing our finding that DEXA creates a therapeutic vulnerability for sunitinib in GBM.

Previous trials assessing sunitinib in GBM patients have been hampered by limitations such as small sample size and vast heterogeneity in prior therapy [41–45]. Furthermore, while restriction for BBB crossing has been discussed, sunitinib has in fact shown activity in the brain in a large trial involving 321 renal cell carcinoma patients with brain metastasis [46], suggesting that BBB crossing should not pose a challenge. Nevertheless, our data imply that in GBM the presence of DEXA impacts on the efficacy of sunitinib, and this factor, which was not considered in previous trials, might have added an unpredicted variability to respective study outcomes.

Our findings suggest that through transcriptional rewiring of glioblastoma cells, DEXA creates a therapeutic vulnerability for tyrosine kinase inhibitors in GBM that could be exploited in future therapy approaches. We believe there is still ground for using multi-targeted RTK inhibitors for the treatment of GBM, and we propose that with their DEXA-ameliorating activity, such RTK inhibitors could be used in a post-surgical adjuvant setting with or without concomitant radiotherapy.

## 4. Material and Methods

### 4.1. Patients

In total, 285 patients seen at the Donostia University Hospital, San Sebastian and diagnosed with primary glioblastoma grade IV according to the World Health Organisation criteria were included in the study. All participants signed informed consent forms approved by the Institutional Ethical Committee (ethical code: PI2016151, 22/02/2017). The study was approved by the ethic committee of the Biodonostia Institute and the Donostia University Hospital.

### 4.2. Cell Culture and Reagents

T98G, A172, LN229, MCF-10A and HMC3 human microglial cells were from ATCC; U251-MG and SF188 cells were a gift from Dr Chris Jones (ICR, London, UK). GBM cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (cat#11995065, Gibco), HMC3 cells in DMEM/F12 (cat#10565018, Gibco), and MCF-10A cells in mammary epithelial cell basal medium (MEBM) (cat#CC-3151, Lonza). Human astrocytes (cat#3P10251; Innoprot) were cultured in AM (cat#1801, ScienCell) with supplements (cat#1852, ScienCell). Mouse GSCs were isolated and cultured as described previously [47]. For radiation, cells were irradiated with a linear electron accelerator (Varian Medical Systems) using a 6MV photon field at varying doses ranging from 6–12 Grays. Dexamethasone (cat#D4920), temozolomide (cat#T2577), human PDGF-BB (cat#P3201) and LPS (cat#L5293) were from Sigma/Merck (Madrid, Spain). IFN $\gamma$  (cat#300-02) was from Peprotech (London, UK) and reversine (cat#ab120921) from abcam (Cambridge, UK). FDA approved drug library (cat#L1300), Ponatinib (cat#S1490), Sunitinib (cat#S7781), Dasatinib (cat#S1021), Venetoclax/ABT-199 (cat#S8048), S63845 (cat#S8383), Vincristine (cat#S1241) and Taxol (cat#S1150) were from Selleckchem (Newmarket, UK). Navitoclax/ABT-263 (cat#M1637) was from AbMole. TKIs were used at concentrations in the range of their IC50s (see Figure S5A).

### 4.3. FDA-Approved Drug Screen

A library with 978 FDA approved drugs (Z148990, Selleckchem) was used for the drug screen. T98G cells (cat#CRL-1690) were plated in 96-well format, and 24 h after plating and

3 h before a 12 Grey single dose radiation, cells were treated with the drugs at 10  $\mu$ M. For the analysis, crystal violet staining was used, because it provided reliable measurements of cell numbers after radiation in a dose dependent manner. At confluence of the control, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) and stained with freshly prepared 0.1% crystal violet. Following rinsing with distilled water the stained cells were dissolved in 200  $\mu$ l 1% SDS and absorbance at 570 nm was measured against a control. Twenty-six compounds with significant protection were selected in the first screen, and re-screened at concentrations of 1, 10 and 25  $\mu$ M using 6 Gy. The second screen identified 13 glucocorticoids (listed in Figure 1B) for their capacity to protect from radiation-induced growth inhibition.

#### 4.4. RNA Analysis

For RNAseq of T98G cells, RNA from cells either left untreated or treated with DEXA for 18 h was extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen 74104). Total RNA was processed as previously described [48]. The sequencing run was performed on an Illumina HiSeq1500 instrument. The quality of the raw unprocessed reads was evaluated using the FastQC software. The reference genome and the reference annotation were obtained from the Ensembl database. Clean reads were aligned to reference human genome (GRCh38) using the STAR aligner in the 2-pass mode. FeatureCounts was used to generate counts of uniquely mapped reads to annotated genes using the reference annotation (version 92) file. Differential gene expression analysis was performed using R-Package DESeq2 with a threshold  $p$ -value < 0.05 after false-discovery rate correction. The fold expression of genes with  $\text{padj} < 0.05$  is shown in Table S1. Functionality analysis was performed using Metascape [49]. For qRT-PCR experiments, total RNA was extracted and analysed as described previously [50]. Primer sequences are provided in Table S2.

#### 4.5. Colony Formation Assay

Cells seeded in 6-well plates were treated with DEXA (cat#D4902, Sigma) as indicated. If present, inhibitors or DMSO were added 18 h after DEXA addition and 3 h before radiation. When control cells had reached density, cells were analysed as described previously [51]

#### 4.6. Neurosphere Formation Assays

Neurosphere formation of KAB-194 mouse GSCs was performed as previously described [52]. DEXA was added 8 h after disaggregation and reseeded. Inhibitors were added 18 h after DEXA addition and 3 hours before radiation.

#### 4.7. Analysis of Mitotic Errors, SAC Override and Kinetochore Localisation

Cells on coverslips were treated with DEXA for 48 h, fixed (4% paraformaldehyde) and stained with Hoechst 33258 (cat#B2883, Sigma). In total, 500 cells were counted and the number of cells in mitosis reported. For quantification of mitotic errors, 50 mitotic cells were counted, and the number of mitotic errors reported. For  $\alpha$ -tubulin staining, fixed cells were washed with PBS/0.2% Triton X-100 and incubated with anti- $\alpha$ -tubulin (DM1A, cat#05-829, Merck) for 2 h, washed three times and incubated with Alexa-Fluor488 anti-mouse (A-11001, Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA) for 1 h. For analysis of SAC override, cells were stained with anti-phospho-H3/S10 (cat#ab14955, Abcam) as described above and 300 cells per condition were analysed. For the kinetochore localization analysis anti-CREST, anti-BUB1 and anti-CENPF [53] were used. Cells were imaged using a Leica DM4000 microscope and analysed with NIS-Elements software (Nikon, Amsterdam, Netherlands).

#### 4.8. Tissue Microarray Analysis

Tissue microarrays were purchased from US Biomax Inc. (Rockville, MD, USA, cat# GL805e). Immunohistochemistry was performed using the Leica Bond Max system (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) and the Bond Polymer Refine Detection Kit (DS9800, Leica).

TMA sections were de-paraffinised and rehydrated in decreasing alcohol concentrations. Endogenous peroxide activity was quenched using Peroxide Block for 15 min and tissue sections were subjected to heat-induced antigen retrieval in a steamer (98 °C for 20 min), using Bond Epitope Retrieval Solution 1 (AR 9961, Leica) (pH 6.0). Tissue sections were incubated for 60 min with the respective primary antibodies. Post Primary solution was added for 8 min and Polymer solution for another 8 min. Then the chromogen DAB (3,3-diaminobenzidine-tetrahydrochloride; Sigma, St Louis, MA, USA) was applied at room temperature (RT) for 10 min and Hematoxylin for 5 min. Primary antibodies were for: phospho-SRC (Tyr419) (#44-660G, Invitrogen, 1:500), PDGFR- $\alpha$  (Rb-9027, ThermoFisher, 1:200), and PDGFR- $\beta$  (#DPABH-01589; Creative Diagnostics, 1:500). Slides were evaluated by at least two of the authors (P.A. and I.A.) and then submitted to an independent experienced pathologist (M.V.Z.) for the final score. The staining for each core was determined as negative, low and high.

#### 4.9. Cell Lysis and Western Blot Analysis

Cells were lysed and analysed by Western blotting as described previously [51]. Primary antibodies were: PDGFR $\alpha$  (cat# 3174S), PDGFR $\beta$  (cat# 3169S), p-PDGFR $\alpha$  (Y849)/ $\beta$ (Y857) (cat# 3170T), p-PDGFR $\beta$  (Y740) (cat# 3168), p-SRC (Y416) (cat# 2101) and p-STAT5 (cat# 4322T) from Cell Signaling; p-PDGFR $\alpha$  (Tyr572)/PDGFR $\beta$  (Tyr579) (cat# bs-5554R) from Bioss Inc and  $\beta$ -Actin (cat# A5441) from Sigma. Detection was through enhanced chemiluminescence ECL using Horse Radish Peroxidase (HRP)-coupled secondary antibodies (GE Healthcare) and NOVEX ECL Chemi Substrate (ThermoFisher).

#### 4.10. In Vivo Drug Treatment

All processes involving animals were subject to approval by the Biodonostia HRI animal experimentation ethics committee. In total,  $2 \times 10^6$  U251-MG cells were injected into both flanks of Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup> nude mice (8 weeks of age). External callipers were used to measure tumour volume. Once tumours had reached size, mice were assigned to different groups ( $n = 7$  per group) with an average tumour volume of  $\sim 25 \text{ mm}^3$ . Drugs or vehicle were administered by intraperitoneal injection (IP). Vehicle, DEXA (0.3 mg/kg), sunitinib (40 mg/kg) or a combination was administered once daily for 10 days and tumour volumes measured on day 3, 6 and 9. Tumours were collected and either paraffin-embedded for immunohistochemistry or snap-frozen for RNA extraction.

#### 4.11. Data Analysis and Statistics

GraphPad Prism version 7.00 for Mac OS (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for analysis. One-way ANOVA or Student's *t* test was used for bar graph analyses, log-rank test for Kaplan–Meier survival analyses, Pearson correlation for co-expression analyses and two-way ANOVA (mixed model) analysis for tumour growth. Data represent the results for assays performed from at least 3 replicates, and values are the mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 5. Conclusions

When DEXA is administered during radiotherapy in GBM patients this correlates with reduced overall- and progression-free survival. Our data suggest that DEXA can directly protect GBM cells from radiation by compromising the SAC and concomitantly increasing survival signalling. The SAC is one of the most crucial cell cycle checkpoints hindering cells with DNA/chromosome damage to divide. We demonstrate that DEXA can propagate GBM cell growth even some time after radiation, suggesting that the ability of DEXA to override the SAC promotes continued proliferation despite DNA damage. In this scenario the DEXA-induced PDGFR/survival signalling may increase the threshold for mitotic catastrophe to set in and may enable GBM cells to better adapt to genomic abnormalities. This suggests a crucial dependence on PDGFR signalling and we show that TKIs overcome the DEXA mediated pro-proliferative and radio-protective activities, and

that furthermore DEXA sensitises GBM cells and GSCs to sunitinib. The novel vulnerability that we reveal encourages the revision of the use of TKIs in future trials, whereby not only the level of DEXA use is monitored but also TKI use is considered in an adjuvant setting.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/2/361/s1>, Figure S1: Patient information of the Biodonostia cohort, Figure S2: A DEXA-down signature correlates with poor survival and faster relapse, Figure S3: Dexamethasone induces mitotic errors and overrides the SAC, Figure S4: Co-expression of a PDGFR-STAT5-SFK-BCL2/MCL1 network in the TCGA patient cohort, Figure S5: Sunitinib enhances effects of DEXA on microglial cells, Figure S6: Sunitinib inhibits the growth promoting effects of DEXA, Table S1: T98G RNAseq data, Table S2: Information for primers used in qRT-PCR reactions. Supplementary Material—Uncropped Western blots for Figure 3C–E.

**Author Contributions:** Conceptualization, P.A., A.M., C.W. and I.A.; methodology, investigation: P.A., J.A.-I., M.D., I.L.-O., E.C.-G., M.V.Z., L.B., A.O.-A., I.M., M.R.-M., M.R., M.S., M.M.-A., J.F.-I., E.S., I.M.L., C.W., I.A.; data curation, L.E., N.S.; resources, M.S.; formal analysis, M.M.-A., J.F.-I., E.S., I.M.L., P.A., C.W., I.A.; writing—original draft preparation, I.A., C.W.; writing—review and editing: C.W., I.A.; supervision, I.A.; project administration, I.A.; funding acquisition, I.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by the Instituto de Salud Carlos III-FEDER through [grant number PI15/00176] to I.A., [grant number PI16/0158] to A.M. and [grant number PT17/0019/009] to J.F.I.; I.A. also acknowledges support through a Miguel Servet fellowship [grant number CP15/00176]. The Industry Department of the Government of Navarra, Spain funded work through [grant number PI1054] and [grant number PI1059] to I.A. and E.S. The Proteomics Platform of Navarrabiomed is member of Proteored (PRB3-ISCIII). A.M. is supported by the Health Department of the Basque Country [grant number DTS18/00181]. J.A.I. is funded by a predoctoral fellowship from the Department of Education, University and Research of the Basque Government [grant number PRE\_2016\_1\_0375]. M.S. acknowledges funding by the Seve Ballesteros Foundation.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethical Committee (ethical code: PI2016151, 22/02/2017) of the Biodonostia Institute and the Donostia University Hospital.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article or Supplementary Material.

**Acknowledgments:** We thank Aitor Fernández, Rocío Estrada and Jesús Escobar from the Radio-physics and Radiological Protection Service (CHN) for assistance with the radiation experiments. We are grateful to Anthony Tighe and Stephen Taylor, University of Manchester, UK for providing the CREST, BUB1 and CENPF antibodies. We are indebted to Isabel Gil, Guadalupe Gutierrez and Beatriz Rodriguez from the Navarrabiomed Biobank for their help with IHC, and to Natalia Lopez-Andres and Mirta Gambarte for their support and helpful discussions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Zanders, E.D.; Svensson, F.; Bailey, D.S. Therapy for glioblastoma: Is it working? *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 1193–1201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **2008**, *455*, 1061–1068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Verhaak, R.G.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P.; et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 98–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Brennan, C.W.; Verhaak, R.G.; McKenna, A.; Campos, B.; Nounshmehr, H.; Salama, S.R.; Zheng, S.; Chakravarty, D.; Sanborn, J.Z.; Berman, S.H.; et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **2013**, *155*, 462–477. [[CrossRef](#)]
5. Wang, Q.; Hu, B.; Hu, X.; Kim, H.; Squatrito, M.; Scarpacci, L.; de Carvalho, A.C.; Lyu, S.; Li, P.; Li, Y.; et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 42–56.e46. [[CrossRef](#)]



6. Ghosh, D.; Nandi, S.; Bhattacharjee, S. Combination therapy to checkmate Glioblastoma: Clinical challenges and advances. *Clin. Transl. Med.* **2018**, *7*, 33. [[CrossRef](#)]
7. Schiff, D.; Lee, E.Q.; Nayak, L.; Norden, A.D.; Reardon, D.A.; Wen, P.Y. Medical management of brain tumors and the sequelae of treatment. *Neuro Oncol.* **2015**, *17*, 488–504. [[CrossRef](#)]
8. Hohwieler Schloss, M.; Freidberg, S.R.; Heatley, G.J.; Lo, T.C. Glucocorticoid dependency as a prognostic factor in radiotherapy for cerebral gliomas. *Acta Oncol.* **1989**, *28*, 51–55. [[CrossRef](#)]
9. Michaelsen, S.R.; Christensen, I.J.; Grunnet, K.; Stockhausen, M.T.; Broholm, H.; Kosteljanetz, M.; Poulsen, H.S. Clinical variables serve as prognostic factors in a model for survival from glioblastoma multiforme: An observational study of a cohort of consecutive non-selected patients from a single institution. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 402. [[CrossRef](#)]
10. Shields, L.B.; Shelton, B.J.; Shearer, A.J.; Chen, L.; Sun, D.A.; Parsons, S.; Bourne, T.D.; LaRocca, R.; Spalding, A.C. Dexamethasone administration during definitive radiation and temozolomide renders a poor prognosis in a retrospective analysis of newly diagnosed glioblastoma patients. *Radiat. Oncol.* **2015**, *10*, 222. [[CrossRef](#)]
11. Watne, K.; Hannisdal, E.; Nome, O.; Hager, B.; Hirschberg, H. Prognostic factors in malignant gliomas with special reference to intra-arterial chemotherapy. *Acta Oncol.* **1993**, *32*, 307–310. [[CrossRef](#)]
12. Wong, E.T.; Lok, E.; Gautam, S.; Swanson, K.D. Dexamethasone exerts profound immunologic interference on treatment efficacy for recurrent glioblastoma. *Br. J. Cancer* **2015**, *113*, 1642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cenciari, M.; Valentino, M.; Belia, S.; Sforna, L.; Rosa, P.; Ronchetti, S.; D’Adamo, M.C.; Pessia, M. Dexamethasone in Glioblastoma Multiforme Therapy: Mechanisms and Controversies. *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *12*, 65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dai, C.; Celestino, J.C.; Okada, Y.; Louis, D.N.; Fuller, G.N.; Holland, E.C. PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 1913–1925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hambardzumyan, D.; Amankulor, N.M.; Helmy, K.Y.; Becher, O.J.; Holland, E.C. Modeling Adult Gliomas Using RCAS/t-va Technology. *Transl. Oncol.* **2009**, *2*, 89–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Holland, E.C.; Hively, W.P.; DePinho, R.A.; Varmus, H.E. A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 3675–3685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hui, C.Y.; Rudra, S.; Ma, S.; Campian, J.L.; Huang, J. Impact of overall corticosteroid exposure during chemoradiotherapy on lymphopenia and survival of glioblastoma patients. *J. Neurooncol.* **2019**, *143*, 129–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Pitter, K.L.; Tamagno, I.; Alikhanyan, K.; Hosni-Ahmed, A.; Pattwell, S.S.; Donnola, S.; Dai, C.; Ozawa, T.; Chang, M.; Chan, T.A.; et al. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma. *Brain* **2016**, *139*, 1458–1471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. The Cancer Genome Atlas Research Network; Brat, D.J.; Verhaak, R.G.; Aldape, K.D.; Yung, W.K.; Salama, S.R.; Cooper, L.A.; Rheinbay, E.; Miller, C.R.; Vitucci, M.; et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2481–2498. [[CrossRef](#)]
20. Ruan, W.; Lim, H.H.; Surana, U. Mapping Mitotic Death: Functional Integration of Mitochondria, Spindle Assembly Checkpoint and Apoptosis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 177. [[CrossRef](#)]
21. Ohashi, A. Different cell fates after mitotic slippage: From aneuploidy to polyploidy. *Mol. Cell Oncol.* **2016**, *3*, e1088503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Topham, C.; Tighe, A.; Ly, P.; Bennett, A.; Sloss, O.; Nelson, L.; Ridgway, R.A.; Huels, D.; Littler, S.; Schandl, C.; et al. MYC Is a Major Determinant of Mitotic Cell Fate. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 129–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Santaguida, S.; Tighe, A.; D’Alise, A.M.; Taylor, S.S.; Musacchio, A. Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J. Cell Biol.* **2010**, *190*, 73–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Amabile, G.; D’Alise, A.M.; Iovino, M.; Jones, P.; Santaguida, S.; Musacchio, A.; Taylor, S.; Cortese, R. The Aurora B kinase activity is required for the maintenance of the differentiated state of murine myoblasts. *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 321–330. [[CrossRef](#)]
25. Heldin, C.H.; Lennartsson, J. Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a009100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Buettner, R.; Mora, L.B.; Jove, R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 945–954.
27. Kim, L.C.; Song, L.; Haura, E.B. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2009**, *6*, 587–595. [[CrossRef](#)]
28. Latha, K.; Li, M.; Chumbalkar, V.; Gururaj, A.; Hwang, Y.; Dakeng, S.; Sawaya, R.; Aldape, K.; Cavenee, W.K.; Bogler, O.; et al. Nuclear EGFRvIII-STAT5b complex contributes to glioblastoma cell survival by direct activation of the Bcl-XL promoter. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 509–520. [[CrossRef](#)]
29. Gressot, L.V.; Doucette, T.A.; Yang, Y.; Fuller, G.N.; Heimberger, A.B.; Bogler, O.; Rao, A.; Latha, K.; Rao, G. Signal transducer and activator of transcription 5b drives malignant progression in a PDGFB-dependent proneural glioma model by suppressing apoptosis. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 2047–2054. [[CrossRef](#)]
30. Vieira de Castro, J.; Goncalves, C.S.; Hormigo, A.; Costa, B.M. Exploiting the Complexities of Glioblastoma Stem Cells: Insights for Cancer Initiation and Therapeutic Targeting. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5278. [[CrossRef](#)]
31. Moroz, M.A.; Huang, R.; Kochetkov, T.; Shi, W.; Thaler, H.; de Stanchina, E.; Gamez, I.; Ryan, R.P.; Blasberg, R.G. Comparison of corticotropin-releasing factor, dexamethasone, and temozolomide: Treatment efficacy and toxicity in U87 and C6 intracranial gliomas. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 3282–3292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Villeneuve, J.; Galarneau, H.; Beaudet, M.J.; Tremblay, P.; Chernomoretz, A.; Vallieres, L. Reduced glioma growth following dexamethasone or anti-angiopoietin 2 treatment. *Brain Pathol.* **2008**, *18*, 401–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Petrilli, A.M.; Garcia, J.; Bott, M.; Klingeman Plati, S.; Dinh, C.T.; Bracho, O.R.; Yan, D.; Zou, B.; Mittal, R.; Telischi, F.F.; et al. Ponatinib promotes a G1 cell-cycle arrest of merlin/NF2-deficient human schwann cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 31666–31681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rossi, F.; Yozgat, Y.; de Stanchina, E.; Veach, D.; Clarkson, B.; Manova, K.; Giacchetti, F.G.; Antonescu, C.R.; Besmer, P. Imatinib upregulates compensatory integrin signaling in a mouse model of gastrointestinal stromal tumor and is more effective when combined with dasatinib. *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 1271–1283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Chitadze, G.; Fluhr, C.; Quabius, E.S.; Freitag-Wolf, S.; Peters, C.; Lettau, M.; Bhat, J.; Wesch, D.; Oberg, H.H.; Luecke, S.; et al. In-depth immunophenotyping of patients with glioblastoma multiforme: Impact of steroid treatment. *Oncimmunology* **2017**, *6*, e1358839. [[CrossRef](#)]
36. Dubinski, D.; Won, S.Y.; Gessler, F.; Quick-Weller, J.; Behmanesh, B.; Bernatz, S.; Forster, M.T.; Franz, K.; Plate, K.H.; Seifert, V.; et al. Dexamethasone-induced leukocytosis is associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma. *J. Neurooncol.* **2018**, *137*, 503–510. [[CrossRef](#)]
37. Luedi, M.M.; Singh, S.K.; Mosley, J.C.; Hassan, I.S.A.; Hatami, M.; Gumin, J.; Anderegg, L.; Sulman, E.P.; Lang, F.F.; Stueber, F.; et al. Dexamethasone-mediated oncogenicity in vitro and in an animal model of glioblastoma. *J. Neurosurg.* **2018**, *129*, 1446–1455. [[CrossRef](#)]
38. Sia, J.; Szymid, R.; Hau, E.; Gee, H.E. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 41. [[CrossRef](#)]
39. Carrasco-Garcia, E.; Martinez-Lacaci, I.; Mayor-Lopez, L.; Tristante, E.; Carballo-Santana, M.; Garcia-Morales, P.; Ventero Martin, M.P.; Fuentes-Baile, M.; Rodriguez-Lescure, A.; Saceda, M. PDGFR and IGF-1R Inhibitors Induce a G2/M Arrest and Subsequent Cell Death in Human Glioblastoma Cell Lines. *Cells* **2018**, *7*, 131. [[CrossRef](#)]
40. Jun, H.J.; Appleman, V.A.; Wu, H.J.; Rose, C.M.; Pineda, J.J.; Yeo, A.T.; Delcuze, B.; Lee, C.; Gyuris, A.; Zhu, H.; et al. A PDGFR $\alpha$ -driven mouse model of glioblastoma reveals a stathmin1-mediated mechanism of sensitivity to vinblastine. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3116. [[CrossRef](#)]
41. Balana, C.; Gil, M.J.; Perez, P.; Reynes, G.; Gallego, O.; Ribalta, T.; Capellades, J.; Gonzalez, S.; Verger, E. Sunitinib administered prior to radiotherapy in patients with non-resectable glioblastoma: Results of a phase II study. *Target. Oncol.* **2014**, *9*, 321–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Grisanti, S.; Ferrari, V.D.; Buglione, M.; Agazzi, G.M.; Liserre, R.; Poliani, L.; Buttolo, L.; Gipponi, S.; Pedersini, R.; Consoli, F.; et al. Second line treatment of recurrent glioblastoma with sunitinib: Results of a phase II study and systematic review of literature. *J. Neurosurg. Sci.* **2019**, *63*, 458–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hutterer, M.; Nowosielski, M.; Haybaeck, J.; Embacher, S.; Stockhammer, F.; Gotwald, T.; Holzner, B.; Capper, D.; Preusser, M.; Marosi, C.; et al. A single-arm phase II Austrian/German multicenter trial on continuous daily sunitinib in primary glioblastoma at first recurrence (SURGE 01-07). *Neuro Oncol.* **2014**, *16*, 92–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kreisl, T.N.; Smith, P.; Sul, J.; Salgado, C.; Iwamoto, F.M.; Shih, J.H.; Fine, H.A. Continuous daily sunitinib for recurrent glioblastoma. *J. Neurooncol.* **2013**, *111*, 41–48. [[CrossRef](#)]
45. Pan, E.; Yu, D.; Yue, B.; Potthast, L.; Chowdhary, S.; Smith, P.; Chamberlain, M. A prospective phase II single-institution trial of sunitinib for recurrent malignant glioma. *J. Neurooncol.* **2012**, *110*, 111–118. [[CrossRef](#)]
46. Gore, M.E.; Hariharan, S.; Porta, C.; Bracarda, S.; Hawkins, R.; Bjarnason, G.A.; Oudard, S.; Lee, S.H.; Carteni, G.; Nieto, A.; et al. Sunitinib in metastatic renal cell carcinoma patients with brain metastases. *Cancer* **2011**, *117*, 501–509. [[CrossRef](#)]
47. Ozawa, T.; Riestter, M.; Cheng, Y.K.; Huse, J.T.; Squatrito, M.; Helmy, K.; Charles, N.; Michor, F.; Holland, E.C. Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 288–300. [[CrossRef](#)]
48. Pariente, A.; Perez-Sala, A.; Ochoa, R.; Pelaez, R.; Larrayoz, I.M. Genome-Wide Transcriptomic Analysis Identifies Pathways Regulated by Sterculic Acid in Retinal Pigmented Epithelium Cells. *Cells* **2020**, *9*, 1187. [[CrossRef](#)]
49. Zhou, Y.; Zhou, B.; Pache, L.; Chang, M.; Khodabakhshi, A.H.; Tanaseichuk, O.; Benner, C.; Chanda, S.K. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1523. [[CrossRef](#)]
50. Ferguson, J.; Smith, M.; Zudaire, I.; Wellbrock, C.; Arozarena, I. Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. *Oncotarget* **2017**, *8*, 32946–32959. [[CrossRef](#)]
51. Erice, O.; Smith, M.P.; White, R.; Goicoechea, I.; Barriuso, J.; Jones, C.; Margison, G.P.; Acosta, J.C.; Wellbrock, C.; Arozarena, I. MGMT Expression Predicts PARP-Mediated Resistance to Temozolomide. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 1236–1246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Garros-Regulez, L.; Aldaz, P.; Arrizabalaga, O.; Moncho-Amor, V.; Carrasco-Garcia, E.; Manterola, L.; Moreno-Cugnon, L.; Barrena, C.; Villanua, J.; Ruiz, I.; et al. mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. *Expert Opin. Ther. Targets* **2016**, *20*, 393–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Johnson, V.L.; Scott, M.I.; Holt, S.V.; Hussein, D.; Taylor, S.S. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 1577–1589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



JID Open

# The Regulators of Peroxisomal Acyl-Carnitine Shuttle CROT and CRAT Promote Metastasis in Melanoma

Irene Lasheras-Otero<sup>1,2</sup>, Iker Feliu<sup>2,3</sup>, Alberto Maillo<sup>4</sup>, Haritz Moreno<sup>2,3</sup>, Marta Redondo-Muñoz<sup>1,2</sup>, Paula Aldaz<sup>1,2</sup>, Ana Bocanegra<sup>5</sup>, Ana Olias-Arjona<sup>1,2</sup>, Fernando Lecanda<sup>2,3,6,7</sup>, Joaquin Fernandez-Irigoyen<sup>2,8</sup>, Enrique Santamaria<sup>2,9</sup>, Ignacio M. Larrayoz<sup>10,11</sup>, David Gomez-Cabrero<sup>2,4,12</sup>, Claudia Wellbrock<sup>1</sup>, Silvestre Vicent<sup>2,3,6,13</sup> and Imanol Arozarena<sup>1,2,13</sup>

Circulating tumor cells are the key link between a primary tumor and distant metastases, but once in the bloodstream, loss of adhesion induces cell death. To identify the mechanisms relevant for melanoma circulating tumor cell survival, we performed RNA sequencing and discovered that detached melanoma cells and isolated melanoma circulating tumor cells rewire lipid metabolism by upregulating fatty acid (FA) transport and FA beta-oxidation-related genes. In patients with melanoma, high expression of FA transporters and FA beta-oxidation enzymes significantly correlates with reduced progression-free and overall survival. Among the highest expressed regulators in melanoma circulating tumor cells were the carnitine transferases carnitine O-octanoyltransferase and carnitine acetyltransferase, which control the shuttle of peroxisome-derived medium-chain FAs toward mitochondria to fuel mitochondrial FA beta-oxidation. Knockdown of carnitine O-octanoyltransferase or carnitine acetyltransferase and short-term treatment with peroxisomal or mitochondrial FA beta-oxidation inhibitors thioridazine or ranolazine suppressed melanoma metastasis in mice. Carnitine O-octanoyltransferase and carnitine acetyltransferase depletion could be rescued by medium-chain FA supplementation, indicating that the peroxisomal supply of FAs is crucial for the survival of nonadherent melanoma cells. Our study identifies targeting the FA-based cross-talk between peroxisomes and mitochondria as a potential therapeutic opportunity to challenge melanoma progression. Moreover, the discovery of the antimetastatic activity of the Food and Drug Administration-approved drug ranolazine carries translational potential.

*Journal of Investigative Dermatology* (2023) 143, 305–316; doi:10.1016/j.jid.2022.08.038

<sup>1</sup>Cancer Signaling Unit, Navarrabiomed, University Hospital of Navarra (HUN), Public University of Navarra (UPNA), Pamplona, Spain; <sup>2</sup>IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, Pamplona, Spain; <sup>3</sup>Program in Solid Tumors, Centre for Applied Medical Research, University of Navarra, Pamplona, Spain; <sup>4</sup>Translational Bioinformatics Unit, Navarrabiomed, University Hospital of Navarra (HUN), Public University of Navarra (UPNA), Pamplona, Spain; <sup>5</sup>Oncimmunology Group, Navarrabiomed, Navarrabiomed, University Hospital of Navarra (HUN), Public University of Navarra (UPNA), Pamplona, Spain; <sup>6</sup>Center for Biomedical Research Network on Cancer (CIBERONC), Madrid, Spain; <sup>7</sup>Department of Pathology, Anatomy and Physiology, School of Medicine, University of Navarra, Pamplona, Spain; <sup>8</sup>Proteomics Platform, Navarrabiomed, University Hospital of Navarra (HUN), Public University of Navarra (UPNA), Pamplona, Spain; <sup>9</sup>Clinical Neuroproteomics Unit, Navarrabiomed, University Hospital of Navarra (HUN), Public University of Navarra (UPNA), Pamplona, Spain; <sup>10</sup>Biomarkers and Molecular Signaling Group, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Foundation Rioja Salud, Logroño, Spain; <sup>11</sup>Pre-departmental Nursing Unit, University of La Rioja (UR), Logroño, La Rioja, Spain; and <sup>12</sup>Biological and Environmental Sciences and Engineering Division, King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Saudi Arabia

<sup>13</sup>These authors contributed equally as senior authors.

Correspondence: Imanol Arozarena, Cancer Signaling Unit, Navarrabiomed, University Hospital of Navarra (HUN), Public University of Navarra (UPNA), 31008 Pamplona, Spain. E-mail: iarozarm@navarra.es

Abbreviations: CRAT, carnitine acetyltransferase; CROT, carnitine O-octanoyltransferase; CTC, circulating tumor cell; FA, fatty acid; FAO, fatty acid beta-oxidation; MCFA, medium-chain fatty acid; siRNA, small interfering RNA

Received 11 May 2022; revised 26 July 2022; accepted 3 August 2022; accepted manuscript published online 1 September 2022; corrected proof published online 29 October 2022

## INTRODUCTION

Cutaneous melanoma is responsible for over 80% of skin cancer-related deaths, but BRAF/mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor combinations and immunotherapies have resulted in significant improvements (Luke et al., 2017; Wolchok et al., 2017). Nevertheless, the development of resistance mechanisms represents a major challenge (Trojaniello et al., 2021).

Melanoma tumors are considerably heterogeneous and frequently consist of populations of cells with distinct transcriptional states (Hoek et al., 2006; Tsoi et al., 2018) called melanoma phenotypes. Importantly, individual phenotypes ranging from an undifferentiated to a fully differentiated state can impact therapy (Arozarena and Wellbrock, 2019; Konieczkowski et al., 2014; Müller et al., 2014; Smith et al., 2017, 2013) and melanoma invasion and metastasis (Campbell et al., 2021; Chapman et al., 2014; Rowling et al., 2020). Crucially, heterogeneity in phenotype markers is also found in circulating tumor cells (CTCs) from patients with melanoma (Khoja et al., 2014).

CTCs are the key link between the primary tumor and distant metastases, and the adaptation of CTCs to the bloodstream environment may provide therapeutic opportunities to target metastasis. However, owing to the challenges associated with their isolation and long-term maintenance, information on CTCs functional properties remains limited.

Earlier studies have shown that CTCs slow down cell cycle progression and switch to an epithelial–mesenchymal transcriptional state (Micalizzi et al., 2017; Polioudaki et al., 2015). Nevertheless, above all, CTCs are exposed to nonadherent conditions in the blood, and to survive, they must overcome anoikis. Although the loss of integrin signaling and activation of death receptor signaling clearly play a part in the induction of anoikis (Simpson et al., 2008), detachment-associated cell death has also been linked to increased ROS production and cancer cells rewire metabolic activities to overcome this threat (Buchheit et al., 2014; Schafer et al., 2009). Melanoma CTCs were found to activate a distinct antiapoptosis program to reduce ROS (Hong et al., 2021). Nevertheless, this was only seen in a particular CTC population, whereas other CTC populations did not activate this program (Hong et al., 2021). This finding is entirely in line with the heterogeneity detectable in melanoma CTC populations from patients (Khoja et al., 2014) and implies that the means CTCs deploy to survive in the circulation are variable. Thus, if we are to target the vulnerabilities of melanoma CTCs to tackle metastatic disease, we need to gain a better understanding of the mechanisms that enable melanoma cells to propagate under nonadherent conditions.

## RESULTS

### Nonadherent melanoma cells display cell-autonomous characteristics of CTCs

We analyzed melanoma cells cultured in suspension in standard high glucose (25 mM) medium and, considering the average physiological blood glucose concentration (90–110 mg/dl), also in the presence of 5 mM (90 mg/dl) glucose. In addition, we included different melanoma cell phenotypes: differentiated 501mel (melanocytic phenotype) cells and undifferentiated WM266-4 (invasive phenotype) cells (Smith et al., 2017).

Detached melanoma cells were present as single cells or small cell clusters (shown are 501mel cells, Figure 1a) and exhibited an altered cell cycle progression (Figure 1b and Supplementary Figure S1a). In line with our previous findings (Ferguson et al., 2017), in adhered cells, glucose restriction to 5 mM decreased cell numbers in S-phase, with more cells present in G1, but this change was generally not seen in cells in suspension (Supplementary Figure S1a).

Over a period of 72 hours, 5–12% of cells in suspension were represented in the sub-G1 fraction (Figure 1c). Glucose restriction led to a slight increase in WM266-4 cells but had no significant impact on cell death in 501mel cells. After the initial induction of anoikis at 24–48 hours, no further increase in cell death occurred at 72 hours, suggesting that the cells were adapting to the suspension conditions.

Because we wanted to use suspension cells to identify the CTC functions relevant to metastasis, we tested the metastatic capacity of detached 501mel cells after tail-vein injection. Thirty minutes after injection (day 0), cells accumulated in the lungs (Figure 1d). After 7 days, although still noticeable throughout the mice, the cells had visibly homed to the liver (Figure 1d). Ex vivo analysis on day 28 revealed that the cells had colonized the liver and, to a lesser degree, the lungs (Figure 1e and f).

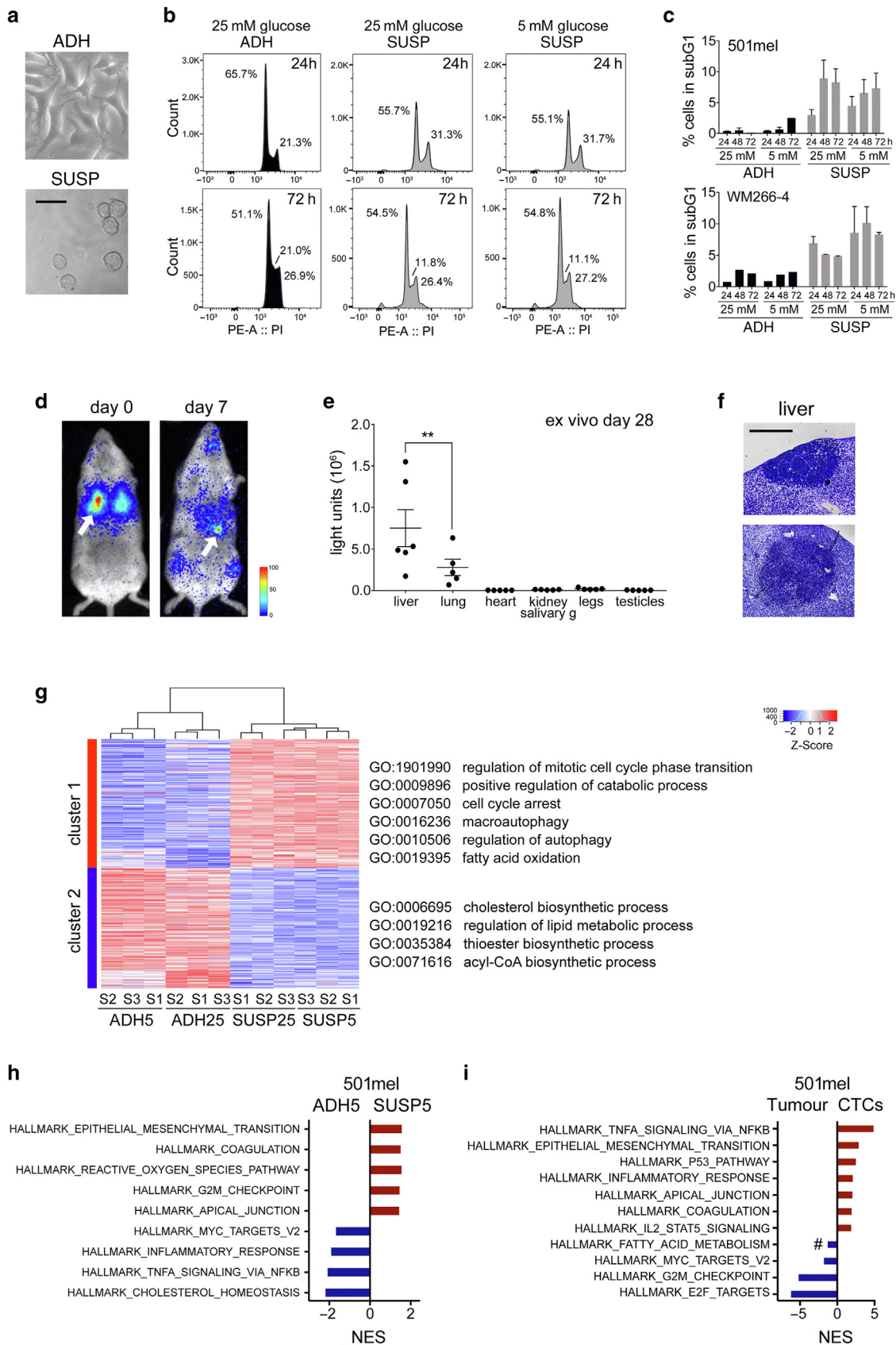
Principal component analysis after RNA sequencing of 501mel and WM266-4 cells showed that adhesion conditions affected cell identity more than glucose concentrations (Supplementary Figure S1b). This was also seen in both cell lines by hierarchical clustering analysis (Figure 1g and Supplementary Figure S1c). Genes upregulated in suspension were enriched in Gene Ontology terms linked to cell cycle arrest; autophagy, a process that can provide anoikis resistance (Fung et al., 2008); catabolic process; and fatty acid beta-oxidation (FAO) (Figure 1g). Genes downregulated in suspension were enriched for cholesterol biosynthetic process and lipid or acyl-CoA metabolic processes (Figure 1g). Similar results were found in WM266-4 cells (Supplementary Figure S1c).

Gene set enrichment analysis for cancer hallmarks identified epithelial–mesenchymal transition and coagulation enriched in 501mel suspension cells cultured in 5 or 25 mM glucose (Figure 1h and Supplementary Figure S1d), but most importantly, the same enrichment was seen in a dataset from CTCs (Figure 1i), which we had previously isolated from 501mel tumor-bearing mice (Rowling et al., 2020). Also, genes for TNF $\alpha$ - or IL-5-signal transducer and activator of transcription 5 signaling generally activated by cytokines in the blood were found enriched in 501mel CTCs (Figure 1i). This was however not seen in suspension cells (Figure 1h), suggesting that these rather activate cell-autonomous processes that might occur in CTCs.

### Fatty acid transport and beta-oxidation are upregulated in 501mel CTCs and correlate with faster progression and poor patient survival

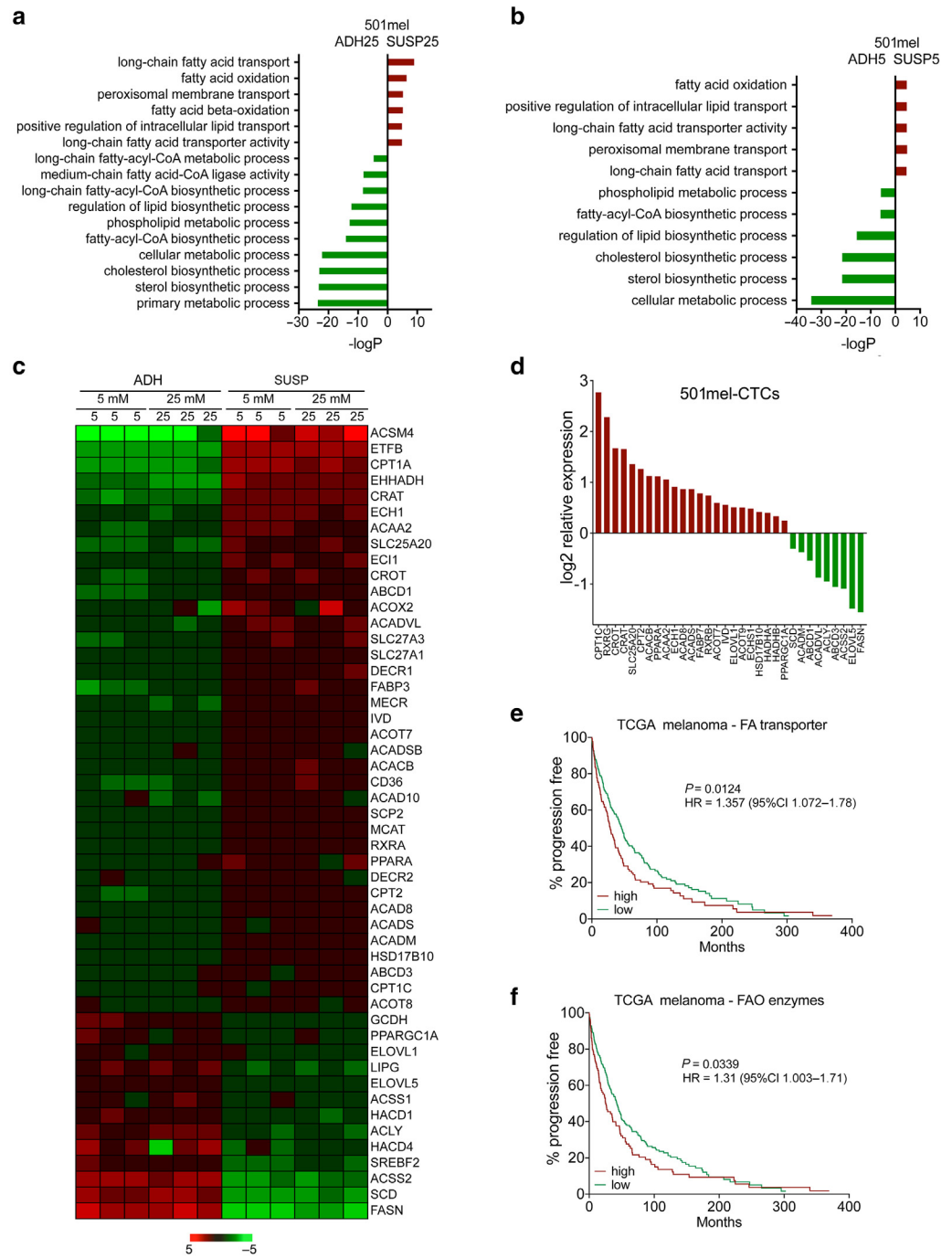
Gene Ontology enrichment analysis of detached 501mel cells showed that independent of glucose concentration, lack of adhesion induced a general rewiring of lipid metabolism. Suspension cells switched toward fatty acid (FA) catabolism, downregulating lipid biosynthetic processes but upregulating FAO (Figure 2a and b). The latter was reflected in the upregulation of genes involved in peroxisomal as well as mitochondrial FAO (Figure 2c). On the other hand, the key regulators of FA synthesis and storage such as stearoyl-CoA desaturase or FA synthase were downregulated (Figure 2c). Suspension cells also upregulated the intracellular FA transport machinery, including regulators of mitochondrial membrane (CPT1A, CPT1C, CPT2, and SLC25A20) and peroxisomal membrane transport (ABCD1, ABCD3) as well as carnitine O-octanoyltransferase (CROT) and carnitine acetyltransferase (CRAT), crucial regulators of FA shuttle between peroxisomes and mitochondria (Figure 2c). Similar results were obtained when analyzing the transcriptome of detached WM266-4 cells (Supplementary Figure S2a). Together this suggests that the upregulation of the FAO program is a direct response to a loss of adhesion, independent of melanoma phenotype and glucose availability.

Many of the genes whose expression was altered in suspension cells were also differentially expressed in 501mel CTCs, with CPT1C, CROT, CRAT, SC25A20, and CPT2 among the highest expressed genes (Figure 2d). Comparable with suspension cells, there was an upregulation of FA transporter and FAO genes and a downregulation of FA synthesis regulators (Figure 2d).



**Figure 1. Cell-autonomous characteristics in nonadherent melanoma cells.** (a) Representative image of 501mel cells in ADH or SUSP conditions. Bar = 50  $\mu$ m. (b) Cell cycle profiles of 501mel cells cultured for 24 or 72 hours in ADH or SUSP condition in the presence of either 25 mM or 5 mM glucose. (c) Quantification of 501mel and WM266-4 cells detectable in sub-G1 over 72 hours. (d) Representative bioluminescent imaging of *Rag2/Ilgr2*<sup>-/-</sup> mice 30 min (day 0) or 7 days after injection with 501mel-GFP/luciferase cells, cultured in SUSP at 5 mM glucose. (e) Ex vivo bioluminescence quantification of 501mel tumor burden in

**Figure 2. FAO regulators are upregulated in 501mel CTCs and correlate with faster disease progression.** (a, b) Functional characteristics of 501mel suspension cells cultured in (a) 25 mM or (b) 5 mM glucose revealed by GSEA using GO term collections. (c) Heatmap of genes upregulated and downregulated in 501mel cells cultured in adhesion or suspension conditions in the presence of 5 or 25 mM glucose. (d) Genes related to FAO regulation upregulated and downregulated in 501mel CTCs. (e) Kaplan–Meier analysis of the TCGA melanoma patient cohort (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Differences in progression-free survival for patients whose tumors express high or low levels of CPT1C, SLC25A20, CPT2, CPT1A, SLC27A1, SLC27A3, and CD36. Respective genes were analyzed for mRNA expression (z-score = 2.0) in cBioportal, and survival data were extracted and analyzed in GraphPad Prism. (f) Progression-free survival in the TCGA melanoma patient cohort for patients whose tumors express high or low levels of CROT, CRAT, ACACB, ACAA2, ECH1, ACADS, ACOT7, ACOT9, ECHS1, and HSD17B10. Respective genes were analyzed as described in e. ADH, adhesion; CI, confidence interval; con, control; CRAT, carnitine acetyltransferase; CROT, carnitine O-octanoyltransferase; CTC, circulating tumor cell; ERK2, extracellular signal-regulated kinase 2; FAO, fatty acid beta-oxidation; GO, Gene Ontology; GSEA, gene set enrichment analysis; HR, hazard ratio; siRNA, small interfering RNA; SUSP, suspension; TCGA, The Cancer Genome Atlas.



Interrogating The Cancer Genome Atlas melanoma database revealed that the expression of FA transporters and FAO enzymes upregulated in suspension cells and in 501mel CTCs significantly correlates with lower progression-free survival (median survival = 28.08

vs. 45.8 months and 25.18 vs. 42.41 months, respectively) and poorer survival (median survival = 66.7 vs. 111.1 months and 64.44 vs. 131.51 months, respectively) (Figure 2e and f and Supplementary Figure S2b and c).

different organs. Graphs show the mean ± SEM signal from six mice. (f) Representative images of H&E staining of liver metastases. Bar = 1,000 μm. (g) Hierarchical cluster analysis of differentially expressed genes ( $P_{adj} < 0.001$ ) of 501mel cells cultured for 24 hours in ADH or SUSP (ADH vs. SUSP) in the presence of 25 or 5 mM glucose. (h) MSigDB hallmarks significantly ( $FDR < 0.05$ ) enriched in 501mel cells cultured in SUSP or ADH in the presence of 5 mM glucose. (i) MSigDB hallmarks significantly ( $FDR < 0.05$ ) enriched in either 501mel CTCs or 501mel subcutaneous tumors. Hash (#) denotes  $FDR = 0.076$  for fatty acid metabolism. The 501mel CTCs had been isolated from 501mel tumor-bearing mice (Rowling et al., 2020). \*\* $P < 0.01$  with one-way ANOVA. ADH, adhesion; adj, adjusted; CTC, circulating tumor cell; FDR, false discovery rate; uh, hour; K, thousand; min, minute; MSigDB, Molecular Signatures Database; NES, normalized enrichment score; PE-A, phycoerythrin area; PI, propidium iodide; SUSP, suspension.

### The carnitine transferases CROT and CRAT control anoikis in melanoma cells

To further corroborate our findings, we analyzed three additional melanoma cell lines: WM9 (melanocytic), WM98-1 (invasive), and MV3 (invasive). Independent of phenotype, CPT1A and CPT2 were significantly upregulated in suspension, whereas SLC25A20 expression was variable, and CPT1C was downregulated (Figure 3a). Apart from in WM266-4 cells, CROT and CRAT as well as the FAO enzymes EHHADH and TFB were also upregulated in suspension (Figure 3b). The upregulation of FAO transporters and enzymes was detectable at 24 hours (Figure 3a and b) and was still seen in cells cultured in suspension for 72 hours (Supplementary Figure S3a).

CROT, CRAT, and SLC25A20 (also CACT) knockdown using small interfering RNA (siRNA) pools significantly reduced the capacity of 501mel cells to survive in suspension (Figure 3c). Using individual siRNAs, we confirmed that CROT or CRAT knockdown reduced the propagation of 501mel suspension cells (Figure 3d and Supplementary Figure S3b) but that the knockdown of SLC25A20 had no significant effect (not shown). CROT or CRAT knockdown in adhered 501mel cells did not significantly impact cell number (Figure 3d), emphasizing the relevance of these carnitine transferases for the propagation of detached cells. Indeed, in suspension cells, CROT or CRAT knockdown over a period of 72 hours induced increased levels of cleaved caspase-3, but this was not seen in adhered cells (Figure 3e). A similar situation was observed with three other melanoma cell lines, where CROT or CRAT knockdown significantly reduced the propagation of cells in suspension, but again, no effect on cell number was seen in adhered cells (Figure 3f and g and Supplementary Figure S3c).

### CROT and CRAT contribute to experimental metastasis of melanoma

We next assessed whether CROT and CRAT are playing a role in the metastatic process in vivo. Transient knockdown of CROT or CRAT in 501mel-luciferase cells injected into the tail-vein of immunodeficient mice (Figure 4a and Supplementary Figure S4a) resulted in a delay in metastasis (Figure 4b and c). On day 28, the whole-body signal of mice injected with CRAT-knockdown cells was significantly reduced (Figure 4b). A similar trend was observed in mice treated with CROT-targeted siRNA (Figure 4b and c), which did however not reach significance. The ex vivo analysis on day 28 of various organs revealed a reduction of light units in the livers of mice treated with CROT-targeted siRNA and CRAT-targeted siRNA, whereas signals in other organs apart from the lungs were considerably weaker (Supplementary Figure S4b). The signal reduction detectable in the liver (Figure 4d) remained significant when values were normalized to whole-body signals from the day of injection, whereas signals in the lungs did not reach significance (Figure 4e).

Clinical relevance for our findings is seen in The Cancer Genome Atlas melanoma cohort, where higher CRAT expression significantly correlates with progression within 2 years after diagnosis, and CROT and CRAT expression is

significantly higher in patients surviving less than 2 years (Figure 4f and g and Supplementary Figure S4c–h).

### Pharmacological inhibition of FAO suppresses the growth of nonadherent melanoma cells

CROT and CRAT, which were amongst the highest upregulated genes in 501mel CTCs (Figure 2d), are carnitine transferases (Houten et al., 2020) that play a central role in controlling the delivery of medium-chain FA (MCFAs) from peroxisomes to mitochondria (Figure 5a). To assess whether the effect of CROT or CRAT knockdown on cell numbers is due to the limitation of MCFAs, we depleted CROT or CRAT by RNA interference and determined suspension cell survival with or without supplementation of the MCFAs octanoyl acid or decanoyl acid. Both MCFAs could not only rescue the CROT or CRAT knockdown, but the addition of octanoyl acid and decanoyl acid even enhanced the propagation of suspension cells (Figure 5b), indicating metabolic rewiring in the absence of CROT or CRAT.

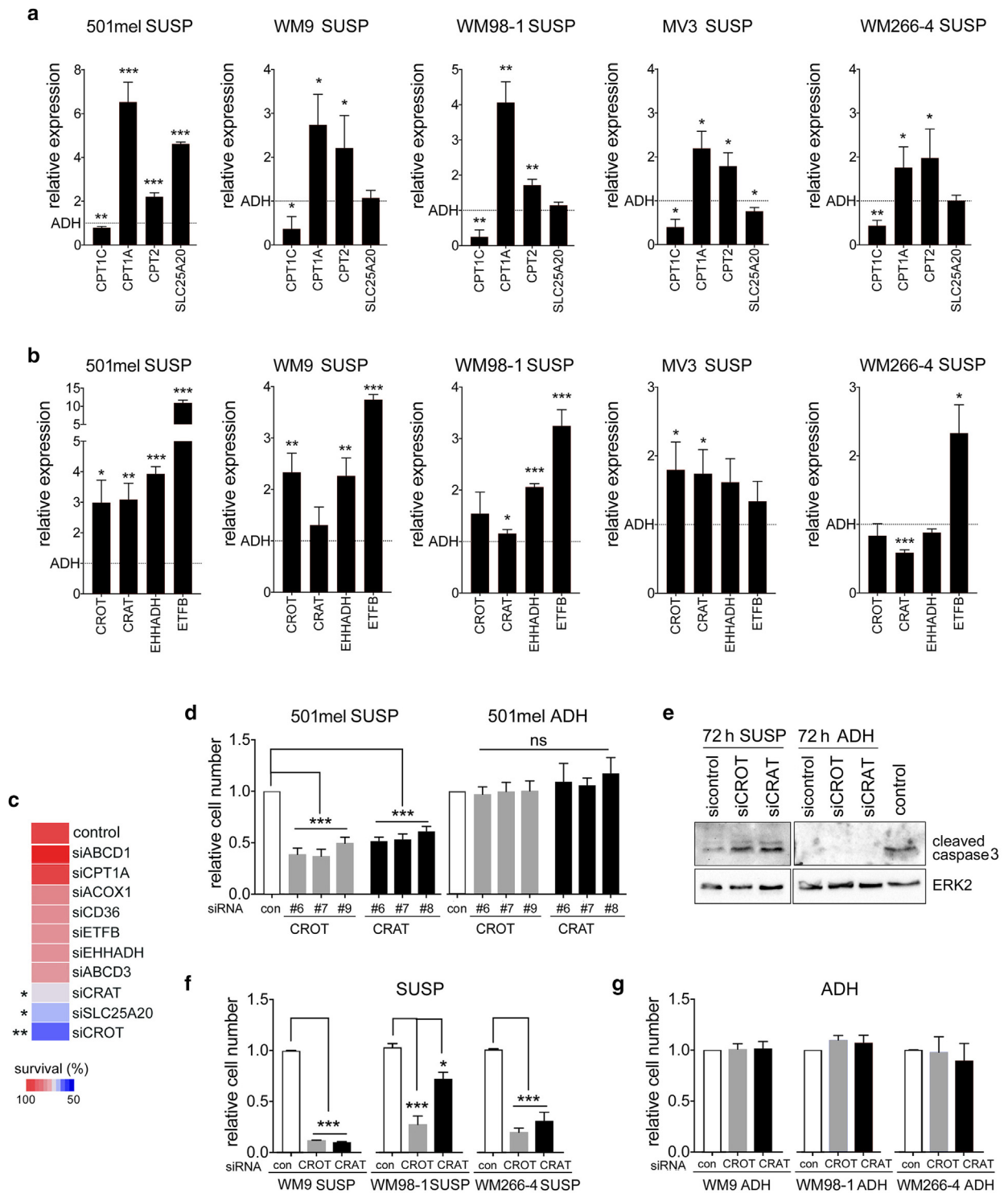
Our data suggest that regulating FA delivery of MCFAs, derived from FAO in peroxisomes, is relevant for the survival of CTCs, possibly because MCFAs fuels FAO in mitochondria. We therefore wished to further assess the relevance of FAO in peroxisomes and mitochondria for suspension cell survival. In the absence of specific CROT or CRAT inhibitors, we opted for two Food and Drug Administration–approved drugs (Figure 5a): thioridazine, which has been shown to target peroxisome-specific beta-oxidation (Leighton et al., 1984; Van den Branden and Roels, 1985), and ranolazine, which inhibits acetyl-CoA production from FAs in mitochondria (McCormack et al., 1998).

Reflecting the relevance of CROT and CRAT for peroxisome function, thioridazine very effectively suppressed 501mel cell propagation (Figure 5c). Supporting the importance of mitochondrial FAO, ranolazine also significantly decreased the growth of 501mel cells (Figure 5c). Importantly, we observed similar effects in five other melanoma cell lines (Figure 5d and e).

The pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK could effectively rescue the ranolazine-induced suppression of 501mel cell propagation, but this was much weaker for thioridazine (Figure 5f), implying additional mechanisms. Of note, FAO can also protect cells from ferroptosis because it consumes FAs and thus reduces the rate of lipid peroxidation. Indeed, two ferroptosis inhibitors, ferrostatin and liproxstatin, effectively increased cell propagation in the presence of thioridazine as well as ranolazine (Figure 5g). These data indicate that FAO is supporting the survival of detached melanoma cells, not only by suppressing apoptosis but also by limiting ferroptosis.

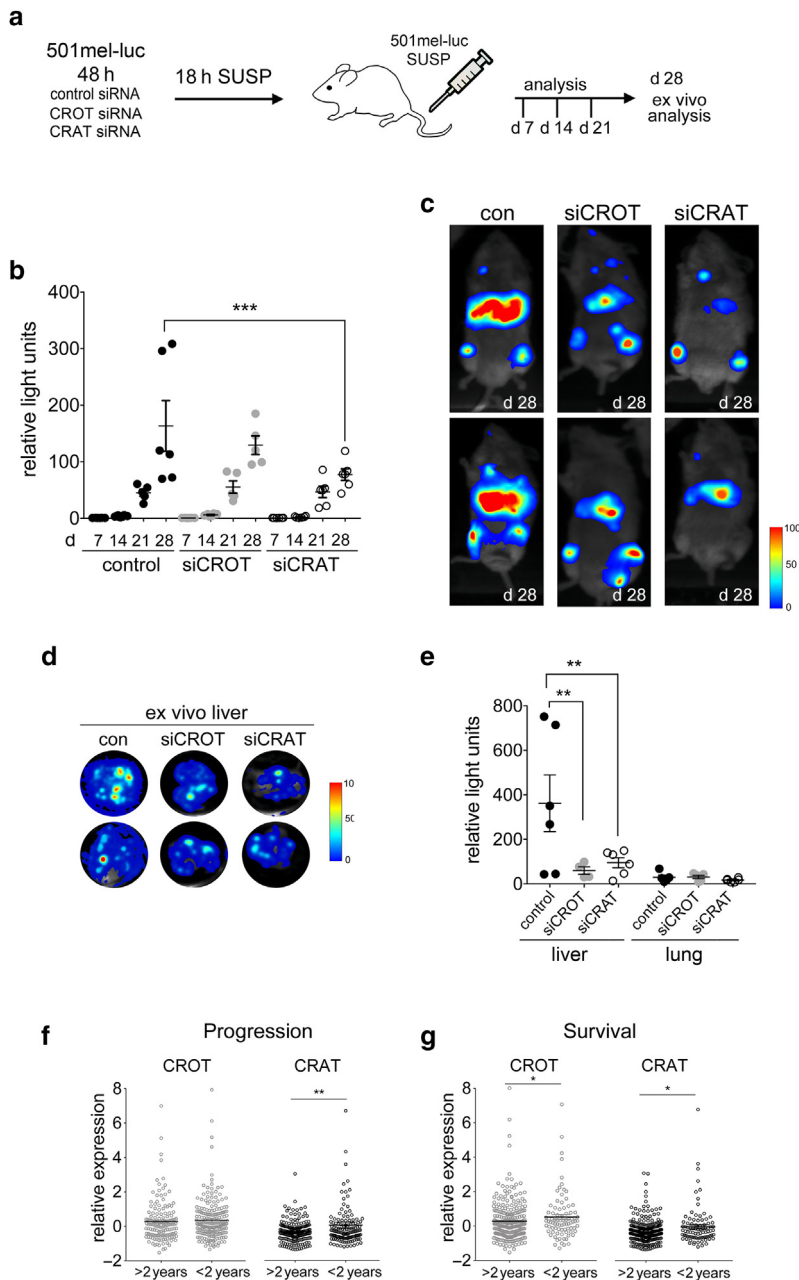
### Inhibition of FAO impacts the metastatic spread of melanoma cells

We next assessed the role of FAO in organ colonization in vivo using 501mel cells. Before injection, suspension cells were pretreated in vitro with thioridazine or ranolazine, and the treatment continued in vivo for 7 days (Figure 6a) because 501mel cells had visibly homed to the liver during this time (Figure 1d). Whole-body luminescence analysis revealed that ranolazine and thioridazine significantly reduced tumor burden during the 7 days of treatment, and the effect was still



**Figure 3. CROT and CRAT are required for the survival of nonadherent melanoma cells.** (a, b) qPCR analysis of the indicated genes in the respective melanoma cells. Fold expression in cells grown in SUSP for 24 hours is indicated. The expression of cells grown in adhesion was set at 1. (c) Clonogenic survival analysis after replating 501mel cells grown for 72 hours in SUSP after a 48-hour knockdown of the indicated FAO regulators. Cells treated with control siRNA have been set at 100%. (d) Clonogenic survival analysis after replating 501mel cells grown in SUSP after knockdown of CROT or CRAT with three individual siRNAs. As a control, 501mel cells were cultured in adhesion conditions after the knockdown of CROT or CRAT with three individual siRNAs and quantified. Cells treated with control siRNA have been set at 1. (e) Western blot for cleaved caspase-3 in 501mel cells treated with control-, CROT-, or CRAT-specific siRNA and cultured in SUSP or adhesion for 72 hours. Adherent cells treated with 1  $\mu$ M staurosporine were used as cleaved caspase-3–positive control. ERK2 served as the loading control. (f, g) Analysis as in d in the indicated cell lines cultured in (f) SUSP or (g) adhesion using siRNA#6 for CRAT or CROT, respectively. Data show the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  with one-way ANOVA and Student's *t*-test. ADH, adhesion; con, control; CRAT, carnitine acetyltransferase; CROT, carnitine O-octanoyltransferase; d, day; ERK2, extracellular signal–regulated kinase 2; FAO, fatty acid beta-oxidation; h, hour; ns, nonsignificant; siCRAT, carnitine acetyltransferase–targeted small interfering RNA; siCROT, carnitine O-octanoyltransferase–targeted small interfering RNA; siRNA, small interfering RNA; SUSP, suspension.





**Figure 4. CROT and CRAT contribute to melanoma metastasis.**

(a) Experimental setup for the in vivo experiment. The 501mel cells were transfected with siRNA in adhesion (48 hours) and then cultured for 18 hours in SUSP before being counted and injected into the tail vein of *Rag2* mice. On days 7, 14, 21, and 28, whole-body bioluminescence imaging was performed. On day 28, mice were killed, and ex vivo bioluminescence imaging was performed on individual organs. (b) Full-body in vivo bioluminescence quantification of 501mel tumor burden over 28 days. Signals, normalized to day 0, from six (control, CRAT) or five (CROT) individual mice are shown. (c) Example images of full-body bioluminescence of control- or *Crot*- or *Crat*-knockdown mice on day 28. (d) Images of ex vivo bioluminescence in livers isolated from mice on day 28. (e) Ex vivo bioluminescence quantification of 501mel tumor burden in the indicated organs. Graphs show the signal of organs from six (control, CRAT) or five (CROT) mice. (f, g) Analysis of the TCGA melanoma patient cohort (Cancer Genome Atlas Network, 2015) for (f) progression-free or (g) overall survival in patients whose tumors express high or low levels of CROT or CRAT. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  with one-way ANOVA and Student's *t*-test. con, control; CRAT, carnitine acetyltransferase; CROT, carnitine O-octanoyltransferase; d, day; luc, luciferase; siCRAT, carnitine acetyltransferase-targeted small interfering RNA; siCROT, carnitine O-octanoyltransferase-targeted small interfering RNA; siRNA, small interfering RNA; SUSP, suspension; TCGA, The Cancer Genome Atlas.

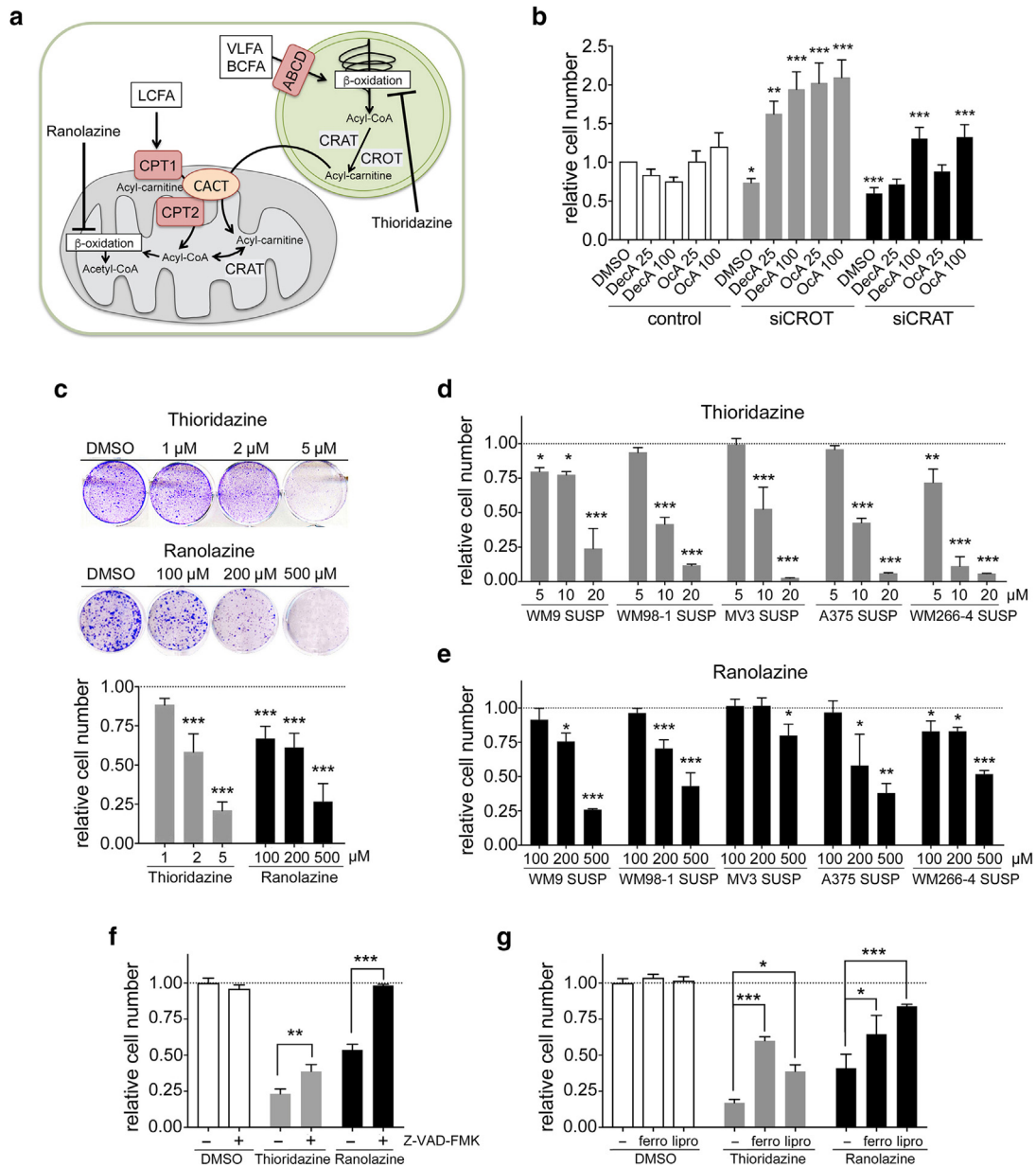
significant on day 14 (Figure 6b), indicating that the FAO inhibitors had impacted the initial establishment of metastasis. Nevertheless, after 21 days, although the trend of suppression was still visible, this did not reach significance (Figure 6b), suggesting that the effect of the drugs had worn off and that they did not produce inhibitory effects strong enough to be detectable in the whole mouse. After 28 days, mice were killed, and ex vivo analysis of liver and lung colonization was performed. Signals were strongest in the livers (Figure 6c), and although no significant change was detectable in the lungs, both ranolazine and thioridazine significantly reduced tumor load in the liver (Figure 6d).

## DISCUSSION

Although the molecular mechanisms of melanoma migration and invasion have been studied in detail (Arozarena and

Wellbrock, 2017; Ju et al., 2018), how melanoma cells survive under detached conditions during metastatic dissemination is less defined. We identified a functional link between FA catabolism, anoikis resistance, and metastatic potential of melanoma cells.

Similar to most CTCs (Tasdogan et al., 2021), melanoma CTCs exhibit elevated ROS levels compared with tumors, and antioxidants increase melanoma metastasis (Le Gal et al., 2015; Piskounova et al., 2015). Thus, the elimination of ROS appears crucial to succeed in metastasis, and a process that can reduce the insult of ROS is autophagy. Autophagy, which removes damaged mitochondria as the primary source of intracellular ROS, is known to counteract anoikis (Fung et al., 2008; Kongara and Karantz, 2012). Both 501mel and WM266-4 had significantly upregulated autophagy when cultured in suspension, which hence would enable

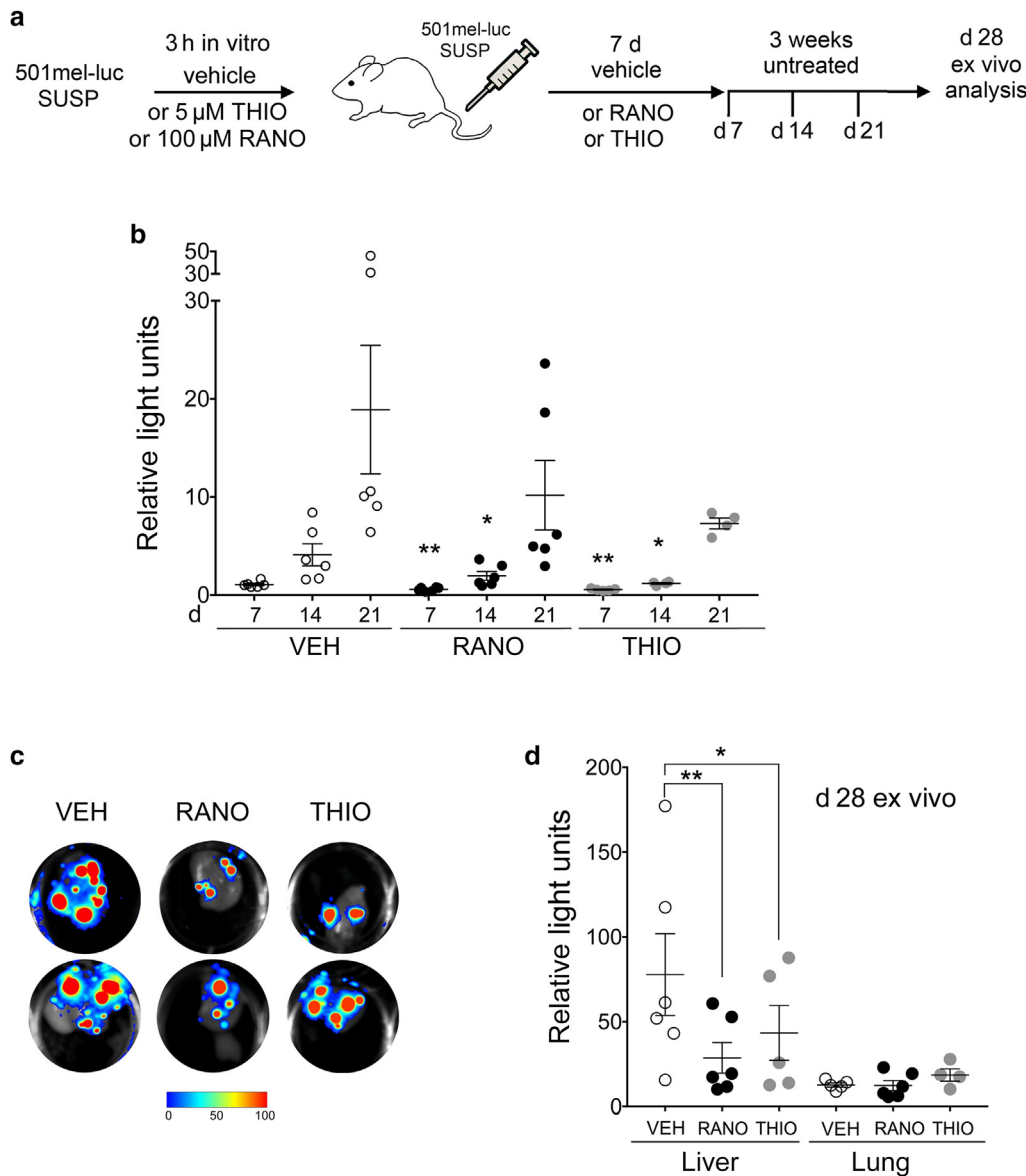


**Figure 5. FAO inhibitors suppress the growth of nonadherent melanoma cells.** (a) Schematic of FAO and acyl-carnitine shuttle. Peroxisomes catabolize VLFA and BCFA to MCFA by beta-oxidation; the transport of these MCFA in form of acyl-carnitines to mitochondria is regulated by CROT and CRAT. In the absence of CROT or CRAT, the energy derived from VLFA and BCFA cannot be utilized. The action of FAO inhibitors is indicated. (b) Clonogenic survival analysis of 501mel cells grown for 72 hours in SUSP after knockdown of *Crot* or *Crat* in the presence or absence of the MCFAs Oca or DecA. Cells treated with control siRNA have been set 1. (c) Clonogenic survival analysis of 501mel cells grown for 72 hours in SUSP in the presence of the indicated FAO inhibitors. Control cells treated with DMSO have been set 1. Example images of the treated cells are shown. (d, e) Clonogenic survival analysis of the indicated cell lines grown for 72 hours in SUSP in the presence of (d) thioridazine or (e) ranolazine. (f) Clonogenic survival analysis of 501mel cells in the presence of the indicated FAO inhibitors and in the presence or absence of 50  $\mu$ M Z-VAD-FMK. (g) Clonogenic survival analysis of 501mel cells in the presence of the indicated FAO inhibitors and in the presence or absence of either 1  $\mu$ M ferro or 200 nM lipro. Data show the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  with one-way ANOVA. BCFA, branched-chain fatty acid; CRAT, carnitine acetyltransferase; CROT, carnitine O-octanoyltransferase; DecA, decanoyl acid; FAO, fatty acid beta-oxidation; ferro, ferrostatin-1; LFA, long-chain fatty acid; lipro, liprostatin-1; MCFA, medium-chain fatty acid; Oca, octanoyl acid; siCRAT, carnitine acetyltransferase–small interfering RNA; CROT, carnitine O-octanoyltransferase–small interfering RNA; siRNA, small interfering RNA; SUSP, suspension; VLFA, very-long-chain fatty acid.

them to modulate cellular ROS levels and contribute to survival.

Upregulation of autophagy can meet another important demand; during autophagy, engulfed damaged organelles are degraded, and this provides the cell with nutrients necessary for cell metabolism during cellular stress (Hernandez and

Perera, 2022). Indeed, in leukemia cells, autophagy can regulate FA availability for FAO and consequently oxidative phosphorylation (Bosc et al., 2020). Importantly, activating FAO can also counteract excessive ROS because it produces the reducing equivalents nicotinamide adenine dinucleotide as well as flavin adenine dinucleotide.



**Figure 6. FAO inhibitors suppress melanoma metastasis.**

**(a)** Experimental setup for the in vivo experiment. Before injection suspension, cells were pretreated in vitro with a vehicle or 100 μM RANO or 5 μM THIO for 3 h. Treatment was continued in vivo with a vehicle, RANO (50 mg/kg/day), or THIO (10 mg/kg, every 2 days) for 7 days after injection, after which treatment was discontinued. On day 28, ex vivo analysis of individual organs was performed. **(b)** Full-body in vivo bioluminescence quantification of 501mel tumor burden over 21 days. Signals, normalized to day 0, from six (VEH control, RANO) or five (THIO) treated individual mice are shown. **(c)** Images of ex vivo bioluminescence in livers isolated from RANO-treated and THIO-treated mice on day 28. **(d)** Ex vivo bioluminescence quantification of 501mel tumor burden in the indicated organs. Graphs show the signal of organs from six (VEH control, RANO) or five (THIO) treated individual mice. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  with one-way ANOVA. d, day; FAO, fatty acid beta-oxidation; h, hour; luc, luciferase; RANO, ranolazine; THIO, thioridazine; VEH, vehicle.

FAO has been previously connected to anoikis and metastasis, with CPT1A as a key player, in a colorectal cancer model, in which blocking FAO led to ROS accumulation (Wang et al., 2018). Likewise, CD36 is a marker for metastasis-initiating cells that express higher levels of FAO enzymes, and a high-fat diet promotes CD36-positive initiated metastasis (Pascual et al., 2017). We found that CPT1A, CD36, and FAO enzymes were upregulated in detached melanoma cells, and intriguingly, this was independent of their phenotype with respect to differentiated melanocytic or undifferentiated invasive.

Some FA metabolism regulators have been linked to melanoma CTCs and their phenotype. For instance, PGC1 $\alpha$  (PPARGC1A), which acts as a cofactor in the induction of FAO gene expression, is highly expressed in the melanocytic phenotype (Vazquez et al., 2013), and low PGC1 $\alpha$  expression was detected in melanoma CTCs and correlated with increased metastasis (Luo et al., 2016). However, metastasis

induced by PGC1 $\alpha$ -low cells was linked to a mechanism independent of PGC1 $\alpha$ 's role in metabolism.

Single-cell analysis of CTCs isolated from patients with melanoma identified SREBP2 (SREBF2), the master regulator of cholesterol homeostasis, as an important factor in CTC survival, where it induced the expression of transferrin, which could counteract ROS-induced ferroptosis (Hong et al., 2021). Again, the mechanism of SREBP2-mediated CTC survival was not related to a particular metabolic state. Furthermore, the SREBP2 transcriptional program was predominantly expressed in a population of CTCs that shared characteristics with both the melanocytic and invasive phenotypes. Thus, the melanoma differentiation phenotypes might not accurately describe metabolic phenotypes in CTCs. This is in line with our findings that FAO upregulation did not correlate with a particular melanoma differentiation phenotype, and in fact, in both phenotypes, the strongest induced gene in detached cells was the same, medium-chain

acyl-CoA synthetase 4 (*ACSM4*). *ACSM4* is a predicted mitochondrial medium-chain acyl-CoA synthetase (Watkins et al., 2007). *ACSM* activate free FAs to generate acyl-CoA, but the particular role of *ACSM4* in FA metabolism is so far unknown. Potentially, *ACSM4* could enable the activation of free FA released through lipophagy.

As mentioned earlier, FAO is required for metastasis (Pascual et al., 2017; Wang et al., 2018), and we find that thioridazine and ranolazine reduced the prometastatic activity of detached melanoma cells. Thioridazine, a first-generation antipsychotic drug, has other targets such as dopamine receptors and the *KCNH2* potassium channel (Feinberg et al., 2022), but in melanoma, acting as an inhibitor of peroxisomal FAO (Leighton et al., 1984; Van den Branden and Roels, 1985), it could suppress BRAF inhibitor-induced drug tolerance (Shen et al., 2020). Ranolazine on the other hand inhibits acetyl-CoA production from FAs in mitochondria (McCormack et al., 1998).

The cross-talk between peroxisomes and mitochondria is controlled by the carnitine-shuttle enzymes CROT and CRAT, both of which are peroxisomal enzymes (Houten et al., 2020). Nevertheless, depending on alternative splicing, CRAT can also be expressed in mitochondria, and for instance, in skeletal muscle cells, mitochondrial CRAT can act as a distinct metabolic rheostat (Muoio et al., 2012; Seiler et al., 2014). However, it appears that in melanoma cells, CROT and CRAT assume very similar and closely linked functions in FA metabolism-controlled survival because we observed that cell death induced by either carnitine transferase could be rescued by MCFAs. Moreover, a double knockdown of *CROT* and *CRAT* did not increase the impact on survival (not shown).

In summary, our study highlights the relevance of the peroxisomal FA catabolism machinery in metastatic spread, and we reveal CROT and CRAT as important players in melanoma progression and metastasis. Although these carnitine transferases have so far mainly been studied in the context of insulin resistance and cardiac metabolism, our study identifies acyl-carnitine shuttle as a potential therapeutic target in metastatic melanoma.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture, survival, and FACS analysis

Cell lines (501mel, WM266-4, A375, WM9, WM98-1 [all *BRAF* sequence variant, and MV3 [*NRAS* mutated]) were grown in DMEM/25 mM glucose (Gibco, Madrid, Spain) with 10% fetal calf serum. For in vitro treatments (drugs and siRNA sequences are provided in Supplementary Materials and Methods), cells were cultured in suspension in DMEM/5 mM glucose for 72 hours before being replated; after 72 hours, they were analyzed using crystal violet as described (Aldaz et al., 2021). For FACS analysis, cells were cultured in adhesion or suspension in the presence of 25 or 5 mM glucose. At individual time points, cells were harvested, washed, and processed as described (Ferguson et al., 2017).

### RNA sequencing and bioinformatics analysis

RNA was isolated from cells either grown in adherent or suspension conditions for 24 hours using an RNeasy Mini Kit (74104, Qiagen, Barcelona, Spain). The sequencing run was performed on an Illumina HiSeq1500, and data were processed as described (Aldaz

et al., 2021). Ranked genes by log fold change were analyzed by gene set enrichment analysis using hallmark gene set (7.1) obtained from the Molecular Signatures Database (Liberzon et al., 2015) and the gene set enrichment analysis function ClusterProfiler (3.16.1) (Yu et al., 2012).

### Experimental metastasis assays

After treatments (siRNA, drugs), viable 501mel cells stably expressing a luciferase/GFP reporter (Creusot et al., 2008) were injected into the tail vein of male *Rag2*<sup>-/-</sup>; *Il2Rγ*<sup>-/-</sup> in-house bred mice (*Rag2*<sup>tm1.1FlvIl2rgtm1.1Flv/J), The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, RRID:IMSR\_JAX:014593). For imaging, mice were injected in the retro-orbital plexus with 50 μl of 15 mg/ml D-Luciferin, and photon flux was monitored using a PhotonIMAGER imaging system and analyzed using M3Vision software (Biospace Lab, Nesles-la-Vallée, France). All experiments in mice were performed in concordance with the Institutional Animal Care Committee of the University of Navarra (Pamplona, Spain) under protocols R-008c-18GN and R-057-18GN approved by the regional Government of Navarra in Spain.</sup>

### qPCR and Western blotting

RNA extraction, quantitative RT-PCR, and western blotting followed standard protocols and were performed as described (Rowling et al., 2020; Sanz et al., 2000). Primary antibodies were cleaved caspase-3 (5A1E; number 9664, Cell Signaling Technologies, Boston, MA), extracellular signal-regulated kinase 2 (D-2; number sc-1647, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), CROT (NBP1-85501), and CRAT (NBP1-86616, Novus Biologicals, Centennial, CO).

### Data Analysis and Statistics

GraphPad Prism, version 7.00, for Mac operating system (GraphPad Software, San Diego, CA) was used for analysis. One-way ANOVA or Student's *t*-test was used for bar graph analyses, and log-rank test was used for Kaplan–Meier survival analyses. Data represent the results for assays performed from at least three replicates, and values are presented as the mean ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, and \*\*\**P* < 0.001.

### Data availability statement

Datasets related to this article can be found at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE208547> and have been deposited in the Gene Expression Omnibus database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)).

### ORCID

Irene Lasheras-Otero: <http://orcid.org/0000-0002-6806-3716>  
Iker Feliu: <http://orcid.org/0000-0001-9279-3973>  
Alberto Maíllo: <http://orcid.org/0000-0002-3835-9794>  
Haritz Moreno: <http://orcid.org/0000-0002-3640-8978>  
Marta Redondo-Muñoz: <http://orcid.org/0000-0001-9726-7294>  
Paula Aldaz: <http://orcid.org/0000-0003-3301-4866>  
Ana Bocanegra: <http://orcid.org/0000-0002-3508-0595>  
Ana Olias-Arjona: <http://orcid.org/0000-0001-6737-7089>  
Fernando Lecanda: <http://orcid.org/0000-0002-7289-2293>  
Joaquín Fernández-Irigoyen: <http://orcid.org/0000-0001-5072-4099>  
Enrique Santamaría: <http://orcid.org/0000-0001-8046-8102>  
Ignacio M. Larrayoz: <http://orcid.org/0000-0003-1629-152X>  
David Gomez-Cabrero: <http://orcid.org/0000-0003-4186-3788>  
Claudia Wellbrock: <http://orcid.org/0000-0002-3825-6381>  
Silvestre Vicent: <http://orcid.org/0000-0002-9457-6881>  
Imanol Arozarena: <http://orcid.org/0000-0001-6349-2442>

### CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Guadalupe Gutierrez and Beatriz Rodriguez from the Navarrabiomed Biobank for their help with the processing and staining of tumor samples. This work was funded by the Instituto de Salud Carlos III-FEDER through PI16-01911 and PI19/00645 to IA. IA and IML acknowledge support through Miguel Servet II fellowships (CPII20/00011 and CPII20/00029). The Health Department of the Government of Navarra, Spain funded work through reference G<sup>o</sup>Na 71/17. SV is funded by FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades - Agencia Estatal de Investigación (PID2020-116344-RB-100) and by Foundation Spanish Association Against Cancer (PROYE20029VICE). ILO is funded through a Navarrabiomed PhD studentship and the Grupo Español Multidisciplinar de Melanoma (reference Beca\_GEM). FL was funded by the Cancer Research Thematic Network of the Instituto de Salud Carlos III (RTICC RD12/0036/0066, SAF2015-71606R, RTI2018-094507-B-100) financed by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by FEDER. FL was also funded by the la Caixa Foundation, Caja Navarra Foundation, and the Foundation AECC. PA is a recipient of a Sara Borrell postdoctoral fellowship from the Instituto de Salud Carlos III (CD21/00137).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: IA, SV, CW; Formal Analysis: AM, IML, DGC, JFI, ES, CW, SV, IA; Funding Acquisition: FL, SV, IA; Investigation: ILO, IF, HM, MRM, PA, AOA, AM, IML, DGC; Project Administration: IA; Supervision: IA, SV; Writing - Original Draft Preparation: IA, CW; Writing - Review and Editing: PA, FL, SV, CW, IA

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at [www.jidonline.org](http://www.jidonline.org), and at <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.08.038>

## REFERENCES

- Aldaz P, Auzmendi-Iriarte J, Duránte M, Lasheras-Otero I, Carrasco-García E, Zelaya MV, et al. Identification of a dexamethasone mediated radioprotection mechanism reveals new therapeutic vulnerabilities in glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2021;13:361.
- Arozarena I, Wellbrock C. Targeting invasive properties of melanoma cells. *FEBS Journal* 2017;284:2148–62.
- Arozarena I, Wellbrock C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer* 2019;19:377–91.
- Bosc C, Broin N, Fanjul M, Saland E, Farge T, Courdy C, et al. Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nat Commun* 2020;11:4056.
- Buchheit CL, Weigel KJ, Schafer ZT. Cancer cell survival during detachment from the ECM: multiple barriers to tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2014;14:632–41.
- Campbell NR, Rao A, Hunter MV, Sznurkowska MK, Briker L, Zhang M, et al. Cooperation between melanoma cell states promotes metastasis through heterotypic cluster formation. *Dev Cell* 2021;56:2808–25.e10.
- Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 2015;161:1681–96.
- Chapman A, Fernandez del Ama L, Ferguson J, Kamarashev J, Wellbrock C, Hurlstone A. Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion. *Cell Rep* 2014;8:688–95.
- Creusot RJ, Yaghoubi SS, Kodama K, Dang DN, Dang VH, Breckpot K, et al. Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice. *Clin Immunol* 2008;127:176–87.
- Feinberg SM, Fariba KA, Saadabadi A. Thioridazine. Treasure Island, FL: StatPearls; 2022.
- Ferguson J, Smith M, Zudaire I, Wellbrock C, Arozarena I. Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. *Oncotarget* 2017;8:32946–59.
- Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* 2008;19:797–806.
- Hernandez GA, Perera RM. Autophagy in cancer cell remodeling and quality control. *Mol Cell* 2022;82:1514–27.
- Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, Sucker A, Ugurel S, Kumar R, et al. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* 2006;19:290–302.
- Hong X, Roh W, Sullivan RJ, Wong KHK, Wittner BS, Guo H, et al. The lipogenic regulator SREBP2 induces transferrin in circulating melanoma cells and suppresses ferroptosis. *Cancer Discov* 2021;11:678–95.
- Houten SM, Wanders RJA, Ranea-Robles P. Metabolic interactions between peroxisomes and mitochondria with a special focus on acylcarnitine metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020;1866:165720.
- Ju RJ, Stehens SJ, Haass NK. The role of melanoma cell-stroma interaction in cell motility, invasion, and metastasis. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:307.
- Khoja L, Shenjere P, Hodgson C, Hodgetts J, Clack G, Hughes A, et al. Prevalence and heterogeneity of circulating tumour cells in metastatic cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2014;24:40–6.
- Kongara S, Karantz V. The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis. *Front Oncol* 2012;2:171.
- Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A, et al. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov* 2014;4:816–27.
- Le Gal K, Ibrahim MX, Wiel C, Sayin VI, Akula MK, Karlsson C, et al. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Sci Transl Med* 2015;7:308re8.
- Leighton F, Pésico R, Necochea C. Peroxisomal fatty acid oxidation is selectively inhibited by phenothiazines in isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:505–11.
- Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* 2015;1:417–25.
- Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:463–82.
- Luo C, Lim JH, Lee Y, Granter SR, Thomas A, Vazquez F, et al. A PGC1alpha-mediated transcriptional axis suppresses melanoma metastasis. *Nature* 2016;537:422–6.
- McCormack JG, Stanley WC, Wolff AA. Ranolazine: a novel metabolic modulator for the treatment of angina. *Gen Pharmacol* 1998;30:639–45.
- Micalizzi DS, Haber DA, Maheswaran S. Cancer metastasis through the prism of epithelial-to-mesenchymal transition in circulating tumor cells. *Mol Oncol* 2017;11:770–80.
- Müller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 2014;5:5712.
- Muoio DM, Noland RC, Kovalik JP, Seiler SE, Davies MN, DeBalsi KL, et al. Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell Metab* 2012;15:764–77.
- Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini CS, et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* 2017;541:41–5.
- Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddleston SE, Zhao Z, et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* 2015;527:186–91.
- Polioudaki H, Agelaki S, Chiotaki R, Politaki E, Mavroudis D, Matikas A, et al. Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 2015;15:399.
- Rowling EJ, Miskolczi Z, Nagaraju R, Wilcock DJ, Wang P, Telfer B, et al. Cooperative behaviour and phenotype plasticity evolve during melanoma progression. *Pigment Cell Melanoma Res* 2020;33:695–708.
- Sanz V, Arozarena I, Crespo P. Distinct carboxy-termini confer divergent characteristics to the mitogen-activated protein kinase p38alpha and its splice isoform Mxi2. *FEBS Lett* 2000;474:169–74.
- Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Gerhart-Hines Z, Irie HY, et al. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature* 2009;461:109–13.
- Seiler SE, Martin OJ, Noland RC, Slentz DH, DeBalsi KL, Ilkayeva OR, et al. Obesity and lipid stress inhibit carnitine acetyltransferase activity. *J Lipid Res* 2014;55:635–44.
- Shen S, Faouzi S, Souquere S, Roy S, Routier E, Libenciuc C, et al. Melanoma persister cells are tolerant to BRAF/MEK inhibitors via ACOX1-mediated fatty acid oxidation. *Cell Rep* 2020;33:108421.
- Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett* 2008;272:177–85.

Smith MP, Ferguson J, Arozarena I, Hayward R, Marais R, Chapman A, et al. Effect of SMURF2 targeting on susceptibility to MEK inhibitors in melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:33–46.

Smith MP, Rowling EJ, Miskolczi Z, Ferguson J, Spoerri L, Haass NK, et al. Targeting endothelin receptor signalling overcomes heterogeneity driven therapy failure. *EMBO Mol Med* 2017;9:1011–29.

Tasdogan A, Ubellacker JM, Morrison SJ. Redox regulation in cancer cells during metastasis. *Cancer Discov* 2021;11:2682–92.

Trojaniello C, Luke JJ, Ascierto PA. Therapeutic advancements across clinical stages in melanoma, with a focus on targeted immunotherapy. *Front Oncol* 2021;11:670726.

Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, et al. Multi-stage differentiation defines melanoma subtypes with differential vulnerability to drug-induced iron-dependent oxidative stress. *Cancer Cell* 2018;33:890–904.e5.

Van den Branden C, Roels F. Thioridazine: a selective inhibitor of peroxisomal beta-oxidation in vivo. *FEBS Lett* 1985;187:331–3.

Vazquez F, Lim JH, Chim H, Bhalla K, Gimun G, Pierce K, et al. PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased

mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell* 2013;23:287–301.

Wang YN, Zeng ZL, Lu J, Wang Y, Liu ZX, He MM, et al. CPT1A-mediated fatty acid oxidation promotes colorectal cancer cell metastasis by inhibiting anoikis. *Oncogene* 2018;37:6025–40.

Watkins PA, Maiguel D, Jia Z, Pevsner J. Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *J Lipid Res* 2007;48:2736–50.

Wolchok JD, Rollin L, Larkin J. Nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma [published correction appears *N Engl J Med* 2018;379:2185]. *N Engl J Med* 2017;377:2503–4.

Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics* 2012;16:284–7.



**This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>**

## SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

### Cell lines, culture, and reagents

The 501mel cells were a gift from Steve Rosenberg (National Cancer Institute, Bethesda, MD), WM266-4 (*BRAF* mutant) and A375 (*BRAF* mutant) cells were bought from ATCC (Manassas, VA), WM9 (*BRAF* mutant), and WM98-1 (*BRAF* mutant) and MV3 (*NRAS* mutant) cells were a gift from Adam Hurlstone (University of Manchester, Manchester, United Kingdom). All cell lines have been authenticated in 2021. To culture cells in suspension, six-well plates were coated with 1 ml of a sterile solution of 2% agar in water. Once the agar had solidified, half a million cells (125,000 cells/ml) in DMEM, 1% fetal calf serum, and 5 mM glucose were plated per well and cultured for up to 3 days. Treatments lasting 72 hours were initiated 5 hours after plating. At the end of any treatment, cells were collected in 15 ml tubes, spun for 5 minutes at 1,500 r.p.m., and then subjected to the respective method of analysis. For all experiments, cells defrosted from a single vial were used for no more than 1 month or six passages. Thiordiazine (T9025, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), ranolazine, Z-VAD-FMK, liproxstatin-1, and ferrostatin-1 (HY-17401, HY-16658B, HY-12726, and HY-100579, MedChemExpress, Gijon, Spain), octanoic and decanoic acid (W279900 and W236403, Merck, Madrid, Spain) were reconstituted in DMSO.

### Mice

We used *Rag2*<sup>-/-</sup>; *Il2Rγ*<sup>-/-</sup> in-house bred mice (Rag2tm1.1Flvll2rgtm1.1Flv/J, The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, RRID:IMSR\_JAX:014593). All experiments in mice were performed following Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments guidelines and in concordance with the Institutional Animal Care Committee of the University of Navarra (Pamplona, Spain) under the protocol numbers R-008c-18GN and R-057-18GN approved by the regional Government of Navarra in Spain. After injection into the tail vein, mice were randomized by age. After imaging, photon flux was calculated for each mouse using a region of interest at the indicated times for 4 weeks. On day 28, mice were killed, and after D-luciferin injection, ex vivo bioluminescence intensity was measured.

### qRT-PCR and primers

For qRT-PCR experiments, total RNA was extracted and analyzed as described previously (Aldaz et al., 2021). Primer sequences were as follows: ABCD1 forward, 5'-CACCCAGCGCATGTTCTAC and ABCD1 reverse, 5'-ACACATAGCCTCCCAACCTCC; ABCD3 forward, 5'-ACGGGTATTTTCATGGAACTTGGGA and ABCD3 reverse, 5'-GCTCCTTTTCCCTCTTTCTCA; ACAA2 forward, 5'-CATCGGGTGTAGCTGATGGT and ACAA2 reverse, 5'-AGCAGGGACAGGACCAATAC; ACOX1 forward, 5'-GGTTTAAAAATTTGTGACCAGGAGG and ACOX1 reverse, 5'-CGAAGGTGAGTTCCATGACCC; CPT1A forward, 5'-GACGTGGGAAAAATAAGCATGC and CPT1A reverse, 5'-ACATCGGCCCGTGTA

GTAGAGAT; CPT1C forward, 5'-CAGTTGGCTTTTCCTTTCAGT and CPT1C reverse, 5'-AGGCAGCAACTCTTTCATCTTC; CPT2 forward, 5'-AAAGAAGCAGCAATGGGCCAG and CPT2 reverse, 5'-ATGCAGGGTCCAGGTAGAGC; CRAT forward, 5'-GGAAGACGGAGAAGTGGCTG and CRAT reverse, 5'-TGAGTTGGCAGCAAATCGGA; CROT forward, 5'-CGCCAGAGCTTCTCAGACAAC and CROT reverse, 5'-CCTTAGCCCATCGAGTTCGC; EHHADH forward, 5'-ATAGGATTGCCACGCAGAG and EHHADH reverse, 5'-TGCTAAAATACGTCTTCTGAGGT; ETFB forward, 5'-TCC TGCTGGGCAGATCCGA and ETFB reverse, 5'-CGGTACGAATCGTCTCCTGGC; and SLC25A20 forward, 5'-CGACAGCCAAAACCCATCA and SLC25A20 reverse, 5'-GTGTCTGCAGTCGGACCTTG.

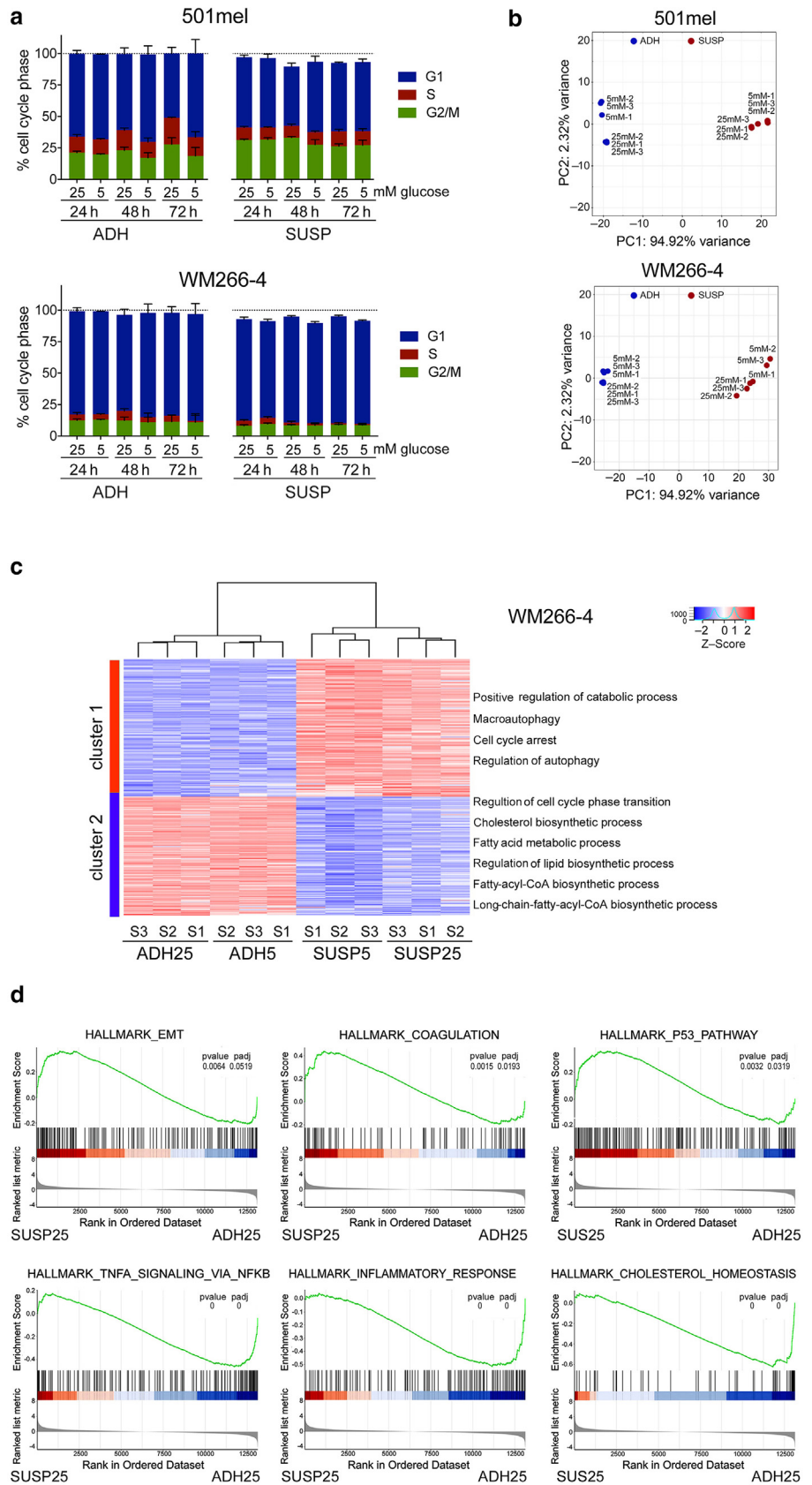
### RNA interference and small interfering RNA sequences

For RNA interference experiments, cells were transfected with small interfering RNAs (siRNAs) using Lipofectamine Transfection Reagent (18324020, Thermo Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom) in adherent conditions. Forty-eight hours later, cells were counted and cultured in suspension for 72 hours. Then, cells were replated and analyzed after 72 hours as described (Aldaz et al., 2021). Human ON-TARGETplus SMARTpools (Horizon Discovery, Waterbeach, United Kingdom) used were ABCD1-targeted siRNA (number L-009605-00), ABCD3-targeted siRNA (number L-009909-00), ACOX1-targeted siRNA (number L-005074-00), CPT1A-targeted siRNA (number L-009749-00), CRAT-targeted siRNA (number L-009524-00), CROT-targeted siRNA (number L-009230-00), EHHADH-targeted siRNA (number L-009822-00), ETFB-targeted siRNA (number L-010494-00), and SLC25A20-targeted siRNA (number L-007480-00). Sequences for individual small interfering RNAs were scrambled control, AAACCGUCGAUUUCCACCGGGUU; siRNA targeting SLC25A20#6, GAAAGCAAGUACACUGGUA; siRNA targeting SLC25A20#7, GAUGUUAUCUGGGCGUAUUC; siRNA targeting SLC25A20#8, GCCAUGAAGUUCUUAAUUC; siRNA targeting SLC25A20#9, CAACUGGGCUGUGGCAAUC; siRNA targeting CROT#6, GUAUAACUCUUUGGCAUUA; siRNA targeting CROT#7, GAACUACUGGCAGCUAUUA; siRNA targeting CROT#9, GUAGUUUACUGGUUAUUAUUC; siRNA targeting CRAT#6, ACUCAUCCCUACAGACCAA; siRNA targeting CRAT#7, GUACCACAGUGACGGGACA; and siRNA targeting CRAT#8, CCAAGAAGCUGCGGUUCA.

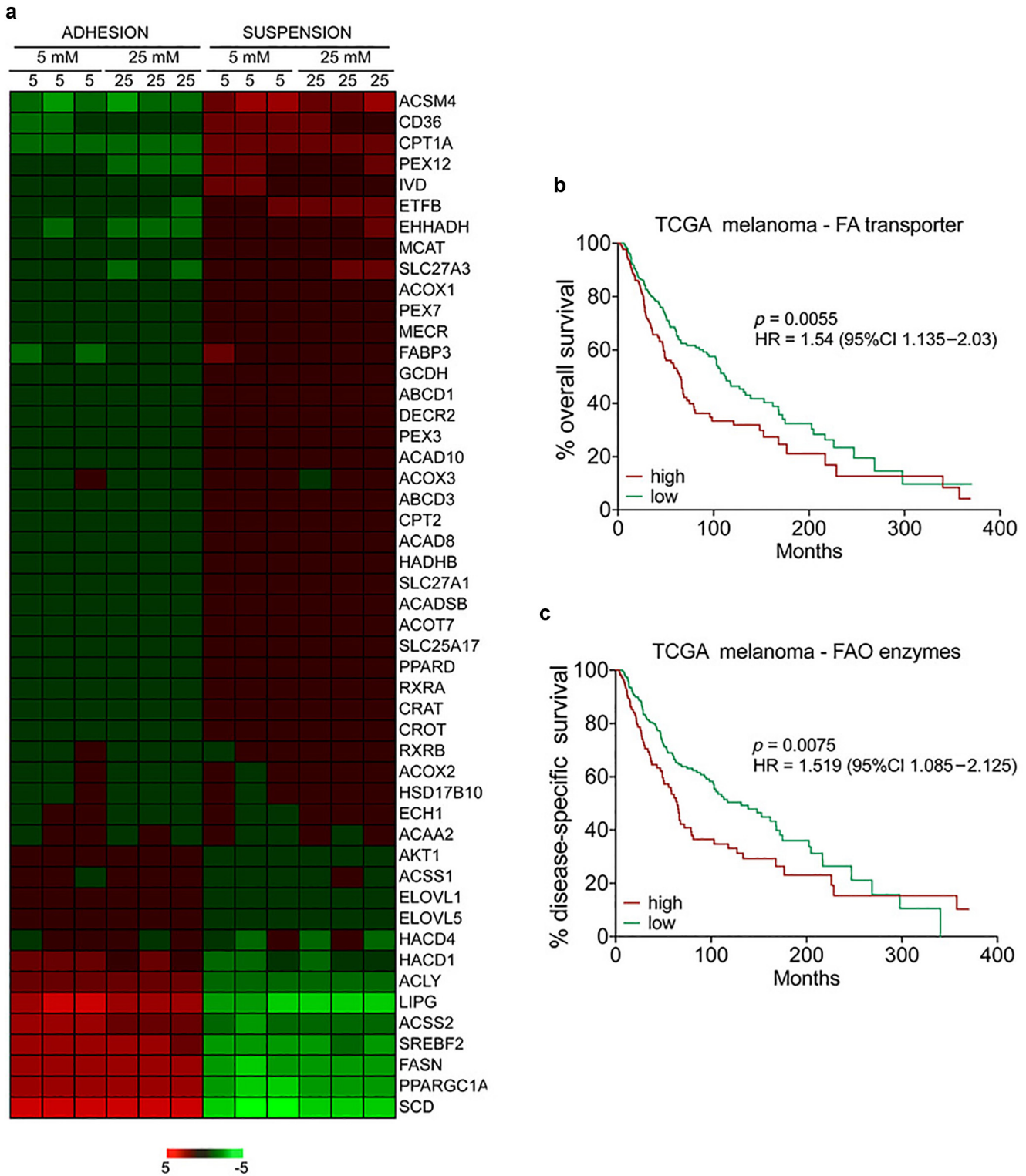
### SUPPLEMENTARY REFERENCES

- Aldaz P, Auzmendi-Iriarte J, Duránte M, Lasheras-Otero I, Carrasco-García E, Zelaya MV, et al. Identification of a dexamethasone mediated radioprotection mechanism reveals new therapeutic vulnerabilities in glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2021;13:361.
- Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* 2015;1:417–25.

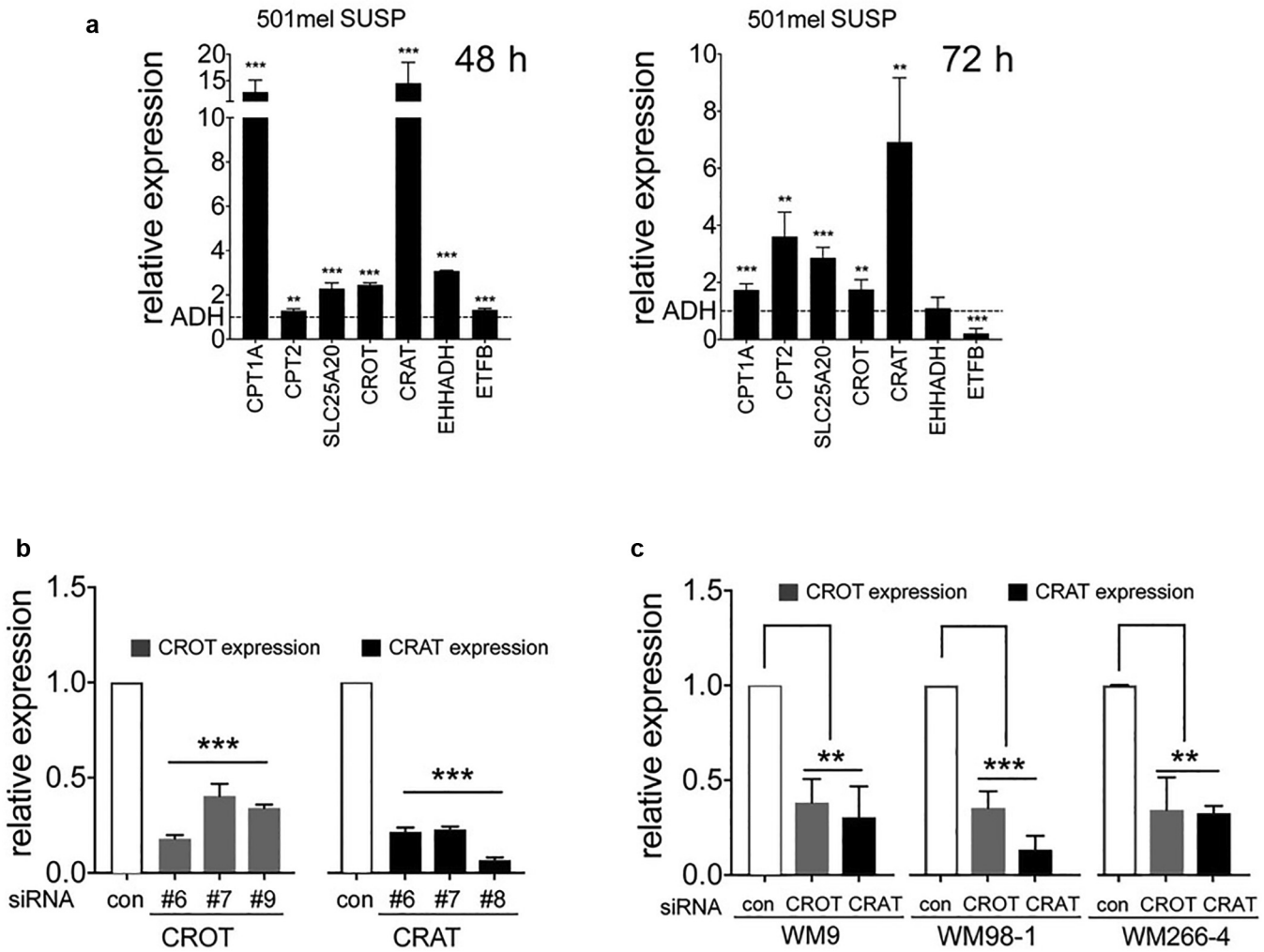
**Supplementary Figure S1. Cell-autonomous characteristics in nonadherent melanoma cells.** (a) Cell cycle profiles of 501mel and WM266-4 cells grown in ADH or SUSP as indicated. (b) Principal component analysis of 501mel and WM266-4 cells cultured in ADH or SUSP in the presence of 25 or 5 mM glucose for 24 hours. (c) Cluster analysis of the transcriptomic profile of WM266-4 cells cultured as indicated. (d) GSEA plots for MSigDB hallmarks (Liberzon et al., 2015) significantly different in 501mel SUSP cells from that in ADH cells grown in the presence of 25 mM glucose. ADH, adhesion; GSEA, gene set enrichment analysis; h, hour; MSigDB, Molecular Signatures Database; PC, principal component; SUSP, suspension.



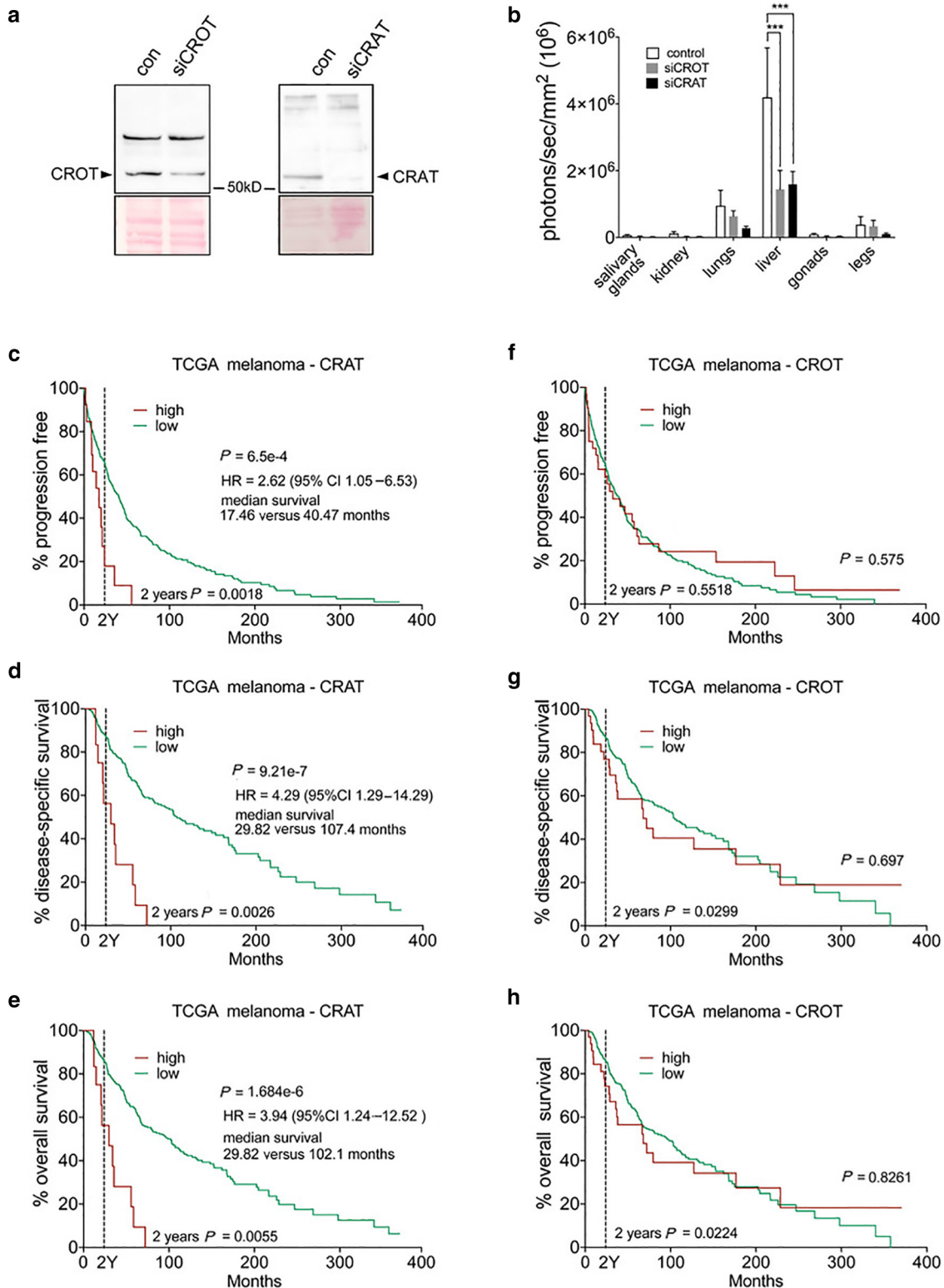




**Supplementary Figure S2. FAO regulator upregulation correlates with poorer survival.** (a) Heatmap of upregulated and downregulated genes in WM266-4 cells cultured as indicated. (b, c) Kaplan–Meier analysis of the TCGA melanoma patient cohort (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Differences in survival for patients whose tumors express high or low levels of (b) CPT1C, SLC25A20, CPT2, CPT1A, SLC27A1, SLC27A3, and CD36 or of (c) CROT, CRAT, ACACB, ACAA2, ECH1, ACADS, ACOT7, ACOT9, ECHS1, and HSD17B10 are shown. Respective genes were analyzed for mRNA expression (z-score = 2.0) in cBioportal, and survival data were extracted and analyzed in GraphPad Prism. CI, confidence interval; CRAT, carnitine acetyltransferase; CROT, carnitine O-octanoyltransferase; FA, fatty acid; FAO, fatty acid beta-oxidation; HR, hazard ratio; TCGA, The Cancer Genome Atlas.



**Supplementary Figure S3. CROT and CRAT in melanoma cells.** (a) qRT-PCR analysis of the indicated genes in 501mel cells grown in suspension for 48 or 72 hours. The expression of cells grown in adhesion was set to 1. (b) qRT-PCR analysis for CROT or CRAT expression in 501mel cells 48 hours after CROT or CRAT RNAi. Expression in cells treated with control siRNA was set 1. (c) qRT-PCR analysis for CROT or CRAT expression in the indicated cell lines after CROT or CRAT RNAi. ADH, adhesion; con, control; CRAT, carnitine acetyltransferase; CROT, carnitine O-octanoyltransferase; h, hour; RNAi, RNA interference; siRNA, small interfering RNA; SUSP, suspension.



**Supplementary Figure S4. CROT and CRAT correlation with melanoma metastasis, progression, and survival.** This figure is related to Figure 4. (a) Western blot for CROT and CRAT 66 hours after RNAi in 501mel-GFP cells. (b) Ex vivo bioluminescence quantification of 501mel tumor burden in the indicated organs. Graphs show the mean ± SEM signal of organs from six (control, CRAT) or five (CROT) mice. \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 with one-way ANOVA. (c–h) Kaplan–Meier analyses of the TCGA melanoma patient cohort (Cancer Genome Atlas, 2015) for (c, f) progression-free, (d, g) disease-specific, and (e, h) overall survival of patients whose tumors express high or low levels of CRAT or CROT, respectively. Respective genes were analyzed in cBioportal, and survival data were extracted and analyzed in GraphPad Prism. CI, confidence interval; con, control; CRAT, carnitine acetyltransferase; CROT, carnitine O-octanoyltransferase; HR, hazard ratio; RNAi, RNA interference; siCRAT, carnitine acetyltransferase-targeted small interfering RNA; siCROT, carnitine O-octanoyltransferase-targeted small interfering RNA; TCGA, The Cancer Genome Atlas.



Pendiente incluir el artículo de tesis cuya contribución es de primera autora que actualmente, en el momento de la solicitud de depósito, se encuentra aceptado en la revista *Nature Metabolism* (NATMETAB-A22107614B). Una vez se disponga de la versión publicada se incluirá en esta tesis en el depósito oficial de Tesis Doctoral.

