



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

**Determinar si la presència del receptor de
melanocortines 1 (MC1R) funcional afecta a la
biogènesi i a la funció mitocondrial en línies
cel·lulars de melanoma en condicions basals**

Gabriel Palou Siquier

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 41537589A

Treball tutelat per Jordi Oliver Oliver

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

No

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball: melanoma, receptor de melanocortines 1, biogènesi mitocondrial, funció mitocondrial

Índex

Resum.....	4
1. Introducció	5
2. Objectius i plantejament experimental	15
3. Materials i mètodes	16
4. Resultats	19
5. Discussió	21
6. Conclusió.....	23
7. Bibliografia	24

Índex de Figures

Figura 1.A. Mapes d'incidència i mortalitat del melanoma.....	6
Figura 1.B. Taxa de incidència i mortalitat del melanoma als països del sud d'Europa.....	7
Figura 1.C. Estructura del MC1R i polimorfismes habituals.....	9
Figura 1.D. Via de senyalització de la cascada de AMPc	11
Figura 1.E. Mecanisme d'acció de la producció de melanina mediada per PGC1- α	12
Figura 1.F. DNA mitocondrial humà.....	13
Figura 3.A. Reaccions en les que es basa el mètode espectrofotomètric per determinar l'activitat enzimàtica de COX.....	16
Figura 3.B. Reaccions acoblades en les que es basa la determinació de l'activitat enzimàtica de l'ATPasa.....	17
Figura 4.A. Representació gràfica dels nivells de proteïna dels diferents complexos OXPHOS.....	19
Figura 4.B. Representació gràfica dels nivells de TFAM.....	20
Figura 4.C. Representació gràfica de les activitats enzimàtiques de COX i ATPasa.....	20

Resum

El melanoma és considerat el càncer de pell més agressiu i és responsable d'un nombre significativament elevat de defuncions anualment. Aquest tipus de càncer s'ha considerat durant molt de temps un dels càncers a on l'ambient té una major importància ja que l'exposició a raigs UV, entre molts d'altres, és un factor de risc important i al qual gran part de la població es veu exposat; però s'ha vist que el component genètic també té una importància cabdal en el desenvolupament del melanoma. Aquí entre en lloc el MC1R, la funcionalitat del qual modula la susceptibilitat dels melanòcits a la carcinogènesi. Després de comprovar que una de les vies afectades per l'acció de la MC1R és la formació de PGC1- α , l'objectiu del present treball consisteix en estudiar la influència del MC1R en la biogènesi i la funció mitocondrial.

Per tal objectiu es va procedir a la determinació dels nivells proteics de TFAM, relacionat amb la biogènesi mitocondrial, i de les diferents subunitats de la cadena respiratòria mitocondrial (OXPHOS), així com de les activitats enzimàtiques dels complexos IV i V de la mencionada cadena en una línia cel·lular salvatge, HBL, i una altra mutant i no funcional pel receptor, A375.

La línia cel·lular HBL presenta valors proteics més elevats del complex OXPHOS, així com una major activitat enzimàtica de COX i ATPasa, mentre que els nivells de TFAM romanen constants en ambdues línies cel·lulars. Això demostra tant una millora en la funció mitocondrial, com una estimulació de la biogènesi mitocondrial en la línia cel·lular amb fenotip salvatge, el que implica una íntima relació entre la funcionalitat del MC1R i aquests dos processos.

1. Introducció

1.1. El melanoma

El melanoma tot i a no ser el tipus de càncer de pell més habitual, sí que és el més agressiu i el responsable del major nombre de morts per carcinogènesi cutània.^{1,3} El melanoma està causat per canvis en els melanòcits, cèl·lules responsables de l'elaboració de la melanina, pigment responsable de la coloració de la pell i dels cabells.²

L'aparició de melanomes presenta un patró diferencial entre ambdós sexes, mentre que en homes es concentren bàsicament a tronc i cap, en les dones és més freqüent la seva aparició a les extremitats.³ Tot i això, i contràriament al que es pugui pensar, els melanomes no limiten el seu radi d'aparició a la pell, sinó que en alguns casos també poden desenvolupar-se a boca, iris o retina ocular; i de manera altament inusual a vagina, esòfag, anus, vies urinàries, intestí prim, meninges i ganglis limfàtics; és a dir, totes aquelles zones que deriven de la migració de la cresta neural.^{2,3}

El melanoma pot classificar-se en quatre grups diferenciats en funció dels trets clínics i les característiques anatòmiques i patològiques del seu creixement.^{1,2}

- Melanoma d'extensió superficial

Representa el tipus més comú de melanoma, sobretot en persones de raça blanca. No té una localització específica i generalment es pla i irregular en forma i color, presentant ombres que oscil·len entre negres i marrons. L'edat mitjana d'aparició és entre 30 i 50 anys.

- Melanoma nodular

És el segon més freqüent i el més agressiu. Sol aparèixer en tronc, cap i coll com una petita elevació de color negre blavós o vermell blavós, tot i que en alguns casos no presenta cap coloració específica. L'edat mitjana d'aparició és al voltant dels 50-60 anys.

- Melanoma lentigen maligne

Aquest tipus és característic de persones d'edat avançada i apareix habitualment a zones amb contacte continuat a l'exposició solar com la cara, el coll i els braços. El melanoma es caracteritza per ser de grans dimensions, anatomia plana i coloració marró amb reflexes de color cafè.

- Melanoma lentiginós acral

Es tracta de la forma més inusual de melanoma. La seva aparició es localitza específicament als palmells de les mans, les plantes dels peus o sota les ungles. És l'únic tipus de melanoma que afecta preferentment a persones de raça negra.

També cal destacar quins són els principals factors de risc en l'aparició dels melanomes. El primer d'ells es tracta de l'edat, ja que encara que sigui un tipus de càncer relativament freqüent en la gent jove la potencialitat d'aparició dels melanomes augmenta amb l'edat. El color de pell, ulls i cabells també influeix, tenint més predisposició persones amb tons més clars. La major exposició al sol també és un desencadenant, ja sigui degut al clima calorós, grans altures o per activitat laboral. Altres possibles factors de risc serien les cremades solars, la utilització de dispositius de bronzejat, exposició a certs factors ambientals (com la radiació, els solvents, el clorur de vinil i els BPC), antecedents familiars propers, presència excessiva de pigues o pigues de grans dimensions i tenir un sistema immunitari excessivament debilitat.^{2,3}

En quant a la seva incidència, destacar que es tracta del dinovè tipus de càncer amb major incidència a nivell mundial, estimada en uns 232000 nous diagnòstics anuals. Aquest càncer no presenta un patró clar de diferenciació entre gèneres representant aproximadament l'1,5% dels tumors malignes en ambdós sexes; sent més freqüent en dones a Europa a diferència de la resta del món, a on el sexe masculí presenta una major incidència. Pel que fa al repartiment geogràfic, els valors més elevats provenen de zones amb elevada radiació solar i amb població blanca no autòctona, encapçalant aquesta llista Austràlia, Nova Zelanda, Estats Units i Sudàfrica (Figura 1A). Europa presenta també una incidència superior a la global en aquest tipus de càncer degut en gran part a una tonalitat de pell bastant pàl·lida i una exposició solar més que significativa durant l'estiu.¹

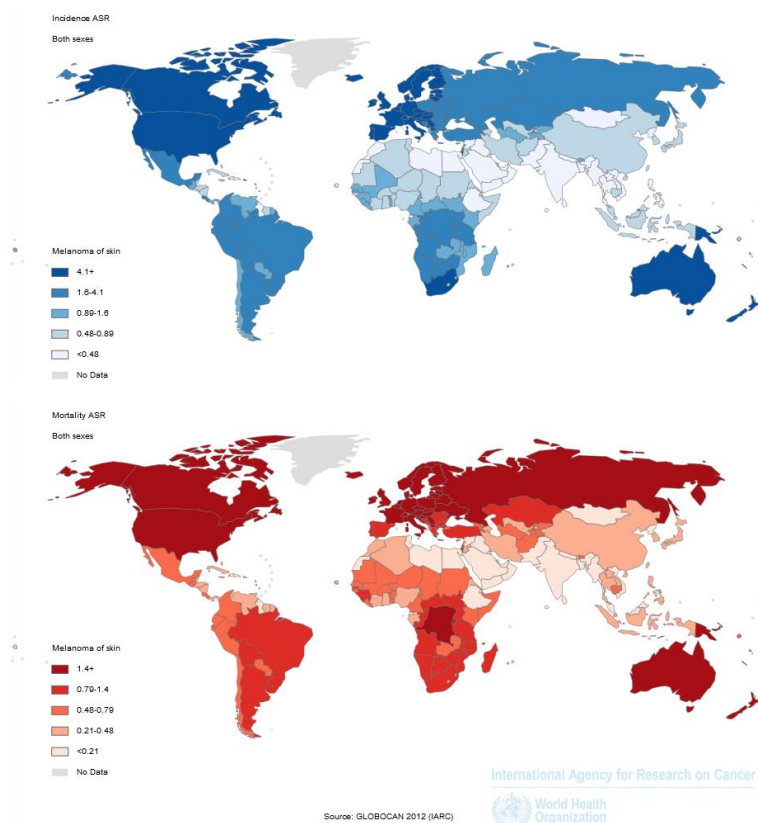


Figura 1A. Mapes d'incidència i mortalitat del melanoma. La imatge superior mostra la taxa d'incidència del melanoma a nivell mundial, representant els valors més obscurs una major taxa incidència. La imatge inferior es correspon a la mortalitat d'aquest tipus de càncer i de la mateixa manera, colors més obscurs simbolitzen una mortalitat major. Totes les dades estan estandarditzades per edat i corresponen al 2012. Extret de GLOBOCAN⁴

En concret, a Espanya el melanoma representa el dotzè tipus de càncer amb major incidència amb 6,9 unitats ASR (“age standardised rate, taxa de població si hi hagués una estructura d’edat estàndard) per 100000 habitants (6,6 en homes i 7,2 en dones), valor significativament diferenciat de les 3 unitats ASR per 100000 habitants que té el melanoma a nivell global (Figura 1B).⁴

Referent a la seva mortalitat, a nivell mundial es tracta del vint-i-dosè càncer amb major mortalitat amb uns 55500 casos anuals i 0,7 unitats ASR per 100000 habitants. Ja a nivell de l’estat espanyol el melanoma representa es vintè tipus de càncer en quant a mortalitat amb 1 unitat ASR per 100000 habitants.⁴

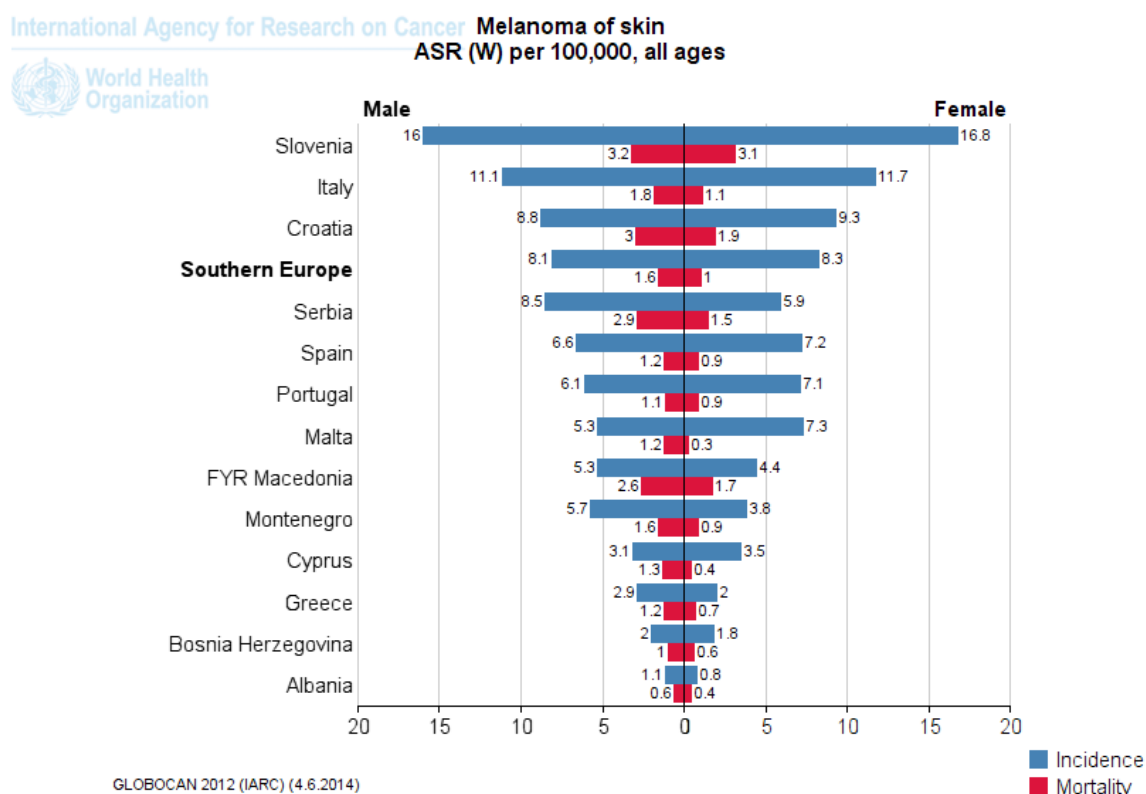


Figura 1B. Taxa de incidència i mortalitat del melanoma als països del sud d’Europa. En aquesta imatge es pot observar una comparativa dels valors de incidència i mortalitat entre homes i dones en aquests països. Totes les dades estan estandarditzades per edat i corresponen al 2012. Extret de GLOBOCAN⁴

1.2. El Receptor de Melanocortines 1

Pel que fa a la seva etiologia, un dels elements més estudiats actualment i en el qual nosaltres ens centrarem és el Receptor de Melanocortines 1 (MC1R). El MC1R és un receptor acoblat a una proteïna G que té un paper cabdal en la regulació de la funció i de la proliferació dels melanòcits, relacionant-se amb la pigmentació de la pell i els cabells, així com a una major susceptibilitat al càncer en alguns casos.^{5,6}

En primer lloc ens centrarem en el seu lligand, les melanocortines (MCs). Aquestes són un conjunt de pèptids bioactius: α -melanocortina, β -melanocortina, γ -melanocortina i hormona adrenocorticotròpica (ACTH) que provenen d'un precursor comú, la proteïna pro-opiomelanocortina (PIMC). La que és del nostre interès és la α -melanocortina o hormona estimuladora de melanòcits (α -MSH), la qual juga un paper clau en la pigmentació estimulants la melanogènesi.⁵

Com ja hem dit el MC1R és un receptor acoblat a proteïna G, i com a tal presenta certa complexitat. El gen que el codifica, també anomenat MC1R és troba situat al cromosoma 16 (16q24.3), a una distància significativament baixa del telòmer, fet que complica el seu estudi, i representa una seqüència sense cap intró de unes 2.3 kb i una regió codificant de 951 nucleòtids. En quant a la proteïna destacar en primer lloc que es tracta d'una proteïna transmembrana de 317 aminoàcids i que es classifica com a GPCR de classe A, el que significa presentar set fragments transmembrana, un fragment N-terminal extracel·lular, tres bucles intracel·lulars, tres bucles extracel·lulars i un extrem C-terminal citosòlic (Figura 1C).^{5,13} Però aquesta classificació com a GPCR de classe A no és del tot clara, ja que altres articles la classifiquen com a classe B degut a la seva capacitat d'unir-se indistintament a la β -arrestina I o a la β -arrestina II en lloc de la preferència per la β -arrestina II característica de les GPCR de classe A.⁹ Deixant aquesta discussió apart, destacar en relació a la seva funcionalitat que tant els bucles com l'extrem extracel·lular presenta una longitud significativament petita, el que podria implicar una activitat constitutiva força elevada.⁵

Alguns estudis demostren l'existència de splicing alternatiu en la formació del MC1R, donant lloc a dues noves conformacions que es basen en afegir una seqüència proteica diferent després de la Ser316 de l'extrem c-terminal. A aquestes no en prestarem especial atenció ja que una d'elles no pareix ser funcional, i l'altre presenta una activitat farmacològica similar a la mencionada inicialment.⁵

Per acabar amb l'estructura, també cal mencionar que es tracta d'una proteïna altament polimòrfica, amb més de 200 polimorfismes no sinònims en la seva estructura (Figura 1C). Aquests diferents polimorfismes són els principals responsables de la pigmentació diferencial així com de les diferents susceptibilitats al càncer de pell.^{5,7,8}

Les mutacions més habituals i per tant les més estudiades són Arg151Cys, Arg160Trp i Asp294His. Totes elles mostren certa predisposició al càncer de pell, tot i que la Arg151Cys demostra una diferència significativa respecte el control fins i tot després de obviar la predisposició ocasionada per la pigmentació de la pell, dels cabells i altres factors de risc.^{5,7,8} Pel nostre interès destacarem la mutació Arg151Cys ja que degut a la seva relació directa amb la predisposició al càncer és l'al·lel present a la línia cel·lular del nostre estudi, la A375 de melanoma.

En quant a les funcions de MC1R, aquesta es tracta d'una proteïna pleiotròpica que presenta un ampli ventall de funcions i múltiples mecanismes d'acció. En primer lloc està el seu paper immunològic ja sigui provocant accions antiinflamatòries o modificant l'expressió de molècules d'adhesió o de factors de transcripció inflamatoris com el NF κ B. Aquesta activitat podria ser per tal de conferir un paper crioprotector a les cèl·lules enfront múltiples situacions d'estrès. Cal remarcar que aquesta activitat del MC1R front l'estimulació per α -MSH li confereix la capacitat potencial de retardar la propagació metastàtica del càncer, però alhora també pot ser responsable de la manca de resposta immune contra el melanoma disminuint l'expressió de les molècules de adhesió.⁶

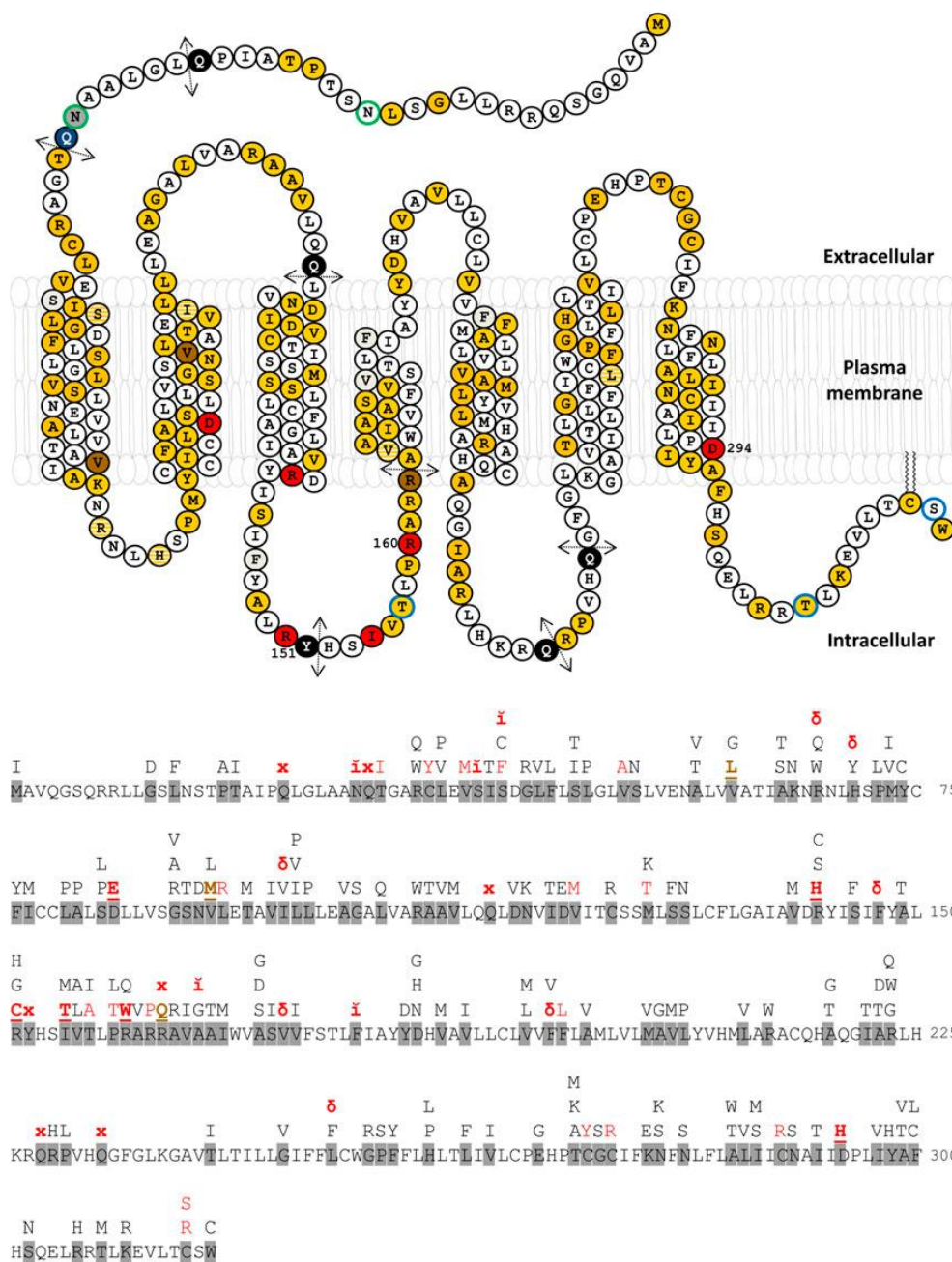


Figura 1C. Estructura del MC1R i polimorfismes habituals. En aquesta imatge es pot veure l'estructura transmembrana del Receptor de Melanocortines 1 (MC1R). A més, la segona part de la imatge ens mostra un recull de les mutacions més freqüents d'aquesta proteïna que conformen els prop de 200 polimorfismes existents. Extret de ⁵

Una altra funció important és la que es relaciona amb la formació dels pigments de melanina. Aquí hi intervenen dues vies de senyalització importants: la via de senyalització extracel·lular de les proteïna quinases ERK1 i ERK2; i la via de senyalització de la cascada intracel·lular de AMPc. Aquestes vies d'acció del receptor MC1R, així com en la majoria de GPCRs, està regulada per la família de les β -arrestines. Les β -arrestines 1 i β -arrestines 2 actuen interaccionant amb el MC1R mitjançant interaccions competitives no dependents de l'agonista. La seva funció és selectiva depenent de la isoforma, la β -arrestina 2 inhibeix la cascada de AMPc dependent de l'agonista però no afecta a l'activació de les ERKs i es responsable de la internalització del receptor MC1R; en contraposició, la β -arrestina 1 no afecta ni a la internalització ni a la funció de MC1R directament, sinó que simplement competeix amb la β -arrestina 2 per la unió al receptor, i en conseqüència el desplaça, atenua la seva activitat, i produeix un increment de la funcionalitat de MC1R.⁹

Centrant-nos un poc més amb la via de senyalització del AMPc intracel·lular, podem dir que la activació seqüencial de la proteïna G acoblada a MC1R i l'adenilat ciclasa (AC) són les responsables de promoure un increment en la formació de AMPc (Figura 1D). Aquest increment de AMPc produirà l'activació de la PKA i seguidament la fosforilació dels factors de transcripció de la família de les proteïnes d'unió a elements de resposta a AMPc (CREB). Una vegada esta fosforilat, CREB interaccionarà amb l'ADN promovent la transcripció de MITF. MITF és un element important en la diferència dels melanòcits estant implicat en la pigmentació d'aquests així com en la resposta als raigs UV; a més participa en una via de retroalimentació positiva que potencia l'expressió i la formació de MC1R. Dins aquesta cascada també juga un paper cabdal la forskolina (FSK) que augmenta l'activitat de la tirosina quinasa, enzim limitant del procés de pigmentació dels melanòcits en ser la responsable en darrera instància de la interconversió de la melanina, des de la forma feomelanina a la de eumelanina, la forma més habitual i a la que ens referim habitualment.^{5,10}

Tot i això, s'ha vist que en ratolins la formació de eumelanina també es produeix, encara que amb menor quantitat, en una situació de no activació del receptor, el que fa pensar que els nivells de senyalització constitutiva d'aquest receptor són suficientment alts com per activar parcialment aquesta via. En els estudis en humans hi ha més controvèrsia, mentre que alguns si observen aquest comportament, en altres no s'han observat diferències en l'expressió entre cèl·lules amb MC1R funcional i d'altres amb el receptor no funcional, en les que no hi hauria d'haver aquesta expressió constitutiva.^{5,9} Aquest fet pot ser degut a la diferència entre els dos tipus de cèl·lules utilitzades per aquest experiment, a on la línia utilitzada pel MC1R no funcional espera tenir un nombre molt més elevat de receptors fruit del mètode d'obtenció de la línia.⁵ També s'ha observat que la transcripció de MITF també està modulada per altres vies de senyalització com les RAF/MAPK (Figura 1D), però aquest només és un dels probables mecanismes implicats en la seva regulació, la majoria dels quals encara romanen desconeguts.¹⁰

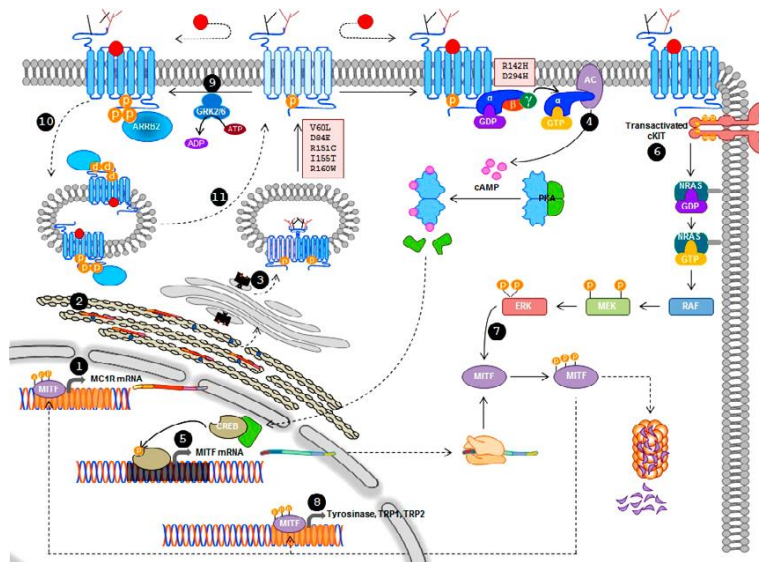


Figura 1D. Via de senyalització de la cascada de AMPc. La imatge mostres de forma esquemàtica les vies intracel·lulars principals relacionades amb l'augment del AMPc citosòlic. Destacar la importància de MITF en la modulació de l'expressió gènica i la capacitat d'internalització dels receptors MC1R. Extret de ⁵

El MC1R també té gran importància com ja s'ha mencionat anteriorment en la resposta dels melanòcits davant l'estímul dels raigs UV. L'estímul és captat en els queratinòcits, cèl·lules predominants en l'epidermis, a on el dany ocasionat en el seu DNA és captat per una via dependent de p53, la qual provoca la secreció de α -MSH, activant MC1R i donant lloc a la resposta front UV.¹⁰ Aquesta resposta és dependent en part de la cascada de AMPc explicada al punt anterior i és la responsable del bronzejat de la pell després de l'exposició solar. Aquesta relació amb la cascada de AMPc és fruit de que un dels principals elements fotoprotectors és la pigmentació, així en ser aquesta via la responsable d'aquesta pigmentació diferencial es converteix en un element important en la resposta front els raigs UV.^{5,10} Però aquesta no és la única via mitjançant la qual el MC1R intervé en aquesta protecció ja que s'ha observat que també es capaç de reduir el dany ocasionat pels raig UV mitjançant la potenciació de la reparació dels dímers de pirimidina ciclobutirat, la principal mutació ocasionada per l'exposició a UV. Aquesta acció es du a terme regulant per part del MC1R el receptor nuclear NR4A, element implicat en la reparació del DNA.⁵

Més allà de la capacitat per mutar l'ADN mitjançant la formació d'aquests dímers, la capacitat mutagènica dels raigs UV també rau en la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), que poden afectar a totes les estructures del melanòcit. El MC1R també intervé en la resposta front aquest estrès modulant l'expressió de diversos enzims antioxidants com la catalasa o la hemo-oxigenasa II. Aquest estímul és especialment important ja que l'estat redox alterat sol ser típic de les cèl·lules cancerígenes, i com no també de les cèl·lules de melanoma, fent que la MC1R tingui un paper clau en la prevenció i la progressió del melanoma.⁵

1.3. *PGC1- α*

Recentment s'han publicat estudis que demostren una estreta relació entre la senyalització de α -MSH i el PGC1- α en els melanòcits. La senyalització de α -MSH promouria la expressió i la estabilització de PGC1- α , el principal coactivador transcripcional de nombrosos processos metabòlics com la gluconeogènesi en el fetge en dejú, l'angiogènesi al múscul esquelètic com a adaptació a l'exercici o la termoregulació en el teixit adipós marró com a resposta al fred; però en aquest estudi és d'especial rellevància la seva implicació en la biogènesi mitocondrial.¹⁰

En els melanòcits, el PGC1- α és responsable d'un augment en la pigmentació d'aquests. Aquest augment es produït en un primer lloc per la capacitat d'aquest per incrementar l'expressió i la activitat de la tirosina quinasa, que com ja s'ha mencionat és la responsable de la activació de de melanina. Per altra banda aquest augment també es fruit de la relació de PGC1- α amb MITF, ja que s'ha demostrat que PGC1- α indueix l'expressió de MITF, possiblement mitjançant la coactivació amb SOX10, i per tant una major expressió de MC1R com es reflexa anteriorment (Figura 1E).¹⁰

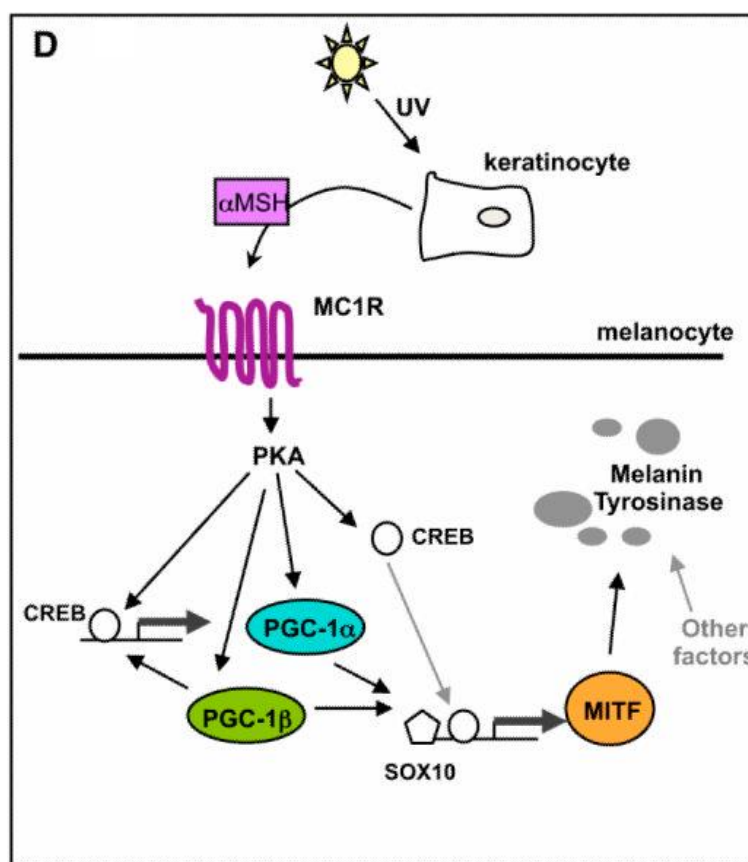


Figura 1E. Mecanisme d'acció de la producció de melanina mediada per PGC1- α . Extret de ¹⁰

1.4. *Biogènesis mitocondrial*

Com s'ha mencionat, el PGC1- α té un paper principal en la biogènesis mitocondrial, ruta que pot veure's alterada per la via de senyalització de α -MSH. La seva funció principal rau en l'activació dels factors de respiració nuclear (NRF1 i NRF2) que seran els responsables de promoure l'expressió de gens codificants per proteïnes mitocondrials, com poden ser algunes subunitats OXPHOS, així com el factor de transcripció mitocondrial A (TFAM).¹¹

El TFAM es una proteïna que té la capacitat de modular l'expressió de certs gens mitocondrials, així com de promouren la seva replicació. Aquesta funció és la que converteix a aquesta proteïna en el punt d'unió entre el DNA nuclear i el mitocondrial en la biogènesis de la mitocòndria.^{11,12}

El complex del DNA mitocondrial està format per diversos elements: en primer lloc un genoma de DNA circular d'unes 16.5kb, els enzims necessaris per a la seva transcripció i la seva replicació, i la maquinària necessària per a la traducció de les proteïnes codificades. El genoma mitocondrial presenta una banda lleugera i una banda pesada, entre les quals hi ha codificades els gens de 13 subunitats de la cadena respiratòria mitocondrial (OXPHOS), 22tRNA i 2 rRNA. Els processos de transcripció i replicació d'aquest DNA tenen el punt d'inici en una regió no codificant anomena D-loop; en aquesta zona és on es troben les zones reguladores per la transcripció a on s'uneixen un grapat de proteïnes, la qual més important és el TFAM (Figura 1F).^{11,12}

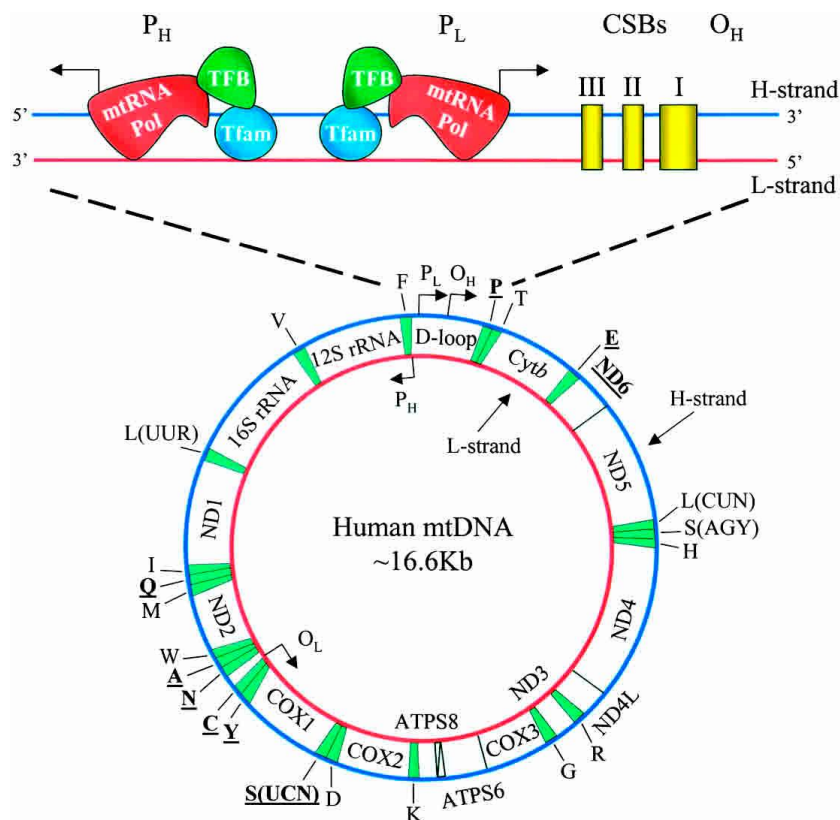


Figura 1F. DNA mitocondrial humà. Representació de l'estructura del DNA mitocondrial i de la situació dels gens codificats, prestant especial atenció a l'estructura de D-loop, a on es pot apreciar el paper de TFAM com a factor de transcripció. Extret de ¹¹

Però el DNA mitocondrial no té cabuda per totes les subunitats de OXPHOS i altres proteïnes importants en la biogènesi o el manteniment mitocondrial, pel que les proteïnes restants es troben codificades en el DNA nuclear, d'aquí l'enorme importància d'una correcta i apurada coordinació entre ambdós genomes per tal d'aconseguir el correcte funcionament d'aquest orgànu.¹¹

Després de veure l'ampli ventall de funcions, cada una més important que l'anterior, en les que participa el MC1R es fa patent la seva importància en el desenvolupament del melanoma. Els estudis actuals mostren que alguns dels diferents polimorfismes d'aquests receptors veuen compromesa la funcionalitat de una o més vies en les que participa MC1R, explicant així el perquè de la susceptibilitat augmentada front el càncer que sofreixen els individus amb aquestes mutacions.^{5,9}

2. Objectius i plantejament experimental

L'objectiu de l'estudi consisteix en determinar les diferències en la biogènesis i en la funció mitocondrial entre dues línies cel·lulars de melanoma humà: la HBL, que presenta un MC1R silvestre i completament funcional; i la A375, que és homozigòtica per la mutació Arg151Cys del MC1R i per tant, no és funcional per aquest receptor.

L'objectiu de comprovar les diferències en la biogènesis i funció mitocondrial és degut a que estudis recents mostren una relació directa entre el receptor MC1R i l'elevació dels nivells de PGC1- α . Sent aquest un dels principals reguladors dels mecanismes explicats anteriorment, s'espera que la seva elevació es vegi reflectida amb un augment de la biogènesis com de la funció mitocondrial.¹⁰

Per dur a terme aquesta comprovació es determinarà l'expressió de distintes proteïnes relacionades amb aquest procés:

- Factor A de Transcripció Mitocondrial (TFAM), proteïna implicada en la regulació del genoma mitocondrial.
- Proteïnes dels complexos de la cadena respiratòria mitocondrial (OXPHOS). Complex I (NADH deshidrogenasa), Complex II (Succinat deshidrogenasa), Complex III (CoQ-citocrom C reductasa), Complex IV (Citocrom C oxidasa) i Complex V (ATPasa/ATP sintasa).

Així com la determinació de l'activitat enzimàtica de OXPHOS, més concretament els complexos IV i V, citocrom C oxidasa i ATPasa respectivament.

3. Materials i mètodes

3.1. Reactius

Els reactius utilitzats en la realització dels assajos de Western Blot i activitats enzimàtiques són de Roche (Barcelona, Espanya), Sigma-Aldrich, Panreac (Barcelona, Espanya) i Bio-rad Laboratories (Hercules, CA, EUA).

3.2. Cultiu de la línia cel·lular

La línia cel·lular utilitzada com a control, la HBL, va ser establida originalment pel laboratori del Professor G E Ghanem de la universitat de Brussel·les. La línia HBL s'originà a partir de la metàstasi dels ganglis limfàtics d'un melanoma maligne de tipus nodular.^{14,15}

La línia cel·lular que presenta la mutació, la A375, va ser originada a partir de la pell d'una dona de 54 anys que sofria un melanoma maligne.¹⁶

El cultiu cel·lular es va realitzar en un medi DMEM (1X) + GlutaMAX™ –I suplementat amb un 1% dels antibiòtics penicil·lina i estreptomicina per tal d'evitar la contaminació de la línia cel·lular.

3.3. Activitats enzimàtiques

Per la determinació de les activitats enzimàtiques de COX i ATPasa, les cèl·lules foren lisades amb aigua lliure de RNAses, fet que produí un xoc osmòtic a aquestes, i posteriorment recollides amb un *scraper*.

L'activitat del complex IV, COX, es va mesurar mitjançant un mètode espectrofotomètric basat en les següents premisses: el citocrom C oxidat té la capacitat d'oxidar la molècula de DAB produint la seva polimerització, al ser observable a 450 nm i 37°C és la reacció a determinar; la COX es la responsable de re-oxidar novament el citocrom C reduït (Figura 3A). Així, l'aparició de polímer de DAB és directament proporcional a la capacitat del COX per re-oxidar el citocrom C, és a dir, a la activitat de COX. Per tal d'evitar possibles interferències fruit del metabolisme mitocondrial, també s'afegeix la catalasa. Al no tenir coneixement del coeficient d'extinció molar del DAB reduït en les condicions de la determinació, no s'aplica la llei de Beer-Lambert sinó que s'agafen els valors una vegada el seu comportament ja és lineal.

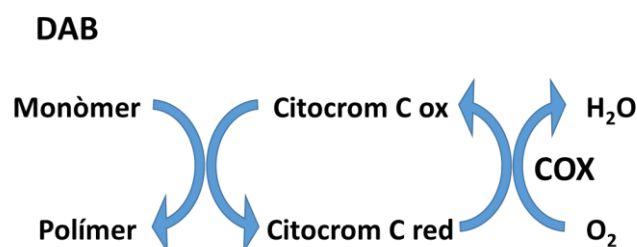


Figura 3A. Reaccions en les que es basa el mètode espectrofotomètric per determinar l'activitat enzimàtica de COX.

Pel que fa a l'activitat de la ATPasa, també s'emprà un mètode espectrofotomètric per a la seva determinació. Aquest mètode es basa en tres reaccions acoblades en el que en darrer terme es determina la velocitat de desaparició del $\text{NADH} + \text{H}^+$ a 340 nm per determinar l'activitat. La primera reacció és la catalitzada per l'ATPasa i no és més que la hidròlisi de l'ATP a ADP i P inorgànic; la segona reacció consisteix en la formació de piruvat i ATP a partir de PEP i ADP per mitjà de la piruvat quinasa; finalment la darrera reacció consisteix en la transformació del piruvat en lactat mitjançant la lactat deshidrogenasa i emprant el coenzim $\text{NADH} + \text{H}^+$ que serà oxidat a NAD^+ (Figura 3B). La determinació de $\text{NADH} + \text{H}^+$ es realitzà a 37°C i en presència d'anticina per tal d'inhibir la cadena respiratòria per evitar interferències en la determinació.

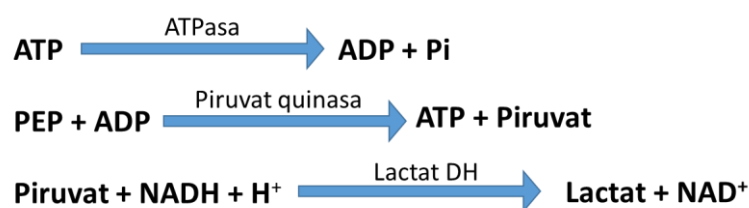


Figura 3B. Reaccions acoblades en les que es basa la determinació de l'activitat enzimàtica de l'ATPasa

3.4. Western Blot

Les cèl·lules de melanoma van ser lisades amb tampó de lisi, compost per Tris-Base 50 mM, EDTA-Na 1 mM, igepal 1%, leupeptin 10 µg/mL, pepstatin 10 µg/mL, PMS-F 1 mM, Na_3VO_4 1 mM i iodeacetamida 10 mM.

Per tal d'aconseguir una càrrega homogènia de proteïna, s'utilitzà un kit de BCA (Pierce, Bonn, Alemanya) per determinar-ne la concentració de cada mostra. El kit en qüestió es basa en el procés de reducció de Cu^{+2} a Cu^{+1} a causa de la proteïna present en la mostra baix condicions d'alcalinitat. El coure reduït reacciona amb l'àcid bicinconínic (BCA), la seva monitorització a 562 nm és la que permet la determinació. Per tal d'evitar possibles interferències en la reacció esmentada, s'afegeix el reactiu de compatibilitat del kit.

Per la realització del Western Blot SDS-PAGE de l'OXPPOS es carregà 25 µg de proteïna provinent de cada mostra en un gel de poliacrilamida al 15 %. En el cas del TFAM també es carregaren 25 µg de proteïna, però en aquest cas en un gel preparat al 12% de poliacrilamida.

Les electroforesis es realitzaren a 200 V, 45 minuts; i posteriorment es procedí a la transferència a membranes de nitrocel·lulosa. Les membranes van ser tractades amb llet descremada en pols al 5% en TBS-Tween (20 mM de Tris-HCl, 0,13 mM de NaCl i 0,1% de Tween 20) per fer el bloqueig.

Els anticossos primaris emprats foren: OXPPOS de Mitoscience (OR, EUA) i TFAM de Santa Cruz (CA, EUA). Els anticossos secundaris conjugats utilitzats es prepararen en llet descremada al 2%. Posteriorment es procedí al revelat ECL i la visualització de les bandes amb el reactiu Immun-Star® Western C® Kit (Bio-rad). La captura de la senyal quimioluminiscent es va dur a terme amb un densitòmetre Chemidoc XRS (Bio-rad) i el seu posterior anàlisi amb el software Quantity One (Bio-rad).

3.5. Anàlisi estadística

Totes les dades estan representades com a les mitjanes \pm els errors estàndard (SEM). En l'estudi estadístic de les dades s'ha emprat el test t-Student amb un p.valor de 0,05 per apreciar les diferències entre els dos grups analitzats.

4. Resultats

Seguidament es procedirà a l'exposició dels resultats obtinguts dels nivells de proteïna així com de les diferents determinacions d'activitat explicades detalladament en l'apartat 2 del present treball. Els resultats obtinguts s'expressen tots en forma de gràfica on es representen les mitjanes i els perspectius errors estadístics (SEM). Els resultats obtinguts s'expressen considerant la línia HBL, receptor silvestre, la referència i atribuint-li valors del 100%, que són contraposats als obtinguts en la línia A375 que es representen en funció dels primers. La presència d'un asterisc (*) indica diferències significativament estadístiques en els resultats analitzats.

En primer lloc ens centrarem en els resultats de la determinació de proteïna dels complexos de la cadena respiratòria mitocondrial (OXPHOS). Podem observar com en general hi ha una major expressió en la línia cel·lular HBL respecte a la A375. El complex I o NADH deshidrogenasa no presenta diferències, mentre que el complex IV o citocrom C oxidasa tot i no presentar diferència significativa si que es pot intuir una tendència a majors nivells en la línia HBL. La resta de complexos, II, III i V si que presenten diferències significatives entre ambdues línies (Figura 4A).

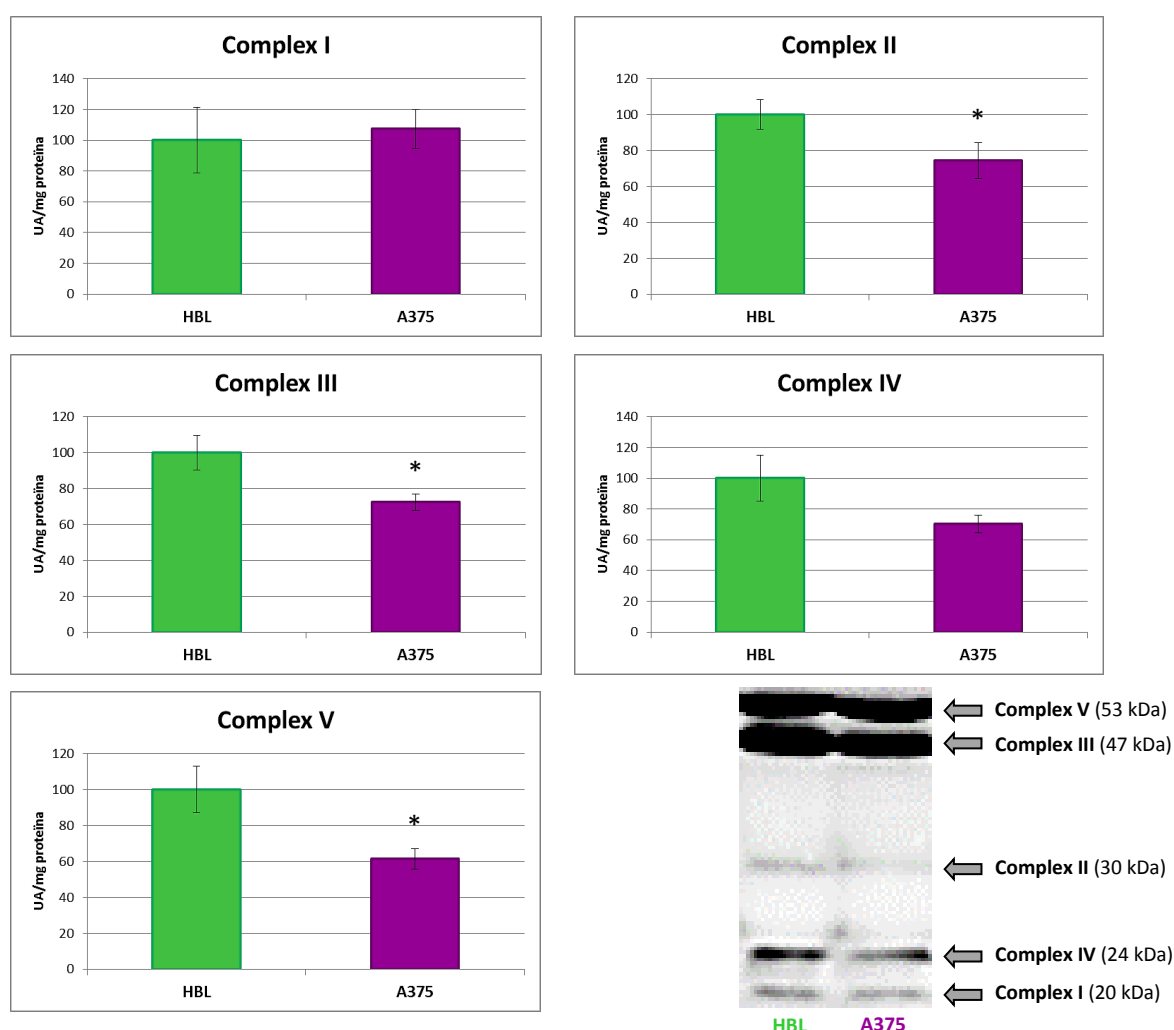


Figura 4A. Representació gràfica dels nivells de proteïna dels diferents complexos OXPHOS. Comparació dels nivells obtinguts en la línia cel·lular HBL front els obtinguts en la línia cel·lular A375. La línia cel·lular HBL es fa fixar en 100 UA: Unitats Arbitràries. Imatge representativa del gel utilitzat per a la determinació.

Per altra banda tenim els resultats obtinguts de l'expressió proteica del TFAM, a on no s'observa cap diferència estadística entre els valors obtinguts procedents de les dues línies cel·lulars de melanoma estudiades (Figura 4B).

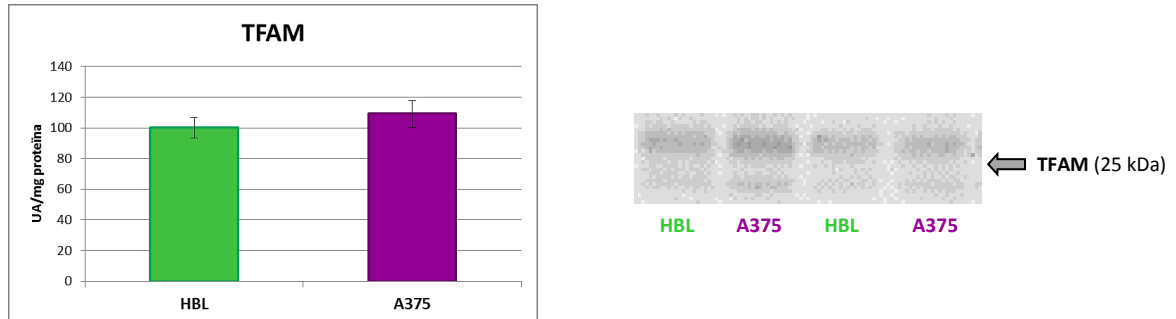


Figura 4B. Representació gràfica dels nivells de TFAM. Comparació dels nivells obtinguts en la línia cel·lular HBL front els obtinguts en la línia cel·lular A375. La línia cel·lular HBL es fa fixar en 100 UA: Unitats Arbitràries. Imatge representativa del gel utilitzat per la determinació.

Finalment tenim les determinacions d'activitat dels complexos IV i V de l'OXPPOS, COX i ATPasa respectivament. En aquest cas sí que es veu una diferència substancial i estadísticament significativa entre les dues línies cel·lulars, tenint la línia HBL, receptor silvestre i 100% funcional, més d'un 30% més d'activitat que no pas la provinent del MC1R mutat i que es coneix que no és funcional, la línia cel·lular A375. (Figura 4C).

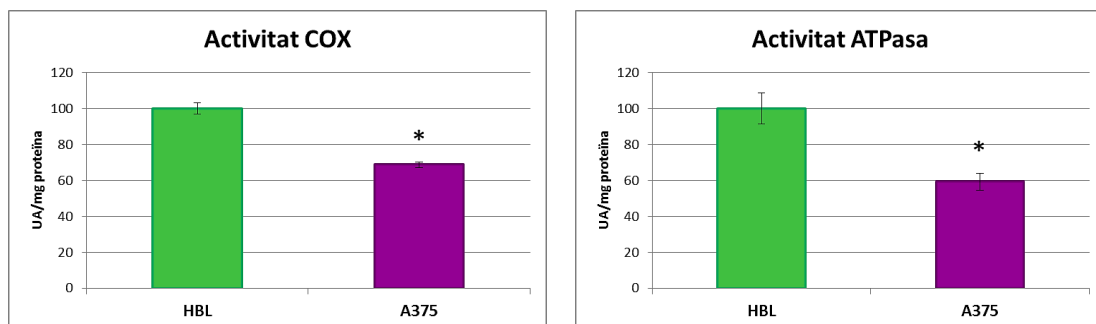


Figura 4C. Representació gràfica de les activitats enzimàtiques de COX i ATPasa. Comparació dels nivells d'activitat obtinguts en la línia cel·lular salvatge, HBL, front els obtinguts en la línia cel·lular mutada, A375. La línia cel·lular HBL es fa fixar en 100 UA: Unitats Arbitràries

5. Discussió

S'ha observat que la línia cel·lular amb el receptor MC1R silvestre, HBL, presenta una millor funció mitocondrial que la línia mutada, A375. Aquesta millora en la funció és derivada d'un augment de la quantitat de complexos de la cadena respiratòria mitocondrial, així com d'un increment de l'activitat enzimàtica dels complexos IV i V, COX i ATPasa respectivament, de la mencionada cadena.

Pel que fa a la biogènesi mitocondrial, es pot determinar de forma indirecta una major activitat en la línia HBL degut a l'augment dels nivells dels complexos OXPHOS. També cabria esperar un augment dels nivells de TFAM, però els resultats obtinguts no presenten diferències significatives entre ambdues línies en aquest sentit. Això podria ser a causa de que TFAM està regulada tant a nivell d'expressió genètica com a nivell post-traducciona per multitud de factors no controlats durant l'experiment.¹⁷ Un d'aquests factors mencionats és l'estrès oxidatiu a l'interior de la cèl·lula, alguns estudis demostren que l'expressió de TFAM es veu potenciada en condicions pro-oxidants.¹⁸ Així, aquesta podria ser la causa d'aquest no augment de TFAM, i no es altre de que la línia cel·lular A375 presenta valors d'estrès oxidatiu superiors als de la línia salvatge, en primer lloc perquè certs estudis han relacionat que l'activitat de MC1R, no funcional en la línia A375, promou la formació d'enzims antioxidants que disminuirien aquest estrès oxidatiu de la cèl·lula⁵, i per altra banda, al presentar la línia silvestre, HBL, una millor funció mitocondrial degut a l'augment de les subunitats OXPHOS i la seva activitat la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) també seria inferior, conduint a un menor estrès oxidatiu per part de la cèl·lula.

D'aquesta manera s'explicaria el valor no esperat de TFAM, no pas per una inhibició de la síntesis en la línia salvatge, sinó per un augment en la línia mutada fruit del major estrès oxidatiu present, tot i això, aquesta elevació dels nivells de TFAM no es traduirien en un increment de l'expressió dels gens de les mitocòndries ja que com s'ha observat presenten un menor nombre de complexos de la cadena respiratòria mitocondrial i una menor activitat d'aquests.

Una altra possible explicació del no augment de TFAM en la línia salvatge està relacionada amb el paper de la proteïna quinasa A (PKA)⁵. Aquest enzim, que veu la seva activitat augmentada en la senyalització de MC1R, és responsable de la fosforilació de TFAM, el que promou la seva degradació per la proteasa Lon, explicant així aquest fet. Però aquesta suposició no ho acabaria d'explicar, ja que aquesta modificació post-traducciona duta a terme per la PKA també es relaciona amb una menor taxa d'unió entre proteïna i DNA mitocondrial, i per tant amb una funcionalitat menor.¹⁷ Això es contradiria amb el fet que aquesta línia cel·lular presenti valors superiors en els complexos de la cadena respiratòria mitocondrial ja que cabria esperar que TFAM no pogués unir-se correctament al DNA mitocondrial i per tant no poder dur a terme la síntesis d'un major nombre de complexos OXPHOS.

Els resultats obtinguts també tenen una relació directa amb la funcionalitat del receptor MC1R i la susceptibilitat al càncer. Com era d'esperar la línia cel·lular amb el MC1R silvestre, HBL, presenta uns valors més elevats en els nivells dels complexos OXPHOS així com una major activitat, fets que com ja s'ha mencionat es relacionen amb una major funcionalitat mitocondrial. Aquesta major funcionalitat mitocondrial desemboca en un control més apurat dels nivells d'estrès oxidatiu als quals la cèl·lula està sotmesa, de manera que la no funcionalitat del receptor, línia cel·lular A375, suposaria un increment significatiu de les espècies reactives d'oxigen (ROS). Aquest ambient pro-oxidatiu aniria íntimament lligat amb una major susceptibilitat de desenvolupar carcinogènesis per part d'aquestes cèl·lules, degut al seu potencial oncogènic amb la estimulació de la proliferació i la inestabilitat genòmica en incrementar la taxa de mutacions.^{19,20}

Així els individus amb un MC1R mutat tindrien més probabilitat de carcinogènesis al tenir els nivells d'estrès oxidatiu de les cèl·lules que els individus amb un MC1R totalment funcional. El problema d'aquesta suposició, i que és habitual en el tractament del càncer, és que el MC1R salvatge també podria tenir alguns desavantatges; els nivells alts de ROS tot i ser pro-oncogènics, a partir de determinats nivells són tòxics per la cèl·lula i provoquen l'apoptosi cel·lular, així la línia salvatge, tot i que és més improbable que desenvolupi un melanoma, després no contarien amb aquesta defensa que suposa l'excés d'estrès oxidatiu intracel·lular.

Per tant, a l'hora d'enfocar un tractament pel melanoma, seria important conèixer les característiques de l'individu referent, en el nostre cas, al MC1R ja que si aquest tractament va dirigit a l'augment de les espècies reactives d'oxigen per fomentar la apoptosi es important conèixer quina és la capacitat de la cèl·lula afectada per reaccionar front aquest nou estímul, perquè en el cas de un melanoma amb MC1R funcional el tractament hauria de ser més fort ja que si no s'arriba a uns valors de ROS suficientment elevats sols s'estaria afavorint un augment de la proliferació del tumor.

6. Conclusió

Els resultats obtinguts no fan més que corroborar el paper cabdal del MC1R en la propensió a la carcinogènesi de melanoma. La relació de MC1R amb el melanoma és àmpliament reconeguda i estudiada, però aquest treball va un poc més enllà i intenta explicar un possible mecanisme d'aquesta relació; s'ha demostrat que la pèrdua de funcionalitat de MC1R altera l'equilibri redox de la cèl·lula, afavorint la creació d'un ambient pro-oxidant, i conseqüentment un major risc de oncogènesi.

Així doncs, aquest major coneixement del funcionament de la cèl·lula tumoral de melanoma podria servir com a base per la millora del tractament d'aquesta patologia, ja que si s'utilitzen tractaments destinats a augmentar l'estrès oxidatiu de la cèl·lula seria important saber si el receptor MC1R del pacient es funcional o no perquè depenent d'això aquest ambient pro-oxidant serviria per desencadenar l'apoptosi cel·lular i eradicar el tumor o simplement s'afavoriria la progressió del carcinoma.

Per tant, aquests estudis transformen la determinació de MC1R en una possible prova diagnòstica del melanoma, ja que permetrien saber amb més exactitud quina teràpia seria més efectiva per fer front al tumor.

7. Bibliografía

1. AECC. Available at: www.aecc.es. Accessed 4/6/2014, 2014.
2. MedlinePlus. Melanoma. Available at: www.nlm.nih.gov/medlineplus. Accessed 4/6/2014, 2014.
3. National Cancer Institute. Available at: www.cancer.gov. Accessed 4/6/2014, 2014.
4. GLOBOCAN. Cancer Fact Sheets: Breast Cancer. Available at: <http://globocan.iarc.fr/>. Accessed 4/6/2014, 2014.
5. García-Borrón JC, Abdel-Malek Z, Jiménez-Cervantes C. MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: Extending the horizon beyond pigmentation *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2014; 2014:n/a <last_page> n/a.
6. Carlson JA, Linette GP, Aplin A, Ng B, Slominski A. Melanocyte receptors: Clinical implications and therapeutic relevance *Dermatol Clin*. 2007;25(4):541 <last_page> 557.
7. Healy E. Melanocortin 1 receptor variants, pigmentation, and skin cancer susceptibility *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*. 2004;20(6):283 <last_page> 288.
8. Han J, Kraft P, Colditz GA, Wong J, Hunter DJ. Melanocortin 1 receptor variants and skin cancer risk *International Journal of Cancer*. 2006; 2006;119(8):1976 <last_page> 1984.
9. Abrisqueta M, Herraiz C, Perez Oliva AB, et al. Differential and competitive regulation of human melanocortin 1 receptor signaling by beta-arrestin isoforms *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 16):3724-3737.
10. Shoag J, Haq R, Zhang M, et al. PGC-1 coactivators regulate MITF and the tanning response *Mol Cell*. 2013;49(1):145-157.
11. Kelly DP. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function *Genes Dev*. 2004;18(4):357 <last_page> 368.
12. Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819(9-10):921-929.
13. Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors *Nature*. 2013;494(7436):185-194.
14. Zhu N, Lalla R, Eves P, et al. Melanoma cell migration is upregulated by tumour necrosis factor-alpha and suppressed by alpha-melanocyte-stimulating hormone *Br J Cancer*. 2004;90(7):1457-1463.

15. Looi CY, Moharram B, Paydar M, et al. Induction of apoptosis in melanoma A375 cells by a chloroform fraction of *Centratherum anthelminticum* (L.) seeds involves NF-kappaB, p53 and bcl-2-controlled mitochondrial signaling pathways *BMC Complement Altern Med*. 2013;13:166-6882-13-166.
16. Bestwick ML, Shadel GS. Accessorizing the human mitochondrial transcription machinery *Trends Biochem Sci*. 2013;38(6):283-291.
17. Piantadosi CA, Suliman HB. Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1 *J Biol Chem*. 2005; 2006;281(1):324 <last_page> 333.
18. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. oxygen radicals and degenerative diseases *Science*. 1983;221(4617):1256-1264.
19. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions *J Carcinog*. 2006;5:14.
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation *Cell*. 2011;144(5):646-674.