



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio de la biogénesis mitocondrial en melanoma.

Mario Moreno Fernández

Grado de Bioquímica

Año académico 2015-16

DNI del alumno: 41583847-P

Trabajo tutelado por Jorge Sastre Serra
Departamento de Biología fundamental y Ciencias de la Salud

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto i difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas i de investigación	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
		X		X

Palabras clave del trabajo:
PGC1 α , MC1R, melanocortin receptor 1, MITF, función mitocondrial

Índice

Índice de figuras	4
Abstract	5
Resumen	6
Abreviaciones	7
1. Introducción	8
1.2. Factores de riesgos.....	10
1.3. Fases del melanoma.....	11
1.4. Receptor de melanocortina 1	12
1.5. PGC1 α y biogénesis mitocondrial	13
1.6. PGC1 α en tumores	14
2. Objetivo y planteamiento experimental.....	16
3. Materiales y métodos	17
3.1. Reactivos	17
3.2. Cultivo de la línea celular y tratamiento	17
3.3. Extracción de proteína	17
3.4. RT-qPCR	18
3.5. Electroforesis SDS-PAGE.....	19
3.6. Actividades enzimáticas.....	19
3.7. Análisis estadístico.....	20
4. Resultados y discusión.....	21
5. Conclusión.....	26
6. Bibliografía.....	27

Figura 1. Incidencia y mortalidad del melanoma en el mundo.....	8
Figura 2. Mapa europeo de incidencia y mortalidad del melanoma.....	9
Figura 3. Fases del melanoma.	11
Figura 4. Activación de MC1R.....	12
Figura 5. Activación de PGC-1 α a través de diferentes vías.	15
Tabla 1. Secuencia y temperaturas de hibridación de los distintos cebadores utilizados en la PCR a tiempo real.	18
Figura 6. Ciclo de reacciones formadas en la determinación enzimática de la COX.....	19
Figura 7. Serie de reacciones acopladas en la que se basa la determinación de la actividad ATPasa.....	20
Figura 8. Representación gráfica de los niveles de expresión de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial	22
Figura 9. Representación gráfica de los niveles de proteína de PGC1 α	23
Figura 10. Representación gráfica de los niveles de proteína de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.....	24
Figura 11. Representación gráfica de la actividad enzimática del citocromo C oxidasa.....	25
Figura 12. Representación gráfica de la actividad enzimática de la ATP sintasa.	26

Abstract

The melanocortin 1 receptor (MC1R) could play an important role in the progression of some tumours. Particularly in which is considered the most aggressive skin cancer, melanoma. That could be due to its activation triggers a signal pathway that active PGC1 α , which plays a central role in the mitochondrial biogenesis through the regulation of several mitochondrial genes and antioxidants enzymes. At this final degree project, it has been analysed how functionality of MC1R affects to mitochondrial biogenesis in two cell lines: HBL which has the receptor functionally and A375 that has not the receptor functionally due to a mutation (451 T>C). Furthermore both cell lines were treated with an analogous of the melanocyte-stimulating hormone, NDP-MSH. For this purpose, It were analysed the expression levels of PGC1 α , mitochondrial transcription factor A (TFAM), nuclear respiratory factor 1 (NRF1) and NRF2; the protein levels of PGC1 α and mitochondrial respiratory chain complexes (OXPHOS) and, at last, were analysed the enzymatic activities of OXPHOS and ATP sintase. The results show that, the expression levels of genes responsible of the control of mitochondrial biogenesis and the protein levels of certain complexes of mitochondrial respiratory chain tend to be higher in the HBL cell line. This is why MC1R could be considered as a risk factor in the melanoma development because it improves mitochondrial biogenesis and function through PGC1 α .

Resumen

El receptor de melanocortina 1 (MC1R) podría tener un papel muy importante en la progresión de algunos tumores, en concreto en el que está considerado como el cáncer de piel más agresivo, el melanoma. Esto podría ser debido a que su activación desencadena una vía de señalización que activa a PGC1 α , la cual tiene un papel central en la biogénesis mitocondrial a través de la regulación de un gran número de genes mitocondriales y enzimas antioxidantes. En este trabajo de fin de grado, se ha analizado cómo afecta la funcionalidad de MC1R a la biogénesis mitocondrial en dos líneas celulares: HBL la cual posee el receptor funcional y A375 que tiene el receptor no funcional debido a una mutación (451 T>C). Además ambas líneas se trataron con un análogo de la hormona estimuladora de melanocitos, la NDP-MSH. Para este propósito, se analizaron los niveles de expresión de PGC1 α , factor A de transcripción mitocondrial (TFAM), factor de respiración nuclear 1 (NRF1) y NRF2; los niveles proteicos de PGC1 α y de los complejos de la cadena de respiración mitocondrial (OXPHOS) y, por último, se determinaron las actividades enzimáticas de OXPHOS y de la ATP sintasa. Los resultados obtenidos, muestran que los niveles de expresión de genes responsables del control de la biogénesis mitocondrial y los niveles proteicos de determinados complejos de la cadena respiratoria mitocondrial tienen tendencia a ser más elevados en la línea HBL. Es por esto que se puede considerar MC1R como un factor de riesgo en el desarrollo del melanoma, ya que mejora la biogénesis y la función mitocondrial a través de PGC1 α .

Abreviaciones

IARC: Asociación Internacional para la Investigación contra el Cáncer.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

MC1R: Receptor de melanocortina 1.

MSH: Hormona estimuladora del melanocito.

PKA: Proteína quinasa A.

CREB protein: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico.

MITF: Factor de transcripción asociado a microftalmia.

TYR: Tirosinasa.

TRP: Proteína relacionada con tirosinasa.

DOPA: Dihidroxifenilalanina.

DCT: Dopacromo tautomerasa.

PGCs: Proteínas coactivadoras del receptor gamma del peroxisoma activado por proliferación.

PPAR α : Receptor α del peroxisoma activado por proliferación.

TFAM: Factor A de transcripción mitocondrial.

NRF: Factor de respiración nuclear.

ERR α : Receptor- α relacionado con estrógenos.

FOXO: Proteína O de la familia “forkhead box”.

SREBP: Proteínas que se unen al elemento de respuesta a esterol.

NEMP: Proteínas mitocondriales codificadas por el genoma nuclear.

TFAM: Factor de transcripción mitocondrial A.

mtSSB: proteína que se une al DNA monocadena mitocondrial.

COX: Citocromo C oxidasa.

1. Introducción

El melanoma es un tipo de cáncer que, a pesar de que constituye una pequeña parte de los cánceres de piel, es el más peligroso y la causa de la gran mayoría de muertes por estos tipos de cáncer. Además, su incidencia viene aumentando desde las últimas 3 o 4 décadas. Esto puede explicarse, en parte, debido a la disminución de la capa de ozono, que constituye un filtro protector contra las radiaciones ultravioletas, permitiendo así que una mayor cantidad de estas radiaciones alcancen la superficie terrestre. Se calcula que una disminución del 10% de los niveles de ozono se traducirían en un aumento de 4.500 casos de melanoma al año¹.

Según el estudio GLOBOCAN, publicado en 2012 por la IARC (Asociación Internacional para la Investigación contra el Cáncer) el melanoma de la piel, en ese año, tenía una incidencia de 232.130 personas al año en todo el mundo, mientras que la mortalidad era de 55.488² [Fig. 1]. Hoy en día, se diagnostican unos 160.000 casos al año en todo el mundo³. Se calcula que solo en Estados Unidos, 76.380 personas contraerán melanoma en 2016 y 10.130 fallecerán a causa del mismo⁴ (según GLOBOCAN en 2012 la incidencia era de 74.515 y la mortalidad de 11.343).

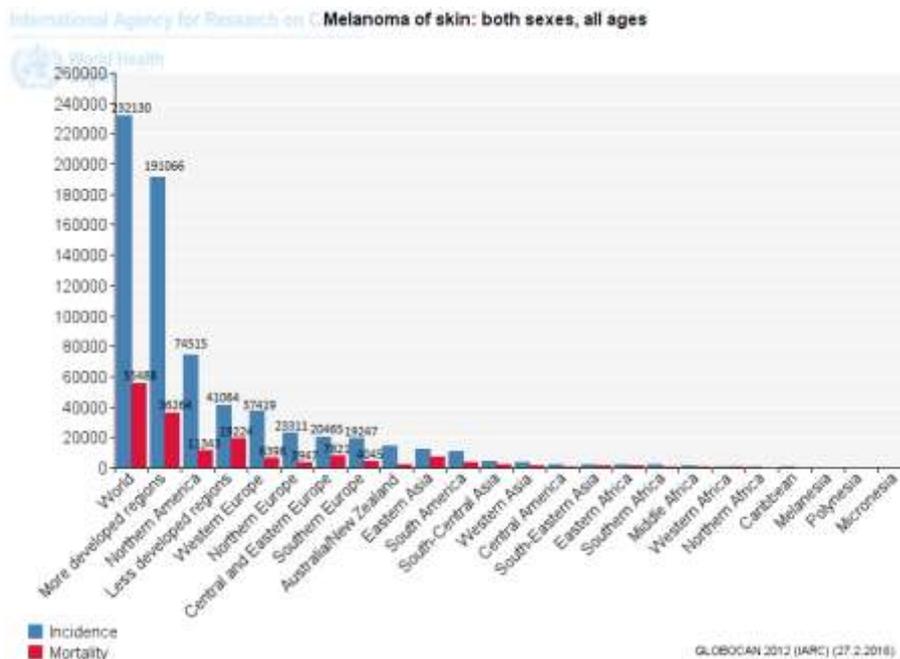


Figura 1. Incidencia y mortalidad del melanoma en el mundo. Gráfico que representa la incidencia y la mortalidad en hombres y mujeres del melanoma. Se muestran los casos en números absolutos por año en diversas regiones del mundo.

En España, la incidencia del melanoma es alta, ya que actualmente se diagnostican unos 3.600 casos anuales. Sin embargo, la mortalidad en España se considera moderada (710 personas al año)³.

Los datos sostienen que se está dando un aumento progresivo de la incidencia en las últimas décadas, que va acompañado de una leve bajada de la mortalidad. Un ejemplo de esto último es que, desde 1973, se ha visto un aumento de 5 años en la esperanza de vida de los pacientes. El aumento de la incidencia puede deberse a las causas ya explicadas anteriormente mientras que, esta leve bajada de la mortalidad podría deberse tanto a mejoras en los diagnósticos, que permitan su detección temprana, como a mejoras en los tratamientos y en las técnicas quirúrgicas⁵.

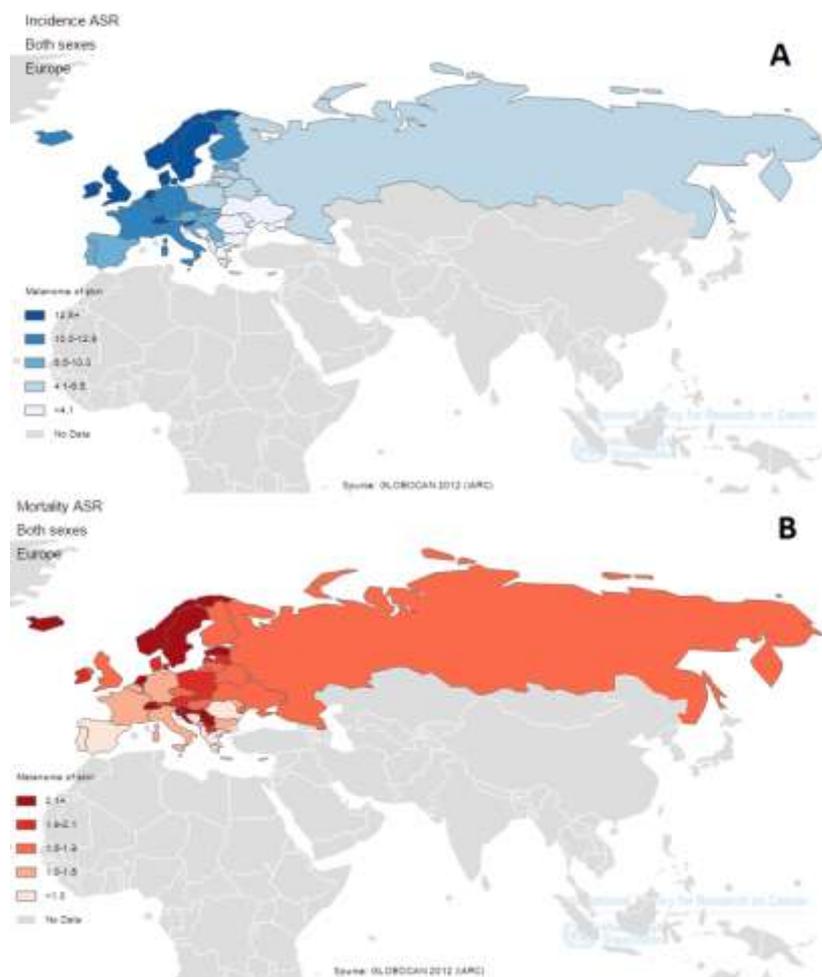


Figura 2. Mapa europeo de incidencia y mortalidad del melanoma. Mapa europeo que representa la incidencia (A) y mortalidad (B) del melanoma en ambos sexos mediante una escala de colores en la que los más oscuros se corresponden con mayor incidencia o mortalidad. Se expresa el ratio de casos por año y por cada 100.000 habitantes.

1.2. Factores de riesgos

El principal factor de riesgo del melanoma es la exposición a la radiación ultravioleta (UV). Esta exposición tiene diferentes efectos en la piel como cambios genéticos, alteraciones en la función inmune, producción de factores de crecimiento que pueden alterar o inducir el desarrollo del melanoma e inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estudios epidemiológicos han relacionado quemaduras solares durante la infancia con un elevado riesgo de padecer melanoma⁶, no en vano se considera que un 68% de las muertes causadas por melanoma son atribuibles a la radiación UV⁷.

Otro de los principales factores de riesgo es el tipo de piel, ya que determina la sensibilidad a la radiación UV⁸. Los melanocitos, son los responsables de producir los dos tipos de pigmentos de la piel: eumelanina (marrón/negra) y la feomelanina (roja), aunque es el primer pigmento el que proporciona un efecto protector contra la radiación UV⁶. En la síntesis de estos pigmentos influye de manera importante un receptor situado en la membrana de los melanocitos, MC1R (receptor de melanocortina 1), ya que su activación provoca el cambio de síntesis de feomelanina (se sintetiza por defecto) a eumelanina siendo así el principal determinante de la pigmentación. Se sabe que, polimorfismos que provocan la pérdida de su función desequilibran la síntesis de eumelanina produciendo el fenotipo pelirrojo, que se caracteriza por tener piel clara, pecas y dificultad para broncearse. Este fenotipo es incapaz de sintetizar la concentración adecuada de eumelanina, siendo por tanto el grupos que posee mayor riesgo de padecer melanoma⁶.

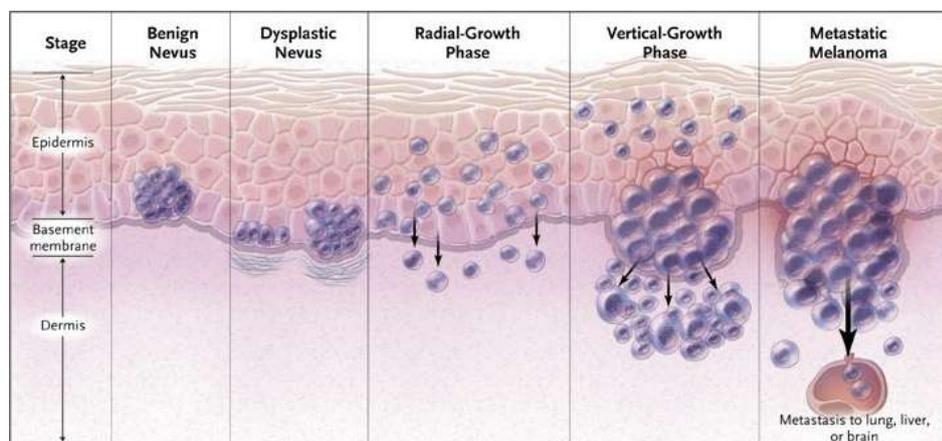
Los lunares son también un factor de riesgo de cara a padecer melanoma, ya que son tumores pigmentados benignos. A mayor número de lunares, más riesgo de contraer melanoma. Además el número de lunares atípicos (grandes con forma o color anormales) también incrementa el riesgo en este tipo de cáncer debido a que una pequeña proporción de estos lunares pueden desarrollarse como melanomas⁹. Por último, como en la mayoría de los cánceres, el historial familiar también es un factor a tener en cuenta en su desarrollo. Se sabe que, el riesgo de contraer melanoma es mayor si un pariente de primer grado (padres, hermanos o hijos), ha padecido ya melanoma. Aproximadamente un 10% de los pacientes que sufren melanoma, tienen esta enfermedad en el historial familiar.^{9,10}

1.3. Fases del melanoma

La clasificación actual más usada de las fases del melanoma es el sistema TNM de la Comisión Unida Americana contra el Cancer (American Joint Committee on Cancer; AJCC), revisado por última vez en 2009¹¹. Según esta clasificación se consideran 5 etapas^{3,10} [Fig. 3]:

- **Fase 0.** Se engloban en esta etapa los melanomas de la epidermis que no han invadido tejidos más profundos. Si se diagnostica en esta fase, el 97% de los pacientes sobreviven al menos 5 años.
- **Fase I.** Melanomas que se encuentran en la epidermis y también aquellos que han alcanzado el inicio de la dermis. El grosor de los melanomas en esta fase es menor a 1-2 mm y no han afectado ganglios linfáticos. En este estadio, la tasa de supervivencia a 5 años es de entre el 90 y el 95%.
- **Fase II.** En esta etapa, el tumor ya ha afectado a la dermis pero aún no ha alcanzado los ganglios linfáticos. Si se diagnostica en esta fase, la tasa de supervivencia a 5 años se reduce al 45-85%.
- **Fase III.** En este estadio se clasifican los melanomas que cumplan algunos de los siguientes requisitos: espesor mayor a 4 mm, afectación de tejidos situados debajo de la piel o ganglios linfáticos cercanos y presencia de tumores satélite alrededor de la lesión principal.
- **Fase IV.** Es la última etapa en el desarrollo del melanoma y la tasa de supervivencia a 5 años es muy baja (10%). En esta fase ya se ven afectados ganglios linfáticos u órganos alejados del tumor primario.

Figura 3. Fases del melanoma. En esta figura se ilustran las diferentes etapas de progresión del melanoma: lunar benigno (Fase 0), Lunas displásico (Fase I), Fase de crecimiento radial (Fase II),



Fase de crecimiento vertical (Fase III) y melanoma metastásico (Fase IV). Imagen adaptada de The New England Journal of Medicine¹².

1.4. Receptor de melanocortina 1

MC1R es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G, cuya activación es producida por la hormona estimuladora del α -melanocito (α -MSH). Esto, pone en marcha un mecanismo de transducción de señal, que provoca un aumento de la concentración de AMPc y la consecuente activación de una proteína quinasa A (PKA). Esta, fosforila a la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) que induce la expresión del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), el cual es un regulador central de la supervivencia, diferenciación y desarrollo del melanocito¹³ [Fig. 4]. Su importancia reside en el papel que juega en la expresión de tirosinasa (TYR) y TRP-1/TRP-2 (proteínas relacionadas con la tirosinasa), ya que estas son las que permiten el inicio de la síntesis de la melanina mediante la hidroxilación de tirosina en DOPA (dihidroxifenilalanina) y su posterior oxidación a dopaquinona¹⁴.

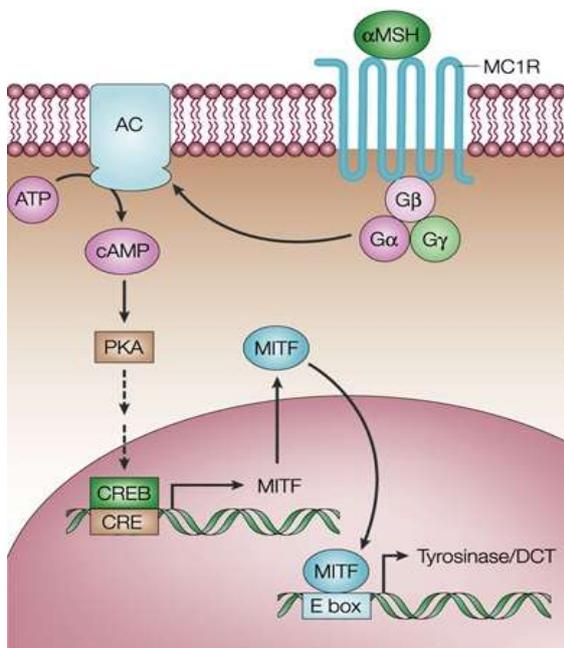


Figura 4. Activación de MC1R. En esta figura se muestra cómo la activación de MC1R media una cascada de AMP cíclico que provoca la activación de la PKA. Esta activación, permite que entre en el núcleo para fosforilar y activar a CREB. De esta manera, CREB puede actuar como factor de transcripción induciendo la síntesis de MITF que viajará al núcleo para, a su vez permitir la síntesis de TYR y DCT (dopacromo tautomerasa, también llamada TRP-2). Por último, estas dos enzimas iniciarán la síntesis de melanina. Imagen extraída de Nature¹⁵.

1.5. PGC1 α y biogénesis mitocondrial

La activación de MC1R mediada por α -MSH, no solo tiene efectos en MITF y en la síntesis de la melanina sino que también induce la expresión de PGC1s (proteínas coactivadoras del receptor gamma del peroxisoma activado por proliferación) como PGC1 α , que juega un papel central en la regulación de la biogénesis mitocondrial^{13,16} [Fig. 5]. Cabe destacar que, esta activación de PGC1s, también dependiente de PKA, está relacionada con la vía explicada anteriormente ya que es necesaria para la inducción de MITF y, además existe una retroalimentación entre ambas, debido a que MITF también contribuye a la transcripción de PGC1 α ¹⁷.

La capacidad codificadora del DNA mitocondrial es limitada, por tanto para que se produzca una transcripción adecuada y por ende biogénesis mitocondrial, son necesarios una serie de genes nucleares, que codifican la mayoría de las proteínas de la cadena respiratoria, así como todos los enzimas requeridos para otras funciones oxidativas y biosintéticas¹⁸. Las PGC1s, son coactivadoras transcripcionales de muchos receptores nucleares y factores de transcripción que, a su vez, se unen a los promotores de estos genes mitocondriales codificados por el genoma nuclear^{16,19}. Se sabe, por ejemplo que PGC1 α interacciona, entre otros, con miembros de la familia PPAR, factores de respiración nuclear (NRF1 y NRF2), receptor- α relacionado con estrógenos (ERR α), FOXO (proteína O de la familia “forkhead box”) y SREBP (proteínas que se unen al elemento de respuesta a esterol). Algunos de ellos, como PPAR α y NRF1 están relacionados con la función respiratoria¹⁹. Este último en concreto, es un factor de transcripción inicial en la inducción de la biogénesis mitocondrial a través de PGC1 α , ya que se une a una secuencia palindrómica del promotor del gen que codifica para citocromo C y además, ha sido asociado con la expresión de genes requeridos para la expresión y la función de la cadena respiratoria^{18,19}. Otro ejemplo de la importancia de NRF1, y también de otros miembros de esta familia como NRF2, es el aumento que producen en la expresión tanto de numerosas proteínas mitocondriales codificadas por el genoma nuclear (NEMP) como del factor A de transcripción mitocondrial (TFAM) que estimula directamente la replicación y transcripción del DNA mitocondrial¹⁶.

1.6. PGC1 α en tumores

La biogénesis mitocondrial es un proceso de gran importancia en los tumores, ya que estos reprograman su metabolismo para hacer frente a un incremento de la demanda energética y anabólica. Una adaptación frecuente que llevan a cabo las células tumorales, es el denominado efecto Warburg, que consiste en un incremento de la captación de glucosa y de la glicolisis aeróbica junto con una disminución del metabolismo oxidativo^{20,21}. Estas adaptaciones llevadas a cabo por la célula, provocan una actividad metabólica aumentada e inestable que conduce a un aumento de ROS que juegan un doble papel en las células cancerosas. Por un lado, este incremento del estrés oxidativo estimula la tumorigenesis promoviendo la proliferación y la inestabilidad genómica, pero por otro, a partir de cierta concentración pueden conducir a la muerte celular²¹. Sin embargo, en los últimos años están surgiendo evidencias de que esta regulación al alza de la glicolisis, no solo responde a satisfacer las demandas energéticas sino que también permite un aumento de la síntesis de ribonucleótidos, aminoácidos y también de NADPH, el cual puede eliminar los ROS generados por el metabolismo acelerado de las células cancerosas²⁰. Por tanto, el tumor no solo sufre adaptaciones para afrontar una mayor demanda energética sino que también adapta su metabolismo a los problemas que esto genera, como un aumento del estrés oxidativo.

En este tipo de adaptaciones, al ser un regulador central de la biogénesis mitocondrial, puede ser clave PGC1 α . Estudios revelan que esta proteína se sobreexpresa en algunas líneas celulares derivadas de melanomas humanos. En condiciones normales, se expresa a niveles bajos, mientras que en respuesta a un incremento de las demandas energéticas y metabólicas es fuertemente activada promoviendo la biogénesis mitocondrial y la respiración [Fig. 5]. Se sabe también, que PGC1 α regula diversos genes involucrados en la detoxificación de ROS como por ejemplo enzimas glutatión sintasas, tioredoxinas, glutarredoxinas, peroxirredoxinas y superóxido dismutasa 2. Por tanto, PGC1 α , no solo produce un incremento del metabolismo, sino también de su eficacia, ya que activa también diferentes mecanismos antioxidantes que ejercerán un efecto protector frente a la apoptosis inducida por ROS como se ha visto en tumores y melanomas humanos²¹.

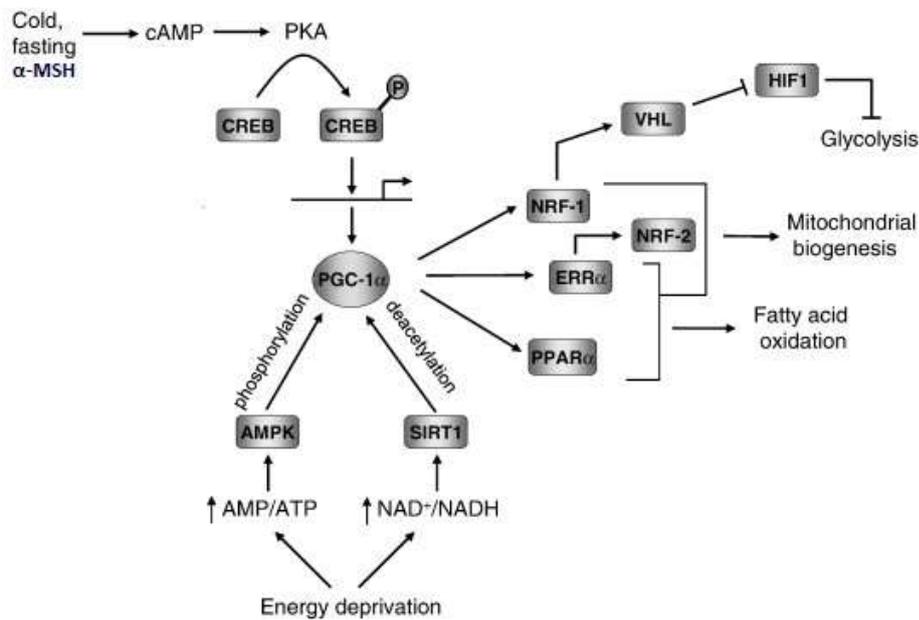


Figura 5. Activación de PGC-1 α a través de diferentes vías. En la parte superior mediante señales extracelulares que desencadenan una cascada de AMPc y la fosforilación de CREB. En la parte inferior a través de señales intracelulares como el incremento de la demanda energética. También se representa la promoción de la biogénesis mitocondrial que produce PGC1- α a través de distintos factores como NRF-1 o ERR α . Figura adaptada de *Molecular Cell Research*¹⁹.

2. Objetivo y planteamiento experimental

El objetivo del trabajo es estudiar cómo afecta el funcionamiento del receptor de melanocortina 1 a la biogénesis mitocondrial en líneas celulares de melanoma.

Estudios anteriores revelan que la activación de MC1R a través de α -MSH induce la expresión de PGC1 α mediante los mecanismos explicados anteriormente¹³. Para comprobar si los efectos son debidos a la interacción de la hormona α -MSH con su receptor (MC1R), en este trabajo de fin de grado se han utilizado dos líneas diferentes: HBL y A375. La primera, posee MC1R funcional mientras que en la línea A375 no es funcional, ya que posee una mutación puntual en el nucleótido 451. Esta consiste en el cambio de una cisteína por una timina lo cual implica un cambio de sentido (se sustituye el codón original CGC que codifica para asparagina por CGT que codifica para cisteína) que afecta al aminoácido 151 de la proteína²². Este se encuentra en el dominio de receptor acoplado a proteínas G similar a rodopsina²³, cuya función consiste transducir señales extracelulares a través de la interacción con proteínas G²⁴. Por tanto, esta mutación afecta al dominio de transducción de la señal provocando que este receptor no sea funcional.

Ambas líneas celulares se trataron con un potente análogo de la hormona α -MSH (NDP-MSH) a una concentración de 10^{-7} M durante 48 horas. Para estudiar los efectos de dicho tratamiento en la función y en la biogénesis mitocondrial, se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

- Niveles de expresión de ARNm PGC1 α , TFAM, mtSSB, NRF1 y NRF2.
- Niveles proteicos de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (OXPHOS): complejo I o NADH deshidrogenasa, complejo II o succinato deshidrogenasa, complejo III o CoQ-citocromo C reductasa, complejo IV o citocromo C oxidasa y complejo V o ATP sintasa.
- Niveles proteicos de PGC1 α
- Actividad enzimática de COX (citocromo C oxidasa) y ATP sintasa

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos

Los reactivos de rutina se compraron en Roche (Barcelona, España), Sigma-Aldrich (st. Louis, MO, EEUU) y Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU). El medio Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) fue adquirido GIBCO. La hormona NDP-MSH fue cedida por la Universidad de Murcia.

3.2. Cultivo de la línea celular y tratamiento

Las líneas celulares fueron obtenidas de melanoma y fueron cedidas por la Universidad de Murcia. Se mantuvo en DMEM al 10% de fetal bovine serum (FBS) y al 1% de penicilina y estreptomocina (PS) en una atmosfera con un 5% de CO₂ a 37°C. El tratamiento fue aplicado cuando los cultivos celulares alcanzaron el 30% de confluencia (previamente se mantuvieron durante tres horas sin suero para evitar interferencias), cuando se añadió NDP-MSH, quedando a una concentración final de 10⁻⁷ M durante 48 horas.

3.3. Extracción de proteína

Para la extracción de proteína, se recogieron las células mediante scrapping en 200 µL de RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Deoxicolato de sodio, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 µM leupeptina y 10 µM pepstatina; 1 mM PMSF se añadió al final). Posteriormente, se realizó la sonicación en 3 ciclos al 40% de 7 segundos cada uno. A continuación, se centrifugó la muestra a 14000xg, 4°C durante 5 min. Se recogió el sobrenadante y se cuantificó la proteína mediante un kit BCA (*bicinchoninic acid protein assay*)²⁵.

3.4. RT-qPCR

La extracción de RNA se llevó a cabo mediante la adición de 1 mL de Tripure® (Roche, Barcelona, España), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se retrotranscribió 1 µg de RNA total a cDNA durante 60 minutos a 42 °C con la siguiente mix: 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 0,1% Tritón X-100, 2,5 mM MgCl₂, 2,5 µM de random hexamers, 10 U inhibidor de RNasa, 500 µM de cada dNTP y 25 U de retrotranscriptasa inversa MuLV. Cada cDNA obtenido se diluyó 1/10.

Se analizaron los niveles de expresión de PGC1α, TFAM, NRF1 y NRF2 con los cebadores que se especifican en la tabla 1, mediante una PCR a tiempo real basada en la tecnología SYBR Green en un termociclador LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). Se añadieron 2,5 µL de cDNA y 7,5 µL de Lightcycler® 580 SYBR Green 1 Master (conteniendo 0,5 µM de los cebadores) y se procedió a la amplificación del cDNA de la siguiente manera: ciclo de desnaturalización de 10 s a 95 °C, un ciclo de hibridación de 10 s y a la temperatura específica de cada cebador, y un ciclo de elongación de 12 s a 72 °C. Los valores Ct y las eficiencias de la reacción fueron analizados y referidos al total de DNA mediante el programa GenEx Standard (Multi-DAnalises, Suecia).

Tabla 1. Secuencia y temperaturas de hibridación de los distintos cebadores utilizados en la PCR a tiempo real.

Gen	Forward primer (5' – 3') Reverse primer (3' – 5')	Temperatura de hibridación
PGC1α	TCAgTCCTCACTggTggACA TgCTTCgTCgTCAAAAACAg	60
TFAM	AgATTggggTCgggTCACT CAAgACAgATgAAAACCACCTC	61
NRF1	CCCgTTACAgggAggTgAg TgTAgCTCCCTgCTgCATCT	60
NRF2	gCgACggaaaGaGTATgAgC gTTggCAgATCCACTggTTT	60

3.5. Electroforesis SDS-PAGE

Para la realización de la Electroforesis SDS-PAGE se cargaron 20 µg de proteína de cada lisado celular en un gel preparado al 15% de poliacrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 120 V y, una vez separadas las proteínas, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-rad). Se utilizó el Trans-Blot® Turbo™ Instrument con el protocolo de 25 V durante 10 minutos. Esta membrana fue bloqueada con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-tween (20 mM de Tris-HCl, 0,13 mM de NaCl i 0,1% de Tween 20). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: OXPPOS (Abcam, Bristol, UK) y PGC1α (Abcam, Bristol, UK). Los anticuerpos secundarios se prepararon en una disolución de leche en polvo al 2%. Las bandas fueron visualizadas con el reactivo *Immun-Star® Western C® Kit* (Bio-rad) y la señal quimioluminiscente se capturó con un densitómetro *Chemidoc XRS* (Bio-rad) y analizada con el software *Quantity one* (Bio-rad).

3.6. Actividades enzimáticas

La actividad de la COX se midió gracias a un ciclo redox con un método espectrofotométrico, en el cual el citocromo C se oxida con la molécula DAB que polimeriza y permite que seguir su formación a 450 nm. Como se observa en la Figura 6, la COX se encarga de re-oxidar el citocromo C reducido, por lo que la aparición del polímero DAB será proporcional a la actividad de COX. Se añade catalasa para eliminar el posible peróxido de hidrógeno que se pueda formar como producto secundario e interferir con la medición.

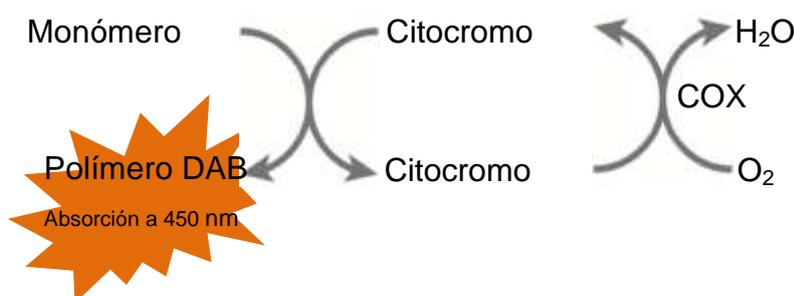


Figura 6. Ciclo de reacciones formadas en la determinación enzimática de la COX. Se observa la formación del polímero de DAB, el cual se puede medir su formación a 450 nm.

La actividad de la enzima ATPasa se midió mediante un método espectrofotométrico basado en tres reacciones acopladas. Como se ve en la Figura 7, en la primera se produce la hidrólisis del ATP en ADP y Pi por acción de la ATPasa de la muestra. En la segunda, el ADP junto al fosfoenolpiruvato (PEP) actúan de sustratos para la piruvato quinasa (PK), produciendo ATP y piruvato. Finalmente, en la tercera el piruvato es transformado en lactato por acción de la lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de NADH + H⁺, que se oxidará en NAD⁺. En este caso, se medirá la bajada de absorbancia a 340 nm por la desaparición de NADH a 37°C y en presencia de antimicina para inhibir la cadena respiratoria y así evitar interferencias.

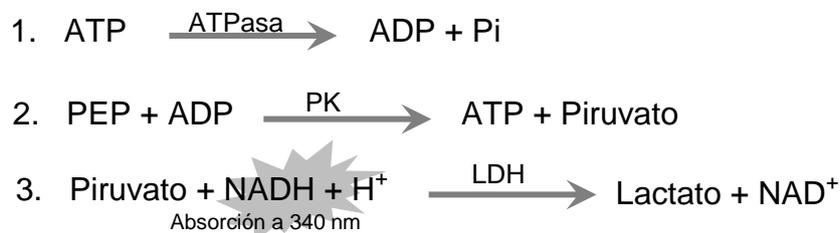


Figura 7. Serie de reacciones acopladas en la que se basa la determinación de la actividad ATPasa. Se observa como la última reacción catalizada por la

LDH permite la cuantificación de la actividad ATPasa por el descenso producido en la absorción a 340 nm por gasto de NADH.

3.7. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó en todos los casos el programa SPSS (versión 19.0). Los datos se representan como la media ± el error estándar de la media (SEM) y se referencian al valor del grupo control de A375 (excepto en el caso de las actividades enzimáticas), al que se le atribuye el valor 100 en las determinaciones de los niveles de proteína y 0 en los análisis de los niveles de expresión. Las diferencias estadísticas se analizaron con la prueba de la t de Student (P<0,05).

4. Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en las diversas determinaciones tras un tratamiento con NDP-MSH en ambas líneas tal y como se ha explicado en el apartado 2.

Para analizar la función mitocondrial, se llevó a cabo un análisis de los niveles de expresión de diversos genes mediante la técnica de la qPCR: PGC1 (considerado un *master regulator* de dicho proceso), TFAM (estimulador directo de la transcripción y replicación mitocondrial), NRF1 y NRF2 (ambos son factores relacionados con la función de la cadena respiratoria). Como se observa en la figura 8, en la línea HBL, el tratamiento con NDP-MSH provocó un aumento significativo de los niveles de expresión de PGC1 α lo que encajaría con el hecho de que dicha línea tiene el MC1R funcional y con que su activación provoca un aumento de PGC1 α . En cambio, en la línea A375 no se apreciaron cambios significativos en la expresión de dicha proteína, cosa que apoya la hipótesis expuesta ya que A375 no tiene MC1R funcional y, por tanto no se puede activar la vía de señalización mediante el tratamiento. Si comparamos los niveles de expresión entre las diferentes líneas, se observó un aumento significativo de la expresión de PGC1 α en la línea celular HBL, respecto a la línea celular A375, lo que concuerda con la hipótesis anterior. Respecto a la expresión de TFAM, también se apreció un aumento significativo en las muestras tratadas de la línea HBL de igual manera que ocurría con PGC1 α , lo cual podría deberse a la regulación que ejerce dicha proteína sobre TFAM. También se encontraron variaciones entre ambas líneas celulares, en concreto un aumento en la línea HBL respecto a A375 que fue significativo en el caso de las muestras tratadas. Esto podría deberse al hecho de que la línea HBL tenga el receptor MC1R funcional, lo que permitiría una mayor expresión en PGC1 α de manera basal y especialmente en respuesta a la activación del receptor. Dicha activación induciría la expresión de toda una serie de genes, entre los que se encuentra TFAM, que pondrían en marcha la biogénesis mitocondrial.

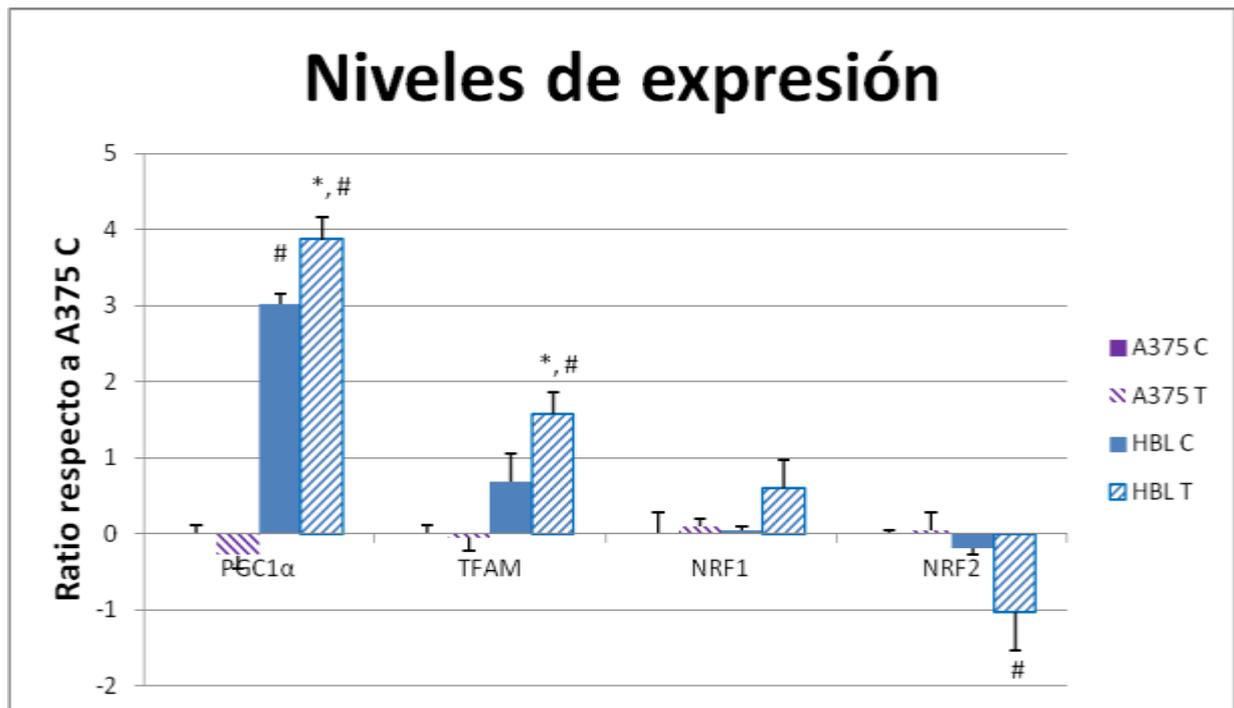


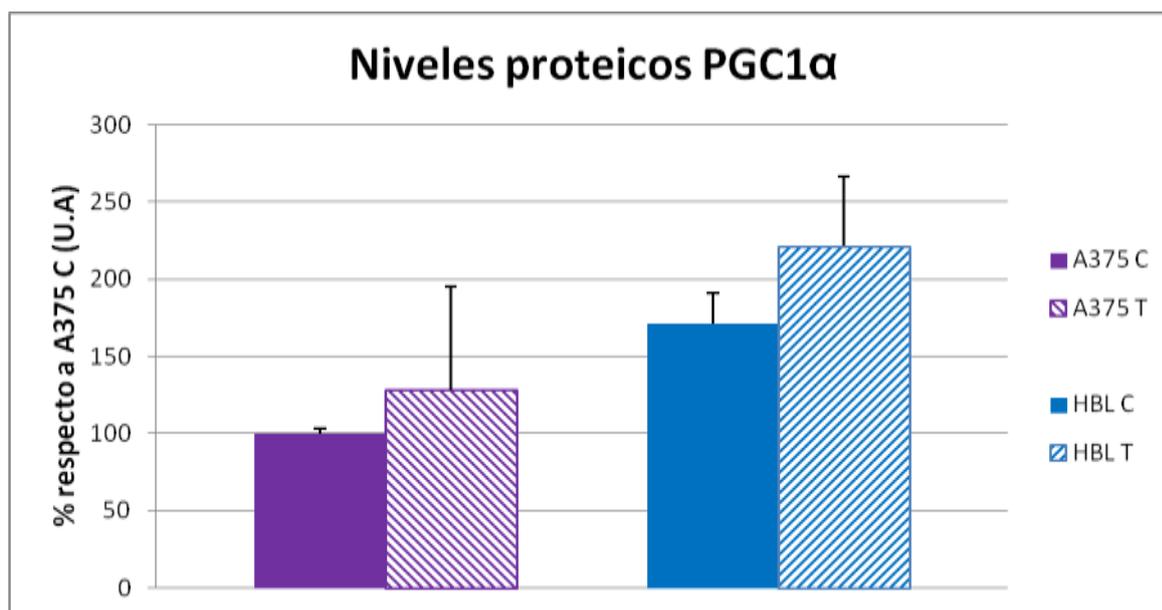
Figura 8. Representación gráfica de los niveles de expresión de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial. Figura que muestra los niveles de expresión de PGC1α, TFAM, NRF1 y NRF2 (genes relacionados con la función mitocondrial) en las líneas celulares HBL (MC1R funcional) y A375 (MC1R no funcional) tras un tratamiento con NDPH. Los datos se expresan según el número de aumentos o disminuciones respecto a la línea A375 control.

* Diferencias significativas respecto a la muestra control de la misma línea (p -valor = 0.05).

Diferencias significativas de la muestra HBL respecto a la línea A375 (p -valor = 0.05).

En cuanto a los factores de respiración nuclear (NRFs), acorde con lo dicho hasta el momento, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras tratadas y no tratadas de la línea A375. En el caso de NRF1, se vio un aumento en las muestras de la línea HBL tratadas respecto a las demás muestras. En cambio, esta misma muestra, tuvo una expresión significativamente menor de NRF2 que el resto.

Por lo que a niveles proteicos respecta, en la figura 9 se pueden ver los resultados obtenidos en PGC1α. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre tratamiento, sí que se observó una tendencia al alza en la línea HBL respecto a A375, cosa que se correspondería con el aumento de su expresión visto en los resultados anteriores.



Fig

Figura 9. Representación gráfica de los niveles de proteína de PGC1α. Gráfico en el que se representan los niveles proteicos de PGC1α en las líneas celulares HBL (MCR1 funcional) y A375 (MCR1 no funcional). Los niveles de proteína se expresan en porcentaje respecto la línea A375 no tratada.

* Diferencias significativas respecto a la muestra control de la misma línea (p -valor = 0.05).

Diferencias significativas de la muestra HBL respecto a la línea A375 (p -valor = 0.05).

En cuanto a los niveles proteicos de OXPHOS, que se muestran en la figura 10, se advirtieron diferencias significativas sobre todo en los complejos II y III. En el complejo II se vieron diferencias significativas entre líneas, con mayores niveles en la línea HBL. De la misma manera, en la línea HBL control también se observó un aumento significativo del complejo III mientras que en la tratada, pese a no aumentar significativamente los niveles proteicos de OXPHOS, sí se apreció una tendencia al alza. Esto podría deberse a lo comentado anteriormente, ya que la funcionalidad del receptor de la línea HBL podría tener un papel en la mayor expresión de PGC1α vista en los resultados anteriores, que a su vez podría inducir una mayor expresión de OXPHOS, en este caso en los complejos II y III.

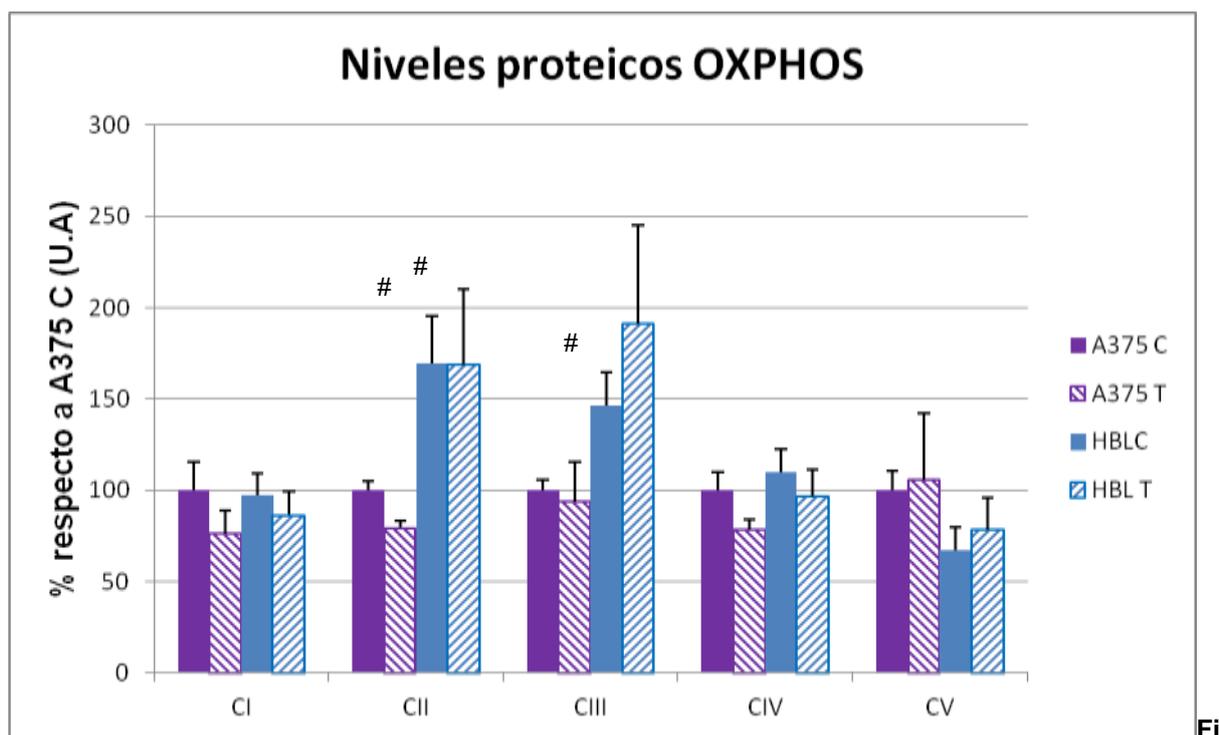


Figura 10. Representación gráfica de los niveles de proteína de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Figura en la que muestran los niveles de proteína de OXPHOS en las líneas A375 (MC1R no funcional) y HBL (MC1R funcional). Los datos se expresan en porcentaje respecto a la línea A375 no tratada.

* Diferencias significativas respecto a la muestra control de la misma línea (p -valor = 0.05).

Diferencias significativas de la muestra HBL respecto a la línea A375 (p -valor = 0.05).

Por otro lado, en la figura 11, se representan los resultados obtenidos en la determinación de la actividad enzimática de la COX. En este caso, no se observaron diferencias significativas causadas por el tratamiento aunque sí se apreció un aumento significativo de la actividad en las muestras control HBL respecto a las muestras no tratadas de la línea A375. Además, valorando los datos en conjunto se puede advertir una tendencia al alza, pese a no ser significativa, de la actividad de esta enzima en las muestras de la línea HBL respecto a las de la línea A375. Este aumento en conjunto con el de los niveles de los complejos II y III expuesto en anteriores resultados, podrían estar orientados a mejorar la función mitocondrial y estarían inducidos por PGC1 α , ya que es un regulador maestro de la biogénesis mitocondrial.

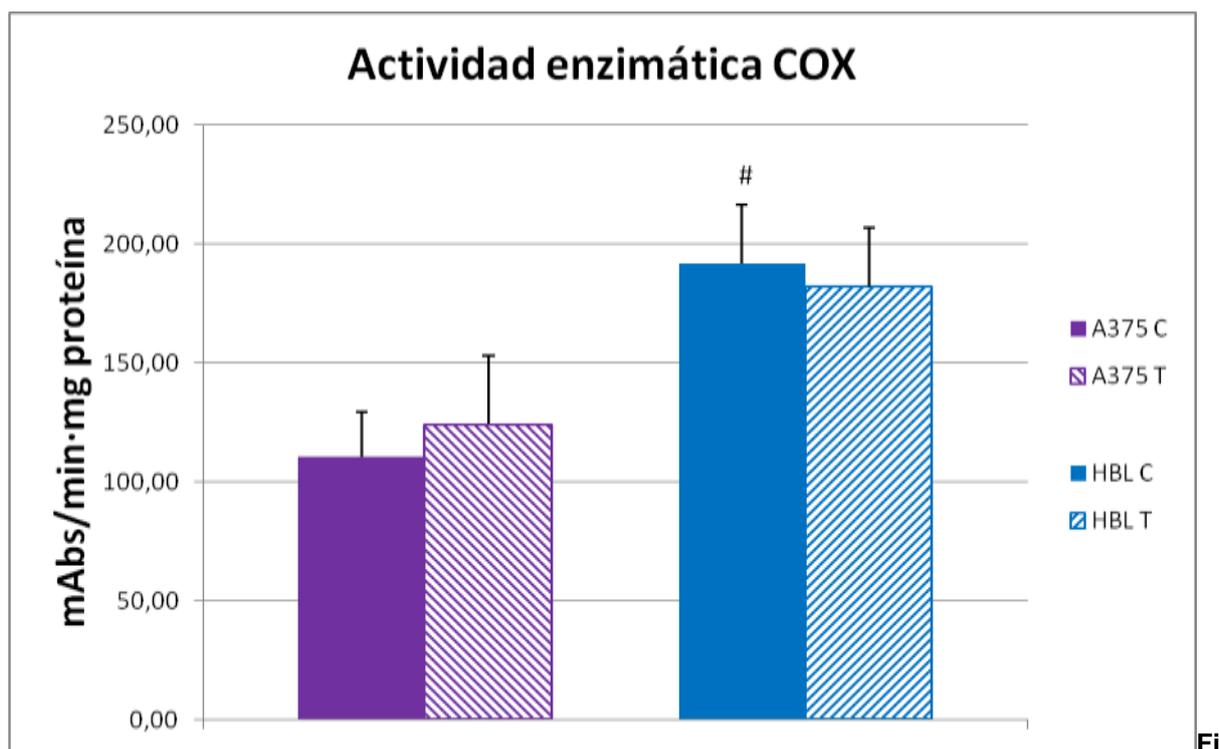


Figura 11. Representación gráfica de la actividad enzimática del citocromo C oxidasa. Imagen que representa de manera gráfica la actividad de la enzima citocromo oxidasa C (COX) en las líneas A375 (MC1R no funcional) y HBL (MC1R funcional). La actividad se expresa en mAbs/min·mg de proteína.

* Diferencias significativas respecto a la muestra control de la misma línea (p -valor = 0.05).

Diferencias significativas de la muestra HBL respecto a la línea A375 (p -valor = 0.05).

En cuanto a los resultados obtenidos en la determinación de la actividad enzimática de la ATPasa, expuestos en la figura 12, se apreciaron diferencias significativas entre líneas. En este caso, al contrario que sucedía con los niveles proteicos ya comentados, se pudo ver una disminución significativa de la actividad en la línea HBL, lo cual podría indicar que necesitan más ATP para poder hacer frente a las demandas energéticas.

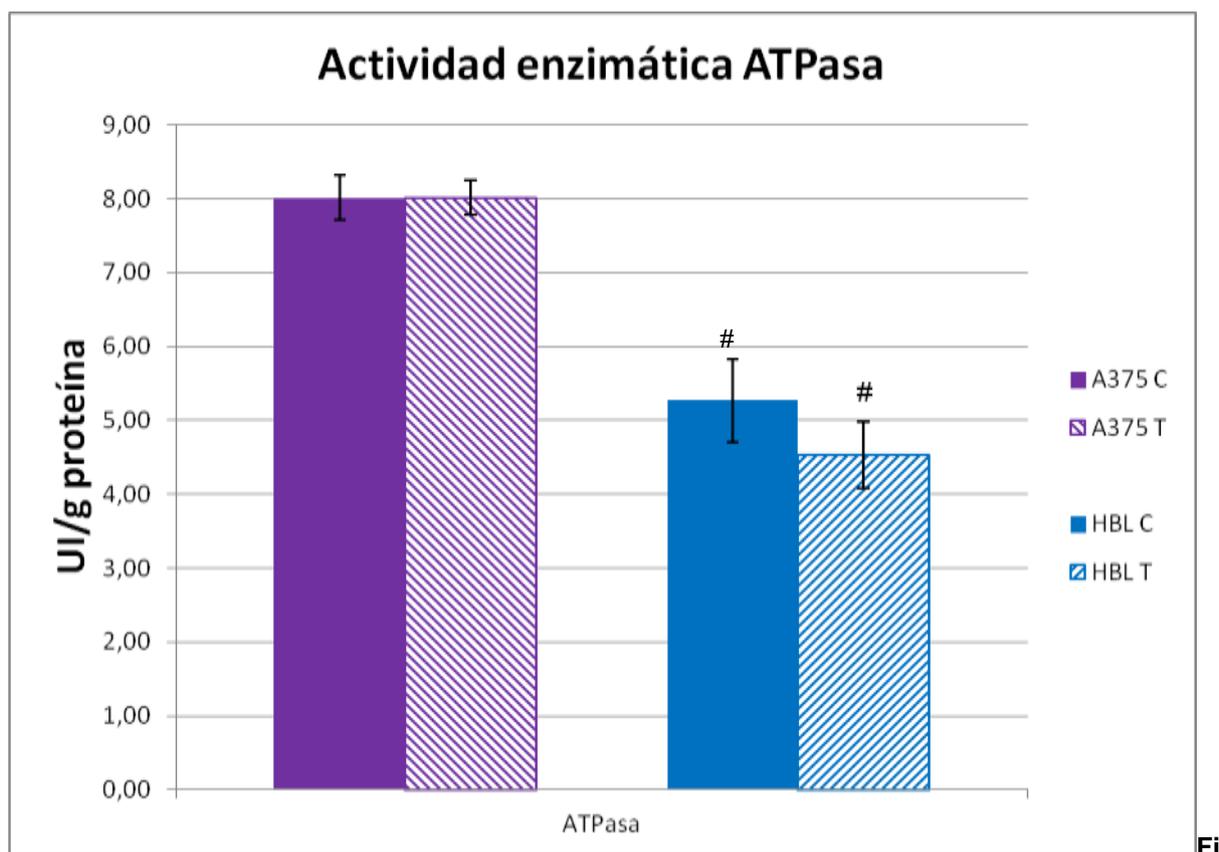


Figura 12. Representación gráfica de la actividad enzimática de la ATP sintasa. Gráfico que muestra la actividad de la enzima ATPasa, expresada en UI/g de proteína, en las líneas A375 (MC1R no funcional) y HBL (MC1R funciona).

* Diferencias significativas respecto a la muestra control de la misma línea (p -valor = 0.05).

Diferencias significativas de la muestra HBL respecto a la línea A375 (p -valor = 0.05).

5. Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran el papel clave que tiene MC1R en los melanomas mediante la activación que provoca de PGC1 α , un regulador maestro de la biogénesis mitocondrial. De esta manera, las células que tengan MC1R funcional, podrían mejorar su cadena respiratoria para hacer frente a diferentes tipos de estrés. Esto podría usarse en el tratamiento de melanomas, ya que aquellos que tuvieran este receptor funcional tendrían una mayor resistencia a ciertos tratamientos y por lo tanto se podría tratar el tumor desde un primer momento con procedimientos más efectivos.

6. Bibliografía

1. WHO | World Health Organization. at <<http://www.who.int/en/>>
2. Globocan 2012. at <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>
3. Asociación Española Contra el Cáncer. at <<https://www.aecc.es>>
4. American Cancer Society | Statistics Center. at <<https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#/>>
5. Clegg, L. X. Impact of Reporting Delay and Reporting Error on Cancer Incidence Rates and Trends. *CancerSpectrum Knowl. Environ.* **94**, 1537–1545 (2002).
6. Lo, J. A., Fisher, D. E. & Hospital, M. G. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science (80-.)*. **346**, 945–949 (2014).
7. Lanoy, E. [Epidemiology, risk factor and screening for melanoma and other skin cancers]. *Rev. Prat.* **64**, 31–6 (2014).
8. D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. & Scott, T. UV radiation and the skin. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 12222–12248 (2013).
9. Williams, M. L. & Sagebiel, R. W. Melanoma risk factors and atypical moles. *West. J. Med.* **160**, 343–350 (1994).
10. American Cancer Society. at <<http://www.cancer.org/index>>
11. Balch, C. M. *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6199–6206 (2009).
12. Miller, A. J. & Mihm, M. C. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **355**, 51–65 (2006).
13. Shoag, J. *et al.* PGC-1 Coactivators Regulate MITF and the Tanning Response. *Cell* **49**, 145–157 (2014).
14. Choi, J. & Jee, J. G. Repositioning of thiourea-containing drugs as tyrosinase

- inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 28534–28548 (2015).
15. Chin, L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 559–70 (2003).
 16. Kang, C. & Ji, L. L. Role of PGC-1 alpha signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1271**, 110–117 (2012).
 17. Maresca, V., Flori, E. & Picardo, M. Skin phototype: A new perspective. *Pigment Cell Melanoma Res.* (2015). doi:10.1111/pcmr.12365
 18. Scarpulla, R., Vega, R. & Kelly, D. Transcriptional Integration of Mitochondrial Biogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 459–466 (2012).
 19. Scarpulla, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 1269–1278 (2011).
 20. Hsu, Y., Li, L. & Fuchs, E. The Warburg Effect: Evolving Interpretations Of An Established Concept. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 847–856 (2015).
 21. Ma, Q. *et al.* PGC1 α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. *Cancer Cell* **27**, 14299–14307 (2013).
 22. National Center for Biotechnology information - ClinVar: NM_002386.3(MC1R):c.451C>T (p.Arg151Cys). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/14312/>>
 23. The European Bioinformatics Institute - InterPro: Melanocyte-stimulating hormone receptor (Q01726). at <<http://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/Q01726>>
 24. The European Bioinformatics Institute - InterPro: GPCR, rhodopsin-like, 7TM (IPR017452). at <<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR017452>>
 25. Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).