



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Caracterización de los mecanismos moleculares y celulares activados por ROR1 durante la progresión de melanoma

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Natalia Brenda Fernández

Director de tesis: Dr. Pablo López Bergami

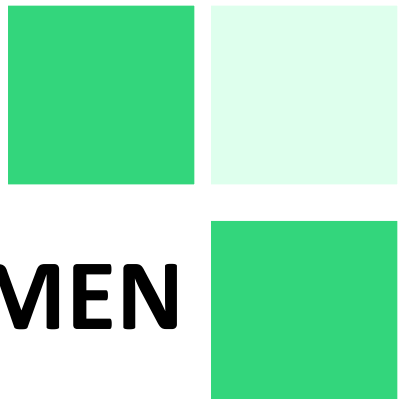
Consejero de estudios: Dr. Norberto Daniel Iusem

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) - CONICET

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2016.

Fecha de defensa: 30 de agosto de 2016.

RESUMEN



Caracterización de los mecanismos moleculares y celulares activados por ROR1 durante la progresión de melanoma

El receptor huérfano de tipo tirosina quinasa, ROR1, se expresa y cumple diversas funciones durante el desarrollo embrionario, mientras que en la adultez, su expresión en los tejidos normales es baja o nula. Sin embargo, se ha descrito que ROR1 se expresa abundantemente en diversos tipos de tumores y leucemias. A su vez, ROR1 actúa como un receptor celular de Wnt5a, un ligando extracelular que ha sido implicado en la tumorigénesis. Es por esto que decidimos determinar la expresión y participación de ROR1 en los procesos celulares y moleculares implicados en la progresión de melanoma.

Nuestros resultados indican que ROR1 se expresa en líneas celulares y muestras tumorales de melanoma humano, y que su expresión se asocia con una menor supervivencia post-recurrencia de los pacientes. Empleando estrategias de pérdida y ganancia de función determinamos que ROR1 favorece el crecimiento celular, tanto de manera dependiente como independiente de un sustrato sólido. A su vez, ROR1 disminuye la adhesión y aumenta la motilidad y migración de las células de melanoma. Estos procesos son mediados, en parte, a través de la regulación positiva de la vía de Akt y del aumento de la expresión de los marcadores mesenquimales N-cadherina y vimentina. La regulación de N-cadherina depende tanto de la presencia de ROR1 como de la activación de la vía de Akt. En conclusión, demostramos que ROR1 contribuye a la progresión de melanoma y constituye un posible nuevo marcador pronóstico y blanco terapéutico.

Palabras clave: Melanoma, Wnt, ROR1, Migración, N-cadherina, PI3K/Akt.

Characterization of the molecular and cellular mechanisms activated by ROR1 during melanoma progression

The Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor 1, ROR1, is primarily expressed during different stages of embryogenesis, while in the adult its expression in the normal tissues is downregulated. However, it has been shown that ROR1 re-express in various types of cancers and leukaemias. Interestingly, ROR1 acts as a Wnt5a receptor, an extracellular ligand that has been implicated in tumorigenesis. For these reasons, we decided to study ROR1 expression in melanoma and its role in the cellular and molecular processes implicated in melanoma progression.

Here we show that ROR1 is aberrantly expressed in melanoma cell lines and tumours, and that its expression associates with poor post-recurrence survival of patients with melanoma. Using gain- and loss-of-function approaches we found that ROR1 enhances both anchorage-dependent and -independent growth of melanoma cells. In addition, ROR1 decreases cell adhesion and increases cell motility and migration. These processes are mediated, in part, by an upregulation of the Akt pathway and an increased expression of the mesenchymal markers N-cadherin and vimentin. The regulation of N-cadherin relies on the presence of ROR1 and the activation of Akt. In summary, we show that ROR1 contributes to melanoma progression and is a candidate biomarker and a prospective therapy target.

Key words: Melanoma, Wnt, ROR1, Migration, N-cadherin, PI3K/Akt.

AGRADECIMIENTOS



Al término de esta etapa, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr este objetivo. El camino no ha sido fácil, pero la experiencia adquirida resulta invaluable.

Esta tesis comenzó gracias a mi director, quien me brindó su voto de confianza inicial y la oportunidad de realizar mi doctorado y con quien logramos, tras mucho esfuerzo, sacar adelante este proyecto.

Es extraño agradecer a las instituciones, pero siento que en algún punto esta tesis forma parte de ellas. Fue gracias a la formación académica recibida en la Universidad de Buenos Aires - Universidad pública, libre y gratuita - que pude afrontar los desafíos que se presentaron en el transcurso de mi doctorado. Al IByME por funcionar como una especie de segundo hogar durante estos años y al CONICET, ANPCyT e INC por ser la fuente de financiamiento estatal que sustentó este trabajo.

Una vez leí que “encontrar un amigo es el éxito de una búsqueda no iniciada”. Me gusta pensarlo así y, de alguna manera, explica cómo se fue armando este hermoso collage de personas que hoy forman parte de mi vida y que atesoro en el alma. Desde lo deportivo a lo académico, desde lo laboral a lo social, desde las relaciones de parentesco a los vínculos elegidos, con todas nuestras similitudes y diferencias, nuestros encuentros y desencuentros, nuestras virtudes y limitaciones, hoy les digo gracias, ustedes nutren y enriquecen mi vida día a día.

Dicen que la familia constituye los cimientos de una sociedad y que es el primer lugar donde se aprenden los valores importantes de la vida. Me siento orgullosa de ser miembro de una familia que, con palabras y ejemplo, me enseñaron a ser una persona fiel, honesta, leal, generosa, libre, agradecida, cariñosa y disparatada. Gracias por la incondicionalidad de siempre, la constante presencia y preocupación, por respetar mis espacios y confiar en mi criterio, y porque, sin necesidad decirlo, sé que me “cuidan la espalda”.

“Lo importante no es lo que han hecho de nosotros, sino lo que hacemos con lo que han hecho de nosotros.”

Jean-Paul Sartre

“Happiness only real when shared.”

Christopher McCandless

ÍNDICE



Resumen.....	2
Agradecimientos	5
Índice.....	8
Abreviaturas	14
Introducción	18
1. Melanoma.....	19
1.1. La piel y el rol de los melanocitos	19
1.2. Incidencia y factores de riesgo	20
1.3. Clasificación y pronóstico.....	21
1.4. Eventos moleculares en la progresión de melanoma	23
1.4.1. Modelo de Clark.....	23
1.4.2. Alteraciones en la vía de MAPK	25
1.4.3. Alteraciones en la vía de PI3K/Akt	26
1.4.4. Alteraciones en moléculas de adhesión	28
1.5. Estrategias terapéuticas para el melanoma metastásico	30
2. La vía de señalización de Wnt	32
2.1. Componentes principales de la vía	32
2.1.1. Ligandos Wnt	32
2.1.2. Receptores y co-receptores Wnt	33
2.1.3. Dishevelled.....	33
2.2. Vía de señalización canónica	34
2.3. Vías de señalización no-canónica	36
2.3.1. Vía de polaridad celular plana	36
2.3.2. Vía de Ca^{2+}	37
2.3.3. Vías alternativas.....	38
2.4. Interacción entre las vías y circuitos de retroalimentación	39
2.5. Rol de Wnt5a en cáncer	40
2.6. Rol de Wnt en el desarrollo de los melanocitos y en la progresión de melanoma	41
3. ROR1.....	44
3.1. Estructura	44
3.2. Actividad tirosina quinasa	46
3.3. Expresión y función	47
3.3.1. Durante el desarrollo	47

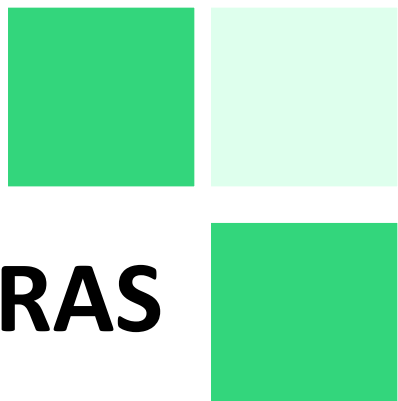
3.3.2. En el adulto	47
3.4. ROR1 en cáncer	48
3.4.1. Expresión	48
3.4.2. Señalización	51
3.5. ROR1 como blanco para terapias contra el cáncer	52
3.5.1. Anticuerpos monoclonales	53
3.5.2. Pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad tirosina quinasa	54
3.5.3. Inmunoterapias.....	54
Hipótesis y Objetivos	56
Hipótesis.....	57
Objetivos	58
Materiales y Métodos	59
1. Reactivos generales	60
2. Construcciones y plásmidos	61
2.1. Diseño y clonado	61
2.1.1. Diseño de los oligonucleótidos	61
2.1.2. Hibridación de los oligos	62
2.1.3. Linealización del vector.....	62
2.1.4. De-fosforilación del vector.....	62
2.1.5. Purificación del vector linealizado	62
2.1.6. Ligación	63
2.1.7. Digestión con BglII	63
2.2. Preparación de bacterias competentes	64
2.3. Transformación de bacterias competentes	64
2.4. Verificación del clonado por PCR de colonias	65
2.5. Purificación de plásmidos por midi-preparación	65
2.6. Secuenciación.....	66
3. Cultivo celular	67
3.1. Líneas celulares	67
3.2. Mantenimiento de células en cultivo	68
3.3. Generación de líneas celulares estables	69
3.3.1. Producción de partículas virales	69
3.3.2. Transducción de células de melanoma	69
3.4. Producción de medios condicionados.....	70

4. Análisis de la expresión génica.....	71
4.1. Extracción de ARN	71
4.2. Reacción de retro-transcripción.....	72
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	72
5. Análisis de la expresión proteica	74
5.1. Citometría de flujo	74
5.2. Extracción de proteínas.....	74
5.3. <i>Western blot</i>	75
5.4. Ensayos de interacción por <i>pull down</i>	76
5.4.1. Obtención de la proteína de fusión GST-RBD	76
5.4.2. Ensayo de interacción	77
5.5. Inmunohistoquímica	77
6. Ensayos celulares y funcionales	79
6.1. Tratamiento con inhibidores y medios condicionados	79
6.2. Ensayos reporteros.....	79
6.2.1. Transfección de las células en cultivo	79
6.2.2. Medición de la actividad luciferasa	80
6.3. Ensayos de apoptosis	80
6.4. Ensayos de proliferación celular	81
6.5. Ensayos clonogénicos.....	82
6.6. Ensayos de adhesión celular	83
6.7. Ensayos de cicatrización de heridas.....	84
6.8. Ensayos de migración celular por <i>transwell</i>	85
Resultados	86
1. Evaluación de la expresión de ROR1, ROR2 y WNT5A en melanoma	87
1.1. Análisis de la expresión de ROR1, ROR2 y WNT5A en líneas celulares de melanoma humano	87
1.2. Análisis <i>in silico</i>	91
1.3. Análisis de la expresión de ROR1 en muestras de tumores de pacientes con melanoma	95
1.4. Evaluación de la asociación entre la expresión de ROR1, ROR2 y WNT5A y la sobrevida de pacientes con melanoma	99
Conclusiones parciales	104
2. Generación de herramientas para el estudio de la relevancia de ROR1 en melanoma	106

2.1.	Inhibición de la expresión de ROR1.....	106
2.2.	Sobrexpresión de ROR1.....	111
	Conclusiones parciales	113
3.	Participación de ROR1 en la vía de señalización de Wnt	114
3.1.	Evaluación de la activación de la vía canónica de Wnt	114
3.2.	Evaluación de la activación de Dvl-2	115
3.3.	Evaluación de la vía de señalización de PI3K/Akt.....	120
3.4.	Estudio de los circuitos de retroalimentación entre WNT5A y ROR1	124
	Conclusiones parciales	129
4.	Evaluación de la participación de ROR1 en la supervivencia celular	130
4.1.	Análisis de la muerte celular por apoptosis	130
4.2.	Análisis de la proliferación celular.....	135
4.3.	Análisis del crecimiento celular independiente de anclaje	138
	Conclusiones parciales	142
5.	Evaluación de la participación de ROR1 en los procesos de adhesión y migración celular	143
5.1.	Análisis de la adhesión celular	143
5.2.	Análisis de la motilidad y migración celular	145
	Conclusiones parciales	150
6.	Evaluación de la expresión de marcadores mesenquimales y epiteliales y su regulación por ROR1 y la vía de PI3K/Akt	151
6.1.	Evaluación de la expresión de N-cadherina, vimentina y E-cadherina	151
6.2.	Regulación de la expresión de N-cadherina por la vía de PI3K/Akt	156
6.3.	Regulación de la expresión de N-cadherina por Wnt5a.....	160
	Conclusiones parciales	162
	Conclusiones Finales	163
	Discusión	166
1.	Expresión de ROR1 en melanoma	167
2.	ROR1 y la supervivencia celular	170
3.	Adhesión, migración y Transición Epitelio-Mesenquimal	173
4.	Regulación de la expresión de N-cadherina por ROR1 y Akt.....	175
5.	ROR1 y Wnt5a	176
6.	ROR1 y su potencial como blanco terapéutico.....	177

Anexos.....	179
I Estadificación TNM para el melanoma cutáneo	180
I.1. Categorias de estadificación TNM para el melanoma cutáneo	180
I.2. Estadificación anatómica por grupos del melanoma cutáneo	181
II Plásmidos.....	182
II.1. Sistema de ARN de interferencia pSUPER retroviral.....	182
II.1.1. Vector pSUPER.retro.puro	182
II.1.2. Plásmido VSV	183
II.1.3. Plásmido GAG	184
II.2. Sistema de sobreexpresión lentiviral	185
II.2.1. Vector VIR-SP	185
II.2.2. Plásmido ENV (VSV-G).....	186
II.2.3. Plásmido PACK (GAG)	187
II.3. Plásmido “TOP Flash”	188
II.4. Plásmido “FHRE”	189
III Oligonucleótidos	190
III.1. Oligonucleótidos para PCR.....	190
III.2. Oligonucleótidos para silenciar ROR1	191
IV Anticuerpos.....	192
IV.1. Anticuerpos primarios.....	192
IV.2. Anticuerpos secundarios	192
V Recetas de soluciones.....	193
VI Datos de expresión y sobrevida de los pacientes.....	195
VI.1. Datos correspondientes al número de acceso GSE46517.....	195
VI.2. Datos correspondientes al número de acceso GSE19234.....	196
VII Comité de Ética	197
VII.1. Aprobación del Comité de Ética del IBYME.....	197
VII.2. Aprobación del Comité de Ética del Instituto Ángel Roffo.....	198
Referencias	199

ABREVIATURAS



Ac-m	Anticuerpos Monoclonales
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AJCC	Comité Conjunto Americano de Cáncer (del inglés <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
AKT o PKB	Proteína Quinasa B (del inglés <i>Protein Kinase</i>)
AML	Melanoma Lentiginoso Acral (del inglés <i>Acral Lentigo Melanoma</i>)
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica (del inglés <i>Cyclic Adenosine MonoPhosphate</i>)
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajeros
ATF2	Factor de Transcripción Activador 2 (del inglés <i>Activating Transcription Factor</i>)
ATP	Adenosina Trifosfato
BAX	Proteína Asociada a Bcl-2 (del inglés <i>Bcl-2-Associated X protein</i>)
Bcl-2	Proteína de Linfoma de Células B 2 (del inglés <i>B-Cell Lymphoma</i>)
CaMK	Quinasa dependiente de Calcio y Calmodulina (del inglés <i>Calcium/calModulin-dependent protein Kinase</i>)
CARTs	Antígenos Quiméricos de Receptores de Células T (del inglés <i>Chimeric Antigen Receptor T cells</i>)
CD	Cúmulo de Diferenciación (del inglés <i>Cluster of Differentiation</i>)
CDK4	Quinasa Dependiente de Ciclina 4 (del inglés <i>Cyclin-Dependent Kinase</i>)
CDKN2A	Inhibidor de Quinasa Dependiente de Ciclina 2A (del inglés <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor</i>)
CIP	Fosfatasa Intestinal de Ternero (del inglés <i>"Calf Intestinal Phosphatase"</i>)
CK	Quinasa de Caseína (del inglés <i>Casein Kinase</i>)
CRD	Dominio Rico en Cisteína (del inglés <i>Cysteine Rich Domain</i>)
CREB	Proteína de Unión a los Elementos de Respuesta al AMPc (del inglés <i>cAMP-Response Element-Binding protein</i>)
CTLA4	Antígeno Asociado a Linfocito T Citotóxico 4 (del inglés <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen</i>)
DAG	Diacilglicerol (del inglés <i>DiAcylGlycerol</i>)
d.e.	Desvío Estándar
Dkk	Dickkopf
Dvl	Dishevelled
E-cadherina	Cadherina Epitelial
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético (del inglés <i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>)
e.e.m.	Error Estándar Medio
ERK	Quinasa Regulada por Señales Extracelulares (del inglés <i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>)
FDA	Administración de Comida y Drogas (del inglés <i>Food and Drug Administration</i>)
FHRE	Elemento Respondedor a FoxO (del inglés <i>Fork Head Response Element</i>)
FoxO	Caja de la cabeza del Tenedor clase O (del inglés <i>Forkhead box class O</i>)
Fzd	Receptores Frizzled
GAPDH	Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (del inglés <i>GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase</i>)

GEO	Colectivo de Expresión Génica (del inglés <i>Gene Expression Omnibus</i>)
GSK-3 β	Quinasa de la Glucógeno Sintasa 3 beta (del inglés <i>Glycogen Synthase Kinase</i>)
GST	Transferasa S de Glutation (del inglés <i>Glutathione S-Transferase</i>)
GPCR	Receptores Acoplados a Proteínas G (del inglés <i>G Protein-Coupled Receptors</i>)
GTP	Guanosina Trifosfato (del inglés <i>Guanosine TriPhosphate</i>)
GTPasa	Fosfatasa de GTP (del inglés <i>Guanosine TriPhosphatase</i>)
HOPP	del inglés <i>Heuristic Online Phenotype Prediction</i>
HuMel	Melanocitos Humanos (del inglés <i>Human Melanocytes</i>)
Ig	Inmunoglobulina
IP	Ioduro de Propidio
IL-2	Interleukina-2
INF- α	Interferón-alfa
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato (del inglés <i>Inositol-1,4,5-trisPhosphate</i>)
JNK	Quinasa del N-terminal de c-Jun (del inglés <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>)
kDa	Kilo Daltons
KNG	Dominio Kringle
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LMM	Melanoma Lentigo Maligno (del inglés <i>Lentigo Maligna Melanoma</i>)
LRP5/6	Lipoproteínas de Baja Densidad 5 y 6 (del inglés <i>Low-density Lipoprotein receptor-Related Protein</i>)
MAPK	Proteína Quinasa Activada por Mitógenos (del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MC	Medio Condicionado
MEC	Matriz Extracelular
MITF	Factor de Transcripción Asociado a Microftalmia (del inglés <i>Micropthalmia-associated Transcription Factor</i>)
mTOR	Blanco de la Rapamicina en Mamíferos (del inglés <i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>)
N-cadherina	Cadherina Neural
NFAT	Factor Nuclear Asociado a Células T (del inglés <i>Nuclear Factor Associated with T cells</i>)
NLK	Quinasa del Tipo Nemo (del inglés <i>Nemo-Like Kinase</i>)
NMM	Melanoma Nodular Maligno (del inglés <i>Nodular Malignant Melanoma</i>)
P-cadherina	Cadherina Placentarias
PCP	Polaridad Celular Plana (del inglés <i>Planar Cell Polarity</i>)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PD-1	Receptor de Muerte Celular Programada 1 (del inglés <i>Programmed cell Death-1 receptor</i>)
PDK1	Quinasa Dependiente de Fosfatidilinositol (del inglés <i>Phosphoinositide-Dependent Kinase</i>)
PI3K	Quinasa de Fosfatidilinositol 3 (del inglés <i>PhosphoInositide 3-Kinase</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2, del inglés <i>PhosphatidyInositol 4,5-bisPhosphate</i>)

PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3, del inglés <i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triPhosphate</i>)
PKC	Proteína Quinasa C (del inglés <i>Protein Kinase C</i>)
PLC	Fosfolipasa C (del inglés <i>PhosphoLipase C</i>)
PRD	Dominio Rico en Prolinas (de inglés: <i>Proline Rich Domain</i>)
PTEN	Fosfatasa y Homólogo de Tensina (del inglés <i>Phosphatase and TENSin homolog</i>)
qRT-PCR	PCR Cuantitativa en Tiempo Real (del inglés <i>Quantitative Real Time PCR</i>)
RBD	Dominio de Unión de la Proteína Rho (del inglés <i>Rho Binding Domain</i>)
RGP	Fase de Crecimiento Radial (del inglés <i>Radial Growth Phase</i>)
RNPII	ARN Polimerasa II
ROCK	Quinasa Asociada a la proteína Rho (del inglés <i>Rho-associated protein Kinase</i>)
ROR α	Receptor Nuclear Huérfano Relacionado al Ácido Retinoico (del inglés <i>Retinoic acid-related Orphan nuclear Receptor</i>)
ROR1/2	Receptores Huérfanos del Tipo Tirosina Quinasa 1 y 2 (del inglés <i>Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor</i>)
RTK	Receptores Tirosina Quinasa (del inglés <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>)
Ryk	Receptores del Tipo Tirosina Quinasa (del inglés <i>Receptor like-tyrosine Kinase</i>)
S/TRD	Dominio Rico en Serinas y Treonina (de inglés: <i>Serine / Threonine Rich Domain</i>)
SAP	Fosfatasa Alcalina de Camarón (del inglés <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)
shARN	ARN cortos en forma de horquilla (del inglés <i>Short Hairpin RiboNucleic Acid</i>)
siARN	ARN pequeños de interferencia (del inglés <i>Small Interfering RiboNucleic Acid</i>)
SFB	Suero Fetal Bovino
sFRP	Proteínas de Secreción Relacionadas a los Receptores Frizzled (del inglés <i>Secreted Frizzled-Related Protein</i>)
SLM	Sobrevida Libre de Metástasis
SPR	Sobrevida Post-Recurrencia
SSM	Melanoma Superficial Difuso (del inglés <i>Superficial Spreading Melanoma</i>)
STAT3	Transductor de la Señal Activador de la Transcripción 3 (del inglés <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
T.amb	Temperatura Ambiente
Tcf/Lef	Factor de Células T / Factor de Unión al Potenciador Linfóide (del inglés <i>T-Cell Factor / Lymphoid Enhancer binding Factor</i>)
TEM	Transición Epitelio-Mesenquimal
TKD	Dominio Tirosina Quinasa (del inglés <i>Tyrosine Kinase Domain</i>)
TKI	Pequeñas Moléculas Inhibidoras de la Actividad Tirosina Quinasa (del inglés <i>Tyrosine Kinase Inhibitors</i>)
UV	Ultravioleta
VE-cadherina	Cadherina Vascular-Endoteliales
VGP	Fase de Crecimiento Vertical (del inglés <i>Vertical Growth Phase</i>)
VSV	Virus de Estomatitis Vesicular (del inglés <i>Vesicular Stomatitis Virus</i>)
WIF-1	Factor Inhibitorio de Wnt 1 (del inglés <i>Wnt Inhibitory Factor</i>)

INTRODUCCIÓN



1. MELANOMA

El melanoma es un de cáncer de piel que se origina a partir de la transformación maligna de un tipo celular denominado melanocitos.

1.1. LA PIEL Y EL ROL DE LOS MELANOCITOS

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y está formada por dos capas principales: la epidermis y la dermis (**Figura 1**). La **epidermis** es la capa más externa y está compuesta principalmente por queratinocitos y, en menor proporción, por los melanocitos, que son los responsables de su pigmentación. Además, se pueden encontrar células del sistema inmune como linfocitos y células de Langerhans. La **dermis** se ubica por debajo de la epidermis y está formada por abundantes fibras de colágeno y elastina, que le brindan a la piel su consistencia y elasticidad característica. En ella se encuentran también otros componentes de la piel como pelos, uñas, glándulas sebáceas y sudoríparas; además de las venas y arterias que irrigan el tejido (Kierszenbaum et al. 2011).

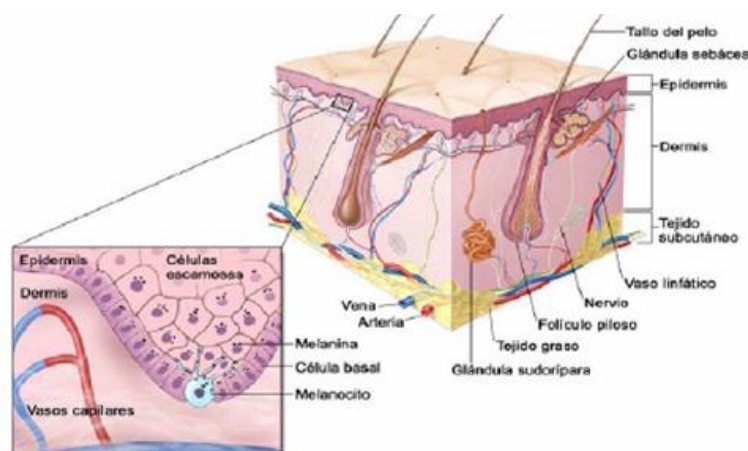


Figura 1. Esquema de la composición de la piel y distribución de los melanocitos. (Adaptada de <http://www.cancer.gov/types/skin>).

Los **melanocitos** se ubican sobre la membrana basal de la epidermis y comprenden sólo el 1% de las células epiteliales (**Figura 1**, panel izquierdo). Cada melanocito se encuentra rodeado por aproximadamente 36 queratinocitos y una célula de Langerhans, formando una unidad funcional (Brenner et al. 2008). Son los encargados de sintetizar la melanina, un pigmento proteico derivado de la L-tirosina que contribuye a la protección contra la luz ultravioleta (UV). La producción de melanina es estimulada por factores producidos por los mismos melanocitos y por las células vecinas en respuesta a la radiación UV, a citoquinas o a hormonas (Slominski et al. 2004). La melanina se esparce por las prolongaciones citoplasmáticas de los melanocitos y es absorbida por los queratinocitos circundantes. Allí se acumula formando una capa protectora alrededor del núcleo de cada célula (Brenner et al. 2008). Este proceso es el responsable del cambio de coloración en la piel luego de la exposición a la luz solar.

1.2. INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO

Los tumores de piel representan el tipo de neoplasia humana más frecuente diagnosticada por año en Estados Unidos. Esto incluye los carcinomas de piel del tipo no-melanoma (originados a partir de los queratinocitos) y los melanomas (o melanoma maligno). Los carcinomas de piel del tipo no-melanoma son curables en casi todos los casos. El melanoma maligno representa sólo el 2-3% de los cánceres de piel, pero debido a su agresividad es el responsable de la mayoría de los fallecimientos ocasionados por este tipo de cáncer. Las tasas de incidencia anuales de melanoma en Estados Unidos son de 1 en 100.000 en personas afro-americanas, 4 en 100.000 en blancos hispanicos (latinos) y 25 en 100.000 en blancos no hispanicos (ACS 2015).

Actualmente, se considera que los factores de riesgo son (Miller et al. 2006; ACS 2015):

- **Predisposición genética.** Ciertas mutaciones pueden generar una predisposición a padecer esta enfermedad. Algunas variantes polimórficas determinan una mayor o menor susceptibilidad a los efectos de la radiación UV. La presencia de lunares también se asocia con una mayor predisposición.
- **Etnicidad.** Las personas de piel pálida presentan polimorfismos que determinan una menor producción de melanina, lo cual aumenta la susceptibilidad a la radiación UV.

- **Grado de exposición a radiación UV.** La radiación UV induce la formación de lesiones en el ADN llamadas fotoproductos que no siempre logran ser reparadas eficientemente y dan origen a mutaciones en la secuencia de ADN (Pfeifer et al. 2005).
- **Inmunosupresión.** Existen casos de pacientes inmunosuprimidos con múltiples nevos melanocíticos. Por lo tanto, los tratamientos o enfermedades que afecten al sistema inmune son considerados importantes factores de riesgo (Zattra et al. 2009).

1.3. CLASIFICACIÓN Y PRONÓSTICO

El sistema de clasificación tradicional se basa en el sitio de origen y el subtipo histológico. Según el sitio de origen, el melanoma puede ser: **cutáneo**, de las **mucosas**, **uveal** (u ocular) o **leptomeníngeo** (derivado de melanocitos presentes en el sistema nervioso central). Los melanomas cutáneos representan aproximadamente el 90% de los casos de melanoma y se dividen en cuatro subtipos histológicos (Clark et al. 1969; McGovern et al. 1973; Porras et al. 1997):

- **Melanoma Superficial Difuso** (SSM, del inglés *Superficial Spreading Melanoma*): es el más frecuente, representa el 70-80% de todos los melanomas. Generalmente se produce en zonas con exposición intermitente al sol (espalda y extremidades) y con una alta densidad de lunares. Se presenta a edades relativamente tempranas (25 a 50 años). Aparece como una lesión asimétrica que puede presentar una gran heterogeneidad cromática (marrón, negro, rosa, gris) y se extiende rápidamente por la superficie de la piel (**Figura 2A**).
- **Melanoma Lentigo Maligno** (LMM, del inglés *Lentigo Maligna Melanoma*): representa el 10% de todos los melanomas. Se observa en zonas de exposición crónica al sol (cara y cuello) y predomina en personas mayores a 50 años. Suele presentarse como manchas aplanadas marrones o negras, de bordes y coloración irregulares. Crecen muy lentamente, y pueden transcurrir entre 5 a 15 años antes de que invadan la dermis (**Figura 2B**).
- **Melanoma Nodular Maligno** (NMM, del inglés *Nodular Malignant Melanoma*): representa el 10-15% de los melanomas en la población caucásica. Son relativamente simétricos y de bordes regulares, y aparecen en regiones similares al SSM. Suele originarse independientemente de los lunares, como nódulos negros o grises, y a menudo presentan

úlceras y sangrado. Es el melanoma más agresivo ya que tiende a expandirse hacia la dermis rápidamente (**Figura 2C**).

- **Melanoma Lentiginoso Acral** (AML, del inglés *Acral Lentigo Melanoma*): es poco frecuente en la población caucásica (5%), pero predomina en indoamericanos, afroamericanos y asiáticos. Aparece en zonas de la piel poco expuestas a radiación solar (palmas de las manos y plantas de los pies y mucosas). Se presenta como manchas de pigmentación muy variable y bordes irregulares, generalmente en personas mayores (**Figura 2D**).

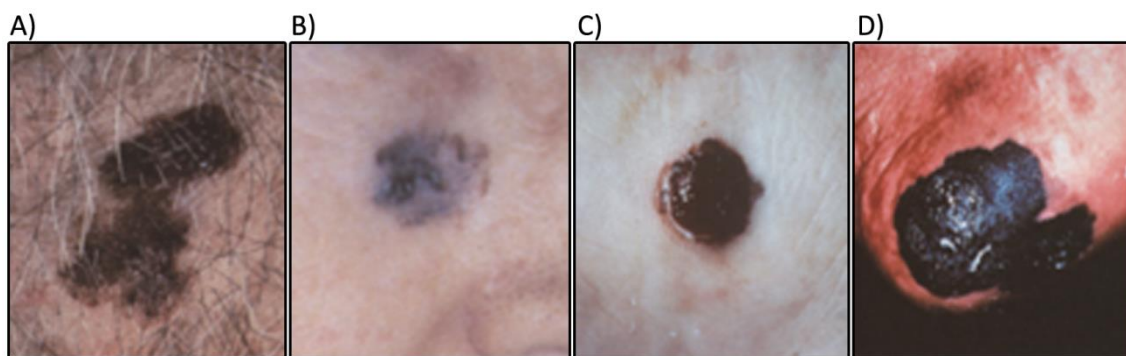


Figura 2. Imágenes representativas de los distintos tipos de melanoma cutáneo. A) Melanoma Superficial Difuso. B) Melanoma Nodular Maligno. C) Melanoma Lentigo Maligno. D) Melanoma Lentiginoso Acral. Adaptada de (Porras et al. 1997).

La aplicación clínica de este tipo de clasificación es muy limitada, ya que carece de valor pronóstico (Balch 1992). En el año 2009, el Comité de Estadificación de Melanoma del AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) desarrolló el sistema de clasificación TNM para los melanoma cutáneos; sus iniciales derivan de Tumor, Nódulos y Metástasis. Este sistema combina información del tumor primario (espesor, índice mitótico y presencia de ulceración), el grado de invasión de los ganglios linfáticos (regionales o distantes) y la presencia de metástasis en otros órganos (ver **Tabla I.1.** en Anexos, sección I. Estadificación TNM para el Melanoma). Estos parámetros poseen valor pronóstico y permiten determinar el grado de evolución de la enfermedad (Balch et al. 2009).

En la **Tabla I.2.** (ver en Anexos, sección I. Estadificación TNM para el Melanoma) se detallan las características de cada estadio, correspondiendo el I y II a los pacientes que no muestran evidencias de metástasis regionales o distantes (N0 y M0), y se diferencian entre sí por el espesor del tumor, el índice mitótico y la presencia/ausencia de ulceración. El estadio III incluye a los pacientes que con metástasis regionales en los ganglios linfáticos (N>N0 y M0), y estadio IV a los pacientes con metástasis distantes en uno o más sitios (M1).

En el 70% de los casos los tumores son detectados en estadios tempranos (IA, IB y IIA) y se resuelven mediante la extirpación quirúrgica de la lesión. Las tasas de supervivencia a diez años se encuentran entre un 92% y 80% (T1 y T2 respectivamente). Sin embargo, en fase metastásica, el pronóstico es muy pobre debido a su elevada agresividad. La tasa de sobrevida a cinco años de los pacientes en estadio III varía entre un 70% (T1-4 N1a M0) y un 39% (T1-4 N3 M0). En el estadio IV la sobrevida a 5 años es de sólo un 25% a 8% (Balch et al. 2009). Estos porcentajes reflejan la importancia del diagnóstico precoz para el control de esta enfermedad.

1.4. EVENTOS MOLECULARES EN LA PROGRESIÓN DE MELANOMA

1.4.1. Modelo de Clark

En 1984, Clark y colaboradores propusieron un modelo que describe los cambios histológicos que acompañan la progresión gradual de los melanocitos normales a melanoma (**Figura 3**) (Clark et al. 1984). Este modelo comienza con una población clonal de melanocitos que prolifera de manera aberrante y forma una lesión hiperplásica, denominada lunar o **nevo**. En cierto punto del crecimiento, las células del nevo entran en un estado de senescencia y la lesión no avanza. Este estado puede durar desde algunos años hasta varias décadas, y si eventualmente se supera la barrera de la senescencia, el lunar progresa hacia una etapa de expansión superficial o Fase de Crecimiento Radial (**RGP**, del inglés *Radial Growth Phase*). En esta etapa, la lesión queda confinada en la epidermis y posee un bajo potencial invasivo. Esta constituye la primera fase del melanoma maligno. Posteriormente, las células atraviesan la membrana basal y adquieren la capacidad de crecer en la dermis formando un nódulo expansivo. A esta etapa se la conoce como la Fase de Crecimiento Vertical (**VGP**, del inglés *Vertical Growth Phase*) y suele seguir a la RGP, aunque a veces ocurre desde el inicio como en

el caso del melanoma nodular (Miller et al. 2006). La **metástasis** se desarrolla cuando las células se disocian de la lesión, migran al estroma circundante e invaden vasos arteriales y linfáticos, para luego formar un tumor en algún sitio distante (Haass et al. 2005).

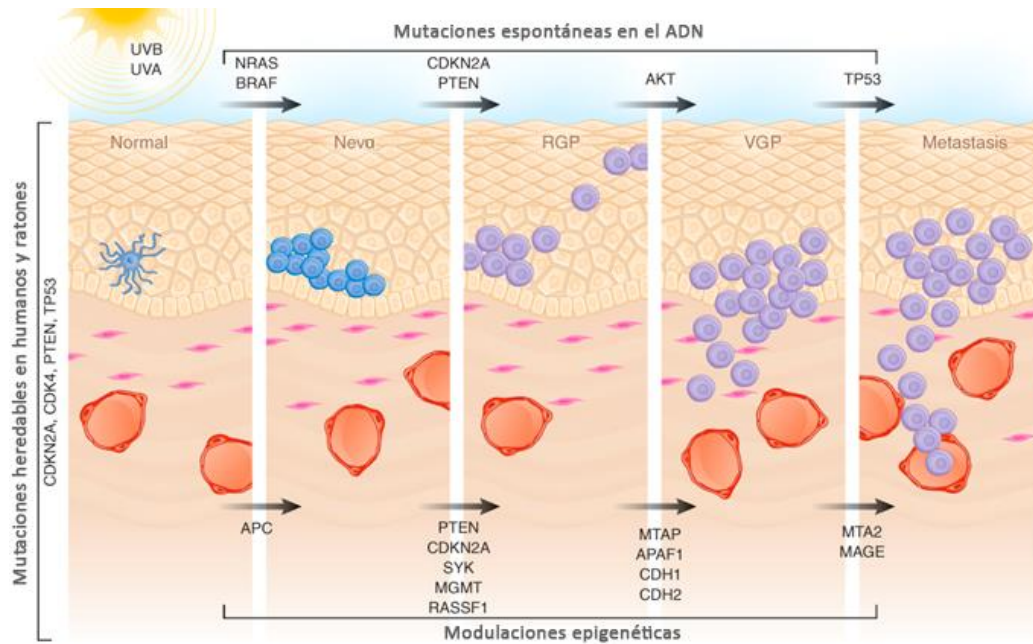


Figura 3. Modelo de Iniciación y Progresión de Melanoma. Se ilustran las etapas de iniciación y progresión tumoral desde un melanocito a un melanoma maligno y metastásico, indicando en cada etapa las alteraciones genéticas y epigenéticas más frecuentes. Adaptada de (Zaidi et al. 2008).

En la actualidad, se sabe que muchos de estos cambios histológicos se relacionan con alteraciones genéticas que afectan la señalización celular de los melanocitos, contribuyendo a la transformación y al desarrollo tumoral. En general, mutaciones en los oncogenes B-Raf y N-Ras dan inicio a la formación del nevo benigno. La progresión hacia un fenotipo invasivo resulta de la acumulación de mutaciones adicionales en genes supresores de tumores, como CDKN2A (del inglés *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor*) y PTEN (del inglés *Phosphatase and TENSin homolog*), y en otros genes que favorecen la proliferación y migración celular (Shain et al. 2015).

1.4.2. Alteraciones en la vía de MAPK

Se ha demostrado que la activación constitutiva de la vía de señalización de las MAPKs (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) constituye una de las primeras alteraciones en la señalización de los melanocitos, y está presente desde la formación del nevo (Pollock et al. 2003). Esta vía regula procesos vitales como la proliferación y la diferenciación celular (Meier et al. 2005).

Las mutaciones más frecuentes que provocan la activación de esta vía en melanoma ocurren en la quinasa B-Raf (50-70%) y, en menor medida, en la GTPasa N-Ras (15-30%); éstas son mutuamente excluyentes (Albino et al. 1989; Davies et al. 2002; Omholt et al. 2003). Ambas mutaciones llevan a la activación de la quinasa ERK (del inglés *Extracellular signal-Regulated Kinase*), la cual posee más de 50 sustratos citoplásmicos y nucleares, incluyendo factores de transcripción como c-Myc, c-Fos, Mitf, ETS y Hif1 α entre otros (Meier et al. 2005; Fecher et al. 2007). Estos últimos afectan la expresión de numerosos genes, quienes serán los responsables de regular los procesos celulares de esta vía (**Figura 4**, panel izquierdo).

Los tumores que no tienen mutaciones en BRAF o NRAS (20-30%) presentan alteraciones en otros genes con funciones similares, como mutaciones activadoras en c-KIT, HRAS, CRAF, GNA11, o de pérdida de función en NF1 (inhibidor de RAS), entre otros (Hodis et al. 2012).

La mutación más frecuente de BRAF en melanoma es la V600E (sustitución de valina por ácido glutámico en el residuo 600) que se encuentra en el dominio quinasa y le confiere una alta actividad catalítica (Davies et al. 2002). Dicha mutación inicialmente estimula la proliferación de los melanocitos. Luego, las células que conforman el lunar entran en estado de senescencia, ya que esta mutación también induce la expresión de la proteína p16^{INK4A}, un inhibidor del ciclo celular (Michaloglou et al. 2005). Por consiguiente, mutaciones adicionales serán necesarias para continuar el desarrollo tumoral.

El 50% de los melanomas posee deleciones en el locus del gen CDKN2A que codifica para la proteína p16^{INK4A} (Flores et al. 1996; Curtin et al. 2005). En otros casos, p16^{INK4A} se encuentra inactivada por mutaciones puntuales o metilación del promotor, o silenciada por la sobreexpresión de su inhibidor transcripcional, ID1 (Gray-Schopfer et al. 2007). Los genes de CDK4 y Ciclina D1 también presentan frecuentes mutaciones y amplificaciones en melanoma (Curtin et al. 2005; Gray-Schopfer et al. 2007).

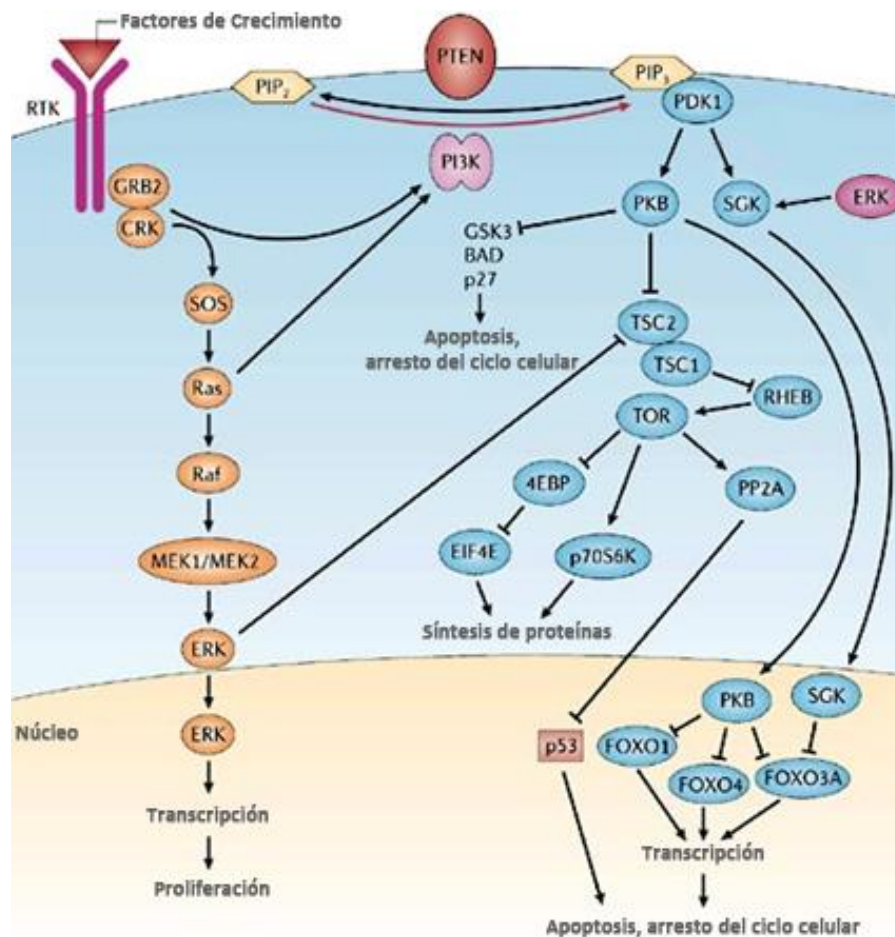


Figura 4. Principales vías de señalización activas en melanoma. Panel izquierdo: Vía de señalización de las MAPKs. Panel derecho: Vía de señalización de PI3K/AKT. Ver detalle en el texto. Adaptada de (Cully et al. 2006).

1.4.3. Alteraciones en la vía de PI3K/Akt

La vía de PI3K (del inglés *PhosphoInositide 3-Kinase*) / Akt (también conocida como PKB, del inglés *Protein Kinase B*) se encuentra frecuentemente alterada en melanomas avanzados. Aproximadamente el 70% de los melanomas metastásicos poseen niveles elevados de Akt activa, que a su vez, incrementan con la progresión del tumor (Stahl et al. 2004; Dai et al. 2005).

PI3K es la quinasa que fosforila y convierte al fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂, del inglés *Phosphatidylinositol 4,5-bisPhosphate*) en fosfatidilinositol trifosfato (PIP₃); este proceso es

regulado negativamente por la proteína supresora de tumores, PTEN. El aumento de PIP3 activa a la quinasa PDK1 (del inglés *Phosphoinositide-Dependent Kinase*), la cual fosforila y activa a otras proteínas quinasas, entre ellas Akt (**Figura 4**, panel derecho). Uno de los principales blancos de Akt es el factor de transcripción FoxO (del inglés *Forkhead box class O*), encargado de mediar la apoptosis y el arresto del ciclo celular. La fosforilación de FoxO por Akt impide su translocación al núcleo, inhibiendo así su función como factor de transcripción. De esta manera, la activación de Akt lleva a un aumento de la proliferación y supervivencia celular (Chang et al. 2003), y a cambios en la expresión de moléculas de adhesión que facilitarán la invasión de las células tumorales a otros tejidos (Meier et al. 2005).

Múltiples factores determinan la activación de la vía PI3K/Akt en melanoma. Entre un 10-30% de los tumores presentan inactivado el gen de PTEN por mutación o delección (Aguissatou et al. 2012; Hodis et al. 2012). Sin embargo, algunos estudios indican que este porcentaje podría ascender a un 20-60%, si se tienen en cuenta los mecanismos de silenciamiento epigenéticos por metilación del promotor (Mirmohammadsadegh et al. 2006) o regulación negativa por micro ARNs (Karreth et al. 2011). La inactivación de PTEN coincide con la presencia de mutaciones en BRAF pero no en NRAS. Dado que mutaciones en NRAS activan tanto la vía MAPK como la de PI3K (ver **Figura 4**) se considera que la activación de ambas vías es necesaria para la progresión de melanoma (Curtin et al. 2005).

La activación de Akt puede originarse también por mutaciones activadoras en PI3K (3% de melanomas metastáticos) (Omholt et al. 2006) o por la sobreexpresión de Akt3, en general por amplificación del gen (Gray-Schopfer et al. 2007). A su vez, mutaciones en NRAS y la estimulación por factores autócrinos y parácrinos, contribuyen a la activación de esta vía (Meier et al. 2005).

Por otro lado, varios genes que codifican para los miembros de la familia de receptores tirosina quinasa (RTK; del inglés *Receptor Tyrosine Kinase*) se encuentran frecuentemente mutados en melanoma, como EGFR (del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*), ERBB3 y 4, EPHA2 (del inglés *EPHrin type A Receptor*), FGFR1 (del inglés *Fibroblast Growth Factor Receptor*), IGF1R (del inglés *Insulin like Growth Factor Receptor*), c-KIT y PDGFRA (del inglés *Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha*), entre otros. Estas mutaciones llevan a la sobreexpresión y/o aumento de la fosforilación de los RTKs, lo cual se traduce en la activación de las vías de MAPKs y PI3K/AKT (Easty et al. 2011).

1.4.4. Alteraciones en moléculas de adhesión

Como mencionamos anteriormente, durante la VGP las células de melanoma adquieren la capacidad de atravesar la membrana basal hacia la dermis y luego, de migrar al estroma e invadir vasos arteriales y linfáticos generando metástasis (ver **Figura 3**). Todos estos cambios están relacionados con alteraciones en la adhesión celular (Haass et al. 2005).

Las moléculas de adhesión permiten a las células interactuar con sus vecinas y con el estroma circundante, formando así una unidad funcional. Entre las moléculas que modulan este proceso se encuentran las proteínas de la familia de las cadherinas y de las integrinas.

Las **cadherinas** son un grupo de glicoproteínas de transmembrana responsables de las uniones intercelulares (célula-célula) que participan en la señalización intracelular. Las cadherinas clásicas se dividen en 4 subtipos: epiteliales (E-cadherina), neurales (N-cadherina), vasculo-endoteliales (VE-cadherina) y placentarias (P-cadherina) (Bonitsis et al. 2006).

Los melanocitos y queratinocitos interaccionan a través de E-cadherina. En condiciones normales, el contacto de los melanocitos con los queratinocitos indiferenciados de la membrana basal inhibe la proliferación de los melanocitos y mantiene el equilibrio entre ambos tipos celulares (Valyi-Nagy et al. 1993). La progresión de melanoma está asociada a una pérdida en la comunicación con los queratinocitos, debida a la disminución de E-cadherina y al aumento de N-cadherina. Esto le permite a las células de melanoma interactuar con otros tipos celulares, como los fibroblastos de la dermis y el endotelio vascular (Hsu et al. 2000; Haass et al. 2005). Este fenómeno se conoce como *switch* o intercambio de cadherinas, y es una de las principales características del proceso conocido como Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM) (**Figura 5**).

Por otro lado, N-cadherina media la progresión tumoral induciendo señales que favorecen la proliferación, la migración y la invasión celular. Su elevada expresión es característica en muchos carcinomas invasivos, incluyendo los melanomas metastásicos (Cavallaro et al. 2004; Alonso et al. 2007).

Las **integrinas** son otro tipo de proteínas de transmembrana. Actúan como receptores mediando las interacciones del citoesqueleto de actina con distintos componentes de la Matriz ExtraCelular (MEC) como fibronectina, colágeno y laminina (Kuphal et al. 2005). La progresión

de melanoma también se asocia con un cambio en el perfil de expresión de las integrinas en las células (Haass et al. 2005; Kuphal et al. 2005).

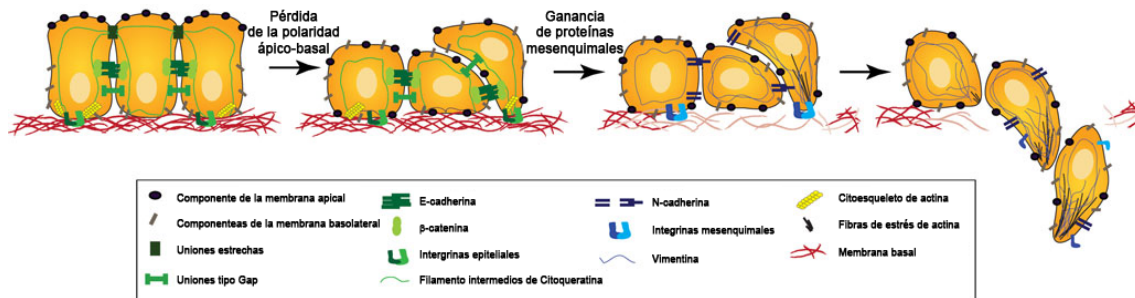


Figura 5. Transición Epitelio-Mesenquimal. Durante este proceso, las células epiteliales pierden su polaridad apico-basal. Las uniones estrechas se disuelven y permiten el intercambio de proteínas de membrana apicales y basolaterales. Las uniones adherentes se desensamblan y E-cadherina es reemplazada por N-cadherina. Ocurren cambios de expresión entre integrinas de células epiteliales a integrinas de interacción con la matriz extracelular. Las citoqueratinas y filamentos intermedios epiteliales son reemplazados por vimentina. A su vez, la membrana basal es degradada y la célula puede invadir y moverse al estroma circundante. Adaptado de (Micalizzi et al. 2010).

En melanoma, además de las vías de señalización mencionadas, se encuentran activas de manera aberrante muchas otras vías de señalización. Entre ellas pueden mencionarse las vías de JAK-STAT, TGF- β , Notch y Wnt, esta última se detalla en la siguiente sección (Kortylewski et al. 2005; Larue et al. 2006; Hardy et al. 2010; Busse et al. 2011). Aunque muchas de estas alteraciones tienen consecuencias similares, cada tumor presenta características moleculares distintivas y por ende distinta será la respuesta a las terapias (Curtin et al. 2005). Esto pone en evidencia la necesidad de la caracterización molecular de cada tumor y el desarrollo de terapias específicas diseñadas para cada paciente.

1.5. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL MELANOMA METASTÁSICO

Las alteraciones en las vías de señalización descritas anteriormente, sólo representan una pequeña muestra de la complejidad molecular presente en las células de melanoma. Se trata de una enfermedad agresiva, con gran potencial metastásico y una notable resistencia a los agentes citotóxicos utilizados en las terapias quimioterapéuticas convencionales (Luke et al. 2013).

Como mencionamos previamente, los melanomas diagnosticados en estadios tempranos pueden extirparse quirúrgicamente, lo cual resulta en la curación del paciente en la mayoría de los casos.

Para los melanomas en estadio IV o tumores irresecables, las únicas drogas disponibles durante décadas fueron: dacarbazina (agente citostático), INF- α (INterFerón) e IL-2 (InterLeukina), presentando todas muy baja tasa de respuesta (Luke et al. 2013). El tratamiento con dacarbazina como agente único, por ejemplo, presenta una tasa de respuesta del 10-20%, que resultan ser transitorias y parciales (Jiang et al. 2014). A su vez, no se han demostrado efectos de la dacarbazina sobre la sobrevida media y su uso en la actualidad es simplemente paliativo (Middleton et al. 2000; Bhatia et al. 2009).

En los últimos años han surgido nuevos tratamientos que demostraron una mejora en las tasas de respuesta en ensayos clínicos. Los nuevos agentes, disponibles a partir del 2011, son:

- **Vemurafenib:** es un inhibidor de BRAF mutante V600E. En ensayos iniciales presentó una sobrevida a 6 meses de un 84% (versus 64% en el grupo control) (Chapman et al. 2011), lo cual suscitó su rápida aprobación por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*, USA). Sin embargo, entre los 6 a 9 meses luego de iniciado el tratamiento, los pacientes comienzan a desarrollar resistencia a este fármaco (Kudchadkar et al. 2013). En el año 2013, se aprobó el uso de **dabrafenib**, un inhibidor alternativo de BRAF-V600E que compite con el ATP por la unión al sitio catalítico. Esta droga también mostró superioridad frente al tratamiento con dacarbazina tanto en la tasa de respuesta como en la sobrevida libre de eventos (Hauschild et al. 2012).
- **Ipilimumab:** es un anticuerpo monoclonal que bloquea la función de CTLA4 (del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen*), regulador negativo de la activación de los linfocitos T. El bloqueo de CTLA4 aumenta la activación y proliferación de células T que atacarían y ayudarían a eliminar el tumor (O'Day et al. 2007). Ipilimumab presenta una tasa de respuesta baja (~15%) y se manifiesta un tiempo después del inicio de la terapia (6 meses o

más). Sin embargo, en aquellos pacientes que responden a esta droga, se logra controlar el tumor por largos períodos, alcanzando entre 3 a 10 años de supervivencia (Hodi et al. 2010). La ventaja de Ipilimumab es que puede ser aplicado a pacientes con o sin mutaciones en BRAF, con tasas de respuesta similares en pacientes con o sin tratamiento previo (30% vs. 33% aproximadamente) (Robert et al. 2011; Shahabi et al. 2012). La desventaja es que los pacientes pueden presentar severos efectos secundarios, que en muchos casos obligan a abandonar el tratamiento (Hodi et al. 2010).

- **Nivolumab, Lambrolizumab, Pembrolizumab:** anticuerpos bloqueantes de PD-1 (del inglés *Programmed cell Death-1 receptor*), un receptor inhibitorio de la activación de linfocitos T. Actúa de manera similar que el ipilimumab. Distintos ensayos clínicos evidenciaron tasas de respuesta similares (~38%) en pacientes con o sin tratamiento previo (ipilimumab o inhibidores de BRAF), y una sobrevida media libre de eventos de 8 meses aproximadamente. También mostraron superioridad frente a la quimioterapia convencional en pacientes recidivantes (Hamid et al. 2013; Weber et al. 2015). Actualmente se los recomienda como tratamiento de segunda línea luego del desarrollo de resistencia a ipilimumab (Dummer et al. 2015).

Estos nuevos tratamientos, usados como agentes únicos o en combinación con inhibidores de la quinasa MEK (como binimetinib, cobimetinib y trametinib), han mostrado importantes y alentadoras respuestas. La quimioterapia convencional se considera hoy en día un tratamiento alternativo y sólo se utiliza cuando los otros agentes no pueden ser aplicados o no ofrecen beneficio alguno (Dummer et al. 2015). En la actualidad, la discusión se basa principalmente en determinar cuál es la secuencia y combinación óptima para la administración de dichos agentes terapéuticos (Sullivan et al. 2015).

El avance alcanzado en los últimos años demuestra la importancia de determinar los factores moleculares que intervienen en el desarrollo del melanoma metastásico, con el fin de diseñar nuevas estrategias terapéuticas y establecer pautas para utilizar, en forma racional, los distintos fármacos en cada paciente.

2. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE WNT

El término “Wnt” resulta de la fusión del nombre de los genes: “Wingless” e “Int-1”. En 1982, el proto-oncogen “Int-1” de ratón fue el primer miembro descrito de la familia de Wnt (Nusse et al. 1982). Cinco años después se descubrió que era homólogo al gen “wingless”, uno de los principales reguladores de la polaridad segmentaria de *Drosophila melanogaster* (Baker 1987).

2.1. COMPONENTES PRINCIPALES DE LA VÍA

2.1.1. Ligandos Wnt

Los ligandos Wnt constituyen una amplia familia de glicoproteínas ricas en cisteínas que se encuentran conservadas evolutivamente. Su tamaño oscila entre 350 a 400 aminoácidos, con un péptido señal hidrofóbico en el amino terminal. La glicosilación es importante para su correcto plegamiento, secreción y actividad biológica (Smolich et al. 1993).

En el humano existen al menos 19 miembros de la familia Wnt. Durante el desarrollo, cada uno posee un patrón de expresión temporal y espacial característico (Cadigan et al. 1997). Numerosos experimentos utilizando ratones *knockout* para los distintos miembros de la familia han demostrado la importancia de estas proteínas durante el desarrollo (Weeraratna 2005).

Los Wnts interaccionan con distintos receptores y co-receptores, de manera autócrina o parácrina, y activan diversas vías de señalización (la vía canónica y las vías no-canónicas, ver en detalle más adelante). La actividad y función de cada Wnt depende del contexto celular, ya que la combinación entre los diferentes Wnts y sus receptores y/o co-receptores es la que determina el camino de señalización que se activará río abajo. Sin embargo, generalmente Wnt1, Wnt3a y Wnt8 activan la vía canónica, mientras que Wnt5a y Wnt11 forman parte de las vías no-canónicas (Kikuchi et al. 2012).

2.1.2. Receptores y co-receptores Wnt

La familia de receptores Frizzled (Fzd) pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés *G Protein-Coupled Receptors*). Existen 10 miembros en el humano y fueron los primeros receptores de Wnts identificados (Bhanot et al. 1996; Wang et al. 2006).

En su estructura se pueden identificar tres regiones (Wang et al. 2006): una región amino-terminal extracelular con un dominio rico en cisteína (CRD, del inglés *Cysteine Rich Domain*) que media la interacción con las proteínas Wnt y otros ligandos (Hsieh 2004; Janda et al. 2012), una región de siete pasos transmembrana, y un extremo carboxi-terminal que comunica las señales río abajo en el citoplasma.

Además de los receptores Fzd, existen varias proteínas de un paso transmembrana que actúan como receptores alternativos o co-receptores de la señalización Wnt. Entre ellos se encuentran: las proteínas relacionadas a receptores de lipoproteínas de baja densidad 5 y 6 (LRP5/6, del inglés *Low-density Lipoprotein receptor-Related Protein*), los receptores del tipo tirosina quinasa (Ryk, del inglés *Receptor like-tYrosine Kinase*) y los receptores huérfanos del tipo RTK 1 y 2 (ROR, del inglés *RTK-like Orphan Receptor*) (Green et al. 2008; MacDonald et al. 2009; Fradkin et al. 2010). Los receptores ROR se describen en mayor detalle en la siguiente sección.

Los receptores Fzd son comunes a la señalización tanto de la vía canónica y no canónica de Wnt, mientras que los LRP5/6 prevalecen en la vía canónica y los Ryk y RORs en las no-canónicas (Niehrs 2012).

2.1.3. Dishevelled

Tanto en la vía canónica como en la no canónica, la interacción de Wnt con su/s receptor/es induce el reclutamiento y la activación de la proteína Dishevelled (Dvl). Dvl es una fosfoproteína multifuncional que fue descrita originalmente en *Drosophila melanogaster*. En humanos existen 3 proteínas Dvl (codificadas por los genes DVL1, DVL2 y DVL3), que presentan

un alto grado de similitud entre sí. Dvl2 es el miembro más abundante de los tres (Kafka et al. 2014).

Las proteínas Dvl poseen tres dominios conservados (Boutros et al. 1998; Kafka et al. 2014):

- **DIX** en el extremo amino-terminal. Está compuesto por 82-85 aminoácidos y se encuentra presente también en la proteína Axin.
- **PDZ** en la región central. Está formado por 73 aminoácidos y provee un sitio de anclaje para diversas proteínas quinasas, fosfatasas y adaptadores de interacciones proteína-proteína.
- **DEP** en el extremo carboxi-terminal. Consiste de 75 aminoácidos y permite la unión de Dvl a los lípidos de la membrana plasmática.

Los dominios DIX y PDZ intervienen en la señalización canónica mientras que los dominios PDZ y DEP intervienen en las vías no canónicas (Wharton 2003).

2.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN CANÓNICA

La primera vía de señalización de Wnt descrita se encuentra mediada por complejos proteicos que contienen β -catenina. Esta última es una proteína de unión a cadherinas que regula la adhesión celular del tipo célula-célula (Kikuchi et al. 2012). Posteriormente, se caracterizaron otras vías de señalización de Wnt, de manera que la vía mediada por β -catenina pasó a denominarse “canónica” y al resto se las conoce como las vías “no canónicas”.

La señalización canónica se encuentra altamente conservada en varias especies como *Drosophila*, *Xenopus*, ratón y humanos (MacDonald et al. 2009). Esta vía regula principalmente procesos de proliferación y diferenciación celular.

En la **Figura 6A** se puede observar que en ausencia de estimulación de Wnts, los niveles de β -catenina son bajos, ya que ésta continuamente es degradada por el proteasoma (Aberle et al. 1997). La proteína Axin funciona como plataforma (*scaffold*) para la formación del complejo de degradación de β -catenina compuesto por: GSK-3 β (del inglés *Glycogen Synthase Kinase*), APC (del inglés *Adenomatous Polyposis Coli*) y CK1a (del inglés *Casein Kinase*), entre otras. Una vez

que β -catenina forma parte del complejo, es fosforilada por GSK-3 β y ubiquitinada por β -TrCP, para luego ser degradada por el proteasoma (Hart et al. 1999; Weeraratna 2005).

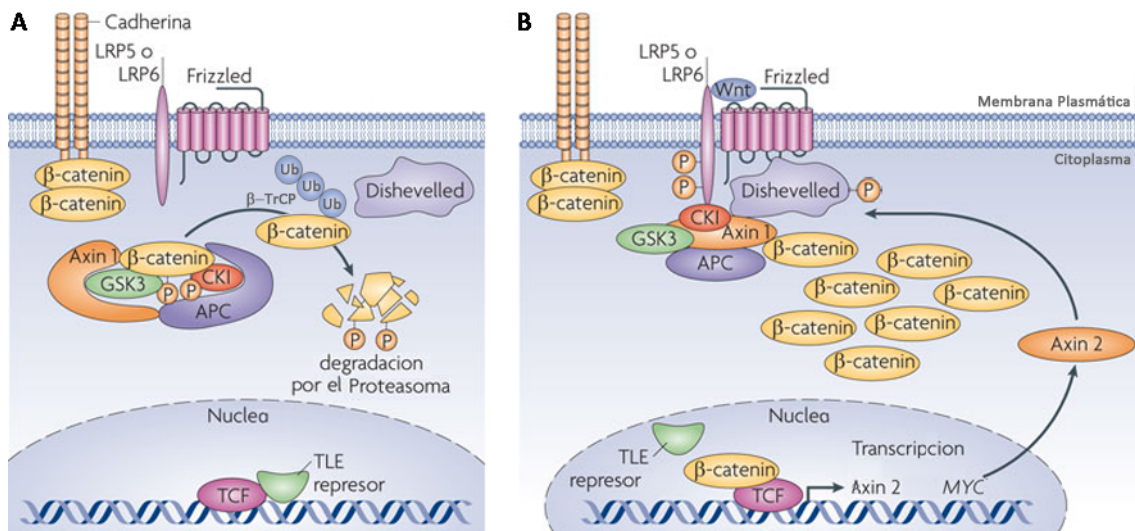


Figura 6. Vía de señalización canónica de Wnt. A) En ausencia de Wnts la vía se encuentra inactiva y β -catenina es degradada por el proteasoma. **B)** En presencia de Wnt, se forma el complejo Wnt-Fzd-LRP en la membrana, se activa Dvl, se acumula β -catenina y transloca al núcleo. Ver detalle en el texto. Adaptado de (McNeill et al. 2010).

Cuando los Wnts, como Wnt1, Wnt3a o Wnt8, se unen a los receptores Fzd y co-receptores LRP5/6 presentes en la célula, se activan las proteínas G α o y G α q (Malbon et al. 2001). Como consecuencia, se reclutan las proteínas Dvl a la membrana plasmática y se hiperfosforilan por la acción de varias quinasas, entre ellas, CK1 (Willert et al. 1997; Peters et al. 1999). Dvl, a través de sus dominios DIX y PDZ, inhibe la fosforilación de β -catenina por GSK-3 β y bloquea la acción de Axin (Willert et al. 1999; Itoh et al. 2000; Weeraratna 2005). De esta manera, se destruye el complejo de degradación y β -catenina se estabiliza, se acumula en el citoplasma y luego transloca al núcleo (**Figura 6B**). Allí se asocia a la maquinaria de transcripción basal y a varios co-activadores transcripcionales; en particular, se une al factor de transcripción Tcf/Lef (del inglés *T-Cell Factor* / *Lymphoid Enhancer binding Factor*) y estimula la transcripción de varios genes blanco como c-Myc, c-Jun y Axin2 (Hurlstone et al. 2002).

2.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN NO-CANÓNICA

En los últimos 25 años se ha descubierto que los Wnts pueden disparar señales intracelulares independientes de β -catenina, y como mencionamos anteriormente, a estas vías de señalización se las conoce como no-canónicas (Semenov et al. 2007).

Las principales vías de señalización no-canónicas son: la vía de Polaridad Celular Plana (PCP del inglés *Planar Cell Polarity*) y la vía de Ca^{2+} . Wnt4, Wnt5a, y Wnt11 son los principales Wnts que activan las vías no-canónicas (Veeman et al. 2003; Weeraratna 2005; Kikuchi et al. 2008).

2.3.1. Vía de polaridad celular plana

Esta vía fue identificada inicialmente en *Drosophila* y describe un mecanismo conservado que genera polaridad celular plana en varios tipos celulares y tejidos.

Como fue descrito anteriormente la interacción de Wnt con los receptores Fzd lleva a la fosforilación de las proteínas Dvl. La señalización de Dvl a través del dominio DEP, activa a pequeñas GTPasas, como Rac y Rho, quienes a su vez regulan la actividad de proteínas quinasas, como JNK (del inglés *c-Jun N-terminal Kinase*) y ROCK (del inglés *Rho-associated protein Kinase*) (**Figura 7A**) (Strutt et al. 1997; Boutros et al. 1998; Weeraratna 2005). Como consecuencia, se activan factores de transcripción, como por ejemplo ATF2 (del inglés *Activating Transcription Factor*) y regulan el citoesqueleto, la polaridad y migración celular (Zallen 2007).

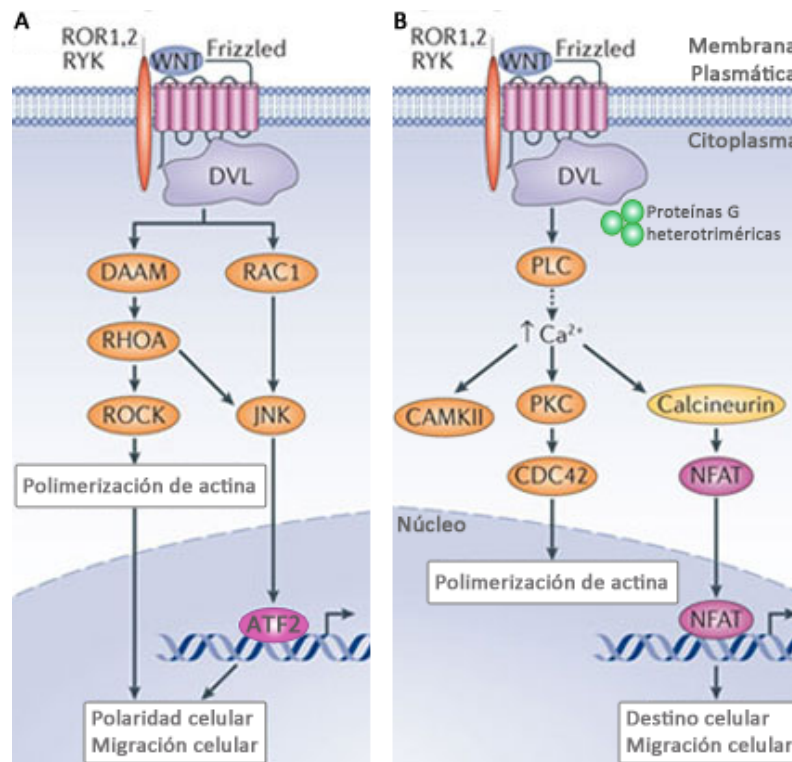


Figura 7. Vías de señalización no-canónicas de Wnt. **A)** Vía de Polaridad Celular Plana: se gatilla la activación de las GTPasas Rac y Rho, quienes activan a las quinasas ROCK y JNK, llevando a la polimerización de actina y estabilización de los microtúbulos. **B)** Vía de Ca²⁺: la liberación de Ca²⁺ intracelular activa a CAMKII, PKC y Calcineurina, quien a su vez activa al factor de transcripción NFAT. Ver detalle en el texto. Adaptado de (Kikuchi et al. 2012; Niehrs 2012).

2.3.2. Vía de Ca²⁺

Esta segunda vía, independiente de β -catenina, fue identificada originalmente en embriones de *Xenopus laevis* (Slusarski et al. 1997).

La unión de Wnt5a o Wnt11 a los receptores Fzd, junto con las proteínas Dvl, median la activación de proteínas G heterotriméricas. Éstas activan a la fosfolipasa C (PLC, del inglés *PhosphoLipase C*) la cual transloca a la membrana plasmática, estimula al segundo mensajero diacilglicerol (DAG, del inglés *DiAcylGlycerol*) y promueve la producción de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3, del inglés *Inositol-1,4,5-trisPhosphate*) (Slusarski et al. 1997). IP3 gatilla la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares con la consecuente activación de la quinas

dependiente de calcio/calmodulina II (CaMK, del inglés *Calcium/calModulin-dependent protein Kinase*), la proteína quinasa C (PKC, el inglés *Protein Kinase C*) y Calcineurina (**Figura 7B**). De esta manera se activa al regulador transcripcional NFAT (del inglés *Nuclear Factor Associated with T cells*) (Weeraratna 2005; De 2011).

La señalización a través de esta vía puede llevar a cambios en el citoesqueleto, en la movilidad celular y morfogénesis. A su vez, participa en los procesos de inflamación y neurodegeneración (Weeraratna 2005; De 2011).

2.3.3. Vías alternativas

Se han descrito otras vías alternativas de señalización no-canónicas, algunas de ellas se esquematizan y explican en la **Figura 8**.

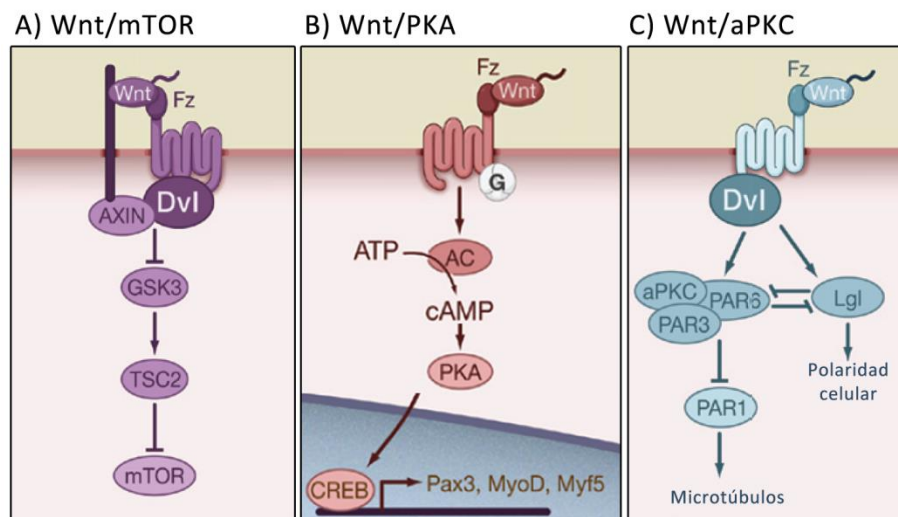


Figura 8. Vías alternativas de señalización no-canónica de Wnt. A) Vía de Wnt/mTOR: Wnt inhibe vía Dvl y Axin la fosforilación de TSC2 por GSK-3 y se regula la traducción mediada por mTOR. **B) Vía Wnt/PKA:** la unión Wnt-Fz activa a las proteínas G y a la adenilato ciclasa (AC) que lleva a un aumento en AMPc y la consecuente activación de PKA y CREB. **C) Vía Wnt/aPKC:** la unión Wnt-Fz vía Dvl induce la activación de aPKC y la asociación con Par3 y 6. Dvl también se asocia a Lgl, que antagoniza a aPKC. Adaptado de (Semenov et al. 2007).

2.4. INTERACCIÓN ENTRE LAS VÍAS Y CIRCUITOS DE RETROALIMENTACIÓN

Si bien Wnt5a ha sido descrito como el ligando no-canónico por excelencia, estudios *in vivo* revelaron que la señalización canónica por β -catenina se encuentra exacerbada en ratones *knockout* para Wnt5a (Topol et al. 2003; Sato et al. 2010).

Se describieron varios mecanismos por los cuales Wnt5a podría estar ejerciendo este efecto inhibitorio sobre la vía canónica:

- Wnt5a compite con Wnt3a por la unión al receptor Fzd2 (Sato et al. 2010).
- Wnt5a induce la expresión de Siah2, una ubiquitina E3 ligasa involucrada en el proceso de degradación de β -catenina (Topol et al. 2003).
- Wnt5a inhibe la expresión de genes regulados por la vía canónica río debajo de β -catenina, a través de NLK (del inglés *Nemo-Like Kinase*) y ROR α (del inglés *Retinoic acid-related Orphan nuclear Receptor*) (Ishitani et al. 2003; Lee et al. 2010).

Por otro lado, la señalización de Wnt puede llevar a la regulación de la expresión de componentes propios de la vía. No se sabe aún si estos genes son regulados de manera directa o indirecta, pero la existencia de mecanismos de retroalimentación resulta clave para controlar el correcto funcionamiento de la señalización (Logan et al. 2004).

Entre los blancos génicos de la vía de Wnt, con frecuencia se encuentran los receptores Fzd. Un estudio por microarreglos estimulando células de carcinoma con Wnt3a, demostró que el tratamiento con Wnt regula la expresión de varios miembros de la vía de señalización, entre ellos Fzd7 (Willert et al. 2002). Por el contrario, en *Drosophila* la señalización de Wingless reprime la expresión de Dfzd2 (Cadigan et al. 1998).

Otros miembros de la señalización de Wnt, también regulados por los propios Wnts, son Axin2 (Jho et al. 2002), β -TrCP (Spiegelman et al. 2000; Willert et al. 2002) y LRP (Wehrli et al. 2000), entre otros.

2.5. ROL DE WNT5A EN CÁNCER

Diversos estudios para dilucidar el rol de Wnt5a en cáncer mostraron resultados contradictorios, indicando que Wnt5a puede actuar como un supresor tumoral o como un oncogén según el tipo de cáncer, el contexto celular y la presencia de receptores en las células cancerígenas (McDonald et al. 2009; Endo et al. 2015).

Los efectos de Wnt5a como **supresor tumoral** se describieron en varios tipos de cáncer como colorrectal (Dejmek et al. 2005), neuroblastoma (Blanc et al. 2005) y cáncer ductal de mama (Jonsson et al. 2002), entre otros (McDonald et al. 2009).

Para el caso de cáncer de mama ductal, la pérdida o disminución de la expresión de Wnt5a se asocia con una menor supervivencia post-recurrencia de la enfermedad (Jonsson et al. 2002). Se ha demostrado que Wnt5a inhibe la migración e invasión celular *in vitro* y la formación de metástasis *in vivo* (Endo et al. 2015). Además, en líneas celulares de cáncer colorrectal y de tiroides, Wnt5a reduce la proliferación, migración e invasión celular y su expresión se asocia con un mejor pronóstico de la enfermedad (Dejmek et al. 2005; Kremenevskaja et al. 2005).

Otros estudios indican que Wnt5a funciona como un **oncogén** en diversos tipos de cáncer. Se ha reportado un aumento en la expresión de Wnt5a en cáncer de piel (Da Forno et al. 2008), de mama (Fernandez-Cobo et al. 2007), gástrico (Kurayoshi et al. 2006), de páncreas (Ripka et al. 2007), de pulmón de células no pequeñas (Huang et al. 2005) y de próstata (Yamamoto et al. 2010).

En células de cáncer gástrico, Wnt5a estimula la migración celular regulando los complejos de adhesiones focales. El aumento de Wnt5a en estos tumores correlaciona con estadios avanzados y una mala prognosis de la enfermedad (Kurayoshi et al. 2006). Wnt5a incrementa también la proliferación, migración e invasión de las células de cáncer de páncreas, y modula la expresión de genes asociados a la TEM (Ripka et al. 2007). A su vez, los pacientes con cáncer de próstata que presentan marcación positiva para Wnt5a poseen una alta tasa de recurrencia tumoral. En estas células, Wnt5a participa en el proceso de invasión vía Fzd2 y ROR2 e induce la expresión de metaloproteasas (Yamamoto et al. 2010).

En el año 2013 se publicó un trabajo que describe la existencia de dos isoformas de Wnt5a: una corta de 338 aa (Wnt5a-S) y una larga de 343 aa (Wnt5a-L) que presentan efectos antagónicos en líneas de cáncer de mama, de cuello de útero y de neuroblastoma (Bauer et al. 2013). Wnt5a-L inhibe la proliferación celular, y por el contrario, Wnt5a-S promueve el crecimiento. A su vez, la expresión de Wnt5a-L disminuye significativamente en los tres tipos de cáncer, mientras que los niveles de Wnt5a-S aumentan sólo en el caso del cáncer de cuello de útero (Bauer et al. 2013).

De esta manera, se propone un modelo que explicaría el rol dual de Wnt5a en cáncer, aunque esta hipótesis no ha sido validada por otros trabajos.

La participación de Wnt5a en melanoma se describe en la siguiente sección.

2.6. ROL DE WNT EN EL DESARROLLO DE LOS MELANOCITOS Y EN LA PROGRESIÓN DE MELANOMA

Las proteínas Wnts cumplen múltiples funciones en la formación de la cresta neural, induciendo la migración, proliferación y diferenciación celular (Wu et al. 2003). En particular, la señalización de Wnt es requerida para el desarrollo normal de los melanocitos a partir de sus precursores en la cresta neural, los melanoblastos. Ratones doble *knockout* para Wnt1 y Wnt3a no desarrollan melanoblastos, posiblemente debido a la pérdida en la expansión temprana de las células de la cresta neural (Ikeya et al. 1997).

El desarrollo de los melanocitos está mediado por la vía canónica de Wnt, mediante la cual β -catenina regula la transcripción del gen homeobox MITF (del inglés *Microphthalmia-associated Transcription Factor*). Este factor de transcripción modula la expresión de varios genes relacionados con la progresión del ciclo celular y la diferenciación, y es conocido como el regulador maestro del desarrollo, sobrevivencia y función de los melanocitos (Levy et al. 2006). A su vez, β -catenina regula positivamente al factor de transcripción BRN2, el cual controla la proliferación de las células de melanoma (Goodall et al. 2004; Paluncic et al. 2016).

El rol de la vía de señalización canónica de Wnt en melanoma es controversial. Se ha propuesto que β -catenina podría tanto promover como prevenir la progresión de melanoma. La activación constitutiva de la señalización de Wnt/ β -catenina incrementa el crecimiento de las células de melanoma murino *in vitro* (Widlund et al. 2002). A su vez, estudios en ratones transgénicos demostraron que esta vía promueve el desarrollo de melanoma (Delmas et al. 2007; Damsky et al. 2011). Ensayos de inmunohistoquímica en melanomas humanos revelaron altos niveles de β -catenina nuclear en los nevi melanocíticos y tumores primarios (Liu et al. 2014). En contraposición, en la mayoría de los melanomas metastásicos los niveles β -catenina nuclear tienden a disminuir y la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina en tumores de pacientes está asociada a una menor sobrevida (Kageshita et al. 2001; Maeldansmo et al. 2003; Chien et al. 2009).

Estos resultados sugieren que las consecuencias de la activación de la señalización Wnt/ β -catenina son complejas y dependen del contexto biológico. Mientras que esta vía parece ser necesaria para la iniciación del melanoma o la transformación melanocítica, aún no se ha esclarecido cuál/es son los efectos de su inhibición en los tumores ya establecidos (Liu et al. 2014).

Con respecto a la vía no-canónica, Wnt5a es el ligando mejor caracterizado en melanoma. Se encuentra sobreexpresado en la mitad de las líneas celulares de melanoma (Iozzo et al. 1995) y aún más en los melanomas más agresivos (Bittner et al. 2000). Análisis de inmunohistoquímicas indican que una alta expresión de Wnt5a en tumores correlaciona con una menor sobrevida de los pacientes (Da Forno et al. 2008).

Varios de los estudios de Wnt5a en melanoma se centran en su rol como promotor de la motilidad e invasión celular. A través de la interacción con ROR2, Wnt5a promueve el clivaje de Filamina A, lo cual incrementa la motilidad celular (O'Connell et al. 2009). A su vez, Wnt5a activa la vía de Ca^{2+} y PKC en las células de melanoma e induce la TEM, aumentando así la motilidad y la invasión celular (Weeraratna et al. 2002; Dissanayake et al. 2007). La interacción de Wnt5a con ROR2 también juega un rol crítico en la formación de metástasis de las células de melanoma. Ambos genes se encuentran sobreexpresados en las líneas celulares con alto potencial invasivo y su expresión es baja en las células con poca capacidad metastásica (O'Connell et al. 2010). En este mismo sentido, el análisis de la expresión génica de muestras de melanomas humanos reveló una alta expresión de Wnt5a y ROR2 en los tejidos metastásicos, pero no así en los melanomas primarios (O'Connell et al. 2010).

Por otro lado, Wnt5a se encuentra sobreexpresado en los melanomas resistentes a la terapia con inhibidores de BRAF. En este caso, promueve el crecimiento y la supervivencia celular a través de la interacción con Fzd7 y Ryk (y no ROR1 o ROR2) con la consecuente activación la vía de PI3K/AKT (Anastas et al. 2014).

3. ROR1

En 1992, Masiakowski y Carroll describieron dos nuevos miembros de la familia de RTK en una línea celular humana de neuroblastoma y los llamaron Receptores Huérfanos del Tipo Tirosina Quinasa 1 y 2 (ROR1 y ROR2) debido a que no se conocían sus ligandos (Masiakowski et al. 1992). Luego, los genes ROR se describieron en *D. melanogaster* (Oishi et al. 1997), ratón (Oishi et al. 1999) y *C. elegans* (CAM-1) (Forrester et al. 1999).

ROR1 y ROR2 comparten un 58% de homología en la secuencia aminoacídica con un 68% de homología en el dominio de tirosina quinasa. A su vez, ROR1 humano y de ratón comparten un 97% de homología aminoacídica y ROR2 un 92% (Forrester 2002). El alto grado de conservación evolutiva de las proteínas ROR en nematodos, xenopus, drosophila, pez cebra y vertebrados (rata, ratón, pollo y humanos) refleja ampliamente la importancia fisiológica de estas proteínas (Masiakowski et al. 1992; Wilson et al. 1993; Yoda et al. 2003).

3.1. ESTRUCTURA

El gen de ROR1 humano está localizado en el cromosoma 1 en la región p31.3 y consiste en 937 aminoácidos (908 luego del clivaje del péptido señal) con un peso molecular estimado de 105 kDa (Masiakowski et al. 1992). Sin embargo, ROR1 posee varios sitios de N-glicosilación que generan una proteína de 130 kDa. Estas modificaciones post-transcripcionales son necesarias para el correcto tráfico de ROR a la membrana plasmática y su función (Kaucka et al. 2011).

ROR1 consiste en 3 regiones extracelulares: un dominio del tipo inmunoglobulina (Ig), un dominio FZD o del tipo CRD y un dominio kringle (KNG). En la región intracelular posee un dominio tirosina quinasa (TKD, del inglés *Tyrosine Kinase Domain*) seguido de un dominio rico en serina / treonina (S/TRD, de inglés: *Serine / Threonine Rich Domain*), un dominio rico en prolina (PRD, de inglés: *Proline Rich Domain*), y un segundo S/TRD en el extremo carboxilo terminal (**Figura 9**).

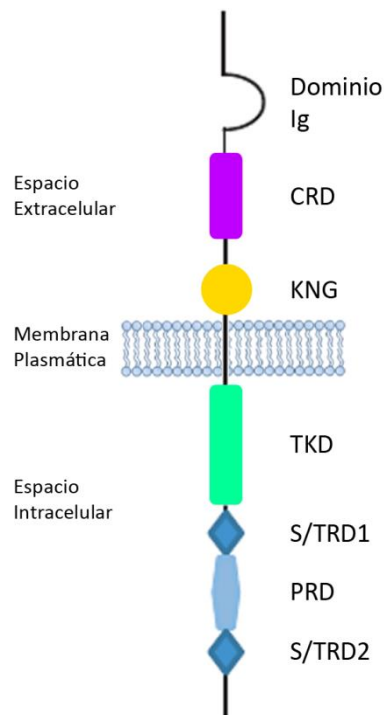


Figura 9. Estructura del receptor tirosina quinasa humano ROR1. En la región extracelular se distinguen los dominios del tipo Ig, CRD y KNG. En la región intracelular los dominios TKD, S/TRD y PRD. Ver detalle de cada uno de los dominios en el texto. Adaptado de (Borcherding et al. 2014).

Cada uno de los dominios presenta diferentes características y funciones:

- **Dominio Ig:** consiste en 106 aminoácidos y su función aún no está del todo esclarecida. Se ha sugerido que puede formar parte de las interacciones proteína – proteína o proteína – ligando (Yoda et al. 2003).
- **Dominio FZD o CRD:** consiste en 135 aminoácidos y presenta 10 cisteínas formando 5 puentes disulfuro. Este dominio es similar al presente en la familia de receptores Frizzled y en los co-receptores LRP, entre otros. Se cree que este dominio es el que media la interacción entre receptor y ligando (Roszmusz et al. 2001; Yoda et al. 2003).
- **Dominio KNG:** consiste en 80 aminoácidos y presenta un alto grado de plegamiento estabilizado por tres puentes disulfuro. Se ha postulado que puede funcionar como módulos de reconocimiento para la unión de proteínas reguladoras de WNT y otros ligandos (Minami et al. 2010). La presencia de este dominio es “marca registrada” de los miembros de la subfamilia ROR, ya que es la única dentro de la familia de RTK que posee este dominio. (Forrester 2002; Yoda et al. 2003).

- **TKD:** contiene 40 aminoácidos de los cuales 21 se encuentran conservados en todo el resto de los RTKs, haciendo de este dominio el más conservado de todos (Hanks et al. 1991). Sólo tres de los 21 aminoácidos conservados presentan variaciones en los miembros de la familia ROR (Forrester 2002). ROR1 posee la secuencia conservada YXXDYY en el sitio de activación del TKD (en este caso, YSADYY) en la posición 641–646 (Pearson et al. 1991). La fosforilación de la primera y última tirosina es de crítica importancia para la función de ROR1. Existen además otras dos secuencias conservadas: YSLM (en la posición 772–775) y YXXF (YGKF en la posición 666–669), que constituyen potenciales sitios de unión de la región SH2 (SRC homóloga 2) de quinasas (Songyang et al. 1995).
- **S/TRD y PRD:** ningún dominio similar fue encontrado en otros miembros de la familia de RTKs. El S/TRD1 presenta un 67% de homología entre ROR1 y ROR2, el PRD un 30% y el S/TRD2 no posee ningún grado de analogía aparente. Estos dominios citoplasmáticos interactúan con diferentes mediadores y participan de la señalización (Minami et al. 2010). Estos residuos de serina y treonina son sitios potenciales de fosforilación, los cuales podrían resultar importantes para la señalización mediada por ROR1 (Yoda et al. 2003).

3.2. ACTIVIDAD TIROSINA QUINASA

La funcionalidad de la actividad tirosina quinasa de ROR1 ha sido ampliamente debatida. Los primeros estudios mostraron que ROR1 posee una actividad quinasa débil comparada con ROR2 (Masiakowski et al. 1992; Oishi et al. 1999). Estudios más recientes revelaron que el TKD de ROR1 es suficiente para fosforilar a c-SRC en células NIH3T3 (Yamaguchi et al. 2012); por el contrario, otro estudio concluyó que ROR1 es una pseudo-quinasa que no posee actividad en células COS-7 (Gentile et al. 2011). Sin embargo, empleando una mutante de ROR1 sin actividad quinasa, se demostró que la misma es necesaria para conferirle a células de adenocarcinoma de pulmón la capacidad de crecer (Yamaguchi et al. 2012).

Se cree que la actividad quinasa de ROR1 puede diferir entre células normales, líneas celulares, células malignas y entre distintos tipos de tumores, pero en su conjunto, ROR1 parece ser un importante RTK para la supervivencia y migración celular (Hojjat-Farsangi et al. 2014).

3.3. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN

3.3.1. Durante el desarrollo

ROR1 se expresa durante varios estadios del desarrollo embrionario murino en los sistemas respiratorio, esquelético y cardíaco, así como también en la extensión neuronal del sistema nervioso (Al-Shawi et al. 2001; Matsuda et al. 2001). La expresión de ROR1 es mucho más restrictiva que la de ROR2 (Al-Shawi et al. 2001).

Los ratones *knockout* para el gen de ROR1 ($mROR1^{-/-}$) resultan letales en el estadio perinatal debido a disfunciones respiratoria, sin embargo, no desarrollan anomalías severas en el corazón y esqueleto como en el caso de los ratones $mROR2^{-/-}$. Los ratones deficientes en $mROR1/mROR2$ poseen un fenotipo mucho más severo que el observado en los ratones $mROR1^{-/-}$ o $mROR2^{-/-}$, lo cual lleva a la conclusión que ambos genes poseen funciones redundantes pero que no se superponen en su totalidad durante el desarrollo (Nomi et al. 2001).

Se ha descrito que ROR1 y ROR2 también cumplen importantes funciones en el sistema nervioso de mamíferos, ya que modulan el crecimiento y las ramificaciones de las neuritas de neuronas del sistema nervioso central en estadios temprano del desarrollo y la formación de sinapsis activas (Paganoni et al. 2003; Paganoni et al. 2005).

En humanos se han caracterizado mutaciones en ROR2 que causan dos desórdenes esqueléticos heredables: el Síndrome de Robinow y Braquidactilia dominante tipo B (Afzal et al. 2000). Hasta el momento no se han descrito enfermedades asociadas a mutaciones en ROR1.

3.3.2. En el adulto

Mientras que ROR1 se encuentra presente durante el desarrollo embrionario y fetal normal, su expresión baja drásticamente luego del nacimiento.

La expresión de ROR1 en humanos no ha sido ampliamente estudiada. Se analizó el perfil de expresión génica de ROR1 en muestras normales de sangre y no se detectó su expresión en

granulocitos, células B y T (Shabani et al. 2007; Baskar et al. 2008; Daneshmanesh et al. 2008). En otro estudio, también a nivel de ARNm en tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos normales, se detectaron altos niveles de expresión en estadios intermedios de la maduración de linfocitos B y baja expresión en tejido adiposo, páncreas, pulmón, ovario y colon (Hudecek et al. 2010). Otro estudio analizó la expresión proteica de ROR1 en 28 tejidos adultos y reveló la ausencia de expresión en la mayoría de las muestras a excepción de una baja expresión en tejido adiposo y menor aún en testículos, útero, pulmones, vejiga, colon y páncreas (Baskar et al. 2008; Fukuda et al. 2008).

3.4. ROR1 EN CÁNCER

3.4.1. Expresión

Numerosos estudios han demostrado que ROR1 se expresa en el adulto en ciertas condiciones patológicas, particularmente en cáncer. La expresión de ROR1 en diferentes tipos de cáncer sólidos y leucemias, descritas hasta este momento, se resumen en la **Tabla 1**.

Los primeros estudios sobre la expresión de ROR1 en enfermedades malignas fueron realizados en leucemia linfocítica crónica (LLC) (Rosenwald et al. 2001). Se demostró la expresión de ROR1 tanto a nivel de ARNm como de proteína en la mayoría de las células mononucleares de sangre periférica y de médula ósea de pacientes con LLC (Baskar et al. 2008; Daneshmanesh et al. 2008; Shabani et al. 2011). A su vez, se determinó que ROR1 se encuentra constitutivamente fosforilado en los residuos serina y tirosina en las células de LLC (Gentile et al. 2011; Hojjat-Farsangi et al. 2013b) y se cree que Wnt5a es el encargado de mantener la fosforilación (Zhang et al. 2012a). La intensidad de la fosforilación de ROR1 correlaciona con el grado de avance de esta enfermedad (Hojjat-Farsangi et al. 2013b).

En el caso de la leucemia linfoblástica aguda, la sobreexpresión de ROR1 se relacionó con una mayor progresión de la enfermedad, así como también con un aumento en la capacidad migratoria de las células y un fenotipo indiferenciado (Bicocca et al. 2012; Dave et al. 2012).

Otros tumores linfoides también mostraron elevada expresión de ROR1 como la leucemia de células pilosas, los linfomas de células del manto, de células B, de zona marginal y folicular, y múltiples mielomas (Barna et al. 2011; Daneshmanesh et al. 2013).

Tipo de cáncer	Referencias
Leucemia Linfocítica Crónica	(Baskar et al. 2008; Daneshmanesh et al. 2008; Barna et al. 2011; Daneshmanesh et al. 2013)
Leucemia Linfoblástica Aguda	(Shabani et al. 2007; Shabani et al. 2008; Shabani et al. 2011; Bicocca et al. 2012; Daneshmanesh et al. 2013)
Leucemia Mieloide Crónica	(Shabani et al. 2007; Shabani et al. 2011; Daneshmanesh et al. 2013)
Leucemia Mieloide Aguda	(Shabani et al. 2011; Daneshmanesh et al. 2013)
Leucemia de Células Pilosas	(Daneshmanesh et al. 2013)
Linfoma de Células B Difuso	(Barna et al. 2011)
Linfoma de Células del Manto	(Barna et al. 2011; Daneshmanesh et al. 2013)
Linfoma de Zona Marginal	(Barna et al. 2011; Daneshmanesh et al. 2013)
Linfoma Folicular	(Barna et al. 2011; Daneshmanesh et al. 2013)
Cáncer Adrenal	(Zhang et al. 2012b)
Cáncer de Colon	(Zhang et al. 2012b)
Cáncer de Mama	(Zhang et al. 2012a)
Cáncer de Ovario	(Zhang et al. 2012b; Zhang et al. 2014a)
Cáncer de Páncreas	(Zhang et al. 2012b)
Cáncer de Piel o Melanoma	(Zhang et al. 2012b)
Cáncer de Próstata	(Zhang et al. 2012b)
Cáncer de Pulmón	(Yamaguchi et al. 2012; Zhang et al. 2012b)
Cáncer de Útero	(Zhang et al. 2012b)
Cáncer de Vejiga	(Zhang et al. 2012b)
Cáncer Renal	(Rabbani et al. 2010)
Cáncer Testicular	(Zhang et al. 2012b)

Tabla 1. Sobreexpresión de ROR1 en leucemias y tumores sólidos. Se indica el nombre de la enfermedad y las referencias bibliográficas de cada una.

Para el caso los tumores sólidos, la expresión de ROR1 se encontró aumentada en una amplia variedad de tumores de diferente origen histológico (**Tabla 1**). Análisis de inmunohistoquímica revelaron una fuerte marcación para ROR1 en más del 30% de las muestras de cáncer de colon, pulmón y páncreas y moderada para el caso de cáncer de ovario, vejiga, piel, testículo, útero, próstata y adrenal (Zhang et al. 2012b). En los pacientes con

cáncer renal, la expresión del transcripto de ROR1 se detectó en el 81.3% del tejido tumoral (Rabbani et al. 2010).

Los trabajos en cáncer de mama muestran que ROR1 se expresa en las células neoplásicas pero no así en las células estromales, y que el aumento de ROR1 correlaciona con una mayor agresividad y una disminución en la sobrevida de los pacientes (Zhang et al. 2012a). Por otro lado, se asoció la expresión de ROR1 con la TEM en la formación de metástasis de cáncer de mama. Adenocarcinomas mamarios con altos niveles de ROR1 expresan genes de la TEM y presentan mayores tasas de recurrencia y metástasis que los adenocarcinomas con bajo ROR1 (Cui et al. 2013).

El aumento en la expresión de ROR1 en cáncer de ovario correlaciona con una menor sobrevida de los pacientes y una mayor tasa de recurrencia (Zhang et al. 2014b). Por este motivo, se postuló a ROR1 como nuevo marcador pronóstico de la enfermedad (Zhang et al. 2014a).

En el caso de melanoma, hasta el momento sólo tres trabajos fueron publicados y los datos resultan contradictorios (Zhang et al. 2012b; Hojjat-Farsangi et al. 2013a; O'Connell et al. 2013). El primero, describe por primera vez la expresión de ROR1 en melanoma, analizando por inmunohistoquímica muestras de pacientes con melanoma (Zhang et al. 2012b). El segundo, describe la expresión de ROR1 en siete líneas celulares de melanoma a nivel de ARNm y de proteína. Mediante ensayos de inmunoprecipitación seguidos de *Western blot*, describen la presencia de una banda de 130 kDa (correspondiente a la forma glicosilada) la cual se encuentra fosforilada en residuos tirosina y serina. El silenciamiento de ROR1 utilizando anticuerpos monoclonales o siARN indujo la apoptosis de las células de melanoma (Hojjat-Farsangi et al. 2013a). En el tercer trabajo, los autores analizan los transcriptos de varias líneas celulares de melanoma y concluyen que ROR1 y ROR2 se expresan inversamente en melanoma. Proponen que ROR1 y ROR2 se regulan negativamente y que en condiciones de hipoxia se desencadena el pasaje de un fenotipo proliferativo y con altos niveles de ROR1 a uno más invasivo y con alta expresión de ROR2 (O'Connell et al. 2013).

La diferencia en el patrón de expresión de ROR1, baja o nula en los tejidos adultos y alta en varios tipos de cáncer, ha llevado a numerosos laboratorios a examinar las ventajas funcionales que puede conferir la expresión de ROR1 en estas patologías y a explorar el uso de diversas terapias anti-tumorales empleando a ROR1 como blanco (Borcherding et al. 2014).

3.4.2. Señalización

Como mencionamos en la sección anterior, ROR1 y ROR2 median las vías señalización de Wnt no-canónicas. Además, se ha demostrado que Wnt5a actúa como ligando directo de ROR1 (Fukuda et al. 2008; Green et al. 2008). En la **Figura 10** se esquematizan las distintas vías de señalización vinculadas a ROR1 descritas en cáncer.

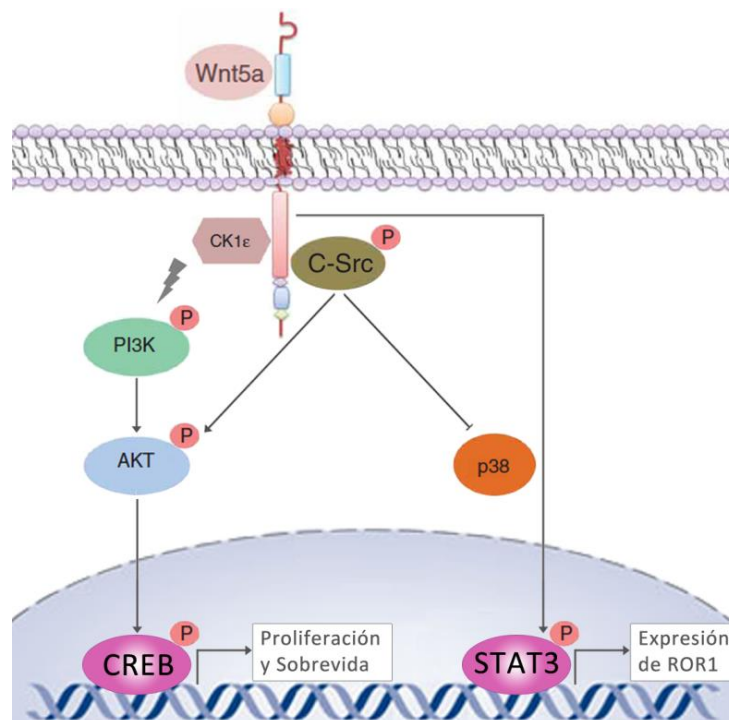


Figura 10. Vías de Señalización de ROR1 en cáncer. Adaptado de (Hojjat-Farsangi et al. 2014; Shabani et al. 2015).

En cáncer de mama, la interacción de Wnt5a con ROR1 activa la vía de señalización de PI3K/Akt/CREB (del inglés *cAMP-Response Element-Binding protein*) a través de la acción de CK1ε. Como consecuencia, se induce la expresión de genes que participan de la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis (Zhang et al. 2012a). A su vez, Wnt5a aumenta el crecimiento de las células de cáncer de mama que expresan ROR1, apoyando la teoría que Wnt5a actúa como ligando de ROR1 (Zhang et al. 2012a; Cui et al. 2013).

En adenocarcinomas de pulmón, Yamaguchi y colaboradores en el año 2012 demostraron que la función de ROR1, a través de la activación de c-Src, es mantener un balance entre la supervivencia celular mediada por la vía de PI3K/Akt y la apoptosis mediada por p38 (Yamaguchi et al. 2012).

La transducción de ROR1 en células derivadas de LLC también aumentó los niveles de fosforilación de Akt y CREB e incrementó la proliferación celular (Zhang et al. 2012b). En líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, cáncer de páncreas y de ovario, la transfección de shARN específicos para ROR1 disminuyó los niveles de fosforilación de Akt y CREB e indujo la apoptosis celular (Zhang et al. 2012b).

Por otro lado, la inhibición de la expresión de ROR1 en líneas celulares de cáncer de mama con altos niveles de ROR1 disminuyó la expresión de proteínas asociadas a la TEM (vimentina y SNAIL1/2, entre otras) y aumentó la expresión de E-cadherina y citoqueratinas epiteliales. Como consecuencia se disminuyó la capacidad migratoria e invasiva de las células. A su vez, la expresión ectópica de ROR1 en una línea celular con bajos niveles de ROR1 generó el fenotipo contrario (Cui et al. 2013).

Por último, estudios de secuenciación del promotor de ROR1 revelaron la existencia de elementos específicos activados por STAT3 (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*). En este sentido, la inhibición de la expresión de STAT3 por un shARN disminuyó los niveles de ROR1 (Li et al. 2010).

3.5. ROR1 COMO BLANCO PARA TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER

Los RTK son uno de los blancos predilectos de las terapias dirigidas desarrolladas contra el cáncer. Las estrategias para inhibir la señalización de los RTKs incluyen el uso de anticuerpos monoclonales (Ac-m), pequeñas moléculas inhibitoras de la actividad tirosina quinasa (TKI, del inglés *Tyrosine Kinase Inhibitors*) e inmunoterapias. La combinación de todas estas terapias podría ser la respuesta para contrarrestar la acción de las células cancerígenas (Shabani et al. 2015).

3.5.1. Anticuerpos monoclonales

Diversos grupos han desarrollado Ac-m contra ROR1 (Baskar et al. 2008; Yang et al. 2011; Daneshmanesh et al. 2013).

Varias características de ROR1 lo convierten en un posible blanco para terapias contra LLC, como por ejemplo su alta expresión en las células de LLC, la nula o muy baja expresión en células normales y su internalización luego de la unión a anticuerpos, entre otras (Baskar et al. 2008; Daneshmanesh et al. 2008; Fukuda et al. 2008; Daneshmanesh et al. 2013). Se ha argumentado que la secreción de una isoforma soluble de ROR1 podría interferir con la eficacia de una terapia con Ac-m, y que los niveles de ROR1 que expresan las células de LLC no son lo suficientemente elevados para considerar una terapia con Ac-m (Baskar et al. 2008). De todas maneras, y considerando que los Ac-m contra ROR1 inducen apoptosis en las células tumorales, los niveles de expresión de ROR1 en las células de LLC parecerían ser suficientes para desarrollar este tipo de terapia (Daneshmanesh et al. 2013; Hojjat-Farsangi et al. 2013b; Shabani et al. 2015).

Recientemente, el laboratorio del Dr. Kipps desarrolló un Ac-m humanizado contra ROR1 denominado UC-961 o cirmtuzumab (Choi et al. 2015). Ensayos pre-clínicos demostraron que el UC-961 tiene actividad biológica contra las células tumorales ROR1+ y no sobre los tejidos normales. A su vez, no se observaron efectos de toxicidad en el transcurso de los ensayos. Actualmente se está realizando un ensayo clínico en fase 1 para pacientes con LLC en recurrencia o refractaria (ID: NCT02222688).

ROR1 también puede considerarse como un interesante blanco terapéutico en el caso de los tumores sólidos. Ac-m contra ROR1 inducen apoptosis de varias líneas celulares de melanoma, así como también citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y citotoxicidad dependiente de complemento (Hojjat-Farsangi et al. 2013a). En líneas celulares de cáncer de páncreas, los Ac-m también provocan la muerte por apoptosis, precedida por la defosforilación de ROR1, PI3K, AKT y mTOR (Daneshmanesh et al. 2014). A su vez, los Ac-m inhiben la capacidad de migración e invasión de células de cáncer de mama tanto *in vitro* como *in vivo*, disminuyendo la expresión de proteínas involucradas en la formación de metástasis (Cui et al. 2013). Los Ac-m también disminuyen la capacidad de formar esferoides y migrar de células de cáncer de ovario *in vitro* e *in vivo* (Zhang et al. 2014b).

3.5.2. Pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad tirosina quinasa

Una de las mayores desventajas en las terapias con Ac-m de RTKs es la resistencia tumoral durante el tratamiento. El uso de terapias combinadas de Ac-m junto con otras drogas que interfieran con el dominio quinasa, podrían solucionar este inconveniente (Shabani et al. 2015).

Actualmente se encuentran en desarrollo TKIs contra ROR1 (www.kancera.com). Mellstedt y colaboradores en la reunión de la *American Society of Clinical Oncology* en el 2012, mostraron que TKIs contra ROR1 inducen la muerte por apoptosis de las células de LLC, defosforilando a ROR1 e inactivando la señalización de la vía PI3K/AKT (Mellstedt et al. 2012). Más recientemente observaron resultados similares en células de adenocarcinoma pancreático (Mellstedt et al. 2014)

3.5.3. Inmunoterapias

Dado que ROR1 puede catalogarse como un antígeno fetal-oncogénico su reconocimiento por el sistema inmunológico puede representar un interesante enfoque terapéutico.

Se ha descrito la inducción de una respuesta humoral anti-ROR1 en terapias de pacientes con LLC tratados con vacunas Ad-CD154 (Fukuda et al. 2008) o con drogas inmunomoduladoras como la lenalidomida (Lapalombella et al. 2010). Algunos pacientes desarrollan espontáneamente una respuesta de células T del tipo 1 contra ROR1 como también anticuerpos IgG (Hojjat-Farsangi et al. 2010; Hojjat-Farsangi et al. 2011). Estos resultados indican que ROR1 podría ser un candidato para vacunas tumorales (Hojjat-Farsangi et al. 2014).

Por otro lado, Hudecek y colaboradores desarrollaron células T de donadores sanos o pacientes con LLC que expresan ROR1-CARTs (del inglés *Chimeric Antigen Receptor T cells*), la cual combina la región de reconocimiento de un Ac-m contra ROR1 con los dominios intracelulares de las moléculas estimuladores del receptor de células T. Estas células T CD8+ fueron capaces de inducir la lisis de las células de LLC pero no de células B maduras normales *in vitro*. Estos resultados sugieren que ROR1-CARTs podrían ser utilizados para tratar pacientes con tumores positivos para la expresión de ROR1 (Hudecek et al. 2010; Hudecek et al. 2013).

Ensayos clínicos con ROR1-CARTs están siendo desarrollados actualmente (Hojjat-Farsangi et al. 2014).

En conclusión, la sobreexpresión de ROR1 en diversos tipos de cáncer, en contraposición con la baja o nula expresión en los tejidos normales en el adulto; el aumento de la expresión y activación de ROR1 en tumores con mayor grado de agresividad; y la inducción de la muerte por apoptosis cuando se inhibe su expresión, son algunas de las características que postulan a ROR1 como blanco para el desarrollo de terapias oncogénicas específicas.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Hacia principios de esta década existían pocas pero claras evidencias de que la vía de señalización de Wnt5a cumplía un importante rol en melanoma. Sin embargo, aspectos tales como el tipo de receptor involucrado o los mecanismos moleculares y procesos celulares implicados no habían sido aún investigados. En este contexto decidimos enfocar nuestro estudio en esta vía de señalización.

Uno de los primeros resultados que obtuvimos en nuestro laboratorio, reveló que ROR1 se expresaba en líneas celulares de melanoma. En función de esta observación y teniendo en cuenta que:

- Los receptores del tipo tirosina quinasa cumplen importantes roles en cáncer (Green et al. 2008).
- ROR1 es un receptor tirosina quinasa muy poco estudiado y sus funciones no han sido aún esclarecidas (Green et al. 2008).
- ROR1 no se expresa en los tejidos normales adultos, pero se encuentra sobreexpresado en leucemias (Shabani et al. 2007; Baskar et al. 2008; Green et al. 2008).
- ROR1 fue identificado como una quinasa importante para la sobrevivencia de las células de carcinoma cervical HeLa (MacKeigan et al. 2005).
- La inhibición de ROR1 induce un aumento en la apoptosis de células de pacientes con leucemias (Tyner et al. 2009; Choudhury et al. 2010).
- ROR1 participa de la señalización de Wnt y actúa como receptor de Wnt5a (Green et al. 2008).
- Wnt5a se encuentra sobreexpresado en melanoma y aumenta la motilidad y migración celular (Weeraratna et al. 2002; Dissanayake et al. 2007).
- Wnt5a activa la Transición Epitelio-Mesenquimal en las células de melanoma (Dissanayake et al. 2007).
- El aumento de Wnt5a correlaciona con una mala prognosis de los pacientes con melanoma (Da Forno et al. 2008).

Nuestra hipótesis de trabajo es que:

“ROR1 se expresa de manera aberrante en melanoma, actúa como receptor de Wnt5a y afecta procesos celulares que contribuyen a la progresión de esta enfermedad”.

OBJETIVOS

En base a la hipótesis planeada, el **objetivo general** de esta tesis es:

“Estudiar la participación de ROR1 en los procesos celulares asociados a la progresión de melanoma y caracterizar los mecanismos moleculares involucrados.

Como **objetivos específicos** nos propusimos:

1. Evaluar la expresión de ROR1 en líneas celulares y muestras de pacientes con melanoma.
2. Establecer posibles asociaciones entre la expresión de ROR1 y distintos estadios clínicos de melanoma.
3. Caracterizar la vía de señalización activada por ROR1.
4. Estudiar la participación de ROR1 en la proliferación y muerte celular.
5. Estudiar la participación de ROR1 en procesos de adhesión, motilidad y migración celular.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS GENERALES

Los reactivos de laboratorio empleados a lo largo de todo el trabajo fueron de grado analítico, de calidad para biología molecular o cultivo celular, dependiendo de su aplicación en cada protocolo específico. El material de plástico necesario para el crecimiento de las líneas celulares en cultivo fue adquirido a la firma *GBO*. Todas las sales y reactivos generales fueron adquiridos a la firma *SIGMA*, los ácidos y alcoholes a la empresa *ANEDRA*, excepto que se especifique lo contrario.

En el **Anexo II** se detallan los mapas y características de los plásmidos y vectores utilizados a lo largo de toda la tesis.

En el **Anexo III** se listan las secuencias y particularidades de cada uno los oligonucleótidos empleados en el trabajo. Todas las secuencias fueron sintetizadas por la empresa *The Midland Certified Reagent Company* (EEUU).

El **Anexo IV** contiene el listado de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, el número de catálogo y empresa que los comercializa a cada uno, las condiciones de uso y diluciones de trabajo empleadas.

En el **Anexo V** se especifican y detallan cada una de las recetas de soluciones y buffers que se prepararon y utilizaron en el transcurso de esta tesis.

2. CONSTRUCCIONES Y PLÁSMIDOS

2.1. DISEÑO Y CLONADO

Se utilizó el sistema de ARN de interferencia **pSUPER** (*pSUPER RNAi System*), mediante el cual se consigue el silenciamiento de un gen incorporando al vector *pSUPER.retro.puro* una secuencia específica de 19 nucleótidos derivada del ARNm del gen que se desea inhibir.

2.1.1. Diseño de los oligonucleótidos

Se diseñaron los oligos de manera que contengan las características requeridas por el sistema de clonado elegido (**Figura 11**). El extremo 5' corresponde a la secuencia de reconocimiento y clivaje de la enzima de restricción BglIII y en el extremo 3' la secuencia de la enzima HindIII. La secuencia blanco específica posee 19 nucleótidos en la orientación sentido y antisentido separadas por 9 nucleótidos que generan el bucle en la estructura secundaria.

De esta manera se obtienen pares de oligos de 60 nucleótidos de longitud para cada secuencia de silenciamiento. El transcripto resultante se pliega sobre sí mismo formando una estructura secundaria que es rápidamente clivada en la célula produciendo el ARNi funcional.

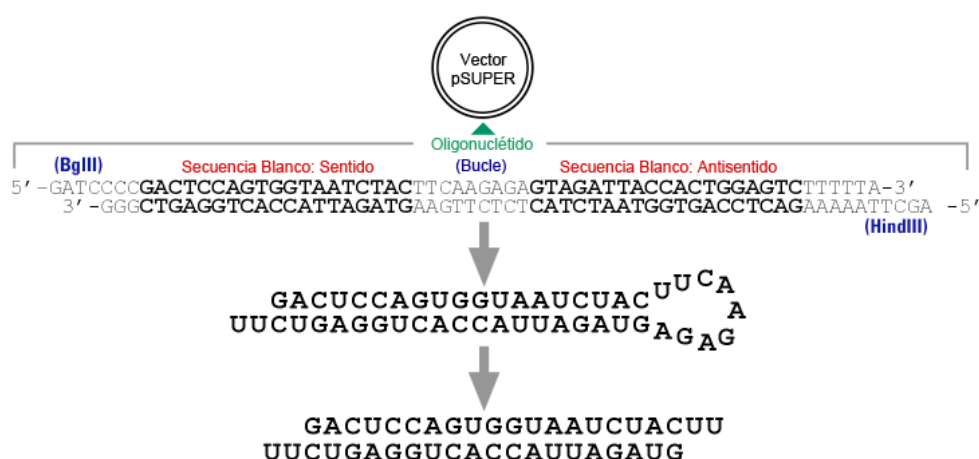


Figura 11. Esquema ilustrativo de la transcripción del oligonucleótido de 60 pares de bases al transcripto primario con estructura secundaria y luego del procesamiento al ARNi funcional. (Adaptado de *pSUPER RNAi System – Manual*).

2.1.2. Hibridación de los oligos

Los oligonucleótidos se disolvieron en agua libre de nucleasas en una concentración 3 µg/µl. Se prepararon 3 µg de cada oligonucleótido en 50 µl de Buffer de Hibridación. La mezcla se desnaturalizó a 90 °C durante 4 minutos y luego a 70 °C por 10 minutos. A continuación se realizó un enfriamiento gradual de la mezcla: 37 °C por 20 minutos y luego a temperatura ambiente (T.amb).

El fragmento de doble cadena se guardó a -20 °C hasta su posterior uso.

2.1.3. Linealización del vector

Se incubaron 3 µg del vector *pSUPER.retro.puro* en el buffer *NEBuffer 2* (*New England BioLabs* - *NEB*) con 10 U de la enzima *BglIII* (*NEB*) durante 1 hora a 37 °C. Luego se modificó la concentración del buffer a 50 mM NaCl, 40 mM Tris pH=8 y se agregaron 20 U de la enzima *HindIII* (*NEB*). Se volvió a incubar 1 hora a 37 °C.

2.1.4. De-fosforilación del vector

Para disminuir la re-ligación del vector, se procedió a la hidrólisis del fosfato de los extremos 5'. Para ello, se agregó 1 U de la enzima *SAP* (del inglés *Shrimp Alkaline Phosphatase* - *NEB*) a la mezcla del vector linealizado y se incubó por 1 hora a 37 °C.

Para inactivar las enzimas se calentó la mezcla a 65 °C por 20 minutos.

El vector se guardó a -20 °C hasta su posterior uso.

2.1.5. Purificación del vector linealizado

El vector *pSUPER.retro.puro* linealizado y de-fosforilado se purificó mediante electroforesis en un gel de 0.7% p/v agarosa (*BioAmerica*) en buffer TAE con bromuro de etidio (*GIBCO*). Luego de la electroforesis se visualizaron las bandas exponiendo al gel a luz UV con un transiluminador (*FotoPrepl*). Se recortó con un bisturí la banda correspondiente al vector lineal utilizando como referencia un marcador de peso molecular de 1.000 pares de bases en escalera (*New England BioLabs*).

La fracción del gel se colocó en un tubo eppendorf limpio y se extrajo el ADN con un kit de extracción (*QIAquick Gel Extraction Kit Protocol, Qiagen*), según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 3 volúmenes de la solución QG por masa de gel (100 mg ~ 100 µl) y se incubó durante 10 minutos a 50 °C agitando cada 2 o 3 minutos hasta que la agarosa se disolvió completamente. Se agregó 1 volumen de isopropanol, se mezcló y se colocó toda la muestra en la columna de unión de ADN. Se centrifugó 1 minuto a 12.500 rpm, se lavó con 750 µl del buffer PE, y se volvió a centrifugar por 1 minuto a 12.500 rpm. Una vez que la columna estuvo completamente seca, se agregaron 50 µl de agua libre de nucleasas y se colectó el eluido en un tubo limpio por centrifugación.

Se corroboró el tamaño e integridad del ADN obtenido por electroforesis en gel de agarosa y posterior exposición a luz UV, utilizando un marcador de peso molecular (*New England BioLabs*). Se determinó la concentración midiendo la absorbancia a 260 nm de 1 µl de muestra utilizando un NanoDrop (*Thermo Scientific*).

El vector linealizado se guardó a -20 °C hasta su posterior uso.

2.1.6. Ligación

La ligación se realizó utilizando 1 U de la enzima *T4 DNA ligase* (*Invitrogen Life Technologies*) con 2 µl de la mezcla de oligonucleótidos hibridados y 500 ng del vector linealizado en el buffer correspondiente (*5X T4 DNA Ligase Buffer, Invitrogen Life Technologies*). La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 16 °C. En paralelo se preparó un control negativo de religación (vector sin inserto).

2.1.7. Digestión con BglII

El sitio de digestión de la enzima BglII es destruido durante el clonado, de manera que los vectores que sean digeridos por esta enzima de restricción serán aquellos que no posean el inserto. Aprovechando esta característica, se realizó una digestión con BglII agregando 1 µl de la misma a la mezcla de ligación del paso anterior e incubando 1 hora a 37 °C.

Luego se precedió a la transformación de bacterias competentes (ver Materiales y Métodos, sección 2.3. Transformación de Bacterias Competentes).

2.2. PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Se partió de una colonia de bacterias de la especie *Escherichia coli* cepa DH5 α crecidas en una placa de Petri con medio LB-agar. Se inocularon 2 cultivos de 5 ml de medio LB y se incubaron toda la noche a 37 °C en agitación. A continuación se inocularon 4 ml del cultivo saturado en 250 ml de LB suplementado con 20 mM MgSO₄ y se incubó a 18 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0.6. Una vez alcanzada la densidad óptica se colocó el erlenmeyer en hielo y todos los pasos a partir de ese momento se realizaron en un cuarto frío. Se centrifugó el cultivo a 12.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El pellet de bacterias se resuspendió en 60 ml de buffer TB a 4 °C y se volvió a centrifugar a 12.500 rpm durante 10 minutos. El nuevo pellet se resuspendió en 10 ml de buffer TB a 4 °C y agitando suavemente se agregaron 1.5 ml de DMSO. Finalmente, las bacterias se dejaron reposar en hielo durante 10 minutos para luego congelarlas en Nitrógeno líquido.

Las baterías se guardaron a -70 °C en alícuotas de 200 μ l.

2.3. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Se utilizaron 80 μ l de bacterias *Escherichia coli* competentes descongeladas en hielo. En condiciones de esterilidad, se adicionaron entre 0.5-1 μ g del plásmido de interés o la mezcla de ligación completa y se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego, se realizó un shock térmico de 90 segundos a 42 °C y rápidamente se volvió a colocar el tubo en hielo. Se agregaron 700 μ l de LB y se incubaron las bacterias durante 45 minutos a 37 °C en agitación. Finalmente, se centrifugaron por 5 minutos a 3.000 rpm, se resuspendió el pellet en 30 μ l de LB y se sembraron en placas de LB-agar con 100 μ g/ml de ampicilina. Las placas se incubaron entre 15-18 horas a 37 °C hasta la visualización de las colonias de bacterias.

2.4. VERIFICACIÓN DEL CLONADO POR PCR DE COLONIAS

Para corroborar que el clonado funcionó correctamente y que las bacterias posean el plásmido con el inserto se realizó la técnica de PCR de Colonias (del inglés *Colony Polymerase Chain Reaction*). Se utilizaron oligonucleótidos que flanquean a la región de clonado del plásmido *pSUPER.retro.puro* (pRS sentido y anti-sentido) de manera que permiten detectar la presencia o ausencia de inserto de acuerdo al tamaño del producto de PCR obtenido.

Se picaron entre 6 a 10 colonias con un tip estéril. Por un lado se realizó un estría en una placa de LB-agar y por otro lado se resuspendió el remanente de bacterias en el tip en un tubo para PCR de 0.2 µl que contenía: 200 nM de cada oligonucleótido (pRS sentido y antisentido), 400 nM dNTPs (*Promega*), 1 U *Taq* polimerasa (*Invitrogen*) y 3 mM MgCl₂ (*Invitrogen*) en el buffer correspondiente (*10X Taq Reaction buffer, Invitrogen*). El protocolo de amplificación se realizó en un termociclador (*Eppendorf*) y consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 40 segundos de desnaturalización a 94 °C, 40 segundos a la temperatura de hibridación correspondiente y 40 segundos de elongación a 72°C, finalizando con 10 minutos a 72 °C para la elongación final. En todos los casos se incluyó un control negativo en el que se omitió el agregado de bacterias.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de 2% p/v agarosa con Buffer de Siembra en buffer TAE con bromuro de etidio y se visualizaron por exposición a luz UV mediante el uso del equipo G-BOX (*Syngene*). Se identificaron como colonias positivas aquellas que presentaron un producto de amplificación de 480 pares de bases, utilizando un marcador de peso moléculas de 100 pares de bases en escalera (*Productos Bio-Lógicos*).

2.5. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS POR MIDI-PREPARACIÓN

Para la purificación de ADN plasmídico se utilizó el kit de purificación de Qiagen (*QIAGEN Plasmid Midi Kits, Qiagen*) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se inoculó una colonia de bacterias transformadas en 5 ml de LB con ampicilina y se incubó durante 15-18 horas a 37 °C en agitación. Luego, se trasvasó el contenido a un erlenmeyer con 100 ml de LB con ampicilina y se incubó a 37 °C en agitación durante 15-18 horas. Las bacterias

se centrifugaron a 12.500 rpm durante 15 minutos y el pellet se resuspendió en 4 ml de buffer P1 en hielo. Se agregaron 4 ml de buffer P2, se mezcló por inversión 4-6 veces y se incubó durante 5 minutos a T.amb. A continuación se agregaron 4 ml de buffer P3, se mezcló por inversión 4-6 veces y se incubó en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó la mezcla a 12.500 rpm durante 30 minutos y se colectó el sobrenadante. Paralelamente, la columna de unión QIAGEN-tip 100 se equilibró con buffer QBT y luego se incorporó el sobrenadante con el ADN plasmídico. Se realizaron dos lavados con 10 ml de buffer QC y se eluyó el ADN de la columna con 5 ml de buffer QF. El eluido se precipitó agregando 3.5 ml de isopropanol y centrifugando durante 30 minutos a 12.500 rpm. El pellet obtenido se lavó con una solución de etanol al 70% y se volvió a centrifugar 15 minutos a 12.500 rpm. Se dejó secar el pellet a T.amb y luego se resuspendió en 50-200 µl de agua libre de nucleasas.

La concentración de ADN obtenido se determinó por medición de la absorbancia a 260 nm de 1 µl de muestra utilizando un NanoDrop.

La integridad y tamaño de los plásmidos purificados se verificó a través de electroforesis en buffer TAE de geles de 0.7% p/v agarosa con bromuro de etidio y exposición a luz UV mediante el uso del equipo G-BOX (*Syngene*).

Los plásmidos se guardaron a -20 °C hasta su posterior uso.

2.6. SECUENCIACIÓN

Una vez obtenido el plásmido con el inserto, se envió una muestra a secuenciar a la empresa *MACROGENE*, junto con una alícuota del oligonucleótidos pRS en la orientación sentido.

Se corroboró que la secuencia obtenida sea la correcta.

3. CULTIVO CELULAR

3.1. LÍNEAS CELULARES

A lo largo de todo el trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares adherentes:

- **HEK-293T:** células epiteliales derivadas de riñón embrionario humano, cedidas gentilmente por el Dr. Zeev Ronai del Instituto Sanford-Burnham, La Jolla, Estados Unidos.
- **A375, G361, MeWo, Lu1205, SkMel28, UACC903, WM9, WM35 y WM115:** células epiteliales de melanoma humano, cedidas gentilmente por el Dr. Zeev Ronai del Instituto Sanford-Burnham, La Jolla, Estados Unidos.
- **501Mel, 888Mel, WM983A y WM983B:** células epiteliales de melanoma humano, cedidas gentilmente por el Dr. Alain Mauviel del Instituto Curie, Orsay, Francia.
- **Células L:** células de fibroblasto de ratón. Se utilizaron células L que expresan de manera estable las secuencias de ADN complementario (ADNc) de Wnt3a (L-Wnt3a), de Wnt5a (L-Wnt5a) o el plásmido vacío (L-Control). Las tres líneas se crecieron en presencia del antibiótico de selección G418 (*Cellgro*) en una concentración de 40 µg/ml hasta el momento de utilizarlas para cosechar los medios condicionados. Estas células fueron cedidas gentilmente por el Dr. Stuart Aaronson del Instituto Mount Sinai, Nueva York, Estados Unidos.

En la siguiente tabla se especifica el estadio y tejido de origen del a partir de los cuales fueron generadas las líneas celulares de melanoma (**Tabla 2**).

Línea Celular	Estadio	Tejido de Origen	Referencia
WM35	RGP	Piel (Cuello)	(Hsu et al. 2002)
WM115	VGP	Piel	(Hsu et al. 2002)
WM983 A	VGP	Piel	(Hsu et al. 2002)
SkMel28	Metastásico	Tumor Primario	(ATCC)
G361	Metastásico	Tumor Primario	(ATCC)
888-Mel	Metastásico	Tumor Primario	(OTT-NIH)
A375	Metastásico	Tumor Primario	(ATCC)
UACC903	Metastásico	Metástasis - Piel (Espalda)	(Bittner et al. 2000)
501-Mel	Metastásico	Metástasis - Nódulo Linfático	(Halaban et al. 2010)
WM9	Metastásico	Metástasis - Nódulo Linfático	(Hsu et al. 2002)
WM983 B	Metastásico	Metástasis - Nódulo Linfático	(Hsu et al. 2002)
MeWo	Metastásico	Metástasis - Nódulo Linfático	(ATCC)
Lu1205	Metastásico	Metástasis - Pulmón (xenografts)	(Hsu et al. 2002)

Tabla 2. Características de las líneas celulares de melanoma utilizadas. Se indica el nombre de la línea celular, el estadio de la enfermedad y el tejido de origen a partir de los cuales se generaron las líneas utilizadas a lo largo de este trabajo.

3.2. MANTENIMIENTO DE CÉLULAS EN CULTIVO

Las líneas celulares se crecieron en medio D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO) suplementado con 10% v/v Suero Fetal Bovino (SFB, PAA), 100 U/ml penicilina – 100 µg/ml estreptomycin (GIBCO). Los cultivos se mantuvieron en placas de 100 mm de diámetro en una estufa a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂ en el aire. Al alcanzar un 70-80% de confluencia, las células se sub-cultivaron utilizando 0.05% p/v tripsina – 0.48 mM EDTA (GIBCO).

Las líneas celulares se conservaron a -70 °C o en Nitrógeno líquido en medio D-MEM suplementado con 30% SFB y 5% DMSO.

3.3. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES

3.3.1. Producción de partículas virales

La producción de retrovirus se realizó en células HEK-293T crecidas en un 60% de confluencia en medio D-MEM 10% SFB en placas de 100 mm de diámetro.

Para el sistema de silenciamiento por shARN se transfectó una mezcla de ADN conteniendo 5 µg del plásmido VSV, 8 µg del GAG y 10 µg del *pSUPER.retro.puro* por cada secuencia blanco utilizada. Para el sistema de sobreexpresión por ADNc recombinante se transfectó una mezcla de ADN conteniendo 10 µg del plásmido ENV, 5 µg del PACK y 10 µg del VIR-SP vacío o del plásmido con la secuencia del ADNc de ROR1.

En ambos casos la transfección de las células HEK-293T se realizó empleando el método de fosfato de calcio. Brevemente, se prepararon 500 µl de una solución 15.5 mM de cloruro de calcio con las mezclas de plásmidos correspondientes y se agregó a cada tubo 500 µl de HBS gota a gota en agitación constante. A continuación, la mezcla se colocó en las células HEK 293T y se guardaron las placas en la estufa. Luego de 8-12 horas de la transfección, se cambió el medio de cultivo y 24 horas después se cosechó el primer sobrenadante contenedor de partículas virales (este paso se realizó 2 veces más de manera de contar con 3 cosechas virales). Las 3 cosechas se centrifugaron durante 10 minutos a 2.000 rpm, se realizaron alícuotas de 2 ml de los sobrenadantes y se guardaron a -70 °C.

3.3.2. Transducción de células de melanoma

Las transducciones de las células de melanoma se realizaron en placas de 100 mm de diámetro crecidas a un 50-60% de confluencia. Se agregaron iguales volúmenes del sobrenadante viral y medio fresco D-MEM 10% SFB a las células previamente crecidas y adheridas a la placa. Se adicionó 1 µg/ml de *polybrene* (SIGMA) para favorecer la adhesión de las partículas virales a la superficie celular. A las 48 horas de realizada la transducción se cambió el medio de cultivo y se agregó puomicina (antibiótico de selección) en una concentración final de 3 µg/ml. Se crecieron las células durante 2 semanas en estas condiciones y se congelaron viales de células en cada pasaje de sub-cultivo. Luego de

transcurridas las 2 semanas de selección se disminuyó la concentración de puromicina a 1 µg/ml para la mantención de las líneas.

De esta manera se generaron las siguientes líneas celulares:

- **A375-scramble y A375-shROR1, Lu1205-scramble y Lu1205-shROR1, y UACC903-scramble y UACC903-shROR1.** Expresan de manera estable el vector *pSUPER.retro.puro* con la secuencia scramble (-scramble) o las secuencias blanco de ROR1 (-shROR1).
- **A375-vacío y A375-ROR1.** Expresan de manera estable el vector vacío VIR-SP (-vacío) o la secuencia ADNc de ROR1 (-ROR1).

Todos los pasos de generación y manipulación de partículas virales se llevaron a cabo respetando las “NORMATIVAS PARA LA MANIPULACIÓN DE VIRUS del INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL” con el Aval de la Comisión de Bioseguridad Laboral e Higiene del Instituto.

3.4. PRODUCCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS

Las células L (L-Control, L-Wnt3a y L-Wnt5a) se crecieron en D-MEM 10% SFB. Una vez que alcanzaron una confluencia del 80-90%, se sub-cultivaron en una dilución al décimo en 4 placas de 100 mm de diámetro con medio D-MEM 1% SFB. Cuatro días después, se realizó la primera cosecha del medio condicionado (MC) y se volvió a agregar medio D-MEM 1% SFB. Luego de tres días se realizó la segunda cosecha de MC. Se unificaron las dos cosechas de MC y se centrifugaron durante 10 minutos a 2.000 rpm. Se realizaron alícuotas de 10 ml y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

4.1. EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN total de las líneas celulares se aisló utilizando el reactivo *TRizol® Reagent* (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, se crecieron las células hasta alcanzar un 70-80% de confluencia, luego se realizó un lavado con PBS frío y estéril y se agregó 1 ml (por placa de 100 mm de diámetro) o en 200 µl (por pocillo de 35 mm) de Trizol. Se colectaron los extractos en tubos eppendorf estériles y se incubaron durante 5 minutos a T.amb. Luego, se agregaron 200 µl de cloroformo por ml de Trizol utilizado y se mezclaron vigorosamente por 15 segundos. Posteriormente, se incubaron los tubos a T.amb por 3 minutos y se centrifugaron a 12.500 rpm por 15 minutos y a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ARN mediante el agregado de 500 µl de isopropanol por ml de Trizol inicial. Se incubaron las muestras durante 10 minutos a T.amb y luego se centrifugaron 15 minutos a 12.500 rpm y a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet obtenido con 1 ml de etanol 75%. Se volvió a descartar el sobrenadante luego de centrifugar por 5 minutos a 7.500 rpm y a 4 °C. El pellet de ARN se resuspendió en 20-50 µl de agua libre de nucleasas.

La concentración del ARN obtenido se determinó a través de la medición de la absorbancia a 260 nm de 1 µl de cada muestra utilizando un NanoDrop. Como parámetro de pureza se verificó que la relación entre la DO_{260}/DO_{280} comprendiese el rango 1.7-2, de esta manera se considera que la contaminación proteica es baja.

La integridad de los ARN purificados se verificó a través de una electroforesis en buffer TAE de geles de 1% p/v agarosa con bromuro de etidio y se visualizaron las bandas correspondientes a los ARN ribosomales por exposición a luz UV mediante el uso del equipo G-BOX (Syngene).

Los ARN obtenidos fueron guardados a -70 °C hasta su utilización.

4.2. REACCIÓN DE RETRO-TRANSCRIPCIÓN

La síntesis del ADNc se realizó en un termociclador *Eppendorf*.

Se utilizaron entre 1-3 µg de ARN previamente incubados por 5 minutos a 55 °C. En una primera instancia se realizó un tratamiento con ADNasa en donde el ARN fue incubado en un volumen final de 10 µl con 1 U de *DNasa RQ1 (Promega)* y 0.5 µl de un inhibidor de ARNasas (*RNase OUT™, Invitrogen*) en el buffer correspondiente (*RQ1 DNase 10X Reaction Buffer, Promega*) durante 30 minutos a 37 °C. Luego, se inactivó la enzima DNasa agregando 1 µl de una solución con EGTA que detiene la reacción (*STOP Solution, Promega*) e incubando por 20 minutos a 65 °C.

Para la reacción de retro-transcripción, se agregó 1 µg de hexámeros de nucleótidos al azar y se incubó por 5 minutos a 65 °C. Se colocaron los tubos rápidamente en hielo por al menos 1 minuto para evitar la renaturalización de los ácidos nucleicos. Finalmente, se agregaron a cada tubo 10 µl de una mezcla que contenía: 20 mM DTT (*Promega*), 10 mM dNTP (*Promega*) y 300 U transcriptasa reversa MMLV (*Promega*) en el buffer correspondiente (*M-MLV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer, Promega*). Se incubó durante 10 minutos a 25 °C y luego 90 minutos a 42 °C. Por último, se calentaron los tubos durante 5 minutos a 95 °C para inactivar la enzima.

Los ADNc obtenidos fueron guardados a -20 °C hasta su utilización.

4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

La evaluación de los niveles de ARNm se realizó por PCR cuantitativa en tiempo real utilizando un termociclador BioRad (*CFX Manager*) mediante el método de Curva de Calibración.

Se prepararon las curvas de calibración a partir de seis diluciones seriadas 1:4 utilizando una mezcla de todos los ADNc a medir en cada reacción. A su vez, se realizaron diluciones de cada muestra de ADNc (entre 1:4 y 1:32) de manera que quedaran contenidas dentro de las curvas.

Para la reacción de PCR en tiempo real se utilizó el reactivo *5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix (Solis BioDyne)* el cual posee: ADN polimerasa, dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, y el colorante *EvaGreen* en el buffer correspondiente. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15 µl agregando 300-500 nM de cada oligonucleótido, 1 µl de la dilución del ADNc y cantidad suficiente de agua libre de nucleasas. El programa de amplificación consistió en un paso de activación de la ADN polimerasa a 95 °C durante 10 minutos, seguidos por 30 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 20 segundos a la temperatura de hibridación de cada oligonucleótido (ver Anexos, sección III.1. Oligonucleótidos para PCR) y 30 segundos de elongación a 72 °C, concluyendo la reacción con una elongación final de 10 minutos a 72 °C. Por último se realizó una curva de calentamiento gradual de 65 a 95 °C incrementando la temperatura cada 0.5 °C (Curva de Disociación).

En todas las reacciones de qRT-PCR se analizaron las curvas de disociación para confirmar la presencia de un solo producto de amplificación. Por otro lado, los productos de las primeras corridas fueron analizados por electroforesis en geles 2% p/v de agarosa para corroborar el correcto tamaño de cada amplicón.

Análisis de datos: Los datos de las corridas de qRT-PCR se analizaron con el programa *Bio-Rad CFX Manager 2.1*. El programa fija automáticamente el valor de un umbral (o *threshold*) en el cual todas las muestras se encuentran dentro de la fase exponencial de amplificación y en ese punto se obtienen los valores de Ct (del inglés *Cycle Threshold*) para cada muestra. Se calculó el promedio (triplicado experimental) de la “masa relativa inicial” (m.r.i.) de ARNm aplicando una regresión lineal a partir de la curva de calibración para cada gen. Los valores de m.r.i. se normalizaron con los del el gen de la ARN polimerasa II (RNPII), el cual fue utilizado como gen endógeno o *housekeeping*. Luego, se promediaron los datos normalizados de al menos 3 experimentos independientes y se relativizaron a la condición y/o tratamiento control. Se aplicó la prueba estadística *test de Student* en los casos que corresponda.

En todos los casos se verificó que la eficiencia de la reacción se encuentre entre 1.8-2. Caso contrario se modificaron las condiciones de la reacción (dilución de las muestras, concentración de oligonucleótidos, temperatura de hibridación) hasta obtener eficiencias dentro del rango establecido.

5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

5.1. CITOMETRÍA DE FLUJO

La expresión de ROR1 en la membrana plasmática de las células se evaluó realizando una citometría de flujo sin permeabilizar las células. Los ensayos se realizaron en placas de 6 pocillos.

Las células fueron lavadas en PBS, dispersadas con tripsina, centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos, resuspendidas en D-MEM 10% SFB y contadas al microscopio en cámara de Neubauer. Se plaquearon 4.0×10^5 células en D-MEM 10% SFB por pocillo. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS frío, se dispersaron en una solución EDTA 2 mM y se centrifugaron durante 5 minutos a 3.000 rpm. Las células se resuspendieron en 50 μ l de una solución 0.1% SFB en PBS (buffer de citometría), se agregaron 0.2 μ g del anticuerpo primario anti-ROR1 (R&D 130386) y se incubaron durante 1 hora en hielo. Luego, se lavaron las células en buffer de citometría, se resuspendieron en 50 μ l y se agregó 1 μ g del anticuerpo secundario anti-cabra IgG-dylight488 (Vector) durante 30 minutos en hielo y oscuridad. Por último, las muestras se llevaron a volumen final de 500 μ l en buffer de citometría y se pasaron por un citómetro de flujo (*FACS Aria*, BD).

Como controles de la técnica se utilizaron células sin marcar y células incubadas sólo con el anticuerpo secundario (control isotipo).

Se analizó la señal fluorescente de 10.000 eventos positivos y se realizaron los gráficos de histogramas utilizando el programa *FlowJO*.

5.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Los extractos de proteínas se realizaron en células crecidas hasta un 70-80% de confluencia en placas de 15, 35, 60 o 100 mm de diámetro. Se colocaron rápidamente en hielo y se lavaron

dos veces con PBS frío. Se agregaron entre 100-600 µl de Buffer de Extracción de Proteínas según el tamaño de la placa y se cosecharon las células de las placas con la ayuda de una pequeña espátula de plástico (*scraper*). El homogenato celular se centrifugó a 12.500 rpm a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo eppendorf y se guardaron a -20 °C.

La concentración proteica se determinó mediante la técnica de Bradford (Bradford 1976). Se utilizaron placas de 96 pocillos sembradas con 200 µl del reactivo de Bradford y 1 µl de la muestra a analizar. Paralelamente, se realizó una curva de calibración con concentraciones entre 0.5-5 µg/µl de albúmina sérica bovina (*SIGMA*) para calcular la concentración de proteínas de cada muestra a partir de una regresión lineal. Se midió la absorbancia a 620 nm utilizando un lector de ELISA (*Microlat*).

5.3. WESTERN BLOT

Las muestras a analizar (entre 20-60 µg de proteínas) fueron desnaturalizadas en Buffer de Siembra e incubadas durante 5 minutos a 100 °C. Luego, se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, en donde las muestras se concentraron en un Gel Concentrador y se separaron según su peso molecular en un Gel Separador de 8-15% según el tamaño de las proteínas a estudiar. En paralelo con las muestras se sembró un marcador de peso molecular (*Page Ruler, FERMENTAS*). La electroforesis se llevó a cabo en el sistema de geles de la empresa BioRad a 35 mA por gel en Buffer de Corrida durante 90 minutos. Posteriormente, las proteínas fueron electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa (*Santa Cruz Biotechnology*) a 300 mA en Buffer de Transferencia durante 90 minutos. Finalizado el procedimiento, las membranas fueron teñidas con Solución de Rojo Ponceau para verificar la eficiencia de la corrida y transferencia electroforética y para facilitar el/los corte/s según el tamaño de cada proteína que se desea analizar. Luego, fueron sumergidas en Solución de Bloqueo durante una hora a T.amb en agitación constante. A continuación, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación constante con los respectivos anticuerpos primarios específicos en solución PBS-T. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS-T para luego incubar cada membrana con el

anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con la enzima peroxidasa en PBS-T durante 90 minutos a T.amb. Transcurrido este tiempo, se realizaron nuevamente tres lavados de 5 minutos con PBS-T.

Finalmente, se revelaron las membranas por el método de quimioluminiscencia mezclando iguales volúmenes de la Solución de Revelado I y II. La señal fue capturada por exposiciones a diferentes tiempos en el equipo G-BOX (*Syngene*), utilizando el programa *GeneSnap*.

5.4. ENSAYOS DE INTERACCIÓN POR *PULL DOWN*

El objetivo de este ensayo es medir la cantidad de proteína activa de Rho unida a GTP (Rho-GTP) presente en las células. Esta metodología nos permite separar la isoforma Rho-GTP del extracto de proteínas totales mediante la utilización de la proteína de fusión GST-RBD. La porción RBD (del inglés *Rho Binding Domain*) presenta los dominios de unión a Rho de la proteína efectora Rotequina.

5.4.1. Obtención de la proteína de fusión GST-RBD

Empleando el protocolo de Transformación de Bacterias Competentes (ver Materiales y Métodos, sección 2.3. Transformación de Bacterias Competentes) se transformaron bacterias *Escherichia coli* cepa BL21 con el plásmido GST-RBD, gentilmente cedido por el Dr. Beron (IHEM-CONICET). Con una muestra de una las colonias obtenidas se inocularon 10 ml de medio LB con ampicilina y se incubó durante toda la noche a 37 °C en agitación constante. Al día siguiente, se inocularon 750 ml de LB con ampicilina con 5 ml del medio de cultivo crecido durante noche anterior y se lo incubó a 37 °C en agitación contante hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.6-0.8$. Luego, se agregaron 0.3 mM IPTG para inducir la expresión de la T7-ARN polimerasa y se incubó el cultivo a 37 °C durante 3 horas. Se centrifugaron las bacterias a 12.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el pellet se resuspendió en hielo con 20 ml de Buffer STE frío. Para realizar el lisado celular, se agregaron 100 mg de Lisozima y se incubó durante 15 minutos en hielo. Rápidamente se sonicó la mezcla en 5 ciclos de 30 segundos. Se agregaron 2% v/v Triton X-100 y 0.7% v/v Sarkosyl y se incubó durante 30 minutos a T.amb. Por último, se recuperó el

sobrenadante luego de centrifugar a 13.000 rpm durante 20 minutos. Para la unión con las “beads” de agarosa, se agregaron 750 µl de “beads” en 10 ml de PBS y se incubaron a T.amb durante 1 hora en agitación. Luego, se realizaron 3 lavados con 50 ml de PBS y por último se resuspendieron en 10 ml de PBS.

Se realizó un *Western blot* utilizando un Gel Separador 15% sembrando distintos volúmenes del lisado celular y una curva de masa creciente de BSA. Luego de la tinción con Rojo Ponceau se estimó la concentración de proteína de fusión en el lisado. A continuación, y para corroborar la identidad y el correcto peso molecular de la proteína GST-RBD, se procedió con el protocolo de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario anti-GST.

5.4.2. Ensayo de interacción

Entre 300-500 µg de los extractos proteicos totales fueron incubados con 50 µg de la proteína de fusión GST-RBD durante 1-2 horas a 4 °C en agitación constante. Se realizaron 3 lavados con 500 µl de Buffer de Lisis y se resuspendieron en 40 µl. Por último, se agregó Buffer de Siembra y se incubaron las muestras durante 10 minutos a 100 °C.

Se procedió con el protocolo de *Western blot* (ver Materiales y Métodos, sección 5.3. *Western blot*) sembrando por un lado el producto del ensayo de interacción y en paralelo los extractos proteicos totales. Se utilizó un Gel Separador 15% y un anticuerpo primario anti-Rho.

5.5. INMUNOHISTOQUÍMICA

La detección de ROR1 por inmunohistoquímica se realizó en cortes de muestras tumorales de melanoma de pacientes del Hospital Italiano y del Instituto de Oncología Ángel Roffo.

Las inmunohistoquímicas de las muestras del Hospital Italiano se realizaron en colaboración de la Dra. Vivian Labovsky del laboratorio de Inmunohematología (IByME-CONICET) bajo la dirección de la Dra. Norma Alejandra Chasseing. Los cortes se desparafinaron en xileno

durante 30 minutos y se rehidrataron por pasajes sucesivos en soluciones de etanol/agua destilada, de concentración decreciente (etanol 100%, 96% y 70%). Luego, se bloqueó la actividad peroxidasa endógena incubando durante 10 minutos con una solución de H₂O₂ 3% v/v. A continuación se realizó un lavado con PBS durante 10 minutos seguido del tratamiento de bloqueo de sitio inespecíficos con BSA 1% p/v en PBS durante 1 hora a T.amb en cámara húmeda. Se realizaron 2 lavados con PBS durante 5 minutos y luego se incubaron los cortes con 50 µl del anticuerpo primario anti-ROR1 (sc-130386, dilución 1:100) durante 2 horas a 37 °C. Luego de 2 lavados con PBS de 10 minutos, se realizó la incubación con 50 µl del reactivo “Biotinylated Link” (mezcla preformada de anticuerpos secundarios biotinilados: anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra, *Dako K0690*) a T.amb durante 30 minutos. Las muestras se lavaron 2 veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron con el conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa a T.amb por 30 minutos. Nuevamente, se realizaron 2 lavados con PBS por 10 minutos y se reveló la señal con el sustrato 3,3'-diaminobenzidine (*DAB, Dako K3468*). La reacción se detuvo sumergiendo los vidrios en agua destilada. A continuación se llevó a cabo la tinción de contraste con hematoxilina activada (*Biopur*) durante 1 minuto. Por último, se deshidrataron los cortes por pasajes sucesivos en las soluciones crecientes de etanol/agua y xileno, se dejaron secar y se montaron con Bálsamo de Canadá (*Biopur*).

Los cortes histológicos se observaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 y se tomaron fotos con una cámara digital Nikon asociada al mismo utilizando el programa ACT-2U.

Como control de especificidad de la técnica, se realizó el mismo procedimiento detallado anteriormente pero reemplazando el anticuerpo primario por inmunoglobulina de ratón (*Zymed 08-6599*) en igual concentración.

Los resultados fueron analizados por el Dr. Hernán García Rivello subjefe del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Italiano.

Las inmunohistoquímicas de las muestras del Instituto de Oncología Ángel Roffo fueron realizadas y analizadas por la Dra. Liliana Giménez directora del Área de Diagnóstico Patológico.

6. ENSAYOS CELULARES Y FUNCIONALES

6.1. TRATAMIENTO CON INHIBIDORES Y MEDIOS CONDICIONADOS

Los tratamientos se realizaron en placas de 6 pocillos. Las células fueron lavadas en PBS, dispersadas con tripsina, centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos, resuspendidas en D-MEM 10% SFB y contadas al microscopio en cámara de Neubauer. Se plaquearon 3.0×10^5 células en 2.5 ml de D-MEM 10% SFB por pocillo. Al día siguiente se agregaron los estímulos: LY294002 (50 μ M, *Santa Cruz Biotechnology*), Rapamicina (1 μ M, *LC Laboratories*) o MC Control o Wnt5a (dilución 1:2 en D-MEM). Los tiempos de tratamiento varían según el experimento. Luego se procedió a la extracción de ácidos nucleicos o proteínas (ver Materiales y Métodos, secciones 4.1. Extracción de ARN o 5.2. Extracción de Proteínas).

6.2. ENSAYOS REPORTEROS

6.2.1. Transfección de las células en cultivo

Los ensayos reporteros se realizaron en placas de 24 pocillos. Las células fueron lavadas en PBS, dispersadas con tripsina, centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos, resuspendidas en D-MEM 10% SFB y contadas al microscopio en cámara de Neubauer. Se plaquearon 8.0×10^5 células en 500 μ l de D-MEM 10% SFB por pocillo (3 pocillos por tratamiento). Entre 15-18 horas después de plaquear las células, se realizó la transfección de las mismas utilizando el reactivo *Metafectene* (*Biontex*) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se agregaron 350 μ l de D-MEM 10% SFB. La mezcla de transfección se preparó en dos tubos (I y II), el tubo I contenía 1 μ l del reactivo *Metafectene* y 24 μ l de D-MEM 10% SFB y el tubo II con 0.5 μ g de plásmido (TOP o FHRE según el experimento correspondiente) y cantidad suficiente de D-MEM 10% SFB para 25 μ l. Los tubos I y II se unificaron, se incubaron durante 20 minutos a T.amb y se agregaron los 50 μ l de la mezcla a cada pocillo. Las células se incubaron 6 horas en la estufa y luego se reemplazó el

medio de cultivo por MC Control o por diluciones de MC Wnt3a o Wnt5a (según el experimento correspondiente). Las placas se volvieron a colocar en la estufa durante 16 horas.

Se realizaron 2 o 3 experimentos independientes.

6.2.2. Medición de la actividad luciferasa

Luego de los tratamientos, las células se lavaron con PBS frío y se realizó la extracción de proteínas en 100 µl de Buffer de Lisis de Proteínas. A continuación, se cuantificaron las proteínas totales por el método de Bradford (ver Materiales y Métodos, sección 5.2. Extracción de Proteínas).

La actividad de la enzima luciferasa se determinó incubando 10 µl del extracto proteico con 50 µl de la Solución de Ensayo de Luciferasa en oscuridad parcial. La medición se realizó durante 20 segundos utilizando un luminómetro (*Lumat*).

Análisis de los datos: Se calculó el promedio (triplicado experimental) de los valores de actividad luciferasa obtenidos por el luminómetro y se normalizaron con la masa total de proteínas. Luego, se promediaron los datos normalizados de 3 experimentos independientes y se relativizaron a la condición y tratamiento control. Se aplicó la prueba estadística *test* de ANOVA de dos factores, seguido por el análisis de contrastes de *Tuckey*.

6.3. ENSAYOS DE APOPTOSIS

Los niveles de apoptosis se midieron a través de la detección de fosfatidil-serina en la cara externa de la membrana celular mediante la tinción con Anexina V-FITC (*eBioscience*) e Ioduro de Propidio (*SIGMA*). Los ensayos se realizaron en placas de 6 pocillos.

Las células fueron lavadas en PBS, dispersadas con tripsina, centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos, resuspendidas en D-MEM 10% SFB y contadas al microscopio en cámara de Neubauer. Se plaquearon 2.5×10^5 células en D-MEM 10% SFB por pocillo (3 pocillos por

tratamiento). Al día siguiente se realizó un cambio del medio de cultivo D-MEM 10 o 0% SFB y se incubaron las células en la estufa durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se recolectó el medio de cultivo y se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 rpm. Las células se lavaron con PBS frío, se dispersaron con tripsina y se centrifugaron durante 5 minutos a 3.000 rpm. Se juntaron ambos *pellets* celulares y se resuspendieron en 200 µl de Buffer de Unión de Anexina. Se agregaron 10 µl de Anexina V (de una dilución 1:4) y se incubó durante 30 minutos en hielo y oscuridad. A continuación las muestras se llevaron a volumen final de 500 µl en Buffer de Unión de Anexina y se agregaron 10 µl de Ioduro de Propidio (IP) de una dilución 1:10 antes de ser analizadas por el citómetro de flujo (*FACSAria*, *BD*).

Como controles de la técnica y para realizar la compensación de la citometría se utilizaron células sin marcar, células incubadas sólo con Anexina V-FITC y células incubadas sólo con IP.

Se analizó la señal fluorescente de 10000 eventos positivos y se realizaron los gráficos de distribución de puntos (*dot plots*) utilizando el programa *WinMDI*.

6.4. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Los ensayos de proliferación se realizaron midiendo la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mediante el reactivo MTT en placas de cultivo de 96 pocillos. Las células fueron lavadas en PBS, dispersadas con tripsina, centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos, resuspendidas en D-MEM 10% SFB y contadas al microscopio en cámara de Neubauer. Se plaquearon 6.0×10^3 células en 200 µl de D-MEM 10% SFB por pocillo (6 pocillos por tratamiento) en 2 placas independientes (I y II). A su vez, en la placa I se realizó una curva de calibración de número creciente de células (2.0×10^3 a 1.0×10^5 células por pocillo). A continuación las dos placas fueron colocadas en la estufa. Luego de 4 horas y una vez que las células se encontraban adheridas a la placa, se agregaron 20 µl del reactivo de MTT (5 mg/ml Formazán, *SIGMA*) a cada pocillo de la placa I y se volvió a incubar la placa en la estufa durante 4 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se descartó el medio y se resuspendieron los cristales de formazán en 100 µl de una solución 0.1 N de ácido clorhídrico en isopropanol. Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de Elisa (*Labsystems Multiskan*).

A los tres días de iniciado el ensayo de proliferación se repitió el mismo protocolo para la placa II.

Se realizaron 2 o 3 experimentos independientes.

Análisis de los datos: Se calculó el promedio (sextuplicado experimental) del número de células inicial (Día 0) y final (Día 3) aplicando una regresión lineal a partir de la curva de calibración. Luego, se promediaron los datos de 3 experimentos independientes y se aplicó la prueba estadística *test* de ANOVA de dos factores, seguido por el análisis por contrastes de *Tuckey*.

6.5. ENSAYOS CLONOGÉNICOS

Los ensayos de crecimiento en agar blando se realizaron en placas de 6 pocillos. Se partió de una solución estéril 1% p/v de agar, se fundió utilizando un microondas y luego se la mantuvo a 40 °C en un baño de agua. Se mezclaron iguales volúmenes de la solución de agar con medio de cultivo D-MEM 20% SFB, de manera de obtener una solución 0.5% agar en D-MEM 10% SFB. Se agregaron 1.5 ml de la mezcla a cada pocillo y se incubó la placa a T.amb hasta que la solución solidificó.

Por otro lado, se preparó una solución estéril 0.7% p/v agarosa que también se fundió en el microondas y se mantuvo en el baño de agua a 40 °C. En paralelo, las células fueron lavadas en PBS, dispersadas con tripsina, centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos, resuspendidas en D-MEM 10% SFB y contadas al microscopio en cámara de Neubauer. Se utilizaron 6.0×10^3 células por pocillo (3 pocillos por tratamiento). Se mezclaron iguales volúmenes de la solución de agarosa con la solución de células en medio de cultivo D-MEM 20% SFB, de manera de obtener una solución 0.5% agarosa en D-MEM 10% SFB. Se agregaron 1.5 ml de la mezcla a cada pocillo y se incubó la placa a T.amb hasta que la solución solidificó. Finalmente se agregó 1 ml de D-MEM 10% SFB y se colocó la placa en la estufa durante 21 días, tiempo en el cual las colonias se hicieron visibles al ojo desnudo.

Las colonias se fijaron y tiñeron agregando 1 ml de una solución 0.005% p/v de cristal violeta en 20% de etanol durante 1 hora en agitación constante. Se utilizó el equipo G-BOX (*Syngene*) para registrar imágenes de las colonias de cada pocillo.

Se realizaron 1 o 2 experimentos independientes.

Análisis de los datos: Se utilizó la función “*Colony Count*” (contador de colonias) del programa *GeneTools* para cuantificar el número de colonias. Se generaron 5 categorías de tamaño de colonias creciente fijando la cantidad de píxeles máximos y mínimos dentro de cada una. Se promediaron los valores del número de colonias (triplicado experimental) totales y en cada categoría. Luego, se calculó el porcentaje de colonias dentro de cada categoría para independizar el resultado de las diferencias en el número total de colonias obtenidas en cada caso.

6.6. ENSAYOS DE ADHESIÓN CELULAR

Los ensayos de adhesión se realizaron en placas de 96 pocillos. Las células fueron lavadas en PBS, dispersadas en una solución 2 mM de EDTA o con tripsina, centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos, resuspendidas en D-MEM 10% SFB y contadas al microscopio en cámara de Neubauer. Se plaquearon 3.0×10^4 células en 200 μ l de D-MEM 10% SFB por pocillo (6 pocillos por tratamiento). A continuación las placas fueron colocadas en la estufa (una durante 30 minutos y otra 6 horas). Una vez transcurrido el tiempo deseado, se descartó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS, se fijaron con metanol por 10 minutos y se tiñeron con una solución 0.1% p/v de cristal violeta durante 10 minutos. Para cuantificar las células que permanecieron adheridas a la placa se resuspendió el colorante con una solución 10% v/v metanol y 5% v/v Ácido acético glacial y se midió la absorbancia en un lector de Elisa (*Microlat*) a 620nm.

Se realizaron al menos 3 experimentos independientes.

Análisis de los datos: Se calculó el promedio (sextuplicado experimental) de las absorbancias medidas para cada condición (30 minutos y 6 horas). Luego, se promediaron los valores de 3 o 5 experimentos independientes (según corresponda en cada caso) y se

relativizaron los valores a la condición control. Se aplicó la prueba estadística *test* de ANOVA de dos factores, seguido por el análisis por contrastes de *Tuckey*.

6.7. ENSAYOS DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

Los ensayos de cicatrización de heridas se realizaron en placas de 6 pocillos. La superficie de la placa fue cubierta por una solución 5 µg/µl fibronectina (*Millipore*) durante 1 hora a 37 °C y luego se la dejó secar al aire dentro de la campana de cultivo. Las células fueron lavadas en PBS, dispersadas con tripsina, centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos, resuspendidas en D-MEM 10% SFB y contadas al microscopio en cámara de Neubauer. Se plaquearon 6.0×10^5 células en 2.5 ml de D-MEM 10% SFB por pocillo. Al día siguiente y una vez formada la monocapa de células, se realizó una herida a lo largo de la placa con un tip amarillo estéril de 200 µl. Se realizaron varios lavados con PBS para descartar las células que se levantaron durante el trazado de la herida y se volvió a agregar medio de cultivo D-MEM 10% SFB. Se registraron imágenes con una cámara digital (*Olympus Q-Colour.5*) acoplada a un microscopio invertido (*Olympus*) de 6 campos diferentes a lo largo de la herida a tiempo inicial y luego de 16 horas de realizada la misma.

Se realizaron al menos 3 experimentos independientes.

Análisis de los datos: Se midió el área inicial (T0) y final (T1) de la herida en todas las imágenes utilizando el programa *ImageJ*. Se calculó el promedio (sexuplicado experimental) del porcentaje de avance de las células mediante la ecuación: $(T0 \cdot 100) / (T0 - T1)$ para cada uno de los seis pares de campos registrados. Luego, se promediaron los valores de 3 experimentos independientes y se aplicó la prueba estadística *test* de *Student*.

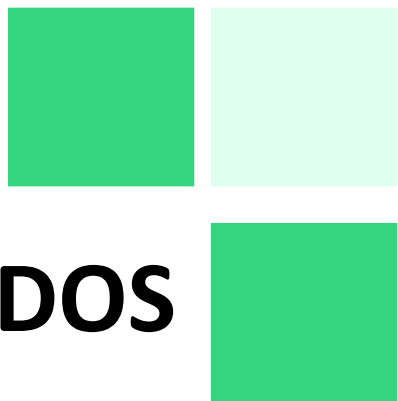
6.8. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR POR *TRANSWELL*

Los ensayos de migración por “*transwell*” se realizaron en placas de 24 pocillos utilizando los insertos con poros de diámetro 0.8 μm (*Falcon*). Se incubó la superficie inferior de la membrana con una solución 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de fibronectina durante 1 hora a 37 °C. Las células fueron lavadas en PBS, dispersadas con tripsina, centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos, resuspendidas en D-MEM 5% SFB y contadas al microscopio en cámara de Neubauer. Se sembraron 5.0×10^4 células en 200 μl de D-MEM 2% SFB en la parte superior del inserto colocado sobre el pocillo de la placa de cultivo con 600 μl de D-MEM con 10% SFB. Luego, se colocó la placa en la estufa durante 16 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el inserto de la placa y se descartó el medio de cultivo remanente. Se realizaron tres lavados con PBS y finalmente se retiraron de la membrana las células que no migraron con un hisopo embebido en PBS. Las células que migraron hacia la superficie inferior de la membrana se fijaron y tiñeron con una solución 0.5% p/v de cristal violeta en 20% v/v de metanol. Se registraron imágenes con una cámara digital (*Olympus Q-Colour.5*) acoplada a un microscopio invertido (*Olympus*) de 11 campos diferentes que comprendían la totalidad de la superficie de la membrana.

Se realizaron 2 experimentos independientes.

Análisis de datos: Se contó el total del número de células en cada imagen registrada utilizando el programa *ImageJ*. Se calculó el promedio del número de células por campo para cada condición.

RESULTADOS



1. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ROR1, ROR2 Y WNT5A EN MELANOMA

Dada la necesidad de identificar nuevos factores moleculares que contribuyan a la progresión de melanoma, y considerando la poca información que se posee sobre la participación de la señalización no-canónica de Wnt en este tipo de cáncer, nos propusimos en primer lugar analizar la expresión de los receptores ROR1 y ROR2 y de su ligando Wnt5a.

En particular, nos interesó estudiar al receptor ROR1, ya que al momento de iniciada esta tesis se había reportado su expresión en algunos tipos de leucemias (LLC y LLA) pero se desconocía su rol en otros tipos de cáncer. Además, nada se sabía sobre las vías de señalización reguladas por ROR1 ni sobre los procesos celulares en los cuales participaba. Por el contrario, la participación de Wnt5a y ROR2 en diversos tipos de cáncer ya había sido descrita (ver Introducción, sección 2.5. Rol de Wnt5a en Cáncer).

1.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ROR1, ROR2 Y WNT5A EN LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO

En una primera instancia evaluamos la expresión de ROR1 por qRT-PCR en 13 líneas celulares de melanoma humano, 7 de las cuales corresponden a líneas primarias y 6 a líneas metastásicas (ver **Tabla 2** en Materiales y Métodos, sección 3.1. Líneas Celulares). La presencia del ARNm de ROR1 fue detectada en todas las líneas celulares estudiadas (**Figura 12A**). Cuando comparamos la expresión de ROR1 en las líneas primarias y metastásicas, no observamos diferencias significativas (**Figura 12B**).

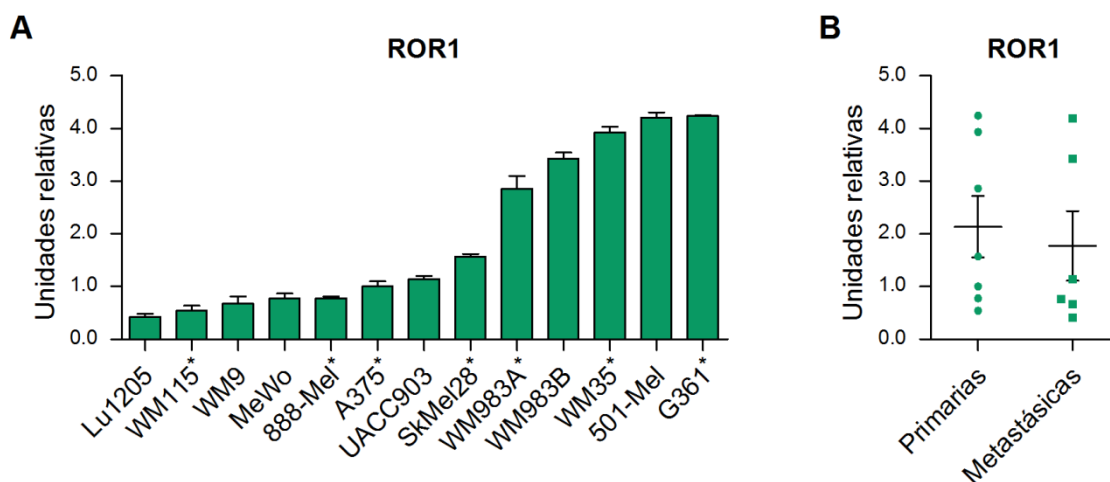


Figura 12. Expresión de ROR1 en líneas celulares de melanoma humano. (A) Expresión relativa del ARNm de ROR1 en líneas celulares de melanoma por qRT-PCR. Los asteriscos (*) indican las líneas primarias. Los resultados se expresan como la media \pm d.e. de los niveles de ARNm de ROR1 normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a la línea A375. **(B)** Comparación de los niveles relativos de ARNm de ROR1 entre las líneas primarias ($n=7$) y metastásicas ($n=6$) de melanoma (valores provenientes del panel A). Se muestra la media (barra horizontal) \pm e.e.m.

Para establecer si la presencia de ROR1 en las líneas celulares de melanoma representa una característica del linaje melanocítico, analizamos su expresión en una línea celular de melanocitos humanos inmortalizados (HuMel, del inglés *Human Melanocytes*) y la comparamos con 5 de las líneas celulares que habían presentado los niveles más bajos de ROR1 en la determinación anterior (**Figura 12A**). Medimos los niveles de ROR1 mediante qRT-PCR y *Western blot* (**Figura 13A y B**, respectivamente) y en ambos casos la expresión de ROR1 en los melanocitos fue muy baja oscilando en un rango entre 3 a 15 veces menor que en las líneas Lu1205, A375 y UACC903.

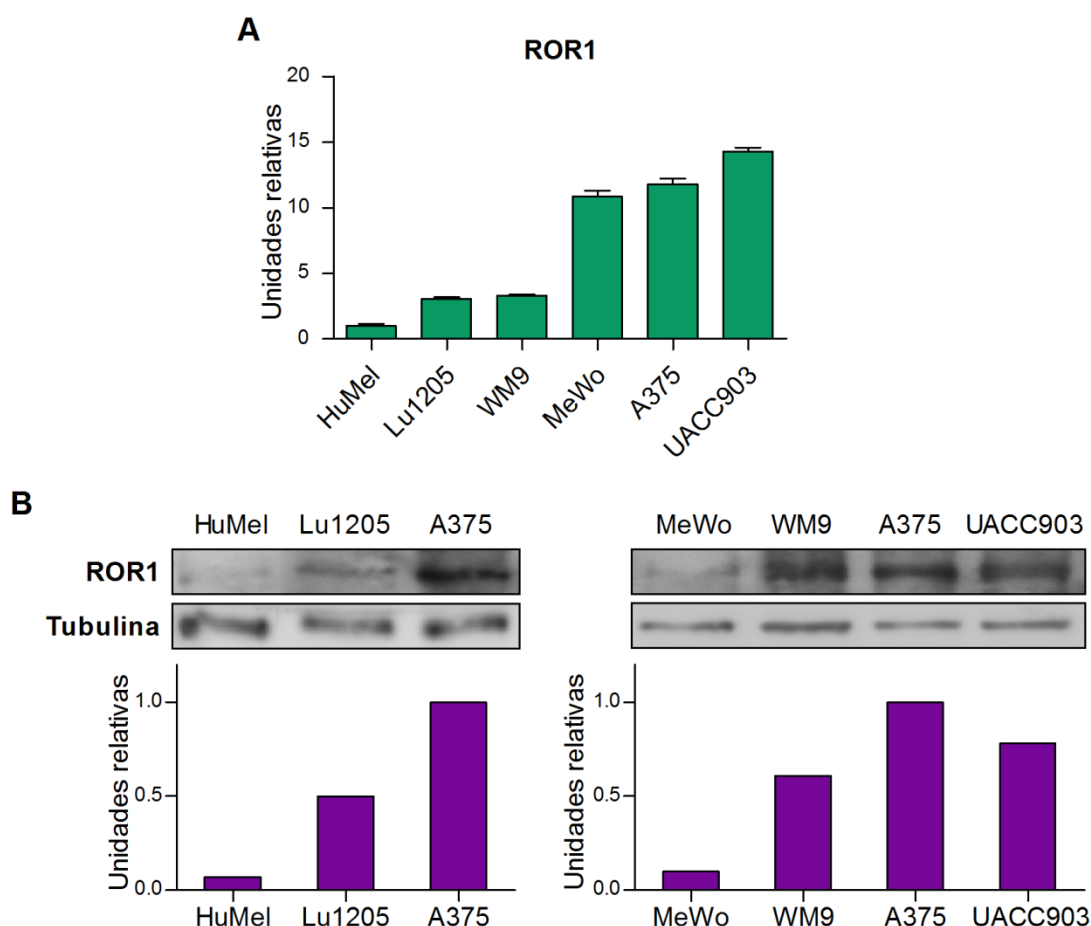


Figura 13. Expresión de ROR1 en melanocitos inmortalizados y líneas celulares de melanoma humano. (A) Expresión relativa del ARNm de ROR1 en HuMel y líneas celulares de melanoma por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm d.e. de los niveles de ARNm de ROR1 normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a los HuMel. (B) Panel superior: Western blot de ROR1 (R&D AF2000) en extractos proteicos de HuMel y líneas celulares de melanoma. Tubulina se utilizó como control de carga. Panel inferior: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de ROR1 normalizados a los valores de tubulina y relativizados a la línea celular A375.

Por otro lado, analizamos la expresión de ROR2 y WNT5A por qRT-PCR en las 13 líneas celulares de melanoma humanas (**Figura 14**). A diferencia de lo que ocurrió con ROR1, el ARNm de ROR2 y WNT5A no fue detectado en todas las líneas y algunas presentaron niveles muy bajos de expresión (**Figura 14A y C**). Si bien no se observaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de ROR2 en las líneas celulares metastásicas al compararlas con las líneas primarias, los niveles más elevados se obtuvieron en 4 líneas celulares derivadas de tumores primarios (WM115, WM35, 888-Mel y G361) (**Figura 14B**). Por otro lado, cuando

comparamos la expresión de WNT5A entre las líneas primarias y metastásicas, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos (**Figura 14D**).

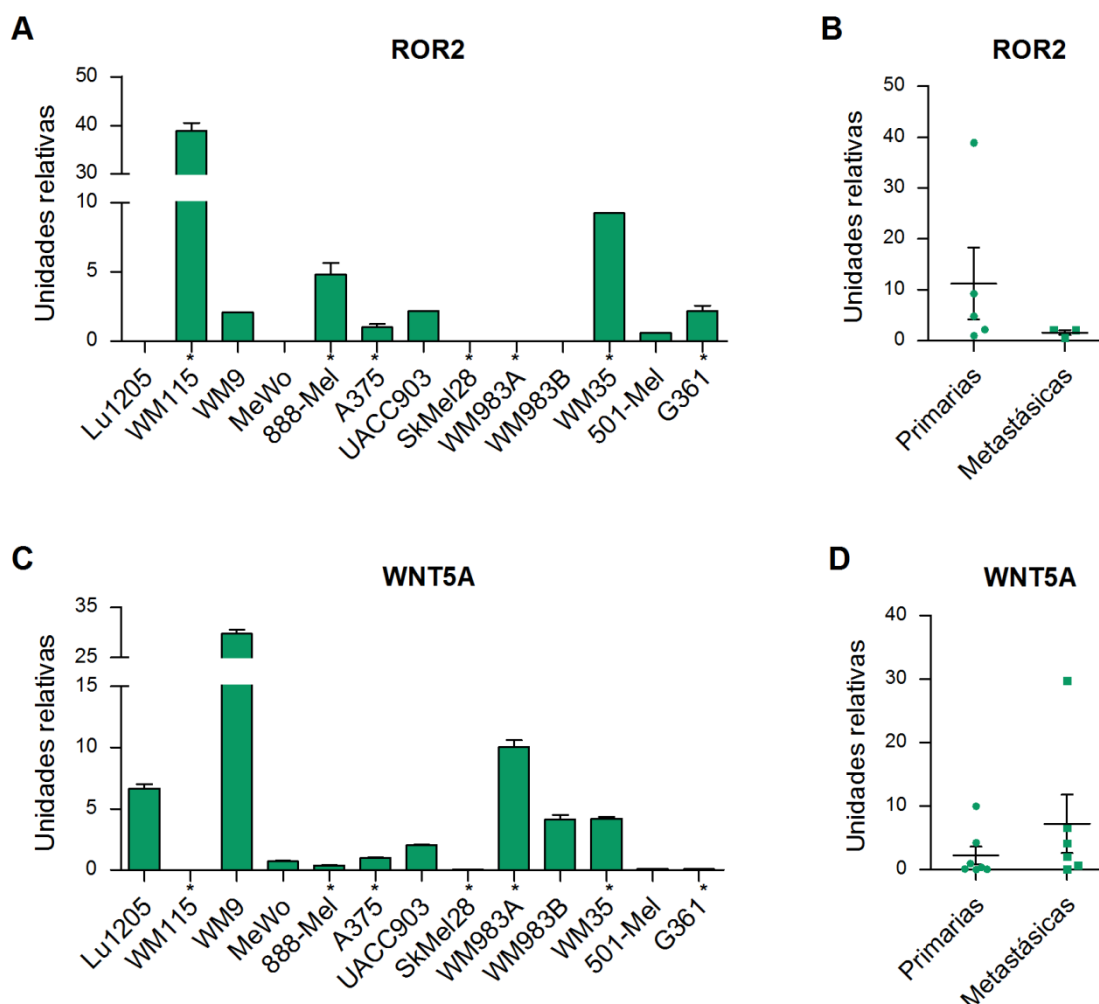


Figura 14. Expresión de ROR2 y WNT5A en líneas celulares de melanoma humano. (A y C) Expresión relativa del ARNm de ROR2 (A) o WNT5A (C) en líneas celulares de melanoma por qRT-PCR. Los asteriscos (*) indican las líneas primarias. Los resultados se expresan como la media \pm d.e. de los niveles de ARNm de ROR2 o WNT5A normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a la línea A375. (B y D) Comparación de los niveles relativos de ARNm de ROR2 (B) y WNT5A (D) entre las líneas primarias (n=7) y metastásicas (n=6) de melanoma. Los datos corresponden a los paneles A y C respectivamente. Se muestra la media (barra horizontal) \pm e.e.m.

Un análisis posterior de los resultados de expresión de ROR1, ROR2 y WNT5A nos permitió determinar que los niveles de ARNm de ROR1 no correlacionan significativamente con la expresión de ROR2 y WNT5A en las 13 líneas celulares analizadas (resultados no mostrados).

1.2. ANÁLISIS *IN SILICO*

Como paso inicial para determinar la función de una proteína en el proceso de progresión tumoral muchas veces resulta útil llevar a cabo análisis bioinformáticos, ya que estos pueden brindar indicios que orienten el trabajo experimental.

Una herramienta de gran utilidad en melanoma es el algoritmo desarrollado por el grupo del Dr. Hoek denominado HOPP (del inglés *Heuristic Online Phenotype Prediction*). A partir de los datos de expresión génica por microarreglos de 97 genes, este algoritmo permite determinar si una muestra posee características asociadas a un fenotipo “proliferativo” o “invasivo” (Widmer et al. 2012). Dado que Wnt5a ha sido asociado a una mayor capacidad invasiva de las células de melanoma (Weeraratna et al. 2002; Dissanayake et al. 2007), este análisis podría indicar si ROR1 tiene similares funciones.

La aplicación del algoritmo HOPP en forma automatizada a los datos de expresión génica de 220 líneas celulares de la base de datos *Melanoma Phenotype - Specific Expression* permite asignar a la mayoría de las líneas celulares uno u otro fenotipo. Cuando analizamos la expresión de ROR1 en las 220 líneas celulares no se observaron diferencias en los niveles de expresión entre los fenotipos “proliferativo” e “invasivo” (**Figura 15**). De las tres sondas utilizadas en este estudio sólo se observaron diferencias significativas con una de ellas, mientras que con las otras dos sondas empleadas no se detectaron diferencias.

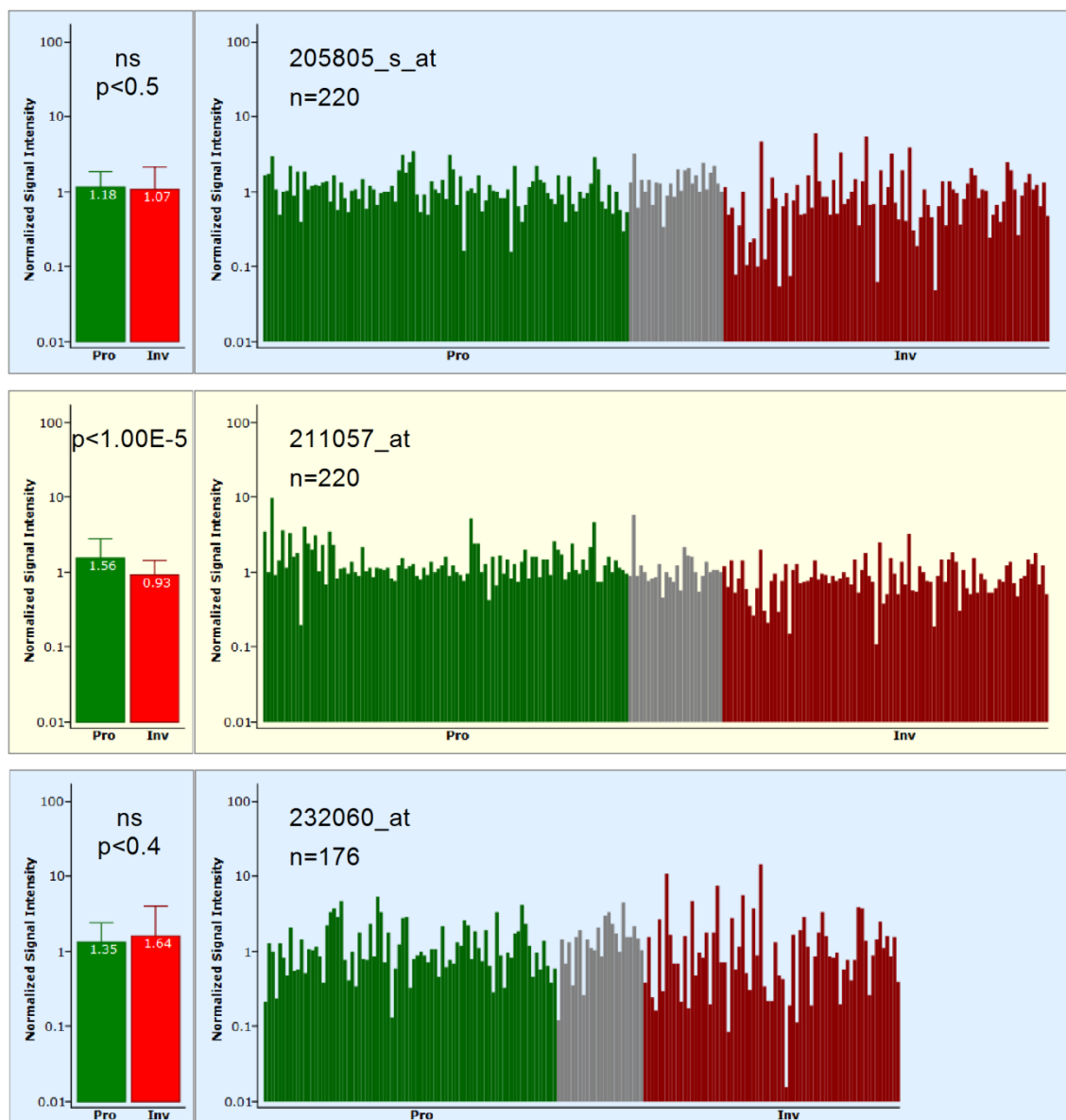
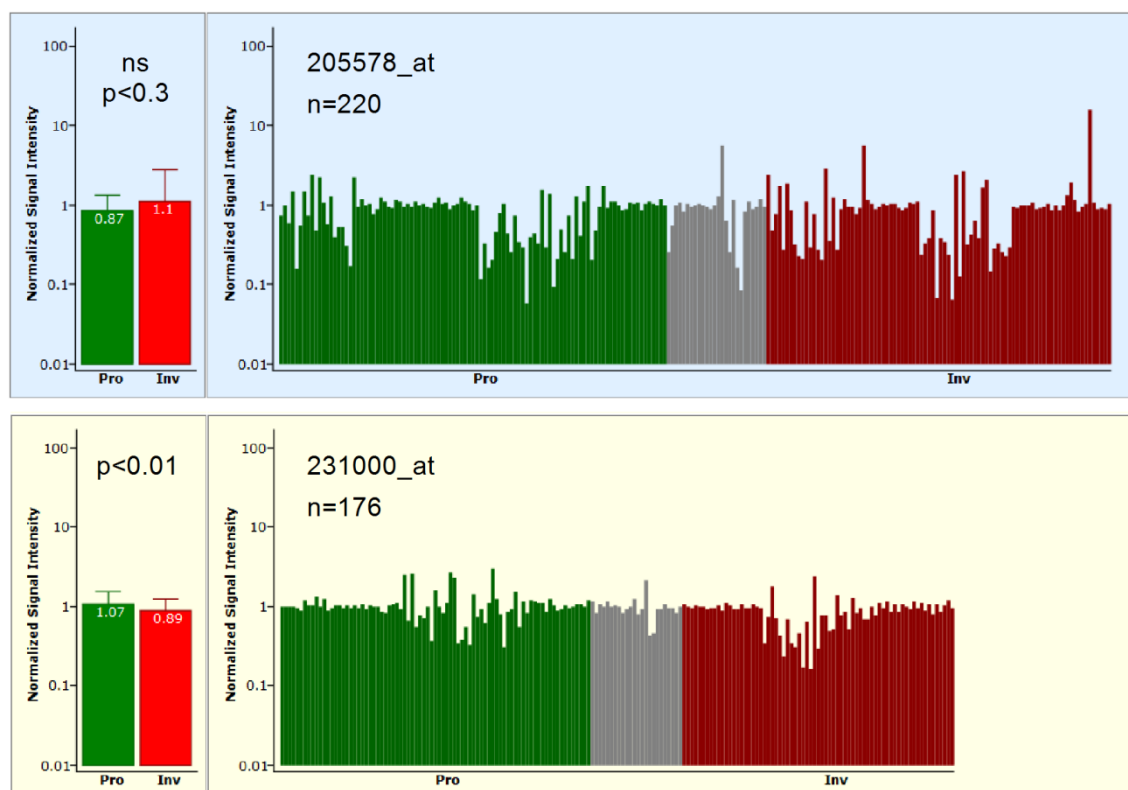
ROR1

Figura 15. Perfiles de expresión de ROR1 en líneas celulares de melanoma y análisis de correlación con fenotipos proliferativo o invasivo. Expresión relativa del ARNm de ROR1 (tres sondas) en 220 líneas celulares de melanoma humano agrupadas según el fenotipo proliferativo (verde) o invasivo (rojo). Cada cuadro corresponde al análisis de una sonda diferente. Los resultados se expresan como la intensidad de señal normalizada para cada línea celular (panel derecho) y el promedio agrupando las líneas con fenotipo proliferativo o invasivo (panel izquierdo). Las líneas en gris corresponden a muestras con fenotipo indeterminado. En los gráficos se indica el valor del p estadístico, el nombre de la sonda utilizada y el número de líneas celulares analizadas en cada estudio. Los gráficos se generaron automáticamente por el: "Heuristic Online Phenotype Prediction MPSE facility" (http://www.jurmo.ch/hopp/hopp_mpse.php).

A continuación evaluamos la expresión de dos sondas correspondientes a ROR2 en la misma base de datos. Una de ellas no arrojó diferencias entre la expresión de ROR2 y los fenotipos “proliferativo” o “invasivo”, mientras que con la otra sonda se observó una asociación significativa pero de muy baja magnitud entre ROR2 y el perfil “proliferativo” (**Figura 16A**).

Por otro lado, y como esperábamos de acuerdo a evidencias previas (Weeraratna et al. 2002), cuando analizamos la expresión de WNT5A, sí encontramos diferencias significativas entre los dos fenotipos. Con las tres sondas empleadas se obtuvieron mayores niveles de expresión de WNT5A en las líneas con fenotipo “invasivo” y en los tres casos las diferencias fueron significativas y de alta magnitud (**Figura 16B**).

A ROR2



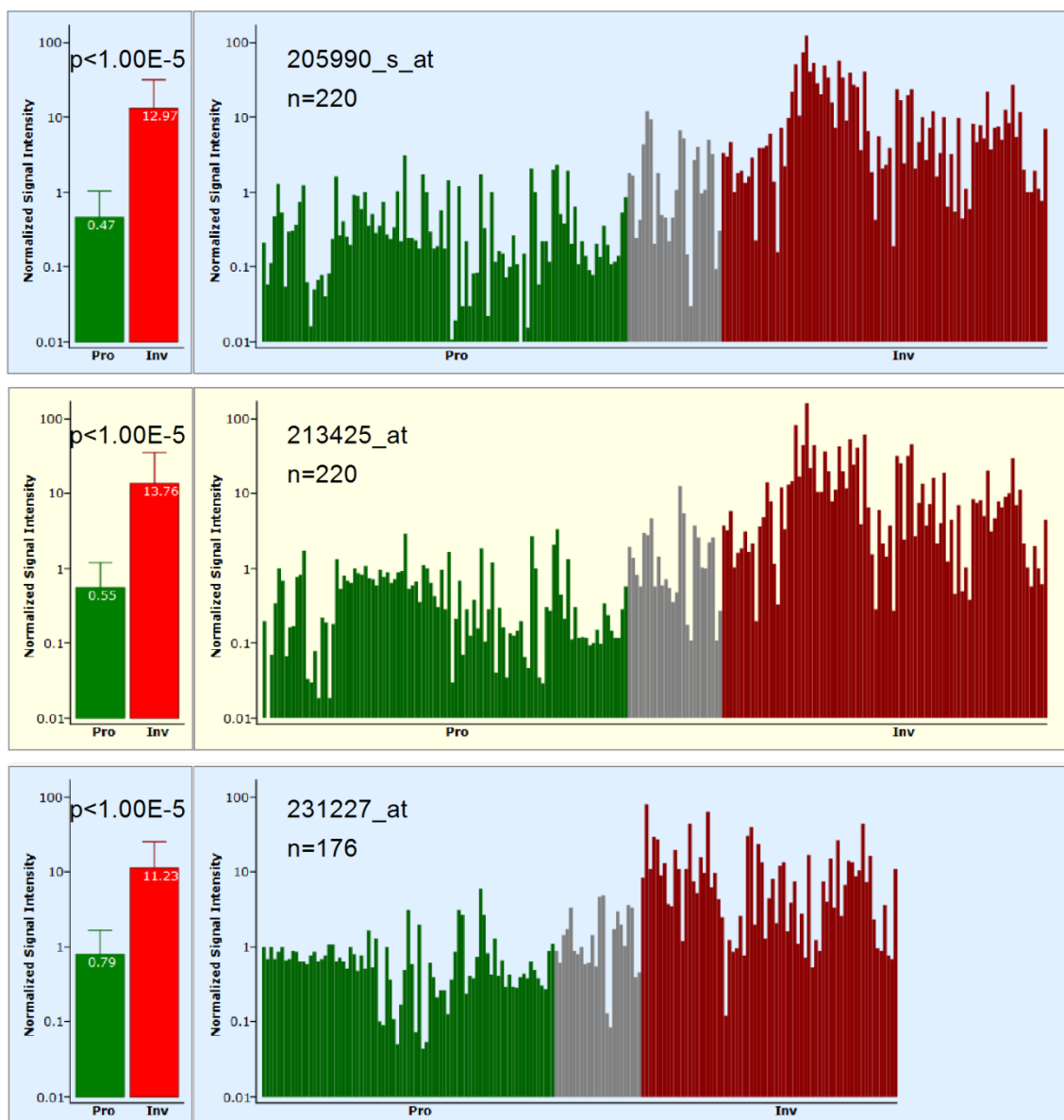
B WNT5A

Figura 16. Perfiles de expresión de ROR2 y WNT5A en líneas celulares de melanoma y análisis de correlación con fenotipos proliferativo o invasivo. Expresión relativa del ARNm de ROR2 (A, dos sondas) y WNT5A (B, tres sondas) en líneas celulares de melanoma humano agrupadas según el fenotipo proliferativo (verde) o invasivo (rojo). Cada cuadro corresponde al análisis de una sonda diferente. Los resultados se expresan como la intensidad de señal normalizada para cada línea celular (panel derecho) y el promedio agrupando las líneas con fenotipo proliferativo o invasivo (panel izquierdo). Las líneas en gris corresponden a muestras con fenotipo indeterminado. En los gráficos se indica el valor del p estadístico, el nombre de la sonda utilizada y el número de líneas celulares analizadas en cada estudio. Los gráficos se generaron automáticamente por el: "Heuristic Online Phenotype Prediction MPSE facility" (http://www.jurmo.ch/hopp/hopp_mpse.php).

En conjunto, nuestros resultados y el análisis de los datos de microarreglos muestran que ROR1 se expresa en líneas celulares de melanoma humano pero que no se asocia a un estadio de progresión específico ni a un fenotipo particular. Mientras tanto, ROR2 parece asociarse a estadios primarios de progresión y WNT5A correlaciona significativamente con un fenotipo del tipo “invasivo”.

1.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ROR1 EN MUESTRAS DE TUMORES DE PACIENTES CON MELANOMA

A continuación quisimos determinar la expresión de ROR1 ya no en líneas celulares *in vitro* sino en muestras de tumores de pacientes con melanoma mediante ensayos de inmunohistoquímica.

Realizamos dos estudios independientes con muestras obtenidas de dos instituciones diferentes. En un caso se utilizaron muestras de tumores de melanoma de pacientes del Hospital Italiano, que fueron analizadas por el Dr. Hernán García Rivello, jefe del servicio de Anatomía Patológica. En el segundo caso, las muestras provinieron del Instituto de Oncología Ángel Roffo y fueron analizadas por la Dra. Liliana Giménez, directora del Área de Diagnóstico Patológico.

Los resultados de las muestras del Hospital Italiano se describen en la **Tabla 3**, en donde se indica el diagnóstico del paciente al momento de realizar la biopsia, el estadio de Clark y el grado de Breslow para cada una de las muestras. En el análisis por inmunohistoquímica observamos marcación positiva para ROR1 en 8 de los 13 (62%) pacientes analizados.

Paciente	Diagnóstico	Clark	Breslow	Marcación ROR1 (sc-130386)
11-3381	Melanoma Superficial Difuso	III	1,1	+++
11-2050	Melanoma Superficial Difuso	III	1	+++
11-6759	Melanoma Superficial Difuso	III	1	+
12-5271	Melanoma Nodular Maligno	III	1,1	+++
11-9462	Melanoma Nodular Maligno	III	2,8	-
11-18368	Melanoma Nodular Maligno	IV	4,5	-
11-19303	Melanoma Nodular Maligno	III	2,5	+
11-25042	Melanoma Nodular Maligno	V	21	-
12-8149	Melanoma Nodular Maligno	IV	6	++
07-19964	Melanoma Nodular Maligno	IV	5	-
09-11521	Melanoma Nodular Maligno	IV	4,3	++
8-2417	Melanoma Lentigo Maligno	III	1,3	-
13-30651	Melanoma	III	0,7	+

Tabla 3. Información correspondiente a las muestras de tumores de melanoma del Hospital Italiano. Inmunohistoquímica de ROR1 (cs-130386) en 13 muestras de tumores de melanoma humano. Se detalla el diagnóstico para cada muestra analizada, así como también el estadio de Clark y grado de Breslow. Los resultados de la tinción inmunohistoquímica contra ROR1 (CS-4102) se clasificaron según el siguiente criterio: +++ más del 70% de las células marcadas, ++ 50% de las células marcadas, + menos del 50% de las células marcadas, - marcación negativa. n.d. no determinado.

En la **Figura 17** se muestran imágenes representativas de dos de los pacientes que presentaron marcación positiva para ROR1. Se puede observar que ROR1 presenta marcación citoplasmática, en concordancia con lo descripto en literatura para otros tipos tumorales (Zhang et al. 2012b).

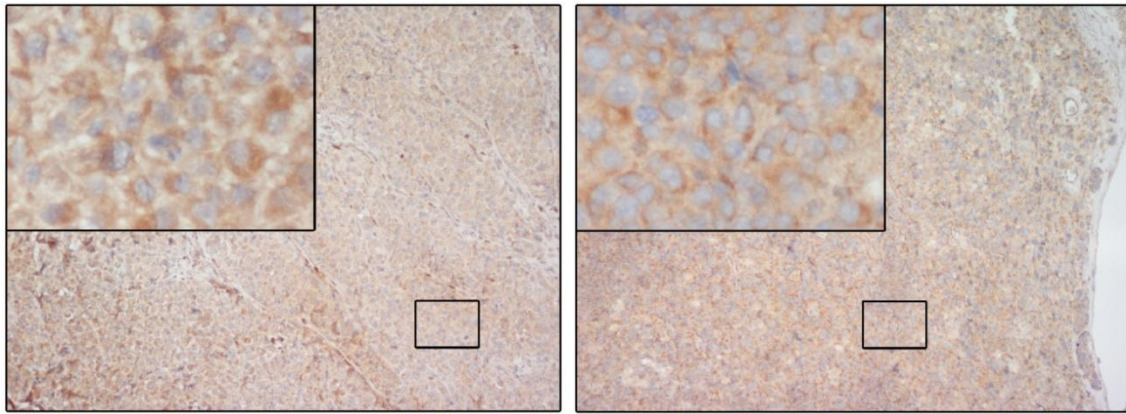


Figura 17. Expresión de ROR1 en muestras de tumores de melanoma del Hospital Italiano. Imágenes representativas de las inmunohistoquímicas de ROR1 y tinción con hematoxilina en dos pacientes con melanoma positivos para la marcación con ROR1 (panel izquierdo: 12-8149 y panel derecho: 09-11521). El área con recuadro se ilustra con un aumento de 500X.

El análisis de las muestras obtenidas del Instituto Roffo se detalla en la **Tabla 4**. De la misma manera que para el caso anterior, se indica el diagnóstico del paciente al momento de realizar la biopsia, el estadio de Clark y el grado de Breslow. En este caso, se detectó marcación positiva para ROR1 en 8 de las 11 (82%) muestras analizadas.

Paciente	Diagnóstico	Clark	Breslow	Marcación ROR1 (CS-4102)
130514-A	Melanoma Superficial Difuso	III	1,8	+++
130714-A	Melanoma Superficial Difuso	III	1,5	++
130986-A	Melanoma Superficial Difuso	> III	> 2	+++
133533-A	Melanoma Superficial Difuso	III	1	-
133786-A	Melanoma Nodular Maligno	> IV	> 3,8	+++
130355-A	Melanoma Lentiginoso Acral	V	13	-
140459-A	Melanoma Maligno	n.d.	n.d.	+++
141609-A	Melanoma Maligno	n.d.	n.d.	++
141826-A	Melanoma Maligno	n.d.	n.d.	+++
BT14	Melanoma Maligno	n.d.	n.d.	+
BT15	Plantar Melanoma	n.d.	n.d.	++

Tabla 4. Información correspondiente a las muestras de tumores de melanoma del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Inmunohistoquímica de ROR1 (CS-4102) en 11 muestras de tumores de melanoma humano. Se detalla el diagnóstico para cada muestra analizada, así como también el estadio de Clark y grado de Breslow. Los resultados de la tinción inmunohistoquímica contra ROR1 (CS-4102) se clasificaron según el siguiente criterio: +++ más del 70% de las células marcadas, ++ 50% de las células marcadas, + menos del 50% de las células marcadas, - marcación negativa. n.d. no determinado.

Como conclusión de ambos estudios podemos decir que ROR1 se expresa en el 60 a 80% de los tumores de melanoma analizados y no parece asociarse con el diagnóstico, el estadio de Clark o el grado de Breslow. Debido a la ausencia de datos sobre la evolución y sobrevida de la mayoría de los pacientes estudiados no pudimos evaluar si la expresión de ROR1 presenta alguna implicancia en la prognosis de la enfermedad o el tiempo de sobrevida de los pacientes.

1.4. EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE ROR1, ROR2 Y WNT5A Y LA SOBREVIDA DE PACIENTES CON MELANOMA

Ante la imposibilidad de analizar la supervivencia de los pacientes de melanoma provenientes de ambas instituciones locales, decidimos llevar adelante este estudio empleando datos de microarreglos de ARN disponibles en bases de datos públicas como *GEO* (del inglés *Gene Expression Omnibus*).

En primer lugar utilizamos datos correspondientes al número de acceso **GSE46517**, compuesto por 34 muestras de melanoma metastásico derivadas de pacientes con un seguimiento detallado y prolongado luego de la escisión del tumor. Para cada uno de los tres genes analizados (ROR1, ROR2 y WNT5A), segregamos a los pacientes en 2 grupos según los niveles de expresión relativa: Alta 50 (A50, 50% de los pacientes con mayores niveles de expresión) y Baja 50 (B50, 50% de los pacientes con menores niveles de expresión). Para evaluar la asociación entre la expresión de ROR1, ROR2 o WNT5A con la esperanza de vida de los pacientes realizamos curvas de supervivencia según el método de Kaplan-Meier para cada uno de los grupos (ver Anexos, sección VI. Datos de Expresión y Supervivencia de los Pacientes).

Cuando analizamos la asociación entre la expresión de ROR1 y la Supervivencia Libre de Metástasis (SLM) de los pacientes, no encontramos diferencias significativas entre los grupos A50 y B50 (**Figura 18A**). No obstante, se puede observar que a partir de los 50 meses las curvas comienzan a diferenciarse, siendo la SLM menor en los pacientes con mayor expresión de ROR1. Cuando analizamos la Supervivencia Post-Recurrencia (SPR) de los pacientes observamos una correlación significativa entre una menor SPR de los pacientes y una mayor expresión de ROR1 ($p=0.0008$). En los pacientes con mayor expresión de ROR1 (A50) la mediana de supervivencia fue de 10 meses, mientras que en los pacientes con menor expresión de ROR1 (B50) fue de 24 meses (**Figura 18B**).

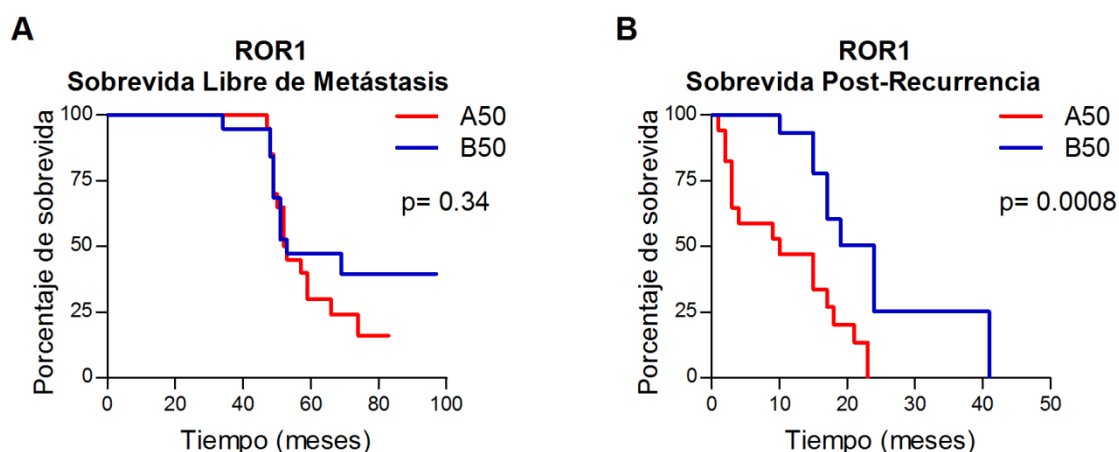


Figura 18. La expresión de ROR1 correlaciona con una menor *Sobrevida Post-Recurrencia* de los pacientes con melanoma de la base de datos GSE46517. A partir de los niveles de expresión de ROR1 de los 34 pacientes de la base de datos GSE46517 se realizaron curvas de *Sobrevida Libre de Metástasis* (A) y de *Sobrevida Post-Recurrencia* (B) según Kaplan-Meier. Los pacientes fueron divididos en 2 grupos de 17 pacientes cada uno según los niveles de expresión relativa de ROR1. Los grupos A50 y B50 contienen a los pacientes con mayores y menores niveles de ROR1, respectivamente. Los valores del p estadístico de la prueba log-rank se muestran en cada gráfico.

Por el contrario, al analizar la asociación entre ROR2 o WNT5A con la SLM o la SPR no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos (**Figura 19**). En particular, se observa una tendencia entre una menor SPR en los pacientes con mayor expresión de Wnt5a a partir de los 25 meses, pero las diferencias no alcanzan a ser significativas (A50 vs B50: $p=0.084$, mediana de supervivencia 15 vs 19 meses, respectivamente) (**Figura 19D**).

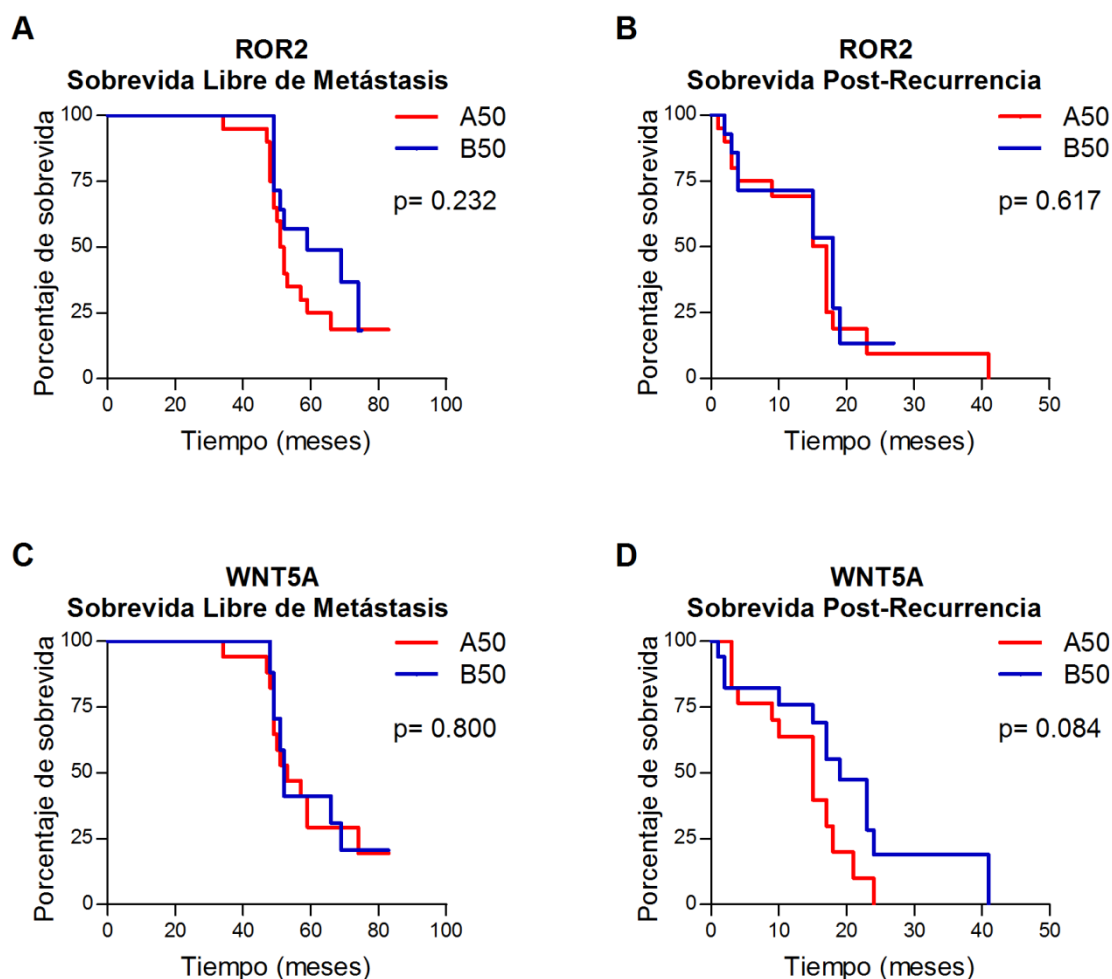


Figura 19. Análisis de la sobrevida de pacientes con melanoma en función d la expresión de ROR2 o WNT5A de la base de datos GSE46517. Se utilizaron los valores de la base de datos GSE46517 para la expresión relativa de ROR2 (A y B) y WNT5A (C y D) de 34 muestras de tumores de melanoma y se analizaron las curvas de Sobrevida Libre de Metástasis (A y C) y de Sobrevida Post-Recurrencia (B y D) de los pacientes según Kaplan-Meier. Los pacientes fueron divididos en 2 categorías según los niveles de expresión relativa de ROR2 y WNT5A. Los grupos A50 y B50 contienen a los pacientes con mayores y menores niveles de expresión, respectivamente). Los valores del p estadístico de la prueba log-rank se muestran en cada gráfico.

Para confirmar estas observaciones analizamos otro grupo independiente de pacientes. En este caso, los datos corresponden al número de acceso **GSE19234**, compuesto por 44 muestras de tumores de melanoma (Bogunovic et al. 2009). En este caso, dividimos a los pacientes en 4 categorías según el nivel de expresión relativa de ROR1 o ROR2: Alta 20 o 35 (A20 o A35, 20% o

35% de los pacientes con mayores niveles de expresión, respectivamente) y Baja 20 o 35 (B20 o B35, 20% o 35% de los pacientes con menores niveles de expresión, respectivamente). Nuevamente realizamos curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para cada una de las categorías (ver Anexos, sección VI. Datos de Expresión y Sobrevida de los Pacientes).

Cuando comparamos los niveles de expresión de ROR1 en los grupos A20 y A35 vs B20 y B35, respectivamente, obtuvimos una asociación significativa entre una mayor de expresión de ROR1 y menor tiempo de sobrevida post-recurrencia de los pacientes (**A35 vs B35**: $p=0.015$, mediana de sobrevida 590 vs 1073 días, respectivamente. **A20 vs B20**: $p=0.016$, mediana de sobrevida 440 vs 1073 días, respectivamente) (**Figura 20A**).

Sin embargo, cuando realizamos el mismo análisis para ROR2, no encontramos diferencias significativas al comparar las curvas de sobrevida de cada grupo (**A35 vs B35**: $p=0.29$, mediana de sobrevida 805 vs 552 días, respectivamente. **A20 vs B20**: $p=0.50$, mediana de sobrevida 887 vs 653 días, respectivamente) (**Figura 20B**).

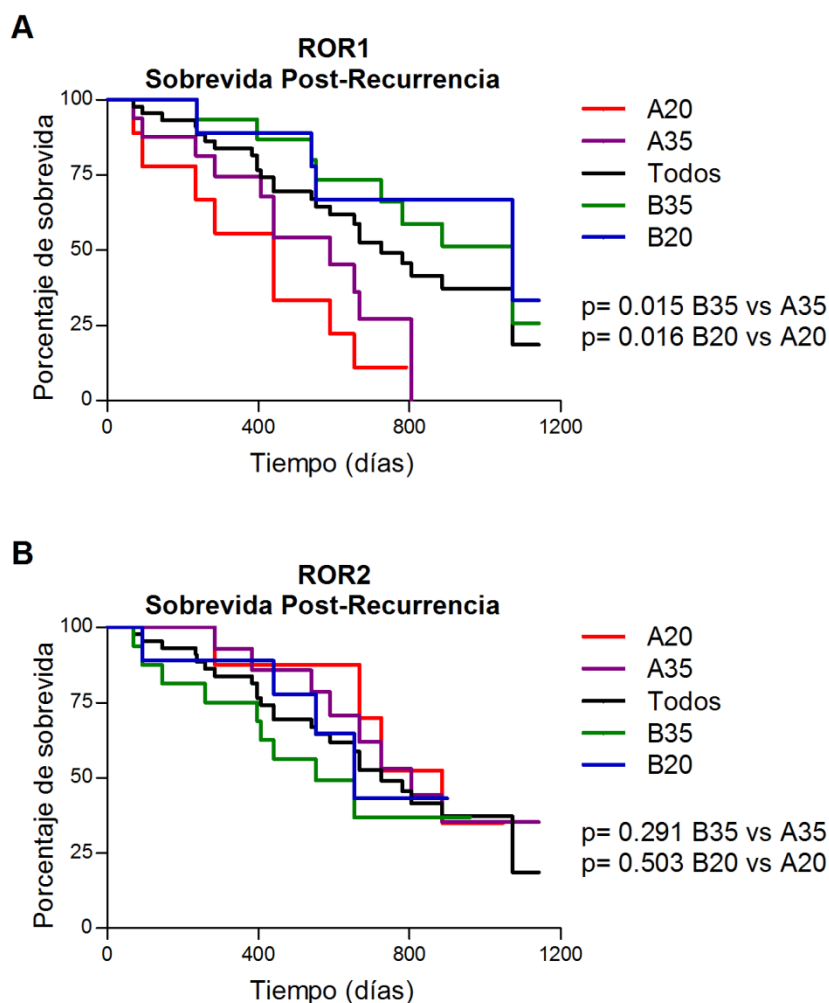


Figura 20. La expresión de ROR1 correlaciona con una menor Sobrevida Post-Recurrencia de los pacientes con melanoma de la base de datos GSE19234. A partir de los niveles de expresión de ROR1 (A) y ROR2 (B) de los 44 pacientes de la base de datos GSE19234 (Bogunovic et al. 2009) se realizaron curvas de Sobrevida Post-Recurrencia. Los 44 pacientes (Todos) fueron divididos en 4 categorías según los niveles de expresión relativa de ROR1 o ROR2: 20% con la expresión más baja (B20, n=9), 35% con la expresión más baja (B35, n=16), 35% con la expresión más alta (A35, n=16) y 20% con la expresión más alta (A20, n=9). Los valores del p estadístico de la prueba log-rank se indican en cada gráfico.

En conjunto, los datos provenientes de ambos estudios indican que una elevada expresión de ROR1 en tumores de melanoma se asocia a una menor supervivencia post-recurrencia de los pacientes. En principio estos resultados podrían sugerir la utilización de ROR1 como un posible marcador del pronóstico de esta enfermedad.

CONCLUSIONES PARCIALES

- ROR1, ROR2 y WNT5A se expresan en líneas celulares de melanoma humano.
- La expresión de ROR1 en líneas celulares de melanoma es mayor que la observada en melanocitos, indicando una posible asociación entre ROR1 y el proceso de transformación maligna.
- Los niveles de ROR1 en líneas celulares derivadas de tumores primarios y de metástasis son similares.
- No detectamos correlación entre los perfiles de expresión de ROR1, ROR2 y WNT5A en las líneas celulares de melanoma.
- La expresión de ROR1 en líneas celulares de melanoma humano NO se asocia a un fenotipo “proliferativo” ni a uno “invasivo”.
- La expresión de WNT5A en líneas celulares de melanoma humano se asocia a un fenotipo “invasivo”.
- ROR1 se expresa en aproximadamente un 60-80% de las muestras de tumores de melanoma analizadas.

- La expresión de ROR1 correlaciona significativamente con una menor sobrevida post-recurrencia de los pacientes.
- La expresión de ROR2 no correlaciona significativamente con la sobrevida de los pacientes.

2. GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE ROR1 EN MELANOMA

Para estudiar y caracterizar los procesos celulares y los mecanismos moleculares regulados por ROR1 desarrollamos estrategias de pérdida y ganancia de función en líneas celulares de melanoma. Elegimos la línea celular de melanoma humano A375 ya que presenta niveles intermedios de expresión de ROR1 (**Figura 12**) lo cual nos permite utilizarla como modelo tanto para la inhibición como para la sobreexpresión de ROR1. A su vez, también posee una moderada expresión de WNT5A. La misma estrategia de silenciamiento fue utilizada con las líneas celulares Lu1205 y UACC903 que poseen perfiles de expresión similares.

Las tres líneas celulares derivan de melanomas metastásicos, siendo la línea A375 de tumor primario, la UACC903 de metástasis de piel y la Lu1205 de metástasis de pulmón de xenotransplantes (ver **Tabla 2** en Materiales y Métodos, sección 3.1. Líneas Celulares).

2.1. INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ROR1

La estrategia de pérdida de función consistió en el silenciamiento de ROR1 mediante la utilización de “*short hairpin*” ARN (shARN). Se utilizaron tres secuencias de shARN específicas para ROR1 (denominadas shROR1A, B y C) y una secuencia inespecífica (scramble) como control (ver Anexos, sección III.2 Oligonucleótidos para Silenciar ROR1). Estas secuencias fueron clonadas en el vector retroviral *pSUPER.retro.puro* y co-tranfectadas junto con los plásmidos de la envoltura viral y los genes de la transcriptasa reversa e integrasa virales en células empaquetadoras HEK293T. Una vez obtenidas las partículas virales, se realizó la transducción en las células de melanoma y se seleccionaron con puromicina a fin de obtener líneas celulares que expresen de manera estable cada una de las secuencias de shARN (ver Materiales y Métodos, secciones 2. Construcciones y Plásmidos y 3.3. Generación de Líneas Celulares Estables).

Para el caso de la línea celular A375, se analizó la expresión de ROR1 por qRT-PCR y *Western blot* en las 4 líneas celulares establecidas: A375-scramble, A375-shROR1A, A375-shROR1B y A375-shROR1C. De las 3 secuencias de shROR1 utilizadas, la secuencia B logró disminuir los niveles de ROR1 con mayor eficiencia, tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteínas (**Figura 21A y B**, respectivamente).

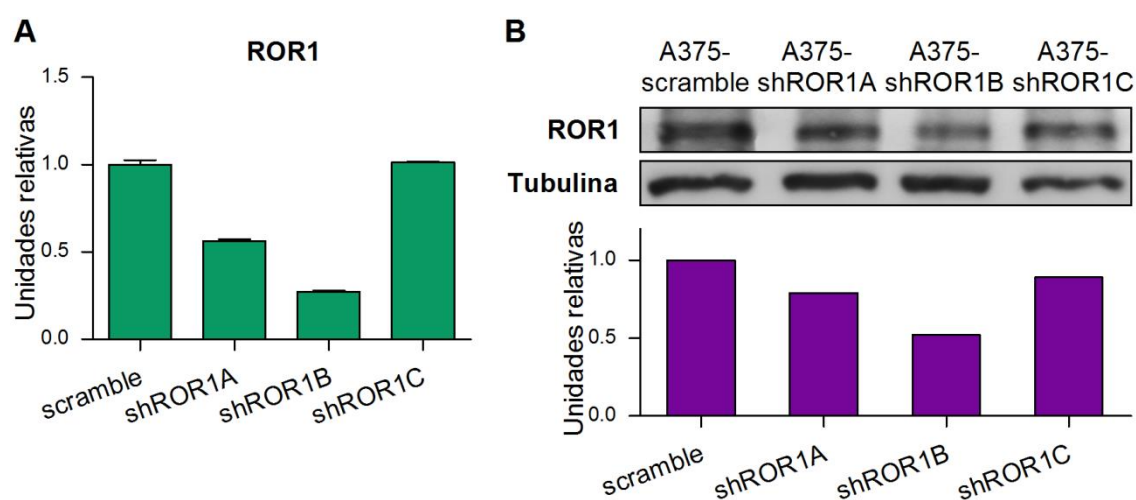


Figura 21. Evaluación de la eficiencia de silenciamiento de tres shARNs dirigidos contra ROR1. **(A)** Expresión relativa del ARNm de ROR1 en las líneas celulares A375-scramble, -shROR1A, B y C por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm d.e. de los niveles de ARNm de ROR1 normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a la línea A375-scramble. **(B)** Panel superior: Western blot de ROR1 (R&D AF2000) en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble, -shROR1A, B y C. Tubulina se utilizó como control de carga. Panel inferior: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de ROR1 normalizados a los valores de tubulina y relativizados a la línea celular A375-scramble.

A partir de este momento continuamos nuestros estudios sólo con las líneas celulares A375-scramble y -shROR1B, a la cual llamaremos shROR1.

En primer lugar corroboramos estadísticamente que la expresión del shROR1 en la línea A375 disminuye la expresión de ROR1 por qRT-PCR (**Figura 22A**). En segundo lugar, analizamos la expresión de ROR1 en la superficie celular mediante citometría de flujo (**Figura 22B**). En ambos casos se observó una disminución en los niveles de ROR1 en la línea celular A375-shROR1 comparada con la línea A375-scramble.

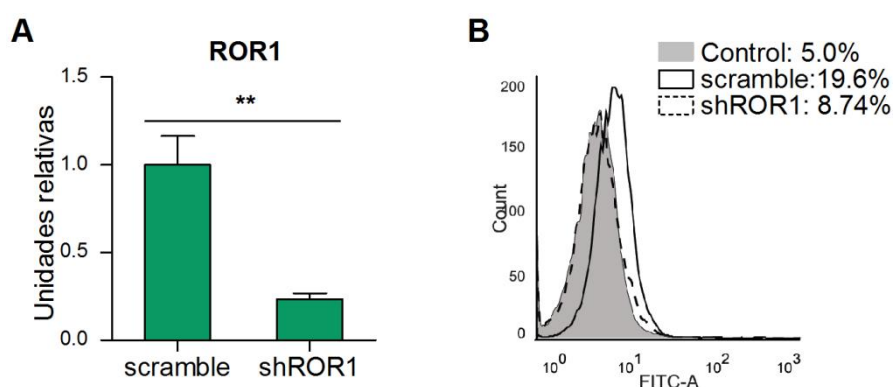


Figura 22. Silenciamiento de ROR1 en la línea celular A375. (A) Expresión relativa del ARNm de ROR1 en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. de los niveles de ARNm de ROR1 normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a la línea A375-scramble de tres extractos independiente. **(B)** Análisis de la expresión de ROR1 en la superficie celular por citometría de flujo. Las células A375-scramble y A375-shROR1 fueron incubadas con el anticuerpo para ROR1 (R&D AF2000) y luego con el anticuerpo secundario IgG-dylight488 (Vector DI-7488). El control se realizó incubando sólo con el anticuerpo secundario. ** $p < 0.01$

El mismo procedimiento detallado anteriormente fue utilizado para inhibir la expresión de ROR1 en la línea celular Lu1205. Analizamos por *Western blot* y citometría de flujo la expresión de ROR1 una vez obtenidas las líneas celulares estables. En ambos casos obtuvimos menores niveles de ROR1 en la línea Lu1205-shROR1B al compararla con las células Lu1205-scramble (**Figura 23**). Además, en el ensayo por citometría de flujo observamos nuevamente que la secuencia B inhibe con mayor eficiencia la expresión de ROR1 que la secuencia A (**Figura 23B**).

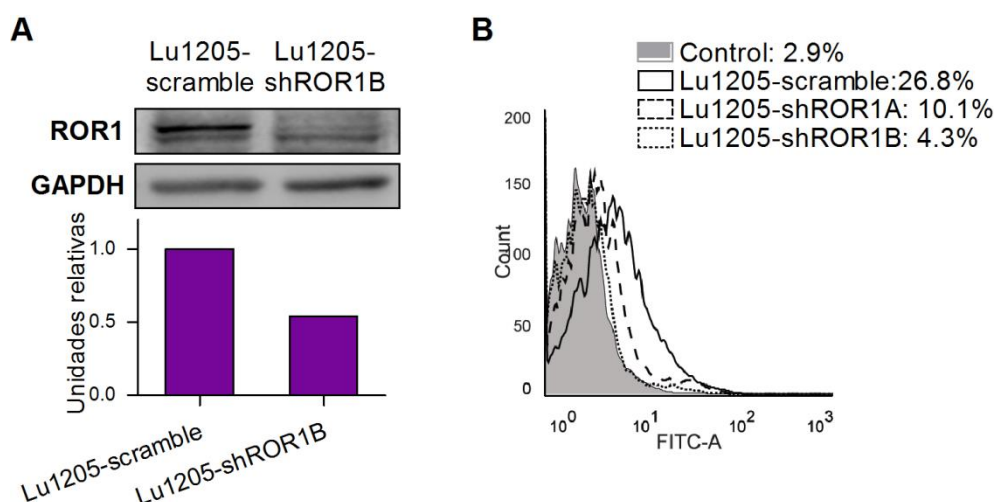


Figura 23. Silenciamiento de ROR1 en la línea celular Lu1205. (A) Panel superior: Western blot de ROR1 (R&D AF2000) en extractos proteicos de las líneas celulares Lu1205-scramble y -shROR1B. GAPDH se utilizó como control de carga. Panel inferior: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de ROR1 normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a la línea celular Lu1205-scramble. **(B)** Análisis de la expresión de ROR1 en la superficie celular por citometría de flujo. Las células Lu1205-scramble, -shROR1A y B fueron incubadas con el anticuerpo para ROR1 (R&D AF2000) y luego con el anticuerpo secundario IgG-dylight488 (Vector DI-7488). El control se realizó incubando sólo con el anticuerpo secundario.

A partir de este momento sólo utilizaremos la línea celular Lu1205-shROR1B y la llamaremos Lu1205-shROR1.

Por último, inhibimos la expresión de ROR1 en la línea celular UACC903. En este caso sólo utilizamos las secuencias scramble y shROR1B (a la que llamamos shROR1). Una vez obtenidas las líneas estables determinamos los niveles de ROR1 por qRT-PCR y *Western blot*. En ambos casos se observaron menores niveles de ROR1 en la línea celular UACC903-shROR1 al compararla con las células UACC903-scramble (**Figura 24**).

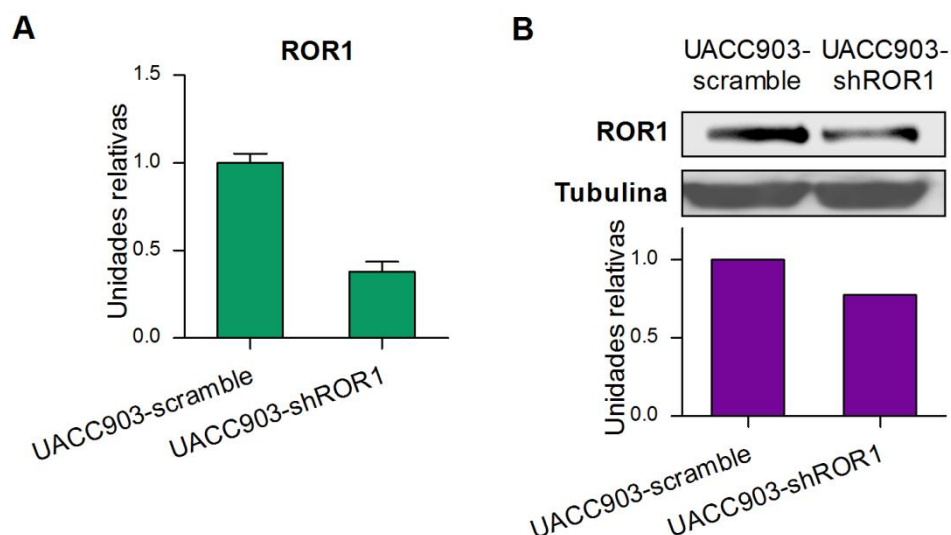


Figura 24. Silenciamiento de ROR1 en la línea celular UACC903. **(A)** Expresión relativa del ARNm de ROR1 en las líneas celulares UACC903-scramble y -shROR1 por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm d.e. de los niveles de ARNm de ROR1 normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a la línea A375-scramble. **(B)** Panel superior: Western blot de ROR1 (R&D AF2000) en extractos proteicos de las líneas celulares UACC903-scramble y -shROR1. Tubulina se utilizó como control de carga. Panel inferior: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de ROR1 normalizados a los valores de Tubulina y relativizados a la línea celular UACC903-scramble.

En resumen, desarrollamos tres líneas celulares (A375, Lu1205 y UACC903) en las cuales la expresión de ROR1 fue silenciada como consecuencia de la expresión estable de un shARN específico.

2.2. SOBREEXPRESIÓN DE ROR1

La estrategia de ganancia de función consistió en la sobreexpresión de ROR1 en la línea celular A375. El Dr. Luca Grumolato de la Universidad de Rouen (Francia) gentilmente nos cedió el sistema de vectores lentivirales VIR-SP el cual contiene el ADNc de ROR1. De manera similar que en el caso de los retrovirus, se generaron las partículas virales en células HE293T y luego se realizó la transducción y selección a fin de obtener células A375 con expresión estable del vector vacío o del ADNc de ROR1: A375-vacío y A375-ROR1, respectivamente.

Analizamos los niveles de ROR1 por qRT-PCR, *Western blot* y citometría de flujo en las líneas celulares A375-vacío y A375-ROR1 (**Figura 25**). En los tres casos observamos un marcado incremento en los niveles de ROR1 en las células que expresan el ADNc de ROR1.

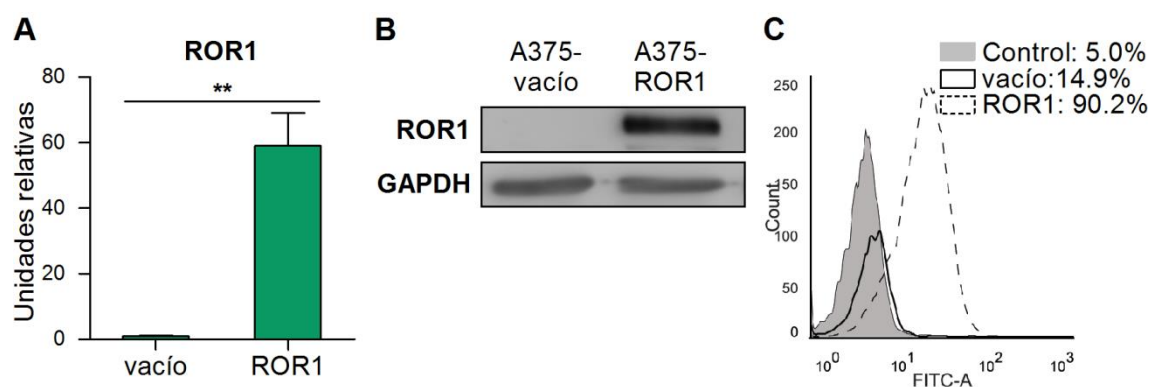


Figura 25. Sobreexpresión de ROR1 en la línea celular A375. **(A)** Expresión relativa del ARNm de ROR1 en las líneas celulares A375-vacío y -ROR1 por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. de los niveles de ARNm de ROR1 normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a la línea A375-vacío de tres extractos independiente. **(B)** Western blot de ROR1 (CS-4102) en extractos proteicos de las líneas celulares A375-vacío y -ROR1. GAPDH se utilizó como control de carga. **(C)** Análisis de la expresión de ROR1 en la superficie celular por citometría de flujo. Las células A375-vacío y -ROR1 fueron incubadas con el anticuerpo para ROR1 (R&D AF2000) y luego con el anticuerpo secundario IgG-dylight488 (Vector DI-7488). El control se realizó incubando sólo con el anticuerpo secundario.

El análisis por citometría de flujo nos permite corroborar que la expresión exógena de ROR1 se localiza correctamente en la membrana plasmática de las células (**Figura 25C**).

Por lo tanto, podemos concluir que la sobreexpresión de ROR1 en la línea celular A375 fue llevada a cabo satisfactoriamente.

CONCLUSIONES PARCIALES

- Se desarrolló un eficiente modelo de inhibición de la expresión de ROR1 empleando shARN en las líneas celulares de melanoma humano **A375**, **Lu1205** y **UACC903**.
- Se desarrolló un eficiente modelo de sobreexpresión de ROR1 en la línea celular de melanoma humano **A375**.

3. PARTICIPACIÓN DE ROR1 EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE WNT

Como mencionamos en la introducción, la vía de señalización de Wnt se divide en dos grandes grupos: la vía canónica y la no-canónica. Cada una de estas vías es activada por distintas combinaciones de ligandos y receptores, quienes a su vez, activan distintas proteínas dentro de la célula (**Figuras 6, 7 y 8**). En esta sección analizamos la participación de ROR1 en ambos tipos de señalizaciones.

3.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA CANÓNICA DE WNT

Si bien los receptores ROR y Ryk fueron descritos como miembros de la vía no-canónica (Kikuchi et al. 2012), quisimos corroborarlo experimentalmente en nuestro modelo de estudio para descartar cualquier efecto de ROR1 sobre la activación de la vía Wnt canónica.

Una herramienta útil para determinar la actividad de la vía canónica de Wnt es el plásmido reportero “TOP-Flash”, el cual presenta repeticiones en tándem de los elementos respondedores a TCF/LEF río arriba del gen de la luciferasa. De esta manera, midiendo la actividad luciferasa, se puede evaluar la activación basal de la vía canónica de Wnt o su inducción mediada por Wnt3a, ligando canónico por excelencia.

Realizamos los ensayos reporteros con el plásmido “TOP-Flash” luego de estimular las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 con Medio Condicionado (MC) Control o diluciones de MC Wnt3a durante 16 horas (ver Materiales y Métodos, sección 3.4. Producción de Medios Condicionados). Se observó un incremento en la actividad luciferasa del reportero TOP en respuesta a Wnt3a (**Figura 26**, compárense los niveles de actividad luciferasa entre las condiciones Control y los tratamientos con Wnt3a). Este aumento fue de similar magnitud en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 (**Figura 26**).

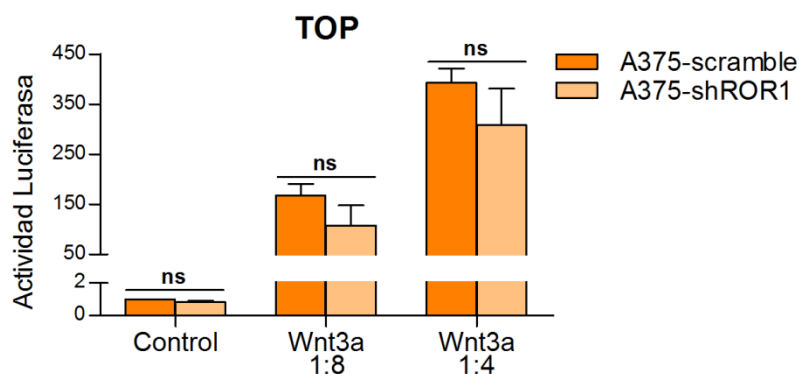


Figura 26. El silenciamiento de ROR1 no afecta la actividad basal e inducida por Wnt3a de la vía canónica de Wnt. Ensayos reporteros en células A375-scramble y -shROR1 transfectadas con el plásmido TOP-Flash y estimuladas con MC Control o Wnt3a (diluciones 1:8 y 1:4) durante 16 horas. La actividad luciferasa se midió en los extractos proteicos utilizando un luminómetro (Lumat). Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. de la actividad luciferasa normalizada a la masa total de proteínas y relativa al tratamiento con MC Control de la línea A375-scramble de 3 ensayos independientes. ns: diferencias no significativas.

De esta manera, confirmamos que ROR1 no participa en la activación de la vía de señalización canónica de Wnt.

3.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE DVL-2

Las proteínas Dvl son un componente clave en la vía de señalización de Wnt. La interacción de los ligandos Wnt con sus respectivos receptores y co-receptores lleva a la activación de las proteínas Dvl luego de su fosforilación por la quinasa de caseína 1 (CK1). A partir de este punto, la señalización se ramifica entre la vía canónica y no-canónica (Willert et al. 1997; Weeraratna 2005).

La fosforilación de Dvl puede evidenciarse mediante un cambio aparente en su peso molecular en ensayos de SDS-PAGE (Bryja et al. 2007). González-Sancho, en el año 2004, demostró mediante tratamientos de los extractos proteicos con distintas fosfatasa, que las

bandas superior e inferior detectadas por *Western blot* con anticuerpos específicos para Dvl-2 corresponden a sus formas fosforilada y no fosforilada, respectivamente (pDvl-2 y Dvl-2) (Gonzalez-Sancho et al. 2004).

Cuando realizamos los primeros *Western blot* en extractos de líneas de melanoma empleando el mismo anticuerpo contra Dvl-2 utilizado por González-Sancho y colaboradores (2004), observamos la presencia de tres bandas en lugar de las dos descritas (Gonzalez-Sancho et al. 2004). Por lo tanto, para caracterizar dichas bandas, realizamos ensayos de *Western blot* en extractos proteicos de la línea celular Lu1205 tratados *in vitro* con la fosfatasa CIP (del inglés *Calf Intestinal Phosphatase*) (**Figura 27**). Como mencionamos, se observan tres bandas de diferente peso molecular aparente en las células en condiciones normales (**Figura 27**, calle 1). El tratamiento con la fosfatasa provocó una disminución en la intensidad de la banda media y un incremento de la banda inferior, demostrando que la banda media e inferior corresponden a las formas pDvl-2 y Dvl-2, respectivamente (**Figura 27**, calle 2). Pese a llevar a cabo distintos experimentos, la identidad de la banda superior aún no ha podido ser determinada (resultados no mostrados).

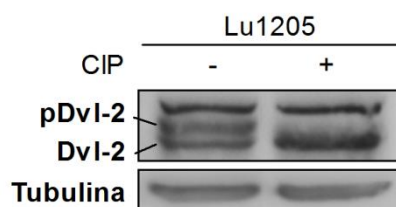


Figura 27. Identificación de las formas fosforilada y no fosforilada de Dvl-2. Western blot de Dvl-2 en extractos proteicos de la línea celular Lu1205 luego del tratamiento con la enzima CIP durante 1 hora a 37 °C. La identidad de la banda superior aún no ha podido ser determinada. Tubulina se utilizó como control de carga.

En concordancia con esta interpretación, la estimulación de células de la línea Lu1205 con Wnt5a, uno de los principales ligandos de la vía de señalización no-canónica, provocó un

aumento en la abundancia de pDvl-2 con la consecuente disminución de la forma no fosforilada (**Figura 28**).

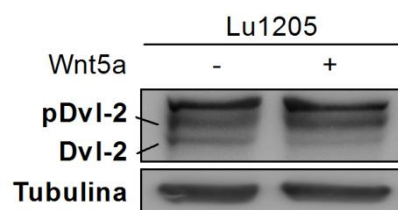


Figura 28. Wnt5a induce la fosforilación de Dvl-2. Western blot de Dvl-2 en extractos proteicos de la línea celular Lu1205 luego del tratamiento con MC Control o Wnt5a durante 1 hora a 37 °C. La identidad de la banda superior aún no ha podido ser determinada. Tubulina se utilizó como control de carga.

Estos experimentos demuestran que la fosforilación de Dvl-2 es inducida por Wnt5a y, a su vez, que parte de las moléculas de Dvl-2 se encuentran fosforiladas basalmente, indicando que la vía de Wnt presenta una activación constitutiva en la línea celular Lu1205.

A continuación, quisimos comprobar si esta característica era excepcional de la línea Lu1205 o si se trataba de un evento frecuente en melanoma. Con este fin determinamos la expresión y activación de Dvl-2 por *Western blot* en varias líneas celulares de melanoma humano. Como se observa en la **Figura 29**, al igual que en las células Lu1205, la mayoría de las líneas celulares estudiadas presentaron cierto grado de fosforilación basal de Dvl-2, indicando la existencia de una moderada actividad constitutiva de la vía de señalización de Wnt en melanoma.

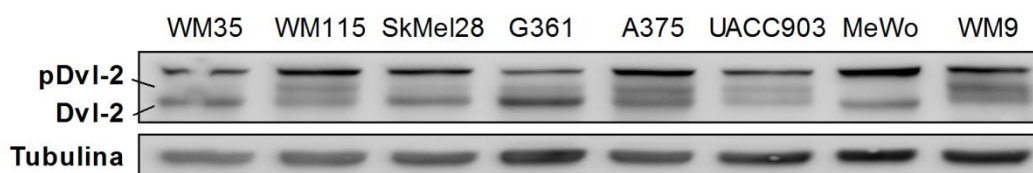


Figura 29. Expresión y activación de Dvl-2 en líneas celulares de melanoma. Western blot de Dvl-2 en extractos proteicos de 8 líneas celulares de melanoma. Tubulina se utilizó como control de carga.

Una vez puesta a punto la discriminación de las formas no fosforilada y fosforilada de Dvl-2 por *Western blot*, podemos utilizar la abundancia relativa de cada una como un indicador de la actividad de la vía de señalización de Wnt y determinar si los cambios en la expresión de ROR1 afectan la activación basal de Dvl-2. Dado que ROR1 no participa en la vía de señalización canónica, los cambios que se observen en Dvl-2 podrán ser atribuidos exclusivamente a la vía no-canónica.

Con este fin, realizamos *Western blot* en las líneas A375-scramble o -shROR1 y A375-vacío o -ROR1 y cuantificamos las bandas correspondientes a las formas no fosforilada (Dvl-2) y fosforilada (pDvl-2) de Dvl-2 (**Figura 30**). El silenciamiento de ROR1 provocó una disminución parcial en la fosforilación de Dvl-2, lo cual se evidencia como una disminución de los niveles de pDvl-2 con el consecuente incremento de la forma no fosforilada Dvl-2 (**Figura 30A**). Por el contrario, la sobreexpresión de ROR1 aumentó significativamente la fosforilación de Dvl-2, disminuyendo la forma no fosforilada de manera significativa (**Figura 30B**).

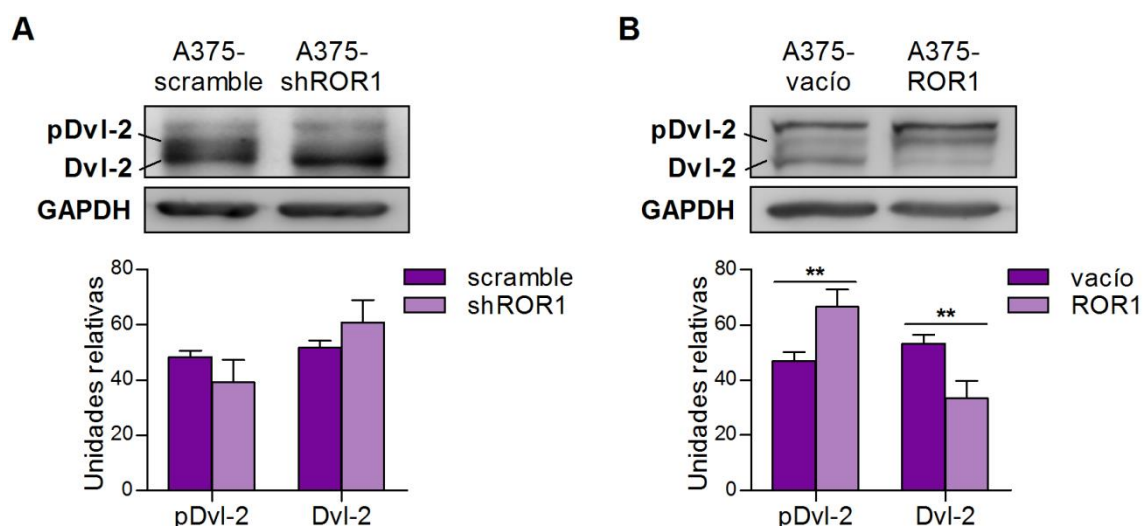


Figura 30. ROR1 promueve la fosforilación de Dvl-2 en la línea celular A375. Panel superior: Western blot de Dvl-2 en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 (**A**) y A375-vacío y -ROR1 (**B**). GAPDH se utilizó como control de carga. Panel inferior: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. del porcentaje de cada banda (pDvl-2 y Dvl-2) relativo al total (pDvl-2 + Dvl-2) de tres extractos independientes. ** $p < 0.01$.

Los cambios detectados en el perfil de pDvl-2 y Dvl-2 en las líneas A375-scramble y -shROR1 no alcanzaron a ser significativos debido a variaciones en los niveles basales de las distintas replicas biológicas analizadas. Sin embargo, en cada una de ellas se observó una disminución de la forma fosforilada de Dvl-2 con el consecuente incremento de la forma no fosforilada.

Para validar este resultado, analizamos si el silenciamiento de ROR1 en la línea celular Lu1205 afectaba la fosforilación de Dvl-2. Realizamos *Western blot* en las líneas celulares Lu1205-scramble y -shROR1 y observamos el mismo comportamiento que en el caso de las células A375 (**Figura 31**). La inhibición de la expresión de ROR1 provocó una disminución significativa en los niveles relativos de pDvl-2 y un aumento significativo de Dvl-2 no fosforilado.

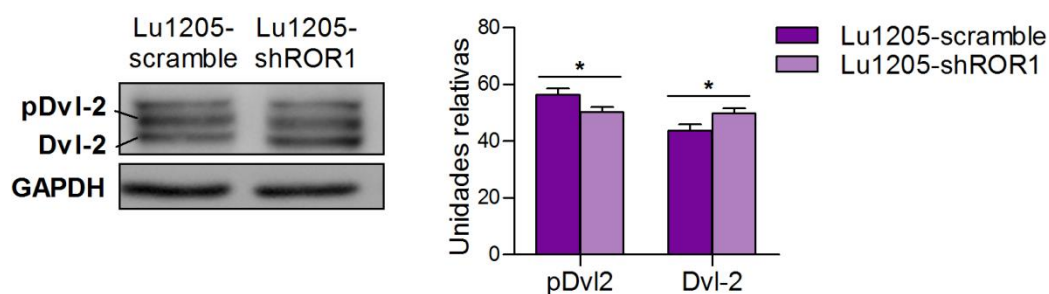


Figura 31. El silenciamiento de ROR1 disminuye la fosforilación de Dvl-2 en la línea celular Lu1205. Panel izquierdo: Western blot de Dvl-2 en extractos proteicos de las líneas celulares Lu1205-scramble y -shROR1. GAPDH se utilizó como control de carga. Panel derecho: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. del porcentaje de cada banda (pDvl-2 y Dvl-2) relativo al total (pDvl-2 + Dvl-2) de tres extractos independientes. * $p < 0.05$.

En conjunto, los resultados presentados en esta sección indican que ROR1 está involucrado en la activación de la vía no-canónica de Wnt y participa de la fosforilación de Dvl-2.

3.3. EVALUACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE PI3K/AKT

Luego de la activación de Dvl-2, la señalización no-canónica de Wnt se ramifica río abajo en las vías de JNK, PKC y mTOR-PI3K/Akt, entre otras. Dada la amplia y reportada influencia de la vía de señalización de PI3K/Akt en la regulación del ciclo celular y su papel fundamental en la transformación celular, quisimos estudiar si el aumento de la expresión de ROR1 en melanoma podría de alguna manera influir sobre esta vía.

En primer lugar, analizamos la expresión de AKT en las líneas celulares A375-scramble o -shROR1 y A375-vacío o -ROR1 por qRT-PCR y *Western blot* (Figura 32). El silenciamiento de ROR1 provocó una disminución significativa en los niveles de Akt1 tanto a nivel de ARNm como

de proteína (**Figura 32A y C**). En este mismo sentido, la sobreexpresión de ROR1 aumentó significativamente los niveles de Akt1 (**Figura 32B y D**).

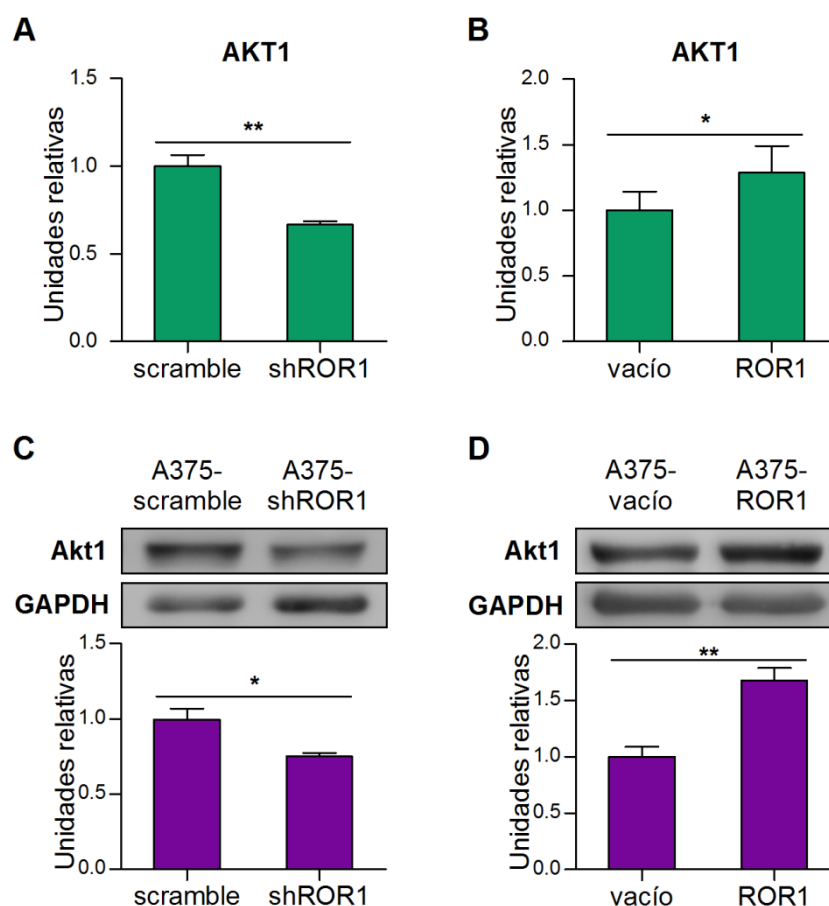


Figura 32. ROR1 aumenta la expresión de AKT1 en la línea celular A375. (**A y B**) Expresión relativa del ARNm de AKT1 en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 (**A**) y A375-vacío y -ROR1 (**B**) por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. de los niveles de ARNm de AKT1 normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a las células control (A375-scramble o -vacío) de tres extractos independientes. (**C y D**) Panel superior: Western blot de Akt1 en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 (**C**) o A375-vacío y -ROR1 (**D**). GAPDH se utilizó como control de carga. Panel inferior: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de Akt1 normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a las células control (A375-scramble o -vacío) de tres extractos independiente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

El silenciamiento de ROR1 generó también una disminución significativa en los niveles de ARNm de AKT3 medido por qRT-PCR, mientras que la expresión de AKT2 permaneció inalterada (**Figura 33**).

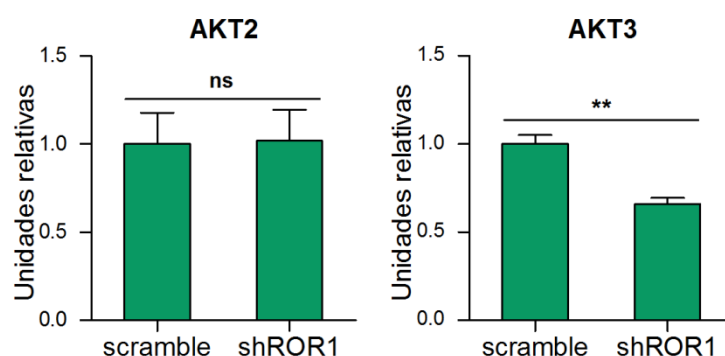


Figura 33. ROR1 regula la expresión de AKT3 pero no de AKT2 en la línea celular A375. Expresión relativa del ARNm de AKT2 y AKT3 en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. de los niveles de ARNm de AKT2 o AKT3 normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a las células A375-scramble de tres extractos independientes. ns: diferencias no significativas, ** $p < 0.01$.

El nivel de expresión de AKT no necesariamente es un indicador del grado de activación de la vía. La forma más adecuada de evaluar la activación de Akt es midiendo la fosforilación en el residuo Serina 473.

Para estudiar el efecto de ROR1 en la activación de Akt, realizamos ensayos de *Western blot* y medimos los niveles de fosforilación de Akt (pAkt) en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 (**Figura 34A**). No se detectaron diferencias en los niveles de pAkt basales frente al silenciamiento de ROR1. Sin embargo, cuando estimulamos las células con MC Wnt5a, los niveles de pAkt aumentaron en las células A375-scramble tanto a los 15 como a los 30 minutos, mientras que en la línea celular A375-shROR1 este efecto se encontró fuertemente atenuado (**Figura 34B**).



Figura 34. El silenciamiento de ROR1 inhibe la fosforilación de Akt inducida por Wnt5a. **A)** Western blot de pAkt (Ser 473) y Akt1 en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1. GAPDH se utilizó como control de carga. **B)** Western blot de pAkt (Ser 473) en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 luego del tratamiento con MC Control (-) o Wnt5a durante 15 y 30 minutos (15' y 30'). GAPDH se utilizó como control de carga.

Por otro lado, analizamos la actividad transcripcional del factor de transcripción FoxO, proteína blanco de la vía de Akt. Cuando FoxO es fosforilado por Akt se bloquea su translocación al núcleo en donde cumple su función como factor de transcripción (**Figura 4**). Utilizamos el sistema reportero “FHRE” (del inglés *ForkHead Response Element*) que presenta repeticiones en tándem de los elementos respondedores a FoxO río arriba del gen de la luciferasa.

Realizamos los ensayos reporteros en las células A375-vacío y -ROR1 previamente estimuladas con MC Control o Wnt5a durante 16 horas. Como se observa en la **Figura 35** la sobreexpresión de ROR1 disminuyó marcadamente la actividad transcripcional basal de FoxO, la cual se anuló casi por completo cuando se estimularon las células con Wnt5a.

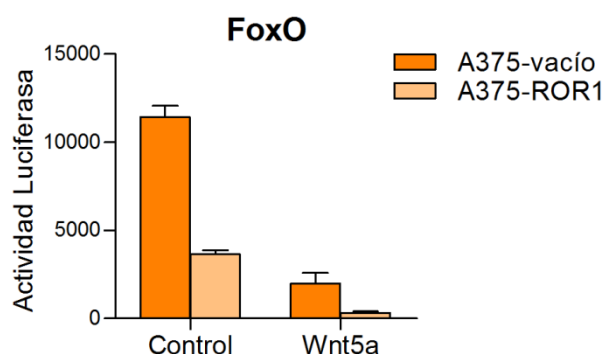


Figura 35. ROR1 inhibe la actividad transcripcional basal e inducida por Wnt5a de FoxO. Ensayos reporteros en células A375-vacío y -ROR1 transfectadas con el plásmido FHRE y estimuladas con MC Control o Wnt5a durante 16 horas. La actividad luciferasa se midió en los extractos proteicos utilizando un luminómetro (Lumat). Los resultados se expresan como la media \pm d.e. de la actividad luciferasa normalizada a la masa total de proteínas y relativa al tratamiento control de la línea A375-vacío de un triplicado experimental. Se muestra un ensayo representativo de dos experimentos independientes.

En conjunto estos resultados demuestran que ROR1 participa en la vía de señalización PI3K/Akt, regulando la expresión de Akt a nivel de ARNm y proteína, afectando la fosforilación y activación de Akt mediada por Wnt5a y la actividad del factor de transcripción FoxO.

3.4. ESTUDIO DE LOS CIRCUITOS DE RETROALIMENTACIÓN ENTRE WNT5A Y ROR1

La mayoría de las vías de transducción de señales cuentan con mecanismos de retroalimentación positiva y negativa que modulan su accionar (Freeman 2000). Entre los mecanismos de retroalimentación más frecuentes se pueden mencionar la regulación de la expresión, del procesamiento o la degradación de componentes esenciales como los ligandos y receptores de dichas vías de señalización.

Como mencionamos anteriormente, Wnt5a es el principal ligando Wnt que activa la vía no-canónica y ha sido frecuentemente asociado a diversos tipos de cáncer. En particular, se encuentra sobreexpresado en melanoma (Jessen 2009; Rao et al. 2014) y se ha descrito que actúa como ligando de ROR1 (Fukuda et al. 2008; Zhang et al. 2012b).

Dado que ROR1 modula la vía no-canónica de Wnt, a través de la señalización vía Dvl-2 / Akt / FoxO, nos preguntamos si la expresión de Wnt5a se encuentra regulada por ROR1. Para responder esta pregunta, medimos los niveles de Wnt5a a nivel de ARNm y proteína en las líneas celulares A375-scramble o -shROR1 y A375-vacío o -ROR1 (**Figura 36**). Observamos que el silenciamiento de ROR1 disminuyó significativamente los niveles de ARNm de WNT5A, mientras que la sobreexpresión generó el efecto contrario (**Figura 36A y B**). El mismo efecto se observó al analizar los niveles proteicos de Wnt5a (**Figura 36C y D**).

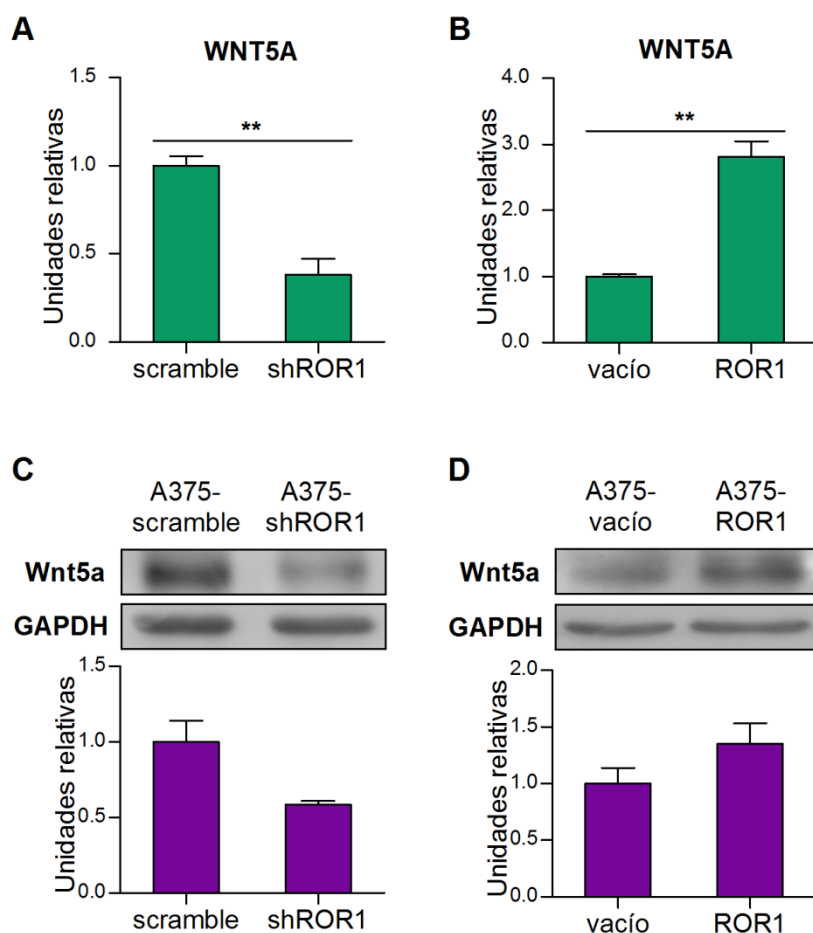


Figura 36. ROR1 estimula la expresión de Wnt5a. (A y B) Expresión relativa del ARNm de WNT5A en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 **(A)** y A375-vacío y -ROR1 **(B)** por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. de los niveles de ARNm de WNT5A normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a las células control (A375-scramble o -vacío) de tres extractos independientes. **(C y D)** Panel superior: Western blot de Wnt5a en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 **(C)** y A375-vacío y -ROR1 **(D)**. GAPDH se utilizó como control de carga. Panel derecho: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de Wnt5a normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a las células control (A375-scramble o -vacío) de dos extractos independiente. ** $p < 0.01$.

A continuación, quisimos determinar si Wnt5a, a su vez, es capaz de regular la expresión de su receptor ROR1. Con este objetivo, medimos los niveles ARNm de ROR1 por qRT-PCR en células A375 estimuladas con MC Wnt5a durante 10 horas (**Figura 37**). Observamos que la expresión de ROR1 aumentó significativamente como consecuencia del tratamiento con Wnt5a.

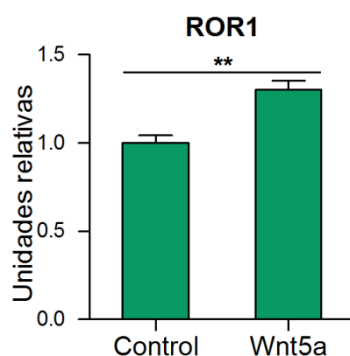


Figura 37. Wnt5a aumenta la expresión de ROR1. Expresión relativa del ARNm de ROR1 en la línea celular A375 luego del tratamiento con MC Control o Wnt5a durante 10 horas por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. de los niveles de ARNm de ROR1 normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados al tratamiento control de tres extractos independientes. ** $p < 0.01$.

Este último resultado se encuentra en concordancia con la observación de que Wnt5a induce la fosforilación de STAT3 (pSTAT3) (**Figura 38**), uno de los reguladores transcripcionales de ROR1 (Li et al. 2010). Ensayos de *Western blot* en extractos de células A375 estimuladas durante 1 hora con MC Control o Wnt5a, mostraron un incremento en los niveles de pSTAT3 frente al tratamiento con Wnt5a.

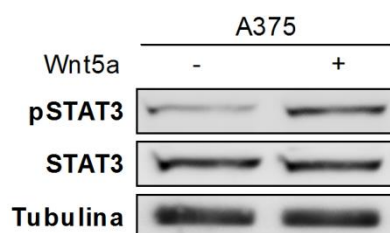


Figura 38. Wnt5a induce la fosforilación de STAT3 en la línea celular A375. Western blot de STAT3 y pSTAT3 (Tyr 705) en extractos proteicos de la línea celular A375 luego del tratamiento con MC Wnt5a durante 1 hora. Tubulina se utilizó como control de carga.

Estos resultados sugieren la existencia de una retroalimentación positiva en la regulación génica entre WNT5A y ROR1. Sin embargo, recordemos que no habíamos observado una correlación entre la expresión de ROR1 y WNT5A en las líneas celulares de melanoma (**Figuras 12 y 14**), lo cual evidencia la presencia de otros mecanismos que regulan la expresión de ambos genes.

CONCLUSIONES PARCIALES

- ROR1 no participa de la señalización por la vía canónica de Wnt.
- Las líneas celulares de melanoma presentan una moderada activación constitutiva de Dvl-2.
- La fosforilación de Dvl-2, en este caso en dónde la señalización canónica de Wnt no se encuentra alterada, resulta un buen marcador de la activación de la vía no-canónica de Wnt.
- ROR1, al igual que Wnt5a, media la activación por fosforilación de Dvl-2.
- ROR1 regula positivamente la expresión de AKT1 y participa en la activación de la vía PI3K/Akt mediada por Wnt5a.
- ROR1 y WNT5A participan en un circuito de retroalimentación positiva a nivel de su expresión génica.

4. EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE ROR1 EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR

Una de las principales funciones de la vía de señalización PI3K/Akt es la regulación de la supervivencia celular. La desregulación de esta vía se encuentra altamente asociada con el desarrollo tumoral en varios tipos de cáncer. Las células transformadas se caracterizan principalmente por un aumento en la tasa de proliferación celular, por adquirir la capacidad de crecer y formar colonias en ausencia de un sustrato sólido y por desarrollar mecanismos que les confieren resistencia a la muerte celular programada o apoptosis (Hanahan et al. 2000).

Dadas las alteraciones descritas en la sección anterior en lo que respecta a la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt como consecuencia de los cambios en la expresión de ROR1, nos preguntamos si los procesos relacionados con la muerte y proliferación celular se encontraban alterados en nuestro modelo de estudio.

4.1. ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

La supervivencia celular puede evaluarse tanto a nivel de la proliferación como de la muerte celular. Uno de los mecanismos de muerte celular más estudiados y regulados es la apoptosis. Durante el proceso de transformación las células suelen adquirir resistencia a la muerte celular por apoptosis.

En primer lugar, estudiamos la participación de ROR1 en la apoptosis celular mediante la marcación con Anexina V e Ioduro de Propidio (IP) y posterior análisis por citometría de flujo. A tal fin, evaluamos los niveles de apoptosis basales e inducidos por privación de suero en las líneas celulares A375-scramble o -shROR1 a las 48 horas. Cuando se crecieron las células en condiciones normales (10% SFB) no se observaron diferencias en el porcentaje de células apoptóticas (**Figura 39**). Sin embargo, en ausencia de suero, observamos un aumento en el

porcentaje de células marcadas con Anexina V e IP cuando ROR1 se encuentra silenciado (A375-scramble 21% vs A375-shROR1 41%).

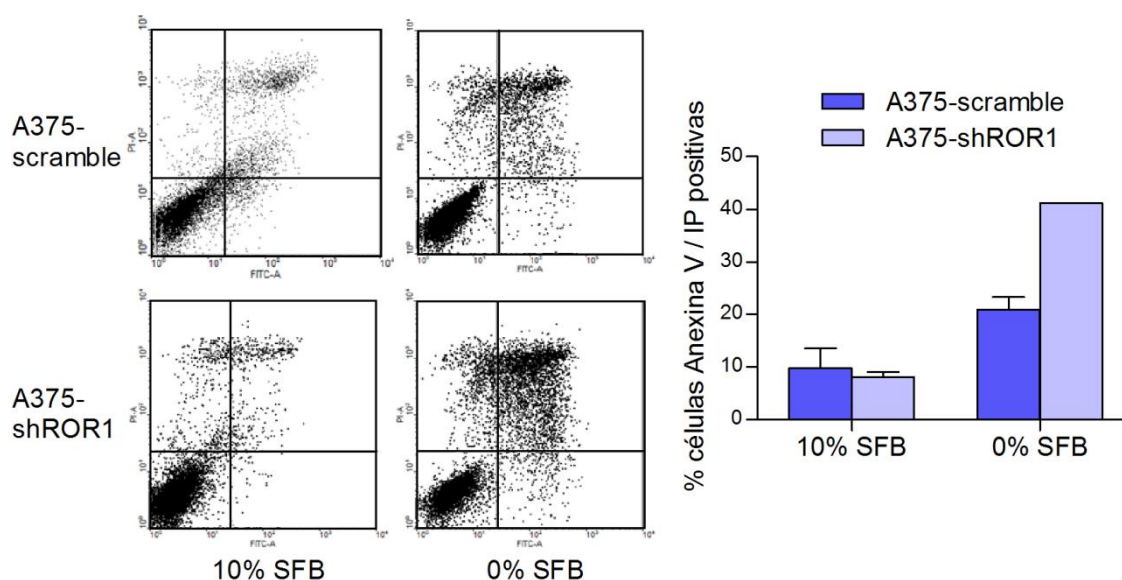


Figura 39. El silenciamiento de ROR1 favorece la apoptosis en las células A375. Las células A375-scramble y -shROR1 se cultivaron en presencia de 10% o 0% de SFB durante 48 horas. Luego, se tiñeron las células con Anexina V e IP y se analizaron por citometría de flujo. Panel izquierdo: se muestra un diagrama de puntos representativo de cada condición experimental, graficando la marcación con Anexina V en el eje "X" y el IP en el "Y". Panel derecho: los resultados se expresan como la media \pm d.e. del porcentaje de células positivas para la marcación con Anexina V e IP, se muestra 1 experimento representativo de 2 ensayos independientes.

Cuando repetimos los ensayos de apoptosis en las células Lu1205-scramble y -shROR1, observamos resultados similares. La inhibición de ROR1 aumentó la susceptibilidad a la apoptosis inducida por privación de suero (Lu1205-scramble 13% vs Lu1205-shROR1 22%), mientras que no encontramos cambios en la apoptosis basal (**Figura 40**).

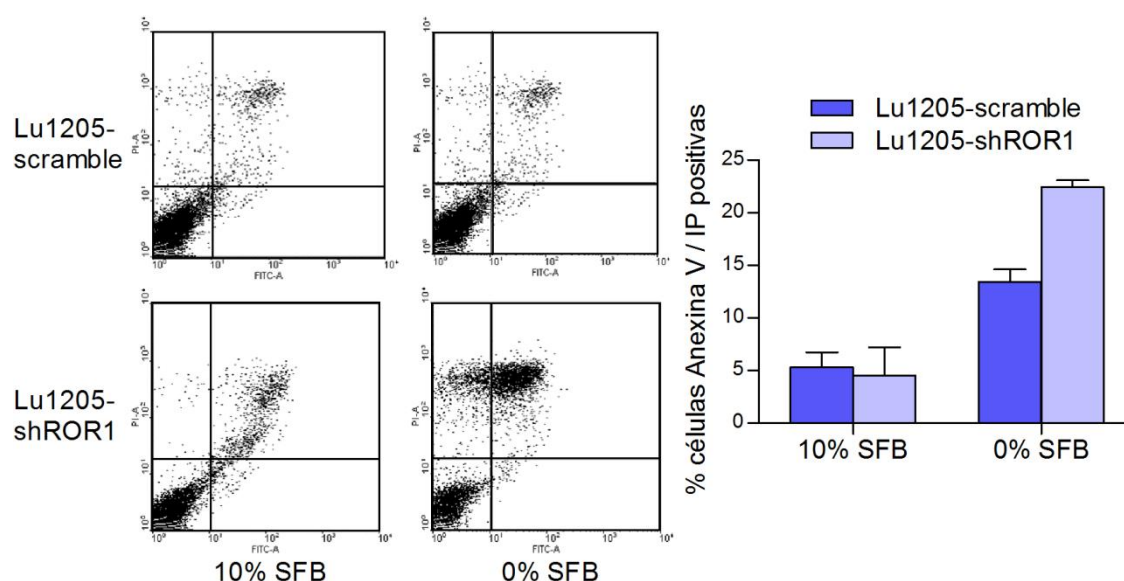


Figura 40. El silenciamiento de ROR1 favorece la apoptosis en las células Lu1205. Las células Lu1205-scramble y -shROR1 se cultivaron en presencia de 10% o 0% de SFB durante 48 horas. Luego, se tiñeron las células con Anexina V e IP y se analizaron por citometría de flujo. Panel izquierdo: se muestra un diagrama de puntos representativo de cada condición experimental, graficando la marcación con Anexina V en el eje “X” y el IP en el “Y”. Panel derecho: los resultados se expresan como la media \pm d.e. del porcentaje de células positivas para la marcación con Anexina V e IP, se muestra 1 experimento representativo de 2 ensayos independientes.

Para estudiar este proceso a nivel molecular, analizamos la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Realizamos qRT-PCR y *Western blot* en la líneas celulares A375-scramble o -shROR1 y A375-vacío o -ROR1. Observamos que el silenciamiento de la expresión de ROR1 disminuyó significativamente los niveles de Bcl-2 tanto a nivel de ARNm como de proteína (**Figura 41A y C**). A su vez, la sobreexpresión de ROR1 generó un aumento significativo en la expresión de Bcl-2 en ambos niveles (**Figura 41B y D**).

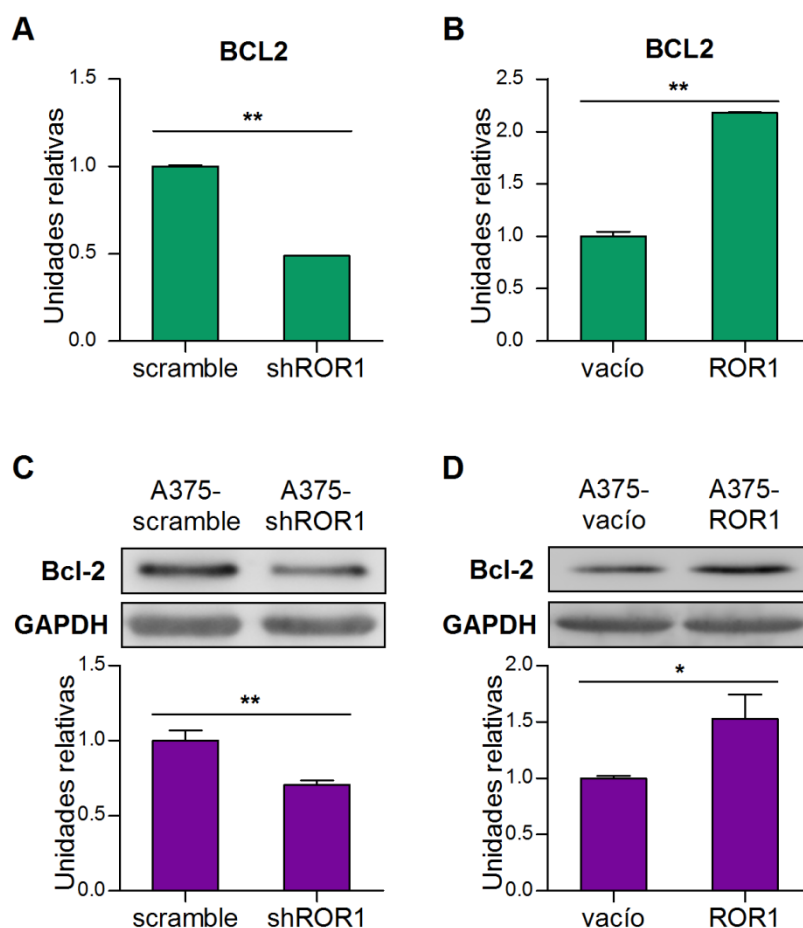


Figura 41. ROR1 aumenta la expresión de Bcl-2 en la línea celular A375. (A y B) Expresión relativa del ARNm de BCL2 en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 **(A)** y A375-vacío y -ROR1 **(B)** por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. de los niveles de ARNm de BCL2 normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a las células control (A375-scramble o -vacío) de tres extractos independientes. **(C y D)** Panel superior: Western blot de Bcl-2 en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 **(C)** y A375-vacío y -ROR1 **(D)**. GAPDH se utilizó como control de carga. Panel inferior: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de Bcl-2 normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a las células control (A375-scramble o -vacío) de tres extractos independiente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Para corroborar la regulación de Bcl-2 por ROR1, realizamos ensayos de *Western blot* en las líneas celulares UACC903-scramble y -shROR1. Observamos el mismo comportamiento que en el caso de las células A375, el silenciamiento de ROR1 provocó una disminución en los niveles proteicos de Bcl-2 (**Figura 42**).

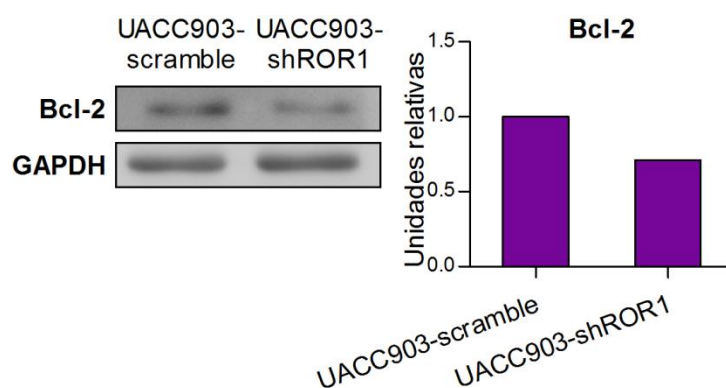


Figura 42. El silenciamiento de ROR1 disminuye los niveles de Bcl-2 en la línea celular UACC903. Panel izquierdo: Western blot de Bcl-2 en extractos proteicos de las líneas celulares UACC903-scramble y -shROR1. GAPDH se utilizó como control de carga. Panel derecho: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de Bcl-2 normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a la línea UACC903-scramble.

Por otro lado, analizamos la expresión de la proteína pro-apoptótica BAX. Realizamos ensayos de *Western blot* en extractos de células A375-scramble y -shROR1 y encontramos que la inhibición de ROR1 aumentó los niveles de BAX (**Figura 43**).

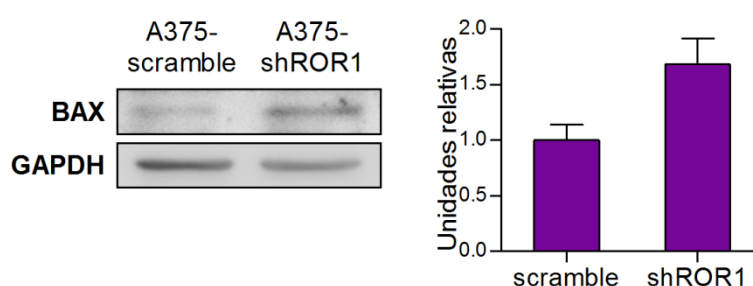


Figura 43. El silenciamiento de ROR1 aumenta los niveles de BAX en la línea celular A375. Panel izquierdo: Western blot de BAX en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1. GAPDH se utilizó como control de carga. Panel derecho: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de BAX normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a la línea A375-scramble de dos extractos independientes.

Los cambios descritos en la expresión de Bcl-2 y BAX son consistentes con el aumento en la susceptibilidad a la apoptosis observada al silenciar ROR1.

4.2. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Para evaluar si cambios en la expresión de ROR1 afectan la proliferación celular, realizamos ensayos de MTT. Estos experimentos fueron realizados en condiciones de cultivo normales con 10% SFB para asegurarnos que los cambios en el número de células se deban a un efecto en la proliferación celular y no a la muerte por apoptosis.

Realizamos los ensayos en las líneas celulares A375-scramble o -shROR1 y A375-vacío o -ROR1 y medimos el número de células totales luego de 3 días. El silenciamiento de ROR1 disminuyó significativamente un 25% la proliferación celular (**Figura 44A**), y en el mismo sentido, cuando ROR1 se encuentra sobreexpresado la proliferación celular aumentó significativamente un 25% (**Figura 44B**).

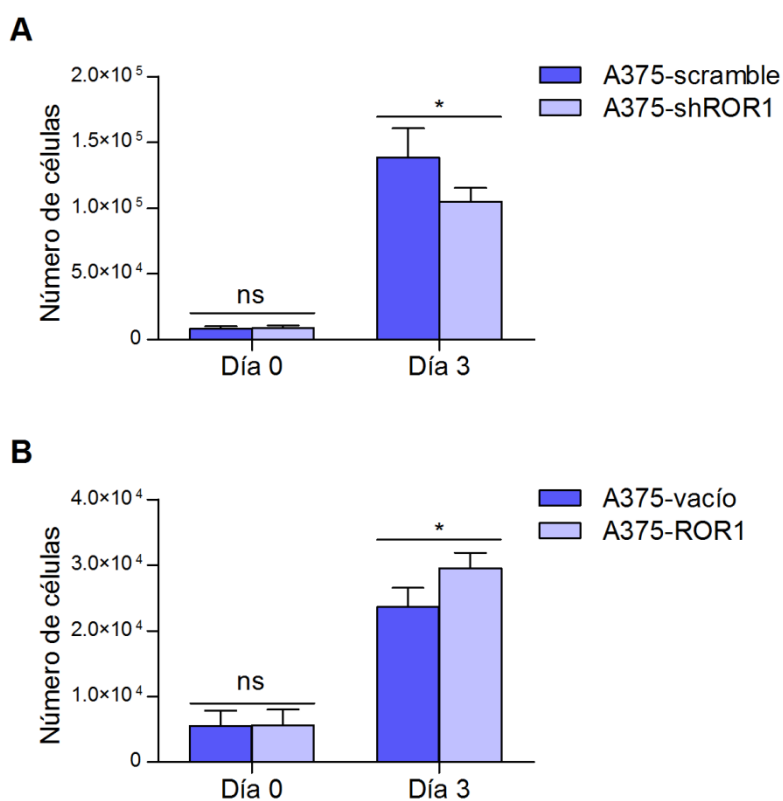


Figura 44. ROR1 aumenta la proliferación celular en la línea celular A375. Ensayos de MTT en células A375-scramble y -shROR1 (**A**) o A375-vacío y -ROR1 (**B**). Luego de incubar el reactivo de MTT, se resuspendieron los cristales de formazán y se midió la absorbancia a 570 nm. Los valores obtenidos fueron convertidos a número de células en cada caso empleando una curva de calibración. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. del número de células sembradas inicialmente (Día 0) y al final del ensayo (Día 3) de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Para confirmar esta observación, evaluamos si el silenciamiento de ROR1 provocaba el mismo efecto sobre la proliferación celular en la línea celular Lu1205. Realizamos los ensayos de MTT en las líneas celulares Lu1205-scramble y -shROR1 y observamos nuevamente una disminución en la proliferación al inhibir la expresión de ROR1 (**Figura 45**).

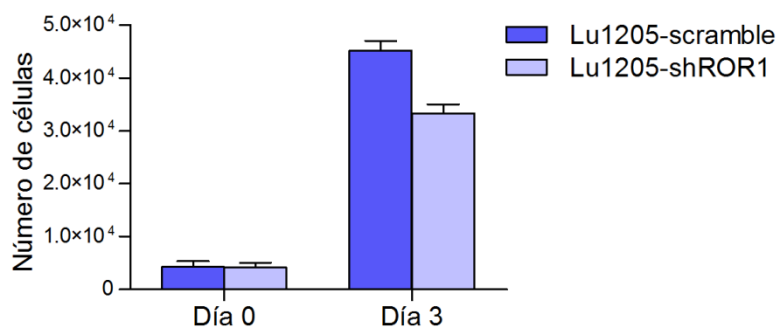


Figura 45. El silenciamiento de ROR1 disminuye la proliferación celular en la línea celular Lu1205.

Ensayos de MTT células Lu1205-scramble y -shROR1. Luego de incubar el reactivo de MTT, se resuspendieron los cristales de formazán y se midió la absorbancia a 570 nm. Los valores obtenidos fueron convertidos a número de células en cada caso empleando una curva de calibración. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. del número de células sembradas inicialmente (Día 0) y al final del ensayo (Día 3) de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Dado el efecto de ROR1 sobre la proliferación celular, decidimos evaluar la expresión de la proteína Ciclina D1, una de las principales reguladoras de la progresión del ciclo celular (Duronio et al. 2013).

Realizamos ensayos de *Western blot* en la línea celular A375-scramble y -shROR1 y encontramos que la inhibición de ROR1 disminuyó significativamente los niveles de Ciclina D1 (Figura 46).

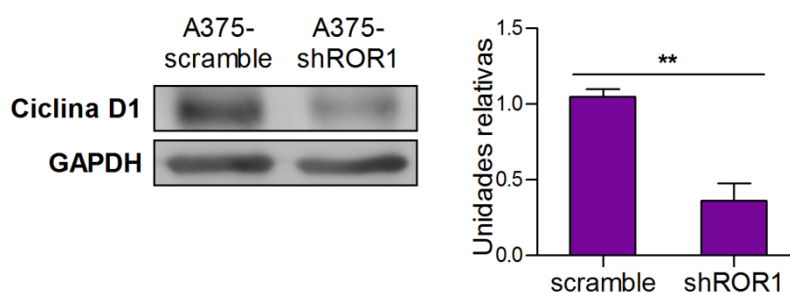


Figura 46. El silenciamiento de ROR1 disminuye los niveles de Ciclina D1 en la línea celular A375. Panel izquierdo: Western blot de Ciclina D1 en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1. GAPDH se utilizó como control de carga. Panel derecho: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de Ciclina D1 normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a la línea A375-scramble de tres extractos independiente. ** $p < 0.01$.

Los resultados de esta sección demuestran que ROR1 actúa como un regulador positivo de la proliferación celular, lo cual podría deberse en parte a la regulación de Ciclina D1.

4.3. ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO CELULAR INDEPENDIENTE DE ANCLAJE

Una de las características distintivas que adquieren las células durante el proceso de transformación celular es la capacidad de crecer en ausencia de un sustrato sólido y formar colonias en agar bando (Hanahan et al. 2000).

Dadas las diferencias encontradas en la proliferación celular, nos preguntamos si ROR1 participa también del crecimiento celular independiente de anclaje. Realizamos ensayos de formación de colonias en agar blando o ensayos clonogénicos en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1. El número total de colonias obtenidas al finalizar el ensayo fue menor en la línea celular A375-shROR1 comparada con la línea scramble (203 ± 45 vs 93 ± 21) (**Figura 47A**).

Cuando observamos detenidamente cada una de las placas, notamos que las colonias de las células A375-scramble parecían ser de mayor tamaño que las A375-shROR1. El tamaño de las colonias, en este caso, sirve como un indicador de la cantidad de células que forman parte de cada una de las colonias. Para poder cuantificar estas diferencias utilizamos el programa *GeneTools*, el cual nos permite generar categorías de colonias de diferentes tamaños fijando la cantidad de píxeles máximos y mínimos. Generamos así 5 categorías de tamaño de colonias creciente y analizamos la distribución de la cantidad de colonias según su tamaño para cada línea celular. El análisis fue realizado comparando el porcentaje de colonias obtenido dentro de cada categoría para independizarnos de las diferencias en el número total de colonias. En la **Figura 47B** se puede observar que cerca del 70% de las colonias de las células A375-shROR1 corresponden a la categoría de colonias más pequeñas, mientras que menos del 40% de las colonias de células A375-scramble pertenecen a esta categoría. Cuando analizamos las categorías de colonias de mayor tamaño, prácticamente no se observaron colonias de células A375-shROR1, a diferencia de las células A375-scramble donde sí pudieron apreciarse.

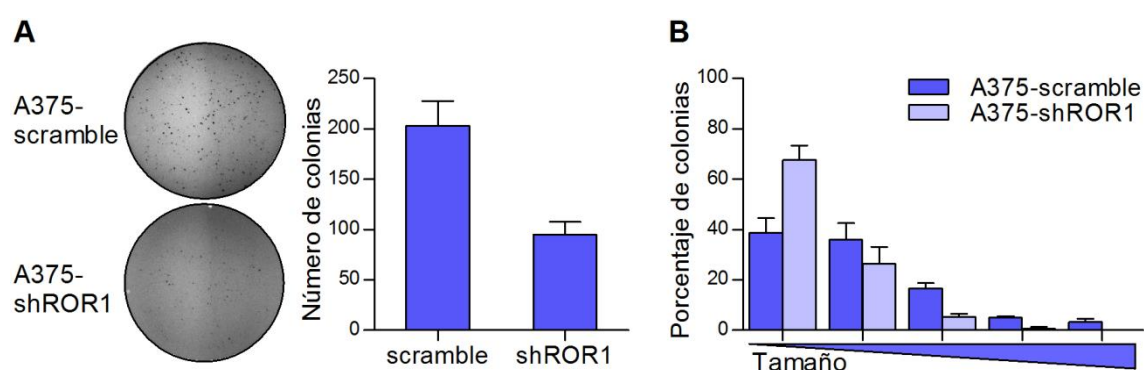


Figura 47. El silenciamiento de ROR1 en la línea A375 disminuye el número y el tamaño de colonias formadas en agar blando. (A y B) Las células A375-scramble y -shROR1 fueron sembradas en agar blando y cultivadas durante 21 días. Luego las colonias se fijaron y tiñeron con cristal violeta. **(A)** Panel izquierdo: Imágenes representativas de las colonias al final del ensayo. Panel derecho: Los resultados se expresan como la media \pm d.e. del número total de colonias de un triplicado experimental. **(B)** Se dividió el número total de colonias según su tamaño en 5 categorías. Los resultados se expresan como el porcentaje \pm d.e. de colonias en cada categoría de un triplicado experimental. Se muestra un ensayo representativo de dos experimentos independientes.

Estos resultados indican que el silenciamiento de ROR1 disminuye la capacidad de las células de crecer en agar blando y formar colonias, afectando tanto el número como su tamaño.

Realizamos también los ensayos clonogénicos en las líneas celulares Lu1205-scramble y -shROR1. En este caso, cuando contamos el número total de colonias al finalizar el ensayo no encontramos diferencias entre las dos líneas celulares, pero sí observamos cambios en la distribución del tamaño de las colonias (**Figura 48**). Similar a lo que ocurrió en las células A375, el silenciamiento de ROR1 disminuyó el tamaño de las colonias con respecto a las células control (**Figura 48B**).

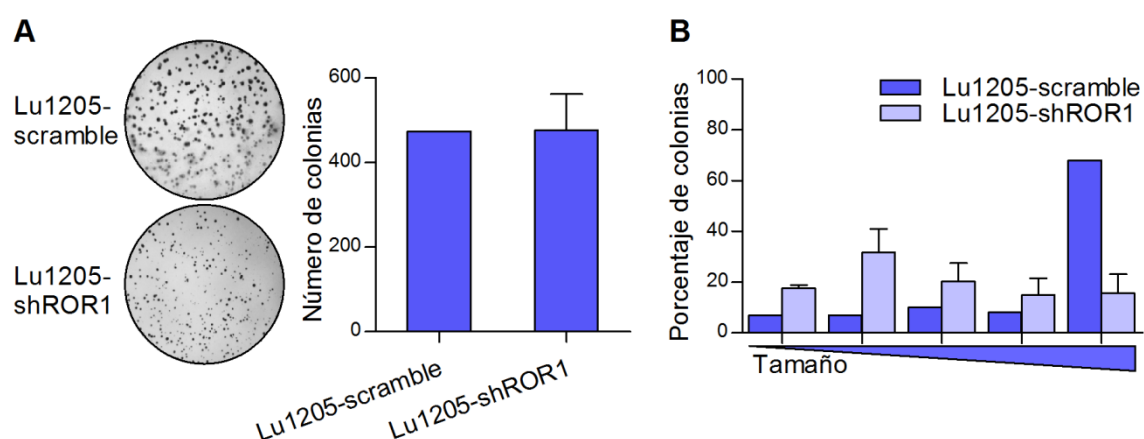


Figura 48. El silenciamiento de ROR1 en la línea Lu1205 disminuye el tamaño de colonias formadas en agar blando. Las células Lu1205-scramble y -shROR1 fueron sembradas en agar blando y cultivadas durante 21 días. Luego las colonias se fijaron y tiñeron con cristal violeta. **(A)** Panel izquierdo: Imágenes representativas de las colonias al final del ensayo. Panel derecho: Los resultados se expresan como la media \pm d.e. del número total de colonias de un triplicado experimental. **(B)** Se dividió el número total de colonias según su tamaño en 5 categorías. Los resultados se expresan como el porcentaje \pm d.e. de colonias en cada categoría de un triplicado experimental.

Estos resultados indican que ROR1 participa en los mecanismos de crecimiento celular independiente de anclaje, y que su silenciamiento se relaciona con una menor tasa de proliferación celular.

En resumen, podemos concluir que ROR1 contribuye positivamente a la proliferación y crecimiento celular tanto de manera dependiente como independiente de la presencia de un sustrato sólido.

La mayor parte de los resultados descriptos a lo largo de esta sección fueron obtenidos en el transcurso de los años 2011 y 2012 y representaban la primera descripción de la participación de ROR1 en los procesos de proliferación y muerte celular. Paralelamente, a mediados del año 2012, Zhang y colaboradores en el laboratorio del Dr. Kipps (Universidad de San Diego, USA) publicaron un trabajo en donde se describía la participación de ROR1 en la proliferación celular de cáncer de mama (Zhang et al. 2012a). Por otro lado, a comienzos del año 2013, Hojjat-Farsangi y colaboradores demostraron que la inhibición de ROR1, mediante el uso de anticuerpos monoclonales o ARN de interferencia, induce apoptosis en diversas líneas celulares de melanoma (Hojjat-Farsangi et al. 2013a).

La publicación de estos artículos significó un importante impedimento para continuar con nuestra investigación en el área de proliferación y apoptosis dado que la similitud con varios de nuestros resultados disminuía la originalidad de nuestros hallazgos. Por este motivo decidimos reorientar el rumbo de nuestra investigación como se describe en la siguiente sección.

CONCLUSIONES PARCIALES

- ROR1 aumenta la susceptibilidad a la apoptosis inducida por privación de suero.
- ROR1 regula positivamente la expresión de Bcl-2 y negativamente la de BAX.
- ROR1 regula positivamente la proliferación celular dependiente e independiente de un sustrato sólido.
- ROR1 afecta la capacidad de formación de colonias en agar blando.
- ROR1 regula positivamente la expresión de Ciclina D1.

5. EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE ROR1 EN LOS PROCESOS DE ADHESIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR

Además del incremento en la proliferación y la resistencia a la muerte celular por apoptosis, el proceso de transformación tumoral se caracteriza por una disminución en la adhesión celular y por un aumento tanto en la motilidad celular como en la capacidad migratoria. En esta sección, nos abocamos a estudiar la contribución de ROR1 sobre la adhesión y migración celular.

5.1. ANÁLISIS DE LA ADHESIÓN CELULAR

Durante la práctica cotidiana de sub-cultivo de las líneas celulares observamos que las células A375-shROR1 permanecían adheridas a la placa durante más tiempo que las células A375-scramble luego del agregado de la solución de Tripsina-EDTA. Por este motivo, decidimos investigar si la manipulación de los niveles de ROR1 afectaba la adhesión celular.

Realizamos ensayos de adhesión celular en las líneas A375-scramble y -shROR1 dispersando las células previo al ensayo con una solución de EDTA 2 mM. Luego de 30 minutos se evaluó la adhesión celular y observamos un incremento significativo del 40% cuando la expresión de ROR1 se encuentra disminuida (**Figura 49A**). Como control, medimos la adhesión celular a las 6 horas, una vez que todas las células se encontraban adheridas a la placa. De esta manera corroboramos que la cantidad de células de A375-scramble y -shROR1 sembradas inicialmente era similar.

Cuando repetimos los ensayos pero dispersando las células con tripsina en lugar de EDTA, no obtuvimos diferencias entre las líneas A375-scramble y -shROR1 (**Figura 49B**). Este resultado pone de manifiesto que las diferencias en la adhesión celular observadas se deben a la participación de moléculas de adhesión presentes previamente en las células.

A continuación, evaluamos la adhesión celular en las líneas A375-vacío y A375-ROR1. En este caso, la sobreexpresión de ROR1 disminuyó significativamente la adhesión celular a los 30 minutos (**Figura 49C**).

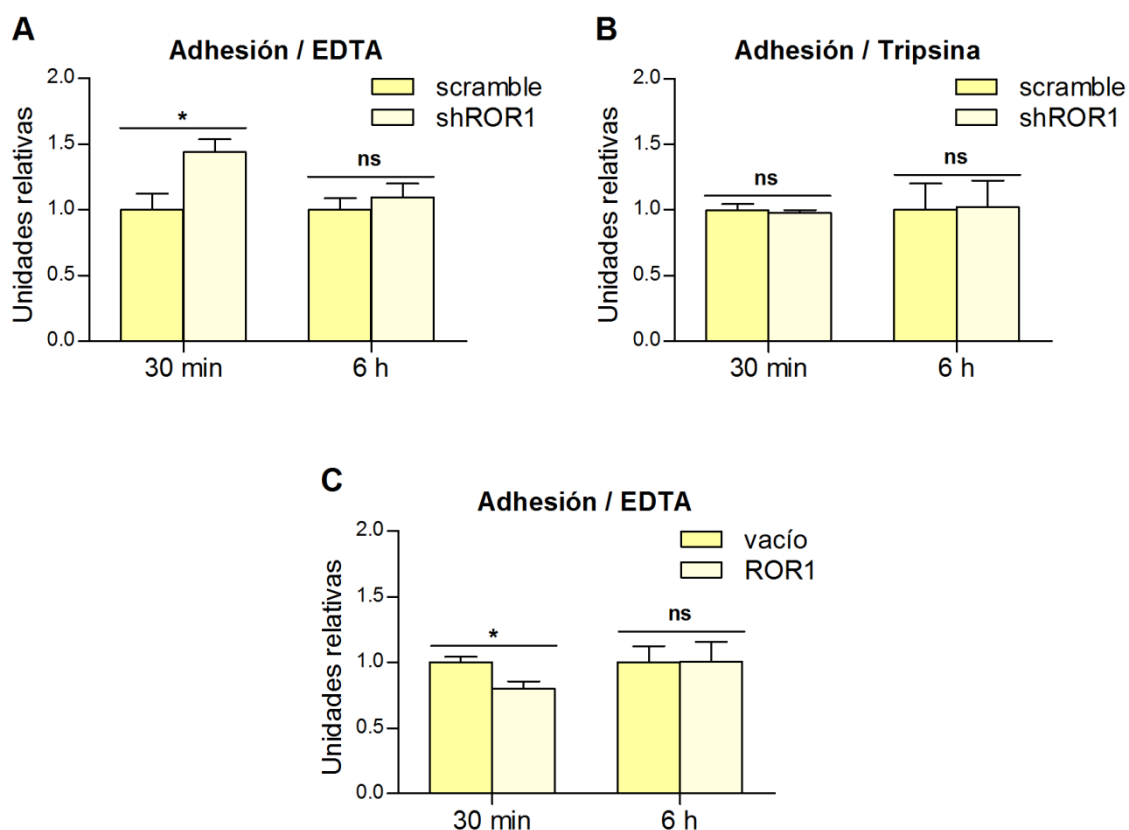


Figura 49. ROR1 disminuye la adhesión celular de la línea celular A375. Las células A375-scramble y -shROR1 (**A y B**) o A375-vacío y -ROR1 (**C**) fueron dispersadas con 2 mM EDTA (**A y C**) o Tripsina (**B**). Luego se sembraron el mismo número de células en placas de 96 pocillos durante 30 minutos o 6 horas. Las células adheridas a la placa fueron fijadas y teñidas con cristal violeta y se midió la absorbancia a 590 nm. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. de la absorbancia relativa a la línea celular control (A375-scramble o -vacío) de cinco (**B**) y tres (**A y C**) experimentos independientes.

Los resultados indican que el aumento de la expresión de ROR1 en melanoma se asocia a una disminución en la adhesión celular, en donde las moléculas de adhesión presentes en las células cumplirían una función en este proceso.

5.2. ANÁLISIS DE LA MOTILIDAD Y MIGRACIÓN CELULAR

Dado que la disminución de la adhesión celular y el aumento en la capacidad de formar colonias en agar blando son dos características que se encuentran asociadas con una mayor capacidad migratoria de células tumorales (Cavallaro et al. 2001), decidimos estudiar si ROR1 regula la motilidad y migración celular.

5.2.1. Ensayos de motilidad celular

Para determinar si ROR1 modula la motilidad celular, realizamos ensayos de cicatrización de heridas en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 y en A375-vacío y -ROR1 en placas revestidas con fibronectina para favorecer la adhesión celular. Dado que ROR1 aumenta la proliferación celular (**Figura 44**), estos experimentos fueron realizados a tiempo cortos, menores al tiempo de replicación celular. Para medir la motilidad celular se calculó el porcentaje de avance de las células desde el borde de la “herida” hacia el área libre de células (ver detalle en Materiales y Métodos, sección 6.7. Ensayos de Cicatrización de Heridas). Observamos que el porcentaje de avance en la línea A375-shROR1 fue significativamente menor que en las células scramble (**Figura 50A**). Por el contrario, la línea A375-ROR1 presentó un aumento significativo en el porcentaje de avance con respecto a su línea control (**Figura 50B**).

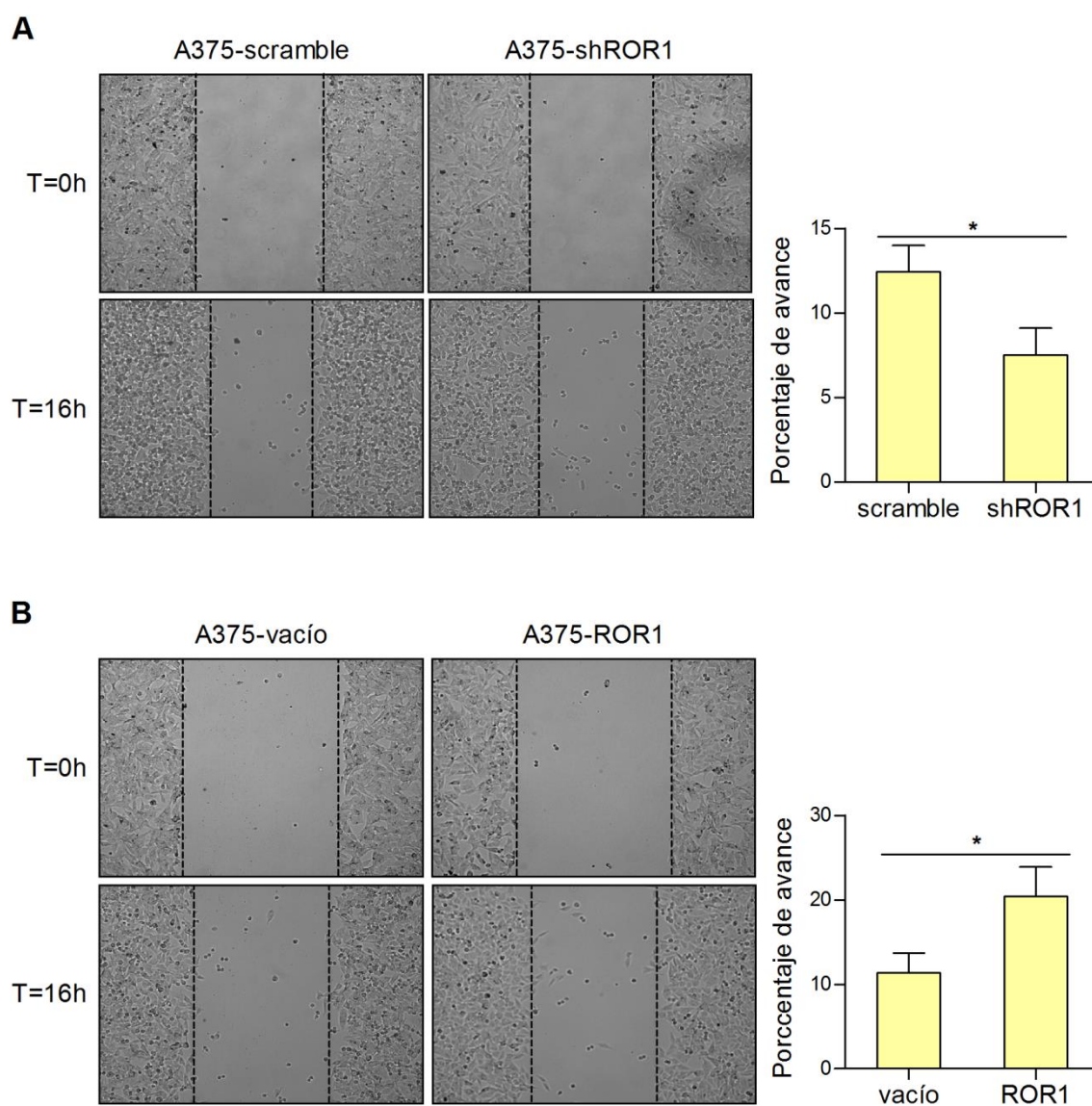


Figura 50. ROR1 aumenta la motilidad celular en ensayos de cicatrización de heridas en la línea celular A375. (A y B) Las células A375-scramble y -shROR1 **(A)** o A375-vacío y -ROR1 **(B)** fueron crecidas hasta formar una monocapa y luego se realizó una “herida” con un tip estéril. Se tomaron imágenes a tiempo inicial (T=0h) y final (T=16h) y se cuantificó el área libre de células utilizando el programa ImageJ en ambos momentos. Panel izquierdo: Imágenes representativas a las 0 y 16 horas luego de realizada la herida. Panel derecho: Los resultados se expresan como el porcentaje de avance celular hacia la “herida” \pm e.e.m. de tres experimentos independientes.

5.2.2. Ensayos de migración celular

Para estudiar la participación de ROR1 en la migración celular empleamos la técnica de *transwell*. Este abordaje experimental nos permite evaluar la capacidad migratoria de las células a través de una membrana porosa de 8 μm de diámetro. La superficie de la membrana a través de la cual las células deben migrar fue recubierta con fibronectina y el medio de cultivo de la cámara inferior del dispositivo contenía medio de cultivo con mayor concentración de SFB.

Los ensayos fueron realizados tanto en las células A375-scramble y -shROR1 como las A375-vacío y -ROR1. La migración fue evaluada 20 horas después de colocar las células sobre la membrana. Para el caso del silenciamiento de ROR1, los resultados mostraron una menor migración a través de la membrana en las células A375-shROR1 que en las células A375-scramble (**Figura 51A**). Por otro lado, cuando ROR1 se encuentra sobreexpresado, observamos un aumento el número de células que atravesaron la membrana con respecto a su línea control (**Figura 51B**).

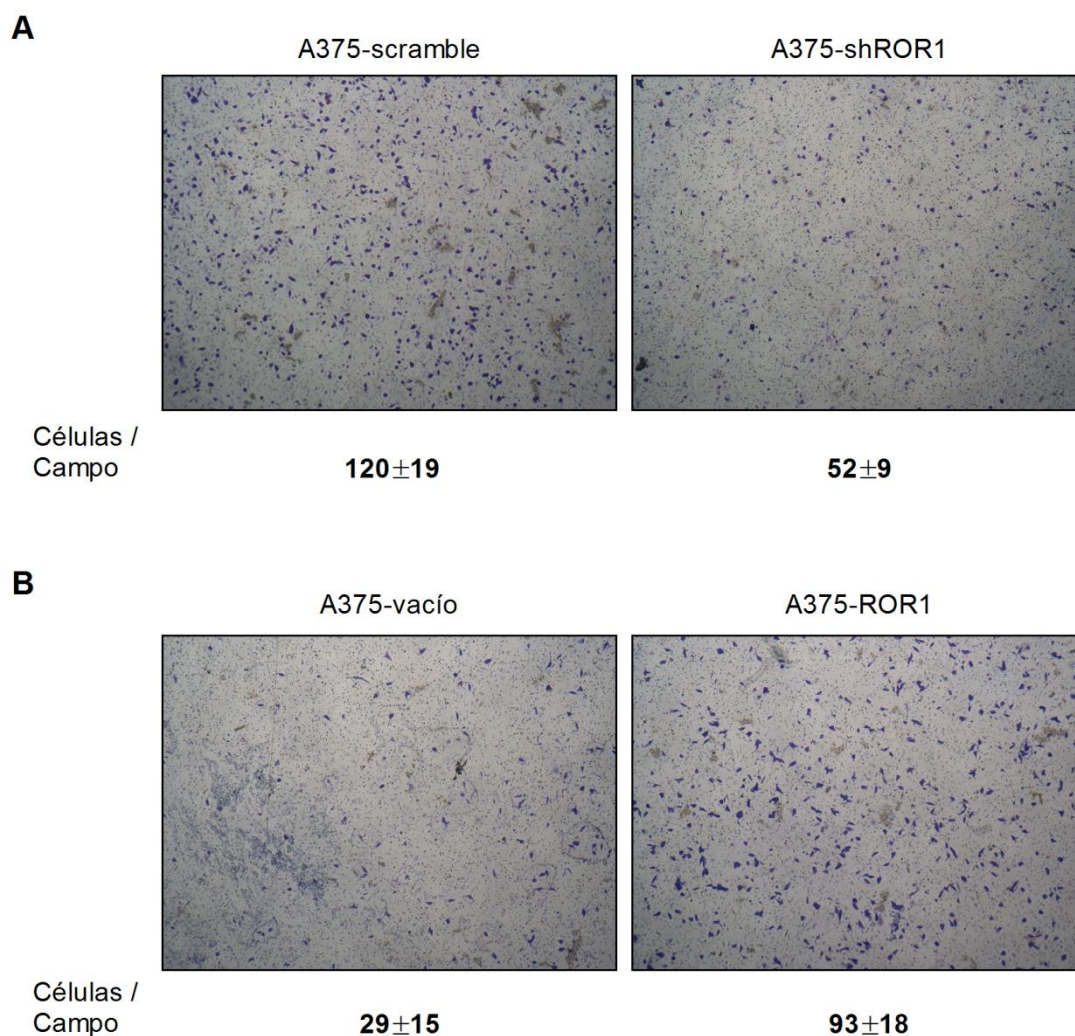


Figura 51. ROR1 aumenta la migración celular en la línea celular A375. (A y B) Las células A375-scramble y -shROR1 (**A**) o A375-vacío y -ROR1 (**B**) fueron sembradas en la parte superior del transwell y 20 horas después se fijaron y tiñeron con cristal violeta las células que migraron por los poros de la membrana. Se tomaron imágenes a lo largo de toda la superficie de la membrana porosa (11 campos en total) y se cuantificó el número de células en cada campo utilizando el programa ImageJ. Panel superior: Imágenes representativas de las células que atravesaron la membrana porosa a las 20 horas de iniciado el ensayo. En cada caso se indica el número de células por campo (media \pm d.e.) de un ensayo representativo. Se realizaron 2 ensayos independientes.

Para asociar los cambios observados en la motilidad y migración celular con cambios a nivel molecular, analizamos la activación de las proteínas GTPasas RhoA y RhoC, las cuales cumplen un papel clave en la regulación de la locomoción y contractibilidad celular (Van Aelst et al. 1997). En particular, la señalización por RhoC en melanoma, es un evento importante en la formación de metástasis (Clark et al. 2000).

La activación de las GTPasas puede evaluarse determinando la abundancia relativa de la forma activa, unida a GTP (RhoA/C-GTP en este caso). Con este objetivo, realizamos ensayos de *Pull down* y *Western blot* de RhoA/C en las líneas A375-scramble y -shROR1 y Lu1205-scramble y -shROR1, utilizando como ligando la proteína de fusión GST-RBD (que posee dominios de unión a RhoA/C-GTP). Mientras que los niveles totales de RhoA/C no se modificaron al silenciar ROR1 en ambas líneas celulares, observamos una marcada disminución en los niveles de RhoA/C-GTP cuando la expresión de ROR1 se encuentra disminuida (**Figura 52**).

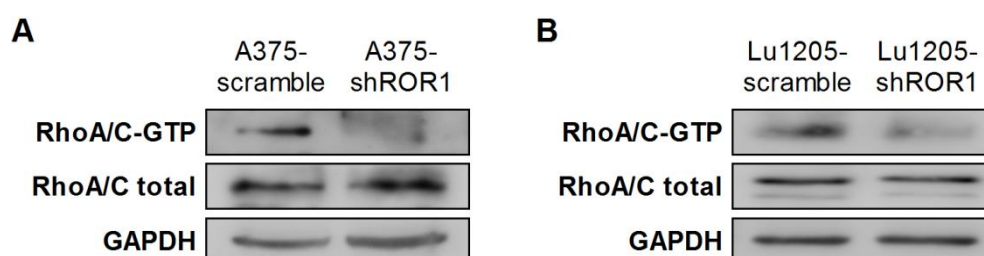


Figura 52. El silenciamiento de ROR1 disminuye la activación de RhoA/C. (A y B) Los ensayos de *Pull down* se realizaron incubando extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 (**A**) o Lu1205-scramble y -shROR1 (**B**) con beads de agarosa unidas a la proteína de fusión GST-RBD. Los niveles de Rho se evaluaron por Western blot antes (RhoA/C total) y después (RhoA/C-GTP) de realizar el *Pull down*. GAPDH se utilizó como control de carga.

En conjunto los resultados de esta sección indican que ROR1 disminuye la adhesión celular y regula positivamente la motilidad y capacidad migratoria de las células de melanoma. Estos cambios inducidos por ROR1 son similares a los que se observan durante el proceso de la Transición Eitelio-Mesenquimal (TEM).

CONCLUSIONES PARCIALES

- ROR1 disminuye la adhesión celular.
- ROR1 aumenta la motilidad y migración celular.
- ROR1 favorece la activación de la proteína GTPasa RhoA/C.

6. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MESENQUIMALES Y EPITELIALES Y SU REGULACIÓN POR ROR1 Y LA VÍA DE PI3K/AKT

El intercambio de cadherinas es un evento que ocurre durante distintas etapas del desarrollo embrionario y permite la segregación y migración de los diferentes tipos celulares. Dicho proceso es una de las características principales de la TEM e implica la disminución o pérdida de la expresión de E-cadherina y el aumento de N-cadherina, como eventos principales. Se ha descrito que las células tumorales que adquieren un fenotipo de características agresivas y metastásicas atraviesan cambios similares en la expresión de las cadherinas que llevan a una disminución en la adhesión y a un aumento en la migración celular (Micalizzi et al. 2010).

Los resultados descritos en la sección anterior dan cuenta de una posible asociación entre la expresión de ROR1 y la TEM; por este motivo quisimos evaluar si ROR1 es capaz de regular la expresión de los principales marcadores epiteliales y mesenquimales involucrados en este proceso.

6.1. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE N-CADHERINA, VIMENTINA Y E-CADHERINA

Analizamos la expresión de los marcadores mesenquimales N-cadherina y vimentina por qRT-PCR y *Western blot* en las líneas celulares A375-scramble o -shROR1 y A375-vacío o -ROR1 (**Figura 53**). Observamos que el silenciamiento de ROR1 disminuyó significativamente los niveles de ambos marcadores, tanto a nivel de ARNm como de proteína (**Figura 53A y B**); mientras que la sobreexpresión de ROR1 generó un incremento significativo de los mismos (**Figura 53C y D**).

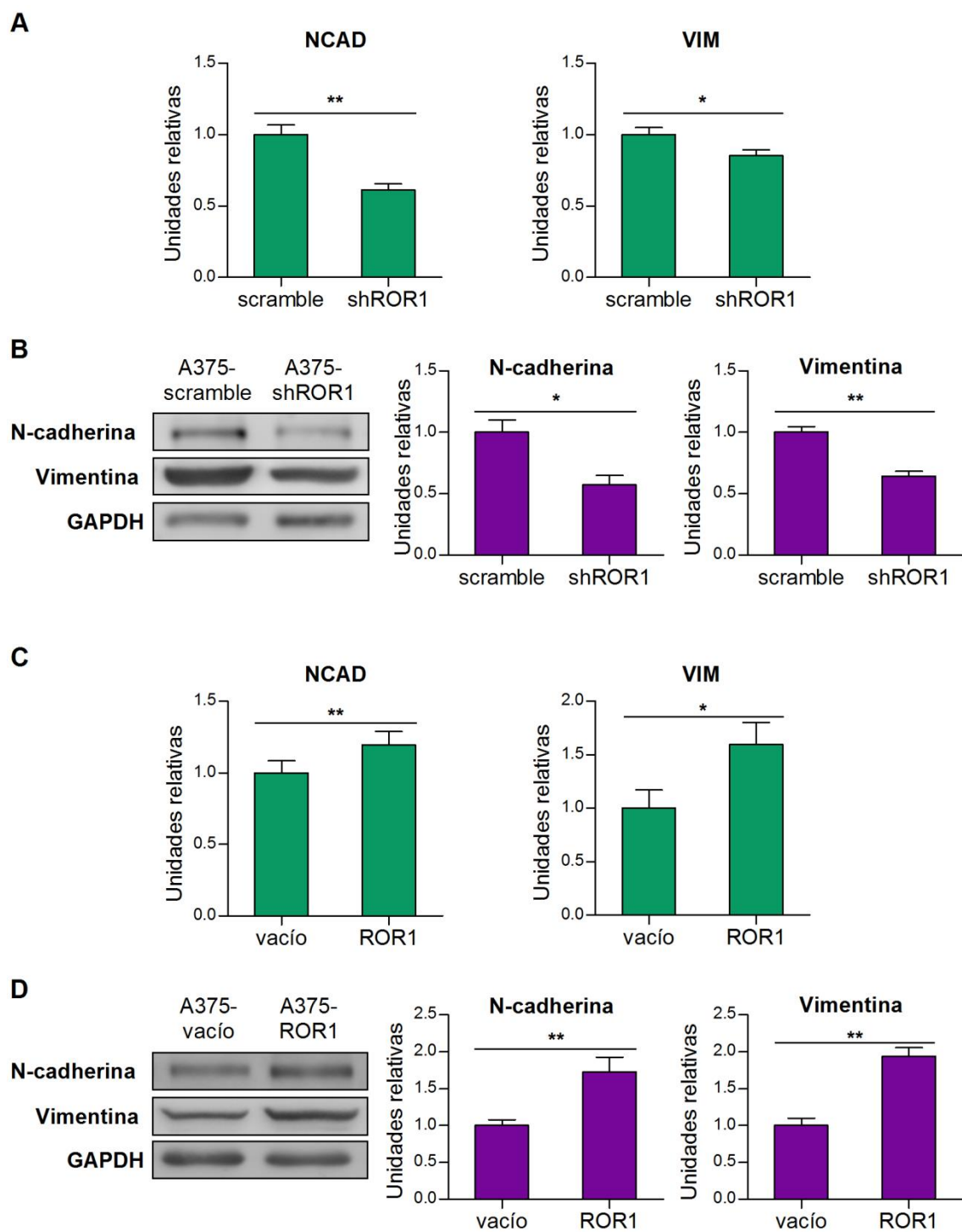


Figura 53. ROR1 aumenta la expresión de N-cadherina y vimentina en la línea celular A375. (A y C) Expresión relativa del ARNm de N-cadherina (NCAD) y vimentina (VIM) en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 **(A)** y A375-vacío y -ROR1 **(C)** por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. de los niveles de ARNm de NCAD y VIM normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a las células control (A375-scramble o -vacío) de tres extractos independientes. **(B y D)** Panel izquierdo: Western blot de N-cadherina y vimentina en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 **(B)** y A375-vacío y -ROR1 **(D)**. GAPDH se utilizó como control de carga. Panel derecho: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de N-cadherina y vimentina normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a las células control (A375-scramble o -vacío) de tres extractos independiente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Cuando analizamos la expresión proteica de N-cadherina y vimentina en la línea celular UACC903-scramble y -shROR1 obtuvimos resultados similares. Ensayos de *Western blot* utilizando extractos de estas líneas mostraron en una disminución de los niveles de N-cadherina y vimentina en las células UACC903-shROR1 (**Figura 54**).

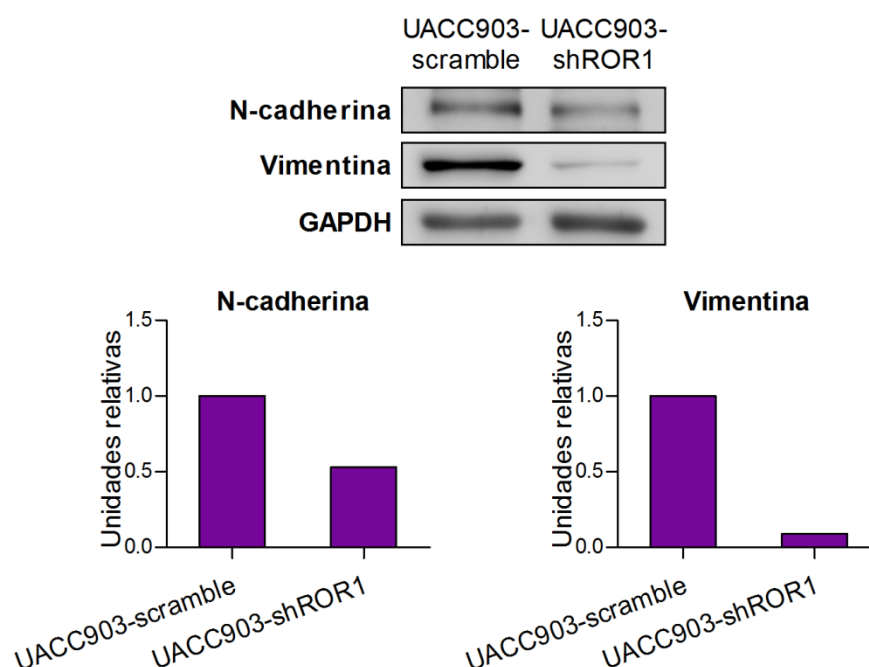


Figura 54. El silenciamiento de ROR1 disminuye los niveles de N-cadherina y vimentina en la línea celular UACC903. Panel superior: Western blot de N-cadherina y vimentina en extractos proteicos de las líneas celulares UACC903-scramble y -shROR1. GAPDH se utilizó como control de carga. Panel inferior: Cuantificación por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como los niveles de N-cadherina y vimentina normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a la línea celular UACC903-scramble.

Estos resultados indican que ROR1 participa de la regulación de la expresión de los marcadores mesenquimales N-cadherina y vimentina.

Por otro lado, la regulación de E-cadherina por ROR1 no pudo ser evaluada ya que no fue posible detectar la expresión de E-cadherina (por *Western blot* o qRT PCR) en las líneas celulares A375, Lu1205 y UACC903 (resultados no mostrados). Como se muestra en el *Western blot* de la **Figura 55A**, a nivel de proteínas, sólo las líneas celulares WM35 y G361 presentaron niveles detectables de E-cadherina; mientras que a nivel de ARNm observamos que la línea WM115 y en menor medida SkMel28, también expresan E-cadherina (**Figura 55B**). Estos resultados se encuentran en concordancia con varios trabajos que demuestran la pérdida de expresión de E-cadherina en melanoma (Poser et al. 2001).

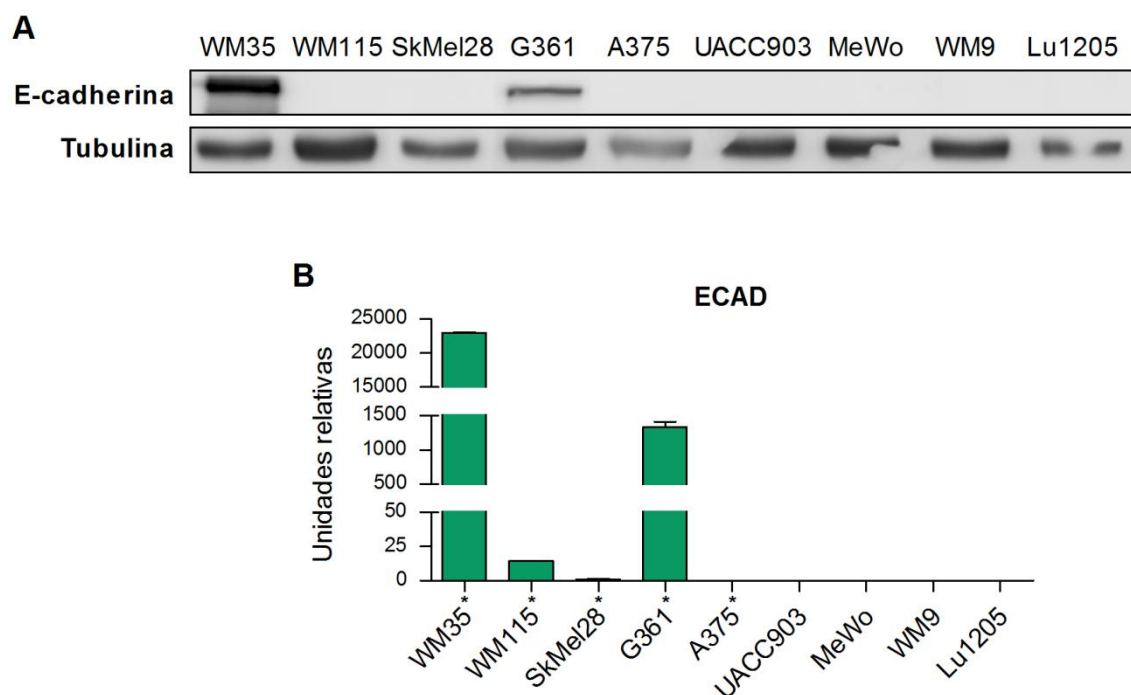


Figura 56. Expresión E-cadherina en líneas celulares de melanoma. (A) Western blot de E-cadherina en extractos proteicos de 9 líneas celulares de melanoma. Tubulina se utilizó como control de carga. **(B)** Expresión relativa del ARNm de E-cadherina (ECAD) en líneas celulares de melanoma por qRT-PCR. Los asteriscos (*) indican las líneas primarias. Los resultados se expresan como la media \pm d.e. de los niveles de ARNm de ECAD normalizados a los valores internos de RNPII y relativizados a la línea SkMel28.

El silenciamiento de ROR1, en las células A375, Lu1205 y UACC903, no fue suficiente para revertir la ausencia de expresión de E-cadherina (a nivel de proteína o ARNm) en ninguna de las tres líneas celulares (resultados no mostrados).

6.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE N-CADHERINA POR LA VÍA DE PI3K/AKT

En secciones anteriores demostramos que la expresión de ROR1 en melanoma contribuye a generar un fenotipo celular de menor adhesión y mayor motilidad, en parte y posiblemente al contribuir a aumentar los marcadores mesenquimales N-cadherina y vimentina. A su vez, también mostramos que ROR1 afecta la expresión y actividad de la vía de señalización de PI3K/Akt.

Nuestro próximo objetivo fue determinar si el aumento de N-cadherina por ROR1 se encuentra mediado por la señalización de Akt.

Para estudiar esta posibilidad, en primer lugar realizamos experimentos con el compuesto LY-294002 (LY), el cual provoca una disminución de los niveles de fosforilación de Akt como consecuencia de la inhibición de PI3K. Medimos por *Western blot* los niveles de N-cadherina y pAkt en las líneas celulares A375-vacío y -ROR1 antes y después del tratamiento con LY (**Figura 56**). Como control del tratamiento corroboramos que el LY disminuye los niveles de pAkt tanto a las 6 como a las 20 horas post-tratamiento (**Figura 56**, ver la línea correspondiente a pAkt). En la **Figura 56** también podemos observar el aumento basal de N-cadherina cuando ROR1 se encuentra sobreexpresado (**Figura 56**, ver las dos primeras calles sin tratamiento), tal como lo describimos previamente (**Figura 55D**).

El tratamiento con el LY disminuyó los niveles de N-cadherina en ambas líneas celulares (A375-vacío y -ROR1), de manera tal que tras 20 horas de tratamiento dejaron de observarse las diferencias en la expresión de N-cadherina entre las células control y las que sobreexpresan ROR1.

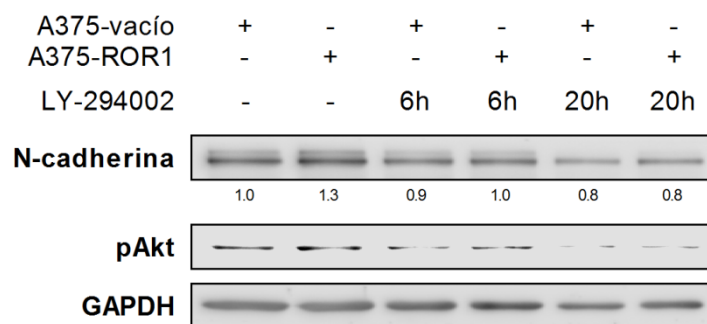


Figura 56. Efecto del tratamiento con LY-294002 en la expresión de N-cadherina al sobreexpresar ROR1. Western blot de N-cadherina y pAkt en extractos proteicos de las líneas celulares A375-vacío y -ROR1 tratadas con 50 μ M de LY-294002 durante 6 o 20 horas. GAPDH se utilizó como control de carga. Los resultados se expresan como los niveles de N-cadherina normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a las células A375-vacío sin tratamiento (calle 1) de tres extractos independientes.

Este resultado demuestra que la activación de la vía de PI3K/Akt, medida como la fosforilación de Akt, es necesaria para mantener el aumento de N-cadherina generado por la sobreexpresión de ROR1.

En segundo lugar, utilizamos la droga rapamicina, la cual inhibe el complejo mTORC1 y como consecuencia aumenta la fosforilación de Akt. Nuevamente medimos por *Western blot* los niveles de N-cadherina y pAkt en las líneas celulares A375-vacío y -ROR1 antes y después del tratamiento, en este caso con rapamicina (**Figura 57**). Como control del tratamiento corroboramos que la rapamicina aumenta los niveles de pAkt tanto a las 6 como a las 20 horas post-tratamiento (**Figura 57**, ver la línea correspondiente a pAkt). Verificamos también el aumento de N-cadherina producto de la sobreexpresión de ROR1 (**Figura 57**, ver las dos primeras calles sin tratamiento).

El tratamiento con rapamicina provocó un incremento en los niveles de N-cadherina en ambas líneas celulares y luego de 20 horas de tratamiento la expresión de N-cadherina alcanzó los mismos niveles en las células control y en las que sobreexpresan ROR1.

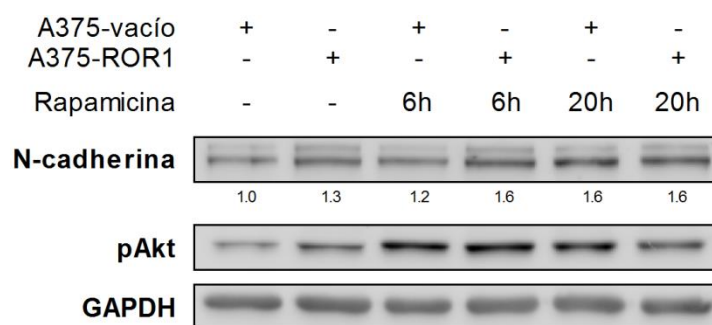


Figura 57. Efecto del tratamiento con rapamicina en la expresión de N-cadherina al sobreexpresar ROR1. Western blot de N-cadherina y pAkt en extractos proteicos de las líneas celulares A375-vacío y -ROR1 tratadas con 1 μ M de rapamicina durante 6 o 20 horas. GAPDH se utilizó como control de carga. Los resultados se expresan como los niveles de N-cadherina normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a las células A375-vacío sin tratamiento (calle 1) de tres extractos independientes.

Este resultado confirma la participación de Akt en la regulación de la expresión de N-cadherina. Además, observamos que los niveles de N-cadherina alcanzan un máximo de inducción cuando ROR1 se encuentra presente (tanto en los niveles endógenos como al sobreexpresarlo) y se estimula la activación de Akt.

A continuación, evaluamos el efecto de los tratamientos con LY y rapamicina sobre la expresión de N-cadherina en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 por *Western blot* (**Figura 58A y B**, respectivamente). En ambos casos controlamos el correcto funcionamiento de las drogas midiendo los niveles de pAkt y corroboramos la inhibición basal de N-cadherina producto de la expresión del shROR1 (**Figura 58**, ver las dos primeras calles sin tratamiento en ambos paneles) como habíamos demostrado previamente (**Figura 58B**).

Para el caso del tratamiento con LY, los niveles de N-cadherina disminuyeron en ambas líneas celulares, siendo siempre menores en las células que expresan el shROR1 (**Figura 58A**). Este resultado sugiere la existencia de mecanismos tanto dependientes como independientes de Akt en la regulación de N-cadherina por ROR1, ya que la inhibición de la vía PI3K/Akt no

logra disminuir la expresión de N-cadherina en las células A375-scramble a los niveles que se obtuvieron en las células sh-ROR1.

Por otro lado, el tratamiento con rapamicina provocó un incremento en los niveles de N-cadherina sólo en la línea celular A375-scramble, mientras que en las células -shROR1 no se observaron cambios (**Figura 58B**). Esto demuestra que la activación de la vía PI3K/Akt es necesaria pero no suficiente para inducir un aumento en los niveles de N-cadherina, ya que cuando ROR1 se encuentra disminuido (A375-shROR1) la activación de Akt no logró restaurar la expresión de N-cadherina.

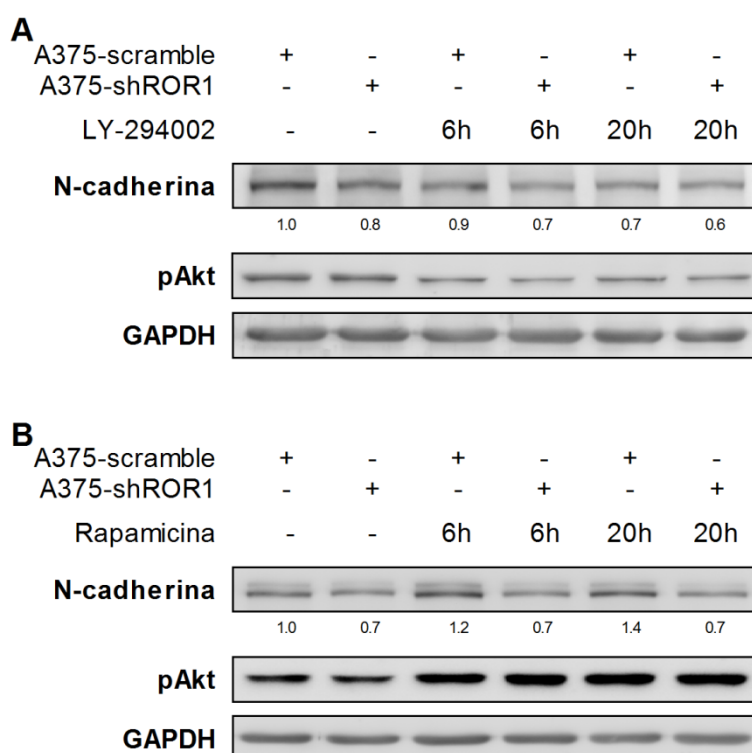


Figura 58. Efecto del tratamiento con LY o rapamicina en la expresión de N-cadherina al silenciar ROR1. Western blot de N-cadherina y pAkt en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 tratadas con 50 μ M de LY-294002 (**A**) o 1 μ M de rapamicina (**B**) durante 6 o 20 horas. GAPDH se utilizó como control de carga. Los resultados se expresan como los niveles de N-cadherina normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a las células A375-vacío sin tratamiento (calle 1) de tres extractos independientes.

En conjunto, podemos concluir que la expresión de N-cadherina depende la presencia de ROR1 y de la activación de la vía de PI3K/Akt. La regulación por ROR1 ocurre tanto por mecanismos dependientes como independientes de Akt, y del mismo modo, los efectos mediados por Akt también ocurren de manera dependiente e independiente de ROR1.

6.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE N-CADHERINA POR WNT5A

En varias oportunidades durante el desarrollo de este trabajo observamos que la sobreexpresión de ROR1 y la estimulación con Wnt5a presentaban efectos similares. En particular, con ambas estrategias obtuvimos un aumento en la fosforilación de Dvl2 (**Figuras 28 y 30B**) y una disminución en la activación de FoxO (**Figura 35**). Luego de haber determinado la participación de ROR1 y Akt en la regulación de N-cadherina (**Figura 53, 56, 57 y 58**), quisimos evaluar si la estimulación con Wnt5a también regula la expresión de N-cadherina y si ROR1 y Akt se encuentran involucrados en dicha regulación.

Con este objetivo, realizamos ensayos de *Western blot* en las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 tratadas con MC Wnt5a y LY y medimos los niveles de N-cadherina a las 20 horas (**Figura 59**). La estimulación con Wnt5a en las células A375-scramble aumentó los niveles de N-cadherina de manera dependiente de la activación de Akt, ya que en presencia del LY la inducción de N-cadherina por Wnt5a se encontró completamente bloqueada (**Figura 59**, ver calles 1, 3 y 5). Por otro lado, en las células A375-shROR1 el aumento de N-cadherina por Wnt5a fue menor al observado en las células control, indicando que existen mecanismos dependientes e independientes de ROR1 que inducen la expresión de N-cadherina por Wnt5a. A su vez, esta inducción también fue completamente bloqueada en presencia del LY (**Figura 59**, ver calles 2, 4 y 6).

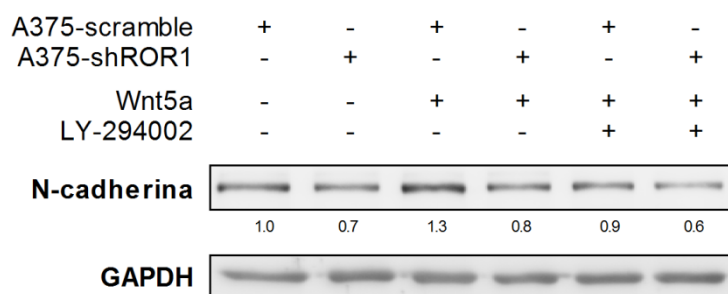


Figura 59. Efecto del tratamiento con Wnt5a y LY en la expresión de N-cadherina al silenciar ROR1.

Western blot de N-cadherina en extractos proteicos de las líneas celulares A375-scramble y -shROR1 tratadas con MC Wnt5a en presencia y ausencia de 50 μ M de LY durante 20 horas. GAPDH se utilizó como control de carga. Los resultados se expresan como los niveles de N-cadherina normalizados a los valores de GAPDH y relativizados a las células A375-vacío sin tratamiento (calle 1) de dos extractos independientes.

En conjunto, los resultados de esta sección demuestran que tanto la activación de Akt como la presencia de ROR1 son requeridas para regular la expresión de N-cadherina a través de la sobreexpresión de ROR1 o de la estimulación con Wnt5a.

CONCLUSIONES PARCIALES

- ROR1 regula positivamente la expresión de los marcadores mesenquimales: N-cadherina y vimentina.
- La inhibición de la expresión de ROR1 en las líneas celulares A375, Lu1205 y UACC903 no fue suficiente para revertir la ausencia de expresión de E-cadherina.
- La actividad de la vía de PI3K/Akt es necesaria para mantener el aumento de N-cadherina generado por la sobreexpresión de ROR1.
- La expresión de N-cadherina depende de la presencia de ROR1 y de la activación de la vía de PI3K/Akt, alcanzando un máximo de inducción cuando se cumplen ambas condiciones.
- La regulación de N-cadherina por ROR1 ocurre por mecanismos dependientes e independientes de Akt, y del mismo modo, la regulación por Akt ocurre de manera dependiente e independiente de ROR1.
- La estimulación con Wnt5a aumenta la expresión de N-cadherina.
- La regulación de N-cadherina por Wnt5a ocurre por mecanismos dependientes e independientes de ROR1 y requiere de la activación de Akt.

CONCLUSIONES FINALES

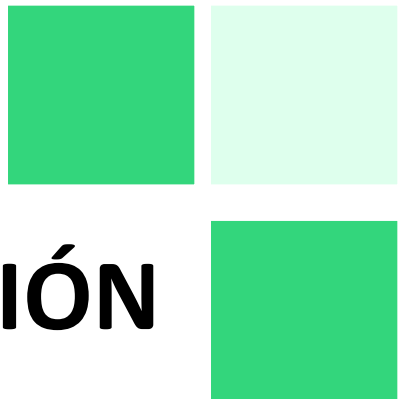


Las conclusiones finales de esta tesis son:

- ROR1 se expresa en líneas celulares y en muestras tumorales de melanoma humano. Su expresión es mayor que la observada en los melanocitos.
- La expresión de ROR1 es similar en líneas celulares de melanoma derivadas de tumores primarios y de metástasis y no se asocia a un fenotipo “proliferativo” ni a uno “invasivo”.
- La elevada expresión de ROR1 en melanoma correlaciona con una menor sobrevida post-recurrencia de los pacientes
- ROR1 no participa de la señalización por la vía canónica de Wnt.
- ROR1 media la activación por fosforilación de Dvl-2, regula positivamente la expresión de AKT1 y participa en la activación de la vía PI3K/Akt mediada por Wnt5a.
- ROR1 y WNT5A participan en un circuito de retroalimentación positiva a nivel de su expresión génica.
- ROR1 regula positivamente la proliferación celular dependiente e independiente de un sustrato sólido y aumenta la susceptibilidad a la apoptosis inducida por privación de suero.

- ROR1 disminuye la adhesión celular y aumenta la motilidad y migración celular.
- ROR1 regula positivamente la expresión de los marcadores mesenquimales: N-cadherina y vimentina.
- La regulación de N-cadherina por ROR1 ocurre por mecanismos dependientes e independientes de Akt, y del mismo modo, la regulación por Akt ocurre de manera dependiente e independiente de ROR1. La regulación de N-cadherina por Wnt5a ocurre por mecanismos dependientes e independientes de ROR1 y requiere de la activación de Akt.

DISCUSIÓN



1. EXPRESIÓN DE ROR1 EN MELANOMA

El receptor huérfano del tipo tirosina quinasa, ROR1, fue identificado por primera vez en 1992 en una línea celular de neuroblastoma humano (Masiakowski et al. 1992). Durante los siguientes años fue descrito en otros organismos como *Drosophila melanogaster* (Oishi et al. 1997), *Mus musculus* (Oishi et al. 1999) y *Caenorhabditis elegans* (CAM-1) (Forrester et al. 1999). Sin embargo, no fue hasta el año 2001 donde comienzan a publicarse los primeros trabajos relacionados a la expresión y función biológica de ROR1.

Una de las características más distintivas sobre ROR1 es su perfil de expresión, la cual es elevada durante el desarrollo embrionario (Al-Shawi et al. 2001; Matsuda et al. 2001) y baja o nula en el adulto (Baskar et al. 2008; Fukuda et al. 2008; Hudecek et al. 2010). Sin embargo, ROR1 vuelve a expresarse en células tumorales de varios tipos de leucemias (Shabani et al. 2007; Baskar et al. 2008; Shabani et al. 2011) y linfomas (Barna et al. 2011; Daneshmanesh et al. 2013), así como también en tumores sólidos de mama (Zhang et al. 2012a), ovario (Zhang et al. 2014a) y pulmón (Yamaguchi et al. 2012), entre otros ((Zhang et al. 2012b).

La información disponible sobre ROR1 en melanoma es limitada. En el año 2013, Hojjat-Farsangi y colaboradores describieron la presencia de ROR1 en líneas celulares de melanoma de origen metastásico (Hojjat-Farsangi et al. 2013a). Ese mismo año, O'Connell y colaboradores en el laboratorio de la Dra. Weeraratna, mostraron que la expresión de ROR1 es mayor en líneas celulares de melanoma con un fenotipo “proliferativo” y poco “invasivo”, y que disminuye en las líneas con fenotipo “invasivo” y poco “proliferativo” (O'Connell et al. 2013). Estas observaciones podrían de alguna manera considerarse contradictorias, ya que las líneas celulares de melanoma que resultan ser más invasivas son habitualmente aquellas derivadas de tumores metastásicos.

Luego de analizar varias líneas celulares de melanoma, nuestros resultados indican que ROR1 se expresa en niveles similares tanto en las células de origen primario como metastásico (**Figura 12**). Más importante aún, demostramos por primera vez que la expresión de ROR1 es mayor en las líneas de melanoma que en los melanocitos humanos inmortalizados (**Figura 13**).

Dada la aparente discrepancia de nuestros resultados con los de O'Connell y colaboradores (2013), en lo referido a la asociación entre la expresión de ROR1 y los fenotipos “proliferativo” o “invasivo”, decidimos estudiar este aspecto en mayor profundidad (O'Connell et al. 2013). El análisis lo realizamos empleando la base de datos *Melanoma Phenotype-Specific Expression*, y el mismo reveló que ROR1 se expresa por igual en las líneas celulares de ambos fenotipos (**Figura 15**). Las diferencias con el trabajo del grupo de la Dra. Weeraratna resultan sorprendentes, ya que en ambos casos se utilizó la misma base de datos y sin embargo arribamos a conclusiones diferentes.

Una posible explicación para estas diferencias podría ser que el análisis de O'Connell sólo incluye 60 líneas celulares mientras que nosotros realizamos el estudio sobre las 220 líneas celulares que posee la base de datos. De esta manera, la selección de un tamaño de muestra menor para realizar el estudio pudo haber llevado a conclusiones erróneas.

Otra posible explicación es que nuestro análisis tuvo en cuenta las 3 sondas disponibles, mientras que O'Connell sólo consideró una de ellas (O'Connell et al. 2013). Lamentablemente, O'Connell y colaboradores no especifican en su artículo cuál de las tres sondas utilizaron. Si bien este punto es meramente especulativo, es probable que la sonda utilizada haya sido la 211057_at, ya que la misma mostró en nuestro análisis un pequeño aumento en el fenotipo “proliferativo”, a diferencia de lo obtenido con las otras dos sondas en donde no se observaron diferencias significativas. Uno de los principales motivos por los cuales los experimentos de microarreglos utilizan varias sondas es para obtener patrones de hibridación representativos y específicos de cada gen. La utilización de una sola sonda puede llevar a conclusiones erróneas y nuestro análisis sugiere que eso es justamente lo que ocurre con la sonda 211057_at.

Luego de analizar los valores de expresión de ROR1 para cada sonda en muestras provenientes de cuatro set de datos de microarreglos, observamos que las sondas 205805_s_at y 232060_at poseen un coeficiente de correlación que osciló entre 0,82 y 0,96. Por otra parte, el coeficiente de correlación de la sonda 211057_at con las otras dos osciló entre 0,4 y 0,5. Este análisis nos permite ratificar que la expresión de ROR1 no se asocia a fenotipos “proliferativos” ni “invasivos”.

Esta conclusión es sumamente importante, ya que la afirmación de O'Connell y colaboradores sobre el rol inhibitorio de ROR1 en la progresión tumoral, deriva en parte del análisis erróneo de los datos de los microarreglos.

Como ya mencionamos anteriormente, existen tres trabajos en la literatura sobre la expresión de ROR1 en melanoma (Zhang et al. 2012b; Hojjat-Farsangi et al. 2013a; O'Connell et al. 2013), de los cuales sólo Zhang y colaboradores (2012) analizaron muestras de tumores de pacientes. Este estudio fue el primero en evaluar la expresión de ROR1 en tumores sólidos de diferente origen. Para el caso del cáncer de piel, 45 de las 55 muestras analizadas presentaron marcación positiva para ROR1 (89%), de las cuales 40 eran muestras de melanoma y 36 resultaron positivas para la marcación de ROR1 (90%) (Zhang et al. 2012b). Nuestros resultados coinciden con los descritos por el grupo del Dr. Kipps, ya que también encontramos un alto porcentaje de muestras de pacientes con marcación positiva para ROR1 (62 y 82% según el origen de las muestras) (**Tablas 3 y 4**).

Para asociar la expresión de ROR1 en los tumores de melanoma con la sobrevida de los pacientes, utilizamos datos de microarreglos de dos grupos independientes de pacientes disponibles en bases públicas. Este análisis reveló una correlación positiva entre los elevados niveles de expresión de ROR1 y una menor sobrevida post-recurrencia de los pacientes (**Figuras 18 y 20A**). Por el contrario, no se observó ninguna relación entre la sobrevida de los pacientes y la expresión de ROR2 y Wnt5a (**Figuras 19 y 20B**).

Si bien estos resultados están basados en datos de ARNm y no de proteínas, la asociación de la expresión de ROR1 con la sobrevida podría ser relevante para el seguimiento de los pacientes con melanoma, ya que permitiría identificar subgrupos de pacientes que desarrollen esta enfermedad de manera más agresiva. Este hecho, a su vez, permitiría escoger el tratamiento más adecuado para aplicar en cada caso. En la actualidad, se carece de marcadores moleculares que posibiliten esta discriminación ya que los mejores indicadores de pronóstico son parámetros surgidos del análisis histopatológico del tumor. En este sentido, nuestro laboratorio ha iniciado un proyecto de investigación para profundizar el estudio de la relación entre la sobrevida de los pacientes y la expresión de ROR1. Se analizará, mediante ensayos de inmunohistoquímica, los niveles proteicos de ROR1 en muestras de pacientes de distintos estadios de la enfermedad y se evaluará la relación entre ROR1 y la sobrevida libre de metástasis y post-recurrencia empleando un amplio número de pacientes. De esta manera, nos proponemos confirmar los resultados observados en relación a la sobrevida post-recurrencia y re-evaluar la posible asociación con la sobrevida libre de metástasis, la cual no alcanzó a ser significativa en este trabajo pero presentó una tendencia a diferenciarse (**Figura 18A**). En este sentido, los resultados obtenidos sobre la participación de ROR1 en las distintas

funciones celulares, darían sustento a una posible asociación entre los niveles de expresión de ROR1 y la supervivencia libre de metástasis.

La asociación entre la expresión de ROR1 y la supervivencia de pacientes, también fue observada para el cáncer de ovario (Zhang et al. 2014a), de mama (Zhang et al. 2012a) y de pulmón de células no pequeñas tratados con erlotinib (inhibidor de EGFR) (Karachaliou et al. 2013). En todos los casos una mayor expresión de ROR1 correlacionó con una menor supervivencia de los pacientes. Además, en LLC, el grado de fosforilación de ROR1 se asoció también a un incremento en la progresión de esta enfermedad (Hojjat-Farsangi et al. 2013b).

Los resultados de esta tesis doctoral indican que ROR1 no sólo representa un potencial marcador pronóstico sino que, como se discute en las siguientes secciones, jugaría un papel activo en la progresión tumoral de melanoma, constituyéndose así en un posible nuevo blanco terapéutico.

2. ROR1 Y LA SUPERVIVENCIA CELULAR

Junto con el potencial uso de ROR1 como marcador pronóstico, se ha demostrado que contribuye a la supervivencia celular y a la progresión de LLA (Bicocca et al. 2012) y de varios tipos tumorales como adenocarcinoma de pulmón (Yamaguchi et al. 2012), cáncer de mama (Zhang et al. 2012a; Cui et al. 2013) y de ovario (Zhang et al. 2014a), entre otros.

A través del empleo de las metodologías de pérdida y ganancia de función en las líneas celulares de melanoma A375 y Lu1205, describimos la participación de ROR1 en la apoptosis celular (**Figuras 39 y 40**), tal como fue determinado por Hojjat-Farsangi y colaboradores (Hojjat-Farsangi et al. 2013a). En este trabajo los autores muestran un aumento en la apoptosis basal al silenciar ROR1 (a través de ARNi o Ac-m). Dicha inducción de la apoptosis varía ampliamente entre las líneas celulares que utilizan, y en el caso particular del silenciamiento con ARNi en la línea celular A375, es de sólo un 18%. En nuestro caso, tanto la línea celular A375 como la Lu1205, presentaron bajos niveles de apoptosis basal y no logramos obtener cambios al silenciar ROR1. Sin embargo, la privación de suero durante 48 horas, aumentó los niveles de apoptosis y pudimos observar una inducción aun mayor al silenciar ROR1.

La participación de ROR1 en la apoptosis fue descrita también para el caso de células de LLC y LLA (Choudhury et al. 2010; Bicocca et al. 2012; Daneshmanesh et al. 2012), células B malignas (Baskar et al. 2012), líneas celulares de cáncer de mama (Zhang et al. 2012a) y de adenocarcinomas de pulmón (Yamaguchi et al. 2012; Liu et al. 2015; Ida et al. 2016). A nivel de señalización, se describió el clivaje de caspasa 8, caspasa 9 y PARP (Daneshmanesh et al. 2012; Hojjat-Farsangi et al. 2013a) y la disminución en los niveles de Mcl-1 (Hojjat-Farsangi et al. 2013a) y Bcl-2 (Zhang et al. 2012a) cuando se silencia o inhibe la acción de ROR1. En este sentido, nuestros resultados también mostraron regulación de Bcl-2 por ROR1 y de la proteína pro-apoptótica BAX (**Figuras 41, 42 y 43**).

Otra manera de evaluar el impacto de ROR1 en la supervivencia celular, es a través del estudio de la proliferación. En este sentido, nuestros resultados mostraron que ROR1 participa en la proliferación tanto de manera independiente como dependiente de un sustrato sólido. Ensayos de MTT y clonogénicos demostraron que la presencia de ROR1 se relaciona con un aumento en la proliferación celular (**Figuras 44 y 45**) y en la capacidad de formar colonias en agar blando (**Figuras 47 y 48**), respectivamente.

Los efectos de ROR1 en la proliferación fueron descritos también para líneas celulares de cáncer de mama (Zhang et al. 2012a), de pulmón (Yamaguchi et al. 2012; Zhang et al. 2012b), gástrico (Tao et al. 2015), de ovario y páncreas (Zhang et al. 2012b). Más aún, en líneas celulares de cáncer gástrico se determinó que ROR1 participa de la formación de colonias en agar blando (Tao et al. 2015). La regulación de Ciclina D1 por ROR1 (**Figura 46**) también fue descrita en líneas celulares de cáncer de mama (Zhang et al. 2012a) y de cáncer gástrico (Tao et al. 2015).

En conjunto, tanto nuestros resultados como los de otros laboratorios, sugieren fuertemente que ROR1 es un regulador positivo del crecimiento y de la supervivencia celular, y que al menos parte de estos efectos los realiza a través de la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt.

Es importante señalar que algunos de los mecanismos moleculares asociados a ROR1 que caracterizamos en este trabajo difieren parcialmente en ciertos aspectos de los descritos previamente en líneas celulares derivadas de otros tipos de tumores. Se ha determinado que al inhibir de manera transitoria la acción de ROR1 se produce una disminución en la fosforilación basal de PI3K, Akt, mTOR y/o CREB (Yamaguchi et al. 2012; Zhang et al. 2012a; Zhang et al. 2012b; Daneshmanesh et al. 2014; Liu et al. 2015). Nuestros resultados también demuestran la participación de ROR1 en la vía de PI3K/Akt, a través de la regulación de la expresión de Akt1 y de la fosforilación de Akt en respuesta a la estimulación con Wnt5a, pero no observamos cambios significativos y de manera consistente en la fosforilación basal de Akt al alterar la expresión de ROR1.

Al menos dos escenarios posibles pueden considerarse para explicar dicha diferencia. El primero es de naturaleza técnica y se basa en las distintas metodologías utilizadas para silenciar ROR1: mientras en los otros trabajos publicados se realiza una inhibición transitoria a través de Ac-m o ARNi, en nuestro caso el silenciamiento lo realizamos de manera estable mediante la utilización de shARN. La utilización de dicha metodología podría favorecer el desarrollo de mecanismos compensatorios que les permitan a las células sobreponerse a los efectos causados por la ausencia de ROR1. La segunda explicación se basa en diferencias inherentes a los tipos celulares empleados. En las células de melanoma, por ejemplo, la

fosforilación de Akt se encuentra potentemente inducida y hasta puede resultar independiente del estado de PTEN (Abel et al. 2013). Esto implica que los reguladores de esta vía en melanoma pueden diferir de los existentes en otros tipos celulares. Más aún cuando los mecanismos moleculares que vinculan a Dvl (en la vía de Wnt) con la vía de PI3K/Akt no han sido caracterizados.

3. ADHESIÓN, MIGRACIÓN Y TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL

Wn5a es uno de los principales ligandos que activan la vía de señalización de PCP y provocan la polarización de proteínas y receptores implicados en los proceso de adhesión y migración celular (Minami et al. 2010; Gao 2012). En concordancia con la descripción de las proteínas ROR como receptores de Wnt5a, éstas han sido extensamente estudiadas en *C. elegans* por su importante participación en la migración celular neuronal (Forrester et al. 1999). Además, se ha demostrado que ROR1 incrementa el número de fibras de estrés de actina y la migración celular en células HeLa (Tseng et al. 2011).

En línea con estos trabajos, nuestros resultados mostraron que ROR1 promueve un fenotipo de menor adhesión (**Figuras 49**) y de mayor motilidad y migración celular (**Figuras 50 y 51**, respectivamente) en células de melanoma. A nivel de señalización, una de las proteínas claves activadas por la vía de PCP es la pequeña GTPasa RhoA/C, la cual cumple un papel clave en la regulación de la locomoción y contractibilidad celular (Van Aelst et al. 1997). Mediante ensayos de *Pull down* seguidos por *Western blot* demostramos que ROR1 participa de la activación de Rho (**Figura 52**). Este hecho, junto con la importancia de Rho en la formación de metástasis en melanoma (Clark et al. 2000), apoya el rol de ROR1 en la progresión de melanoma.

Por otro lado, la regulación en la adhesión, la motilidad y la migración celular por ROR1 sugiere que este receptor podría jugar un rol en la progresión de melanoma induciendo procesos similares a los observados en la TEM. En este sentido, tanto en células de cáncer de mama como de cáncer de ovario, el silenciamiento de ROR1 indujo cambios en varios marcadores característicos de la TEM, como ser la disminución de N-cadherina, vimentina, Snail 1 y 2, entre otros (Cui et al. 2013; Zhang et al. 2014b).

En las células de melanoma, nuestros resultados mostraron que ROR1 regula positivamente la expresión de N-cadherina y vimentina a nivel de ARNm y de proteína (**Figuras 53 y 54**). Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en las células de cáncer de mama (Cui et al. 2013), el silenciamiento de ROR1 no fue suficiente para revertir la ausencia de expresión de E-cadherina. Es posible que esta diferencia se deba al importante rol de BRAF en melanoma y sus efectos en la reorganización de la red de factores de transcripción de la TEM que resultan, entre otros hechos, en la pérdida de la expresión de E-cadherina (Caramel et al. 2013).

En conjunto, los resultados que presentamos sugieren que ROR1 contribuye a la progresión de melanoma, participando tanto en los procesos tempranos (proliferación) como tardíos (adhesión y migración). La expresión de ROR1 en las líneas celulares de melanoma con fenotipo “proliferativo” e “invasivo”, así como también en las líneas celulares de origen primario y metastásico, son consistentes con la potencial participación de ROR1 a lo largo de ambos estadios de la progresión tumoral.

De lo descripto, se desprende que nuestro trabajo contribuye a establecer a ROR1 como un factor que promueve la TEM, la motilidad, la migración y la invasión celular en distintos tipos celulares incluyendo melanoma. Estas características, propias de los tumores más agresivos, podrían ser, al menos en parte, responsables de la menor sobrevida post-recurrencia de los pacientes que presentan elevada expresión de ROR1 (**Figuras 18 y 20**).

Sin embargo, debe mencionarse que llamativamente y en contraposición con la mayoría de las evidencias descriptas hasta el momento, O'Connell y colaboradores han señalado que ROR1 regula de manera negativa la invasión celular y la formación de metástasis de células de melanoma (O'Connell et al. 2013). Dada la gran atención que ha recibido en los últimos años la

vía de señalización Wnt5a/ROR1 en el campo de la oncología, se espera que en el corto plazo nuevos trabajos de investigación permitan aclarar esta discrepancia.

4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE N-CADHERINA POR ROR1 Y AKT

En la sección anterior describimos y discutimos sobre las distintas evidencias que demuestran el rol de ROR1 en la tumorigénesis. Sin embargo, la información disponible respecto de los mecanismos moleculares regulados por ROR1 es limitada. La mayoría de los trabajos publicados en este tópico analizan la participación de la vía PI3K/Akt/CREB y su relación con la supervivencia celular, tanto en cáncer de mama (Zhang et al. 2012a), de pulmón (Choudhury et al. 2010; Yamaguchi et al. 2012) como en células de LLC (Zhang et al. 2012b). También se ha descrito que esta vía regula genes relacionados a la supervivencia celular como Ciclina D1, c-Myc y Bcl-2 en respuesta a cambios en ROR1.

Unos de nuestros objetivos finales fue determinar si la señalización por PI3K/Akt, modulada por ROR1, podría estar involucrada en la regulación del marcador mesenquimal N-cadherina. En este sentido, nuestros resultados demostraron que la activación de Akt es necesaria pero no suficiente para regular la expresión de N-cadherina (**Figuras 56, 57 y 58**), ya que también se necesita de eventos adicionales que provee la presencia de ROR1. Esto se puso en evidencia, por ejemplo, al observar que la activación de Akt por rapamicina no logró restaurar los niveles de N-cadherina disminuidos por el silenciamiento de ROR1 (**Figura 58B**).

Los efectos adicionales de ROR1 (independientes de Akt) podrían estar vinculados con su capacidad de translocar al núcleo y actuar como factor de transcripción (Tseng et al. 2011), aunque aún este hecho no ha sido investigado en profundidad.

5. ROR1 Y WNT5A

Resulta interesante discutir acerca de la conexión entre ROR1 y su ligando Wnt5a, ya que a este último se le han atribuido roles tanto oncogénicos como de supresor tumoral.

Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión de ROR1 tiene efectos similares a la estimulación con Wnt5a en las células de melanoma, regulando la fosforilación de Dvl-2, la activación de Akt/FoxO y la expresión de N-cadherina (**Figuras 28, 35 y 59**, respectivamente). Esto podría sugerir, en principio, que las señales de Wnt5a en melanoma podrían estar mediadas por ROR1. Sin embargo, antes de realizar esta conexión, cabe mencionar que se han descrito efectos contrapuestos de ROR1 y Wnt5a en cáncer de mama. Por un lado, ROR1 promueve el crecimiento celular, la TEM y la formación de metástasis (Zhang et al. 2012a; Cui et al. 2013); mientras que por el otro, Wnt5a actúa como supresor tumoral (Bafico et al. 2001; Jonsson et al. 2002; Serra et al. 2011; Endo et al. 2015). Este hecho nos obliga a ser extremadamente cautos al momento de asociar los efectos de ROR1 a la acción de Wnt5a.

En este contexto, es importante recordar que Wnt5a puede interaccionar con varios receptores, incluyendo ROR1, ROR2, Ryk, Fzd2 y Fzd7, entre otros (Sato et al. 2010; O'Connell et al. 2013; Anastas et al. 2014), lo cual resulta crítico para la regulación de los diversos procesos celulares desencadenados río debajo de la interacción Wnt5a-Receptor. Esta diversidad indica que las señalizaciones a través de ROR1 y Wnt5a no resultan equivalentes, ya que depende del contexto celular y de la presencia de receptores en la célula.

En el caso particular de melanoma, tanto nuestros resultados como el hecho que ROR1 se encuentra fosforilado constitutivamente (Hojjat-Farsangi et al. 2013a), apoyan la noción de que la expresión de ROR1 *per se* contribuye a la progresión de melanoma, potenciada seguramente por los efectos autócrinos y parácrinos de Wnt5a sobre la señalización de ROR1. Esta posibilidad se encuentra reforzada por la existencia de un circuito de retroalimentación positivo a nivel génico entre ROR1 y Wnt5a (**Figuras 36 y 37**). Resulta interesante que dicha regulación ocurre aun cuando los niveles de ambos genes en las células de melanoma no correlacionan entre sí (**Figuras 12 y 14**). Probablemente esto se deba a que los mayores

reguladores transcripcionales de Wnt5a son las vías de NF- κ B, Hedgehog, TGF β y Notch (Katoh 2009).

Interesantemente, el análisis de la región promotora del gen que codifica para ROR1, reveló la presencia de elementos específicos de activación por STAT3 y el silenciamiento por ARNi de STAT3 generó una disminución en los niveles de ROR1 (Li et al. 2010). La activación constitutiva de STAT3 en melanoma sugiere un posible rol de este factor de transcripción en la regulación de ROR1. Además, en células B de LLC, la expresión de Wnt5a es inducida por STAT3, el cual a su vez induce la expresión de ROR1 y Wnt5a (Katoh 2007). De esta manera se postula una vía autócrina de interacción entre STAT3-Wnt5a-ROR1.

6. ROR1 Y SU POTENCIAL COMO BLANCO TERAPÉUTICO

Uno de los desafíos actuales en melanoma es identificar nuevos blancos para el desarrollo de terapias combinadas. ROR1 es un receptor tirosina quinasa que se expresa en varios tipos de cáncer y no en los tejidos adultos normales y posee un rol pro-tumorigénico, posicionándolo como un potencial blanco terapéutico.

En los últimos años, se han desarrollado varias herramientas para neutralizar los efectos de ROR1, entre las cuales se incluyen pequeñas moléculas inhibitorias (Mellstedt et al. 2012; Mellstedt et al. 2014), células T que expresan un receptor quimérico (Hudecek et al. 2010; Hudecek et al. 2013) y Ac-m (Baskar et al. 2008; Yang et al. 2011; Daneshmanesh et al. 2013).

En particular, el uso de Ac-m resulta una herramienta útil para inhibir la acción de ROR1, ya que se expresa específicamente en la membrana celular y su bloqueo por anticuerpos induce apoptosis en las células de LLC y de melanoma (Daneshmanesh et al. 2012; Hojjat-Farsangi et al. 2013a).

Actualmente, se encuentra en fase I un ensayo clínico para pacientes con LLC que utiliza un Ac-m humanizado contra ROR1, denominado UC-961 o cirmtuzumab y desarrollado por el laboratorio del Dr. Kipps (ID: NCT02222688). En ensayos pre-clínicos, el UC-961 mostró actividad biológica sólo contra las células tumorales que expresan ROR1 y ausencia de efectos de toxicidad (Choi et al. 2015).

Si bien algunas de las conclusiones de este trabajo restan ser confirmadas en experimentos *in vivo*, el conjunto de resultados obtenidos indican que ROR1 podría constituir un nuevo e interesante blanco para el desarrollo de terapias contra melanoma.

ANEXOS



I ESTADIFICACIÓN TNM PARA EL MELANOMA CUTÁNEO

I.1. CATEGORÍAS DE ESTADIFICACIÓN TNM PARA EL MELANOMA CUTÁNEO

CLASIFICACION	ESPESOR (MM)	N PAC.	ULCERACION / MITOSIS
Tis	no se aplica		no se aplica
T1	≤ 1 mm	11.841	a. sin ulceración y mitosis < 1/mm ² b. con ulceración o mitosis ≥ 1/mm ²
T2	1.01 a 2.00 mm	8.046	a. sin ulceración b. con ulceración
T3	2.01 a 4.00 mm	5.291	a. sin ulceración b. con ulceración
T4	> 4.00 mm	2.461	a. sin ulceración b. con ulceración
N	NRO. DE GANGLIOS REGIONALES METÁSTASICOS n = 3.307		CARGA TUMORAL
N0	0		no se aplica
N1	1		a. micrometástasis ¹ b. macrometástasis ²
N2	2 – 3		a. micrometástasis ¹ b. macrometástasis ² c. metástasis en tránsito / satelitosis sin ganglios metastásicos
N3	4+ ganglios metastásicos, o múltiples ganglios adheridos, o metástasis en tránsito /satelitosis con ganglios metastásicos		
M	SITIO DE METÁSTASIS	N = 7.972	LDH SÉRICA ³
M0	Sin metástasis a distancia		no se aplica
M1a	Piel a distancia; tejido subcutáneo; ganglios a distancia		normal
M1b	Metástasis pulmonares		normal
M1c	Todas las otras metástasis viscerales		normal
	Cualquier metástasis a distancia		elevado
1. Las micrometástasis se diagnostican con biopsia del ganglio centinela. 2. Las macrometástasis se definen como ganglios metastáticos clinicamente detectables y confirmados por histopatología. 3. Lactodehidrogenasa sérica. n = Número de pacientes analizados en cada grupo de estadificación.			

I.2. ESTADIFICACIÓN ANATÓMICA POR GRUPOS DEL MELANOMA CUTÁNEO

Estadio	Estadificación clínica ¹			Estadio	Estadificación anatomopatológica ²		
	T	N	M		T	N	M
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	cualquier T	N > N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
				IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
					cualquier T	N3	M0
IV	cualquier T	cualquier N	M1	IV	cualquier T	cualquier N	M1

1. Estadificación clínica: incluye la microestadificación del melanoma primario y la evaluación clínica / radiológica de metástasis. Por convención, se debe utilizar luego de la extirpación del melanoma primario, con evaluación clínica para metástasis regionales o a distancia.

2. Estadificación patológica: incluye la microestadificación del melanoma primario e información histopatológica sobre los ganglios linfáticos regionales luego de una linfadenectomía parcial (ganglio centinela) o total (linfadenectomía). Los pacientes con Estadificación Patológica Estadio 0 ó IA constituyen una excepción: NO requieren evaluación histopatológica de su ganglios linfáticos

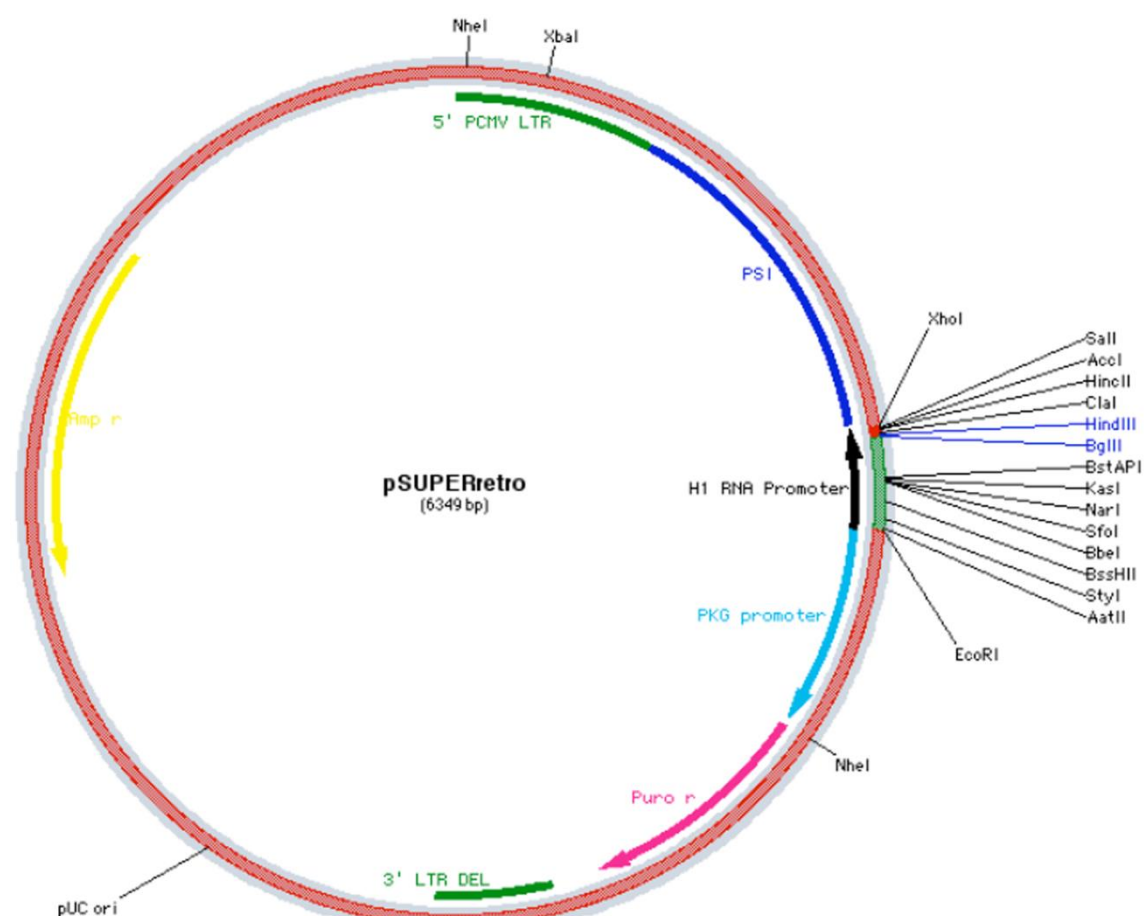
II PLÁSMIDOS

II.1. SISTEMA DE ARN DE INTERFERENCIA pSUPER RETROVIRAL

II.1.1. Vector pSUPER.retro.puro

Este vector fue utilizado para clonar las secuencias de shARN de ROR1 y la secuencia scramble con el fin de silenciar la expresión génica de manera estable. El clonado se realizó en las enzimas HindII y BgIII.

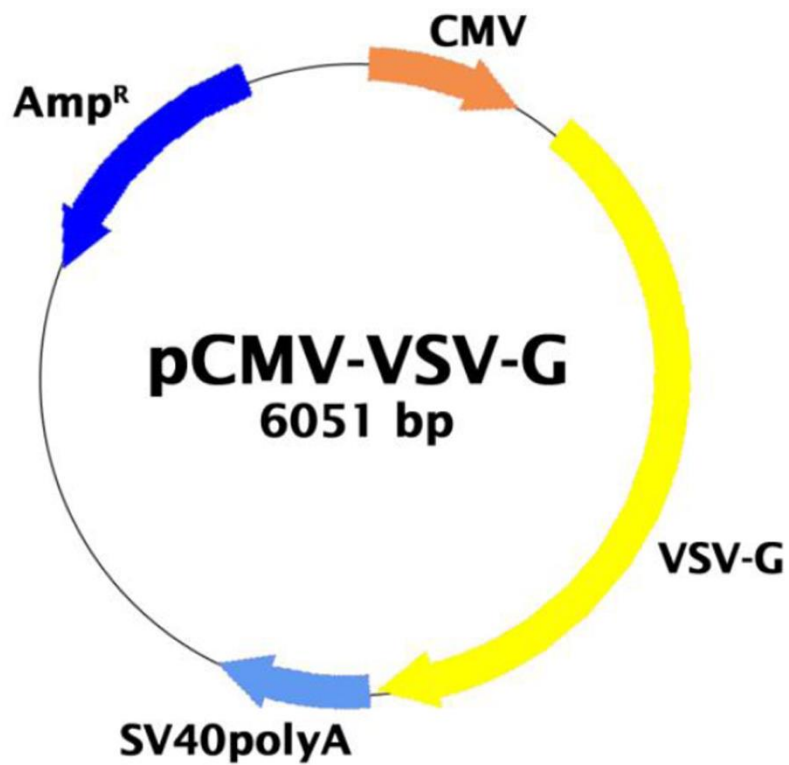
Las secuencias LTR permiten la inserción tanto de la secuencia clonada como del gen de resistencia a ampicilina, de manera de poder realizar la selección en células eucariotas.



II.1.2. Plásmido VSV

Este plásmido expresa la glicoproteína G de virus de estomatitis vesicular (VSV-G, del inglés *Vesicular Stomatitis Virus*). Esta proteína interactúa con los componentes de los fosfolípidos de la membrana de las células blanco y favorece la fusión del virus a la membrana celular.

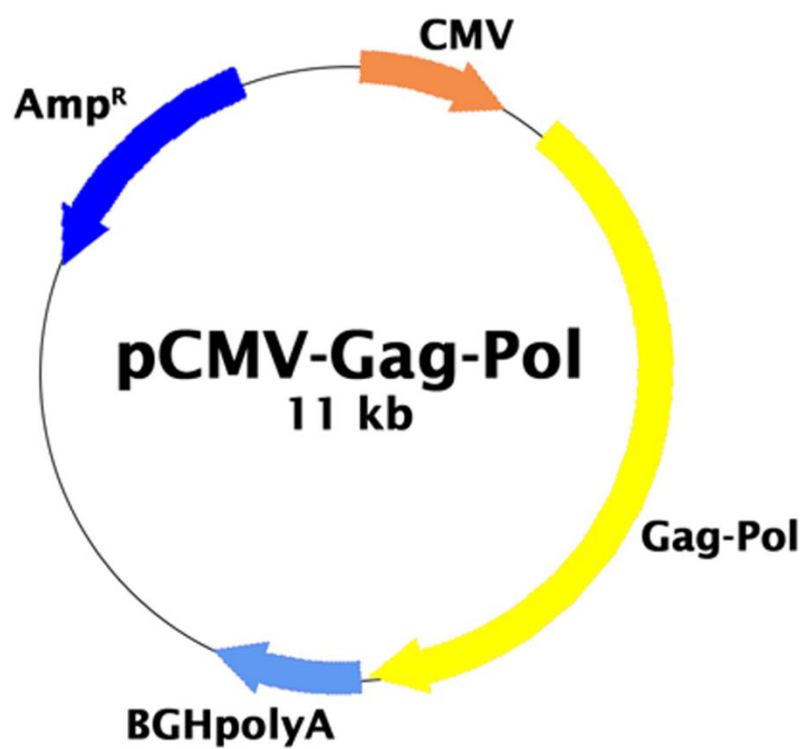
La expresión de VSV se encuentra bajo el control del promotor CMV.



II.1.3. Plásmido GAG

Este plásmido expresa las proteínas de la estructura retroviral. La región GAG codifica para los genes que conforman la cápside del virus y la región POL para la transcriptasa reversa y la proteína integrasa.

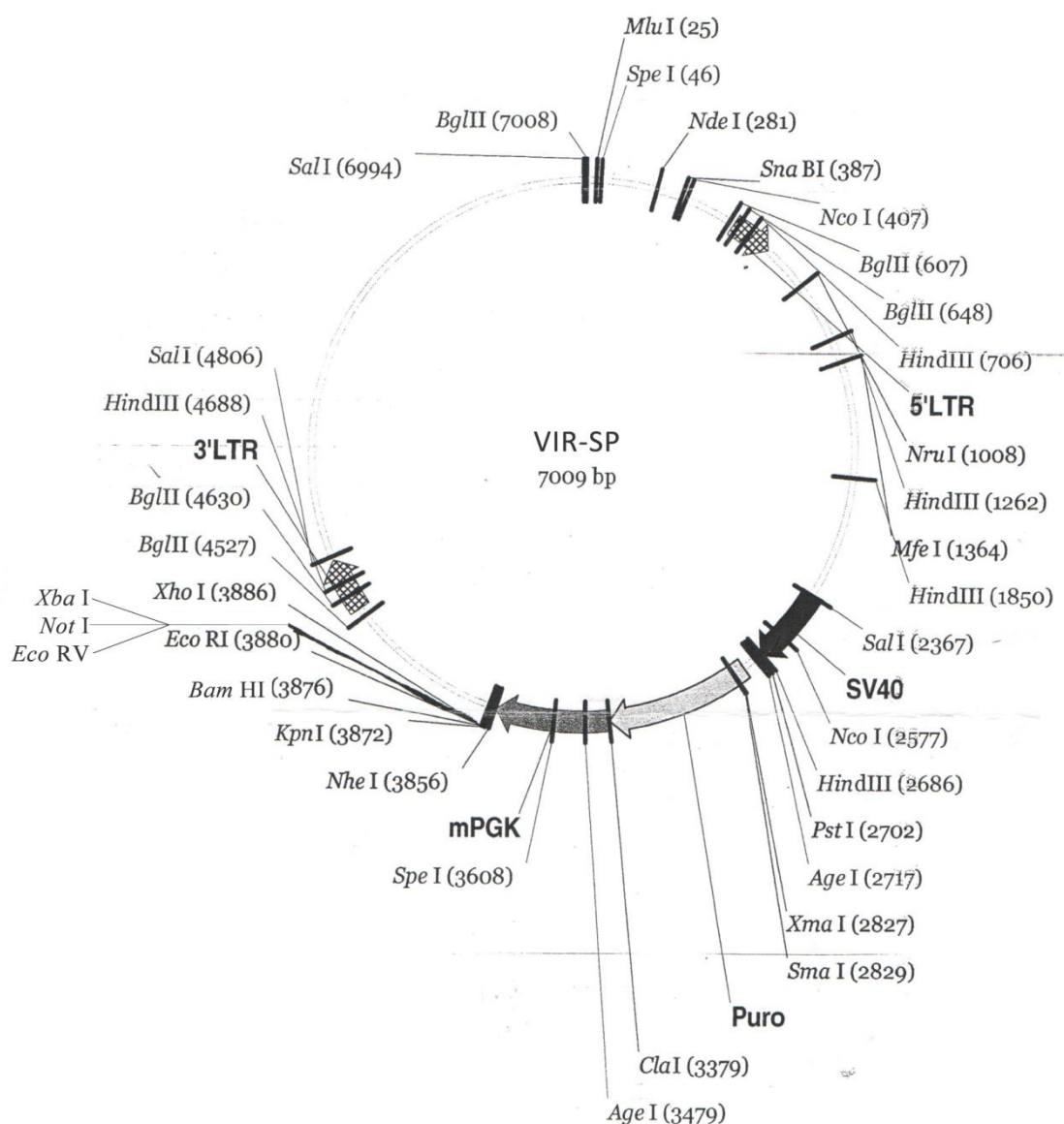
Amabas secuencias GAG y POL se encuentran bajo el control del promotor del CMV.



II.2. SISTEMA DE SOBREEXPRESIÓN LENTIVIRAL

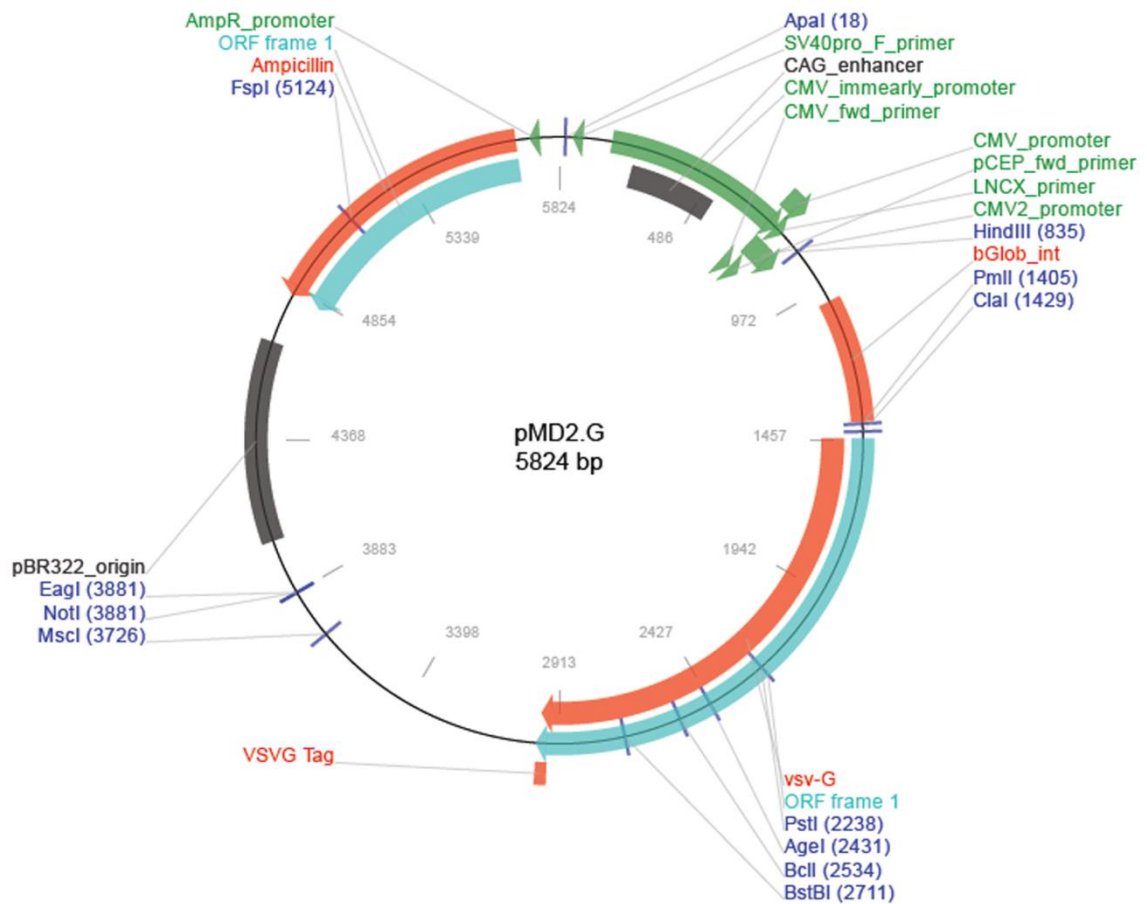
II.2.1. Vector VIR-SP

Este plásmido lentiviral que se generó a partir del VIRHD-EP. Para el clonado de la secuencia del ADNc de ROR1 se utilizó el sitio *NheI* (destruido tras la inserción) y *XhoI*.



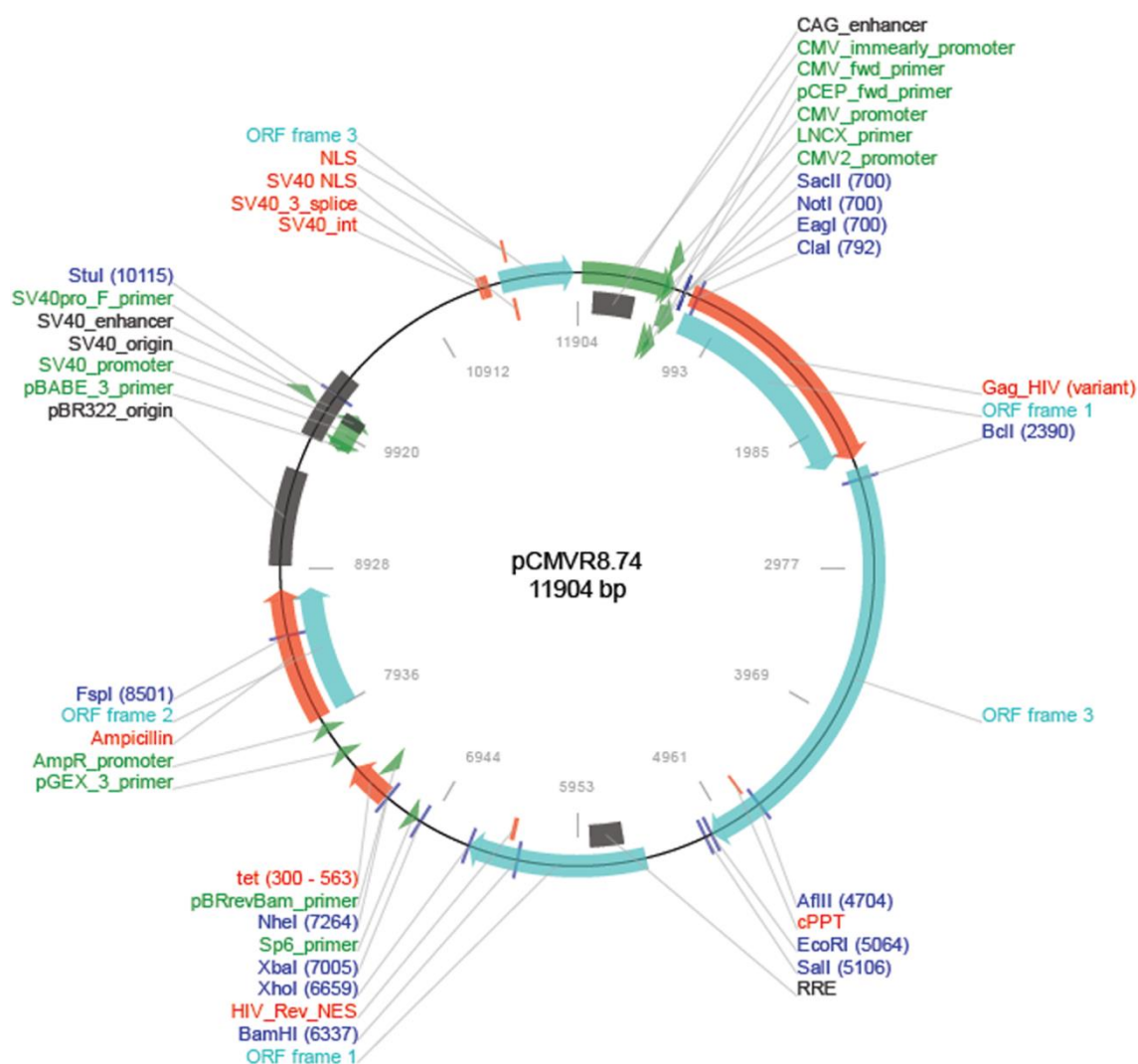
II.2.2. Plásmido ENV (VSV-G)

Al igual que para el sistema de retrovirus, este sistema también cuenta con un plásmido que expresa la proteína VSV-G bajo el control del promotor CMV.



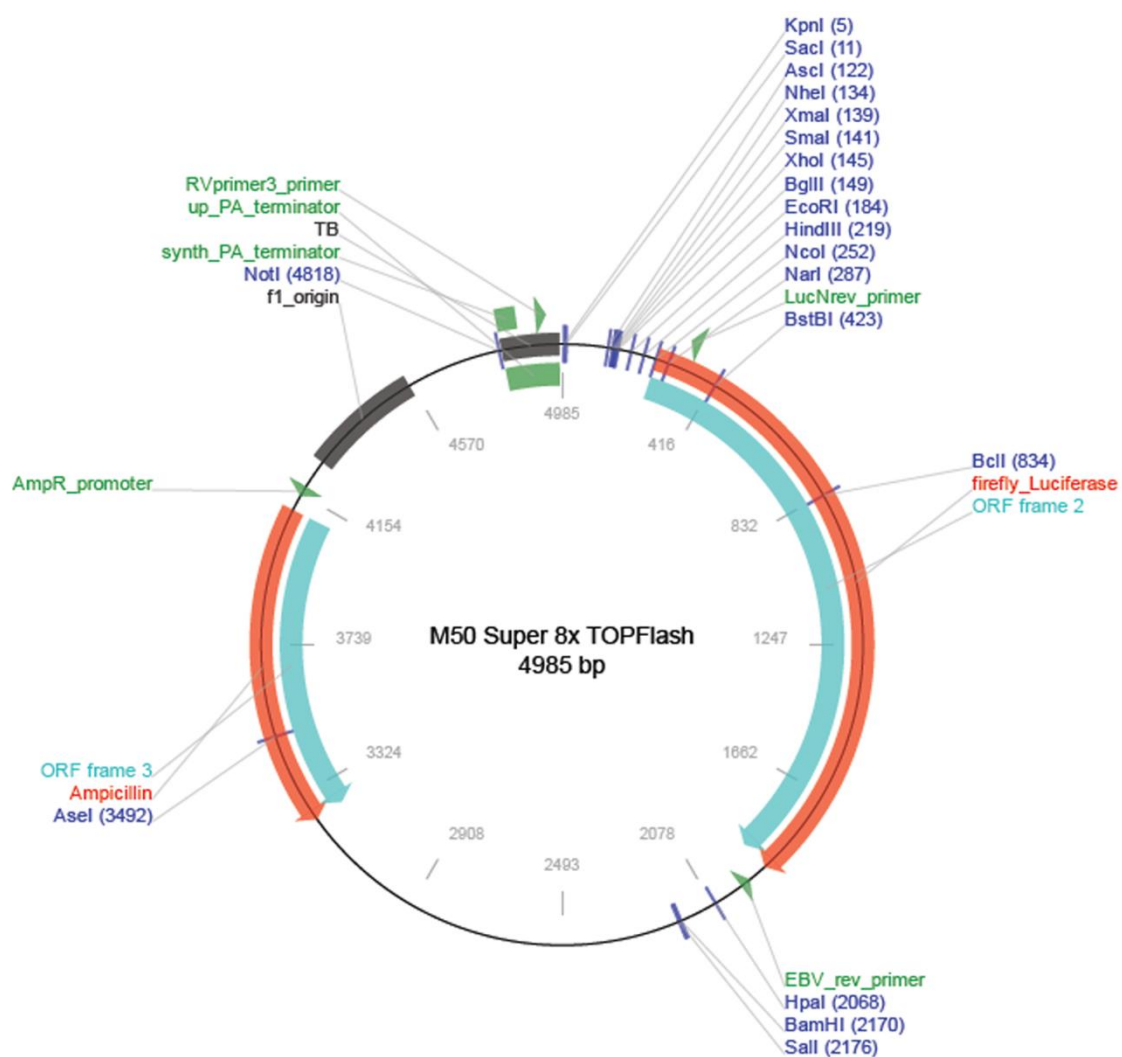
II.2.3. Plásmido PACK (GAG)

Esta es la 2da generación de los plásmidos de empaquetamiento lentivirales generados a partir del virus del HIV. Posee varios genes auxiliares del virus deletionados para facilitar la eficiencia y manipulación del plásmido. Codifica para las proteínas del empaquetamiento, la transcriptasa reversa y la integrasa.



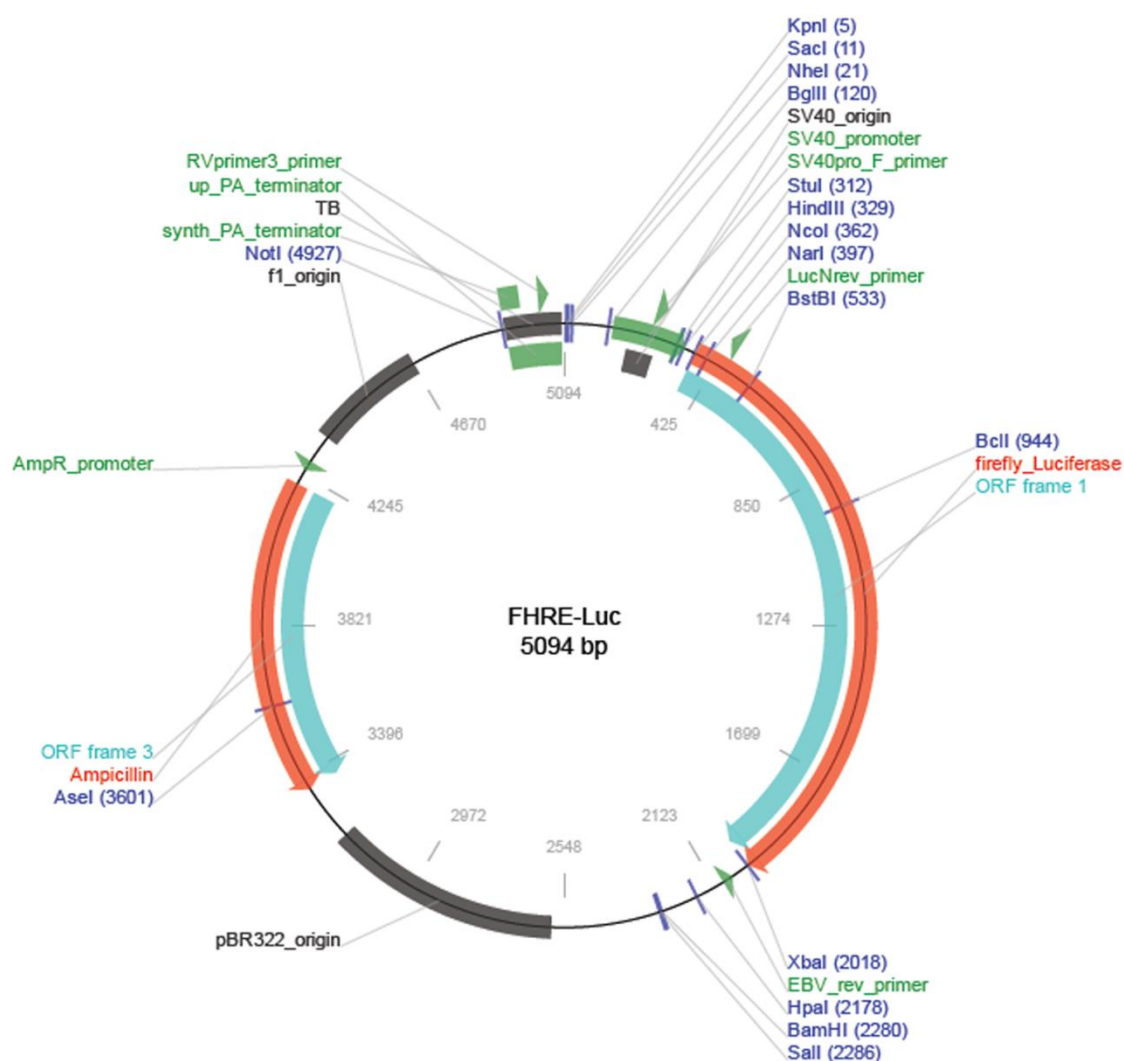
II.3. PLÁSMIDO “TOP FLASH”

Este plásmido posee los sitios de unión TCF/LEF reconocidos por β -catenina, clonados en la secuencia de la enzima de restricción MluI (no se indica en el mapa del sitio de múltiple clonado porque se desconoce si fue destruido luego de la inserción) con un tamaño de 120 pares de bases.



II.4. PLÁSMIDO “FHRE”

Este plásmido posee 3 copias de la secuencia respondedora a FoxO3A (FRE, del inglés *Forkhead Responsive Element*) entre las secuencias de las enzimas de restricción NheI y BglII con un tamaño de 96 pares de bases.



III OLIGONUCLEÓTIDOS

III.1. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR

Nombre	Orientación	Secuencia	Temperatura de Hibridación	Tamaño del Amplicon
Akt1	Sentido	GCACAAACGAGGGGAGTACAT	58	113
	Antisentido	CCTCACGTTGGTCCACATC		
Akt2	Sentido	AGCAGGACATGCAGGAGG	58	122
	Antisentido	AACACAAGGAAAGGGAACCA		
Akt3	Sentido	TTGAGGGGATAAGGTAAATCCA	58	129
	Antisentido	AGGTTGGGTTCAGAAGAGGG		
Bcl-2	Sentido	GTGTGGAGAGCGTCAACC	55	182
	Antisentido	CTCAGAGACAGCCAGGAG		
N-Cadherina	Sentido	GGACCGAGAATCACCAAATGT	55	101
	Antisentido	TCTGCAGCGTTCTCTGTCCA		
pRS	Sentido	CCCTCACTCCTTCTCTAGGCG	55	420 - 480
	Antisentido	AAGCGCATGCTCCAGACTGCC		
RNPII	Sentido	GCTGTGTCTGCTTCTTCTG	55	171
	Antisentido	CGAACTTGTTGTCCATCTCC		
ROR1	Sentido	AGCGTGCGATTCAAAGGATT	58	151
	Antisentido	GACTGGTGCCGACGATGACT		
Vimentina	Sentido	CCCTCACCTGTGAAGTGGAT	55	241
	Antisentido	TCCAGCAGCTTCTGTAGGT		
Wnt5a	Sentido	ATTCTTGGTGGTCGCTAGG	55	107
	Antisentido	CTGTCCTTGAGAAAGTCCTG		

III.2. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA SILENCIAR ROR1

Nombre	Orientación	Secuencia
Scramble	Sentido	GATCCCC GAAACTGCTGACCGTTA ATTTCAAGAGAATTAACGGTCAGCAG TTTCTTTT GGAAA
	Antisentido	GATCCCC GAAACTGCTGACCGTTA ATTTCAAGAGAATTAACGGTCAGCAG TTTCTTTT GGAAA
shROR1A	Sentido	GATCCCC AGTGTTCTCAGTTCGCCATT CAAGAGAATGGCGAACTGAGAA CACTTTTT GGAAA
	Antisentido	AGCTTTTCCAAAA AAGTGTTCAGTTCGCCATT CTCTTGAAATGGCGAAC TGAGAACACT GGG
shROR1B	Sentido	GATCCCC GCAAGCATCTT ACTAGGATTCAAGAGATCCTAGTAAAGATGC TTGCTTTT GGAAA
	Antisentido	AGCTTTTCCAAAA GCAAGCATCTT ACTAGGATCTCTTGAATCCTAGTAA AGATGCTTG CGGG
shROR1C	Sentido	GATCCCC GGGATTGCATGTGCAAGATT CAAGAGAATCTTGACATGCAA TCCCTTTT GGAAA
	Antisentido	AGCTTTTCCAAAA GGGATTGCATGTGCAAGATT CTCTTGAAATCTTGACAC ATGCAATCCC GGG

IV ANTICUERPOS

IV.1. ANTICUERPOS PRIMARIOS

Nombre	Catálogo	PM (kDa)	Dilución	Especie - Dilución	% Gel Separador
AKT1	cs-2967	60	1/2000	Ratón - 1/3000	10
pAKT1/2/3 (S473)	sc-7985R	62/56/62	1/1000	Conejo - 1/3000	10
Bax	sc-7480	23	1/1000	Ratón - 1/3000	15
Bcl-2	sc-2876	28	1/1000	Conejo - 1/2000	15
Ciclina D1	sc-246	37	1/1000	Ratón - 1/3000	10
Dvl-2	sc-13974	92	1/1000	Conejo - 1/3000	8
E-cadherina	BD 610181	120	1/1000	Ratón - 1/3000	8
GAPDH	sc-25778	37	1/3000	Conejo - 1/5000	10-12-15
N-cadherina	sc-7939	130	1/1000	Conejo - 1/3000	8
RhoA/C	sc-418	24	1/1000	Ratón - 1/3000	15
ROR1	CS-4102	135	1/1000	Conejo - 1/2000	8
ROR1	R&D AF2000	135	1/800	Cabra - 1/2000	8
STAT3	sc-482	91	1/2000	Conejo - 1/3000	8
pSTAT3	sc-8059	91	1/1000	Ratón - 1/3000	8
Tubulina	SigmaT9026	50	1/5000	Ratón - 1/5000	8-10-12
Vimentina	AMF-17b	54	1/3000	Ratón - 1/3000	10
Wnt5a	cs-2530	45	1/1000	Conejo - 1/2000	12

IV.2. ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Nombre	Catálogo
Ratón	GE NA931V
Conejo	GE NA934
Cabra	sc-2020

V RECETAS DE SOLUCIONES

Bradford: 0.01% p/v Coomassie blue G-250; 5% v/v Etanol y 8,5% v/v ácido fosfórico.

Buffer de Corrida: 25 mM Tris-HCl pH=8.8, 192 mM Glicina y 0.1% p/v SDS.

Buffer de Hibridación: 100 mM NaCl y 50 mM HEPES pH=7.4.

Buffer de Lisis de Proteínas: 25 mM Tris-HCl pH=7.5, 150 mM NaCl, 0.5% v/v NP-40, 1% p/v, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 10% v/v glicerol. Suplementado con inhibidores de proteasas (Cóctel Inhibidor de Proteasas: 10 µg/ml Leupeptina, 5 µg/ml Pepstatina A, 5 µg/ml Aprotinina) e inhibidores de fosfatasas (1 mM Fluor fenilmetilsulfonil, 50 mM β-glicerfosfato, 10 mM PNPP, 10 mM Fluoruro de sodio y 1 mM Ortovanadato de sodio).

Buffer de Siembra: 50 mM Tris-HCl pH=6.8, 2% p/v SDS, 10% v/v glicerol, 0.01% p/v azul de bromofenol y 2% v/v β-mercaptoetanol.

Buffer de Siembra (6X para geles agarosa): 10 mM Tris pH=7.6, 60 mM EDTA, 0.03% azul de bromofenol, 0.03% xileno cianol y 60% v/v glicerol.

Buffer de Transferencia: 25 mM Tris-HCl pH=8.8, 192 mM Glicina y 20% v/v Metanol.

Buffer de Unión de Anexina: 0,1 M HEPES pH=7.4, 1.4 M NaCl y 25 mM CaCl₂.

Buffer STE: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA y 150 mM NaCl.

Gel Concentrador: 3.9% Acrilamida:Bisacrilamida (29:1), 250 mM Tris-HCl pH=6.8, 0.1 % p/v SDS, 0.2% p/v persulfato de amonio y 0.075% v/v TEMED.

Gel Separador: 8-15% Acrilamida:Bisacrilamida (29:1), 375 mM Tris-HCl pH=8.8, 0.2 % p/v SDS, 0.2% p/v persulfato de amonio y 0.075% v/v TEMED.

HBS (2X): 50 Mm HEPES, 10 mM KCl, 12 mM Glucosa, 1.5 mM Na₂HPO₄ y 280 mM NaCl pH=7.05.

LB: 10 g/l NaCl, 5 g/l extracto de levadura y 10 g/l tripteína bacteriológica.

LB-agar: LB y 1.5% p/v ágar.

P1 (Buffer de resuspensión): 50 mM Tris-Cl pH=8, 10 mM EDTA y 100 µg/ml RNAasa A.

P2 (Buffer de lisis): 200 mM NaOH y 1% p/v SDS.

P3 (Buffer de neutralización): 3 M acetato de potasio pH=5.5.

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM, Na₂HPO₄ y 2 mM KH₂PO₄ pH=7.2.

PBS-T: PBS y 0.05% v/v Tween.

QBT (Buffer para equilibrar): 1 M NaCl, 50 mM MOPS pH=7.0 y 15% v/v isopropanol.

QC (Buffer de lavado): 1 M NaCl, 50 mM MOPS pH=7.0 y 15% v/v isopropanol.

QF (Buffer de lavado): 1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH=8.5 y 15% v/v isopropanol.

Solución de Bloqueo: PBS-T y 5% p/v leche en polvo descremada (Molico).

Solución de Ensayo de Luciferasa: 25 mM Glicilglicina pH=7.8, 5 mM ATP, 10 mM MgSO₄ y 330 nM Luciferina.

Solución de Lisozima: 10 mg/ml en agua. Se prepara en el momento.

Solución de Revelado I: 0.1 M Tris pH=8.4, 2.5 mM luminol y 0.36 mM ácido p-cumárico.

Solución de Revelado II: 0.1 M Tris pH=8.4 y 0.25% v/v H₂O₂ 30 vol.

Solución de Rojo Ponceau: 0.2% p/v Rojo Ponceau S y 0.5% v/v Ácido Acético.

TAE: 0.8 mM Tris, 0.02 mM EDTA y 0.11% v/v Ácido Acético Glacial pH=8.4.

TB: 10 mM Pipes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂·2H₂O, 250 mM KCl pH=6.7.

VI DATOS DE EXPRESIÓN Y SOBREVIDA DE LOS PACIENTES

VI.1. DATOS CORRESPONDIENTES AL NÚMERO DE ACCESO GSE46517

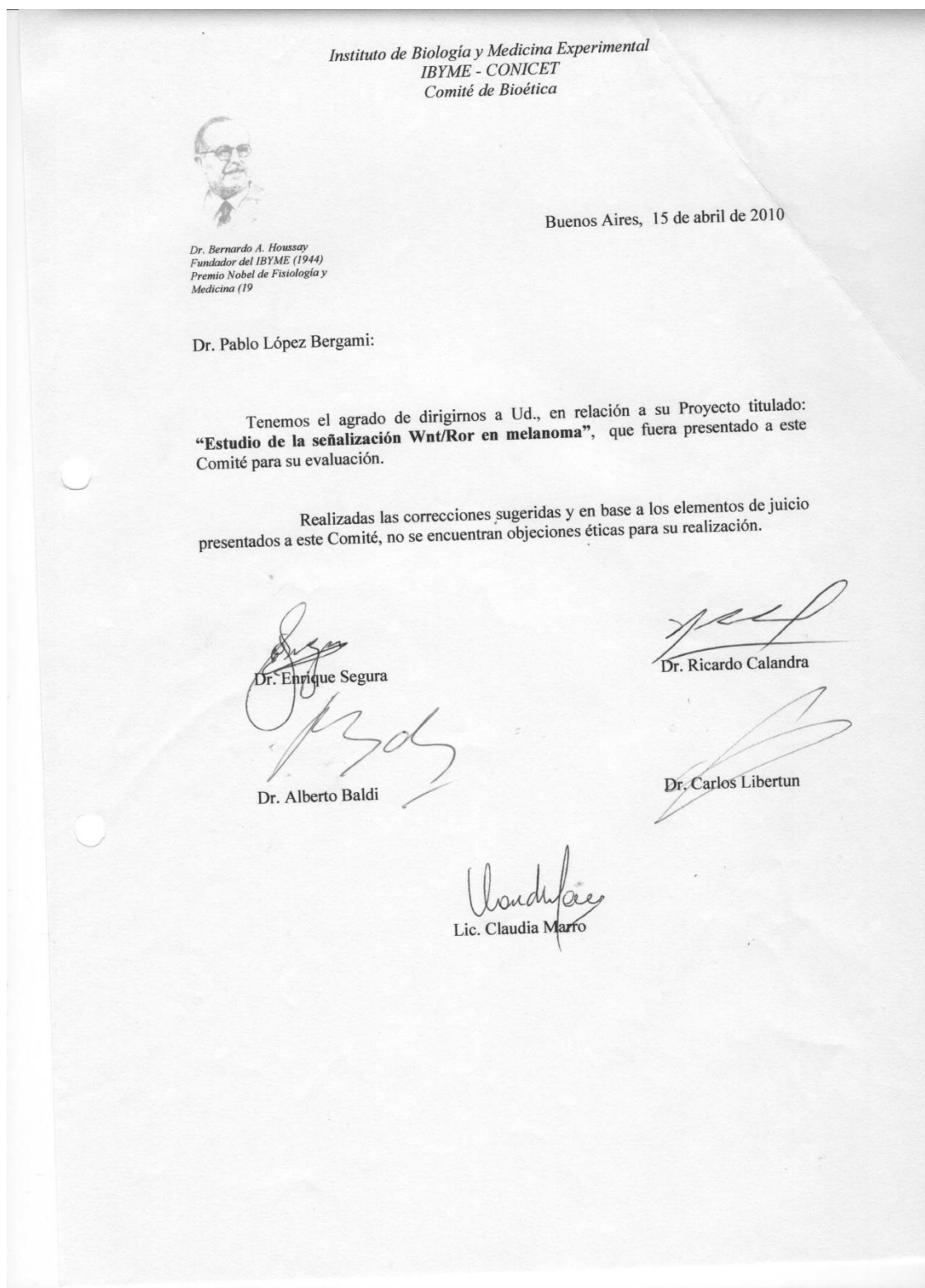
ID	Expresión relativa ROR1	Expresión relativa ROR2	Expresión relativa Wnt5a	Tiempo libre de metástasis (meses)	Tiempo post- recurrencia (meses)	Muerte
13	10,95	31,04	53,20	34	17	Sí
17	13,02	12,28	77,45	51	24	Sí
23	13,04	12,94	60,89	58	17	No
32	13,21	12,90	95,43	75	16	No
32	14,48	25,10	28,32	75	21	No
36	14,69	10,23	54,33	49	10	Sí
10	15,84	16,14	44,88	53	-	Sí
13	17,15	18,30	47,58	51	17	Sí
35	17,42	20,47	65,75	83	5	No
4	17,71	33,32	69,70	48	-	Sí
33	18,47	6,87	50,92	60	27	No
38	18,60	12,67	72,34	49	19	Sí
39	18,73	22,68	22,88	49	41	Sí
18	19,06	10,51	60,77	69	15	Sí
16	19,88	17,62	94,80	97	-	No
31	21,13	20,10	47,79	88	-	No
23	21,36	22,73	69,33	63	12	No
17	21,83	34,15	35,19	51	24	Sí
22	22,34	22,72	74,63	48	15	Sí
35	23,61	26,33	52,54	83	5	No
34	23,96	17,96	88,10	65	10	No
24	24,62	14,95	43,72	72	12	No
19	24,78	22,99	39,88	82	-	No
6	25,39	16,59	40,14	52	2	Sí
5	25,99	31,48	89,25	50	21	Sí
26	26,65	19,75	78,79	47	10	Sí
6	27,01	18,09	56,68	52	2	Sí
29	27,22	21,51	129,15	49	3	Sí
40	27,82	17,31	101,14	49	4	Sí
27	27,93	10,78	147,79	74	18	Sí
18	29,01	15,71	60,58	59	15	Sí
9	29,34	19,32	63,90	57	9	Sí
29	30,71	14,29	61,55	49	3	Sí
13	31,85	35,81	41,66	48	17	Sí
15	32,48	34,02	49,41	66	23	Sí
2	32,54	25,88	53,02	52	23	Sí
11	36,45	32,31	28,30	48	1	Sí
18	39,94	47,21	261,52	59	15	Sí
28	41,58	23,34	73,91	53	3	Sí

VI.2. DATOS CORRESPONDIENTES AL NÚMERO DE ACCESO GSE19234



ID	Estadio	Expresión relativa ROR1	Expresión relativa ROR2	Tiempo post- recurrencia (días)	Muerte
12	IIIC	13,11	18,50	1009	No
17	IIIB	13,41	4,07	1048	No
10	IIIB	14,19	12,93	1073	Sí
8	IIIC	15,09	6,40	1143	No
13	IIIB	15,37	2,87	998	No
6	IIIB	18,37	17,95	237	Sí
38	IIIA	18,97	62,01	617	No
22D	IIIB	20,12	6,08	540	Sí
37	IV	22,70	46,67	552	Sí
18	IIIB	24,11	2,73	725	Sí
9	IIIA	24,34	7,49	944	No
2	IIIC	25,95	10,29	1015	No
3	IIIB	26,51	1,99	115	No
22	IIIB	27,50	1,85	887	Sí
5	IIIC	29,51	11,65	780	Sí
21B	IIIB	29,91	16,57	397	Sí
21	IIIB	30,27	20,71	397	Sí
26	IIID	33,99	36,08	259	Sí
39	IIIB	34,62	67,05	609	No
25	IIIC	36,27	3,38	668	Sí
14	IIIB	36,66	67,09	901	No
24	IIIB	38,33	8,12	383	Sí
16	IIIB	41,60	30,72	961	No
31	IIIA	44,72	2,23	645	No
34	IIIC	45,26	29,09	144	Sí
29	IIIA	51,40	9,28	720	No
01B	IIIB	51,50	30,91	610	No
28	IIIC	55,46	10,06	791	No
45	IIIC	57,70	2,54	558	No
33	IIIB	58,35	90,19	513	No
22B	IIIB	61,90	6,32	805	Sí
27	IIIB	65,00	6,22	282	No
25B	IIIC	67,77	8,43	668	Sí
1	IIIC	69,23	86,50	690	No
19	IIIB	81,97	45,91	406	Sí
44	IIIB	88,70	12,45	792	No
46	IIIC	91,09	17,12	440	Sí
7	IV	96,16	6,67	590	Sí
32	IIIB	96,81	46,49	440	Sí
07B	IIIB	111,08	3,11	285	Sí
36	IIIB	113,27	104,27	653	Sí
4	IV	116,48	71,17	92	Sí
43	IIIB	120,75	14,69	234	Sí
11	IV	123,94	23,55	68	Sí

VII COMITÉ DE ÉTICA

VII.1. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DEL IBYME



VII.2. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DEL INSTITUTO ÁNGEL ROFFO

Universidad de Buenos Aires – Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"

Buenos Aires, 15 de abril de 2010

De nuestra mayor consideración:

Nos dirigimos a Ud. con el fin de poner en su conocimiento que el Comité de Ética del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo" en su reunión del día de la fecha ha recibido la documentación que a continuación se detalla: WnT "Estudio del Rol de la vía de señalización Wnt no canónico en el desarrollo de Melanoma". DR. PABLO LOPEZ BERGAMI - DR. CHAPELA.


Habiendo evaluado y analizado los documentos, este Comité resuelve aprobarlos al no encontrar conflictos que impidan su realización. Esta decisión está basada en la Declaración de Helsinki y en las Buenas Prácticas Clínicas.

El Investigador Principal deberá cumplir con las siguientes obligaciones:

1. Informará al Comité cualquier modificación al Protocolo original (cambiando) o cambios realizados en el Consentimiento Informado.
2. Deberá conducir el estudio de acuerdo a las recomendaciones establecidas en: Declaración de Helsinki, preceptos de las Buenas Prácticas Clínicas, recomendaciones de la ICH y ANMAT.
3. Comunicará en los lapsos correspondientes de cualquier evento serio que suceda durante el estudio y/o nueva información sobre el fármaco en estudio que pueda afectar el curso del mismo.

Nómina de miembros del comité de Ética; Nómina de miembros del Comité de Ética: Dra. Berta Roth, Director; Lic. Mirta Di Preto, coordinadora; Dr. Ricardo Kirzhuk, vocal; Prof. Laura Carugati, vocal; Lic. Elsa Gomez, vocal; Pbto. Luis María Landa, vocal; Dr. Omar Luna, vocal; Sra. Nilda Scoppa, vocal; Sra. Gladys Renard, vocal.

Sin otro particular, saludo a Ud. muy atentamente.


 Dr. Omar Luna
 Vocal

Av. San Martín 5481 – CP (1417) – Ciudad Autónoma de Buenos Aires
 Tel.: 4580-2800/9 Fax: 4580-2811
 www.institutoroffo.org

REFERENCIAS



- Abel, EV, Basile, KJ, Kugel, CH, 3rd, Witkiewicz, AK, Le, K, Amaravadi, RK, Karakousis, GC, Xu, X, Xu, W, Schuchter, LM, Lee, JB, Ertel, A, Fortina, P and Aplin, AE (2013). "Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3." J Clin Invest **123**(5): 2155-68.
- Aberle, H, Bauer, A, Stappert, J, Kispert, A and Kemler, R (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." EMBO J **16**(13): 3797-804.
- ACS (2015). "American Cancer Society. Cancer Facts & Figures."
- Afzal, AR, Rajab, A, Fenske, CD, Oldridge, M, Elanko, N, Ternes-Pereira, E, Tuysuz, B, Murday, VA, Patton, MA, Wilkie, AO and Jeffery, S (2000). "Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2." Nat Genet **25**(4): 419-22.
- Aguissa-Toure, AH and Li, G (2012). "Genetic alterations of PTEN in human melanoma." Cell Mol Life Sci **69**(9): 1475-91.
- Al-Shawi, R, Ashton, SV, Underwood, C and Simons, JP (2001). "Expression of the Ror1 and Ror2 receptor tyrosine kinase genes during mouse development." Dev Genes Evol **211**(4): 161-71.
- Albino, AP, Nanus, DM, Mentle, IR, Cordon-Cardo, C, McNutt, NS, Bressler, J and Andreeff, M (1989). "Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype." Oncogene **4**(11): 1363-74.
- Alonso, SR, Tracey, L, Ortiz, P, Perez-Gomez, B, Palacios, J, Pollan, M, Linares, J, Serrano, S, Saez-Castillo, AI, Sanchez, L, Pajares, R, Sanchez-Aguilera, A, Artiga, MJ, Piris, MA and Rodriguez-Peralto, JL (2007). "A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis." Cancer Res **67**(7): 3450-60.
- Anastas, JN, Kulikavskas, RM, Tamir, T, Rizos, H, Long, GV, von Euw, EM, Yang, PT, Chen, HW, Haydu, L, Toroni, RA, Lucero, OM, Chien, AJ and Moon, RT (2014). "WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors." J Clin Invest **124**(7): 2877-90.
- ATCC "Cell Lines by Gene Mutation."
- Bafico, A, Liu, G, Yaniv, A, Gazit, A and Aaronson, SA (2001). "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow." Nat Cell Biol **3**(7): 683-6.
- Baker, NE (1987). "Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in Drosophila: the spatial distribution of a transcript in embryos." EMBO J **6**(6): 1765-73.
- Balch, CM (1992). "Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide." Semin Surg Oncol **8**(6): 400-14.
- Balch, CM, Gershenwald, JE, Soong, SJ, Thompson, JF, Atkins, MB, Byrd, DR, Buzaid, AC, Cochran, AJ, Coit, DG, Ding, S, Eggermont, AM, Flaherty, KT, Gimotty, PA, Kirkwood, JM, McMasters, KM, Mihm, MC, Jr., Morton, DL, Ross, MI, Sober, AJ and Sondak, VK (2009). "Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification." J Clin Oncol **27**(36): 6199-206.
- Barna, G, Mihalik, R, Timar, B, Tombol, J, Csende, Z, Sebestyen, A, Bodor, C, Csernus, B, Reiniger, L, Petak, I and Matolcsy, A (2011). "ROR1 expression is not a unique marker of CLL." Hematol Oncol **29**(1): 17-21.
- Baskar, S, Kwong, KY, Hofer, T, Levy, JM, Kennedy, MG, Lee, E, Staudt, LM, Wilson, WH, Wiestner, A and Rader, C (2008). "Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia." Clin Cancer Res **14**(2): 396-404.
- Baskar, S, Wiestner, A, Wilson, WH, Pastan, I and Rader, C (2012). "Targeting malignant B cells with an immunotoxin against ROR1." MAbs **4**(3): 349-61.
- Bauer, M, Benard, J, Gaasterland, T, Willert, K and Cappellen, D (2013). "WNT5A encodes two isoforms with distinct functions in cancers." PLoS One **8**(11): e80526.
- Bhanot, P, Brink, M, Samos, CH, Hsieh, JC, Wang, Y, Macke, JP, Andrew, D, Nathans, J and Nusse, R (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." Nature **382**(6588): 225-30.

- Bhatia, S, Tykodi, SS and Thompson, JA (2009). "Treatment of metastatic melanoma: an overview." *Oncology (Williston Park)* **23**(6): 488-96.
- Bicocca, VT, Chang, BH, Masouleh, BK, Muschen, M, Loriaux, MM, Druker, BJ and Tyner, JW (2012). "Crosstalk between ROR1 and the Pre-B cell receptor promotes survival of t(1;19) acute lymphoblastic leukemia." *Cancer Cell* **22**(5): 656-67.
- Bittner, M, Meltzer, P, Chen, Y, Jiang, Y, Seftor, E, Hendrix, M, Radmacher, M, Simon, R, Yakhini, Z, Ben-Dor, A, Sampa, N, Dougherty, E, Wang, E, Marincola, F, Gooden, C, Lueders, J, Glatfelter, A, Pollock, P, Carpten, J, Gillanders, E, Leja, D, Dietrich, K, Beaudry, C, Berens, M, Alberts, D and Sondak, V (2000). "Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling." *Nature* **406**(6795): 536-40.
- Blanc, E, Roux, GL, Benard, J and Raguenez, G (2005). "Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma." *Oncogene* **24**(7): 1277-83.
- Bogunovic, D, O'Neill, DW, Belitskaya-Levy, I, Vacic, V, Yu, YL, Adams, S, Darvishian, F, Berman, R, Shapiro, R, Pavlick, AC, Lonardi, S, Zavadil, J, Osman, I and Bhardwaj, N (2009). "Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(48): 20429-34.
- Bonitsis, N, Batistatou, A, Karantima, S and Charalabopoulos, K (2006). "The role of cadherin/catenin complex in malignant melanoma." *Exp Oncol* **28**(3): 187-93.
- Borcherding, N, Kusner, D, Liu, GH and Zhang, W (2014). "ROR1, an embryonic protein with an emerging role in cancer biology." *Protein Cell* **5**(7): 496-502.
- Boutros, M, Paricio, N, Strutt, DI and Mlodzik, M (1998). "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." *Cell* **94**(1): 109-18.
- Bradford, MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brenner, M and Hearing, VJ (2008). "The protective role of melanin against UV damage in human skin." *Photochem Photobiol* **84**(3): 539-49.
- Bryja, V, Schulte, G, Rawal, N, Grahn, A and Arenas, E (2007). "Wnt-5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism." *J Cell Sci* **120**(Pt 4): 586-95.
- Busse, A and Keilholz, U (2011). "Role of TGF-beta in melanoma." *Curr Pharm Biotechnol* **12**(12): 2165-75.
- Cadigan, KM, Fish, MP, Rulifson, EJ and Nusse, R (1998). "Wingless repression of Drosophila frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing." *Cell* **93**(5): 767-77.
- Cadigan, KM and Nusse, R (1997). "Wnt signaling: a common theme in animal development." *Genes Dev* **11**(24): 3286-305.
- Caramel, J, Papadogeorgakis, E, Hill, L, Browne, GJ, Richard, G, Wierinckx, A, Saldanha, G, Osborne, J, Hutchinson, P, Tse, G, Lachuer, J, Puisieux, A, Pringle, JH, Ansieau, S and Tulchinsky, E (2013). "A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma." *Cancer Cell* **24**(4): 466-80.
- Cavallaro, U and Christofori, G (2001). "Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough." *Biochim Biophys Acta* **1552**(1): 39-45.
- Cavallaro, U and Christofori, G (2004). "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(2): 118-32.
- Clark, EA, Golub, TR, Lander, ES and Hynes, RO (2000). "Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC." *Nature* **406**(6795): 532-5.
- Clark, WH, Jr., Elder, DE, Guerry, Dt, Epstein, MN, Greene, MH and Van Horn, M (1984). "A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma." *Hum Pathol* **15**(12): 1147-65.

- Clark, WH, Jr. and Mihm, MC, Jr. (1969). "Lentigo maligna and lentigo-maligna melanoma." Am J Pathol **55**(1): 39-67.
- Cui, B, Zhang, S, Chen, L, Yu, J, Widhopf, GF, 2nd, Fecteau, JF, Rassenti, LZ and Kipps, TJ (2013). "Targeting ROR1 inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis." Cancer Res **73**(12): 3649-60.
- Cully, M, You, H, Levine, AJ and Mak, TW (2006). "Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis." Nat Rev Cancer **6**(3): 184-92.
- Curtin, JA, Fridlyand, J, Kageshita, T, Patel, HN, Busam, KJ, Kutzner, H, Cho, KH, Aiba, S, Brocker, EB, LeBoit, PE, Pinkel, D and Bastian, BC (2005). "Distinct sets of genetic alterations in melanoma." N Engl J Med **353**(20): 2135-47.
- Chang, F, Lee, JT, Navolanic, PM, Steelman, LS, Shelton, JG, Blalock, WL, Franklin, RA and McCubrey, JA (2003). "Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy." Leukemia **17**(3): 590-603.
- Chapman, PB, Hauschild, A, Robert, C, Haanen, JB, Ascierto, P, Larkin, J, Dummer, R, Garbe, C, Testori, A, Maio, M, Hogg, D, Lorigan, P, Lebbe, C, Jouary, T, Schadendorf, D, Ribas, A, O'Day, SJ, Sosman, JA, Kirkwood, JM, Eggermont, AM, Dreno, B, Nolop, K, Li, J, Nelson, B, Hou, J, Lee, RJ, Flaherty, KT, McArthur, GA and Group, B-S (2011). "Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation." N Engl J Med **364**(26): 2507-16.
- Chien, AJ, Moore, EC, Lonsdorf, AS, Kulikauskas, RM, Rothberg, BG, Berger, AJ, Major, MB, Hwang, ST, Rimm, DL and Moon, RT (2009). "Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(4): 1193-8.
- Choi, MY, Widhopf, GF, 2nd, Wu, CC, Cui, B, Lao, F, Sadarangani, A, Cavagnaro, J, Prussak, C, Carson, DA, Jamieson, C and Kipps, TJ (2015). "Pre-clinical Specificity and Safety of UC-961, a First-In-Class Monoclonal Antibody Targeting ROR1." Clin Lymphoma Myeloma Leuk **15** Suppl: S167-9.
- Choudhury, A, Derkow, K, Daneshmanesh, AH, Mikaelsson, E, Kiaii, S, Kokhaei, P, Osterborg, A and Mellstedt, H (2010). "Silencing of ROR1 and FMOD with siRNA results in apoptosis of CLL cells." Br J Haematol **151**(4): 327-35.
- Da Forno, PD, Pringle, JH, Hutchinson, P, Osborn, J, Huang, Q, Potter, L, Hancox, RA, Fletcher, A and Saldanha, GS (2008). "WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome." Clin Cancer Res **14**(18): 5825-32.
- Dai, DL, Martinka, M and Li, G (2005). "Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases." J Clin Oncol **23**(7): 1473-82.
- Damsky, WE, Curley, DP, Santhanakrishnan, M, Rosenbaum, LE, Platt, JT, Gould Rothberg, BE, Taketo, MM, Dankort, D, Rimm, DL, McMahon, M and Bosenberg, M (2011). "beta-catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas." Cancer Cell **20**(6): 741-54.
- Daneshmanesh, AH, Hojjat-Farsangi, M, Khan, AS, Jeddi-Tehrani, M, Akhondi, MM, Bayat, AA, Ghods, R, Mahmoudi, AR, Hadavi, R, Osterborg, A, Shokri, F, Rabbani, H and Mellstedt, H (2012). "Monoclonal antibodies against ROR1 induce apoptosis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells." Leukemia **26**(6): 1348-55.
- Daneshmanesh, AH, Hojjat-Farsangi, M, Moshfegh, A, Mikaelsson, E, Khan, AS, Åsterborg, A and Mellstedt, Hk (2014). "Anti-ROR1 monoclonal antibodies induce apoptosis in pancreatic cancer cells via the PI3-kinase/AKT/mTOR pathway." Cancer Research **74**(19 Supplement): 4770-4770.
- Daneshmanesh, AH, Mikaelsson, E, Jeddi-Tehrani, M, Bayat, AA, Ghods, R, Ostadkarampour, M, Akhondi, M, Lagercrantz, S, Larsson, C, Osterborg, A, Shokri, F, Mellstedt, H and Rabbani, H (2008). "Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in chronic lymphocytic leukemia and may serve as a putative target for therapy." Int J Cancer **123**(5): 1190-5.

- Daneshmanesh, AH, Porwit, A, Hojjat-Farsangi, M, Jeddi-Tehrani, M, Tamm, KP, Grander, D, Lehmann, S, Norin, S, Shokri, F, Rabbani, H, Mellstedt, H and Osterborg, A (2013). "Orphan receptor tyrosine kinases ROR1 and ROR2 in hematological malignancies." Leuk Lymphoma **54**(4): 843-50.
- Dave, H, Anver, MR, Butcher, DO, Brown, P, Khan, J, Wayne, AS, Baskar, S and Rader, C (2012). "Restricted cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia suggests targetability with therapeutic monoclonal antibodies." PLoS One **7**(12): e52655.
- Davies, H, Bignell, GR, Cox, C, Stephens, P, Edkins, S, Clegg, S, Teague, J, Woffendin, H, Garnett, MJ, Bottomley, W, Davis, N, Dicks, E, Ewing, R, Floyd, Y, Gray, K, Hall, S, Hawes, R, Hughes, J, Kosmidou, V, Menzies, A, Mould, C, Parker, A, Stevens, C, Watt, S, Hooper, S, Wilson, R, Jayatilake, H, Gusterson, BA, Cooper, C, Shipley, J, Hargrave, D, Pritchard-Jones, K, Maitland, N, Chenevix-Trench, G, Riggins, GJ, Bigner, DD, Palmieri, G, Cossu, A, Flanagan, A, Nicholson, A, Ho, JW, Leung, SY, Yuen, ST, Weber, BL, Seigler, HF, Darrow, TL, Paterson, H, Marais, R, Marshall, CJ, Wooster, R, Stratton, MR and Futreal, PA (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-54.
- De, A (2011). "Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **43**(10): 745-56.
- Dejmek, J, Dejmek, A, Safholm, A, Sjolander, A and Andersson, T (2005). "Wnt-5a protein expression in primary dukes B colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis." Cancer Res **65**(20): 9142-6.
- Delmas, V, Beermann, F, Martinozzi, S, Carreira, S, Ackermann, J, Kumasaka, M, Denat, L, Goodall, J, Luciani, F, Viros, A, Demirkan, N, Bastian, BC, Goding, CR and Larue, L (2007). "Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development." Genes Dev **21**(22): 2923-35.
- Dissanayake, SK, Wade, M, Johnson, CE, O'Connell, MP, Leotlela, PD, French, AD, Shah, KV, Hewitt, KJ, Rosenthal, DT, Indig, FE, Jiang, Y, Nickoloff, BJ, Taub, DD, Trent, JM, Moon, RT, Bittner, M and Weeraratna, AT (2007). "The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition." J Biol Chem **282**(23): 17259-71.
- Dummer, R, Hauschild, A, Lindenblatt, N, Pentheroudakis, G and Keilholz, U (2015). "Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **26 Suppl 5**: v126-32.
- Duronio, RJ and Xiong, Y (2013). "Signaling pathways that control cell proliferation." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(3): a008904.
- Easty, DJ, Gray, SG, O'Byrne, KJ, O'Donnell, D and Bennett, DC (2011). "Receptor tyrosine kinases and their activation in melanoma." Pigment Cell Melanoma Res **24**(3): 446-61.
- Endo, M, Nishita, M, Fujii, M and Minami, Y (2015). "Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells." Int Rev Cell Mol Biol **314**: 117-48.
- Fecher, LA, Cummings, SD, Keefe, MJ and Alani, RM (2007). "Toward a molecular classification of melanoma." J Clin Oncol **25**(12): 1606-20.
- Fernandez-Cobo, M, Zammarchi, F, Mandeli, J, Holland, JF and Pogo, BG (2007). "Expression of Wnt5A and Wnt10B in non-immortalized breast cancer cells." Oncol Rep **17**(4): 903-7.
- Flores, JF, Walker, GJ, Glendening, JM, Haluska, FG, Castresana, JS, Rubio, MP, Pastoride, GC, Boyer, LA, Kao, WH, Bulyk, ML, Barnhill, RL, Hayward, NK, Housman, DE and Fountain, JW (1996). "Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma." Cancer Res **56**(21): 5023-32.
- Forrester, WC (2002). "The Ror receptor tyrosine kinase family." Cell Mol Life Sci **59**(1): 83-96.
- Forrester, WC, Dell, M, Perens, E and Garriga, G (1999). "A C. elegans Ror receptor tyrosine kinase regulates cell motility and asymmetric cell division." Nature **400**(6747): 881-5.
- Fradkin, LG, Dura, JM and Noordermeer, JN (2010). "Ryks: new partners for Wnts in the developing and regenerating nervous system." Trends Neurosci **33**(2): 84-92.

- Freeman, M (2000). "Feedback control of intercellular signalling in development." Nature **408**(6810): 313-9.
- Fukuda, T, Chen, L, Endo, T, Tang, L, Lu, D, Castro, JE, Widhopf, GF, 2nd, Rassenti, LZ, Cantwell, MJ, Prussak, CE, Carson, DA and Kipps, TJ (2008). "Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 3047-52.
- Gao, B (2012). "Wnt regulation of planar cell polarity (PCP)." Curr Top Dev Biol **101**: 263-95.
- Gentile, A, Lazzari, L, Benvenuti, S, Trusolino, L and Comoglio, PM (2011). "Ror1 is a pseudokinase that is crucial for Met-driven tumorigenesis." Cancer Res **71**(8): 3132-41.
- Gonzalez-Sancho, JM, Brennan, KR, Castelo-Soccio, LA and Brown, AM (2004). "Wnt proteins induce dishevelled phosphorylation via an LRP5/6- independent mechanism, irrespective of their ability to stabilize beta-catenin." Mol Cell Biol **24**(11): 4757-68.
- Goodall, J, Martinozzi, S, Dexter, TJ, Champeval, D, Carreira, S, Larue, L and Goding, CR (2004). "Brn-2 expression controls melanoma proliferation and is directly regulated by beta-catenin." Mol Cell Biol **24**(7): 2915-22.
- Gray-Schopfer, V, Wellbrock, C and Marais, R (2007). "Melanoma biology and new targeted therapy." Nature **445**(7130): 851-7.
- Green, JL, Kuntz, SG and Sternberg, PW (2008). "Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more." Trends Cell Biol **18**(11): 536-44.
- Haass, NK, Smalley, KS, Li, L and Herlyn, M (2005). "Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma." Pigment Cell Res **18**(3): 150-9.
- Halaban, R, Zhang, W, Bacchiocchi, A, Cheng, E, Parisi, F, Ariyan, S, Krauthammer, M, McCusker, JP, Kluger, Y and Sznol, M (2010). "PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells." Pigment Cell Melanoma Res **23**(2): 190-200.
- Hamid, O, Robert, C, Daud, A, Hodi, FS, Hwu, WJ, Kefford, R, Wolchok, JD, Hersey, P, Joseph, RW, Weber, JS, Dronca, R, Gangadhar, TC, Patnaik, A, Zarour, H, Joshua, AM, Gergich, K, Elassaiss-Schaap, J, Algazi, A, Mateus, C, Boasberg, P, Tumei, PC, Chmielowski, B, Ebbinghaus, SW, Li, XN, Kang, SP and Ribas, A (2013). "Safety and tumor responses with pembrolizumab (anti-PD-1) in melanoma." N Engl J Med **369**(2): 134-44.
- Hanahan, D and Weinberg, RA (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanks, SK and Quinn, AM (1991). "Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members." Methods Enzymol **200**: 38-62.
- Hardy, KM, Kirschmann, DA, Seftor, EA, Margaryan, NV, Postovit, LM, Strizzi, L and Hendrix, MJ (2010). "Regulation of the embryonic morphogen Nodal by Notch4 facilitates manifestation of the aggressive melanoma phenotype." Cancer Res **70**(24): 10340-50.
- Hart, M, Concordet, JP, Lassot, I, Albert, I, del los Santos, R, Durand, H, Perret, C, Rubinfeld, B, Margottin, F, Benarous, R and Polakis, P (1999). "The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell." Curr Biol **9**(4): 207-10.
- Hauschild, A, Grob, JJ, Demidov, LV, Jouary, T, Gutzmer, R, Millward, M, Rutkowski, P, Blank, CU, Miller, WH, Jr., Kaempgen, E, Martin-Algarra, S, Karaszewska, B, Mauch, C, Chiarion-Sileni, V, Martin, AM, Swann, S, Haney, P, Mirakhur, B, Guckert, ME, Goodman, V and Chapman, PB (2012). "Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial." Lancet **380**(9839): 358-65.
- Hodi, FS, O'Day, SJ, McDermott, DF, Weber, RW, Sosman, JA, Haanen, JB, Gonzalez, R, Robert, C, Schadendorf, D, Hassel, JC, Akerley, W, van den Eertwegh, AJ, Lutzky, J, Lorigan, P, Vaubel, JM, Linette, GP, Hogg, D, Ottensmeier, CH, Lebbe, C, Peschel, C, Quirt, I, Clark, JI, Wolchok, JD, Weber, JS, Tian, J, Yellin, MJ, Nichol, GM, Hoos, A and Urban, WJ (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(8): 711-23.

- Hodis, E, Watson, IR, Kryukov, GV, Arold, ST, Imielinski, M, Theurillat, JP, Nickerson, E, Auclair, D, Li, L, Place, C, Dicara, D, Ramos, AH, Lawrence, MS, Cibulskis, K, Sivachenko, A, Voet, D, Saksena, G, Stransky, N, Onofrio, RC, Winckler, W, Ardlie, K, Wagle, N, Wargo, J, Chong, K, Morton, DL, Stemke-Hale, K, Chen, G, Noble, M, Meyerson, M, Ladbury, JE, Davies, MA, Gershenwald, JE, Wagner, SN, Hoon, DS, Schadendorf, D, Lander, ES, Gabriel, SB, Getz, G, Garraway, LA and Chin, L (2012). "A landscape of driver mutations in melanoma." *Cell* **150**(2): 251-63.
- Hojjat-Farsangi, M, Daneshmanesh, AH, Jeddi-Tehrani, M, Osterborg, A, Shokri, F, Mellstedt, H and Rabbani, H (2010). T cells from CLL patients recognize spontaneously peptides derived of the receptor tyrosine kinase Ror1. Blood, AMER SOC HEMATOLOGY 1900 M STREET. NW SUITE 200, WASHINGTON, DC 20036 USA.
- Hojjat-Farsangi, M, Ghaemimanesh, F, Daneshmanesh, AH, Bayat, AA, Mahmoudian, J, Jeddi-Tehrani, M, Rabbani, H and Mellstedt, H (2013a). "Inhibition of the receptor tyrosine kinase ROR1 by anti-ROR1 monoclonal antibodies and siRNA induced apoptosis of melanoma cells." *PLoS One* **8**(4): e61167.
- Hojjat-Farsangi, M, Khan, AS, Daneshmanesh, AH, Moshfegh, A, Sandin, A, Mansouri, L, Palma, M, Lundin, J, Osterborg, A and Mellstedt, H (2013b). "The tyrosine kinase receptor ROR1 is constitutively phosphorylated in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells." *PLoS One* **8**(10): e78339.
- Hojjat-Farsangi, M, Moshfegh, A, Daneshmanesh, AH, Khan, AS, Mikaelsson, E, Osterborg, A and Mellstedt, H (2014). "The receptor tyrosine kinase ROR1 - An oncofetal antigen for targeted cancer therapy." *Semin Cancer Biol* **29C**: 21-31.
- Hojjat-Farsangi, M, Mozaffari, F, Daneshmanesh, A, Osterborg, A, Shokri, F and Mellstedt, H (2011). Patients with chronic lymphocyte leukemia (CLL) have naturally occurring antibodies against the receptor tyrosine kinase (ROR1). Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).
- Hsieh, JC (2004). "Specificity of WNT-receptor interactions." *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **9**: 1333-1338.
- Hsu, M-Y, Elder, DE and Herlyn, M (2002). Melanoma: the Wistar melanoma (WM) cell lines. *Human cell culture*, Springer: 259-274.
- Hsu, M, Andl, T, Li, G, Meinkoth, JL and Herlyn, M (2000). "Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression." *J Cell Sci* **113** (Pt 9): 1535-42.
- Huang, CL, Liu, D, Nakano, J, Ishikawa, S, Kontani, K, Yokomise, H and Ueno, M (2005). "Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* **23**(34): 8765-73.
- Hudecek, M, Lupo-Stanghellini, MT, Kosasih, PL, Sommermeyer, D, Jensen, MC, Rader, C and Riddell, SR (2013). "Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells." *Clin Cancer Res* **19**(12): 3153-64.
- Hudecek, M, Schmitt, TM, Baskar, S, Lupo-Stanghellini, MT, Nishida, T, Yamamoto, TN, Bleakley, M, Turtle, CJ, Chang, WC, Greisman, HA, Wood, B, Maloney, DG, Jensen, MC, Rader, C and Riddell, SR (2010). "The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor." *Blood* **116**(22): 4532-41.
- Hurlstone, A and Clevers, H (2002). "T-cell factors: turn-ons and turn-offs." *EMBO J* **21**(10): 2303-11.
- Ida, L, Yamaguchi, T, Yanagisawa, K, Kajino, T, Shimada, Y, Suzuki, M and Takahashi, T (2016). "Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, a target of NKX2-1/TTF-1 lineage-survival oncogene, inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated pro-apoptotic signaling in lung adenocarcinoma." *Cancer Sci* **107**(2): 155-61.
- Ikeya, M, Lee, SM, Johnson, JE, McMahon, AP and Takada, S (1997). "Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors." *Nature* **389**(6654): 966-70.

- Iozzo, RV, Eichstetter, I and Danielson, KG (1995). "Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy." *Cancer Res* **55**(16): 3495-9.
- Ishitani, T, Kishida, S, Hyodo-Miura, J, Ueno, N, Yasuda, J, Waterman, M, Shibuya, H, Moon, RT, Ninomiya-Tsuji, J and Matsumoto, K (2003). "The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling." *Mol Cell Biol* **23**(1): 131-9.
- Itoh, K, Antipova, A, Ratcliffe, MJ and Sokol, S (2000). "Interaction of dishevelled and Xenopus axin-related protein is required for wnt signal transduction." *Mol Cell Biol* **20**(6): 2228-38.
- Janda, CY, Waghray, D, Levin, AM, Thomas, C and Garcia, KC (2012). "Structural basis of Wnt recognition by Frizzled." *Science* **337**(6090): 59-64.
- Jessen, JR (2009). "Noncanonical Wnt signaling in tumor progression and metastasis." *Zebrafish* **6**(1): 21-8.
- Jho, EH, Zhang, T, Domon, C, Joo, CK, Freund, JN and Costantini, F (2002). "Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway." *Mol Cell Biol* **22**(4): 1172-83.
- Jiang, G, Li, RH, Sun, C, Liu, YQ and Zheng, JN (2014). "Dacarbazine combined targeted therapy versus dacarbazine alone in patients with malignant melanoma: a meta-analysis." *PLoS One* **9**(12): e111920.
- Jonsson, M, Dejmek, J, Bendahl, PO and Andersson, T (2002). "Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas." *Cancer Res* **62**(2): 409-16.
- Kafka, A, Basic-Kinda, S and Pecina-Slaus, N (2014). "The cellular story of dishevelleds." *Croat Med J* **55**(5): 459-67.
- Kageshita, T, Hamby, CV, Ishihara, T, Matsumoto, K, Saida, T and Ono, T (2001). "Loss of beta-catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma." *Br J Dermatol* **145**(2): 210-6.
- Karachaliou, N, Drozdowskyj, A, Costa, C, Molina-Vila, MA, Gimenez Capitan, A, Vergnenegre, A, Massuti, B, Moran, T, Majem, M and Felip, E (2013). ROR1 mRNA expression in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with the T790M mutation: A potential therapeutic target. ASCO Annual Meeting Proceedings.
- Karreth, FA, Tay, Y, Perna, D, Ala, U, Tan, SM, Rust, AG, DeNicola, G, Webster, KA, Weiss, D, Perez-Mancera, PA, Krauthammer, M, Halaban, R, Provero, P, Adams, DJ, Tuveson, DA and Pandolfi, PP (2011). "In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma." *Cell* **147**(2): 382-95.
- Katoh, M (2007). "STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (Review)." *Int J Mol Med* **19**(2): 273-8.
- Katoh, M (2009). "Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF-kappaB, Hedgehog, TGFbeta, and Notch signaling cascades." *Int J Mol Med* **23**(6): 763-9.
- Kaucka, M, Krejci, P, Plevova, K, Pavlova, S, Prochazkova, J, Janovska, P, Valnohova, J, Kozubik, A, Pospisilova, S and Bryja, V (2011). "Post-translational modifications regulate signalling by Ror1." *Acta Physiol (Oxf)* **203**(3): 351-62.
- Kierszenbaum, AL and Tres, L (2011). Histology and cell biology: an introduction to pathology, Elsevier Health Sciences.
- Kikuchi, A and Yamamoto, H (2008). "Tumor formation due to abnormalities in the beta-catenin-independent pathway of Wnt signaling." *Cancer Sci* **99**(2): 202-8.
- Kikuchi, A, Yamamoto, H, Sato, A and Matsumoto, S (2012). "New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation." *Int Rev Cell Mol Biol* **291**: 21-71.
- Kortylewski, M, Jove, R and Yu, H (2005). "Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts." *Cancer Metastasis Rev* **24**(2): 315-27.
- Kremenevskaja, N, von Wasielewski, R, Rao, AS, Schofl, C, Andersson, T and Brabant, G (2005). "Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma." *Oncogene* **24**(13): 2144-54.

- Kudchadkar, RR, Gonzalez, R and Lewis, K (2013). "New targeted therapies in melanoma." Cancer Control **20**(4): 282-8.
- Kuphal, S, Bauer, R and Bosserhoff, AK (2005). "Integrin signaling in malignant melanoma." Cancer Metastasis Rev **24**(2): 195-222.
- Kurayoshi, M, Oue, N, Yamamoto, H, Kishida, M, Inoue, A, Asahara, T, Yasui, W and Kikuchi, A (2006). "Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion." Cancer Res **66**(21): 10439-48.
- Lapalombella, R, Andritsos, L, Liu, Q, May, SE, Browning, R, Pham, LV, Blum, KA, Blum, W, Ramanunni, A, Raymond, CA, Smith, LL, Lehman, A, Mo, X, Jarjoura, D, Chen, CS, Ford, R, Jr., Rader, C, Muthusamy, N, Johnson, AJ and Byrd, JC (2010). "Lenalidomide treatment promotes CD154 expression on CLL cells and enhances production of antibodies by normal B cells through a PI3-kinase-dependent pathway." Blood **115**(13): 2619-29.
- Larue, L and Delmas, V (2006). "The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma." Front Biosci **11**: 733-42.
- Lee, JM, Kim, IS, Kim, H, Lee, JS, Kim, K, Yim, HY, Jeong, J, Kim, JH, Kim, JY, Lee, H, Seo, SB, Rosenfeld, MG, Kim, KI and Baek, SH (2010). "RORalpha attenuates Wnt/beta-catenin signaling by PKCalpha-dependent phosphorylation in colon cancer." Mol Cell **37**(2): 183-95.
- Levy, C, Khaled, M and Fisher, DE (2006). "MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene." Trends Mol Med **12**(9): 406-14.
- Li, P, Harris, D, Liu, Z, Liu, J, Keating, M and Estrov, Z (2010). "Stat3 activates the receptor tyrosine kinase like orphan receptor-1 gene in chronic lymphocytic leukemia cells." PLoS One **5**(7): e11859.
- Liu, J, Fukunaga-Kalabis, M, Li, L and Herlyn, M (2014). "Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma." Arch Biochem Biophys **563**: 13-21.
- Liu, Y, Yang, H, Chen, T, Luo, Y, Xu, Z, Li, Y and Yang, J (2015). "Silencing of Receptor Tyrosine Kinase ROR1 Inhibits Tumor-Cell Proliferation via PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Adenocarcinoma." PLoS One **10**(5): e0127092.
- Logan, CY and Nusse, R (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.
- Luke, JJ and Schwartz, GK (2013). "Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma." Clin Dermatol **31**(3): 290-7.
- MacDonald, BT, Tamai, K and He, X (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." Dev Cell **17**(1): 9-26.
- MacKeigan, JP, Murphy, LO and Blenis, J (2005). "Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance." Nat Cell Biol **7**(6): 591-600.
- Maelandsmo, GM, Holm, R, Nesland, JM, Fodstad, O and Florenes, VA (2003). "Reduced beta-catenin expression in the cytoplasm of advanced-stage superficial spreading malignant melanoma." Clin Cancer Res **9**(9): 3383-8.
- Malbon, CC, Wang, H and Moon, RT (2001). "Wnt signaling and heterotrimeric G-proteins: strange bedfellows or a classic romance?" Biochem Biophys Res Commun **287**(3): 589-93.
- Masiakowski, P and Carroll, RD (1992). "A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain." J Biol Chem **267**(36): 26181-90.
- Matsuda, T, Nomi, M, Ikeya, M, Kani, S, Oishi, I, Terashima, T, Takada, S and Minami, Y (2001). "Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development." Mech Dev **105**(1-2): 153-6.
- McDonald, SL and Silver, A (2009). "The opposing roles of Wnt-5a in cancer." Br J Cancer **101**(2): 209-14.
- McGovern, VJ, Mihm, MC, Jr., Bailly, C, Booth, JC, Clark, WH, Jr., Cochran, AJ, Hardy, EG, Hicks, JD, Levene, A, Lewis, MG, Little, JH and Milton, GW (1973). "The classification of malignant melanoma and its histologic reporting." Cancer **32**(6): 1446-57.

- McNeill, H and Woodgett, JR (2010). "When pathways collide: collaboration and connivance among signalling proteins in development." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(6): 404-13.
- Meier, F, Schitteck, B, Busch, S, Garbe, C, Smalley, K, Satyamoorthy, K, Li, G and Herlyn, M (2005). "The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma." *Front Biosci* **10**: 2986-3001.
- Mellstedt, H, Daneshmanesh, AH, Moshfegh, A, Hojat Farsangi, M, Khan, S, Mikaelsson, E, Vagberg, J, Bystrom, S, Schultz, J and Olin, T (2014). A new class of compound for pancreatic carcinoma targeting the tyrosine kinase receptor (TKR) ROR1. ASCO Annual Meeting Proceedings.
- Mellstedt, H, Khan, S, Vagberg, J, Bystrom, S, Schultz, J, Hojat Farsangi, M, Mansouri, L, Danesh Manesh, AH, Osterborg, A and Moshfegh, A (2012). Effect of ROR1-targeting small molecules on chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. ASCO Annual Meeting Proceedings.
- Micalizzi, DS, Farabaugh, SM and Ford, HL (2010). "Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**(2): 117-34.
- Michaloglou, C, Vredeveld, LC, Soengas, MS, Denoyelle, C, Kuilman, T, van der Horst, CM, Majoor, DM, Shay, JW, Mooi, WJ and Peeper, DS (2005). "BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi." *Nature* **436**(7051): 720-4.
- Middleton, MR, Grob, JJ, Aaronson, N, Fierlbeck, G, Tilgen, W, Seiter, S, Gore, M, Aamdal, S, Cebon, J, Coates, A, Dreno, B, Henz, M, Schadendorf, D, Kapp, A, Weiss, J, Fraass, U, Statkevich, P, Muller, M and Thatcher, N (2000). "Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma." *J Clin Oncol* **18**(1): 158-66.
- Miller, AJ and Mihm, MC, Jr. (2006). "Melanoma." *N Engl J Med* **355**(1): 51-65.
- Minami, Y, Oishi, I, Endo, M and Nishita, M (2010). "Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases." *Dev Dyn* **239**(1): 1-15.
- Mirmohammadsadegh, A, Marini, A, Nambiar, S, Hassan, M, Tannapfel, A, Ruzicka, T and Hengge, UR (2006). "Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma." *Cancer Res* **66**(13): 6546-52.
- Niehrs, C (2012). "The complex world of WNT receptor signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(12): 767-79.
- Nomi, M, Oishi, I, Kani, S, Suzuki, H, Matsuda, T, Yoda, A, Kitamura, M, Itoh, K, Takeuchi, S, Takeda, K, Akira, S, Ikeya, M, Takada, S and Minami, Y (2001). "Loss of mRor1 enhances the heart and skeletal abnormalities in mRor2-deficient mice: redundant and pleiotropic functions of mRor1 and mRor2 receptor tyrosine kinases." *Mol Cell Biol* **21**(24): 8329-35.
- Nusse, R and Varmus, HE (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." *Cell* **31**(1): 99-109.
- O'Connell, MP, Fiori, JL, Xu, M, Carter, AD, Frank, BP, Camilli, TC, French, AD, Dissanayake, SK, Indig, FE, Bernier, M, Taub, DD, Hewitt, SM and Weeraratna, AT (2009). "The orphan tyrosine kinase receptor, ROR2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma." *Oncogene* **29**(1): 34-44.
- O'Connell, MP, Fiori, JL, Xu, M, Carter, AD, Frank, BP, Camilli, TC, French, AD, Dissanayake, SK, Indig, FE, Bernier, M, Taub, DD, Hewitt, SM and Weeraratna, AT (2010). "The orphan tyrosine kinase receptor, ROR2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma." *Oncogene* **29**(1): 34-44.
- O'Connell, MP, Marchbank, K, Webster, MR, Valiga, AA, Kaur, A, Vultur, A, Li, L, Herlyn, M, Villanueva, J, Liu, Q, Yin, X, Widura, S, Nelson, J, Ruiz, N, Camilli, TC, Indig, FE, Flaherty, KT, Wargo, JA, Frederick, DT, Cooper, ZA, Nair, S, Amaravadi, RK, Schuchter, LM, Karakousis, GC, Xu, W, Xu, X and Weeraratna, AT (2013). "Hypoxia induces phenotypic plasticity and therapy resistance in melanoma via the tyrosine kinase receptors ROR1 and ROR2." *Cancer Discov* **3**(12): 1378-93.

- O'Day, SJ, Hamid, O and Urba, WJ (2007). "Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies." Cancer **110**(12): 2614-27.
- Oishi, I, Sugiyama, S, Liu, ZJ, Yamamura, H, Nishida, Y and Minami, Y (1997). "A novel Drosophila receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. Unique structural features and implication in developmental signaling." J Biol Chem **272**(18): 11916-23.
- Oishi, I, Takeuchi, S, Hashimoto, R, Nagabukuro, A, Ueda, T, Liu, ZJ, Hatta, T, Akira, S, Matsuda, Y, Yamamura, H, Otani, H and Minami, Y (1999). "Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development: implications in development and function of the nervous system." Genes Cells **4**(1): 41-56.
- Omholt, K, Krockel, D, Ringborg, U and Hansson, J (2006). "Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma." Melanoma Res **16**(2): 197-200.
- Omholt, K, Platz, A, Kanter, L, Ringborg, U and Hansson, J (2003). "NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression." Clin Cancer Res **9**(17): 6483-8.
- OTT-NIH. "<https://www.ott.nih.gov/erma/metastatic-melanoma-cancer-cell-line-888-mel>."
- Paganoni, S and Ferreira, A (2003). "Expression and subcellular localization of Ror tyrosine kinase receptors are developmentally regulated in cultured hippocampal neurons." J Neurosci Res **73**(4): 429-40.
- Paganoni, S and Ferreira, A (2005). "Neurite extension in central neurons: a novel role for the receptor tyrosine kinases Ror1 and Ror2." J Cell Sci **118**(Pt 2): 433-46.
- Paluncic, J, Kovacevic, Z, Jansson, PJ, Kalinowski, D, Merlot, AM, Huang, ML, Lok, HC, Sahni, S, Lane, DJ and Richardson, DR (2016). "Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling." Biochim Biophys Acta **1863**(4): 770-84.
- Pearson, RB and Kemp, BE (1991). "Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations." Methods Enzymol **200**: 62-81.
- Peters, JM, McKay, RM, McKay, JP and Graff, JM (1999). "Casein kinase I transduces Wnt signals." Nature **401**(6751): 345-50.
- Pfeifer, GP, You, YH and Besaratinia, A (2005). "Mutations induced by ultraviolet light." Mutat Res **571**(1-2): 19-31.
- Pollock, PM, Harper, UL, Hansen, KS, Yudt, LM, Stark, M, Robbins, CM, Moses, TY, Hostetter, G, Wagner, U, Kakareka, J, Salem, G, Pohida, T, Heenan, P, Duray, P, Kallioniemi, O, Hayward, NK, Trent, JM and Meltzer, PS (2003). "High frequency of BRAF mutations in nevi." Nat Genet **33**(1): 19-20.
- Porrás, BH and Cockerell, CJ (1997). "Cutaneous malignant melanoma: classification and clinical diagnosis." Semin Cutan Med Surg **16**(2): 88-96.
- Poser, I, Dominguez, D, de Herreros, AG, Varnai, A, Buettner, R and Bosserhoff, AK (2001). "Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail." J Biol Chem **276**(27): 24661-6.
- Rabbani, H, Ostadkarampour, M, Danesh Manesh, AH, Basiri, A, Jeddi-Tehrani, M and Forouzesh, F (2010). "Expression of ROR1 in patients with renal cancer--a potential diagnostic marker." Iran Biomed J **14**(3): 77-82.
- Rao, TP and Kuhl, M (2014). "An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more." Circ Res **106**(12): 1798-806.
- Ripka, S, Konig, A, Buchholz, M, Wagner, M, Sipos, B, Kloppel, G, Downward, J, Gress, T and Michl, P (2007). "WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer." Carcinogenesis **28**(6): 1178-87.
- Robert, C, Thomas, L, Bondarenko, I, O'Day, S, Weber, J, Garbe, C, Lebbe, C, Baurain, JF, Testori, A, Grob, JJ, Davidson, N, Richards, J, Maio, M, Hauschild, A, Miller, WH, Jr., Gascon, P, Lotem, M, Harmankaya, K, Ibrahim, R, Francis, S, Chen, TT, Humphrey, R, Hoos, A and

- Wolchok, JD (2011). "Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma." *N Engl J Med* **364**(26): 2517-26.
- Rosenwald, A, Alizadeh, AA, Widhopf, G, Simon, R, Davis, RE, Yu, X, Yang, L, Pickeral, OK, Rassenti, LZ, Powell, J, Botstein, D, Byrd, JC, Grever, MR, Cheson, BD, Chiorazzi, N, Wilson, WH, Kipps, TJ, Brown, PO and Staudt, LM (2001). "Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia." *J Exp Med* **194**(11): 1639-47.
- Roszmusz, E, Patthy, A, Trexler, M and Patthy, L (2001). "Localization of disulfide bonds in the frizzled module of Ror1 receptor tyrosine kinase." *J Biol Chem* **276**(21): 18485-90.
- Sato, A, Yamamoto, H, Sakane, H, Koyama, H and Kikuchi, A (2010). "Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2." *EMBO J* **29**(1): 41-54.
- Semenov, MV, Habas, R, Macdonald, BT and He, X (2007). "SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways." *Cell* **131**(7): 1378.
- Serra, R, Easter, SL, Jiang, W and Baxley, SE (2011). "Wnt5a as an effector of TGFbeta in mammary development and cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**(2): 157-67.
- Shabani, M, Asgarian-Omran, H, Jeddi-Tehrani, M, Vossough, P, Faranoush, M, Sharifian, RA, Tougher, GR, Kordmahin, M, Khoshnoodi, J, Roohi, A, Tavoosi, N, Mellstedt, H, Rabbani, H and Shokri, F (2007). "Overexpression of orphan receptor tyrosine kinase Ror1 as a putative tumor-associated antigen in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia." *Tumour Biol* **28**(6): 318-26.
- Shabani, M, Asgarian-Omran, H, Vossough, P, Sharifian, RA, Faranoush, M, Ghragozlou, S, Khoshnoodi, J, Roohi, A, Jeddi-Tehrani, M, Mellstedt, H, Rabbani, H and Shokri, F (2008). "Expression profile of orphan receptor tyrosine kinase (ROR1) and Wilms' tumor gene 1 (WT1) in different subsets of B-cell acute lymphoblastic leukemia." *Leuk Lymphoma* **49**(7): 1360-7.
- Shabani, M, Asgarian Omran, H, Farsangi, MH, Vossough, P, Sharifian, RA, Tougher, GR, Razavi, SM, Khoshnoodi, J, Jeddi-Tehrani, M, Rabbani, H and Shokri, F (2011). "Comparative expression profile of orphan receptor tyrosine kinase ROR1 in Iranian patients with lymphoid and myeloid leukemias." *Avicenna J Med Biotechnol* **3**(3): 119-25.
- Shabani, M, Naseri, J and Shokri, F (2015). "Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1: a novel target for cancer immunotherapy." *Expert Opin Ther Targets* **19**(7): 941-55.
- Shahabi, V, Whitney, G, Hamid, O, Schmidt, H, Chasalow, SD, Alaparthi, S and Jackson, JR (2012). "Assessment of association between BRAF-V600E mutation status in melanomas and clinical response to ipilimumab." *Cancer Immunol Immunother* **61**(5): 733-7.
- Shain, AH, Yeh, I, Kovalyshyn, I, Sriharan, A, Talevich, E, Gagnon, A, Dummer, R, North, J, Pincus, L, Ruben, B, Rickaby, W, D'Arrigo, C, Robson, A and Bastian, BC (2015). "The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions." *N Engl J Med* **373**(20): 1926-36.
- Slominski, A, Tobin, DJ, Shibahara, S and Wortsman, J (2004). "Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation." *Physiol Rev* **84**(4): 1155-228.
- Slusarski, DC, Corces, VG and Moon, RT (1997). "Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling." *Nature* **390**(6658): 410-3.
- Smolich, BD, McMahon, JA, McMahon, AP and Papkoff, J (1993). "Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface." *Mol Biol Cell* **4**(12): 1267-75.
- Songyang, Z and Cantley, LC (1995). "Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling." *Trends Biochem Sci* **20**(11): 470-5.
- Spiegelman, VS, Slaga, TJ, Pagano, M, Minamoto, T, Ronai, Z and Fuchs, SY (2000). "Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor." *Mol Cell* **5**(5): 877-82.
- Stahl, JM, Sharma, A, Cheung, M, Zimmerman, M, Cheng, JQ, Bosenberg, MW, Kester, M, Sandirasegarane, L and Robertson, GP (2004). "Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma." *Cancer Res* **64**(19): 7002-10.

- Strutt, DI, Weber, U and Mlodzik, M (1997). "The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling." *Nature* **387**(6630): 292-5.
- Sullivan, RJ and Flaherty, KT (2015). "New strategies in melanoma: entering the era of combinatorial therapy." *Clin Cancer Res* **21**(11): 2424-35.
- Tao, J, Zhi, X, Zhang, X, Fu, M, Huang, H, Fan, Y, Guan, W and Zou, C (2015). "miR-27b-3p suppresses cell proliferation through targeting receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1 in gastric cancer." *J Exp Clin Cancer Res* **34**: 139.
- Topol, L, Jiang, X, Choi, H, Garrett-Beal, L, Carolan, PJ and Yang, Y (2003). "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation." *J Cell Biol* **162**(5): 899-908.
- Tseng, HC, Kao, HW, Ho, MR, Chen, YR, Lin, TW, Lyu, PC and Lin, WC (2011). "Cytoskeleton network and cellular migration modulated by nuclear-localized receptor tyrosine kinase ROR1." *Anticancer Res* **31**(12): 4239-49.
- Tyner, JW, Deininger, MW, Loriaux, MM, Chang, BH, Gotlib, JR, Willis, SG, Erickson, H, Kovacovics, T, O'Hare, T, Heinrich, MC and Druker, BJ (2009). "RNAi screen for rapid therapeutic target identification in leukemia patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(21): 8695-700.
- Valyi-Nagy, IT, Hirka, G, Jensen, PJ, Shih, IM, Juhasz, I and Herlyn, M (1993). "Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact." *Lab Invest* **69**(2): 152-9.
- Van Aelst, L and D'Souza-Schorey, C (1997). "Rho GTPases and signaling networks." *Genes Dev* **11**(18): 2295-322.
- Veeman, MT, Axelrod, JD and Moon, RT (2003). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." *Dev Cell* **5**(3): 367-77.
- Wang, HY, Liu, T and Malbon, CC (2006). "Structure-function analysis of Frizzleds." *Cell Signal* **18**(7): 934-41.
- Weber, JS, D'Angelo, SP, Minor, D, Hodi, FS, Gutzmer, R, Neyns, B, Hoeller, C, Khushalani, NI, Miller, WH, Jr., Lao, CD, Linette, GP, Thomas, L, Lorigan, P, Grossmann, KF, Hassel, JC, Maio, M, Sznol, M, Ascierto, PA, Mohr, P, Chmielowski, B, Bryce, A, Svane, IM, Grob, JJ, Krackhardt, AM, Horak, C, Lambert, A, Yang, AS and Larkin, J (2015). "Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial." *Lancet Oncol* **16**(4): 375-84.
- Weeraratna, AT (2005). "A Wnt-er wonderland--the complexity of Wnt signaling in melanoma." *Cancer Metastasis Rev* **24**(2): 237-50.
- Weeraratna, AT, Jiang, Y, Hostetter, G, Rosenblatt, K, Duray, P, Bittner, M and Trent, JM (2002). "Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma." *Cancer Cell* **1**(3): 279-88.
- Wehrli, M, Dougan, ST, Caldwell, K, O'Keefe, L, Schwartz, S, Vaizel-Ohayon, D, Schejter, E, Tomlinson, A and DiNardo, S (2000). "arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling." *Nature* **407**(6803): 527-30.
- Wharton, KA (2003). "Runnin'with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction." *Developmental biology* **253**(1): 1-17.
- Widlund, HR, Horstmann, MA, Price, ER, Cui, J, Lessnick, SL, Wu, M, He, X and Fisher, DE (2002). "Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor." *J Cell Biol* **158**(6): 1079-87.
- Widmer, DS, Cheng, PF, Eichhoff, OM, Belloni, BC, Zipser, MC, Schlegel, NC, Javelaud, D, Mauviel, A, Dummer, R and Hoek, KS (2012). "Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping." *Pigment Cell Melanoma Res* **25**(3): 343-53.
- Wilson, C, Goberdhan, DC and Steller, H (1993). "Dror, a potential neurotrophic receptor gene, encodes a Drosophila homolog of the vertebrate Ror family of Trk-related receptor tyrosine kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(15): 7109-13.

- Willert, J, Epping, M, Pollack, JR, Brown, PO and Nusse, R (2002). "A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells." *BMC Dev Biol* **2**: 8.
- Willert, K, Brink, M, Wodarz, A, Varmus, H and Nusse, R (1997). "Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled." *EMBO J* **16**(11): 3089-96.
- Willert, K, Shibamoto, S and Nusse, R (1999). "Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex." *Genes Dev* **13**(14): 1768-73.
- Wu, J, Saint-Jeannet, JP and Klein, PS (2003). "Wnt-frizzled signaling in neural crest formation." *Trends Neurosci* **26**(1): 40-5.
- Yamaguchi, T, Yanagisawa, K, Sugiyama, R, Hosono, Y, Shimada, Y, Arima, C, Kato, S, Tomida, S, Suzuki, M, Osada, H and Takahashi, T (2012). "NKX2-1/TITF1/TTF-1-Induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma." *Cancer Cell* **21**(3): 348-61.
- Yamamoto, H, Oue, N, Sato, A, Hasegawa, Y, Matsubara, A, Yasui, W and Kikuchi, A (2010). "Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase." *Oncogene* **29**(14): 2036-46.
- Yang, J, Baskar, S, Kwong, KY, Kennedy, MG, Wiestner, A and Rader, C (2011). "Therapeutic potential and challenges of targeting receptor tyrosine kinase ROR1 with monoclonal antibodies in B-cell malignancies." *PLoS One* **6**(6): e21018.
- Yoda, A, Oishi, I and Minami, Y (2003). "Expression and function of the Ror-family receptor tyrosine kinases during development: lessons from genetic analyses of nematodes, mice, and humans." *J Recept Signal Transduct Res* **23**(1): 1-15.
- Zaidi, MR, Day, CP and Merlino, G (2008). "From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse." *J Invest Dermatol* **128**(10): 2381-91.
- Zallen, JA (2007). "Planar polarity and tissue morphogenesis." *Cell* **129**(6): 1051-63.
- Zattra, E, Fortina, AB, Bordignon, M, Piasterico, S and Alaibac, M (2009). "Immunosuppression and melanocyte proliferation." *Melanoma Res* **19**(2): 63-8.
- Zhang, H, Qiu, J, Ye, C, Yang, D, Gao, L, Su, Y, Tang, X, Xu, N, Zhang, D, Xiong, L, Mao, Y, Li, F and Zhu, J (2014a). "ROR1 expression correlated with poor clinical outcome in human ovarian cancer." *Sci Rep* **4**: 5811.
- Zhang, S, Cui, B, Lai, H, Liu, G, Ghia, EM, Widhopf, GF, 2nd, Zhang, Z, Wu, CC, Chen, L, Wu, R, Schwab, R, Carson, DA and Kipps, TJ (2014b). "Ovarian cancer stem cells express ROR1, which can be targeted for anti-cancer-stem-cell therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(48): 17266-71.
- Zhang, S, Chen, L, Cui, B, Chuang, HY, Yu, J, Wang-Rodriguez, J, Tang, L, Chen, G, Basak, GW and Kipps, TJ (2012a). "ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth." *PLoS One* **7**(3): e31127.
- Zhang, S, Chen, L, Wang-Rodriguez, J, Zhang, L, Cui, B, Frankel, W, Wu, R and Kipps, TJ (2012b). "The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers." *Am J Pathol* **181**(6): 1903-10.