



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA

**Interacciones Funcionales entre el Receptor
de Melanocortinas 1, β -Arrestinas y
Mahogunina.**

D^a Marta Abrisqueta González

2015

UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e
Inmunología



**INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE EL RECEPTOR
DE MELANOCORTINAS 1, β -ARRESTINAS Y
MAHOGUNINA.**

Memoria presentada por
Marta Abrisqueta González
para optar al grado de Doctora por
la Universidad de Murcia

Murcia, Diciembre 2015



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología

Facultad de Medicina. Campus de Espinardo, Murcia.

Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias. Campus de CC de la Salud, El Palmar, Murcia.

Doña **Concepción Olivares Sánchez**, Profesora Contratada Doctora de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Doña **Celia Jiménez-Cervantes Frigols**, Profesora Titular de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, y Don **José Carlos García-Borrón Martínez**, Catedrático de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología,

AUTORIZAN

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Interacciones funcionales entre el receptor de melanocortinas 1, β -arrestinas y mahogunina**”, realizada por Doña **Marta Abrisqueta González** bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, y que presenta para la obtención del grado de Doctora por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 4 de diciembre de 2015

Fdo Concepción Olivares

Celia Jiménez-Cervantes

José Carlos García-Borrón

El trabajo experimental expuesto en esta Tesis Doctoral ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación con cargo al Proyecto SAF2009-10942 y por el Ministerio de Economía y Competitividad con cargo al Proyecto SAF2012-32134.

Marta Abrisqueta González ha disfrutado de una beca del Programa de Formación del Personal Investigador de la Fundación Séneca (12422/FPI/09).

Algunos de los resultados obtenidos han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

ARTÍCULOS

1. **Abrisqueta M**, Herraiz C, Pérez-Oliva AB, Sánchez-Laorden BL, Olivares C, Jiménez-Cervantes C, García-Borrón JC.

Differential and competitive regulation of human melanocortin 1 receptor by beta-arrestin isoforms.

Journal of Cell Science, 2013, 126 (Pt16): 3724-37

COMUNICACIONES A CONGRESOS

1. *Structural and functional characterization of MGRN1 isoforms expressed in human melanoma cells. Effects on the cAMP and ERK1/2 signalling pathways.*

Pérez-Oliva, AB; **Abrisqueta, M**; Olivares, C; Herraiz, C; García-Borrón, JC; Jiménez-Cervantes, C. 34TH FEBS Congress. Praga (República Checa), 2009.

2. *New insights into post-receptor signalling of MC1R.* Pérez-Oliva, AB; Olivares, C; **Abrisqueta, M**; García-Borrón, JC; Jiménez-Cervantes, C. 15th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research. Munich (Alemania), 2009.

3. *MGRN1 inhibits MC1R functional coupling and provides a new pathway for signalling to the nucleus.* Pérez-Oliva, AB; Olivares, C; **Abrisqueta, M**; García-Borrón, JC; Jiménez-Cervantes, C. XIII Congress of the Sociedad Española de Biología Celular. Murcia (España), 2009.

4. *Regulation of human melanocortin 1 receptor (MC1R) signalling by β -arrestins.* Pérez-Oliva, AB; Olivares, C; Abrisqueta, M; Jiménez-Cervantes, C; García-Borrón, J.C. XXIst International Pigment Cell Conference (IPCC) "Skin and Other Pigment Cells: Bridging Clinical Medicine and Science". Burdeos (Francia), 2011.

5. *Mahogunin Ring Finger 1 may contribute to MC1R-dependent ubiquitylation of β -arrestins.* **Abrisqueta, M**; Olivares, C; Pérez-Oliva, AB; Herraiz, C; García-Borrón, JC; Jiménez-Cervantes, C. 17th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research. Ginebra (Suiza), 2012.

6. *Functional interactions of human melanocortin 1 receptor, cytosolic arrestin isoforms and the E3 ubiquitin ligase Mahogunin Ring Finger 1.* **Abrisqueta, M**; Olivares, C; Pérez-Oliva, AB; Herraiz, C; García-Borrón, JC; Jiménez-Cervantes, C. 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress. Sevilla (España), 2012.

7. *Human melanocortin 1 receptor (MC1-R)-mediated ubiquitylation and proteolysis of nonvisual arrestins.* **Abrisqueta, M**; Olivares, C; Sirés Campos J; García-Borrón, JC; Jiménez-Cervantes, C. XXII International Pigment Cell Conference. Singapur, 2014.

8. *Functional Interactions of β -arrestin isoforms and human melanocortin 1 receptor.* **Abrisqueta, M**; Olivares, C; Sirés Campos J; Castejón M; Herraiz, C; García-Borrón, JC; Jiménez-Cervantes, C. 38th FEBS Congress. Valencia (España), 2015.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. LA PIEL Y EL SISTEMA PIGMENTARIO.....	7
1.1. Estructura de la piel.....	7
1.2. Melanocitos.....	8
1.3. Melanosomas y melanina. Vía de Raper-Mason.....	10
2. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRS).....	12
2.1. Características generales de los GPCRS.....	12
2.2. Función de los GPCRS.....	14
2.3. Subfamilia de los receptores de melanocortinas (MCRs).....	15
2.3.1. Melanocortinas.....	16
2.3.2. Características generales de los MCRs.....	17
3. RECEPTOR DE MELANOCORTINAS 1 (MC1R).....	17
3.1. Estructura del MC1R.....	17
3.1.1. Extremo N-terminal.....	18
3.1.2. Bucles extracelulares.....	18
3.1.3. Bucles intracelulares.....	19
3.1.4. Fragmentos transmembrana.....	19
3.1.5. Extremo C-terminal.....	20
3.2. Señalización aguas abajo del MC1R.....	21
3.3. Agonismo inverso y actividad constitutiva del MC1R.....	23
3.4. Variantes alélicas y procesamiento alternativo de <i>MC1R</i>	23
3.5. Regulación de la función del MC1R.....	24
3.6. Desensibilización homóloga e internalización.....	25

4. FAMILIA DE LAS ARRESTINAS. β-ARRESTINAS.....	26
4.1. Clasificación de las arrestinas.....	26
4.2. β -Arrestinas (ARRBs).....	26
4.3. Estructura de las ARRBs.....	27
4.4. Función de las ARRBs.....	30
4.5. Regulación de la actividad de las ARRBs.....	32
4.5.1. Fosforilación.....	32
4.5.2. N-nitrosilación.....	32
4.5.3. Ubiquitinación.....	32
4.5.4. SUMOilación.....	33
5. MGRN1: PROTEÍNA ACCESORIA DE LA SEÑALIZACIÓN POR MCs.....	34
5.1. Isoformas de MGRN1.....	35
5.2. Mecanismo de actuación y localización subcelular.....	35
5.3. Función de MGRN1.....	36
6. VÍA UBIQUITINA-PROTEASOMA.....	37
OBJETIVOS.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. REACTIVOS Y MATERIALES.....	57
2. LÍNEAS DE CULTIVO CELULARES Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	58
2.1. Líneas y cultivos celulares.....	58
2.2. Obtención de extractos celulares.....	59

3. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS Y ESTABLES.....	60
3.1. Transfección transitoria de ADN plasmídico.....	60
3.2. Transfección transitoria de ARN pequeño de interferencia.....	61
3.3.. Transfección estable en células HBL.....	61
4. ELECTROFORESIS ANALÍTICA DE PROTEINAS (SDS-PAGE).....	62
5. TRANSFERENCIA WESTERN.....	63
6. INMUNOPRECIPITACIÓN.....	65
7. ENSAYO DE ACOPLAMIENTO FUNCIONAL.....	66
7.1. Estimulación y extracción de AMPc.....	66
7.2. Ensayo de AMPc.....	67
8. ENSAYO DE UNIÓN HORMONA-RECEPTOR E INTERNALIZACIÓN.....	68
9. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN.....	68
10. SÍNTESIS DE ADNc.....	69
11. PCR A TIEMPO REAL (qPCR).....	69
12. OBTENCIÓN DE MUTANTES POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA...	75
13. PCR CONVENCIONAL Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	77

14. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	78
15. MICROSCOPIA.....	78
15.1. Microscopía óptica.....	78
15.2. Microscopía confocal.....	79
15.2.1. Tinción inmunológica.....	79
15.2.2. Adquisición de imágenes.....	79
16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	80
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
Capítulo 1	
Regulación diferencial de MC1R por ARRBs en su entorno fisiológico.....	85
Capítulo 2	
Consecuencias funcionales de la formación de complejos MC1R-ARRB.....	111
Capítulo 3	
Papel de mahogunina en la ubiquitinación de ARRBs dependiente de MC1R.....	149
Capítulo 4	
Estudio de nuevas dianas de MGRN1. Análisis mediante la tecnología de hibridación diferencial de micromatrices de ADN..	167
CONCLUSIONES.....	197
APÉNDICE.....	201

ABREVIATURAS

En la siguiente relación se definen las abreviaturas utilizadas en esta Memoria. Siguiendo el criterio internacional, los símbolos de los genes y proteínas humanos se escriben con mayúsculas, y los de ratón con minúsculas.

AC: adenilato ciclasa	ERK: quinasa regulada por señales extracelulares
ACTH: hormona adenocorticotropa	FSK: forskolina
ADN: ácido desoxirribonucleico	G418: geneticina
AMPc: adenosina 3'-5'-monofosfato	GFP: proteína verde fluorescente
ARRB: β -arrestina	GPCR: receptor acoplado a proteína G
AP2: proteína adaptina 2	GRK: quinasa de receptores acoplados a proteína G
ARN: ácido ribonucleico	IQ: indol-5,6-quinona
ARNm: ARN mensajero	IQCA: ácido indol-5,6-quinona-2-carboxílico
ASP/ASIP: proteína de señalización agoutí	IL: bucle intracelular
BSA: albúmina de suero bovino	MCR: Receptor de melanocortinas
CRE: elemento de respuesta al AMPc	MGRN1: mahogunina o Mahogunin RING-finger.
CREB: proteína de unión a elementos sensibles a AMPc	MITF: factor de transcripción asociado a microphthalmia
cpm: cuentas por minuto	αMSH: hormona estimulante del melanocito alfa
DCT: dopacromo tautomerasa	NDP-MSH: [Nle ⁴ ,D-Phe ⁷] α MSH
DHI: 5,6-dihidroxiindol	NHM: melanocitos normales humanos
DHICA: ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico	PBS: tampón fosfato salino
DQ: L-dopaquinona	PKA: proteína quinasa A
DMEM: medio mínimo esencial modificado por Dulbecco	PKC: proteína quinasa C
EDTA: ácido etilendiaminotetracético	PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
EL: bucle extracelular	

POMC: Proopiomelanocortina

RHC: fenotipo “Red Hair Colour”

SBF: Suero bovino fetal

SDS: dodecil sulfato sódico

siARN: ARN pequeño de interferencia

TBS: tampón tris salino

TEMED: N,N,N',N'-
tetrametilendiamina

TGS: tampón tris glicina SDS

TM: fragmento transmembrana

TPA (PMA): forbol-12-miristato-13-
acetato

TUBB3: tubulina β 3

UV: ultravioleta

INTRODUCCIÓN

1. LA PIEL Y EL SISTEMA PIGMENTARIO.

1.1. Estructura de la piel.

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano. Tiene una superficie total de aproximadamente 2 m² en adultos y un grosor variable entre 0.4 mm en los párpados y 4 mm en el talón.

La piel es extremadamente importante por la multiplicidad de funciones que desempeña: juega un papel crucial en la protección del organismo contra agentes externos, siendo la primera línea de defensa contra factores físicos y químicos, así como también contra agentes infecciosos y alergénicos ¹. La piel es también un órgano sensorial que permite la comunicación con el medio ambiente ya que contiene receptores para el dolor, el tacto y la temperatura, y tiene alguna función metabólica, como la síntesis de vitamina D.

Desde fuera hacia dentro se distinguen tres capas de tejido cuyo origen embriológico es totalmente distinto (**Fig. 1**):

- epidermis
- dermis
- hipodermis o tejido subcutáneo

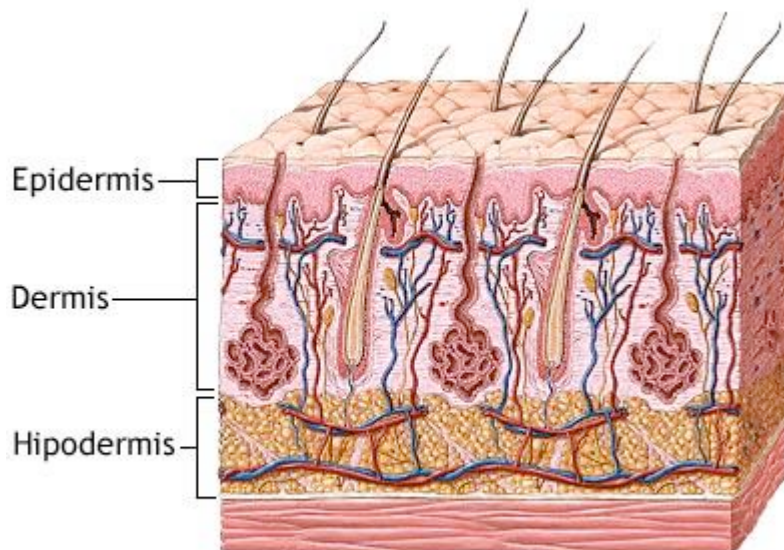


Figura 1. Estructura de la piel. Representación esquemática donde se ilustran las capas principales de la piel.

La **epidermis** es la capa más externa de la piel. Es un epitelio plano poliestratificado y queratinizado que cubre la totalidad de la superficie corporal y en el que podemos encontrar distintos tipos celulares ²: entre el 80 y el 90% de las células epidérmicas son queratinocitos que aumentan su grado de diferenciación y disminuyen su capacidad proliferativa conforme ascienden por los distintos estratos que constituyen la epidermis ³. Son, además, los responsables de sintetizar la queratina. Los melanocitos representan un 10% y son células altamente especializadas encargadas de la síntesis de melanina, pigmento que da color a la piel y confiere protección frente a la radiación ultravioleta (UV). El resto de tipos celulares lo forman las células de Langerhans, que provienen de la médula ósea y que más tarde migran a la piel, donde forman parte del sistema inmunitario, y las células de Merkel, células neuro-endocrinas que actúan como receptores sensoriales cutáneos.

La **dermis** es la capa intermedia de la piel. Proporciona soporte, resistencia y elasticidad. Es un tejido fibroelástico formado principalmente por fibroblastos, con una elevada proporción de fibras, no muy compactadas, de colágeno (>75%), elastina y reticulina. Es un tejido muy vascularizado que sirve de soporte a la epidermis y constituye la mayor masa de la piel, con un grosor máximo de 5 mm. En condiciones normales está desprovista de melanocitos.

La **hipodermis** o capa subcutánea es la capa más profunda de la piel. Está constituida por tejido conectivo laxo y tejido adiposo que sirve como almacén de energía, además de aislante térmico y de protector mecánico frente a los impactos.

1.2. Melanocitos.

Los melanocitos son células muy especializadas que derivan de la cresta neural. Se originan durante el desarrollo embrionario como precursores no pigmentados denominados melanoblastos. Posteriormente, migran hacia la piel donde se diferencian a melanocitos maduros y adquieren la maquinaria completa para la síntesis y transferencia de melanina ^{4,5}. La densidad de melanocitos es variable dependiendo de la región anatómica, pero es muy constante entre los individuos de diferentes razas.

En condiciones normales, los melanocitos se localizan en la capa basal de la epidermis, donde presentan una morfología dendrítica. Su principal función es la síntesis de melanina, un pigmento fotoprotector que transfieren a los queratinocitos circundantes a través de sus dendritas ⁶. La melanina se distribuye de manera uniforme por las distintas capas de queratinocitos que conforman la epidermis

constituyendo así una barrera protectora homogénea y eficaz contra la radiación UV. La asociación funcional y estructural que se establece entre melanocitos y queratinocitos se denomina unidad melano-epidérmica y en ella se estima que cada melanocito está en contacto con unos 40 queratinocitos de la zona más interna de la epidermis ⁴ (**Fig. 2**). Los queratinocitos, a su vez, contribuyen a la regulación del grado de diferenciación y proliferación de los melanocitos secretando factores que actúan de forma paracrina, tales como endotelina-1, péptidos derivados de proopiomelanocortina (POMC), o el ligando del receptor cKIT (KITL o SCF). La liberación de estos factores paracrinos por los queratinocitos varía bajo ciertas condiciones como el nivel de irradiación con luz UV ⁷.

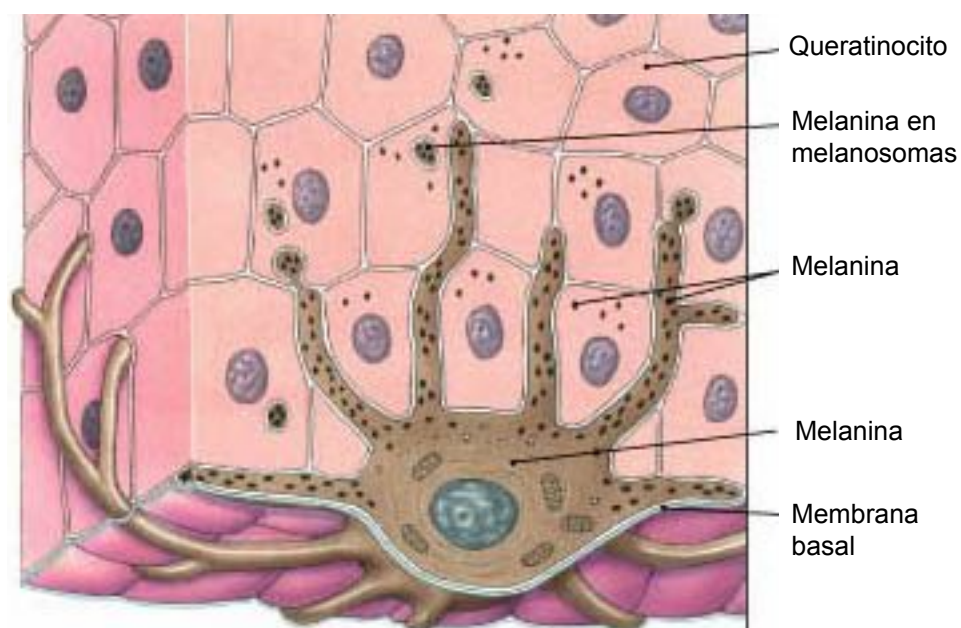


Figura 2. Unidad melano-epidérmica. Detalle de un melanocito en contacto con queratinocitos circundantes en la epidermis de la piel.

La transformación maligna de los melanocitos conduce a un tipo de cáncer de piel denominado melanoma. Normalmente este proceso de malignización se produce como consecuencia de mutaciones debidas a daño en el ADN inducidas por radiación UV ⁴, aunque también influyen factores endógenos ⁸. El melanoma familiar es el menos frecuente: constituye únicamente el 10% de los casos diagnosticados y se relaciona con la mutación de dos genes importantes en el control de la división celular (*CDKN2A* y *CDK4*). En el melanoma esporádico son frecuentes, sin embargo, mutaciones en genes que codifican proteínas de la vía de señalización de las ERKs, clave en la proliferación celular del melanocito.

En los últimos años se ha producido un crecimiento exponencial de los casos de melanoma ⁹: es el quinto tipo de cáncer más común en hombres y el tercero más común en mujeres por debajo de los 35 años. Es además un tipo de cáncer muy agresivo, responsable del 80% de las muertes por cáncer de piel aunque solo representa el 4% de este tipo de tumores.

1.3. Melanosomas y melanina. Vía de Raper-Mason.

La principal característica de los melanocitos es su capacidad de producir melanina. La síntesis y el acúmulo de este pigmento tiene lugar en unos órganos especializados denominados melanosomas. Los melanosomas son, desde un punto de vista biogénético, orgánulos subcelulares relacionados con los lisosomas ¹⁰ que atraviesan varias etapas de maduración antes de ser transferidos a los queratinocitos. Se han identificado cuatro etapas o estadíos: durante las etapas I y II los melanosomas carecen aún de pigmentos en su interior y su contenido pasa de ser una matriz de estructura relativamente amorfa a una matriz fibrilar. Durante la etapa III empieza a haber una deposición progresiva de melanina y cuando se alcanza el estadio IV el melanosoma es completamente maduro y está lleno de melanina, lo que hace que sea muy electrondenso cuando se observa con el microscopio electrónico ^{11,12} (**Fig. 3**).

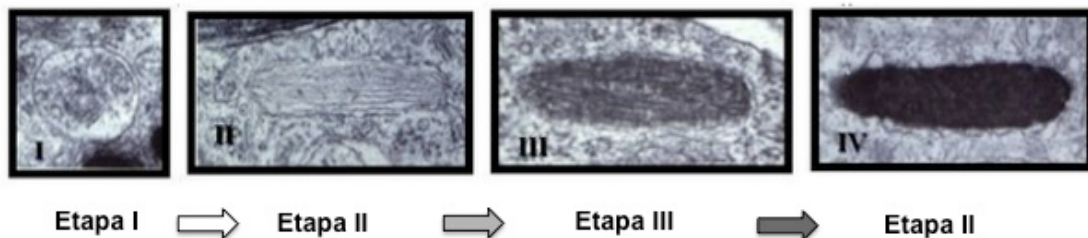


Figura 3. Formación de los melanosomas. Imágenes tomadas con microscopio electrónico de un melanosoma en diferentes estados de maduración.

La síntesis de melanina o melanogénesis tiene lugar a través de una vía enzimática compleja denominada Vía de Raper-Mason (**Fig. 4**). La enzima clave de esta vía es *tirosinasa* que cataliza las dos primeras etapas que son las limitantes del proceso. La vía se inicia con la oxidación de L-tirosina a L-dopa, un intermedio que se oxida rápidamente a L-dopaquinona. Este compuesto es el primer punto de ramificación de la melanogénesis y conduce a la formación de los dos tipos principales de pigmento en animales: eumelaninas y feomelaninas ¹³. Las eumelaninas tienen un color marrón o negro y una alta capacidad fotoprotectora,

mientras que las feomelaninas tienen un color rojizo-amarillento y no protegen eficazmente contra la radiación UV.

En condiciones de alto contenido en compuestos con grupos tiólicos libres (por ejemplo glutatión reducido o el aminoácido L-cisteína) se produce una rápida conjugación entre L-dopaquinona (DQ) y el grupo tiol, que conduce a la formación de cisteinildopa. Este intermedio sufre una serie de reordenamientos estructurales, se oxida y da finalmente una estructura cíclica de benzotiazilalanina, que es la estructura base de las feomelaninas ¹⁴. Por el contrario, cuando el contenido en grupos sulfhidrilo es bajo, la ruta favorecida es la de formación de eumelaninas. En una sucesión de reacciones espontáneas, la L-dopaquinona se transforma en L-dopacromo (DC), que constituye un segundo punto de ramificación de la vía. Por un lado puede sufrir un descarboxilación espontánea para formar 5,6-dihidroxiindol (DHI), o puede reorganizarse rápidamente para formar ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA), un intermedio mucho más estable, por acción de la enzima *dopacromo tautomerasa* (DCT o Tyrp2). Es importante resaltar que dentro de los eumelanosomas siempre habrá una mezcla de DHI y DHICA cuya proporción vendrá determinada por el nivel de actividad de DCT ¹⁵. Las etapas siguientes de la vía están poco caracterizadas pero incluyen varias reacciones de oxidación y polimerización que dan finalmente indol-5,6-quinona (IQ) y ácido indol-5,6-quinona-2-carboxílico (IQCA) que se van incorporando al polímero melánico creciente ^{16,17}.

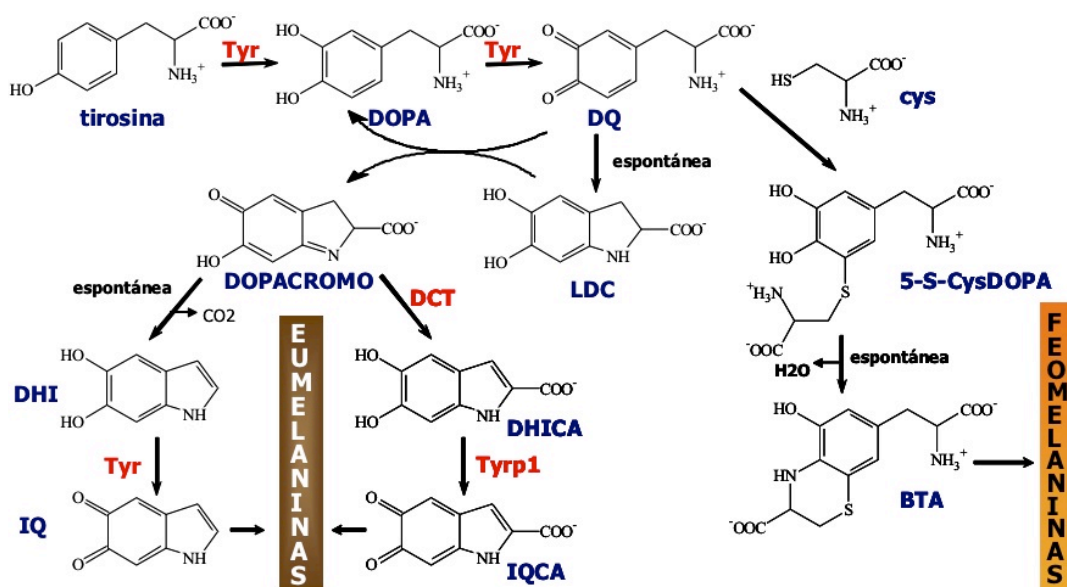


Figura 4. Vía de Raper Mason. Esquema general de la ruta enzimática que da lugar a la formación de eumelaninas y feomelaninas, con las principales enzimas marcadas en rojo.

La melanogénesis depende de una gran variedad de factores que modulan la función de los melanocitos a distintos niveles. Entre estos se incluyen los factores que afectan a:

- la migración y desarrollo del melanoblasto durante la embriogénesis.
- la supervivencia y proliferación del melanocito.
- la diferenciación del melanocito en respuesta a estímulos ambientales con un incremento de la velocidad de biosíntesis del pigmento melánico.
- la distribución de los gránulos de melanina y subsecuente transferencia a los queratinocitos.

Hasta la fecha se han identificado más de 120 genes que afectan estos procesos, de forma directa o indirecta, de los cuales se han clonado y caracterizado aproximadamente el 50% ¹⁸. Uno de estos genes codifica para el denominado receptor de melanocortinas 1 (MC1R), un receptor acoplado a proteínas G presente en la membrana del melanocito y que estudiaremos en profundidad en el siguiente apartado dada su gran importancia en la regulación de la melanogénesis.

2. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs).

2.1. Características generales de los GPCRs.

Los receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled receptors* o *GPCRs*) están presentes en casi todos los organismos, incluidos los insectos y las plantas ¹⁹. Se estima que aproximadamente el 1-3% del genoma humano codifica para más de 1000 miembros de esta familia ²⁰ lo que los convierte en la mayor familia de receptores de superficie celular en eucariotas ²¹. Deben su nombre a su capacidad para reclutar y regular la actividad de una proteína intracelular heterotrimérica denominada proteína G como parte central del mecanismo de transducción de señales ²².

Los GPCRs se activan por una amplia variedad de ligandos: neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento, moléculas odorantes, luz, Ca^{2+} , aminoácidos, nucleótidos y péptidos ²⁰. Participan, por tanto, en la regulación de numerosas funciones vitales como neurotransmisión, secreción de glándulas endocrinas y exocrinas, exocitosis, foto y quimiorrecepción, quimiotaxis, presión sanguínea, función plaquetaria, embriogénesis, angiogénesis, regeneración tisular y

crecimiento celular normal o aberrante ²³. Además, más del 30% de los medicamentos tienen como diana este tipo de receptores ^{24,25}.

Todos los GPCRs comparten una estructura específica común constituida por siete secuencias de aminoácidos, predominantemente hidrofóbicos, que forman otras tantas hélices α que atraviesan la membrana. Estas hélices α están separadas por secuencias de aminoácidos hidrofílicos que dan lugar a tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares ²² (**Fig. 5**). Debido a esta estructura común se les conoce también como "receptores de 7 hebras". La longitud y secuencia de los bucles conectores y de los extremos terminales es muy variada y da lugar a distintas clases de GPCRs.

En base a la naturaleza farmacológica de los ligandos y a la homología de su secuencia, la superfamilia de los GPCRs se ha dividido en tres clases mayoritarias (A, B y C) y otras dos minoritarias (D y E) que en su conjunto engloban alrededor de 173 familias y subfamilias. Dentro de cada clase, las secuencias comparten más de un 25% de identidad en las regiones transmembrana, y además aparecen residuos y motivos altamente conservados.

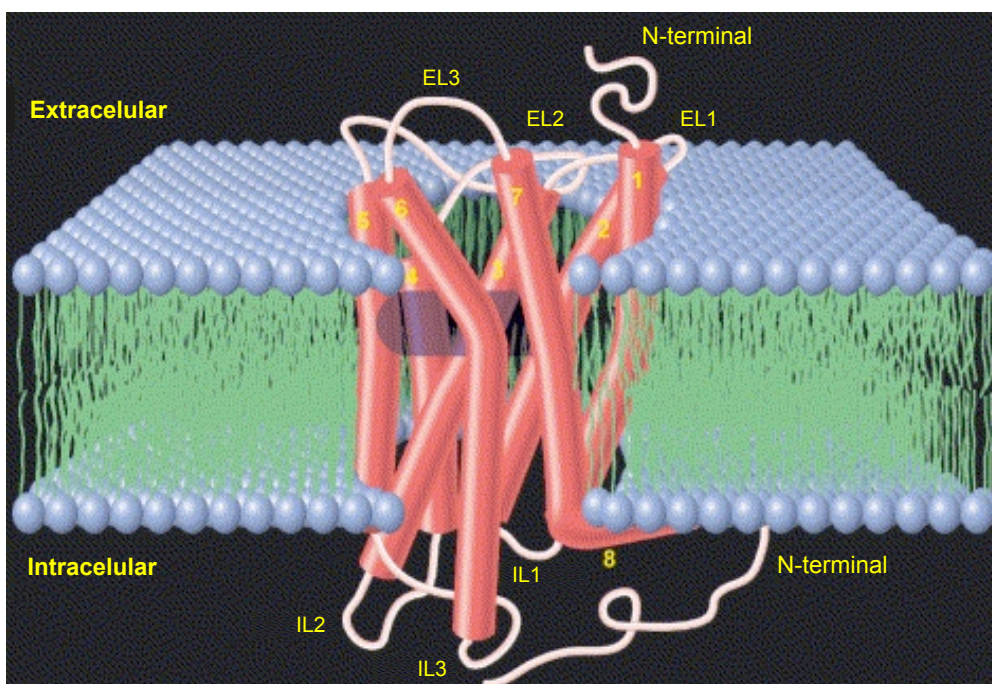


Figura 5. Estructura general de un GPCR. Representación tridimensional de la estructura de un GPCR en la membrana plasmática. En color rojo se destacan las 7 hélices transmembrana. En color blanco se representan los bucles extracelulares (EL1, EL2 y EL3), los bucles intracelulares (IL1, IL2 e IL3) y los extremos N- y C-terminal.

2.2. Función de los GPCRs.

Los GPCRs se activan por la unión de un ligando al extremo amino terminal orientado hacia la zona extracelular de la membrana plasmática o a otras zonas accesibles desde el medio extracelular. Esta unión provoca un cambio conformacional en los bucles conectores intracelulares y un reordenamiento de las hélices transmembrana ²⁶. Este cambio de conformación permite al receptor activado interactuar con una proteína G heterotrimérica. Las proteínas G son pequeñas proteínas intracelulares, compuestas por tres subunidades, α , β y γ , con actividad GTPasa intrínseca. La subunidad α es la responsable de la unión de GTP y GDP y de la hidrólisis de GTP, mientras que las subunidades β y γ se asocian en un complejo dimérico ²⁷.

La formación del complejo ligando-GPCR-proteína G promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α . Este cambio de nucleótido hace que disminuya la afinidad de $G\alpha$ por el dímero $G\beta\gamma$, provocando la disociación del heterotrímero, con liberación de $G\alpha$ -GTP por un lado y $G\beta\gamma$ por otro. Tanto $G\alpha$ -GTP como $G\beta\gamma$ en su estado libre pueden regular diversos efectores tales como la *adenilato ciclasa* o la *fosfolipasa C*, promoviendo la respuesta celular al estímulo como consecuencia del cambio en la concentración de un segundo mensajero.

El estado activado dura hasta la hidrólisis del GTP hasta GDP debido a la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$, modulada por otros factores, como los denominados RGSs (Regulators of G protein signaling) ²⁸. Una vez hidrolizado el GTP, las subunidades α , β y γ se reasocian para formar el heterotrímero inactivo (**Fig. 6**).

Las proteínas G se clasifican según el tipo de subunidad α que posean. De esta forma podemos distinguir cuatro familias distintas ²⁹:

- **G_s**: proteínas que están acopladas a la estimulación de la *adenilato ciclasa*
- **G_i**: proteínas acopladas a la inhibición de la *adenilato ciclasa* y a la activación de canales de potasio (GIRK)
- **G_q**: proteínas asociadas a la activación de la *fosfolipasa C β*
- **G₁₂**: proteínas acopladas a la activación del factor intercambiador de nucleótidos de guanina Rho.

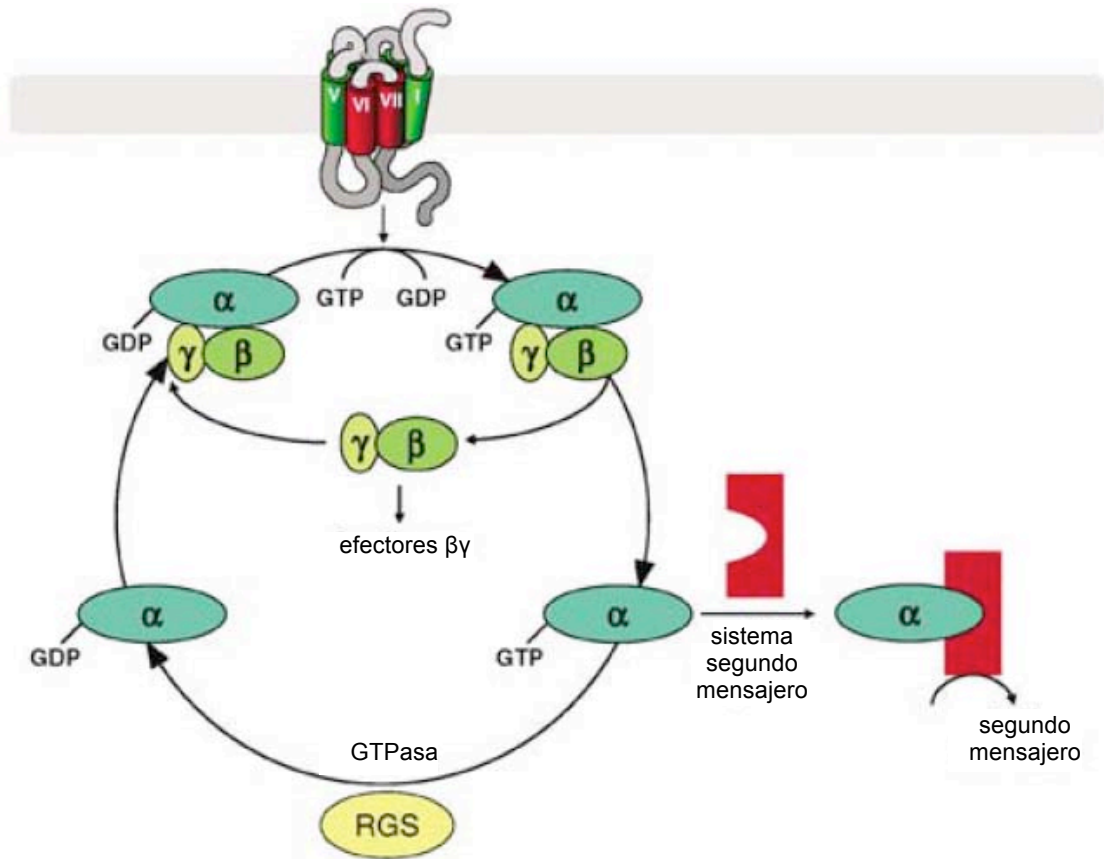


Figura 6. Ciclo de activación/desactivación de una proteína G tras su unión a un GPCR.

La señalización a través de GPCRs es un mecanismo complejo en el que influye no solo el tipo de proteína $G\alpha$ que se asocia con el receptor sino también las acciones llevadas a cabo por el dímero $G\beta\gamma$. Por otro lado, algunos estudios han puesto de manifiesto que la activación de los GPCRs puede provocar respuestas que no están mediadas por proteínas G y que no incluyen la modulación de los niveles de segundos mensajeros²⁰.

2.3. Subfamilia de los receptores de melanocortinas (MCRs).

Como ya se ha comentado, uno de los principales genes implicados en la regulación de la pigmentación es el *MC1R*. Este gen codifica un receptor perteneciente a una pequeña subfamilia de GPCRs de clase A denominada receptores de melanocortinas (MCRs), que consta de 5 miembros (MC1R-MC5R). Dentro de esta familia, los receptores muestran una homología del 40-60% y se acoplan positivamente a la cascada del AMPc³⁰. A su vez, difieren en su afinidad hacia las distintas melanocortinas (MCs) y ciertos péptidos antagonistas endógenos.

2.3.1. Melanocortinas.

Las melanocortinas (MC) son péptidos hormonales originalmente identificados por su capacidad de aumentar la pigmentación melánica cutánea y de inducir la síntesis de corticosteroides en las glándulas suprarrenales. Todas las MCs derivan de un precursor común llamado proopiomelanocortina (POMC). Esta pre-hormona consta de 225 aminoácidos y se expresa en la pituitaria y en algunas regiones del cerebro y de la periferia, incluyendo la piel. El procesamiento postraduccional de POMC es complejo y específico del tejido, y da lugar a las MCs (ACTH , $\alpha\text{-MSH}$, $\beta\text{-MSH}$ y $\gamma\text{-MSH}$) junto con otros péptidos bioactivos como β -lipotropina y β -endorfina ³¹ (**Fig. 7**).

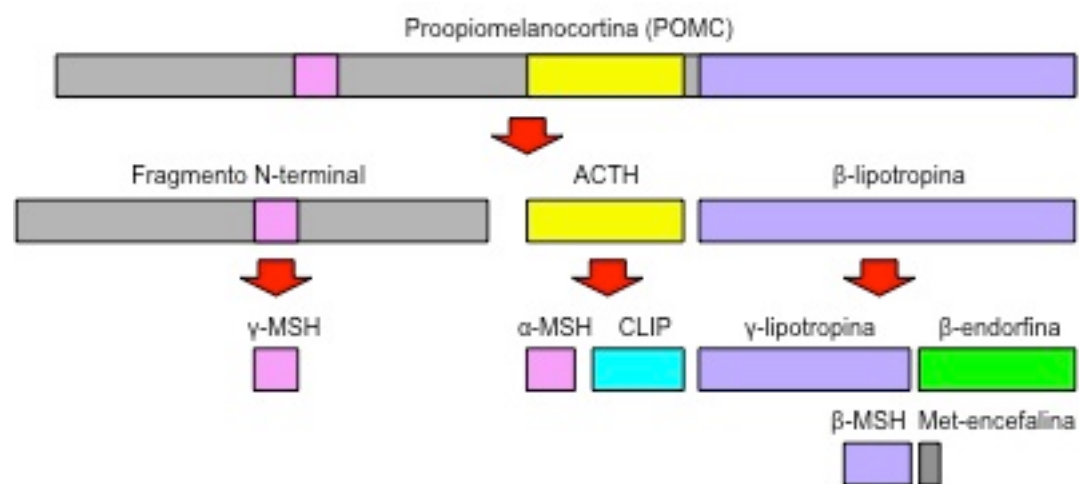


Figura 7. Procesamiento de proopiomelanocortina y péptidos biológicamente activos derivados.

Tradicionalmente, las principales actividades biológicas que se atribuyen a las MCs son la regulación de la producción de glucocorticoides y aldosterona (a través de ACTH) y el control de la biosíntesis de melaninas en los melanocitos de la epidermis (a través de $\alpha\text{-MSH}$ y ACTH). Sin embargo también participan en otras funciones fisiológicas como el control de la ingesta de alimentos, la homeostasis energética y de la masa corporal, y regulan la secreción de determinadas glándulas exocrinas y algunas respuestas del sistema inmunológico, del comportamiento sexual e incluso del aprendizaje ³².

2.3.2. Características generales de los MCRs.

El MC1R fue el primer miembro de la familia clonado ^{33,34}. Se expresa en melanocitos cutáneos y tiene un papel clave en la pigmentación de la piel y el pelo. También se ha encontrado expresión de MC1R en otros tipos celulares de la piel como queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales y células presentadoras de antígeno (revisado en ³¹).

El MC2R se expresa en la corteza suprarrenal donde media los efectos de la hormona ACTH en la secreción de esteroides. El MC3R se localiza en muchas áreas del sistema nervioso central y tejidos periféricos, incluyendo el tracto gastrointestinal y la placenta. El MC4R se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso central y junto con el MC3R participa en la homeostasis energética y el control del peso corporal. El MC5R se expresa en numerosos tejidos periféricos, incluyendo las glándulas sebáceas, adipocitos y leucocitos ³⁵ y su principal función está relacionada con la regulación de las secreciones glandulares.

Los MCRs están sometidos a una regulación compleja tanto a nivel transcripcional como a nivel postraduccional. El MC1R es probablemente el mejor conocido en este aspecto, debido a que mutaciones en los genes que codifican determinadas proteínas reguladoras dan frecuentemente fenotipos de pigmentación que han permitido identificar los genes implicados ³⁶.

3. RECEPTOR DE MELANOCORTINAS 1 (MC1R).

El gen *MC1R* fue clonado en 1992 ^{33,34}. Codifica para un GPCR de pequeño tamaño, constituido por 317 aminoácidos en el hombre y 315 en ratón ³⁶. Como se ha comentado anteriormente, se expresa mayoritariamente en melanocitos y células de melanoma donde regula la cantidad y el tipo de pigmento producido.

El gen MC1R es altamente polimórfico con unas 300 variantes naturales descritas ³⁷ por lo que se considera el principal determinante genético del fototipo cutáneo, así como el gen de susceptibilidad a melanoma mejor establecido.

3.1. Estructura del MC1R.

El MC1R posee todas las características estructurales típicas de los GPCRs: un extremo N-terminal extracelular, siete helices transmembrana y un extremo C-terminal intracelular.

3.1.1. Extremo N-terminal.

La mayoría de las proteínas de membrana contienen un péptido señal en el extremo amino que las dirige durante su síntesis por los ribosomas hacia la membrana del retículo endoplasmático, donde rápidamente es eliminado. Sin embargo, el extremo N-terminal del MC1R no encaja en el consenso descrito para el péptido señal y la eliminación de los primeros 27 aminoácidos no tiene efecto en la unión al ligando ni en los niveles de expresión³⁸. Además, cuando se fusiona un pequeño epítipo Flag al extremo N-terminal, este no es eliminado durante el procesamiento de la proteína en células HEK293T³⁹. Esto sugiere que el MC1R pertenece a una clase minoritaria de proteínas de membrana que utilizan el primer dominio transmembrana como una señal no degradable que los guía hacia la membrana plasmática⁴⁰.

Aunque el MC1R maduro contiene en esta zona dos secuencias de glicosilación, ¹⁵NSTP¹⁶ y ²⁹NQTG³², no ha sido hasta hace poco que nuestro grupo de investigación ha confirmado que los residuos Asn15 y Asn29 se glicosilan con cadenas de glicanos estructural y funcionalmente diferentes, ya que hay un desplazamiento de la movilidad electroforética de la proteína tras el tratamiento con endoglicosidasas⁴¹. Esta N-glicosilación no es necesaria para la unión del agonista con alta afinidad o el acoplamiento funcional, pero si tiene un fuerte efecto sobre la disponibilidad del MC1R en la membrana plasmática, posiblemente debido a una combinación de dos factores: un mejor tráfico hacia la membrana celular y una disminución de la internalización⁴².

Otro elemento importante en la secuencia N-terminal del receptor es un residuo de Cys (Cys35) cercano al primer fragmento TM, que está conservado en todos los MCRs y es crítico para su función ya que su mutación a Gly provoca la pérdida de función del receptor⁴³. Este comportamiento se debe probablemente a que el residuo Cys35 está implicado en la formación de un puente disulfuro intermolecular que contribuye a la dimerización del receptor.

3.1.2. Bucles extracelulares.

Los bucles extracelulares (ELs) del MC1R son pequeños⁴⁴⁻⁴⁶, particularmente el EL2 que es muy corto. Esta característica se ha relacionado con la alta actividad constitutiva que muestran varios miembros de la subfamilia de los MCRs⁴⁷ y el MC1R en particular⁴⁸. El EL3 de los MCRs está inusualmente conservado comparado con la mayoría de los GPCRs. Además, es rico en residuos

invariables de Pro y Gly, lo que sugiere que posee una función muy especializada ⁴⁷. Por otra parte, la mutación de los residuos Cys267 o Cys275 a Gly provoca la pérdida de función del receptor ⁴³ debido a su implicación en la formación de puentes disulfuro que son necesarios para mantener la estructura de la proteína ⁴⁹. El residuo Cys271 del MC4R, que equivale al residuo Cys267 del MC1R, está unido mediante un puente disulfuro al residuo Cys279, que equivale a la Cys275 del MC1R, y se ha descrito una mutación C271R asociada con obesidad mórbida ⁵⁰. Estos hallazgos, junto la perfecta conservación de los residuos de Cys presentes en EL3 en todos los MCRs, sugieren un papel general de los puentes disulfuro en la función de los MCRs.

3.1.3. Bucles intracelulares.

Los bucles intracelulares (ILs) de los GPCRs proporcionan la superficie de unión para las proteínas G heterotriméricas y además contienen dianas de fosforilación implicadas en la regulación de la señalización, internalización y reciclaje de los receptores ⁵¹. Dentro del IL2 del MC1R humano se han identificado algunas variantes naturales, de las cuales al menos cuatro corresponden a formas de pérdida parcial o total de función, lo que indica la importancia de este dominio.

Localizado en la interfase entre IL2 y TM3 se encuentra un tripéptido ¹⁴¹DRY¹⁴³, característico de los receptores de clase A. Se trata de un elemento crítico, como demuestra la pérdida parcial de función que sufre el receptor cuando el residuo Arg142 es mutado a His ⁵².

El IL2 presenta además sitios de fosforilación conservados para la proteína quinasa A (PKA) y para la proteína quinasa C (PKC). Si estas dianas se encuentran fosforiladas en condiciones fisiológicas, aun no se ha determinado.

El IL3 es rico en residuos básicos y está poco conservado en los MCRs.

3.1.4. Fragmentos transmembrana.

Los fragmentos transmembrana del MC1R se sitúan aproximadamente de forma perpendicular al plano de la membrana, con una disposición en sentido antihorario. Para los GPCRs de clase A, cuyo tipo es la rodopsina, el sitio de unión al ligando se localiza en un bolsillo formado por varias hélices transmembrana en la interfase entre la membrana plasmática y el medio extracelular.

Se han desarrollado modelos tridimensionales para analizar el complejo ligando-receptor ^{53,54}. En estos modelos se sugiere que una región rica en

aminoácidos con carga negativa, que contiene los residuos Glu94 (en TM2), Asp117 y Asp121 (en TM3), interacciona con el aminoácido Arg contenido en la secuencia farmacófora His-Phe-Arg-Trp, presente en las MCs naturales. Además, una red de residuos aromáticos situados cerca del lado extracelular de los fragmentos TM4, 5 y 6 también contribuiría a la unión del agonista mediante su interacción con los residuos aromáticos del farmacóforo ⁵⁵. Hay al menos once mutantes naturales encontrados en el fragmento TM2 del MC1R (**Fig. 8**) y varios de ellos presentan cambios funcionales, lo que confirma su importancia.

3.1.5. Extremo C-terminal.

La cola carboxilo terminal del MC1R es corta. Está formada por 19 aminoácidos, de los cuales seis son invariables en los MCRs. Dentro de los GPCRs, este dominio es funcionalmente muy relevante por diversos motivos:

a) participa en la interacción del complejo ligando-receptor con la proteína G.

51

b) participa en la correcta disposición del receptor en la membrana plasmática gracias a la acilación de residuos Cys. La cadena alifática del ácido graso se inserta dentro de la membrana

c) proporciona señales para el tráfico intracelular de la proteína. Cabe destacar, esta región contiene residuos de Ser y Thr cuya fosforilación regula la desensibilización e internalización del MC1R.

Una mutación natural encontrada en perros y que da lugar a una truncación prematura del extremo C-terminal produce un fenotipo de pelaje feomelánico ⁵⁶. Además, la delección artificial de los últimos cinco aminoácidos del MC1R, que incluye el tripéptido terminal CSW presente en todos los MCRs secuenciados hasta el momento, es suficiente para anular su función ³⁹. Este mutante delecionado es retenido en el interior de la célula y no alcanza la membrana plasmática. Por tanto, la integridad del extremo C-terminal va a determinar la correcta expresión del MC1R en la superficie celular. Un mutante natural recientemente descrito que carece de la extensión C-terminal por truncación de la proteína después de Tyr298 ha confirmado la importancia de este dominio en el MC1R humano ⁵⁷.

Otra mutación, C315A, también afecta a la función del MC1R ³⁹. El mutante C315A se expresa con menor densidad en la superficie celular en relación al MC1R silvestre. Por lo tanto, la acilación de Cys315 podría ser un determinante importante de la densidad del receptor en la membrana, bien por mejorar el tráfico anterógrado o inhibir la internalización, bien por modificar la estabilidad de la proteína en la

membrana plasmática⁵⁸. Por otra parte, tal y como se mencionará más adelante, los residuos que rodean a Cys315, Thr314 y Ser316, parecen ser dianas de fosforilación importantes en la desensibilización del MC1R.

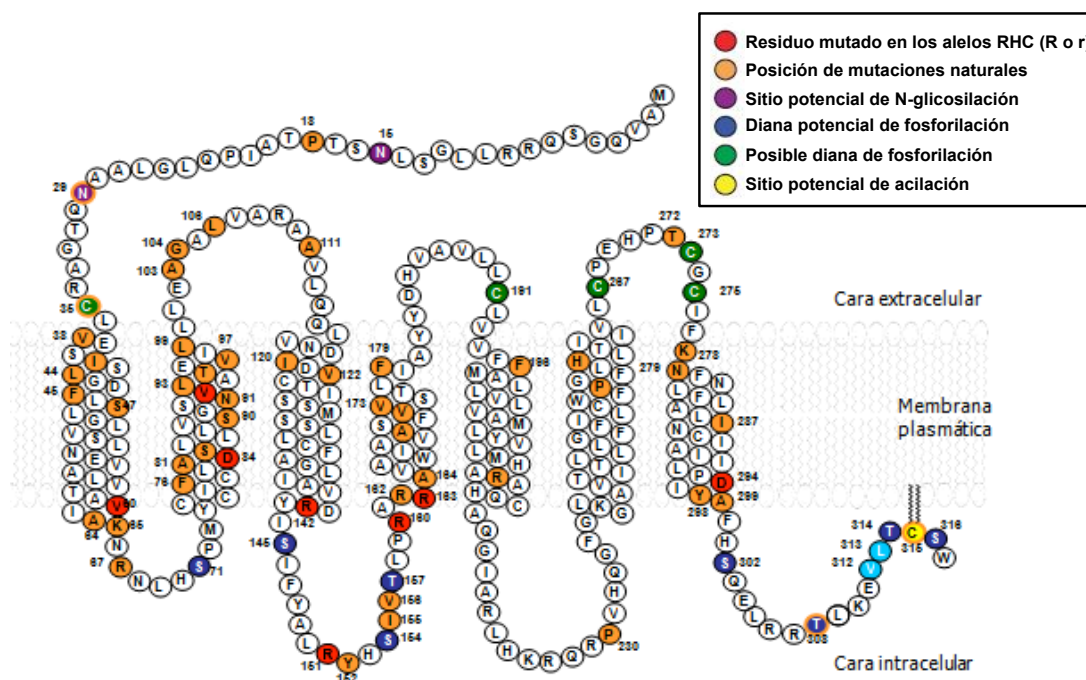


Figura 8. Estructura bidimensional del MC1R según el modelo de Rhingolm et al⁴⁴. La secuencia de aminoácidos corresponde al MC1R silvestre (número de acceso GenBank AF326275).

3.2. Señalización aguas abajo del MC1R.

El MC1R se activa por unión de su principal agonista, la hormona α -MSH. Aunque este receptor está acoplado a varias cascadas de señalización intracelular, la mejor caracterizada es aquella que, tras unión del ligando, provoca la estimulación de una *adenilato ciclasa* por medio de la proteína Gs (**Fig. 9**). Como resultado, se produce un aumento de los niveles intracelulares de AMPc, que actúa como segundo mensajero. El AMPc se une a las dos subunidades reguladoras de una *proteína quinasa A* (PKA) y libera y activa las subunidades catalíticas de la quinasa. La PKA activa puede ahora fosforilar a sus sustratos, que pueden ser canales iónicos, enzimas y otras proteínas reguladoras. Además, también es capaz de trasladarse a núcleo, donde fosforila a miembros de la familia de factores de transcripción CREB. Una vez fosforiladas, las proteínas CREB activan la expresión de genes específicos que contienen la secuencia consenso CRE (elemento sensible a AMPc) en la región promotora⁵.

El AMPc es responsable de la mayor parte de las acciones melanogénicas de α MSH⁵. Entre estas acciones se incluye la activación de la expresión de

tirosinasa, la enzima limitante en la biosíntesis de melanina. Esta activación ocurre principalmente a nivel transcripcional y es mediada por la inducción de *Microphthalmia* (*Mitf*), un factor de transcripción de la familia hélice-bucle-hélice cuya expresión se activa en respuesta a las proteínas CREB ⁵⁹.

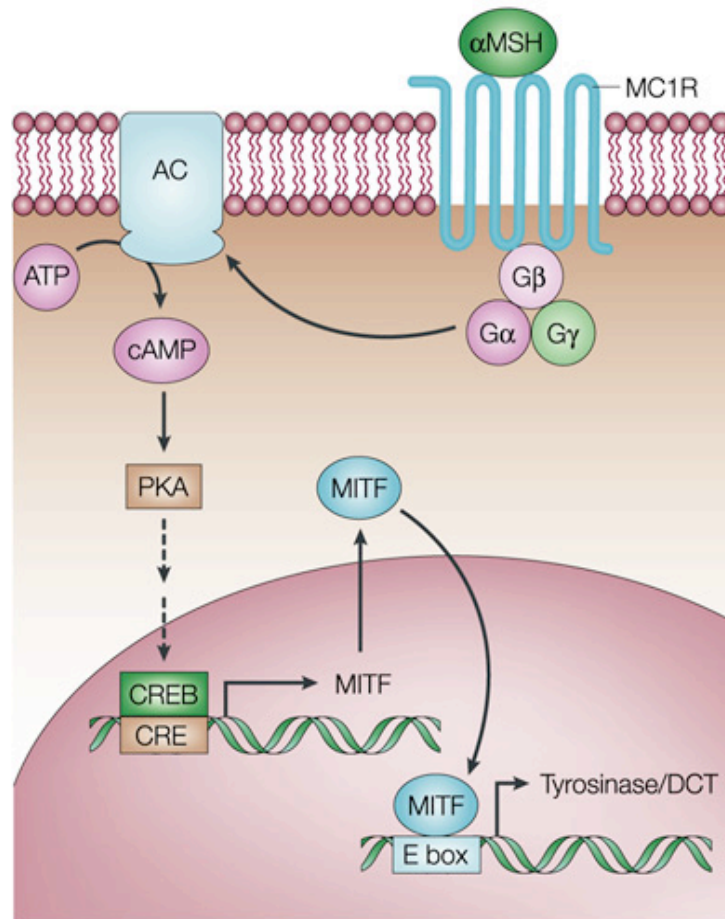


Figura 9. Regulación de la melanogénesis a través de la activación de MC1R por acción del agonista α MSH (vía canónica) ⁶⁰.

Además de esta vía de señalización canónica de MC1R a través de AMPc, se ha descrito que la activación del receptor también puede estimular otras vías como la cascada de las MAP quinasas ERK1 y ERK2. La señalización de esta vía requiere niveles mucho más bajos de receptor activado y se produce por transactivación de c-KIT, un receptor tirosina quinasa esencial para la proliferación, diferenciación y supervivencia de precursores del melanocito ⁶¹.

3.3. Agonismo inverso y actividad constitutiva del MC1R.

El MC1R es un GPCR único debido a la diversidad de ligandos endógenos que regulan su estado funcional, con agonistas y antagonistas fisiológicos identificados. El antagonista de MC1R mejor caracterizado es la proteína de señalización agouti (ASP) ⁶². Se ha demostrado que, en ratones, ASIP (ASP en humanos) disminuye la proliferación del melanocito e inhibe la expresión de los genes que codifican las enzimas melanogénicas y por tanto la producción de melanina ⁶³. En humanos, la unión de ASP al MC1R inhibe la estimulación de la síntesis de eumelanina en respuesta a α MSH y favorece la producción de feomelaninas en detrimento de las eumelaninas.

Por otra parte, el MC1R presenta una fuerte actividad constitutiva independiente de agonista ⁴⁸, una característica relativamente frecuente dentro de los GPCRs ^{37,64}. En células HEK 293T que expresan MC1R, esta actividad constitutiva puede alcanzar el 40% de los valores de AMPc máximos que se obtienen tras la estimulación con el agonista. Estos hallazgos, que fueron descritos por nuestro grupo de investigación ⁴⁸ y confirmados posteriormente por Benned-Jensen y colaboradores ⁶⁵, pueden explicar ciertos efectos del ligando inhibitorio ASP, que se comporta como un agonista inverso más que como un antagonista competitivo ⁶⁶.

Otro antagonista de MC1R recientemente identificado es β -defensina3 (HBD3), un péptido perteneciente a una familia de pequeñas proteínas con actividad antimicrobiana. En melanocitos normales humanos, HBD3 se comporta como un antagonista neutro ya que no tiene efecto sobre la formación basal de AMPc pero sí inhibe significativamente la producción de AMPc inducido por α MSH, así como la proliferación células de los melanocitos y la actividad *tirosinasa* ⁶⁷.

3.4. Variantes alélicas y procesamiento alternativo de MC1R.

Con aproximadamente 300 variantes alélicas descritas, de las cuales más de 200 se localizan en la región codificante, *MC1R* es probablemente el gen de GPCR más polimórfico del genoma humano ³⁷. Existe una fuerte asociación entre ciertas variantes, denominadas RHC (Red Hair Color) y un fenotipo de pigmentación caracterizado por piel clara, pelo rojizo, escasa capacidad de bronceado y propensión a las quemaduras solares tras exposición a radiación UV ⁶⁸, además de un aumento en el riesgo de desarrollar melanoma y otros tipos de cáncer de piel ⁶⁹⁻⁷². Estas variantes pueden tener unas características funcionales marcadamente

diferentes de las del receptor silvestre. Así, dentro de los melanocitos humanos, el genotipo del gen *MC1R* proporciona un primer nivel de regulación de la señalización del receptor.

El gen *MC1R* se localiza en el cromosoma 16q24.3 y contiene cuatro exones. El transcrito principal (MC1R-001) es el que hemos denominado MC1R en esta memoria, pero se conoce al menos otro transcrito denominado MC1R-002, con un marco abierto de lectura (ORF) de 1149 nucleótidos que daría lugar a una proteína de 382 aminoácidos ⁷³. Esta isoforma secundaria es idéntica a la principal hasta la Ser316 a partir de la que se produce la adición de 65 aminoácidos extra que dan lugar a un extremo C-terminal diferente.

El *MC1R* es un miembro inusual dentro de la superfamilia de genes de GPCR no solo por su alto polimorfismo sino también por la aparición de un procesamiento de corte-empalme (“splicing”) alternativo intergénico que afecta al gen localizado aguas abajo (β tubulina 3 o *TUBB3*) ⁷⁴ y que tiene lugar como consecuencia del alto empaquetamiento génico existente en la región 16q24. Hasta la fecha se han descrito dos productos de este splicing alternativo intergénico ⁷⁴. Uno de ellos contiene los exones 3 y 4 de *MC1R* fusionados con los exones 3, 4 y 5 de *TUBB3*. Este transcrito (*MC1R-TUBB3*) da lugar a una proteína quimérica denominada Iso1 cuya secuencia se corresponde con los primeros 366 residuos de la isoforma MC1R-002 y la mayor parte de TUBB3. El segundo transcrito de este procesamiento intergénico, Iso2, da lugar a un producto proteico de 432 aminoácidos. Los primeros 316 aminoácidos coinciden con la secuencia del MC1R mientras que 116 restantes no tienen homología con ninguna proteína conocida ⁷⁴. Aunque ambas isoformas mantienen los elementos estructurales importantes para la unión del agonista y la señalización posterior, su capacidad de señalización por la vía del AMPc está muy disminuida en relación al transcrito canónico MC1R-001 (Herraiz, C. *et al.*, PLOS ONE, 2015, aceptado)

3.5. Regulación de la función del MC1R.

El MC1R está sometido a una regulación compleja tanto a nivel transcripcional como a nivel postraducciona. Ya hemos comentado que el genotipo constituye un primer nivel de regulación. Una vez en la membrana plasmática, la actividad del MC1R es principalmente controlada por su interacción con los distintos ligandos fisiológicos. La unión del ligando desencadena a su vez otros eventos reguladores entre los que se incluyen la desensibilización homóloga y la

internalización del receptor, procesos que estudiaremos con más detalle en apartados posteriores.

En relación con la regulación transcripcional, se han estudiado los efectos de numerosos factores endocrinos y paracrinicos en la expresión de MC1R. En melanocitos humanos estimulados con NDP-MSH (un potente agonista de MC1R, análogo estructural de α MSH) se observa un incremento de los niveles de ARNm del MC1R. La inducción aumenta tras un tratamiento de 24 horas con TPA ⁷⁵ y se explica por una activación de la transcripción del gen *MC1R* ⁷⁶. Esta inducción se mimetiza por forskolina, un activador de la *adenilato ciclasa*, lo que sugiere que es dependiente de AMPc.

A nivel transcripcional, la expresión del gen *MC1R* también se activa por la radiación UV que incide sobre la epidermis ⁷⁷ y se inhibe por especies reactivas de oxígeno (ROS) ⁷⁸. Además, la radiación UV también es responsable de la activación de la quinasa de estrés p38 ⁷⁹ que fosforila y a su vez activa el factor de transcripción USF1. Este factor de transcripción activa la transcripción de *tirosinasa* y todo esto determina un incremento de la capacidad de respuesta de los melanocitos a la hormona α MSH, principal agonista endógeno del MC1R.

También se han estudiado los efectos reguladores de ciertas citoquinas que contribuyen a la homeostasis cutánea ⁷⁵. Interleucina 1 α y 1 β incrementan los niveles de ARNm de MC1R. Además, las citoquinas TNF α ⁸⁰ y TGF β ⁸¹, que reprimen fuertemente la melanogénesis en células de melanoma, disminuyen moderadamente la expresión de MC1R en células de melanoma de ratón.

3.6. Desensibilización homóloga e internalización.

La mayoría de los GPCRs sufren un proceso de desensibilización homóloga, o pérdida de la capacidad de acoplamiento a la vía de transmisión de señales, en condiciones de estimulación sostenida. Por norma general, este proceso es dependiente de fosforilación del receptor activado por una familia de quinasas específicas denominadas quinasas de GPCR (GRKs) ⁸² la posterior internalización en vesículas recubiertas de clatrina, lo que supone su desaparición de la membrana plasmática. Clatrina, adaptina 2 (AP2) y otras proteínas endocíticas intervienen en el ensamblaje de la vesícula a través del reconocimiento de dominios que exponen, entre otras, las proteínas de la familia β -arrestina (ARRBs), que son reclutadas por el GPCR tras su fosforilación por GRKs, y actúan como andamios moleculares imprescindibles para la formación de la vesícula recubierta. Por otra parte, además de fosforilar al receptor, las GRKs orquestan la formación de complejos proteicos, ya

que poseen en su extremo C-terminal un motivo de unión a clatrina, e interaccionan con otras proteínas como GIT1 (GRK interactor 1), fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y ezrina, que regulan el tráfico de los GPCRs internalizados.

EL MC1R sufre desensibilización homóloga cuando se estimula con su agonista en células de melanoma humano HBL y en sistemas de expresión heteróloga ⁸³. Este proceso es mediado por las quinasas GRK2 y GRK6 que fosforilan al receptor en los residuos Thr308 y Ser316 localizados en el extremo C-terminal y promueven su internalización. No está claro, sin embargo, el papel que ejercen las ARRBs en la regulación de la señalización del MC1R.

4. FAMILIA DE LAS ARRESTINAS. β -ARRESTINAS.

4.1. Clasificación de las arrestinas.

Las arrestinas constituyen una pequeña familia de proteínas de unión a GPCRs que fueron descubiertas por el papel que desempeñan en su desensibilización ^{84,85}. En mamíferos, esta familia consta de 4 miembros, codificados por diferentes genes, que se agrupan dentro de dos subfamilias distintas:

- arrestinas visuales: son la arrestina1 (arrestina visual) y la arrestina 4 (X-arrestina). Se expresan casi exclusivamente en la retina, donde regulan la actividad del GPCR rodopsina.

- arrestinas no visuales o sensoriales o β -arrestinas: son la arrestina2 (β -arrestina1 o ARRB1) y la arrestina3 (β -arrestina2 o ARRB2) ⁸⁶. Se expresan de forma ubicua en casi todos los tejidos y modulan la actividad de la mayoría de los GPCRs.

4.2. β -Arrestinas (ARRBs).

El genoma humano contiene dos genes *ARRB*. El gen *ARRB1*, localizado en el cromosoma 11, da lugar a dos transcritos: ARRB1-001, que da lugar a la isoforma 1A y ARRB1-202, que da lugar a la isoforma 1B. Por otro lado, el gen *ARRB2* se localiza en el cromosoma 17 y codifica para cinco transcritos que dan lugar a la isoforma 1 (antiguamente denominada ARRB2-201), isoforma 2 (antigua ARRB2-001), isoforma 3, isoforma 4 (antigua ARRB2-203) e isoforma 5 (antigua ARRB2-202) (**Fig 10**). Todas estas isoformas de ARRB mantienen los extremos amino y carboxilo y se diferencian en los exones internos.

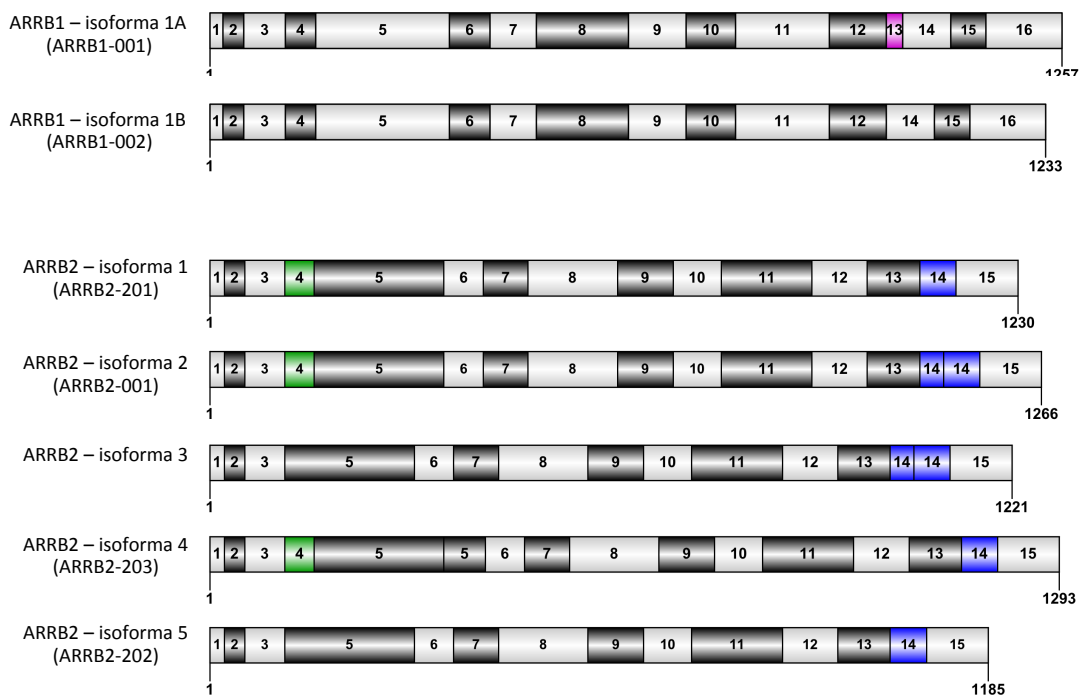


Figura 10. Esquema de los transcritos de ARRBs. En colores alternos, gris claro y gris oscuro, se representan los exones maduros que componen el ARNm y su longitud. En rosa para ARR1, y en verde y azul para ARR2 se representan los exones en donde difiere la secuencia.

Existe una gran homología dentro de la familia de las arrestinas que afecta no solo a su secuencia de aminoácidos, con multitud de residuos conservados a lo largo de la escala filogenética, sino también a su estructura secundaria. Tanto las arrestinas visuales como las no visuales presentan una estructura tridimensional casi idéntica con dos dominios N- y C-terminal construidos casi enteramente con hojas β antiparalelas⁸⁷⁻⁸⁹ (**Fig. 11**). Es interesante resaltar que, a pesar de su alto grado de identidad, las dos isoformas de ARRBs parecen ser suficientes para regular el amplio repertorio de GPCRs existente.

4.3. Estructura de las ARRBs.

Las ARRBs están formadas por 23 hojas β antiparalelas y 1 hélice α que se agrupan formando dos dominios (N y C) que permanecen en contacto estrecho a través de una región muy flexible de aminoácidos denominada "hinge" o región bisagra y la estructura denominada "ariat loop" (**Fig. 11**). La estructura de las ARRBs parece estar íntimamente relacionada con su estado de activación. Se han propuesto dos conformaciones distintas, una para la forma libre o inactiva y otra para la forma unida a receptor o activa.

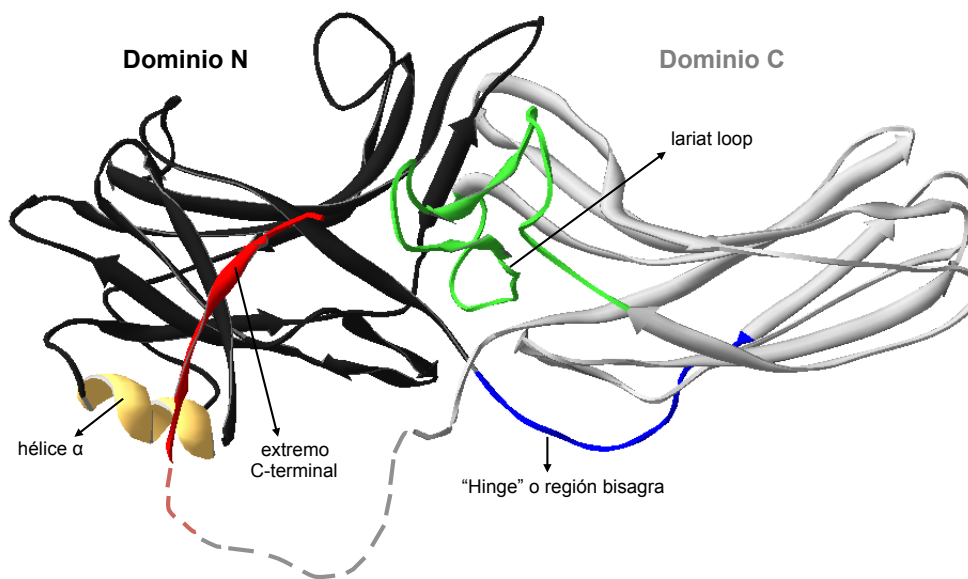


Figura 11. Estructura general de las ARRBs. La proteína se pliega formando un dominio N (en color negro) y un dominio C (en color gris) unidos por una región muy flexible denominada "hinge" o región bisagra (en azul). Ambos dominios se encuentran en estrecho contacto a través del lariat loop (en color verde). En amarillo se marca la única hélice α de la proteína. Esta estructura corresponde a la ARRB2 bovina, cuya secuencia es prácticamente idéntica a la ARRB2 humana (entrada PDB 3P2D). La región no cristalizada de la proteína se indica en trazo discontinuo.

En la conformación inactiva, la ARRB tiene una estructura cerrada y compacta que se encuentra estabilizada por distintas interacciones intramoleculares (Fig 12):

- interacciones hidrofóbicas entre la hélice α , la primera hoja β y la cola C-terminal de la molécula, que está plegada hacia el dominio N.
- puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas que se establecen entre diversos residuos polares localizados en el interior de la estructura y que se denominan en conjunto núcleo polar o "polar core". Estos residuos se localizan tanto en el dominio N como en el dominio C.

El "lariat loop" es otro motivo de gran importancia en la estabilización del núcleo polar. Se trata de un bucle localizado entre las hojas β 18 y 19 que presenta una elevada variabilidad de secuencia entre las distintas isoformas de arrestina, pero que mantiene una estructura secundaria muy conservada. Esto apoya la idea de que su conformación es esencial en la estabilización de la forma inactiva o basal de las ARRBs.

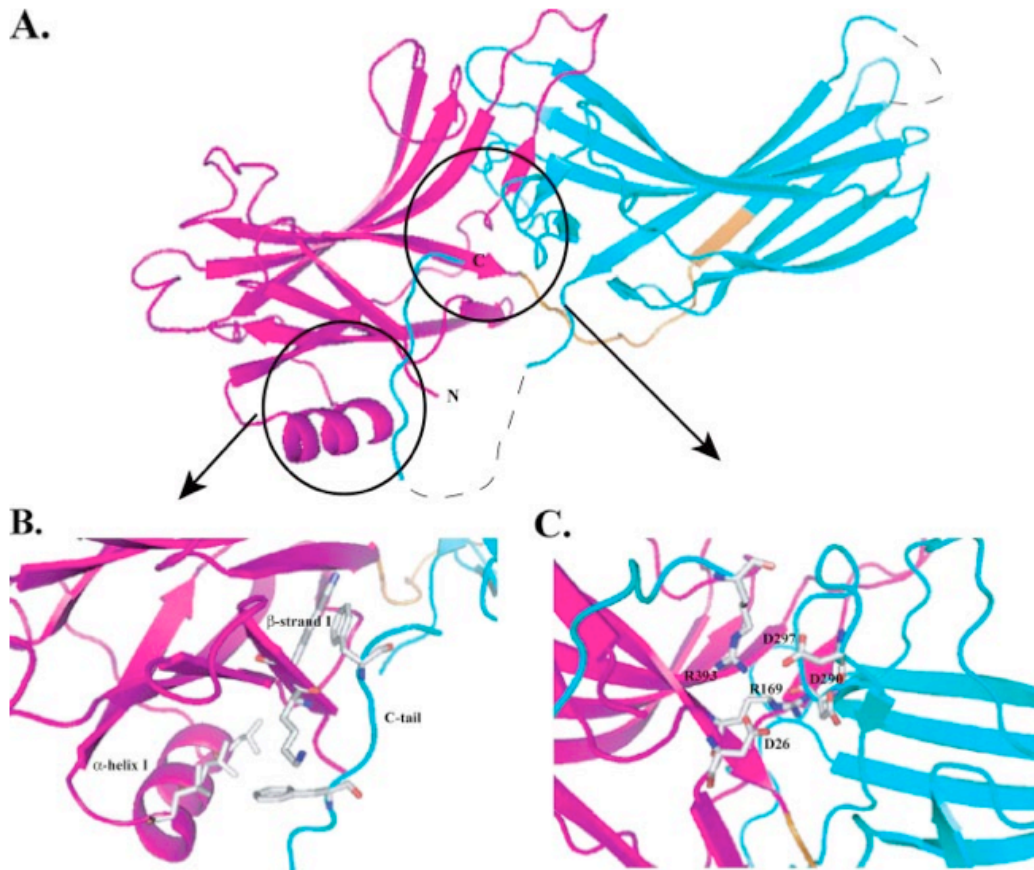


Figura 12. Estructura en estado basal de ARR1 bovina ⁹⁰. Las hojas β se disponen formando dos dominios N y C (en rosa y azul respectivamente) **(A)**. Esta conformación está estabilizada por interacciones hidrofóbicas entre la hélice α , la primera hoja β y el extremo C-terminal **(B)** y puentes de hidrógeno entre los residuos que forman parte del núcleo polar **(C)**.

Estudios de cristalografía llevados a cabo con ARR1 de rata (cuya secuencia de aminoácidos es casi idéntica a la humana) sugieren un mecanismo de activación en el que cuando ARR1 se une al GPCR activado y fosforilado, la carga negativa de estos fosfatos altera el núcleo polar. Esta alteración provoca que los dominios N y C de la proteína se muevan uno respecto al otro, gracias a la flexibilidad de la región bisagra ⁸⁸, y se libere la cola C-terminal, dejando expuestos los sitios de unión a clatrina y AP2. Como consecuencia de estos movimientos la ARR1 adopta una conformación más abierta y relajada que permite, por un lado, la interacción con alta afinidad con el GPCR, y por otro, con clatrina, AP2 y otras proteínas endocíticas que forman una vesícula que termina gemando en un proceso dependiente de dinamina **(Fig 13)**.

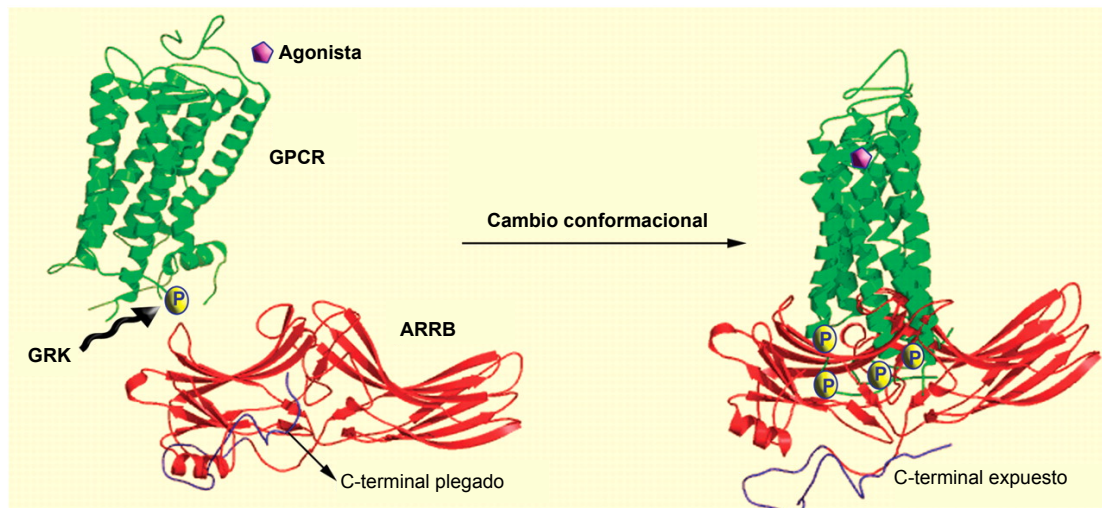


Figura 13. Activación y cambio conformacional de ARRB. La unión al GPCR provoca un cambio conformacional en las ARRBs que permite su activación. El extremo C-terminal, que se encuentra plegado sobre el dominio N en estado basal, se libera tras unión al GPCR y permite la adopción de una conformación abierta que deja expuestos los dominios de unión a clatrina y AP2, localizados ambos en este extremo C-terminal.

4.4. Función de las ARRBs.

Como se ha comentado en apartados anteriores, las ARRBs juegan un papel fundamental en el proceso de desensibilización e internalización de los GPCRs. La activación del receptor por su agonista provoca el reclutamiento de las ARRBs desde el citoplasma hasta la membrana plasmática donde tienen lugar dos procesos importantes. Por un lado, la unión de la ARRBs al receptor desacopla la proteína G y provoca un cese de la señalización a través de segundos mensajeros. Por otro lado, la ARRB actúa como molécula adaptadora para la unión de diversas proteínas que participan en la formación de vesículas de endocitosis que retiran el receptor de la superficie de la célula (**Fig. 14**).

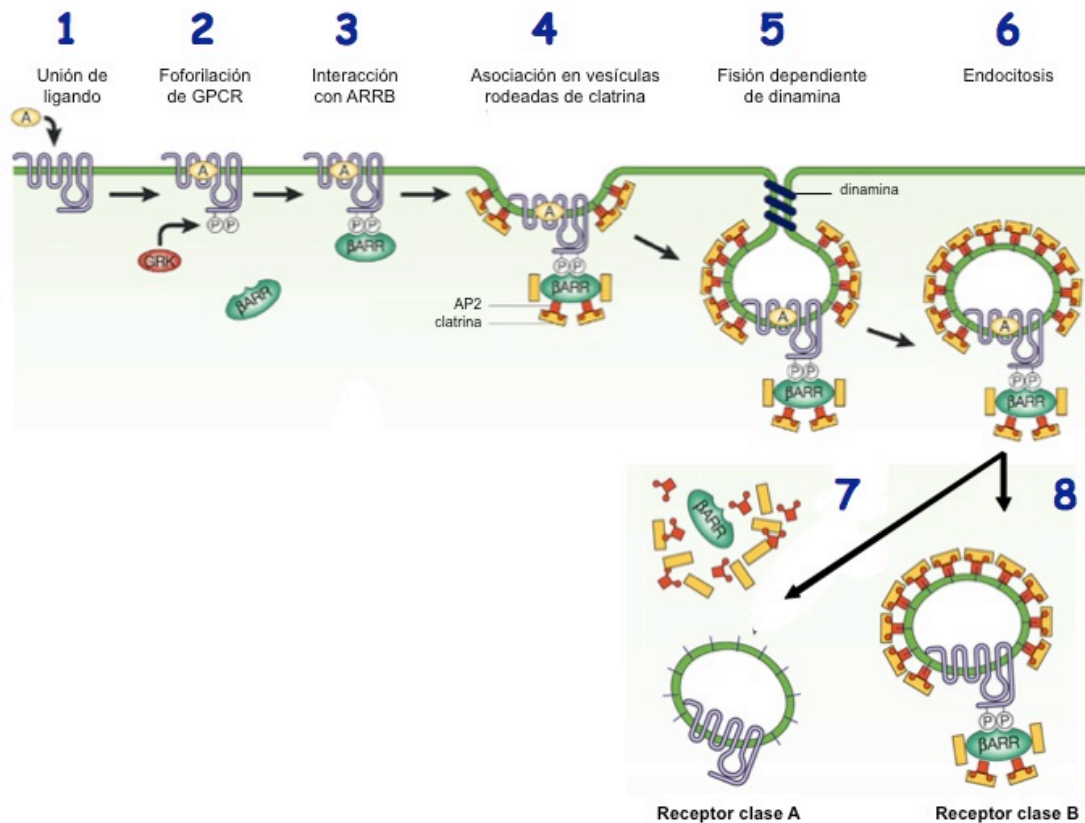


Figura 14. Esquema general de la desensibilización e internalización de los GPCRs. (1-6) Las ARRBs son reclutadas a la membrana plasmática en respuesta a GPCRs activados y fosforilados. La unión a estos GPCRs provoca la desensibilización del receptor y su internalización a través de un mecanismo dependiente de clatrina y AP2. **(7-8)** La especificidad y estabilidad de la interacción ARRB-GPCR clasifica a los receptores en clase A o en clase B.

La afinidad con la que las ARRBs se unen a los receptores fosforilados está determinada por el patrón de fosforilación (dependiente de la estructura primaria del receptor y la fosforilación por GRKs) de la cola C-terminal de los GPCRs. En función de la especificidad y la estabilidad de la interacción ARRB-GPCR, los GPCRs se pueden clasificar en dos tipos distintos⁹¹ (**Fig. 14**).

- Receptores de clase A: (como el receptor adrenérgico β_2) establecen uniones débiles con las ARRBs, son internalizados en vesículas forradas de clatrina y una vez en el interior de la vesícula se separan de la arrestina y se reciclan rápidamente a la membrana plasmática.

- Receptores de clase B: (V2R y AT1aR) se unen más fuertemente a la arrestina y no se disocian de ella una vez han internalizado. Los complejos pueden permanecer así durante periodos de tiempo relativamente largos antes de ser mandados a lisosomas o reciclarse lentamente a la membrana plasmática.

4.5. Regulación de la actividad de ARRBs.

Las ARRBs pueden sufrir modificaciones postraduccionales que se producen normalmente en respuesta a la activación de los GPCRs. Estas modificaciones son responsables de la amplia variedad de funciones que se han descrito para ARRB1 y ARRB2, y destacan por encima del resto los mecanismos de fosforilación, S-nitrosilación, ubiquitinación y SUMOilación.

4.5.1. Fosforilación.

Las ARRBs se encuentran en el citosol como fosfoproteínas que se desfosforilan tras la estimulación del receptor adrenérgico β_2 , o β_2 -AR, por su agonista^{92,93}. Además, mutaciones en residuos clave muestran que esta desfosforilación es importante para la interacción con clatrina y para la internalización del receptor en vesículas rodeadas de clatrina. Todo esto hace pensar que los procesos de fosforilación/desfosforilación de las ARRBs constituyen un mecanismo de regulación negativa que media su interacción con proteínas específicas de endocitosis y modula en última instancia la señalización de los GPCRs, aunque aún no se conoce el mecanismo exacto de esta desfosforilación⁹⁴.

4.5.2. S-Nitrosilación.

La ARRB2 es S-nitrosilada en el último residuo de su secuencia (Cys410 en roedores, Cys409 en humanos) por la *óxido nítrico sintasa epitelial* (eNOS). Esto favorece su interacción con clatrina y AP2, en marcado contraste con el efecto inhibitorio que tiene la S-nitrosilación en la interacción entre ARRB2 y eNOS. Aunque se ha descrito que la S-nitrosilación de ARRB2 provoca un incremento en la internalización del β_2 -AR, se desconoce su efecto sobre la señalización dependiente de ARRB⁹⁵.

4.5.3. Ubiquitinación.

El estado de ubiquitinación de las ARRB parece determinar las características de interacción de estas moléculas⁹⁶. De hecho, esta modificación postraduccionales aporta nuevas estructuras terciarias a la proteína sustrato, modificando su conformación y las interfases de interacción proteína-proteína⁹⁷.

La activación de los GPCRs promueve la ubiquitinación de las ARRBs mediada por la E3-ubiquitina ligasa MDM2 ⁹⁸. Además, se ha visto que esta modificación no es solo necesaria para la internalización de los receptores, sino que también determina la afinidad de la interacción entre las ARRBs y los GPCRs, de manera que los receptores de clase A (que establecen uniones débiles con la ARRBs) inducen una ubiquitinación transitoria, mientras que los receptores de clase B (que establecen uniones más fuertes) promueven una ubiquitinación persistente.

No está claro, sin embargo, los residuos específicos de lisina que se ubiquitinan en las ARRBs, siendo posible que varíen entre los distintos receptores. No obstante, sí que parece establecida la relación entre dicha ubiquitinación, la estabilidad de estas modificaciones y el destino del complejo internalizado. Prueba de ello es que cuando se mutan las lisinas 11 y 12 de la ARRB2, el AT1aR pasa de tener un comportamiento típico de un receptor de clase B a promover una ubiquitinación transitoria de la ARRB2 típica de los receptores de clase A ⁹⁹.

Mutantes de MDM2 que carecen del dominio catalítico conservan a capacidad de unir ARRB2, que no se ubiquitina, pero provocan una internalización deficiente del receptor β_2 -AR. Se desconoce si MC1R activado media la ubiquitinación de ARRBs y, en su caso, cual es la identidad de la(s) E3 ubiquitina ligasa(s) implicada(s).

4.5.4. SUMOilación.

Recientemente se ha demostrado que las ARRBs sufren otro tipo de modificación postraduccional conocido como SUMOilación. En este proceso se produce la adición de SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) a un residuo de lisina de la proteína aceptora a través de un mecanismo muy parecido a la ubiquitinación. La SUMO es una proteína de pequeño tamaño relacionada estructuralmente con la ubiquitina aunque difiere bastante en su secuencia de aminoácidos. La SUMOilación de ARRBs se ha relacionado con la regulación de la endocitosis del β_2 -AR y se ha postulado que la adición de SUMO o ubiquitina a una molécula de ARRB puede determinar la activación de distintos efectores funcionales en la regulación de los GPCRs ¹⁰⁰. Nótese que ambas modificaciones se producen sobre el mismo tipo de residuos, por lo que podrían ser mutuamente excluyentes, al menos en algunos casos.

Además de mediar la desensibilización homóloga de los GPCRs, las ARRBs también son importantes en la transducción de señales, conectando los GPCRs con diversas vías de señalización alternativas como la cascada de señalización de la

superfamilia de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) ¹⁰¹ o uniendo proteínas como la E3-ubiquitina ligasa MDM2, que regula a su vez factores de transcripción como p53 ¹⁰². En este aspecto, existen diferencias en cuanto al interactoma de ARRB1 y ARRB2 ¹⁰³, de manera que si un GPCR demostrara una preferencia por una de las dos ARRBs, estaría también sesgado en cuanto a las proteínas de señalización a las que queda conectado. Además, ARRB1 es capaz de traslocarse a núcleo e inducir la transcripción de varios genes mediante el reclutamiento de cofactores como p300 que incrementan la acetilación de histonas ¹⁰⁴. En resumen, existen múltiples evidencias que demuestran que, a pesar de su elevada homología estructural y de sus analogías funcionales evidentes, ARRB1 y ARRB2 poseen características propias y diferenciales.

5. MGRN1: PROTEÍNA ACCESORIA DE LA SEÑALIZACIÓN POR MCs.

Además de los mecanismos generales de regulación de los GPCRs comentados anteriormente, el MC1R presenta mecanismos reguladores mucho menos frecuentes, que son mejor conocidos en el ratón que en el hombre gracias al estudio de mutaciones con fenotipo de pigmentación ¹⁰⁵. Se ha visto que algunas de estas mutaciones (como *md* o *mahoganoide*) no solo afectan al color del pelo del ratón, sino también a su peso corporal, lo cual indica que estos mecanismos se comparten al menos entre el MC1R y el MC4R.

Estudios genéticos en ratones han permitido identificar varias proteínas accesorias de la señalización a través de MCs. Una de ellas, Mahogunin Ring Finger-1 (MGRN1, antes conocida como mahogunina) está implicada en la regulación de la señalización por MC1R.

El gen *MGRN1* fue identificado por clonación posicional de *mahoganoide*, una mutación que anula la expresión de MGRN1 y provoca una coloración oscura del pelaje del ratón ¹⁰⁶. El fenotipo de pigmentación *Mahoganoide* se caracteriza por una acumulación de eumelaninas en la región dorsal, orejas y cola del ratón, y además es causa de una neurodegeneración esponjiforme en el ratón adulto ¹⁰⁷ y una mortalidad embrionaria y neonatal elevada debida a defectos cardiacos congénitos ¹⁰⁸. Todo ello sugiere una amplia variedad de acciones biológicas de MGRN1.

5.1. Isoformas de MGRN1.

El *locus MGRN1* está situado en el brazo corto del cromosoma 16 y consta de 17 exones. En células de melanoma humano se han descrito cuatro transcritos distintos resultado de un procesamiento alternativo de los exones 12 y 17. Según la longitud de la secuencia codificante del exón 17 los transcritos se nombran como L (del inglés *long*), si contienen la versión larga del exón, o S (del inglés *short*), si contienen la versión corta ¹⁰⁹. Atendiendo a la presencia o ausencia del exón 12, que codifica una secuencia de 19 aminoácidos con una señal de localización nuclear, se distinguen las formas (+), que contienen el citado exón, y las formas (-), que carecen de él (Fig. 15).

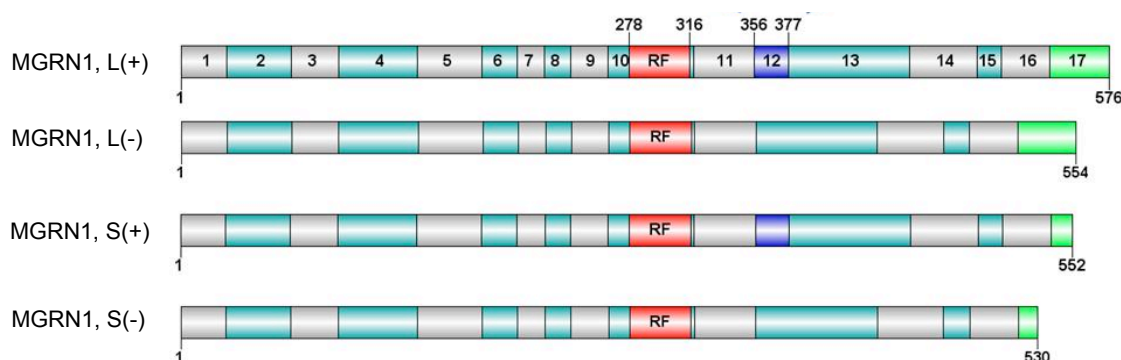


Figura 15. Estructura del gen *MGRN1* e isoformas de *MGRN1* humana. Los exones numerados que forman estos transcritos se destacan en colores alternos gris y azul claro. En azul oscuro destacamos el exón 12, inexistente en las formas (-) y en color verde el exón 17 cuya longitud da nombre a las formas L y S. En rojo se resalta la localización del dominio *RING finger* (exón 10) (ver texto).

5.2. Mecanismo de actuación y localización subcelular.

Recientemente se ha demostrado que la *MGRN1* humana se comporta como un regulador negativo de la señalización por MC1R y MC4R ¹⁰⁹. Su expresión disminuye la acumulación de AMPc en respuesta a las MCs en células que expresan dichos receptores. Además, se ha visto que esta inhibición de la señalización no depende de ubiquitinación y degradación de los receptores que resultan incluso estabilizados en presencia de *MGRN1*, a pesar de que, tal y como se discutirá más adelante, *MGRN1* posee características de E3 ubiquitina ligasa.

Nuestro grupo de investigación propuso recientemente un mecanismo de inhibición de la señalización basado en la competición entre *MGRN1* y la proteína Gsx por su unión al receptor MC1R. De esta manera, la unión de *MGRN1* al

receptor bloquearía la activación de Gs, lo que finalmente se traduce en una disminución de los niveles de AMPc y por tanto de la respuesta celular al estímulo hormonal ¹⁰⁹.

Las cuatro isoformas de MGRN1 tienen una capacidad similar para inhibir la señalización del MC1R y MC4R y reducir los niveles de AMPc. Sin embargo, la localización subcelular parece distinta para las formas (+) y para las (-). En ausencia de receptores de melanocortinas, todas las isoformas de MGRN1 se localizan preferentemente en el citosol. Por tanto, la secuencia de localización nuclear codificada por el exón 12 y presente en las formas (+) no es plenamente funcional en ausencia de MCRs. Por el contrario, la coexpresión junto con MC1R o MC4R conduce a una acumulación de las formas (+) en el núcleo. No ocurre lo mismo con las formas MGRN1 (-), que permanecen en el citoplasma en presencia y ausencia del receptor ¹⁰⁹, o al menos resultan traslocadas en menor proporción.

5.3. Función de MGRN1.

La proteína codificada por el gen murino (*Mgrn1*) y su ortólogo humano (KIAA0544, MGRN1) contienen, en el exón 10, un dominio *RING finger* característico de las E3 ubiquitina ligasas. Se ha demostrado que la mahogunina de ratón presenta actividad ubiquitina ligasa tanto *in vivo* ¹¹⁰ como *in vitro* ¹⁰⁷. El acrónimo RING proviene de sus siglas en inglés "*Really Interesting New Gene*" y se trata de un tipo de dedo de zinc que presenta un motivo caracterizado por la secuencia de aminoácidos C4HC3 (4 cisteínas, 1 histidina y 3 cisteínas) y la capacidad de unir dos cationes de zinc. Este tipo de enzimas son muy importantes en la degradación proteica, ya que muchas proteínas se monoubiquitinan o poliubiquitinan antes de ser degradadas, ya sea vía lisosoma o vía proteasoma ^{111,112}.

Se desconocen hasta el momento las funciones específicas que pueden tener las distintas isoformas de MGRN1 humana en la célula. En concreto, no se sabe si, al igual que la proteína murina, se comporta como una E3 ligasa y tampoco se conocen sus posibles sustratos. Los datos existentes y el fenotipo del ratón *mahoganoide*, en el que la expresión de *Mgrn1* está anulada, demuestran su implicación en la regulación de procesos como la pigmentación de la piel, la neurodegeneración y la regulación de la ingesta, homeostasis energética y peso corporal, pero es necesario descubrir posibles dianas citosólicas y/o nucleares para seguir avanzando y profundizando en el conocimiento de su fisiología.

6. VÍA UBIQUITINA-PROTEASOMA.

La ubiquitinación es una de las modificaciones postraduccionales más frecuente y un proceso clave para la regulación de la degradación de proteínas por el proteasoma.

El proteasoma es un complejo proteico presente en el núcleo y el citosol de todas las células eucariotas, encargado de degradar proteínas que ya no son necesarias o están mal plegadas o dañadas. De esta forma se consigue un mecanismo por el cual las células controlan la concentración de determinadas proteínas ¹¹³. También juega un papel esencial en la regulación del ciclo celular y la apoptosis ¹¹⁴.

Para que una proteína se degrade por el proteasoma, debe ser previamente marcada con ubiquitina, una pequeña proteína de 76 aminoácidos y aproximadamente 8,4 kDa de peso, altamente conservada en todas las células eucariotas. El proceso de ubiquitinación está mediado por un sistema de tres enzimas acopladas que actúan de manera secuencial añadiendo una ubiquitina a un residuo de lisina mediante un enlace isopeptídico.

En una primera etapa, la enzima E1 o enzima activadora de ubiquitina activa la ubiquitina: la E1 adenila el extremo C-terminal de la ubiquitina y forma un enlace tioéster entre este y un residuo de cisteína del centro catalítico de la E1 ^{115,116}. Este paso requiere la hidrólisis de una molécula de ATP. A continuación tiene lugar una etapa de transesterificación en donde la ubiquitina es transferida desde la E1 a un residuo de cisteína del centro activo de la segunda enzima, E2 o enzima conjugadora de ubiquitina. Por último, una tercera enzima, E3 o ubiquitina ligasa, reconoce la proteína específica que va a ser ubiquitinada y cataliza la transferencia de la ubiquitina desde la E2 al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la proteína diana, formándose un enlace isopeptídico ¹¹⁷ (**Fig. 16**).

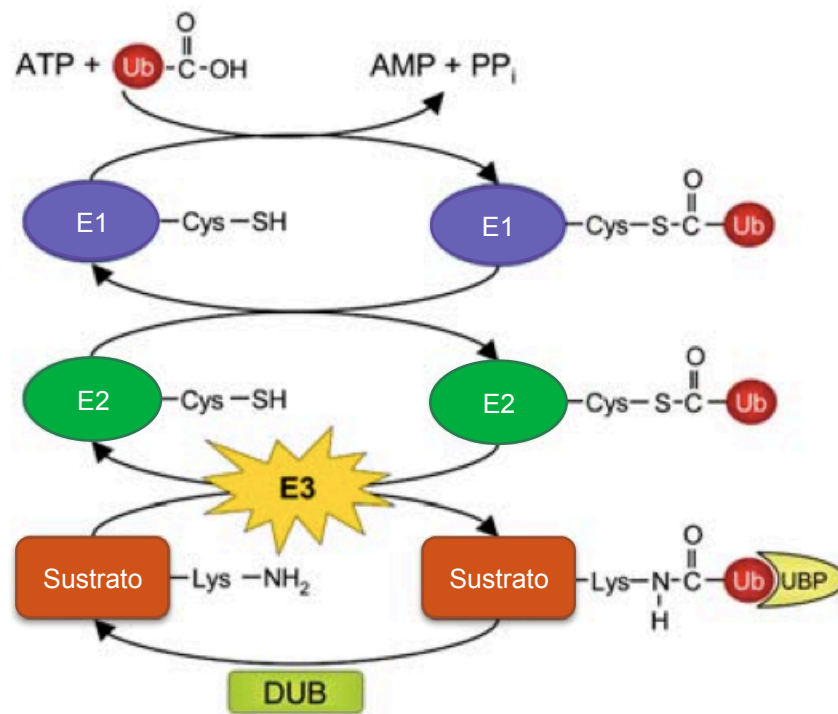


Figura 16. Mecanismo general de ubiquitinación de proteínas.

Existen tres variantes de ubiquitinación descritas: monoubiquitinación, multi-monoubiquitinación y poliubiquitinación. Las dos primeras consisten en la adición de una única molécula de ubiquitina a uno o varios residuos de lisina. En la poliubiquitinación se forman polímeros de ubiquitina que son añadidas a un mismo residuo de Lys de la proteína diana. Esto es posible porque dentro de la propia secuencia de la ubiquitina hay residuos de lisina susceptibles de ser ubiquitinados, entre los que destacan Lys48 y Lys63, aunque técnicas con espectroscopía de masas han determinado que las lisinas de las posiciones 6, 11, 27 y 33 también son susceptibles de formar enlaces isopeptídicos en diferentes porcentajes ¹¹⁸.

Además del marcaje de proteínas para su degradación por el proteasoma, la ubiquitinación también es importante en otros procesos que nada tienen que ver con la proteólisis del sustrato. Esto además parece estar relacionado con el número de moléculas de ubiquitina unidas a la proteína diana y con el residuo de lisina específico de la molécula de ubiquitina que participa en la formación de las cadenas de poliubiquitina. De esta manera la ubiquitinación del sustrato puede afectar a la regulación de la endocitosis, el remodelado de histonas y la actividad de algunas quinasas y factores de transcripción ¹¹². Otros procesos regulados por ubiquitinación son el tráfico al lisosoma, el tráfico nuclear y la reparación del ADN. Además, la ubiquitinación de los GPCRs u otras proteínas de las vías de señalización iniciadas

por estos parece jugar un papel importante en la regulación de la señalización ¹¹⁹, aunque al parecer no se trata de un mecanismo general ya que no se han encontrado evidencias de ubiquitinación de MC1R ¹⁰⁹.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kupper, T. S. Immune and Inflammatory Processes in Cutaneous Tissues. *J.Clin.Invest.* **86**, 1783–1789 (1990).
2. Costin, G.-E. & Hearing, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* **21**, 976–994 (2007).
3. Quevedo, W. C. & Holstein, T. J. in *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology: Second Edition* 61–90 (2007). doi:10.1002/9780470987100.ch3
4. Goding, C. R. Melanocytes: The new Black. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 275–279 (2007).
5. Buscà, R. & Ballotti, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **13**, 60–69 (2000).
6. Lin, J. Y. & Fisher, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **445**, 843–850 (2007).
7. Abdel-Malek, Z. & Kadekaro, A. L. in *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology: Second Edition* 410–420 (2007). doi:10.1002/9780470987100.ch20
8. Pho, L., Grossman, D. & Leachman, S. a. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. *Curr. Opin. Oncol.* **18**, 173–179 (2006).
9. Merrill, S. J., Ashrafi, S., Subramanian, M. & Godar, D. E. Exponentially increasing incidences of cutaneous malignant melanoma in Europe correlate with low personal annual UV doses and suggests 2 major risk factors. *Dermatoendocrinol.* **7**, e1004018 (2015).
10. Hearing, V. J. Biogenesis of pigment granules: A sensitive way to regulate melanocyte function. *J. Dermatol. Sci.* **37**, 3–14 (2005).
11. Kushimoto, T. *et al.* A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10698–10703 (2001).
12. Boissy, R. E., Huizing, M. & Gahl, W. A. in *The Pigmentary System* 155–170 (2007). doi:10.1002/9780470987100.ch7

13. García-Borrón, J. C. & Solano, F. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* **15**, 162–173 (2002).
14. Hearing, V. J. & Tsukamoto, K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**, 2902–2909 (1991).
15. Aroca, P., Solano, F., Garcia-Borrón, J. C. & Lozano, J. A. Specificity of dopachrome tautomerase and inhibition by carboxylated indoles. Considerations on the enzyme active site. *Biochem. J.* **277** (Pt 2, 393–397 (1991).
16. Kobayashi, T. *et al.* Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J.* **13**, 5818–5825 (1994).
17. Jimenez-Cervantes, C. *et al.* A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.* **269**, 17993–18000 (1994).
18. Bennett, D. C. & Lamoreux, M. L. The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res.* **16**, 333–44 (2003).
19. Fredriksson, R. & Schio, H. B. The Repertoire of G-Protein – Coupled Receptors in Fully. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1414–1425 (2005).
20. Marinissen, M. J. & Gutkind, J. S. G-protein-coupled receptors and signaling networks: Emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 368–376 (2001).
21. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G. & Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256–1272 (2003).
22. Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **21**, 90–113 (2000).
23. Gutkind, J. S. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci. STKE* **2000**, re1 (2000).
24. Wise, A., Gearing, K. & Rees, S. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discovery Today* **7**, 235–246 (2002).
25. Shenoy, S. K. Seven-transmembrane receptors and ubiquitination. *Circulation Research* **100**, 1142–1154 (2007).

26. Nygaard, R. *et al.* The Dynamic Process of β 2-Adrenergic Receptor Activation. *Cell* **152**, 532–542 (2013).
27. Gilman, A. G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615–649 (1987).
28. Heximer, S. P. A 'new twist' on RGS protein selectivity. *Structure* **21**, 319–20 (2013).
29. Lefkowitz, R. J., Pierce, K. L. & Luttrell, L. M. Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Mol. Pharmacol.* **62**, 971–974 (2002).
30. Catania, A., Gatti, S., Colombo, G. & Lipton, J. M. Targeting Melanocortin Receptors as a Novel Strategy. *Pharmacol. Rev.* **56**, 1–29 (2004).
31. Böhm, M., Luger, T. a, Tobin, D. J. & García-Borrón, J. C. Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1966–1975 (2006).
32. Gantz, I. & Fong, T. M. The melanocortin system. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, E468–E474 (2003).
33. Chhajlani, V. & Wikberg, J. E. S. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett.* **309**, 417–420 (1992).
34. Mountjoy, K. G., Robbins, L. S., Mortrud, M. T. & Cone, R. D. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* **257**, 1248–1251 (1992).
35. Chhajlani, V. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38**, 73–80 (1996).
36. Garcia-Borrón, J. C., Sanchez-Laorden, B. L. & Jimenez-Cervantes, C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* **18**, 393–410 (2005).
37. García-Borrón, J. C., Abdel-Malek, Z. & Jiménez-Cervantes, C. MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 699–720 (2014).
38. Schio, H. B. *et al.* Deletions of the N-terminal regions of the human melanocortin receptors. *FEBS Lett* **410**, 223–228 (1997).

39. Sánchez-Más, J., Sánchez-Laorden, B. L., Guillo, L. a, Jiménez-Cervantes, C. & García-Borrón, J. C. The melanocortin-1 receptor carboxyl terminal pentapeptide is essential for MC1R function and expression on the cell surface. *Peptides* **26**, 1848–57 (2005).
40. Wallin, E. & von Heijne, G. Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study. *Protein Eng.* **8**, 693–8 (1995).
41. Sánchez Más, J. *et al.* Loss-of-function variants of the human melanocortin-1 receptor gene in melanoma cells define structural determinants of receptor function. *Eur. J. Biochem.* **269**, 6133–6141 (2002).
42. Herraiz, C., Sánchez-Laorden, B. L., Jiménez-Cervantes, C. & García-Borrón, J. C. N-glycosylation of the human melanocortin 1 receptor: occupancy of glycosylation sequons and functional role. *Pigment Cell Melanoma Res.* **24**, 479–89 (2011).
43. Frändberg, P. a, Doufexis, M., Kapas, S. & Chhajlani, V. Cysteine residues are involved in structure and function of melanocortin 1 receptor: Substitution of a cysteine residue in transmembrane segment two converts an agonist to antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 851–7 (2001).
44. Ringholm, A. *et al.* Pharmacological characterization of loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor that are associated with red hair. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 917–923 (2004).
45. Holst, B., Elling, C. E. & Schwartz, T. W. Metal ion-mediated agonism and agonist enhancement in melanocortin MC1 and MC4 receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 47662–47670 (2002).
46. Prusis, P. *et al.* Modeling of the three-dimensional structure of the human melanocortin 1 receptor, using an automated method and docking of a rigid cyclic melanocyte-stimulating hormone core peptide. *J. Mol. Graph. Model.* **15**, 307–317 (1997).
47. Holst, B. & Schwartz, T. W. Molecular mechanism of agonism and inverse agonism in the melanocortin receptors: Zn(2+) as a structural and functional probe. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **994**, 1–11 (2003).
48. Sanchez-Más, J., Hahmann, C., Gerritsen, I., Garcia-Borrón, J. C. & Jiménez-Cervantes, C. Agonist-independent, high constitutive activity of the human melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Res.* **17**, 386–395 (2004).
49. Zanna, P. T. *et al.* Mechanism of dimerization of the human melanocortin 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 211–216 (2008).

50. Tarnow, P., Schöneberg, T., Krude, H., Grüters, A. & Biebermann, H. Mutationally induced disulfide bond formation within the third extracellular loop causes melanocortin 4 receptor inactivation in patients with obesity. *J. Biol. Chem.* **278**, 48666–48673 (2003).
51. Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D. & Dixon, R. A. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 101–32 (1994).
52. Schiöth, H. B. *et al.* Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 488–491 (1999).
53. Haskell-Luevano, C. *et al.* Three-dimensional molecular models of the hMC1R melanocortin receptor: complexes with melanotropin peptide agonists. *Drug Des. Discov.* **14**, 197–211 (1996).
54. Prusis, P. *et al.* A three dimensional model for the interaction of MSH with the melanocortin-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **210**, 205–210 (1995).
55. Yang, Y. -k., Dickinson, C., Haskell-Luevano, C. & Gantz, I. Molecular Basis for the Interaction of [Nle⁴,D-Phe⁷]Melanocyte Stimulating Hormone with the Human Melanocortin-1 Receptor (Melanocyte -MSH Receptor). *J. Biol. Chem.* **272**, 23000–23010 (1997).
56. Newton, J. M. *et al.* Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mamm. Genome* **11**, 24–30 (2000).
57. Shahzad, M. *et al.* Identification and functional characterization of natural human melanocortin 1 receptor mutant alleles in Pakistani population. *Pigment Cell Melanoma Res.* (2015). doi:10.1111/pcmr.12400
58. Qanbar, R. & Bouvier, M. Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Ther.* **97**, 1–33 (2003).
59. Vance, K. W. & Goding, C. R. The Transcription Network Regulating Melanocyte Development and Melanoma. *Pigment Cell Res.* **17**, 318–325 (2004).
60. Chin, L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 559–70 (2003).
61. Herraiz, C. *et al.* Signaling from the human melanocortin 1 receptor to ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases involves transactivation of cKIT. *Mol. Endocrinol.* **25**, 138–156 (2011).

62. Walker, W. P. & Gunn, T. M. Shades of meaning: The pigment-type switching system as a tool for discovery. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 485–495 (2010).
63. Hida, T. *et al.* Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes: A cAMP-independent pathway. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 623–634 (2009).
64. Parnot, C., Miserey-Lenkei, S., Bardin, S., Corvol, P. & Clauser, E. Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 336–43 (2002).
65. Benned-Jensen, T., Mokrosinski, J. & Rosenkilde, M. M. The E92K melanocortin 1 receptor mutant induces cAMP production and arrestin recruitment but not ERK activity indicating biased constitutive signaling. *PLoS One* **6**, e24644 (2011).
66. Le Pape, E. *et al.* Microarray analysis sheds light on the dedifferentiating role of agouti signal protein in murine melanocytes via the Mc1r. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1802–7 (2009).
67. Swope, V. B. *et al.* Defining MC1R regulation in human melanocytes by its agonist α -melanocortin and antagonists agouti signaling protein and β -defensin 3. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2255–62 (2012).
68. Rees, J. L. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 739–51 (2004).
69. Box, N. F., Wyeth, J. R., O’Gorman, L. E., Martin, N. G. & Sturm, R. A. Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet* **6**, 1891–1897 (1997).
70. Duffy, D. L. *et al.* Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 447–461 (2004).
71. Healy, E. *et al.* Melanocortin-1-receptor gene and sun sensitivity in individuals without red hair. *Lancet* **355**, 1072–1073 (2000).
72. Smith, R. *et al.* Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 119–122 (1998).
73. Tan, C. P. *et al.* Molecular analysis of a new splice variant of the human melanocortin-1 receptor. *FEBS Lett.* **451**, 137–41 (1999).

74. Dalziel, M. *et al.* Alpha-MSH regulates intergenic splicing of MC1R and TUBB3 in human melanocytes. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2378–92 (2011).
75. Funasaka, Y. *et al.* Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1alpha, interleukin-1beta, endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Br. J. Dermatol.* **139**, 216–24 (1998).
76. Scott, M. C., Suzuki, I. & Abdel-Malek, Z. A. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res.* **15**, 433–9 (2002).
77. Cui, R. *et al.* Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* **128**, 853–64 (2007).
78. Jiménez-Cervantes, C. *et al.* Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. *J. Cell Sci.* **114**, 2335–2344 (2001).
79. Galibert, M. D., Carreira, S. & Goding, C. R. The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *EMBO J.* **20**, 5022–31 (2001).
80. Martínez-Esparza, M., Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J. A. & García-Borrón, J. C. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **255**, 139–46 (1998).
81. Martínez-Esparza, M. *et al.* Transforming growth factor-beta1 inhibits basal melanogenesis in B16/F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1. *J. Biol. Chem.* **272**, 3967–72 (1997).
82. Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.* **115**, 455–465 (2002).
83. Sánchez-Más, J. *et al.* Role of G protein-coupled receptor kinases in the homologous desensitization of the human and mouse melanocortin 1 receptors. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1035–48 (2005).
84. Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **53**, 1–24 (2001).

85. Luttrell, L. M. Composition and function of G protein-coupled receptor signaling complexes controlling mitogen-activated protein kinase activity. *J. Mol. Neurosci.* **26**, 253–64 (2005).
86. Gurevich, V. V & Gurevich, E. V. The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **110**, 465–502 (2006).
87. Hirsch, J. A., Schubert, C., Gurevich, V. V & Sigler, P. B. The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* **97**, 257–269 (1999).
88. Han, M., Gurevich, V. V, Vishnivetskiy, S. A., Sigler, P. B. & Schubert, C. Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure* **9**, 869–880 (2001).
89. Zhan, X., Gimenez, L. E., Gurevich, V. V & Spiller, B. W. Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *J. Mol. Biol.* **406**, 467–78 (2011).
90. Nobles, K. N., Guan, Z., Xiao, K., Oas, T. G. & Lefkowitz, R. J. The active conformation of β -arrestin1: Direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of β -arrestins1 and -2. *J. Biol. Chem.* **282**, 21370–21381 (2007).
91. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G. & Barak, L. S. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 17201–10 (2000).
92. Lin, F. T., Miller, W. E., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. Feedback regulation of β -arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 15971–15974 (1999).
93. Lin, F. *et al.* Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* **41**, 10692–10699 (2002).
94. Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. B-Arrestin-Mediated Receptor Trafficking and Signal Transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* **32**, 521–533 (2011).
95. Ozawa, K. *et al.* S-Nitrosylation of β -Arrestin Regulates β -Adrenergic Receptor Trafficking. *Mol. Cell* **31**, 395–405 (2008).

96. Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* **278**, 14498–506 (2003).
97. Varadan, R. *et al.* Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 7055–63 (2004).
98. Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A. & Lefkowitz, R. J. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* **294**, 1307–13 (2001).
99. Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Receptor-specific ubiquitination of β -arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J. Biol. Chem.* **280**, 15315–15324 (2005).
100. Wyatt, Malik, Vesecky & Marchese. Small ubiquitin-like modifier modification of arrestin-3 regulates receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* **286**, 3884–3893 (2011).
101. Shukla, A. K., Xiao, K. & Lefkowitz, R. J. Emerging paradigms of β -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 457–69 (2011).
102. Wang, P. *et al.* Beta-arrestin 2 functions as a G-protein-coupled receptor-activated regulator of oncoprotein Mdm2. *J. Biol. Chem.* **278**, 6363–6370 (2003).
103. DeFea, K. a. Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: How do they determine what to scaffold? *Cell. Signal.* **23**, 621–629 (2011).
104. Kang, J. *et al.* A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* **123**, 833–47 (2005).
105. Miller, K. A. *et al.* Genetic studies of the mouse mutations mahogany and mahoganoid. *Genetics* **146**, 1407–15 (1997).
106. Phan, L. K., Lin, F., LeDuc, C. a, Chung, W. K. & Leibel, R. L. The mouse mahoganoid coat color mutation disrupts a novel C3HC4 RING domain protein. *J. Clin. Invest.* **110**, 1449–1459 (2002).
107. He, L. *et al.* Spongiform degeneration in mahoganoid mutant mice. *Science* **299**, 710–2 (2003).

108. Cota, C. D. *et al.* Mice with mutations in Mahogunin ring finger-1 (Mgrn1) exhibit abnormal patterning of the left-right axis. *Dev. Dyn.* **235**, 3438–47 (2006).
109. Pérez-Oliva, A. B., Olivares, C., Jiménez-Cervantes, C. & García-Borrón, J. C. Mahogunin ring finger-1 (MGRN1) E3 ubiquitin ligase inhibits signaling from melanocortin receptor by competition with Galphas. *J. Biol. Chem.* **284**, 31714–25 (2009).
110. Kim, B. Y., Olzmann, J. A., Barsh, G. S., Chin, L.-S. & Li, L. Spongiform neurodegeneration-associated E3 ligase Mahogunin ubiquitylates TSG101 and regulates endosomal trafficking. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1129–42 (2007).
111. Hicke, L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 195–201 (2001).
112. Weissman, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 169–78 (2001).
113. Lodish, H. *et al.* *Molecular Cell Biology. Perspective* **4**, (2008).
114. Konstantinova, I. M., Tsimokha, A. S. & Mittenberg, A. G. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **267**, 59–124 (2008).
115. Haas, A. L., Warms, J. V, Hershko, A. & Rose, I. A. Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* **257**, 2543–8 (1982).
116. Haas, A. L. & Rose, I. A. The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *J. Biol. Chem.* **257**, 10329–37 (1982).
117. Hershko, a & Ciechanover, a. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479 (1998).
118. Kulathu, Y. & Komander, D. Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 508–23 (2012).
119. Wojcikiewicz, R. J. H. Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 35–41 (2004).

OBJETIVOS

De acuerdo con lo expuesto en la Introducción, la activación de MC1R, el principal determinante molecular del fototipo de la piel, está sometida a una regulación compleja. Las proteínas β -arrestina (ARRB) participan en la desensibilización homóloga e internalización de muchos GPCRs, aunque no está caracterizada la función de las diferentes isoformas de ARRB expresadas en melanocitos sobre MC1R activo, ni las consecuencias funcionales de la formación de los posibles complejos MC1R-ARRB. Por otro lado, MGRN1 es una proteína accesoria de la señalización vía melanocortinas que compite con la proteína Gs por su unión a MC1R. Aunque se ha descrito una mutación inactivadora del gen murino (*Mgrn1*), denominada *mahoganoide*, que genera ratones de pelaje oscuro, aún no se conoce su posible función como reguladora de la actividad del MC1R en humanos.

A la vista de estos antecedentes, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Análisis del efecto diferencial de las isoformas de ARRB (ARRB1 y ARRB2) sobre la señalización de MC1R, tanto en un sistema heterólogo clásico (células HEK 293T), como en su entorno fisiológico (células de melanoma humano HBL).
2. Estudio del procesamiento de ARRB1 y ARRB2 inducido por su interacción con MC1R.
3. Caracterización del posible papel de MGRN1 como E3-ubiquitina ligasa dependiente de MC1R.
4. Búsqueda de posibles dianas de ubiquitinación de MGRN1 en melanocitos humanos y murinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS Y MATERIALES.

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico. Las disoluciones se prepararon con agua bidestilada tratada con un sistema de desionización MilliQ-Plus de Water-Millipore, hasta alcanzar una resistividad final de 18.2 MΩ.cm.

Cada una de estas empresas suministró los siguientes materiales, reactivos o kits:

Ambion (Austin, TX, USA): ARN de interferencia (ARRB1 y ARRB2).

AppliChem GMBH (Darmstad, Alemania): fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y dodecil sulfato sódico (SDS).

Bio-Rad (Richmond, VA, USA): acrilamida, bisacrilamida, persulfato amónico, TEMED, Tween 20, Extra Thick Blot Paper Protean XL Size.

Dako Corporation (Carpinteria, USA): medio de montaje de inmunofluorescencia.

Fermentas (Barcelona, España): estándares de peso molecular de ADN, EcoTaq DNA polimerasa y endonucleasas de restricción.

Invitrogen (Carlsbad, CA, USA): Lipofectamina 2000, Library Efficiency DH5α, DNA ligasa, Alexa 568-AntiRabbit conjugate, Alexa 568-AntiMouse conjugate, pcDNA3.1 y SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR.

Merck (Darmstadt, Alemania): isopropanol y ácido acético.

Millipore (Billerica, MA, USA): Immobilon-Ny+ Blotting Membrane.

Pronadisa (Madrid, España): Agarosa, medio LB agar, medio SOB.

Qiagen (Hilden, Alemania): RNeasy Mini Kit.

R&D Systems (Minneapolis, MN, USA): Parameter cAMP Assay.

Scharlab (Barcelona, España): Tris, glicina

Santa Cruz Biotechnology (Sta Cruz, CA, USA): anti-ratón Ig conjugado con peroxidasa, antiERK2 policlona y otros anticuerpos, siARN de interferencia (MC1R).

Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA): Igepal CA-630, albúmina de suero bovino (BSA), ácido bicinconínico, ampicilina, kanamicina, p-formaldehído, β-mercaptoetanol, monoclonal AntiHA-peroxidase antibody, monoclonal AntiFlag M2-peroxidase antibody, antiFLAG M2 monoclonal antibody, anti-β-tubulin III antibody, GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit, GenElute HP Plasmid Miniprep Kit, iodoacetamida, N-etilmaleimida.

Stratagene (La Jolla, CA, USA): QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit.

TPP (Trasadingen, Suiza): material de plástico utilizado en los cultivos celulares.

Los productos no descritos aquí, se especifican en los apartados correspondientes y la composición de tampones que no se detallan en esta sección y que se subrayan en el texto, se encuentra recogida en el Apéndice I.

2. LÍNEAS, CULTIVOS CELULARES Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.

2.1. Líneas y cultivos celulares.

Los medios de cultivo empleados fueron OptiMEM, DMEM-GlutaMAX™ y RPMI-GlutaMAX™. Los medios, el suero bovino fetal (SBF), tripsina/EDTA y los antibióticos penicilina y estreptomina fueron suministrados por Gibco BRL-Life Technologies (Gaithersburg, USA). El antibiótico geneticina G418 fue suministrado por Calbiochem (Darmstadt, Alemania).

Las líneas celulares empleadas durante este tesis doctoral fueron: células embrionarias humanas HEK 293T, proporcionadas por la Sección de Cultivo de Tejidos del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI, Universidad de Murcia); células de melanoma humano HBL, procedentes del laboratorio del Profesor G. Ghanem (LOCE, Bruselas, Bélgica); y melanocitos de ratón melan a6 y md1, del laboratorio de la Dra. D. Bennett (St George's University of London, Reino Unido).

Los cultivos celulares se realizaron en distintos tipos de botellas o placas según lo más idóneo en cada experimento. Las células HEK 293T y HBL se cultivaron en medio MEM modificado por Dulbecco con GlutaMAX™, suplementado con un 10% de SBF, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de sulfato de estreptomina. Las células melan a6 y md1 se cultivaron en medio RPMI con GlutaMAX™, suplementado con un 10% de SBF, 200 nM de TPA, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de sulfato de estreptomina. El crecimiento de las células tuvo lugar en un incubador ThermoQuest (Forma Scientific, Marietta, OH, USA) a una temperatura constante de 37 °C y en una atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO₂ para las células HEK 293T y HBL y un 10% de CO₂ para las células melan a6 y md1.

De manera rutinaria el cultivo celular se mantuvo sembrando una densidad inicial de aproximadamente 5×10^5 células por botella de 75 cm², en 10 ml de medio

de cultivo adecuado a cada línea celular. El cultivo se mantuvo hasta llegar a un 80% de confluencia, lo cual tenía lugar al cabo de 2 o 3 días. Para recoger las células primero se lavaron con tampón fosfato salino estéril, PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1mM, pH 7.2) y posteriormente se despegaron con un tratamiento de tripsina/EDTA (0.5% tripsina, 0.2% EDTA en PBS) de 3 min. Las células HEK 293T no requirieron este tratamiento con tripsina. Por último se centrifugaron a 2000g durante 5 min.

2.2. Obtención de extractos celulares.

Para la extracción proteica, se siguieron dos procedimientos distintos en función de las proteínas que se deseaban detectar:

1. Para la extracción y posterior análisis por transferencia Western de proteínas fosforiladas, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron con tampón de solubilización celular I, que contiene PMSF 100ng/ml, 1% de Igepal y 1% de inhibidores de fosfatasa (imidazol 200mM, NaF 100 mM, molibdato de sodio 115 mM, o-vanadato de sodio 100 mM y tartrato de sodio dihidratado 400 mM) (Calbiochem) en PBS. A continuación, se centrifugaron a 13000rpm durante 30 minutos a 4° C en una centrífuga Eppendorf. Los sobrenadantes se recogieron para determinar el contenido total de proteína mediante el kit del ácido bicinónico, según las instrucciones del fabricante. Como patrón para obtener la recta de calibrado se utilizó BSA.

2. Para la extracción y posterior detección de proteínas en presencia de MC1R, las células se lavaron primero con PBS frío y se despegaron posteriormente con un tratamiento de tripsina/EDTA de 5 minutos, y se centrifugaron a 2000 rpm a 4° C durante 5 minutos. Una vez aspirado el sobrenadante, se solubilizaron en tampón de solubilización celular II (50 mM Tris-HCl pH 8, 1% Igepal, 1mM EDTA, 0.1 mM PMSF), suplementado con iodoacetamida 10 mM y N-etilmaleimida 10 mM. La iodoacetamida carboximetila grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína e impide la formación de agregados que alteren el proceso de separación electroforética, la N-etilmaleimida es un agente protector de tioles que bloquea la actividad de isopeptidasas y enzimas deubiquitinantes. Tras la resuspensión, las muestras se incubaron con agitación vigorosa en oscuridad, a 4° C durante 1h. A continuación, se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf (30 min a 4° C). Se recogieron los sobrenadantes y se procedió a la cuantificación de la proteína total como se ha descrito anteriormente.

3. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS Y ESTABLES.

3.1. Transfección transitoria de ADN plasmídico.

Para las transfecciones transitorias se utilizó el reactivo Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) a una concentración de 1 mg/ml. En todos los casos, la lipofectamina y el ADN se diluyeron antes de la formación de los complejos lipofectamina-ADN en medio OptiMEM reducido en suero para aumentar la eficiencia de transfección.

Las células se cultivaron en placas de 6, 12 o 24 pocillos, según las necesidades. Cuando las células alcanzan una confluencia del 85-90% se procede a la transfección. El ADN y la lipofectamina se diluyen por separado (concentraciones en **tabla 1**) en optiMEM reducido en suero durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este periodo, del ADN diluido se mezcla con la lipofectamina diluida y se incuban durante 20 minutos como máximo, a temperatura ambiente para permitir que se formen los complejos ADN-Lipofectamina 2000. A continuación se añade DMEM suplementado con 10% de SBF hasta el volumen final que figura en la tabla 1. No se añaden antibióticos durante la transfección. Transcurridas 6 horas, el medio es sustituido por DMEM-GlutaMAX™ suplementado con 10% de SBF, 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina. Las células se procesan entre 24 y 48h después de la transfección. Para células melan a6 y md1, la transfección se realizó en todo momento usando optiMEM reducido en suero y la cantidad de ADN y lipofectamina 2000 se recoge en la **tabla 2**.

Tamaño de placa	ADN plasmídico	Lipofectamina 2000	Volumen final
6 pocillos	0,6 µg	1,5 µl	800 µl
12 pocillos	0,3 µg	1 µl	400 µl
24 pocillos	0,15 µg	0,75 µl	350 µl

Tabla 1. Cantidades de ADN y Lipofectamina 2000 utilizadas según el tamaño de placa para las transfecciones transitorias en células HEK 293T y HBL.

Tamaño de placa	ADN plasmídico	Lipofectamina 2000	Volumen final
6 pocillos	1 µg	2 µl	800 µl
12 pocillos	0,5 µg	1.5 µl	400 µl
24 pocillos	0,3 µg	1 µl	350 µl

Tabla 2. Cantidades de ADN y Lipofectamina 2000 utilizadas según el tamaño de placa para las transfecciones transitorias en células melan a6 y md1.

3.2. Transfección transitoria de ARN pequeño de interferencia.

Para el silenciamiento de la expresión de genes se realizaron ensayos de interferencia de ARN por transfección transitoria con ARN pequeños de interferencia (siARN) procedentes de Santa Cruz Biotechnology y Ambion. Los siARNs son moléculas de ARN de 20-25 nucleótidos de longitud, que silencian genes promoviendo la hidrólisis de ARNm cuyas secuencias son exactamente complementarias. Cada molécula de siARN es incorporada a un complejo multiproteico conocido como RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), que separa las dos hebras de la molécula de siARN, quedándose una de ellas incorporada en el complejo. Esta hebra es usada como molde para reconocer a la molécula de ARNm lo que, posteriormente conduce a su degradación por RISC.

La transfección transitoria de los siARNs se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Los siARN de la casa comercial Ambion se utilizaron a una concentración final de 60 nM/pocillo, mientras que los de Sta Cruz se emplearon a una concentración de 10 μ M (**tabla 3**). Se diluyeron por separado el siARN y la Lipofectamina 2000 en OptiMEM reducido en suero y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El procedimiento continúa según se ha detallado en el protocolo 3.1 pero las células se procesan 48 horas después de la transfección. Como control negativo, se utilizó una mezcla de secuencias de ARN que no conduce a degradación específica de ningún ARNm celular conocido.

RNA de interferencia	Casa comercial	ARNm silenciado
siARN ARRB1	Ambion	Variante de ARRB: ARRB1
siARN ARRB2	Ambion	Variante de ARRB: ARRB2
siARN control Ambion	Ambion	Control utilizado para los siARN de ARRB1 y ARRB2.
siARN MC1R	Sta Cruz	Receptor MC1R
siARN control A	Sta Cruz	Control utilizado para el siARN de MC1R

Tabla 3. ARN de interferencia utilizado y proteínas silenciadas. Nombre del siARN, cantidad de siARN por pocillo de 12 y proteína silenciada por cada uno de ellos

3.3. Transfección estable en células HBL.

Los experimentos de transfección estable se llevaron a cabo en las células HBL con unas construcciones de ARRB marcadas con el epitopo FLAG en el

extremo N-terminal contenidas en el vector de expresión pcDNA3.1. Para ello se utilizaron placas de 10 cm de diámetro. Cuando las células se encontraban confluentes a un 80% se añadieron 10 µg de ADN plasmídico y 60 µl del reactivo de transfección Superfect (Qiagen). El plásmido pcDNA3.1 expresa un marcador de selección que consiste en un gen que codifica una proteína que confiere resistencia al antibiótico geneticina, también conocido como G418. Una vez incubadas las células con la mezcla de transfección durante 3 horas, se recuperaron durante 48 horas con medio completo fresco. Pasado este tiempo se volvieron a sembrar en nuevas placas de 10 cm a una dilución 1:10 con medio suplementado con G418 a una concentración final de 800 µg/ml. El medio se cambió cada dos días por medio fresco con G418 hasta que se pudieron aislar clones individuales resistentes al antibióticos. Estos clones fueron recogidos, sembrados en pocillos individuales y amplificados, siempre en presencia de medio suplementado G418.

4. ELECTROFORESIS ANALÍTICA DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE).

Una vez solubilizadas las células como se ha descrito en el apartado 2.2 y cuantificada la cantidad de proteína total, las muestras fueron diluidas en tampón de electroforesis de proteínas 4X (250 mM Tris pH 6.8, 8% SDS, 20% glicerol, 0.08% azul de bromophenol, 3.2 M β-mercaptoetanol). La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) mediante el sistema discontinuo descrito por Laemmli con algunas modificaciones, con una cubeta Mini Protean II o III y una fuente de alimentación 3000 Xi, ambos de BioRad.

El gel hacinador, de aproximadamente 1 cm de altura, se preparó a una concentración final de acrilamida-bisacrilamida del 3%. El gel separador, de aproximadamente 6 cm de altura y 0.75 cm de grosor, se preparó a una concentración final de acrilamida-bisacrilamida del 10%. Los geles polimerizan por la acción del TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina) y del persulfato amónico sobre una disolución de acrilamida y bisacrilamida. El volumen máximo de muestra aplicado en cada calle fue de 30 µl, con una cantidad de proteína celular comprendida entre 8 y 30 µg. A continuación se procedió a la electroforesis usando un tampón de recorrido disociante. La intensidad de corriente aplicada fue de 15 mA/gel hasta que el frente de la muestra entró en el gel separador y posteriormente de 25 mA/gel. Una vez que el frente salió del gel separador se detuvo la corriente, y se procedió a la detección inmunoquímica mediante transferencia Western de las proteínas separadas por peso molecular.

5. TRANSFERENCIA WESTERN.

La presencia y cantidad de determinadas proteínas en los extractos celulares se analizó mediante transferencia Western utilizando anticuerpos específicos (**tabla 4**). Una vez finalizada la electroforesis en condiciones reductoras, el gel fue incubado en tampón de transferencia durante 5 min y transferido a una membrana de PVDF (Immobilon-P) de 0.45 μm de tamaño de poro (Millipore), previamente tratada según las instrucciones de la casa proveedora. Para ello utilizamos una unidad de electrotransferencia semi-seca de Bio-Rad. Tras 1 h de transferencia a 22 V (que corresponde con un descenso en la intensidad de corriente de 0.12 A/gel a 0.04 A/gel), la membrana se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente en agitación orbital suave (50 rpm), con el mismo tampón empleado en la etapa posterior de unión del anticuerpo, pero desprovisto de este último. Los tampones de unión empleados se especifican en la Tabla 3. Posteriormente, se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación orbital suave con el anticuerpo primario en el tampón de unión más idóneo. Finalizada la incubación, se realizaron cinco lavados de 10 min en agitación vigorosa (100 rpm) con tampón de lavado adecuado y, cuando fue necesario, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente y agitación orbital suave (50 rpm), utilizando el mismo tampón de unión que en la incubación anterior (**Tabla 4**). La membrana fue lavada de nuevo 5 veces antes de proceder a su revelado.

Para la detección de proteínas específicas se empleó el método de quimioluminiscencia mejorada o aumentada con el reactivo Pierce ECL Plus Western Substrate (Thermo Scientific) y la emisión se registró en un sistema de adquisición de imágenes Chemi-Smart 3000 en condiciones no saturantes. La cuantificación se realizó con el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA).

La homogeneidad de la carga total de proteínas en las distintas calles del gel se comprobó mediante la incubación de la membrana con el anticuerpo antiERK2, que se une específicamente a la MAP quinasa ERK2. Para ello se realizó un proceso conocido como “*stripping*”, que consiste en un lavado de 10 min con NaOH 0.5 M seguido de otro lavado de 10 minutos con agua destilada, ambos en agitación vigorosa. Con esto se consigue despegar de la membrana los anticuerpos primario y secundario utilizados anteriormente. A continuación, se realiza un lavado con TGS-Tween y se bloquea de nuevo la membrana con BSA al 2% en TGS-Tween20 durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación orbital suave. Posteriormente se incubó la membrana con α -ERK2 en tampón de bloqueo (dilución 1:7500) durante

toda la noche a 4°C en agitación. El tratamiento continúa lavando 5 veces la membrana con TGS-Tween20 y se incuba con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1:10000) diluido en TGS-Tween20 con BSA al 2%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras otros 5 lavados, se procede al revelado, tal y como se ha indicado anteriormente.

La intensidad de las bandas correspondientes a la proteína de interés, se corrigió por diferencia con el obtenido para el fondo y los resultados de cuantificación se normalizaron dividiendo el valor para la proteína diana entre el obtenido para ERK2.

Anticuerpo Primario	Dilución	Tampón de Bloqueo	Anticuerpo Secundario	Dilución
α -ARRB1 (BD Biosciences)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α -ratón (Sta Cruz)	1:10000
α -ARRB2 (Cell Signaling)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α -conejo (Millipore)	1:10000
α -CREB1 (Sta Cruz)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α -conejo (Millipore)	1:10000
α ERK2 (Sta Cruz)	1:7500	2% BSA en <u>TBST</u>	α -conejo (Millipore)	1:10000
α -pERK1/2 (Sta Cruz)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α -conejo (Millipore)	1:10000
α -FLAG-HRP (Sigma-Aldrich)	1:5000	5% leche en <u>PBS</u> -Tween 0.1%	-	-
α -HA-HRP	1:5000	5% leche en <u>PBS</u> -Tween 0.1%	-	-
α -MGRN1 (Oigene)	1:2000	2% BSA en <u>TBST</u>	α -ratón (Sta Cruz)	1:10000
α -Myc (Sigma-Aldrich)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α -conejo (Millipore)	1:10000
α -PEP7h	1:10000	5% leche en <u>PBS</u> -Tween 0.1%	α -conejo (Millipore)	1:10000
α -TUBB3 (Sigma-Aldrich)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α -conejo (Millipore)	1:10000
α -Ub (Sigma-Aldrich)	1:1000	2% BSA en <u>TBST</u>	α -ratón (Sta Cruz)	1:10000

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en la detección de proteínas mediante transferencia Western. Se especifica para cada anticuerpo la casa comercial, el tampón utilizado en el bloqueo de la membrana, que coincide con el tampón de unión del anticuerpo eliminando la leche, la dilución utilizada, el anticuerpo secundario (si es necesario) y la dilución empleada.

6. INMUNOPRECIPITACIÓN.

Para los experimentos de inmunoprecipitación se utilizaron aproximadamente 2×10^6 células que se lavaron dos veces con PBS y se lisaron en 200 μ l de tampón de solubilización a 4° C. Se llevaron a cabo dos tipos de inmunoprecipitación: una de ellas con proteína G unida a micropartículas magnéticas y otra con proteína G-agarosa:

1. Con proteína G-magnética: las partículas se equilibraron con tampón de solubilización y se llevó a cabo un pre-aclarado incubando los 200 μ l del lisado con 30 μ l de proteína G unida a micropartículas magnéticas (MicroMACS Protein G MicroBeads, Miltenyi Biotec) durante 1 hora en cámara fría y en agitación orbital. Tras el pre-aclarado el sobrenadante se separó de la proteína G aplicando una fuerza magnética a través de columnas MACS Separation Columns (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación un volumen aproximado de 100-200 μ l de cada muestra se incubó durante 1 hora en agitación orbital a 4° C con 1 μ g de anticuerpo purificado y 50 μ l de MicroMACS Protein G MicroBeads. Tras esta incubación, se llevó a cabo la separación en las columnas MACS Separation Columns empleando el μ MACS Separator (Miltenyi Biotec). Para ello, se depositó la muestra en la columna y, una vez eluida completamente, se realizaron 5 lavados con 200 μ l de tampón de solubilización. Tras los lavados se depositaron 20 μ l de tampón de carga de electroforesis con β -mercaptoetanol previamente calentado a 95° C, y se incubó 5 minutos en las columnas. Finalmente, se añadieron 50 μ l del mismo tampón de carga precalentado y se recogió todo el eluido en un tubo limpio. Esta muestra se analizó por SDS-PAGE o se congeló a -20° C hasta su uso.

2. Con proteína G-agarosa: esta proteína G-agarosa, proporcionada por Sigma-Aldrich, viene unida covalentemente a un anticuerpo monoclonal antiFLAG (EZview™ Red AntiFLAG M2 agarose affinity gel) o antiHA (EZview™ Red Anti-HA Affinity Gel) y permite por tanto inmunoprecipitar proteínas que contengan uno de estos epitopos. La suspensión de proteína G-agarosa se equilibró con tampón de solubilización y se incubó con PBS-BSA 2% durante 1 hora a 4° C en agitación orbital para bloquear los sitios de unión inespecífica. Tras el bloqueo, la proteína G-agarosa se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. A continuación se incubó el lisado celular con 25 μ l de proteína G-agarosa bloqueada durante 1 hora a 4° C en agitación orbital. Tras la incubación se centrifugó la mezcla durante 30 segundos a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 5 veces con 500 μ l de tampón de solubilización, suplementado con 300mM NaCl y 0.1% de Tween20. Tras el último lavado se

eliminó cuidadosamente todo el sobrenadante y se procedió a la elución. Se añadieron 25 μ l de tampón de electroforesis 2X (con β -mercaptoetanol) y se incubó a 95° C (50° C si está presente el MC1R) durante 5 minutos. Finalmente, se centrifugó 30 segundos a 140000 rpm y se recogieron 20 μ l del sobrenadante. La muestra inmunoprecipitada se analizó por SDS-PAGE o se congeló a -20° C hasta su uso.

7. ENSAYO DE ACOPLAMIENTO FUNCIONAL.

La unión del agonista α -MSH al MC1R provoca la activación de la proteína Gs, que a su vez estimula la *adenilato ciclasa*. El resultado es un aumento en los niveles intracelulares de AMPc, que actúa como segundo mensajero. Por tanto, para analizar el acoplamiento funcional del MC1R, se usó el siguiente método de cuantificación del nivel de AMPc intracelular.

7.1. Estimulación y extracción de AMPc.

Se sembró un número equivalente de células en placas de 12 pocillos. Para cada experimento, como mínimo, se sembraron pocillos por duplicado y dos pocillos paralelos para determinar la proteína total. Cuando las células se encontraban a un 80-90 % de confluencia o 16 horas después de realizar una transfección transitoria, fueron privadas de suero al menos durante 3 horas previas a la estimulación.

La estimulación se realizó con NDP-MSH a una concentración final en pocillo de 10^{-7} M (a partir de un stock de una concentración 10^{-3} M en HCl 0.1N) y se incubó a 37° C en atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂, durante 30 min, tiempo en el que se observa el máximo de producción de AMPc.

Una vez terminado el tiempo de estimulación se aspiró el medio y los pocillos fueron lavados con 0.5 ml de PBS a 4° C. Para liberar el AMPc intracelular al medio se retiró el PBS de los pocillos y se añadieron 200 μ l de HCl previamente calentado a 70° C. El choque térmico y el HCl hipotónico permiten la lisis celular y la liberación del AMPc a la vez que inactivan las fosfodiesterasas. Cada pocillo se recogió en tubos eppendorf y estos fueron liofilizados durante aproximadamente 2 horas en un liofilizador Speed-Vac Concentrador, SVC100H, Savant. Los precipitados obtenidos se lavaron con 100 μ l de agua bidestilada y se secaron durante 30 minutos para eliminar el HCl restante. Finalmente, cada muestra se disolvió en tampón de lisis en

un volumen adecuado según los niveles de AMPc que se espera obtener. El tampón fue proporcionado por el kit utilizado para la cuantificación.

7.2 Ensayo de AMPc.

La cuantificación del AMPc se realizó mediante el kit comercial Parameter cAMP Assay de R&D Systems. Este ensayo se basa en la competición entre el AMPc no marcado presente en las muestras a cuantificar y una cantidad fija de AMPc conjugado con peroxidasa (APMc-HRP) por su unión a un anticuerpo primario específico para AMPc fijado en la superficie de una placa de 96 pocillos donde se realiza el ensayo. De este modo, la cantidad de producto quimioluminiscente formado tras la adición del sustrato de la peroxidasa es inversamente proporcional a la cantidad de AMPc no marcado presente en la muestra. En paralelo al tratamiento de nuestras muestras, realizamos una recta patrón con AMPc de concentraciones conocidas que nos permite posteriormente extrapolar los valores de lectura de las muestras a cantidad de AMPc.

En primer lugar, se añadieron 50 μ l del anticuerpo primario a todos los pocillos de la placa, excepto a dos de ellos donde se determinó la unión inespecífica (NSB). Tras 1 hora a temperatura ambiente y en agitación vigorosa (200 rpm) se lavó la placa 5 veces con 300 μ l de tampón de lavado (proporcionado por el kit) y se añadieron 100 μ l de la muestra diluida. Para la recta de calibrado se prepararon, por duplicado, pocillos con 0, 0.75, 1.5, 3, 6, 12 y 24 pmoles de AMPc, a partir de un stock de 2400 pmoles del kit. A los pocillos NSB se les añadió 100 μ l de tampón de lisis. A continuación, se adicionó a todos los pocillos 50 μ l de AMPc conjugado con peroxidasa. La placa, con un volumen final de 150 μ l por pocillo, se incubó durante 2 horas en agitación vigorosa (200 rpm). Al finalizar la incubación, se lavó la placa 5 veces con 300 μ l de tampón de lavado y se adicionó a cada pocillo 200 μ l del sustrato proporcionado. Tras 30 minutos de incubación en oscuridad, la reacción se paró con 100 μ l de una solución de stop y se determinó la cantidad de producto quimioluminiscente midiendo la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA ELx800 de BioTek.

Las medidas de absorbancia fueron convertidas a picomoles/ μ g proteína mediante el programa GraphPrism (San Diego, CA, USA), teniendo en cuenta las diluciones realizadas y la cantidad de proteína de los pocillos.

8. ENSAYO DE UNIÓN HORMONA-RECEPTOR E INTERNALIZACIÓN.

Para medir el porcentaje de receptor internalizado en presencia de ligando, se realizaron ensayos de unión a radioligando utilizando una mezcla isotópica de [¹²⁵I]NDP-MSH con una concentración 10⁻¹⁰ M y NDP-MSH con una concentración 10⁻⁹ M. Tras incubar las células (privadas de suero al menos 3 horas), con la mezcla durante 90 minutos, se lavaron 2 veces con DMEM y 2 veces con la solución de lavado ácido a 4° C. Los lavados ácidos liberan el ligando unido al receptor en la membrana plasmática sin lisar las células, por lo que la radiactividad asociada a estos lavados es indicativa del receptor presente en la superficie celular, no internalizado. Los lavados se recogieron y se midió su radiactividad. Después, se recogieron las células con tripsina, y se contó la radiactividad asociada. La unión total de radioligando es la suma de las cpm asociadas a los lavados ácidos y las cpm asociadas al lisado celular, mientras que el índice de internalización es el porcentaje de radiactividad interna (tratamiento con tripsina), respecto a las cpm totales.

9. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN.

Para la extracción del ARN total, se utilizó el kit comercial RNeasy Mini Kit de Qiagen, partiendo de aproximadamente 10⁶ células. Las células se lavaron con PBS frío y, a continuación, se añadieron 350 µl de Buffer RLT, un tampón con isotiocianato de guanidinio que permite simultáneamente la lisis celular y la inactivación de las RNAsas endógenas. Para homogeneizar la muestra se hizo pasar el lisado a través de una jeringuilla de 20G (0.9 mm de diámetro) al menos 5 veces. A continuación se añadió un volumen igual al lisado de etanol al 70% y la mezcla se colocó sobre un filtro proporcionado por el kit que se centrifugó a 10000rpm durante 15 segundos. Tras descartar el sobrenadante, se realizaron lavados sucesivos del filtro a 10000rpm durante 15 segundos y, finalmente, se recuperó el ARN mediante agua libre de RNAsa (proporcionada por el kit) precalentada a 95° C.

Para la cuantificación de la concentración de AR; se realizó la lectura de la absorbancia a 260 nm mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000c de Thermo Scientific. La pureza del ARN se determinó mediante la relación entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm.

10. SÍNTESIS DE ADNc.

La síntesis de ADNc se realizó a partir de ARN total purificado según el protocolo descrito en el apartado anterior, mediante el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), partiendo de aproximadamente 2 µg de ARN. El procedimiento consistió en una primera etapa de desnaturalización del ARN molde, durante 5 minutos a 65° C en presencia de oligo(dT)₁₂₋₁₈ y dNTPs. A continuación, la muestra se enfrió lentamente y se incubó en hielo durante al menos 1 minuto. Se añadió el volumen adecuado de tampón de la retrotranscriptasa, DTT, MgCl₂ y RNaseOUT™ (a las concentraciones recomendadas por el fabricante). Las muestras se incubaron a 42° C, 2 minutos y, posteriormente, se añadieron 2 µl de la enzima SuperScript III Retrotranscriptasa. La reacción de síntesis de ADNc se llevó a cabo a 42° C durante 50 minutos y se terminó incubando las muestras a 70° C, 15 minutos. Para eliminar el ARN restante, las muestras se incubaron con 1 µl de RNase H a 37° C durante 20 minutos.

11. PCR A TIEMPO REAL (qPCR).

El análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) se realizó con ADNc obtenido con el procedimiento descrito en el apartado anterior. Los cebadores se diseñaron para amplificar secuencias de entre 50 y 150 pb, situadas entre dos exones para evitar la amplificación de un posible ADN genómico contaminante. El contenido G+C total de estos cebadores fue de 40-60% y la temperatura de *annealing* de 58-60° C. Además, se evitó la presencia de más de dos bases G o C en los cinco últimos nucleótidos del extremo 3'. La secuencia exacta de los primers utilizados durante esta memoria se detalla en la **tabla 5**.

La amplificación por PCR a tiempo real se realizó en placas de 96 pocillos en un equipo *7500 Fast Real Time PCR* de Applied Biosystem (Warrington, Reino Unido). En cada pocillo se añadió 10 µl de SYBR Green PCR Master Mix, 1 µl de ADNc, 2 µl de mezcla de cebadores 0.5 µM y 7 µl de agua libre de nucleasas (volumen total 20 µl). El protocolo de amplificación usado para la PCR fue el siguiente:

- 1 ciclo: 10 min/95° C
- 40 ciclos: 15 seg/95° C y 1min/60° C

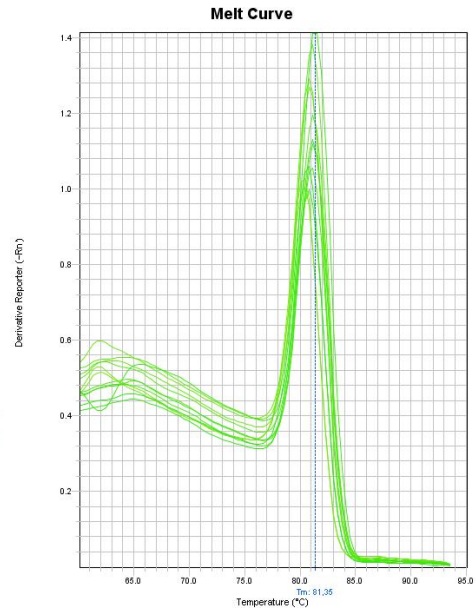
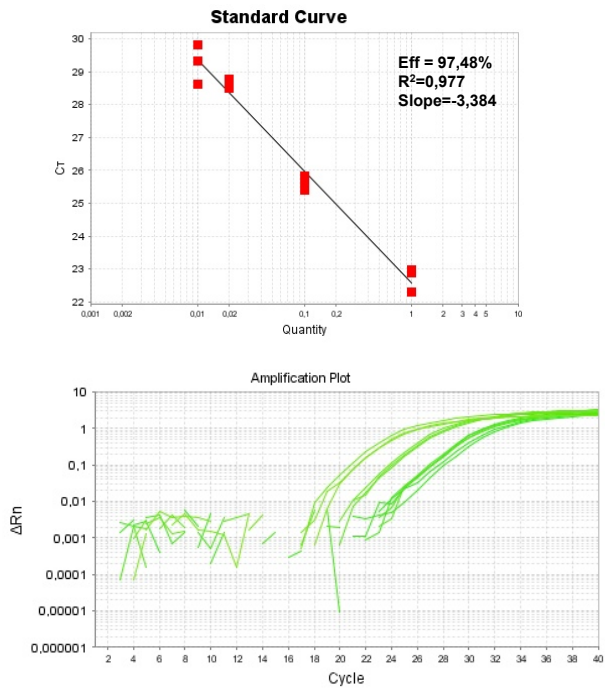
La recogida de los datos de fluorescencia se realizó en cada ciclo y el análisis de estos datos se efectuó con la aplicación 7500 SDS Software de Applied Biosystem. La cuantificación de la expresión génica se realizó mediante el cálculo del ciclo de corte (Ct) para un umbral de fluorescencia dentro de la fase exponencial y su relación con el Ct de un gen control (Mapk1 y Rpl35). Para descartar posibles amplificaciones múltiples con las parejas de cebadores se realizó una curva de disociación. La existencia de un solo pico en esta curva excluyó la posibilidad de dos productos de amplificación (curva de melting o *melt curve*).

Nombre	Secuencia (5' → 3')
Mgrn1	Fw: GTCGTCCAGTCCAGTTTCCCTAT Rv: TCGTCTTCTTTGTACCTCACAAG
Creb5	Fw: TTGATGCCTATGGAGAGACAGATG Rv: CTTCAGTCTCATTCTGGCTTCTGA
Cdk6	Fw: GTGGTCGTCACGCTGTGGTA Rv: AAAGAGGCTTTCTGCGAAACAT
Cdk1	Fw: CAAATATAGTCAGCCTGCAGGATGT Rv: TGGTGTAAAGTAACTCTTAACGAGTGAAGA
Ciclina D1	Fw: GGAGCTGCTGCAAATGGAA Rv: TGCGGATGGTCTGCTTGTT
Ciclina E1	Fw: TCCAGATAGCTCAGCTTTTAGATCTG Rv: CCCATTCCAAACCTGAAGCTT
Ciclina A2	Fw: ATGGCAGTTTTGAATCACCACAT Rv: TTTACATTTAACCTCCATTTCCCTAAG
Tgfb2	Fw: CCCAGCGCTACATCGATAGC Rv: AGGTTCCCTGTCTTTGTGGTGAAG
Mapk1	Fw: GCTGACTCCAAAGCTCTGGATT Rv: TCAGCAATGGGCTCATCACTT
Rpl35	Fw: AAGCTCTCCAAGATACGAGTCGTT Rv: TATTTCTTGCCCTTGTAGAATTTCCCT

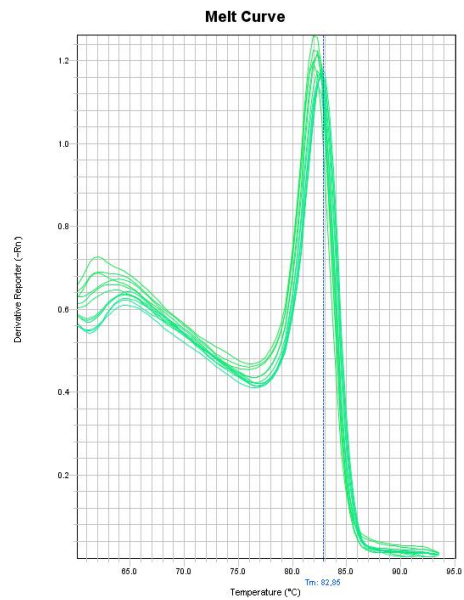
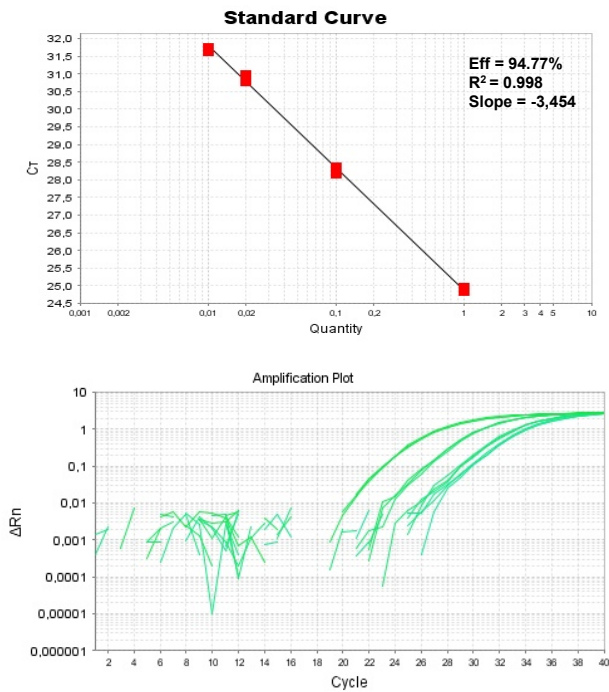
Tabla 5. Cebadores de qPCR utilizados para la realización de la PCR a tiempo real o cuantitativa.

Para descartar que las diferencias en la expresión génica sean debidas a diferencias en las eficiencias de hibridación entre los oligonucleótidos y la secuencia diana, se realizó un cálculo de la eficiencia de los cebadores mediante diluciones seriadas de la muestra. La pendiente de la recta que resulta de representar Ct/dilución utilizada corresponde a la eficiencia de la hibridación del cebador. A continuación se muestran las eficiencias de los cebadores empleados:

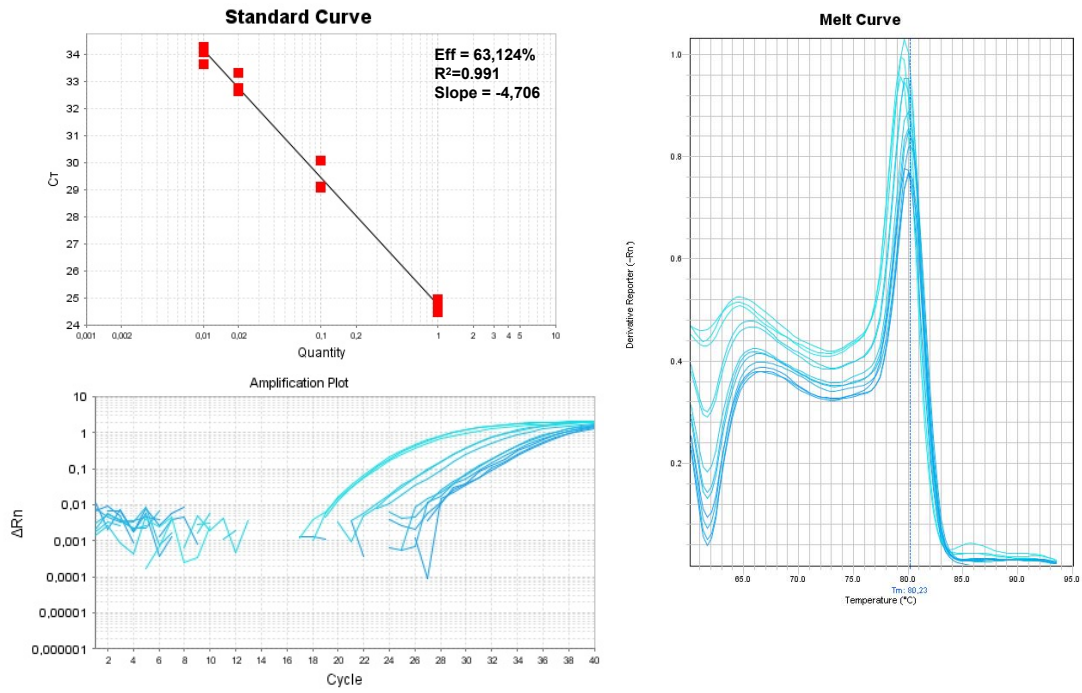
Gen Mgrn1



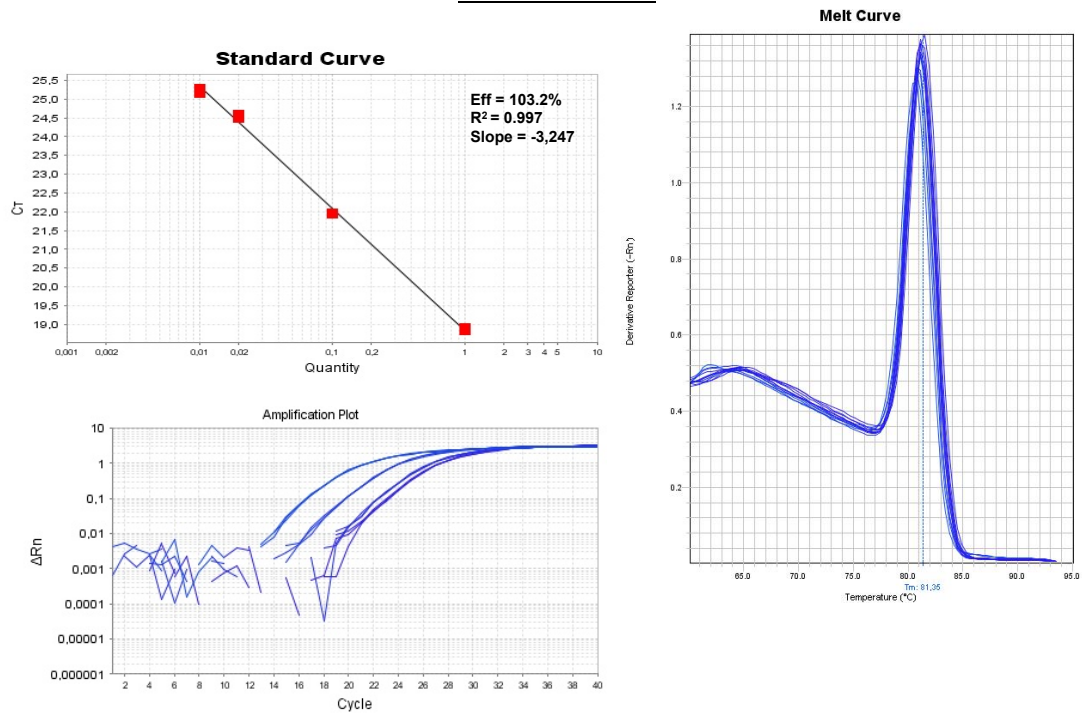
Gen Cdk6



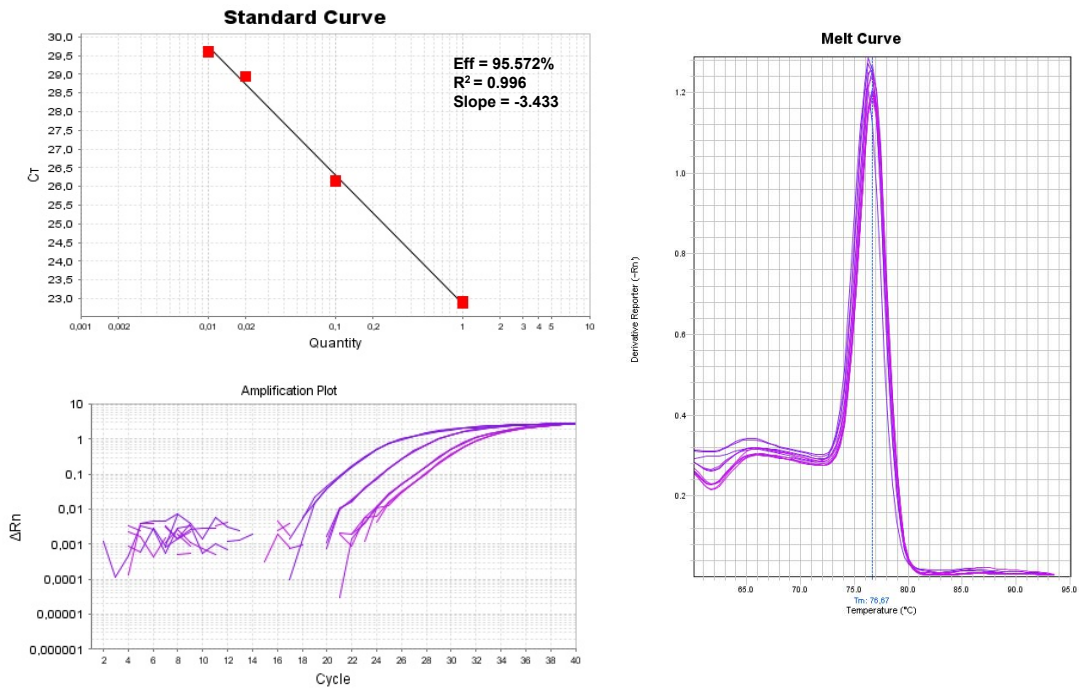
Gen Cdk1



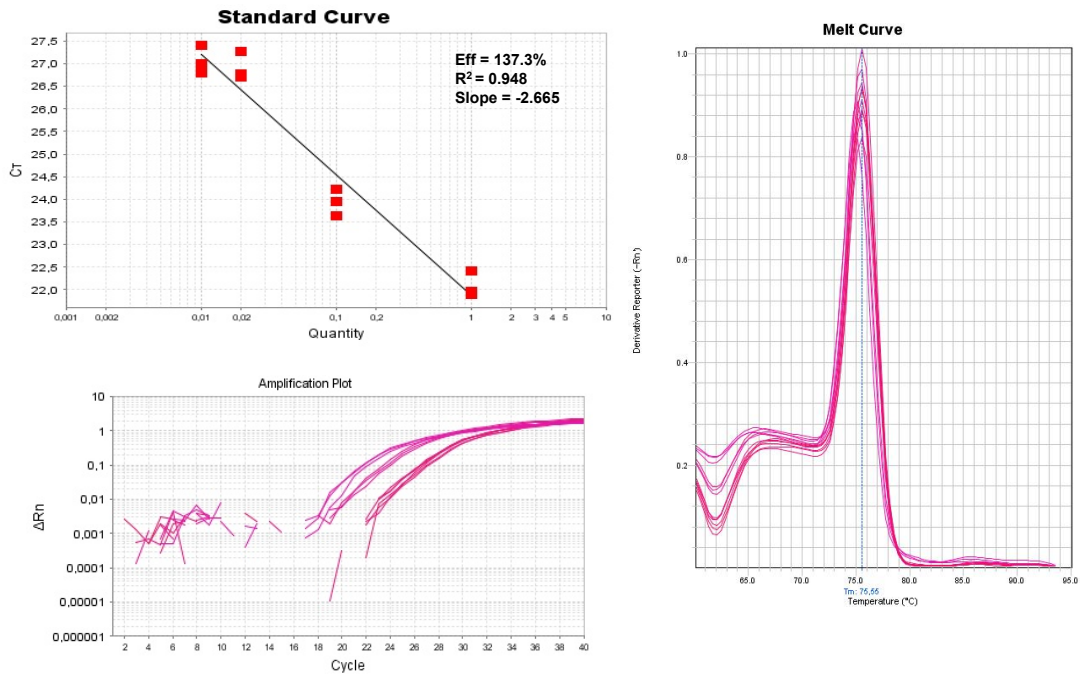
Gen Ciclina D1



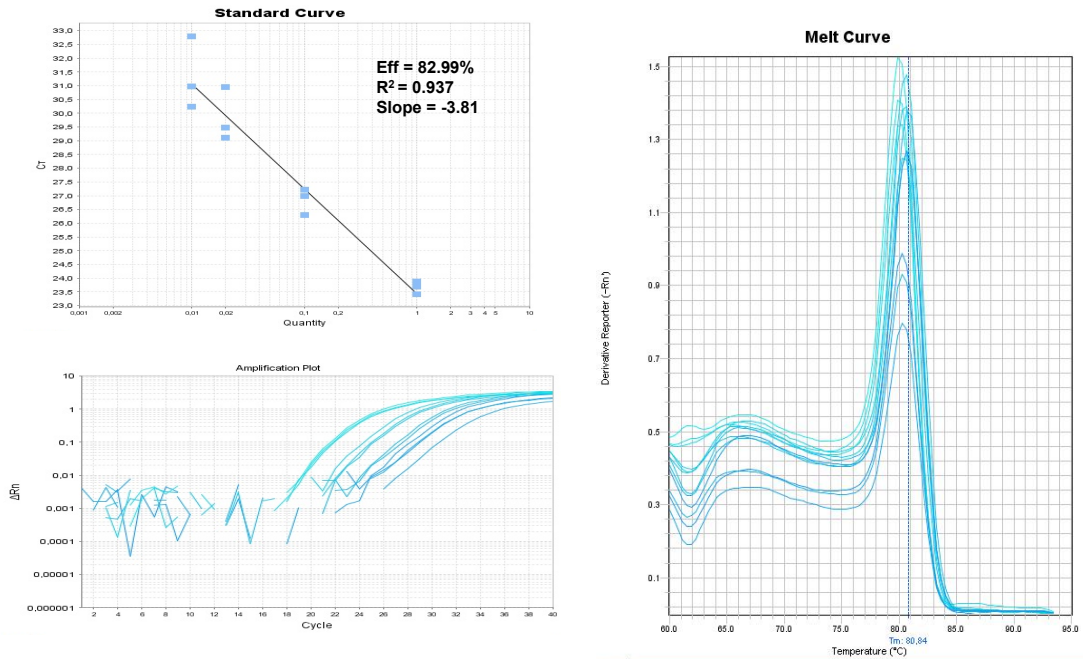
Gen Ciclina E1



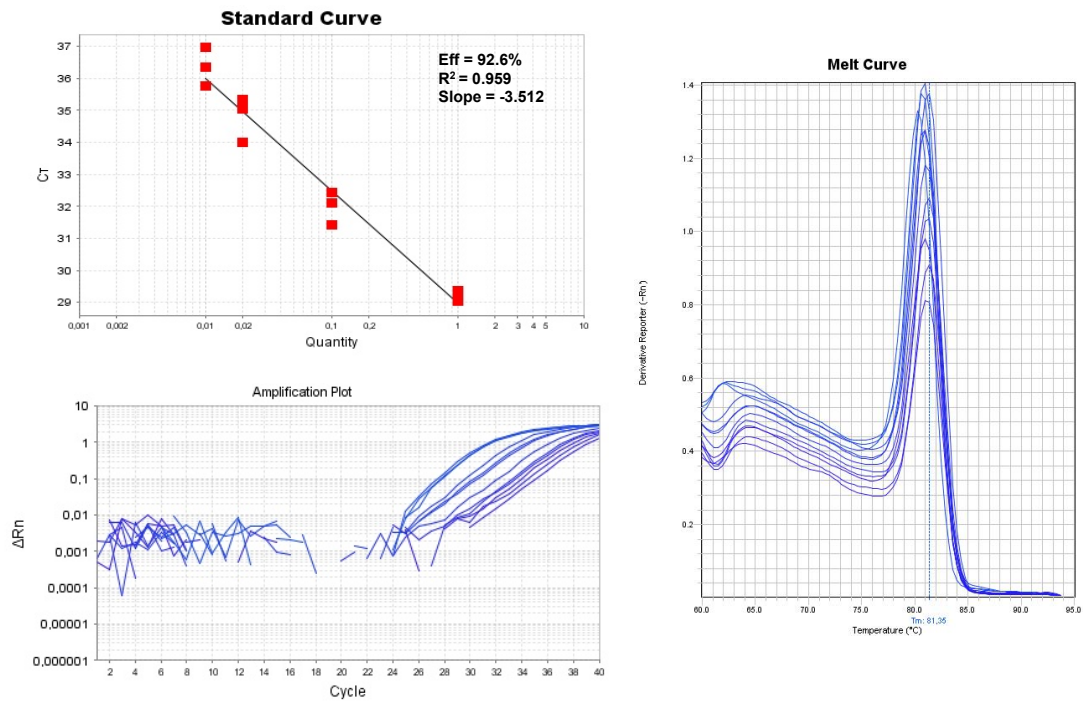
Gen Ciclina A2



Gen Creb5



Gen Tgfb2



12. OBTENCIÓN DE MUTANTES POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

Para realizar mutaciones puntuales en ARRB2, se utilizó el kit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene. Este kit usa la Pfu Turbo DNA Polimerasa, que puede replicar ambas cadenas del plásmido. Como molde se usa un plásmido con el inserto que se quiere mutar y se diseñan dos oligonucleótidos (uno directo y otro reverso), que contengan la mutación que se desea realizar. Los oligonucleótidos (cada uno complementario a una de las cadenas del molde), se utilizan como cebadores para la ADN polimerasa durante el proceso de PCR obteniendo el plásmido con el inserto mutado. Posteriormente, para diferenciar el plásmido molde del obtenido por PCR, se realiza una digestión con endonucleasa DPN1 que sólo digiere ADN metilado y hemimetilado. El ADN procedente de la mayoría de cepas de *Escherichia coli* es dam metilado y por tanto susceptible de digestión por esta encima, mientras que el plásmido de nueva síntesis permanece sin metilar, lo que permite su selección. Después se realiza la transformación de células ultracompetentes XL10 Gold, y la selección de recombinantes.

Las PCR y la selección de recombinantes, se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante (2.5 U de Pfu Turbo, 10 ng de ADN molde, y 125 ng de cada cebador, para cada reacción). Los oligonucleótidos empleados en la mutagénesis se especifican en la tablas 5 y 6. El ADN molde utilizado, siempre que no se indique lo contrario, fue ARRB2 marcada con el epitopo 3xHA en el extremo N-terminal insertado en el vector de expresión pCS2-3xHA. En todos los casos, el programa de amplificación consistió en 18 ciclos y una vez completados, una extensión de 7 minutos a 68° C. Cada ciclo de la PCR constó de tres etapas:

1. Desnaturalización: 50 s/95° C.
2. Hibridación de los cebadores con el molde: 50 s/60° C
3. Extensión de la cadena: 7min/68° C.

Tras la digestión del molde mediante la endonucleasa de restricción DpnI y la transformación de las células ultracompetentes se seleccionaron los recombinantes. Para ello, después de cada experimento de mutagénesis se inocularon varias colonias en 4 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina dejándolos crecer a 37° C en agitación vigorosa durante toda la noche. Los plásmidos se aislaron utilizando el Plasmid GeneElute HP Miniprep kit que acopla el sistema de extracción por lisis alcalina con el uso de columnas de elevada afinidad por el ADN. Se determinó la concentración del ADN extraído mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm en un nanodrop 2000c. Se verificó que estuviera presente la mutación deseada mediante secuenciación (Servicio de Secuenciación de la Universidad de Murcia).

Nombre	Secuencia (5' → 3')
V54D	Fw: ¹⁴⁵ CTGAAGGACCGCAAAG AT TTTGTGACCCTCAC ¹⁷⁶ Rv: ¹⁷⁶ GTGAGGGTCACAAA AT CCTTTGCGGTCCTTCAG ¹⁴⁵
K78R	Fw: ²¹⁸ GCTTGTCTTCCGCA G AGACCTGTTTCATC ²⁴⁶ Rv: ²⁴⁶ GATGAACAGGTCT CT GCGGAAGGACAAGC ²¹⁸
R107N	Fw: ³⁰⁶ GGACCGGCTGCTGA ATA AGCTGGGCCAGCATGC ³³⁸ Rv: ³³⁸ GCATGCTGGCCAGCTTATTCAGCAGCCGGTCC ³⁰⁶
K108R	Fw: ³¹¹ GGCTGCTGAGG AG GCTGGGCCAGCAT ³³⁶ Rv: ³³⁶ ATGCTGGCCAGC CT CCTCAGCAGCC ³¹¹
R170N	Fw: ⁴⁹³ GTGCGGCTGGTGAT CAAT AAGGTGCAGTTCG ⁵²³ Rv: ⁵²³ CGAACTGCACCT ATT GATCACCAGCCGCAC ⁴⁹³
K153Q	Fw: ⁴⁴² CGAGCCTTCTGTGCT CAAT CACTAGAAGAGAAAAG ⁴⁷⁶ Rv: ⁴⁷⁶ CCTTTCTCTTCTAGTGATT G AGCACAGAAGGCTCG ⁴⁴²
K158Q	Fw: ⁴⁵⁴ GCTAAATCACTAGAAGAG CAA AGCCACAAAAGGAAC ⁴⁸⁹ Rv: ⁴⁸⁹ GTTCCCTTTGTGGCTTT G CTCTTCTAGTGATTTAGC ⁴⁵⁴
K161Q/R162Q	Fw: ⁴⁶⁹ GAGAAAAGCCAC CAA CAGAACTCTGTGCGGC ⁴⁹⁵ Rv: ⁴⁹⁵ GCCGCACAGAGTT CTG TTGGTGGCTTTTCTC ⁴⁶⁹
R286N	Fw: ⁸⁴¹ GACAACCGGGAGAAGAATGGTCTCGCCCTGGATGG ⁸⁷⁵ Rv: ⁸⁷⁵ CCATCCAGGGCGAGACCATTCTTCTCCCGTTGTC ⁸⁴¹
K295Q/R286Q	Fw: ⁸³⁹ GTGACAACCGGGAG CAG CAGGGTCTCGCC ⁸⁶⁷ Rv: ⁸⁶⁷ GGCGAGACC CTG CTGCTCCCGTTGTCAC ⁸³⁹
K293R/K295R	Fw: ⁸⁶⁶ CCCTGGATGGG AG ACTCAGGCACGAGGACAC ⁸⁹⁶ Rv: ⁸⁹⁶ GTGTCTCGTG CT GAGTCTCCCATCCAGGG ⁸⁶⁶
K308	Fw: ⁹⁰⁹ CAGCACCATCGTG AG GGAGGGTGCCAACAAG ⁹³⁹ Rv: ⁹³⁹ CTTGTGGCACCC CTC ACGATGGTGCTG ⁹⁰⁹
K313R	Fw: ⁹²⁴ GGAGGGTGCCAAC AG GGAGGTGCTGGGAATC ⁹⁵⁴ Rv: ⁹⁵⁴ GATTCCAGCACCT CC TGTTGGCACCC TCC ⁹²⁴
K325R/K327R	Fw: ⁹⁶² CCTACAGGGT CAG GGTGAGGCTGGTGGTGTGTC ⁹⁹² Rv: ⁹⁹² GACACCACCAG CTC ACC CTG ACCCTGTAGG ⁹⁶²
K348R	Fw: ¹⁰²⁷ GTTCTTATGCACCC AG CCCCACGACCACATC ¹⁰⁵⁹ Rv: ¹⁰⁵⁹ GATGTGGTCGTGGGG CT GGGGTGCATAAGAAC ¹⁰²⁷
R357N	Fw: ¹⁰⁵⁵ ACATCCCCCTCC CAAT CCCCAGTCAGCCGCT ¹⁰⁸⁶ Rv: ¹⁰⁸⁶ AGCGGCTGACTGGGG AT TGGGGAGGGGGATGT ¹⁰⁵⁵
R393N	Fw: ¹¹⁶¹ GTTTGAGGACTTTGCC AA TCTTCGGCTGAAGGGG ¹¹⁹⁴ Rv: ¹¹⁹⁴ CCCCTT CAG CCGAAG ATT GGCAAAGTCTCAAAC ¹¹⁶¹
K397R	Fw: ¹¹⁷⁷ CGGCTTCGGCTG AG GGGGATGAAGGATG ¹²⁰⁴ Rv: ¹²⁰⁴ CATCCTTCATCCCC CTC AGCCGAAGCCG ¹¹⁷⁷
K400R	Fw: ¹¹⁸⁴ GGCTGAAGGGGAT AG GGATGACGACTATG ¹²¹⁰ Rv: ¹²¹⁰ CATAGTCGTCAT CCT CATCCCC CTC AGCC ¹¹⁸⁴
K397R/K400R	Fw: ¹¹⁸⁰ CTTCGGCTG AG GGGGATG AG GGATGACGACTATG ¹²¹³ Rv: ¹²¹³ CATAGTCGTCAT CCT CATCCCC CTC AGCCGAAG ¹¹⁸⁰

Tabla 6. Cebadores utilizados para la construcción de mutantes puntuales de ARRB2. Se indica el nombre del mutante y la secuencia en sentido 5' → 3' del cebador directo (Fw) y reverso (Rv).

Nombre	Secuencia (5' → 3')
INI-R107	Fw: ²⁹³ CCACCCGCCTGCAGGATCCGCTG ACCAT GAAAGCTGGGCCAGCATGC ³³⁸ Rv: ³³⁸ GCATGTTGGCCCAGCTTC ATGGT CAGCG GAT CCTGCAGGCGGGTGG ²⁹³
R286*	Fw: ⁸⁴³ CAACCGGGAGAAGCGG TGACT CGCCCTGGATGGG ⁸⁷⁶ Rv: ⁸⁷⁶ CCCATCCAGGGCGAG TCACCG CTTCTCCCGGTTG ⁸⁴³
R357*	Fw: ¹⁰⁵⁶ CATCCCCCTCCCCAGAT TAGCAG TCAGCCGCTC ¹⁰⁸⁷ Rv: ¹⁰⁸⁷ GAGCGGCTGACTG CTAT CTGGGGAGGGGGATG ¹⁰⁵⁶
T382*	Fw: ¹¹²⁹ GATACCAACTATGCCACAT TAGGAT GACATTGTGTTTGGAG ¹¹⁶⁷ Rv: ¹¹⁶⁷ CTCAAACACAATGT CATCTA TGTGGCATAGTTGGTATC ¹¹²⁹
R393*	Fw: ¹¹⁶⁵ GAGGACTTTGCCCGG TGAC GGCTGAAGGGGATGAAGG ¹²⁰¹ Rv: ¹²⁰¹ CCTTCATCCCCT TCAG CCGTCACCGGGCAAAGTCCTC ¹¹⁶⁵

Tabla 7. Cebadores utilizados para la construcción de mutantes truncados de ARRB2. Se indica el nombre del mutante y la secuencia en sentido 5' → 3' del cebador directo (Fw) y reverso (Rv).

13. PCR CONVENCIONAL Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Para comprobar la presencia de transcritos de interés (Figuras 1 y 2 del Capítulo 4) llevamos a cabo una PCR convencional de ADNc de células HBL transfectadas transitoriamente con las construcciones MGRN1 L+ y L- clonadas en el vector pcDNA3.1, o con el propio vector. Como control positivo de la reacción utilizamos los plásmidos transfectados. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl con una concentración de MgCl₂ de 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, 1 µM de cada oligonucleótido, directo y reverso (ver secuencias en los pies de figura), 1 µl de ADNc y 1 U de la *Taq* polimerasa (Fermentas). Empleamos 30 ciclos con tres etapas: desnaturalización (95°C/45''), *annealing* (54°C/45'') y extensión (78°C/1 min), tras lo cual llevamos a cabo una electroforesis de los productos obtenidos en un gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE, en el cual aplicamos la muestra que contiene el producto de PCR junto a una calle con marcadores de peso molecular del rango apropiado (Fermentas). La migración del ADN tiene lugar al aplicar una corriente de 90V durante 30 min. Una vez finalizada la migración, el gel se sumerge en una solución del agente intercalante bromuro de etidio (5 µg/ml) durante 10 minutos, lo que nos permite visualizar las bandas amplificadas en un Transiluminador de luz UV Gel Doc 1000 (BioRad).

14. CITOMETRÍA DE FLUJO.

El análisis de la distribución de células de una población en las distintas fases del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo en un sistema FACSCalibur de Becton-Dickinson. A partir de células melan a6 y md1 sembradas un mínimo de 4 días, se preparó una suspensión de 200 μ l de PBS que contenía entre 5×10^5 y 10^6 células. Agitando continuamente, se añadieron 2ml de una mezcla de etanol-PBS (70%-30%) a 4° C y se incubó en hielo durante 30 minutos. Tras la incubación, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. Una vez desechado el sobrenadante, se añadieron 800 μ l de PBS y se comprobó al microscopio que no había células agregadas, en cuyo caso se hizo pasar la mezcla, mediante una jeringuilla, por una aguja de 25G. A continuación, se añadieron 100 μ l de RNAsa (1mg/ml) y 100 μ l de Ioduro de Propidio (IP) y se incubó a 37° C durante 30 minutos. Finalmente, se analizó el contenido de ADN mediante un laser de argón de 488 nm.

El IP es un fluorocromo que se une estequiométricamente con los ácidos nucleicos por lo que la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN nuclear. Tiene afinidad tanto por el ADN como por el ARN, de ahí que sea necesario el tratamiento con RNAsa para eliminar las cadenas de ARN.

El análisis y representación de los resultados se realizó mediante el programa ModFit LT.

15. MICROSCOPIA.

15.1. Microscopía óptica.

Las células se sembraron en monocapa sobre cubreobjetos estériles colocados en placas de 24 pocillos. Cuando alcanzaron el 70-80% de confluencia, se lavaron con PBS y se fijaron introduciendo los cubreobjetos en metanol a -20° C durante 2 segundos. Tras dos lavados adicionales con PBS, se añadió DAPI a una dilución 1:5000 en PBS a partir de una disolución de 5 μ g/ μ l. Los cubreobjetos se lavaron una vez más y se montaron sobre portaobjetos mediante 3 μ l de medio de montaje para fluorescencia.

Tanto las imágenes de contraste de fases como las de fluorescencia (obtenidas excitando la muestra con un conjunto de filtros de 340-380 nm) se tomaron con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-U de la Sección de Cultivo de Tejidos (SAI, Universidad de Murcia).

15.2. Microscopía confocal.

15.2.1. Tinción inmunoquímica.

En todos los casos se utilizaron células sembradas en monocapa sobre cubreobjetos estériles colocados en placas de 24 pocillos. La tinción se realizó en células HEK 293T transfectadas transitoriamente, tras 12 horas de expresión de las proteínas, y en células melan a6 y md1 cuando alcanzaron el 80% de confluencia. Las células se fijaron con p-formaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos y, a continuación se lavaron tres veces con PBS. La tinción inmunoquímica continúa mediante la incubación de las células con glicina 20 mM en PBS durante al menos 20 minutos, para bloquear los grupos amino libres. Posteriormente, para permeabilizar la membrana, las células se incubaron con Igepal CA630 0.5% en PBS durante 15 minutos, previamente a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (**tabla 8**). Tras la incubación durante 30 minutos, las células se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS-BSA 1% y se incubaron 30 minutos con el anticuerpo secundario correspondiente. Tras la incubación, las preparaciones se lavaron tres veces con PBS-BSA 1%, y tras retirar el exceso de líquido, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos, mediante el uso de 3 μ l de medio de montaje para fluorescencia. Tras el secado del medio sobrante, se sellaron los cubreobjetos con laca de uñas, quedando preparadas para su observación.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
α -FLAG (Sigma-Aldrich)	1:7000	α -ratón conjugado con Alexa 568	1:400
α -TUBB3 (Sigma-Aldrich)	1:1000	α -conejo conjugado con Alexa 568	1:200

Tabla 8. Anticuerpos usados en la tinción inmunoquímica de preparaciones para microscopía confocal. Se indica para cada anticuerpo primario, su procedencia, la dilución empleada, el anticuerpo secundario empleado y su dilución. Todas las incubaciones con los anticuerpos tanto primario como secundario se realizaron en PBS-BSA 1%.

15.2.2. Adquisición de imágenes.

Las imágenes fueron captadas mediante un microscopio de fluorescencia confocal True Confocal Scanner TCS-SP2 de Leica. Para cada tipo de línea celular y para cada condición, se capturaron diferentes imágenes en zonas aleatorias del cubreobjetos. Las imágenes representan múltiples series de cortes transversales en

el eje Z, adquiridos a intervalos de entre 0.1 y 0.5 μm , desde el polo superior hasta el inferior de la célula, o bien imágenes de una sola sección en diferentes niveles del eje Z. Las secciones se obtuvieron a través de un objetivo de 63X en aceite de inmersión. La correcta adquisición de imágenes para una posterior colocalización requirió que la selección de los filtros fuera la idónea y que la emisión espectral de los fluorocromos usados estuviera suficientemente separada para evitar el fenómeno de cruce de señales o “crosstalking”. Otro de los requisitos importantes de que la intensidad de fluorescencia del fondo fuera mínima y la intensidad de fluorescencia de la muestra no estuviera saturada. Para los estudios de colocalización, la toma de imágenes de una misma sección marcada con diferentes fluorocromos se realizó de manera secuencial para cada fluorocromo y ambas imágenes fueron adquiridas en condiciones espaciales idénticas.

16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para comparar diferencias entre dos grupos se utilizó la prueba t de Student. Las comparaciones múltiples se realizaron usando el análisis de la varianza (ANOVA). Los datos se analizaron mediante la utilización del programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA). Se consideraron diferencias significativamente estadísticas a $P < 0.05$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1

Regulación diferencial de MC1R por ARRBs
en su entorno fisiológico.

INTRODUCCIÓN

MC1R es un GPCR que se localiza mayoritariamente en la membrana de los melanocitos cutáneos, donde regula aspectos clave de la biología del melanocito ¹. Entre sus acciones más relevantes destaca la síntesis de melanina en respuesta a sus ligandos (α MSH y ACTH) ². Además, el MC1R también activa mecanismos de supervivencia y reparación de ADN ³, así como defensas antioxidantes ⁴ cuando se expone a radiación ultravioleta (UV). La regulación de la actividad del MC1R es responsable de muchas de las variaciones naturales de la pigmentación en mamíferos ⁵.

Como se ha comentado en la introducción, una propiedad casi universal de los GPCRs es su capacidad para sufrir desensibilización homóloga e internalización en condiciones de exposición sostenida a su agonista ⁶. Este proceso, que contribuye a regular la cantidad de receptor presente en la membrana plasmática de los melanocitos, es controlado, entre otras, por una familia de proteínas citosólicas denominadas β -arrestinas (ARRBs) que funcionan como adaptadores endocíticos y terminadores de la señal ⁷.

En mamíferos, las ARRBs están codificadas por dos genes, *ARRB1* y *ARRB2*, que codifican varias isoformas con una gran homología estructural y de secuencia. Se expresan de forma ubicua en todas las células y son reclutadas a la membrana plasmática en respuesta a la activación de los GPCRs. Los GPCRs activados son fosforilados por unas quinasas específicas, las GRKs, y esta fosforilación determina la unión de las ARRBs a los receptores, provocando su desacoplamiento de la proteína G y marcándolos para su internalización en vesículas rodeadas de clatrina.

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que MC1R sufre desensibilización homóloga mediada por las quinasas GRK2 y GRK6 que fosforilan los residuos Thr308 y Ser316 del extremo C-terminal del receptor ⁸. Esta modificación es también muy importante en la internalización posterior del MC1R en vesículas de endocitosis. Además, algunos resultados preliminares parecen indicar un mayor papel de ARRB2 en comparación con ARRB1 en la desensibilización del MC1R (Ana B. Pérez-Oliva. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2011). Sin embargo, el papel de las isoformas de ARRB en la regulación de la señalización del MC1R aún no está claro, particularmente en el entorno fisiológico de células de tipo melanocítico.

En este capítulo abordamos el estudio del efecto diferencial que ejercen las distintas isoformas de ARRB sobre la señalización del MC1R, tanto en un sistema heterólogo clásico en el estudio de la señalización de los GPCRs (células HEK 293T), como en sistemas más fisiológicos (células de melanoma humano HBL).

1.1. Expresión de las isoformas de ARRB en células melanocíticas humanas.

Para estudiar el efecto de las ARRBs en la desensibilización del MC1R en un entorno fisiológico comenzamos por comparar la cantidad de arrestina que expresan de manera natural los melanocitos malignos HBL y las células HEK 293T. Analizamos extractos solubilizados de células en cultivo, mediante electroforesis y posterior transferencia Western. Para detectar las ARRBs se utilizaron dos anticuerpos distintos: por un lado, un anticuerpo anti-ARRB1 que detecta tanto ARRB1 como ARRB2 y, por otro lado, un anticuerpo específico contra ARRB2 (**Fig. 1A**). El resultado muestra que los niveles de ARRB1 son comparables en HBL y en HEK 293T, mientras que la expresión de ARRB2 es significativamente mayor en células HEK 293T.

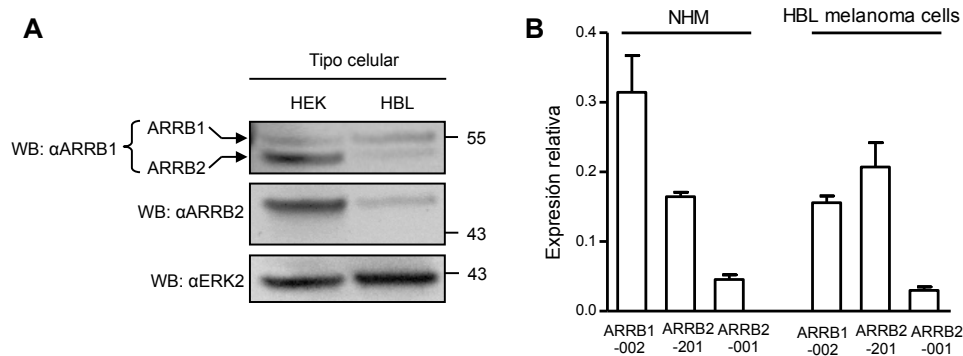


Figura 1. Comparación de la expresión de las isoformas de ARRB en células HEK 293T y células melanocíticas. **(A)** Expresión endógena de ARRB1 y ARRB2 en células HEK 293T y células de melanoma HBL. Para detectar cada ARRB se utilizaron dos anticuerpos diferentes, uno anti-ARRB1, que detecta tanto ARRB1 como ARRB2, y otro anti-ARRB2 que detecta de manera específica esta isoforma. **(B)** Análisis por RT-PCR cuantitativa de las isoformas de ARRB que expresan las células melanocíticas. Para ello se han utilizado cebadores específicos contra cada isoforma de ARRB y los resultados han sido normalizados por el gen de la β-actina. Se representa la media de dos muestras independientes de ADNc que han sido analizadas por cuadruplicado.

Según la bibliografía, existen dos transcritos distintos para el gen *ARRB1* que dan a lugar a las isoformas 1A (ARRB1-001) y 1B (ARRB1-002), y cinco para

ARRB2 que codifican, la isoformas 1 (antiguamente denominada *ARRB2-201*), isoforma 2 (antigua *ARRB2-001*), isoforma 3, isoforma 4 (antigua *ARRB2-203*) e isoforma 5 (antigua *ARRB2-202*). Todos estos transcritos mantienen los exones de los extremos 3' y 5' y se diferencian en los exones internos ⁹. Teniendo esto en cuenta y debido a que las técnicas electroforéticas empleadas no permiten resolver con facilidad las distintas isoformas, decidimos emplear otra técnica que nos permitiera discriminar entre los diferentes transcritos. Con este fin se diseñaron parejas de cebadores comunes para todas las variantes y, usando como molde el ADNc de células HBL, se realizó una PCR convencional para amplificar la secuencia de las *ARRBs*. Los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector de expresión pcDNA3 y secuenciados. Encontramos que las células de melanoma humano HBL expresan al menos las isoformas *ARRB1-001* (410 aminoácidos), *ARRB2-201* (409 aminoácidos) y *ARRB2-001* (421 aminoácidos) (resultados no mostrados). *ARRB2-001* comparte casi la totalidad de su secuencia con la isoforma *ARRB2-201* pero contiene un inserto de 12 residuos muy ricos en prolina cerca del extremo C-terminal. Estos resultados fueron confirmados analizando mediante RT-PCR cuantitativa y cebadores específicos para cada isoforma, con muestras de ADNc procedentes de células HBL y de un cultivo de melanocitos normales (NHM) (**Fig. 1B**).

Una vez determinado el repertorio de *ARRBs* presente en melanocitos y células de melanoma, nos propusimos estudiar su efecto sobre la señalización del MC1R. Para ello obtuvimos construcciones de *ARRB* marcadas con el epitopo HA para poder sobreexpresarlas en los distintos sistemas celulares y detectarlas utilizando un mismo anticuerpo antiHA. La estrategia que seguimos consistió en subclonar las arrestinas que ya teníamos en el vector pcDNA3 dentro del vector pCS2-3HA. Esta aproximación proporciona una proteína con un epitopo 3xHA fusionado en su extremo N-terminal, inmediatamente después de la metionina inicial. El análisis de la expresión de las construcciones sin epitopo en células HEK 293T mostró que la *ARRB1* migra como una banda mayoritaria de aproximadamente 55 kDa (**Fig. 2A, panel superior**) mientras que las dos isoformas *ARRB2* migran como un doblete (**Fig. 2A, panel medio**). Este resultado es consistente con los datos publicados por otros investigadores ^{10,11}. Además, se observa que la coexpresión de *ARRB1* y *ARRB2* con MC1R no modifica los niveles basales de expresión del receptor.

Este mismo patrón electroforético se confirmó al expresar las tres isoformas de *ARRB* marcadas con el epitopo 3xHA en células HBL que expresan de forma estable niveles casi fisiológicos de FLAG-MC1R (**Fig. 2B**). También observamos

niveles comparables de expresión para las tres isoformas de ARRB, lo que sugiere una estabilidad intracelular similar de las diferentes variantes de ARRB.

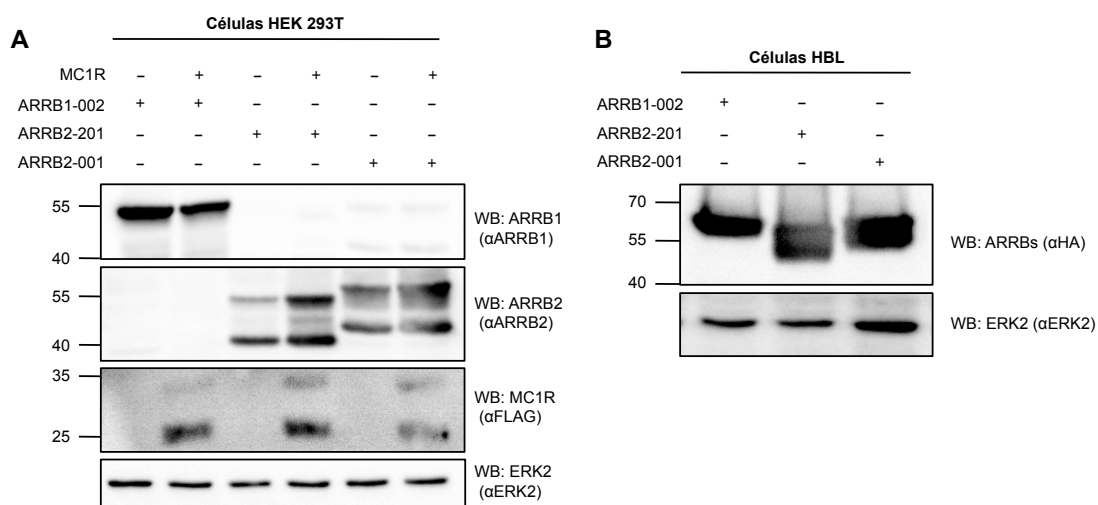


Figura 2. Valoración de la expresión de distintas construcciones de ARRB. **(A)** Células HEK 293T transfectadas de forma transitoria con las construcciones de ARRB sin epítopo y FLAG-MC1R. Extractos solubilizados de cada condición fueron analizados por electroforesis y transferencia Western y las ARRBs se detectaron con anticuerpos específicos antiARRB1 y antiARRB2. Se usó un anticuerpo contra ERK2 para normalizar la cantidad de proteína. **(B)** Expresión en células HBL de las ARRBs marcadas con el epítopo 3xHA y analizadas de la misma manera que la figura 2A, aunque en este caso se hizo uso de un anticuerpo contra el epítopo HA para detectar las ARRBs.

En conjunto, estos resultados nos permiten comparar el efecto que tienen las distintas ARRBs sobre la función del MC1R sin factores que complicarían su análisis como, por ejemplo, una diferencia en los niveles de expresión.

1.2. Efecto diferencial de las isoformas de ARRB sobre la señalización de MC1R

El MC1R se activa por unión de sus principales ligandos (α -MSH y ACTH). Como resultado de esta activación se han descrito dos vías de señalización a través de las cuales el MC1R cumple su función regulando la pigmentación de la piel y la proliferación y diferenciación del melanocito. La vía canónica clásica implica la activación de la proteína Gs que estimula una *adenilato ciclasa* y provoca un aumento de los niveles de AMPc. Este segundo mensajero se ha descrito como responsable de la mayor parte de las acciones melanogénicas de α -MSH ¹². La activación de MC1R también puede estimular otras vías de señalización, como la

cascada de las MAP quinasas ERK1 y ERK2. La señalización a través de esta vía requiere niveles mucho más bajos de receptor activado que la síntesis de AMPc y se produce por la transactivación de c-KIT, un receptor tirosina quinasa esencial para la proliferación, diferenciación y supervivencia de precursores del melanocito ¹³.

Como ya se ha comentado en la introducción, uno de los mecanismos existentes para controlar la señalización del MC1R y con ello los niveles de AMPc intracelular es la desensibilización homóloga, mecanismo en el que intervienen las ARRBs. También se ha descrito que algunos GPCRs interaccionan diferencialmente con las distintas isoformas de ARRB ^{14,15}. Por este motivo, nos planteamos estudiar si las distintas isoformas ARRBs que expresan los melanocitos producen un efecto diferente sobre la señalización del MC1R.

Con este propósito transfectamos células HEK 293T con MC1R solo o junto con las diferentes ARRBs. Los datos de AMPc basales se obtuvieron manteniendo las células durante al menos 3 horas en medio mínimo en ausencia de factores de crecimiento y hormonas. A continuación, las células se estimularon 30 minutos con NDP-MSH (un potente agonista de MC1R y análogo estructural de α -MSH) y mediante un kit de inmunoensayo comercial se determinaron los niveles de AMPc en cada una de las condiciones (**Fig. 3A**). Los resultados se presentan como porcentaje de AMPc respecto del nivel máximo alcanzado cuando se estimula el MC1R expresado en solitario, y muestran que la sobreexpresión de ARRB1 no varía el nivel de AMPc que se obtiene expresando el MC1R en solitario, lo que indicaría que esta isoforma no tiene efecto sobre la señalización de MC1R. Sin embargo, la sobreexpresión de ARRB2 (isoformas 201 y 001) provoca una fuerte caída del nivel de AMPc que hace suponer una fuerte inhibición de la vía, sin que parezcan existir diferencias significativas entre las dos isoformas, que serían por tanto igualmente efectivas a la hora de desensibilizar al MC1R.

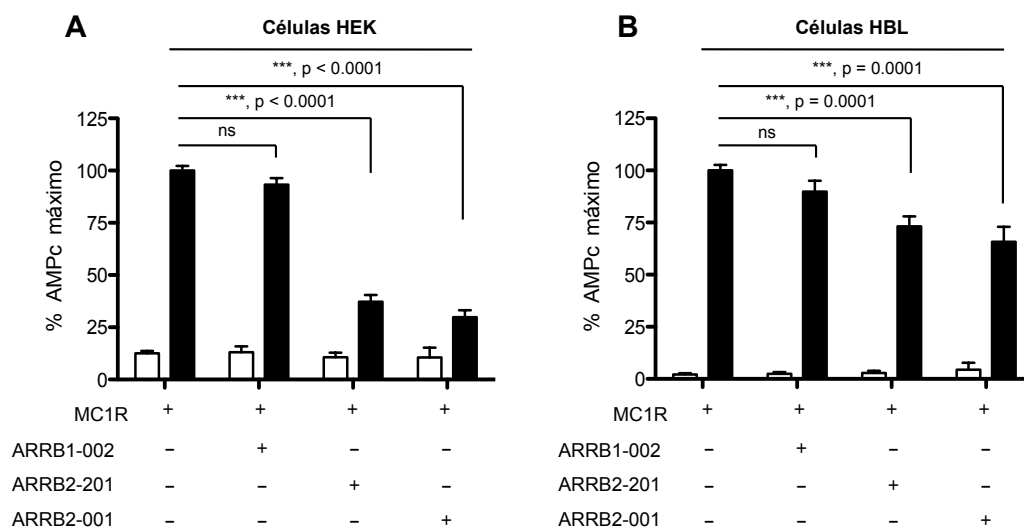


Figura 3. Efecto diferencial de las isoformas de ARRB sobre la señalización de MC1R a través de la vía del AMPc. **(A)** Efecto de la expresión de las distintas ARRBs sobre el acoplamiento funcional de MC1R a la síntesis de AMPc en células HEK 293T que habían sido previamente transfectadas con ARRB y MC1R. Los controles sin estimular (barras blancas) se mantienen 3 horas creciendo en medio mínimo. Las muestras estimuladas (barras negras) son sometidas al mismo procedimiento, tras el cual son estimuladas durante 30 minutos con NDP-MSH 10^{-7} M. Después del tratamiento, las células se lisan en medio ácido y la cantidad de AMPc se mide por un kit comercial. **(B)** Efecto de la expresión de ARRBs sobre la síntesis de AMPc en células HBL que ya expresan MC1R de forma estable en niveles ligeramente superiores a los fisiológicos. El procedimiento seguido es el mismo que en la figura 3A.

Para confirmar estos resultados, realizamos el mismo experimento en un entorno más fisiológico. Se sobreexpresaron las tres isoformas de ARRB en células de melanoma HBL y, después de tres horas creciendo en medio mínimo, se estimularon 30 minutos con NDP-MSH (**Fig. 3B**). La medida de AMPc en cada condición confirma lo observado en HEK 293T, ya que las dos isoformas de ARRB2 provocan una caída en los niveles de AMPc mientras que la ARRB1 no tiene un efecto significativo.

Como hemos comentado anteriormente, la unión de NDP-MSH a MC1R es capaz de activar la vía de las ERK mediante la transactivación del receptor tirosina quinasa c-KIT. Por esta razón, tras analizar el efecto de las arrestinas sobre la vía del AMPc, el siguiente paso fue estudiar el efecto de las distintas ARRBs sobre esta vía de señalización no canónica. Como la cascada de las ERK es una vía de activación secuencial, se puede seguir su estado de actividad midiendo el nivel de fosforilación de su último miembro, las quinasas ERK1 y ERK2. Con este fin, sobreexpresamos en células HBL, las isoformas ARRB1 y ARRB2 y las estimulamos con NDP-MSH a distintos tiempos (**Fig. 4**). Al analizar la cinética de fosforilación de ERK1/2 en células HBL que no sobreexpresan ARRBs y compararlas con células

HBL que sobreexpresan cualquiera de las dos isoformas de ARRB se comprueba que no se produce ningún cambio ni en el grado ni en la cinética de activación de la vía. Esto sugiere que, a diferencia de lo que ocurre con la vía del AMPc, las ARRBs no tienen ningún efecto sobre la señalización vía ERK dependiente de NDP-MSH. En este sentido, el efecto de las ARRBs en la desensibilización homóloga del MC1R estaría sesgado, favoreciendo la señalización por la vía de las ERK frente a la señalización canónica mediada por AMPc.

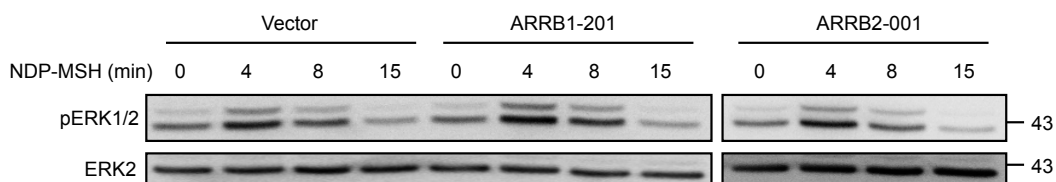


Figura 4. Efecto de la sobreexpresión de las isoformas de ARRB sobre la señalización vía ERK dependiente de agonista. Células HEK 293T transfectadas con las distintas ARRBs fueron privadas de suero durante 3 horas y estimuladas a distintos tiempos con NDP-MSH 10^{-7} M. A continuación se solubilizaron y se analizaron por transferencia Western para detectar pERK1 y pERK2 mediante un anticuerpo específico anti-pERK1/2.

Sabemos que las ARRBs no solo median la desensibilización de los GPCRs, sino que también participan en los procesos de endocitosis que los retiran de la membrana plasmática. Por esto, lo siguiente que nos planteamos fue determinar si la presencia de ARRB modificaba el número de sitios de unión a α -MSH en la célula. Este dato nos daría información acerca del número de moléculas de MC1R localizadas en la membrana plasmática y con potencial para unir ligando. Mediante un ensayo de desplazamiento de radioligando (ligando marcado con un isótopo radiactivo 125 I, ver materiales y métodos) observamos que la sobreexpresión de las dos isoformas de ARRB2 provocaba una descenso significativo del número de sitios de unión a NDP-MSH, mientras que la ARRB1 no causaba ningún efecto (**Fig. 5A**). En principio, esta disminución puede explicarse tanto por un cambio conformacional en MC1R inducido por ARRB2 que impide la unión del ligando, como por una disminución de la cantidad de receptor disponible en membrana debido a que la ARRB2 esté promoviendo su internalización. Con el fin de comprobar si esta última posibilidad era la correcta, analizamos el índice de internalización del MC1R con un método de lavado ácido que nos permite discriminar entre complejos agonista-receptor internos y externos (**Fig. 5B**). Los resultados mostraron un aumento en el índice de internalización en presencia de las dos isoformas de ARRB2 tanto en células HEK 293T como HBL. Esto confirma que la sobreexpresión de ARRB2 es la causa de un aumento en el índice de internalización de MC1R. Es de destacar,

además, que ARRB1 no modificó ni la cantidad de radioligando unido ni el índice de internalización de los complejos ligando-receptor, lo que indica que, además de no mediar el desacoplamiento funcional del MC1R, la ARRB1 tampoco promueve su internalización.

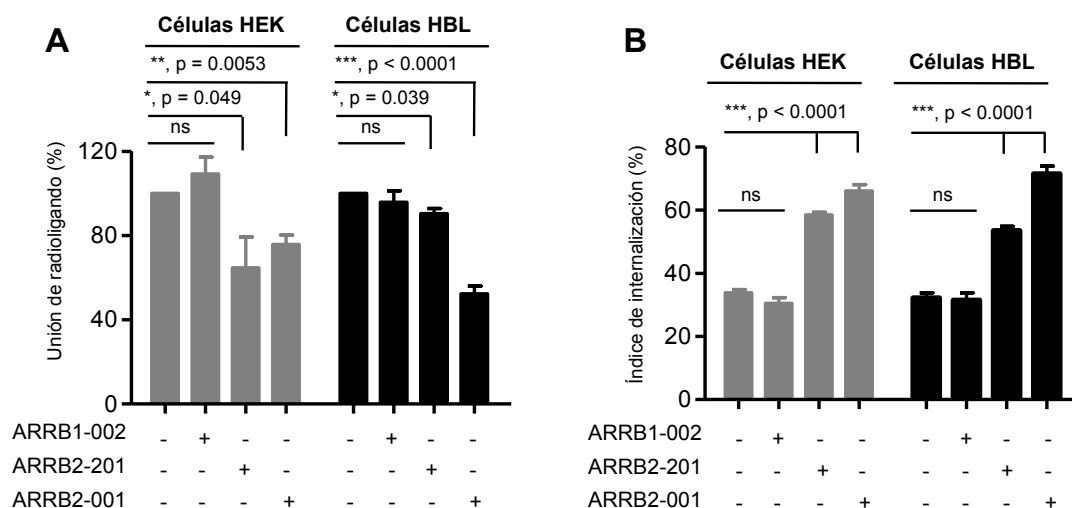


Figura 5. Efecto diferencial de las ARRBs la internalización del MC1R. **(A)** Unión del agonista de MC1R en presencia de ARRBs. Células HEK 293T (barras grises) y células HBL (barras negras) que expresan MC1R solo o en presencia de las ARRBs se incubaron con 10^{-9} M de [125 I]NDP-MSH durante 1 hora, se lavaron y se midió la unión de la hormona radiactiva. **(B)** Medida de la internalización del MC1R en células transfectadas como en (A). La cantidad de ligando radiactivo unido e internalizado se determinó mediante lavados ácidos y se calculó el índice de internalización (porcentaje de agonista internalizado respecto del total unido) fue calculado.

Los datos obtenidos hasta el momento sugieren una interacción física entre ARRB2 y MC1R. Esta posibilidad fue analizada en profundidad con un ensayo de coimmunoprecipitación en células HBL que expresan FLAG-MC1R y transfectadas con ARRB2. Las células fueron además estimuladas con NDP-MSH a distintos tiempos para estimar la estabilidad de la interacción. Se obtuvieron extractos celulares mediante solubilización con detergente no iónico y se inmunoprecipitó el MC1R con un anticuerpo anti-FLAG. El inmunoprecipitado obtenido se analizó por transferencia Western para identificar la presencia de ARRB2 mediante el uso de un anticuerpo específico (**Fig. 6**). El ensayo muestra que existe una interacción entre MC1R y la isoforma ARRB2-201 (designada a partir de ahora como ARRB2). Esta interacción tiene lugar en ausencia de agonista y se mantiene incluso tras 90 minutos de estimulación.

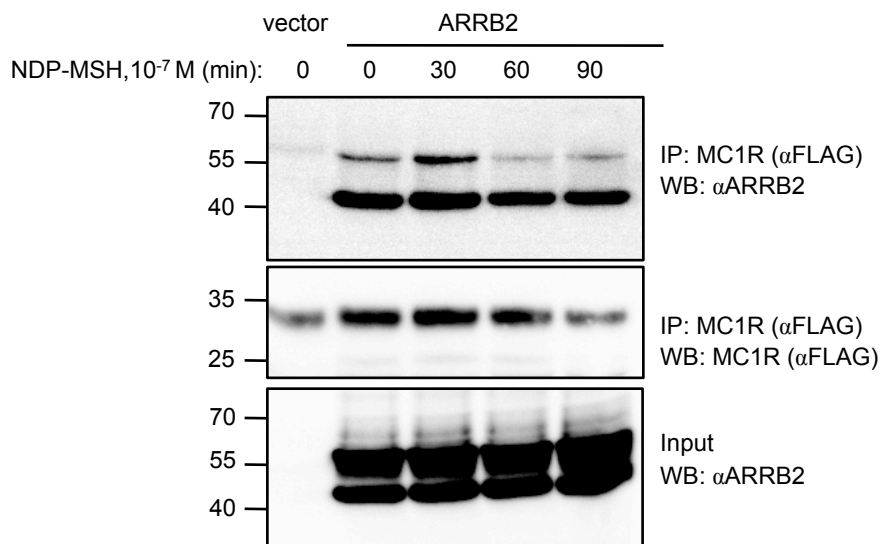


Figura 6. Asociación estable de ARRB2 y MC1R en células estimuladas con agonista. Coinmunoprecipitación de FLAG-MC1R y ARRB2 en células HBL estimuladas a distintos tiempos con NDP-MSH 10⁻⁷ M. Las células fueron transfectadas con la isoforma ARRB2-201 (ARRB2 de aquí en adelante) y luego lisadas e inmunoprecipitadas para MC1R. Los inmunoprecipitados fueron sometidos a electroforesis y transferencia Western y analizados para ARRB2 con un anticuerpo monoclonal específico (panel superior). La correcta inmunoprecipitación del MC1R fue comprobada con un anticuerpo anti-FLAG (panel intermedio). La expresión de ARRB2 en todas las condiciones fue comprobada mediante su detección en una muestra de extracto previo al tratamiento (INPUT).

Estos resultados fueron confirmados por ensayos de microscopía confocal. Para ello, transfectamos células HEK 293T con FLAG-MC1R y ARRB2 marcada con la proteína verde fluorescente (GFP-ARRB2) y analizamos su colocalización en la célula (**Fig. 7A**). Los resultados muestran una colocalización detectable del MC1R con ARRB2 en todos los intervalos de tiempo y una rápida redistribución del receptor desde la membrana plasmática hacia vesículas internas tras estimulación con el agonista. De nuevo, se observa que la colocalización persiste incluso tras 90 minutos de estimulación, indicando la existencia de una asociación estable entre MC1R y ARRB2. También observamos que existe interacción incluso en ausencia de agonista. El análisis cuantitativo de las imágenes por estimación del coeficiente de correlación de Pearson mostró una tendencia hacia un incremento en el grado de colocalización, con una diferencia significativa 30 minutos después de estimular con el agonista (**Fig. 7B**).

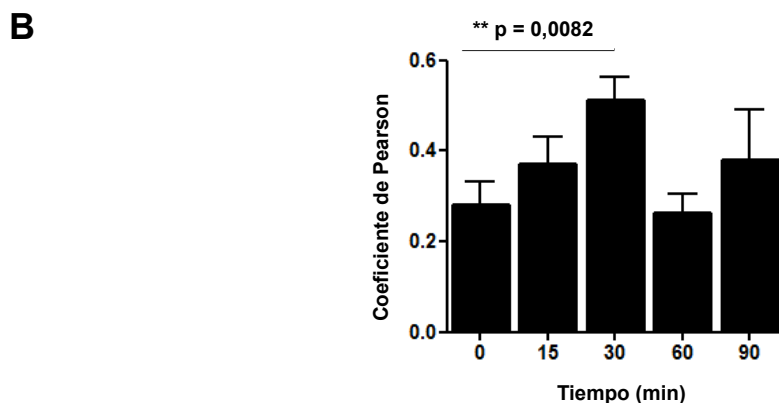
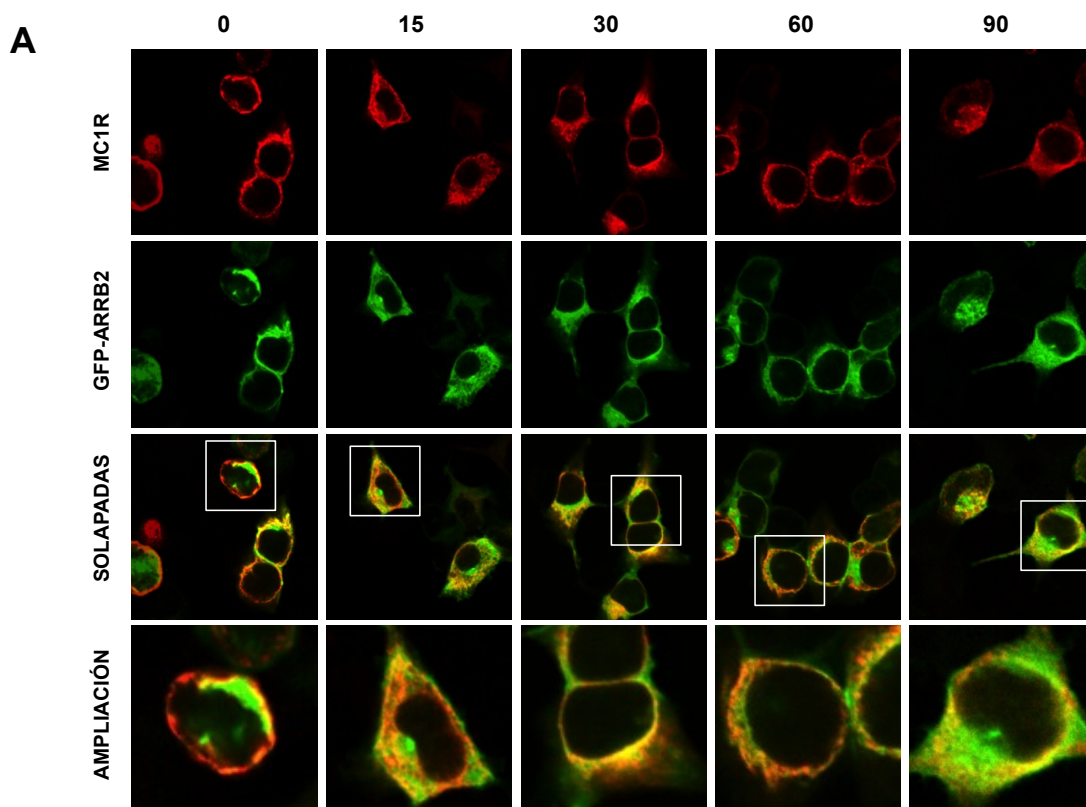


Figura 7. Colocalización estable de MC1R y ARRB2 en vesículas endocíticas. **(A)** Células HEK 293T que coexpresan MC1R y GFP-ARRB2 fueron estimuladas a distintos tiempos con NDP-MSH 10^{-7} M. Posteriormente fueron fijadas, permeabilizadas y analizadas por microscopía confocal. El MC1R se muestra en rojo (primera fila), la GFP-ARRB2 en verde (segunda fila) y la colocalización en amarillo (tercera fila). En la cuarta se muestra una imagen ampliada de la colocalización. **(B)** Análisis cuantitativo de la colocalización entre FLAG-MC1R y GFP-ARRB2 en células HEK 293T estimuladas con agonista a distintos tiempos. Las células fueron transfectadas y tratadas como en (A). Se cuantificaron al menos 10 células tomadas aleatoriamente en cada punto temporal. Para el análisis de la colocalización se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson con el programa ImageJ.

Todos los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la sobreexpresión de ARRB2 disminuye específicamente la señalización del MC1R a través de AMPc y estimula su internalización, sin que se observe un efecto

desensibilizador similar en el caso de la ARRB1. Decidimos confirmar esta hipótesis bajo condiciones más fisiológicas inhibiendo la expresión de ARRB1 y ARRB2 en células HBL. Para conseguir este objetivo utilizamos un método de silenciamiento génico mediante el uso de ARN de interferencia de pequeño tamaño o siARN. Estos siARN, dirigidos específicamente contra el ARN de ARRB1 o ARRB2, provocan la degradación específica de su ARNm, impidiendo por tanto la síntesis proteica de ambas isoformas.

Antes de profundizar en el efecto de esta inhibición sobre la señalización de MC1R, comprobamos mediante electroforesis y transferencia Western el grado de silenciamiento de ARRB1 y ARRB2 conseguido con este método (**Fig 8A**). La cuantificación de las bandas obtenidas nos confirmó que en nuestras condiciones experimentales se produce un silenciamiento de hasta el 80% de la proteína diana (**Fig. 8B**).

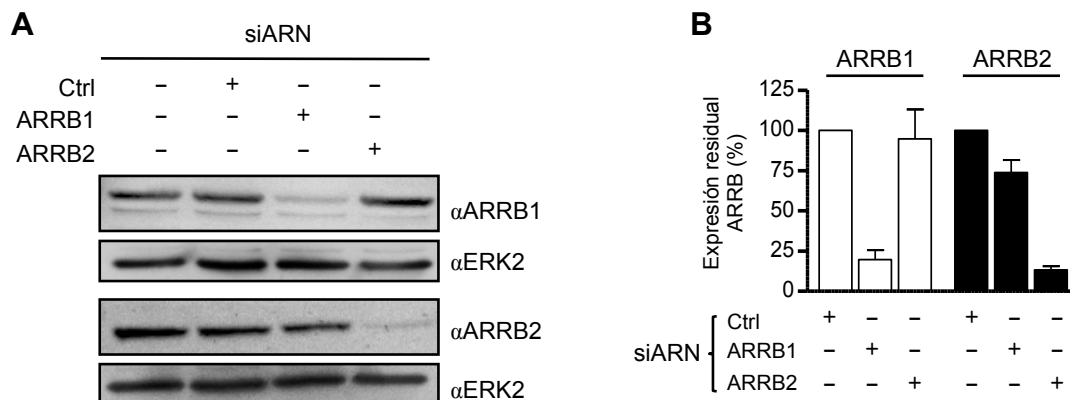


Figura 8. Expresión residual de ARRBs en células transfectadas con siRNA. **(A)** Células HBL transfectadas con siARN control y específico para silenciar ARRB1 y ARRB2. Tras solubilización y electroforesis, se detectó la presencia de ARRBs con anticuerpos específicos antiARRB1 y antiARRB2. Se utilizó antiERK2 como control de carga. **(B)** Análisis cuantitativo de la expresión residual de ARRB1 y ARRB2 en (A). Valores normalizados por cantidad de proteína total.

El siguiente paso fue determinar cómo afecta el silenciamiento de cada una de las isoformas de ARRB a la señalización del MC1R. Sorprendentemente, la medida de AMPc intracelular tras estimular las células con NDP-MSH mostró que el silenciamiento de ARRB1 provoca una disminución de la producción de AMPc comparable con la observada cuando se sobreexpresa la ARRB2. Por otro lado, llama la atención la ausencia de cambios significativos en el nivel de AMPc cuando se silencia la ARRB2 (**Fig. 9A**). Cuando analizamos el grado de internalización de MC1R en estas mismas condiciones en células HEK 293T (**Fig 9B**) observamos que en presencia de siARN contra ARRB1 apenas se producían cambios con respecto al control, mientras que en presencia de siARN contra ARRB2 tenía lugar una fuerte

reducción en la internalización del MC1R. Estos resultados se vieron confirmados por experimentos de microscopía confocal en donde determinamos la localización subcelular de MC1R tras estimulación con NDP-MSH (**Fig. 9C**). En condiciones basales, el receptor se localiza preferentemente en la membrana plasmática. Cuando se estimula con su agonista, aparece una mayor proporción dentro del citoplasma que corresponde al receptor internalizado. Este patrón de expresión no cambia cuando se inhibe la expresión de ARRB1. Por el contrario, cuando se silencia la ARRB2 volvemos a encontrar al receptor localizado preferentemente en la membrana plasmática indicando una disminución del índice de internalización.

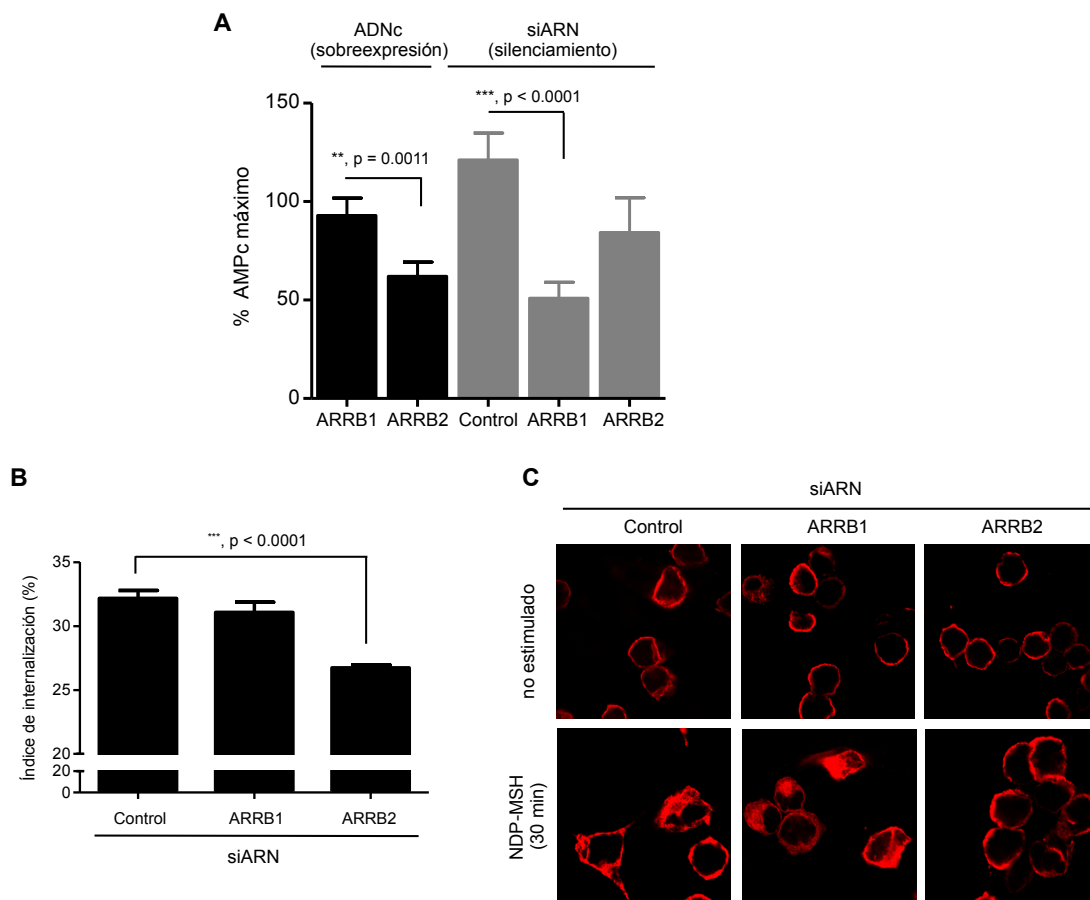


Figura 9. Efecto del silenciamiento génico de ARRBs sobre la señalización del MC1R vía AMPc. **(A)** Niveles de AMPc en células HEK 293T que tienen las ARRBs sobreexpresadas (color negro) o silenciadas (color gris). Las medidas se realizaron tras 30 minutos de estimulación con NDP-MSH 10^{-7} M y se expresan como porcentaje del AMPc máximo obtenido cuando se estimula el MC1R en solitario. **(B)** Índice de internalización de MC1R en células HEK 293T que tienen inhibida la expresión de ARRB1 o ARRB2 mediante un siARN específico. Las células fueron estimuladas 90 minutos con $[^{125}\text{I}]\text{NDPMSH}$ (10^{-9} M), tras lo cual se separó el ligando unido extracelularmente del internalizado en complejos hormona-receptor, mediante lavado ácido. El índice de internalización se representa como el porcentaje de agonista internalizado respecto al total unido. **(C)** Análisis por microscopía confocal de la internalización de MC1R en células HEK 293T carentes de ARRBs. Las

células fueron transfectadas con un siARN control o específico y mantenidas por un lado en estado basal (no estimulado) y por otro estimuladas con NDP-MSH 10^{-7} M durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo fueron permeabilizadas, teñidas y analizadas por microscopía confocal.

Así pues, los datos obtenidos hasta el momento sugieren que el silenciamiento de ARRB1 endógena inhibe específicamente el acoplamiento de MC1R a la vía del AMPc pero no ejerce ningún efecto sobre la internalización del receptor, mientras que el silenciamiento de ARRB2 anula la internalización del MC1R sin afectar a su acoplamiento funcional. Por otra parte, la sobreexpresión de ARRB1 carece de efectos funcionales evidentes sobre MC1R, mientras que la de ARRB2 promueve su desacoplamiento de la cascada del AMPc y su internalización en vesículas endocíticas.

Tampoco encontramos cambios significativos en la cinética o en el grado de activación de la vía de las ERK cuando se silencian las ARRBs (**Fig. 10A y 10B**). El hecho de que ni la sobreexpresión ni la inhibición de ARRBs afecten a la activación de ERK dependiente de agonista confirma el del efecto diferencial de las ARRBs sobre la señalización del MC1R, ya que no solo afectan de forma diferente las distintas vías iniciadas por la activación del receptor, sino que dentro de la vía canónica de señalización ARRB1 y ARRB2 regulan diferencialmente el comportamiento del MC1R y por tanto su función final en el melanocito.

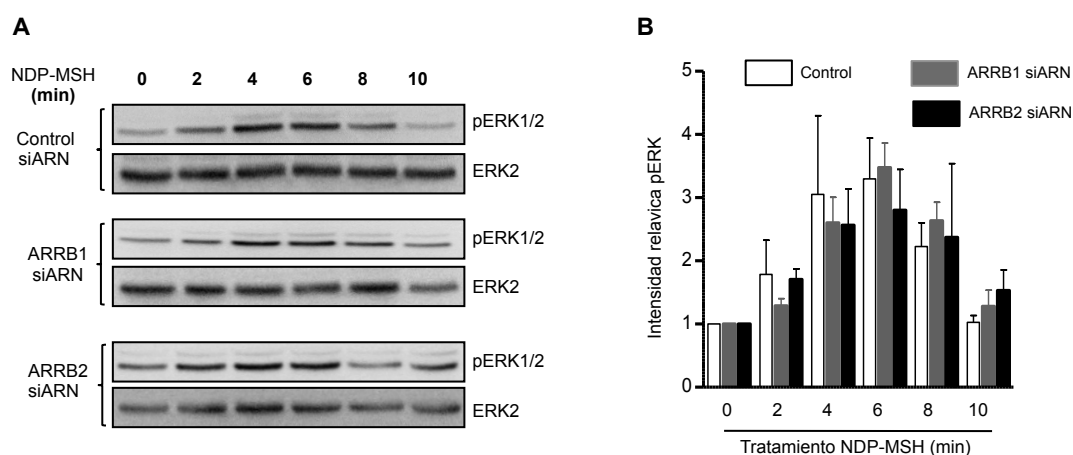


Figura 10. Efecto del silenciamiento génico de ARRBs sobre la señalización de ERK dependiente de la activación de MC1R. **(A)** Células HBL transfectadas con siARN control o específico de ARRB fueron estimuladas a tiempos cortos con NDP-MSH 10^{-7} M, solubilizadas en tampón con detergente no iónico e inhibidores de fosfatasa y analizadas por transferencia Western para determinar la expresión de ERK fosforilado. Como control de carga se usó ERK total. **(B)** Análisis cuantitativo de la expresión de ERK fosforilado en células con las ARRBs silenciadas. Datos procedente de tres experimentos independientes, corregidos por su correspondiente control de carga y normalizados por los valores a tiempo 0.

1.3. Asociación competitiva de ARRB1 y ARRB2 por el MC1R

El hecho de que el silenciamiento de ARRB1 endógena inhiba el acoplamiento funcional de MC1R a la vía del AMPc sugiere que una asociación de ARRB1 (funcionalmente neutra) y MC1R puede estar reduciendo la interacción del receptor con la ARRB2 inhibidora. Para confirmar si realmente ARRB1 y ARRB2 compiten por su unión al receptor decidimos estudiar con más profundidad estas interacciones. Comenzamos por confirmar que las tres isoformas de ARRBs presentes en los melanocitos interaccionan de forma comparable con MC1R. Para ello, extractos de células HEK 293T transfectados con las tres isoformas de ARRB en presencia y ausencia de MC1R fueron inmunoprecipitados para el receptor y analizados por transferencia Western para detectar la presencia de arrestinas (**Fig. 11**). Observamos que las tres isoformas de ARRB interaccionan con MC1R de manera eficiente, comparable y específica.

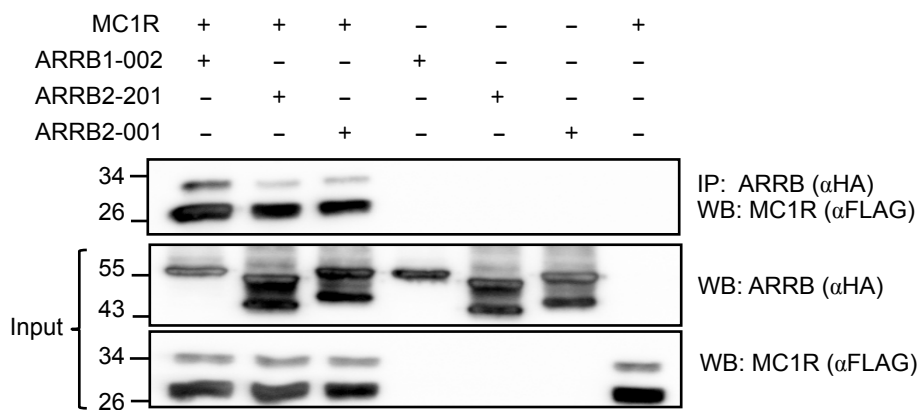


Figura 11. Interacción entre las distintas isoformas de ARRB y el MC1R. Células HEK 293T transfectadas con MC1R y las tres isoformas de ARRB (marcadas con HA en N-terminal) según se indica. Tras un mínimo de 3 horas en medio de cultivo mínimo, se solubilizaron y los extractos se inmunoprecipitaron con un anticuerpo antiHA. Los inmunoprecipitados se revelaron con antiFLAG para detectar la presencia de MC1R. Se analizó también una alícuota del extracto solubilizado como control de expresión (input).

Puesto que, en general, la fosforilación de los GPCRs por las quinasas GRK es mucho más eficiente en receptores unidos a agonista, nuestros resultados sugieren que la interacción entre MC1R y ARRB podría estar ocurriendo en ausencia de fosforilación de MC1R. Para confirmarlo repetimos el mismo experimento utilizando dos formas mutantes de MC1R. Se ha descrito que cuando el MC1R se une a agonista y se activa, se fosforila en dos residuos clave de su extremo C-terminal (Thr308 y Ser316) en un proceso dependiente de GRK2 y GRK6

¹⁶. Por ello analizamos la interacción de las ARRBs con los mutantes dobles de MC1R T308A-S316A y T308D-S316D. En el primero se han sustituido los dos residuos Thr308 y Ser316 por alanina. Este cambio impide que se produzca la fosforilación simulando por tanto un estado permanentemente desfosforilado del receptor. En el segundo mutante, estos residuos se han sustituido por aspartato, un residuo con carga negativa que mimetiza el estado fosforilado y por tanto un receptor permanentemente activado. Al coimmunoprecipitar estos mutantes con las ARRBs, observamos que la cantidad de ARRB1 inmunoprecipitada con el receptor fue comparable para el receptor silvestre y para los dos mutantes y lo mismo ocurre con la ARRB2 (**Fig. 12**). Esto confirma la hipótesis planteada de que ARRB1 y ARRB2 interactúan con MC1R independientemente de su estado de fosforilación.

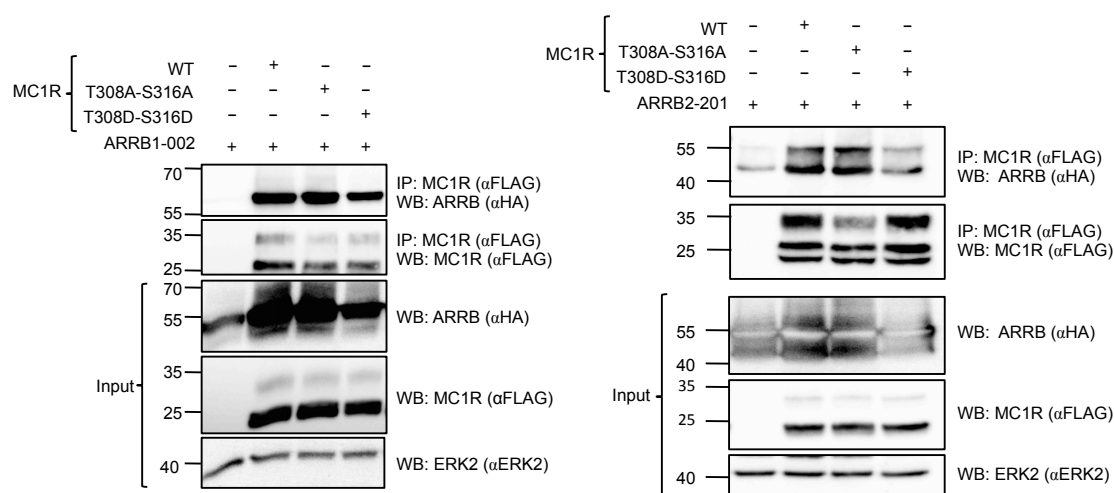


Figura 12. La interacción de ARRB1 y ARRB2 con MC1R es Independiente del estado de fosforilación de MC1R. Se coexpresaron en células HEK 293T el receptor silvestre MC1R y dos mutantes que mimetizan un estado desfosforilado (T308A-S316A) o fosforilado (T308D-S316D), los tres marcados con el epitopo FLAG, con las dos isoformas de ARRB (con HA en N-terminal). Los extractos fueron solubilizados e inmunoprecipitados para MC1R con un anticuerpo antiFLAG y analizados para detectar la presencia de ARRBs con antiHA. El revelado con un anticuerpo antiFLAG nos permitió comprobar la correcta inmunoprecipitación de las tres variantes de MC1R. Como control de expresión se analizó una alícuota del extracto recién solubilizado (input).

Antes hemos planteado la posibilidad de que ARRB1 y ARRB2 estuvieran compitiendo por su unión a MC1R. Para valorar esta posibilidad, sobreexpresamos simultáneamente ARRB1 y ARRB2 y analizamos la interacción de cada isoforma con el MC1R. Para ello, inmunoprecipitamos la ARRB1 en extractos solubilizados de HEK 293T que expresaban las dos isoformas de ARRB y el MC1R, y comprobamos la presencia de este último en los inmunoprecipitados (**Fig. 13**). Observamos que, en presencia de ARRB2, MC1R interactúa en menor medida con la ARRB1 que

cuando se sobreexpresa solo esta última. La misma tendencia puede observarse cuando se analiza la interacción de ARRB2 con MC1R en presencia de ARRB1, en donde ARRB1 parece disminuir la interacción entre ARRB2 y MC1R (resultados no mostrados). Se obtuvieron resultados similares mediante columnas de cromatografía de filtración en gel, de manera que en ausencia de ARRB1 la mayor parte de ARRB2 está interaccionando con MC1R, mientras que en presencia de ARRB1 el perfil de elución de la ARRB2 indica que ésta se encuentra mayoritariamente en estado libre (resultados no mostrados).

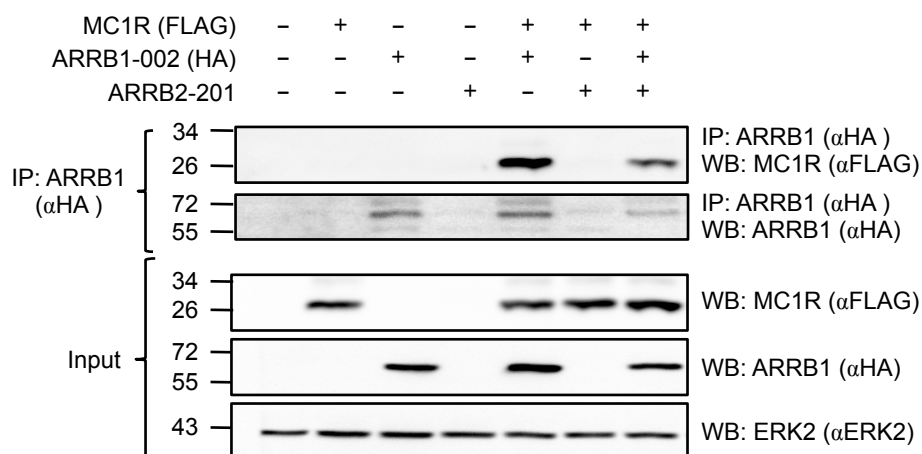


Figura 13. Interacción competitiva de ARRB1 y ARRB2 por su unión a MC1R. Células HEK 293T transfectadas con MC1R (marcado con FLAG), ARRB1 (marcada con HA) y ARRB2 (sin epitopo) según se indica en la leyenda. Los extractos solubilizados se inmunoprecipitaron con un anticuerpo antiHA y se analizó mediante transferencia Western la presencia de ARRB1 mediante el uso de este mismo anticuerpo y uno comercial específico (antiARRB1). Se analizó una alícuota del extracto recién solubilizado como control de expresión (input).

En conjunto, todos estos datos apoyan la hipótesis propuesta de que existe una competición entre ARRB1 y ARRB2 por su unión a MC1R y que esta unión ocurre en ausencia de agonista e independientemente de la fosforilación del receptor en células HEK 293T. En este contexto, la inhibición específica de ARRB1 mediante siARN tendría el efecto paradójico de disminuir el acoplamiento funcional de MC1R a la cascada del AMPc al favorecer la unión de ARRB2 al receptor. A continuación, nos propusimos confirmar los resultados obtenidos en un modelo más cercano a la situación fisiológica de los melanocitos. Por ello, hicimos uso de nuevo de la tecnología que nos permite silenciar los genes que codifican para ARRB1 y ARRB2 y ver el impacto que tiene esto en la interacción de las arrestinas con el receptor.

En primer lugar, llevamos a cabo una inmunoprecipitación del MC1R en células HBL previamente transfectadas con siARN específico contra ARRB1 y

ARRB2 y analizamos la presencia de ambas isoformas de ARRB en el inmunoprecipitado antes y después de estimular las células con NDP-MSH durante 30 minutos (**Fig. 14A**). En condiciones basales observamos una interacción ARRB2-MC1R débil únicamente cuando la expresión de ARRB1 se encuentra silenciada. Tras la estimulación con el agonista, la interacción ARRB2-MC1R se ve reforzada, con reclutamiento de más moléculas de ARRB2 a los complejos ARRB-GPCR, pero una vez más el efecto está muy incrementado cuando la expresión de ARRB1 se ha reducido. Estos datos son consistentes con los obtenidos en células HEK 293T y apoyan un modelo de regulación de la señalización del MC1R en el que la interacción de ARRB1 o ARRB2 con el receptor es competitiva, exclusiva y además tiene lugar a niveles fisiológicos de expresión.

A continuación diseñamos un ensayo para encontrar una evidencia funcional que apoyara este modelo. Para ello, aprovechamos el efecto diferencial que tienen las dos isoformas de ARRB sobre el acoplamiento del MC1R a la vía del AMPc. Transfectamos células HEK 293T con MC1R y con ARRB1 y/o ARRB2 (**Fig. 14B**) y analizamos la producción de AMPc dependiente de la activación del MC1R. Como ya hemos visto antes, ARRB1 no modifica producción de este segundo mensajero mientras que ARRB2 provoca una fuerte reducción en su concentración. Sin embargo, esta inhibición de la síntesis de AMPc se revierte de manera significativa cuando sobreexpresamos a la vez ARRB1 y ARRB2. Esto apoya el modelo propuesto de interacción competitiva entre los dos tipos de ARRB por su unión a MC1R.

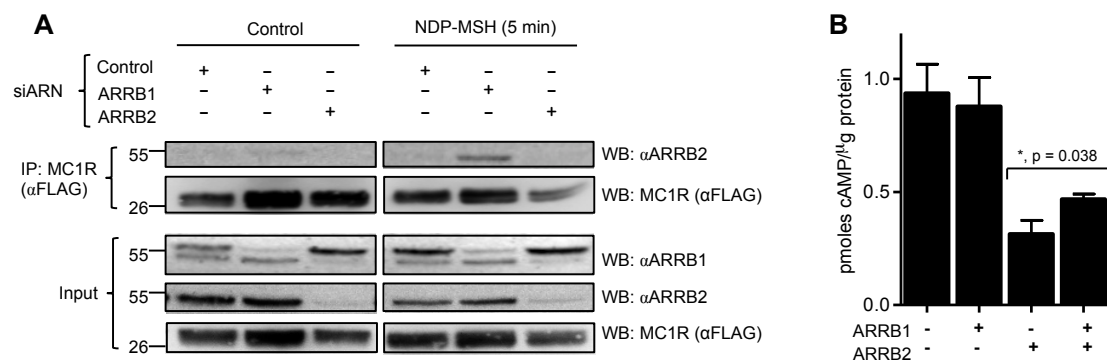


Figura 14. Interacción competitiva de ARRB1 y ARRB2 con MC1R en condiciones de silenciamiento génico de las ARRBs. **(A)** Se transfectaron células HBL que expresan niveles fisiológicos de MC1R (marcado con FLAG) con un siARN control y uno específico para anular la expresión de ARRB1 y ARRB2. A continuación se estimularon con NDP-MSH 10^{-7} M durante 5 minutos y se solubilizaron junto con los correspondientes controles sin estimular. Los extractos fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo antiFLAG para retener el MC1R y se determinó la presencia de ARRB2 en el inmunoprecipitado con un anticuerpo comercial específico (antiARRB2). La correcta inmunoprecipitación de MC1R en todas las calles se determinó con un anticuerpo antiFLAG. Se

comprobó la eficiencia del silenciamiento de ARRB1 y ARRB2 analizando una alícuota del extracto recién solubilizado con los correspondientes anticuerpos (input). **(B)** La expresión de ARRB1 contrarresta parcialmente la inhibición de la señalización a través AMPc debida a ARRB2. Células HEK 293T fueron transfectadas con ARRB1 y ARRB2 según lo indicado y estimuladas durante 30 minutos con NDP-MSH 10^{-7} M, y se determinaron los niveles de AMPc mediante un kit comercial

1.4. Efecto diferencial de ARRB1 y ARRB2 en clones estables de HBL

Muchos de los experimentos descritos hasta el momento se han realizado mediante transfección transitoria de las distintas construcciones en células HEK 293T y células de melanoma humano HBL ligeramente enriquecidas en FLAG-MC1R. Esta aproximación podría conducir a artefactos debidos a la sobreexpresión de las ARRBs que favorecieran interacciones no relevantes a niveles de expresión más fisiológicos. Nuestro siguiente objetivo fue estudiar las consecuencias funcionales de la activación del MC1R en un modelo constituido por células HBL que expresan niveles fisiológicos de receptor y niveles casi fisiológicos de las distintas ARRBs. Para ello, hicimos clones de células HBL que expresan de forma estable ARRBs marcadas con el epitopo FLAG y seleccionamos aquellos que expresaran niveles comparables de las distintas isoformas de ARRB **(Fig. 15A)**. Se seleccionaron dos clones independientes de cada tipo.

Cuando analizamos el acoplamiento funcional de cada uno de estos clones a la vía del AMPc y los comparamos con células HBL control, observamos que los clones enriquecidos en ARRB1 (HBL-ARRB1) presentaban una mayor producción de AMPc dependiente MC1R. Por el contrario, aquellos enriquecidos en ARRB2 (HBL-ARRB2) sufrían una marcada inhibición en la producción de AMPc **(Fig. 15B)**. Estos resultados son consistentes con una situación basal en donde un incremento en la proporción ARRB1/ARRB2 causaría un desplazamiento competitivo de la ARRB2 promoviendo el acoplamiento funcional del MC1R a la vía del AMPc y disminuyendo la internalización **(Fig. 15C, columnas en blanco)**. Por otra parte, el enriquecimiento en ARRB2 produce la esperada inhibición de producción de AMPc tras estimulación con el agonista de MC1R.

De acuerdo con la hipótesis propuesta, cuando inhibimos la ARRB1 en el clon HBL-ARRB1, el índice de internalización aumenta con respecto al control. Por el contrario, HBL-ARRB2 presenta un índice elevado de internalización de MC1R que no se ve afectado por el silenciamiento de ARRB1 pero sí por el de ARRB2, que lo disminuye significativamente **(Fig. 15C)**. Estos datos, por tanto, también apoyan el

modelo propuesto de competición entre ARRB1 y ARRB2 por su unión al MC1R, demostrando además que tiene lugar a niveles de expresión fisiológicos.

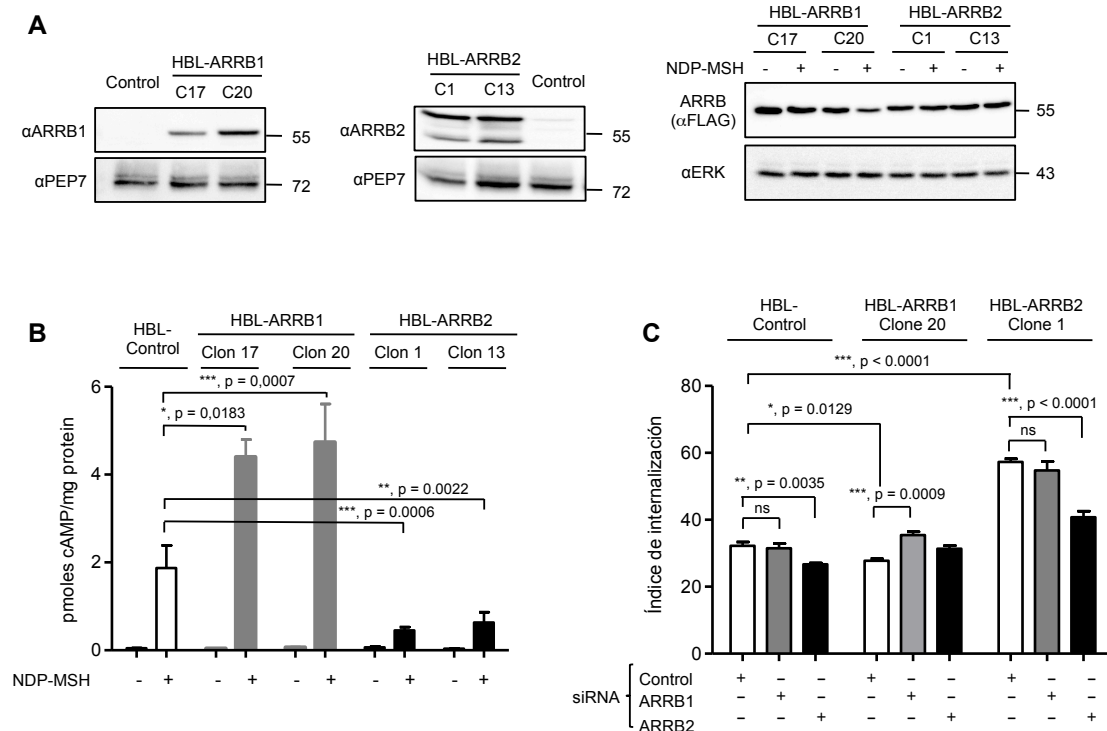


Figura 15. Efecto de ARRB1 y ARRB2 sobre el acoplamiento funcional de MC1R en clones estables de ARRB. **(A)** Expresión estable de ARRB1 y ARRB2 en clones de células HBL. Las células fueron transfectadas con ARRB1 o ARRB2 (marcadas con FLAG en N-terminal y clonadas en pcDNA3) o con un vector vacío (control) y se seleccionaron clones resistentes a geneticina. Se seleccionaron dos clones de cada isoforma de ARRB y se analizó la expresión de ARRB1 (panel izquierdo) o ARRB2 (panel central) usando anticuerpos específicos contra la proteína nativa. Como control de carga se utilizó la expresión de *tirosinasa* con el anticuerpo específico antiPEP7. Para comparar los niveles de expresión relativa de ARRB1 y ARRB2, los extractos se analizaron con un anticuerpo antiFLAG para detectar simultáneamente ambas isoformas (panel derecho). En este caso, el experimento se llevó a cabo con células control y estimuladas con NDP-MSH 10^{-7} M durante 5 minutos. Se usó ERK como control de carga. **(B)** Efecto de la expresión estable de ARRB1 y ARRB2 sobre el acoplamiento funcional a la vía del AMPc. Los clones indicados se estimularon con NDP-MSH 10^{-7} M durante 30 minutos, dejando los correspondientes controles sin estimular. Transcurrido este tiempo se determinaron los niveles de AMPc intracelular con un kit comercial. **(C)** Análisis de la internalización del MC1R en clones estables de ARRB tras silenciar la expresión de ARRB mediante un siARN específico. Tras 48 de expresión con el siARN, los clones fueron estimulados con [125 I]NDPMSh (10^{-9} M, 10 cpm) durante 90 minutos a 37° C. Mediante lavado ácido se separó el ligando unido extracelularmente del internalizado en complejos hormona-receptor. El índice de internalización se representa como el porcentaje de agonista internalizado respecto al total unido).

1.5. Resumen y modelo propuesto de interacción diferencial entre MC1R y las isoformas de ARRB.

Los receptores de clase B unen ambas ARRBs con igual afinidad y forman complejos estables con una prolongada colocación en vesículas endocíticas. Nuestros resultados demuestran que el MC1R humano es un GPCR de clase B con una afinidad comparable por ARRB1 y ARRB2 en condiciones basales. Tras estimulación con el agonista, se asocia formando un complejo estable con la ARRB2 en vesículas endocíticas. Hemos visto, además, mediante coimmunoprecipitación y ensayos funcionales, que existe una clara competición entre ARRB1 y ARRB2. En consecuencia, los sitios de unión para ambas arrestinas deberían estar al menos parcialmente superpuestos. Hasta donde sabemos, todavía no se han descrito evidencias directas de un desplazamiento competitivo entre ARRB1 y ARRB2 por su unión a un mismo GPCR, aunque se ha sugerido esta posibilidad debido a la gran homología de su secuencia y su similar plegamiento ³¹.

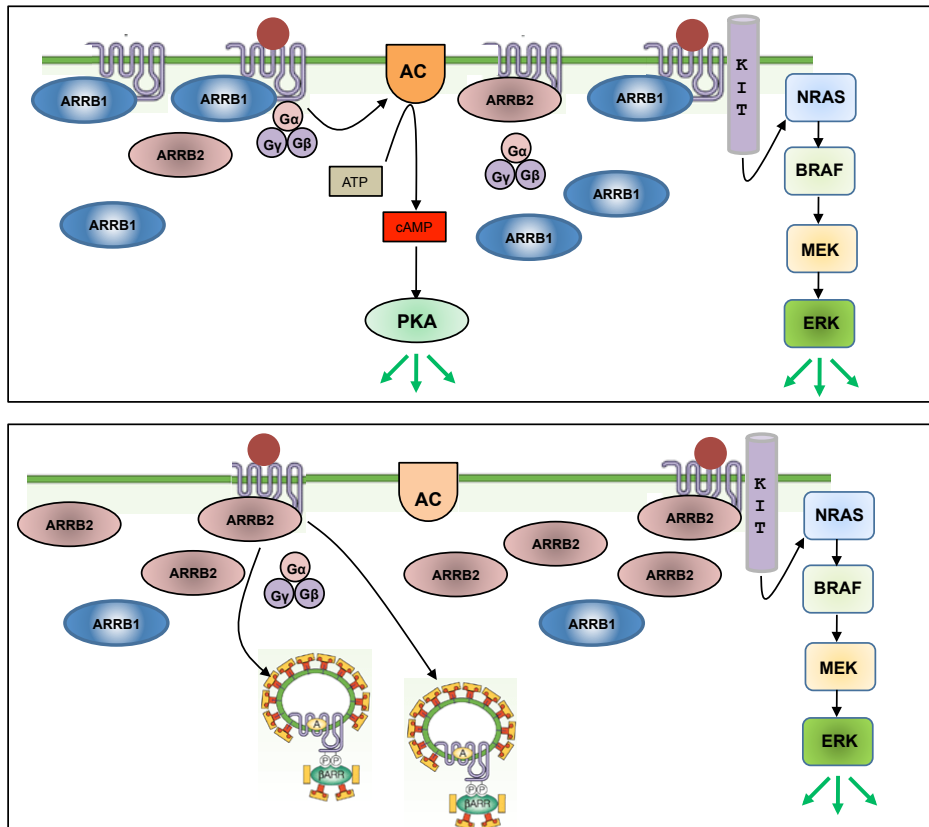
Ensayos de microscopía confocal y coimmunoprecipitación muestran que MC1R puede unir las distintas isoformas de ARRB en presencia y en ausencia de agonista. Datos previos de nuestro grupo y de otros investigadores ponen de manifiesto que el MC1R presenta una elevada actividad constitutiva independiente de agonista ^{32,33}. De este modo, la capacidad del MC1R para adoptar una conformación activa en ausencia de un ligando activador podría explicar al menos parcialmente estas interacciones independientes de agonista. Por otra parte, la unión comparable de las ARRBs al MC1R silvestre y al mutante incapaz de fosforilarse T308A-T316A sugiere la existencia de una interacción independiente de fosforilación. De acuerdo con esto, la fosforilación del receptor en residuos de su extremo C-terminal por las GRKs no parece estrictamente necesario para el reclutamiento de las ARRBs a la membrana, como ya se ha demostrado para otros GPCRs ³⁴⁻³⁶, aunque sí puede ser un determinante importante de la estabilidad y el destino de los complejos. Sin embargo, para otros GPCRs se ha descrito que la eliminación de dianas de fosforilación primarias de GRKs pueden dar lugar a la aparición de dianas secundarias que podrían contribuir también al reclutamiento de las ARRBs. Por lo tanto, aunque parece claro que la fosforilación de los residuos Thr308 y Ser316 del MC1R no es requerida para la unión de ARRBs, no podemos descartar que estén ocurriendo procesos de fosforilación en otros residuos secundarios.

También resulta interesante resaltar que la unión de las ARRBs al receptor en estado basal no parece conducir a la internalización del receptor en ausencia de

agonista. Nuestros datos sugieren que la interacción con las ARRBs no es suficiente para promover la internalización del MC1R y que pueden existir complejos estables ARRB-MC1R asociados a la membrana plasmática de las células melanocíticas. Debido a la alta capacidad de las ARRBs para actuar como sitios de anclaje para componentes de otras vías de señalización, estos complejos ARRB-MC1R pueden tener consecuencias funcionales aún sin caracterizar.

Por otro lado, nuestros resultados demuestran un efecto específico distintos para cada isoforma de ARRB en la señalización del receptor. ARRB1 no inhibe el acoplamiento funcional del MC1R a la vía del AMPc ni promueve su internalización, ya sea en presencia o en ausencia de agonista. Por el contrario, ARRB2 sí que reduce la señalización del receptor a través de AMPc, y aumenta su internalización dependiente de agonista. La internalización tiene lugar a través de la formación de vesículas intracelulares en donde el complejo ARRB2-MC1R puede mantenerse periodos de tiempo relativamente prolongados. De esta manera, nuestros datos apoyan el modelo emergente según el cual, a pesar de su elevada homología estructural, las distintas isoformas de ARRB no son funcionalmente redundantes y pueden llevar a cabo funciones específicas ^{9,14,34}. También es importante resaltar que ARRB2 no altera el acoplamiento funcional del MC1R a la vía de las ERK. Nuestro grupo ha demostrado previamente que la activación de ERK dependiente de MC1R tiene lugar por transactivación independiente de AMPc del receptor tirosina quinasa cKIT ¹³. También se ha demostrado que muchas variantes naturales o artificiales de MC1R disminuyen el acoplamiento del MC1R a la vía del AMPc sin afectar a la activación de ERK ³⁷. Así, la activación de ambas vías de señalización aguas abajo del MC1R probablemente implica un conjunto diferente de proteínas efectoras, así como requerimientos estructurales distintos.

El efecto diferencial de ARRB1 y ARRB2 en la señalización del MC1R, junto con su afinidad comparable y la competición por su unión, sugiere la existencia de dos perfiles funcionales para el MC1R que dependen de los niveles relativos de expresión de cada isoforma (**Esquema 1**).



Esquema 1. Efecto diferencial de ARR1 y ARR2 en la señalización del MC1R. En el panel superior se ilustra una situación en donde la concentración de ARR1 supera la de ARR2. En el panel inferior la concentración de ARR2 es mayor que la de ARR1.

Si la concentración intracelular de ARR1 es mayor que la de ARR2 (panel superior), entonces los complejos ARR1-MC1R serían más abundantes que los complejos ARR2-MC1R. Esta situación favorecería la actividad del receptor, así como una desensibilización menos evidente y una internalización inhibida. Sin embargo, si la actividad de ARR2 es mayor que la de ARR1 (panel inferior), el MC1R estaría unido preferencialmente a la isoforma inhibidora y su señalización se vería disminuida. Esta posibilidad se ve confirmada con nuestros resultados en clones de células HBL que sobreexpresan ligeramente las distintas isoformas de ARR y en donde observamos una marcada diferencia tanto en la producción de AMPc como en el índice de internalización del MC1R en función de la isoforma que se sobreexpresen. Es más, dado el comportamiento de las ARRBs como moléculas de andamiaje con ligeras diferencias en cuanto a las moléculas a las que se asocian, los complejos de señalización orquestados por el MC1R pueden ser diferentes. Todo esto sugiere un nuevo mecanismo de regulación funcional del MC1R en el que será importante, en un futuro, determinar si existen diferencias en la proporción ARR1/ARR2 en melanocitos humanos que tengan el mismo genotipo de MC1R pero distinto fenotipo de piel.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gantz, I. & Fong, T. M. The melanocortin system. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, E468–E474 (2003).
2. Garcia-Borrón, J. C., Sanchez-Laorden, B. L. & Jimenez-Cervantes, C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* **18**, 393–410 (2005).
3. Böhm, M. *et al.* alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *J. Biol. Chem.* **280**, 5795–802 (2005).
4. Kadekaro, A. L. *et al.* Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses oxidative stress through a p53-mediated signaling pathway in human melanocytes. *Mol. Cancer Res.* **10**, 778–86 (2012).
5. Ito, S. & Wakamatsu, K. Diversity of human hair pigmentation as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **25**, 1369–80 (2011).
6. Moore, C. A. C., Milano, S. K. & Benovic, J. L. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 451–82 (2007).
7. Luttrell, L. M. & Gesty-Palmer, D. Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol. Rev.* **62**, 305–30 (2010).
8. Sánchez-Laorden, B. L., Jiménez-Cervantes, C. & García-Borrón, J. C. Regulation of human melanocortin 1 receptor signaling and trafficking by Thr-308 and Ser-316 and its alteration in variant alleles associated with red hair and skin cancer. *J. Biol. Chem.* **282**, 3241–51 (2007).
9. Gurevich & Gurevich. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* **7**, 236 (2006).
10. Nobles, K. N., Guan, Z., Xiao, K., Oas, T. G. & Lefkowitz, R. J. The active conformation of β -arrestin1: Direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of β -arrestins1 and -2. *J. Biol. Chem.* **282**, 21370–21381 (2007).
11. Orsini, M. J. & Benovic, J. L. Characterization of Dominant Negative Arrestins That Inhibit β 2-Adrenergic Receptor Internalization by Distinct Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **273**, 34616–34622 (1998).
12. Buscà, R. & Ballotti, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **13**, 60–69 (2000).
13. Herraiz, C. *et al.* Signaling from the human melanocortin 1 receptor to ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases involves transactivation of cKIT. *Mol. Endocrinol.* **25**, 138–156 (2011).

14. DeFea, K. a. Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: How do they determine what to scaffold? *Cell. Signal.* **23**, 621–629 (2011).
15. DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. β -Arrestins and Cell Signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 483–510 (2007).
16. Sánchez-Más, J., Sánchez-Laorden, B. L., Guillo, L. a, Jiménez-Cervantes, C. & García-Borrón, J. C. The melanocortin-1 receptor carboxyl terminal pentapeptide is essential for MC1R function and expression on the cell surface. *Peptides* **26**, 1848–57 (2005).
17. Cui, R. *et al.* Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* **128**, 853–64 (2007).
18. Le Pape, E., Wakamatsu, K., Ito, S., Wolber, R. & Hearing, V. J. Regulation of eumelanin/pheomelanin synthesis and visible pigmentation in melanocytes by ligands of the melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**, 477–86 (2008).
19. Kadekaro, A. L. *et al.* alpha-Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. *Cancer Res.* **65**, 4292–4299 (2005).
20. Kadekaro, A. L. *et al.* Melanocortin 1 receptor genotype: an important determinant of the damage response of melanocytes to ultraviolet radiation. *FASEB J* **24**, 3850–3860 (2010).
21. Maresca, V. *et al.* MC1R stimulation by alpha-MSH induces catalase and promotes its re-distribution to the cell periphery and dendrites. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 263–75 (2010).
22. Healy, E. *et al.* Melanocortin-1-receptor gene and sun sensitivity in individuals without red hair. *Lancet* **355**, 1072–1073 (2000).
23. Rees, J. L. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 739–51 (2004).
24. Palmer, J. S. *et al.* Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 176–86 (2000).
25. Duffy, D. L. *et al.* Multiple pigmentation gene polymorphisms account for a substantial proportion of risk of cutaneous malignant melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 520–528 (2010).
26. Sánchez-Más, J. *et al.* Role of G protein-coupled receptor kinases in the homologous desensitization of the human and mouse melanocortin 1 receptors. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1035–48 (2005).
27. Pérez-Oliva, A. B., Olivares, C., Jiménez-Cervantes, C. & García-Borrón, J. C. Mahogunin ring finger-1 (MGRN1) E3 ubiquitin ligase inhibits signaling from

- melanocortin receptor by competition with Galphas. *J. Biol. Chem.* **284**, 31714–25 (2009).
28. Walker, W. P. & Gunn, T. M. Shades of meaning: The pigment-type switching system as a tool for discovery. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 485–495 (2010).
 29. Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* **278**, 14498–506 (2003).
 30. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G. & Barak, L. S. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 17201–10 (2000).
 31. Gurevich, V. V & Gurevich, E. V. The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **110**, 465–502 (2006).
 32. Healy, E. *et al.* Functional variation of MC1R alleles from red-haired individuals. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2397–2402 (2001).
 33. Sanchez-Más, J., Hahmann, C., Gerritsen, I., Garcia-Borrón, J. C. & Jiménez-Cervantes, C. Agonist-independent, high constitutive activity of the human melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Res.* **17**, 386–395 (2004).
 34. Gesty-Palmer, D. *et al.* Distinct β -arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* **281**, 10856–10864 (2006).
 35. Wang, P. & DeFea, K. a. Protease-activated receptor-2 simultaneously directs beta-arrestin-1-dependent inhibition and Galphaq-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochemistry* **45**, 9374–9385 (2006).
 36. Zoudilova, M. *et al.* Beta-arrestin-dependent regulation of the cofilin pathway downstream of protease-activated receptor-2. *The Journal of biological chemistry* **282**, 20634–20646 (2007).
 37. Herraiz, C., Journé, F., Ghanem, G., Jiménez-Cervantes, C. & García-Borrón, J. C. Functional status and relationships of melanocortin 1 receptor signaling to the cAMP and extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 pathways in human melanoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 2244–52 (2012).

CAPÍTULO 2

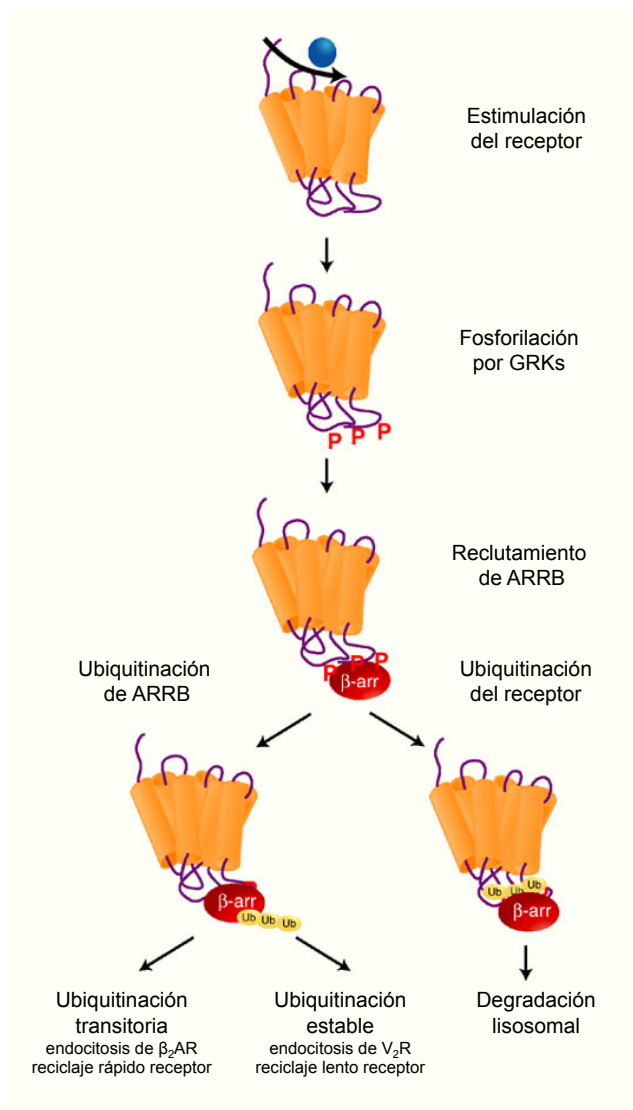
Consecuencias funcionales de la formación de
complejos MC1R-ARRB

INTRODUCCIÓN

Las ARRBs fueron descubiertas por su papel en la desensibilización e internalización de los GPCRs ^{1,2}, aunque recientemente se ha demostrado que también actúan como proteínas de anclaje para miembros de diversas vías de señalización ³. Una característica importante de las ARRBs es que pueden sufrir procesos de modificación postraduccional, frecuentemente como consecuencia de su interacción con los GPCRs ⁴. Estas modificaciones, entre las que destacan los procesos de ubiquitinación y fosforilación, podrían modular la amplia variedad de funciones que se han descrito para ARRB1 y ARRB2.

Los GPCRs pueden seguir varios destinos tras su internalización mediada por ARRBs. En ocasiones, el receptor es reciclado a la membrana plasmática pero en otras termina por ser degradado en el lisosoma o el proteasoma. La especificidad y la estabilidad de los complejos ARRB-GPCR permiten clasificar los receptores en dos tipos: receptores de clase A y receptores de clase B ⁵. Existen algunos indicios que han permitido establecer un paralelismo entre esta clasificación de los receptores y el patrón de ubiquitinación que inducen en las ARRBs ⁶. Así, los receptores de clase A como el receptor adrenérgico β_2 (β_2 AR) y el receptor de angiotensina II tipo 1 ($AT_{1A}R$) inducen una ubiquitinación transitoria de las ARRBs y como consecuencia de su rápida deubiquitinación se disocian rápidamente del receptor y este se recicla a la membrana plasmática. Los receptores de clase B como el receptor de vasopresina V2 (V_2R) provocan una ubiquitinación sostenida de las ARRBs que conduce a la formación de complejos estables ARRB-GPCR que pueden permanecer en los endosomas durante periodos de tiempo relativamente prolongados antes de ser reciclados a la membrana o degradados ^{7,8} (**Esquema 1**). Así parece claro que la ubiquitinación de las ARRBs es un proceso determinante para la internalización y el destino de los GPCRs.

En el primer capítulo hemos analizado la interacción que existe entre el MC1R y las principales formas de ARRB expresadas por los melanocitos. También hemos estudiado las consecuencias de esta asociación sobre el acoplamiento funcional del receptor a sus vías de señalización principales. Nuestros datos han demostrado que el MC1R humano es un GPCR de clase B con afinidad comparable por ARRB1 y ARRB2 en condiciones basales. Además, resultados previos de nuestro grupo con un mutante de MC1R carente de lisinas descartan la posible ubiquitinación y degradación por el proteasoma de este receptor (Ana B. Pérez. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2011).



Esquema 1. Papel de la ubiquitinación en la regulación del tráfico de los GPCRs y su señalización⁹. La unión de un agonista a su GPCR conduce a la fosforilación de diversos residuos de serina y treonina del extremo C-terminal del receptor. Los GPCRs activados y fosforilados reclutan entonces a las ARRBs que a su vez traen hacia el complejo la maquinaria de ubiquitinación. Como consecuencia, tanto los GPCRs como las ARRBs pueden ubiquitinarse. En mamíferos, la ubiquitinación de los GPCRs conduce usualmente a degradación por el lisosoma. La ubiquitinación de ARRBs presenta una cinética diferente según el GPCR implicado. Los GPCRs de clase A inducen una ubiquitinación transitoria que media un rápido reciclaje del receptor a la membrana mientras que los GPCRs de clase B median una ubiquitinación estable con un reciclaje más lento.

Teniendo en cuenta estos precedentes, en el presente capítulo abordamos el estudio y caracterización de una posible ubiquitinación de ARRBs como consecuencia de la formación del complejo ARRB-MC1R.

2.1. Las ARRBs se ubiquitinan en presencia de MC1R

Resultados previos de nuestro laboratorio sugerían que el MC1R podría estar induciendo la ubiquitinación de las ARRBs (Ana B. Pérez. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2011). Esta modificación de las proteínas es fácilmente reconocible mediante experimentos de Western blot, ya que suele generar un conjunto de bandas poco definidas de alto peso molecular aparente (M_r). Para confirmar esta posibilidad, coexpresamos MC1R y ARRBs y observamos si aparecían especies de elevado M_r . Transfectamos células HEK 293T con las distintas isoformas de ARRB nativa y el MC1R marcado con el epitopo FLAG, y analizamos el perfil electroforético de las ARRBs en presencia y ausencia de MC1R. La bibliografía existente hasta el momento sugiere que las modificaciones postraduccionales de ARRB ocurren como consecuencia de su interacción con el receptor activado, por lo que realizamos este experimento en ausencia de agonista y estimulando el receptor durante distintos tiempos con NDP-MSH, un análogo estructural de α -MSH que se comporta como agonista superpotente de MC1R.

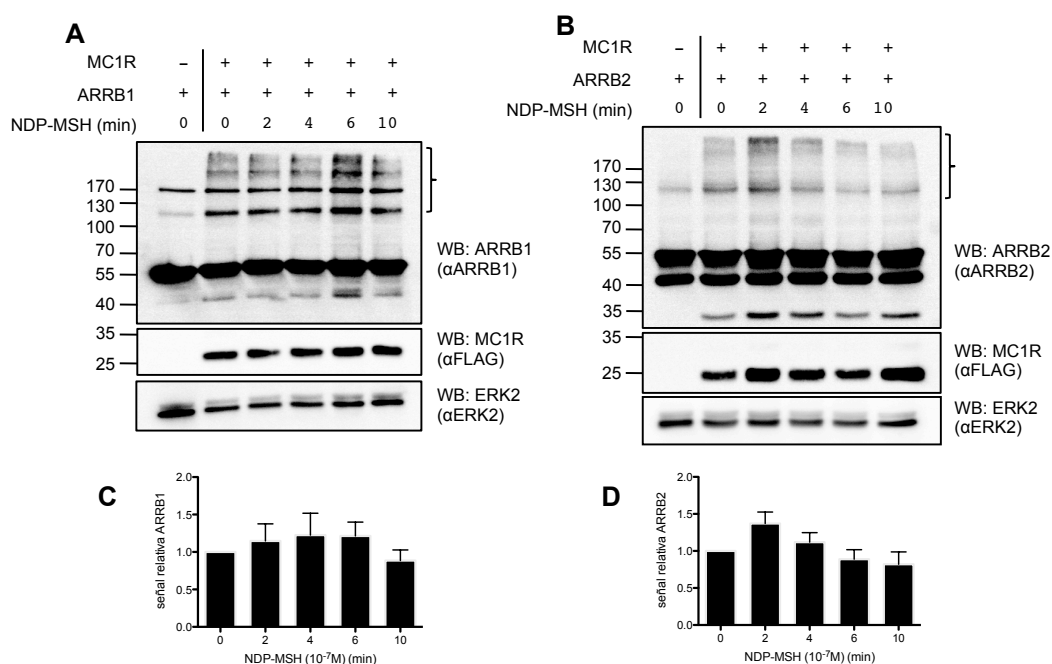


Figura 1. Aparición de bandas de elevado M_r derivadas de ARRBs en presencia de MC1R. **(A)** Células HEK 293T transfectadas con ARRB1 en ausencia y en presencia de MC1R se mantuvieron 3 horas en medio mínimo antes de ser estimuladas con NDP-MSH 10^{-7} M durante 2, 4, 6 o 10 minutos. Extractos celulares solubilizados se analizaron mediante transferencia Western con un anticuerpo específico contra ARRB1. Se comprobó la correcta expresión de MC1R con un anticuerpo contra el epitopo FLAG y se empleó antiERK2 como control de carga. **(B)** Mismo experimento que en (A) usando ARRB2 en lugar de ARRB1. En este caso se utilizó un anticuerpo específico contra ARRB2. **(C)** y **(D)** Intensidad de las formas de elevado M_r para ARRB1 y ARRB2 respectivamente normalizadas por el

control de carga y referidas a la señal obtenida por el complejo ARRB-MC1R sin estimular. Los resultados obtenidos son la media de 4 experimentos. No se apreciaron diferencias significativas en los valores obtenidos a los distintos tiempos de estimulación.

Los resultados obtenidos confirman que en ausencia de MC1R las dos ARRBs se comportan como hemos descrito anteriormente: ARRB1 da lugar a una banda mayoritaria de aproximadamente 55 kDa (**Fig. 1A**) mientras que ARRB2 se muestra como un doblete de 55 y 40 kDa (**Fig. 1B**). Cuando las ARRBs se coexpresan con MC1R aparecen formas de elevado peso Mr. Estas bandas derivadas de ARRB, que se reconocen con anticuerpos específicos contra estas proteínas, podrían ser formas poliubiquitinadas de ARRB. Se trata, además, de un fenómeno independiente de agonista puesto que tiene lugar tanto en ausencia como en presencia de NDP-MSH. En efecto, no existe una variación significativa en la intensidad de estas bandas de elevado Mr durante la estimulación del MC1R (**Fig. 1C y 1D**), incluso estimulaciones de 30 minutos, que es cuando se alcanzan los niveles máximos de AMPc intracelular (resultados no mostrados).

A continuación, transfectamos ARRB1 y ARRB2 en melanocitos malignos HBL que expresan niveles fisiológicos de MC1R, con el fin de comprobar los resultados anteriores en un entorno más fisiológico. En este caso, se expresaron las ARRBs marcadas con HA en su extremo N-terminal y se analizó su perfil electroforético mediante el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente este epitopo y permite así detectar ambas isoformas a la vez (**Fig. 2A**). Al igual que ocurre en células HEK 293T, en estas células melanocíticas también aparecen formas de Mr elevado derivadas de ARRB, aunque con este anticuerpo el patrón electroforético parece ligeramente distinto. Esta diferencia aparente será estudiada con más detenimiento más adelante.

Para confirmar si esta modificación es dependiente del receptor repetimos el mismo experimento inhibiendo la expresión del MC1R mediante un siARN específico. En este caso, para poder monitorizar el correcto silenciamiento de MC1R utilizamos células HBL que expresan niveles fisiológicos de MC1R marcado con el epitopo FLAG. Transfectamos estas células con las dos isoformas de ARRB marcadas con el epitopo HA y silenciamos la expresión del receptor mediante el uso de un siARN específico para MC1R (y su correspondiente control). Los extractos celulares se solubilizaron y se analizaron mediante transferencia Western y el uso de anticuerpos específicos. Comprobamos el correcto silenciamiento de MC1R con un anticuerpo contra el epitopo FLAG (**Fig. 2B, panel medio**) y comparamos el patrón electroforético de las ARRBs con un anticuerpo contra el epitopo HA. Los

resultados obtenidos muestran que niveles fisiológicos de MC1R son suficientes para inducir la expresión de formas de alto Mr de ARRBs y que el silenciamiento de este receptor abole este fenómeno.

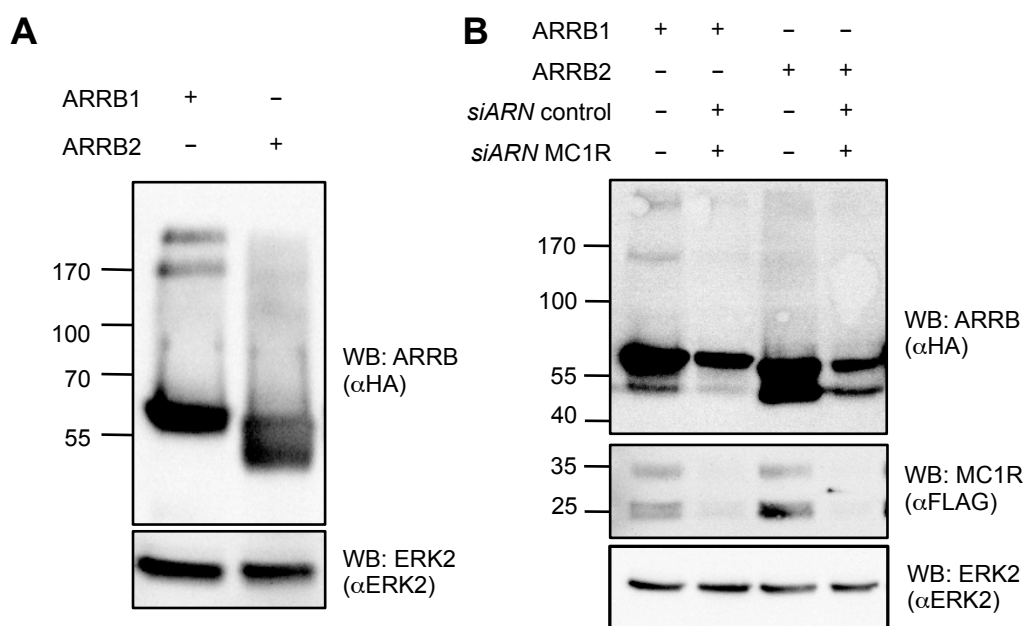


Figura 2. Aparición de bandas de elevado Mr en melanocitos malignos. **(A)** Análisis mediante electroforesis y transferencia Western de la expresión de ARRB1 y ARRB2 marcadas con el epitopo HA en células de melanoma HBL. Para su detección se hizo uso de un anticuerpo contra el epitopo HA localizado en el extremo N-terminal de ambas isoformas de ARRB. **(B)** Células HBL que expresan niveles fisiológicos de FLAG-MC1R transfectadas con ARRB1 y ARRB2 y tratadas con siARN control o específico de MC1R para silenciar la expresión de este receptor. Se usó un anticuerpo antiHA para detectar las ARRBs, un anticuerpo antiFLAG para comprobar el correcto silenciamiento de MC1R y antiERK2 como control de carga.

Como se ha comentado anteriormente este patrón electroforético de bandas de elevado Mr es típico de proteínas modificadas por poliubiquitinación. La unión de una unidad o varias moléculas de ubiquitina a uno o varios residuos de lisina en la proteína modificada da lugar a un conjunto de formas con distinto grado de ubiquitinación y diferente Mr. Las ARRBs tienen en su secuencia entre 31 y 33 residuos de lisina potencialmente ubiquitinables, por lo que nos planteamos la hipótesis de que estas formas de elevado Mr que detectábamos con los anticuerpos contra ARRB podrían ser diferentes formas de poliubiquitinación. Para confirmar esta idea, realizamos experimentos de inmunoprecipitación con ARRBs expresadas en células HEK 293T. Transfectamos estas células con ARRB1 y ARRB2 en presencia y ausencia de MC1R e inmunoprecipitamos los extractos solubilizados con un anticuerpo contra ubiquitina. Los inmunoprecipitados fueron analizados para detectar la presencia de ARRBs (**Fig. 3**). Observamos que en células que

coexpresan ARRB y MC1R existe una interacción entre ubiquitina y ARRB. Cuando analizamos los resultados con un anticuerpo específico para cada isoforma de ARRB vemos que existe una inmunoprecipitación de las bandas de elevado Mr y también de la banda única en el caso de ARRB1 y del doblete en el caso de ARRB2. Las bandas de más de 70 kDa se confirman entonces como formas ubiquitinadas de ARRB que pueden estar formando complejos en los que participaría el MC1R, así como formas monoubiquitinadas o sin ubiquitinar.

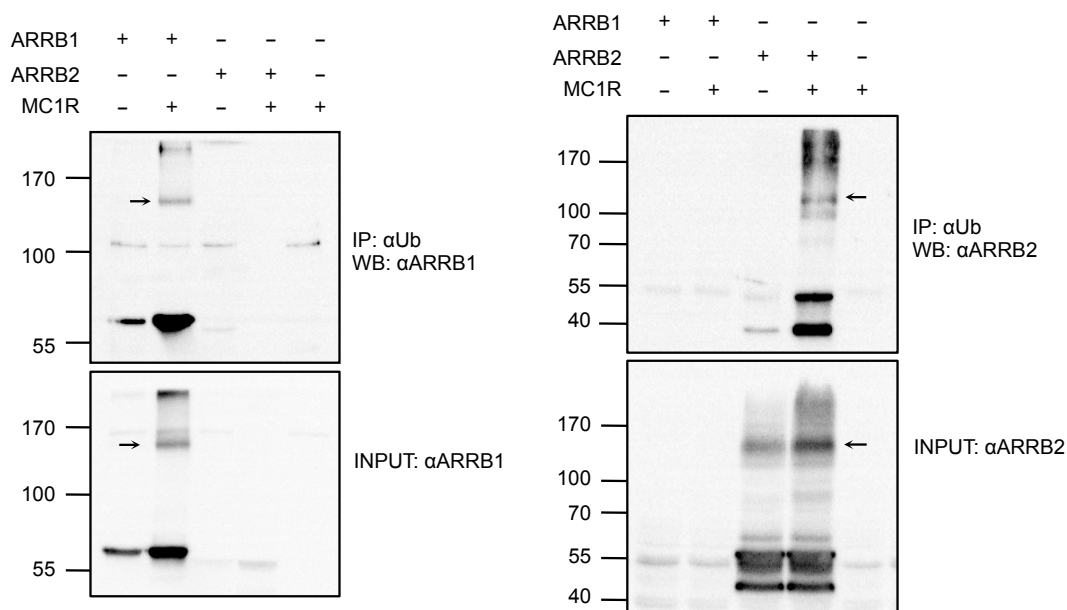


Figura 3. Identificación de las bandas de elevado Mr como formas poliubiquitinadas de ARRB. Células HEK 293T transfectadas con ARRB1, ARRB2 y MC1R, según se indica en la leyenda. Tras la solubilización, los extractos se inmunoprecipitaron con un anticuerpo contra ubiquitina y los inmunoprecipitados analizados con anticuerpos específicos contra ARRB1 (panel izquierdo) y ARRB2 (panel derecho).

MC1R pertenece a una pequeña subfamilia de GPCRs que consta de otros 4 miembros (MC2R-MC5R). Todos ellos muestran una homología del 40-60% y se acoplan positivamente a la cascada del AMPc¹⁰. Difieren, sin embargo, en su afinidad por las distintas MCs y por péptidos antagonistas endógenos. Para determinar si el efecto inductor de la ubiquitinación de las ARRBs era exclusivo del MC1R o una característica compartida por todos los miembros de la subfamilia de MCRs coexpresamos en células HEK 293T las dos isoformas de ARRB con los distintos MCRs, y comparamos su capacidad de inducir la aparición de bandas de elevado Mr con la del MC1R. Debido a que los MCRs estaban marcados con el epítopo HA, se utilizaron para este experimento unas construcciones de ARRB marcadas con el epítopo FLAG (**Fig. 4A y 4B**). Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones experimentales empleadas, todos los miembros de la familia

de los MCRs, salvo MC4R, son capaces de inducir la ubiquitinación de ARRB2, mientras que tan solo MC1R y MC3R tienen este efecto sobre la ARRB1. No obstante, debido a la baja eficiencia de expresión de MC4R, que apenas fue detectable en Western blot, no podemos sacar ninguna conclusión fiable en relación a capacidad de este receptor de inducir la ubiquitinación de las ARRBs.

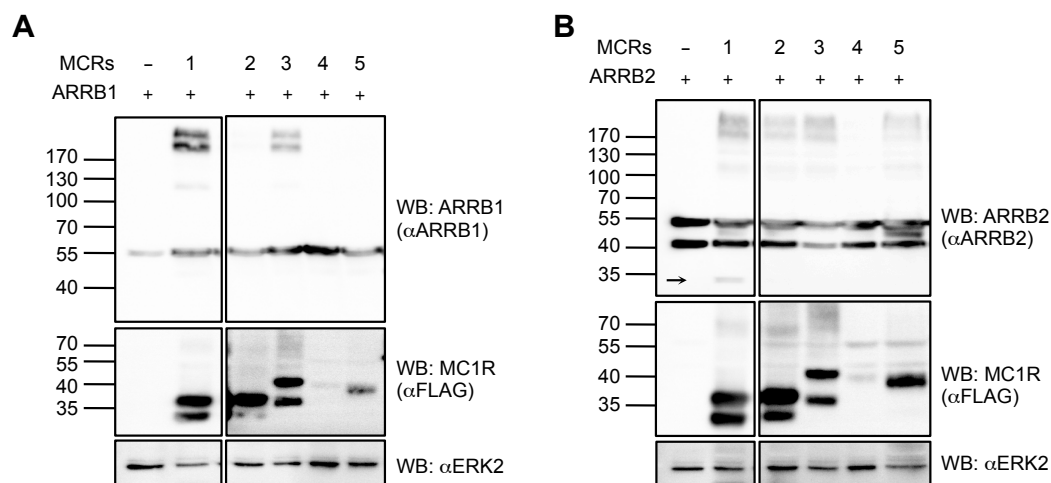


Figura 4. Efecto de otros receptores de la familia de los MCRs sobre la ubiquitinación de las ARRBs. ARRB1 (A) y ARRB2 (B) se coexpresan en células HEK 293T con los cinco miembros de la familia de receptores de MCs. Las células se solubilizaron y los extractos se analizaron mediante transferencia Western. Las ARRBs se revelaron con un anticuerpo antiFLAG, los distintos receptores con un anticuerpo antiHA y utilizamos antiERK2 como control de carga.

2.2. Relación entre el estado funcional del MC1R y la ubiquitinación de ARRB dependiente de MC1R

MC1R es un gen altamente polimórfico, con más de 200 variantes alélicas localizadas en su región codificante¹¹. Algunas de estas variantes son formas con función disminuida, aunque los mecanismos moleculares y el grado de su disfunción aún no se conocen por completo. Se han realizado estudios que demuestran la asociación de algunos de estos polimorfismos con un fenotipo de pelo rojizo, piel clara, escasa capacidad de bronceado^{12,13} y elevada probabilidad de desarrollar melanoma u otros tipos de cáncer de piel¹⁴. Por esto, a este fenotipo se le denomina RHC (Red Hair Colour, pelo color rojizo). Las variantes de MC1R de mayor penetrancia para el fenotipo RHC se denominan alelos “tipo R”, e incluyen las variantes R151C, R160W y D294H. Otras variantes, como V60L y V92M, tienen una asociación más débil con el fenotipo RHC y se denominan alelos “tipo r”¹⁵.

Los resultados que hemos obtenido hasta el momento indican que el MC1R es capaz de inducir la poliubiquitinación tanto de la isoforma funcionalmente neutra

ARRB1, como de la isoforma inhibidora ARRB2. También hemos visto que esta ubiquitinación tiene lugar incluso en ausencia de agonista, lo que podría relacionarse con la elevada actividad constitutiva que posee el MC1R. Por esta razón, nos planteamos averiguar si existe una relación entre el estado funcional del receptor y su capacidad para inducir la ubiquitinación de las ARRBs. Elegimos un panel de 11 variantes de MC1R con diferente potencial de señalización, desde formas hiperactivas como E94K ¹⁴ hasta mutantes con pérdida total de función como S41F, L93R, R162P y C289R ^{14,16-18}. Analizamos también algunas variantes “tipo r”: V60L y V92M, y los principales alelos “tipo R”: R151C, I155T, R160W y D294H (**tabla 1**). Sobreexpresamos estos mutantes con las dos isoformas de ARRB, solubilizamos las células con detergente no iónico y analizamos mediante electroforesis y transferencia Western la aparición de bandas de elevado Mr. Utilizamos en este caso las ARRBs marcadas con un epítipo 3xHA (**Fig. 5**).

Variante	Acoplamiento AMPc	Expresión en superficie	Observaciones
S41F	nulo / indetectable	reducida	retenido en RE
V60L	reducido	¿?	tipo r
V92M	ligeramente reducido	normal	tipo r
L93R	nulo / indetectable		
E94K	hiperativo		
R151C	reducido	reducida	tipo R
I155T	reducida	reducida	tipo R
R160W	reducido	reducida	tipo R
R162P	nulo / indetectable	normal	incapaz unir agonista
C289R	nulo / indetectable	normal	incapaz unir agonista
D294H	reducido	incrementada	incapaz de internalizar, tipoR

Tabla 1. Selección de 11 variantes naturales de MC1R asociadas al fenotipo RHC y/o con potencial de señalización vía AMPc alterado respecto del MC1R silvestre. A excepción del mutante E94K que corresponde a una forma hiperactiva del receptor, el resto de mutantes presenta una pérdida parcial o total de su capacidad de acoplamiento a la cascada del AMPc.

Al analizar los resultados observamos que los mutantes caracterizados por pérdida total de función (S41F, L93R, R162P y C289R) no son capaces de inducir la poliubiquitinación de ninguna de las dos isoformas de ARRB. Existe una fuerte disminución de las bandas de elevado Mr cuando se expresan las ARRBs con cualquiera de estas variantes hasta hacer las formas poliubiquitinadas prácticamente

indetectables. Lo mismo ocurre en presencia del mutante D294H, una variante de MC1R con elevada pérdida de función (actividad residual <25%) y resistente a internalización¹⁹. El resto de variantes incluidas en el ensayo (a excepción de E94K, que es una forma hiperactiva) también presentan una pérdida parcial de función y una menor capacidad de estimular la síntesis de AMPc¹⁹. Estas variantes sí son capaces de inducir la ubiquitinación de las ARRBs aunque lo hacen de una manera menos efectiva que el MC1R silvestre o el mutante hiperactivo E94K. Por otro lado, es importante destacar que estos resultados son más evidentes para la ARRB2 que para la ARRB1.

Por tanto, nuestros resultados apoyan la existencia de una correlación entre la capacidad del MC1R para acoplarse a la vía del AMPc y la estimulación de la poliubiquitinación de las ARRBs.

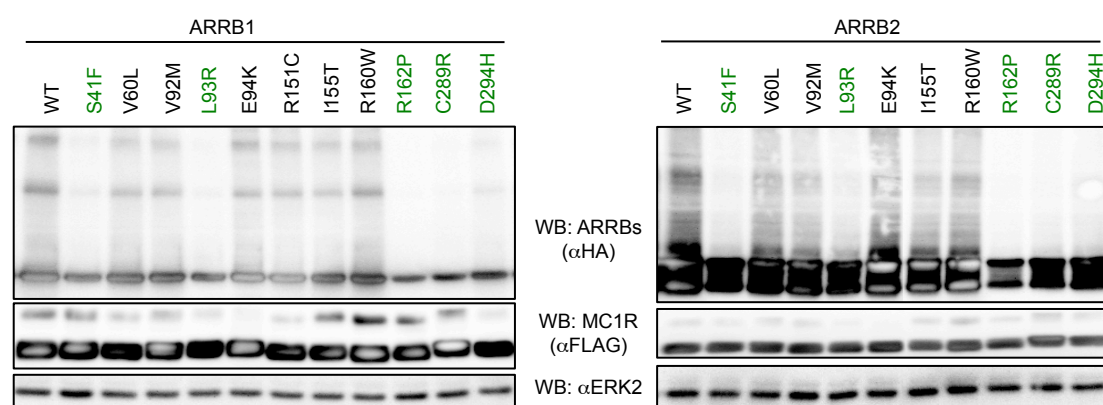


Figura 5. Capacidad de variantes de MC1R con diferente potencial de señalización para inducir la ubiquitinación de ARRB1 y ARRB2. Células HEK 293T se transfectaron con ARRB1 (panel izquierdo), ARRB2 (panel derecho) marcadas con el epítipo HA y un panel de 11 mutantes de MC1R marcados con FLAG. Análisis por transferencia Western y anticuerpo específico contra el epítipo HA del perfil de bandas de elevado Mr. En verde se marcan los alelos con pérdida total de función y el mutante D294H con una señalización mínima. La correcta expresión de cada uno de los receptores se determinó con un anticuerpo antiFLAG. Se utilizó antiERK2 como control de carga del experimento.

Con el propósito de confirmar la existencia de esta relación, realizamos un nuevo experimento en presencia de mutantes truncados de MC1R que exhiben distinta capacidad para estimular la vía de señalización del AMPc. Datos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que el extremo carboxilo terminal del MC1R es necesario para su correcta señalización²⁰. Se crearon una serie de mutantes de MC1R con deleciones progresivamente mayores del extremo C-terminal denominados $\Delta 1$, $\Delta 3$, $\Delta 5$ y $\Delta TM7$. En esta serie de mutantes, $\Delta 1$ carece del último aminoácido C-terminal, $\Delta 3$ y $\Delta 5$ de los últimos 3 y 5 residuos, respectivamente, y $\Delta TM7$ carece de la última hélice transmembrana y el extremo C-

terminal citosólico completo. Es importante resaltar que estos mutantes sufren una pérdida de función progresiva según el número de residuos que han perdido. Así, la eliminación del residuo terminal de triptófano (en $\Delta 1$) no tiene efectos detectables sobre los niveles de AMPc tras estimulación con el agonista. Por el contrario, la eliminación del tripéptido terminal $^{315}\text{CSW}^{317}$ (en $\Delta 3$) reduce en más de un 50% la producción máxima de AMPc y la pérdida del pentapéptido $^{313}\text{LTCSW}^{317}$ (en $\Delta 5$) o de la última hélice transmembrana 7 (en ΔTM7) conducen a una pérdida total de función ²⁰. En base a esta correlación entre la pérdida de aminoácidos por el extremo C-terminal y su capacidad de señalización, consideramos que se trataba de un buen modelo para corroborar la relación que hemos sugerido con anterioridad entre el estado funcional del MC1R y su capacidad para inducir la poliubiquitinación de ARRBs.

Con este fin, transfectamos las dos isoformas de ARRB en células HEK 293T con los mutantes truncados de MC1R y el receptor silvestre y estimamos la poliubiquitinación de las ARRBs, observando la aparición de bandas de elevado Mr (**Fig. 6**). Los resultados mostraron que tanto el receptor silvestre como $\Delta 1$ inducen la formación de niveles comparables de las formas poliubiquitinadas de ARRB. El mutante $\Delta 3$, que tiene reducida al 50% la producción máxima de AMPc en respuesta a agonistas, también induce, aunque en menor medida, la poliubiquitinación de ARRBs. Por su parte las formas truncadas de MC1R, $\Delta 5$ y ΔTM7 , son completamente ineficientes a la hora de inducir este proceso. De esta forma, se confirma que MC1R debe ser funcional para inducir la poliubiquitinación de las ARRBs.

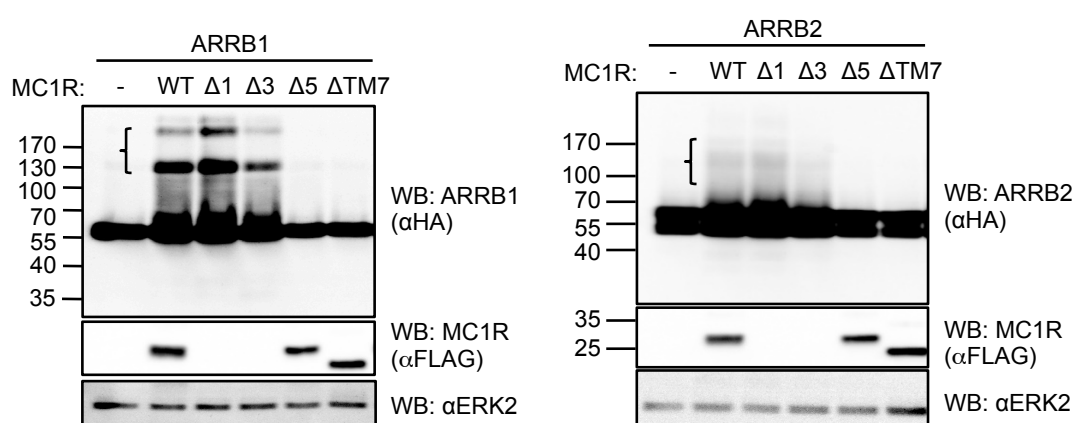


Figura 6. Capacidad de mutantes truncados de MC1R para inducir la ubiquitinación de ARRBs. Se solubilizaron células HEK 293T cotransfectadas con ARRB1 (panel izquierdo) o ARRB2 (panel derecho), ambas marcadas con HA en N-terminal, con el MC1R marcado con el epítopo FLAG y 4 mutantes truncados de MC1R con diferente extensión de su extremo C-terminal. El perfil de bandas ubiquitinadas se analizó con un anticuerpo antiHA y la correcta expresión de MC1R se determinó con

un anticuerpo antiFLAG, Los mutantes $\Delta 1$ y $\Delta 3$ carecen de este epítipo por lo que no pueden ser detectados por esta vía. Como control de carga del experimento se utilizó antiERK2.

Los resultados obtenidos no permiten distinguir si la poliubiquitinación de ARRB2 es dependiente de segundo mensajero y se explicaría por la actividad constitutiva de MC1R nativo o, alternativamente, si el proceso es independiente de segundo mensajero y se debe a un cambio conformacional en ARRB2 inducido por la formación de un complejo MC1R-ARRB2 que solo es posible cuando el MC1R posee una conformación nativa. Para distinguir entre estas dos posibilidades estudiamos la poliubiquitinación de ARRB2 en presencia de un inductor potente de la cascada del AMPc, la forskolina (FSK) (**Fig. 7**).

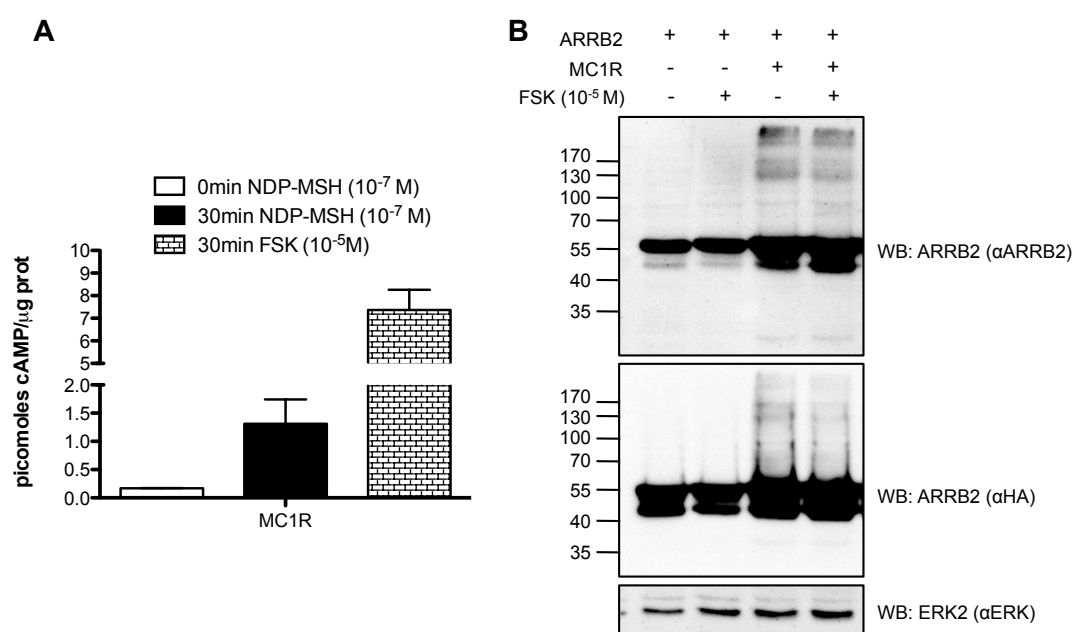


Figura 7. Poliubiquitinación de ARRB2 en presencia del inductor de la adenilato ciclase forskolina (FSK). **(A)** Células HEK 293T transfectadas con MC1R y estimuladas 30 min con NDP-MSH 10^{-7} M o FSK 10^{-5} M y analizadas con un kit comercial para determinar el nivel intracelular de AMPc. **(B)** Células HEK 293T transfectadas con ARRB2 marcada con HA en N-terminal y con FLAG-MC1R y estimuladas con forskolina (FSK) 10^{-5} M durante 30 minutos. Se usaron los anticuerpos antiHA y antiARRB2 para analizar su perfil electroforético y antiERK2 como control de carga del experimento.

La FSK estimula la actividad de la adenilato ciclase y provoca un aumento del nivel de AMPc intracelular que es independiente de la activación del MC1R (**Fig. 7A**). Coexpresamos ARRB2 (marcada con HA en N-terminal) y MC1R en células HEK 293T y observamos si tenía lugar la aparición de algún cambio en el perfil de bandas de poliubiquitinación cuando añadimos FSK al medio (**Fig. 7B**). Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas entre las células tratadas con FSK, que tienen estimulada la *adenilato ciclase*, y las células

sin estimular con niveles fisiológicos de AMPc. Esto sugiere que la poliubiquitinación de ARRB2 es independiente de segundo mensajero y se debe por tanto a la actividad constitutiva del MC1R nativo.

2.3. La ubiquitinación de ARRB2 dependiente de MC1R tiene lugar en el dominio C-terminal de ARRB2.

Los resultados descritos hasta este punto apoyan un modelo en el que las ARRBs sufren un proceso de poliubiquitinación dependiente de MC1R con una conformación nativa pero independiente de la estimulación del receptor o de segundo mensajero, ya que tiene lugar incluso en ausencia de agonista. Es interesante resaltar que, en el caso de la isoforma ARRB2, el perfil de bandas de elevado Mr que se obtiene como consecuencia de la poliubiquitinación varía de manera significativa en función del anticuerpo que estemos utilizando para detectar ARRB2 (**Fig. 8**). Así, el anticuerpo comercial específico antiARRB2 reconoce formas poliubiquitinadas con un tamaño superior a 100 kDa, así como un péptido de aproximadamente 31 kDa que, al igual que la poliubiquitinación, solo aparece en presencia de MC1R (del que hablaremos en profundidad más adelante). Por el contrario, este anticuerpo no es capaz de reconocer especies con un tamaño comprendido entre 70 y 100 kDa que sí son reconocidas por el anticuerpo antiHA (cuyo epitopo se localiza en el extremo N-terminal de la ARRB2). Este último anticuerpo no reconoce el péptido de 31 kDa. Estas observaciones se explican porque cada anticuerpo reconoce epitopos distintos dentro de la proteína y, además, sugieren la existencia de un fenómeno de degradación parcial de ARRB2 ubiquitinada que conduciría a un conjunto de especies poliubiquitinadas de ARRB2 de diferente tamaño.

Este fenómeno, junto con el hecho de que solamente ARRB2, pero no ARRB1, participe en el proceso de internalización del MC1R activado y el papel que la ubiquitinación de ARRBs parece jugar en el proceso de internalización de otros GPCRs, nos condujo a abordar la localización de las posibles dianas de ubiquitinación y proteólisis de la ARRB2 humana.

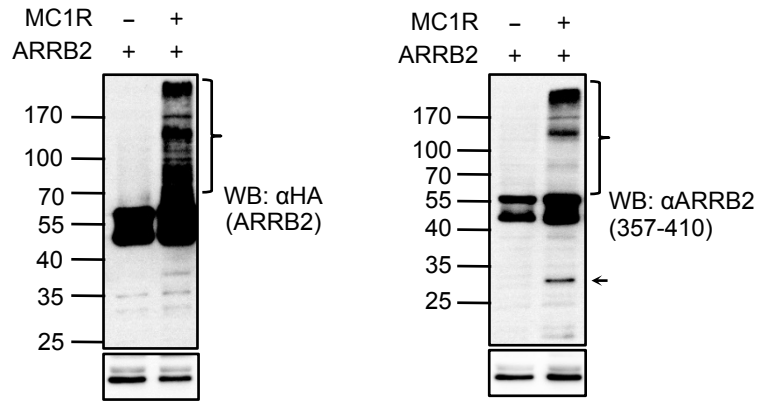
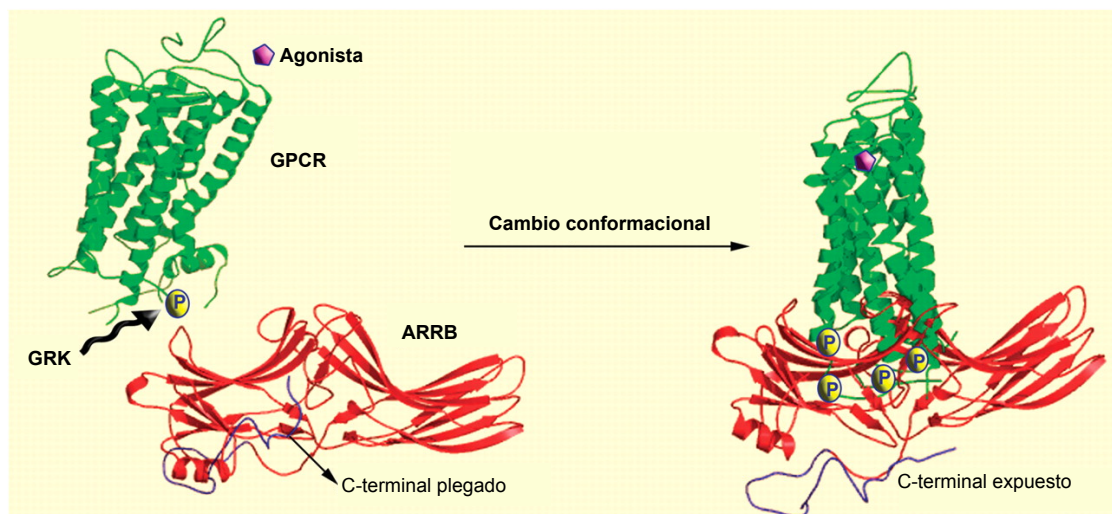


Figura 8. Comparación del perfil electroforético obtenido con dos anticuerpos distintos que reconocen ARRB2, a partir de extractos de células HEK 293T transfectadas con ARRB2 y MC1R y analizadas mediante transferencia Western. En el panel de la izquierda se usa un anticuerpo antiHA contra el extremo N-terminal. En el panel de la derecha se usa un anticuerpo específico que reconoce el extremo C-terminal de ARRB2, y la flecha indica la posición del péptido de 31 kDa reconocido por este anticuerpo.

Como ya se comentó en la introducción de esta memoria, la ARRB2 que expresan los melanocitos es una proteína de 409 aminoácidos, que se organizan en 23 hojas β antiparalelas y una hélice α . Estas estructuras secundarias se agrupan a su vez formando dos dominios (N y C) que se encuentran unidos por una región muy flexible denominada región bisagra o “hinge”²¹. Esta estructura es muy importante en el proceso de activación de la ARRB2 (**esquema 2**) ya que, cuando esto ocurre, la región bisagra flexible permite que ambos dominios se muevan uno con respecto al otro y la ARRB2 pase a adoptar una conformación laxa que le va a permitir interactuar con diferentes proteínas efectoras encargadas de organizar respuestas complejas.



Esquema 2. Activación y cambio conformacional de ARRB. La unión al GPCR provoca un cambio conformacional en las ARRBs que permite su activación. El extremo C-terminal, que se encuentra plegado sobre el dominio N en estado basal, se libera tras unión al GPCR y permite la adopción de una conformación abierta que deja expuesto los dominios de unión a clatrina y AP2, localizados ambos en este extremo C-terminal.

Además, durante este proceso, la última hoja β , que se encontraba en estrecho contacto con el dominio N, se libera contribuyendo a la activación de la proteína (**esquema 2**).

Debido a la importancia que tienen los dos dominios de la ARRB2 en su estado de activación y como aproximación para caracterizar los residuos diana de la ubiquitinación, nos propusimos analizar si los procesos antes descritos de poliubiquitinación y proteólisis ocurrían de manera preferencial en alguno de los dos dominios de la molécula. Para ello construimos una serie de mutantes truncados de ARRB2 en los que, por mutagénesis dirigida (ver sección MATERIALES Y MÉTODOS), eliminamos parte de su secuencia, tanto por el extremo N como por el C terminal. Obtuvimos un mutante carente de los primeros 106 aminoácidos denominado INI-R107, y cuatro mutantes interrumpidos después de los residuos Arg286, Arg357, Thr382 y Arg393, que denominamos R286*, R357*, T382* y R393*, respectivamente (**Esquema 3**). Todas estas formas truncadas de ARRB2, con excepción de INI-107, presentan un epitopo 3xHA inmediatamente después de la metionina inicial, de modo que pueden ser reconocidas por el anticuerpo monoclonal antiHA.

Una vez contruidos, expresamos estos mutantes truncados junto al MC1R en células HEK 293T y analizamos el perfil electroforético que se obtiene con los anticuerpos antiHA y antiARRB2 (**Fig. 9A**). Los resultados mostraron que el perfil de bandas poliubiquitinadas que aparecía con antiARRB2 era al menos igual de intenso para los mutantes INI-R107, T382* y R393* que para la ARRB2 silvestre. Además, el doblete de menor Mr sí era detectado eficientemente y mostraba el Mr esperado, con una disminución respecto a ARRB2 nativa consistente con el tamaño de la deleción. Este anticuerpo, sin embargo, no reconocía ninguna forma derivada de los mutantes R286* y R357*. Esta ausencia de señal puede explicarse bien por una expresión muy poco eficiente de estas formas delecionadas, quizás como consecuencia de una pérdida de estabilidad de las proteínas truncadas, debido a que les falta gran parte de su secuencia proteica. Alternativamente, las formas delecionadas R286* y R357* podrían haber perdido la zona donde se localiza el epitopo que reconoce el anticuerpo antiARRB2. Para distinguir entre estas dos posibilidades analizamos las mismas muestras con el anticuerpo antiHA y

observamos que este anticuerpo sí que detectaba estos dos mutantes truncados (**Fig. 9A y 9B**). Esta observación nos permitió, por un lado, confirmar la correcta expresión de estos dos truncados y, por otro, situar el epitopo reconocido por el anticuerpo antiARRB2 entre los residuos Arg357 y Thr382. El análisis de las formas de elevado Mr nos mostró que los truncados R286* y R357*, a diferencia de la ARRB2 silvestre y de los truncados T382* y R393*, no son capaces de poliubiquitinarse, o al menos no lo hacen con tanta eficiencia. Estos datos sugieren que la poliubiquitinación de ARRB2 está teniendo lugar preferentemente en el dominio C-terminal de la proteína. Una explicación alternativa, basada en la posibilidad de que R286* y R357* hubieran perdido la capacidad de interactuar con MC1R, puede descartarse en base a resultados experimentales que se describirán más adelante.

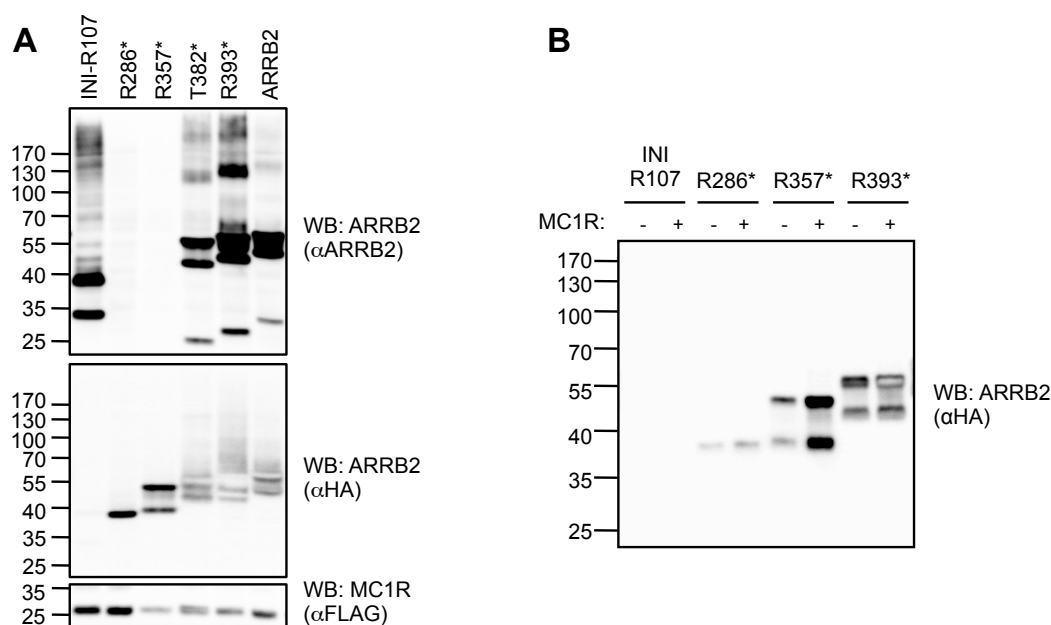
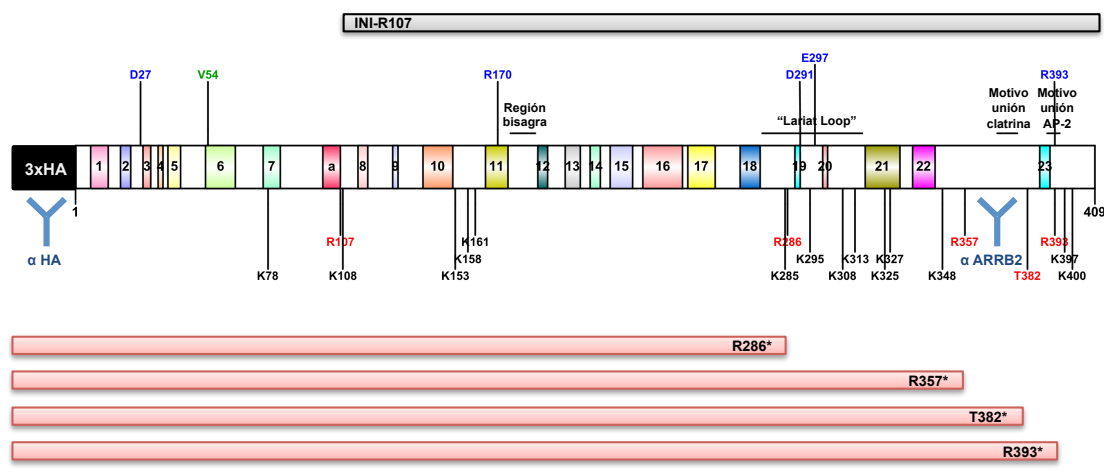


Figura 9. Localización del epitopo de ARRB2 reconocido por el anticuerpo monoclonal comercial antiARRB2 e identificación de la zona C-terminal como diana preferencial de ubiquitinación. **(A)** Por transfección en células HEK 293T de una serie de mutantes truncados de ARRB2 en presencia de MC1R, seguida de solubilización y transferencia Western, se detectó la ARRB2 silvestre y sus formas truncadas y ubiquitinadas con dos anticuerpos distintos: antiHA y antiARRB2. **(B)** Mismo experimento que en (A), disminuyendo la cantidad de proteína total para no saturar la imagen obtenida con el anticuerpo antiHA.

La expresión de estos mutantes truncados nos da información adicional acerca del doblete que se observa cuando expresamos ARRB2. En un primer momento, nos planteamos la posibilidad de que la banda inferior del doblete fuera producto de una proteólisis específica de ARRB2. Sin embargo, el hecho de que este doblete de bandas aparezca también con los distintos mutante truncados y que,

las dos bandas que lo forman sean reconocidas por antiHA y antiARRB2 nos indica que se trata de formas que conservan los extremos N y C terminales. Lo que sí podemos asociar a una proteólisis específica de ARRB2 es un pequeño fragmento de 31 kDa que se reconoce solo con el anticuerpo antiARRB2 y se debe corresponder por tanto a una parte C-terminal de la proteína. Analizaremos la aparición de este fragmento de proteólisis, así como la relación entre las dos bandas del doblete, en apartados posteriores.

Por otro lado, con el fin de facilitar la visualización de las regiones que se conservan en los distintos mutantes truncados y, por tanto, la interpretación de los resultados, representamos en el **esquema 3** un modelo lineal de ARRB2, en el que destacamos los motivos más importantes de su secuencia, así como la localización y extensión de sus estructuras secundarias. Podemos ver cómo las 23 hojas β se distribuyen a lo largo de toda la longitud de la molécula y también la localización exacta del “lariat loop”, la región bisagra y los motivos de unión a clatrina y adaptina. Como podemos ver en el esquema 3, los truncados R286* y R357* han perdido los dominios de unión a clatrina y AP-2. También se indica la zona de unión de los dos anticuerpos utilizados y los residuos que definen los extremos de los mutantes truncados que hemos resaltado en gris (truncado carente del extremo N-terminal) y rojo (truncados carentes del C-terminal).



Esquema 3. Representación lineal de la secuencia de ARRB2. Las distintas hojas β se han numerado del 1 al 23 y resaltado en diferentes colores. La hélice α , localizada entre las hebras 7 y 8, se ha denominado como “a” y se han localizado la posición del “lariat loop”, la región bisagra y los dominios de unión a clatrina y adaptina. Los aminoácidos implicados en la formación del núcleo polar se destacan en azul y los límites de los mutantes truncados en rojo. Los residuos de lisina mutados se han marcado en negro. Se representa además la zona de reconocimiento de los anticuerpo antiHA y antiARRB2.

Puesto que sabemos que la poliubiquitinación de ARRB2 es dependiente de MC1R, nos cuestionamos si la falta de ubiquitinación de estos truncados se debía a una pérdida de la capacidad de interactuar físicamente con el MC1R. Para estudiar esta posibilidad, diseñamos una serie de experimentos destinados a determinar tanto su interacción con el MC1R como su capacidad de inducir la desensibilización del receptor.

Mediante ensayos de coimmunoprecipitación en extractos de células HEK 293T transfectadas analizamos la capacidad de los mutantes truncados de interactuar con el MC1R en situación basal. Para ello, transfectamos las distintas construcciones truncadas de ARRB2 con el receptor y, tras privar a las células de suero y factores de crecimiento durante 3h, solubilizamos los extractos e inmunoprecipitamos el MC1R con un anticuerpo antiFLAG (**Fig. 10A**).

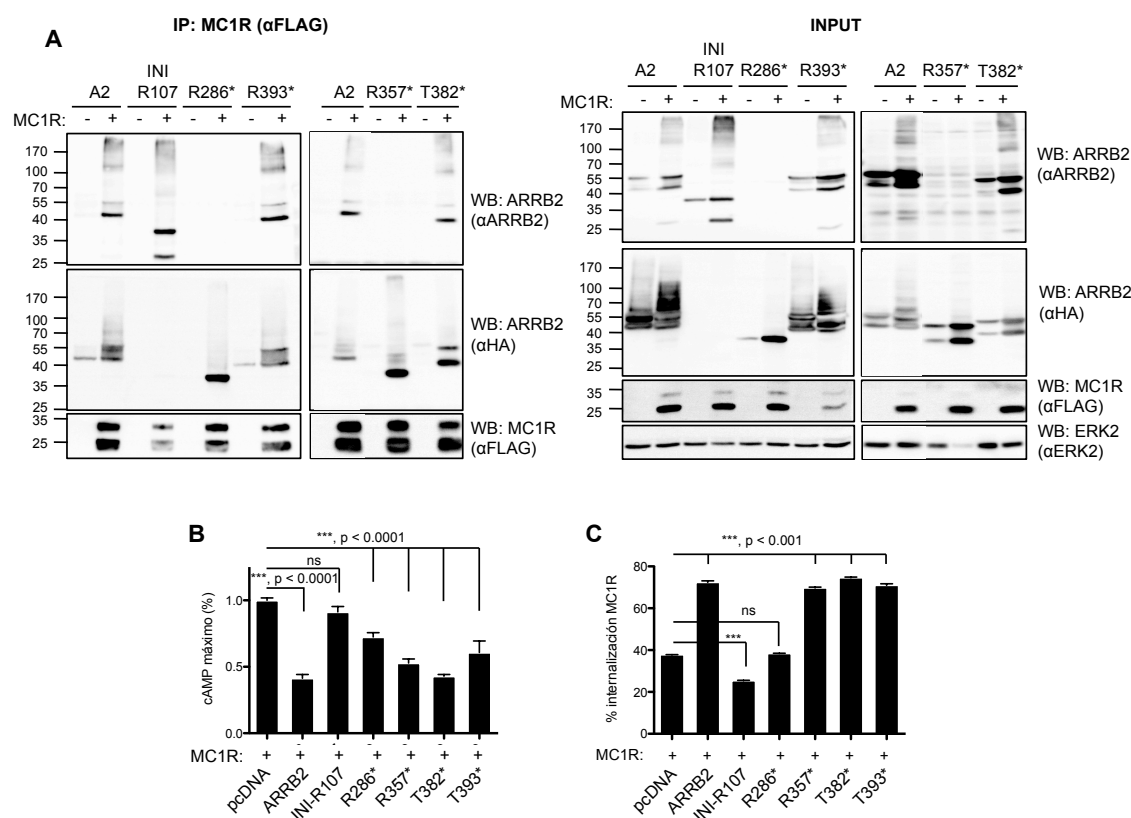


Figura 10. Capacidad de los mutantes truncados de ARRB2 de interactuar con el MC1R y modular su desensibilización y posterior internalización. (A) Células HEK 293T fueron transfectadas con ARRB2 silvestre marcada con HA en N-terminal o los distintos mutantes truncados (también marcados con HA, excepto INI-R107) en presencia y ausencia de FLAG-MC1R. Tras solubilización, se inmunoprecipitó el MC1R con un anticuerpo antiFLAG y se analizó la presencia de las distintas formas de ARRB2 coimmunoprecipitadas con los anticuerpos antiHA y antiARRB2 (panel izquierdo). El anticuerpo antiFLAG se utilizó para comprobar la correcta inmunoprecipitación del MC1R. El input correspondiente se muestra en el panel derecho. (B) Determinación del nivel de AMPc intracelular en células HEK 293T transfectadas con las mismas construcciones que en (A). Tras ser mantenidas al

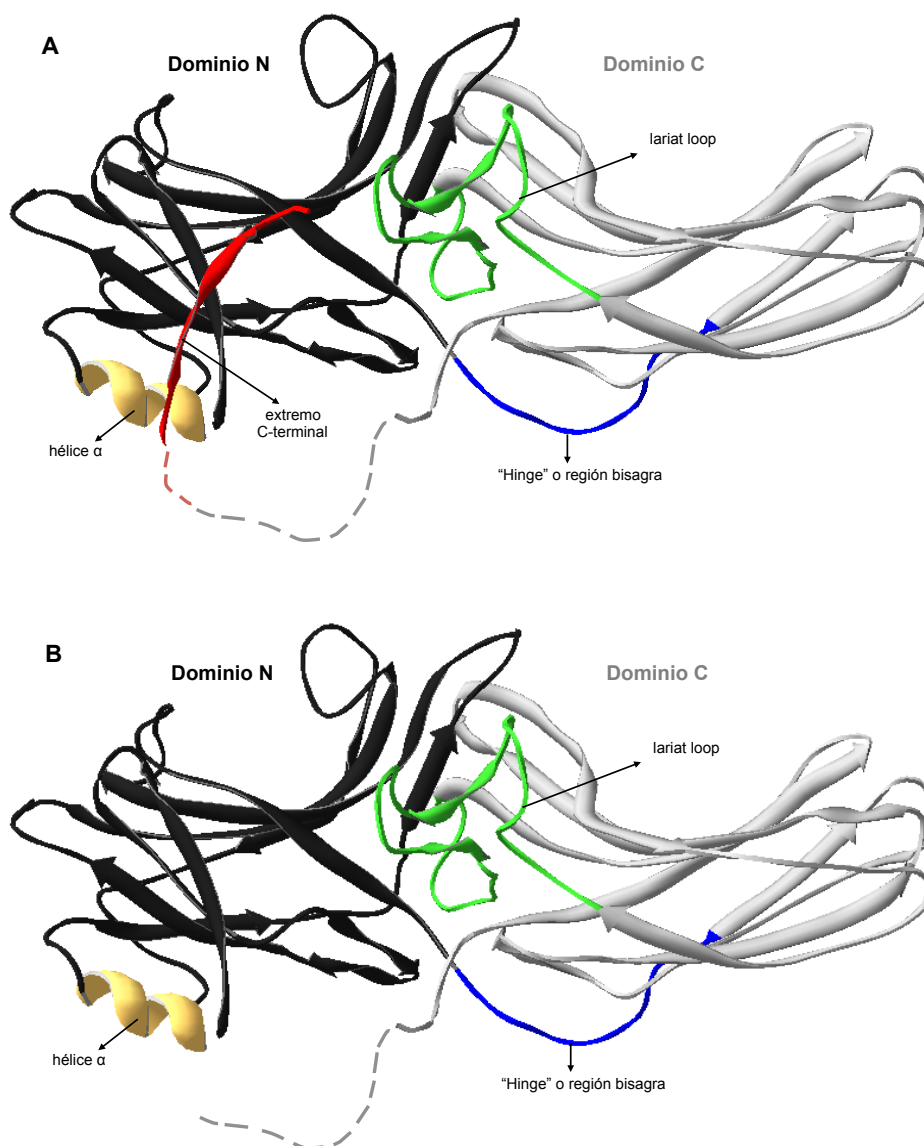
menos 3 horas en ausencia de suero bovino fetal, las células se estimularon con NDP-MSH 10^{-7} M durante 30 minutos y se lisaron con HCl 0,1 N para determinar la concentración de AMPc con un kit comercial. (C) Determinación del índice de internalización de MC1R en células transfectadas como en (B). La cantidad de ligando unido al receptor e internalizado se determinó mediante lavados ácidos y el índice de internalización se calculó como el porcentaje de agonista internalizado respecto del total unido.

El análisis con antiHA y antiARRB2 de los inmunoprecipitados demostró que todos los mutantes coinmunoprecipitaban con MC1R de forma comparable a la ARRB2 silvestre, descartando por tanto que la pérdida de parte de la secuencia afecte a la capacidad de interacción de R286* o R357* con el receptor. Una vez confirmada la correcta interacción de todos los mutantes truncados con el MC1R, determinamos la capacidad de cada uno de ellos de inducir su desensibilización y posterior internalización. Para ello, volvimos a coexpresar los mutantes con MC1R y medimos en sendos ensayos el aumento de AMPc intracelular derivado de la activación del MC1R (**Fig. 10B**) y el índice de internalización del mismo (**Fig. 10C**).

El análisis de la capacidad que tienen los mutantes truncados para desacoplar al MC1R de la vía de señalización del AMP demuestra que existe una aparente pérdida progresiva de esta capacidad conforme eliminamos una extensión cada vez mayor de secuencia en el extremo C-terminal. La representación tridimensional de los mutantes truncados R393* (**Fig. 11A**), T382* y R357* (**Fig. 11B**) nos muestra que estas formas han perdido la última hoja β , aunque aún mantienen la zona de unión al MC1R así como la mayor parte de su secuencia. El residuo Arg286 se localiza en el "ariat loop" de manera que la proteína truncada R286* ha perdido las tres últimas hojas β así como tres de los residuos que forman el núcleo polar (muy importante en el proceso de activación de la ARRB2) (**Fig. 11C**). La pérdida de todos estos determinantes puede ser la causa de la actividad disminuida de esta forma truncada. Se conserva, sin embargo, la zona de unión al MC1R, ya que existe una correcta interacción entre las dos proteínas como muestran los ensayos de coinmunoprecipitación. El mutante INI-R107 (**Fig. 11D**) pierde los primeros 106 aminoácidos que corresponden a las primeras 7 hojas β y la única hélice α de la ARRB2. Esta hélice está descrita como un punto de anclaje adicional y reversible a la membrana plasmática. Debido a esto, es posible que INI-R107 no sea capaz de desplazar de forma eficiente la unión de la proteína G al MC1R y, por tanto, no induzca la desensibilización ni la internalización del receptor. Al igual que el resto de mutantes truncados, mantiene gran parte de la estructura denominada "silla de montar", encargada de unir los GPCRs, por lo que la interacción con MC1R no se ve afectada ²². Sin embargo, cuando analizamos su efecto sobre el índice de internalización del MC1R, vemos que este disminuye de

manera significativa, incluso por debajo de los niveles observados cuando no hay sobreexpresión de ARRB2, sugiriendo que este mutante truncado se está comportando como un dominante negativo de internalización, desplazando incluso la unión de la ARRB2 endógena.

Un aspecto reseñable de la estructura y función de estos mutantes truncados es el hecho de que algunos de ellos, como R382*, que ha perdido el dominio de unión a AP-2, o R357*, que, además del dominio de unión a AP2, ha perdido también el de unión a clatrina, sean capaces de inducir la internalización del MC1R con un índice comparable al de ARRB2 silvestre (**Fig. 10C**). Estos datos sugieren que la internalización del MC1R inducida por ARRB2 sería un proceso independiente de clatrina y AP-2. Este tipo de internalización no es muy frecuente, pero se ha descrito previamente por otros investigadores como explicación para la internalización constitutiva independiente de agonista de algunos GPCRs como el β_2AR ²³.



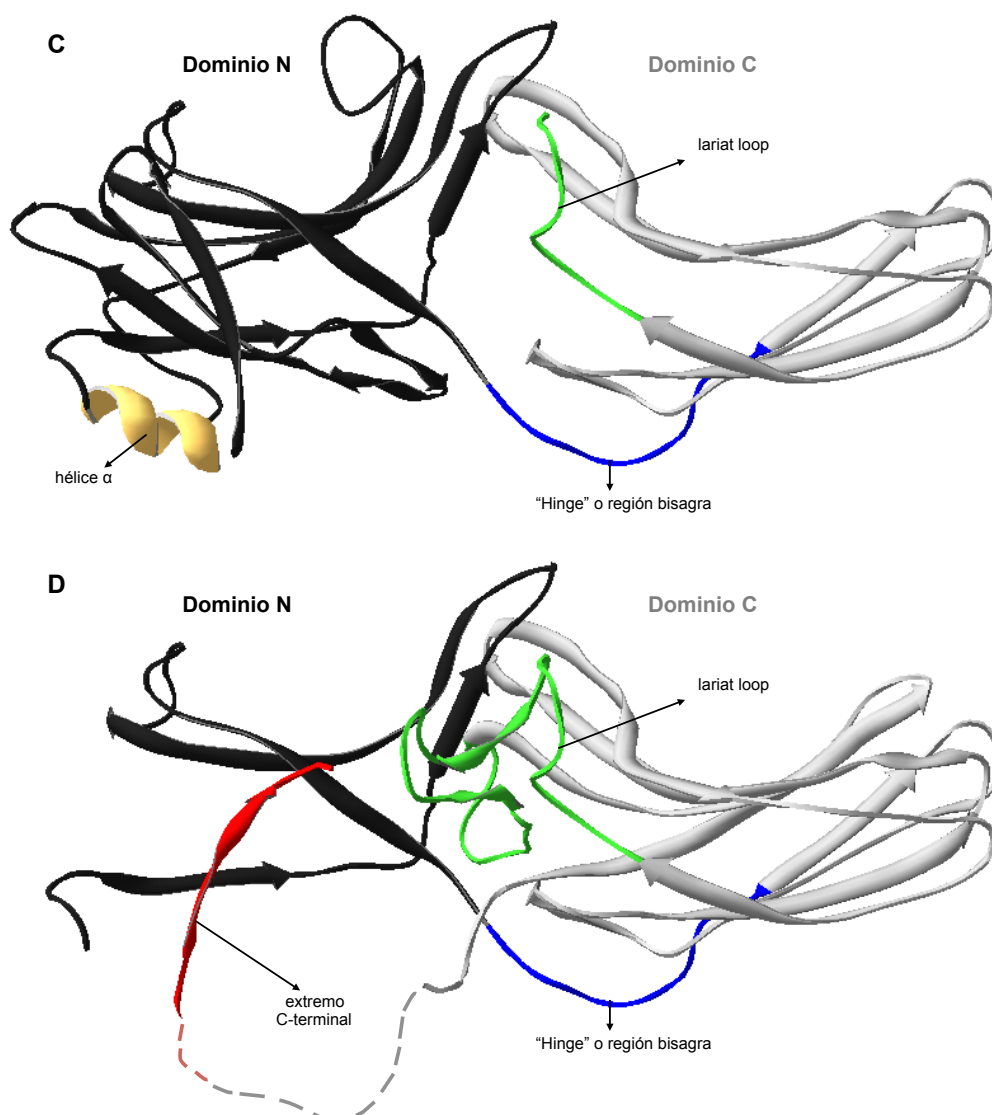


Figura 11. Representación tridimensional de la estructura de los mutantes truncados de ARR2B2 utilizando como modelo la secuencia de la ARR2B2 bovina y el programa Swiss Pdbviewer (entrada PDB 3P2D). **(A)** Mutante truncado R393*. Conserva la última hoja β y ha perdido el extremo C-terminal flexible. **(B)** mutantes R357* y T382*. Han perdido tanto la última hoja β como el extremo C-terminal flexible. **(C)** Mutante R286*. Se corta a mitad del "lariat loop". Pierde las últimas 5 hojas β . **(D)** Mutante INI-R107. Carece del extremo N-terminal. Ha perdido la hélice α y las primeras 7 hojas β .

2.4. Caracterización de los residuos implicados en la poliubiquitinación y proteólisis de ARR2B2.

Los datos expuestos en el apartado anterior sugieren que la deficiente ubiquitinación observada en alguna de las formas de ARR2B2 truncadas no se explica por su incapacidad de interactuar con el MC1R. Por tanto, nuestros resultados indican que la poliubiquitinación de ARR2B2 está teniendo lugar

preferentemente en el dominio C-terminal de la proteína. También hemos encontrado pruebas de la existencia de un fenómeno de proteólisis de ARRB2, inducido por MC1R, que da lugar a formas parcialmente degradadas de ARRB2 poliubiquitinada que han perdido el extremo C-terminal. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue tratar de identificar los residuos implicados en estos procesos de poliubiquitinación y proteólisis.

La ubiquitinación de las proteínas es una modificación postraduccional que tiene lugar en residuos de lisina. Previamente, otros grupos de investigación han mapeado estas dianas para las isoformas de ARRB2 bovina y de rata y han localizado distintos residuos en función de qué ortólogo se trate (a pesar de existir una gran homología entre ellas) y de qué GPCR la reclute. Así, ARRB2 de rata se ubiquitina mayoritariamente en los residuos contiguos Lys11 y Lys12 cuando se coexpresa con AT1_AR. Esta ubiquitinación es requerida para la formación de los complejos estables AT1_AR-ARRB2 que provocan la endocitosis de este receptor ²⁴. Por otro lado, V2R parece inducir la ubiquitinación de ARRB2 de rata en los residuos Lys18, Lys107, Lys108, Lys207 y Lys296 ⁶. Teniendo en cuenta esta información y los mutantes expresados hasta ahora, es posible que la poliubiquitinación de ARRB2 esté teniendo lugar en más de un residuo de lisina, localizado, al menos uno de ellos, en una posición posterior a Arg286.

Con el fin de identificar estos residuos susceptibles de unir ubiquitina y utilizando la información proporcionada por la base de datos online CPLM (Compendium of Protein Lysine Modification) y el programa de predicción "online" CKSAAP_UbSITE, construimos una batería de mutantes de ARRB2 en los que mutamos distintos residuos de lisina a arginina perdiendo así la capacidad de unir ubiquitina en posiciones determinadas. Elegimos los residuos Lys293, Lys295, Lys308, Lys397 y Lys400 por tener una elevada probabilidad de ser ubiquitinados según las predicciones teóricas proporcionadas por los programas arriba mencionados. Además, también mutamos las lisinas Lys313, Lys325, Lys327 y Lys348, completando así la totalidad de los residuos de lisina presentes en el dominio C de ARRB2. Dado que consideramos muy posible que la ubiquitinación no se restrinja a un único residuo de ARRB2, construimos los mutantes dobles K293/295R, K325/327R y K397/400R, y el cuádruple mutante K293/295/397/400R (denominado QM).

Una vez obtenidos estos mutantes puntuales, los coexpresamos con MC1R y analizamos su patrón de poliubiquitinación. El análisis de los resultados mostró que la poliubiquitinación de ARRB2 mediada por MC1R no se ve afectada en los mutantes K308R, K313R, K348R, K397R, K293/295 y K325/327R. Por el contrario,

sí se observa una fuerte reducción de las especies poliubiquitinadas de elevado Mr en los mutantes K400R y K397/400R (**Fig. 12A**). Lo mismo ocurre cuando analizamos el patrón de poliubiquitinación del mutante cuádruple en las mismas condiciones anteriores (**Fig. 12B**). En conjunto, todos estos resultados señalan al residuo Lys400 como probable diana principal de ubiquitinación de ARRB2. Sin embargo, tal y como habíamos planteado al principio, podrían existir otras dianas de poliubiquitinación secundarias, ya que no parecen eliminarse completamente las formas de Mr elevado.

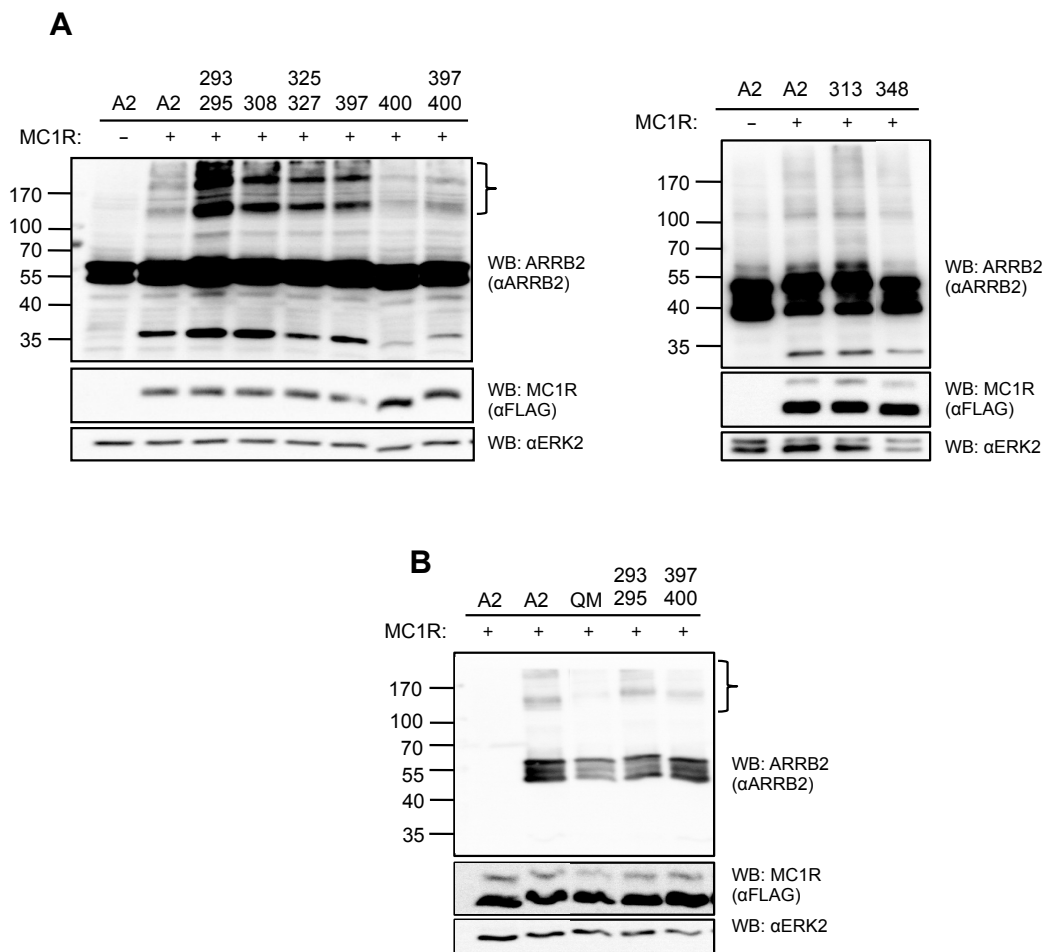


Figura 12. Ubiquitinación mediada por MC1R de diversos mutantes de Lys de ARRB2. (A) Se han mutado todos los residuos de lisina localizados en dominio C de ARRB2 y se han coexpresado junto con MC1R para analizar la aparición de bandas de poliubiquitinación de ARRB2 con un anticuerpo específico. Se usó un anticuerpo antiFLAG para detectar MC1R y antiERK2 como control de carga. (B) Células HEK 293T transfectadas con el mutante cuádruple de lisina K293/R295/K397/K400R y los dos mutantes dobles K293/K295R y K397/K400R, en presencia de MC1R. Análisis de la expresión de bandas de poliubiquitinación igual que en (A).

Finalmente, nos centramos en la caracterización del proceso de proteólisis de ARRB2 poliubiquitinada que da lugar a la aparición del péptido de 31 kDa en presencia de MC1R.

2.5. MC1R media la proteólisis específica de ARRB2 y no de ARRB1.

Como hemos comentado previamente, el MC1R induce la poliubiquitinación de ARRB2 que da lugar a diferentes patrones tras transferencia Western según que se emplee para su revelado un anticuerpo dirigido contra el extremo N- o contra el C-terminal. Este reconocimiento específico por los anticuerpos sugiere que se trata de productos de proteólisis de ARRB2. Así, destaca la formación de un péptido de 31 kDa que solo es reconocido por el anticuerpo antiARRB2, indicando que ha perdido el extremo N-terminal. Por otro lado, tenemos una multitud de formas intermedias con un Mr comprendido entre 70 y 100 kDa que son reconocidas preferencialmente por antiHA, que corresponderían a formas poliubiquitinadas de ARRB2 que han perdido el extremo C-terminal.

Con el fin de obtener una información más detallada de estos procesos de proteólisis de la ARRB2 como consecuencia de su interacción con MC1R, realizamos una predicción teórica de posibles puntos de corte en la proteína con el programa online ProP (ProPeptide cleavage site prediction). Este programa analiza la secuencia en busca de motivos dibásicos Arg-Lys que puedan ser diana de proteasas. El resultado de este análisis nos proporcionó un motivo con alta probabilidad de ser diana de proteasas en posición ²⁸⁵KR²⁸⁶ y otro con menor probabilidad en posición ¹⁰⁶KR¹⁰⁷. Sabemos por experimentos anteriores que cuando expresamos el mutante INI-R107 en presencia de MC1R y analizamos el resultado con antiARRB2 (**Fig. 9A y 10A**) aparecen dos bandas mayoritarias en su perfil electroforético. La de mayor tamaño corresponde a la forma truncada derivada de ARRB2, mientras que la de menor tamaño coincide con el péptido de 31 kDa. Esto sugiere que la proteólisis tiene lugar después del residuo Arg107. Además, el hecho de que la intensidad de este fragmento de 31 kDa sea mayor en el mutante truncado INI-R107 que en la ARRB2 silvestre nos hace pensar que la pérdida de las primeras 6 hojas β y la hélice α favorece de alguna manera la accesibilidad a esta diana de proteólisis.

Por otro lado, los datos obtenidos con los mutantes truncados T382* y R393* (**Fig. 9A y 10A**) que tienen delecionado parte de su extremo C-terminal, en donde observamos que el péptido tiene menos de 31 kDa, sugieren que el extremo C-terminal se mantiene intacto durante esta proteólisis. Para confirmarlo, construimos

una nueva forma ARRB2 silvestre marcada con el epitopo HA en C-terminal. A continuación transfectamos esta forma de ARRB2, a la que denominamos ARRB2-HA(C), en presencia de MC1R y analizamos la aparición del péptido de 31 kDa con un anticuerpo antiHA (**Fig. 13**). Los resultados mostraron que en células transfectadas con MC1R y ARRB2-HA(C) aparece un péptido equivalente al fragmento de 31 kDa aunque con un tamaño ligeramente mayor debido a la presencia del epitopo HA (flecha roja). Esto confirma que la proteólisis de ARRB2 no afecta al extremo C-terminal. En este mismo ensayo observamos, además, la aparición de un fragmento de aproximadamente 20 kDa (flecha verde) en células que expresan la forma de ARRB2 marcada con el epitopo 3xHA en N-terminal y que podría ser el fragmento correspondiente al dominio N de la molécula (el fragmento complementario). Todas las evidencias apoyan, por tanto, nuestra hipótesis de que la ARRB2 sufre un proceso de proteólisis como consecuencia de su interacción con el MC1R y que dicha proteólisis tiene lugar en algún residuo localizado en posición C-terminal con respecto a Arg107.

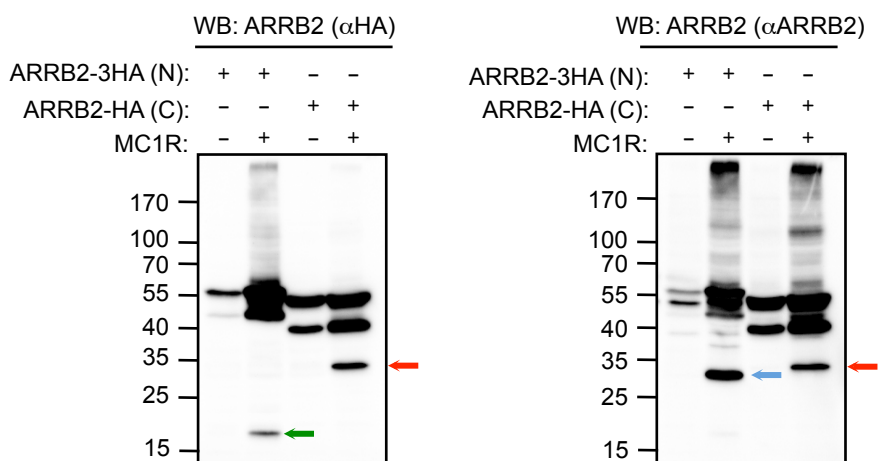


Figura 13. El péptido de 31 kDa mantiene intacto el extremo C-terminal de ARRB2. Células HEK 293T transfectadas con una construcción de ARRB2 con el epitopo HA en N-terminal o en C-terminal, en presencia y ausencia de MC1R. La expresión de ARRB2 y del péptido de 31 kDa derivado de ella, se analizó con un anticuerpo que reconoce el epitopo HA (panel izquierdo) y con un anticuerpo específico antiARRB2 (panel derecho). La flecha azul señala el péptido derivado de la construcción de ARRB2 marcada con HA en N-terminal y la flecha roja el péptido derivado de ARRB2 marcada con HA en C-terminal. La flecha verde muestra el fragmento complementario de este péptido.

Además, teniendo en cuenta la relación lineal del número de aminoácidos y el peso molecular de la ARRB2, estimamos que el péptido de 31 kDa podría corresponder a un fragmento originado por un corte proteolítico en el entorno de la posición 170 o uno derivado de ARRB2 monoubiquitinada o diubiquitinada proteolizado en un residuo posterior a 170, en el entorno de la posición 240. Por

esta razón y con el fin de caracterizar el punto de corte que da lugar a la aparición del péptido, construimos una serie de mutantes puntuales en donde modificamos, mediante mutagénesis dirigida, los aminoácidos predichos por el programa PopP como motivos de alta probabilidad Arg107 (R107N) y Arg286 (R286N). Además, también mutamos el residuo Arg170 (R170N) y las lisinas 78 (K78R), 108 (K108R), 153 (K153Q), 158 (K158Q), 161 (K161Q) y 285 (K285Q). Una vez obtenidos estos mutantes puntuales, los expresamos en presencia de MC1R y analizamos, mediante Western blot y el uso de antiARRB2, la aparición del fragmento de 31 kDa (**Fig. 14**). Los resultados muestran que ni la mutación de los residuos con elevada probabilidad de ser dianas de proteólisis según el programa ProP (panel izquierdo), ni la de Arg170 (panel medio), ni tampoco la de los residuos de lisina localizados en las posiciones 78, 108, 153, 158, 161 y 285 (panel derecho) modifica la aparición del fragmento de 31 kDa. Por otro lado, el hecho de que ninguno de los mutantes puntuales de las lisinas localizadas a partir de la posición 240 modifique el tamaño del péptido (**Fig. 12A**) no apoya la idea de que este fragmento se corresponda con un péptido proteolizado en el entorno de 240 y unido a una molécula de ubiquitina. Por tanto, la hipótesis más probable es que el péptido de 31 kDa se genere por un corte proteolítico en el entorno de la posición 170, pero distinto de Arg170, que aún no hemos logrado caracterizar.

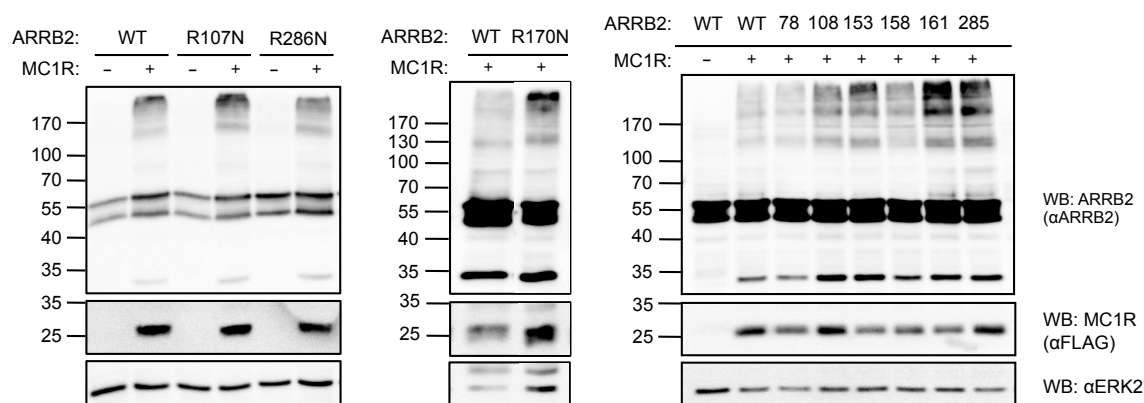


Figura 14. Caracterización del sitio de corte responsable de la aparición del péptido de 31 kDa. Células HEK 293T transfectadas con MC1R y diversos mutantes puntuales de ARRB2 en residuos con potencialidad para ser dianas de proteólisis. Se utilizó un anticuerpo específico contra ARRB2 y un anticuerpo antiFLAG para detectar MC1R y antiERK2 como control de carga.

2.6. Relación entre las bandas no poliubiquitinadas de ARRB2

En todos los experimentos de expresión realizados hasta el momento hemos podido observar que ARRB2 migra como un doblete de bandas de unos 40 y 52 kDa, independientemente de que se coexpresa con MC1R o no. La relación existente entre estas dos bandas aún no está clara, por lo que nos propusimos profundizar en ella. Existen dos mecanismos que pueden explicar la existencia de estas dos especies de distinto Mr: por un lado, la existencia de un corte proteolítico en la ARRB2 nativa, en cuyo caso la banda superior sería la nativa y la inferior una forma parcialmente degradada; y, por otro lado, la existencia de una modificación postraduccional que aumentaría el tamaño de la banda inferior, que correspondería a la banda nativa.

La primera hipótesis fue descartada desde el principio, ya que al analizar la expresión de ARRB2 con los anticuerpos antiHA y antiARRB2 (dirigidos contra los extremos N y C-terminal respectivamente) ambos fueron capaces de reconocer las dos bandas del doblete (**Fig. 8**). Esto nos confirmó que mantenían sus extremos N y C-terminal, de modo que la banda de 40 kDa no podría tratarse de una forma proteolizada de la de 52 kDa. Por otro lado, el análisis de los mutantes truncados T382* y R393* (**Fig. 9A y 10A**) mostró que también migran como un doblete, aunque de menor tamaño debido a la pérdida de aminoácidos por su extremo C-terminal. El hecho de que este doblete se observe también con los dos anticuerpos descarta que se trate de una proteólisis y nos llevó a desterrar completamente esta posibilidad.

La otra explicación para la aparición del doblete es la existencia de una modificación postraduccional en ARRB2. Las modificaciones postraduccionales más frecuentes que pueden sufrir las ARRBs incluyen la ubiquitinación, la sumoilación, la fosforilación y la S-nitrosilación. Existen datos en la bibliografía que confirman que ARRB2 posee una diana de fosforilación primaria en Thr382 ²⁵ y, al menos la isoforma de rata, una diana secundaria en la Ser361 (equivalente a Ser360 humana) ²⁶. También se han descrito procesos de S-nitrosilación de ARRB2 en el último residuo de su secuencia Cys409 ²⁷. Sin embargo, estas dos modificaciones han sido descartadas como responsables de la formación de la banda de 52 kDa, ya que la adición de uno o dos fosfatos o de un grupo nitrosilo no es suficiente para explicar el cambio de aproximadamente 10 kDa existente entre ambas bandas. Además, todos nuestros experimentos se han llevado a cabo en ausencia de inhibidores de fosfatasas y, tratamientos con fosfatasa alcalina a 37° C durante 1h no produjeron ningún cambio en el perfil electroforético de ARRB2 (resultados no mostrados).

Por esta razón, nos centramos en los procesos de SUMOilación y ubiquitinación, puesto que la adición de una molécula de SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier, 95 aminoácidos) o una o dos moléculas de ubiquitina (76 aminoácidos) sí explicaría la diferencia en tamaño entre las bandas del doblete. Tanto la SUMOilación como la ubiquitinación son modificaciones postraduccionales que afectan a residuos de lisina. La información proporcionada por la base de datos online CPLM propone los residuos Lys293, Lys295, Lys397 y Lys400 como dianas de SUMOilación. Esto se confirmó con el programa de predicción SUMOplot que destaca como dianas de elevada probabilidad las lisinas K295, K308 y K400. Sin embargo, experimentos realizados con mutantes puntuales en donde hemos sustituido estos residuos de lisina por arginina no producen ninguna alteración en el patrón de expresión del doblete (**Fig. 12A**). Además, experimentos previos realizados sobreexpresando SUMO1, SUMO2 y SUMO3 en células HEK 293T (resultados no mostrados), tampoco proporcionaron información relevante que justificara la existencia de esta modificación postraduccional. Por todo esto, descartamos la posibilidad de que se estuviera produciendo una SUMOilación y nos centramos en la ubiquitinación.

Durante el transcurso de esta memoria hemos aportado indicios suficientes que apoyan un fenómeno de poliubiquitinación de ARRB2 dependiente de MC1R. En este punto, proponemos la existencia de un fenómeno de mono o diubiquitinación de ARRB2, responsable de la aparición de una banda de 52 kDa e independiente de la presencia de MC1R, puesto que el doblete aparece incluso en ausencia de este receptor. Hasta el momento hemos construido mutantes puntuales de todos los residuos de lisina localizados en el dominio C de ARRB2 (**Fig. 12A**) y ninguno de ellos hace desaparecer la banda de 52 kDa. Esto nos lleva a pensar que la mono o diubiquitinación de ARRB2, a diferencia de la poliubiquitinación, tiene lugar en el dominio N de la proteína. En este dominio existen 23 residuos de lisina de los cuales hemos mutado los localizados en las posiciones 78, 108, 153, 158, 161 y 285. Ninguno de estos mutantes puntuales abole la aparición del doblete, por lo que también fueron descartados como dianas de mono o diubiquitinación (**Fig. 14, panel derecho**). El residuo o los residuos susceptibles de sufrir ubiquitinación podrían ser cualquiera de los 17 restantes.

Experimentos de inmunoprecipitación realizados durante este capítulo muestran que MC1R interacciona mejor con la banda inferior de la ARRB2 que con la superior (**Fig. 10A**). Esto nos llevó a proponer un modelo según el cual la ARRB2 mono o diubiquitinada se encontraría en la célula en estado inactivo pero capaz de interaccionar con baja afinidad con el receptor. La unión de alta afinidad al MC1R

permitiría la entrada de una deubiquitinasa encargada de eliminar los residuos de ubiquitina unidos en el dominio N de ARRB2 y esto en última instancia provocaría la activación total de ARRB2 y la desensibilización e internalización del MC1R.

En relación con este modelo merece la pena comentar el comportamiento de un mutante que, basándonos en resultados de otros investigadores²⁸, construimos para obtener un dominante negativo de la internalización. Este mutante consiste en la sustitución del residuo Val54 Asp (V54D). Una vez construido, caracterizamos su correcta expresión en células HEK 293T y su funcionalidad midiendo por una parte su capacidad para desacoplar el MC1R de la vía del AMPc y por otra su efecto sobre la internalización del receptor. De acuerdo a lo ya publicado, este mutante es incapaz tanto de inducir la internalización del receptor (**Fig. 15A**) como de desplazar la unión de la proteína Gs al MC1R (**Fig. 15B**). Además, cuando observamos su perfil electroforético llama la atención que migra como una sola banda mayoritaria que se corresponde con la banda de mayor Mr del doblete (**Fig. 15C**).

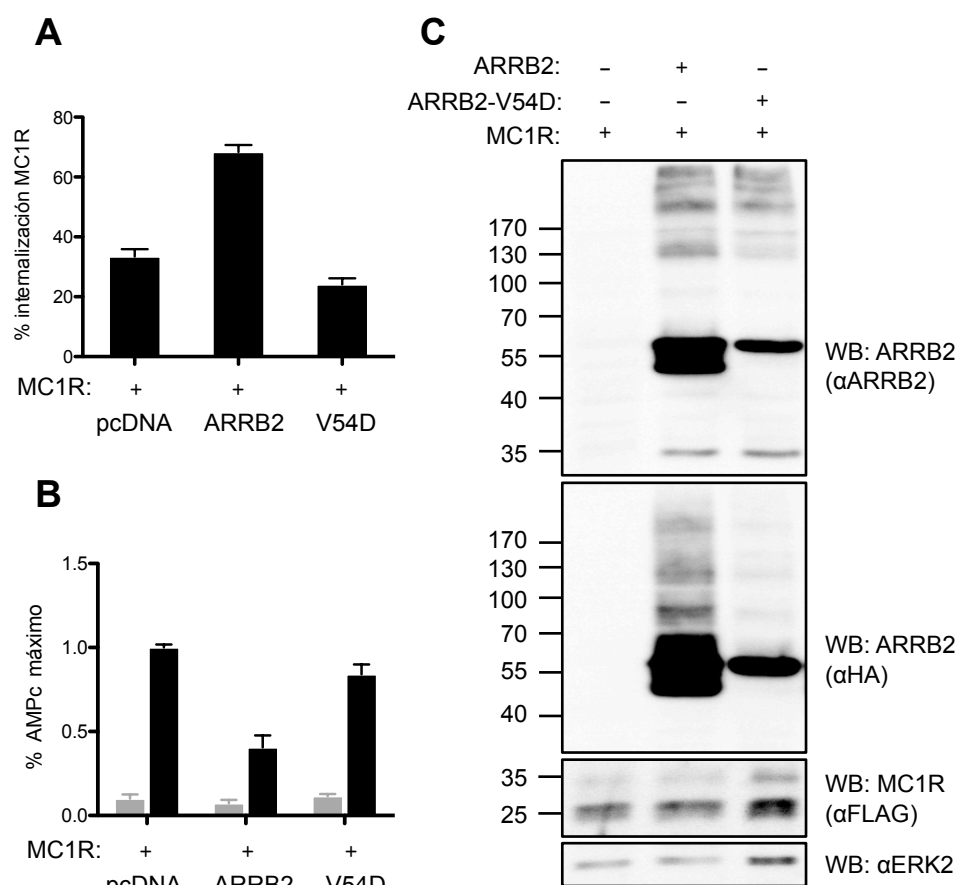


Figura 15. Caracterización funcional del mutante de ARRB2 V54D. (A) Efecto de la expresión del mutante V54D sobre la internalización de MC1R. Células HEK 293T se incubaron 90 minutos con [¹²⁵I]NDP-MSH (10⁻⁹ M) a 37° C. Mediante lavado ácido se separó el ligando unido extracelularmente del internalizado en complejos hormona receptor. Los resultados se muestran como

índice de internalización de MC1R (porcentaje de agonista internalizado respecto del total unido). **(B)** Células HEK 293T transfectadas como en (A) se mantienen al menos 3 horas creciendo en medio mínimo. Tras este tiempo se estimulan con NDP-MSH (10^{-7} M) durante 30 minutos a 37° C (barras negras). Los controles se mantienen sin estimular (barras grises). A continuación, se lisan las células con HCl 0,1N y se mide el nivel de AMPc intracelular mediante un kit comercial. **(C)** Células HEK 293T transfectadas con ARRB2 silvestre o el mutante V54D (marcados con HA en N-terminal) en presencia de MC1R. Análisis de la expresión mediante transferencia Western y el uso dos anticuerpos, antiHA y antiARRB2. La expresión de MC1R se comprobó con un anticuerpo antiFLAG. Se utilizó antiERK2 como control de carga.

Este mutante V54D se comporta, por tanto, de forma muy parecida a como lo hace la ARRB1 y apoya el modelo propuesto de que la banda superior del doblete de ARRB2 es una forma funcionalmente inactiva. Una explicación para el comportamiento de V54D puede ser que la sustitución de un residuo eléctricamente neutro, como valina, por uno con carga negativa impida de alguna manera el reconocimiento por una enzima deubiquitinasa, de manera que aunque la ARRB2 mutada es capaz de unirse a MC1R, la molécula no se deubiquitina y no termina de activarse. Hasta el momento, no hemos logrado localizar el residuo o los residuos de lisina que estarían implicados en esta posible mono o diubiquitinación. Resultados de otros investigadores han demostrado que los residuos Lys11 y Lys12 de ARRB2 de rata se ubiquitinan en presencia de AT1_AR²⁴. Si observamos la estructura tridimensional de ARRB2 y localizamos estas lisinas, vemos que se encuentran relativamente cerca de la posición 54, por lo que se trata de dos candidatos a analizar en relación con la posible ubiquitinación responsable de la aparición del doblete. Otro residuo a tener en cuenta es Lys53, localizada inmediatamente antes de Val54. Cualquiera de estos residuos podría ser responsable de la banda de 52 kDa en ARRB2 y deberán estudiarse los correspondientes mutantes puntuales para confirmarlo.

1.7. Resumen y modelo propuesto de ubiquitinación de ARRB1 y ARRB2.

Las proteínas de la familia de las arrestinas no visuales, ARRB1 y ARRB2, participan activamente en el desacoplamiento de los GPCRs activos de sus cascadas de transducción de señales intracelulares, seguido de su endocitosis normalmente mediada por vesículas recubiertas de clatrina/adaptina. La duración de la interacción GPCR-ARRB, característica propia de cada pareja, permite clasificar a los receptores en dos clases. Los GPCR de clase A son aquellos que se disocian

rápidamente de las ARRB, mientras que los de clase B permanecen unidos a la ARRB por más tiempo. Uno de los factores determinantes de la duración de esa interacción parece estar íntimamente ligado con la dinámica de ubiquitinación/deubiquitinación de la ARRB.

En este capítulo, nuestros resultados demuestran que MC1R es un GPCR de clase B, que al interactuar tanto con ARRB1 como con ARRB2 promueve la poliubiquitinación de ambas de modo sostenido y, probablemente, permanece unido a ellas con esta modificación en la vesícula endocítica. La ubiquitinación es independiente de la unión del agonista, pero es estrictamente dependiente de la coexpresión MC1R/ARRB, lo que en principio podría deberse a que este receptor posee una considerable actividad constitutiva en ausencia de ligando unido. De acuerdo con esta hipótesis, para inducir la ubiquitinación de las ARRBs es necesario que MC1R esté insertado en la membrana plasmática y sea funcional, ya que mutantes naturales con pérdida parcial de función (clasificados como R por su asociación de alta penetrancia con individuos pelirrojos) y mutantes artificiales truncados en el carboxilo terminal que son pérdida total de función, no inducen la poliubiquitinación de ARRBs. Además, en una serie de mutantes artificiales con disminución progresiva de la actividad del receptor, se observa que la capacidad de inducir ubiquitinación de las ARRB se correlaciona bien con la actividad residual del mutante.

Por otro lado, nuestros resultados también demuestran que la poliubiquitinación de ARRB2, la isoforma de arrestina que desacopla a MC1R de la vía del AMPc/PKA, ocurre en el dominio C-terminal de la proteína, muy probablemente en el residuo K400, y puede que en alguno más. La batería de formas truncadas en C-terminal progresivas y el uso de anticuerpos que reconocen epítopos en distintos dominios de la molécula, nos sirvió para comprobar que, como consecuencia de la poliubiquitinación, ARRB2 se proteoliza en el entorno del aminoácido R170, dando lugar a dos fragmentos proteicos que se corresponden aproximadamente a los dos dominios característicos de las ARRB. La proteólisis dependiente de MC1R es exclusiva de ARRB2, siendo indetectable con ARRB1, y podría por tanto relacionarse con la adquisición de la conformación activa de la arrestina. En efecto, dado que ARRB1 no tiene capacidad de mediar el desacoplamiento funcional de MC1R, es lógico suponer que tras unirse al receptor no experimenta la transición conformacional hacia el estado activo.

Por último, nuestros resultados también demuestran que ARRB2, pero no ARRB1, se modifica en el dominio N-terminal, dando lugar a un doblete que puede resolverse por SDS-PAGE. Este doblete no puede explicarse por un proceso

proteolítico que transformara una forma nativa de mayor tamaño en una forma proteolizada, ya que los dos componentes del doblete conservan los extremos N y C-terminales de la arrestina. Esta observación, junto con algunas pruebas adicionales obtenidas por co-transfección con ubiquitina etiquetada y experimentos de co-inmunoprecipitación, nos hacen pensar que la modificación es una mono- o diubiquitinación, compatible con un aumento de unos 12 kDa en el peso molecular aparente de la ARRB2. Hemos descartado posibles dianas de ubiquitinación en este dominio, aunque aún no hemos logrado determinar la diana implicada entre las 17 posibles que restan. Desde el punto de vista funcional, nuestros resultados apuntan a que la forma modificada interacciona con menor afinidad con MC1R en estado basal.

Por tanto, queda por confirmar la naturaleza de la modificación postraduccional que explica el doblete característico del patrón electroforético de la ARRB2. También será necesario analizar en profundidad el posible significado funcional de dicho proceso. En este sentido, podría pensarse en una posible relación de la activación de ARRB con la transformación de la banda de mayor tamaño (probablemente ubiquitinada) en la banda más ligera (probablemente de menor tamaño). En efecto, ARRB1 que no sufre el cambio conformacional a la forma activa tras su unión a MC1R, aparece muy mayoritariamente con una única banda correspondiente a la forma de mayor tamaño. Teniendo en cuenta nuestros datos, podría especularse que la unión al receptor de la forma de ~ 55 kDa provocaría un cambio conformacional activador hacia un estado de alta afinidad que dejaría expuestas la(s) cadena(s) de ubiquitina unida en el dominio N-terminal. La exposición de ubiquitina y el consiguiente reconocimiento por una deubiquitinasa liberaría las cadenas de ubiquitina de ARRB2, convirtiéndola en su forma activa de menor masa molecular, con capacidad de desacoplar e internalizar a MC1R. Por el contrario, la conformación de unión de baja afinidad de la ARRB1 mono- o diubiquitinada no debe ser compatible con un desplazamiento a una forma activa de alta afinidad, ni dejaría expuestas las cadenas de ubiquitina para la deubiquitinasa. Como consecuencia, ARRB1 no sería capaz ni de desacoplar al MC1R de la proteína Gs ni de desencadenar su internalización, como hemos demostrado en el capítulo 1 de esta Tesis. Este modelo, aún especulativo, deberá ser confirmado con experimentos adicionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **53**, 1–24 (2001).
2. Luttrell, L. M. Composition and function of G protein-coupled receptor signalosomes controlling mitogen-activated protein kinase activity. *J. Mol. Neurosci.* **26**, 253–64 (2005).
3. DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. β -Arrestins and Cell Signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 483–510 (2007).
4. Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. B-Arrestin-Mediated Receptor Trafficking and Signal Transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* **32**, 521–533 (2011).
5. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G. & Barak, L. S. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 17201–10 (2000).
6. Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Receptor-specific ubiquitination of β -arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J. Biol. Chem.* **280**, 15315–15324 (2005).
7. Perroy, J., Pontier, S., Charest, P. G., Aubry, M. & Bouvier, M. Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat. Methods* **1**, 203–8 (2004).
8. Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* **278**, 14498–506 (2003).
9. Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Resonating to the music of ubiquitination. *Nat. Methods* **1**, 191–3 (2004).
10. Catania, A., Gatti, S., Colombo, G. & Lipton, J. M. Targeting Melanocortin Receptors as a Novel Strategy. *Pharmacol. Rev.* **56**, 1–29 (2004).
11. García-Borrón, J. C., Abdel-Malek, Z. & Jiménez-Cervantes, C. MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 699–720 (2014).
12. Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J. L. & Thody, a J. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair

- and fair skin in humans. *Nat. Genet.* **11**, 328–330 (1995).
13. Rees, J. L. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 739–51 (2004).
 14. Sánchez Más, J. *et al.* Loss-of-function variants of the human melanocortin-1 receptor gene in melanoma cells define structural determinants of receptor function. *Eur. J. Biochem.* **269**, 6133–6141 (2002).
 15. Beaumont, K. a. *et al.* Altered cell surface expression of human MC1R variant receptor alleles associated with red hair and skin cancer risk. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2145–2154 (2005).
 16. Jiménez-Cervantes, C. *et al.* The Pro162 variant is a loss-of-function mutation of the human melanocortin 1 receptor gene. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 156–8 (2001).
 17. Pérez Oliva, A. B. *et al.* Identification and functional analysis of novel variants of the human melanocortin 1 receptor found in melanoma patients. *Hum. Mutat.* **30**, 811–22 (2009).
 18. Garcia-Borron, J. C., Sanchez-Laorden, B. L. & Jimenez-Cervantes, C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* **18**, 393–410 (2005).
 19. Herraiz, C., Journé, F., Ghanem, G., Jiménez-Cervantes, C. & García-Borrón, J. C. Functional status and relationships of melanocortin 1 receptor signaling to the cAMP and extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 pathways in human melanoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 2244–52 (2012).
 20. Sánchez-Más, J., Sánchez-Laorden, B. L., Guillo, L. a, Jiménez-Cervantes, C. & García-Borrón, J. C. The melanocortin-1 receptor carboxyl terminal pentapeptide is essential for MC1R function and expression on the cell surface. *Peptides* **26**, 1848–57 (2005).
 21. Han, M., Gurevich, V. V, Vishnivetskiy, S. A., Sigler, P. B. & Schubert, C. Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure* **9**, 869–880 (2001).
 22. Shukla, A. K. *et al.* Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* **512**, 218–222 (2014).
 23. Scarselli, M. & Donaldson, J. G. Constitutive internalization of G protein-coupled receptors and G proteins via clathrin-independent endocytosis. *J. Biol. Chem.* **284**, 3577–85 (2009).

24. Shenoy, S. K. *et al.* Ubiquitination of beta-Arrestin Links Seven-transmembrane Receptor Endocytosis and ERK Activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 29549–29562 (2007).
25. Kim, Y. M., Barak, L. S., Caron, M. G. & Benovic, J. L. Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **277**, 16837–16846 (2002).
26. Lin, F. *et al.* Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* **41**, 10692–10699 (2002).
27. Ozawa, K. *et al.* S-Nitrosylation of β -Arrestin Regulates β -Adrenergic Receptor Trafficking. *Mol. Cell* **31**, 395–405 (2008).
28. Cheng, Z. J. *et al.* beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J. Biol. Chem.* **275**, 2479–85 (2000).
29. Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**, 512–517 (2005).

CAPÍTULO 3

Papel de mahogunina en la ubiquitinación de
ARRBs dependiente de MC1R.

INTRODUCCIÓN

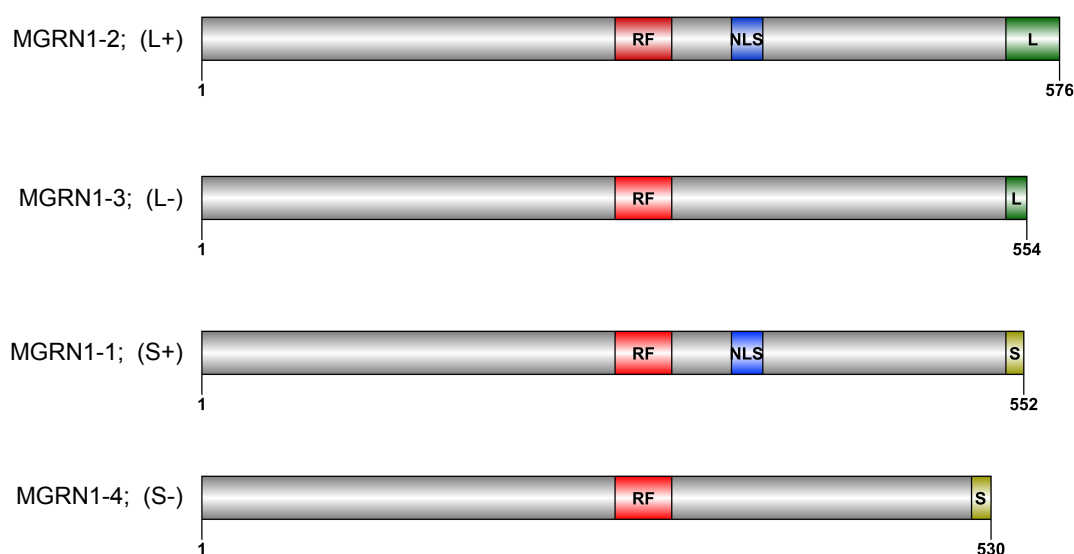
Como ya hemos comentado previamente, el MC1R es un GPCR que se expresa mayoritariamente en la membrana plasmática de los melanocitos cutáneos¹. Su principal función es la síntesis de melanina en respuesta a sus ligandos naturales, MSH y ACTH². Como muchos GPCRs, MC1R, en condiciones de estimulación sostenida, sufre un proceso de desensibilización homóloga e internalización en el que participan los miembros de la familia de las β -arrestinas (ARRBs). Hasta el momento, nuestros datos confirman que tanto ARRB1 como ARRB2 son capaces de interactuar con MC1R, aunque solo la ARRB2 desacopla al receptor de la vía del AMPc, su principal vía de señalización. Por otra parte, hemos visto que ambas isoformas de ARRB sufren un proceso de ubiquitinación que requiere la presencia de MC1R correctamente expresado en la membrana plasmática y funcional. Esta ubiquitinación es, además, independiente de agonista.

La ubiquitinación es un proceso ampliamente conocido por su papel en la degradación de proteínas por el proteasoma, en donde las proteínas a degradar son marcadas con ubiquitina³. Sin embargo, esta modificación post-traducciona también se asocia con otros procesos que nada tienen que ver con la proteólisis del sustrato, que incluyen la regulación de diversas actividades proteicas, las interacciones proteína-proteína y la localización subcelular⁴. Por eso participan en funciones tales como la regulación de la actividad de algunas quinasas y factores de transcripción, el remodelado de histonas, la regulación de la endocitosis y el tráfico a la membrana⁵⁻⁸. Otros procesos regulados por ubiquitinación son el tráfico al lisosoma, el tráfico nuclear y la reparación del ADN, por lo que es importante para la progresión del ciclo celular y la apoptosis.

El mecanismo de ubiquitinación de una proteína diana incluye la acción de tres enzimas denominadas E1, E2 y E3 que actúan de manera secuencial⁹. En células eucariotas existe un solo tipo de E1 (Uba1) y aproximadamente 10-30 E2s¹⁰. Por el contrario, se desconoce el número total de E3s, aunque supera ampliamente el número de E2s. Normalmente, la E3 ligasa es la enzima que determina la especificidad de la vía, puesto que reconoce secuencias específicas del sustrato y es frecuentemente el único componente de esta vía sujeto a regulación³.

Mahogunin *RING Finger-1* (mahogunina o MGRN1) es una proteína implicada en la regulación de la señalización por MCs¹¹. El gen *Mgrn1* se identificó por clonación posicional de *Mahoganoide*, una mutación que anula la expresión de *Mgrn1* y provoca una coloración oscura del pelaje del ratón¹² (además de

desórdenes neurológicos, malformaciones en el corazón y alta letalidad embrionaria^{13,14}). Hasta el momento se han identificado cuatro transcritos distintos del gen humano, MGRN1, producto de un procesamiento alternativo de los exones 12 y 17¹⁵. Así, cuando los transcritos contienen la versión larga del exón 17, se nombran como L (del inglés *long*), y S (de inglés *short*), si contienen la versión corta. Por otro lado, en cuanto a la presencia o ausencia del exón 12, que codifica una secuencia de 22 aminoácidos con una señal de localización nuclear (NLS), se distinguen las formas (+), que contienen el citado exón, y las formas (-), que carecen de él. El exón 10 codifica el dominio RING-finger (RF), que está presente en los cuatro transcritos **(esquema 1)**.



Esquema 1: Representación lineal de las isoformas de MGRN1 humanas. Se destaca el dominio RING finger (en rojo), la presencia o no del péptido que contiene la NLS (en azul) y el extremo C-terminal diferente entre variantes L o S (en dos tonos de verde).

Los cuatro transcritos de MGRN1 se comportan como reguladores negativos de la señalización por MC1R y MC4R inhibiendo la señalización a través de la vía del AMPc. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha propuesto un modelo de inhibición de la señalización basado en la competición entre MGRN1 y la proteína G α por su unión al receptor MC1R¹⁵. Por otra parte, como MGRN1 contiene un dominio *RING-finger* (característico de las E3 ubiquitina ligasas), no es de extrañar que, al menos en el ratón, se haya demostrado que Mgrn1 tenga actividad Ub-ligasa tanto *in vivo*¹⁶ como *in vitro*¹³.

Debido a esto, y a su implicación en los procesos de regulación de la pigmentación, nos planteamos la posibilidad de que MGRN1 fuera la E3 ubiquitina ligasa responsable de la ubiquitinación de las ARRBs dependiente de MC1R.

3.1. MGRN1 como posible E3-ubiquitina ligasa responsable de la ubiquitinación de las ARRBs mediada por MC1R.

Para abordar este objetivo nos propusimos analizar el efecto que tiene la expresión de MGRN1 sobre la ubiquitinación de ARRB1 y ARRB2 en presencia de MC1R. Previo a esto, comprobamos que las construcciones elegidas de las cuatro isoformas de MGRN1, que contenían un epitopo Myc fusionado en su extremo N-terminal, se expresaban de manera comparable en el sistema celular HEK 293T. Para ello transfectamos estas células con L+, L-, S+ y S- y analizamos los extractos solubilizados por transferencia Western y el uso de dos anticuerpos distintos, uno contra el epitopo Myc (antiMyc) y otro, comercial, específico contra la secuencia de MGRN1. (Fig. 1).

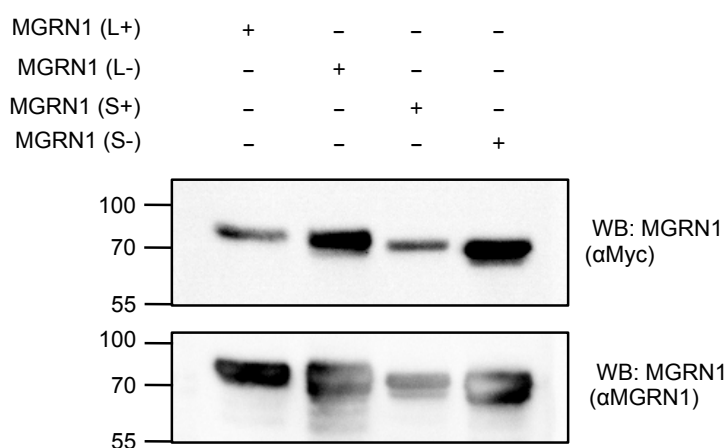


Figura 1. Expresión de las cuatro isoformas de MGRN1. Células HEK 293T transfectadas con las isoformas de MGRN1: L+, L-, S+ y S-, marcadas con el epitopo Myc en su extremo N-terminal. Tras solubilización con detergente no iónico y electroforesis y transferencia Western, las isoformas de MGRN1 fueron detectadas con un anticuerpo antiMyc (panel superior) y un anticuerpo comercial específico contra MGRN1 (antiMGRN1).

Los resultados mostraron que las cuatro isoformas de MGRN1 se transfectan de forma correcta, aunque la expresión de las formas (-) es más eficiente que la expresión de las formas (+). El perfil electroforético muestra una única banda que se corresponde en tamaño con el peso estimado de cada una de las isoformas. Además, todas las isoformas son detectadas con tanto con el anticuerpo antiMyc, como el anticuerpo comercial antiMGRN1.

Una vez asegurada la correcta expresión en células HEK 293T de las cuatro isoformas de MGRN1 y su reconocimiento por el anticuerpo antiMGRN1, nuestro siguiente paso fue determinar si la sobreexpresión de cada una de ellas tiene algún efecto sobre la poliubiquitinación de ARRB1 y ARRB2 en presencia de MC1R. Con

este fin coexpresamos en células HEK 293T las cuatro isoformas de MGRN1 (marcadas con Myc), las dos isoformas de ARRB (marcadas con HA en N-terminal) y el MC1R (marcado con FLAG). Los extractos fueron solubilizados y analizados por transferencia Western y las ARRBs reveladas con un anticuerpo antiHA (**Fig. 2A y 2B**).

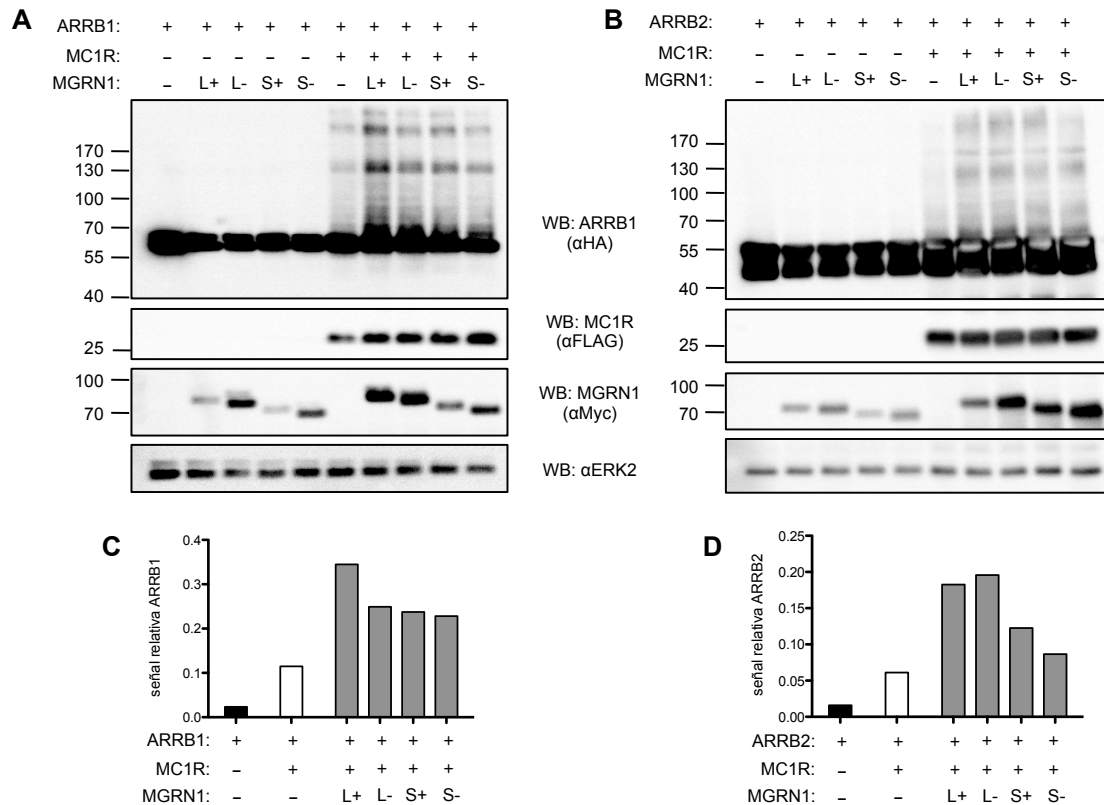


Figura 2. Efecto de MGRN1 sobre la ubiquitinación de ARRBs dependiente de MC1R. **(A)** Células HEK 293T transfectadas con ARRB1 (marcada con HA en N-terminal), MC1R y las cuatro isoformas de MGRN1. Tras solubilización, electroforesis y transferencia Western, las ARRB2 se detectaron con un anticuerpo antiHA, el receptor con antiFLAG y las isoformas de MGRN1 con antiMyc. Se usó antiERK2 como control de carga. **(B)** Mismo experimento que en (A), pero con ARRB2. **(C)** Análisis cuantitativo de la expresión de bandas de poliubiquitinación en células HEK 293T transfectadas como en (A) con los datos corregidos por su correspondiente control de carga. **(D)** Mismo análisis con células transfectadas como en (B).

Como ya demostramos en los capítulos 1 y 2 de esta memoria, al coexpresar las ARRBs junto al MC1R, estas sufren un proceso de poliubiquitinación que da lugar a la aparición de bandas de elevado Mr que no se detectan cuando ARRB1 y ARRB2 se expresan solas. Es de destacar que cuando incluimos en el sistema de sobreexpresión cualquiera de las isoformas de MGRN1 estas bandas de elevado Mr se hacen más intensas, lo que sugiere un aumento del proceso de poliubiquitinación. Al normalizar este incremento en la intensidad por la cantidad de proteína, para cada

una de las condiciones, observamos que, aunque las 4 isoformas de MGRN1 son capaces de inducir un incremento en las bandas de elevado Mr, este efecto es más acusado en presencia de la isoforma L+ en el caso de la ARRB1 (**Fig. 2C**), mientras que para la ARRB2, tanto la forma L+ como la forma L- inducen una mayor intensidad de bandas que las isoformas S (**Fig. 2D**).

Este aumento de las especies poliubiquitinadas en presencia de MGRN1 apoya la hipótesis de que MGRN1 sea una E3 ubiquitina ligasa implicada en el proceso de ubiquitinación de las ARRBs, al menos en nuestro sistema experimental. Estos resultados muestran también que MGRN1 por sí misma es incapaz de inducir la poliubiquitinación de las ARRBs, lo que confirma que se trata de un proceso dependiente de MC1R. Nuestra hipótesis es que MC1R fuera necesario para aproximar MGRN1 a ARRB2. Para evaluarlo, realizamos un experimento en el que estudiamos la interacción de MGRN1 tanto con MC1R como con ARRB1 y ARRB2, en una situación de coexpresión de las tres construcciones. Para ello, transfectamos células HEK 293T con las dos isoformas de ARRBs (marcadas con HA en N-terminal), el MC1R y la isoforma L+ de MGRN1 (marcadas con Myc en N-terminal). Los extractos solubilizados se inmunoprecipitaron con un anticuerpo antiHA para retener la ARRB y los inmunoprecipitados se analizaron para detectar la presencia de MGRN1 y MC1R (**Fig. 3**).

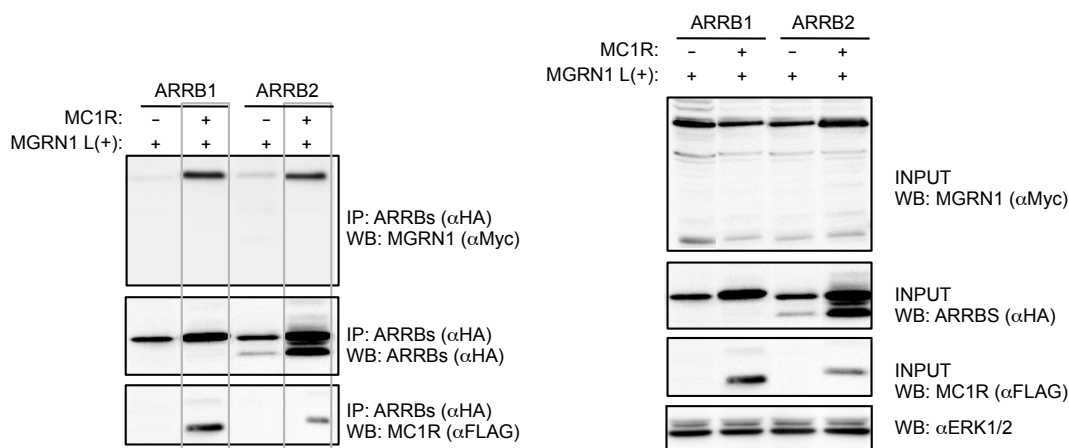


Figura 3. Formación de un complejo ternario ARRB-MC1R-MGRN1. Células transfectadas con MC1R, las dos isoformas de ARRB y MGRN1, según se indica en la leyenda. Los extractos fueron solubilizados y posteriormente inmunoprecipitados con un anticuerpo antiHA para retener la ARRB1 o la ARRB2 (según el caso). El inmunoprecipitado fue analizado mediante transferencia Western y la MGRN1 relevada con un anticuerpo antiMyc y el MC1R con un anticuerpo antiFLAG. Se comprobó la correcta inmunoprecipitación analizando el inmunoprecipitado con un anticuerpo antiHA. Se extrajo una alícuota del extracto recién solubilizado, previo a la inmunoprecipitación, para comprobar la expresión de todas las construcciones transfectadas (INPUT, panel derecho).

Los resultados mostraron que en ausencia de MC1R, MGRN1 interacciona de forma poco eficiente con ARRB1 y ARRB2. Sin embargo, en presencia de MC1R esta interacción es mucho más fuerte, sugiriendo que MC1R, de alguna manera, favorece la unión de MGRN1 con las dos isoformas de ARRB. MC1R podría estar por tanto actuando como proteína andamio para la formación de un complejo ternario ARRB-MC1R-MGRN1 que estaría favoreciendo el acercamiento físico entre las ARRBs y MGRN1. Este acercamiento favorecería, además, el reconocimiento de ARRB como diana de ubiquitinación de MGRN1.

3.2. La poliubiquitinación de ARRB2 inducida por MGRN1 es independiente de agonista.

Los resultados del apartado anterior demuestran que MGRN1 ubiquitina ambas ARRBs de modo dependiente de la expresión de MC1R. Por eso, quisimos comprobar si además dependía del estado de activación del MC1R. Para ello, se estimularon células transfectadas con ARRB2 (marcadas con HA en N-terminal), MC1R y MGRN1, con el ligando NDP-MSH (10^{-7} M) a distintos tiempos, y se analizaron los extractos solubilizados con los anticuerpos antiARRB2 y antiHA (**Fig. 4**).

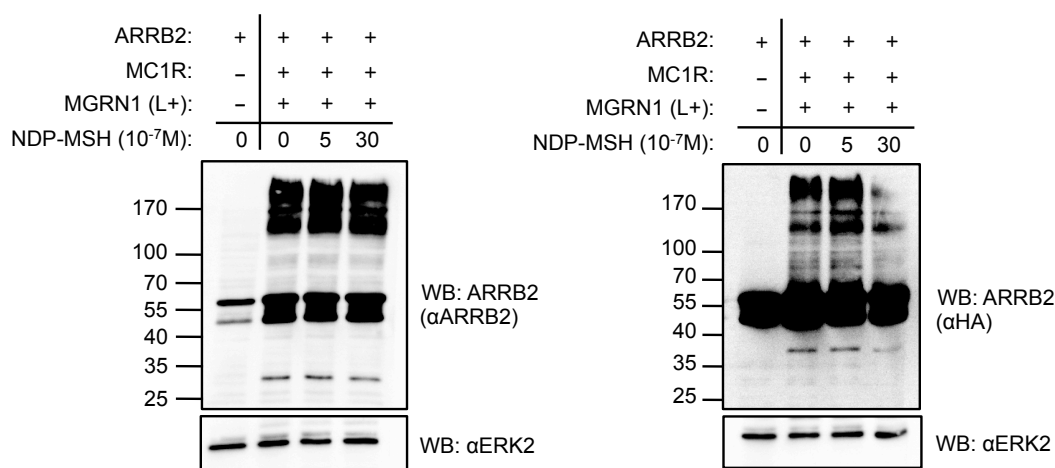


Figura 4. Poliubiquitinación de ARRB2 por MGRN1 independiente de agonista. Células HEK 293T transfectadas con ARRB2 (marcada con HA en N-terminal), MC1R y la isoforma L+ de MGRN1, según la leyenda, se mantuvieron creciendo en medio mínimo al menos 3 horas. Transcurido este tiempo, se estimularon las células con NDP-MSH (10^{-7} M) durante 5 o 30 minutos, mientras que los controles se dejaron sin estimular. Los extractos solubilizados se analizaron mediante transferencia Western y la ARRB2 se detectó con antiARRB2 (panel izquierdo) y antiHA (panel derecho). Se usó antiERK2 como control de carga.

Los resultados confirman que en ausencia de MC1R no aparecen las formas poliubiquitinadas de ARRB2, que sí aparecen cuando este receptor se coexpresa con ella. Por otro lado, sin embargo, no se aprecia ninguna diferencia significativa en el patrón de ARRB2 poliubiquitinada entre las células control sin estimular, que han sido privadas de suero durante al menos 3h, y aquellas que han sido estimuladas con NDP-MSH durante 5 y 30 minutos. Estos resultados nos confirman que la poliubiquitinación de ARRB2 debida a MGRN1 tiene lugar, incluso, en ausencia de agonista, probablemente debida a la actividad constitutiva que caracteriza al MC1R, que lo mantiene en conformación activa en la membrana aún en ausencia de agonista unido.

A continuación, llevamos a cabo un ensayo con un mutante truncado de MC1R. Este mutante, denominado $\Delta 5$, carece de los últimos 5 aminoácidos y no es funcional, ya que no desacopla a MC1R activo de la vía del AMPc. Quisimos comprobar si la poliubiquitinación de ARRB1 y ARRB2, que hemos demostrado en el capítulo 2 que es dependiente de MC1R, se produce incluso si éste no es funcional. Para ello, transfectamos las ARRBs (marcadas con HA en N-terminal) junto a MGRN1 y MC1R: silvestre y truncado (**Fig. 5A y 5B**). Solubilizamos los extractos y los analizamos mediante transferencia Western. Las ARRBs se detectaron con un anticuerpo antiHA.

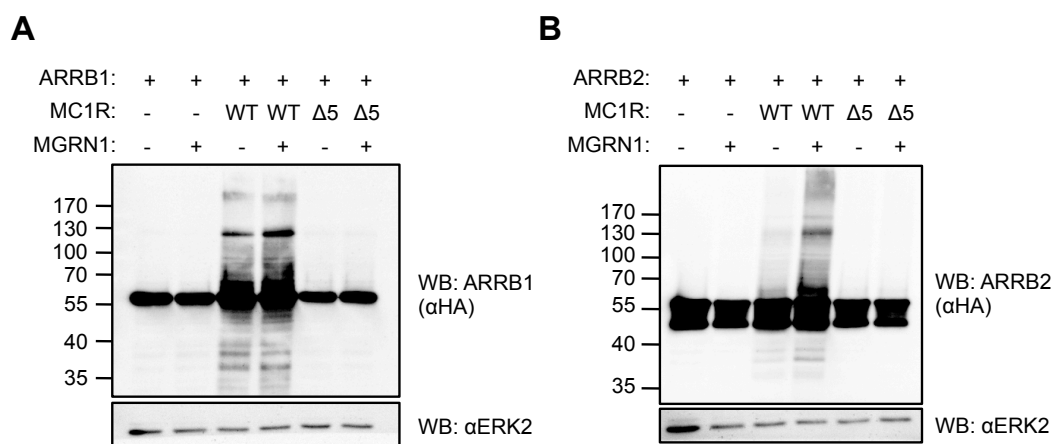


Figura 5. La poliubiquitinación de ARRB2 mediada por MGRN1 es dependiente de MC1R funcional. Células HEK 293T transfectadas con ARRB1 (A) o ARRB2 (B), marcadas con el epítopo HA en N-terminal, junto con MGRN1 y dos formas de MC1R, la forma silvestre y el mutante no funcional $\Delta 5$. Los extractos se solubilizaron y se analizaron mediante transferencia Western. Las ARRBs fueron detectadas con un anticuerpo antiHA. Se utilizó antiERK como control de carga del experimento.

Los resultados mostraron que el mutante $\Delta 5$, aunque conserva la mayor parte de su secuencia intacta, no induce la formación de bandas de elevado Mr derivadas de ARRBs, ni en condiciones de expresión endógena de MGRN1 (como

ya habíamos visto en el capítulo anterior), ni tras la sobreexpresión de la misma en nuestro sistema celular. Estos resultados indican que MGRN1 necesita para poliubiquitar a las dos isorformas de ARRB que MC1R se exprese en la membrana plasmática y que sea plenamente funcional.

3.3. El dominio *RING-finger* de MGRN1 es esencial para inducir la poliubiquitinación de ARRB2.

MGRN1 tiene varios motivos de interés dentro de su secuencia (**esquema 1**). El exón 12, que se encuentra presente únicamente en las formas denominadas (+), codifica una secuencia consenso rica en aminoácidos básicos, que corresponde a una secuencia de localización nuclear o NLS (del inglés “Nuclear Localization Signal”). Esta secuencia es responsable de la traslocación de estas isoformas al núcleo en presencia de MC1R¹⁵. Otro motivo muy importante de la proteína es el dominio *RING-finger*, codificado por el exón 10, y presente, por tanto, en los cuatro transcritos de MGRN1. Este dominio es el responsable de la actividad ubiquitina ligasa que se ha descrito *in vivo*¹⁶ e *in vitro*¹³ para la proteína murina, Mgrn1. Hasta el momento, no se sabe si la proteína humana se comporta como una E3-ubiquitina ligasa. Nuestros resultados sugieren que al menos una parte de la poliubiquitinación de ARRB2 dependiente de MC1R puede ser debida a MGRN1. Con el fin de obtener nuevos datos que confirmen que ARRB2 tiene una diana de ubiquitinación, nos propusimos estudiar el efecto de diversos mutantes de MGRN1 sobre la poliubiquitinación de ARRB2.

Resultados previos de nuestro laboratorio confirmaron que el dominio *RING-finger* no es esencial en la interacción entre MC1R y MGRN1 (Ana B. Pérez. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2011), ya que mutantes truncados de MGRN1 que carecen de este dominio interaccionan con el receptor de manera comparable a como lo hace la proteína silvestre. Para determinar la especificidad de MGRN1 en la poliubiquitinación de ARRB2 e implicación del dominio RING-finger en este proceso, utilizamos unos mutantes truncados de MGRN1 presentes en nuestro laboratorio. Los mutantes están contruidos sobre la forma L+ y se denominan: Δ 10-17, Δ 11-17 y Δ 12-17. Esta nomenclatura hace referencia a los exones que han perdido respecto del transcrito silvestre, de manera que Δ 10-11 ha perdido el dominio RING-finger, que sí mantienen por el contrario los mutantes truncados Δ 11-17 y Δ 12-17. Se utilizaron estas construcciones para transfectar células HEK 293T, así como la MGRN1 silvestre y las proteínas ARRB2 y MC1R. (**Fig. 6A**).

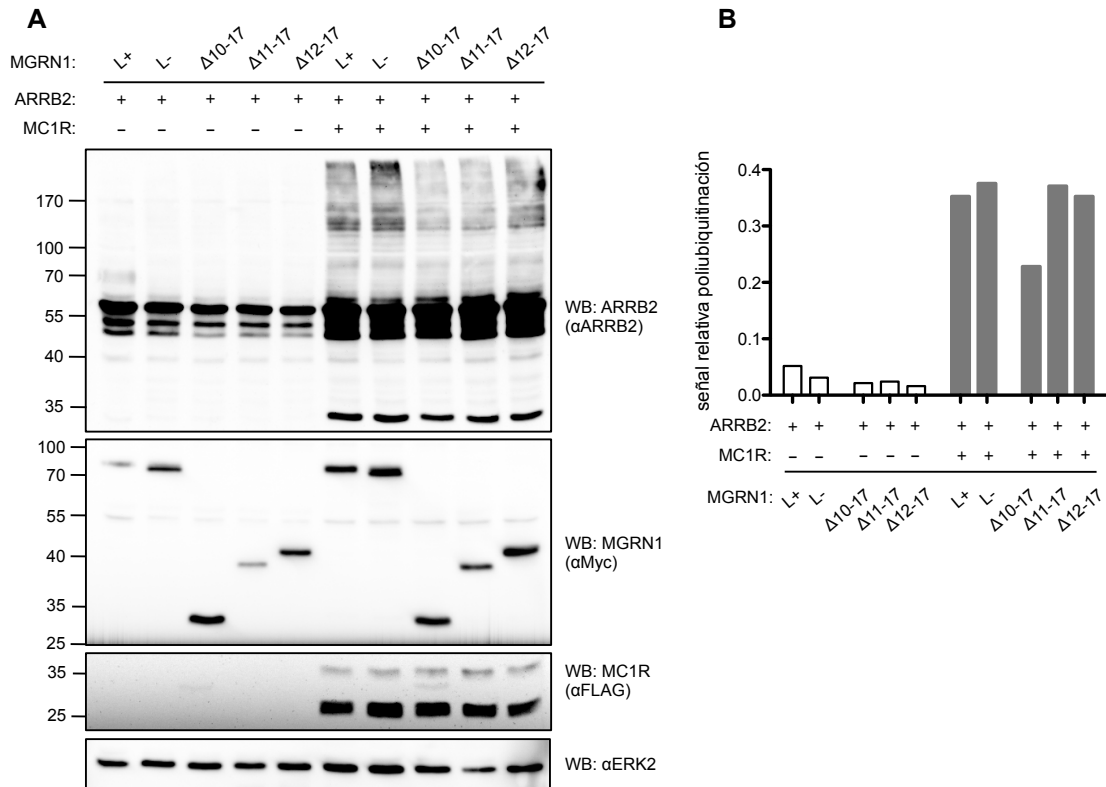


Figura 6. El dominio RING-finger de MGRN1 es esencial para inducir la poliubiquitinación de ARRB2. **(A)** Células HEK 293T transfectadas con MC1R, ARRB2 y diferentes formas silvestres y truncadas de MGRN1 (marcada con Myc en N-terminal), según la leyenda. Los extractos fueron solubilizados y analizados mediante transferencia Western. Las diferentes proteínas fueron detectadas con los anticuerpos especificados. Se usó antiERK2 como control de carga (panel izquierdo). **(B)** Análisis cuantitativo de la intensidad de las formas de elevado Mr derivadas de ARRB2 detectadas con el anticuerpo específico antiARRB2. Los valores fueron normalizados por la proteína total.

El análisis de los extractos solubilizados con el anticuerpo antiARRB2 volvió a confirmar que MC1R es necesario para que MGRN1 ubiquitine a ARRB2. Además, mostró que las células transfectadas con los mutantes truncados tenían una menor poliubiquitinación que aquellas células que presentan cualquiera de las dos formas silvestres, L⁺ o L⁻. El análisis cuantitativo de estas formas poliubiquitinadas, normalizado por la cantidad total de proteína en cada condición, mostró que los dos mutantes truncados que mantienen el dominio RING-finger, Δ11-17 y Δ12-17, inducen una poliubiquitinación de ARRB2 comparable a la observada con la proteína silvestre (**Fig. 6B**). Por el contrario, el mutante Δ10-17 provoca una poliubiquitinación mucho menor. Este resultado vuelve a señalar a MGRN1 como E3-ubiquitina ligasa responsable, al menos en parte, de la poliubiquitinación de ARRB2, y sugiere que el dominio RING-finger es esencial en este proceso.

Con el fin de confirmar esta conclusión, repetimos el experimento anterior utilizando un mutante puntual de MGRN1 disponible en nuestro laboratorio que desestructura la conformación de este dominio funcional, pero que contiene el resto de la secuencia completa, ya que el truncado de MGRN1 Δ 10-17 carece de una porción muy grande de polipéptido. Esta construcción, denominado RF6, contiene el cambio isostérico C313S sobre la isoforma S+ de MGRN1, que abole el consenso C3HC4 que conforma el dominio RING-finger y que, presumiblemente inactivaría su actividad enzimática (**Fig. 7A**).

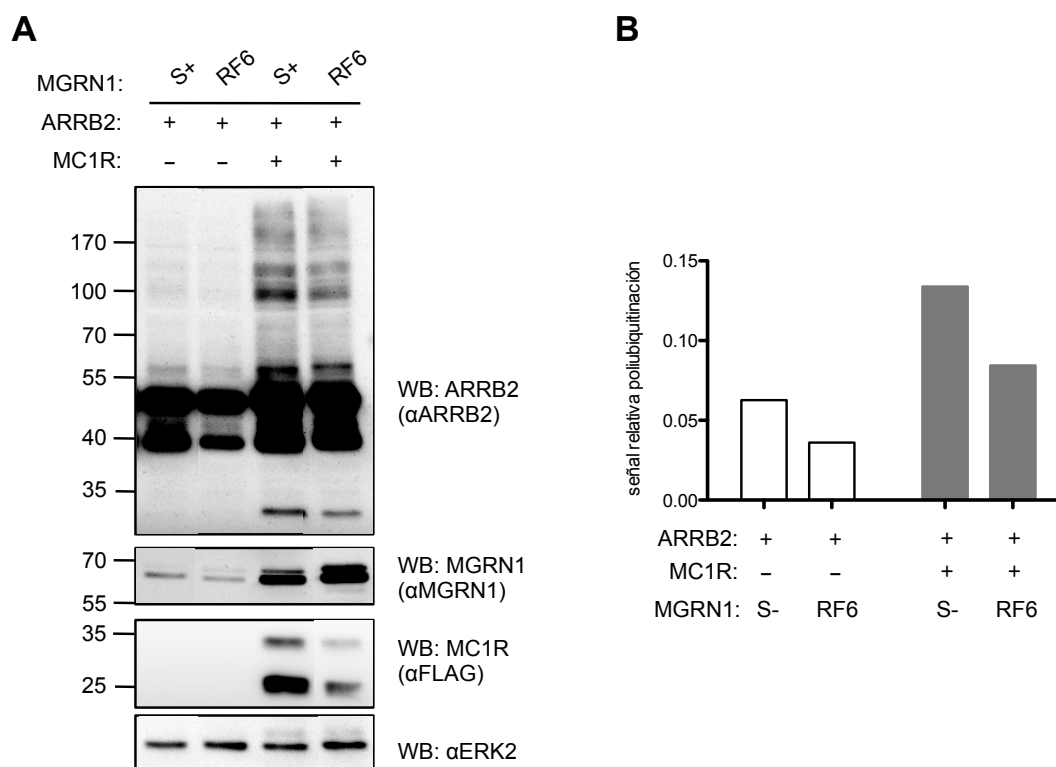


Figura 7. El dominio RING-finger de MGRN1 es esencial para inducir la poliubiquitinación de ARRB2. **(A)** Células HEK 293T fueron transfectadas con ARRB2, MC1R y la isoformas S+ de MGRN1 y el mutante puntual RF6, según se indica en la leyenda. Los extractos solubilizados se analizaron mediante transferencia Western y las proteínas detectadas con anticuerpos específicos. En este experimento se usó el anticuerpo antiMGRN1 comercial (Origene) y antiERK2 como control de carga. **(B)** Análisis cuantitativo de las formas poliubiquitinadas derivadas de ARRB2 detectadas con antiARRB2 y normalizadas por la cantidad total de proteína.

3.4. Efecto de MGRN1 y ARRB1/ARRB2 sobre la señalización del MC1R a través de la vía del AMPc.

MGRN1 actúa como un regulador negativo de la señalización del MC1R, provocando una disminución de la acumulación de AMPc intracelular en respuesta a

su agonista. Sabemos que esta inhibición de la señalización no depende de la ubiquitinación y posterior degradación del MC1R, y que incluso resulta estabilizado en presencia de MGRN1 ¹⁵. Por otro lado, en el capítulo anterior hemos propuesto un modelo en el que la poliubiquitinación de ARRB2 se relaciona con una menor actividad de esta proteína y por tanto, con una disminución de la capacidad de inducir la desensibilización e internalización del MC1R.

Nuestros resultados nos llevan a pensar que la forma poliubiquitinada de ARRB2 es una forma principalmente inactiva, que adquiere plena funcionalidad cuando pierde todas sus moléculas de ubiquitina. Con el fin de obtener nuevas evidencias que apoyasen este modelo, decidimos comprobar si existía un efecto sinérgico entre MGRN1 y las dos isoformas de ARRB sobre el acoplamiento del MC1R a la cascada del AMPc. Para ello, expresamos el MC1R en células HEK 293T junto con MGRN1 y/o ARRB1 o ARRB2, y determinamos los niveles de AMPc intracelular después de estimular las células durante 30 minutos con el agonista NDP-MSH (10^{-7} M). Tras este tiempo, las células estimuladas y los controles sin estimular se lisaron con HCl (0,1N) y se midió el AMPc con un kit comercial (**Fig. 8**).

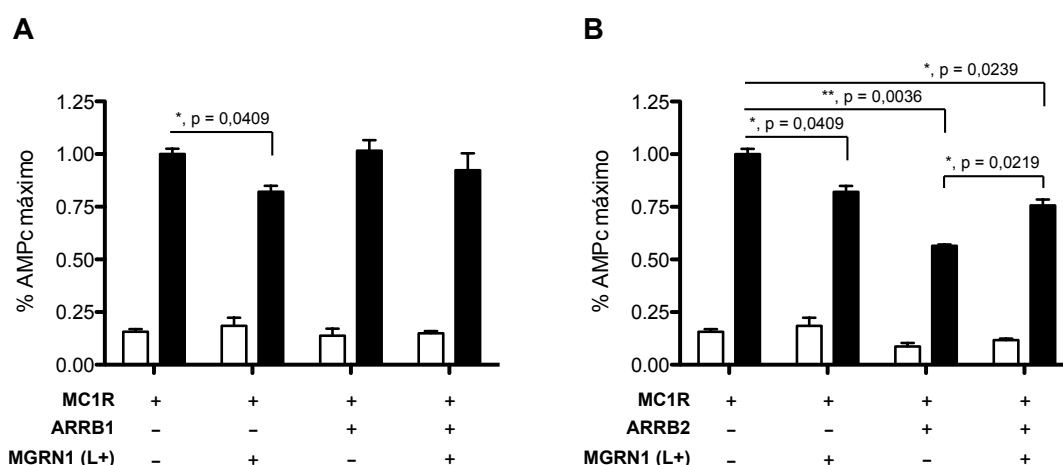


Figura 8. Efecto de la expresión de MGRN1 sobre la regulación de la señalización de MC1R por ARRB1 y ARRB2. Células HEK 293T transfectadas con MC1R, MGRN1 (L+) y ARRB1 (panel izquierdo) o ARRB2 (panel derecho). Tras ser mantenidas en medio sin suero durante un mínimo de 3 horas, se estimularon con NDP-MSH (10^{-7} M) durante 30 minutos (barras negras) mientras que los controles permanecieron sin estimular (barras blancas). A continuación las células se lisaron con HCl 0,1 N y los niveles de AMPc se midieron con un kit comercial.

Elegimos la forma L+ por ser la isoforma de MGRN1 que provoca un mayor incremento en la poliubiquitinación, tanto de ARRB1 y como de ARRB2. Como era de esperar, MGRN1 disminuye de manera significativa el nivel de AMPc intracelular en células estimuladas (**Fig. 8A y 8B**). ARRB1, como ya sabemos, no inhibe la señalización del receptor, manteniendo estable el nivel de AMPc (**Fig. 8A**). ARRB2,

por el contrario, provoca un fuerte descenso en los niveles de este segundo mensajero (**Fig. 8B**). Cuando coexpresamos MGRN1 y ARRB2, se produce una recuperación significativa de los niveles de AMPc intracelular en condiciones de estimulación con el agonista (**Fig. 8B**). Este resultado apoya nuestro planteamiento inicial que propone que la ubiquitinación de ARRB2, de alguna manera, interfiere con la función de la ARRB2, siendo la forma no ubiquitinada la forma plenamente activa. Además, confirma que MGRN1 es una E3 ubiquitina ligasa implicada en esta ubiquitinación.

3.5. Resumen y modelo propuesto de ubiquitinación de ARRB por MGRN1.

Tras haber demostrado en el capítulo anterior que tanto en células de melanoma como en un sistema heterólogo que sobreexpresan MC1R se produce una poliubiquitinación de ARRB sostenida dependiente de la interacción con MC1R, a lo largo de este capítulo hemos abordado la identificación de la ubiquitina ligasa responsable de esta modificación de las β -arrestinas. En la búsqueda de los candidatos más idóneos *a priori* por la naturaleza pigmentaria de nuestro sistema experimental, destaca una proteína con un dominio *RING finger* (característico de enzimas E3 ubiquitina ligasas) llamada Mahogunina, o MGRN1, ya que la mutación espontánea *Mahoganoide* anula la expresión de Mgrn1 y provoca, entre otros desórdenes, una coloración oscura del pelaje del ratón ¹². Además, se ha demostrado la actividad ubiquitina ligasa de la proteína murina, tanto *in vivo* ¹⁶ como *in vitro* ¹³, aunque no en humanos.

Así, evaluamos la posible participación de MGRN1 como ubiquitina ligasa mediante la coexpresión MC1R y las ARRB 1 y 2 con cada una de las 4 isoformas descritas de la MGRN1 humana y observamos un incremento significativo en la ubiquitinación de ambas ARRB en comparación con la ausencia de MGRN1, lo que sugiere la intervención directa de MGRN1 en la ubiquitinación. Además, hemos podido demostrar que este aumento en la ubiquitinación no tiene lugar en ausencia de MC1R o si este no es funcional, incluso en presencia de MGRN1, y que la interacción MGRN1-ARRB es más eficiente en un complejo con MC1R. Estos resultados apuntan a que el receptor actúa como un andamio molecular para favorecer la interacción de la enzima (MGRN1) y su sustrato (ARRB) en el complejo ternario, incluso en condiciones basales, puesto que la estimulación con agonista no modifica esta tendencia. Por último, mutantes truncados o puntuales de MGRN1 en

el dominio *RING finger* no incrementan la ubiquitinación de ARRB2, lo que confirma que el proceso es específico para esta ubiquitina ligasa.

Los resultados expuestos en esta memoria demuestran que MGRN1 y ARRB2, implicadas ambas en la regulación de la función del MC1R, son capaces de interaccionar con MC1R e provocar, de manera independiente, una disminución de la señalización a través de AMPc. MGRN1 compite con la proteína G por su unión al receptor ¹⁵, mientras que ARRB2 promueve, entre otras acciones, la desensibilización e internalización del MC1R. Sorprendentemente, cuando ambas proteínas se coexpresan en presencia de MC1R, no solo no se produce un efecto sinérgico, sino que se recupera ligeramente la señalización de MC1R. Esto podría deberse a que MC1R, en su conformación activa en la membrana plasmática, actuaría de proteína andamio para aproximar MGRN1 y ARRB2, de manera que la primera ubiquitinaria a la segunda. La poliubiquitinación de ARRB2 provocaría un cambio conformacional importante en esta proteína, de modo que la haría menos afín por MC1R, lo que causaría una disminución del desacoplamiento del receptor de la vía del AMPc.

De acuerdo con esta hipótesis, en ausencia de esta E3-ubiquitina ligasa predominaría la forma no ubiquitinada de ARRB2. Según nuestros resultados, esta forma se corresponde con la proteína activa, responsable del aumento de la desensibilización e internalización del MC1R y, por tanto, de una disminución de la síntesis de melanina. Sin embargo, se ha descrito, que los ratones nulos para este gen poseen el pelaje más oscuro que los que expresan el gen salvaje. Por este motivo, no descartamos que haya otras dianas de MGRN1 implicadas en la regulación de la pigmentación y que puedan explicar este fenotipo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gantz, I. & Fong, T. M. The melanocortin system. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, E468–E474 (2003).
2. Garcia-Borrón, J. C., Sanchez-Laorden, B. L. & Jimenez-Cervantes, C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* **18**, 393–410 (2005).
3. Passmore, L. a & Barford, D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J.* **379**, 513–525 (2004).
4. Schnell, J. D. & Hicke, L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 35857–60 (2003).
5. Hicke, L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 195–201 (2001).
6. Hicke, L. & Dunn, R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 141–72 (2003).
7. Muratani, M. & Tansey, W. P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 192–201 (2003).
8. Katzmann, D. J., Odorizzi, G. & Emr, S. D. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 893–905 (2002).
9. Hershko, a & Ciechanover, a. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479 (1998).
10. Pickart, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 503–33 (2001).
11. He, L., Eldridge, A. G., Jackson, P. K., Gunn, T. M. & Barsh, G. S. Accessory proteins for melanocortin signaling: attractin and mahogunin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **994**, 288–98 (2003).
12. Phan, L. K., Lin, F., LeDuc, C. a, Chung, W. K. & Leibel, R. L. The mouse mahoganoid coat color mutation disrupts a novel C3HC4 RING domain protein. *J. Clin. Invest.* **110**, 1449–1459 (2002).
13. He, L. *et al.* Spongiform degeneration in mahoganoid mutant mice. *Science* **299**, 710–2 (2003).

14. Cota, C. D. *et al.* Mice with mutations in Mahogunin ring finger-1 (Mgrn1) exhibit abnormal patterning of the left-right axis. *Dev. Dyn.* **235**, 3438–47 (2006).
15. Pérez-Oliva, A. B., Olivares, C., Jiménez-Cervantes, C. & García-Borrón, J. C. Mahogunin ring finger-1 (MGRN1) E3 ubiquitin ligase inhibits signaling from melanocortin receptor by competition with Galphas. *J. Biol. Chem.* **284**, 31714–25 (2009).
16. Kim, B. Y., Olzmann, J. A., Barsh, G. S., Chin, L.-S. & Li, L. Spongiform neurodegeneration-associated E3 ligase Mahogunin ubiquitylates TSG101 and regulates endosomal trafficking. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1129–42 (2007).

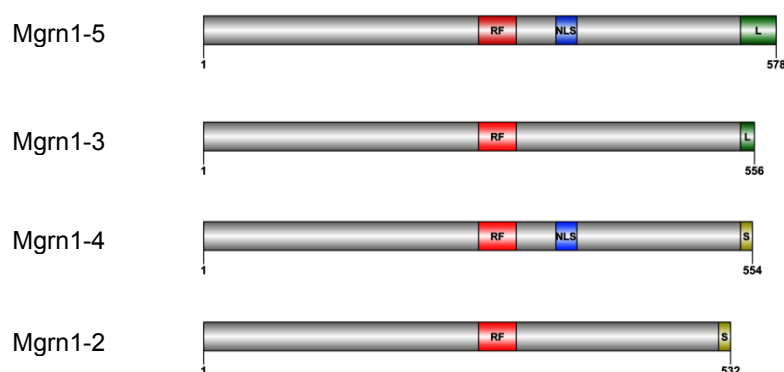
CAPÍTULO 4

Estudio de nuevas dianas de MGRN1.
Análisis mediante la tecnología de hibridación
diferencial de micromatrices de ADN.

INTRODUCCIÓN

Ya hemos expuesto en la introducción de esta Tesis y en el capítulo anterior que MGRN1 es una E3-Ub ligasa que participa en el fenotipo normal del patrón de color del pelo, al menos en ratón. Mutaciones naturales inactivadoras de este gen, como *md* o *mahoganoide*, generan ratones de pelaje oscuro, en los que aparecen además desórdenes neurológicos, malformaciones en el corazón y alta letalidad embrionaria.

El gen de Mgrn1 mapea en el brazo corto del cromosoma 16 del ratón. En la base genómica Ensembl.org existen anotados cinco transcritos que codifican para 5 isoformas proteicas denominadas Mgrn1-1 a Mgrn1-5 (Esquema 1). Las formas Mgrn1-1 y Mgrn1-2 se diferencian únicamente en que la segunda contiene una inserción de una Ala en posición 30. Las formas 1 y 3 se diferencian en la secuencia C-terminal. Las formas 4 y 5 se diferencian entre sí en la secuencia C-terminal (la forma 1 es como la 4 y la forma 3 es como la 5). Por otro lado, las formas 4 y 5 poseen un péptido de 22 aminoácidos que contiene una NLS canónica (codificados en el exón 12), del que carecen las formas 1 y 3. Las cinco isoformas contienen el exón 10, que codifica una secuencia peptídica correspondiente a un dominio proteico *RING finger*. La presencia de este dominio clasifica a MGRN1 como una *E3-ubiquitina ligasa*.



Esquema 1: Representación lineal de las isoformas de Mgrn1 de ratón. Se destaca el dominio *RING finger* (en rojo), la presencia o no del péptido que contiene la NLS (en azul) y el extremo C-terminal diferente entre variantes L o S (en dos tonos de verde).

La estructura general de las Mgrn1 murinas es idéntica a la de las isoformas MGRN1 humanas, cuyo esquema está en el capítulo 3 de esta Tesis. La diferencia en la secuencia de aminoácidos entre las formas humanas y de ratón es tan solo de unos 30 cambios puntuales, por lo que *a priori* se supone que desempeñan una función muy similar o idéntica. Nuestro grupo ha demostrado que MGRN1 humana es un regulador negativo de la señalización por MC1R que disminuye la acumulación de AMPc

intracelular en respuesta a melanocortinas. Además, nuestros resultados descartan que MGRN1 sea *E3-ubiquitina ligasa* de MC1R. Sin embargo, hemos demostrado que MGRN1 ubiquitina tanto a ARRB1 como ARRB2, proteínas que regulan la endocitosis de MC1R (esta Tesis, Capítulo 3). En nuestro sistema experimental (las células de melanoma humano HBL y las células HEK-293T), la co-expresión del complejo ternario MC1R/MGRN1/ARRB2 es suficiente para que tenga lugar la poliubiquitinación de ARRB2. Estos resultados no excluyen que puedan existir otras dianas fisiológicas de MGRN1, que contribuirían a explicar el complejo fenotipo del ratón *mahoganoide*. Como se ha expuesto arriba, algunas isoformas de MGRN1 (humana y murina) contienen señales de tráfico nuclear (NLS), por lo que se podrían localizar en el núcleo. Nuestro grupo ha demostrado que, aunque MGRN1 humana es una proteína citosólica, las isoformas que contienen la NLS se translocan al núcleo en células que expresan MC1R (Tesis Doctoral de Ana B. Pérez-Oliva).

Ello nos hace pensar que MGRN1 podría regular algunas funciones nucleares, quizás relacionadas con la expresión y actividad de factores de transcripción u otras proteínas. De este modo, modularía la expresión génica de los melanocitos y también de células del corazón y sistema nervioso (entre otras), lo que podría explicar el fenotipo del ratón *mahoganoide*.

Con la finalidad de buscar posibles dianas de MGRN1 en los melanocitos, empleamos la tecnología de hibridación de micromatrices o *microarrays* para poder analizar la expresión génica diferencial entre células que expresan cantidades muy diferentes de MGRN1. Para ello, partimos de dos modelos diferentes:

- 1- Células de melanoma humano HBL que sobreexpresaran MGRN1, cuya expresión génica se pudiera comparar con las células parentales con una expresión endógena de MGRN1.
- 2- Melanocitos de ratón mutantes naturales del gen *Mgrn1* (melan md1) que no expresan la proteína, para poderlas comparar con células normales de la misma estirpe de ratón.

4.1. Análisis de expresión génica diferencial en células HBL humanas que sobreexpresan MGRN1.

Purificamos la población de ARNm de células de melanoma HBL que sobreexpresaban la variante de MGRN1 L(+) o L(-) (correspondientes a las isoformas murinas 5 y 3 respectivamente) y el ARNm de las células control (n=3 para cada condición). Siguiendo las recomendaciones del fabricante de la matriz, sintetizamos, amplificamos e hidrolizamos el cDNA resultante. Mediante análisis por *Western blot* verificamos la sobreexpresión de las dos isoformas de MGRN1 respecto a las células control (Figura 1, paneles A y B). Este análisis no nos da información sobre el porcentaje de las células que expresan el plásmido, aunque sí nos informa del aumento general de la expresión. En cualquier caso, esta aproximación debe proporcionar una población mixta de células que, o bien no expresan MGRN1 heteróloga, o bien la expresan en cantidades variables. También comprobamos, mediante amplificación por PCR convencional con oligonucleótidos específicos, que la muestra de cDNA contenía fragmentos de secuencia de MGRN1 (Figura 1, panel C) y que, tras la digestión del cDNA, la muestra conservaba alguno de estos fragmentos (Figura 1, panel D). Tras la realización de estos controles, procedimos a hibridar las sondas de una micro matriz de expresión génica (matriz "Human Gene 1.0" de Affimetrix, con aproximadamente 30.000 sondas de exones humanos) con nuestras muestras.

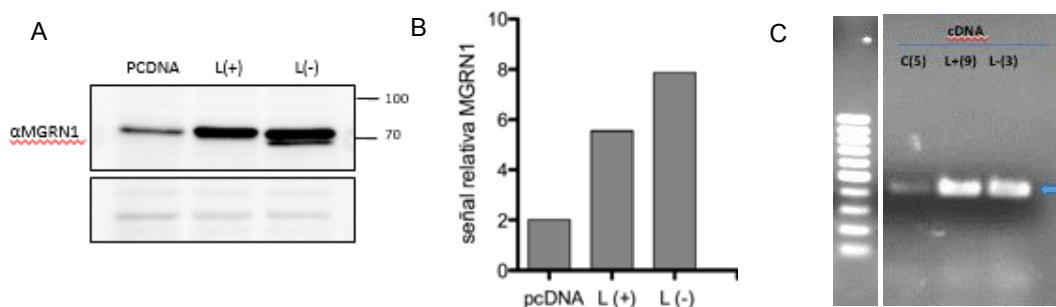
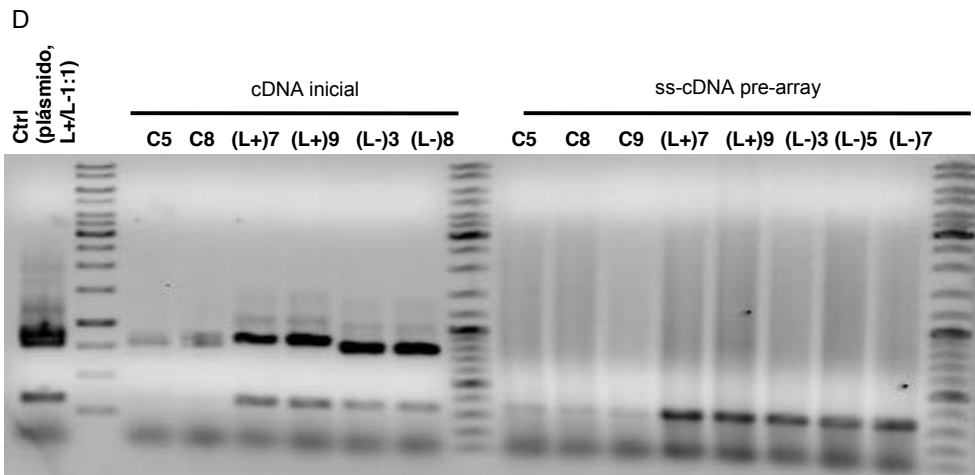


Figura 1: Expresión de MGRN1 en las células HBL empleadas para el análisis de expresión génica diferencial. Los paneles A y B muestran el nivel de sobreexpresión relativa de las isoformas de MGRN1 exógenas en las células HBL respecto a la línea parental. El panel C muestra el resultado de la amplificación por PCR convencional de las muestras de cDNA usadas para la hibridación diferencial. Para ello se utilizaron condiciones estándar de amplificación por PCR y los directo 5'-TCCAGGCGAACTCGGCCTATCGCTA y reverso 5'-TGGCTCACCCCTCTTGTAGTGGA. Tras 30 ciclos de amplificación por PCR la muestra se analizó por electroforesis de agarosa y se tiñó con bromuro de etidio. Como se puede observar, aparece una banda de 457 nt (flecha azul) que corresponde al fragmento de MGRN1 amplificado, que es más intensa en las calles donde están las muestras de HBL que sobreexpresan MGRN1.



El panel D muestra los resultados de la amplificación por PCR convencional de fragmentos de cDNA de MGRN1 de varias muestras que sobreexpresaban MGRN1 (isoformas L+ y L-), antes y después de digerirlo, con 30 ciclos de amplificación por PCR y los cebadores 5'-ACGAGCTGAACTTTGACCTGG y 5'-GGATGGGGCAGACGGGGACCGTAGG. Los amplicones de 820 nt (formas (+) / 750 nt (formas (-) y 330 nt (todas) corresponden al cDNA de MGRN1 antes y después de digerirlo.

La lectura de la fluorescencia de cada posición de la matriz nos da un valor relativo de expresión de cada gen. Si comparamos la intensidad en cada punto de la matriz hibridada con la muestra de cDNA procedente de las células que sobreexpresan MGRN1, con la de la que se hibridó con el cDNA de las células HBL control, obtenemos, para cada gen, un valor de factor de cambio (*fold change*, fch) o relación del nivel de expresión. Ese valor es indicativo del aumento o disminución de nivel de expresión de cada gen entre las condiciones comparadas. En nuestro caso, el cambio en el nivel de expresión génica general en las células que sobreexpresaban MGRN1 respecto al grupo de células control no fue muy alto, es decir, los valores absolutos de fch fueron menores de 10 en todos los casos. Probablemente estas diferencias modestas se deben a que la eficiencia de transfección no supera el 25 % y, en consecuencia, solo conseguimos una sobreexpresión de MGRN1 en una población minoritaria de células.

A pesar de la sobreexpresión moderada de MGRN1, el análisis de los valores de fch para los genes cuyo resultado es estadísticamente significativo (valor de $p < 0.05$) mediante el software IPA (*Ingenuity Systems*) nos informó de que existe una transcripción génica diferencial en las dos poblaciones celulares ensayadas (Figura 2). Según este análisis preliminar, la sobreexpresión de MGRN1 afectaría a procesos como la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, a algunas vías de transducción de señales características de factores de crecimiento, ubiquitinación e incluso a la regulación de la progresión del ciclo celular. Estos procesos podrían estar relacionados, en principio, con la base molecular del fenotipo del ratón *mahoganoide*.

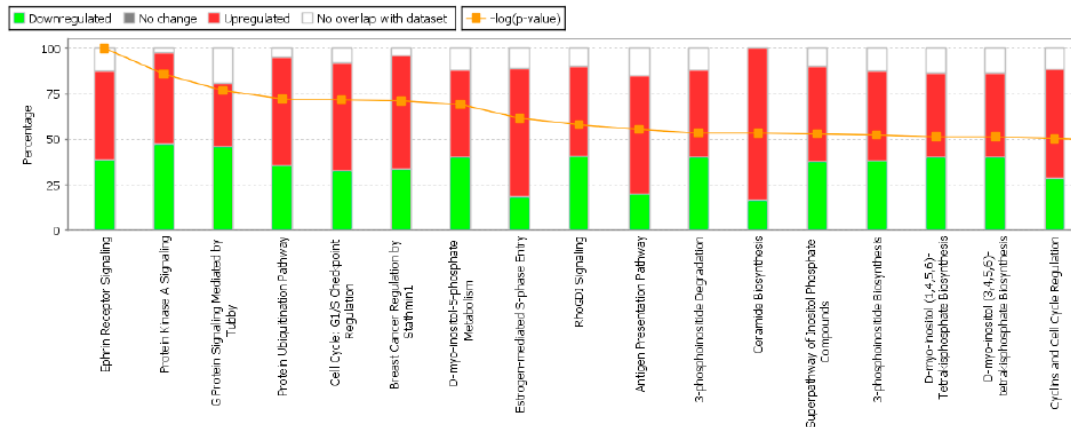


Figura 2: Principales eventos celulares cuya transcripción estaría regulada por la sobreexpresión de MGRN1. En verde y rojo se indica la proporción relativa de genes dentro de cada vía que estarían reprimidos o activados por la sobreexpresión de MGRN1, según el software de análisis de expresión génica diferencial IPA (*Ingenuity Systems*).

Sin embargo, el valor estadístico de estos resultados no es suficientemente robusto, tal y como se observa en el diagrama de barras de la figura 3, que nos indica que el cambio del nivel de expresión génica global entre las dos muestras analizadas no es muy relevante.

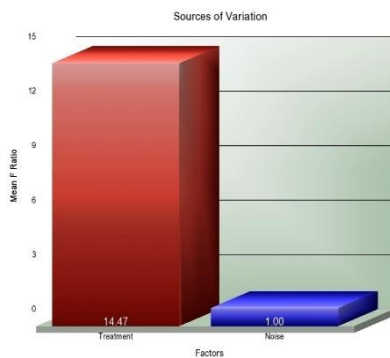


Figura 3: Representación de barras de la variación de expresión génica general de las dos muestras ensayadas (según el análisis con el programa *Partek Genomics Suite* de los resultados de fch obtenidos para los genes con un $p < 0,05$). “Treatment” corresponde a la muestra que sobreexpresa MGRN1, referido al nivel de expresión génica basal en las células control.

Para mejorar la significancia de los resultados necesitábamos partir de una población celular en la que un porcentaje lo más cercano posible al 100% sobreexpresara MGRN1 respecto a las células control. Por ello, recurrimos al estudio de expresión diferencial en la línea de melanocitos de ratón MGRN1^{mg-nc} (melan md1), nula para la expresión de MGRN1, respecto a la línea de melanocitos de ratón normales (células melan a6) derivada de la misma estirpe de ratón. Ambas proceden de animales *Ink4a-Arf*^{+/+} para facilitar su crecimiento y proliferación en las condiciones de cultivo *in vitro*.

4.2. Análisis de expresión génica diferencial en melanocitos murinos melan a6 vs melan md1

Procedimos de forma similar a la descrita en el apartado anterior. Hibridamos las poblaciones de ADNc hidrolizado (obtenido a partir del ARN de ambas líneas de melanocitos) con las micromatrices de Affimetrix “Mouse Gene 2.1”. Los resultados preliminares se sesgaron por un valor de fch de +/-1,5 y de $p < 0,05$. Globalmente son de un alto valor significativo, ya que indican un fuerte efecto de Mgrn1 sobre la expresión génica general (según se deduce de la gráfica de barras, Figura 4, panel A), en la que el tipo corresponde al valor de expresión génica de las células melan md1, carentes de Mgrn1, en relación con las células control. En comparación con el *array* anterior, observamos un fuerte efecto de Mgrn1 sobre el transcriptoma de las células melan a6 respecto a las melan md1. También observamos que son varios miles de genes (alrededor de 4000) los que poseen una expresión diferencial, como muestra la representación Vulcano (Figura 4, panel B). Este segunda representación predice, igualmente, un fuerte efecto de la ausencia de expresión de Mgrn1 en la línea melan md1 sobre la expresión génica general. Estas dos gráficas corroboran que la expresión génica de la población de células analizada es muy homogénea dentro de cada grupo y muy distinta entre grupos (Figura 4).

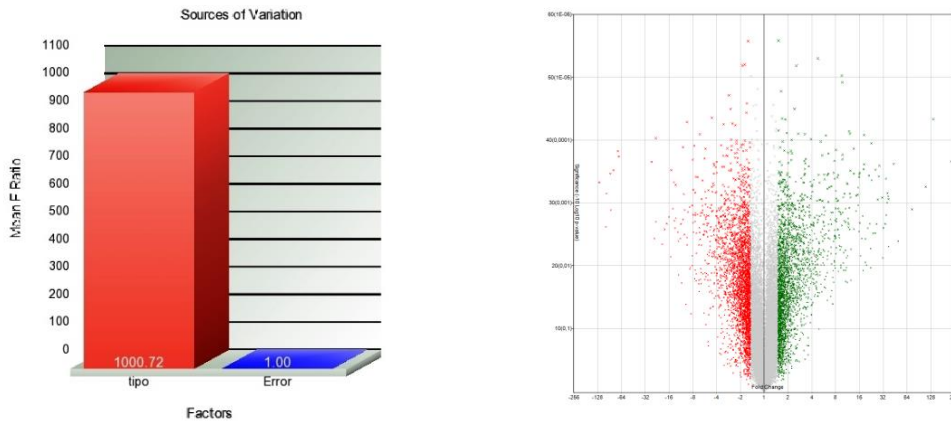


Figura 4: Análisis de expresión génica diferencial en matriz mouse 2.1 Array Strip (Affymetrix) tras hibridación de la población de cDNA de células melan a6 y melan md1 (deprivadas de suero bovino fetal y TPA durante 24 h). El histograma del panel de la izquierda representa la media de la señal respecto al control de la expresión diferencial de todos los genes, entre los grupos comparados. El valor se obtiene al aplicar el modelo ANOVA a los resultados de la hibridación. La representación de la derecha corresponde al diagrama Vulcano de la expresión génica diferencial que cumpla el requisito de poseer un valor de fch de +/- 1,5 y un $p < 0,05$. Los puntos verdes representan los genes cuya expresión es superior en la línea melan md respecto a la línea control y los puntos rojos son los genes cuya expresión disminuye en la línea mutante respecto a la control. Las dos gráficas se obtuvieron con el software *Partek Genomics Suite*.

El análisis preliminar de los datos de expresión génica diferencial se realizó empleando el software *Partek Genomics Suite*, incluyendo los genes con un $p < 0.05$ y un cambio de expresión mayor o menor que $+ 1.5$ o $- 1.5$, respectivamente. Los resultados preliminares indican que el fuerte efecto de *Mgrn1* sobre la expresión génica agrupa a genes que participan en vías importantes para la regulación del ciclo celular, concretamente, señala que el 70 % de los genes que participan en la replicación del ADN tienen una expresión génica diferencial en las dos líneas (Tabla 1).

Pathway Name	Enrichment Score	Enrichment p-value	% genes in pathway that are present
DNA replication	26,4659	3,21E-12	70,5882
Cell cycle	26,4148	3,37E-12	42,1875
Metabolic pathways	16,1485	9,70E-08	21,7213
Mismatch repair	14,7986	3,74E-07	66,6667
Pyrimidine metabolism	14,7492	3,93E-07	36,8932

Tabla 1: Relación de los 5 procesos celulares más relevantes, que agrupan los genes modificados diferencialmente en las células melan md1 respecto a las melan a6, que poseen mayor grado de enriquecimiento (mayores valores de *enrichment score*).

El reagrupamiento de los genes en estas rutas celulares concretas fue confirmado tras un nuevo análisis de los datos con otro software (*MetaCore*, de Thomson Reuters). La Figura 5 muestra las rutas más probables que mejor agrupan a los genes con expresión diferencial. Como se observa, el análisis de nuevo apunta a genes muy relacionados con la progresión y regulación del ciclo celular.

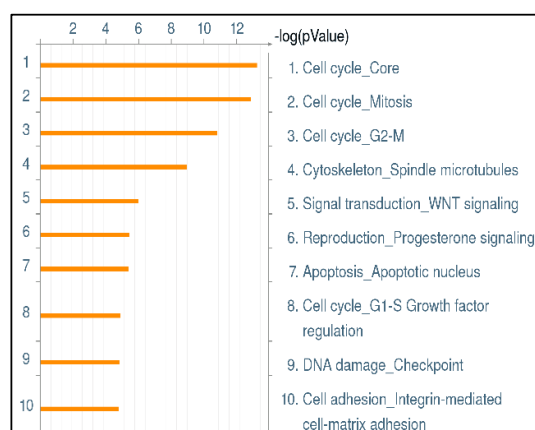


Figura 5: Relación de los 10 procesos celulares más probables que agrupan a los genes con mayor expresión diferencial en las células melan md1 y melan a6.

Aunque está ausente en este listado de eventos celulares, podemos suponer también una expresión diferencial importante de genes relacionados con el fenotipo de pigmentación del ratón, dado el carácter fuertemente diferenciado y el grado de melanización de los melanocitos melan md1 en relación a la línea parental melan a6 (Figura 6). El hecho de que no aparezca la ruta entre las señaladas como más probables

puede ser debido, únicamente, a que la ruta de pigmentación no está incluida en la información del programa de análisis.

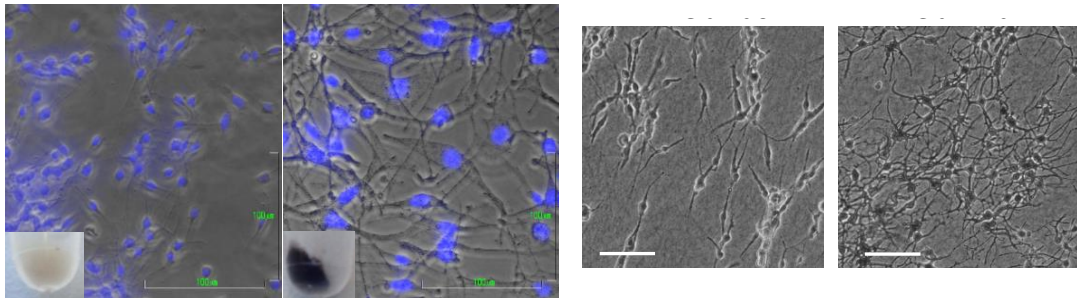


Figura 6: Micrografías de las líneas celulares de ratón melan a6 (control) y melan md1 (*mahoganoide*). Las imágenes de la izquierda contienen un inserto con el detalle de la hiperpigmentación del pellet celular de melan md1 en relación a las células control y tienen los núcleos marcados con DAPI. En las de la derecha se puede observar la diferencia en longitud y número de las dendritas.

4.3. Validación funcional preliminar del patrón de expresión diferencial de genes de proliferación. Análisis de la velocidad de proliferación de las células melan md1 y melan a6.

El hallazgo de una expresión diferencial de genes de ciclo celular sugiere importantes diferencias en la velocidad de proliferación de los melanocitos murinos en función del nivel de expresión de *Mgrn1*. Una forma rápida y precisa para abordar si existe alguna alteración relevante en el ciclo vital de una línea celular es analizar su velocidad de proliferación mediante el cálculo del tiempo de duplicación o *doubling time*. Por eso, para confirmar la predicción de los programas *Partek Genomics Suite* y *MetaCore*, que señalan que, de los 10 eventos celulares representativos de la expresión génica diferencial de las células melan md1 respecto a las melan a6, los 8 primeros están relacionados de algún modo con el ciclo celular, calculamos la velocidad de duplicación de las dos líneas celulares. Las células se sembraron en placas de 12 pocillos (25.000 células aproximadamente) y se mantuvieron en las condiciones de cultivo estándar (RPMI en presencia de 10 % de SBF y TPA a 37 °C y 10% de CO₂). Cada 24 horas aproximadamente, se recogieron y se contaron las células contenidas en cada pocillo, mediante contaje en cámara de Neubauer, previa incubación de las células con azul tripano. Procedimos de modo paralelo en las dos líneas celulares (triplicados para cada punto de tiempo). Los tiempos de duplicación se calcularon a partir de la representación y ajuste de los datos del recuento del número de células en la placa a los distintos tiempos con el programa *GraphPad* (Figura 7), para un valor de n=3.

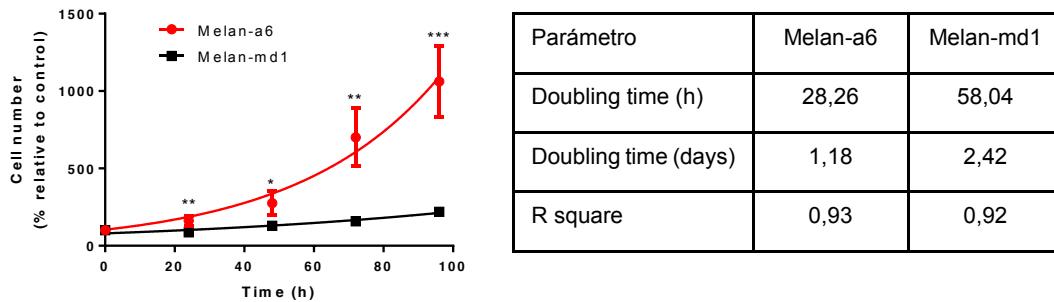


Figura 7: Cálculo del tiempo de duplicación de los melanocitos melan a6 y melan md1 tras ajustar los datos experimentales con el software *GraphPad*. Como se puede observar, para que se divida la línea melan md1 necesita el doble de tiempo que el de la línea control melan a6.

Los valores del tiempo de duplicación obtenidos de las curvas de crecimiento se corresponden muy bien con la diferencia en la velocidad de proliferación celular que ya habíamos observado, menor para la línea melan md1 que para las melan a6. Estos resultados confirman la existencia de una parada o impedimento de la progresión del ciclo celular, plenamente consistente con las tablas de las rutas de los genes con expresión diferencial.

4.4 Análisis de la expresión de genes reguladores del ciclo celular de las células melan md y melan a6.

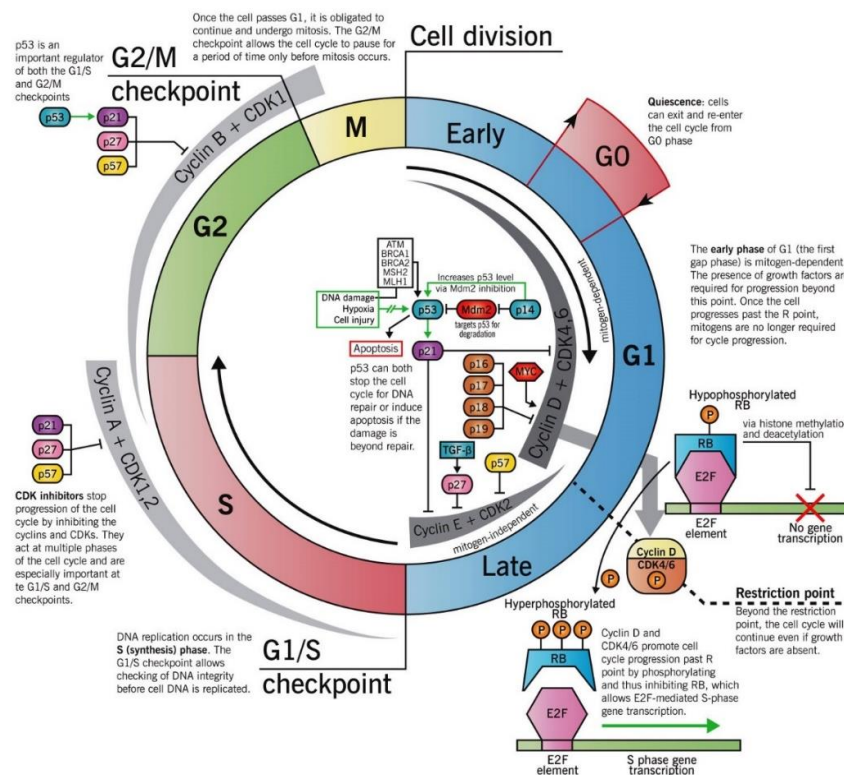
El ciclo celular de una célula eucariota somática se clasifica a grandes rasgos en cuatro etapas: G1 (fase gap1), en la que la célula crece y se prepara para la fase de replicación, o fase S (fase de síntesis). A continuación tiene lugar la fase G2 (gap2), en la que se prepara para la mitosis o fase M (ver Esquema 2). Al terminar la mitosis, cada célula se habrá dividido en dos células hijas, previo reparto equitativo de la dotación genética y el ensamblaje de dos núcleos funcionales. La progresión a través de este ciclo celular determina la tasa de proliferación o tiempo de duplicación celular. Por eso, el crecimiento y mantenimiento normal de los tejidos de un organismo pluricelular depende, en gran medida, de la estrecha regulación de la progresión de su ciclo celular.

La oscilación en la actividad de las Cdks (quinasas dependientes de ciclina) es la base de la consecución completa de cada etapa del ciclo celular ¹. La actividad de estas Cdks está determinada, aparte de por su expresión, por su asociación con proteínas reguladoras positivas y negativas, así como por mecanismos de fosforilación reversible. La síntesis y degradación periódica de las ciclinas (reguladores positivos), por un lado, y de proteínas inhibitoras (familia Cdkn), por otro, determina unos patrones de

expresión temporal característicos a lo largo del ciclo que, en definitiva, regulan el equilibrio de activación de las Cdks, lo cual conduce a una proliferación celular normal.

En los mamíferos existen complejos ciclina/Cdk específicos para cada fase del ciclo: ciclina D/Cdk4 (o Cdk6) para la progresión de la fase G1; ciclina E/Cdk2 para la transición G1/S; ciclina A/Cdk2 para la progresión por la fase S. Además, son necesarios los complejos ciclina A/Cdk1 y ciclina B/Cdk1 para la entrada en fase M¹. Obviamente, existen mecanismos de control que velan por la oportunidad de la transición G1/S (punto de restricción y G1/S *checkpoint*) en los que participan los inhibidores de Cdk4 Cdkn2a, Cdkn2b, Cdkn2c y Cdkn2d (p16, p15, p18 y p19, respectivamente) así como Cdkn1a, Cdkn1b y Cdkn1c (p21, p27 y p57), inhibidores de Cdk2 (Esquema 2).

La actividad kinasa de los complejos ciclina D/Cdk4 (o Cdk6) y ciclina E/Cdk2 permite, en última instancia, que tenga lugar la replicación del DNA celular (fase S). De hecho, estos complejos activos fosforilan a la familia de proteínas del retinoblastoma (Rb, p107 y p130)^{2, 3}. Rb no fosforilado une con alta afinidad a los factores de transcripción de la familia de E2f (E2f1 a E2f8), reguladores de la transcripción de genes de la fase S. Sin embargo, una vez que Rb está hiperfosforilado pierde afinidad por E2f, o lo que es lo mismo, Rb queda inactivo y E2f se activa⁴.



Esquema 2: Fases del ciclo con anotación de las principales proteínas reguladoras (adaptado de Eric Wong. *Introduction to neoplasia*. McMaster Pathophysiology Review).

E2f libre de Rb se asocia con el factor de transcripción Dp1 y ambos inducen la transcripción de genes necesarios para la entrada y el inicio de la fase S⁵. Entre ellos, ciclina E y Cdk1. Los complejos ciclina D/Cdk4 y ciclina E/Cdk2 son necesarios, a su vez, para la expresión de ciclina A, que al igual que la ciclina E, es un regulador de la actividad de Cdk2. De hecho, el complejo ciclina A/Cdk2 fosforila a E2f durante la fase S, lo que contribuye a modular su actividad transcripcional⁴

La progresión por G2/M es dependiente de la activación del complejo ciclina B/Cdk1 en el núcleo¹. Es más, no sólo es imprescindible la expresión de ambas y la localización subcelular nuclear sino también la fosforilación de Cdk1. Existe en esta etapa del ciclo un punto de control que determina si la célula está lista para llevar a cabo la mitosis (*G2/M checkpoint*), mediado por la actividad transcripcional del supresor tumoral Tp53. La inducción de Cdkn1a, Cdkn1b y Cdkn1c (p21, p27 y p57, respectivamente) contribuye a frenar el ciclo en caso necesario en este punto. El Esquema 2 ilustra de modo resumido el lugar de participación de los principales reguladores de cada etapa del ciclo celular.

A partir de nuestros resultados del *array* de expresión diferencial, confirmamos que la expresión de genes relacionados con el ciclo celular está reprimida en las células melan md1. Esta disminución de expresión en genes claves del ciclo explica la diferencia de los valores del tiempo de duplicación calculados por nosotros. La Tabla 2 muestra los valores de fch de algunos de los principales genes del ciclo celular, ordenados por familias, tras sesgar los resultados del *array* por un $p < 0,05$ y fch +/- 1,5 y que posean las mayores variaciones de expresión.

Kinasas dependiente de ciclinas	Gen	FCH	P valor
cyclin-dependent kinase 6	Cdk6	-6,409	1,5E-03
cyclin-dependent kinase 18	Cdk18	-3,506	1,1E-02
cyclin-dependent kinase-like 5	Cdkl5	-1,353	5,3E-03
cyclin-dependent kinase 1	Cdk1	-2,355	2,8E-02
cyclin-dependent kinase 7	Cdk7	-1,701	2,8E-02

Ciclinas	Gen	FCH	P valor
cyclin E2	Ccne2	-5,630	1,3E-02
cyclin E1	Ccne1	-3,613	1,1E-02
cyclin D1	Ccnd1	-3,328	5,4E-04
cyclin A2	Ccna2	-2,115	4,8E-04
cyclin F	Ccnf	-1,977	2,4E-02
cyclin B2	Ccnb2	-1,857	3,8E-02

Inhibidores de CDKs	Gen	FCH	P valor
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	Cdkn3	-1,846	2,9E-03
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	Cdkn1a	-1,717	1,7E-02
cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19)	Cdkn2d	-1,627	8,7E-02
cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)	Cdkn2b	1,338	1,2E-01
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)	Cdkn2a	2,420	5,2E-02

Rb	Gen	FCH	P valor
retinoblastoma binding protein like 1	Rbl1	-2,241	6,0E-03
retinoblastoma binding protein 8	Rbbp8	-1,847	5,8E-03
retinoblastoma binding protein 6	Rbbp6	-1,607	4,5E-02
retinoblastoma 1	Rb1	-1,593	3,9E-03

E2F	Gen	FCH	P valor
E2F transcription factor 8	E2f8	-5,300	2,4E-03
E2F transcription factor 2	E2f2	-3,775	2,0E-03
E2F transcription factor 1	E2f1	-3,488	5,4E-03
E2F transcription factor 3	E2f3	-3,306	2,1E-04
E2F transcription factor 7	E2f7	-3,140	4,8E-03
E2F transcription factor 5	E2f5	-1,267	1,0E-01
transcription factor Dp 1	Tfdp1	-4,109	7,4E-04

Tabla 2: Valores de fch y p de los genes reguladores del ciclo celular con mayor variación. Se muestran los valores del cambio del nivel de expresión (fch) con indicación de si se trata de una disminución (valores negativos) o un aumento de la expresión (valores positivos) del gen concreto en la línea melan md1 respecto a la línea control. Además, se indica también el valor p de dicho cambio. En rojo se indican los genes cuya expresión disminuye, y en verde aquéllos cuya expresión aumenta.

Como se puede observar, la transcripción de un número sorprendentemente alto de genes de Cdk's y de ciclinas está reprimida en las células melan md1. Además, la expresión tanto del factor de transcripción E2F como de su coactivador transcripcional DP1 está también disminuida, por lo que podemos anticipar que las células melan md1 tendrán dificultades para entrar y progresar por la fase S del ciclo, pues estos dos factores de transcripción regulan la expresión de un gran número de genes importantes para la fase S⁵.

Para validar de modo general los resultados de un *array*, es conveniente confirmar mediante q-PCR la expresión diferencial de algunos genes, para comprobar que, al menos, el sentido del cambio del fch se conserva. Por ello, en un primer análisis, elegimos algunas de las dianas implicadas en el ciclo celular y diseñamos oligonucleótidos de RT-qPCR específicos de ciclinas (Ciclina D1, Ciclina E1, Ciclina A2) y kinasas dependientes de ciclina (Cdk4, Cdk6, Cdk1). Comprobamos las eficiencias de

hibridación de los oligos, mediante amplificación de diluciones seriadas del cDNA de células melan a6 (obtenido de la misma población de ARN analizada en el *array*). Los resultados del porcentaje de eficiencia de alineamiento de los oligonucleótidos usados de cebadores se muestran en la Tabla 3. A continuación, calculamos la variación de la expresión de dichos genes (fch) en los melanocitos melan md1 respecto a las células control melan a6 por RT-qPCR (Tabla 3).

Gen	Mgrn1	Creb5	Cdk6	Cdk1	Ciclina D1	Ciclina E1	Ciclina A2	Tgfb2
Fold Change (array)	-7.53	-7.07	-6.41	-2.35	-3.33	-3.61	-2.11	2.11
Eficiencia primers (%)	97.5	83.0	95.0	63.0	103.0	96.0	135.0	93.0
Fold Change qPCR*	-12.0	-23.0	-8.1	-4.0	-6.2	-10.1	-4.6	47.4

Tabla 3: Validación de la expresión diferencial de algunos genes relacionados con la regulación y progresión del ciclo celular en eucariotas mediante RT-qPCR. *Las variaciones de la expresión se normalizaron considerando los genes de Mapk1 y Rpl35 como genes constitutivos, tras comprobar que están expresados de forma análoga en las dos líneas de melanocitos. Para calcular la variación de la expresión de cada gen, asignamos el valor de 1 al nivel de expresión de ese gen en las células melan a6.

Los resultados obtenidos validan la expresión diferencial observada para dichos genes en el *array*, y por extrapolación, validan los resultados del *array*.

4.5. Análisis de las etapas del ciclo celular de las células melan md y melan a6.

Los resultados expuestos hasta ahora indican que los melanocitos *mahoganoides* (carentes de Mgrn1) poseen una velocidad de proliferación inferior respecto a los melanocitos control. Además, sabemos que los genes de proteínas reguladoras del ciclo celular están menos expresadas en los melanocitos mutantes. Por eso, procedimos a analizar el perfil del reparto en las distintas fases del ciclo (G0/G1, S y G2/M) de la población celular de ambas líneas (Figura 8). El histograma correspondiente a las células melan a6 (panel de la izquierda) muestra una distribución en las distintas etapas del ciclo celular característica de células proliferativas, con un máximo de células en la fase G1 del ciclo (80,53 %) y menor porcentaje de células repartidas entre las fases S (15,73 %) y fase G2/M (3,74 %). El perfil para las células melan md1 fue completamente distinto y anómalo (panel del centro), con una gran retención de células en fase S (90,15 %) y menos células en fase G0/G1 (7,10 %). El porcentaje de células en fase G2 (2,75 %) fue, sin embargo, similar al de las células

control. Estos resultados sugieren una fuerte retención de las células melan md1 en la fase de duplicación del ADN (panel de la derecha).

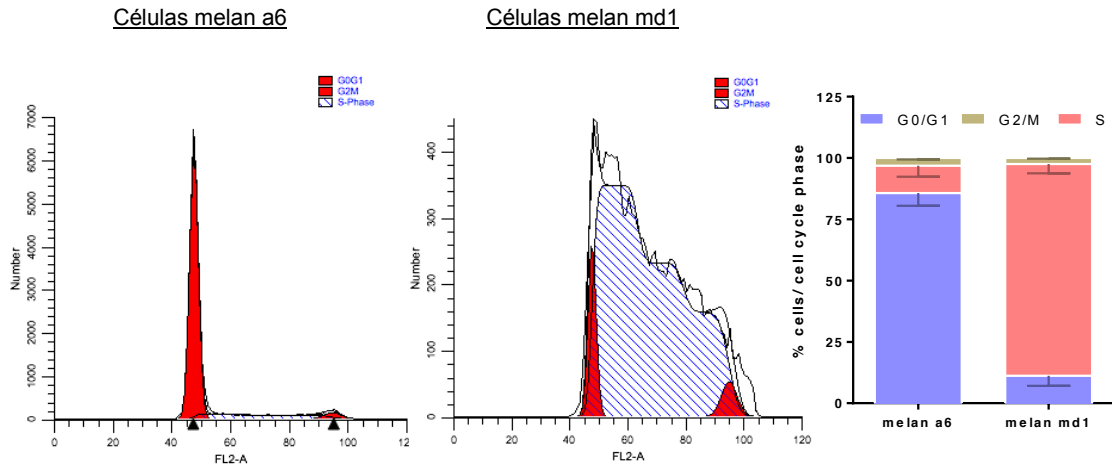


Figura 8: Análisis del ciclo celular de las células melan a6 y melan md1. Los paneles de la izquierda y del centro corresponden a los histogramas de fluorescencia obtenidos al analizar las dos líneas de melanocitos de ratón. El panel de la derecha representa el porcentaje de células de cada línea que a un tiempo dado se encuentra en cada una de las fases del ciclo indicadas. Los melanocitos de las dos líneas mantenidas en medio completo (10 % SBF y TPA) se fijaron con 70 % de etanol a 4° C y posteriormente se trataron con RNasa y se tiñeron con yoduro de propidio (30 minutos a 37° C). La población celular seleccionada (alrededor de 30.000 células) fue analizada mediante un citómetro FACScalibur y los resultados se representaron empleando el programa ModFit LT.

Es decir, las células que carecen de Mgrn1 tienen mucha dificultad para salir de la fase S de replicación hacia la mitosis.

4.6. Análisis de expresión de genes de fase S de las células melan md y melan a6.

El control primario de la división celular se ejerce tanto a nivel de la replicación del ADN celular como de la mitosis. Además de los genes de expresión temprana y algunos de respuesta tardía como ciclinas, CDKs, y proteínas reguladoras de su expresión y actividad, en la progresión de las etapas del ciclo participan tanto las proteínas y enzimas que dirigen la replicación del ADN⁶ como proteínas formadoras de microtúbulos (MT) y microfilamentos. Entre estas últimas, destacan los isotipos de tubulina III (α , β , γ) por su participación en la polimerización y el ensamblaje de los MT que configuran el huso acromático y el áster al terminar la replicación del ADN celular, en la etapa previa a la mitosis^{7,8}. El punto de control del ensamblaje del huso (abreviado SAC, del inglés *Spindle Assembly Checkpoint*) regula la entrada en anafase, por lo que los errores en la formación de estas estructuras provocan una retención de las células

en la fase S¹. Este complejo mecanismo detecta que el huso mitótico se ha formado correctamente, que todos los cromosomas están asociados a él de modo bipolar y que están alineados en la placa metafásica. En caso contrario, es decir, cuando concurren defectos en la estructura o composición de los MT del huso, del cinetocoro, de los centrómeros, o de la duplicación de los centrosomas, se detiene la mitosis y la célula activa los mecanismos de reparación para evitar una aneuploidía.

En el SAC participan proteínas de diferentes familias^{7, 8, 9, 10} que, de modo coordinado, intervienen para que la mitosis, y por lo tanto la proliferación celular, culmine con éxito. Entre ellas, destacan las proteínas estructurales de los MT, α -y β -Tubulinas (cuyas isoformas están codificadas por los genes TUBA y TUBB) y proteínas asociadas y reguladoras (familias Map, Mastl y enzimas como Cpa); proteínas estructurales y reguladoras del cinetocoro y del centrómero como las de la familia Cenp, Mad2 y Tpx y, por último, proteínas del ensamblaje del centrosoma y material pericentriolar como γ -tubulina y las de la familia Cep, Plk y Aurk.

La Tabla 4 muestra las mayores variaciones de expresión que hemos encontrado en algunos de los genes que codifican proteínas que participan en el SAC. Como en el caso de los genes de fase G1 (Tabla 2), una gran mayoría están reprimidos en las células *mahoganoides* (marcados en rojo), y sólo unos pocos activados (en verde).

Tubulina	Gen	FCH	P valor
tubulin, beta2a	Tubb2a	-2,992	1,8E-03
epsilon-tubulin 1	Tube1	-2,298	1,8E-01
tubulin, beta6	Tubb6	-2,105	5,9E-03
tubulin, beta3	Tubb3	-1,959	8,8E-04
tubulin, alpha1c	Tuba1c	-1,710	1,8E-02
tubulin, beta5	Tubb5	-1,606	1,8E-02
tubulin, gamma 2	Tubg2	2,288	6,7E-02

Centrosoma	Gen	FCH	P valor
centrosomal protein 55	Cep55	-4,34	2,7E-03
centrosomal protein 72	Cep72	-3,52	1,4E-03
centrosomal protein 78	Cep78	-2,38	1,1E-02
centrosomal protein 68	Cep68	-2,25	1,6E-02
centrosomal protein 104	Cep104	-1,94	2,1E-02
centrosomal protein 170	Cep170	1,86	7,5E-03
centrosomal protein 290	Cep290	2,88	8,5E-04

Proteínas asociadas	Gen	FCH	P valor
microtubule-associated protein 9	Map9	-1,765	3,5E-02
microtubule-associated protein 4	Map4	2,251	4,3E-03
microtubule-associated protein 1B	Map1b	5,561	9,0E-03

Centrómero	Gen	FCH	P valor
centromere protein H	Cenph	-7,251	2,9E-03
centromere protein K	Cenpk	-6,090	1,2E-03
centromere protein I	Cenpi	-3,651	2,4E-03
centromere protein N	Cenpn	-3,580	7,7E-03
inner centromere protein	Incenp	-3,268	2,1E-03
centromere protein W	Cenpw	-2,963	3,8E-02
centromere protein P	Cenpp	-2,308	8,4E-03
centromere protein E	Cenpe	-2,041	1,2E-03

Enzimas reguladoras	Gen	FCH	P valor
bora, aurora kinase A activator	Bora	-3,835	1,6E-02
aurora kinase B	Aurkb	-2,941	7,0E-03
aurora kinase A	Aurka	-1,995	3,0E-02
polo-like kinase 4	Plk4	-4,368	3,3E-03
polo-like kinase 2	Plk2	-3,510	2,5E-03
polo-like kinase 1	Plk1	-2,571	3,7E-03

Tabla 4: Valores de fch y p de algunos genes relacionados con el SAC. Se muestran los valores del cambio del nivel de expresión (fch) con indicación de si se trata de una disminución (valores negativos) o un aumento de la expresión (valores positivos) del gen concreto en la línea melan md1 respecto a la línea control. Además, se indica también el valor p de dicho cambio.

Con estos resultados de expresión génica, podemos anticipar que la célula *mahoganoide* va a tener muchas dificultades para poder orquestar la correcta organización de todas las estructuras del SAC. Por lo tanto, parece lógico que estas células necesiten más tiempo para completar su ciclo celular. Además, estos datos de expresión génica son totalmente consistentes con el fenotipo de retención en fase S observado para las células melan md1.

Llegados a este punto, es importante destacar varias cosas: 1) estudios recientes (Srivastava et al 2014, ¹¹) relacionan la actividad E3-Ub ligasa de MGRN1 con la poliubiquitinación de α -tubulina. Esta modificación postraduccional de α -tubulina podría participar de algún modo en la dinámica de los MT de tubulina, permitiendo, por lo tanto, la adecuada progresión desde la fase S del ciclo celular hacia la fase G2/M. 2) La ubiquitinación de los heterodímeros α/β de tubulina es un mecanismo al que recurren las células del sistema nervioso para evitar, por un lado, un exceso de heterodímeros α/β de tubulina libres (no incorporados a MT) y por otro, acúmulos de tubulina mal plegada. Este mecanismo protege a las células del sistema nervioso de la citotoxicidad inherente a un exceso de tubulina libre ¹⁰. 3) Parkina, una E3-Ub ligasa similar a Mgrn1, se asocia tanto a MT como a heterodímeros α/β de tubulina libres, y además cataliza *in*

in vitro la ubiquitinación de α/β tubulina ¹². 4) Las formas mutantes de Parkina encontradas en pacientes con la enfermedad de Parkinson (PD) no son capaces de ubiquitinar α/β tubulina ¹². Por lo tanto, cabría la posibilidad de que Mgrn1 tuviera cierta analogía funcional con Parkina y ubiquitinara también a las isoformas de tubulina, desempeñando alguna función en la dinámica de los MT.

Para poder verificar esta hipótesis, los datos de expresión génica, aunque informativos, no lo son tanto como los de expresión de las proteínas. De hecho, en la Tabla 4 vemos cómo la expresión de varias isoformas de tubulina está reprimida en las células melan md1 respecto a las células melan a6. Sin embargo, nuestros resultados preliminares sobre la expresión de las isoformas de tubulina muestran una gran diferencia entre la cantidad de tubulina β III (Tubb3) expresada en las dos líneas de melanocitos en la dirección contraria (Figura 9). Tras analizar el contenido de la isoforma III de tubulina β por Western blot con un anticuerpo específico vimos que las células melan md1 acumulan una gran cantidad de tubulina β III (peso molecular aparente de unos 55 kDa), a diferencia de los lisados celulares de melan a6. Además, observamos que el patrón electroforético de la banda correspondiente a tubulina β III es distinto, ya que en los lisados de células melan a6 se detectan bandas específicas correspondientes a tubulina β III de alto peso molecular y probablemente también fragmentos de la proteína, que no se aprecian en los lisados de melan md1.

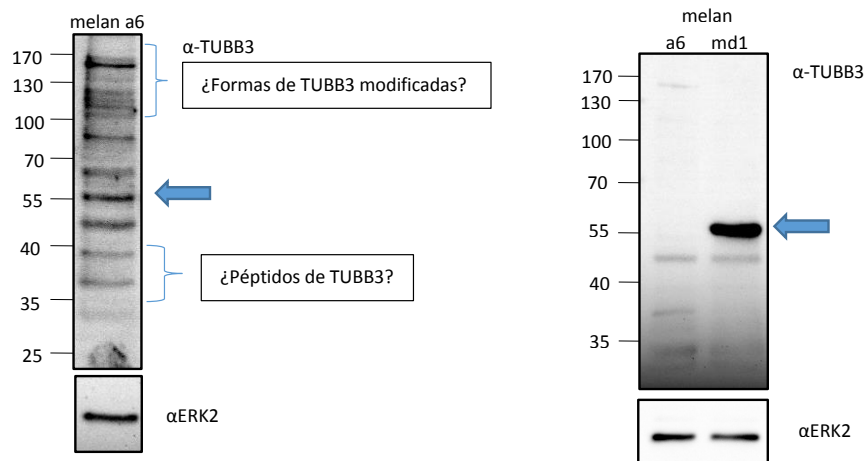


Figura 9: Análisis electroforético del patrón de expresión de tubulina β III (Tubb3) en las células melan a6 y melan md1. Las células fueron solubilizadas en tampón de lisis (Tris 50 mM pH 6,8 EDTA 1 mM 1% Igepal). 10 μ g del extracto fue separado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. La detección de las bandas de beta Tubb3 se realizó tras reconocimiento con el anticuerpo primario anti beta tubulina (α Tubb3).

Estos resultados de sobreexpresión de tubulina en las células melan md1 respecto a las melan a6 fueron confirmados mediante microscopía confocal utilizando el mismo anticuerpo, asociado a un anticuerpo secundario fluorescente. Las imágenes tomadas con el microscopio muestran una red de MT muy evidente en las células con fenotipo *mahoganoide* (Figura 10). De momento, desconocemos si el exceso de expresión de Tubb3 que observamos es similar para el resto de genes de tubulina β y/o para los de tubulina α .

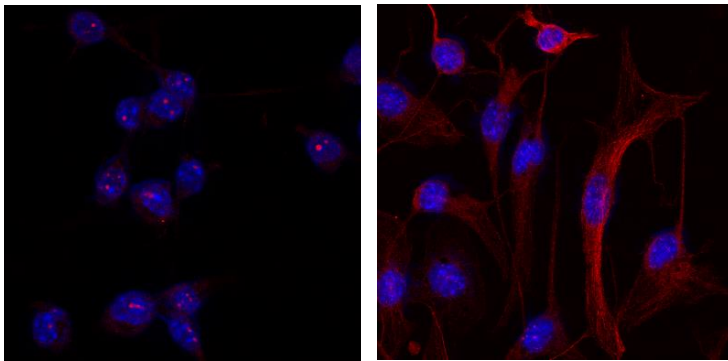
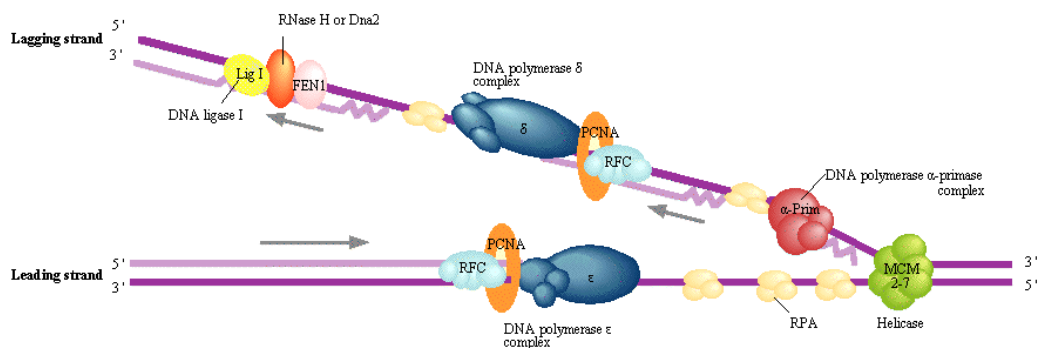


Figura 10: Micrografías obtenidas con el microscopio confocal en las que se marcó la proteína tubulina β III. A la izquierda, melan a6; a la derecha, melan md1.

Por lo tanto, los resultados expuestos indican que podría existir una regulación postraduccional de tubulina β III por Mgrn1. Los resultados sugieren que en las células melan md1, la falta de Mgrn1 ocasiona una ubiquitinación deficiente de tubulina β III que provoca su acumulación.

Por último, el análisis de la expresión génica diferencial de los genes que codifican tanto las enzimas que participan en la replicación y las proteínas asociadas (Esquema3) incluyendo las proteínas Orc, Cdt1 y Cdc6 que forman el complejo de prereplicación, nos indica que todos están reprimidos en mayor o menor medida (Tabla 5, genes indicados en rojo), a excepción de los tres últimos (genes anotados en verde).



Esquema 3: Conjunto de enzimas y proteínas que participan en el proceso de replicación del ADN en eucariotas, con indicación de si están unidos a la hebra líder o retardada.

Enzimas de la replicación	Gen	FCH	P valor
Helicasa	Mcm5	-4,378	2,8E-03
Helicasa	Mcm2	-4,049	2,2E-03
DNA polimerasa d2	Pold2	-3,395	4,4E-03
Helicasa	Dna2	-3,216	4,3E-03
S-phase kinase-associated protein 2	Skp2	-3,139	1,6E-03
Ligasa	Lig1	-3,128	8,2E-03
DNA polimerasa a1	Pola1	-2,955	1,3E-04
DNA polimerasa e2	Pole2	-2,917	1,1E-02
Helicasa	Mcm3	-2,744	1,2E-02
Helicasa	Mcm6	-2,732	1,4E-03
DNA polimerasa e	Pole	-2,637	6,4E-03
Helicasa	Mcm7	-2,582	7,2E-04
Endonucleasa	Fen1	-2,529	1,1E-02
DNA polimerasa a2	Pola2	-2,390	1,1E-03
DNA polimerasa d1	Pold1	-2,377	7,5E-03
DNA primasa 1	Prim1	-2,355	1,0E-02
Helicasa	Mcm4	-2,229	1,4E-03
Proliferating cell nuclear antigen	Pcna	-1,986	2,3E-03
DNA primasa 2	Prim2	-1,721	1,8E-02
Rnase H	Rnaseh2c	-1,684	2,6E-02

Proteínas reguladoras	Gen	FCH	P valor
DNA replication factor Cdt1	Cdt1	-3.903	4,2E-03
replication factor	Rpa2	-3,684	5,1E-03
cell division cycle 6	Cdc6	-3,058	8,7E-03
cell division cycle 45	Cdc45	-2,806	2,5E-05
replication factor a3	Rpa3	-2,340	1,4E-02
Dbf4 Ring Finger	Dbf4	-2,116	1,5E-02
Origin recognition complex 6	Orc6	-2,073	2,1E-02
replication factor c5	Rfc5	-2,058	1,6E-03
cell division cycle associated 7	Cdca7	-2,044	1,2E-03
replication factor c4	Rfc4	-1,990	5,0E-02
cell division cycle 25A	Cdc25a	-1,934	8,9E-03
Growth Arrest DNA-Damage-Inducible, a	Gadd45a	2,536	5,0E-03
Growth Arrest DNA-Damage-Inducible, b	Gadd45b	4,686	7,0E-03

Tabla 5: Valores de fch y p de algunos genes relacionados con la replicación. Se muestran los valores del cambio del nivel de expresión (fch) con indicación del valor p de dicho cambio de las células melan md1 respecto a la línea control.

Los resultados expuestos anteriormente demuestran que las células con fenotipo *mahoganoide* tienen afectada la expresión de una proporción muy alta de genes relacionados con la progresión de fase G1 a fase S, de la propia fase S y del punto de

control de la entrada en mitosis o SAC. Consecuentemente, manifiestan una tasa de proliferación inferior a la de las células control melan a6 y una retención en la fase S del ciclo celular. Este fenotipo, que a su vez se relaciona con el fenotipo de diferenciación muy pigmentado, es consecuencia de la carencia de expresión de Mgrn1, una ubiquitina ligasa con dominio *RING* cuyas dianas responsables de todas estas alteraciones celulares son, de momento, desconocidas. Parece lógico pensar que esas dianas fuesen un número reducido de proteínas con un fuerte efecto sobre la expresión génica.

4.7. Factores de transcripción reguladores de la expresión génica en las células melan md1.

El análisis de los resultados del *array* con el programa *MetaCore* predice que los reguladores transcripcionales más probables que estarían regulando aguas arriba la expresión génica diferencial de las células melan md1 serían los que se muestran en la Tabla 6. De la veintena de reguladores transcripcionales propuestos, tras ordenarlos por el parámetro *z score* (indicador de mayor probabilidad de que el factor de transcripción esté involucrado), destacan c-Myc y Creb1 como los más probables, con una notable diferencia en ese parámetro sobre los inmediatamente siguientes.

Object name	Ratio	p-value	z-score
c-Myc	1.58	2.8 e-80	19.64
CREB-1	1.35	2.9 e-72	18.28
ZNF143	1.64	2.2 e-37	13.30
E2F1	1.67	1.1 e-32	12.41
Oct3/4	1.45	1.5 e-24	10.52

Tabla 6. Factores de transcripción seleccionados por el programa de análisis *MetaCore* como los reguladores transcripcionales diferenciales más probables en las células melan md1 respecto a las células melan a6.

Por eso, esta predicción apunta que c-Myc, Creb1 y E2f estarían implicados en la expresión diferencial de las células melan md1. Estos tres factores de transcripción son muy relevantes en el contexto de nuestros resultados por el importantísimo papel que desempeñan como reguladores de la expresión génica de muchos de los genes recopilados en las Tablas 2, 4 y 5. De hecho, el oncogén c-Myc se expresa en las células proliferativas del SNS y la epidermis durante el desarrollo del ratón. Su sobreexpresión se relaciona con diversos tumores¹³ y se considera junto con otros tres factores (Oct4, Sos2 y Klf4) el cóctel necesario para reprogramar las células diferenciadas en células pluripotentes. Regula la transcripción de multitud de genes en respuesta a mitógenos¹⁴, mediante la dimerización con otras proteínas (como Max) que contengan también el dominio unión al ADN *bHLH*. Por su parte, Creb1 es un factor de transcripción de expresión ubicua que, tras fosforilación mediada por mitógenos¹⁵, activa la transcripción

génica mediante su unión a los elementos de respuesta CRE, presentes en multitud de promotores de genes que se regulan por AMPc ¹⁶. En cuanto a E2f1, sabemos que regula la transcripción de los genes necesarios para la replicación del ADN ⁵. Nuestros resultados sugieren que la expresión y/o actividad de los tres será más baja en la línea que carece de Mgrn1. De hecho, confirmamos mediante análisis por transferencia Western que efectivamente, la expresión basal de c-Myc y Creb1 en la línea *mahoganoide* es inferior a la de la línea parental de melanocitos (Figura 11). Sería muy importante confirmar mediante la expresión de genes reporteros de ambas sus actividades en los dos tipos celulares, así como la expresión y actividad del factor de transcripción E2f1, objetivo que se está abordando en este momento.

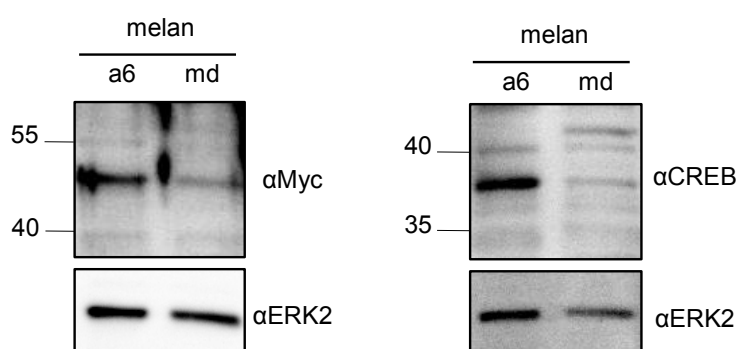


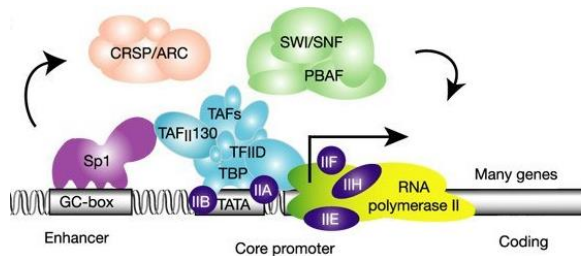
Figura 11: Resultado de la expresión basal de c-Myc y Creb1 mediante western blot de los lisados celulares de melan a6 y melan md1, empleando 10 µg de proteína total por calle y como anticuerpos primarios sc-764 y sc-58 (respectivamente) y un anti-rabbit conjugado con HRP como secundario.

Por último, Chhangani y colaboradores postularon en 2014 que Mgrn1 podría participar en la degradación de proteínas poliglutaminadas ¹⁷, evitando la agregación de proteínas con la señal de poliglutamina expandida. El ratón *mahoganoide* (md/md) desarrolla alteraciones neuronales similares a las de enfermedades producidas por priones y encefalopatía espongiiforme ¹⁸. Este fenotipo podría explicarse, al menos en parte, por un déficit de ubiquitinación de proteínas con secuencia de poliglutamina en las células del SNC que se acumularían al no degradarse y podrían terminar agregando y formando acúmulos de tipo amiloide. Entre las posibles proteínas candidatas, hemos considerado como muy probable el factor de transcripción Tbp (TATA *box binding protein*), por dos motivos: 1) es una proteína de 35 kDa poliglutaminada, con el motivo poliglutamina en su dominio amino terminal (ver secuencia en figura 12).

MDQNNLPPYAQGLASPOGAMTPGIPIFSPMPYGTGLTPQPIQNTNSLSILEEQQRQQQQQQQQQQQQQ
 AVATAAASVQQSTSQQPTQGASGQTPQLFHSQTLTAPLPGTTPLYPSPMTPMTPITPATPASESSGIVP
 QLQNIIVSTVNLGCKLDLKTIALRARNAEYNPKRFAAVIMRIREPRTTALIFSSGKMVCTGASSEEQSRLA
 ARKYARVVQKLGFPKFLDFKIQNMVGSQDVKFPRIREGLVLTHTQQFSSYEPELFPGLIYRMIKPRIVLL
 IFVSGKVVLTKAKVRAEIEYAFENIYPIILKGRKTT

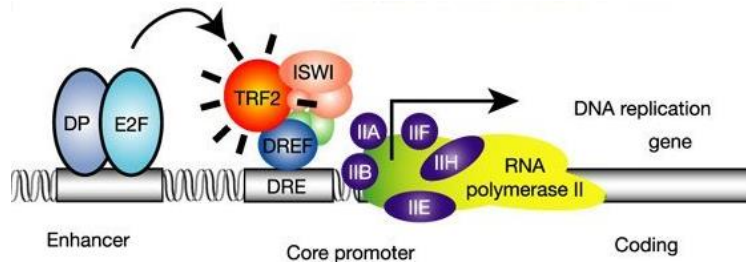
Figura 12: Secuencia de aminoácidos de la proteína de ratón *TATA box binding protein* (Tbp) del ratón, en la que se aprecia el péptido poliglutinado, o motivo rico en glutamina (subrayado en amarillo). La proteína humana es muy similar, con un motivo de poliglutamina más largo. La expansión de esta secuencia de poliglutamina está asociada con un desorden neurológico degenerativo llamado ataxia espinocerebelar. La Lys 202 (marcada en verde) posee una alta probabilidad de ser ubiquitinada (según el programa Ubpred.org, de predicción de Lys ubiquitinables)

2) Es un regulador transcripcional de una gran cantidad de genes de las células somáticas ¹⁹, por lo que un exceso o una carencia del mismo tendría un fuerte efecto sobre la expresión génica. Esta proteína regula la transcripción de genes de tipo II (aquellos que dan lugar a un ARNm traducible a proteína, transcritos por la ARN polimerasa II) mediante la unión a la caja TATA (*TATA box*) en el promotor proximal, normalmente en posición alrededor de -100 del inicio de la unidad de transcripción, asociada al complejo multiproteico TFIID, con el que forma el complejo de preiniciación de la transcripción ¹⁹ (Esquema 4).



Esquema 4: Representación esquemática del reclutamiento de factores de transcripción nucleados por TBP que participan en la transcripción dependiente de RNA polimerasa II. Adaptado de Levine and Tjian, Nature 424, 147-151 (2003).

Sin embargo, no todos los genes tipo II están regulados por Tbp. Se ha demostrado que los promotores de algunos genes necesarios para el desarrollo embrionario temprano de *Drosophila* que participan en la replicación no unen Tbp ²⁰. Por el contrario, poseen en su promotor proximal la secuencia DRE a la que se une un complejo, formado por varios factores de transcripción como Dref (*DNA replication-related element factor*), Iswi (subunidad catalítica de proteínas de remodelado de la cromatina de la familia Nurf), y el factor de transcripción Trf2 (*TATA box binding protein-related factor 2*). El Esquema 5 ilustra este proceso.



Esquema 5: Representación esquemática de la transcripción de genes de *Drosophila* cuyo promotor proximal une un complejo formado por factores de transcripción en el que no participa TBP. Por el contrario, participan proteínas como TRF2, ISWI y DREF. Adaptado de Levine and Tjian, *Nature* 424, 147-151 (2003).

En *Drosophila*, este complejo de transcripción alternativo regula positivamente la transcripción de los ARNm correspondientes a una treintena de genes, algunos de ellos directamente relacionados con la replicación del ADN: *Pcna*, ADN polimerasa α (*DNA Pola*) y *E2f*²⁰. También la de otros que codifican proteínas ribosomales en *Drosophila* y humanos²¹. Más aún, este complejo inhibe la transcripción del ARNm correspondiente a *Tbp*, por un lado, y compite con ella por la unión de las proteínas que forman el TFIID, por otro¹⁹. Consecuentemente, la sobreexpresión de *Tbp* disminuiría la actividad de *Trf2* y viceversa.

En las células humanas y de ratón, los ortólogos de *Trf2*, *Iswi* y *Nurf* codifican las proteínas *Tbpl1*, *Smarca* y *Rbbp*, respectivamente. *Tbpl1* posee cierta homología con *Tbp* (Figura 13) y conserva el dominio C-terminal de unión al ADN. Sin embargo, es inactivo en promotores que contienen la *TATA box* y por el contrario activa la transcripción de genes que carecen de esta²².

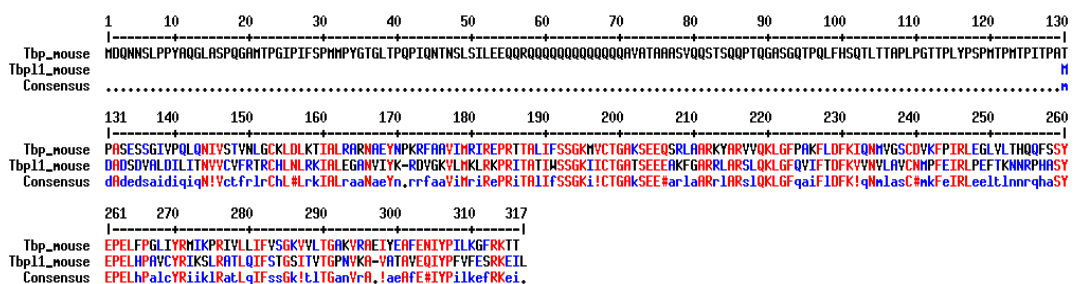


Figura 13: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de ratón *Tbp* (*TATA box binding protein*) y *Tbpl1* (*TATA box binding protein-like 1*). En color negro se especifican los residuos no comunes, en azul los cambios conservativos y en rojo los aminoácidos idénticos entre las dos secuencias. En *Tbp*, el dominio de unión al ADN abarca desde 138 al 317. En *Tbpl1* es la proteína completa.

Para concluir, podemos especular que una célula que expresara un exceso de Tbp tendría una mayor tasa de transcripción sobre una batería de genes concreta y diferente a la regulada por Tbp1-1, cuya transcripción estaría desfavorecida. Si además, como ocurre en *Drosophila*, Tbp1 mediara la transcripción de genes que codifican proteínas y enzimas de la replicación del ADN, en este escenario, esta célula tendría una fase S más larga, o lo que es lo mismo, la replicación sería más ineficiente y se observaría una progresión más lenta por la etapa de síntesis del ADN. Sería muy interesante comprobar los niveles de expresión de Tbp y Tbp1 en las células con fenotipo *mahoganoide* respecto a las células melan a6, ya que nuestros resultados de expresión génica diferencial demuestran que las células que carecen de Mgrn1 son deficitarias en la expresión de muchos genes reguladores de la replicación, algunos de los cuales (*Pcna*, *ADN Pola*, *E2f1*) están regulados por Tbp1 en *Drosophila*. Más aún, esta hipótesis está reforzada por el hecho de que Tbp y Tbp1 compiten por unir los factores o proteínas asociadas a Tbp (TAFs) que forman el complejo TFDII, pero activan promotores diferentes, de manera que la sobreexpresión de Tbp en la célula *mahoganoide* derivada de la carencia de Mgrn1 estaría desfavoreciendo la transcripción génica de los promotores activados por Tbp1. Los experimentos necesarios para confirmar esta hipótesis han quedado al margen de los objetivos de esta Tesis Doctoral, y se están iniciando en este momento.

4.8. Resumen y modelo propuesto.

Los ensayos de expresión génica diferencial entre dos poblaciones celulares en las que una de ellas expresa una determinada proteína y la otra carece, total o parcialmente, de la misma se pueden abordar actualmente mediante aproximaciones a gran escala, gracias a la tecnología de micromatrices génicas de expresión. En estas matrices de ADN codificante, conocidas como *microarrays de expresión*, el soporte contiene un número variable de oligonucleótidos, o sondas, para cada gen de un organismo. De este modo, todos los genes conocidos con expresión en esa especie están representados. La hibridación de la matriz con una muestra de ADNc obtenido a partir del ARNm de una línea celular o tejido, seguido de la lectura de la hibridación complementaria para cada punto de la matriz, nos da una idea del nivel de expresión de cada gen, una vez integradas las señales de todas las sondas para cada uno.

Aplicando esta tecnología al análisis de la posible regulación de la expresión génica por MGRN1, comparamos el resultado de hibridar una línea celular de melanoma humano que sobreexpresara MGRN1 como consecuencia de la transfección con una

construcción de expresión, respecto a la línea celular con expresión endógena. Con esta aproximación pretendíamos averiguar qué genes estaban diferencialmente expresados y así determinar nuevas dianas de MGRN1, esta vez no como consecuencia directa de su ubiquitinación y consiguiente degradación por el proteasoma. Sin embargo, dado que las eficacias de transfección no son muy elevadas (rondan el 25%) los resultados que obtuvimos no fueron muy significativos, pues un gran número de células no sobreexpresaba la proteína. No obstante, estos ensayos aportaron una información preliminar de interés al apuntar a una regulación diferencial de genes implicados en la regulación del ciclo celular, entre otros.

Para obtener una mayor sensibilidad en la identificación de genes regulados por MGRN1, recurrimos a una línea de melanocitos del ratón *mahoganoide* que carece de Mgrn1. Con estas células (melan md1) y las parentales salvajes correspondientes (melan a6) repetimos el análisis de expresión génica diferencial con micromatrices de ADN. Obtuvimos una expresión diferencial significativa en unos 4000 genes. Una gran parte de ellos desempeñan funciones clave en la progresión y control del ciclo celular, cuya expresión está reprimida respecto a la de las células melan a6. Para validar funcionalmente este hallazgo, procedimos al análisis de la tasa de proliferación y de la distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo de duplicación mitótica. Observamos que las células mutantes tienen una velocidad de duplicación considerablemente inferior a las de las células control. Lo más sorprendente fue comprobar que están reprimidos el 80% de los genes conocidos que codifican las proteínas de la replicación del ADN y las reguladoras del control de entrada en mitosis. Estos resultados dan cuenta de modo convincente de la retención en fase S que observamos, con la consiguiente disminución de la tasa de proliferación de las células *mahoganoides*, en comparación con los melanocitos control.

No menos importante es el hallazgo de que esta expresión génica diferencial podría estar orquestada a nivel transcripcional por c-Myc, Creb1 y E2f1. Estos reguladores transcripcionales clave estarían fuertemente reprimidos en las células melan md1, de acuerdo con la predicción *in silico* de modificaciones en la actividad de factores de transcripción aplicada al patrón de expresión diferencial de expresión génica en las células melan md. Cabe resaltar que esta predicción ha sido parcialmente confirmada analizando la expresión de las proteínas Myc y Creb por Western blot. Todo ello avala la hipótesis de que Mgrn1 podría ser una E3-*Ubiquitina ligasa* de algun(os) factor(es) de transcripción clave para la salida de fase G1 y la entrada y progresión de la fase S. La carencia de Mgrn1 en las células melan md1, y la consiguiente acumulación de este factor de transcripción, conduciría a un patrón transcripcional aberrante con disminución de la actividad de c-Myc, Creb1 y también de E2f1. A su vez, esta

disminución acarrearía la represión de los genes diana de dichos factores de transcripción, en una cascada que explicaría, al menos parcialmente, el sorprendentemente alto número de genes expresados diferencialmente en las células melan md. La relación de este patrón de expresión génica aberrante con las distintas manifestaciones patológicas del fenotipo *mahoganoide* es muy probable, y su análisis será sin duda objeto de estudio en el futuro próximo.

BIBLIOGRAFIA

1. Malumbres, M. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol. Rev.* **91**, 973–1007 (2011).
2. Dick, F. A. & Rubin, S. M. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 297–306 (2013).
3. Munro, S., Carr, S. M. & La Thangue, N. B. Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct? *Oncogene* **31**, 4343–52 (2012).
4. Kato, J. Induction of S phase by G1 regulatory factors. *Front. Biosci.* **4**, D787–92 (1999).
5. Ohtani, K. Implication of transcription factor E2F in regulation of DNA replication. *Front. Biosci.* **4**, D793–804 (1999).
6. Takeda, D. Y. & Dutta, A. DNA replication and progression through S phase. *Oncogene* **24**, 2827–43 (2005).
7. Woodruff, J. B., Wueseke, O. & Hyman, A. A. Pericentriolar material structure and dynamics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **369**, (2014).
8. Janke, C. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J. Cell Biol.* **206**, 461–72 (2014).
9. Song, Y. & Brady, S. T. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol.* **25**, 125–36 (2015).
10. Field, J. J., Kanakkanthara, A. & Miller, J. H. Microtubule-targeting agents are clinically successful due to both mitotic and interphase impairment of microtubule function. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 5050–9 (2014).
11. Srivastava, D. & Chakrabarti, O. Mahogunin-mediated α -tubulin ubiquitination via noncanonical K6 linkage regulates microtubule stability and mitotic spindle orientation. *Cell Death Dis.* **5**, e1064 (2014).
12. Ren, Y., Zhao, J. & Feng, J. Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J. Neurosci.* **23**, 3316–24 (2003).
13. Adhikary, S. & Eilers, M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 635–45 (2005).

14. Bretones, G., Delgado, M. D. & León, J. Myc and cell cycle control. *Biochim. Biophys. Acta* **1849**, 506–16 (2015).
15. Sands, W. A. & Palmer, T. M. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell. Signal.* **20**, 460–6 (2008).
16. Johannessen, M., Delghandi, M. P. & Moens, U. What turns CREB on? *Cell. Signal.* **16**, 1211–27 (2004).
17. Chhangani, D. *et al.* Mahogunin ring finger 1 suppresses misfolded polyglutamine aggregation and cytotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 1472–84 (2014).
18. He, L. *et al.* Spongiform degeneration in mahoganoid mutant mice. *Science* **299**, 710–2 (2003).
19. Akhtar, W. & Veenstra, G. J. C. TBP-related factors: a paradigm of diversity in transcription initiation. *Cell Biosci.* **1**, 23 (2011).
20. Hochheimer, A., Zhou, S., Zheng, S., Holmes, M. C. & Tjian, R. TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila*. *Nature* **420**, 439–45 (2002).
21. Wang, Y.-L. *et al.* TRF2, but not TBP, mediates the transcription of ribosomal protein genes. *Genes Dev.* **28**, 1550–5 (2014).
22. Levine, M. & Tjian, R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature* **424**, 147–51 (2003).

CONCLUSIONES

1. MC1R es un GPCR de clase B que une tanto ARRB1 como ARRB2, con una afinidad comparable en condiciones basales. A diferencia de lo descrito para la mayoría de los GPCRs, la unión de ambas isoformas de ARRB al receptor es independiente de agonista y del estado de fosforilación de MC1R.
2. La interacción de ARRB1 y ARRB2 con MC1R es competitiva y mutuamente excluyente.
3. ARRB2, pero no ARRB1, inhibe el acoplamiento funcional de MC1R a la vía del AMPc/PKA e induce su internalización dependiente de agonista, por un mecanismo que no implica necesariamente la participación de clatrina y adaptina. La asociación MC1R-ARRB2 forma un complejo estable en vesículas endocíticas.
4. ARRB2 no desacopla a MC1R de la vía de las MAPK ERK1/2, ni señala a través de esta vía de señalización.
5. Tanto ARRB1 como ARRB2 se poliubiquitinan de modo dependiente de la expresión de MC1R funcional e independiente de segundo mensajero.
6. La poliubiquitinación de ARRB2 ocurre al menos en el residuo Lys400. Esta modificación promueve la proteólisis de la ARRB2 en el entorno del residuo Arg170.
7. Tanto ARRB1 como ARRB2 sufren una modificación post-traduccional independiente de MC1R, que modifica su masa molecular y que podría consistir en una mono- o diubiquitinación en residuo(s) situado(s) en el dominio N-terminal de las arrestinas.
8. La E3-ubiquitina ligasa MGRN1 participa en la poliubiquitinación de las ARRBs en presencia de MC1R, que actúa de andamio molecular al inducir la formación de un complejo ternario ARRB-MC1R-MGRN1 necesario para esta modificación.
- 9- Una mutación en el gen *Mgrn1* murino que anula la expresión de la proteína da lugar a un cambio profundo en el patrón de expresión génica, con una expresión diferencial de unos 4000 genes en los melanocitos mutantes, en relación con células control. El análisis *in silico* de los cambios de expresión génica muestra una represión generalizada de genes reguladores de la progresión a través del ciclo celular.

10- Los melanocitos mutantes carentes de Mgrn1 tienen una menor velocidad de duplicación asociada a una retención en la fase S del ciclo celular, en comparación con melanocitos control. Por tanto, Mgrn1 es un regulador importante de la expresión génica y la proliferación de los melanocitos, no caracterizado hasta la fecha.

11- Los melanocitos de ratón carentes de Mgrn1 presentan una represión de los factores de transcripción c-Myc, Creb1 y probablemente E2f. Dado que estos factores de transcripción poseen abundantes dianas, el elevado número de genes reprimidos en los melanocitos mutantes podría explicarse, al menos parcialmente, por la inhibición de su actividad transcripcional.

APÉNDICE

1. TAMPONES

a) Generales

PBS 1X (pH 7.2):

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10.0 mM
KH ₂ PO ₄	1.0 mM

Tampón de solubilización celular I:

PBS	1X
PMSF	100 ng/ml
Igepal-CA630	1%
Inhibidores de fosfatasas	1%

Tampón de solubilización celular II:

Tris (pH 8.0)	50 mM
Igepal-CA630	1%
EDTA	1 mM
PMSF	0.1 mM
Iodoacetamida	0.1 mM
N-etilmaleimida	0.1 mM

Tampón de lavado ácido:

Glicina	50 mM
NaCl	150 mM
ajustado a pH 3 con HCl	

b) ADN

Tampón de recorrido TAE:

Tris	40 mM
EDTA	1.0 mM
Ácido acético	30 mM

2. REACTIVOS DE SDS-PAGE Y TRANSFERENCIA WESTERN

a) SDS-PAGE

Geles de Poliacrilamida: la mezcla de acrilamida/bisacrilamida (AA/bAA) se utilizó en la proporción 30:0.0. A continuación se detalla la composición de los geles utilizados habitualmente en SDS-PAGE.

Gel separador (10% acrilamida)

H ₂ O	1.6 ml
AA/bAA	1.33 ml
Tris-HCl 1.5 M, 0.4% SDS, pH 8.8	1.0 ml
Persulfato amónico 10%	40 µl
TEMED	5 µl

Gel hacinador (4% acrilamida)

H ₂ O	1.2 ml
AA/bAA	270 µl
Tris-HCl 1.5 M, 0.4% SDS, pH 8.8	0.5 ml
Persulfato amónico 10%	20 µl
TEMED	2.5 µl

Tampón de muestra (4x):

Tris-HCl	1.6 ml	ph 6.8
Glicerol	20%	
SDS	8%	
Azul de bromofenol	0.08%	
β-mercaptoetanol	7.5 µl	

Tampón de recorrido (TGS) (pH 8.3):

Tris (base)	25 mM	
Glicina	190 mM	
SDS	0.1%	(pH aproximado 8.3)

b) Transferencia Western

Tampón de transferencia:

Tris (base)	48 mM	pH 9.2
Glicina	39 mM	
SDS	0.04%	
Metanol	20%	

TBS 10X:

Tris (base)	200 mM
NaCl	1.37 M

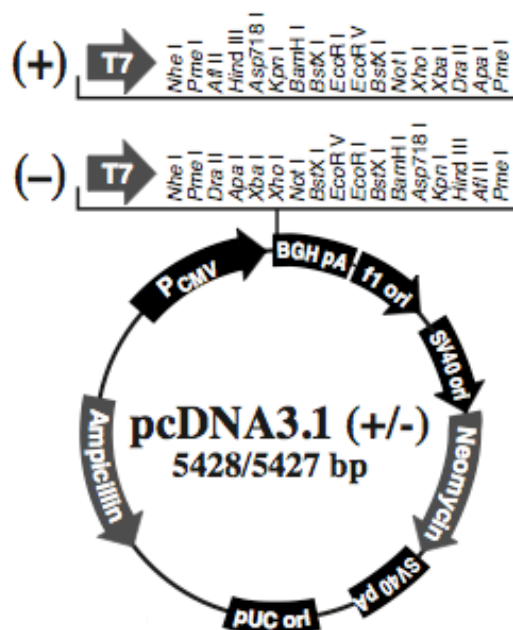
TBST:

TBS	1X
Tween 20	0.1%

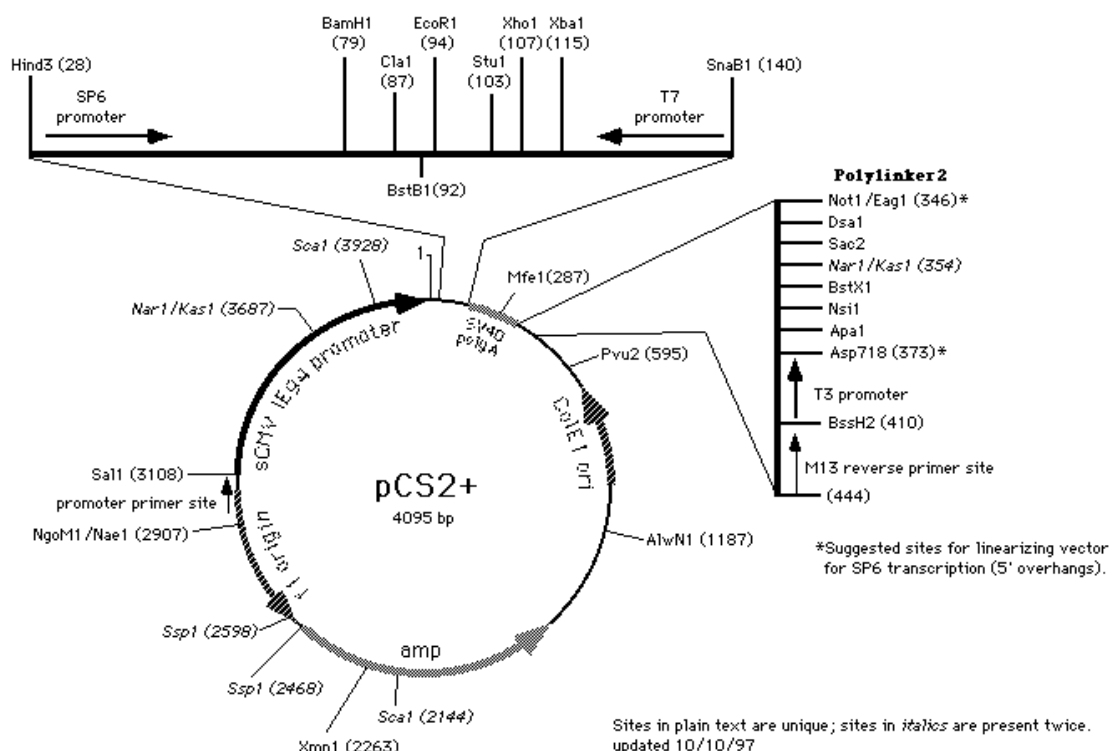
Los anticuerpos utilizados, la casa comercial, la dilución empleada y su tampón de unión están detallados en el apartado 5.

3. MAPAS Y SITIOS DE RESTRICCIÓN DE VECTORES EMPLEADOS.

a) pcDNA3.1 (Invitrogen)



a) pCS2+ (Sigma)



4. BÚSQUEDA DE BIBLIOGRAFÍA Y SECUENCIAS.

En la búsqueda de referencias bibliográficas fueron de gran utilidad los archivos de la Hemeroteca Científica de la Universidad de Murcia y las siguientes direcciones de Internet:

Centro Nacional para la Información Biotecnológica de Bethesda (NCBI):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Biblioteca de la Universidad de Murcia

<http://www.um.es/web/biblioteca/contenido/biblioteca-digital>

Asimismo, las secuencias de ADNc y proteínas se localizaron en el NCBI y en el instituto Sanger:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>

<http://www.ensembl.org/index.html>