



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Regulación de la Señalización
no Canónica por el Receptor de
Melanocortinas 1 Humano**

D^a Julia Sirés Campos

2018

UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología

REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN NO CANÓNICA POR EL RECEPTOR DE MELANOCORTINAS 1 HUMANO

Memoria presentada por **D^a Julia Sirés Campos** para optar al grado de **Doctora en Bioquímica** por la Universidad de Murcia.

Murcia, 2018



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología

D. **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, y D^a. **M^a Concepción Olivares Sánchez**, Profesora Contratada Doctora 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 “**Regulación de la Señalización no Canónica por el Receptor de Melanocortinas 1 Humano**”, realizada por Doña **Julia Sirés Campos** bajo nuestra 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 21 de marzo de 2018

Fdo. José Carlos García-Borrón

Fdo. M^a Concepción Olivares



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología

D^a. **Elvira Larqué Daza**, Profesora Titular de Universidad del Área de Fisiología y Presidenta de la Comisión Académica del Programa de Doctorado “Integración y Modulación de Señales en Biomedicina” de la Facultad de Medicina,

INFORMA

Que la Tesis Doctoral titulada “**Regulación de la Señalización no Canónica por el Receptor de Melanocortinas 1 Humano**”, ha sido realizada por D^a. **Julia Sirés Campos** bajo la dirección de los Profesores D. José Carlos García-Borrón Martínez y D^a. M^a Concepción Olivares Sánchez, y que la Comisión Académica que presido ha dado su conformidad unánime para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a 21 de marzo de 2018

Fdo. Elvira Larqué Daza

El trabajo experimental expuesto en esta Tesis Doctoral ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad con cargo a los Proyectos SAF-2012-32134 y SAF-2015-67092-R y por el proyecto Grupos de Excelencia de la Región de Murcia 19553/GERM/14.

Julia Sirés Campos ha disfrutado de una beca del Programa de Formación del Personal Investigador del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BES-2013-065266). Algunos de los resultados obtenidos han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

PUBLICACIONES

1. Mohsin Shahzad*, **Julia Sires Campos***, Nabeela Tariq, Cecilia Herraiz Serrano, Rizwan Yousaf, Celia Jiménez-Cervantes, Sairah Yousaf, Yar M. Waryah, Haseeb A. Dad, Elizabeth M. Blue, Nara Sobreira, Francesc López-Giráldez, Tasleem Kausar, Muhammad Ali, Ali M. Waryah, Saima Riazuddin, Rehan S. Shaikh, José Carlos García-Borrón, Zubair M. Ahmed. (*** igual contribución**).
Identification and functional characterization of natural human melanocortin 1 receptor (MC1R) mutant alleles in Pakistani population
Pigment Cell & Melanoma Research (Impact Factor: 5.641. Q1) 2015 Nov;28(6):730-5.
2. Marta Abrisqueta, Conchi Olivares, Cecilia Herraiz, María Castejón-Griñán, **Julia Sirés-Campos**, José Carlos García-Borrón, Celia Jiménez-Cervantes.
Human Melanocortin 1 receptor-mediated ubiquitination of nonvisual Arrestins. Role of Mahogunin ring finger 1 E3 ligase.
Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research (Impact Factor: 5.547. Q1). 2018 Jan;1865(1):76-94

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Melanocortin receptor 1 (MC1R) variants and human pigmentation phenotypes. Characterization of a MC1R mutant from a family with hypopigmentation of skin and hair. **Julia Sirés-Campos**, Marta Abrisqueta González, Celia Jiménez-Cervantes, José Carlos García-Borrón Martínez, Conchi Olivares Sánchez. 37 Congreso Sociedad Española Bioquímica y Biología Molecular. Granada. España. Septiembre 2014.

Functional characterization of a natural human melanocortin 1 receptor hypomorphic mutant with premature truncation of the C-terminal cytosolic domain. **Julia Sirés-Campos**, R. Yousaf, S. Riazuddin, C. Jiménez-Cervantes, Z. M. Ahmed, J. C. García-Borrón. XXII International Pigment Cell Conference. Singapur. Septiembre 2014.

Mgrn1-dependent downregulation of pigmentation is a cell-autonomous process involving changes in melanosome and melanogenic enzymes maturation. **Julia Sirés-Campos**, María Castejón, Marta Abrisqueta, Cecilia Herraiz, José Carlos García-Borrón, Celia Jiménez-Cervantes, Concepción Olivares. 38 Congreso Sociedad Española Bioquímica y Biología Molecular. Valencia. España. Septiembre 2015.

Genetic and Functional studies of genes associated with hypopigmentation disorders in human. Sairah Yousaf, Mohsin Shahzad, **Julia Sirés-Campos**, Nabeela Tariq, Cecilia Herraiz Serrano, Rizwan Yousaf, Celia Jimenez-Cervantes, Yar M. Waryah, Tasleem Kausar, Muhammad Ali, Ali

M. Waryah, Saima Riazuddin, Rehan S. Shaikh, Jose Carlos Garcia-Borrón, Zubair M. Ahmed. American Society of Human Genetics Annual Meeting. Baltimore, USA. Octubre 2015

Mahogunin RING Finger 1 regulates the melanosomal pH and decreases pigmentation by acidification of the melanosome. **Julia Sirés-Campos**, María Castejón Griñán, Marta Abrisqueta, Dorothy C. Bennett, Elena V. Sviderskaya, Cecilia Herraiz, Celia Jimenez-Cervantes, José Carlos García-Borrón, Concepción Olivares. 20th European Society of Pigment Cell Research Meeting. Milán, Italia. Septiembre 2016

MGRN1: a key regulator of the melanosomal pH and hypopigmentation upon organelle acidification. **Julia Sirés-Campos**, María Castejón Griñán, Marta Abrisqueta, Idoya María Martínez, Cecilia Herraiz, Celia Jiménez-Cervantes, José Carlos García-Borrón, Conchi Olivares. I Jornada de Investigación del Instituto Murciano de Investigación Biosanitario. Murcia, España. Noviembre 2016

Mahogunin RING Finger 1 regulates the melanosomal pH and decreases pigmentation by acidification of the melanosome. **Julia Sirés-Campos**, María Castejón Griñán, Marta Abrisqueta, Dorothy C. Bennett, Elena V. Sviderskaya, Cecilia Herraiz, Celia Jiménez-Cervantes, José Carlos García-Borrón, Conchi Olivares. III Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia (Escuela Internacional de Doctorado). Murcia, España. Mayo-Junio 2017

Mahogunin ring finger-1 controls tyrosinase activity and melanin synthesis by regulation of melanosomal pH. **Julia Sirés**, Conchi Olivares, Ana Lambertos, Cecilia Herraiz, Marta Abrisqueta, María Castejón-Griñán, Idoya Martínez-Vicente, Elena V. Sviderskaya, Dorothy C. Bennett, Rafael Peñafiel, Celia Jiménez-Cervantes, José Carlos García-Borrón. 23rd International Federation of Pigment Cell Societies. Denver, Colorado, EEUU. Agosto 2017

MGRN1: a key regulator of the melanosomal pH and hypopigmentation upon organelle acidification. **Julia Sirés-Campos**, María Castejón Griñán, Marta Abrisqueta, Idoya María Martínez, Cecilia Herraiz, Celia Jiménez-Cervantes, José Carlos García-Borrón, María Concepción Olivares. II Jornada de Investigación del Instituto Murciano de Investigación Biosanitario. Murcia, España. Noviembre 2017.

*A mi FAMILIA, que es la mayor riqueza de mi vida,
y en especial a Carmen y Pepe.*

AGRADECIMIENTOS

Comenzaré dando las gracias a todo aquel que me acompañó y ha hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, agradecer a mis directores de Tesis todo el esfuerzo y dedicación empleados para que pudiera crecer como investigadora. Gracias a ambos por guiar y supervisar el trabajo y aconsejarme en todo momento.

A José Carlos por su enorme sabiduría y sus ganas de investigar y crecer. A Conchi por ser guía profesional y personal, compañera y amiga. A Celia, por ser también guía durante todo el tiempo, apoyarme y motivarme. A Cecilia, porque es una maravillosa profesional, siempre dispuesta a ayudar al equipo con una sonrisa, además de ser una maravillosa persona. Gracias de corazón.

A mis compañeras de laboratorio, ¡mis niñas! Básicamente, ¡daros las gracias por todo! Porque nos entendemos, nos apoyamos y nos reímos siempre y mucho de lo pringadas que somos y seremos, siempre de buena gana. A Marta por enseñarme a dar los primeros pasos de todo en el labo. Por esas horas de risas, de bailes y de vídeos absurdos. A Ana por ser tan auténtica, tan profesional y tan amiga. A Ceci que también la incluyo en el pack de niñas porque sigue al pie del cañón, tanto las tonterías como las cosas importantes. A Idoya, que va dejando huella en este grupito tan precioso que nos hemos montado. A María, por estar codo con codo siempre, desde el primer día que apareció por el labo. Tantas horas de risas, conversaciones, ayudas profesionales y personales, y esos magníficos consejos, hacen que me quede con un recuerdo precioso y una amiga enorme. Gracias. Me llevo de todas vosotras un cachito que me ha hecho crecer. Gracias.

A Paco Arques y Fernando, por todas las ayudas informáticas, de papeleos y demás que hacéis que sea más llevadero.

Al resto de compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Rafa y Paco Solano y a la parte de Inmunología que, aunque poco, nos seguimos viendo y siguen apoyando en la distancia, Trini, Gonzalo y Ana Tapia.

Al equipo de Biología Celular, María, Emma, Manolo, José Ángel, Blanca, Rebeca, Ascen, Leo y Julieta.

A todos los miembros del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia, tanto a los del servicio de Cultivo de Tejidos, Toñi, Pepe y Juana, a los de Microscopía, Maruja y Manoli, como a los de Biología Molecular, César, M^aJosé, Francisco y M^a del Mar y Análisis de Imagen y, en especial, a los de la Estación Experimental de Radiactividad, M^a Dolores y Régulo.

A todos los componentes del equipo del Institut Curie, por cuidarme durante 3 meses estando lejos de casa, enseñarme todas las técnicas necesarias y entenderme cuando el cansancio me inundaba. Gracias a Cédric por guiarme, a Graça por permitirme pertenecer al grupo y al resto de compis: Ilse, Maryse, Xavier, Lèa, Lia, Roberta, Gisela, Frederik, Christin, Guillaume y Riddhi (me llevo una amiga a la que visitaré en la India sin pensarlo).

Gracias a todos los del equipo “Châtelet nunca mais”, en especial a Irantzu y Nuria S. Por todo lo vivido hasta el momento y por lo que queda por disfrutarnos.

A mis niñas de Granada. Por todos los años de carrera, de doctorado y de vida juntas. Mon y Lau, Dras. María y Marian, que orgullosa estoy de vosotras. Cómo os adoro y qué gran apoyo seréis siempre.

A Tere e Irune, por admirarme al evitar la procrastinación, o intentarlo siempre.

A mi Pandilla Plumilla que, siendo cada uno de su padre y de su madre empezamos en el cole y haciendo teatro desde bien pequeñitos y seguimos siendo pandilla. Gracias por entender que a muchos eventos no podía ir por trabajo, gracias por echarme de menos y motivarme con el: menuda doctoraza vamos a tener! Gracias por ser mi vía de desconexión más sana. Lury, tu si me entiendes bien.

A mi FAMILIA, que como ya he dicho, es la mayor riqueza de mi vida. Tanto la lejana como la cercana. Por estar ahí siempre, por hacer que esto sea posible, por esperarme cuando llego tarde y por entender mi agotamiento. Porque nosotros siempre hemos sido de apoyarnos y de reírnos por tonterías, y qué gusto me da eso. Gracias Abuelili. Te tengo adoración y admiración absoluta. Gracias Manito, porque estos tiempos durillos hace que nos queramos más. Y un enorme gracias a mamá y Pepe por todo el esfuerzo que han puesto en todo, por el apoyo y por creer en mí.

Y de la nueva familia que vamos montando, agradecer a Gonzalo que ha sabido siempre levantarme y motivarme para seguir el camino, lleno de risas y desconexiones necesarias. Eres una de mis personas favoritas en el mundo. A Karma y Floki, como no, que forman parte de esto también.

Y si se me olvida alguien, que no me lo tenga en cuenta. Es falta de memoria, no por ello sois menos importantes.

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>INTRODUCCIÓN</u>	7
1. LA PIEL Y EL SISTEMA PIGMENTARIO	9
1.1. Estructura y composición de la piel	9
2. MELANOCITOS	10
2.1. Melanosomas y melanina	11
2.1.1. Desarrollo melanosomal	12
2.1.1.1. Biogénesis y maduración	12
2.1.1.2. Transportadores de la membrana del melanosoma. Regulación del pH intramelanosomal	16
2.1.2. Melanogénesis	23
3. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs)	26
4. MC1R: RECEPTOR DE MELANOCORTINAS 1	28
4.1. Estructura del MC1R	28
4.2. Señalización del MC1R	30
4.3. Regulación de la señalización por MC1R	32
4.3.1. Variantes alélicas y de splicing de MC1R	33
4.3.2. Tráfico del MC1R	34
4.3.3. Desensibilización e internalización	34
5. REGULACIÓN DE LA PIGMENTACIÓN	35
5.1. Regulación paracrina	35
5.2. Regulación de la biogénesis y transporte de melanosomas	37
6. MAHOGUNIN RING FINGER 1	39
6.1. Estructura de MGRN1	39
6.2. Localización intracelular de MGRN1	40
6.3. Función de MGRN1	41
<u>OBJETIVOS</u>	45
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	49
1. REACTIVOS Y MATERIALES	51
2. LÍNEAS CELULARES Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	53
2.1. Líneas y cultivos celulares	53
3. REACTIVOS UTILIZADOS	54
3.1. Activadores	54
3.2. Inhibidores	54

4. DETECCIÓN DEL pH EN ORGÁNULOS	54
4.1. Sondas específicas	54
5. ESTUDIOS CON MEDIO CONDICIONADO	55
6. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES	55
7. CUANTIFICACIÓN DE MELANINAS	56
8. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS Y ESTABLES	57
8.1. Transfección transitoria de ADN plasmídico	58
8.2. Transfección transitoria de ARN de interferencia (siRNA)	58
8.3. Producción de CRISPR-Cas9	58
9. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE)	59
10. TRANSFERENCIA WESTERN	60
11. INMUNOPRECIPITACIÓN	61
12. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	62
12.1. Actividad tirosina hidroxilasa (TH)	62
12.2. Actividad DOPA oxidasa (DO)	63
12.3. Cálculo de parámetros cinéticos de actividad DO	64
13. TRATAMIENTO DE ENDOGLICOSIDASAS	64
14. ENSAYO DE ACOMPLAMIENTO FUNCIONAL	64
14.1. Estimulación y extracción de AMPc	64
14.2. Cuantificación de AMPc	65
15. UNIÓN HORMONA-RECEPTOR	66
16. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN	67
17. SÍNTESIS DE ADNc	67
18. PCR A TIEMPO REAL (RT-PCR o qPCR)	67
19. PCR SEMICUANTITATIVA Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA ..	70
20. TECNOLOGÍA DE HIBRIDACIÓN DE MICROMATRICES O MICROARRAYS	70
21. CITOMETRÍA DE FLUJO	71
22. MICROSCOPIA	71
22.1. Microscopía óptica	71
22.2. Microscopía de fluorescencia	72
22.3. Microscopía confocal	72
22.4. Tinción inmunológica	72
22.5. Microscopía electrónica	73
22.5.1. Microscopía electrónica convencional	74
22.5.2. Microscopía inmunoelectrónica	74
23. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
CAPÍTULO 1	79
1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE VARIANTES ALÉLICAS NATURALES DEL RECEPTOR MC1R	81
1.1. Identificación de las variantes alélicas potencialmente patogénicas del <i>MC1R</i> humano p.Tyr298* y p.Val174del	81
1.2. Caracterización funcionales de las variantes p.Tyr298* y p.Val174del de <i>MC1R</i>	83
1.3. Expresión en superficie de las variantes p.Tyr298* y p.Val174del de <i>MC1R</i>	86
1.4. Estudios funcionales en células melanocíticas humanas	89
CAPÍTULO 2	93
2. HIPERPIGMENTACIÓN DE MELANOCITOS CARENTES DE MGRN1: UN PROCESO CELULAR AUTÓNOMO DEPENDIENTE DE LA ACTIVACIÓN DE TIROSINASA	95
2.1. Contenido de melaninas y melanosomas en melanocitos tras la represión del gen <i>Mgrn1</i>	96
2.2. Activación de <i>MC1R</i> por NDP-MSH en células melan-a6 y melan-md1	107
2.3. Efecto del medio condicionado por células carentes de <i>Mgrn1</i>	112
2.4. Efecto de <i>Mgrn1</i> en la actividad de la enzima tirosinasa	113
2.4.1. Actividad DOPA oxidasa y tirosina hidroxilasa en extractos de células melan-a6 y melan-md1	114
2.4.2. Expresión de proteínas melanogénicas en células melan-a6 y melan-md1	116
2.4.3. Estudio del procesamiento de tirosinasa en células melan-a6 y melan-md1	117
2.4.4. Actividad tirosina hidroxilasa en células vivas con diferente expresión de <i>Mgrn1</i>	119
2.5. Captación de tirosina por los melanocitos en células melan-a6 y -md1	121
2.6. Efecto de Cu ⁺² sobre la actividad DOPA oxidasa de extractos de melanocitos melan-a6 y melan-md1	122
2.7. Efecto de la manipulación del pH en la actividad melanogénica de células melan-a6 y melan-md1	123
CAPÍTULO 3	127
3.1. MGRN1 COMO REGULADOR DEL pH DE ORGÁNULOS DEL LINAJE LISOSOMAL	129

3.1.1.	Comparación del pH de los orgánulos intracelulares de células melan-a6 y melan-md1 mediante DAMP-DNP	129
3.1.2.	Estimación del pH de orgánulos intracelulares mediante naranja de acridina	133
3.1.3.	Efecto de la represión de <i>Mgrn1</i> con siRNA en el pH de orgánulos intracelulares de melanocitos murinos	136
3.1.4.	Efecto de la anulación de <i>Mgrn1</i> mediante la tecnología CRISPR-Cas9 en el pH de orgánulos intracelulares de melanocitos murinos	138
3.1.5.	Efecto de <i>MGRN1</i> sobre el pH de orgánulos intracelulares en células heterólogas HEK293T	140
3.2.	IDENTIFICACIÓN DE GENES REGULADORES DE pH DEPENDIENTES DE MGRN1	143
3.2.1.	Análisis preliminar de los resultados de expresión génica diferencial de las células <i>mahoganoïdes</i>	146
3.2.2.	Validación de la expresión génica diferencial de las células <i>mahoganoïdes</i> mediante qPCR	151
3.2.3.	Análisis computacional de la expresión génica diferencial de las células <i>mahoganoïdes</i> mediante GSEA	152
CAPÍTULO 4	163	
4.	IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS AGUAS ABAJO DE MGRN1 COMO POSIBLES MEDIADORES DEL EFECTO DE MGRN1 SOBRE EL pH	165
4.1.	Selección de las posibles dianas	165
4.2.	Efecto de <i>Atp6v0d2</i> sobre la pigmentación y el cambio de pH	167
4.3.	Efecto de <i>Ctns</i> sobre la pigmentación y el cambio de pH	172
4.4.	<i>Mcoln3</i> como mediador del efecto de <i>Mgrn1</i> sobre el pH melanosomal	174
4.4.1.	Localización subcelular de <i>Mcoln3</i>	177
4.4.2.	Implicación de <i>Mcoln3</i> en la regulación del pH	181
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	187	
<u>CONCLUSIONES</u>	205	
<u>ANEXOS</u>	211	
Anexo I	213	
Anexo II	221	
Anexo III	227	

Anexo IV	231
----------------	------------

ABREVIATURAS

En este apartado se detallan por orden alfabético las abreviaturas utilizadas en esta Tesis Doctoral. 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	FSK: forskolina
ACTH: hormona adenocorticotropa	G418: geneticina
AG: aparato de Golgi	GFP: proteína verde fluorescente
AMPc: adenosina 3'-5'-monofosfato	GPCR: receptor acoplado a proteínas G
AO: naranja de acridina	GRK: quinasa de receptores acoplados a proteína G
AP1-3: proteína adaptadora 1-3	GS: síndrome de Griscelli
ARRβ: β -arrestina	HPS: síndrome de Hermansky-Pudlak
ASP: proteína agoutí	IQ: indol-5,6-quinona
AGRP: proteína relacionada con el gen <i>AGOUTI</i>	IQCA: ácido indol-5,6-quinona-2-carboxílico
BLOC1-3: complejos de biogénesis de los LRO 1, 2 y 3	IL: interleucina
BSA: albúmina de suero bovino	ILV: vesículas intralumenales
cDNA: DNA complementario	LRO: orgánulos relacionados con lisosomas
CRE: elemento de respuesta al AMPc	MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
CREB: proteína de unión a elementos sensibles a AMPc	MART-1: antígeno de melanoma reconocido por células T
cpm: cuentas por minuto	MCs: melanocortinas
CTNS: cistinosina	MCR: receptor de melanocortinas
DCT (TYRP2): DOPAcrómo tautomerasa	MCOLN3: mucolipina 3
DHI: 5,6-dihidroxiindol	MGRN1: mahogunina o Mahogunin RING-finger 1
DHICA: ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico	MITF: factor de transcripción asociado a microphthalmia
DOPA: dihidroxifenilalanina	MVE: endosomas multivesiculares
dpm: desintegraciones por minuto	α-MSH: hormona estimulante del melanocito alfa
DQ: L-DOPAquinona	mRNA: RNA mensajero
DMEM: medio mínimo esencial modificado por Dulbecco	NDP-MSH: [Nle ⁴ ,D-Phe ⁷] α -MSH
DNA: ácido desoxirribonucleico	NES: secuencia de exporte nuclear
EDTA: ácido etilendiaminotetracético	NLS: secuencia de localización nuclear
EDN1-3: endotelinas 1, 2 y 3	OA1: albinismo ocular 1
Endo H: endoglicosidasa H	OCA: albinismo oculocutáneo
ERK: quinasa regulada por señales extracelulares	PBS: tampón fosfato salino
ESCRT: complejo endosomal de transporte	PKA: proteína quinasa A
FCh: fold change o factor de cambio	PKC: proteína quinasa C
FGFR: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos	PMEL17: proteína premelanosomal

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNGasa F: N-glicosidasa F
POMC: proopiomelanocortina
RE: retículo endoplasmático
RHC: fenotipo “Red Hair Colour”
RNA: ácido ribonucleico
ROS: especies reactivas de oxígeno
SBF: suero bovino fetal
SCF: factor de células madre
SDS: dodecil sulfato sódico
SLC: transportador de solutos (“solute carrier”)
siRNA: RNA pequeño de interferencia
TAE: tampón acético-EDTA
TBS: tampón tris salino
TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TGFβ: factor de crecimiento transformante β
TGN: Trans Golgi Network
TGS: tampón tris glicina SDS
TM: fragmento transmembrana
TNFα: factor de necrosis tumoral α
TPA (PMA): forbol-12-miristato-13-acetato
TSG101: gen de susceptibilidad de tumores 101
TYR: tirosinasa
TYRP1: proteína relacionada con tirosinasa
UME: unidad melanoepidérmica
UV: ultravioleta

INTRODUCCIÓN

1. LA PIEL Y EL SISTEMA PIGMENTARIO.

1.1. Estructura y composición de la piel.

La piel es el órgano que establece una barrera natural entre el medio ambiente y el resto de órganos y tejidos. Es el órgano más extenso del cuerpo humano, con una organización estructural compleja que le permite desempeñar múltiples funciones vitales, entre las que cabe destacar las siguientes:

1. **Protección** del organismo contra agentes externos, al ser la primera línea de defensa frente factores físicos (cambios de presión, temperatura, radiaciones) y químicos, agentes infecciosos y alérgenos ¹;
2. **Órgano sensorial** que permite la comunicación con el medio ambiente, con receptores para el dolor, tacto y la temperatura;
3. **Participación en el metabolismo**, por ejemplo al colaborar en la síntesis de vitamina D ².

La estructura de la piel consiste en un epitelio pluriestratificado, bien diferenciado en tres capas, de origen embriológico y funciones diferentes (**figura I-1**):

- a. **Epidermis**: es la capa más externa de la piel y de origen ectodérmico. Es un epitelio plano poliestratificado que está en continua renovación y donde encontramos distintos tipos celulares:
 - queratinocitos (80-90%), que producen queratinas y disminuyen su capacidad proliferativa al ascender por los distintos estratos, a la vez que aumenta su grado de diferenciación morfológica y bioquímica (queratinización) ³;
 - melanocitos (10%), células dendríticas localizadas generalmente en la capa basal y encargadas de la producción de melanina, el pigmento que da color y protege frente a la radiación ultravioleta (UV) ⁴;
 - células de Langerhans (5-8%), responsables de la respuesta inmunológica epidérmica;
 - células de Merkel (3-5%), células neuroendocrinas que actúan como receptores sensoriales cutáneos.
- b. **Dermis**: separada de la epidermis por la unión dermoepidérmica o lámina basal y de origen mesodérmico. Es un tejido conjuntivo grueso y elástico formado principalmente por fibroblastos, células dendríticas y mastocitos, así como numerosas moléculas fibrosas (colágenos, elastina y reticulina). Se trata de un tejido muy vascularizado que presenta receptores táctiles y del dolor, así como diversas glándulas (sudoríparas, sebáceas y folículos pilosos). Proporciona soporte, resistencia y elasticidad.

- c. **Hipodermis:** es la capa más profunda, de origen mesodérmico. Es un tejido conjuntivo adiposo. Conecta la dermis con los órganos y destaca su función en la termorregulación, almacén nutricional y protección mecánica.

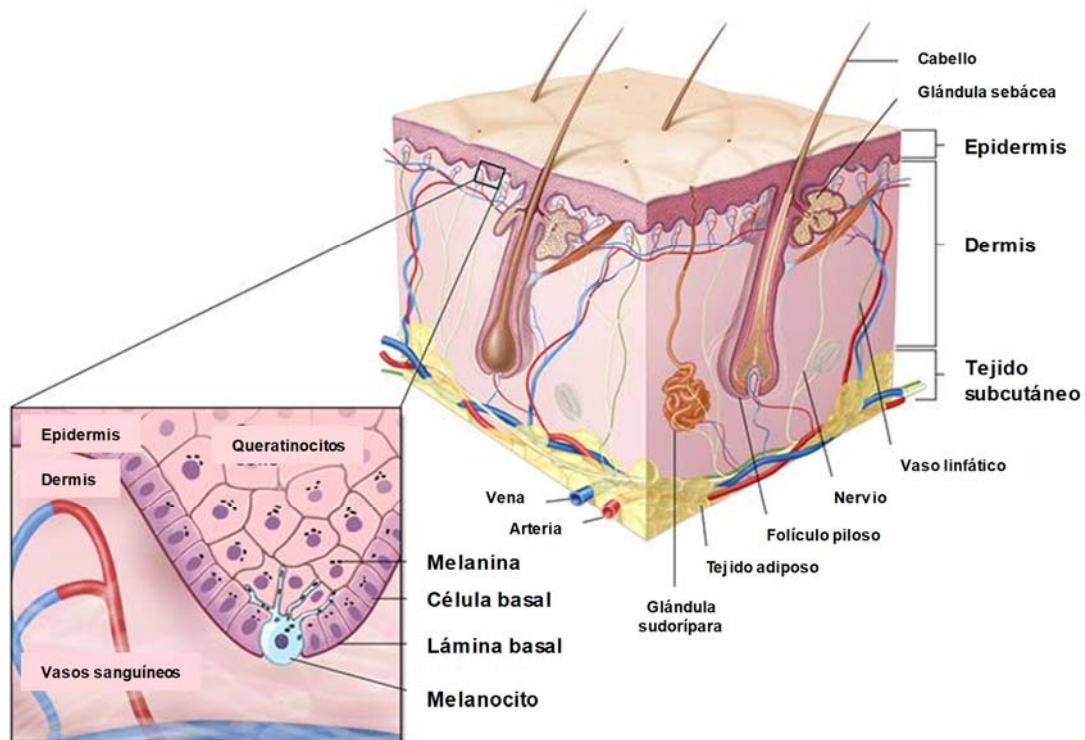


Figura I-1. Representación esquemática de las diferentes capas de la piel. Detalle de la membrana basal y epidermis. Esquema adaptado de Vandergriff et al. 2012 ⁵.

2. MELANOCITOS.

Los melanocitos son células altamente especializadas, que se originan a partir de células pluripotentes no pigmentadas de la cresta neural durante el desarrollo embrionario, denominados melanoblastos, mediante un proceso de diferenciación y maduración ^{6,7}. Posteriormente migran hacia la capa basal de la epidermis, al bulbo piloso y al ojo, adquiriendo la maquinaria completa para la síntesis y transferencia de melanina a los queratinocitos a través de las dendritas de los melanocitos ^{8,9}. A continuación el pigmento se distribuye de manera uniforme por las distintas capas de la epidermis, de manera que proporciona una barrera protectora homogénea y eficaz frente a la radiación UV ⁶.

La asociación entre melanocitos y queratinocitos se define como unidad melanoepidérmica (UME), y se estima que cada melanocito está en contacto con 4-10 queratinocitos ¹⁰ (**figura I-2**). Los mecanismos que controlan la organización y densidad de melanocitos en la epidermis todavía se desconocen. Sin embargo, puesto que el número de melanocitos apenas varía entre individuos de distintas etnias y fototipos, el grado de pigmentación de la piel depende del número, tamaño y densidad de los melanosomas (orgánulos ricos en pigmentos) que se transfieren de los melanocitos a los queratinocitos ¹¹.

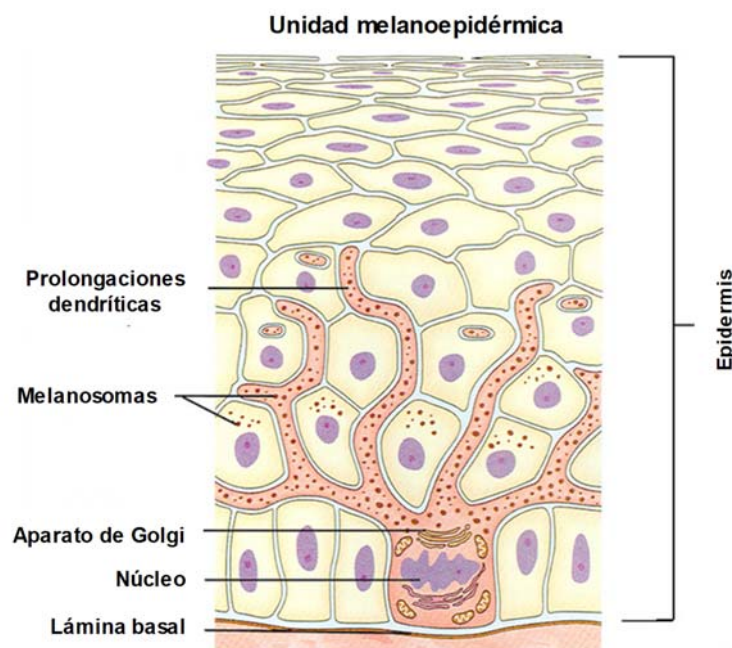


Figura I-2. Unidad melanoepidérmica (UME). Cada melanocito está en contacto íntimo con 4-10 queratinocitos.

Las células de la epidermis, principalmente los queratinocitos, regulan de forma paracrina la función de los melanocitos por medio de la secreción de endotelina-1 (EDN1), péptidos derivados de proopiomelanocortinas (POMC), el ligando SCF del receptor cKit de melanocitos, interleucina 1 y las citoquinas $TNF\alpha$ y $TGF\beta$, y quizá otros mensajeros químicos. La radiación UV modula la proporción de estímulos activadores e inhibidores de la diferenciación de los melanocitos ^{12,13}. Todos estos factores determinan el grado de diferenciación del melanocito en cuanto a pigmentación, forma, dendricidad, movilidad y capacidad de adhesión ¹⁴.

La alteración de la biología del melanocito se relaciona con enfermedades como vitíligo (despigmentación de la piel por destrucción de melanocitos por el propio sistema inmunológico)¹⁵, o melanoma, un tipo de cáncer de piel agresivo originado por malignización de melanocitos, consecuencia de mutaciones por daño en el DNA inducido por radiación UV ⁸ y/o factores endógenos ¹⁶.

2.1. Melanosomas y melanina.

Los melanosomas son orgánulos exclusivos de los melanocitos, especializados en la síntesis, almacenamiento y transporte de melaninas. La existencia de estos compartimentos, considerados orgánulos del linaje lisosomal o relacionados con lisosomas (LRO), ya que se organizan y ensamblan en un proceso similar al de formación de lisosomas ^{17,18}, es debida a que la melanogénesis genera productos intermedios muy reactivos que serían nocivos para el resto de componentes celulares ¹⁹⁻²¹. Además, los melanosomas presentan un pH más ácido que el citosol, al menos en sus estadios iniciales de maduración ^{22,23}.

Por lo general, la estructura de los melanosomas depende del tipo de melanina producida, existiendo dos tipos: eumelanosomas y feomelanosomas. Los primeros son elípticos, con una matriz fibrilar muy organizada y producen pigmentos marrones y negros (eumelanina, altamente fotoprotectora); los segundos son generalmente más pequeños y redondeados, con matriz vesiculoglobular y producen pigmentos rojizos amarillentos (feomelanina) ²⁴.

2.1.1. Desarrollo melanosomal.

2.1.1.1. Biogénesis y maduración.

Los melanosomas constituyen un ejemplo bien estudiado de la familia de LRO ²⁵, un grupo de estructuras membranosas específicas de tejido que comparten algunas características con los lisosomas, como la procedencia del sistema endocítico, pH del lumen ácido y la presencia de proteínas de membrana como LAMP1, asociadas a los lisosomas ²⁶. Los precursores directos de los melanosomas son los orgánulos endosomales procedentes del TGN (Trans Golgi Network), que dan lugar a los premelanosomas ^{17,23,27,28} y posteriormente sufren una serie de etapas de maduración. La biogénesis de los eumelanosomas está relativamente bien caracterizada, pero se desconocen muchos detalles en el caso de los feomelanosomas.

Podemos dividir el proceso de maduración de los melanosomas en dos grandes etapas, que a su vez comprenden dos estadios diferentes cada una ^{26,29}, de forma que las melaninas sintetizadas en las dos últimas etapas se depositan en una "matriz melanosómica" formada a lo largo de las dos primeras ³⁰. La etapa no pigmentada comprende los estadios I y II (que consideramos melanosomas inmaduros) y la etapa pigmentada, los estadios III y IV (melanosomas maduros). Estos estadios de desarrollo de los melanosomas se caracterizan por su morfología ultraestructural y el contenido en melanina (**figura I-3**):

- **Estadio I** → premelanosomas o endosomas multivesiculares (MVEs) que carecen de actividad melanogénica y que pueden albergar vesículas intralumenales (ILV ²³). Los melanosomas en estadio I presentan un recubrimiento de clatrina en el lado citosólico ²⁹.
- **Estadio II** → se caracterizan por su matriz fibrilar de PMEL17 más organizada, con láminas paralelas que comienzan a elongar el orgánulo, donde se van a ir depositando los acúmulos de eumelanina, que se sintetizan a partir del estadio III (la feomelanina, sin embargo, empieza a detectarse a partir de este estadio) ²⁶.
- **Estadio III** → en esta etapa se realiza tanto la síntesis como el depósito de melanina tras la incorporación de enzimas melanogénicas y otras proteínas. La eumelanina se sintetiza y deposita de manera organizada en las fibrillas intraluminales, confiriendo a las estrías un aspecto más engrosado y oscuro ²⁹.

- **Estadio IV** → melanosoma maduro, cargado de melanina (muy oscuro) y prácticamente carente de actividad tirosinasa al final de su maduración ^{26,27,31-33}.


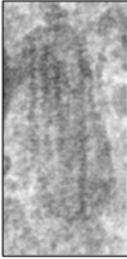
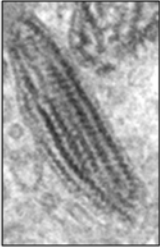

Características melanosomales	Etapas no pigmentadas		Etapas pigmentadas	
	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
				
Forma	Esférica	Elongada	Elíptica Elipsoidal	Elíptica Elipsoidal
Estructura interna (PMEL17)	--	Matriz fibrilar	Matriz fibrilar	Matriz fibrilar cargada de melanina
Enzimas melanosomales (TYR, TYRP1 y TYRP2)	--	+	+	+
Síntesis de melanina	--	--	Comienza a depositarse la melanina en las fibrillas internas	Cargado de melanina
Color			Marrón	Marrón oscuro-negro

Figura I-3. Características de los diferentes estadios melanosomales. La melanogénesis se produce en los melanosomas. En el estadio I, el orgánulo no contiene aún proteínas melanogénicas, que se incorporan en el estadio II (TYR, TYRP1 y TYRP2). Durante el estadio III tiene lugar la síntesis y acúmulo de melanina, que polimeriza sobre las fibrillas. Por último, el estadio IV está completamente cargado de melanina, pero ya no es activo desde el punto de vista de la síntesis del pigmento. Esquema adaptado de Cichorek et al. 2013 ³⁴.

Por tanto, además de las enzimas melanogénicas responsables de la síntesis de los pigmentos, el melanosoma contiene proteínas estructurales, como la proteína PMEL17, que representa el constituyente principal de la matriz interna de los orgánulos ³⁵, el receptor acoplado a proteínas G (GPCR) de la membrana melanosomal OA1, también conocido como GPR143, o MART1. GPR143 está mutado en albinismo ocular tipo 1 ^{36,37} y se detecta en endosomas tardíos, lisosomas y melanosomas, especialmente en estadio I. MART1 (por “melanoma antigen recognized by I-cells”, también llamado melan-A) es una pequeña proteína integral de membrana de interés inmunológico que se localiza en los mismos compartimentos que GPR143 y se cree que participa en el tráfico de GPR143 y PMEL17 ³⁸, aunque la función de ambas proteínas sigue sin estar completamente caracterizada y es objeto de numerosos estudios. Por último, merecen mención especial los transportadores de membrana del melanosoma que controlan el flujo de sustratos, cofactores y otros iones críticos para la correcta actividad de las enzimas melanogénicas, de entre los que destacan aquellos involucrados en la regulación del pH melanosomal. Todas estas proteínas serán tratadas en el apartado 2.1.1.2 por su especial interés en este trabajo.

La síntesis, plegamiento y tráfico de estas proteínas son procesos fundamentales para la correcta función del orgánulo ³⁹. Así, la mayoría de las proteínas melanosomales de los

melanosomas en estadios II a IV son glicoproteínas integrales de membrana, que cuando están correctamente plegadas en el retículo endoplasmático (RE) pasan a través del aparato de Golgi (AG) en dirección a los melanosomas, mientras que un plegamiento incorrecto, como ocurre en variantes de TYR, TYRP1, OCA2 y OA1 asociadas con el albinismo, produce retención en el RE y la consiguiente degradación de la proteína conformacionalmente aberrante por parte del proteasoma ⁴⁰⁻⁴². En cuanto a PMEL17, por ejemplo, es imprescindible la presencia de cadenas de O- y N-oligosacáridos complejos unidos a la proteína, ya que participan en la formación de las fibrillas y estructuras laminares de la matriz del melanosoma ⁴³.

En mamíferos, los melanosomas se desplazan bidireccionalmente a lo largo de los microtúbulos. El movimiento anterógrado, es decir, hacia microtúbulos más periféricos, se logra mediante proteínas de la superfamilia de quinesina, mientras que el movimiento retrógrado, es decir, hacia microtúbulos ubicados en la región perinuclear, se logra mediante dineína y proteínas asociadas. En la periferia, los melanosomas interactúan con el citoesqueleto de actina a través de un complejo tripartito formado por la pequeña GTPasa Rab27a, melanofilina y miosina V. Esta interacción es esencial para la dispersión de los melanosomas hacia las dendritas, como prueban la agrupación perinuclear de orgánulos detectada en mutantes en cualquiera de las proteínas mencionadas ⁴⁴. En la piel, la transferencia de los melanocitos a los queratinocitos circundantes se realiza tras la acumulación de melanosomas maduros en la periferia celular a través de procesos dendríticos ³³. Estos melanosomas se sitúan alrededor del núcleo de los queratinocitos en respuesta a la luz UV, puesto que las eumelaninas absorben esta radiación y protegen al DNA de su acción mutagénica ⁴⁵ (**figura I-4**).

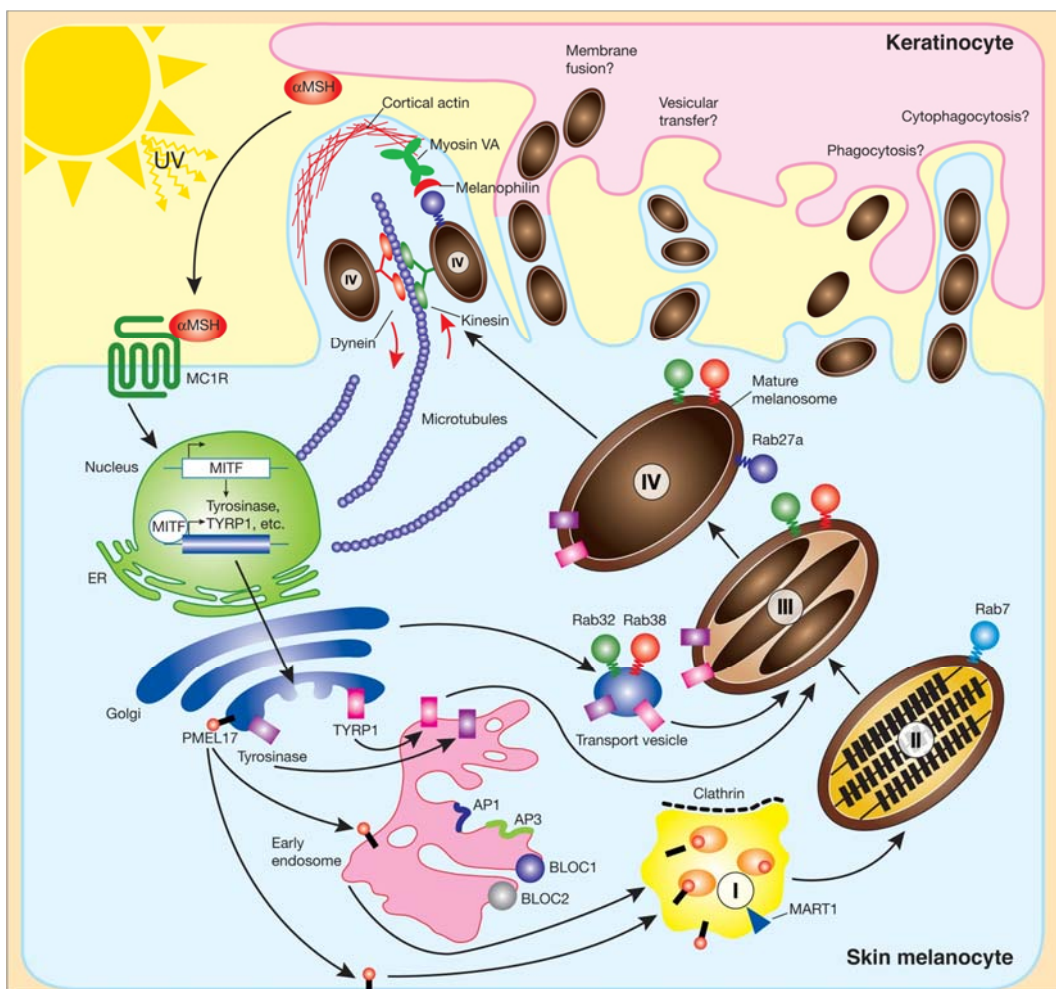


Figura I-4. Representación esquemática de la biogénesis de melanosomas. Los estadios I y II, no pigmentados, permiten la formación de las estructuras internas del melanosoma, donde se depositará de forma organizada la melanina sintetizada en los estadios III y IV. Los melanosomas en estadio IV, totalmente cargados de melanina, se transfieren a los queratinocitos a través de las dendritas de los melanocitos. Esquema adaptado de Wasmeier et al. 2008 ⁴⁶.

Algunos de los componentes de la maquinaria de tráfico de proteínas melanosomales se han identificado gracias a patologías en pacientes humanos o alteraciones en la pigmentación del pelaje de los ratones, ya que cualquier mutación genética que interfiera con la biogénesis de los melanosomas y su transporte y transferencia a los queratinocitos se traduce en defectos de pigmentación fácilmente detectables, a la vez que puede causar otros trastornos funcionales que afectan a los LRO ^{26,47}. Por esta razón, la caracterización de algunos de estos genes gracias a cambios en el fenotipo de modelos principalmente mamíferos o células en cultivo representa una importante fuente de información y un modelo para orgánulos pertenecientes a la vía secretora/endocítica, y más concretamente de los LRO ⁴⁸.

Las enfermedades genéticas de la biogénesis de LRO incluyen el síndrome de Chediak-Higashi y el síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS) ⁴⁷. El síndrome Chediak-Higashi es un trastorno multisistémico letal que resulta de defectos en el gen que codifica una proteína llamada CHS1 o Lyst. La deficiencia de Lyst produce una disminución de la fisión de los lisosomas y, presumiblemente, de los LRO ⁴⁹, pero no se sabe el papel que desempeña Lyst en este proceso.

El HPS se caracteriza por albinismo oculocutáneo (OCA) y hemorragia prolongada debido a la malformación de melanosomas y gránulos densos de plaquetas, que también contienen LRO, respectivamente. La mayoría de los pacientes padece además fibrosis pulmonar, que causa mortalidad prematura y algunos también presentan deficiencias en el sistema inmunológico debido a defectos en las células T citotóxicas o células NK (*natural killer*), cuya función depende también del correcto funcionamiento de LRO. Hay al menos nueve subtipos de HPS, cada uno causado por defectos en un gen diferente, que incluyen subunidades del complejo AP-3, que participa en el tráfico de tirosinasa (TYR) y OCA2 al melanosoma, o de los complejos de biogénesis de los LRO (BLOC-1, 2 y 3) ⁵⁰.

2.1.1.2. Transportadores de la membrana del melanosoma. Regulación del pH intramelanosomal.

El transporte de iones a través de las membranas es un proceso celular muy relevante para la biología de la célula y para los melanocitos, en particular. Así, además de los genes que codifican las enzimas de la melanogénesis, proteínas estructurales del melanosoma y otras que contribuyen a la distribución y reparto de estos orgánulos en la epidermis, participan como reguladores de la pigmentación un grupo de genes reguladores del pH melanosomal que codifican proteínas transportadoras de iones que actúan tanto de canales a favor de gradiente como de bombas en contra de gradiente electroquímico ⁵¹. El pH es un regulador crítico en la biogénesis organular en general. Los melanosomas son LRO, y poseen un pH ácido en sus estadios tempranos, que va alcalinizándose a medida que empiezan a madurar y a cargarse de melanina ³⁵. Por ello es evidente que los melanosomas utilizan canales o transportadores para regular las concentraciones de diferentes iones, entre ellos los protones. Estos transportadores de iones desempeñan un papel fundamental en el proceso de endocitosis y tráfico vesicular, mediante el control del pH del medio intraorganular, que va desde aproximadamente 7 hasta 4.

Mutaciones en algunos de los genes que codifican proteínas transportadoras de iones también se han relacionado con defectos en la pigmentación, como el OCA en humanos ^{52,53}. Estas manifestaciones clínicas son debidas, en gran medida, al papel que desempeñan los canales iónicos en la biogénesis y maduración de los melanosomas, ya que modulan el gradiente y el potencial de membrana, definitivos en los eventos de fisión y fusión, endocitosis, exocitosis, tráfico proteico y biogénesis organular ⁵⁴.

En la membrana plasmática de los melanocitos y otras células de la piel, así como en el oído interno, se expresan canales pertenecientes a la familia TRP (por Transient Receptor Potential channels), como TRPM1, TRPM7 y TRPA1. Estos canales participan en la entrada de iones a la célula de modo poco selectivo ⁵⁴. Uno de los iones que pasa a través de ellos es el Ca²⁺. Algunas mutaciones en TRPM1 ocasionan un aclaramiento del pelaje de animales, como el caballo *Appaloosa*, con patrones punteados y ceguera nocturna. En los melanocitos humanos, estas

mutaciones también reducen la pigmentación basal, aunque su papel *in vivo*, de momento, es hipotético. Las mutaciones en TRPM7 en pez cebra también ocasionan desórdenes en el desarrollo de los melanocitos.

En la membrana de los melanosomas se expresan un buen número de canales y bombas, algunas comunes con los lisosomas y otras vesículas de la vía endosomal, pero otras propias de estos orgánulos de los melanocitos y relevantes para la pigmentación. Entre las primeras, destacan TRPML3, TPC2 y CLC-7, CTNS y las V-ATPasas. Entre las proteínas transportadoras de iones propias de los melanosomas, cabe mencionar OCA2 (proteína P), SLC45A2 (MATP), SLC24A5 (NCKX5) y la ATPasa ATP7A⁵¹. A pesar de la enorme importancia que desempeñan todas ellas en la biología de los melanocitos se desconoce hoy en día la función precisa de la mayoría⁵⁵⁻⁵⁷. A continuación, se expone un breve resumen de la estructura y función de las mismas, en la medida del conocimiento que se tiene de ellas.

MCOLN3 pertenece a una pequeña subfamilia génica de los canales TRP, conocida como mucolipinas. A la proteína codificada por *MCOLN3* se la conoce por TRPML3 o MCOLN3. Se expresa mayoritariamente en la membrana plasmática y en los endosomas tempranos y tardíos, en los que parece desempeñar un papel muy relevante en la regulación de la acidificación y por lo tanto del tráfico interorganular de la vía endosomal, procesos de fusión y fisión, tráfico, autofagia y exocitosis⁵⁸. Aunque hoy en día solo se dispone de información limitada sobre su función molecular, se conoce que estos canales contribuyen al incremento de la melanina celular^{59,60}. MCOLN3 posee una topología característica con 6 hélices transmembrana, y forma homo- y heterodímeros con TRPML1 y TRPML2 cuando se sobreexpresa en células heterólogas. Actúa como un canal de iones Ca²⁺, que pasarían desde el lumen del melanosoma hasta el citosol, cuya apertura está probablemente regulada por el pH de modo que el canal se cierra en respuesta a un medio extracelular o intraorganular muy ácido. Así, parece que a bajo pH intravesicular el canal queda inactivo. En células que sobreexpresan esta proteína, el pH endosomal es elevado, lo que sugiere que este canal es indispensable en la regulación del pH endosomal⁶¹. Los alelos dominantes con ganancia de función del gen *Mcoln3* son responsables del fenotipo Varitint-Waddler del ratón, y cursan con letalidad embrionaria, defectos de pigmentación y sordera en los animales portadores. Concretamente, las mutaciones Va (A419P) y Va^J (A419P, I362T) en *Mcoln3* producen cambios en el comportamiento, coloración y visión del ratón⁵⁸ (**figura I-5**). Los melanocitos que expresan el gen mutante de *Mcoln3* poseen una sobrecarga de Ca²⁺ citosólico que afecta a la adhesión, integridad de la membrana y viabilidad celular.

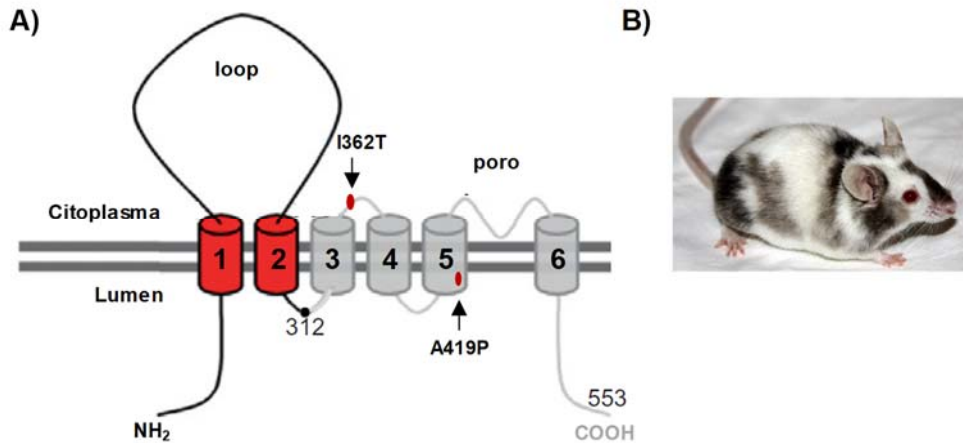


Figura I-5. Representación esquemática de la proteína codificada por Mcoln3 y fenotipo mutante. A) Topología de la proteína, así como la posición y cambio de los aminoácidos mutados en el ratón Va^J/Va^J . Adaptado de Choi et al. 2014 ⁶² B) Imagen del ratón mutante Va^J/Va^J .

TPC (del inglés Two Pore Channels) es una familia de canales intraorganulares expresados en orgánulos ácidos como los lisosomas y los endosomas tardíos, ubicuos en las células humanas y del ratón. La función de estos canales está relacionada con el transporte selectivo de Na^+ en respuesta a una baja concentración de ATP intracelular mediada por falta de nutrientes. TPC2 participa en la fusión de orgánulos, la regulación del pH y de algún modo en la fisiología de los melanosomas y la pigmentación de los melanocitos, pues polimorfismos de nucleótido único (SNPs) correlacionan con el color del pelo en humanos ⁶³.

CLC-7 es un canal de iones cloruro que media un antiporte con protones. Está expresado en los lisosomas, de los que exporta cloruros hacia el citosol a cambio de la entrada de protones al lumen lisosomal y requiere para su actividad la cooperación con la proteína Ostm1. En los melanocitos, la expresión de CLC-7, regulada por el factor de transcripción Microftalmia (MITF), es importante para la función y supervivencia de los mismos, pues ratones mutantes que carecen de Clc-7 o de Ostm1 (*grey-lethal* mouse) tienen defectos de pigmentación, además de defectos óseos ⁶⁴. La concentración de Cl^- luminal varía dramáticamente en la vía endosomal y suele correlacionar inversamente con el pH ⁶⁵, es decir, a valores ácidos de pH intraorganular, suele haber menor concentración de cloruro que a valores más neutros. Además, el Cl^- luminal podría modular canales iónicos para regular de forma indirecta el pH ⁶⁶. Por ello, puede que los melanosomas empleen los transportadores de este anión para modular la acidez del lumen melanosomal, participando así en la maduración de los mismos.

La cistinosina (**CTNS**) es una proteína transportadora expresada en los lisosomas de varios tejidos como ojos, glándula tiroidea, páncreas, gónadas, músculo, SNC y en los melanosomas de los melanocitos. CTNS transporta cistina desde el lumen del orgánulo hasta el citosol ⁶⁷. Su secuencia de aminoácidos es compatible con una estructura terciaria con siete hélices

transmembrana, cuyo extremo amino terminal quedaría orientado hacia el lumen del orgánulo y el carboxilo terminal hacia el citosol celular (**figura I-6A**). Probablemente simporta cistina/H⁺ fuera de los orgánulos lisosomales o de los LRO, influyendo de este modo en el mantenimiento del pH luminal. Mutaciones en el gen *CTNS* dan lugar a la enfermedad autosómica recesiva cistinosis, caracterizada por acúmulo de cristales de cistina a pH ácido. De momento, se han descrito unas 100 mutaciones patogénicas con distinto grado de severidad y manifestación clínica: la forma nefropática infantil, la forma juvenil nefropática y la no nefropática ocular. La manifestación ocular no nefropática es la que ocurre en adultos, con fotofobia y despigmentación de la retina, así como complicaciones posteriores que conducen a la ceguera ⁶⁸. Todo ello es debido a la acumulación de cristales de cistina en la córnea. Además, los pacientes no caucásicos con esta enfermedad presentan pelo rubio, piel clara y envejecimiento prematuro de la piel, debido a mayor cantidad de feomelaninas, por alteración en la melanogénesis (**figura I-6B y I-6C**). De hecho, se ha descrito que el silenciamiento génico en células de melanoma en cultivo del gen *CTNS* redujo alrededor de un 50% la síntesis de melanina ⁶⁹.

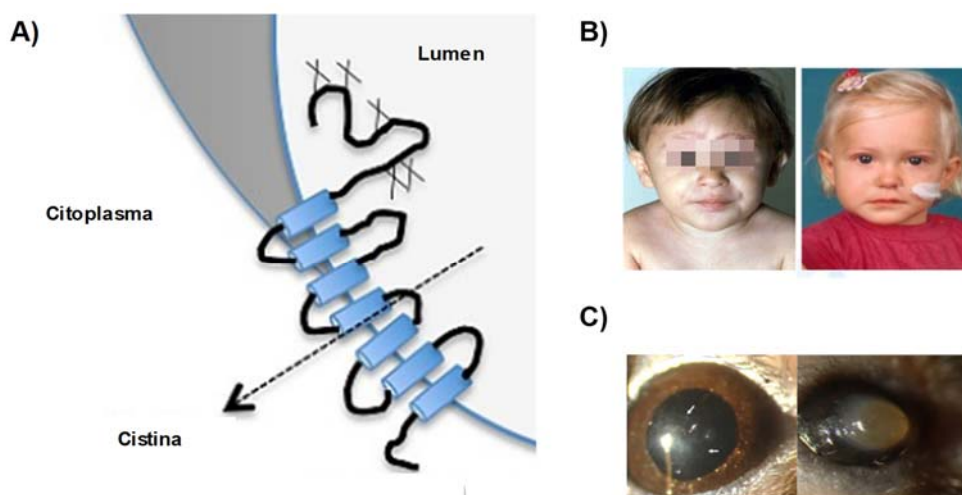


Figura I-6. Representación esquemática de la proteína codificada por *Ctns* y fenotipo mutante. A) Topología de la proteína, B) imagen de individuos enfermos de cistinosis y C) imágenes de ojos de ratones de 7 meses de edad: las flechas blancas indican aparición de cristales en la córnea (izquierda) y el aspecto de la córnea en la fase final de la enfermedad (derecha) del ratón mutante *Ctns*^{-/-} ⁷⁰.

Las ATPasas vacuolares (**V-ATPasas**) conforman una familia de proteínas de membrana multiméricas y complejas que funcionan como bombas de protones ⁷¹. En ellas se distinguen dos dominios estructurales y funcionales bien diferenciados. Uno de ellos, denominado V_0 , posee una conformación en anillo, anclado en membrana, y funciona como un motor y una bomba de protones. Este dominio V_0 está acoplado al funcionamiento del segundo dominio (V_1), que está orientado hacia el citosol y posee actividad catalítica hidrolítica de ATP (**figura I-7**). Esta familia de proteínas se expresa mayoritariamente en los lisosomas, endosomas y vesículas de la vía secretora, pero también en la membrana plasmática de determinados tipos celulares como osteoclastos, células del túbulo renal proximal y del epidídimo. El canal facilita el transporte de

protones desde el citosol hasta el lumen de las vesículas endosomales, o bien hasta el medio extracelular⁷². Esta translocación de protones contribuye a la acidificación del medio intraorganular, necesaria para la degradación de proteínas dependiente de hidrolasas, que tiene lugar en los lisosomas. Además, el gradiente de pH generado también favorece el co-transporte mediado de pequeñas moléculas como aminoácidos, neurotransmisores o iones como el Ca^{+2} a través de otros transportadores dependientes de protones. En los endosomas tempranos la V-ATPasa aporta el pH ácido necesario para facilitar la separación de los receptores de sus ligandos y permitir el reciclaje de los primeros a la membrana plasmática. El pH ácido participa, así mismo, en la gemación de vesículas de la vía endosomal que transportan cargo entre endosomas tempranos y endosomas tardíos ⁷³.

El dominio catalítico V_1 asociado con la región citosólica de V_0 promueve la hidrólisis de ATP y genera ADP y P_i en el citosol. La hidrólisis de un ATP aporta la energía necesaria para que el anillo V_0 rote 360° e impulse el paso de 2-4 protones en contra de gradiente hacia el lumen del orgánulo o al medio extracelular. La estructura de V_1 está compuesta por 8 tipos de subunidades (A-H) con una estequiometría A3 B3 C D E3 F G3 H. La actividad catalítica reside en las interfases entre las subunidades A y B y provoca un cambio conformacional en ellas que se transmite al vástago central formado por las subunidades D y F, promoviendo su rotación. Las subunidades C, E, G y H forman el anclaje que impide el movimiento del hexámero A3B3 durante la hidrólisis de ATP. Precisamente, el vástago central es el que acopla la actividad catalítica de la V-ATPasa con la rotación del anillo de V_0 embebido en la membrana. Este dominio está compuesto por las subunidades a-e con una estequiometría ac10de. Las subunidades c conforman el anillo, cuya rotación, inducida por la rotación de D y F y d, determina la translocación de protones a través de los semicanales que se alojan en la subunidad a (**figura I-7**).

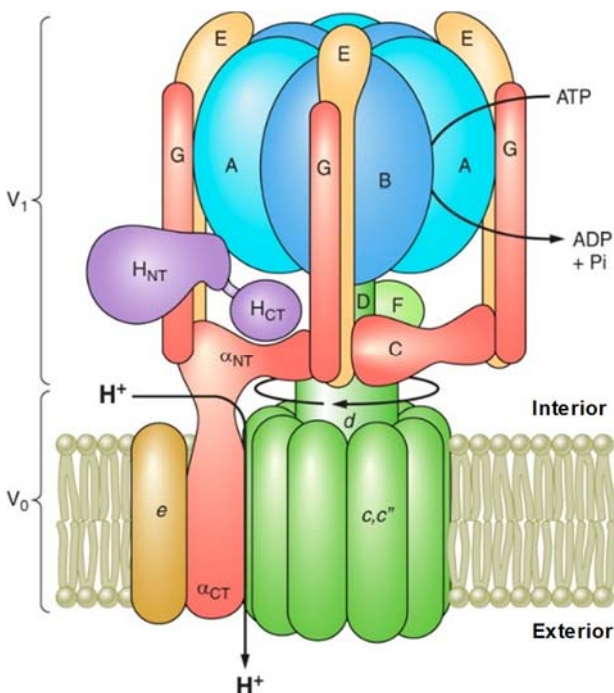


Figura I-7. Estructura general de las V-ATPasas. El esquema detalla los dominios V_0 y V_1 , con especificación de las subunidades que los componen, e indica la actividad ATPasa del dominio citosólico y la arquitectura del anillo c en contacto con los semicanales a y con el vástago d central del dominio V_0 ⁷¹.

La actividad de este complejo multiproteico está sometida a una estrecha regulación que ocurre a varios niveles: i) la eficiencia en el proceso de ensamblaje reversible que tienen los dos dominios; ii) las isoformas de las distintas subunidades que lo componen. De hecho, la eficiencia en el acoplamiento entre el bombeo de protones y la hidrólisis de ATP parece depender de la presencia de determinadas isoformas del dominio V_0 en la estructura del complejo. Los niveles de expresión de estas isoformas son tejido y tipo celular-específicos y se desconoce la regulación de su expresión génica. Por otro lado, se ha descrito que el complejo de la V-ATPasa se puede disociar de modo reversible en respuesta a distintos estímulos (**figura I-8**).

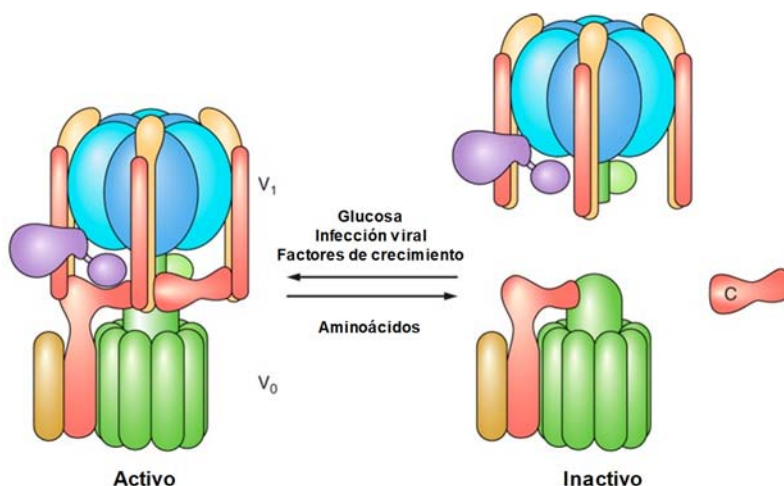


Figura I-8. Esquema representativo de la regulación de la V-ATPasa. La forma activa es regulada de manera reversible por disociación de los dominios V_1 y V_0 , que da lugar a la forma inactiva ⁷⁴.

A través de la regulación de la asociación-disociación de los dos dominios de las V-ATPasa, estas proteínas podrían actuar como sensores metabólicos. Por ejemplo, en ausencia de glucosa la V-ATPasa se disociaría y el sistema no estaría activo, con lo que no consumiría ATP para conservar energía metabólica. La disponibilidad de aminoácidos también sería un estímulo para el desensamblaje de los dos dominios. Así mismo, la disociación de los dos dominios parece estar regulada en respuesta al pH luminal: en células neuroendocrinas, están asociados al pH neutro de los gránulos secretores y, por el contrario, se disocian en condiciones ácidas, para facilitar la exocitosis. Sin embargo, en células de riñón, la disociación aumenta en los orgánulos menos ácidos. Por último, la naturaleza de los lípidos de las membranas, también podrían dictar el ensamblaje. Se ha descrito la dependencia de determinados derivados acilo (26 C) unidos a esfingosina en el ensamblaje y por tanto en la actividad del complejo. La ausencia de fosfatidilinositol-3,5-bifosfato se ha relacionado también con deficiencia en el ensamblaje ⁷⁵.

OCA2 es un gen cuya mutación ocasiona el ratón *pink-eyed dilution*, caracterizado por falta de pigmento en el pelaje y ojos. En humanos provoca el OCA2 ⁵³. Codifica una proteína melanosomal con una estructura terciaria que se corresponde con un canal de 12 hélices transmembrana, implicada en la regulación del pH melanosomal y quizá en el transporte de tirosina y tirosinasa al melanosoma ⁷⁶. Por eso, se cree que los individuos portadores de esta

mutación carecen de pigmentación debido, quizás, a un transporte deficiente de tirosina a los melanosomas y a una falta de actividad melanogénica.

SLC45A2 es un gen que, como en el caso anterior, codifica presumiblemente un canal de transporte de iones, con 12 hélices transmembrana y de localización melanosomal ^{77,78}. Posee cierta analogía con canales transportadores de glucosa, con los que comparte el bolsillo de unión de glucosa en un lazo citosólico, por lo que se le considera un simportador de glucosa y protones. Regula el pH melanosomal ⁷⁹, el transporte de tirosinasa (enzima limitante de la velocidad de síntesis de melaninas) al orgánulo y la ultraestructura del mismo ⁸⁰. Así, los ratones portadores de mutaciones en este gen, denominados *underwhite*, se caracterizan por poseer una severa deficiencia de pigmentación en el pelaje y los ojos. En humanos, es la causa de OCA4 ⁷⁸. Es importante mencionar que la inhibición farmacológica de las V-ATPasa rescatan parcialmente el fenotipo de OCA2 y SLC45A2 en pez cebra y en cultivos de melanocitos, por lo que esto sugiere que la desregulación del pH subyace a los defectos de pigmentación asociados con estas mutaciones ^{79,81,82}.

SLC24A5 pertenece a la familia de los transportadores intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependientes de K^+ ⁸³. Su actividad promueve un aumento del Ca^{2+} en el lumen melanosomal, a costa del Ca^{2+} citosólico, que modula el contenido en melaninas ⁶⁰. Mutaciones en el gen que lo codifica dan lugar al fenotipo denominado *golden* en pez cebra, y a OCA6 en humanos por déficits de pigmentación ^{55,84}.

La **ATP7A** es una ATPasa transportadora de Cobre (Cu^{2+}) expresada en los melanosomas y que suple de este metal cofactor a tirosinasa, de tal manera que participa en la maduración de los melanosomas ⁸⁵.

Igualmente, **OA1** tampoco es una bomba de protones, sino una proteína integral de la membrana del melanosoma que pertenece a la familia de los GPCRs, crítico para la biogénesis melanosomal ⁸⁶. Como otros GPCRs, es muy probable que esté acoplado a transportadores iónicos y mediante su actividad regule el transporte melanosomal, la fusión y fisión de los melanosomas. Las mutaciones en el gen que lo codifica ocasionan albinismo ocular por deficiencia de pigmentación en el ojo ⁸⁷.

En resumen, la acción de estos transportadores de iones en el melanosoma regula su pH, de forma compatible tanto con la biogénesis como con la síntesis del pigmento (**figura I-9**). Pero los detalles de estos procesos y las interacciones funcionales implicadas permanecen poco conocidas.

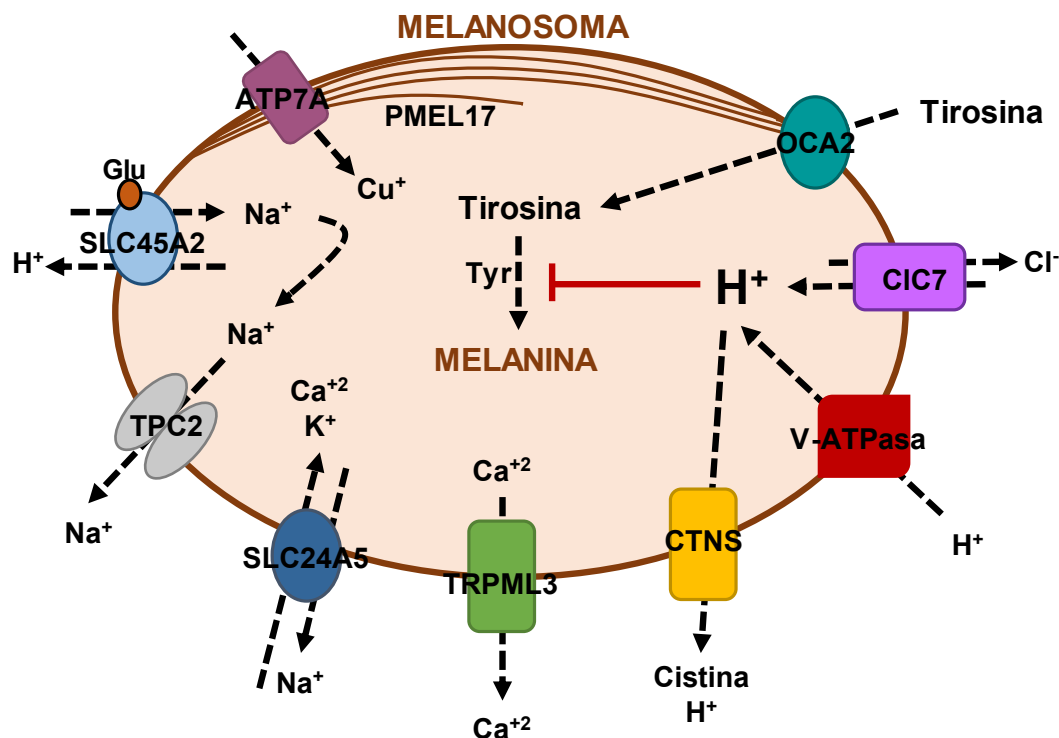


Figura I-9. Regulación de la melanogénesis por varios transportadores melanosomales. Tirocina y cisteína, precursores de eu- y feomelaninas, son transportados activamente al interior del melanosoma. La cistina, dímero oxidado de la cisteína, se transporta del lumen al citoplasma a través de CTNS, cotransportador Cistina/ H^+ . Los niveles de protones se regulan por 4 transportadores de iones: V-ATPasa, SLC45A2, SLC24A5 y TPC2. Polimorfismos en alguno de estos transportadores puede producir la acidificación del medio melanosomal, y están asociados a fenotipos de hipopigmentación, incluyendo OCA y OA.

2.1.2. Melanogénesis.

La síntesis de melanina, o melanogénesis, se produce por una compleja ruta enzimática denominada la vía de Raper-Mason⁸⁸. En ella, los pigmentos melánicos se sintetizan a partir de L-tirosina, con la participación de 3 metaloenzimas muy semejantes entre sí: tirosinasa (TYR) y las proteínas relacionadas con la tirosinasa (TYRP1 y TYRP2).

TYR cataliza dos reacciones sucesivas: la hidroxilación de tirosina a L-DOPA, etapa limitante del proceso, y la oxidación de L-DOPA a DOPAquinona (DQ), utilizando como oxidante el oxígeno molecular. Estas dos reacciones transcurren acopladas, sin que tenga lugar la salida del producto intermedio del centro activo de la enzima⁸⁹ y en un único centro activo⁹⁰. A partir de este intermedio, la ruta puede derivar en la síntesis de los tipos de melaninas mencionadas, en función del contenido celular en compuestos con grupos tioles:

- En situación de bajo contenido de compuesto con grupos sulfhidrilo se producen eumelaninas. DQ cicla espontáneamente para formar el intermedio DOPAcromo, que puede descarboxilarse espontáneamente generando 5,6-dihidroxiindol (DHI), el cual se oxida y da lugar a polímeros insolubles de alto peso molecular de color marrón oscuro

(DHI-melaninas); o bien, en presencia de la enzima TYRP2, también llamada DOPAcromo tautomerasa (DCT), puede reorganizarse formando ácido DHI-2-carboxílico (DHICA), que forma polímeros de moderada solubilidad, tamaño intermedio y color marrón claro (DHICA-melaninas) ⁸⁸. En los eumelanosomas siempre se forma una mezcla de DHI y DHICA, cuya proporción está determinada por la actividad de TYRP2 ⁹¹.

Las siguientes etapas de la vía, poco caracterizadas, incluyen reacciones de oxidación y en las que parece participar TYRP1 ⁹², que producen indol-5,6-quinona (IQ) y ácido IQ-2-carboxílico (IQCA) que se van incorporando al polímero melánico ^{93,94} (**figura I-10**).

- En situación de abundancia de compuestos tiólicos (cisteína o glutatión), se produce una reacción de conjugación entre estos compuestos con DQ, que conduce a la formación de cisteinilDOPA. Estos compuestos se oxidan y polimerizan dando lugar a feomelaninas ⁹⁵⁻⁹⁷.

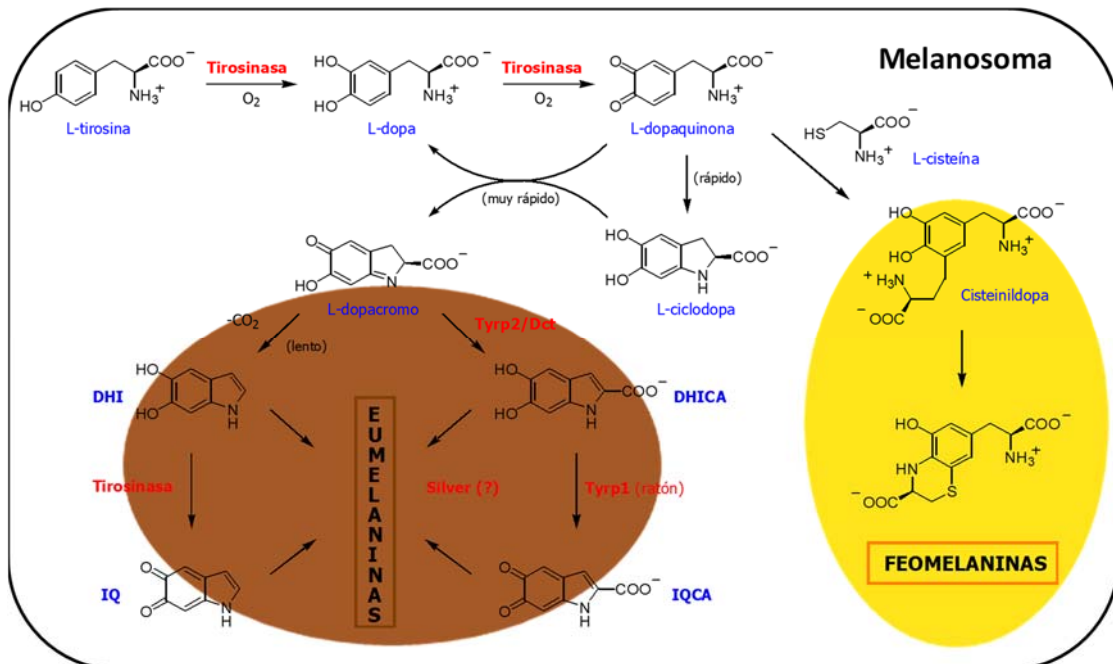
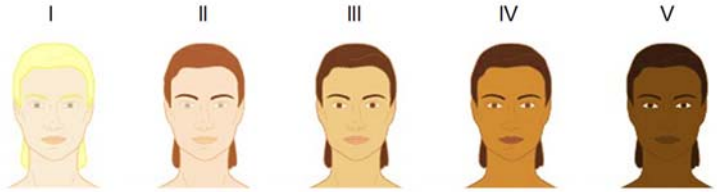


Figura I-10. Vía de Raper-Mason. Primeras etapas de la ruta biosintética de eumelaninas y feomelaninas.

Las enzimas melanogénicas (TYR, TYRP1 y TYRP2/DCT) son una familia de proteínas de alto grado de homología, con estructuras terciarias y centros activos muy similares ⁹⁸, con características comunes tales como: tamaño parecido, con cadenas polipeptídicas de algo más de 500 aminoácidos; varias secuencias consenso de N-glicosilación; centros activos con residuos de unión a iones metálicos muy conservados, presentando como cofactor Cu^{+2} para TYR y probablemente también TYRP1, y Zn^{+} para TYRP2 ^{91,101}; presentan un único fragmento transmembrana que atraviesa la membrana melanosomal, compuesta por unos 25 aminoácidos hidrofóbicos, de manera que las enzimas se orientan hacia el interior del melanosoma ⁹⁸.

Estas tres proteínas sufren un procesamiento post-traducciona complejo antes de alcanzar la membrana melanosoma. Así, durante la traducción de TYR, la cadena polipeptídica se transloca al RE, donde se producen las primeras modificaciones co- y post-traduccionales, incluyendo N-glicosilaciones y formación de puentes disulfuro ¹⁰¹. A continuación, es transportada al AG donde los N-oligosacáridos sufren modificaciones adicionales. Finalmente, las proteínas correctamente plegadas se empaquetan en vesículas que se fusionan con los premelanosomas y melanosomas de estadio II ²⁶. Aquellas incorrectamente plegadas quedan retenidas y son finalmente degradadas en el proteasoma ¹⁰². La importancia del plegamiento de estas enzimas queda de manifiesto en que algunos casos de OCA ¹⁰³ se deben a retención en el RE de TYR o TYRP1 o a dificultades en su transporte al melanosoma al coexistir una de las proteínas silvestre con la otra aberrante ⁴².

El color de piel en individuos caucásicos y la capacidad de protección frente a la radiación solar están determinados por la proporción de eumelaninas/feomelaninas epidérmicas. Las eumelaninas, de color marrón o negro, son altamente fotoprotectoras, mientras que las feomelaninas (color rojizo-amarillento) son poco eficaces absorbiendo luz UV e incluso parecen actuar como fotosensibilizadoras ¹⁰⁴. Para sistematizar y clasificar de manera precisa los rasgos fenotípicos y el riesgo de daño desencadenado por la fracción UV de la radiación solar, Thomas B. Fitzpatrick estableció en 1975 una clasificación de la piel en varios fototipos (**figura I-11**), atendiendo a la coloración de piel, pelo y ojos y el tipo de respuesta a la exposición al sol [posteriormente se incluyó en la clasificación un criterio adicional asociado con el riesgo de padecer cáncer de piel] ^{105,106}.



Fototipo	Descripción de la piel	Tendencia a quemaduras solares	Bronceado
I	Muy clara, lechosa, con pecas. Pelirrojos, ojos azules	Facilidad	Nulo
II	Piel blanca. Tras mucha exposición solar adquiere tono café con leche. Con pecas. Pelo rubio pelirrojo, ojos azules o verdes	Facilidad	Ligero
III	Piel clara (caucásicos). Con las primeras exposiciones solares sufren quemaduras, aunque posteriormente tono bronceado. Pelo castaño	Cierta facilidad	Claro
IV	Piel clara, similar al III, pero que en pocos días adquiere bronceado. Pelo castaño oscuro	Requiere exposición intensa y mantenida	Oscuro, con facilidad
V	Piel morena, con cierto tono oscuro natural. Pelo castaño muy oscuro	Requiere exposición solar muy intensa	Muy oscuro y fácilmente

Figura I-11. Escala de los fototipos de Fitzpatrick. Descripción de la piel, tendencia a quemaduras solares y bronceado de cada uno de los fototipos existentes.

3. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs).

Las células se comunican con el medio gracias a numerosas proteínas que están dedicadas exclusivamente a recibir ligandos químicos externos o estímulos físicos, y a desencadenar una respuesta intracelular. La superfamilia de los GPCRs, con más de 800 miembros en el hombre, es la familia más extensa de proteínas de membrana ¹⁰⁷. Sus miembros regulan la respuesta de gran variedad de estímulos como la luz, el olor, el gusto, recepción de iones, neurotransmisores y hormonas. En respuesta a estos estímulos regulan la actividad de enzimas metabólicas, canales iónicos, transportadores de membrana, movilidad y maquinarias de secreción ¹⁰⁸. Reciben el nombre GPCRs por la capacidad que presentan para reclutar y regular la actividad de proteínas G, proteínas intracelulares heterodiméricas que forman la parte central del mecanismo de transducción de señales ¹⁰⁹.

Los GPCRs comparten una estructura característica, constituida por 7 α -hélices transmembrana (TM), separadas por 3 bucles extracelulares y 3 bucles intracelulares ¹⁰⁹, un extremo N-terminal extracelular y un C-terminal intracelular. La longitud de las secuencias de los bucles conectores y de los extremos es muy variada (**figura I-12**).

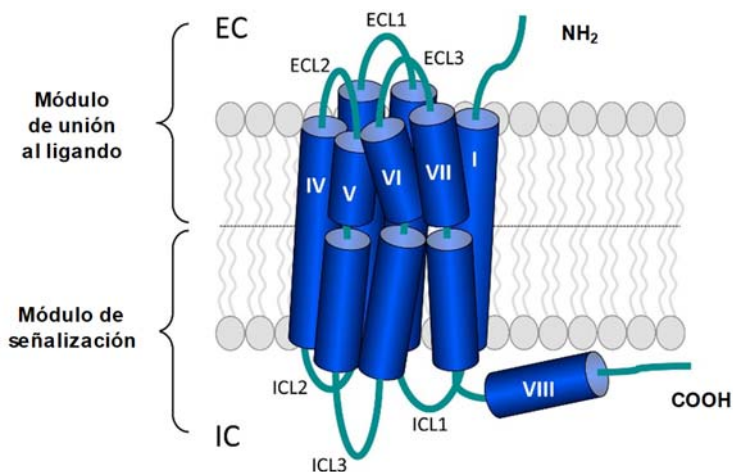


Figura I-12. Estructura general de los GPCRs. Representación tridimensional de la estructura de GPCR en la membrana plasmática. En azul se observan las 7 hélices TM. En verde, los bucles intracelulares (ICL1-3) y extracelulares (ECL1-3) y los extremos N- y C-terminal.

La unión de agonistas a la cara extracelular de los GPCR induce un cambio conformacional ¹¹⁰ que lleva al acoplamiento del receptor a una proteína G heterotrimérica (formadas por las subunidades α , β y γ). Las proteínas G son miembros centrales del mecanismo de transducción de señales al interior celular ¹⁰⁹ capaces de unir nucleótidos de guanina y con actividad GTPasa intrínseca. La interacción del GPCR con las proteínas G promueve que la subunidad $G\alpha$ intercambie GDP por GTP y se disocie del dímero $G\beta\gamma$ y del receptor (**figura I-13**). La subunidad $G\alpha$ y el dímero $\beta\gamma$ activan por separado diversos efectores ¹¹¹.

En el caso de la proteína $G\alpha$, su acción dependerá de la familia a la que pertenezca ¹¹²:

- G_s activa la adenilato ciclasa (AC) y canales de Ca^{2+} .
- G_i inhibe la AC y activa canales de K^+ (GIRK);
- G_t o transducina, activa las fosfodiesterasas de GMPc de células fotorreceptoras.
- G_q activa la fosfolipasa $C\beta$.
- G_{12} activa los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) de Rho.

Como consecuencia de estas acciones, se estimula o inhibe la producción de segundos mensajeros tales como AMPc, GMPc, diacilglicerol, inositoltrifosfato, ácido araquidónico, etc ¹¹², lo que modula funciones celulares variadas.

El estado activo de las subunidades $G\alpha$ dura hasta la hidrólisis del GTP a GDP debido a la actividad de la GTPasa intrínseca, modulada por otros factores como los denominados RGS (Regulators of G protein signaling)¹¹³, que conduce a la reasociación de las subunidades para formar el heterodímero inactivo.

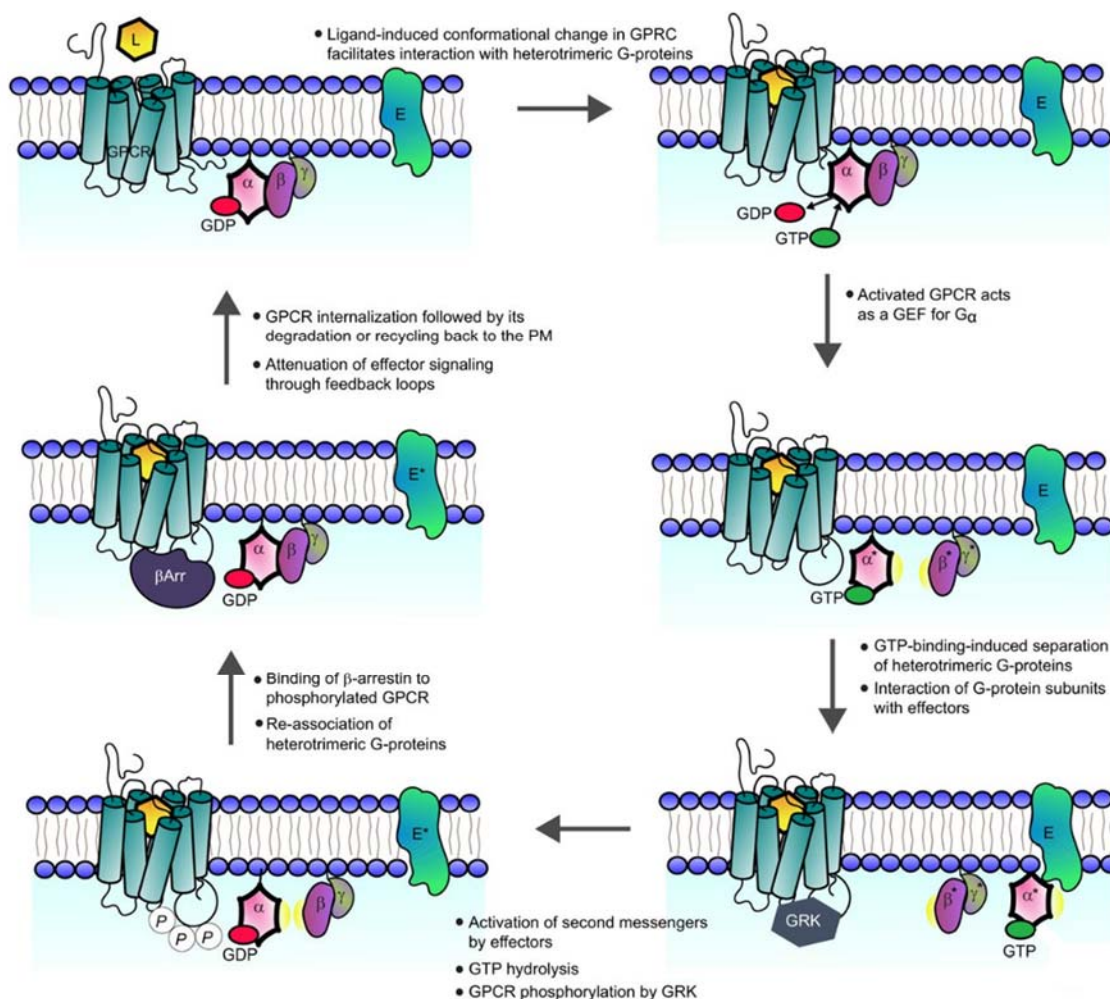


Figura I-13. Ciclo de activación/desactivación de una proteína G tras su unión a un GPCR.

4. MC1R: RECEPTOR DE MELANOCORTINAS 1.

El *MC1R* es uno de los genes principales en la regulación de la pigmentación. Este gen codifica el primer miembro clonado de una pequeña familia de GPCRs de clase A denominada subfamilia de receptores de melanocortinas (MCRs). Esta familia está compuesta por 5 miembros (MC1R-MC5R), que se acoplan positivamente a la cascada de señalización mediada por AMPc. Presentan una alta homología en su secuencia, pero difieren entre sí en la distribución tisular y en la afinidad que presentan por sus agonistas naturales, las melanocortinas (MCs), y por sus antagonistas, como la proteína de señalización agouti (ASP) y la proteína relacionada con agouti (AGRP) ¹¹⁴. Algunos de los procesos fisiológicos regulados por la familia de los MCRs son la pigmentación epidérmica, la ingesta de comida, la producción de cortisol, el comportamiento sexual, la memoria y la respuesta inflamatoria ¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Las MCs con péptidos derivados del polipéptido POMC, que consta de 225 aminoácidos y se expresa generalmente en la pituitaria, en algunas regiones del cerebro y en la piel ^{118,119}. Su procesamiento postraduccional es complejo y específico de tejidos, dando lugar a varias hormonas, entre las que destacan la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH) por ser agonistas de MC1R ¹²⁰ (**figura I-14**). Estas MCs son secretadas por los queratinocitos en respuesta a la radiación UV y estimulan la diferenciación y proliferación de los melanocitos ^{121,122}.

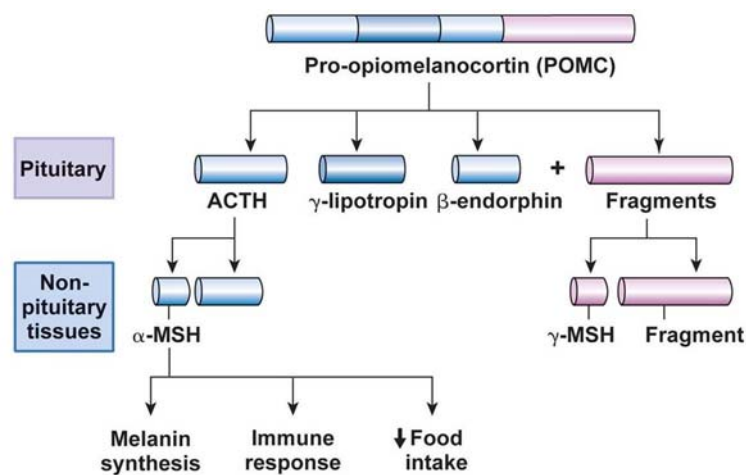


Figura I-14. Procesamiento de proopiomelanocortina y péptidos biológicamente activos derivados.

4.1. Estructura del MC1R.

El gen *MC1R* fue el primero de la subfamilia MCR en ser clonado ^{123,124}. Se expresa sobre todo en melanocitos cutáneos y células de melanoma ^{125,126}. Regula la cantidad y tipo de pigmento producido en la piel y el pelo, aunque también se ha encontrado en otros tipos celulares como queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales y células presentadoras de antígeno ¹²⁰.

estas variantes y el riesgo de sufrir cáncer de piel, incluido melanoma, de modo que el *MC1R* no solo se considera el mayor determinante del fototipo cutáneo, sino también un gen de susceptibilidad a sufrir esta enfermedad ¹³.

El gen *MC1R* codifica una proteína compuesta por 317 aminoácidos en humanos y 315 en el ratón ¹⁰⁸. Es una proteína transmembrana, con las características ya descritas de los GPCRs (figura I-15).

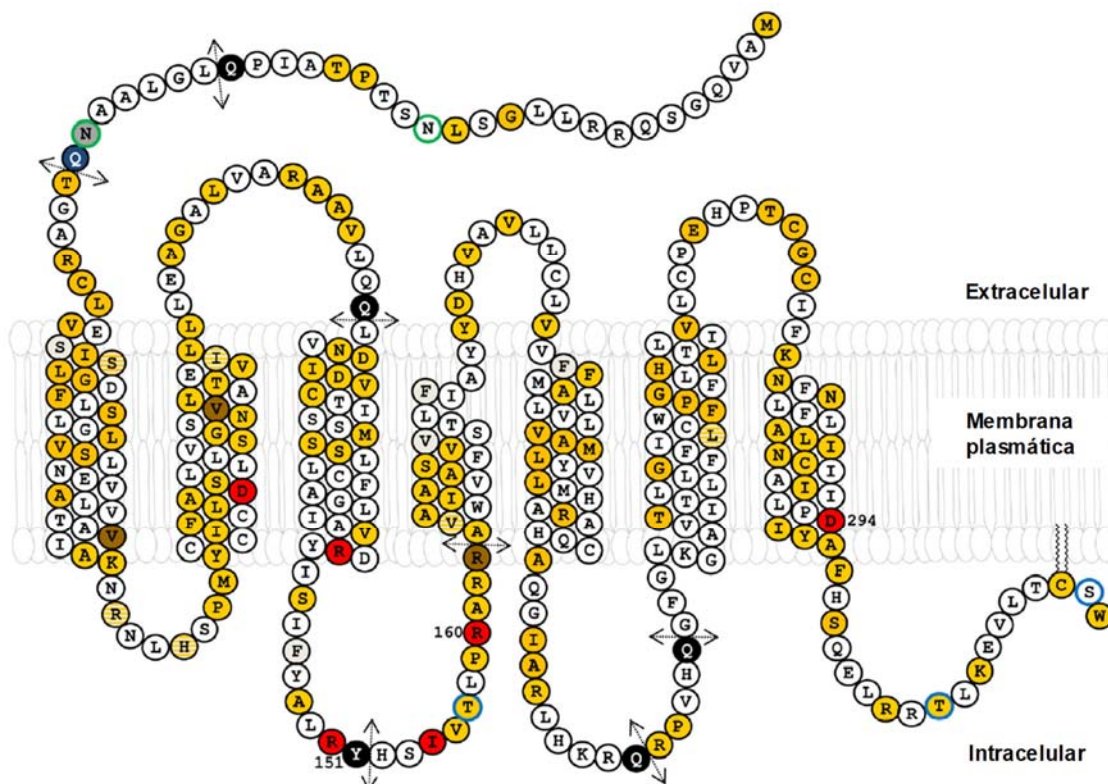


Figura I-15. Estructura primaria y topología del MC1R. Las regiones TM están dibujadas acorde con el modelo en dos dimensiones de Ringholm et al. (2004). La secuencia de aminoácidos corresponde al MC1R WT consenso (GenBank accession number AF326275). En amarillo están indicadas las posiciones polimórficas descritas, pero no asociadas a ninguna característica funcional. En rojo o marrón: mutaciones naturales correspondientes a alelos RHC. En negro seguidos de la flecha, los codones de stop prematuro. Los sitios potenciales de sufrir modificaciones postraduccionales están también marcados: las Ser/Thr fosforilables están indicados con un borde azul y con borde verde las Asn que se glicosilan.

La mayoría de las proteínas de membrana contienen un péptido señal en su extremo amino que las dirige durante la síntesis hacia la membrana del RE, donde se elimina. Sin embargo, el MC1R pertenece a una clase minoritaria de proteínas de membrana que utilizan el primer dominio TM como señal no degradable que los guía hacia la membrana plasmática ¹²⁷.

En el extremo N-terminal citosólico se encuentran dos secuencias consenso de glicosilación: ¹⁵NSTP¹⁶ y ²⁹NQTG³², ambas ocupadas con glicanos estructuralmente distintos. Es importante destacar que esta N-glicosilación es fundamental para la disponibilidad del MC1R en la membrana plasmática, debido a una combinación de dos factores: mejor tráfico hacia la membrana y disminución de la internalización ¹²⁸.

El sitio de unión del ligando es un bolsillo formado por la unión de varios fragmentos transmembrana, localizado por debajo de la interfase entre la membrana plasmática y el medio extracelular. Se han descrito modelos tridimensionales del complejo Ligando-Receptor ^{129,130}, según los cuales algunos residuos cargados negativamente de MC1R, como Glu94 en el TM2, Asp117 y Asp121 en el TM3, interaccionan con el aminoácido Arg de la secuencia común a todas las MCs (His-Phe-Arg-Trp). A esta unión contribuirán también residuos aromáticos situados cerca del lado extracelular del cuarto, quinto y sexto fragmento TM ¹³¹, que interaccionarían con los dos residuos aromáticos presentes en el tetrapéptido farmacóforo.

El extremo C-terminal es intracelular y contiene solo 19 aminoácidos. Este dominio es muy relevante por varios motivos:

- a. Participa en la interacción del complejo MC1R activado con la proteína G ¹³².
- b. Se encarga de la correcta disposición del receptor en la membrana plasmática por la acilación de residuos Cys315 al insertarse en la membrana la cadena alifática del ácido graso ¹³³. Se ha demostrado que la delección artificial de los últimos aminoácidos, incluyendo el tripéptido terminal CSW presente en todos los MCRs, anula totalmente su función ¹³⁴, ya que el mutante es retenido en el RE y no alcanza nunca la membrana plasmática. Por tanto, la integridad de esta región terminal es indispensable para la correcta expresión de MC1R en la superficie, y para su actividad ¹³⁵.
- c. Proporciona señales en el tráfico intracelular retrógrado, ya que contiene residuos de Ser314 y Thr316, cuya fosforilación regula la desensibilización e internalización del receptor ¹³⁶.

4.2. Señalización del MC1R.

El MC1R se activa por unión del agonista α -MSH. Tras esta unión, se puede acoplar a diferentes cascadas de señalización, de las que la mejor caracterizada es la que, a través de la proteína Gas, estimula a la AC. El resultado es un aumento en los niveles intracelulares de AMPc, que actúa como segundo mensajero. El AMPc, a su vez, se une a sitios específicos de las subunidades reguladoras de la PKA, permitiendo así que se liberen y activen las subunidades catalíticas. Una vez activa, PKA fosforila sustratos tales como canales iónicos, enzimas y proteínas reguladoras de la transcripción. Es capaz de translocar al núcleo, donde fosforila miembros de la familia de factores de transcripción CREB. Una vez fosforilado, CREB activa la expresión de genes que contienen la secuencia consenso CRE (elemento de respuesta al AMPc) en la región promotora ⁹(**figura I-16**).

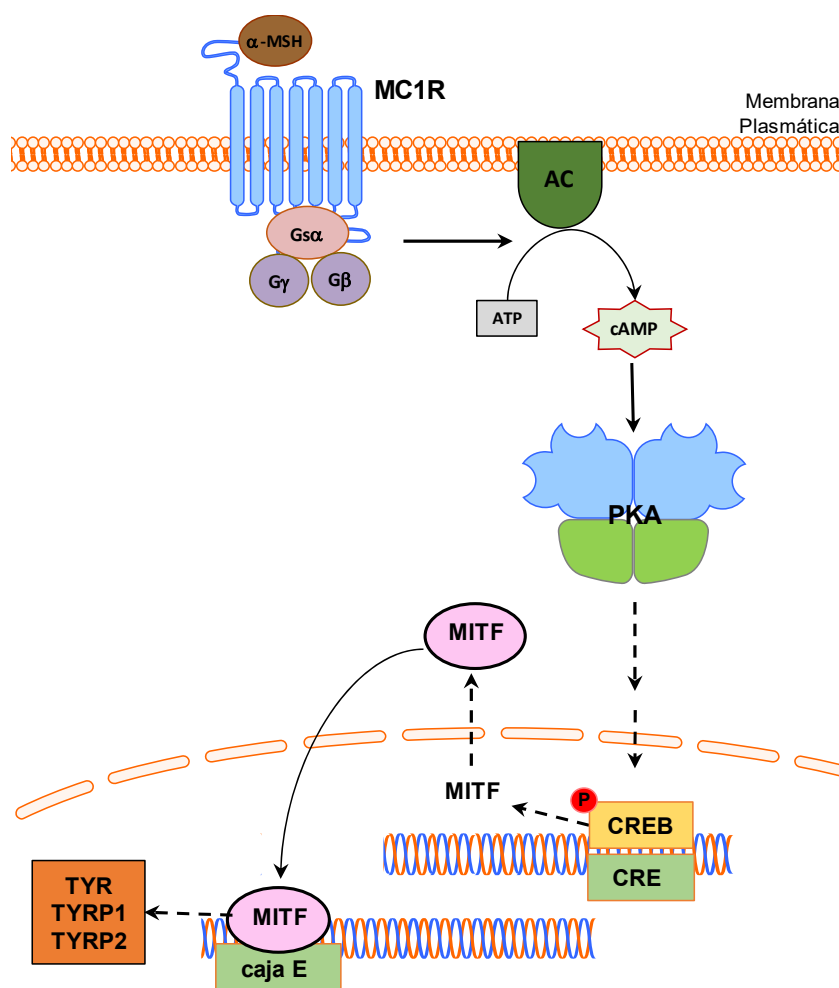


Figura I-16. Señalización del MC1R. Esquema del acoplamiento del MC1R a la vía del AMPc y estimulación de la eumelanogénesis.

El gen más importante en la regulación transcripcional de la melanogénesis, con secuencias CRE en su promotor, es el que codifica MIF¹³⁷. Este factor de transcripción, que se induce por AMPc, se une a la caja E de los promotores de genes de enzimas melanogénicas (*TYR*, *TYRP1* y *TYRP2/DCT*), y estimula la expresión de estas proteínas, así como la maduración de los melanosomas¹³⁷. El resultado final es el aumento de la actividad de la proteína TYR, la enzima limitante de la síntesis de melanina, con el consiguiente aumento de pigmentación. Los niveles de AMPc descienden por la acción de la fosfodiesterasa, cuyo gen *PDE4D* presenta activación transcripcional inducida por el propio AMPc, vía MIF¹³⁸.

Además de esta vía canónica de señalización del MC1R a través de AMPc, se ha descrito que la activación del receptor puede estimular otras vías como la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) ERK1 y ERK2⁹. La activación de esta vía requiere niveles más bajos de MC1R activado, y se produce por transactivación de c-KIT, un receptor tirosina quinasa esencial para la proliferación, diferenciación y supervivencia de precursores del melanocito¹³⁹ (**figura I-17**). Por otro lado, la señalización por AMPc activa la proteína quinasa p38, que también promueve la diferenciación y proliferación, senescencia o apoptosis dependiendo del tipo celular.

Finalmente, otra de las vías de señalización moduladas por MC1R es la vía PI3K/AKT, que participa en procesos como progresión del ciclo celular, proliferación, migración y supervivencia. Los mecanismos de regulación de la actividad AKT aguas abajo de MC1R son poco conocidos, pero podrían implicar también a c-Kit, o bien relacionarse con la fosfatasa PTEN ¹⁴⁰.

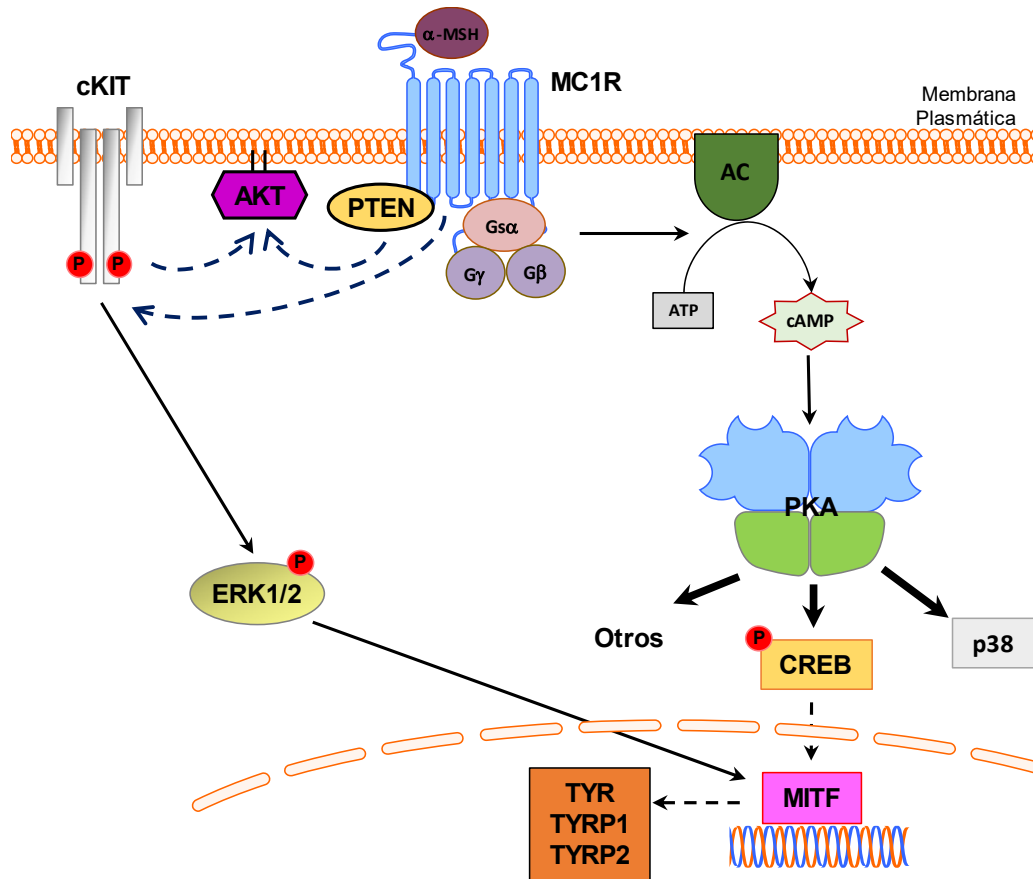


Figura I-17. Vías de señalización activadas por MC1R.

El MC1R presenta actividad constitutiva independiente de agonista ¹⁴¹, característica relativamente frecuente entre los GPCRs ^{13,142}. En receptores constitutivamente activos, como el MC1R, los agonistas inversos, compiten con ligandos activadores por los sitios de unión y además estabilizan la forma inactiva del receptor, disminuyendo la señalización basal. El principal agonista inverso de MC1R es ASP, y recientemente se ha establecido una relación entre esta proteína con la pigmentación en humanos ¹⁴³.

Otro antagonista recientemente identificado es la β-defensina3 (HBD3), péptido perteneciente a una familia de pequeñas proteínas con actividad antimicrobiana, que parece inhibir la producción de AMPc inducida por α-MSH, así como la proliferación de melanocitos y la actividad tirosinasa ¹⁴⁴.

4.3. Regulación de la señalización por MC1R.

La actividad del MC1R está modulada a diversos niveles. El primero de ellos es el genotipo, ya que el gen *MC1R* es altamente polimórfico, con más de 300 variables alélicas ¹³. Otro de los

niveles de regulación es el transcripcional, con numerosos factores endocrinos y paracrinicos que regulan la expresión de MC1R^{145,146}, que también estaría activada por la radiación UV. También influye en la actividad de MC1R el tráfico a través de la vía endocítica-secretora. Otro nivel regulador es la propia unión con las MCs, que además de activación, causa la desensibilización homóloga e internalización en vesículas endocíticas¹³. Algunos de estos eventos reguladores se comentan a continuación.

4.3.1. Variantes alélicas y de splicing de MC1R.

El gen *MC1R* se localiza en el cromosoma 16q24.3 y contiene 4 exones, lo que da lugar a varios transcritos resultado de splicing intra- e intergénico¹⁴⁷. Sin embargo, solo se conoce bien la función y relevancia fisiológica del transcrito *MC1R*-001 (en adelante *MC1R*), que es la forma canónica a la que nos referimos en este trabajo¹⁴.

Además, como hemos comentado anteriormente, presenta un elevado grado de polimorfismo. Algunas de las variantes alélicas del *MC1R* se asocian estrechamente con el pelo rojo, la piel clara y la escasa capacidad de broncearse, fenotipo denominado RHC (Red Hair Colour). Los individuos con este fenotipo, además, son propensos a quemaduras solares tras la exposición a la radiación UV^{148,149}, y tienen mayor riesgo de desarrollar melanoma u otros tipos de cáncer de piel¹⁵⁰⁻¹⁵².

Las variantes del MC1R más fuertemente asociadas a este fenotipo RHC incluyen D84E, R142H, R151C, R160W y D294H, designados como alelos "R" de alta penetrancia. Por el contrario, las variantes alélicas V60L, V92M y R163Q tienen una asociación más débil con el fenotipo RHC y se denominan "r". Las variantes "R" R142H, R151C, R160W y D294H y el alelo "r" V60L, están presentes en el 30% de la población del norte de Europa y corresponden, en conjunto, a más del 60% de todos los pelirrojos¹⁵³.

La causa molecular de este fenotipo es que las formas de MC1R R142H, R151C, R160W y D294H presentan pérdida de función, manifestada por una menor producción de AMPc tras la unión al agonista con respecto al alelo silvestre. El motivo de esta alteración es una retención intracelular con reducida expresión en superficie celular para D84E, R151C y R160W (aunque no para D294H), por lo que un procesamiento aberrante puede contribuir a la pérdida de función asociada con ciertos alelos RHC debido a defectos en el tráfico anterógrado o el reciclaje a la membrana plasmática tras la desensibilización e internalización del receptor¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

Nuestro grupo de investigación, en colaboración con otros grupos nacionales e internacionales, ha caracterizado funcionalmente algunas variantes del receptor y su grado de pérdida de función con respecto al receptor silvestre¹³. Se ha demostrado que el MC1R sufre dimerización constitutiva^{154,157} en una etapa temprana de la biosíntesis, probablemente en el RE, y que dicha dimerización es crucial para la llegada del receptor a la membrana plasmática¹⁵⁸. Además, mutantes naturales pueden homodimerizar y heterodimerizar con el MC1R WT. Esta

heterodimerización podría causar alteraciones en la función del receptor silvestre, con la consiguiente pérdida de eficacia en el acoplamiento a la vía del AMPc ¹⁵⁴.

4.3.2. Tráfico de MC1R.

Tanto el procesamiento como el tráfico del MC1R son esenciales para el funcionamiento de la proteína. Como hemos comentado anteriormente, existen mutantes con pérdida de función debida a defectos en el tráfico anterógrado. El MC1R se sintetiza en el RE rugoso, donde la maquinaria de control de calidad comprueba que se ha plegado e incluso dimerizado correctamente para permitir su tráfico o bien determinar su retención y posterior degradación. La glicosilación de los dos secuencias presentes en el extremo N-terminal de MC1R también se inicia en este compartimento. Estas cadenas se procesan posteriormente en el AG ¹³⁹. El tráfico anterógrado hacia TGN y la membrana plasmática depende de la fosforilación de la Thr157 y otros residuos cercanos ¹⁵⁶.

4.3.3. Desensibilización e internalización.

La desensibilización es un mecanismo de regulación de la señalización de receptores de membrana. Es una pérdida transitoria de la capacidad de acoplamiento a la vía de transmisión de señal y está mediada por una familia de Ser/Thr quinasas conocidas como GRKs. Estas GRKs reconocen al receptor activado ^{159,160} y lo fosforilan, con lo que se produce la interacción con las proteínas de la familia de las β -arrestinas (ARR β), andamios moleculares necesarios para la formación de vesículas endocíticas. De esta manera, se desacopla el receptor de las proteínas G, y se produce la internalización mediante vesículas de clatrina. Este proceso es el principal mecanismo de regulación de la actividad de los GPCRs y determina la intensidad y duración de la respuesta de estos receptores.

La desensibilización del MC1R se produce tras la exposición a agonistas ¹⁶¹, y está mediado por GRK2 y GRK6, que fosforilan al receptor en los residuos Thr308 y Ser316, del extremo C-terminal. Así, mutantes para estos residuos presentan una tasa de internalización reducida ¹³⁶. El destino del receptor, una vez internalizado formando complejos con ARRB2, aún no se ha determinado de forma clara, ya que puede degradarse en los lisosomas o ser reciclado a la membrana plenamente funcional de nuevo ¹³.

5. REGULACIÓN DE LA PIGMENTACIÓN.

5.1. Regulación paracrina.

Los melanocitos proceden de los melanoblastos, precursores indiferenciados que derivan de las células de la cresta neural. La proliferación y diferenciación de melanoblastos/melanocitos está regulada por el entorno tisular, que libera moléculas como α -MSH y ACTH, endotelinas (EDNs), factores de crecimiento como el SCF o el β FGF, etc (figura I-18).

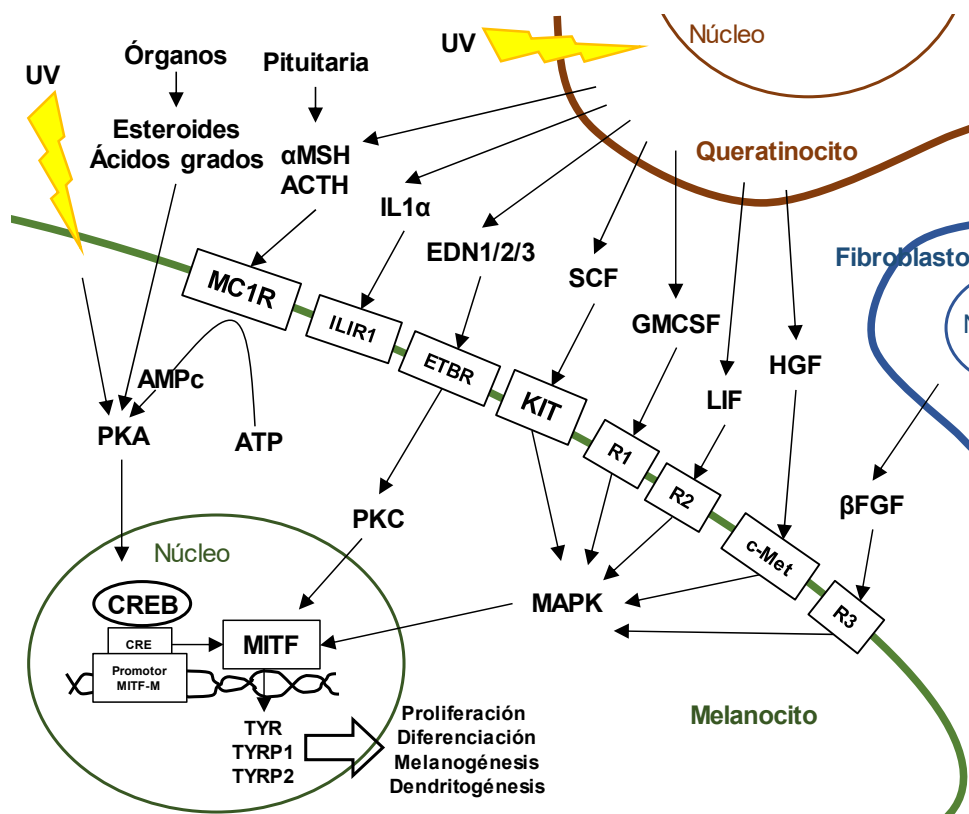


Figura I-18. Regulación de la melanogénesis. Esquema de las vías de señalización de la unidad melano-epidérmica y mecanismos por los cuales los factores derivados de los queratinocitos actúan sobre la proliferación y diferenciación de los melanocitos humanos. R1: GMCSFR (receptor del factor estimulante de macrófagos); R2: LIFR α (receptor LIF, factor inhibidor de leucemia); R3: FGFR1/2 (receptor de factor de crecimiento de fibroblastos). Adaptado de Costin & Hearing 2007 ⁴.

La radiación UV es el principal factor inductor de la melanogénesis, puesto que tiene efectos directos sobre los melanocitos o indirectos por medio de la modulación de la secreción de moléculas de señalización por queratinocitos, fibroblastos y otros melanocitos ¹⁶². En los queratinocitos cutáneos, el daño del DNA inducido por radiación UV conduce a la estabilización y aumento de actividad de la proteína supresora de tumores p53 (figura I-19), que activa la transcripción del gen *POMC*, que codifica el precursor de α -MSH y ACTH ¹⁶³. El resultado es un aumento de la estimulación paracrina de MC1R ¹²², que explica el oscurecimiento de la piel tras la exposición a la radiación UV (bronceado).

La radiación UV también causa peroxidación de lípidos en las membranas celulares, lo que libera especies reactivas de oxígeno (ROS) y, además, diacilglicerol (DAG), de manera que conduciría a la activación de la proteína quinasa C (PKC) en los melanocitos. Alternativamente, esta enzima también se estimularía por medio de la EDN1 secretada por los queratinocitos y su receptor de la membrana de los melanocitos ⁴, y regularía eventos relacionados con la diferenciación de los melanocitos, incluyendo la activación post-traduccional de tirosinasa ¹⁶⁴.

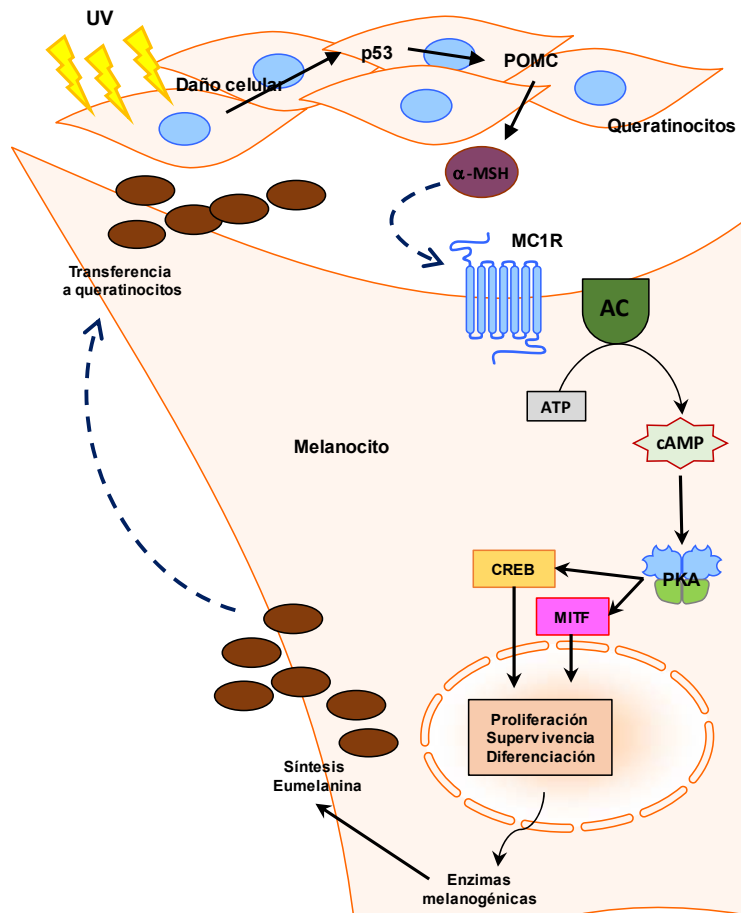


Figura I-19. Activación de los queratinocitos y producción de eumelaninas por melanocitos. La radiación UV incide sobre los queratinocitos, activando p53 y POMC. De este modo se libera α-MSH que activa el MC1R de los melanocitos, estimulando la producción de eumelaninas, que son posteriormente transferidas a los queratinocitos para evitar el daño del DNA producido por la radiación UV.

La fosforilación por PKC de la enzima tirosinasa parece también estar implicada en la regulación. Se produce en el dominio citoplasmático de TYR, en los residuos Ser505 y 509 del extremo C-terminal ¹⁶⁵. Además, parece que inhibición en la actividad de PKC β produce una disminución de la pigmentación cutánea y pilosa, ya que el uso de BIM (bisindolilmaleimida), un inhibidor específico de PKC, también reduce la pigmentación basal y el bronceado en la epidermis ¹⁶⁶.

5.2. Regulación de la biogénesis y transporte de melanosomas.

El control de la maduración de los melanosomas requiere la actuación de enzimas melanogénicas y transportadores, tales como TYR, TYRP1 y OCA2, que deben ser transportadas hasta el melanosoma desde el endosoma temprano donde se han acumulado procedentes del AG. Estas proteínas presentan un motivo de reconocimiento por parte del complejo proteico adaptor (AP). A su vez, AP-1 AP-2 y AP-3 reclutan clatrina, formando así vesículas recubiertas de clatrina, que finalmente alcanzarán el melanosoma para aportarle la dotación de proteínas melanogénicas. OCA2 y TYR interactúan con AP-1, AP-2 y AP-3 (**figura I-20**). Por el contrario, TYRP1 interactúa con AP-1 pero no con AP-3. Además, AP-1 es necesaria para posicionar los melanosomas maduros en la periferia de los melanocitos, al reclutar el motor de microtúbulos KIF13A¹⁶⁷. AP-2 es necesario para una correcta entrega de PMEL17. Por otra parte, AP-1 contribuye a establecer túbulos conectores que provienen de la zona endosomal hacia la periferia, fusionando con la membrana de los melanosomas cercanos. BLOC-1 también está implicado en la entrada de las proteínas en los túbulos conectores. BLOC-2 y RAB38 parecen estar implicados en guiar y orientar los túbulos conectores a los melanosomas y quizá también las vesículas cargadas de proteínas melanosomales desde los endosomas a los melanosomas. En melanocitos, la proteína RAB27A, asociada a melanosomas maduros junto a la proteína melanofilina, recluta el motor actina-miosina Va. Esto permite la transferencia de los melanosomas a través de los microtúbulos a la zona periférica de los melanocitos, necesario para la transferencia a los queratinocitos. Mutaciones en estos genes producen una transferencia deficiente, dando lugar a un fenotipo hipopigmentado, característico del síndrome de Griscelli (GS)³⁹.

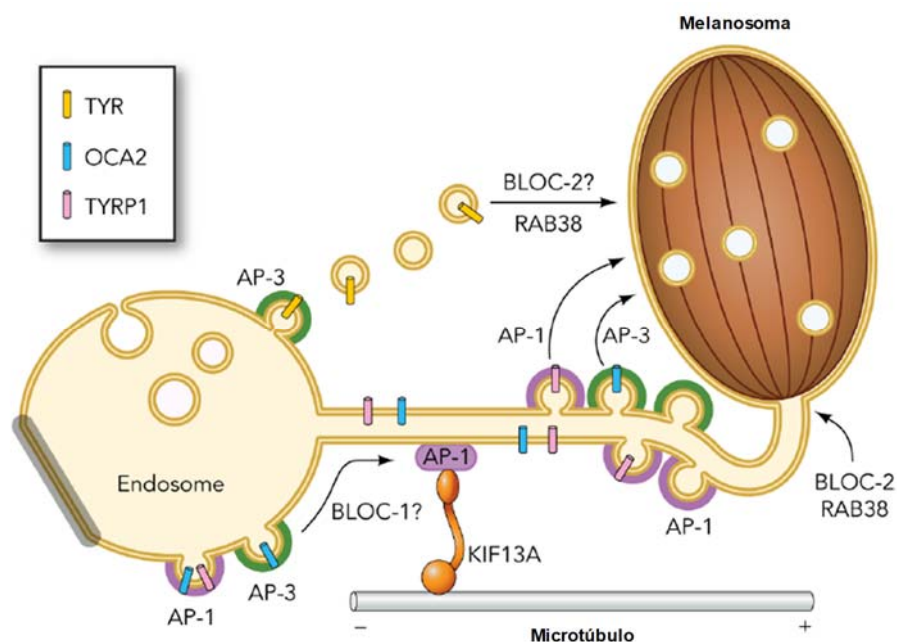


Figura I-20. Modelo de transporte de diferentes proteínas a melanosomas maduros. Adaptado de Sitaram et al. 2012³⁹.

En el ratón hay tres mutaciones de interés en proteínas implicadas en el movimiento de los melanosomas hasta la periferia del melanocito: *dilute* (MyoVA), *ashen* (Rab27A) y *leaden* (Mlph), que dan lugar al mismo fenotipo. En ellas, los melanosomas quedan agrupados en la zona perinuclear de los melanocitos. *Dilute* afecta a la proteína miosina Va, dímero que se mueve a lo largo de los filamentos de actina a pasos de 36 nm. Como el resto de miosinas, miosina Va se compone de 3 dominios: una cabeza, con actividad ATPasa, un cuello y una cola de anclaje (**figura I-21**). Los animales que son nulos para miosina Va presentan colores claros y defectos neurológicos severos que dan lugar a una temprana mortalidad. Estas mutaciones en humanos se encuentran en pacientes GS que muestran déficit neurológico. En melanocitos, la conexión de miosina Va con el melanosoma depende de Rab27a y Mlph. Rab27a, que da lugar a la mutación *ashen*, es una Ras-GTPasa perteneciente a la familia de las Rab, proteínas reguladoras del transporte. Esta proteína colocaliza con miosina Va en los melanosomas maduros. En mutaciones de Rab27a que causen su ausencia o inactividad, miosina Va es incapaz de transportar correctamente los melanosomas a la periferia. Las proteínas Rab probablemente regulan otros aspectos de la biología de los melanosomas y otros LRO. Por último, el producto del gen *leaden* (Mlph) puede servir como un intercambiador GDP/GTP (GEF) que activa Rab27a y estabiliza la unión con el melanosoma. Por otro lado, *leaden* puede actuar de andamio, conectando Rab27a y miosina Va (**figura I-21**).

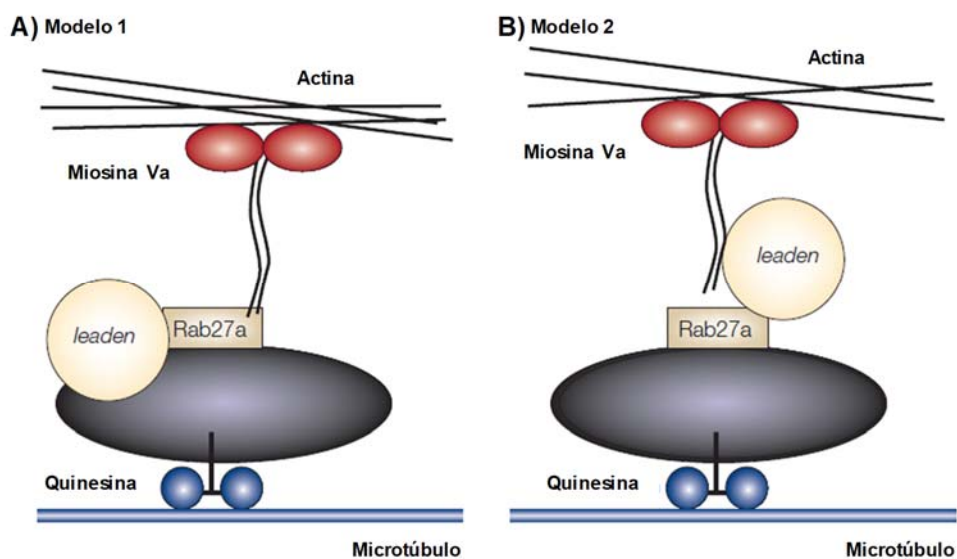


Figura I-21. Mecanismos moleculares de transporte melanosomal. Se proponen dos modelos que representan el orden de actuación de Rab27a, *leaden* (Mlph) y miosina Va. A) *leaden* es requerido para la asociación del melanosoma con Rab27a, que a su vez recluta a miosina Va a través de la cola. B) Rab27a se asocia primero al melanosoma maduro y luego se recluta *leaden*, necesario para la unión con miosina Va. En ambos casos la cabeza de miosina Va se une a los filamentos de actina. Esquema adaptado de Marks 2001 ³³.

La transferencia final de los melanosomas desde las dendritas de los melanocitos a las células vecinas, los queratinocitos, es un proceso aún poco conocido. Posiblemente implica varios mecanismos que incluyen la citofagocitosis de la punta de la dendrita melanosomal por parte de los queratinocitos, la exocitosis de los acúmulos de melanina al medio seguido de una fagocitosis

de los queratinocitos o la transferencia entre ambas células mediante unión directa de las membranas. Esta transferencia debe ser estimulada por el contacto físico entre los dos tipos celulares, activando una señal paracrina y/o la producción de señales intracelulares de Ca^{+2} . Además, los queratinocitos presentan receptores de membrana como PAR2 y FGFR2 que parecen regular la captación de los melanosomas ^{11,33}.

6. MAHOGUNIN RING FINGER 1.

Además de los mecanismos ya descritos de regulación de la pigmentación, estudios genéticos en ratones han permitido identificar varias proteínas ubicuas que regulan la señalización por MC1R y por tanto la melanogénesis. Una de estas proteínas es mahogunina (Mahogunin Ring Finger-1, MGRN1). El gen *Mgrn1* fue descrito por primera vez en el ratón¹⁶⁸ gracias a una mutación espontánea debida a la inserción de 5 kb de un retrovirus en la región intrónica 5' del exón 12, que tiene como consecuencia un fenotipo de pigmentación similar al de mutaciones ganancia de función de MC1R o pérdida de función de su agonista inverso, ASP, pues conduce a un oscurecimiento en el pelaje del animal, caracterizada por acúmulo de eumelaninas en la región dorsal, orejas y cola (**figura I-22**) ¹⁶⁹. Esta mutación se denomina *mahoganoide* (md) por su homología con la mutación *mahogany* que tiene lugar en el gen de otra proteína accesoria de la melanogénesis (attractina, que podría funcionar como un receptor complementario para ASP) ¹⁷⁰. Además, el ratón *mahoganoide* presenta defectos congénitos en el corazón¹⁷¹, alta letalidad embrionaria y desarrollo de una neurodegeneración esponjiforme en algunos individuos adultos (similar a la encefalopatía esponjiforme bovina) ¹⁷². Estas evidencias sugieren que el gen *Mgrn1* presenta una amplia variedad de acciones biológicas.

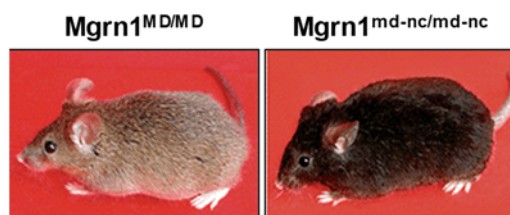


Figura I-22. Fenotipo de pigmentación de ratones portadores de mutaciones que anulan la función de *Mgrn1*. *Mgrn1*^{MD/MD} corresponde al ratón silvestre y *Mgrn1*^{md-nc/md-nc} corresponde al ratón mutado, nulo para el gen *Mgrn1*.

6.1. Estructura de MGRN1.

En humanos, el gen que codifica esta proteína está situado en el brazo corto del cromosoma 16 y presenta 17 exones. Hasta la fecha se han descrito 18 transcritos distintos; de entre ellos, los que son codificantes dan lugar en células de melanoma humano a 4 isoformas (**figura I-23**) cuya denominación depende de la presencia o no del exón 12 y de la longitud del exón 17 ¹⁷³: MGRN1-L(+), MGRN1-L(-), MGRN1-S(+) y MGRN1-S(-):

- L/S → hace referencia a la longitud de la secuencia codificante del exón 17. Se nombran como “L” (long) si contiene la versión larga del exón, y como “S” (short) si contiene la versión corta.
- (+)/(-) → según contengan (+) o no (-) el exón 12.

En el ratón, el gen *Mgrn1* también se sitúa en el cromosoma 16 y contiene 20 exones, dando lugar a los transcritos codificantes de proteínas ortólogas a las descritas en humanos, más un quinto transcrito codificante que se diferencia de la forma Mgrn1-S(-) en un triplete adicional en la unión de los exones 1 y 2.



Figura I-23. Esquema de la estructura de las diferentes isoformas de MGRN1. 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).

6.2. Localización intracelular de MGRN1.

El exón 12 de *Mgrn1* codifica una secuencia de 19 aminoácidos que contiene una señal canónica de localización o importe nuclear (NLS, Nuclear Localization Sequence). Asimismo, el exón 6 contiene otra secuencia putativa de exporte nuclear (NES, nuclear export sequence), presente por tanto en todas las isoformas de *Mgrn1*¹⁷⁴, de manera que es probable que las isoformas (+) que expresan la NLS transiten entre el citoplasma y el núcleo celular a través de los poros de la envoltura nuclear.

La localización subcelular de las formas (+) difiere en presencia o ausencia de receptor MC1R. Cuando no se expresa el receptor, todas las isoformas se encuentran preferentemente en el citosol, independientemente de que contengan a no la NLS codificada en el exón 12. Sin embargo, en presencia de MC1R las formas (+) tienden a acumularse en el núcleo, quedando las formas (-) dispersas en el citoplasma¹⁷³. Por ello la presencia de MC1R promueve la translocación de MGRN1 (+) desde el citosol al núcleo celular de manera específica. Esto sugiere que MGRN1 puede desempeñar alguna función en el núcleo que contribuya al fenotipo *mahoganoide*. No obstante, esta función se desconoce a día de hoy.

En un trabajo reciente se demuestra, mediante el uso de neuronas del hipocampo en cultivo e *in vivo*, que el envejecimiento neuronal desencadena una reducción de la expresión de MGRN1 y su redistribución de citoplasma a núcleo, donde MGRN1 podría potenciar la respuesta celular transcripcional al estrés proteotóxico que se genera por la acumulación de proteínas mal plegadas o aberrantes debido a perturbaciones ambientales o celulares, por mecanismos no descritos hasta el momento ¹⁷⁵.

6.3. Función de MGRN1.

A pesar de que el conocimiento de las funciones de la proteína MGRN1 va aumentando, en los últimos años se ha avanzado poco en el descubrimiento de su papel en relación con la pigmentación, evidenciado por el fenotipo del ratón *mahoganoide*.

Todas las isoformas de *Mgrn1* contienen una secuencia en el exón 10, denominada dominio RING Finger, que las cataloga como E3 ubiquitina ligasas potenciales ¹⁷⁶. Las siglas RING provienen del inglés “Really Interesting New Gene”, tratándose de un dominio característico tipo “dedos de Zinc”, con capacidad de unir dos cationes Zn^{+2} y con un motivo definido por la secuencia de aminoácidos C4HC3. Las E3 ligasas son enzimas clave en la degradación de proteínas que se monoubiquitinan o poliubiquitinan antes de ser degradadas, ya sea vía proteasoma o vía lisosoma ^{177,178}. Además, se ha demostrado que *Mgrn1* presenta actividad ubiquitina ligasa tanto *in vivo* ¹⁷⁹ como *in vitro* ¹⁷².

Los sustratos fisiológicos de la actividad E3 ligasa de *Mgrn1* se conocen aún parcialmente. Se sabe que MGRN1 establece interacciones proteína-proteína y participa en la multi-monoubiquitinación de la proteína TSG101, un componente clave del complejo ESCRT-I de tráfico de proteínas de los endosomas a los lisosomas ¹⁷⁹. Este proceso controla no solo el tráfico y la vida media de proteínas, sino también la duración e intensidad de la señalización intracelular, lo que podría afectar a múltiples funciones, como la maduración de los LRO y fenómenos de autofagia y heterofagia ¹⁸⁰.

Algunos estudios han relacionado la ubiquitinación de TSG101 por MGRN1 con la neurodegeneración del ratón *mahoganoide*. Se ha postulado que en estos ratones el patrón de ubiquitinación de TSG101 (más ubiquitinado e insoluble que en los ratones silvestres) sugiere que la pérdida de MGRN1 promueve la ubiquitinación de TSG101 por otras E3-Ub ligasas, lo que provocaría una ubiquitinación anómala que tendría como resultado una alteración de su disociación de las membranas endosomales o la formación de agregados insolubles ¹⁸¹. Otra explicación podría encontrarse en estudios recientes que apuntan a que la proteína TSG101 participa directamente en prevenir la apoptosis por estrés del RE. La importancia de este hallazgo en relación a la función de MGRN1 radica en que la neurodegeneración y la mortalidad prenatal y neonatal del ratón *mahoganoide*, que no expresa mahogunina, podrían deberse al exceso de

muerte celular en regiones cerebrales seleccionadas o a la apoptosis de cardiomiocitos durante el desarrollo embrionario ¹⁸².

Por último, varios trabajos del mismo grupo de investigación han descrito la ubiquitinación no canónica de α -tubulina, pero no de β - y γ -tubulinas, mediada por MGRN1 como estrategia de regulación de la estabilidad de los microtúbulos y la correcta orientación del huso mitótico en las células en división, que además afecta al transporte intracelular de mitocondrias y endosomas ¹⁸³⁻¹⁸⁵.

En cuanto a la relación de MGRN1 con la pigmentación o la función de la familia de los MCRs, se ha descrito la implicación de MGRN1 en la ubiquitinación de MC2R, en la corteza adrenal, aunque se desconoce la finalidad de este proceso ¹⁸⁶. Asimismo, aunque algunos autores han sugerido que MGRN1 podría ubiquitinar MC1R, promoviendo así su internalización y/o degradación ¹⁸⁷, esta posibilidad fue descartada por nuestro grupo por medio de la expresión de mutantes de MC1R carentes de dianas de ubiquitinación ¹⁸⁸. En este mismo trabajo se demostró que MGRN1 interacciona físicamente con MC1R e inhibe la señalización de MC1R por competición con la proteína $G\alpha_s$ en su unión al receptor, regulando negativamente la producción de AMPc. Esta competición también ocurre para MC4R, lo que apuntaría a la participación de MGRN1 en la regulación de la ingesta y el sobrepeso. Además, nuestro grupo de investigación también ha publicado recientemente que la ubiquitinación de ARRB2, proteína citosólica que interviene en la desensibilización e internalización de MC1R, es dependiente de la presencia de MC1R funcional en la membrana plasmática y aumenta en presencia de MGRN1. Un hallazgo significativo fue que mientras MGRN1 no parece interactuar con ARRB2 en ausencia de MC1R, en presencia del receptor es posible detectar una co-inmunoprecipitación eficiente de MGRN1 y ARRB2. Estos datos se han interpretado postulando que MGRN1 sería la E3 ubiquitina ligasa responsable de la ubiquitinación de ARRB2 en presencia de MC1R que podría actuar como andamiaje para este proceso y determinar la selectividad de la E3-ubiquitina ligasa de ARRB2 y destino de la arrestina tras la modificación ¹⁸⁹.

OBJETIVOS

De acuerdo con lo expuesto en la introducción, y resumiendo brevemente, Mahogunin Ring Finger1 (MGRN1) es una E3 ubiquitina ligasa identificada a partir de la mutación *mahoganoide* del ratón, que provoca hiperpigmentación, trastornos del desarrollo embrionario, anomalías cardíacas congénitas y encefalopatía de tipo esponjiforme. Estudios previos demostraron que MGRN1 es un regulador negativo del acoplamiento funcional del MC1R de los melanocitos, que interacciona directamente con el receptor y modula su acoplamiento a la vía de señalización del AMPc. MC1R activa la melanogénesis a través de la vía de señalización del AMPc. La regulación canónica mediada por este receptor se centra en su acoplamiento a la vía del AMPc y es relativamente bien conocida. Sin embargo, cada vez cobran mayor relevancia los mecanismos de regulación de la señalización por MC1R no canónicos que comprenden dos aspectos de interés:

- a. El efecto de las variantes alélicas del gen *MC1R*, que destaca precisamente por su alto grado de polimorfismo
- b. El papel de proteínas mediadoras de la función de MC1R, una de las cuales podría ser MGRN1.

En este contexto, los objetivos concretos del trabajo fueron los siguientes:

- 1- Análisis de la señalización por mutantes naturales de *MC1R* humano:** Para ello, nos centramos en mutantes del MC1R identificados en población de piel oscura, natural de Pakistán, a través de una colaboración *ad hoc* establecida con investigadores de EEUU y dicho país.
- 2- Análisis del efecto de MGRN1 en la melanogénesis en melanocitos de ratón y humanos:** Para ello recurrimos en primer lugar a líneas celulares de melanocitos murinos control (melan-a6) y mutados en el gen *Mgrn1* (melan-md1, con expresión nula de *Mgrn1* pero idéntico fondo genético), y posteriormente ampliamos nuestro estudio a líneas celulares KO para *Mgrn1* obtenidas mediante tecnología CRISPR/Cas9 y a células de melanoma humano en condiciones control o de represión de *MGRN1* mediante siRNA.
- 3- Análisis del efecto de MGRN1 en el pH en melanocitos de ratón y humanos:** Para ello recurrimos al análisis de la expresión génica diferencial en los modelos celulares citados e identificamos y validamos una serie de proteínas implicadas en la regulación del pH, reguladas a su vez por la presencia o ausencia de MGRN1.

MATERIAL 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 del orden de 18.2 MΩ·cm.

A continuación, se detalla cada una de las empresas que suministraron los siguientes materiales, reactivos o kits:

- **AppliChem GMBH** (Darmstad, Alemania): fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y dodecil sulfato sódico (SDS).
- **Arbor Assays** (Eisenhower Place, Michigan, USA): DIRECT CYCLIC AMP Enzyme Immunoassay Kit.
- **Bio-Rad** (Richmond, VA, USA): acrilamida, bisacrilamida, persulfato amónico, TEMED, Tween-20, Extra Thick Blot Paper Protean XL Size.
- **Calbiochem** (Darmstad, Alemania): geneticina (G418) e inhibidores de fosfatasas (imidazol, fluoruro de sodio, ortovanadato de sodio y βglicerolfosfato).
- **Dako Corporation** (Carpinteria, USA): medio de montaje de inmunofluorescencia.
- **Dharmacon Inc.** (Lafayette, Colorado, USA): ARN de interferencia
- **Fermentas** (Barcelona, España): estándares de peso molecular de ADN, EcoTaq DNA polimerasa y endonucleasas de restricción.
- **Fluka** (Buchs, Suiza): Celite 545.
- **Gibco BRL-Life Technologies** (Gaithersburg, USA): medios de cultivo de células eucariotas OptiMEM, DMEM-GlutaMAX™ y RPMI-GlutaMAX™, suero fetal bovino (SBF), penicilina y estreptomycin y Tripsina/EDTA.
- **Invitrogen** (Carlsbad, CA, USA): Lipofectamina™ 2000, Library Efficiency DH5α, DNA ligasa, Alexa 568-AntiRabbit conjugate, Alexa 568-AntiMouse conjugate, vector de expresión pcDNA3.1 y el kit de síntesis de ADNc SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR.
- **Merck** (Darmstadt, Alemania): etanol, isopropanol, ácido tricloracético (TCA) y carbón activo.
- **Millipore** (Billerica, MA, USA): PVDF (Immobilon-P) Blotting Membrane.
- **National Diagnostics** (Inglaterra): cóctel de centelleo
- **Oxford Biomedical Research** (Rochester Hills, MI): Acidic Granule Kit
- **Panreac** (Barcelona): cloruro de amonio (NH₄Cl)
- **PerkinElmer** (Boston, USA): [¹²⁵I]NDP-MSH (2000 Ci/mmol); L-[Ring-3,5-³H]-Tyrosine, >97%, 250 μCi (9.25MBq)
- **Promega** (Madison, Wisconsin, USA): DNasa I
- **Pronadisa** (Madrid, España): Agarosa, medio LB agar, medio SOB.

- **Qiagen** (Hilden, Alemania): RNeasy Mini Kit.
- **Roche Applied Sciences** (Mannheim, Alemania): Las enzimas PNGasa F y Endoglicosidasa H.
- **Scharlab** (Barcelona, España): Tris, glicina
- **Santa Cruz Biotechnology** (Sta Cruz, CA, USA): AntiRabbit Ig conjugado con peroxidasa, antiERK2 policlonal y otros anticuerpos que vendrán detallados más adelante.
- **Sigma-Aldrich** (St Louis, MO, USA): Igepal CA-630, albúmina de suero bovino (BSA), ácido bicinconínico, ampicilina, kanamicina, p-formaldehído, β -mercaptoetanol, L-DOPA, MBTH, monoclonal antiHA-peroxidase antibody, monoclonal antiFlag M2-peroxidase antibody, antiFlag M2 monoclonal antibody, GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit, GenElute HP Plasmid Miniprep Kit, iodoacetamida, N-etilmaleimida y TPA (12-O-Tetradecanoilforbol 13-acetato o PMA). EZview™ Red AntiFLAG M2 agarose affinity gel, EZview™ Red Anti-HA Affinity Gel, Naranja de Acridina y 1-Phenyl-2-thiourea (PTU).
- **Thermo Fisher Scientific** (Waltham, Massachusetts, USA): ECL Plus Western Blotting Detection System y el Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A, 16% Paraformaldehído.
- **Tocris Bioscience** (Abingdon, OX): [Nle⁴, D-Phe⁷]- α -MSH, SN2 y GdCl₃.
- **VWR** (Radnor, Pennsylvania): material de plástico utilizado en los cultivos celulares.
- **Zymo Research** (Orange, CA, USA): Kit DNA Clean & Concentrator™.

Aquellos productos que no se citen anteriormente se especificarán en los apartados correspondientes. La composición de algunos tampones (aquellos que aparecen subrayados en el texto) se detalla en el Anexo II.

2. LÍNEAS CELULARES Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.

2.1. Líneas y cultivos celulares.

Las líneas celulares empleadas durante esta Tesis Doctoral fueron las siguientes:

- a. Células embrionarias humanas HEK293T, proporcionadas por la Sección de Cultivo de Tejidos del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI, Universidad de Murcia);
- b. Células de melanoma humano HBL, procedentes del laboratorio del Profesor G. Ghanem (LOCE, Bruselas, Bélgica);
- c. Melanocitos de ratón melan-a6 y -md1, del laboratorio de la Dra. D. Bennett (St George's University of London, Reino Unido);
- d. Melanocitos humanos MNT1, del laboratorio de la Dra. Raposo (UMR144 - Institut Curie, París, Francia);
- e. Células de melanoma de ratón B16F10, cedidas por el Profesor José Neptuno Rodríguez-López, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A de la Universidad de Murcia, España.

Estos cultivos se realizaron en diferentes formatos de botellas (Flask T25, T75 cm²) o placas (P6, P12 o P24 pocillos) según el experimento.

Las células HEK293T, HBL y MNT1 se cultivaron en medio MEM modificado por Dulbecco con GlutaMAXTM, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SBF), 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de sulfato de estreptomicina. Adicionalmente, el medio de las células MNT1 contiene un 10% extra de SBF, 10% de AIM-VTM (medio comercial libre de suero, específico para la proliferación y manipulación de células en cultivo que contiene L-glutamina, 50 ug/ml de sulfato de estreptomicina y 10ug/ml de sulfato de gentamicina) 1% de aminoácidos no esenciales y un 1% de piruvato sódico ^{189,190}. Las células melan-a6 y -md1 se cultivaron en medio RPMI con GlutaMAXTM, suplementado con un 10% de SBF, 200 nM de TPA, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de sulfato de estreptomicina ¹⁹¹. 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 HEK293T, HBL y MNT1 y un 7,5% de CO₂ para las células melan-a6 y -md1.

De manera rutinaria, el cultivo celular se mantuvo sembrando una densidad inicial de aproximadamente 5·10⁵ 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 (2 o 3 días). Para recoger las células primero se lavaron con tampón fosfato salino estéril (PBS 1x) y posteriormente se despegaron con un tratamiento de Tripsina/EDTA durante 3 min a 37°C. Las células HEK293T no requirieron este tratamiento con tripsina. Por último, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min. El pellet obtenido se manipuló según el ensayo a realizar.

3. REACTIVOS UTILIZADOS.

En todos los casos se comprobó que los tratamientos no afectaran a la viabilidad celular.

3.1. Activadores.

Se ha usado como activador el análogo sintético a la hormona fisiológica α -MSH, el **NDP-MSH** (Calbiochem) a una concentración de 10^{-7} M para los experimentos de cinéticas y a concentraciones crecientes de hormona desde 10^{-12} M hasta 10^{-7} M para los experimentos de dosis-respuesta, partiendo en ambos casos de un stock 10^{-3} M.

El activador de la adenilato ciclasa, **forskolina (FSK)** (Calbiochem), a una concentración final de 10^{-5} M, a partir de un stock 10^{-2} M.

Para activar el canal de calcio Mucolipina-3 (Mcoln3) en melanocitos de ratón se usó el fármaco **SN2** a diversas concentraciones en el medio de cultivo correspondiente. Se mantuvo durante 24 h y se procesó la muestra según la técnica aplicada.

3.2. Inhibidores.

Para la inhibición de la tirosinasa se usó **feniltiourea (PTU)** a una concentración de 0.1 mM durante tiempos de 24, 48 y 72 h.

4. DETECCIÓN DEL pH EN ORGÁNULOS.

Para los ensayos de basificación del medio intracelular se usó cloruro amónico (**NH₄Cl**) a una concentración de 10 mM y mantenido a tiempos largos (24, 48 y 72 h).

4.1. Sondas específicas.

Para el estudio del pH de orgánulos en las diferentes líneas estudiadas se han utilizado dos tipos de sondas dependiendo del ensayo:

- a) **DAMP-DNP**, Acidic Granule Kit. Para la tinción se siembran las células en cubreobjetos estériles de 10 o 12 mm de diámetro y cuando están a una confluencia óptima, se añade DAMP al medio de cultivo correspondiente a cada línea, a una concentración de 30 μ M, durante 30 min a 37°C²³. Para el inmunomarcaje véase la explicación detallada (apartado de microscopía 22.4 Tinción inmunológica).
- b) **Naranja de Acridina (AO)**. Se sembraron las células en pocillos independientes estériles con base adaptada con un cubreobjetos. Cuando el cultivo llegó a una

confluencia óptima, se incubó con AO a una concentración de 5 µg/ml en medio de cultivo a 37°C durante 20 min y se lavaron seguidamente con PBS 1x a 37°C¹⁹². Se mantienen las células en PBS 1X y se van adquiriendo imágenes *in situ* con el microscopio confocal. Debido a la toxicidad de la sonda, tanto la manipulación como la toma de imágenes (pocas por muestra) deben realizarse con rapidez.

5. ESTUDIOS CON MEDIO CONDICIONADO.

En el caso de los ensayos del medio condicionado, se sembraron las células en placas P10 (de 10 cm²) a un 50% de confluencia. Una vez adheridas a la superficie, se realizaron varios lavados para eliminar todo factor de crecimiento del medio completo y se añadió medio libre de suero. Se mantuvieron las células en cultivo 48-72 h, obteniendo así el medio al que llamamos medio condicionado (MC). Este medio se recoge y se centrifuga a 1200 rpm para eliminar restos celulares.

Para normalizar el MC, se cuantifica la cantidad de proteína de las células que provienen de las P10. Si hay diferencias entre líneas, se compensa el medio añadiendo medio fresco libre de suero al MC proveniente de las células más confluentes.

Finalmente, se usan estos MC sobre células previamente sembradas en P12 al 80% de confluencia. Se incuban durante 72 h y se observan los cambios de pigmentación, actividad enzimática y diferenciación celular.

6. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.

Se utilizan tampones diferentes en función de las proteínas que se deseen detectar.

1. Para la extracción y posterior análisis por transferencia Western de proteínas fosforiladas, las células se lavaron con PBS 1x y se resuspendieron con tampón de solubilización celular I, suplementado con 1% de cocktail de inhibidores de fosfatasas.

2. Para la extracción y posterior detección de proteínas en presencia de MC1R, las células se lavaron primero con PBS 1x frío y se despegaron posteriormente con un tratamiento de Tripsina/EDTA de 5 min, y se centrifugaron a 2000 rpm a 4°C durante 5 min. Una vez aspirado el sobrenadante, se solubilizaron en tampón de solubilización celular II, 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, unidos por puentes disulfuro, 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 1 h. 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. Para la obtención de extractos destinados a cuantificar actividad L-DOPA oxidasa se utilizó el tampón de solubilización II.

Para la cuantificación de proteínas se centrifugaron los lisados celulares a 13000 rpm durante 30 min a 4°C en una centrífuga Eppendorf. Los sobrenadantes se recogieron para determinar el contenido total de proteína mediante el kit del ácido bicinonínico, según las instrucciones del fabricante. Como patrón para obtener la recta de calibrado se utilizó BSA. La lectura de las diferentes absorbancias se realizó mediante un lector de placas BioTek ELx800 y se analizaron los datos en base a la recta patrón mediante el programa de análisis estadístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA).

7. CUANTIFICACIÓN DE MELANINAS.

La cuantificación de melaninas se realizó por un método colorimétrico. Se utilizaron los pellets de cada línea celular de células sembradas en el formato deseado. Se recogieron con PBS 1x y se centrifugaron. Una vez obtenido el pellet, se trataron con 100 µl de hidróxido de potasio (KOH) 0.85 M durante 4 h a 100°C¹⁹³. A continuación, se cuantificaron 50 µl del producto de la reacción en placa de 96 pocillos (siempre por duplicado) y se cuantificó mediante la medida de absorbancia de 405 nm en un lector de placas BioTek ELx800. Los datos de absorbancia recogidos sirvieron para calcular los µg de proteína en cada muestra con la ecuación:

$$\text{Abs}_{405 \text{ nm}}: (0.0165 \times \mu\text{g melaninas}) + 0.003$$

Los datos obtenidos se representaron gráficamente y se realizó el estudio estadístico para determinar si había diferencias significativas entre las células o tratamientos comparados mediante GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA).

8. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS Y ESTABLES.

8.1. Transfección transitoria de ADN plasmídico.

Las células se cultivaron en placas de 6, 12 o 24 pocillos, según las necesidades y se procede a transfectarlas cuando el cultivo alcanza una confluencia del 75-80%. Para este tipo de transfecciones se utilizó el reactivo Lipofectamina™ 2000 a una concentración de 1 mg/ml. En todos los casos, la lipofectamina y el ADN se diluyeron en OptiMEM con suero durante 10 min a temperatura ambiente para aumentar la eficiencia de transfección (ver concentraciones en **tablas MM-1 y MM-2**). Tras este periodo, el ADN diluido se mezcla con la Lipofectamina™ diluida y se incuban durante 20 min, a temperatura ambiente, para permitir que se formen los complejos ADN-Lipofectamina™. A continuación, se añade DMEM enriquecido con 10% de SBF hasta el volumen final necesario. No se añaden antibióticos durante la transfección. Transcurridas 6 h, el medio es sustituido por el correspondiente en cada tipo celular. Las células se procesan entre 24 y 48 h tras haber sido transfectadas. En la **tabla MM-3** se recogen los plásmidos utilizados.

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 MM-1. Cantidades de ADN y Lipofectamina 2000 utilizadas según el tamaño de placa para las transfecciones transitorias en células HEK293T, HBL y MNT1.

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

ADN plasmídico	Gen sobreexpresado	Compañía
MC1R-WT	MC1R silvestre	*
MC1R-Arg162Pro	MC1R mutante cambio de R162P	*
MC1R-Val174del	MC1R mutante deleciónado	Dr. Zubair
MC1R-Tyr293*	MC1R mutante truncado en aa 293	Dr. Zubair
Mcoln3	Mucolipina-3	Addgene
MGRN1	Mahogunina	*
CTNS	Cistinosina	Addgene
pcDNA3.1(+/-)	Control negativo	Invitrogen

Tabla MM-3. ADN plasmídico usado en las transfecciones transitorias en células melan-a6 y -md1, gen que sobreexpresan y compañía o laboratorio de origen (*Donado por el grupo de investigación).

8.2. Transfección transitoria de ARN de interferencia (siRNA).

Para el silenciamiento de la expresión de genes se realizaron ensayos de interferencia por transfección transitoria con ARN de interferencia (siRNA).

Los siRNA son moléculas de ARN de 20-25 nucleótidos de longitud, que silencian genes al promover la hidrólisis de mRNA cuyas secuencias son exactamente complementarias. Cada molécula de siRNA es incorporada a un complejo multiproteico conocido como RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), que separa las dos hebras de la molécula de siRNA, quedándose una de ellas incorporada en el complejo. Esta hebra es usada como molde para reconocer a la molécula de mRNA lo que, posteriormente, conduce a su degradación por RISC.

Esta transfección se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Las células se procesaron 72 h después de la transfección. Como control negativo, se utilizó una mezcla de secuencias de ARN que no conduce a degradación específica de ningún mRNA celular conocido. Los siRNA se utilizaron a una concentración de 30 nM y fueron los siguientes (**tabla MM-4**).

siRNA	Especie	Gen silenciado	Compañía
siMGRN1	Humano	Mahogunina	Dharmacon
siMGRN1	Ratón	Mahogunina	Dharmacon
siMcoln3	Humano	Mucolipina-3	Origene
siMcoln3	Ratón	Mucolipina-3	Origene
siATP6v0d2	Ratón	Subunidad v0d2 de la VATPasa	Origene
siCTNS	Ratón	Cistinosina	Origene
siCtrl	Humano y Ratón	Control utilizado para los siRNA	Dharmacon y Origene

Tabla MM-4. ARN de interferencia utilizado y genes silenciadas.

8.3. Producción de CRISPR-Cas9.

Durante este trabajo se han generado en el laboratorio clones celulares de melanocitos murinos inmortales melan-a6 anulando la expresión de Mgrn1 mediante ingeniería genética con la técnica CRISPR-Cas9. Esto permite estudiar el papel de Mgrn1 en diversas funciones de interés evitando efectos fenotípicos debidos a la posible deriva de las células melan-md1, ya que las líneas celulares en cultivo tienden a acumular anomalías que pueden conducir a artefactos.

El sistema CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), es un mecanismo de defensa creado en Procariotas y *Archeas* que hace referencia a repeticiones palindrómicas, cortas, agrupadas y espaciadas entre sí por secuencias únicas y no repetidas, a las que se denomina espaciadores¹⁹⁴. Muy próximos a estas agrupaciones, existen regiones que contienen genes asociados a CRISPR codificadores de proteínas Cas, que son nucleasas capaces de fragmentar material genético bicatenario gracias a sus dos centros activos¹⁹⁵. Ante la invasión vírica, la bacteria inserta fragmentos de DNA vírico en su región CRISPR a modo de

espaciador que podrá ser transcrito a pre-crRNA y madurar hasta crRNA. El crRNA será complementario al ADN del virus invasor y podrá aparearse con él, quedando una doble cadena accesible para que actúe la Cas. Por ello, se dice que las proteínas Cas actúan a modo de “nucleasas guiadas por RNA bacteriano”.

En los clones obtenidos a partir de células melan-a6 se silenció la expresión de Mgrn1. Para ello, se utilizó un crRNA diseñado para unirse específicamente al exón 1 del gen Mgrn1 promoviendo un corte bicatenario en dicho gen que trunca la expresión de la proteína que codifica. Para llevar a cabo la selección de los clones se utilizó un plásmido que, además de codificar la nucleasa Cas9, confería resistencia a puromicina.

Los clones Mgrn1-KO resultantes fueron analizados mediante secuenciación. De entre ellos, se seleccionaron 4 clones en los que se identificaron distintos eventos (inserciones y deleciones) del gen que codifica para Mgrn1 (**tabla MM-5**).

crRNA6	Secuencia editada del exón 1
Clon 24 (6C24)	Alelo 1: ⁴⁷ ACATACAGGCCAAC (delección 22 nt)AGT ⁸⁵ Alelo 2: ⁶⁸ ATC (G) CTACCCTC (C)AGAAGT ⁸⁵
Clon 34 (6C34)	Alelo 1 y 2: ⁶⁸ AT (CG) CTACCCTCCGAAGTCC ⁸⁷
Clon 35 (6C35)	Alelo 1: ⁵⁸ AACTCGGCCTATCGGCTA ⁷⁴ Alelo 2: ⁵⁸ AACTCGGCCTATC (GC) TA ⁷⁴
Clon 45 (6C45)	Alelo 1: ⁶⁸ ATC (G) CTACCCTCCGAAGTCC ⁸⁷ Alelo 2: ⁴⁷ ACATACAGGCCAAC (delección 22 nt)AGTCC ⁸⁷

Tabla MM-5. Clones de melan-a6 seleccionados como positivos y sus secuencias modificadas. Secuencias editadas resultantes del método CRISPR-Cas9 en células melan-a6. Se muestran las secuencias resultantes en el exón 1 de los clones positivos 6C24, 6C34, 6C35 y 6C45. Inserciones y deleciones representados en verde y rojo, respectivamente.

9. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE).

Tras solubilizar las células como se ha descrito en el apartado 2.3 y cuantificar la proteína total, las muestras fueron diluidas en tampón de electroforesis de proteínas (4X). La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) mediante el sistema discontinuo descrito por Laemmli ¹⁹⁶ con algunas modificaciones, con una cubeta Mini Protean II o III y una fuente de alimentación 3000 Xi, ambas de BioRad.

Se prepararon el gel hacinador, de aproximadamente 1 cm de altura, a una concentración del 4% de acrilamida-bisacrilamida y el gel separador, de aproximadamente 6 cm de altura y 1 mm de grosor, 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. El volumen máximo de muestra cargado en cada calle fue de 30 µl, con una cantidad de proteína celular

comprendida entre 8 y 30 μg (dependiendo de los requerimientos del ensayo). 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 transferencia Western.

10. TRANSFERENCIA WESTERN.

Se utilizó la transferencia Western para analizar la presencia y cantidad relativa de determinadas proteínas en los extractos celulares. 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 de 0.45 μm de tamaño de poro, previamente tratada según las instrucciones de la casa proveedora. Para ello utilizamos una unidad de electrotransferencia semi-seca de Bio-Rad. Tras 20 min de transferencia a 22V y 1.3A, la membrana se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave (50 rpm), con tampón de bloqueo. Posteriormente, se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación orbital suave con el anticuerpo primario (**tabla MM-6**) en el tampón de unión idóneo. Finalizada la incubación, se realizaron 5 lavados de 10 min en agitación vigorosa (100 rpm) con tampón de lavado. Dependiendo del anticuerpo, se procedió directamente el revelado (en el caso de anticuerpos primarios conjugados con HRP (peroxidasa de rábano)) o se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente y agitación orbital suave (50 rpm). En el segundo caso, 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 ECL Plus Western Blotting Detection System y la emisión se registró en un sistema de adquisición de imágenes Fusion Solo.6S de Vilber-Lourmat 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 α -ERK2, 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 min 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 tampón de lavado y se bloquea de nuevo la membrana durante 1 h a temperatura ambiente y agitación orbital suave. Posteriormente se incubó la membrana con antiERK2 en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación suave. El tratamiento continúa lavando 5 veces la membrana e incubando con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con HRP durante 1 h 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 la lectura de fondo y los resultados de cuantificación se normalizaron dividiendo el valor para la proteína diana entre el obtenido para ERK2.

Anticuerpo 1°	Dilución	Tampón de Bloqueo	Anticuerpo 2°
α-PEP1 (Tyrp1) (Dr. V. Hearing)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α-rabbit IgG-HRP (Millipore)
α-PEP7 (Tyr) (Dr. V. Hearing)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α-rabbit IgG-HRP (Millipore)
α-ERK1/2 (Sta Cruz)	1:10000	2% BSA en <u>TBST</u>	α-rabbit IgG-HRP (Millipore)
α-FLAG-HRP (Sigma-Aldrich)	1:5000	5% leche en <u>PBS-Tween</u>	-
α-HA-HRP (Sigma-Aldrich)	1:5000	5% leche en <u>PBS-Tween</u>	-
α-MGRN1 (Origene)	1:2000	2% BSA en <u>TBST</u>	α-mouse IgG-HRP (Sta Cruz)
α-Myc (Sigma-Aldrich)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α-rabbit IgG-HRP (Millipore)
α-ATP6v0d2 (Aviva System)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α-rabbit IgG-HRP (Millipore)
α-Actina (Sigma-Aldrich)	1:1000	2% BSA en <u>TBST</u>	α-mouse IgG-HRP (Sta Cruz)
α-βTubulina III (Sigma-Aldrich)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α-mouse IgG-HRP (Sta Cruz)
α-Histona H1.4 (Sigma-Aldrich)	1:5000	2% BSA en <u>TBST</u>	α-mouse IgG-HRP (Sta Cruz)
α-GAPDH (Sigma-Aldrich)	1:10000	2% BSA en <u>TBST</u>	α-mouse IgG-HRP (Sta Cruz)

Tabla MM-6. Anticuerpos utilizados en la detección de proteínas mediante transferencia Western. Se especifica para cada anticuerpo la casa comercial o laboratorio de origen, el tampón utilizado en el bloqueo de la membrana, la dilución utilizada y el anticuerpo secundario (si es necesario, empleado a una dilución de 1:10000).

11. INMUNOPRECIPITACIÓN.

Para estos experimentos se utilizaron aproximadamente $2 \cdot 10^6$ células que se lavaron 2 veces con PBS 1x y se lisaron en 200 μ l de tampón de solubilización I a 4°C.

Las inmunoprecipitaciones se realizan con una resina de afinidad formada por agarosa unida covalentemente a un anticuerpo monoclonal antiFLAG (EZview™ Red AntiFLAG M2 agarose affinity gel) o antiHA (EZview™ Red Anti-HA Affinity Gel). Esto permite inmunoprecipitar proteínas que contengan uno de estos epítomos. La suspensión de la resina se equilibró con tampón de solubilización I y se incubó con PBS 1x-BSA 2% durante 1 h a 4°C en agitación orbital para bloquear los sitios de unión inespecífica. Tras el bloqueo, se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. A continuación, se incubó el lisado celular con 25 μ l de la resina bloqueada durante 1 h a 4°C en agitación orbital. Tras este paso, se centrifugó la mezcla durante 30 s a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 5 veces con 500 μ l de tampón de solubilización I, suplementado con 300 mM NaCl y 0.1% Tween20. Tras el último lavado

se eliminó cuidadosamente todo el sobrenadante y se procedió a la elución. Se añadieron 25 µl de tampón de electroforesis de proteínas (2X) (con β-mercaptoetanol) y se incubó a 95°C (50°C si está presente MC1R) durante 5 min. Finalmente, se centrifugó 30 s a 14000 rpm y se recogieron 20 µl del sobrenadante. La muestra inmunoprecipitada se analizó por SDS-PAGE.

Es importante destacar que en este tipo de ensayos se guarda el 10% del extracto total para realizar un INPUT como control de cantidad inicial de proteína.

12. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Los distintos estudios de actividad para la tirosinasa han sido revisados y se describen brevemente a continuación.

12.1. Actividad tirosina hidroxilasa (TH).

La actividad tirosina hidroxilasa (TH) de tirosinasa se determinó radiométricamente mediante el método descrito por ¹⁹⁷, posteriormente modificado. El fundamento de este método consiste en determinar el ³H liberado de una de las posiciones en orto al hidroxilo del anillo fenólico de tirosina, en forma de agua tritiada. El sustrato de la reacción de hidroxilación es L-[3,5-³H]-tirosina.

Es importante destacar que los ensayos radiométricos se han realizado siempre en la estación experimental de la Sección de Radioprotección y Residuos (SRR) del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI), bajo los protocolos de seguridad y radioprotección necesarios.

El ensayo fue realizado tanto *in vitro* como *in vivo*.

- **TH *in vitro*** → El sustrato marcado se diluyó isotópicamente con L-tirosina para alcanzar una concentración 0.25 mM, equivalente a 50 µCi/ml. Esta disolución se preparó mezclando 475 µl de una disolución 0.262 mM de L-tirosina no marcada en tampón fosfato 10 mM, pH 6.8, con 25 µl de tirosina tritiada (51.0 Ci/mmol). Para que la reacción tenga lugar sin el período de retardo característico de tirosinasa, el medio contiene L-DOPA 10 µM (disuelto también en tampón fosfato 10 mM, pH 6.8), necesario como cofactor. Un ensayo tipo se realiza en un volumen final de 50 µl presentando 10 µl de la mezcla de tirosina no tritiada y la radiactiva a 250 µM (concentración final de 50 µM), 10 µl de L-DOPA 50 µM (concentración final de 10 µM), de 5 a 30 µl de extracto enzimático con un volumen de tampón de solubilización necesario para completar el volumen final. Se prepararon además algunos tubos sin extracto enzimático que sirven como referencia de la liberación de radiactividad debida al intercambio espontáneo ¹H-³H de la L-tirosina tritiada con el agua. Las muestras se incubaron a 37°C durante tiempos variables comprendidos entre 30 min y 1 h, y tras este período se adicionaron 450 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 1% para detener la reacción. A continuación, se trataron con 100 mg de una mezcla 1:1 (p/p)

de los adsorbentes Celite 545 y carbón activo, se agitaron moderadamente durante 10 min y posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min a 4°C.

- **TH *in vivo*** → En este caso, el sustrato marcado se añade al medio de cultivo completo del cultivo celular, diluyéndolo isotópicamente con L-tirosina (propia del medio) hasta alcanzar una concentración final de 100 µM frente a 0.022 µM del sustrato radiactivo. Un ensayo tipo se realiza en placas de 12 pocillos y contiene 0.5 µl de sustrato radioactivo en 500 µl de medio. Se prepararon además algunos pocillos sin células (sin enzima) que sirven como referencia de la liberación de radiactividad debida al intercambio isotópico de la L-tirosina tritiada con el agua. Las muestras se incubaron a 37°C durante 12 h en el incubador. Tras este período se recogieron 500 µl de sobrenadante (medio de cultivo) en tubos Eppendorf. A continuación, se trataron con 100 mg de una mezcla 1:1 (p/p) de los adsorbentes Celite 545 y carbón activo, para eliminar todo residuo orgánico, mediante agitación moderada. Posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min a 4°C.

La medida del agua tritiada se realizó añadiendo 100 µl del sobrenadante de cada muestra a 2 ml de cóctel de centelleo en un contador de centelleo beta Perkin Elmer TriCarb 2900, provisto de un sistema de corrección interno por comparación del espectro de la muestra con el de un patrón de tritio no apantallado. Este sistema permite la transformación directa de cuentas por min (cpm) en desintegraciones por min (dpm). Las desintegraciones netas de cada ensayo se obtuvieron al restar a las dpm de cada tubo, las dpm del tubo blanco (sin enzima).

Las actividades enzimáticas se expresaron como dpm netas por µg de proteína y se refirieron al control (actividad relativa).

12.2. Actividad DOPA oxidasa (DO).

El método está basado en la alta reactividad de DOPAquinona, formada por la oxidación de L-DOPA por tirosinasa, y su capacidad para formar un aducto estable y de color rosa oscuro con la hidrazona 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH). El pigmento formado absorbe en el espectro visible a 490 nm, y la reacción de MBTH con DOPAquinona es muy rápida en relación con la oxidación catalítica de L-DOPA, por lo que puede ser considerada como una medida de la actividad enzimática¹⁹⁸.

El ensayo se realizó en placa ELISA de 96 pocillos, utilizando como sustrato de la enzima L-DOPA a concentración final de 2 mM en el medio de reacción, disuelto en tampón fosfato 10 mM, pH 6.8. Dependiendo del volumen de extracto incorporado, se adicionó el volumen necesario de MBTH 5 mM disuelto en tampón fosfato hasta completar 200 µl de volumen total. La reacción transcurrió a 37°C en incubador y se realizaron medidas de absorbancia (A_{490nm}), cada 5 min, en un lector de placas BioTek ELx800 durante 30-60 min.

Las actividades enzimáticas se expresaron como $\Delta A_{490\text{nm}}$ por minuto y por μg de proteína y se refirieron al control.

12.3. Cálculo de parámetros cinéticos de actividad DO.

La cinética de la reacción enzimática se ajustó al modelo de Michaelis-Menten. Para el cálculo de las constantes cinéticas (K_M y velocidad máxima, $V_{\text{máx}}$) de las actividades DO *in vitro* de las enzimas estudiadas, se realizaron los ensayos de medida de actividad enzimática descritos en el apartado anterior manteniendo las condiciones experimentales, pero variando la concentración de L-DOPA entre 0.1 y 2.0 mM. Los valores de $\Delta A_{490\text{nm}}$ por minuto para las concentraciones de sustrato variables se ajustaron a una curva de Michaelis-Menten para el cálculo de la $V_{\text{máx}}$ y la K_M mediante el uso del software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA).

13. TRATAMIENTO DE ENDOGLICOSIDASAS.

Para analizar el patrón de glicosilación de tirosinasa, se llevaron a cabo ensayos de desglicosilación mediante el uso de dos glicosidasas específicas: la endoglicosidasa H (endoH) y la N-glicosidasa F (PNGasa F).

Los extractos proteicos se incubaron a 37°C durante 3 h en el tampón de desglicosilación con 2 unidades de PNGasa F o 15 miliunidades de endoH en un volumen final de 15 μl . En el caso de las digestiones con PNGasa F, las muestras se incubaron previamente a 95°C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas y facilitar la completa desglicosilación.

Tras la incubación a 37°C, se añadió a cada tubo 5 μl de tampón de electroforesis de proteínas (4X), con β -mercaptoetanol. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE y tirosinasa se detectó mediante transferencia Western.

14. ENSAYO DE ACOMPLAMIENTO FUNCIONAL.

La unión del agonista αMSH 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.

14.1. Estimulación y extracción de AMPc.

Para este ensayo 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

adicionales para determinar la proteína total. Cuando las células se encontraban a un 80-90 % de confluencia o 16 h después de realizar una transfección transitoria, fueron privadas de suero al menos durante 3 h previas a la estimulación.

La estimulación se realizó con NDP-MSH a una concentración final en pocillo de 10^{-7} M a 37°C en el incubador de cultivos 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 se lavaron con 0.5 ml de PBS 1x a 4°C . Para liberar el AMPc intracelular al medio, se retiró el PBS 1x y se añadieron 200 μl de 0.1 M de HCl previamente calentado a 70°C . El choque térmico y el medio ácido e 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 h en un liofilizador MAXI Dry Plus Heto Vacuum Centrifuge Dry Winner. Los precipitados obtenidos se lavaron dos veces con 100 μl de agua bidestilada y se secaron durante 30 min 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 esperaba obtener. El tampón fue proporcionado por el kit utilizado para la cuantificación.

14.2. Cuantificación de AMPc.

La cuantificación del AMPc se realizó mediante el kit comercial DIRECT CYCLIC AMP Enzyme Immunoassay Kit. 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. 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 a cada pocillo 25 μl de una solución neutralizante del kit. Tras ello, se añadieron 75 μl del tampón de dilución a dos pocillos control de unión inespecífica (NSB) y 50 μl al resto (muestras o estándares). Posteriormente, se añadieron 25 μl del AMPc conjugado con peroxidasa y luego se añadieron otros 25 μl del anticuerpo específico frente AMPc.

Tras 2 h a temperatura ambiente y en agitación vigorosa (200 rpm) se lavó la placa 4 veces con 300 μl de tampón de lavado (proporcionado por el kit) y se añadieron 100 μl de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina). Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 min sin agitación y

protegida de la luz. Se añadió 50 µl de la solución de parada y se determinó la cantidad de producto quimioluminiscente midiendo la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA ELx800 de BioTek.

Para la recta de calibrado se prepararon, por duplicado, pocillos con 0, 0.617, 1.85, 5.56, 16.67, 50 y 150 pmoles de AMPc por ml.

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

15. UNIÓN HORMONA-RECEPTOR.

El número de sitios de unión para el agonista del MC1R en la membrana plasmática, así como la afinidad de las distintas variantes de interés del receptor por el ligando, se cuantificó mediante ensayos de unión del radioligando [125 I]-NDP-MSH.

Se realizaron ensayos de competición, los cuales se basan en la competición para unirse al receptor presente en la membrana plasmática de las células en cultivo del ligando NDP-MSH a diversas concentraciones frente a una cantidad fija de [125 I]-NDP-MSH. La radiactividad asociada a las células representa la cantidad de radioligando unido al receptor, que se relaciona inversamente con la cantidad de receptor unido a NDP-MSH no marcado. Así se pueden construir curvas de desplazamiento que indican el valor de la IC₅₀ (Concentración de ligando no marcado que conduce a un 50% de inhibición de la unión del radioligando), relacionado directamente con la afinidad del receptor por el ligando. Alternativamente, conociendo la dilución isotópica del trazador radiactivo en cada condición, pueden construirse curvas de saturación, cuyo ajuste proporciona los valores de B_{max} (número total de sitios de unión específicos en la preparación) y de K_D (constante de disociación del complejo ligando-receptor).

Los ensayos se realizaron en placas de 12 pocillos donde, tras privar a las células de suero al menos durante 3h, se añadió un volumen final de 300 µl de la dilución isotópica con [125 I]-NDP-MSH 10⁻¹⁰ M (0,1 µCi/pocillo) y concentraciones crecientes desde 10⁻¹¹ hasta 10⁻⁷ M de NDP-MSH (competidor no marcado)¹⁹⁹. Tras 1h de incubación, se realizaron 2 lavados con DMEM y, posteriormente se recuperaron las células unidas a la hormona con Tripsina/EDTA, en tubos eppendorf (unión específica). La hormona radiactiva unida al receptor se contó en un contador gamma (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer). La unión total de hormona es la suma:

$$\text{unión total} = \text{unión específica} + \text{unión inespecífica}$$

Las cpm correspondientes a la unión inespecífica se obtuvieron a partir de células transfectadas sólo con el plásmido, sin presencia de receptor, e incubadas únicamente con [125 I]-NDP-MSH o bien células incubadas con el trazador radioactivo en presencia de un gran exceso de ligando nativo (10⁻⁶M). Se emplearon pocillos paralelos para estimar la cantidad de proteína por

pocillo. Los valores de B_{max} y las constantes de disociación se calcularon por regresión no lineal (hipérbola rectangular) con el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA).

16. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN.

Para la extracción del ARN total, se utilizó el kit comercial RNeasy Mini Kit, partiendo de aproximadamente $1 \cdot 10^6$ células. Las células se lavaron con PBS 1x frío y, a continuación, se añadieron 350 μ l de buffer RLT, un tampón con isotiocianato de guanidinio que permite simultáneamente la lisis celular y la inactivación de las RNAsas endógenas. A continuación, se agitó vigorosamente y se añadió un volumen igual al lisado de etanol al 70%. La mezcla se colocó sobre un filtro proporcionado por el kit que se centrifugó a 10000 rpm durante 15 s. Tras descartar el sobrenadante, se realizaron lavados sucesivos del filtro a 10000 rpm durante 15 s y, finalmente, se recuperó el ARN mediante agua libre de RNAsa (proporcionada por el kit).

Para la cuantificación de la concentración de ARN 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 (entre 1.8-2).

17. 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, partiendo de aproximadamente 1 μ g de ARN. El procedimiento consistió en una primera etapa de desnaturalización del ARN molde, durante 5 min a 65°C en presencia de oligo(dT) y dNTPs. A continuación, la muestra se enfrió lentamente y se incubó en hielo durante 5 min. Se añadió el volumen adecuado de tampón de la retrotranscriptasa, DTT, $MgCl_2$ y RNaseOUT™ (a las concentraciones recomendadas por el fabricante). Las muestras se incubaron a 42°C, 2 min y, posteriormente, se añadió 1 μ l de la enzima SuperScript III Retrotranscriptasa. La reacción de síntesis de ADNc se llevó a cabo a 42°C durante 50 min y se terminó incubando las muestras a 70°C, 15 min. Para eliminar el ARN restante, las muestras se incubaron con 1 μ l de RNase H a 37°C durante 20 min para bloquear la retrotranscriptasa.

18. PCR A TIEMPO REAL (RT-PCR o qPCR).

Para el análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real se utilizó ADNc. Los cebadores se diseñaron para amplificar secuencias de entre 50 y 150 pb, situadas entre dos exones para evitar la amplificación de ADN genómico contaminante. El contenido G+C total de estos cebadores fue de 40-60% y la temperatura de hibridación 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 cebadores utilizados se detalla en la **tabla MM-7** para humano y **tabla MM-8** para ratón.

Esta técnica 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:

CICLOS	T (°C)	TIEMPO
1 ciclo	→ 95°C	10 min
40 ciclos	→ 95°C	15 s
	60°C	1 min
1 ciclo	→ 95°C	15 s
	60°C	1 min
	95°C	30 s
	60°C	15 s

Se recogieron los datos de fluorescencia 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 (C_T) para un umbral de fluorescencia dentro de la fase exponencial y su relación con el C_T de un gen control (β -Actina para humanos y Rpl35 para ratón). 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*).

Gen diana	Secuencia del cebador (5' → 3')
MGRN1	Fw: GTCGTCCAGTCCAGTTTCCCTAT Rv: TCGTCTTCTTTGTACCTCACAAG
MCOLN3	Fw: GAGTGTTTCTTTGTGGAGCCAGA Rv: CTGTGGAAGTCCAGTGTTAAGTTCA
ATP6V0D2	Fw: ATCGAAACGCCATTAGCTCCATTCT Rv: CCTCAAGGTAAGACTTGTATAGTTTATTGC
CTNS	Fw: GGAGGCGGAAAAGTGTTCATTGG Rv: AGGAGAACTGCTCCTTGATGTAGG
βACTINA	Fw: GAGAGGATGCAGAAGGAGATCA Rv: GCTCAGGAGGAGCAATGATCTT

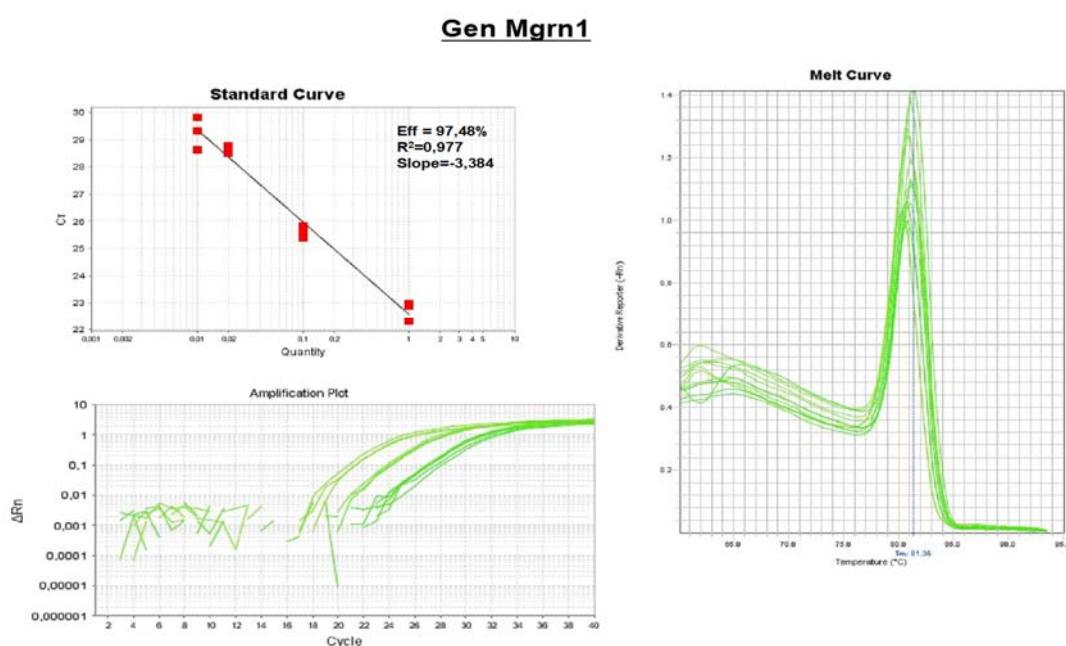
Tabla MM-7. Cebadores diseñados para genes de humano utilizados para la realización de la PCR a tiempo real.

Gen diana	Secuencia del cebador (5' → 3')
Mgrn1	Fw: GTCGTCCAGTCCAGTTTCCCTAT Rv: TGC GTCTTCTTTGTACCTCACAAG
Mcoln3	Fw: ATCCAAGCCAAGAGTCTCACAAG Rv: GGAGGGTCAGAATAAGGAGATTGTAC
Tyr	Fw: GCTCCCATCTTCAGCAGATGT Rv: GACTGGCAAATCCTTCCAGTGT
Tyrrp1	Fw: GAAAATTCTCACAGTCAGGAGAAATCT Rv: AGTTGTGCGCTTCGCCATAT
Atp6v0d2	Fw: GTTGAACACCATTAGCTCCATTCT Rv: CCTCAAGGTAAGACTTGTATAGTTTATTGC
CTNS	Fw: GGAGACGGAAAAGTGTCAATTGG Rv: AGGAGAACTCCTCCTGGATATAGG
Oca2	Fw: CTGCTGTTTGGCATGATGATCT Rv: AAGTTGATATGCCTTTACAGCACAGT
Silver	Fw: CAACTTGTGTTCCTGGTCAAGAC Rv: CTGCTTCTTAAGTCTATGCCTATGTATCA
Oa1	Fw: CCTTCTGTGTCCAGGTGTGAGA Rv: CAGTAAAGAGGCCACTGAAGTCACT
Rpl35	Fw: AAGCTCTCCAAGATACGAGTCGTT Rv: TATTTCTTGCCCTGTAGAATTTCTT

Tabla MM-8. Cebadores diseñados para genes de ratón utilizados para la realización de la PCR a tiempo real.

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 C_T /dilución utilizada, corresponde a la eficiencia de la hibridación del cebador.

A continuación, se muestra un ejemplo del análisis de la eficiencia de uno de los cebadores (en el ejemplo podemos ver reflejado el análisis para Mgrn1)



19. PCR SEMICUANTITATIVA Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Se realizaron este tipo de ensayos para comprobar la presencia de transcritos de interés. La reacción se realizó en un volumen final de 20 μ l con una concentración de $MgCl_2$ de 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, 1 μ M de cada oligonucleótido interés (directo y reverso) 1 μ l de ADNc y 1U de la *Taq* polimerasa. Empleamos 30 ciclos con tres etapas:

Desnaturalización \rightarrow 95°C, 45 s

Hibridación \rightarrow ($T^\circ C$ del par de cebadores -4°C), 45 s

Extensión \rightarrow 78°C, 1 min

Tras la finalización de la PCR, llevamos a cabo una electroforesis de los productos obtenidos en un gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE con el intercalante RedSafe al 1%. Se introdujeron las muestras interés en cada calle junto a una calle con marcadores de peso molecular del rango apropiado. La migración del ADN tiene lugar al aplicar una corriente de 90V durante 30-40 min. Una vez finalizada la migración observamos las bandas amplificadas en un transiluminador de luz UV Gel Doc 1000 (BioRad).

20. TECNOLOGÍA DE HIBRIDACIÓN DE MICROMATRICES O MICROARRAYS.

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 niveles variables de MGRN1. Partimos del modelo celular de melanocitos de ratón mutantes naturales del gen *Mgrn1^{mg/nc}* (*melan-md1*) que no expresan la proteína, comparadas con células normales 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.

Siguiendo las recomendaciones del fabricante de la matriz, sintetizamos, amplificamos e hidrolizamos el ADNc resultante. Hibridamos las poblaciones de ADNc hidrolizado (obtenido a partir del ARN de ambas líneas de melanocitos) con las sondas de una micromatriz de expresión génica de Affimetrix "Mouse Gene 2.1". Todo ello realizado con la colaboración de la sección de Biología Molecular del SACE de la Universidad de Murcia. Los resultados preliminares se sesgaron por un valor de fch de +/-1.25 y de $p < 0.05$.

La lectura de la fluorescencia de cada posición de la matriz nos da un valor relativo de expresión de cada gen. Si en cada punto de la matriz hibridada comparamos la intensidad de la muestra de ADNc procedente de las células que sobreexpresan MGRN1 con la intensidad de la muestra mutante, obtendremos, 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.

El análisis de los valores de fch para los genes cuyo resultado es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) se realizó mediante el software IPA (Ingenuity Systems).

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 +1.25 o -1.25, respectivamente.

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) y por el GSEA (Gene Set Enrichment Analysis).

21. CITOMETRÍA DE FLUJO.

Para la citometría de flujo se empleó un sistema FACScalibur de Becton-Dickinson. Las células interés se recogieron en eppendorf y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4°C. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 300 μ l de PBS 1x. Tras realizar el recuento de las mismas, se pusieron alrededor de 10^5 células en una placa de 96 pocillos (de pocillo redondo). Se centrifugó la placa y se eliminó el sobrenadante de nuevo, tras lo cual se añadió el anticuerpo 1º (**tabla MM-9**) (10 μ l por pocillo durante 30 min a temperatura ambiente). Después se procedió a 3 lavados con solución de bloqueo. Se añadió el anticuerpo 2º (**tabla MM-9**) (10 μ l por pocillo durante 15 min a temperatura ambiente). Después se procedió a 3 lavados con tampón de bloqueo y finalmente se fijaron las células con PFA 1% en medio de cultivo.

Anticuerpo 1º	Dilución	Anticuerpo 2º	Dilución
α -HLA	1:25	α -conejo FITC (eBioscience)	1:400
α -Flag	1:50	α -ratón Alexa488 (Invitrogen)	1:200
α -DNP	1:100	α -cabra Alexa647 (Invitrogen)	1:200

Tabla MM-9. Anticuerpos utilizados en los ensayos de citometría de flujo

Se pasaron las muestras, con $5 \cdot 10^2$ y $1 \cdot 10^3$ células, dependiendo del experimento, por el citómetro y con el programa CellQuestPro de FACScalibur se organizaron las poblaciones celulares primero por tamaño (FCS) y complejidad (SSC) y posteriormente por fluorescencia emitida según el tratamiento utilizado. Tras la obtención de los resultados, éstos se analizaron con un programa de análisis de citometría llamado Flowing Software (Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology).

22. MICROSCOPIA.

22.1. Microscopía óptica.

Las imágenes se adquirieron directamente sobre las células en cultivo en placas o botellas. Previamente se sacaron del incubador y se les cambió el medio de cultivo por PBS 1x. Tras la

captación de las imágenes necesarias se devolvieron las células, con el medio de cultivo correspondiente, al incubador a 37°C, o bien se procesaron las muestras como interesó. Las imágenes se tomaron con un microscopio Nikon Eclipse TS2.

22.2. Microscopía de fluorescencia.

Para esta técnica se sembraron las células en monocapa sobre cubreobjetos estériles de 10 o 12 mm de diámetro colocados en placas de 24 pocillos. Se trataron, transfectaron o mantuvieron en condiciones basales, según el experimento diseñado. Cuando alcanzaron el 70-80% de confluencia se procedió a la tinción inmunquímica, que se describe más adelante.

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 TS2. Para cada tipo de línea celular y para cada condición, se capturaron diferentes imágenes en zonas aleatorias del cubreobjetos.

22.3. Microscopía confocal.

Para esta técnica se sembraron las células en monocapa sobre cubreobjetos estériles colocados en placas de 24 pocillos y se trataron, transfectaron o dejaron en condiciones basales. Cuando alcanzaron el 70-80% de confluencia se procedió a la tinción inmunquímica.

Las imágenes fueron captadas mediante un microscopio confocal de barrido espectral SP8 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. Las secciones se obtuvieron a través de un objetivo de 63X en aceite de inmersión. La correcta adquisición de imágenes para analizar la colocalización de moléculas de interés 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 es 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.

22.4. Tinción inmunquímica.

Tanto para microscopía de fluorescencia como para confocal se siguió el mismo procedimiento.

Las células se lavaron con PBS 1x y se fijaron con PFA 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó el bloqueo de los grupos amino libres con glicina 20 mM en tampón de bloqueo durante 30 min. Se usó saponina al 0.1% durante 15 min para permeabilizar (si fue necesario) y se incubó cada muestra con el anticuerpo 1° (**tabla MM-10**) 30 min en oscuridad y cámara húmeda para evitar evaporación. Se lavaron con tampón de bloqueo 2 veces y se incubó con anticuerpo 2° otros 30 min. De nuevo se realizaron 2 lavados y se incubaron con DAPI (1:10000) 5 min. Finalmente se realizaron dos lavados en tampón de bloqueo, un último lavado con PBS 1x y se montaron con 3 µl de DAKO en portaobjetos.

Anticuerpo 1°	Dilución	Anticuerpo 2°	Dilución
α-FLAG (Sigma-Aldrich)	1:7000	α-ratón conjugado Alexa 568	1:400
α-DNP (Oxford Biom Res)	1:1000	α-cabra conjugado Alexa 568	1:200
α-Tyr	1:5000	α-conejo conjugado Alexa 488	1:200
α-Tyrp1	1:1000	α-conejo conjugado Alexa 647	1:200
α-Lamp1	1:200	α-ratón conjugado Alexa 647	1:200
α-LC3	1:1000	α-conejo conjugado Alexa 488	1:400
α-NKI	1:200	α-ratón conjugado Alexa 647	1:400
α-HMB45	1:1000	α-ratón conjugado Alexa 555	1:400
α-TGN38	1:200	α-conejo conjugado Alexa 488	1:400

Tabla MM-10. Anticuerpos usados en la tinción inmunocitoquímica 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%.

En el caso de la tinción con DAMP, con el fin de mantener siempre un pH idóneo, se emplearon algunas modificaciones del protocolo descrito.

En este caso, se eliminó cuidadosamente el medio y se fijaron las células con PFA al 3% en el tampón A durante 15 min a temperatura ambiente. Se hicieron lavados con ese mismo tampón suplementado con NH₄Cl 50 mM. Se permeabilizaron las células con 0.1% de Triton X100 en tampón A, 5 min a -20°C. A continuación, se incubaron las muestras con α-DNP 1:10 en tampón A durante 1 h a 37°C (siempre manteniéndolas en una cámara húmeda para evitar evaporación). Lavar con tampón A y poner el anticuerpo secundario α-cabra a 1:200. Finalmente se realizaron varios lavados, se tiñeron los núcleos con DAPI (1:10000) 5 min y se realizó el montaje con DAKO, tal y como se especifica anteriormente.

22.5. Microscopía electrónica.

Durante la estancia externa realizada en el transcurso de esta Tesis Doctoral se han realizado experimentos de microscopía electrónica convencional y microscopía inmunoelectrónica. Esto ha sido posible gracias a la acogida del grupo de investigación de la Dra. Raposo, en el departamento de “*Biogenesis and Functions of Lysosome-Related Organelles*” (UMR144) del Instituto de Investigación Curie, en París, Francia.

Además, también se ha realizado una colaboración con el grupo de investigación del Profesor José Ángel Martínez Menárguez, del departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad de Murcia, gracias a la cual se han obtenido y reforzado los resultados de microscopía electrónica convencional.

22.5.1. Microscopía electrónica convencional.

Para esta técnica, se sembraron las células en monocapa sobre cubreobjetos estériles colocados en placas de 24 pocillos. Se trataron, transfectaron o dejaron en condiciones basales. Cuando alcanzaron el 70-80% de confluencia se procedió a la manipulación. Primero se realizó una fijación de 2% PFA, 1% Glutaraldehído en tampón fosfato 0.2 M a pH 7.4. A continuación, se realizó una tinción con 1% de tetróxido de osmio (OsO_4) suplementado con 1.5% de ferrocianuro potásico. Se realizan deshidrataciones progresivas para eliminar todo el resto de agua de la muestra y que no perturbe a los electrones en su paso por la columna del microscopio. Finalmente, los cubreobjetos se embeben en resina Epon 20²⁰⁰. Se introdujeron las muestras a 60°C durante 48 h para que polimerice correctamente la resina y se procedió a cortar secciones ultrafinas con un Ultramicrotomo Reichert UltracutS (Leica). Tras este proceso, se capturaron los cortes en rejillas específicas y se procedió a la tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo para proporcionar contraste a las muestras.

La observación de las muestras y adquisición de imágenes se realizó con un microscopio electrónico de transmisión TEM Tecnai Spirit G2 (Eindhoven, Holanda) equipado con una cámara de 4k CCD (Quemesa, Olympus, Munster, Alemania).

22.5.2. Microscopía inmunoeléctronica.

Para este tipo de técnica se necesitaron gran cantidad de células, bien en condiciones basales o bajo tratamientos. Por ello se cultivaron en botellas de 75 cm² y se fijaron con 4% PFA en tampón fosfato 0.2 M a pH 7.4. Tras recoger las células con rasqueta en 1% de gelatina se procedió a centrifugarlas a 10000 rpm durante 5 min. Posteriormente se cortó el pellet en pequeños cuadrados con ayuda de una lupa para embeberlos en una solución de 10% de gelatina y 2.3 M sacarosa durante 8 h¹⁹⁰. Tras esto, se posicionaron los cuadrados de muestra en un tornillo específico y se cortaron en el Ultracriomicrotomo Cryo Leica EM UC7. Se capturaron en rejillas específicas carbonatadas embebidas en 2% de metilcelulosa y 2.3 M de sacarosa²⁰¹. Las siguientes etapas del inmunomarcaje son: anticuerpo 1º durante 45 min en PBS 1x-gelatina, lavados pertinentes, anticuerpo 2º durante 20 min, lavados pertinentes y finalmente marcaje con proteína A conjugada a partículas de oro de 10 nm (PAG10). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio electrónico de transmisión TEM Tecnai Spirit G2 (Eindhoven, Holanda) equipado con una cámara de 4k CCD (Quemesa, Olympus, Munster, Alemania).

23. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En todos los ensayos cuantitativos se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA). 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). Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas a partir de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1

1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE VARIANTES ALÉLICAS NATURALES DEL RECEPTOR MC1R.

1.1. Identificación de las variantes alélicas potencialmente patogénicas del *MC1R* humano p.Tyr298* y p.Val174del.

Como ya se ha descrito anteriormente, el proceso de pigmentación de la piel es uno de los fenotipos más visibles en humanos. Es un proceso complejo y está regulado por unos 120 genes aproximadamente ^{202,203}. Las proteínas codificadas por estos genes participan en muchas funciones, y abarcan desde factores de transcripción, como por ejemplo PAX3, SOX10, MITF, hasta receptores expresados en la membrana plasmática de los melanocitos, como el MC1R. El gen *MC1R* es muy polimórfico y algunas de sus variantes se asocian fuertemente a un fenotipo de pigmentación característico de piel clara rica en feomelaninas y cabello rubio o pelirrojo ²⁰⁴. Por ello se considera uno de los genes responsables de la variación normal de la pigmentación humana. El estudio de estas variantes alélicas puede aportar información relevante acerca de las relaciones estructura-función del MC1R y de su regulación. Por ello, una parte de este trabajo se centró en analizar variantes del MC1R asociadas a fenotipos hipopigmentados.

En este trabajo, en colaboración con investigadores de EEUU y de Pakistán, se seleccionaron 30 familias, procedentes de diferentes regiones pakistaníes cuya información se recoge en el **anexo I, figuras A y B**. Todas estas familias presentan algún individuo con hipopigmentación. En la **tabla 1 del anexo I** se refleja el fenotipo de los primeros miembros de cada familia pakistaní seleccionada.

Para acotar la selección de estas 30 familias, nuestros colaboradores de este estudio realizaron un cribado genético mediante secuenciación masiva (de exoma completo). Con el análisis bioinformático de los datos obtenidos tras dicha secuenciación, se identificaron seis variantes de MC1R segregadas conjuntamente con el fenotipo en 7 de estas familias (**anexo I, figura A y tabla 2**).

Se puede observar que todos los individuos homocigotos para MC1R mutado presentan cabello castaño rojizo, piel blanca rosácea e iris de color marrón claro, y pecas en la piel (**figura A del anexo I**). En las revisiones médicas realizadas por nuestros colaboradores, no se observó degeneración en la retina, fotofobia ni nistagmo. Además, los antecedentes familiares y las evaluaciones físicas y clínicas de los dos individuos de mayor edad afectados no revelaron signos de hipotonía, obesidad, deterioro de las capacidades vestibulares o cognitivas, convulsiones, pérdida de audición, cataratas o cáncer de piel.

De las variantes encontradas en las familias seleccionadas, 4 fueron mutaciones con cambio de sentido, una consistió en una delección de 3 nucleótidos que eliminó un aminoácido sin

alterar la pauta de lectura y la última originó un codón sin sentido, con terminación prematura del marco de lectura (**tabla 2 del anexo I y figura 1**).

El alelo p.Asp294His encontrado en la familia PKAB150 es una variante bien conocida del "color rojo del cabello" (alelo R), frecuente en poblaciones de ascendencia europea. También habían sido ya descritos los alelos p.Gly89Arg, p.Ser172Ile y p.Val174del^{205,206}, y la variante p.Ala171Gly que aparece en las bases de datos públicas de SNPs también como alelo R (**tabla 2 del anexo I**).

Por otro lado, se encontró una variante c.894C>G (p.Tyr298*) desconocida hasta el momento. De acuerdo con los programas de análisis "in silico", se predijo que todas las mutaciones sin sentido producían daño de algún tipo. Sin embargo, no se pudieron obtener predicciones fiables para la mutación p.Tyr298* ni para p.Val174del, siendo por tanto las dianas a caracterizar en este trabajo (**tabla 2 del anexo I**). No se encontraron mutaciones en otros genes de pigmentación en estas siete familias.

La mutación p.Tyr298*, supone la pérdida de la cola citoplásmica que incluye el pentapéptido C-terminal (**figura 1**), requerida para la expresión de la proteína en la superficie celular. Por tanto, podría tratarse de una mutación con pérdida de función, ya que la eliminación de los últimos 5 aminoácidos C-terminales del MC1R es suficiente para anular su actividad, al menos en términos de acoplamiento funcional a la cascada del AMPc¹³⁴. Las consecuencias funcionales de la mutación p.Val174del son más difíciles de predecir ya que se trata de la delección de un único aminoácido, sin alteración de la pauta de lectura. Además, este aminoácido no está demasiado conservado en los MC1R de distintas especies, lo que sugiere que podría ser poco relevante desde un punto de vista funcional (**figura 1**). Por ello, decidimos llevar a cabo la caracterización funcional completa de estas dos variantes en paralelo.

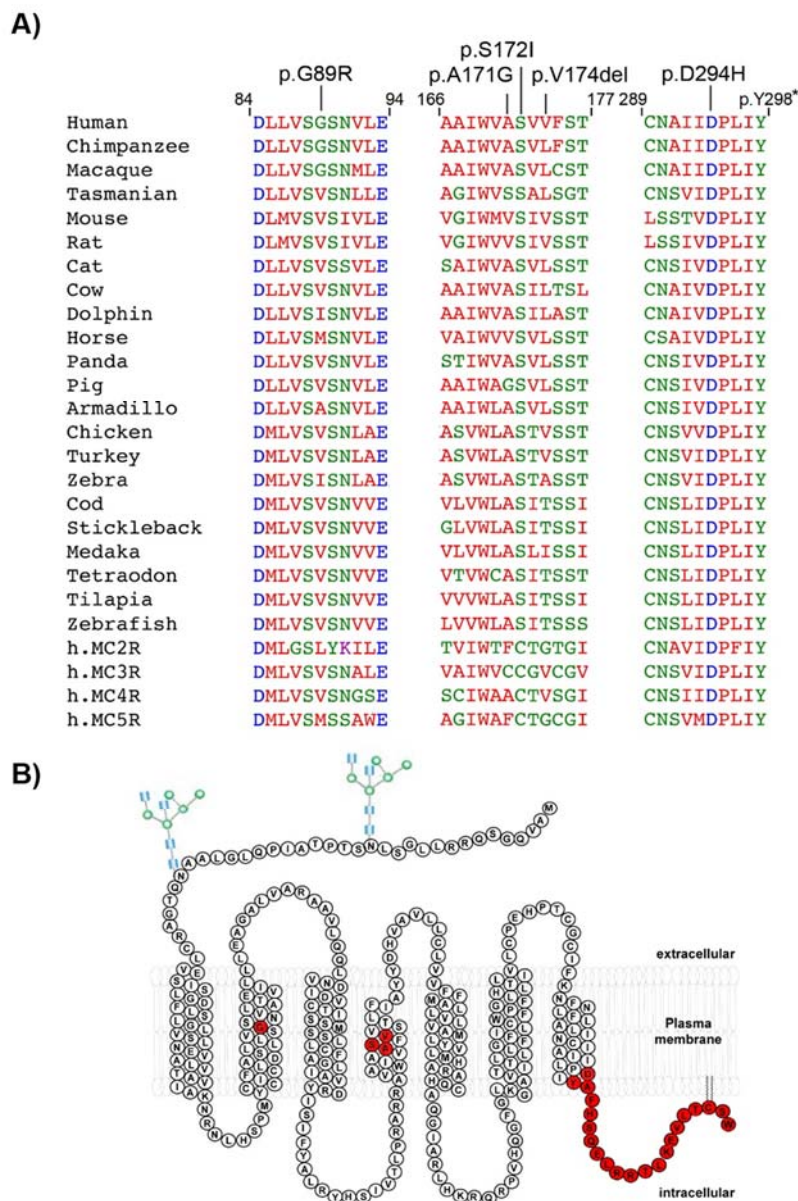


Figura 1. Mutaciones de MC1R en familias pakistáníes. A) Alineamiento de la secuencia de la proteína MC1R en distintas especies, que muestra el grado de conservación en las posiciones 89, 171, 172, 174 y 294. El residuo p.Asp294 está altamente conservado tanto en MC1R ortólogos como parálogos. B) Representación esquemática de MC1R. Los residuos mutados en las familias pakistáníes y la delección de 19 aminoácidos en C-terminal en p.Y298* están marcados en rojo.

23.1. Caracterización funcional de las variantes p.Tyr298* y p.Val174del.

Para su análisis funcional, las variantes p.Tyr298* y p.Val174del se clonaron en el vector pcDNA3 y se expresaron en células HEK293T transfectadas transitoriamente. En primer lugar, comparamos el patrón electroforético de los mutantes y el MC1R silvestre (WT), que fueron semejantes, con bandas correspondientes a monómeros y dímeros "de novo" (figura 2A), así como a las correspondientes formas glicosiladas, previamente descritas¹²⁸. No obstante, se

apreciaron diferencias en la intensidad de las bandas, que sugirió una menor acumulación de p.Val174del en comparación con WT. Por ello fue interesante estudiar la estabilidad intracelular de las proteínas. Ello se evaluó mediante el tratamiento de células transfectadas con cicloheximida (CHX) 0,1 mM a diferentes tiempos, seguido de la estimación de los niveles residuales de MC1R por Western blot (**figura 2B**). Las intensidades de las señales obtenidas se representaron frente al tiempo de tratamiento en un gráfico semilogarítmico que permite calcular la vida media de la proteína a partir de la pendiente de las rectas resultantes (**figura 2C**). La vida media de las distintas formas fue de 3.9 h para WT, 2.1 h para p.Tyr298* y 1.6 h para p.Val174del. Por lo tanto, podemos concluir que las mutaciones p.Tyr298* y p.Val174del desestabilizan significativamente el receptor.

El MC1R sufre dimerización como un paso biosintético temprano¹⁵⁴. Para verificar si los mutantes pudieron heterodimerizar con el receptor WT, se realizaron estudios de coinmunoprecipitación usando formas de MC1R marcadas diferencialmente con distintos epítipo. En concreto empleamos el receptor silvestre marcado con un epítipo HA y las formas mutantes marcadas con Flag. Como control positivo también empleamos el receptor silvestre marcado con Flag. Transfectamos células HEK293T con cantidades similares de los plásmidos de expresión correspondientes a la forma WT-HA y de cada una de las formas marcadas con Flag. Las células se solubilizaron y el extracto se inmunoprecipitó con un anticuerpo α -HA. Los precipitados obtenidos se analizaron por Western blot empleando anticuerpos contra el epítipo Flag para detectar las formas mutantes o el WT como control positivo. Puede observarse que, tras la inmunoprecipitación de WT, se detectaron tanto p.Tyr298* como p.Val174del, indicando una heterodimerización eficiente (**figura 2D**).

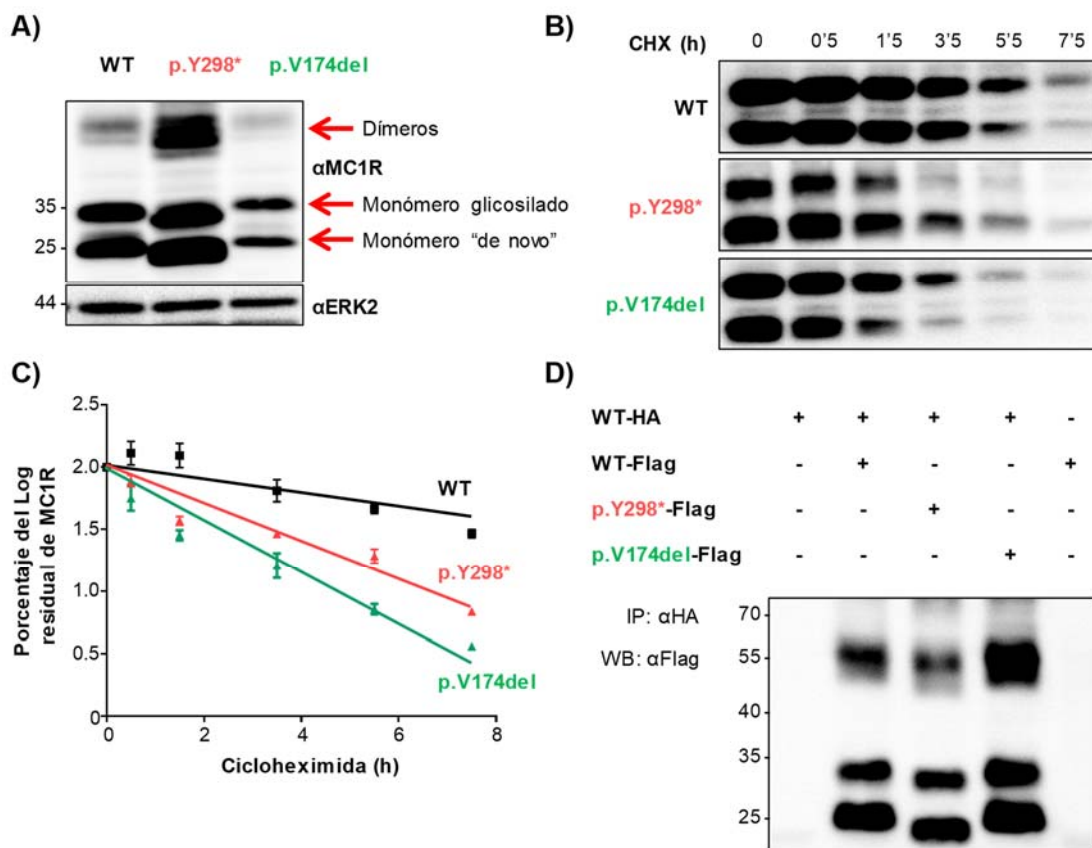


Figura 2. Expresión y estabilidad de p.Tyr298* y p.Val174del MC1R. A) Western blot de extractos de células HEK293T transfectadas con las diferentes variantes del MC1R-Flag solubilizadas. La membrana se trató con anticuerpo αFlag para localizar el MC1R. Las membranas se revelaron también con un anticuerpo αERK2 como control de carga proteica. B) Western blot de extractos de células HEK293T transfectadas con las diferentes variantes del MC1R-Flag y posteriormente tratadas con CHX 0.1 mM a diferentes tiempos (0.5-7.5 h). Membrana revelada con anticuerpo αFlag para localizar el MC1R. C) Gráfica representativa de la vida media de cada variante alélica de MC1R. Cuantificación realizada con ImageJ. D) Coinmunoprecipitación de MC1R WT y las variantes analizadas. Extractos de células HEK293T transfectadas con MC1R WT con epítipo HA sólo o cotransfectado con MC1R WT, p.Tyr298* o p.Val174del marcados con epítipo Flag, se inmunoprecipitaron con αHA (para MC1R WT) y se analizaron por Western blot revelado con un αFlag para detectar las variantes. Se realizaron 3 experimentos independientes con resultados comparables.

Al igual que muchos otros GPCRs, el MC1R activa diferentes cascadas de señalización intracelular¹⁴. Tras la unión a MSH o ACTH, se produce el acoplamiento funcional a la cascada del AMPc, por medio de la activación secuencial de la proteína Gs y de la AC, aumentando los niveles de AMPc¹³. Por ello, comparamos la activación de la producción de AMPc por parte de MC1R WT y los receptores mutantes. Tras la estimulación con NDP-MSH, las células que expresaban p.Val174del mostraron niveles de AMPc aumentados en una magnitud comparable al receptor WT. Por el contrario, p.Tyr298* resultó incapaz de activar significativamente la producción de AMPc (**figura 3A**). También obtuvimos curvas dosis-respuesta analizando el contenido de AMPc de células tratadas con distintas concentraciones de agonista comprendidas entre 10⁻¹¹ y 10⁻⁶ M (**figura 3B**), en el caso del mutante con actividad. Dichas curvas fueron similares para p.Val174del y WT (EC50 ~ 10 y 30 nM, respectivamente). Evidentemente este análisis no fue posible para pTyr298*, que carece de acoplamiento funcional detectable.

El MC1R estimulado por agonista activa las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares ERK1 y ERK2 independientemente de AMPc^{139,207}. Por tanto, analizamos la posible activación de las ERK por los dos mutantes estudiados (**figura 3C**). Se observa que tanto WT como p.Val174del activan de forma comparable las ERK tras la estimulación con NDP-MSH, mientras que el mutante p.Tyr298* es completamente inactivo también en lo referente a esta vía de señalización.

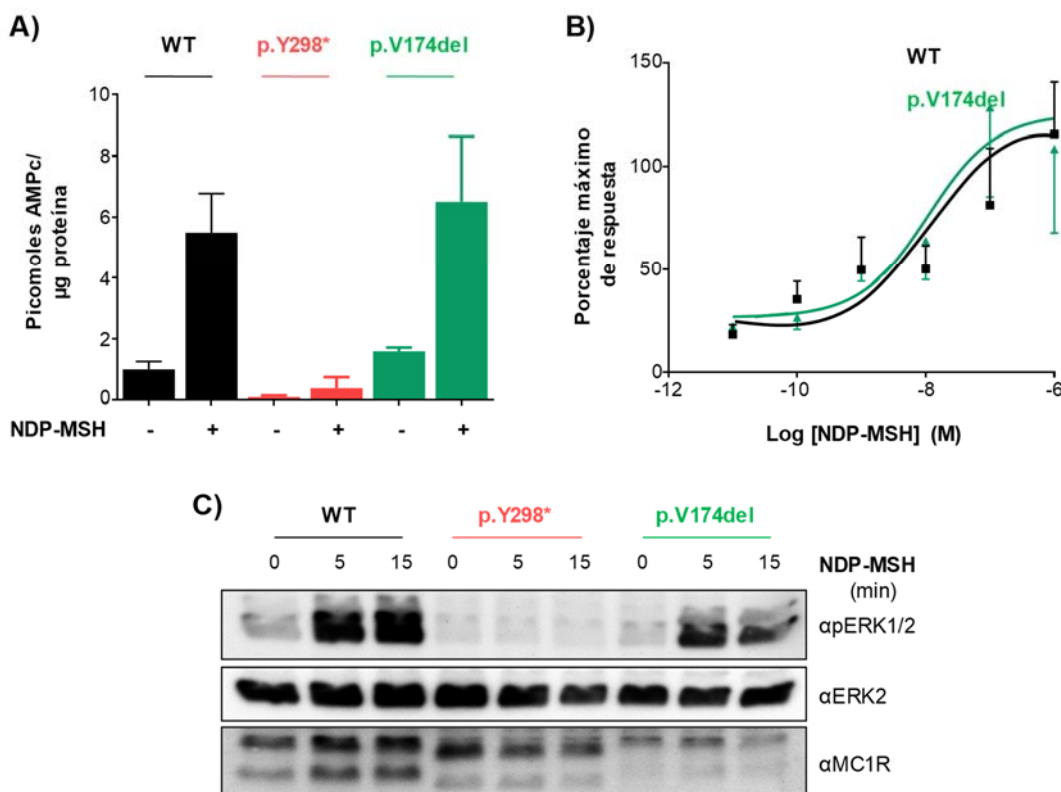


Figura 3. Análisis funcional de las variantes p.Tyr298* y de p.Val174del de MC1R. A) Niveles de AMPc en células HEK293T que expresan las variantes alélicas tras estimulación con concentración saturante de NDP-MSH (10^{-6} M durante 30 min). La cantidad de AMPc se estimó mediante inmunoensayo en 3 experimentos independientes, con duplicados cada ensayo. B) Curva dosis-respuesta de activación de la síntesis de AMPc de células HEK293T transfectadas con WT o p.Val174del y estimuladas durante 30 min con concentraciones crecientes de NDP-MSH (10^{-11} a 10^{-6} M). Realizado en 3 ensayos independientes, con duplicados en cada ensayo. No se detectaron aumentos significativos de AMPc en células transfectadas con la variante p.Y298*, a ninguna de las concentraciones ensayadas. C) Activación de las ERK por p.Val174del y MC1R WT. Células PC12 transfectadas con las variantes indicadas se estimularon con NDP-MSH (10^{-6} M) durante los tiempos mostrados. Los extractos se solubilizaron en presencia de inhibidores de fosfatasa. La activación de las ERK se estimó mediante Western Blot revelado con un anticuerpo específico de la forma activa fosforilada de ERK1 y ERK2. El anticuerpo αERK2 se utilizó como control de carga proteica.

23.2. Expresión en superficie de las variantes p.Tyr298* y p.Val174del de MC1R.

Los resultados reseñados demuestran que la variante p.Tyr298* de MC1R encontrada en una familia pakistaní en asociación con un fenotipo hipopigmentado es una forma mutante no funcional. La falta de acoplamiento funcional de los GPCRs mutantes puede explicarse por varios

mecanismos. Por una parte, el receptor puede ser incapaz de unirse a sus agonistas, bien por presentar un tráfico intracelular aberrante con retención en compartimentos intracelulares y falta de expresión en superficie, bien por pérdida de afinidad por sus ligandos una vez insertado en la membrana plasmática. Por otra parte, algunas variantes pueden expresarse en la superficie celular y unir agonistas, pero tras esta unión no son capaces de sufrir el cambio conformacional activador que las conecte a las vías de señalización normales ¹⁸⁸.

Para distinguir entre la incapacidad de p.Tyr298* para unirse al agonista o, como alternativa, no experimentar una transición al estado activo, se realizó un análisis de unión de radioligando usando ^[125I]NDP-MSH. El mutante p.Tyr298* no mostró unión detectable (**figura 4A**). Sin embargo, p.Val174del presentó una capacidad de unión considerable. Esta capacidad permitió construir curvas de desplazamiento para dichos mutantes (**figura 4B**). Estas curvas se obtienen incubando las células transfectadas con una cantidad fija de ligando marcado radioactivamente, en presencia de cantidades crecientes de ligando sin marcar. Posteriormente las células se lavan y se determina la radioactividad asociada, representando la radioactividad unida frente a la concentración de ligando competidor no marcado.

El análisis de estas curvas reveló que p.Val174del muestra una afinidad de unión comparable con WT (K_d 1.2 ± 0.3 y 3.4 ± 0.7 nM para p.Val174del y WT, respectivamente), aunque una B_{max} significativamente menor (11.7 ± 0.7 y 3.3 ± 0.2 femtomoles / µg de proteína para WT y p.Val174del, respectivamente). Esta caída de B_{max} es consistente con la menor unión de radioligando mostrada en las **figuras 4A y 4B**.

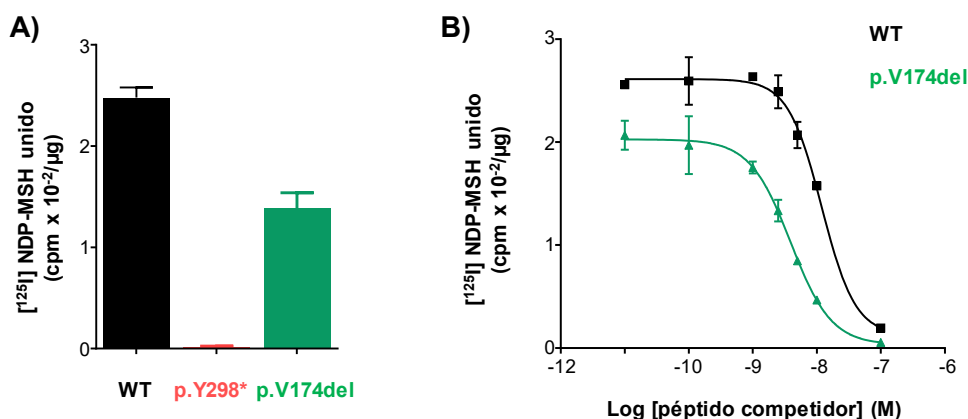


Figura 4. Unión de radioligando a las variantes naturales p.Tyr298* y de p.Val174del del MC1R. A) Células HEK293T transfectadas con los plásmidos indicados se incubaron durante 1 h con una concentración fija de ^[125I]NDP-MSH. Las células se lavaron varias veces y la radiactividad asociada se determinó en un contador γ. Se realizaron 3 experimentos independientes, con duplicados cada ensayo. B) Células HEK293T transfectadas con MC1R WT o la variante alélica p.Val174del fueron incubadas con una concentración fija de ^[125I]NDP-MSH (10⁻¹⁰ M) en 500 µl de medio libre de suero en presencia de concentraciones crecientes de hormona no marcada (10⁻¹¹ a 10⁻⁷ M). Los resultados indicados corresponden a la media ± SEM de 3 ensayos independientes, con duplicados cada ensayo.

Estos datos sugieren que p.Val174del es capaz de unirse al agonista con alta afinidad pero se transporta a la superficie celular de manera menos eficiente que WT. Por el contrario, p.Tyr298* no puede unirse al agonista, ya sea debido a una retención intracelular prácticamente completa o debido a una conformación aberrante con muy baja afinidad por el agonista. Para analizar con más detalle estas posibilidades, se estudió la distribución subcelular de los mutantes por microscopía confocal, y su expresión en superficie por citometría de flujo.

En primer lugar, se expresaron los mutantes marcados con el epítipo Flag fusionado al extremo N-terminal de la proteína en células HEK293T, y las células se tiñeron para microscopía con un anticuerpo α Flag, con o sin permeabilización previa. Puesto que el epítipo está localizado en la posición N-terminal extracelular del receptor, la interacción entre el anticuerpo α Flag y su epítipo debe ser posible cuando el receptor esté insertado en la membrana plasmática y, por tanto, no debe requerir permeabilización. Como controles se introdujeron el receptor WT y la variante p.Arg162Pro mal procesada y totalmente retenida ¹⁵⁶. Como se aprecia en la **figura 5A**, en células no permeabilizadas tanto el receptor WT como los mutantes p.Tyr298* y p.Val174del fueron detectables, mientras que el mutante p.Arg162Pro no dio ninguna señal. Este resultado indica que los dos mutantes analizados fueron capaces de alcanzar parcialmente la superficie celular. Por otra parte, todas las formas del MC1R analizadas se tiñeron en células permeabilizadas con intensidades comparables. Esta tinción debería corresponder a la fracción de moléculas en tránsito a través de la vía biosintética secretora, o bien a formas con una conformación aberrante que quedan retenidas en compartimentos intracelulares por acción de los sistemas de garantía de calidad.

La expresión en superficie detectable de los mutantes p.Tyr298* y p.Val174del se confirmó por citometría de flujo. En este caso (**figura 5B**), las células se tiñeron sin una permeabilización previa puesto que el epítipo Flag se encuentra fusionado al extremo N-terminal extracelular del MC1R. Así, solo se tiñeron las moléculas correctamente insertadas en la superficie celular. Puede apreciarse que p.Tyr298* y p.Val174del fueron detectables en la superficie celular, con intensidades comparables, pero inferiores a las correspondientes al receptor WT. Ello confirma la expresión parcial de p.Val174del en la membrana plasmática, pero sugiere una retención parcial del mismo. Además, junto con los datos anteriores, demuestra que p.Tyr298* es incapaz de unir agonista, ya que la falta de unión de radioligando de este mutante se observa a pesar de una expresión detectable en la superficie celular.

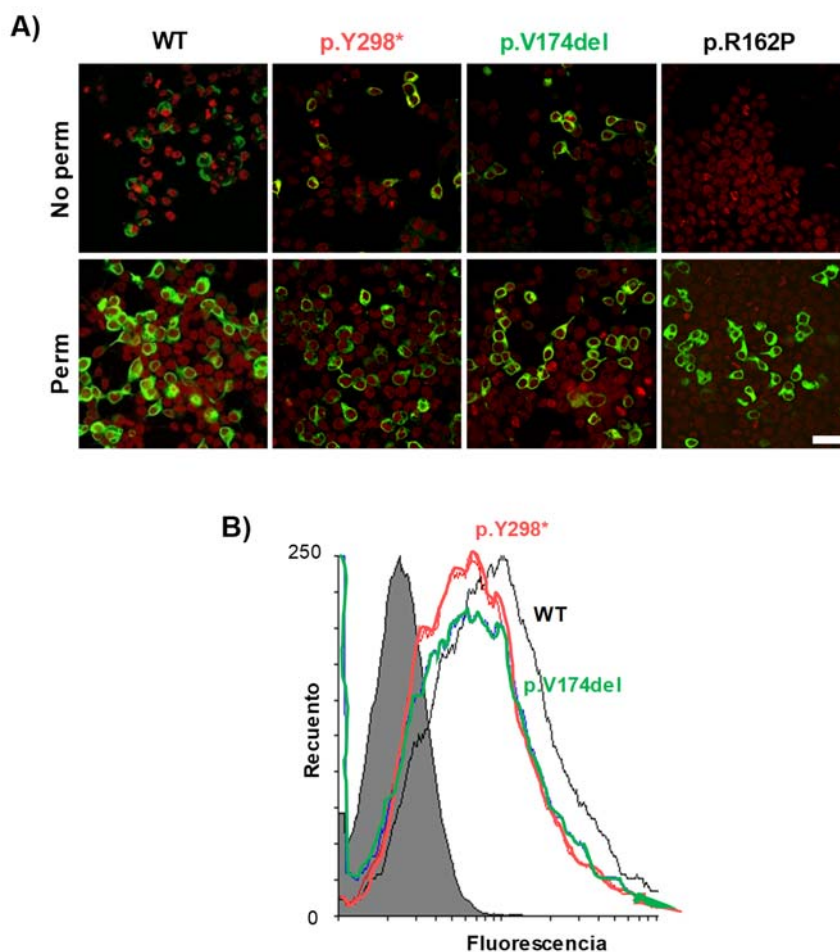


Figura 5. Análisis de expresión en superficie de p.Tyr298* y de p.Val174del MC1R en células HEK293T. A) Imágenes de microscopía confocal de células HEK293T transfectadas con las variantes indicadas. Células no permeabilizadas (No perm) o permeabilizadas (Perm) con 0.5% de Igepal durante 15 min a 4°C. Las distintas formas de MC1R se detectaron con un anticuerpo α -Flag seguido de un secundario conjugado con Alexa 488 (verde). Los núcleos están marcados con 7-AAD (rojo). Como control negativo se usó la variante alélica totalmente retenida p.Arg162Pro (p.R162P)¹⁵⁶. Barra de escala: 42 μ M. B) Histograma del análisis de la expresión en superficie mediante citometría de flujo. Las células transfectadas con MC1R WT o las variantes alélicas fueron teñidas en condiciones no permeabilizantes. Se analizaron 10.000 eventos. La curva gris es el blanco obtenido mediante células transfectadas con el vector vacío, en negro WT, en rojo p.Tyr298* (p.Y298*) y en verde p.Val174del (p.V174del). Se muestra un histograma representativo de 3 ensayos independientes, que dieron resultados similares.

23.3. Estudios funcionales en células melanocíticas humanas.

Finalmente, quisimos confirmar el tráfico incorrecto de p.Val174del en células melanocíticas. Células HBL de melanoma humano se transfectaron con las construcciones marcadas con el epítipo, como en el caso de las células HEK293T descritas más arriba. Posteriormente, las células se tiñeron con un anticuerpo α Flag marcado con ficoeritrina y se analizaron en un citómetro de flujo (**figura 6A**). De acuerdo con los resultados obtenidos en células HEK293T heterólogas, ambas variantes mostraron una intensidad de tinción comparable y significativamente inferior a la de WT. También analizamos mediante ELISA las células HBL no permeabilizadas que expresan WT o p.Val174del teñidas con α Flag (**figura 6B**). Este

procedimiento confirmó nuevamente la expresión reducida en la superficie celular de p.Val174del expresada en células melanocíticas comparada con el receptor WT.

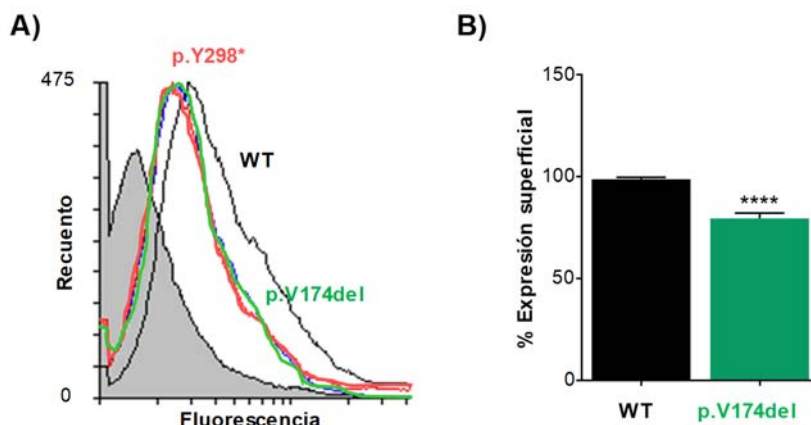


Figura 6. Expresión en superficie de p.Tyr298* y de p.Val174del MC1R en células HBL. A) Histograma del análisis de la expresión en superficie mediante citometría de flujo. Las células de melanoma humano HBL fueron transfectadas con MC1R WT o las variantes alélicas y teñidas con un anticuerpo α Flag marcado con ficoeritrina en condiciones no permeabilizantes. Se analizaron 10.000 eventos. La curva gris es el blanco obtenido mediante células transfectadas con el vector vacío, en negro WT, en rojo p.Tyr298* (p.Y298*) y en verde p.Val174del (p.V174del). Se realizaron 3 ensayos independientes con resultados comparables. B) Análisis mediante ELISA de la expresión superficial de MC1R y p.Val174del transfectadas en HBL. Células transfectadas se cultivaron en placas y posteriormente las variantes del receptor se detectaron con el anticuerpo α Flag.

En conjunto, los resultados descritos demuestran que p.Tyr298* es un mutante de pérdida de función total, que parece presentar un tráfico intracelular parcialmente impedido, aunque una parte de las moléculas expresadas alcanzan la membrana plasmática. Sin embargo, dichas moléculas serían incapaces de unir agonista y por tanto, no presentarían ninguna capacidad de señalización. Esto confirma los hallazgos previos sobre la importancia funcional de la extensión citosólica del MC1R¹³⁴, ya que p.Tyr298* es una forma truncada que carece de la misma.

Por otro lado, p.Val174del activó eficientemente las rutas AMPc y ERK, pero la expresión en superficie celular se redujo de acuerdo con citometría de flujo, microscopía confocal y experimentos de unión a radioligandos. Este tráfico anterógrado deteriorado no dio como resultado la disminución de los parámetros de señalización en un sistema heterólogo de sobreexpresión donde el MC1R exógeno debería estar en exceso sobre los componentes aguas abajo de la maquinaria de transducción de señales²⁰⁸. Sin embargo, en los melanocitos normales que expresan como máximo algunos cientos o pocos miles de receptores por célula, MC1R debería ser el factor limitante. En estas condiciones fisiológicas, cualquier reducción en la expresión en superficie debería causar una disminución similar en la respuesta intracelular²⁰⁸, que sería consistente con la asociación de p.Val174del con un fenotipo hipopigmentado en los individuos analizados.

Por otra parte, el metanálisis de la relación entre actividad residual de mutantes MC1R y penetrancia fenotípica del alelo en cuestión ha permitido concluir que variantes con actividades

residuales inferiores al 25% en términos de acoplamiento a la cascada del AMPc se comportan como alelos “R”, fuertemente penetrantes²⁰⁴. Finalmente, variantes con actividad residual del 50% o mayores se comportarían como alelo “r” poco penetrantes. En estas condiciones nuestros datos funcionales permiten predecir que la variante p.Tyr298* del MC1R debería comportarse como un fuerte alelo de tipo “R”, mientras que el p.Val174del mutante podría mostrar una pérdida de función parcial y tener una menor penetrancia, del tipo “r”.

CAPÍTULO 2

2. Hiperpigmentación de melanocitos carentes de MGRN1: un proceso celular autónomo dependiente de la activación de tirosinasa.

Como ya hemos comentado, uno de los objetivos del presente trabajo consistió en identificar las bases moleculares del efecto de MGRN1 en la pigmentación, ya que el ratón *mahoganoide* con expresión nula de MGRN1 está más pigmentado que los controles correspondientes¹⁷². En este sentido, resultó interesante analizar si la pérdida de expresión de MGRN1 en melanocitos *mahoganoide*s ocasionaba una mejor activación de dichos melanocitos por α -MSH al impedir la inhibición de MC1R por la E3 ligasa y si su mayor grado de pigmentación es una propiedad inherente de los melanocitos carentes de MGRN1 o depende de señales procedentes del entorno.

Como modelo de estudio utilizamos los melanocitos melan-a6 (control) y los melanocitos melan-md1 (*mahoganoide*s), que presentan un fondo genético idéntico, pero expresión nula de *Mgrn1*. En estos modelos celulares comparamos el contenido de melaninas y melanosomas, la actividad de MC1R y el efecto del medio condicionado por cada una de estas líneas celulares sobre la actividad melanogénica de la otra línea.

Para abordar el primer punto, cuantificamos el contenido de melaninas de las líneas celulares melan-a6 y melan-md1. El estudio se realizó mediante ensayo colorimétrico tras solubilización de los pigmentos en medio básico y obtuvimos la cantidad de melanina normalizada por proteína en cada línea celular. Para evitar posibles artefactos debidos a la deriva fenotípica de líneas establecidas hace algunos años, como melan-a6 y -md1, ampliamos el estudio utilizando clones de células melan-a6 o B16F10 en las que la expresión de MGRN1 se anuló mediante tecnología CRISPR-Cas9. Estos clones se emplearon en pase bajo, por lo que el efecto de la deriva fenotípica debe ser descartado. Además, durante la estancia de 3 meses realizada en el laboratorio de la Dra. Raposo, en el Intitut Curie de París, se comparó el número y grado de maduración de los melanosomas en células melan-a6 y -md1 mediante microscopía electrónica. Durante esta estancia se estudiaron, en paralelo, células de melanoma humano MNT-1.

Para abordar el segundo punto se analizó el contenido de AMPc en ambas líneas celulares tras estimulación con un análogo de α -MSH (NDP-MSH) o con Forskolina, un activador directo de la AC, y se estudió la posible activación de la vía de las ERK. Por último, realizamos ensayos con medio condicionado para cada línea y se midieron las actividades enzimáticas melanogénicas tanto en extractos celulares como en células *in vivo*.

2.1. Contenido de melaninas y melanosomas en melanocitos tras la represión del gen *Mgrn1*.

Como refleja la **figura 7**, las células melan-a6 presentan un aspecto menos pigmentado que las células melan-md1 al microscopio óptico y un fenotipo menos diferenciado, carente de las prolongaciones dendríticas presentes en las células mutantes (**figura 7A**). Además, el contenido en melaninas de las células melan-a6 es un orden de magnitud menor que el de las células mutantes (**figura 7B**). Este menor contenido en pigmentos melánicos es consistente con el aspecto de los pellets celulares procedentes de cultivos de ambas líneas (**figura 7C**). Comprobamos mediante Western blot que, como era de esperar, MGRN1 está presente únicamente en las células melan-a6 (**figura 7D**). Resultados similares se observan en células melan-a6 silenciadas para *Mgrn1* con diversos siRNAs. Así, observamos en la **figura 7E** imágenes de microscopía óptica en las que las células tratadas con vehículo (Mock) o con un siRNA control (siCTRL) no presentan cambios significativos, mientras que las células tratadas con 2 siRNAs diferentes, dirigidos contra *Mgrn1* (siMGRN1-01 y -04) presentan más dendritas y, aparentemente, están más pigmentadas. Este aumento de pigmento no se observó ni en los pellets celulares ni mediante cuantificación de melaninas, quizá porque cambios sutiles no son apreciables por estas técnicas o, porque las células tratadas con siRNA conservan un nivel de expresión de *Mgrn1* suficiente para mantener la función de la proteína. En la **figura 7F** se muestra la expresión de *Mgrn1* tras el tratamiento con los siRNAs, analizada por Western blot, que confirma una expresión residual detectable de la proteína.

Se obtuvieron resultados análogos en clones de células melan-a6 con expresión de *Mgrn1* anulada mediante CRISPR-Cas9 (**figura 8, paneles A - D**). El análisis de 4 clones independientes (C24, C34, C35 y C45) mostró un fenotipo celular más diferenciado (**figura 8A**), con una tendencia a mayor acumulación de melaninas (**figura 8B y 8C**). No obstante, en este caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas, quizá en parte debido a las limitaciones técnicas del ensayo, con sensibilidad algo baja. El análisis por Western blot confirmó la represión de la expresión de *Mgrn1* en los clones analizados (**figura 8D**).

Los mismos resultados se obtuvieron en el caso de los clones CRISPR-Cas9 obtenidos a partir de células de melanoma de ratón B16F10. Estos clones mostraron un fenotipo ligeramente más diferenciado que los controles (**figura 8E**) y mayor acúmulo de melaninas (**figura 8F y 8G**). En dichos clones, la falta de expresión de *Mgrn1* se confirmó también por Western blot (**figura 8H**). El clon 6C3 mantuvo una expresión detectable de *Mgrn1* lo que explica el contenido en melaninas similar al de las células control y constituye de por sí un buen control negativo adicional.

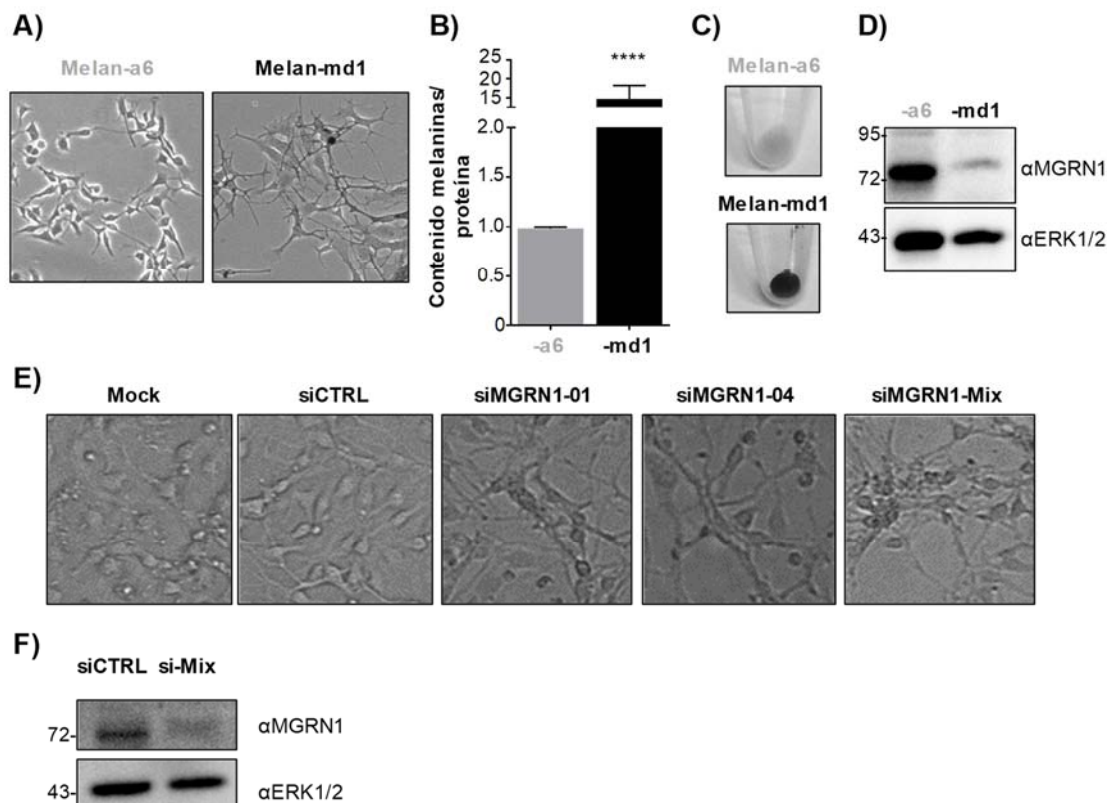


Figura 7. Contenido de melanina de las células melan-a6 y melan-md1. A-D) Análisis de las células melan-a6 y melan-md1 y E-F) de las células melan-a6 silenciadas para *Mgrn1* mediante tratamientos con siRNA específicos. siCTRL es un RNA control sin dianas previstas en el genoma del ratón. Los siMGRN1-01 y -04 son dos siRNA distintos, ambos dirigidos contra *Mgrn1*. siMGRN1-Mix es una mezcla equimolecular de los dos oligonucleótidos anteriores, que se empleó a la misma concentración final. A) y E) Imágenes de contraste de fases; B) Cuantificación del contenido relativo de melanina en melan-a6 y melan-md1 (media \pm SEM de 3 ensayos independientes con diferentes extractos celulares, cada uno realizado por triplicado); C) Imágenes de pellets de células melan-a6 y melan-md1 obtenidos por centrifugación a baja velocidad y análisis por Western blot de la expresión de *Mgrn1* en D) células melan-a6 y -md1 y F) tras silenciamiento de *Mgrn1* con siRNA en células melan-a6.

El contenido en melaninas del modelo de células melanocíticas humanas MNT-1 también se caracterizó, en comparación con las líneas murinas. Se observa que son células con aspecto fusiforme (**figura 9A**), altamente pigmentadas (**figura 9B**) y con un contenido en melaninas más elevado que las células control melan-a6, pero no tanto como las *mahoganoideas* melan-md1, y una expresión alta de la enzima tirosinasa (TYR) y de MGRN1 (**figura 9D**).

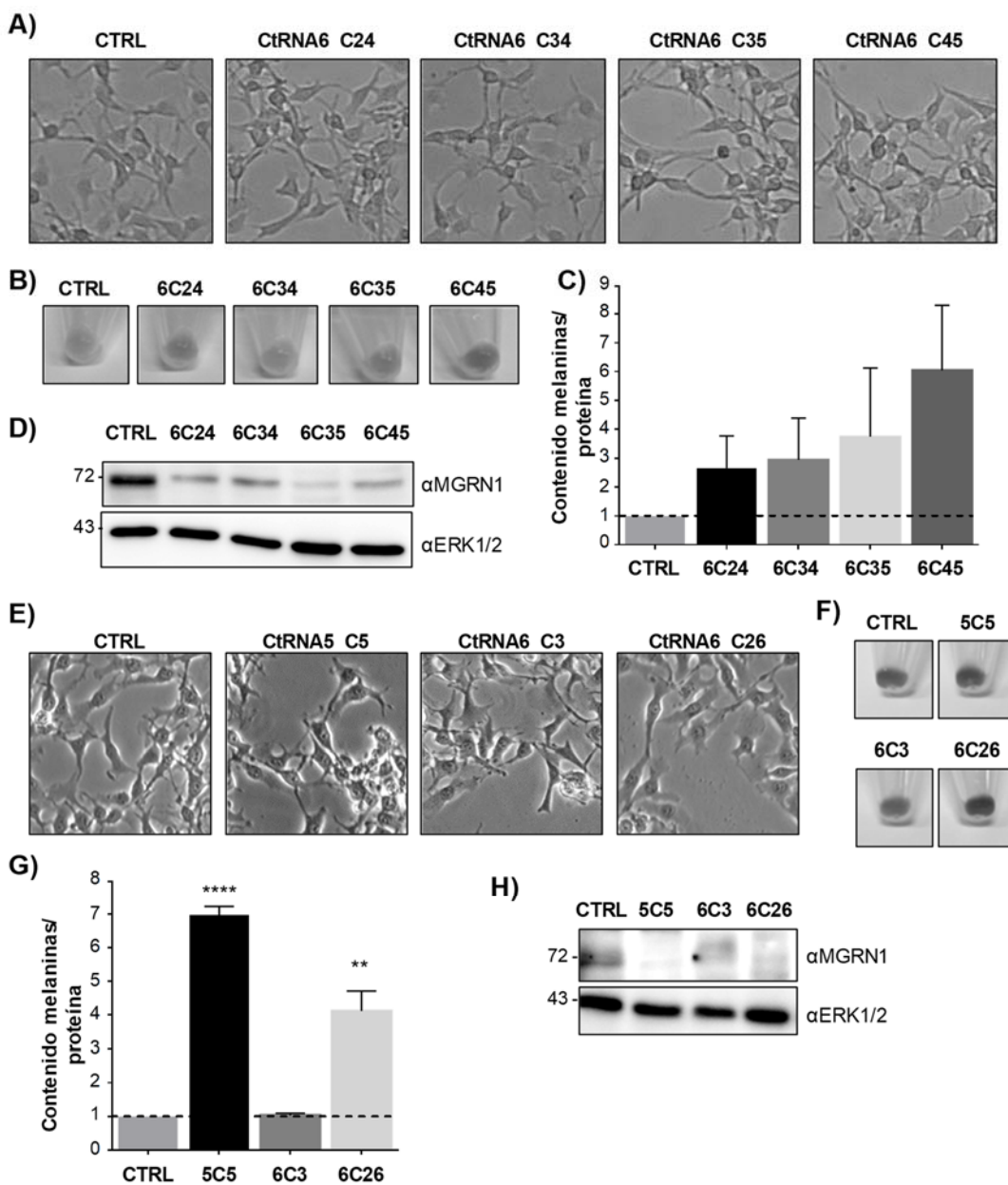


Figura 8. Análisis del contenido de melanina de melanocitos de ratón *Mgrn1*-KO mediante tecnología CRISPR-Cas9. A-D) Células melan-a6 CRISPR-Cas9 y E-H) células B16F10 CRISPR-Cas9: A) y E) Imágenes de contraste de fases; B) y F) imágenes de pellets celulares obtenidos por centrifugación a baja velocidad; C) y G) cuantificación del contenido de melaninas/proteínas, referido el valor obtenido para células control. Se realizaron 3 ensayos independientes con diferentes extractos celulares, cada uno por triplicado; D) y H) análisis por Western blot de la expresión de *Mgrn1* en las células indicadas. Como control de carga se empleó ERK2.

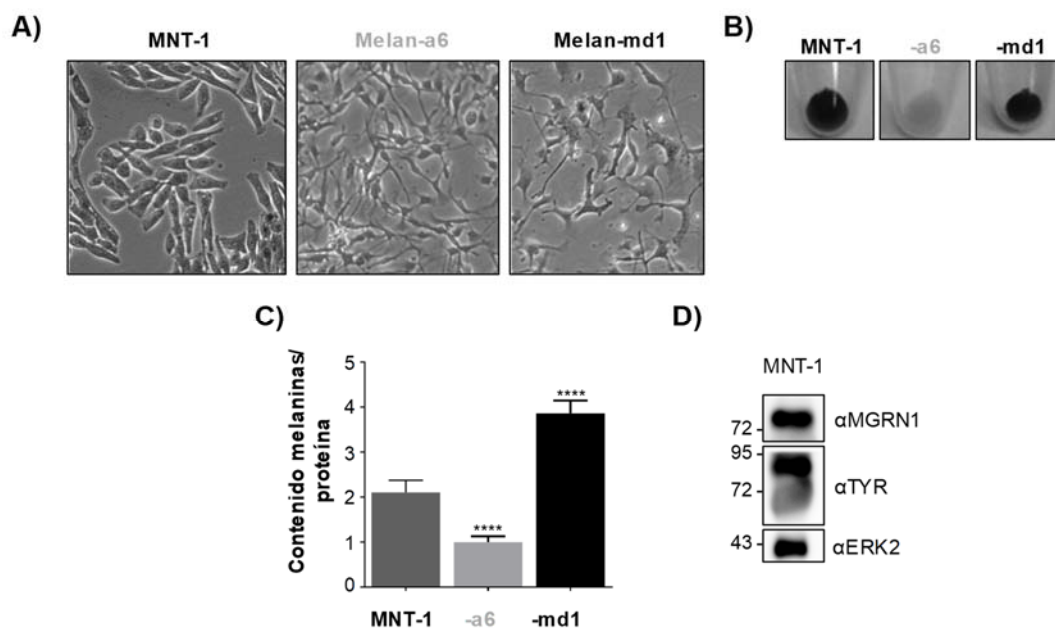


Figura 9. Análisis comparativo de células de melanoma humano MNT-1 y melanocitos de ratón. A) Imágenes de contraste de fases; B) pellets celulares; C) contenido en melaninas; D) Análisis por Western blot de la expresión de MGRN1 y tirosinasa en células MNT1.

Los resultados obtenidos con los distintos modelos celulares murinos sugieren que la falta de expresión de MGRN1 se asocia, en efecto, a un fenotipo más pigmentado. Además, parecen indicar que se trata de un proceso celular autónomo independiente de mayor señalización por MC1R, ya que las diferencias se observan sin que se haya añadido ningún agonista al medio de cultivo. De todos modos, no se puede excluir una activación autocrina por MCs producidas por los propios melanocitos melan-md1, o bien una mejor respuesta en células melan-md1 a las MCs presentes en el suero fetal bovino.

Para profundizar en la caracterización del fenotipo hiperpigmentado de las células melan-md1, realizamos un análisis ultraestructural de dichas células, en comparación con los melanocitos control melan-a6. Para ello, en colaboración con el equipo de investigación de la Dra. Raposo, se adquirieron imágenes de microscopía electrónica de células melan-a6 y -md1 (**figura 10**). Puede apreciarse que, mientras que en las células melan-a6 predominan los melanosomas en estadio I, en las células melan-md1 el estadio más abundante es el IV. Además, el porcentaje de melanosomas en estadio II es significativamente mayor en melanocitos melan-a6, mientras que los melanosomas en estadio III no presentan diferencias significativas entre las líneas estudiadas (**figura 10A y 10B**).

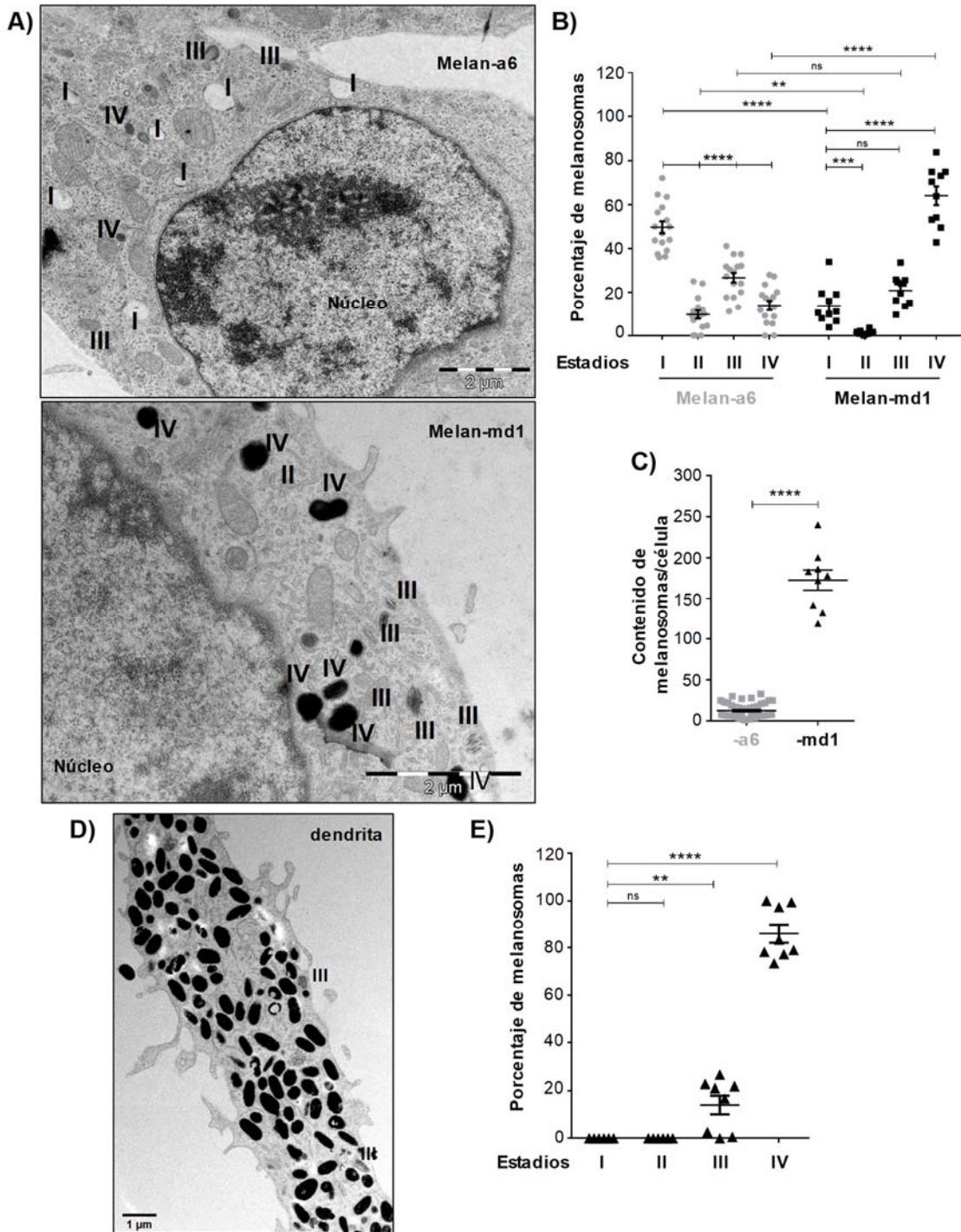


Figura 10. Análisis de los estadios melanosomales en melanocitos de ratón. A) Imágenes de microscopía electrónica de las células melan-a6 y -md1; se indican los estadios melanosomales en números romanos (barra de escala: 2 µm); B) Porcentajes de melanosomas en cada estadio. Se identificaron y contaron los melanosomas en varias células distintas y se calcularon los porcentajes de melanosomas en cada estadio. Resultados de 3 experimentos diferentes, con n=15 en cada uno de ellos; C) Número de melanosomas por célula (recuento en el soma celular, ya que es lo único que se puede comparar, al no existir dendritas diferenciadas en las células control melan-a6); D) Imagen de microscopía electrónica de una dendrita perteneciente a las células melan-md1. Estas dendritas se cargan de melanosomas de estadio IV (prácticamente todos los orgánulos). Se indican únicamente los orgánulos que pertenecen a otro estadio. E) Distribución de los melanosomas entre los estadios existentes en las dendritas de las células melan-md1.

En resumen, en los melanocitos melan-a6 predominan los estadios menos melanizados, I y II (aproximadamente un 60% de los melanocitos totales), mientras que en los melanocitos melan-md1 son más abundantes los estadios maduros, III y IV (aproximadamente el 80% de los melanocitos totales). También determinamos el número de melanosomas por cada célula. Para ello se contaron los melanosomas en un mínimo de 10 células individuales. Se observó un número mucho mayor de melanosomas en células melan-md1 debido, sobre todo, a la gran cantidad de melanosomas maduros presentes en las células (**figura 10C**). Es de resaltar que en células melan-md1 se observan prolongaciones dendríticas cargadas de melanosomas maduros, con un predominio abrumador del estadio IV y básicamente desprovistas de melanosomas I y II (**figura 10D y 10E**). En células melan-a6 estas estructuras fueron difícilmente detectables. Por lo tanto, en conjunto, el análisis morfológico por microscopía electrónica indicó que la carencia de *Mgn1* favorece la maduración de los melanosomas y probablemente también su biogénesis.

Puesto que las comparaciones directas entre las líneas melan-a6 y melan-md1 pueden verse afectadas por la deriva fenotípica de las mismas, decidimos comprobar el efecto de *Mgn1* en la ultraestructura de los melanocitos por silenciamiento del gen *Mgn1* en células melan-a6 mediante siRNA. Para ello, cultivos de células melan-a6 se trataron durante 72 h con 2 siRNAs distintos, como anteriormente, y se analizó la ultraestructura de las células tras dicho tratamiento por microscopía electrónica. Como control se utilizaron células melan-a6 tratadas con siRNA “scramble” (siCTRL), sin ninguna diana predicha en el genoma de ratón. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 11**. Pueden observarse diferencias notables entre los melanosomas de las células control y los de las células silenciadas (**figura 11A - C**). El perfil de los estadios melanosomales de las células tratadas con siMGRN1 (**figura 11E**) se aproximó al de las células melan-md1, aunque las diferencias respecto a melan-a6 fueron menores. El estadio más abundante comienza a ser el IV, mientras que en las células tratadas con siCTRL se mantiene el perfil normal, con un porcentaje superior de melanosomas en estadio I, menos melanizados. Por otra parte, la cuantificación del número total de melanosomas por célula indicó que la represión de *Mgn1* por tratamiento con siRNA produjo un aumento del número de melanosomas por célula, ligero pero significativo para siMGRN1-01 y más marcado para siMGRN1-04 (**figura 11F**). En estos experimentos, la eficiencia del silenciamiento se estimó mediante cuantificación de los niveles de mRNA para *Mgn1* por qPCR, tras extracción del RNA total de células tratadas de forma idéntica (**figura 11D**). Se observan niveles inferiores al 50% en células tratadas con el siMGRN1-01 y una mayor represión de *Mgn1* tras el tratamiento con siMGRN1-04, consistente con el mayor cambio fenotípico observado.

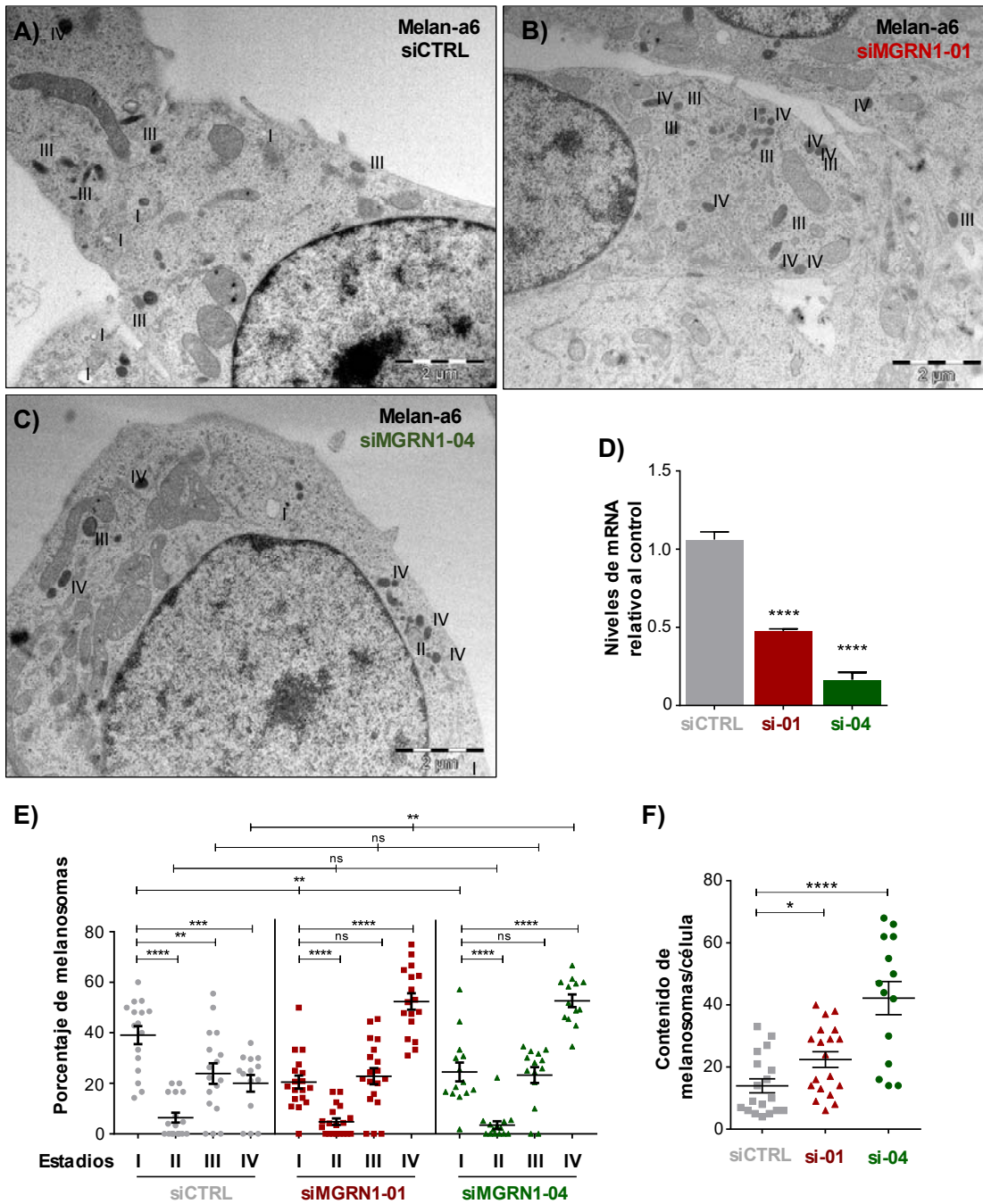


Figura 11. Estadios melanosomales en células melan-a6 tras represión de la expresión de *Mgrn1*. A) Imagen de microscopía electrónica de células melan-a6 tratadas con siCTRL, B) siMGRN1-01 y C) siMGRN1-04. (En los tres casos, los tratamientos de silenciamiento son de 72 h. Se indican los estadios con números romanos encima de cada melanosoma. Barra de escala: 2 μ m). D) Niveles de mRNA para *Mgrn1* determinados por qPCR. Los resultados se expresan relativos a las células tratadas con siCTRL. E) Análisis de los diferentes estadios melanosomales tras silenciamiento de *Mgrn1*. Resultados de 3 experimentos diferentes, con n=15 en cada uno de ellos. F) Número de melanosomas por célula (recuento del soma, ya que las células tratadas con siCTRL no presentan dendritas).

Además, es reseñable la aparición de prolongaciones en células melan-a6 silenciadas para *Mgrn1*, que no se encuentran en las células melan-a6 control (**figura 12**). En las células tratadas tanto con siMGRN1-01 (**figura 12A**) como con siMGRN1-04 (**figura 12B**) se observaron prolongaciones claramente definidas y cargadas de melanosomas, sobre todo de estadios

maduros, más melanizados (estadios III y IV). Por lo tanto, la represión de *Mgrn1* en melanocitos melan-a6 recapitula los aspectos esenciales del fenotipo de pigmentación de células *mahoganoides* melan-md1, al menos a nivel ultraestructural, si bien estos cambios son menos intensos que los detectables en la línea *mahoganoide*, quizá como consecuencia de la expresión residual de *Mgrn1*.

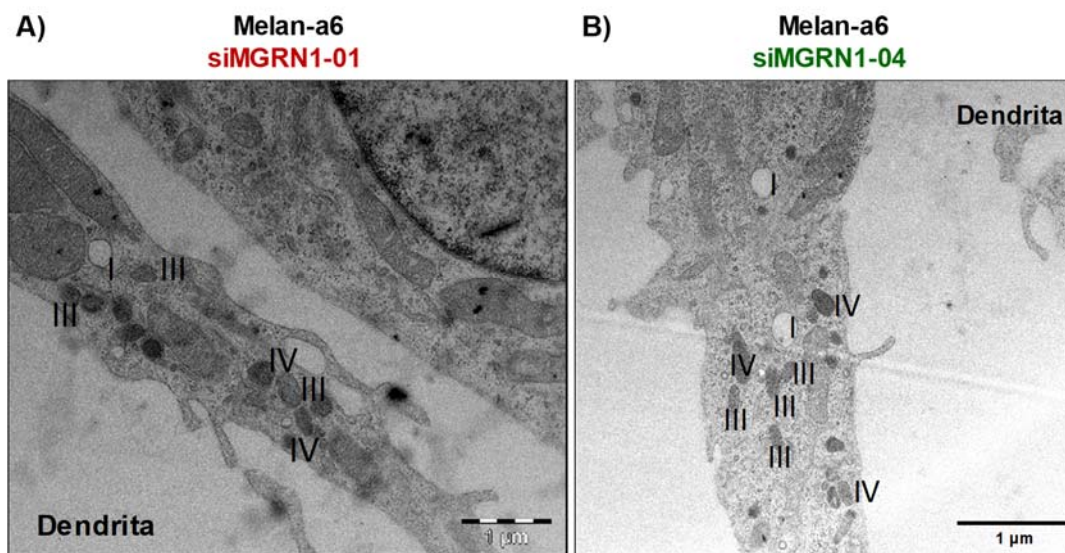


Figura 12. Prolongaciones dendríticas pertenecientes a células melan-a6 anulando *Mgrn1* con siRNA. A) Imagen de microscopía electrónica de una prolongación perteneciente a las células melan-a6 tratadas durante 72 h con siMGRN1-01 y B) siMGRN1-04. Estas dendritas se cargan de melanosomas de estadio IV, aunque también se observan otros estadios, como estadio III y, en menor cantidad, estadio I. Se indican los estadios con números romanos al lado de cada melanosoma. (Barra de escala: 1 µm).

Los experimentos descritos hasta el momento se realizaron en distintos modelos celulares murinos. Quisimos comprobar si los efectos de la falta de *MGRN1* en el sistema melanogénico se observan también en melanocitos humanos. Para ello utilizamos las células MNT-1. Comenzamos por analizar los niveles de expresión del gen *MGRN1* en células MNT-1. Para ello, procedimos a la extracción de mRNA total, la síntesis de cDNA y el análisis de PCR a tiempo real. Los resultados obtenidos se compararon con los correspondientes a células melan-a6 y melan-md1 y se muestran en la **figura 13**. Puede observarse que las células MNT-1 mostraron una fuerte expresión del gen, aproximadamente el doble de las células melan-a6, mientras que en las células melan-md1, empleadas como control negativo, los niveles de expresión fueron prácticamente indetectables. Por lo tanto, las células MNT-1 constituyen un buen modelo para el estudio del papel de *MGRN1* en experimentos en los que se reprima la expresión del gen, pero serán de poca utilidad en experimentos de sobreexpresión del mismo.

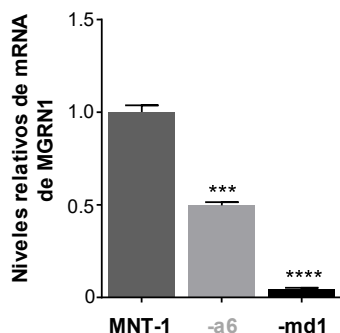


Figura 13. Expresión del gen *MGRN1* en células MNT-1, mediante qPCR y comparado con la expresión del mismo gen en células de ratón. Los resultados se expresan normalizados con respecto a los niveles de expresión en las células MNT1.

Así, decidimos realizar el análisis ultraestructural de las MNT-1 tras el silenciamiento de *MGRN1*. Primero realizamos un análisis mediante microscopía óptica (**figura 14A**) y observación de pellets (**figura 14B**). Observamos que las células estaban algo más pigmentadas tras la represión de la expresión del gen, verificada para 2 siRNA diferentes mediante qPCR (**figura 14C**), aunque estos cambios resultan poco evidentes, ya que el acúmulo de melaninas impide visualizar leves variaciones de coloración.

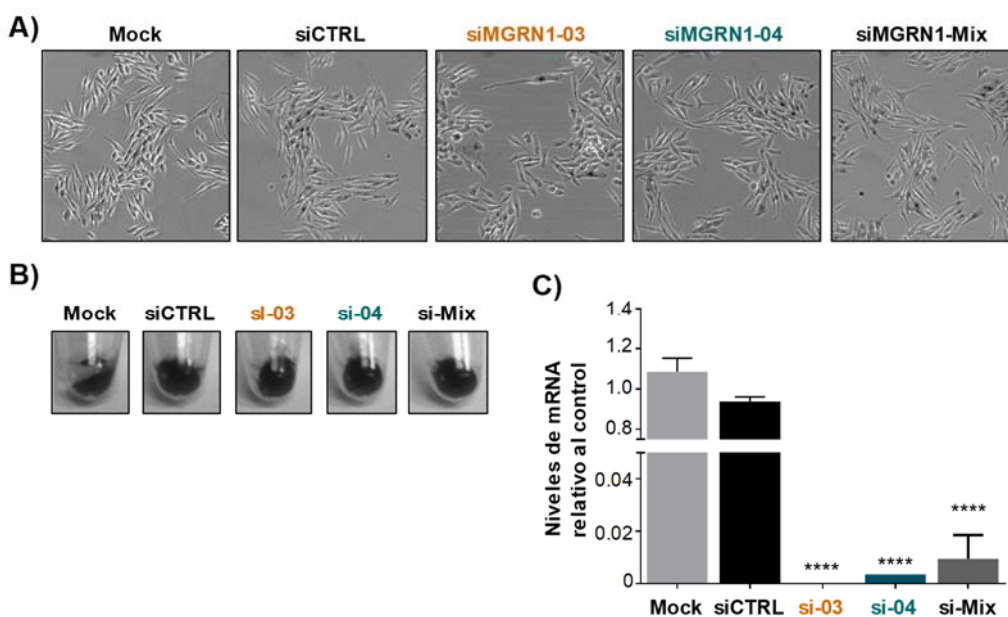


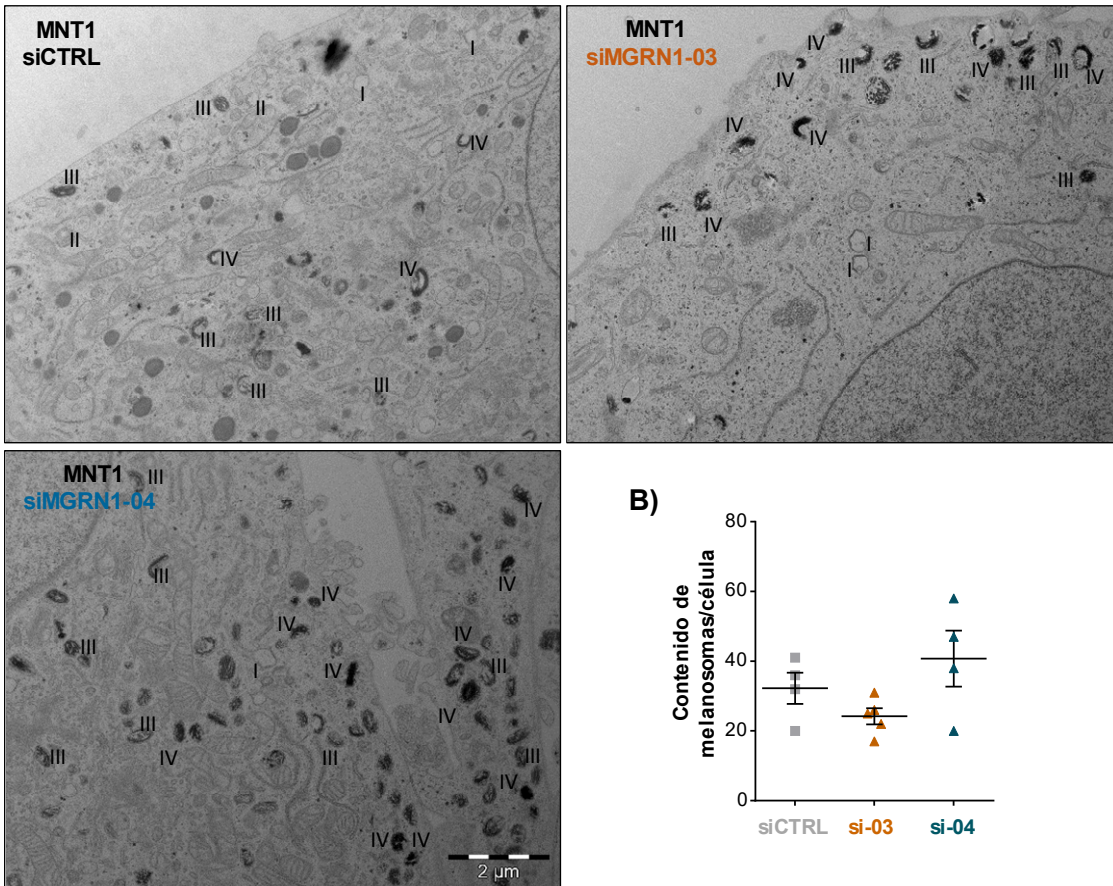
Figura 14. Análisis fenotípico y cantidad de melaninas en células humanas MNT-1 tras represión de la expresión del gen *MGRN1*. A) Imágenes de contraste de fases; B) pellet celulares y C) control del silenciamiento mediante qPCR de células MNT-1 usando diferentes siRNA frente *MGRN1*.

Cuando analizamos estas condiciones a nivel ultraestructural, observamos melanosomas más pigmentados (**figura 15A**) tras el silenciamiento con los distintos siRNA, cuya eficiencia fue elevada a juzgar por los bajos valores de los niveles residuales de mRNA de *MGRN1* (**figura 14C**). La cuantificación de los porcentajes de melanosomas en cada estadio (**figura 15C**) y del número de melanosomas por célula (**figura 15B**) resultó más complicada que en las líneas murinas, debido al menor tamaño de los melanosomas humanos y a la menor homogeneidad del contenido en pigmento de estos orgánulos, que mostraron en ocasiones un aspecto punteado. No obstante,

podimos observar un cambio en las proporciones relativas de melanosomas en los distintos estadios. En efecto, la represión de la expresión de *MGRN1* condujo a un incremento claro de melanosomas en estadio IV, en detrimento del estadio III, que fue el mayoritario en condiciones control. (**figura 15C**). Sin embargo, no se observó la aparición de prolongaciones dendríticas. En cuanto al número de melanosomas por célula, la **figura 15B** muestra que hay un leve incremento en la cantidad tras el tratamiento con siMGRN1-04, no tan evidente como en células melan-a6 silenciadas para el mismo gen.

En resumen, los resultados obtenidos en experimentos de silenciamiento de *MGRN1* en melanocitos MNT-1 sugieren que, en células humanas, *MGRN1* jugaría un papel similar al observado en melanocitos murinos, disminuyendo su grado de melanización. En condiciones de represión del gen *MGRN1*, la melanogénesis estaría aumentada, tal y como refleja el mayor contenido en melanosomas en estadio IV, fuertemente melanizados.

A)



C)

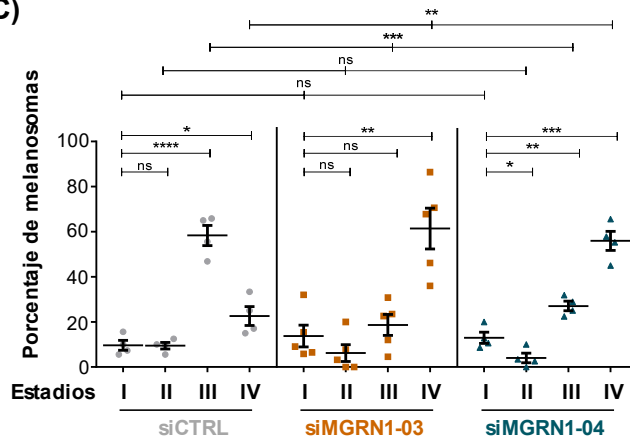


Figura 15. Estadios melanosomales en células humanas MNT-1 tras silenciamiento de la expresión de *MGRN1*. A) Imágenes de microscopía electrónica de células humana MNT1 tratadas con siCTRL, siMGRN1-03 y siMGRN1-04. Se indican los estadios melanosomales con número romano. (Barra de escala: 2 μm) B) Número de melanosomas por célula. C) Análisis de la distribución de los diferentes estadios melanosomales. Resultados de 3 experimentos diferentes.

2.2. Activación de MC1R por NDP-MSH en células melan-a6 y melan-md1.

Una de las interacciones funcionales conocidas de la proteína MGRN1 es la competición existente entre ésta y la proteína G α para unirse con el receptor MC1R¹⁷³. Esto provoca una disminución de la eficacia del acoplamiento de la unión de α -MSH al MC1R y a la vía del AMPc, responsable de la activación transcripcional de MITF, factor de transcripción que activa la expresión de las diferentes proteínas melanogénicas. La principal proteína enzimática en esta vía es la tirosinasa, enzima reguladora del flujo de la vía productora de melanina. Por ello, se ha postulado que MGRN1 regularía negativamente a TYR, y con ello la producción de pigmento, al interferir con la señalización por MC1R. En este sentido, consideramos interesante analizar si la pérdida de expresión de *Mgrn1* ocasionaba una mejor activación de los melanocitos por α -MSH. Con el propósito de observar si existen diferencias en la actividad del MC1R en función de la expresión de MGRN1, se analizaron los niveles de AMPc en células melan-a6 y melan-md1 estimuladas con un análogo estable de α -MSH, la NDP-MSH.

Previamente se secuenció el receptor MC1R para descartar posibles mutaciones que pudieran arrastrar las células. Para secuenciar el gen *MC1R*, el marco abierto de lectura completo se amplificó con cebadores específicos mediante una PCR convencional. Posteriormente se analizaron las muestras haciéndolas migrar en un gel de agarosa (**figura 16A**) para comprobar la correcta amplificación del producto interés y, finalmente, el producto de PCR se purificó mediante un kit comercial y se secuenció en el Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia. Se comprobó que las células expresan la secuencia silvestre del receptor (**figura 16B**), previamente establecida por nuestro grupo²⁰⁹. Las secuencias de *Mc1r* procedentes de los dos tipos celulares fueron idénticas, de forma coherente con el hecho de que los ratones control y *mahoganoïdes* presentan el mismo fondo genético.

Nótese que la intensidad de las bandas obtenidas tras amplificación del cDNA procedente de melan-a6 y melan-md1 (**figura 16A**) fue similar en ambas líneas celulares, lo que sugiere un nivel de expresión análogo del gen *Mc1r* en presencia y ausencia de MGRN1.

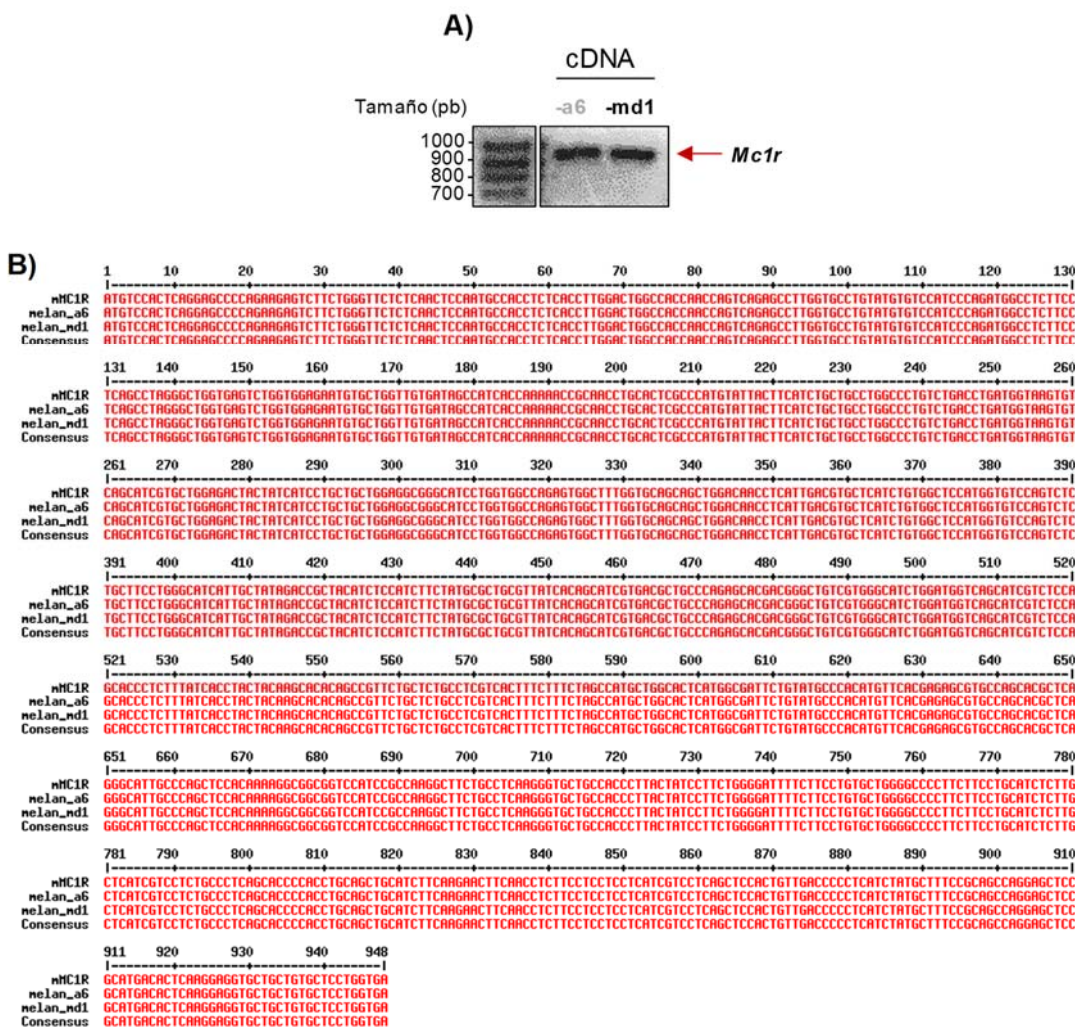


Figura 16. Naturaleza del *Mc1r* en células melan-a6 y melan-md1. A) Resultado de la amplificación del gen *Mc1r* por PCR semicuantitativa de las muestras de cDNA de las células de ratón. Tras la amplificación, la muestra se analizó por electroforesis en gel de agarosa con RedSafe. Bandas de MC1R a 948pb. B) Alineamiento de la secuencia canónica de *Mc1r* de ratón comparada con la secuencia del gen en las líneas estudiadas (alineamiento de la secuencia realizado por Multalin).

Una vez comprobado que las células melan-a6 y melan-md1 expresan la secuencia silvestre del receptor, comparamos los niveles de expresión en superficie de sitios de unión para NDP-MSH. Para ello se recurrió a un ensayo de unión de radioligando de acuerdo a procedimientos descritos anteriormente ^{137,211,212}. Tal y como se muestra en la **figura 17A**, las células melan-a6 y melan-md1 unieron específicamente cantidades comparables del radioligando [¹²⁵I]-NDP-MSH. Estos resultados concuerdan con la similar expresión del gen *Mc1r* sugerida por los experimentos de PCR. Por lo tanto, en caso de detectarse respuestas funcionales distintas a la hormona en ambos tipos celulares, las diferencias no podrían atribuirse ni a mutaciones en el *Mc1r* ni a diferentes niveles de expresión del receptor.

Comprobado este punto, pasamos a comparar los niveles de AMPc tanto en condiciones basales como tras la estimulación de MC1R con una concentración saturante de NDP-MSH o con

el activador directo de la AC, forskolina (FSK). Los datos de AMPc basales se obtuvieron manteniendo las células durante al menos 3 h en medio sin suero y por tanto en ausencia de factores de crecimiento y hormonas. A continuación, las células se estimularon 30 min con NDP-MSH (10^{-7} M) o con FSK (10^{-5} M). Los niveles de AMPc se cuantificaron mediante un kit de inmunoensayo comercial y los datos se normalizaron por cantidad de proteína. Se observó una activación correcta de la producción de AMPc en ambas líneas celulares por ambos tratamientos, algo mayor en las células mutantes melan-md1, si bien los niveles basales del segundo mensajero fueron comparables (**figura 17B**). La mayor activación de la vía del AMPc en células melan-md1 tratadas con NDP-MSH podría deberse, en principio, a la ausencia de *Mgrn1* en estas células, ya que previamente se había demostrado que MGRN1 inhibe la interacción de la proteína G α con el receptor ¹⁷³. No obstante, se observó un comportamiento muy parecido cuando la cascada de AMPc se estimuló directamente a nivel de AC por tratamientos con FSK. Por tanto, la mejor activación de la vía del AMPc en las células nulas para MGRN1 no se relacionaría con una mayor capacidad de acoplamiento del MC1R a la AC, sino con una mayor expresión de ésta o quizá con cambios en la expresión de algún elemento “aguas abajo” de la vía, como una fosfodiesterasa. En cualquier caso, los resultados anteriores no permiten excluir un efecto de *Mgrn1* sobre la desensibilización del receptor MC1R que pudieran contribuir a mejorar su respuesta funcional. Por ejemplo, podría ser que una menor velocidad de desensibilización condujera a una mayor acumulación de AMPc tras estimulación de MC1R con un agonista. Por ello decidimos comparar la velocidad de desensibilización de MC1R expuesto de forma continua al agonista, estimando los niveles de AMPc en células melan-a6 y -md1 a los 30, 60, 90 y 180 min del inicio de la estimulación con NDP-MSH. Puede apreciarse en la **figura 17C** que la velocidad de desensibilización fue incluso mayor en células melan-md1 en comparación con células melan-a6. Además, y de forma consistente con estos resultados, la tasa de internalización del complejo ligando-receptor fue también más alta en las células *mahoganoideas* (**figura 17D**).

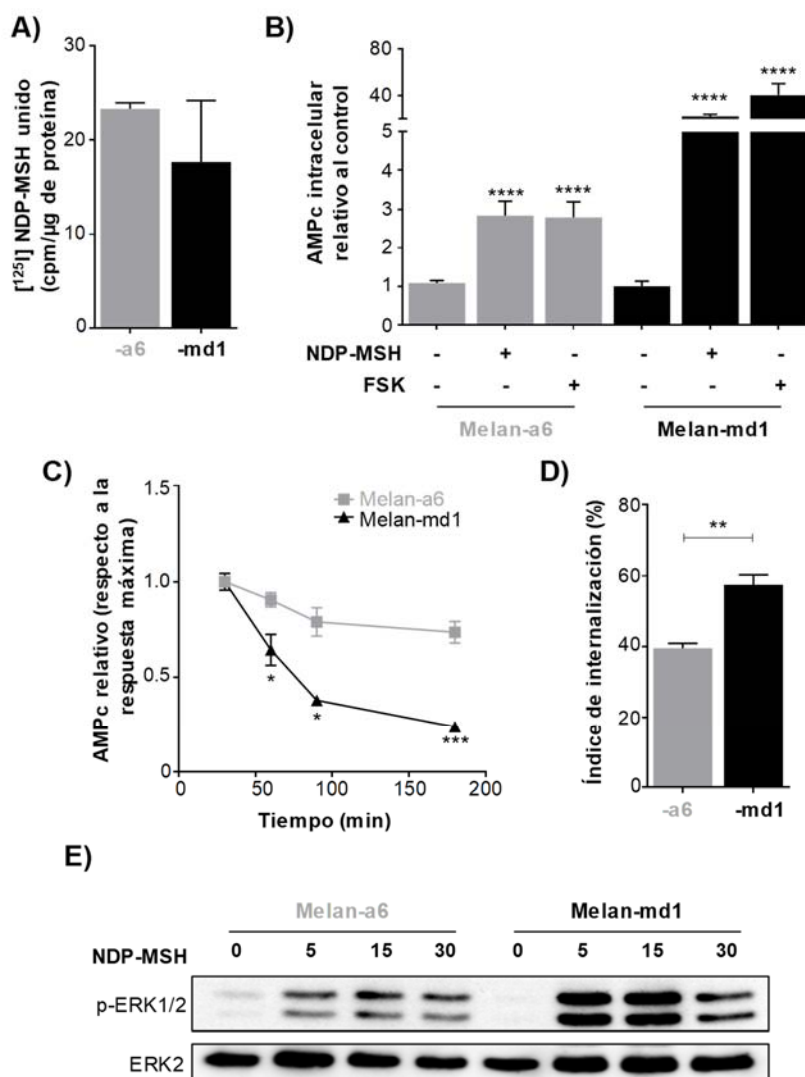


Figura 17. Acoplamiento funcional del MC1R a la ruta del AMPc en melan-a6 y melan-md1. A) Unión de radioligando a células melan-a6 y -md1. Los resultados corresponden a la media \pm SEM de 3 experimentos distintos. No se observaron diferencias significativas. B) Niveles de AMPc. Las células se estimularon 30 min con NDP-MSH 10^{-7} M o con FSK 10^{-5} M. Tras el tratamiento, las células se lisaron en medio ácido y la cantidad de AMPc se midió mediante un kit comercial. Experimento realizado 5 veces, con 3 repeticiones cada vez. C) Cinética de desensibilización de Mc1r en su acoplamiento a la cascada del AMPc. Las células se mantuvieron en presencia de NDP-MSH (10^{-7} M) y se determinó su contenido en AMPc a los tiempos indicados. D) Índice de internalización del Mc1r en melan-a6 y -md1. La unión externa del ligando se separó de la interna mediante lavados ácidos. E) Cinética de activación de ERK1/2 en respuesta a NDP-MSH. Resultados obtenidos mediante Western blot. Se realizaron 3 experimentos distintos con resultados comparables.

Las MAPK ERK1/2 son capaces de fosforilar MITF ²¹¹. Esta fosforilación aumenta la actividad transcripcional de MITF y, con ello, la transcripción de las proteínas melanogénicas y la activación de la melanogénesis. Para comprobar la activación de las ERK aguas debajo de MC1R se estimularon las células melan-a6 y melan-md1 con NDP-MSH a tiempos cortos (5, 15 y 30 min). Se recogieron los extractos celulares y se analizaron mediante Western blot (**figura 17E**). Observamos que la vía de ERK1/2 también se activa aguas abajo de MC1R, tanto en células melan-a6 como en melan-md1. En ambas líneas celulares, el tiempo máximo de estimulación es de 15 min.

En conjunto, estos datos sugieren que la funcionalidad del receptor MC1R es similar en células melan-a6 y melan-md1¹⁸⁹, si bien no puede descartarse una mayor velocidad de desensibilización en las células carentes de *Mgrn1*. No obstante, dichos datos no descartan que la mayor producción de AMPc en las células melan-md1 estimuladas por MCs pueda contribuir a su hiperpigmentación.

Procedimos también a la caracterización de la secuencia de *MC1R* y su acoplamiento funcional en las células humanas MNT-1. La secuenciación del gen *MC1R* se efectuó tras amplificación por PCR, tal y como ya se ha descrito para el gen *Mc1r* de ratón en células melan-a6 y melan-md1 (**figura 18A**). La secuencia obtenida se correspondió con la canónica. El siguiente paso fue comparar los niveles de AMPc tanto en condiciones basales como tras la estimulación de MC1R con una concentración saturante de NDP-MSH (10^{-7} M) o Forskolina (10^{-5} M). Se observó una activación de la producción de AMPc en las células MNT-1 por ambos tratamientos (**figura 18B**). Estos resultados validan las células MNT-1 como modelo para analizar respuestas a agonistas del MC1R.

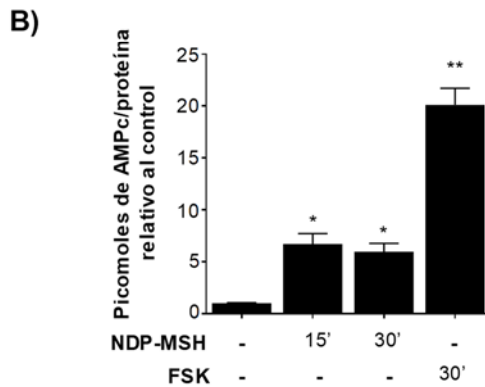
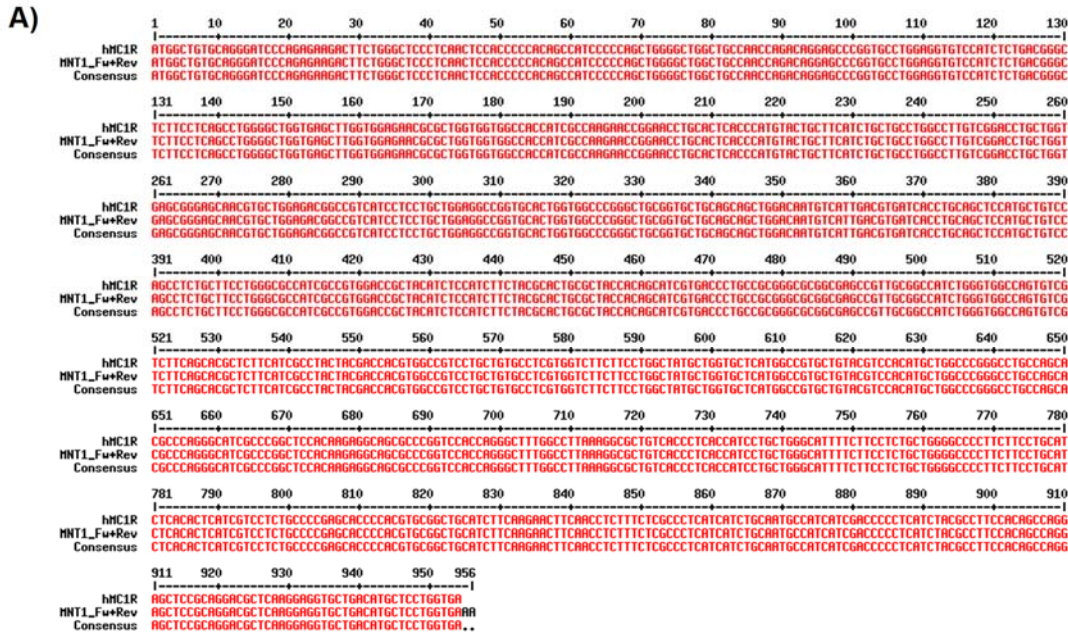


Figura 18. Secuencia del gen *MC1R* y acoplamiento a la cascada del AMPc en melanocitos humanos MNT-1. A) Alineamiento de la secuencia canónica de *MC1R* humano comparada con la secuencia de *MC1R* amplificado a partir de cDNA de la línea MNT-1 (alineamiento de la secuencia realizado por Multalin). B) Niveles de AMPc en las células MNT-1. Los niveles basales se determinaron en células mantenidas durante 3 h en ausencia de suero. Las células se estimularon durante 30 min con NDP-MSH 10^{-7} M o con FSK 10^{-5} M. Tras el tratamiento, las células se lisaron en medio ácido y la cantidad de AMPc se midió mediante un kit comercial. Experimento realizado 3 veces, con 3 repeticiones cada vez.

2.3. Efecto del medio condicionado por células carentes de *Mgrn1*.

A continuación, estudiamos la posible liberación al medio de cultivo de factores paracrinos producidos por células melan-md1 analizando su efecto sobre la morfología celular y el contenido en melaninas de células tratadas con medio condicionado. Se sembraron el mismo número de células melan-a6 y melan-md1 para obtener medio condicionado y tratar la otra línea celular. Se mantuvieron las células 72 h en cultivo y se recogió y centrifugó el medio. Cultivos de células

recién sembradas se trataron con este medio condicionado durante 24 h. Posteriormente se analizaron las muestras para cuantificación de melaninas.

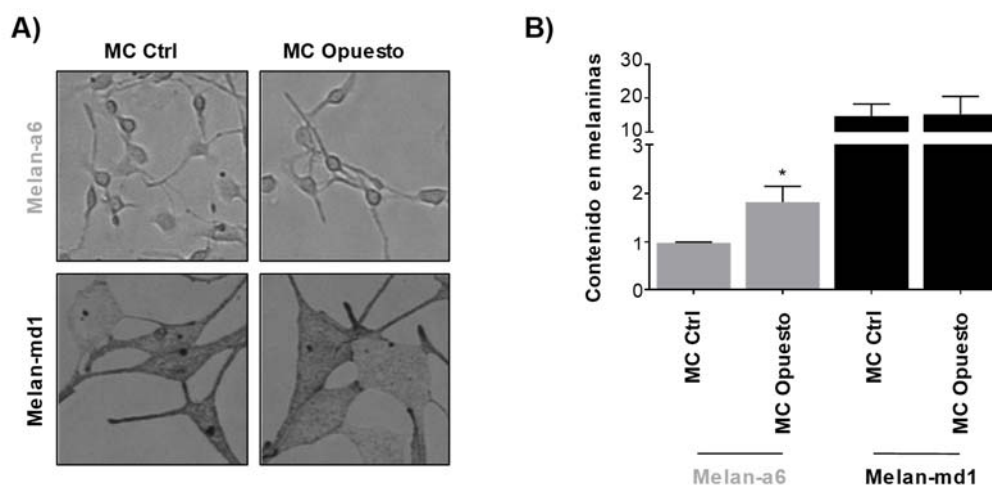


Figura 19. Efecto del medio condicionado sobre los melanocitos de ratón. A) Imágenes de contraste de fases de células tratadas durante 24 h con medio condicionado. B) Contenido en melaninas analizado mediante ensayos colorimétricos. Los resultados se normalizaron de acuerdo al contenido en proteínas y se refirieron al valor de células melan-a6 tratadas con medio procedente de cultivos de las mismas células, que se tomó como control (media \pm SEM de 3 experimentos independientes) (MC: Medio condicionado).

Puede observarse que las células melan-md1 mantuvieron su morfología (**figura 19A**) y su contenido en melaninas (**figura 19B**) cuando se incubaron con medio condicionado por células melan-a6. Aparentemente la morfología de las células control melan-a6 tratadas con medio condicionado por células melan-md1 fue algo más diferenciada, pero con un efecto muy leve. Además, las células melan-a6 mostraron un ligero aumento del contenido en melaninas cuando se trataron con medio condicionado por células melan-md1, sugiriendo que estas últimas producen factores paracrinos que estimulan la melanogénesis, sea vía MC1R, o por otros mecanismos que no hemos caracterizado por el momento. No obstante, este efecto fue limitado y no parece suficiente para explicar en su totalidad el fenotipo hiperpigmentado de las células melan-md1.

2.4. Efecto de Mgrn1 en la actividad de la enzima tirosinasa.

Los resultados expuestos hasta aquí muestran que:

- Las células melan-md1 están más pigmentadas que las células melan-a6, lo que indica que la hiperpigmentación del ratón *mahoganoide* procede de una mayor actividad de los propios melanocitos y parece independiente de otros tipos celulares presentes en la epidermis del ratón, como los queratinocitos.
- Esta hiperpigmentación podría tener un componente de estimulación autocrina y/o de mayor capacidad de activar la cascada del AMPc, que sería limitado y no explica en su totalidad el fenotipo celular.

- c) La hiperpigmentación de las células melan-md1 correlaciona con un mayor contenido de melanosomas fuertemente melanizados.
- d) En células de melanoma humano, la represión de la expresión de MGRN1 también aumenta el contenido en melanosomas maduros.

Sin embargo, estos resultados no indican cuáles son los cambios que se producen dentro del melanosoma de las células carentes de MGRN1 que causan el mayor acúmulo de melaninas. Por ello, los experimentos que se describen a continuación tuvieron como finalidad identificar la naturaleza molecular de estos cambios.

Como ya se ha comentado, los mamíferos presentan más de 100 genes implicados en la pigmentación, que codifican para proteínas relacionadas con la supervivencia y proliferación del melanoblasto-melanocito, la biogénesis y el transporte de melanosomas, así como proteínas enzimáticas y de señalización y regulación de la melanogénesis. De todos los genes que codifican para enzimas melanogénicas, el más importante es el asociado al *locus c* o *locus albino*, que codifica para la enzima tirosinasa, limitante del flujo a través de la vía melanogénica^{88,212-215}. Existen al menos otras dos enzimas implicadas llamadas “proteínas relacionadas con la tirosinasa” (*Tyrosine Related Proteins*), TYRP1 y TYRP2²¹⁶⁻²¹⁸, esta última también conocida como DCT, por poseer actividad DOPAcromo tautomerasa.

Tirosinasa es una cuproproteína que presenta dos actividades distintas: actividad monooxigenasa o tirosina hidroxilasa, consistente en la hidroxilación de tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), usando el propio L-DOPA como cofactor, y actividad DOPA oxidasa, donde la L-DOPA se oxida, dando lugar a DOPAquinona⁸⁸.

Con el fin de comparar la actividad de la enzima en las células melan-a6 y melan-md1, se procedió, en un primer momento, a medir *in vitro* las actividades DOPA oxidasa y tirosina hidroxilasa, utilizando extractos celulares solubilizados. Además, se analizó la expresión de tirosinasa y las Tyrp mediante Western blot. Interesó también comparar el procesamiento de esta enzima en ambas líneas celulares.

2.4.1. Actividad DOPA oxidasa y tirosina hidroxilasa en extractos de células melan-a6 y melan-md1.

La actividad DOPA oxidasa se determinó siguiendo la conversión de L-DOPA en DOPAquinona, que forma un aducto estable de color rosa oscuro con MBTH. Este aducto absorbe en el espectro visible a 490 nm, con lo que su formación puede seguirse espectrofotométricamente.

Tal y como muestra la **figura 20**, se observó una actividad DOPA oxidasa similar en los extractos de células melan-md1 y melan-a6. La determinación de las constantes cinéticas

aparentes en los extractos de células melan-a6 y melan-md1 se realizó midiendo la velocidad de la reacción a diferentes concentraciones del sustrato L-DOPA (**figura 20A y B**). Puede observarse que no existieron diferencias significativas en los valores de K_M aparente o de la V_{max} obtenidos para extractos de células melan-a6 o melan-md1. Si acaso, se apreció una tendencia al alza de la V_{max} en las células *mahoganoideas*, que no alcanzó significación estadística.

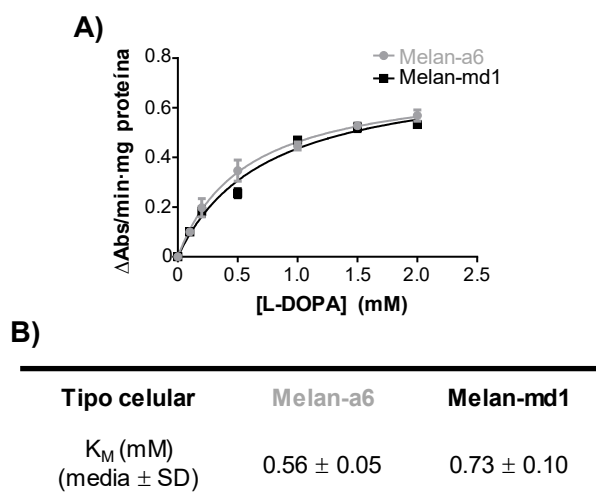


Figura 20. Actividad DOPA oxidasa en extractos celulares crudos. A) Representación de Michaelis-Menten, obtenida variando la concentración de sustrato en un rango de 0.1 a 2 mM. B) Valor de la constante de Michaelis, calculado por regresión no lineal de los datos representados en el panel A. Las diferencias observadas no fueron significativas.

En el caso de la actividad tirosina hidroxilasa, incubamos tirosina marcada radiactivamente con tritio (^3H) con los extractos celulares, en presencia de L-DOPA a una concentración final de 10 μM , necesario como cofactor. El ^3H liberado del sustrato en la reacción de hidroxilación en forma de agua tritiada se cuantifica en un contador β . Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 21**, que indica que no hubo diferencias significativas en dicha actividad, en línea con los resultados obtenidos en la determinación de la actividad DOPA oxidasa.

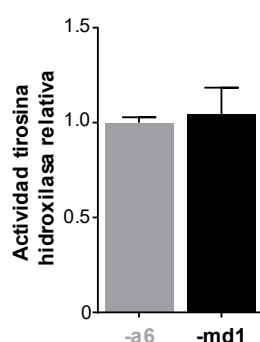


Figura 21. Actividad tirosina hidroxilasa en extractos crudos de melan-a6 y melan-md1. La actividad enzimática se determinó mediante el ensayo radimétrico de Pomerantz, modificado por Jara y colaboradores ²¹⁹. Los valores obtenidos se normalizaron respecto al contenido en proteína de los extractos y se refirieron a las de las células melan-a6. Los resultados mostrados corresponden a 3 ensayos con diferentes extractos celulares, cada uno realizado por triplicado.

2.4.2. Expresión de proteínas melanogénicas en células melan-a6 y melan-md1.

Procedimos a continuación a comparar los niveles de expresión de tirosinasa en las células melan-a6 y melan-md1, mediante ensayos de Western blot, y los niveles de expresión relativa de mRNA, mediante ensayos de qPCR. En estos experimentos se incluyeron otras proteínas melanogénicas como Pmel17. Pmel17 forma fibrillas amiloides que actúan como superficie para las enzimas requeridas en la melanogénesis y para la deposición de los pigmentos en los melanosomas y es, por lo tanto, necesaria para la biogénesis de los melanosomas²²⁰. También analizamos las otras dos enzimas melanogénicas, Tyrp1 y Tyrp2. Para ello utilizamos anticuerpos específicos de cada proteína, cedidos por el profesor V. J. Hearing (NIH, Bethesda), en el caso de Western blot, y cebadores específicos para cada gen, diseñados por nosotros.

Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 22**. Puede observarse una expresión similar de tirosinasa, consistente con los datos del ensayo de actividad tirosina hidroxilasa. Los niveles de expresión de Pmel17 también fueron similares en células melan-a6 y melan-md1. Por otra parte, se observaron niveles algo más altos de Tyrp1 en los extractos de células melan-md1, que podría explicar la V_{max} de la actividad DOPA oxidasa ligeramente superior en este tipo celular. Por último, se observaron niveles inferiores de expresión de Tyrp2 (**figura 22A**).

En cuanto a la expresión relativa de mRNA, la expresión de los genes *Tyr* y *Tyrp1* concuerda bastante bien con los resultados obtenidos de expresión proteica. No obstante, la expresión relativa de mRNA de *Pmel17* aumenta en melan-md1 con respecto al perfil proteico. Esto podría explicarse por una escasa eficiencia de solubilización de la proteína a partir de los melanosomas más melanizados, mayoritarios en melan-md1, o por una pérdida del epítipo reconocido por el anticuerpo utilizado durante la maduración del melanosoma.

Observamos también una mayor expresión del factor de transcripción responsable de la expresión de proteínas melanogénicas, *Mitf*, en células melan-md1 con respecto a melan-a6 (**figura 22B**). La mayor expresión de *Mitf* podría explicar la ligera inducción de la expresión de los genes *Tyr*, *Tyrp1* y *Pmel17*.

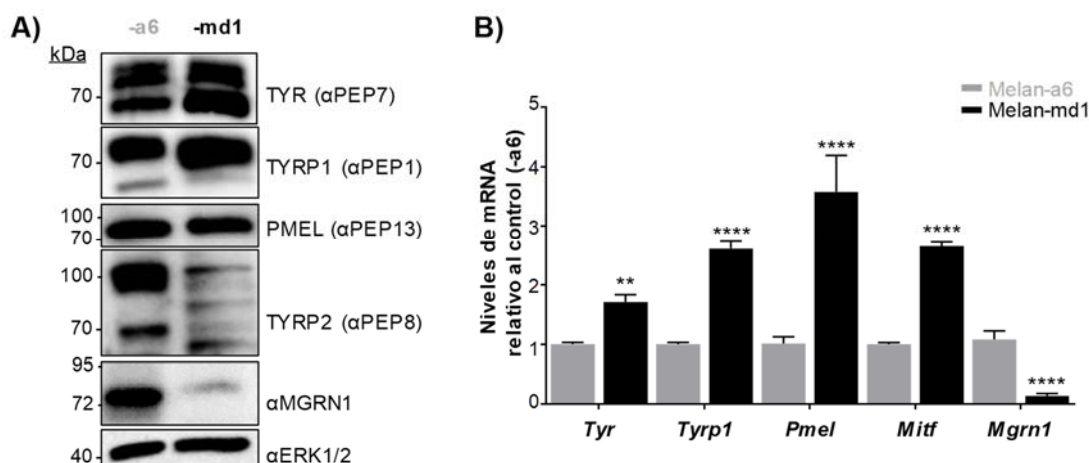


Figura 22. Expresión de las diferentes proteínas melanogénicas y niveles de mRNA. A) Análisis por Western blot de los niveles y perfil electroforético de proteínas melanogénicas en células melan-a6 y melan-md1. Los extractos celulares se resolvieron por SDS-PAGE y el gel se transfirió a una membrana que se hibridó con los anticuerpos indicados. Como control de carga se usó un anticuerpo α-ERK1/2. Se cargaron aproximadamente 30 µg de proteína por calle. La figura muestra un Western blot representativo de 3 ensayos diferentes. B) Datos de qPCR de la expresión de genes que codifican proteínas melanogénicas en melan-a6 y melan-md1. Se realizaron 3 ensayos independientes, con triplicados cada uno de ellos. Tanto en A) como en B) se añade el control de *Mgrn1* y *Mgrn1*, respectivamente.

2.4.3. Estudio del procesamiento de tirosinasa en células melan-a6 y melan-md1.

El perfil electroforético de tirosinasa mostrado en la **figura 22** presenta al menos dos bandas, una de masa molecular aparente superior a 70kDa, y otra de menor tamaño. Estas bandas podrían corresponder a la forma madura y glicosilada de la enzima, y a la forma “de novo”, respectivamente ²²¹.

Las enzimas melanogénicas son glicoproteínas transmembrana que sufren un procesamiento post-traduccional complejo antes de llegar a su destino, la membrana del melanosoma. Durante la traducción, la cadena polipeptídica en formación se trasloca al RE, donde se producen tanto modificaciones co- como post-traduccionales, que incluyen N-glicosilaciones. Seguidamente, la proteína correctamente glicosilada y plegada se transporta al AG, donde los N-oligosacáridos sufren modificaciones adicionales ¹²⁸. Por el contrario, las proteínas que no están bien plegadas son retenidas gracias a la maquinaria de control de calidad propia del RE, y en algunos casos conducidas al citosol y degradadas en el proteasoma.

La similitud de los patrones electroforéticos de tirosinasa en células melan-a6 y melan-md1 sugieren un procesamiento análogo de las proteínas en ambos tipos celulares. Para comprobar este aspecto, analizamos el patrón de glicosilación de tirosinasa mediante digestión con endoglicosidasas. Las glicoproteínas inmaduras anormalmente plegadas que no progresan del RE al AG son sensibles a la digestión con endoglicosidasa H (Endo H), mientras que las enzimas correctamente plegadas adquieren resistencia a dicha glicosidasa. Por otro lado, la digestión con N-glicosidasa F (PGNasa F) permite comprobar el tamaño de la cadena polipeptídica, ya que

hidroliza todos los glicanos presentes, independientemente de su grado de maduración y del plegamiento de la proteína ²²¹.

Como se observa en la **figura 23**, no hay diferencias reseñables entre la resistencia de tirosinasa a Endo H en melanocitos normales y *mahoganoides*. En ambos casos tirosinasa aparece como parcialmente resistente a la digestión con Endo H, lo que indicaría una correcta glicosilación y plegamiento. En cuanto a Tyrp1, también fue procesada de forma correcta y resultó mayoritariamente resistente a Endo H en ambos tipos celulares. Parece, por tanto, que la ausencia de Mgrn1 en células melan-md1 no altera sustancialmente el procesamiento por glicosilación de las enzimas melanogénicas. Este resultado es consistente con los niveles similares de actividad en extractos solubilizados y el perfil electroforético anteriormente descritos.

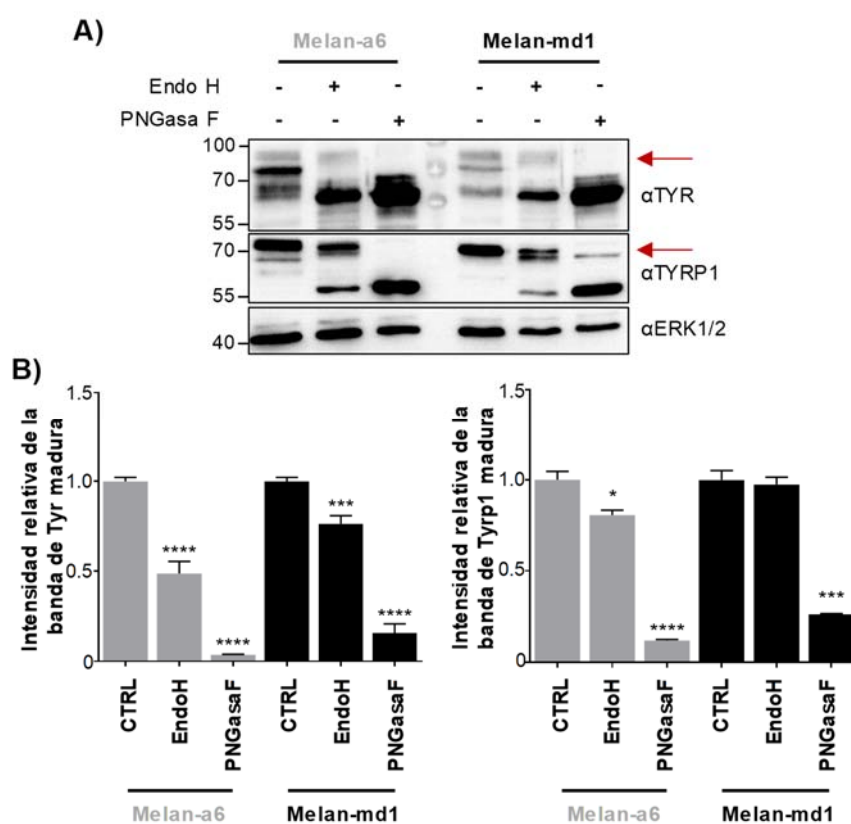


Figura 23. Análisis del patrón de glicosilación de tirosinasa en las células melan-a6 y melan-md1. A) Western blot con αTYR y αTYRP1 de extractos de melanocitos de ratón melan-a6 y melan-md1, tratados con Endo H o PNGasa F. Como control de carga se usó un anticuerpo αERK1/2. El Western blot mostrado es representativo de 3 ensayos independientes con diferentes extractos celulares. B) Cuantificación de las bandas de tirosinasa (izquierda) y de Tyrp1 (derecha) maduras (flechas) en ambas líneas celulares, tanto en extractos control como en extractos tratados con las endoglicosidasas.

2.4.4. Actividad tirosina hidroxilasa en células vivas con diferente expresión de *Mgrn1*.

Los resultados expuestos hasta el momento demuestran que las células melan-md1, carentes de *Mgrn1*, presentan un contenido de melaninas muy superior a los melanocitos control melan-a6. Sin embargo, los niveles de tirosinasa y el procesamiento de la enzima son parecidos en ambos tipos celulares y la actividad tirosina hidroxilasa en extractos solubilizados de melanocitos melan-md1 y melan-a6 es también comparable. Estos resultados, aparentemente discrepantes, se explicarían si la actividad específica de la enzima fuera mayor en su entorno natural, es decir, en el melanosoma de las células melan-md1. En este escenario, la ausencia de *Mgrn1* podría alterar alguna característica del medio melanosomal que determina una mayor actividad específica de tirosinasa en las células melan-md1. De acuerdo con esta hipótesis, se ha descrito que la actividad tirosinasa, pero no la cantidad de enzima, es superior en los melanocitos de individuos de raza negra en comparación con individuos de raza caucásica ²²².

Para verificar esta posibilidad, procedimos a medir la actividad tirosina hidroxilasa de tirosinasa en células intactas, mediante una modificación de los ensayos radiométricos previamente descritos. En este caso, la tirosina tritiada se añade al medio de cultivo, las células se mantienen en condiciones óptimas de cultivo durante 12 h y la actividad tirosina hidroxilasa se estima a partir de la liberación de agua tritiada al medio de cultivo. Los ensayos se realizaron en melanocitos melan-a6 y -md1 y en las líneas creadas en nuestro laboratorio, en las que el gen *Mgrn1* se anuló mediante tecnología CRISPR-Cas9 en células melan-a6 y B16F10. También incluimos en este estudio células con expresión reprimida de *Mgrn1* mediante siRNA, tanto melan-a6 como MNT-1. Observamos que la actividad tirosina hidroxilasa de las células -md1 fue unas 20 veces mayor que la actividad de las células control (**figura 24A**), presentando las MNT-1 una actividad específica intermedia. Cuando realizamos el análisis en células melan-a6 con expresión reducida de *Mgrn1* mediante siRNA, observamos que la actividad aumentó, tanto para los siRNA separados como para las mezclas correspondientes (siMix) (**figura 24B**). En el caso de los clones creados mediante tecnología CRISPR-Cas9, tanto en los derivados de células melan-a6 (**figura 24C**) como en clones derivados de células de melanoma B16F10 (**figura 24D**), salvo en el clon 6C3, se apreció un aumento en la actividad tirosina hidroxilasa. Debe recordarse que el clon 6C3 mantiene la expresión de *Mgrn1*, por lo que debe considerarse como control normal. Por último, en las células MNT-1 en las que la expresión de *MGRN1* se reprimió por tratamientos con siRNA (**figura 24E**), también se apreció un aumento en la actividad, comparable al observado en las células murinas tras la represión de *Mgrn1*.

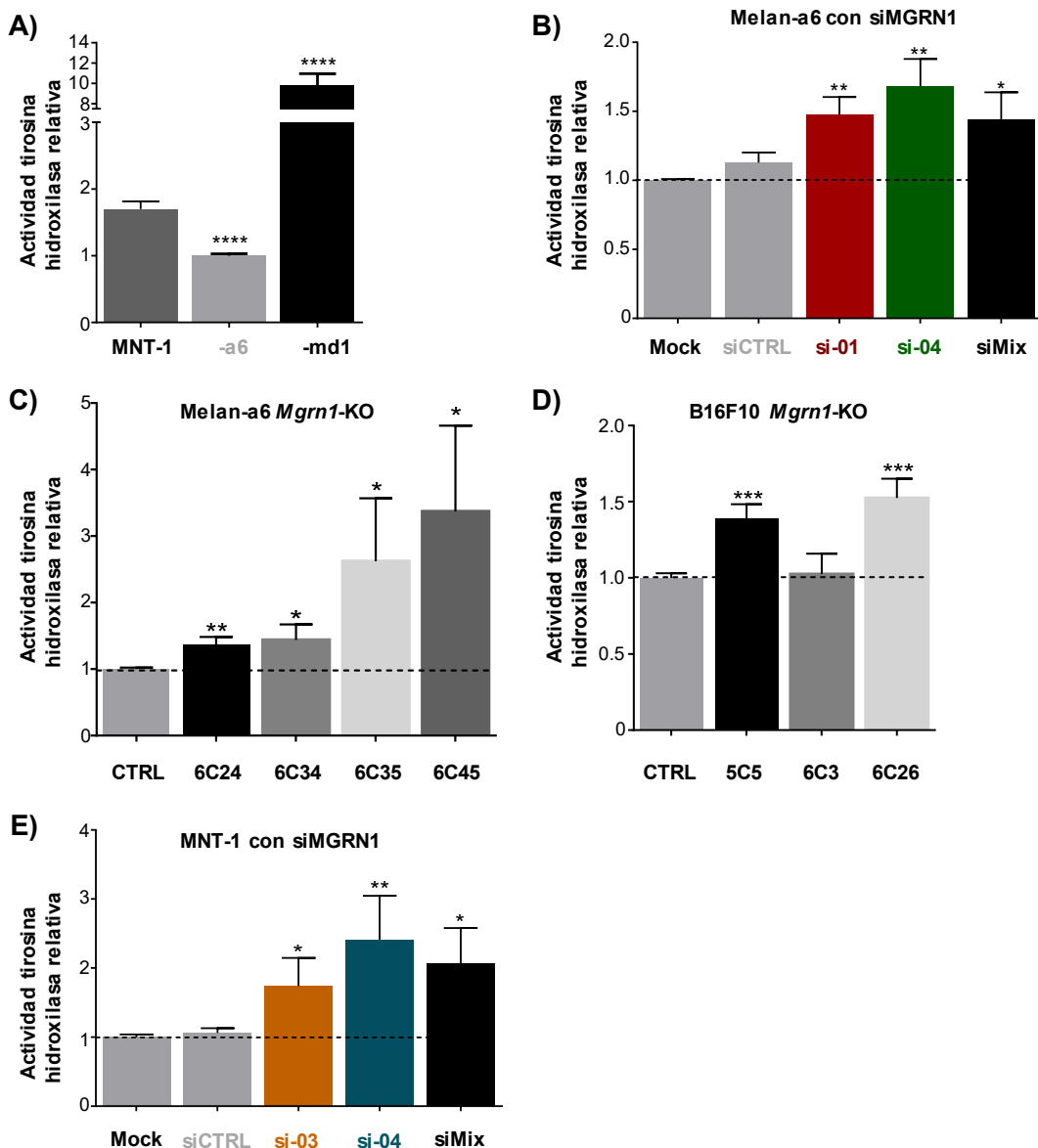


Figura 24. Análisis de la actividad tirosina hidroxilasa *in vivo* tras represión de la expresión de *Mgrn1*. Los datos representados se refieren a células control (A), células melan-a6 con expresión de *Mgrn1* disminuida por tratamientos con siRNA (B) o anulada mediante CRISPR-Cas9 (C), células de melanoma B16F10 con expresión de *Mgrn1* anulada mediante CRISPR-Cas9 (D) o células MNT-1 con expresión de *MGRN1* reprimida (E). En todos los casos la actividad tirosina hidroxilasa se normalizó por proteína y se refiere al control correspondiente. Los resultados corresponden al menoa a 3 ensayos independientes, cada uno de ellos con medidas realizadas por duplicado.

Estos resultados demuestran que en ausencia de MGRN1 el medio melanosomal se ve alterado, de manera que favorece la actividad tirosina hidroxilasa, por lo que ésta es mayor para niveles comparables de la enzima. No obstante, la disminución de MGRN1 no conlleva un aumento de la actividad específica del enzima tan espectacular como el observado al comparar las células melan-a6 con las células melan-md1. Ello sugiere que, en estas células, a la carencia de MGRN1 se suma un efecto de deriva fenotípica, probablemente asociado a la adquisición de un fenotipo senescente y muy diferenciado. Quedaría por ver si esta deriva se ve a su vez favorecida por la

ausencia de MGRN1. Este aspecto podrá aclararse en el futuro próximo, a medida que vayamos observando la evolución de los clones obtenidos por CRISPR-Cas9, mantenidos en cultivo.

En cualquier caso, para explicar la mayor actividad específica de tirosinasa en su entorno fisiológico, es decir, en células *mahoganoides* vivas, contemplamos varias posibilidades:

- a. La falta de expresión de MGRN1 podría determinar una mayor eficiencia del transporte de tirosina al interior del melanosoma. En estas condiciones, las células melan-md1 presentarían una mayor concentración de sustrato en el entorno de la enzima, aumentando de esta manera la velocidad de la reacción *in vivo*.
- b. Puesto que se ha demostrado que una parte de la tirosinasa presente en melanocitos de ratón se encuentra en forma apoenzimática, carente del cofactor Cu^{+2} y enzimáticamente inactiva ²²³, podría postularse que la carencia de MGRN1 favorece la formación de la holoenzima activa, quizá al aumentar la disponibilidad de Cu^{+2} .
- c. La ausencia de MGRN1 podría alterar alguna característica físico-química del medio melanosomal que promoviera una activación de la enzima. En este sentido, se ha demostrado que el pH intramelanosomal es mayor en melanocitos procedentes de piel negra en comparación con piel caucásica ²²², y aumenta tras el tratamiento con α -MSH ²²⁴.

A continuación, analizaremos cada una de estas posibilidades.

2.5. Captación de tirosina por los melanocitos en células melan-a6 y -md1.

Para analizar la eficacia del transporte de tirosina en células control o carentes de *Mgrn1*, se realizaron ensayos radiométricos de captación de tirosina tritiada en presencia de un inhibidor de tirosinasa, la feniltiourea (PTU). La inhibición de tirosinasa limita la eliminación de un átomo de tritio de la tirosina marcada, lo que permitiría, en primera aproximación, utilizar la radiactividad asociada a las células como medida de la eficacia de la captación del aminoácido.

En estos ensayos se introduce en el medio de cultivo la tirosina marcada radiactivamente con tritio. Las células se mantienen en cultivo 12 h, tanto en condiciones control como en presencia de PTU a una concentración final de 1 mM. Ésta actúa mediante la unión a los iones cobre en el sitio activo de la enzima, bloqueando su actividad ^{225,226}. Tras este período de incubación, se procede a retirar el sobrenadante, hacer lavados para eliminar la unión inespecífica del sustrato a la superficie celular, y recoger el pellet celular para medir la radiactividad asociada, mediante un contador β . El sobrenadante nos indicará la actividad tirosina hidroxilasa residual de la enzima y el pellet celular nos indicará la cantidad de tirosina marcada introducida en la célula.

Como se observa en la **figura 25**, en las condiciones del ensayo, la inhibición de la actividad tirosinasa medida a través de la liberación de agua tritiada fue intensa con actividades residuales del orden de 35% para células melan-a6 y muy inferiores para células melan-md1

(figura 25A). En estas condiciones, la radiactividad asociada a las células puede considerarse, en primera aproximación, una medida de la captación de tirosina. Esta resultó ser menor en células melan-md1 que en melan-a6, existiendo diferencias significativas entre los dos tipos celulares, tanto en presencia como en ausencia de PTU (figura 25B). Por lo tanto, aunque estos resultados no constituyen un análisis riguroso de la capacidad de transporte de tirosina de estas células, sí que permiten excluir este fenómeno como causante de la mayor actividad melanogénica de las células melan-md1.

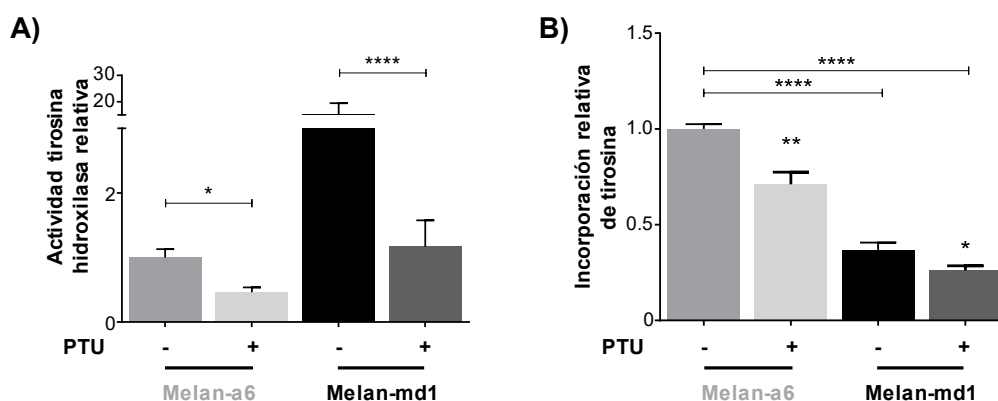


Figura 25. Análisis del transporte de tirosina en células melan-a6 y melan-md1. A) Actividad tirosina hidroxilasa en las células de ratón melan-a6 y melan-md1 tratadas con PTU. Se han realizado 3 ensayos independientes por duplicado cada caso. Los datos están normalizados por proteína y referidos a la actividad en células melan-a6 sin tratar, que se tomaron como control B) Captación relativa de sustrato por células *in vivo*. Medida del sustrato tritiado dentro de las células, normalizadas como en el caso de la actividad enzimática.

2.6. Efecto de Cu^{+2} sobre la actividad DOPA oxidasa de extractos de melanocitos melan-a6 y melan-md1.

Una de las características estructurales de TYR y de TYRP1 es que son metaloproteínas con centros activos muy conservados, con cobre como cofactor⁸⁸. Quisimos comprobar si la actividad *in vitro* de la enzima mejoraba tras adicionarle el cofactor, lo que podría indicar la existencia de distintas proporciones de una forma proenzimática en las células melan-a6 y melan-md1. Este ensayo no puede realizarse espectrofotométricamente por adición de Cu^{+2} al medio de reacción, ya que el ion metálico oxida al sustrato L-DOPA, provocando una fuerte interferencia. Además, la unión al centro activo de una forma apoenzimática de tirosinasa podría requerir un cierto tiempo de incubación. Por ello empleamos una estrategia alternativa.

Se le añadió a cada extracto celular una concentración final de 100 μM de Cu^{+2} o Zn^{+2} como control negativo, y se incubaron los extractos durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de acrilamida en condiciones no reductoras compatibles con una tinción de actividad DOPA oxidasa²²⁷. Una vez finalizada la electroforesis, se incubó el gel a 37°C durante 30 min en presencia del sustrato y de MBTH, y se observó la banda resultante de esta tinción de actividad (figura 26).

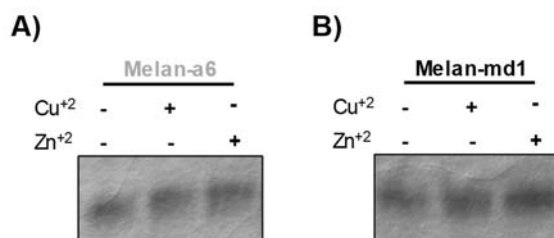


Figura 26. Tinción de actividad enzimática tirosinasa en geles de pliacrilamida correspondientes a extractos de células melan-a6 y melan-md1 incubados con iones metálicos. Extractos de células melan-a6 (A) o melan-md1 (B) se incubaron con los iones metálicos indicados durante 1 h. Cantidades iguales de proteína se separaron por electroforesis no reductora y la banda de tirosinasa se detectó por tinción de actividad.

No se detectaron diferencias significativas en la actividad de la enzima en ninguna de las condiciones ensayadas. Ello parece descartar que las células melan-a6 contengan una mayor cantidad de una forma proenzimática inactiva de tirosinasa.

2.7. Efecto de la manipulación del pH en la actividad melanogénica de células melan-a6 y melan-md1.

Puesto que los experimentos anteriores sugieren que ni el transporte de tirosina, ni el procesamiento por glicosilación ni la captación del cofactor Cu⁺² por tirosinasa son distintos en células melan-a6 y melan-md1, procedimos a realizar una serie de experimentos para analizar un posible efecto del pH del medio melanosomal, ya que éste se ha postulado como un punto de control importante de la actividad melanogénica en los melanocitos ^{222,224}.

En primer lugar, comprobamos que la actividad tirosina hidroxilasa es, efectivamente, muy dependiente del pH. Para ello, extractos celulares se ajustaron a diferentes pH mediante adición de HCl 0'05 M, hasta conseguir valores de pH comprendidos entre 5 y 6.8, midiendo su actividad mediante ensayo radiométrico *in vitro* (**figura 27**). Puede observarse que la actividad de la enzima tirosinasa aumentó alrededor de 6 veces cuando el pH del medio pasó de 5 a 6.8 en el caso de los extractos de células control melan-a6. Los extractos de células melan-md1 mostraron un comportamiento similar. Esto demuestra una fuerte dependencia de la actividad tirosina hidroxilasa con respecto al pH del medio en el que transcurre la reacción.

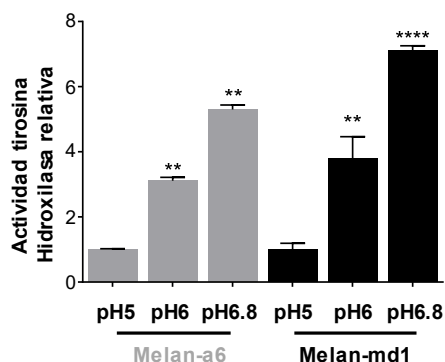


Figura 27. Efecto del pH en la actividad tirosina hidroxilasa de extractos de células melan-a6 y melan-md1. Las medidas de actividad tirosina hidroxilasa se realizaron al pH final indicado. Los datos se normalizaron por proteína y se refirieron al valor obtenido a pH 5. Experimentos realizados por triplicado, con extractos independientes.

A continuación, pasamos a tratar células melan-a6 y melan-md1 en cultivo con un agente lisosomotrópico, el cloruro amónico (NH₄Cl), que aumenta el pH de los orgánulos intracelulares, incluyendo los orgánulos ácidos del linaje lisosomal como los melanosomas²²⁸⁻²³⁰. Tras un periodo de 48 h en cultivo en presencia de una concentración 10 mM de este agente, se analizaron la morfología, el contenido en melaninas y la actividad tirosina hidroxilasa *in situ* de las células (**figura 28**). Puede observarse que, tras el tratamiento, las células melan-a6 adquieren un aspecto más pigmentado y diferenciado al microscopio óptico (**figura 28A**). El aumento de pigmentación se confirmó plenamente al comparar la coloración de los pellets celulares (**figura 28B**) y, de acuerdo con ello, la cantidad de melanina en estas células aumentó significativamente tras la basificación de los orgánulos ácidos con NH₄Cl (**figura 28C**). En contraposición, los niveles de pigmentación no se modificaron significativamente en células melan-md1. En cuanto a la actividad tirosinasa, se apreciaron cambios muy leves cuando se determinó *in vitro* utilizando extractos solubilizados (**figura 28D**), en ambos tipos celulares. Sin embargo, cuando la medida se realizó *in situ* utilizando células vivas se observó una fuerte activación en melan-a6 (**figura 28E**), mientras que la respuesta de las células melan-md1 al tratamiento con NH₄Cl fue en el mismo sentido, pero mucho más moderada. De hecho, de acuerdo con los pequeños cambios en la cantidad de melanina, la actividad tirosina hidroxilasa de células melan-md1 permaneció prácticamente constante tras la incubación con el agente basificante.

En conclusión, los datos expuestos hasta el momento muestran que la mayor actividad melanogénica de las células melan-md1 carentes de *Mgrn1*, en relación con las células control melan-a6, no se debe a una mayor expresión de la enzima, sino a una mayor actividad específica de ésta en su entorno fisiológico. Esta mayor eficacia catalítica sólo se observó en ensayos *in vivo* y fue indetectable en extractos solubilizados. Además, no se correlacionó con una mayor acumulación del sustrato tirosina en los melanocitos, ni con una captación diferencial del cofactor metálico en los dos tipos celulares. Por último, la activación de tirosinasa en células melan-a6 tratadas con NH₄Cl, no observada en melan-md1, sugiere la posibilidad de que las células control melan-a6 presenten un pH melanosomal más bajo. Así, la mayor actividad específica de tirosinasa en células melan-md1 podría explicarse por un pH melanosomal más cercano a la neutralidad en éstas células.

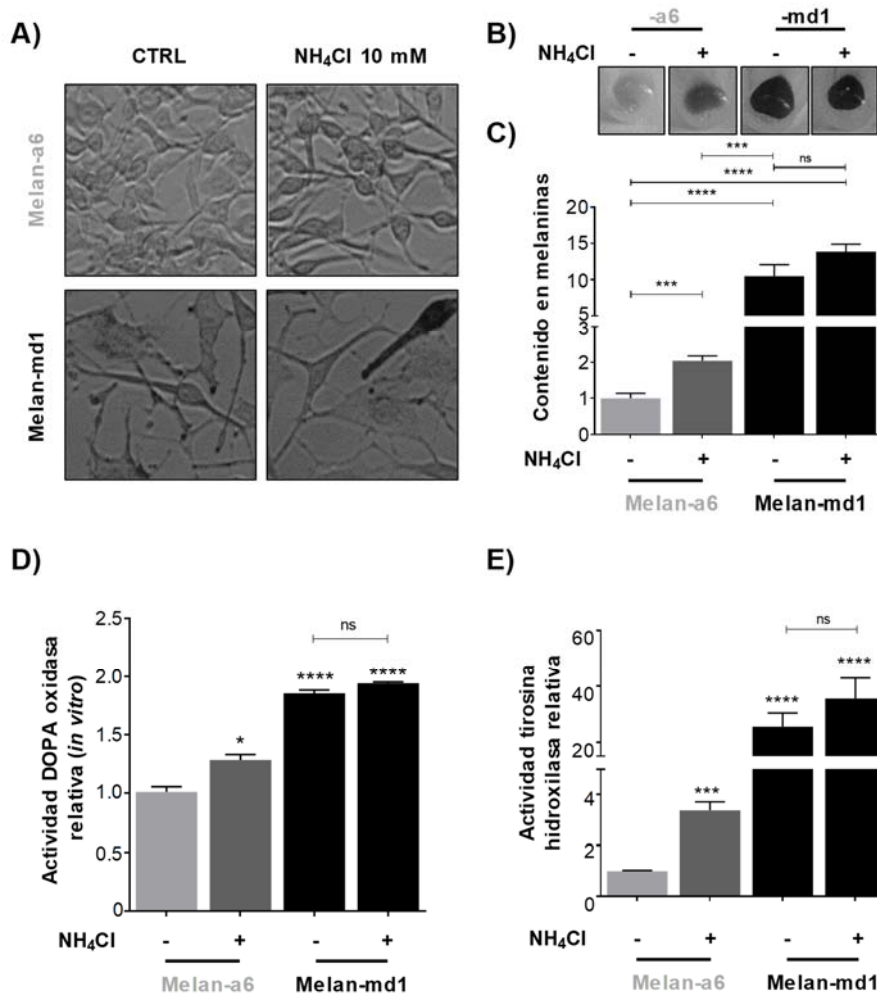


Figura 28. Análisis del fenotipo de pigmentación de células melan-a6 y melan-md1 tras tratamiento con NH₄Cl. A) Imágenes de microscopía de contraste de fases tras 48 h de tratamiento; B) Pellets celulares de células control y mahoganoideas, tanto tratadas como sin tratar con cloruro amónico. C) Contenido en melaninas; D) Actividad DOPA oxidasa medida *in vitro* de los extractos de células de ratón melan-a6 y melan-md1, tratadas y sin tratar con cloruro amónico y E) análisis *in vivo* de la actividad tirosina hidroxilasa. Los datos, normalizados por proteína, se refirieron a las células melan-a6 en condiciones control en todos los casos. Se realizaron 3 ensayos independientes, por triplicado cada uno.

Por ello, nos planteamos la posibilidad de que *Mgrn1* pudiera ser un nuevo regulador aún no caracterizado del pH melanosomal y, por extensión, quizá de otros orgánulos intracelulares del linaje lisosomal. Los estudios que se resumirán en el siguiente capítulo se plantearon para analizar esta hipótesis.

CAPÍTULO 3

3.1. MGRN1 COMO REGULADOR DEL pH DE ORGÁNULOS DEL LINAJE LISOSOMAL.

Como ya hemos comentado, *Mgrn1* podría tener un efecto regulador sobre el pH de los melanosomas y quizá otros orgánulos del linaje lisosomal. Resumiendo resultados previos, cuando se aumenta con agentes lisosomotrópicos el pH de los orgánulos ácidos de las células melan-a6, y se realizan medidas de actividad de tirosinasa *in vivo*, se observa un aumento en dicha actividad y una mayor pigmentación. Este tratamiento tiene un efecto mucho menor en las células *mahoganoides*, desprovistas de *Mgrn1*, ya que, por una parte, el pH melanosomal sería ya de por sí más alto y, por otra parte, al poseer las células una carga de melanina muy elevada, las pequeñas diferencias en la pigmentación no son observables. Estos resultados sugieren que el medio interno de los melanosomas de las células *mahoganoides* melan-md1 presentaría un pH cercano al óptimo para la actuación de la enzima. Por el contrario, el pH del interior de los melanosomas de las células control melan-a6 sería menor y, por tanto, en un entorno más ácido la enzima trabajaría de manera menos eficiente.

Para demostrar que el pH del interior de los melanosomas está regulado por *Mgrn1* utilizamos una serie de sondas indicadoras de pH tanto en condiciones basales como tras tratamientos con NH₄Cl.

3.1.1. Comparación del pH de los orgánulos intracelulares de células melan-a6 y melan-md1 mediante DAMP-DNP.

DAMP-DNP (3-(2,4-dinitroanilino)-3'-amino-N-metildipropilamina)-DNP es una sonda citoquímica permeable que permite distinguir orgánulos ácidos, por lo que constituye una buena herramienta indicadora de pH *in vivo*²³¹. La molécula contiene una unidad de DNP, que sirve como epítipo localizador. Cuando se incuba un cultivo celular con DAMP-DNP, la sonda se acumula en compartimentos ácidos, como los orgánulos del linaje lisosomal, donde se protona y queda retenida tras la fijación con paraformaldehído. Posteriormente es posible localizarla tratando las células con un anticuerpo α-DNP, que se detectará con un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo²²⁴. Puesto que la acumulación de DAMP-DNP en los orgánulos intracelulares depende de su protonación, la señal fluorescente es tanto más intensa cuanto menor sea el pH del lumen del orgánulo.

Así, realizamos ensayos con células melan-a6 y -md1 sembradas en cristales de 10 mm de diámetro e incubadas con DAMP-DNP durante 30 min a 37°C. Tras ello se fijaron e incubaron con los anticuerpos necesarios. Obtuvimos los resultados reflejados en la **figura 29**. El acúmulo de DAMP fue alrededor de 2 veces mayor en células control melan-a6 que en células melan-md1. Esto indica que, en condiciones basales, las células *mahoganoides* presentan un pH orgánulo más cercano a la neutralidad, de acuerdo con nuestra hipótesis. En las células control melan-a6, la mayor retención de DAMP en los orgánulos demuestra que estos presentan un pH más ácido,

con lo que la actividad catalítica de la enzima TYR sería menor. Nótese que se emplearon dos anticuerpos secundarios marcados con sondas fluorescentes diferentes. Los resultados obtenidos fueron similares usando Alexa 647 o Alexa 488 (**figura 29A y 29B**), como sondas de propiedades espectroscópicas diferentes unidas al anticuerpo secundario. Para ambas sondas, el análisis estadístico de la intensidad de fluorescencia confirmó la existencia de diferencias significativas sugerida por la inspección visual de las imágenes. Esto permite descartar la posible interferencia debida a la absorción de luz visible por las melaninas presentes en las células hiperpigmentadas melan-md1.

Reforzando estos resultados, el análisis de la intensidad de fluorescencia estimado por citometría de flujo presentó el mismo patrón. La intensidad de fluorescencia en las células melan-a6 marcadas con DAMP-DNP fue considerablemente mayor que la de células melan-md1. Esto confirma un mayor acúmulo de la sonda en los orgánulos ácidos de las células control frente a las células *mahoganoides* (**figura 29C**).

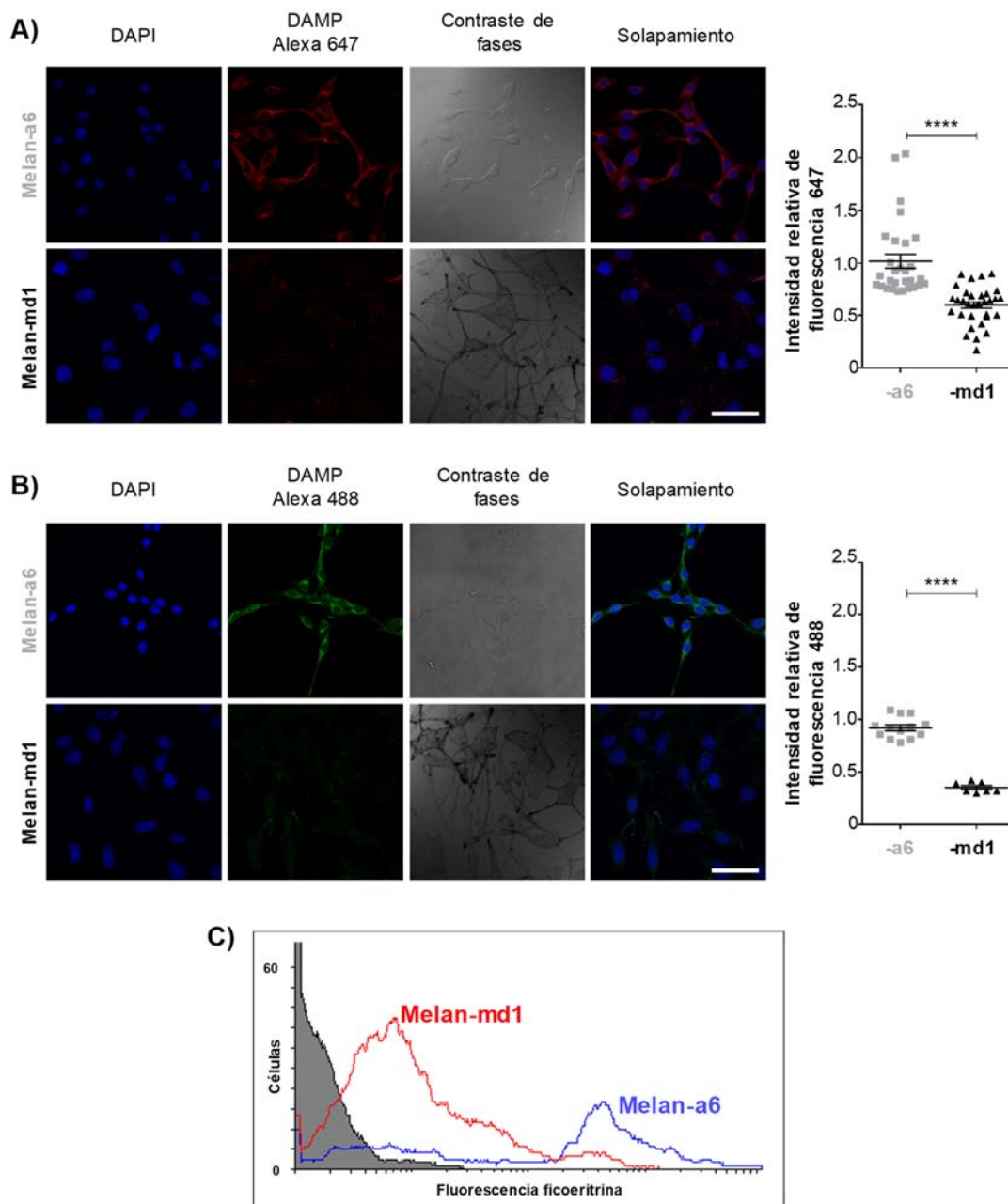


Figura 29. Análisis del pH en los orgánulos mediante DAMP-DNP. Imágenes de microscopía confocal y sus correspondientes cuantificaciones de células melan-a6 y melan-md1 tratadas con DAMP durante 30 min a 37°C, fijadas e incubadas con α -DNP y con A) α -Alexa 647 o B) α -Alexa 488. Núcleos teñidos con DAPI. (Barra de escala: 50 μ m) C) Datos obtenidos mediante citometría de flujo de células marcadas con α -DNP y con un anticuerpo secundario marcado con ficoeritrina. Se realizaron 3 ensayos independientes, con resultados comparables. Para la cuantificación, se realizaron campos al azar en los que se midió la intensidad de señal con ImageJ, que se normalizó dividiendo por el número de células en cada campo. Los resultados (media \pm SEM) se muestran a la vez que la nube de puntos que corresponde a los valores para cada uno de los campos cuantificados, referidos al valor medio del grupo correspondiente.

Para validar la técnica de marcaje dependiente de pH con DAMP-DNP y poder relacionar más directamente la activación de tirosinasa por tratamiento de células vivas con NH_4Cl con cambios de pH melanosomal, realizamos experimentos similares en células tratadas con el agente lisosomotrópico. Se sembraron las células en cristales de 10 mm de diámetro, se trataron con

NH₄Cl 48 h y posteriormente con DAMP-DNP 30 min a 37°C, se lavaron con PBS 1x y se fijaron y marcaron con los anticuerpos necesarios. Analizando las imágenes de microscopía confocal correspondientes se observaron de nuevo diferencias significativas en el comportamiento de las células melan-a6 y melan-md1. Como en el experimento anterior, la sonda DAMP-DNP se acumuló más en células control melan-a6 que en células *mahoganoides* melan-md1 (**figura 30A**). Además, tras tratar las células melan-a6 con NH₄Cl, durante 48 h, el acúmulo de la sonda dentro de los orgánulos disminuyó significativamente (**figura 30A y 30B**). Esto indica una neutralización de los orgánulos ácidos, que disminuye la retención de la sonda, y es compatible con la activación de tirosinasa y el aumento del contenido en melaninas previamente observado. Por otro lado, las células melan-md1 en condiciones basales acumularon una menor cantidad de DAMP-DNP, y además no se obtuvieron diferencias significativas tras el tratamiento con NH₄Cl (**figura 30B**). Esto puede deberse muy probablemente a que el pH del medio melanosomal ya es alto en ausencia de NH₄Cl, con lo que la adición del agente lisosomotrópico no supone un cambio de pH detectable mediante tinción con DAMP. Estas observaciones fueron compatibles con el pequeño efecto del NH₄Cl sobre la actividad de tirosinasa medida *in vivo*.

La cuantificación de la fluorescencia por citometría de flujo confirmó estos resultados, pudiendo observarse dos picos diferenciados en células melan-a6 tratadas con NH₄Cl, uno correspondiente a células de baja fluorescencia y otro indicativo de células que retienen DAMP-DNP de forma comparable con las células control (**figura 30C**). En el caso de las células melan-md1 predomina de forma muy clara el pico de baja intensidad de fluorescencia que coincide con el que aparece en las células melan-a6 tras tratamiento con el agente lisosomotrópico.

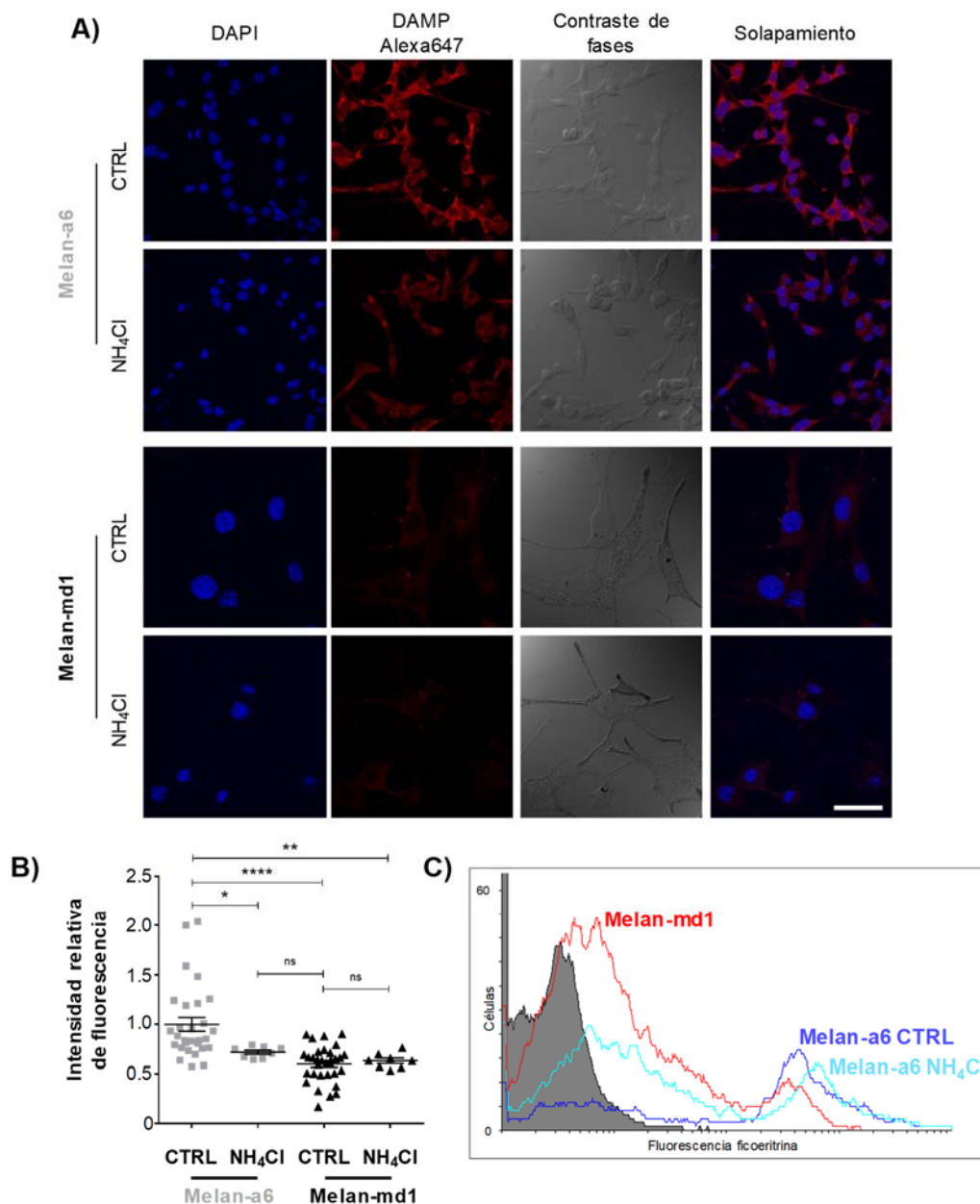


Figura 30. Análisis del pH de los orgánulos intracelulares mediante DAMP-DNP tras tratamiento con NH₄Cl. A) Imágenes de microscopía confocal de células melan-a6 y melan-md1 tratadas durante 48 h con NH₄Cl, seguido de DAMP-DNP durante 30 min y posteriormente teñidas. (Barra de escala: 50 μ m) B) Gráfica de la cuantificación de intensidad de fluorescencia normalizada por número de células. Se realizaron 3 ensayos independientes. C) Análisis de citometría de flujo de DAMP durante 30 min a 37°C y marcadas con α -DNP y un anticuerpo secundario marcado con ficoeritrina. Se realizaron 3 ensayos independientes, con triplicados cada ensayo. Para la cuantificación, se realizaron campos al azar en los que se midió la intensidad de señal con ImageJ, que se normalizó dividiendo por el número de células en cada campo. Los resultados (media \pm SEM) se muestran a la vez que la nube de puntos que corresponde a los valores para cada uno de los campos cuantificados, referidos al valor medio del grupo correspondiente.

3.1.2. Estimación del pH de orgánulos intracelulares mediante naranja de acridina.

La estimación del pH de los melanosomas mediante sondas fluorescentes se ve dificultada por la presencia de melaninas, que pueden absorber luz de excitación y/o emisión, complicando

la interpretación de los resultados. La magnitud de esta interferencia depende del espectro de absorción y emisión de la sonda, por lo que para obtener conclusiones fiables deben emplearse varias sondas diferentes y comprobar que se obtienen resultados similares. Así, decidimos emplear el naranja de acridina (AO) para aumentar la robustez de las conclusiones anteriores.

El AO es otra sonda permeable que se acumula en los orgánulos dependiendo del pH. Así, en células vivas se acumula en las vesículas ácidas produciendo una señal en el espectro rojo²³²⁻²³⁴. Como en el caso de DAMP-DNP, el mecanismo de acumulación de AO dentro de las vesículas depende de la protonación de la molécula en un ambiente ácido, ya que la carga eléctrica disminuye la capacidad de las moléculas de AO para atravesar la membrana vesicular y escapar al citoplasma. No obstante, en el caso de la tinción con AO, las células no se fijan, sino que se observan directamente al microscopio mientras se mantienen viables. Para confirmar los resultados obtenidos con DAMP-DNP, se sembraron células en pocillos independientes con fondo de cristal para poder obtener las imágenes *in vivo* mediante microscopía confocal. Se trataron las células durante 48 h con NH₄Cl y, posteriormente, se incubaron con AO a 37°C durante 20 min. Se procedió a lavar los pocillos con PBS 1x y se adquirieron las imágenes y analizaron las intensidades de fluorescencia (**figura 31**).

Observamos el mismo patrón que en el caso de la sonda DAMP. Las células melan-a6 mostraron una mayor retención de la sonda en las vesículas intracelulares, consistente con un pH más ácido de las mismas. Tras los tratamientos con NH₄Cl, la cantidad de sonda retenida disminuyó drásticamente, indicando la basificación de compartimentos originalmente ácidos (**figura 31A**). Las células melan-md1, que en situación normal acumulan menos AO que las melan-a6, no presentaron diferencias significativas tras tratamiento con agentes lisosomotrópicos (**figura 31B**).

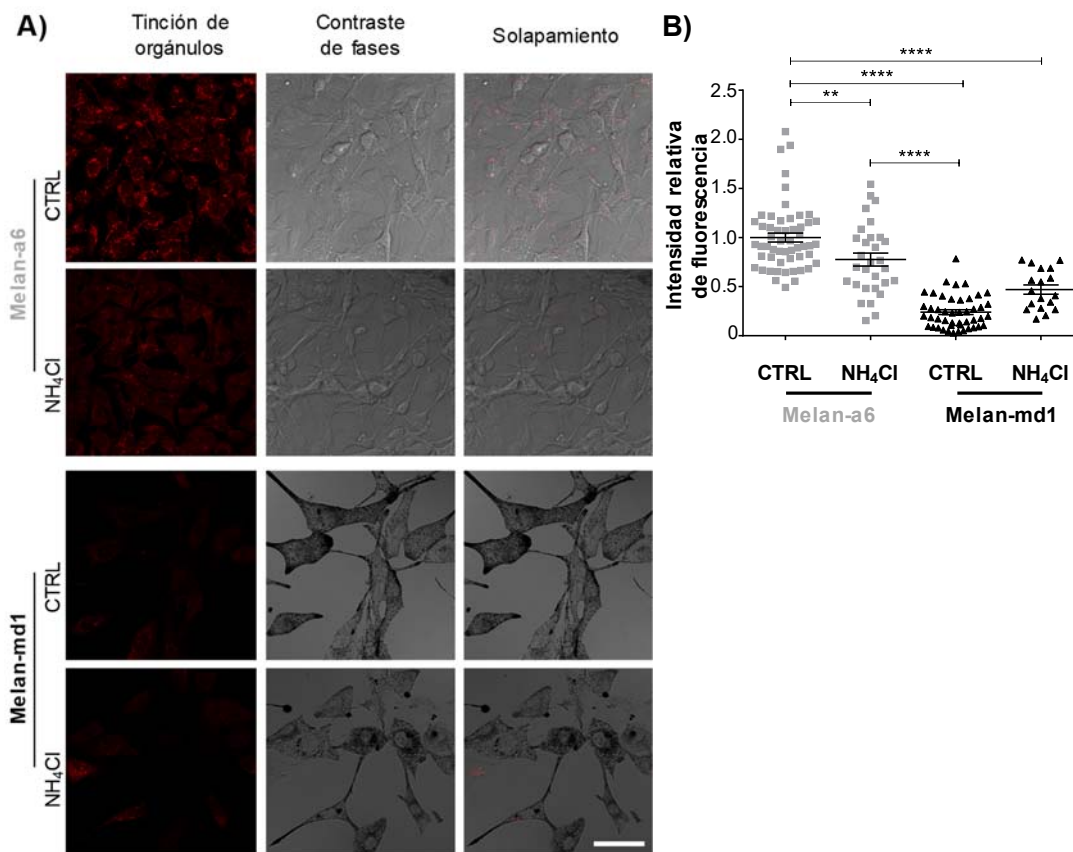


Figura 31. Análisis del pH de los orgánulos intracelulares mediante AO en células melan-a6 y melan-md1 tratadas con NH_4Cl . A) Imágenes de microscopía confocal de células melan-a6 y melan-md1 *in vivo* realizadas tras tratamientos de 48 h con NH_4Cl , tratadas con AO durante 20 minutos y posteriormente lavadas con PBS1x. (Barra de escala: 50 μm) B) Gráfica de la cuantificación de intensidad de fluorescencia normalizada por número de células. Se realizaron 3 ensayos independientes, con $n=18$ en cada uno de ellos. Para la cuantificación, se tomaron campos al azar en los que se midió la intensidad de señal con ImageJ, que se normalizó dividiendo por el número de células en cada campo. Los resultados (media \pm SEM) se muestran a la vez que la nube de puntos que corresponde a los valores para cada uno de los campos cuantificados, referidos al valor medio del grupo correspondiente.

Estos resultados confirman que el medio del interior de los orgánulos en las células melan-a6 es más ácido que el medio de los orgánulos de células melan-md1, con lo que la enzima tirosinasa actuaría de forma óptima y el contenido en melanina sería mayor en la línea *mahoganoide*.

Debe tenerse en cuenta, además, que la tinción con AO se realiza con células vivas, sin someterlas a ningún tratamiento de fijación. Por ello, los resultados obtenidos con esta sonda no solo confirman, sino que complementan los descritos para la sonda DAMP-DNP. En conjunto, consideramos demostrado que el pH del lumen de los orgánulos ácidos es diferente en las dos líneas celulares analizadas.

3.1.3. Efecto de la represión de *Mgrn1* con siRNA en el pH de orgánulos intracelulares de melanocitos murinos.

Como ya hemos comentado, las líneas celulares mantenidas en cultivo durante largos periodos suelen acumular cambios genotípicos y fenotípicos que dificultan la interpretación de los resultados experimentales. Por ello, nos pareció arriesgado achacar la diferencia del pH de los orgánulos intracelulares en células melan-a6 y melan-md1 a la diferente expresión de *Mgrn1* en ambos tipos celulares, aunque esta fuera la hipótesis más plausible. Para confirmar o descartar dicha hipótesis recurrimos a experimentos de silenciamiento mediante siRNA. Silenciamos *Mgrn1* en células melan-a6 para acercar las células control al modelo *mahoganoide* y posteriormente evaluamos cambios en el pH de los orgánulos intracelulares mediante las sondas descritas anteriormente (**figura 32**). Las condiciones de silenciamiento incluyeron 2 controles, "Mock" (sin siRNA) y "siCTRL" (siRNA sin diana prevista), en los cuales no se observaron cambios de retención de la sonda. Además, analizamos 3 condiciones de silenciamiento: 2 tipos de siRNA específicos del gen *Mgrn1* (siMGRN1-01, siMGRN1-04) y una mezcla de ambos (siMGRN1-Mix) (**figura 32A**). Tras la cuantificación de la intensidad de fluorescencia (**figura 32B**), se observaron cambios significativos en las 3 condiciones de silenciamiento, en las que la intensidad de fluorescencia detectada fue aproximadamente la mitad de la correspondiente a los controles. El silenciamiento efectivo de *Mgrn1* se verificó mediante qPCR (**figura 32C**). Esto indicó que el medio interno de los orgánulos intracelulares del linaje lisosomal es más básico tras represión de *Mgrn1*.

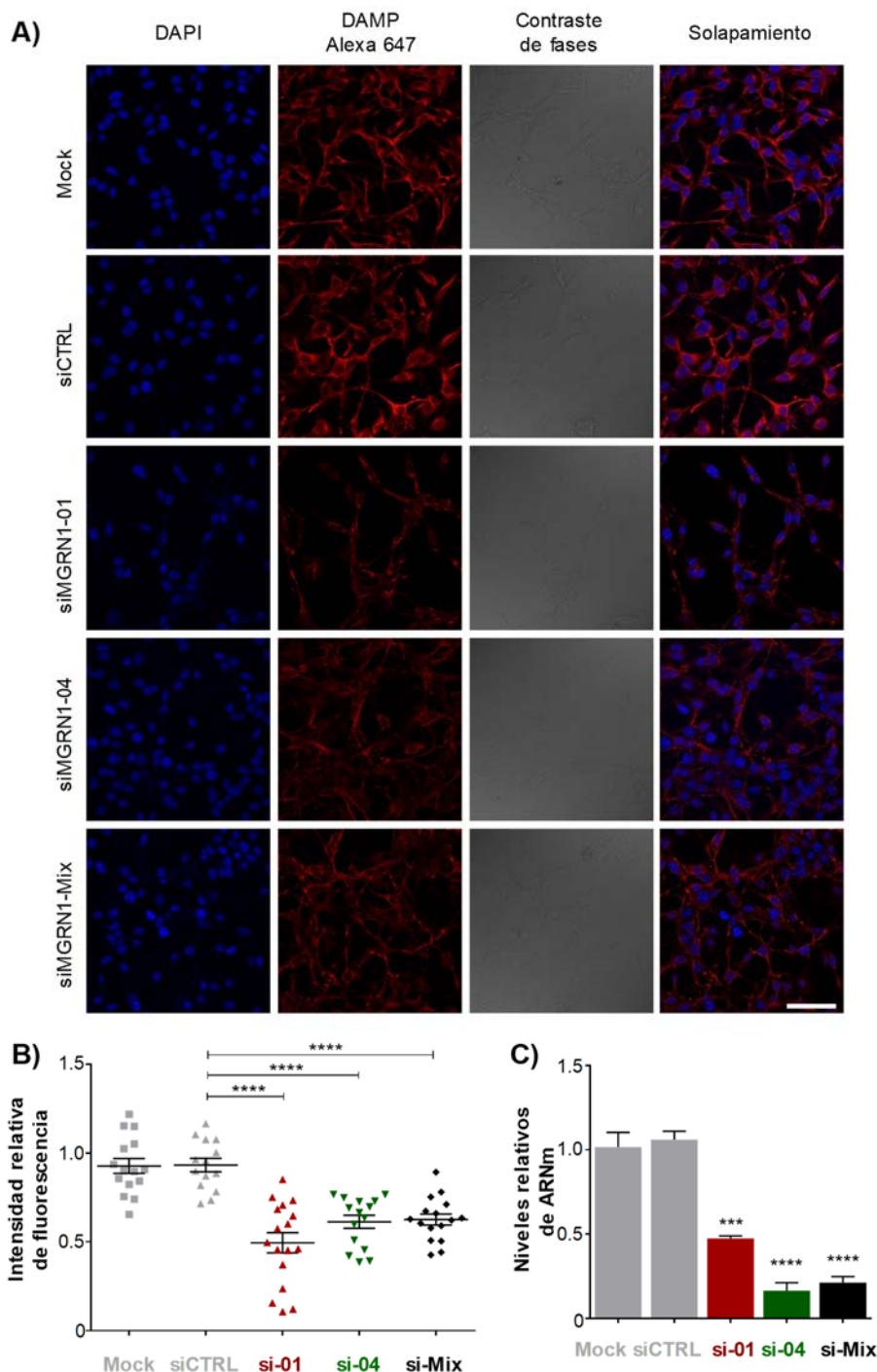


Figura 32. Análisis del pH de los orgánulos intracelulares mediante DAMP-DNP tras anular *Mgrn1* con siRNA en células melan-a6. A) Imágenes de microscopía confocal, B) gráfica de la cuantificación de intensidad de fluorescencia normalizada por número de células y C) comprobación del silenciamiento por qPCR de células melan-a6 anulando *Mgrn1* durante 72 h, tratadas con DAMP-DNP durante 30 min y posteriormente teñidas. (Barra de escala: 50 μ m). Para la cuantificación, se realizaron campos al azar en los que se midió la intensidad de señal con ImageJ, que se normalizó dividiendo por el número de células en cada campo. Los resultados (media \pm SEM) se muestran a la vez que la nube de puntos que corresponde a los valores para cada uno de los campos cuantificados, referidos al valor medio del grupo correspondiente.

El siguiente paso consistió en confirmar los resultados obtenidos con DAMP-DNP utilizando la sonda alternativa (AO) y manteniendo las células vivas durante el desarrollo del experimento. Tras el silenciamiento de *Mgrn1*, la cantidad de sonda retenida en los orgánulos

ácidos cayó drásticamente, tal y como se muestra en la **figura 33**, confirmando totalmente los resultados obtenidos con DAMP-DNP.

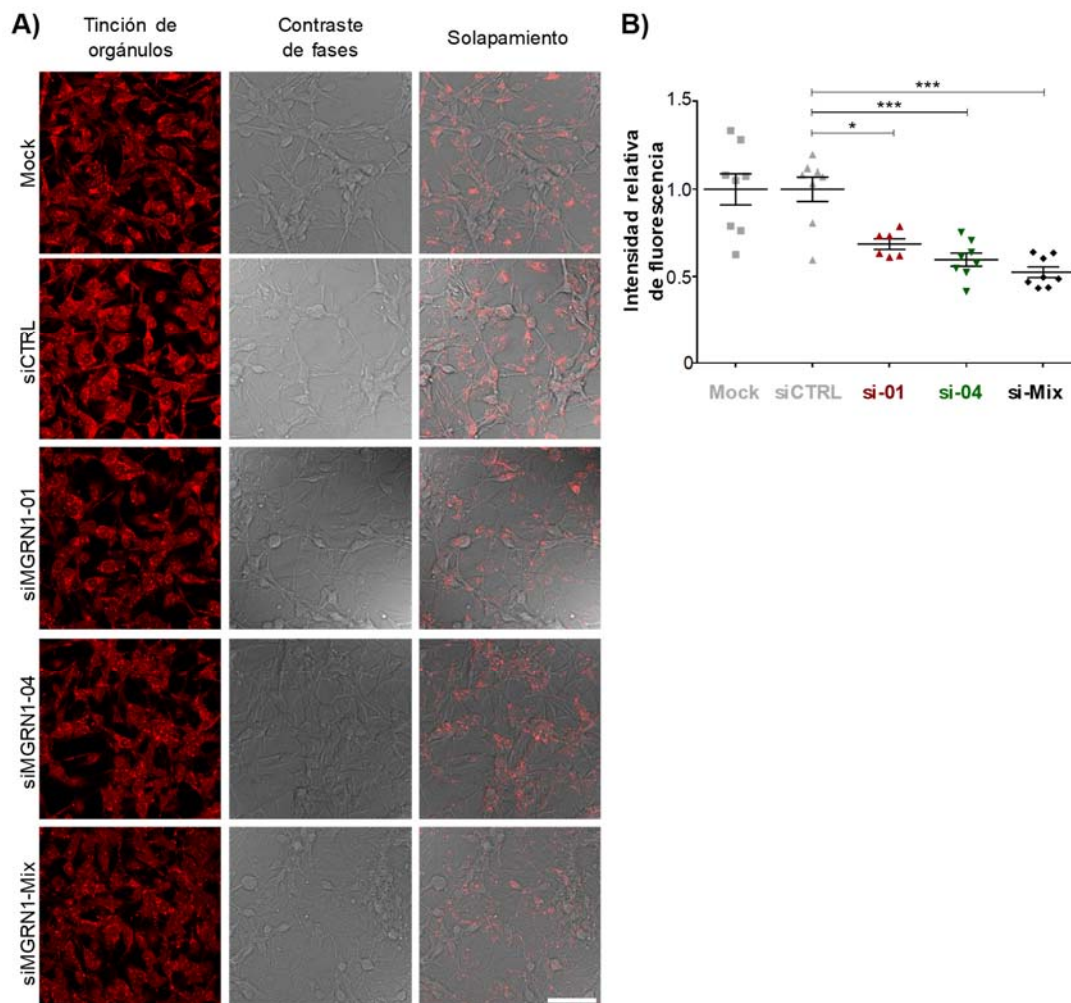


Figura 33. Análisis del pH de los orgánulos intracelulares mediante AO en células melan-a6 tras anulación de *Mgrn1* con siRNA. A) Imágenes de microscopía confocal de células melan-a6 silenciadas para *Mgrn1* con siRNA durante 72 h *in vivo*, tratadas con AO durante 20 minutos y posteriormente lavadas con PBS1x. (Barra de escala: 50 μ m) B) Gráfica de la cuantificación de intensidad de fluorescencia normalizada por número de células. Se realizaron 3 ensayos independientes. Cuantificación de imagen y normalización de datos similar a lo descrito anteriormente.

3.1.4. Efecto de la anulación de *Mgrn1* mediante la tecnología CRISPR-Cas9 en el pH de orgánulos intracelulares de melanocitos murinos.

La regulación del pH de orgánulos ácidos por *Mgrn1* se confirmó finalmente en las células CRISPR-Cas9 con expresión de *Mgrn1* anulada, tanto procedentes de la línea melan-a6 como de células B16F10. Por un lado, el DAMP-DNP quedó menos retenido en orgánulos intracelulares en clones KO para *Mgrn1* procedentes de células melan-a6 respecto a su control (**figura 34A**). Por otro lado, se realizaron experimentos *in vivo* con la sonda alternativa AO, siendo también menos abundante la retención de sonda en los clones de células melan-a6 KO para *Mgrn1* (**figura 34B**).

Además, se obtuvieron resultados similares cuando se analizaron clones de células B16F10 KO para *Mgrn1*, tal y como se muestra en la **figura 35**.

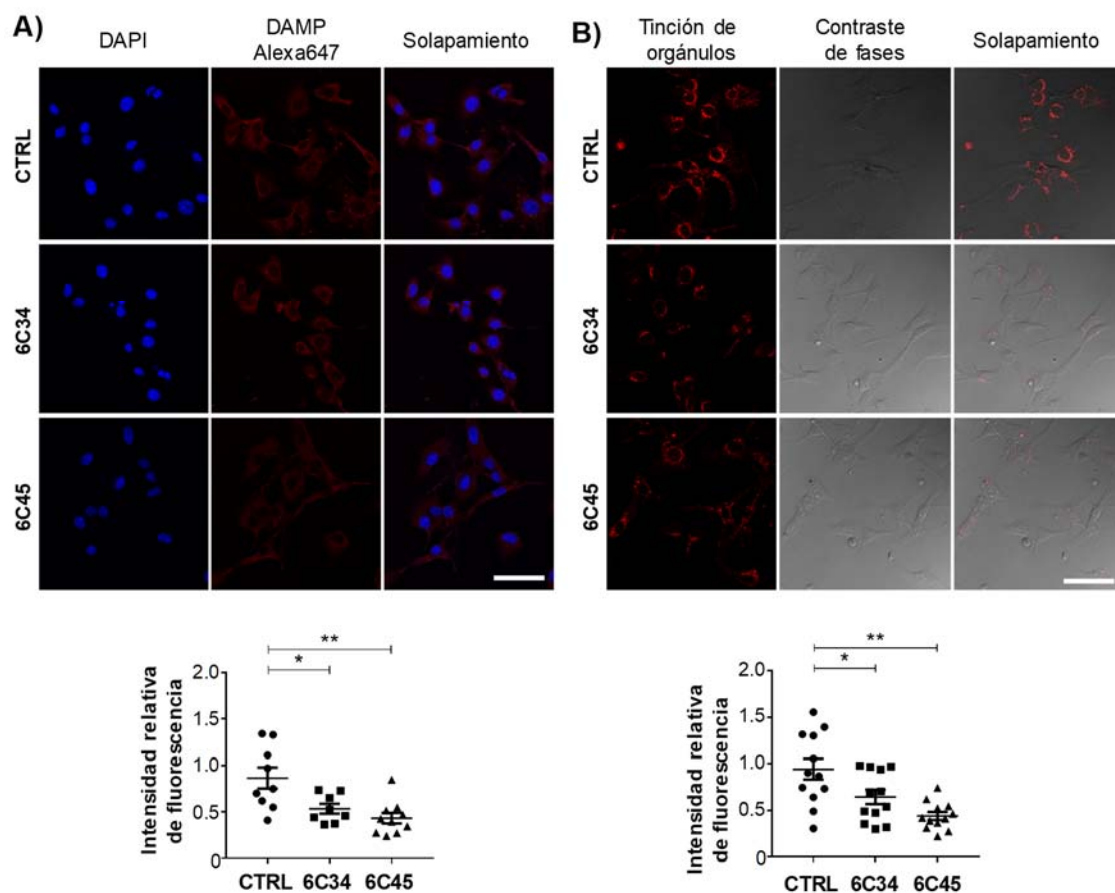


Figura 34. Análisis del pH de los orgánulos intracelulares mediante DAMP-DNP y AO en células CRISPR-Cas9 melan-a6. Imágenes de microscopía confocal y gráfica de la cuantificación de intensidad de fluorescencia normalizada por número de células de A) células CRISPR-Cas9 melan-a6 tratadas con DAMP-DNP durante 30 min y posteriormente teñidas y B) tratadas con AO durante 20 minutos y posteriormente lavadas con PBS1x. (Barra de escala: 50 μ m).

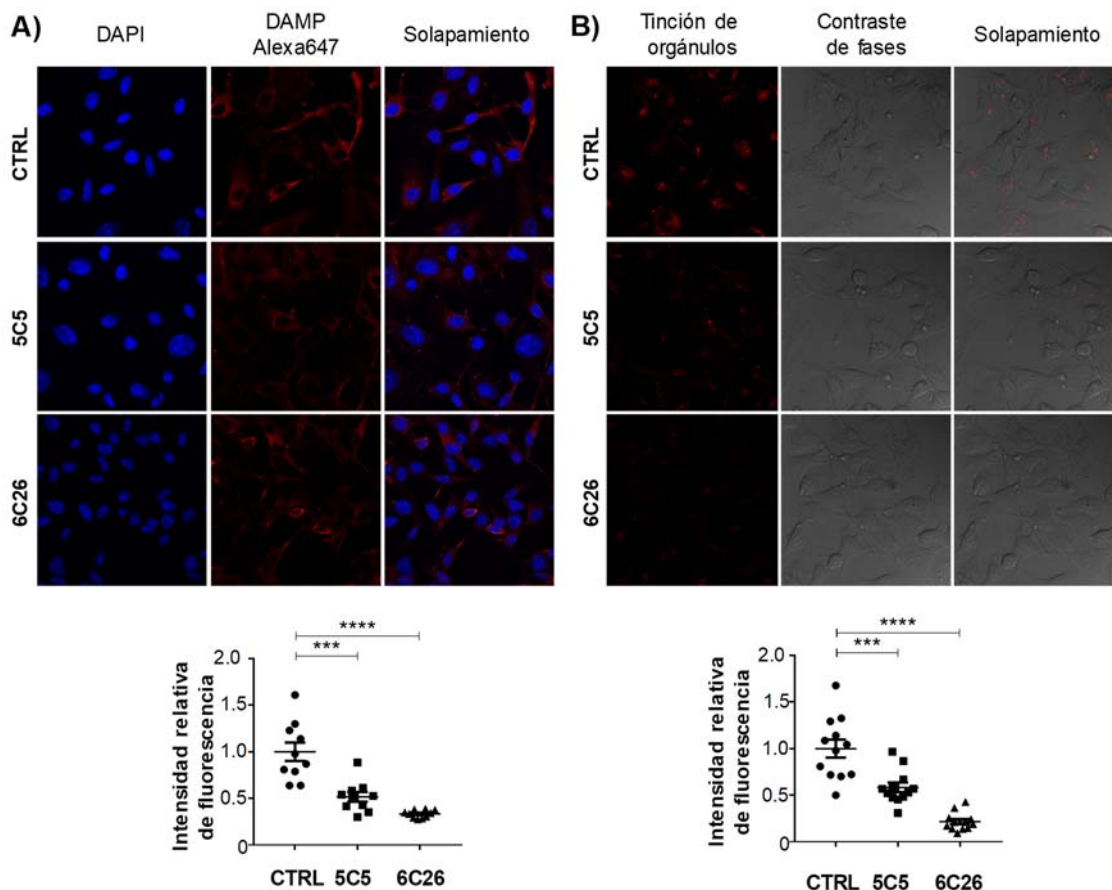


Figura 35. Análisis del pH de los orgánulos intracelulares mediante DAMP-DNP y AO en células CRISPR-Cas9 B16F10. Imágenes de microscopía confocal y gráfica de la cuantificación de intensidad de fluorescencia normalizada por número de células de A) células CRISPR-Cas9 B16F10 tratadas con DAMP-DNP durante 30 min y posteriormente teñidas y B) tratadas con AO durante 20 minutos y posteriormente lavadas con PBS1x. (Barra de escala: 50 μ m).

En conjunto, estos experimentos permiten concluir que *Mgrn1* regula el pH del lumen de orgánulos del linaje lisosomal, al menos en melanocitos de ratón.

3.1.5. Efecto de *MGRN1* sobre el pH de orgánulos intracelulares en células heterólogas HEK293T.

Una vez establecido el efecto de *MGRN1* como regulador del pH de orgánulos del linaje lisosomal en melanocitos murinos, consideramos interesante averiguar si dicho efecto era específico de células melanocíticas o se observaba también en otros tipos celulares. Para ello empleamos células HEK293T de origen humano, que se transfectan con buena eficiencia con genes exógenos, incluyendo tirosinasa²³⁵ y *MGRN1*¹⁸⁹. En este sistema heterólogo realizamos dos tipos de experimentos. Por una parte, se comprobó la actividad de la enzima tirosinasa tras transfectarla individualmente o en combinación con *MGRN1* para su expresión transitoria. Por otra, comparamos la captación de DAMP-DNP en células que expresaban o no *MGRN1* exógena.

Cuando las células embrionarias de riñón HEK293T se transfectaron con *TYR*, fue posible detectar la actividad de la enzima (**figura 36A**) así como la aparición de una pigmentación melánica evidente y de la proteína enzimática en extractos solubilizados (**figura 36B**). La cotransfección con *MGRN1* produjo una disminución de la actividad tirosinasa, estadísticamente significativa (**figura 36A**). La menor actividad tirosinasa podría deberse a una disminución del pH de los orgánulos en los que se localiza la enzima, que muy probablemente son del linaje lisosomal dada su relación con los melanosomas. Puesto que la represión de *MGRN1* aumenta el pH de dichos orgánulos, podemos suponer que su sobreexpresión favorecería la acidificación de los mismo.

Para comprobar directamente esta posibilidad, células cotransfectadas con tirosinasa y *MGRN1* se trataron con DAMP-DNP y se tiñeron para la sonda con Alexa 647 para DNP y para *MGRN1* con Alexa 488. De esta forma, en una misma imagen pueden distinguirse las células que expresan *MGRN1* exógena de las que no lo hacen, con lo que se puede comparar los niveles de retención de DAMP en condiciones experimentales estrictamente idénticas. Los resultados obtenidos con este tipo de análisis se muestran en la **figura 36C**, en la que puede observarse una mayor retención de DAMP-DNP en las células que expresan *MGRN1* exógeno (**figura 36D**), consistente con un pH más ácido de los orgánulos donde se expresa tirosinasa exógena y por tanto con la menor actividad de esta enzima. Por tanto, *MGRN1* parece actuar como regulador del pH de orgánulos intracelulares no solo en células melanocíticas, sino también en otros tipos celulares.

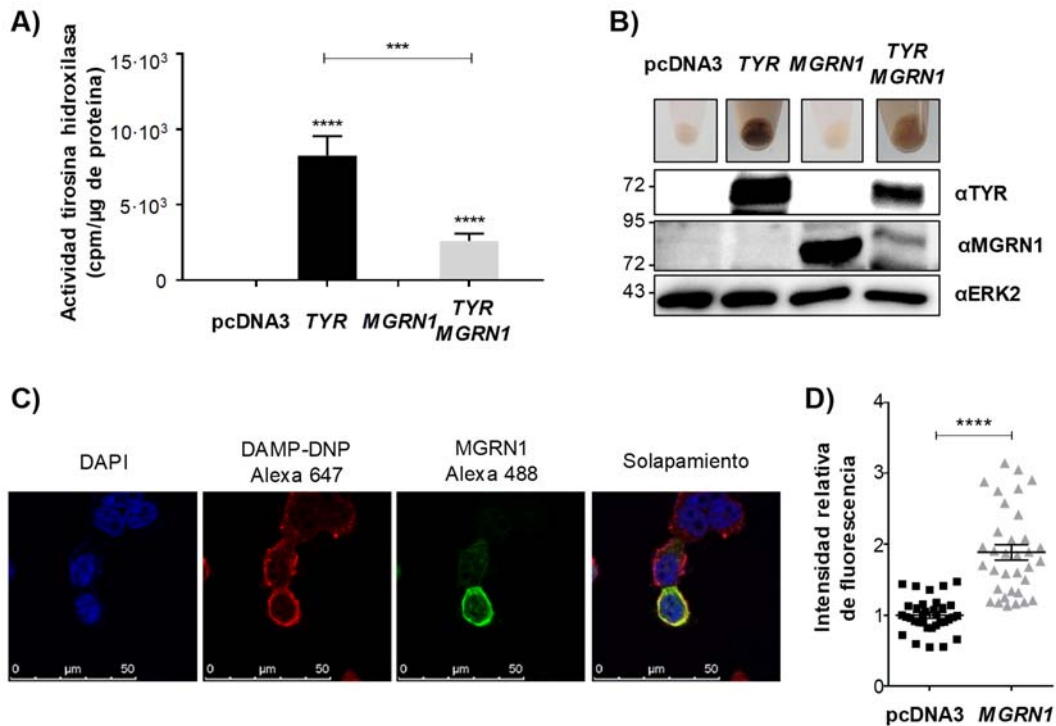


Figura 36. Análisis de actividad tirosina hidroxilasa y pH de orgánulos mediante la sonda DAMP-DNP en un sistema heterólogo tras transfección transitoria. A) Análisis de la actividad tirosina hidroxilasa, B) expresión de tirosinasa (TYR) y MGRN1 analizada por Western blot, C) imágenes de microscopía confocal de células tratadas con DAMP-DNP 30 min a 37°C y, posteriormente, fijadas y marcadas y D) gráfica de la cuantificación de intensidad de fluorescencia en células HEK293T transfectadas transitoriamente con *TYR* sola o en combinación con *MGRN1*.

Además, caracterizamos la localización de la tirosinasa transfectada en el sistema heterólogo, para comprobar su localización subcelular en células carentes de melanosomas. La **figura 37** muestra una célula transfectada con tirosinasa exógena, que se detectó con un anticuerpo específico y un secundario marcado con Alexa 488 y teñida también para LAMP1 endógeno, en este caso utilizando un secundario marcado con Alexa 568, en la que se observa una elevada colocalización. Tras el análisis de numerosas células transfectadas y teñidas, existe un $58.3\% \pm 1.9$ de colocalización entre tirosinasa transfectada y LAMP1 endógena. Por tanto, como era de esperar, tirosinasa se localiza en orgánulos del linaje lisosomal, ya que son los orgánulos más cercanos a los melanosomas donde reside la enzima en los melanocitos. En consecuencia, la sobreexpresión de MGRN1 disminuyó el pH de los lisosomas en células HEK293T.

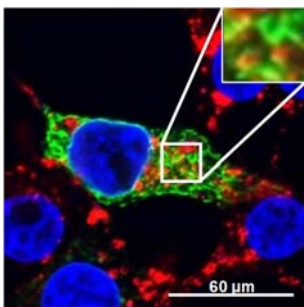


Figura 37. Localización subcelular de tirosinasa transfectada y LAMP1 endógena en células HEK293T. Imágenes de microscopía confocal de células HEK293T transfectadas con tirosinasa. Tinción realizada con α TYR unido a un Alexa 488 y α LAMP1 endógeno unido a un Alexa 568. El porcentaje de colocalización es del $58.3\% \pm 1.9$.

En conjunto, nuestros resultados parecen demostrar que *MGRN1* regula el pH de orgánulos del linaje lisosomal, de manera que la sobreexpresión de *MGRN1* aumenta su acidificación mientras que la represión del gen lo neutraliza. Este efecto no es exclusivo de células melanocíticas murinas, sino que se observa también en células HEK293T heterólogas de origen humano. Así, la basificación del melanosoma parece ser un determinante importante del fenotipo de pigmentación *mahoganoide*.

3.2. IDENTIFICACIÓN DE GENES REGULADORES DE pH DEPENDIENTES DE MGRN1.

Trabajos anteriores del grupo demostraron que *MGRN1* se expresa en el citosol y/o en el núcleo celulares, dependiendo de la isoforma concreta de la que se trate y de su co-expresión o no con *MC1R*¹⁷³. Esta localización se aprecia fácilmente mediante marcaje con anticuerpos específicos seguido de microscopía confocal en células HEK293T (**figura 38**) y en melanocitos malignos humanos HBL (**figura 39**).

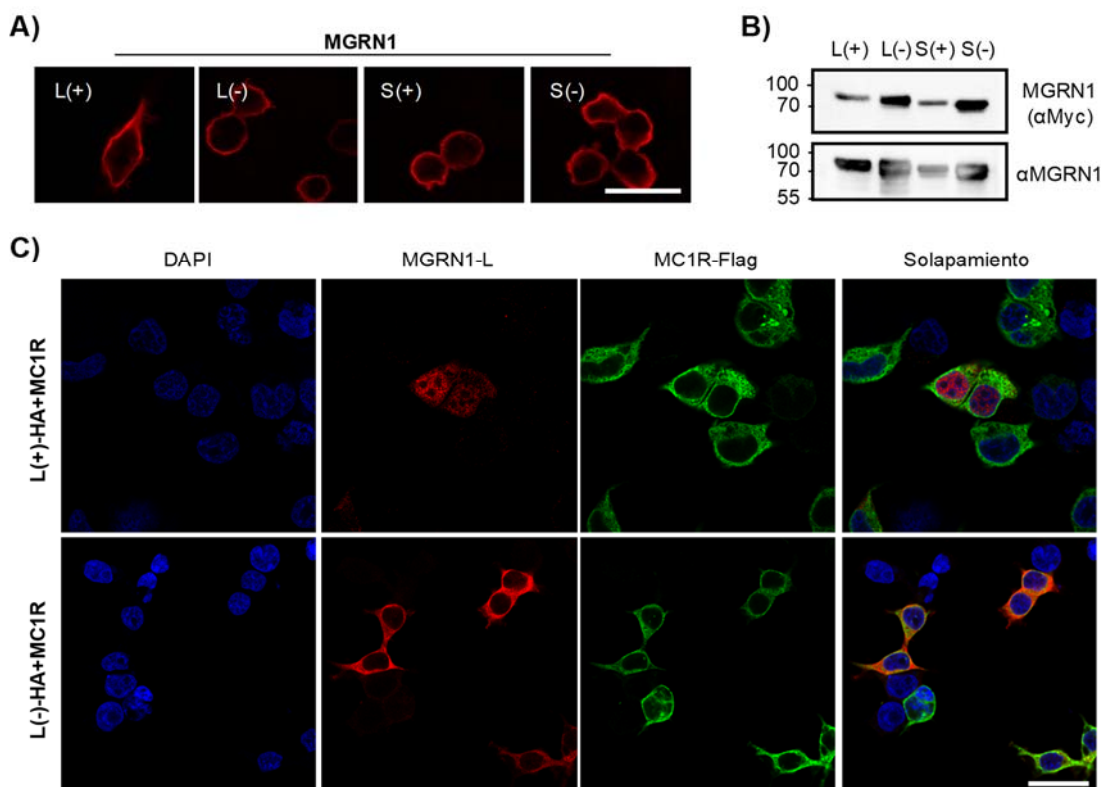


Figura 38. Detección de la localización subcelular de las isoformas de MGRN1 en células HEK293T. A) Expresión citosólica de las cuatro isoformas de MGRN1 tras la transfección transitoria en células HEK293T. B) Western blot en el que se observa la expresión comparable de las cuatro isoformas de MGRN1 sobreexpresadas. C) Imágenes adquiridas con el microscopio confocal en las que se observa la expresión nuclear de la isoforma L(+) de MGRN1 cuando se co-expresa con MC1R, en contraposición con la de la isoforma L(-) que se localiza en el citosol. Barra de escala: 50 μ m.

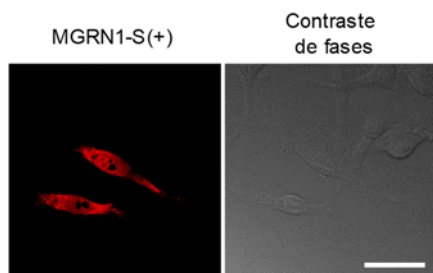


Figura 39. Detección de la localización subcelular de la isoforma S(+) de MGRN1 en los melanocitos humanos HBL. Expresión citosólica y nuclear de la isoforma S(+) de MGRN1 tras la transfección transitoria en células HBL, que expresan MC1R. Barra de escala: 50 μ m.

Sin embargo, ni nuestro grupo ni ningún otro de los que han analizado las propiedades biológicas de MGRN1 han encontrado una asociación de la proteína con los LROs. Por lo tanto, el efecto regulador del pH de dichos orgánulos debería ser indirecto. Pueden postularse varias posibilidades, siendo una de ellas que MGRN1 regulara los niveles de alguna proteína con actividad transcripcional (un factor de transcripción) que, a su vez, regulara la expresión de genes implicados en el control del pH lisosomal. Esta posibilidad resulta atractiva en función de otros resultados obtenidos por el equipo, que indicaban diferencias importantes en los perfiles de expresión génica en células murinas melan-a6 y melan-md1. Por lo tanto, decidimos explorarla en detalle.

La secuencia y estructura general de las isoformas de Mgrn1 murinas son muy homólogas a sus correspondientes isoformas humanas (ver esquema en la Introducción). La diferencia en la secuencia de aminoácidos entre las formas humanas y de ratón estriba tan solo en unos 30 cambios puntuales, por lo que, *a priori*, suponemos que desempeñarán una función biológica muy similar, si no idéntica. Con el objetivo de identificar genes regulados por Mgrn1 que pudieran participar en el control del pH melanosomal y, por extensión de otros LROs, abordamos el análisis de los perfiles diferenciales de expresión génica entre las líneas de melanocitos de ratón melan-md1 y los melanocitos normales melan-a6. Para ello empleamos la tecnología de hibridación de micromatrices (*microarrays* de expresión génica) usando las micromatrices de Affimetrix "Mouse Gene 2.1" y el protocolo que recomienda el proveedor.

Purificamos la población de RNA de las dos líneas de melanocitos en cultivo en 3 condiciones distintas: a) con medio completo, b) exentas de suero bovino fetal y c) estimuladas con NDP-MSH (n=4 para cada condición) y mediante análisis por qPCR verificamos la ausencia de expresión de cualquier isoforma de Mgrn1 en las células *mahoganoides* (**figura 40**).

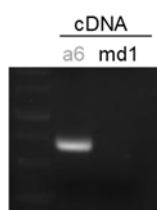


Figura 40. Ausencia de expresión de Mgrn1 en las células melan-md1 empleadas para el análisis de expresión génica diferencial. Se utilizaron condiciones estándar de amplificación mediante semicuantitativa PCR y los primers directo 5'-GTCGTCCAGTCCAGTTTCCCTAT y reverso 5'-CAATCTGAGACCGTCCAC. Tras 30 ciclos de amplificación analizamos los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa seguida de tinción con RedSafe. Como se puede observar, aparece una banda de 532 nt que corresponde al fragmento de Mgrn1 amplificado, únicamente en la calle correspondiente a las células melan-a6.

Siguiendo las recomendaciones del fabricante de la matriz, sintetizamos, amplificamos e hidrolizamos el cDNA resultante y procedimos a hibridar las sondas de la micromatriz

(aproximadamente 42.000 sondas) con nuestras muestras en las 3 condiciones diferentes, para lo que contamos con el soporte del personal de la sección de Genómica del CAID, Servicios Generales de la UM, siguiendo el procedimiento esquematizado en la **figura 41**.

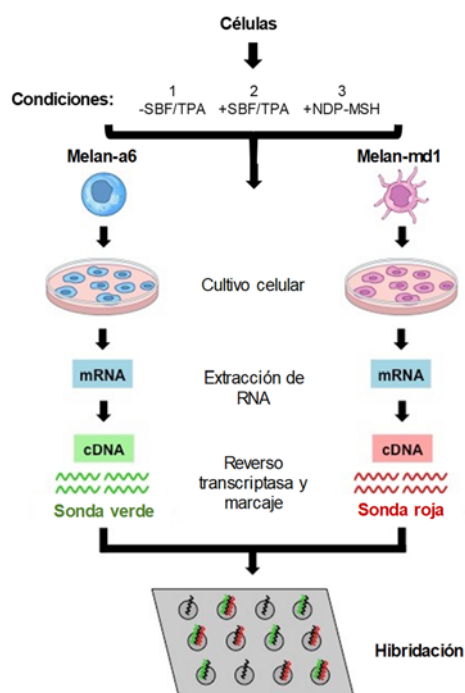


Figura 41. Esquema del proceso general de hibridación de una población de mRNA en las micromatrices de Affimetrix. Células murinas de las líneas melan-a6 y melan-md1 cultivadas en distintas condiciones (1. desprovistas de suero y TPA; 2. con suero y TPA y, 3. estimuladas con NDP-MSH durante 24 h). Posterior extracción de mRNA y conversión a cDNA para marcarlas con sondas diferentes y proceder a la hibridación con la matriz de Affimetrix.

La lectura de la fluorescencia de cada posición de la matriz nos da un valor relativo de expresión del gen según la sonda fijada en dicha posición. La intensidad para cada gen de cada réplica se calcula a partir de todas las obtenidas con las distintas sondas que hibridan con dicho gen diana (al menos 10 sondas/gen). El valor de “Fold Change” (FCh) o factor de cambio de expresión es el número de veces que se expresa un gen de una condición respecto a otra, teniendo en cuenta para ese cálculo las medias de las tres réplicas biológicas para cada gen. Por tanto, el FCh es un valor indicativo del aumento o disminución del nivel de expresión de cada gen entre las condiciones comparadas. En nuestro estudio, el análisis del cambio en el nivel de expresión génica general de los genes cuyo resultado es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) entre las células que no expresan *Mgrn1* (melan-md1) y las control (melan-a6) mediante los softwares Transcriptome Analysis Console (TAC) y Partek Genomics Suite mostró que: i) la expresión génica de las muestras analizadas es muy homogénea dentro de cada grupo estudiado y muy diferente entre ambos grupos (**figura 42A**); ii) existe una transcripción génica diferencial en las dos poblaciones celulares ensayadas con alto valor significativo, que sugieren un fuerte efecto de *Mgrn1* sobre la expresión génica general y ii) el valor absoluto del FCh es muy variable según el gen, y oscila desde las unidades hasta la centena, como se observa en el diagrama de Vulcano (**figura 42B**). Estas dos gráficas corroboran que la expresión génica de la población de células analizada es muy distinta entre grupos y, sin embargo, es muy homogénea dentro de cada grupo.

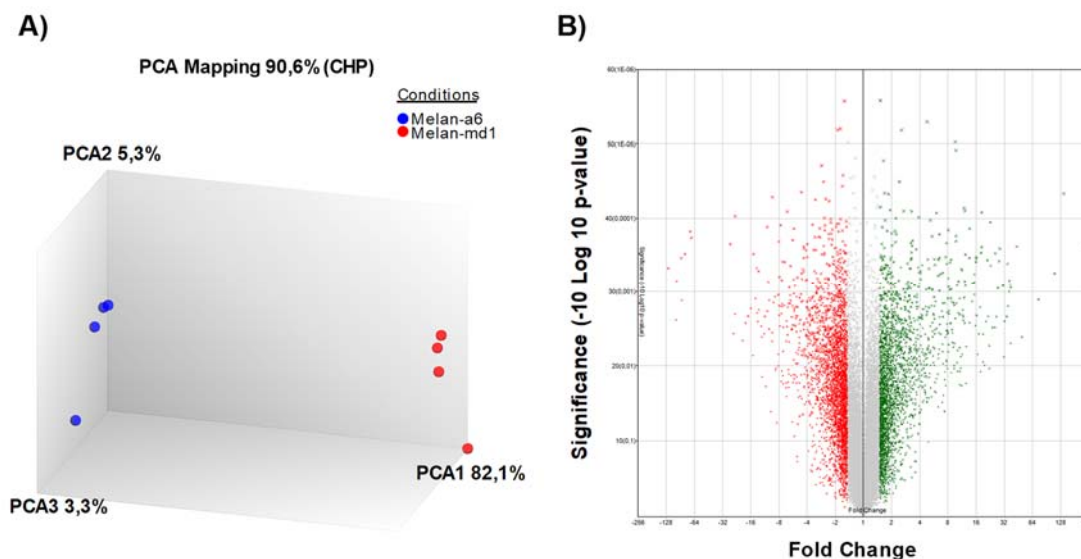


Figura 42. Análisis estadístico de la expresión génica diferencial en matriz Mouse Gene 2.1 ST de células melan-a6 y melan-md1. A) Diagrama de control de calidad (QC) realizado con el software TAC de Affymetrix. B) Diagrama Vulcano de la expresión génica diferencial que cumpla el requisito de poseer un valor de FCh de $\pm 1,5$ y un p-valor $< 0,05$. Los puntos verdes representan los genes cuya expresión es superior en la línea melan-md1 respecto a la línea control y los puntos rojos son los genes cuya expresión disminuye en la línea mutante respecto a la línea control. Análisis realizado a partir de muestras en condiciones de +SBF/TPA.

Como se observa en la **figura 42B**, consideramos significativos los resultados del *Array* para los genes que cumplieran con la doble condición de poseer: i) valores absolutos de FCh superiores a 1,5 y ii) con $p < 0,05$ para las tres réplicas biológicas. Observamos que son varios miles de genes (alrededor de 4000) los que cumplen esta doble condición. Este resultado refuerza la hipótesis del fuerte efecto de la ausencia de expresión de *Mgrn1* en la línea melan-md1 sobre la expresión génica general comentado más arriba.

3.2.1. Análisis preliminar de los resultados de expresión génica diferencial de las células mahoganoideas.

Realizamos un análisis preliminar de estos resultados empleando el software *Partek Genomics Suite*, incluyendo los genes con un valor de $p < 0,05$ y un cambio de expresión mayor o menor que 1.5. La diferencia de expresión en células melan-a6 y melan-md1 se observa mayoritariamente en agrupaciones de genes que participan en vías importantes como la regulación del ciclo celular, concretamente en la replicación del DNA, en vías metabólicas en general y en procesos de reparación del DNA o en el metabolismo de las bases nitrogenadas (**tabla 1**).

Nombre de la ruta	Enrichment Score	Enrichment P-valor	% Genes presentes en cada ruta
Replicación del DNA	26,4659	$3,21 \cdot 10^{-12}$	70,5882
Ciclo Celular	26,4148	$3,37 \cdot 10^{-12}$	42,1875
Rutas metabólicas	16,1485	$9,70 \cdot 10^{-08}$	21,7213
Reparaciones mismatch	14,7986	$3,74 \cdot 10^{-07}$	66,6667
Metabolismo de la pirimidina	14,7492	$3,93 \cdot 10^{-07}$	36,8932

Tabla 1. Relación de los 5 procesos celulares que agrupan a 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*).

La tabla muestra unos valores de enriquecimiento génico y de significancia estadística muy elevados, sobre todo para los dos primeros procesos o vías celulares, relacionados con los puntos de control de la progresión del ciclo celular. Sin embargo, en este listado de eventos celulares no aparece la ruta génica de pigmentación, como una agrupación de genes reguladores del color de los melanocitos (codificantes de enzimas de la vía melanogénica, de proteínas transportadoras de aminoácidos, o de proteínas estructurales o reguladoras del proceso de biosíntesis de melanosomas, o melaninas, entre otras), aunque suponemos que existe una expresión diferencial importante de los mismos, dado el carácter fuertemente diferenciado y el grado de melanización de los melanocitos melan-md1 en relación a la línea parental melan-a6.

El hecho de que no apareciera esta ruta entre las señaladas como más probables podría deberse bien a que dicha ruta de pigmentación no está incluida en la información del programa de análisis o bien a que apareciera como una vía del metabolismo secundario incluida dentro del epígrafe *Metabolic pathways*. Para saber si el software de análisis podía informar sobre el cambio de expresión de genes reguladores de la pigmentación, comparamos los resultados de expresión de las células melan-a6 tratadas con la hormona NDP-MSH 24 h respecto a su control en ausencia de hormona, utilizando el mismo *array* y en idénticas condiciones a las descritas arriba. La **figura 43A y 43B** nos muestra los procesos celulares más probables que agrupan a los genes diferencialmente expresados entre estas dos condiciones. Como se observa en el Panel A, el proceso celular que agrupa al mayor número de genes diferencialmente expresados es “pigmentation” según el análisis con el software de *Partek Genomic Suites*, seguido de otros como desarrollo, proliferación, metabolismo o localización celular. El diagrama de la derecha (*Forest Graph*) muestra la dirección del cambio del grupo de genes enriquecidos de cada epígrafe. Como se observa, la mayoría de los genes reguladores de la pigmentación aumenta su expresión tras el tratamiento de las células melan-a6 con NDP-MSH durante 24 h.

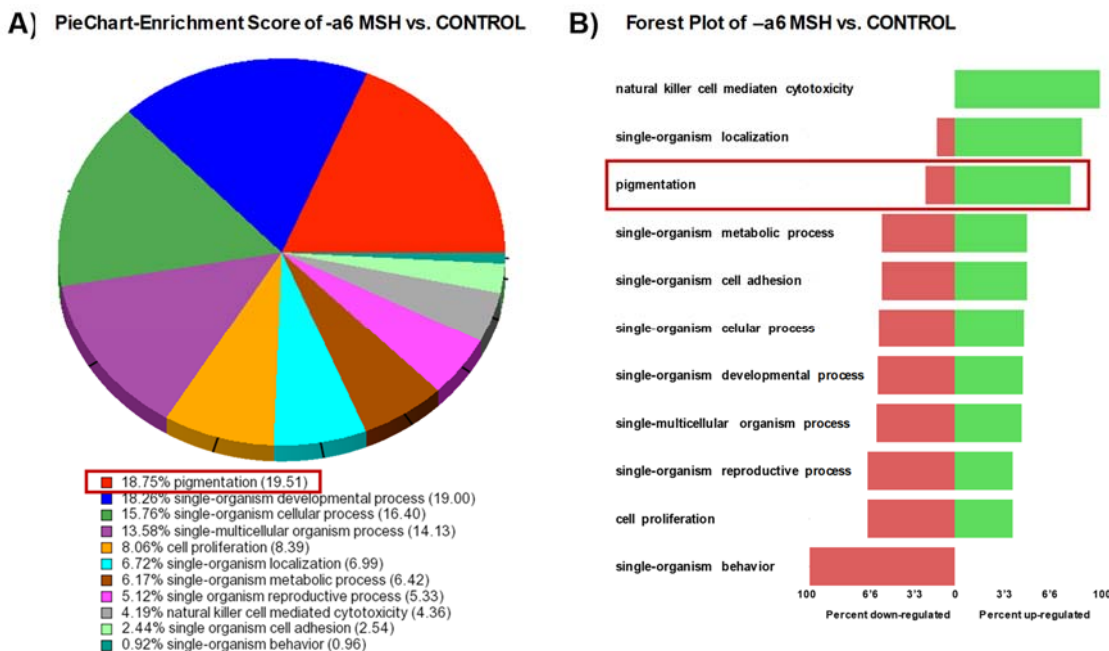


Figura 43. Análisis de expresión génica diferencial en matriz “mouse 2.1 Array Strip” (Affymetrix) tras hibridación de la población de cDNA de células melan-a6 tratadas con NDP-MSH durante 24 h respecto a las células control. A) Diagrama de porciones que representa los porcentajes de los procesos celulares con mayor enriquecimiento génico entre las condiciones de células tratadas o no 24 h con NDP-MSH. B) Diagrama de *Forest* de los mismos procesos, en los que se observa el sentido del cambio en cada proceso.

Por lo tanto, una vez comprobado que mediante la tecnología empleada era posible detectar la expresión de genes de pigmentación en caso de estar diferencialmente expresados, y dado que nuestro primer análisis no lo había considerado entre los procesos celulares más diferentes entre las células melan-md1 y melan-a6, realizamos una búsqueda dirigida de la expresión diferencial de los genes que están incluidos en la base de datos *Color Genes* (<http://www.espcr.org/micemut>), que agrupa todos los genes que se han relacionado experimentalmente con el color del pelaje de los ratones, y sus homólogos en humanos y pez cebra. Comparamos la expresión de este panel de genes en dos condiciones de nuestro proyecto de expresión génica diferencial: las células crecidas con medio completo (con SBF y TPA) y las células desprovistas de SBF y TPA durante 24 h.

La **tabla 2** contiene los resultados de FCh y el valor de p en estas dos condiciones, una vez excluidos los genes que no cumplen con la doble condición de poseer valores absolutos de FCh superiores a 1,25 y valores de p < 0,05 para las cuatro réplicas biológicas. Como se observa, la tendencia del cambio se conserva en las dos condiciones cuando comparamos la expresión génica de ambas líneas celulares, es decir, la expresión génica cambia más o menos en la misma magnitud independientemente de que las células estuviesen en crecimiento exponencial o quiescentes en la placa de cultivo. Por otro lado, la expresión de *Mgrn1* aparece como la más reprimida dentro del grupo entre las dos líneas celulares. Además, destacan los genes *Mcoln3* y *Timp3* por los niveles de sobreexpresión en las células *mahoganoides* respecto al control. El

HeatMap para la misma lista de genes demuestra la homogeneidad de la señal obtenida mediante la media de las cuatro réplicas independientes incluidas en el ensayo. Como se observa en la **figura 44**, los valores medios de FCh incluidos en la **tabla 2** proceden de unos datos individuales que son muy homogéneos, lo que le da verosimilitud y significancia estadística.

En conclusión, el software de análisis probablemente no incluyó en las primeras cinco posiciones los genes de pigmentación y reguladores de pH como agrupación de genes con alto enriquecimiento en las células melan-md1 porque el fenotipo de las células *mahoganoides* es complejo y pleiotrópico y las diferencias de expresión génica en genes de pigmentación pueden quedar enmascarados por motivos estadísticos.

GEN	Función	Pvalor	FCh (+SBF/TPA)	Pvalor	FCh (-SBF/TPA)
Mcoln3	mucoilipin 3 //	3,43E-09	60,9173	4,65E-05	138,5
Timp3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 //	7,60E-08	19,687	8,06E-04	36,96
Cited1	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-ter //	2,04E-06	3,32764	2,08E-03	5,57
Foxd3	forkhead box D3 //	1,92E-06	3,07303	8,40E-03	3,67
Kit	kit oncogene //	2,52E-07	2,71521	1,74E-02	2,06
Notch1	notch 1 // 2 A3 2 18.91 cM //	6,34E-06	2,69988	4,72E-03	3,19
Elov14	elongation of very long chain fatty acids //	3,85E-06	2,41074	3,12E-02	2,11
Hps4	Hermansky-Pudlak syndrome 4 homolog (human) //	2,43E-07	2,35883	3,22E-02	2,48
Adamts20	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with //	2,13E-05	2,17631	9,32E-03	1,5
Mreg	melanoregulin //	1,36E-05	2,14562	4,19E-03	2,54
Snai2	snail homolog 2 (Drosophila) //	1,98E-04	2,0085	1,06E-02	1,84
Gpr143	G protein-coupled receptor 143 // OAI	1,56E-05	1,96649	3,48E-03	2,27
Map2k1	mitogen-activated protein kinase kinase 1 //	6,57E-06	1,9132	1,36E-03	2,24
Gpc3	glypican 3 //	1,20E-04	1,82713	2,72E-01	0,9
Apc2	adenomatosis polyposis coli 2 //	4,15E-04	1,82572	2,62E-02	1,77
Nf1	neurofibromatosis 1 //	9,53E-06	1,78102	2,43E-02	2,6
Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family //	2,62E-05	1,67579	9,21E-03	1,9
Edaradd	EDAR (ectodysplasin-A receptor)-associated death domain //	1,15E-03	1,59957	4,13E-03	1,23
Vps33a	vacuolar protein sorting 33A (yeast) //	2,02E-04	1,59838	2,24E-02	1,58
Pax3	paired box gene 3 //	7,07E-07	1,57134	2,85E-02	1,24
Muted (Bloc1s5)	biogenesis of organelles complex-1, subunit 5, muted //	7,32E-05	1,51973	3,40E-02	1,86
Pts	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase //	1,33E-03	1,50165	2,09E-01	1,21
Mlph	melanophilin //	2,87E-03	1,46129	4,76E-03	1,39
Slc31a1	solute carrier family 31, member 1 //	2,15E-04	1,45601	4,11E-01	1,09
Oca2	oculocutaneous albinism II //	4,56E-05	1,45332	4,41E-04	1,91
Atrn	attractin //	2,28E-04	1,43502	4,14E-02	1,54
Ggt1	gamma-glutamyltransferase 1 //	4,06E-03	1,40473	2,86E-02	1,68
Lyst	lysosomal trafficking regulator //	2,32E-04	1,3983	6,21E-02	2,01
Dock7	dedicator of cytokinesis 7 //	8,20E-06	1,38823	3,58E-03	1,44
Pldn (Bloc1s6)	biogenesis of organelles complex-1, subunit 6, pallidin //	1,32E-03	1,36268	2,97E-01	1,12
Ap3d1	adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit //	3,49E-06	1,36231	8,85E-02	1,33
Fgfr2	fibroblast growth factor receptor 2 //	5,66E-05	1,35617	2,52E-01	1,16
Pmel	premelanosome protein //	5,48E-05	1,34E+00	3,86E-03	1,58
Myo5a	myosin VA //	4,04E-04	1,31329	1,08E-03	1,49
Sox10	SRY-box containing gene 10 //	2,04E-03	1,31051	7,60E-01	1,04
Atox1	ATX1 (antioxidant protein 1) homolog 1 (yeast) //	2,10E-03	-1,25662	6,46E-02	-1,56
Polg	polymerase (DNA directed), gamma //	5,04E-04	-1,26538	3,03E-01	1,09
Rps19	ribosomal protein S19 //	2,98E-03	-1,28526	2,70E-02	-1,2
Polh	polymerase (DNA directed), eta (RAD 30 related) //	1,25E-03	-1,29024	1,37E-02	-2,04
Zbtb17	zinc finger and BTB domain containing 17 //	2,33E-03	-1,29293	7,01E-02	-1,56
Hs2st1	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1 //	4,81E-04	-1,33287	5,93E-02	-1,26
Bmpr1a	bone morphogenetic protein receptor, type 1A //	4,45E-06	-1,3631	2,49E-02	-1,46
Pdgfc	platelet-derived growth factor, C polypeptide //	3,69E-03	-1,36528	4,64E-03	-1,38
Oat	ornithine aminotransferase //	9,37E-05	-1,38593	3,08E-01	-1,01
Atp7a	ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide //	1,45E-04	-1,3947	8,19E-02	-1,52
Ercc2	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, comp //	1,54E-03	-1,39981	1,98E-02	-1,3
Smarca5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of //	1,62E-04	-1,41931	4,59E-02	-1,36
Eed	embryonic ectoderm development //	9,02E-05	-1,42694	2,03E-02	-1,62
Hps3	Hermansky-Pudlak syndrome 3 homolog (human) //	5,24E-04	-1,43302	3,95E-01	-0,95
Rabggta	Rab geranylgeranyl transferase, a subunit //	2,10E-05	-1,46182	3,29E-02	-1,17
Mc1r	melanocortin 1 receptor //	3,62E-03	-1,4783	1,64E-02	-2,08
Frem2	Fras1 related extracellular matrix protein 2 //	4,54E-03	-1,52755	2,50E-02	-1,18
Itgb1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta) //	9,90E-07	-1,55964	1,32E-02	-1,65
Fzd4	frizzled homolog 4 (Drosophila) //	2,37E-03	-1,57387	2,40E-01	-1,32
Gnpat	glyceronephosphate O-acyltransferase //	1,75E-07	-1,69053	6,09E-03	-1,53
Grif1	glucocorticoid receptor DNA binding factor 1 //	2,82E-06	-1,73243	5,00E-03	-1,72
Gnaq	guanine nucleotide binding protein, alpha q polypeptide //	7,57E-07	-1,75126	1,19E-02	-2,05
Hells	helicase, lymphoid specific //	1,08E-04	-1,84548	1,25E-03	-6,01
Sfxn1	sideroflexin 1 //	5,55E-06	-1,8681	5,40E-03	-2,12
Myo7a	myosin VIIA //	1,04E-06	-2,12606	4,06E-01	-1,07
Gli3	GLI-Kruppel family member GLI3 //	2,88E-06	-2,14757	2,37E-03	-2,52
Brca2	breast cancer 2 //	1,58E-03	-2,17773	2,89E-02	-2,7
Vldlr	very low density lipoprotein receptor //	1,56E-03	-2,24	2,92E-02	-3,8
Mgm1	mahogunin, ring finger 1 //	1,28E-08	-6,29	1,98E-03	-7,53

Tabla 2. Valores de FCh y p para los genes de la base de datos "Color Genes". Valores de FCh con significancia estadística de los genes de la base de datos *Color Genes* una vez sesgados por FCh > 1,25 y p < 0,05, tanto para la condición de las células mantenidas en cultivo con medio completo como para las que se privaron de SBF durante 24h. Como se puede observar, la magnitud del cambio conserva la tendencia independientemente de las condiciones de crecimiento de las líneas mantenidas en cultivo. Zona verde → sobreexpresión; Zona roja → represión de genes en melan-md1 con respecto al control (-a6). En negrita aquellos genes reguladores de pH comentados en la Introducción.

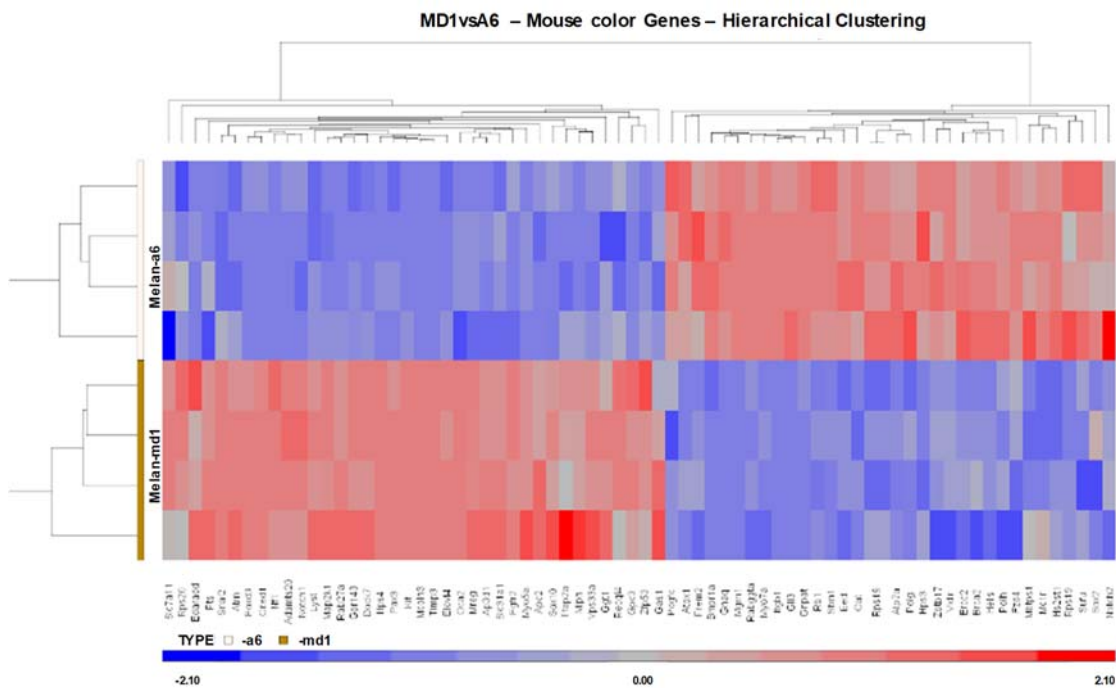


Figura 44. Asociación jerárquica y representación *HeatMap* de los genes de pigmentación diferencialmente expresados entre las células melan-a6 y melan-md1. Tras sesgar los resultados de expresión diferencial de los genes de pigmentación de la base de datos *Mouse Color Genes* por los valores de FCh y p, se representaron los datos de las dos líneas celulares con el software de *Partek Genomic Suites* en forma de *HeatMap*. Se observa tanto la reproducibilidad de las réplicas biológicas como la distinción entre los genes reprimidos o sobreexpresados en cada línea celular respecto a la otra.

3.2.2. Validación de la expresión génica diferencial de las células *mahoganoïdes* mediante qPCR.

A pesar de la robustez que indica el programa *Partek*, quisimos validar los resultados y refinarlos mediante una tecnología más cuantitativa y a pequeña escala. Un modo de validación general consiste en confirmar la expresión diferencial de algunos genes mediante qPCR, para comprobar que, al menos, el sentido del cambio se conserva. Por ello, en un primer análisis, elegimos algunas de las dianas que aparecen en la **tabla 2** y diseñamos oligonucleótidos de qPCR específicos que cumplieran con los requisitos de longitud, apareamiento de bases y Tm descritos en la sección de Material y Métodos. En primer lugar, 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 RNA empleada en el *Array*. Los resultados del porcentaje de eficiencia de alineamiento de los oligonucleótidos usados para las dianas seleccionadas se muestran en la **tabla 3**. Los oligonucleótidos con eficiencias correctas se emplearon para calcular la variación de la expresión de dichos genes (FCh) en los melanocitos melan-md1 respecto a las células control melan-a6 por qPCR, y los resultados obtenidos se muestran también en la **tabla 3**.

Gen	<i>Mgrn1</i>	<i>Tyr</i>	<i>Tyrp1</i>	<i>Mitf</i>	<i>Atp6v0d2</i>	<i>Ctns</i>	<i>Mcoln3</i>	<i>Rpl35</i>
Fold Change (array)	-7.53	1.17	1.20	1.20	111.14	1.88	138.49	-1.00
Eficiencia de Cebadores (%)	97.5	112.5	80.5	93.22	87.38	120	128.5	102
Fold Change (qPCR)	-12.0	0.42	0.38	0.38	$5.8 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^2$	$2.4 \cdot 10^4$	1

Tabla 3. Validación de la expresión diferencial de algunos genes relacionados con la pigmentación de los melanocitos mediante qPCR. Las variaciones de la expresión se normalizaron considerando el gen *Rpl35* como gen constitutivo, utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (ver en Material y Métodos). 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.

Es importante destacar que muchos de los transportadores relacionados con la regulación del pH no se seleccionaron ni validaron ya que no se observó variación de la expresión génica en los datos del análisis mediante micromatrices.

Para cada uno de los genes, la tabla anterior incluye los valores de FCh obtenidos mediante las dos tecnologías: la hibridación de la micromatriz (condiciones –SBF/TPA) y la qPCR. Observamos que el sentido de la variación es el mismo. Sin embargo, esta variación es en ocasiones mayor en valor absoluto cuando se cuantificó por qPCR. En conjunto, estos resultados validan la expresión diferencial observada para dichos genes en el *Array*, y por extrapolación, los resultados del mismo.

3.2.3. Análisis computacional de la expresión génica diferencial de las células *mahoganoides* mediante GSEA.

El GSEA (del inglés Gene Set Enrichment Analysis) es un software de acceso público que permite analizar los metadatos obtenidos en un experimento de expresión génica diferencial mediante la comparación con librerías o *sets* de genes. Estos paquetes de genes tienen en común alguna propiedad funcional o estructural. El software está en constante actualización desde el *Broad Institute*, un organismo del *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) de EEUU, y permite comparar los resultados de expresión génica diferencial de cualquier organismo vivo, independientemente de la casa comercial de la plataforma de *Array* empleada. Posee alrededor de 18.000 sets de genes agrupados en 8 colecciones. Las colecciones o carpetas se denominan:

- H : Hallmark gene sets,
- C1: Positional gene sets,
- C2: Curated gene sets,
- C3: Motif gene sets,
- C4: Computational gene sets,
- C5: GO gene sets,
- C6: Oncogenic signatures y,
- C7: Immunologic signatures.

El análisis computacional determina si existe “a priori” concordancia significativa con la expresión de algún set de genes por una parte y las diferencias en la expresión génica entre dos estados biológicos o fenotipo (en nuestro caso las células melan-md1 y las melan-a6). Tras preparar los archivos necesarios según las instrucciones del GSEA *user guide*, centramos nuestro análisis en la comparación con los sets de genes incluidos en la colección C5, que contiene a la vez tres subcarpetas, que nos podían aportar información sobre la fisiología celular en general y sobre la regulación del pH en particular:

- BP: Biological Process;
- CC: Cellular Components y
- MF: Molecular Function.

La lista de los 10 procesos biológicos más significativos tras el análisis de nuestro Array con la colección génica “BP” está detallada en la **tabla 4**.

	GS (follow link to MSigDB)	Size	EN	NES
1	GO_RESPONSE_TO_TYPE_I_INTERFERON	49	0.82	2.37
2	GO_REGULATION_OF_OLIGODENDROCYTE_DIFFERENTIATION	28	0.78	2.04
3	GO_ADAPTATIVE_IMMUNE_RESPONSE	111	0.61	2.02
4	GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_VIRAL_GENOME_REPLICATION	41	0.71	1.99
5	GO_T_CELL_MEDIATED_IMMUNITY	23	0.81	1.98
6	GO_RESPONSE_OF_INTERFERON_BETA	20	0.80	1.97
7	GO_MONOCYTE_DIFFERENTIATION	15	0.85	1.96
8	GO_DEFENSE_RESPONSE_TO_VIRUS	124	0.59	1.96
9	GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_LEUKOCYTE_PROLIFERATION	57	0.66	1.96
10	GO_REGULATION_OF_PH	88	0.62	1.96
	⋮	⋮	⋮	⋮
18	GO_REGULATION_OF_CELLULAR_PH	74	0.61	1.90

Tabla 4. GSEA con los resultados del Array de expresión diferencial de las células melan-md1 vs melan-a6 y los sets de genes de la colección C5 (subcarpeta BP). La lista está ordenada de forma priorizada desde el 1 al 10 para los eventos celulares más probables compatibles con el fenotipo *mahoganoide* (incluyendo el 18, también relevante para nuestro estudio). “Size” indica el número de genes contenido en cada *signature* o set génico. ES y NES indican el *enrichment score* y el *normalized enrichment score*, y representan el grado de enriquecimiento relativo de un set en el fenotipo de estudio.

Como se puede observar, entre los procesos celulares ordenados por el valor de *NES* (grado de enriquecimiento de un conjunto para un fenotipo) encontramos fenómenos relacionados con la respuesta del sistema inmunológico y con la regulación del pH. Esta última *signature*, o firma génica, aparece en posición 10 y 18 de los 4553 sets de genes incluidos en esta colección y confirma nuestras sospechas sobre el papel relevante del pH en la regulación de la actividad melanogénica de las células *mahoganoides*. Concretamente, la firma génica denominada

“Regulation of pH” (número 10) y su enriquecimiento en las células melan-md1 frente melan-a6 está representada en el gráfico de la **figura 45**.

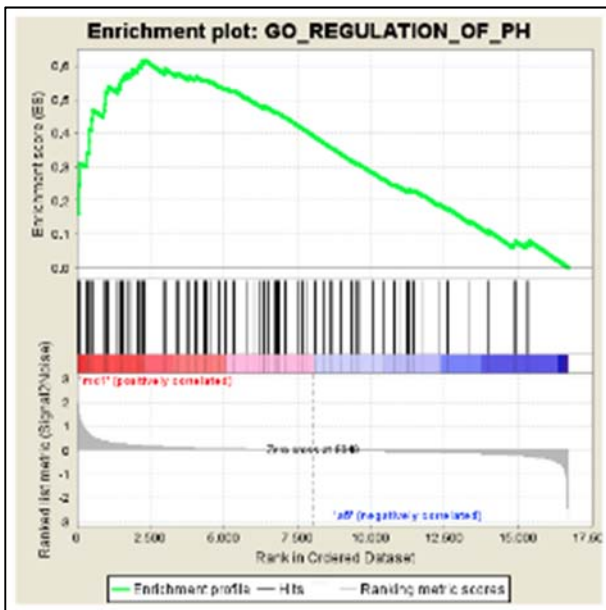


Figura 45. Diagrama del enriquecimiento génico de las células melan-md1 respecto a las células melan-a6 en el set de genes reguladores de pH. La gráfica muestra un aumento de expresión, muy significativo, del conjunto de genes situados a la izquierda en el código de barras (cada barra corresponde a un gen) en las células *mahoganoides*. Estos son los genes que contribuyen al enriquecimiento de este set en este fenotipo.

La **figura 46** contiene el *HeatMap* de los genes incluidos en este set “Regulation of pH”, y corresponde a los representados en el código de barras de la **figura 45**.

Como se observa en la **figura 46**, los genes de la parte alta de la lista están sobreexpresados en la línea melan-md1 respecto a la línea melan-a6 y los de la parte baja están reprimidos en la línea melan-md1 respecto a la línea de melanocitos control. Los 23 primeros de la lista son los que el programa de análisis considera que contribuyen al enriquecimiento génico. El primer candidato *ATP6V0d2*, es una subunidad de la FV-ATPasa muy expresada en LRO y que contribuye a acidificar estos orgánulos. Además, es la diana transcripcional con el FCh mayor en valor absoluto (aproximadamente 110) de los que están diferencialmente expresados entre las células *mahoganoides* y las células control (ver **tabla 3**).

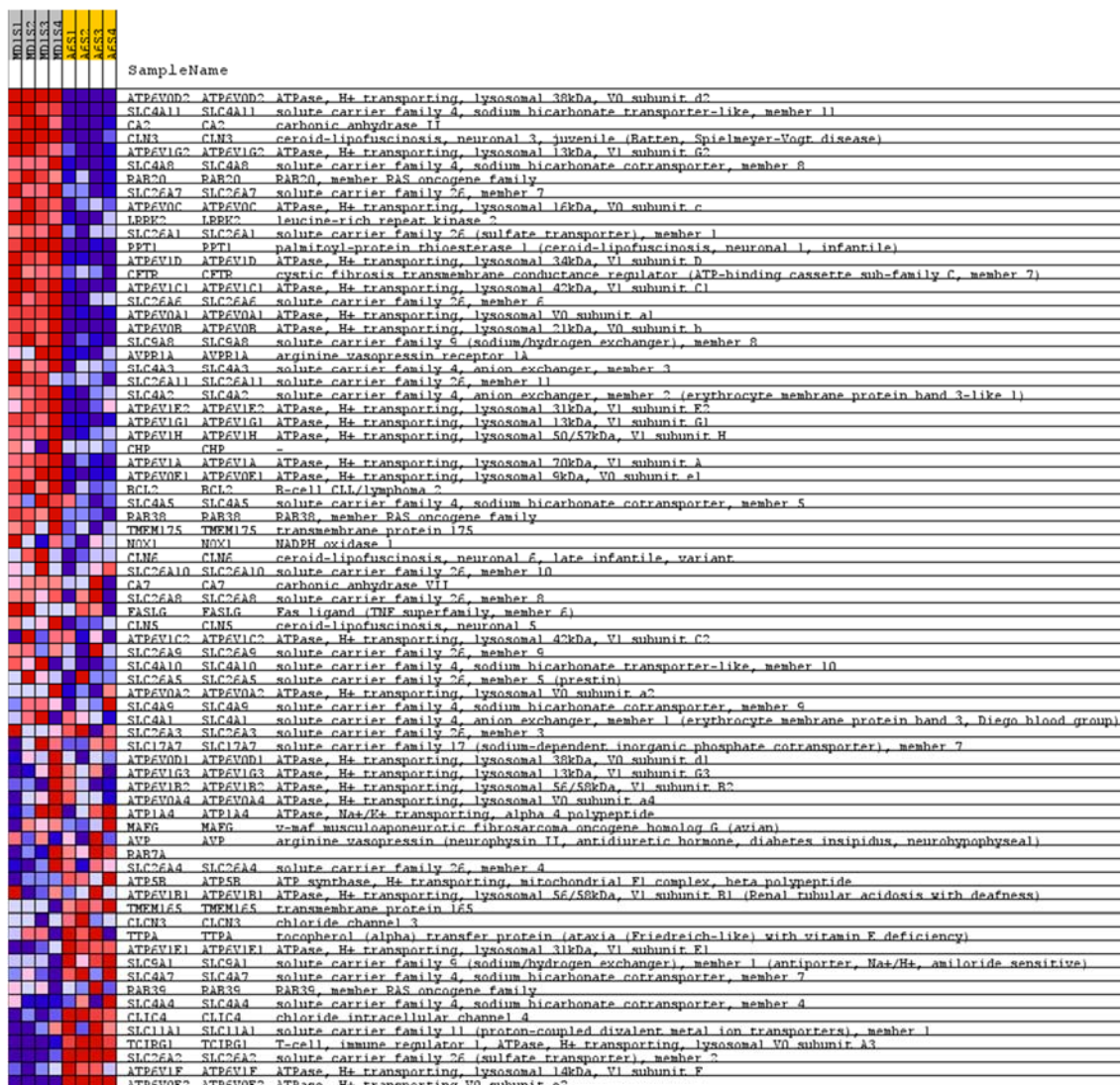


Figura 46. HeatMap de los genes incluidos en la firma génica molecular de GSEA “Regulation of pH” para nuestro array de expresión de las células melan-md1. El color rojo indica sobreexpresión y el azul represión génica en la línea celular indicada arriba (gris → -md1 y amarillo → -a6).

El análisis computacional con el software GSEA también permite realizar una comparación con firmas génicas seleccionadas dentro de las colecciones mediante el uso de la búsqueda dirigida con palabras clave. Cuando buscamos los sets de genes que contenían en su descriptor la palabra “pH” encontramos 19 firmas génicas (las detalladas en **tabla 5**) que empleamos para realizar el análisis de enriquecimiento del transcriptoma diferencial de melan-md1 frente melan-a6. De ellos, solo 12 cumplieron con los filtros impuestos (contener un número de genes comprendido entre 15 y 500, entre otros aspectos). Como se puede comprobar en la **figura 47**, que muestra el esquema tanto de las condiciones como del resultado del análisis, los 12 sets de genes resultaron enriquecidos en las células melan-md1 frente a las células melan-a6. Este resultado refuerza la importancia del fenómeno de la regulación del pH como aspecto distintivo de los melanocitos carentes de expresión de Mgrn1.

Por lo tanto, la herramienta GSEA nos permitió confirmar varios aspectos de las células que no expresan *Mgrn1* desde el punto de vista transcripcional:

1. Las células melan-md1 poseen una expresión génica muy diferente a la de las células melan-a6, a pesar de que derivaron de ellas por mutación natural en el gen de *Mgrn1* y que desde que se caracterizaron no se ha descrito otra alteración génica causal.
2. La regulación del pH es uno de los principales fenómenos celulares distintivos de las células *mahoganoides*.
3. Esta variación del pH podría ser consecuencia de la acción de, al menos, 23 genes diferencialmente expresados en las células melan-md1.

	GRUPO DE GENES	Tamaño
1	GO_ACID_PHOSPHATASE_ACTIVITY	11
2	GO_ACIDIC_AMINO_ACID_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	14
3	GO_ACIDIC_AMINO_ACID_TRANSPORT	21
4	GO_BASIC_AMINO_ACID_TRANSPORT	12
5	GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_PH	19
6	GO_CIRCULATORY_SYSTEM_DEVELOPMENT	788
7	GO_LATE_ENDOSOME	213
8	GO_LYTIC_VACUOLE	526
9	GO_PH_REDUCTION	39
10	GO_PHAGOSOME_ACIDIFICATION	27
11	GO_RESPONSE_TO_ACIDIC_PH	21
12	GO_RESPONSE_TO_PH	42
13	GO_VACUOLAR_ACIDIFICATION	15
14	GO_VACUOLE	1180
15	LATE_ENDOSOME	12
16	LYSOSOME	61
17	LYTIC_VACUOLE	61
18	REGULATION_OF_PH	13
19	VACUOLE	69

Tabla 5. Listado de las 19 firmas génicas que contienen el término pH en la base de datos GSEA. La tabla incluye el nombre del set de genes, y el número de genes que contiene cada set en los 19 encontrados al buscar con la palabra clave “pH” dentro de los 18.000 sets incluidos en la base de datos.

Enrichment in phenotype: md1 (4 samples)

- 12 / 12 gene sets are upregulated in phenotype md1
- 2 gene sets are significant at FDR < 25%
- 0 gene sets are significantly enriched at nominal pvalue < 1%
- 4 gene sets are significantly enriched at nominal pvalue < 5%
- [Snapshot](#) of enrichment results
- Detailed [enrichment results in html](#) format
- Detailed [enrichment results in excel](#) format (tab delimited text)
- [Guide to](#) interpret results

Enrichment in phenotype: a6 (4 samples)

- None of the gene sets are enriched in phenotype a6
- [Guide to](#) interpret results

Dataset details

- The dataset has 41345 native features
- After collapsing features into gene symbols, there are: 16705 genes

Gene set details

- Gene set size filters (min=15, max=500) resulted in filtering out 7 / 19 gene sets
- The remaining 12 gene sets were used in the analysis
- List of [gene sets used and their sizes](#) (restricted to features in the specified dataset)

Figura 47. Resumen del análisis GSEA dirigido con 19 sets de genes relacionados con la regulación del pH celular. Como se puede observar, los genes de 12 sets utilizados están enriquecidos en el fenotipo *mahoganoide* respecto a las células melan-a6.

La **tabla 5** muestra los sets relacionados con la regulación del pH celular que utilizamos en el análisis, y las gráficas de la **figura 48** representan la priorización de los sets más enriquecidos en el fenotipo *mahoganoide* (desde la izquierda a la derecha desde arriba a abajo) una vez realizado el análisis (se muestran solo los seis primeros).

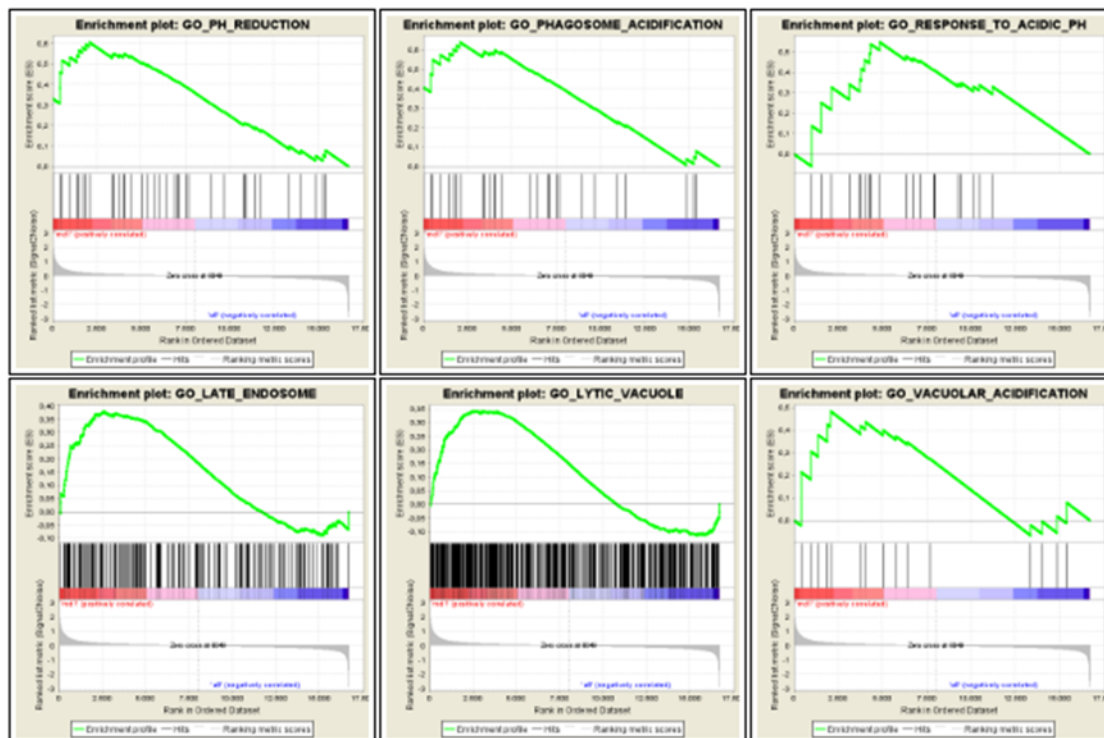


Figura 48. Representación gráfica de las firmas génicas relacionadas con la regulación del pH celular más representativas del fenotipo *mahoganoide*. Como se observa, todas las firmas génicas están enriquecidas en el fenotipo *mahoganoide* independientemente del número de genes y de qué genes contenga cada una.

La **tabla 6** contiene, asimismo, la lista priorizada de los 6 *sets* enriquecidos en melan-md1 con sus valores de p (no todos son estadísticamente significativos). El resto de *sets* (hasta los 12 que empleamos en el análisis) no pasaron el corte de significancia estadística.

	GS (follow link to MSigDB)	Size	ES	NES	NOM p-val
1	GO_PH_REDUCTION	38	0.61	1.56	0.000
2	GO_PHAGOSOME_ACIDIFICATION	27	0.64	1.54	0.000
3	GO_LATE_ENDOSOME	194	0.38	1.37	0.077
4	GO_RESPONSE_TO_ACIDIC_PH	20	0.55	1.34	0.028
5	GO_LYTIC_VACUOLE	476	0.34	1.31	0.000
6	GO_VACUOLAR_ACIDIFICATION	15	0.48	1.21	0.168

Tabla 6. Listado de las 6 firmas génicas que contienen el término pH en la base de datos GSEA priorizadas según su NES tras el análisis de enriquecimiento.

La representación *HeatMap* de los genes incluidos en estas firmas génicas más enriquecidos en las células melan-md1 se muestra en la **figura 49**. En ella se observa en las 4 columnas de la izquierda el nivel de expresión génica de las células melan-md1 y en las de la derecha el nivel de expresión de las melan-a6. El color rojo indica sobreexpresión y el azul representa una disminución del nivel de expresión, siempre tomando las células melan-a6 como referencia. Como se puede observar, tanto los genes de *Atp6v0d2* y *Mcoln3*, previamente comentados como relevantes por ser de los más sobreexpresados y simultáneamente incluidos en la lista de los *Coat Color Genes*, aparecen también en este listado como genes reguladores del pH celular significativamente enriquecidos, por lo que consideramos que podrían ser buenas dianas para confirmar su papel como reguladores de pH, y como consecuencia de la pigmentación, de las células *mahoganoides*.

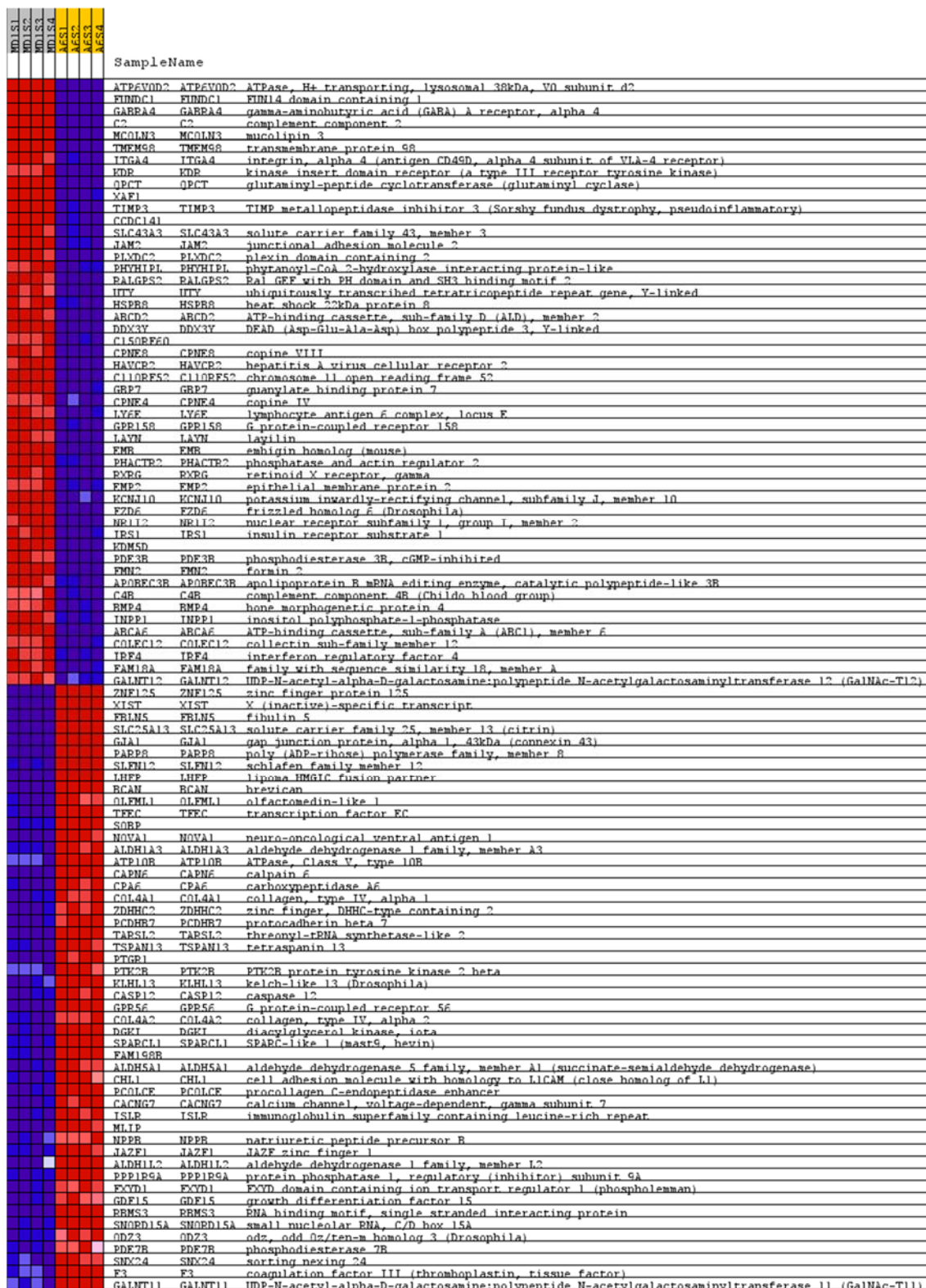


Figura 49. HeatMap de los genes incluidos en los 12 sets de genes de GSEA relacionados con el pH celular para el array de expresión diferencial de las células melan-md1 y melan-a6, que tienen la máxima significancia estadística. El color rojo indica sobreexpresión y el azul represión génica en la línea celular indicada arriba.

Por último, un análisis de los genes enriquecidos, que están incluidos en el mayor número de firmas génicas de la **tabla 6**, nos mostró la presencia de otro gen, CTNS, como posible candidato a tener en cuenta, además de los mencionados arriba (**figura 50**).

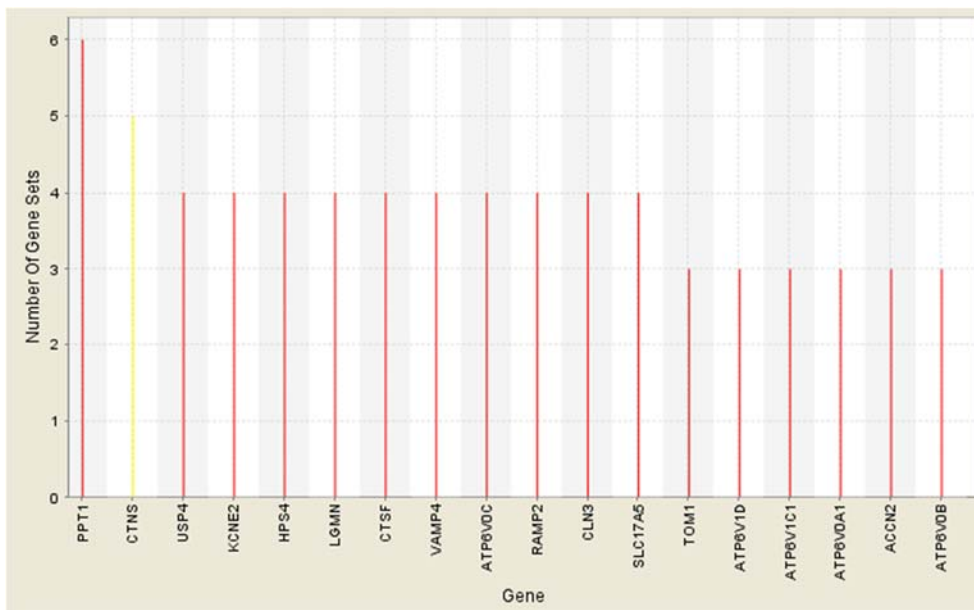


Figura 50. Histogramas que representan la participación simultánea de genes en las diferentes carpetas génicas de la Tabla 6. El eje Y indica el número de sets en los que está incluido un gen concreto.

CTNS codifica una proteína de la membrana lisosomal, expresada también en los melanocitos, que posee una heptahélice cuya función descrita está relacionada con el transporte de protones. Por eso, consideramos que CTNS, junto a ATP6V0d2 y MCOLN3 podrían estar funcionando de forma concertada para regular el pH en las células melan-md1. Esta acción concertada podría promover la basificación de los melanosomas observada y, por tanto, el aumento del contenido de eumelanosomas maduros, que darían lugar a la fuerte melanización de los melanocitos epidérmicos del ratón mahoganoide. Los experimentos que se describen en el capítulo siguiente tuvieron como objetivo verificar, a nivel funcional, la implicación de estos genes en el fenotipo de pigmentación de las células melan-md1.

Para concluir, incluimos en este apartado un diagrama de flujo realizado con todos los resultados anteriores, obtenidos a partir del array de expresión diferencial. En él podemos observar los diferentes niveles analizados, tanto mediante bases de datos masivas como búsquedas dirigidas (**figura 51**).

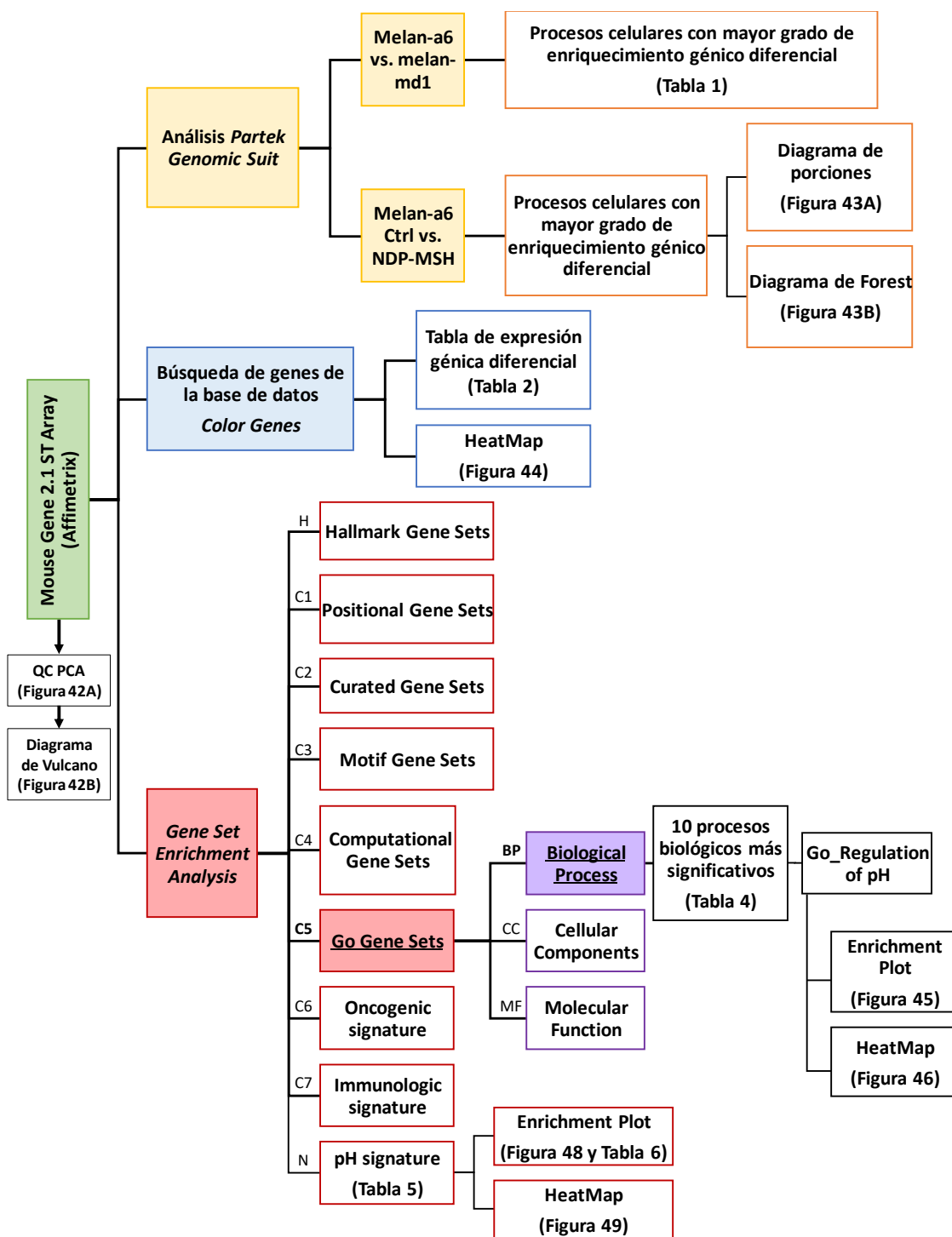


Figura 51. Diagrama de flujo del análisis realizado a los resultados del array de expresión diferencial. Esquema de los softwares y bases de datos empleados en el análisis de los resultados de la hibridación de la matriz de expresión génica con muestras de RNA procedentes de células melan-md1 y melan-a6, en el que se detallan las figuras y las tablas que contienen los resultados más significativos descritos en este capítulo.

CAPÍTULO 4

4. IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS AGUAS ABAJO DE MGRN1 COMO POSIBLES MEDIADORES DEL EFECTO DE MGRN1 SOBRE EL pH.

4.1. Selección de las posibles dianas.

En base a todo lo expuesto hasta el momento, y teniendo en cuenta los datos obtenidos mediante la micromatriz de Affimetrix y el análisis de los mismos mediante el programa GSEA, aparecen como posibles candidatos los siguientes genes:

- ***Atp6v0d2***, el gen correspondiente a la subunidad d2 de la V-ATPasa, recogido tanto en el paquete de “regulación del pH” como en el paquete de “regulación del pH celular”;
- ***Mcoln3***, que codifica la proteína mucolipina 3, en los paquetes de “regulación de pH” y “diferenciación de células pilosas”; y
- ***Ctns***, cistinosina, también implicada en la regulación del pH y del transporte de cisteína (Cys) de acuerdo con datos bibliográficos.

Estos genes están sobreexpresados en las células *mahoganoides* melan-md1, con respecto a las células control melan-a6. Antes de proceder a su validación funcional se confirmó su sobreexpresión mediante qPCR. Así, comprobamos que en condiciones basales las células melan-md1 presentan una fuerte sobreexpresión de estos genes (**figura 52**). Además, verificamos también su inducción en las células melan-a6 silenciadas para *Mgrn1* (**figura 53**) y en los modelos CRISPR-Cas9 de células melan-a6 y de células B16F10 (**figura 54**). En este caso se detectó el aumento de expresión de los genes *Mcoln3* y *Atp6v0d2* para las CRISPR-Cas9 melan-a6 (**figura 54A y 54B**), habiendo sido analizado también *Ctns* sin observar diferencias significativas entre el control y los clones estudiados (no mostrado). Además, se detectó un aumento en la expresión de *Atp6v0d2* en las células CRISPR-Cas9 B16F10 (**figura 54C**), aunque en este caso no se observan diferencias significativas entre el control y los clones seleccionados para *Mcoln3* y *Ctns* (no mostrado).

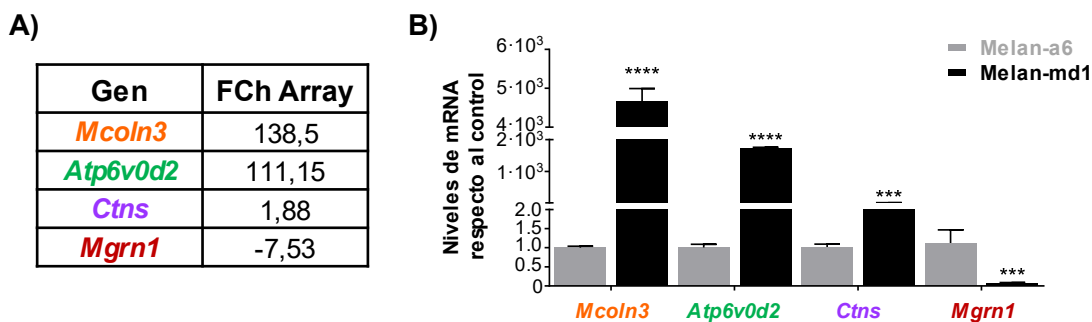


Figura 52. Análisis de genes reguladores de pH regulados por *Mgrn1* en células de ratón melan a6- y melan-md1. A) Tabla indicativa de los cambios de expresión de los genes de interés en cuanto a FCh del análisis de micromatriz (condición –SBF/TPA) en células melan-md1 en comparación con las células melan-a6. B) Niveles de expresión de los genes de interés analizados por qPCR en las células melan-md1 *mahoganoideas*, en relación con la expresión en las células control melan-a6, a las que se asigna el valor 1.

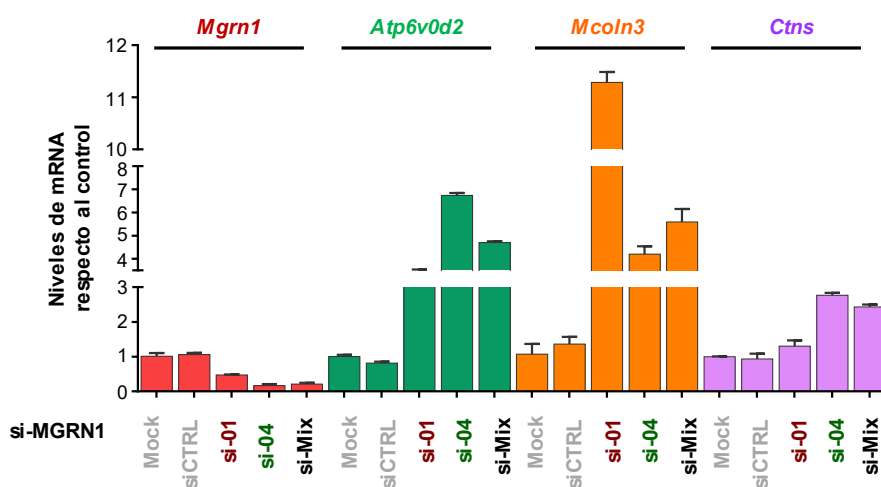


Figura 53. Análisis del efecto de silenciar *Mgrn1* en células melan-a6 control sobre los niveles de expresión de genes reguladores de pH. Niveles de expresión de los genes de interés analizados por qPCR en células melan-a6 silenciadas con siMGRN1 durante 72 h. Genes testados: *Mgrn1* como control de silenciamiento; *Atp6v0d2*; *Mcoln3* y *Ctns*. La figura muestra niveles relativos de expresión, tomando como unidad el valor determinado en células melan-a6 tratadas con vehículo, pero sin ningún siRNA (Mock). siCTRL indica células tratadas con siRNA control cuya secuencia no debe hibridar en ningún mRNA. Se realizaron 3 ensayos independientes con triplicados cada uno.

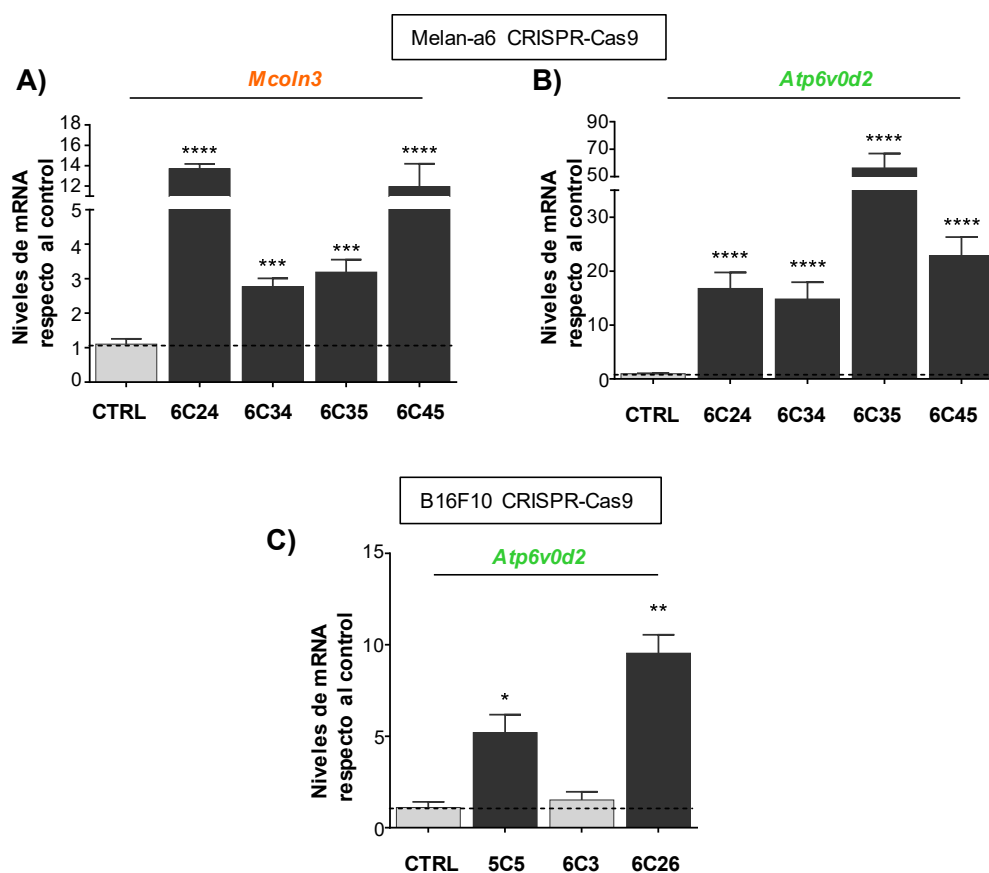


Figura 54. Análisis de la expresión de genes y reguladores de pH en células CRISPR-Cas9 melan-a6 y B16F10. Análisis del gen A) *Mcoln3* y B) *Atp6v0d2* en células CRISPR-Cas9 melan-a6. C) Análisis del gen *Atp6v0d2* en células CRISPR-Cas9 B16F10. Recuérdese que el clon 6C3 conserva la expresión de *Mgrn1*, por lo que es equiparable al control. Se realizaron 3 ensayos independientes, con triplicados cada uno.

En conjunto, estos datos demuestran que la ausencia de *Mgrn1* regula positivamente la expresión del gen *Atp6v0d2*, y quizá también la de los genes *Mcoln3* y *Ctns*. En concreto, la sobreexpresión de los mismos observada por tecnología de micromatrices se verificó en todos los casos tras silenciamiento de *Mgrn1* en células melan-a6. La regulación de *Atp6v0d2* se observó también tras anulación de la *Mgrn1* por tecnología CRISPR-Cas9. Para *Mcoln3* y *Ctns*, los resultados obtenidos mediante esta técnica fueron menos concluyentes, pero dada su sobreexpresión por silenciamiento transitorio de *Mgrn1* mediante siRNA, los consideramos también candidatos de interés. Por ello se introdujeron también en los análisis funcionales que se describen a continuación.

4.2. Efecto de *Atp6v0d2* sobre la pigmentación y el cambio de pH.

El melanosoma es un orgánulo del linaje lisosomal²⁷ y por tanto es de esperar que su lumen presente un pH ácido. En los lisosomas, la acidificación del lumen, necesaria para su función, se produce mediante una V-ATPasa que bombea protones desde el citosol al interior del orgánulo.

Como ya hemos comentado con anterioridad, tirosinasa, la enzima limitante de la melanogénesis, exhibe una actividad óptima a pH neutro, siendo menos activa en orgánulos que presentan pH ácidos ^{236,237}. Así, la acidificación del interior de los melanosomas inhibe la melanogénesis ^{76,237}. Por ello, resulta bastante contraintuitivo observar la fuerte sobreexpresión de una subunidad de la ATPasa en las células melan-md1, cuyos melanosomas son menos ácidos y están más pigmentados, de acuerdo con los resultados anteriormente expuestos. En este sentido, es necesario remarcar que la acidificación regula la biogénesis de los melanosomas ya que el tráfico endocítico depende de una acidificación progresiva. De hecho, la acidificación de los lisosomas parece estar implicada en la morfogénesis y biogénesis intraorganular, regulando la invaginación de la membrana ²³⁸ y el crecimiento del orgánulo. ^{239,240}. Además, los melanosomas acumulan en el lumen unas estructuras fibrilares estriadas donde se deposita la melanina, que se forman por procesamiento de Pmel17. La formación de estas estructuras requiere un medio acidificado, ya que el procesamiento de Pmel17 es sensible a la inhibición de V-ATPasa y al tratamiento con NH₄Cl ³⁵. Por tanto, la acidificación de los melanosomas en los estadios previos a la maduración es un requisito para la biogénesis y desarrollo de melanosomas maduros.

Por otra parte, las V-ATPasas son agrupaciones multimoleculares complejas, con una estequiometría bien definida de las distintas subunidades que la forman. Tal y como se comentó en la introducción, el ensamblaje de los dominios principales de ATPasas, V₁ y V₀, constituye un mecanismo de control importante de la actividad de estas bombas de protones. Podría postularse que una sobreexpresión de algunas de las subunidades que contactan con los dos dominios puede promover la disociación del complejo activo, al unirse una de dichas subunidades a cada dominio en lugar de una única subunidad a los dos dominios, actuando como andamio molecular. En este escenario, la sobreexpresión de alguna subunidad sí podría conducir a una pérdida de función y, por tanto, a una basificación de los orgánulos intracelulares.

Así, consideramos interesante estudiar el papel de la proteína ATP6V0D2 en los melanosomas de los melanocitos *mahoganoides* melan-md1. En un primer paso, quisimos corroborar la sobreexpresión del gen a nivel de proteína. Tras tinción inmunoquímica vimos mayor cantidad de proteína ATP6V0D2 en las células *mahoganoides* melan-md1 que en las células control melan-a6, como se puede observar en las imágenes de microscopía confocal (**figura 55A**) y en la cuantificación de intensidad de estas imágenes mediante el software ImageJ (**figura 55B**). También fue notable el aumento de expresión de ATP6V0D2 en células melan-md1 analizado mediante Western blot en relación con las melan-a6 (**figura 55C**).

Es importante remarcar que en las imágenes de microscopía confocal se observó un marcaje punteado en melan-a6 (flechas en blanco). Este marcaje es consistente con una localización de la proteína en orgánulos como lisosomas o melanosomas. No obstante, en la mayoría de las células melan-md1 teñidas con el anticuerpo αATP6V0D2 el marcaje se localizó

preferentemente en la región perinuclear (flechas amarillas) y fue prácticamente indetectable en las prolongaciones dendríticas. Esta localización subcelular parece consistente con la menor expresión de la proteína en melanosomas maduros frente a los orgánulos en formación, ya descrita por otros autores ²⁴¹.

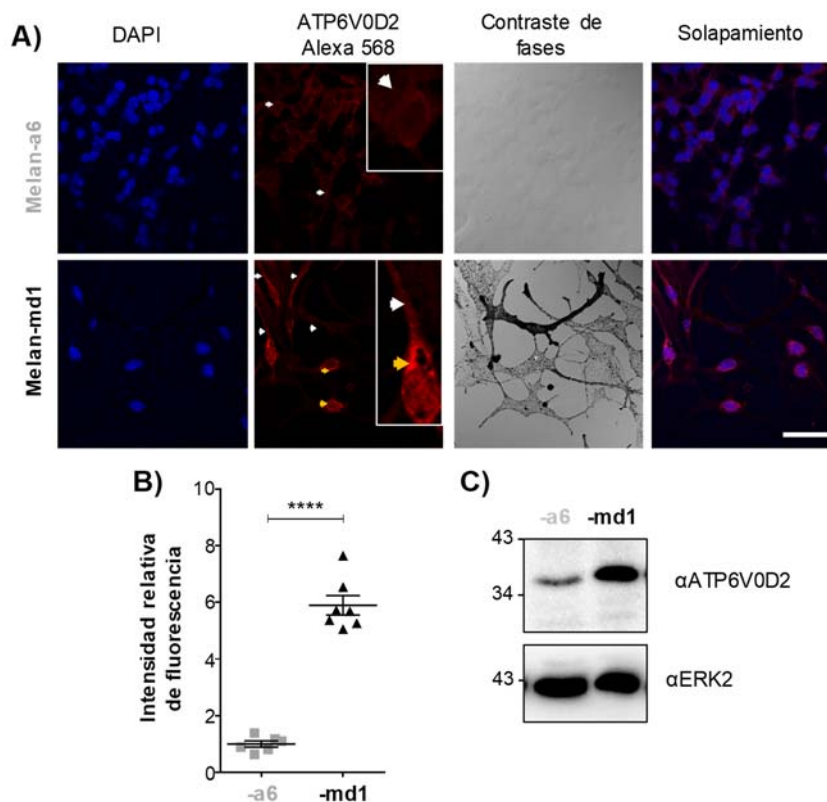


Figura 55. Expresión del gen *Atp6v0d2* en células melan-a6 y melan-md1. A) Imágenes de microscopía confocal tras marcaje de *Atp6v0d2* en células melan-a6 y melan-md1. Células fijadas con PFA 4% e incubadas con α -ATP6V0D2 como anticuerpo primario, usando un anticuerpo secundario marcado con Alexa 568. Núcleos marcados con Dapi. Las flechas blancas señalan un marcaje punteado característico de orgánulos citosólicos mientras que las amarillas indican un marcaje perinuclear. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en células melan-a6 y melan-md1 sobre imágenes de confocal. Los datos se expresan como intensidad relativa respecto al control (células melan-a6) C) Western blot que muestra el perfil electroforético de la proteína ATP6V0D2 tanto en melan-a6 como en melan-md1 usando un anticuerpo α -ATP6V0D2. Se empleó α -ERK2 como control de carga.

A continuación, quisimos comprobar si se producían variaciones en la actividad de la enzima tirosinasa tras silenciar del gen *Atp6v0d2* en células melan-md1. Para ello usamos diversos siRNA específicos de ratón para el gen en cuestión y analizamos la actividad tirosina hidroxilasa *in vivo* tras 72 h de silenciamiento. Observamos pocas diferencias en la actividad enzimática con cualquiera de los 3 siRNAs empleados, que sin embargo rebajaron fuertemente la expresión de *Atp6v0d2* (figura 56). Si acaso, se detectó una tendencia al aumento de la actividad tirosina hidroxilasa tras el silenciamiento del gen, aunque solo existieron diferencias significativas en la condición de silenciamiento de siAtp6v0d2-A.

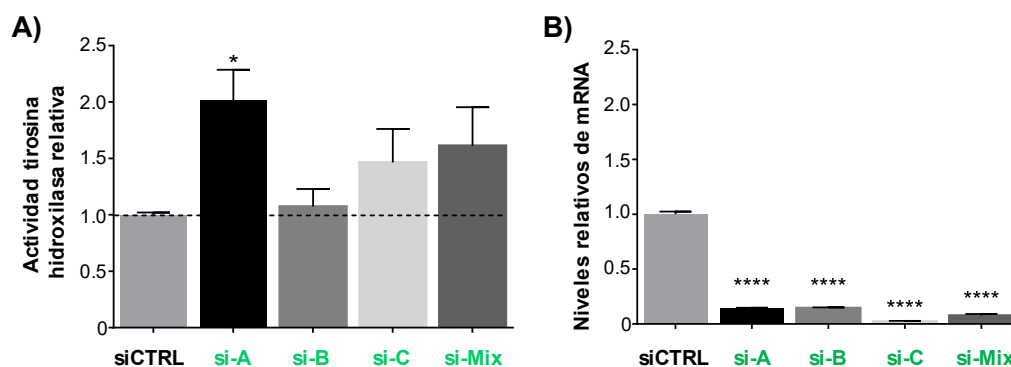


Figura 56. Actividad tirosina hidroxilasa tras silenciamiento del gen *Atp6v0d2* en células melan-md1. A) Actividad tirosina hidroxilasa de células melan-md1 tratadas con distintos siRNA dirigidos contra el gen *Atp6v0d2*. Los resultados, normalizados por proteína, se expresaron en relación al control de células melan-a6. B) Verificación del silenciamiento del gen *Atp6v0d2* en células melan-md1 mediante qPCR.

En resumen, los datos preliminares obtenidos para *Atp6V0d2* son los siguientes:

- El gen está regulado negativamente por *Mgrn1*, de manera que se sobreexpresa en las células *mahoganoideas* o en las células melan-a6 tras la represión de *Mgrn1* con siRNA o CRISPR-Cas9.
- La proteína también está sobreexpresada en células *mahoganoideas*, pero en éstas su localización celular es preferentemente perinuclear y no parece asociarse a los melanosomas más melanizados y por tanto más maduros.
- La represión de la expresión de *Atp6V0d2* en células melan-md1 produce un escaso efecto sobre la actividad tirosina hidroxilasa medida *in vivo* consistente en una ligera estimulación de dicha actividad.

Estos resultados pueden interpretarse en función del conocimiento actual de la biología de la V-ATPasa en los melanocitos. Existen algunos trabajos que asignan a estas V-ATPasa un papel en la regulación de la biogénesis y maduración de los melanosomas, a través de la modulación del pH del lumen melanosomal. Como ya hemos comentado, Fuller y colaboradores²²² describieron en 2001 que el incremento de actividad tirosinasa observada en los melanocitos de piel de individuos de raza negra respecto a los de origen caucásico podría deberse a que los melanosomas de estos últimos son orgánulos más ácidos que los de los primeros, como consecuencia de un funcionamiento más eficiente de las V-ATPasa. La inhibición farmacológica de estas bombas de protones aumentó significativamente la actividad tirosinasa de los melanocitos caucásicos, pero no de los de individuos negros. Sin embargo, este mismo grupo, demostró que tanto unos melanosomas como otros expresan la V-ATPasa²⁴² además de otras proteínas transportadoras de protones de la familia de los SLC (NHE-7 and NHE-3), por lo que concluyeron que el pH melanosomal debe ser el resultado de la actividad de varias proteínas que actúan conjuntamente. Otro grupo describió que la V-ATPasa melanosomal de melanocitos murinos expresa la isoforma a3 y colocaliza con el marcador Pmel17²⁴³. Sin embargo, esta subunidad no colocalizó con los melanosomas más melanizados y menos ácidos, que no quedaron marcados

con la sonda DAMP, a diferencia de los premelanosomas o melanosomas inmaduros, fuertemente marcados con DAMP. Por ello, concluyeron que la expresión de la V-ATPasa se va perdiendo paralelamente a la maduración de los melanosomas y a la basificación de los mismos. Por otro lado, Nuckels y colaboradores ²⁴⁴ propusieron incluso un papel para estas V-ATPasas como reguladores de la proliferación, supervivencia y morfogénesis de los fotorreceptores y pigmentación del epitelio retinal pigmentado del ojo (RPE) en el modelo animal del pez cebra. Mediante la expresión de varias isoformas mutantes de distintas subunidades de la V-ATPasa, mostraron que estos animales desarrollan un albinismo oculocutáneo con defectos en la formación y/o la supervivencia de los melanosomas y malformaciones en el RPE que comprometen la distribución normal de los melanosomas, por lo que podrían ser también la causa molecular de algunas patologías oculares humanas. En este mismo contexto, van der Poel y colaboradores ²⁴⁵ mediante el uso de la línea de melanocitos mutantes GM95, incapaces de sintetizar glicoesfingolípidos, demostraron que el lumen de los melanosomas de estos melanocitos posee un pH más básico que el de los melanocitos control, así como una menor actividad ATPasa. Por eso, concluyeron que dicha actividad requiere la asociación con lípidos de esta naturaleza, de modo que su ausencia impide la biogénesis melanosomal normal, como consecuencia de una falta de acidificación de estos orgánulos. En el mismo sentido, Dooley y colaboradores ⁷⁹ demostraron hace unos años que es posible rescatar el fenotipo pigmentado de determinados melanosomas albinos mediante la inhibición genética o química de las V-ATPasa, al incrementar el pH de lumen de estos orgánulos.

Por último, recientemente se ha descrito un método de purificación de melanosomas intactos de melanocitos de origen porcino que carece de contaminación con otros orgánulos relacionados ²⁴¹. Solamente los premelanosomas aislados con este modo conservan la expresión y actividad de la bomba de protones V-ATPasa mientras que los melanosomas muy melanizados carecen completamente de expresión de esta proteína.

En conjunto, los trabajos comentados arriba demuestran que la expresión y actividad de la V-ATPasa es necesaria para que tenga lugar una correcta biogénesis melanosomal en los melanocitos epidérmicos y del RPE, aportando la acidificación del lumen que es compatible con la formación de la ultraestructura particular que tienen los premelanosomas y los melanosomas inmaduros. Sin embargo, la maduración de estos últimos conlleva una pérdida de expresión y actividad de la bomba de protones, con lo que tiene lugar un aumento paulatino del pH melanosomal con el consiguiente aumento de la actividad tirosinasa y por tanto del contenido en pigmento del orgánulo.

En conclusión, este modelo sugiere que la expresión de la V-ATPasa sigue una evolución bifásica durante la biogénesis y maduración de los melanosomas. Sería necesaria en las etapas iniciales de la biogénesis del orgánulo, pero la pérdida de expresión o ausencia de actividad sería igualmente necesaria para una completa maduración de estos orgánulos de los melanocitos.

En nuestro caso, puede descartarse que la sobreexpresión de *Atp6v0d2* sea la responsable del incremento de pH melanosomal en células *mahoganoides*. No obstante, nuestros resultados son compatibles con una participación de la proteína en la biogénesis del melanosoma²³⁷. Una vez formado el melanosoma maduro melanogénicamente activo, la proteína sería eliminada del orgánulo, de acuerdo a lo publicado por otros autores²³ y su expresión residual supondría si acaso un cierto nivel de flujo de protones desde el citosol al orgánulo. Así, aunque parece posible que la sobreexpresión de *Atp6v0d2* juegue un papel importante en el fenotipo de pigmentación *mahoganoide*, éste no se relacionaría con la basificación del melanosoma. En consecuencia, nos centramos en los otros posibles candidatos identificados previamente.

4.3. Efecto de *Ctns* sobre la pigmentación y el cambio de pH.

Otro de los posibles candidatos a mediar el efecto de *Mgrn1* en la regulación del pH melanosomal es la cistinosina (CTNS). Ésta viene codificada por el gen *Ctns*, compuesto por 12 exones que codifican los 367 aminoácidos que dan lugar a la proteína, con 7 dominios TM, con una región N-terminal presentando 7 sitios de N-glicosilación y una cola C-terminal²⁴⁶. Es una proteína localizada en los orgánulos del linaje lisosomal^{247,248} y actúa como un transportador de cistina/H⁺, exportando activamente cistina, dímero del aminoácido cisteína, al exterior de los orgánulos gracias a la fuerza impulsora del gradiente de protones. Cuando existen mutaciones en este gen, generalmente deleciones, inserciones, procesamiento alternativo y mutaciones sin sentido^{249,250}, se produce la enfermedad conocida por cistinosis. La cistinosis es una enfermedad rara autosómica recesiva, caracterizada por anomalías en el transporte lisosomal, con lo que se acumula cistina en el interior de éstos. Causa disfunción de varios órganos, siendo el fallo renal el problema más común y más grave^{251,252}. Además, como se indicó anteriormente, los pacientes de cistinosis muestran frecuentemente escasa pigmentación y un mayor contenido en feomelaninas⁶⁹. Estas observaciones sugieren que *Ctns* podría contribuir a un aumento de la síntesis de eumelaninas, hecho característico de los melanocitos *mahoganoides*²⁵³.

Por otra parte, el gen *Ctns* aparece sobreexpresado en las células mahoganoides melan-md1, por lo que quisimos comprobar si la proteína estaba implicada en la activación de la pigmentación en estas células. Para ello, analizamos si la sobreexpresión del mRNA de *Ctns* previamente observada (**figura 52**) se correspondía con un aumento de expresión de la proteína detectable por microscopía confocal (**figura 57**). Pudimos observar mayor cantidad de proteína Ctns en las células *mahoganoides* melan-md1 respecto a las células control melan-a6 (**figura 57A**). Además, cuando se cuantificaron las imágenes con ImageJ (**figura 57B**) se detectó un aumento significativo de la señal de fluorescencia. Por tanto, existe una sobreexpresión evidente de Ctns en células melan-md1 respecto a células-a6. Por otra parte, a diferencia de lo observado previamente para *Atp6v0d2*, en este caso el marcaje fue punteado y se excluyó de la región perinuclear, siendo

mucho más consistente con la localización lisosomal/melanosomal de la proteína descrita por otros autores ⁶⁹.

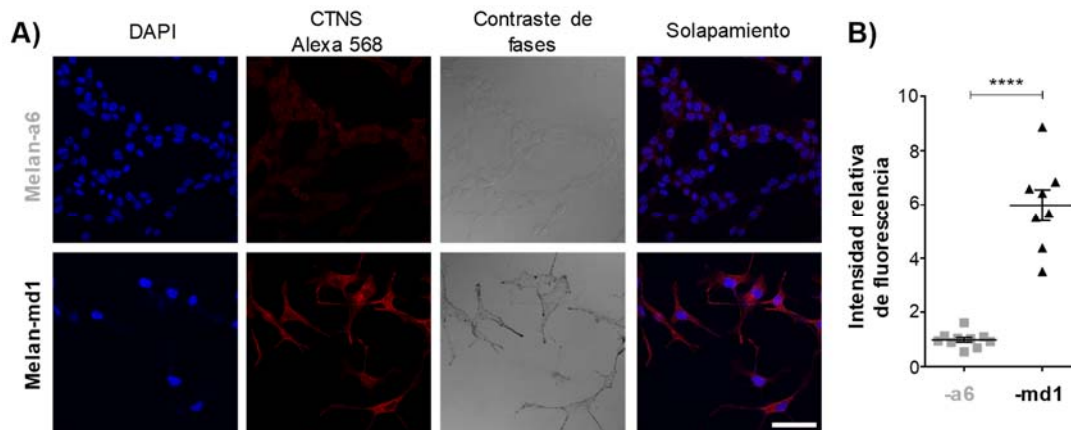


Figura 57. Análisis de la expresión de la proteína Cttn en células melan-a6 y melan-md1. A) Imágenes de microscopía confocal de células melan-a6 y melan-md1 teñidas con anticuerpo α Cttn. Células fijadas con PFA 4% e incubadas con α Cttn como anticuerpo primario y marcadas con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 568. Núcleos marcados con Dapi. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia Alexa 568 en células melan-a6 y melan-md1.

Por otro lado, se analizó la actividad tirosina hidroxilasa tras silenciamiento de *Cttn* con siRNA específico. Para ello, se mantuvieron las células 72 h en presencia de varios siRNA específicos y posteriormente otras 12 h con el sustrato radiactivo para determinar la actividad tirosina hidroxilasa *in vivo*. El tratamiento con siRNA redujo fuertemente la expresión del gen *Cttn* a juzgar por una fuerte disminución de los niveles de mRNA cuantificados por qPCR (**figura 58A**) y por el contenido en la proteína Cttn (**figura 58B**). La represión de *Cttn* se acompañó de un aumento pequeño, pero estadísticamente significativo de la actividad tirosina hidroxilasa (**figura 58C**). Estos datos demuestran que la sobreexpresión de *Cttn* tras represión de *Mgn1* no contribuye a la mayor actividad melanogénica en células *mahoganoideas*, sino que, si acaso, más bien la limita, aunque de forma moderada a juzgar por el pequeño aumento de la actividad tirosinasa tras represión de *Cttn*. Estas observaciones son difíciles de explicar en función a los resultados disponibles y del conocimiento escaso del papel de Cttn en la melanogénesis. De acuerdo con el conocimiento actual de la función de Cttn, la proteína mediaría la salida de cisteína del melanosoma, acoplada al movimiento de un protón desde el lumen al citosol de la célula, a favor de gradiente. Por lo tanto, por una parte, promovería la eumelanogénesis al disminuir el contenido en grupos tiólicos del melanosoma, y por otra, aumentaría la actividad específica de la enzima al disminuir la acidez del orgánulo. No obstante, los experimentos de represión de *Cttn* mediante siRNA no confirman este modelo, ya que, aunque se observó una fuerte disminución de la cantidad de proteína expresada, no se apreció una disminución paralela de la actividad tirosinasa.

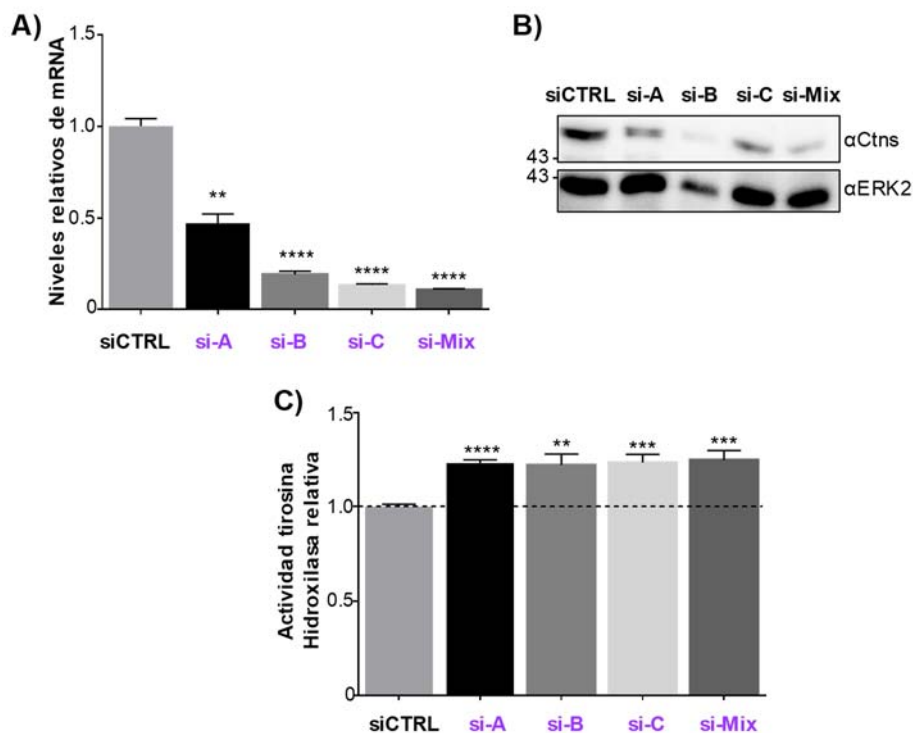


Figura 58. Actividad tirosina hidroxilasa tras silenciamiento del gen *Ctns* en células melan-md1. A) Verificación del silenciamiento del gen *Ctns*, por cuantificación del mRNA correspondiente mediante qPCR. Los datos se refieren al valor de las células tratadas con un siRNA control. B) Western blot que muestra la represión de expresión de la proteína Ctns y C) Actividad tirosina hidroxilasa de células melan-md1 anuladas para el gen *Ctns*, empleando 3 siRNA diferentes y una mezcla de los mismos. Los datos de expresión obtenidos se representaron en relación a células tratadas con siRNA control (siCTRL) a los que se asignó el valor 1.

En cualquier caso, la neutralización de los melanosomas en células *mahoganoïdes* tendría como consecuencia una disminución del gradiente de protones, por lo que es de esperar que en los melanocitos *mahoganoïdes* Ctns presentaría una actividad reducida, ya que es precisamente dicho gradiente lo que promueve la expulsión de cisteína. Esta escasa actividad sería consistente con el pequeño efecto de su represión sobre la enzima tirosinasa. En resumen, los datos presentados parecen descartar la modulación de la expresión de *Ctns* como causa importante de la variación del pH melanosomal en células carentes de *Mgrn1*.

4.4. *Mcoln3* como mediador del efecto de *Mgrn1* sobre el pH melanosomal.

El último de los candidatos que seleccionamos como posibles mediadores del efecto de *Mgrn1* en el pH melanosomal *Mcoln3* que codifica una proteína llamada mucolipina3, de la familia de los canales iónicos, denominados TRPML (del inglés “Transient Receptor Potential channels”). Existen 3 isoformas diferentes de la misma familia (MCOLN1, MCOLN2 y MCOLN3). MCOLN3 se localiza principalmente en los endosomas y lisosomas^{254–258}, y realiza una función crítica en la ruta endocítica.

Las proteínas de la familia de los TRPML son tetrámeros, en los que cada subunidad presenta 6 segmentos transmembrana, y el canal iónico se encuentra entre los segmentos 5 y 6 ²⁵⁹. Los canales TRPML son canales de cationes no selectivos, que conducen principalmente cationes monovalentes y Ca^{+2} del lumen organular hacia el citoplasma ^{255-257,260,261}. MCOLN3 está compuesta por 553 aminoácidos, con una masa molecular típica de 64 kDa, y alrededor de un 75% de similitud con las otras especies de la familia ⁶¹. Por el momento no se han caracterizado enfermedades relacionadas con MCOLN3 en humanos, pero se han descrito dos mutaciones de ganancia de función (Va → A419P; VaJ → A419P+I362T), que producen ceguera y defectos en pigmentación en ratones ^{257,262-264}. A esta mutación se le llama Varitint-Waddler.

Además, estos canales se inhiben en medios extracelulares o lumenales ácidos ^{264,265}, con altas concentraciones de H^+ . Esta inhibición del canal parece relacionarse con un grupo de 3 histidinas (H252, H273 y H283), localizadas en el primer giro extracelular ²⁶⁶. Por ello, nos planteamos la relación existente entre la regulación del pH melanosomal por parte de MGRN1 y el canal de calcio MCOLN3.

Como en los casos de *Atp6v0d2* y *Ctns*, comenzamos por confirmar la sobreexpresión a nivel de mRNA, observada tanto en el análisis con micromatrices de expresión como por qPCR (**figuras 52A y 52B**, respectivamente). Además, el gen *Mcoln3* parece regulado por *Mgrn1*, ya que cuando analizamos su nivel de expresión mediante qPCR en células que han sido anuladas para *Mgrn1*, observamos un aumento de los niveles de mRNA de *Mcoln3* (**figura 53**). La sobreexpresión de *Mcoln3* se demostró también a nivel de proteína, tanto por tinción inmunológica con un anticuerpo específico y comparación de las señales obtenidas en células *mahoganoides* melan-md1 y en células melan-a6, como se puede observar en las imágenes de microscopía confocal (**figura 59A y 59B**) como por Western blot (**figura 59C**).

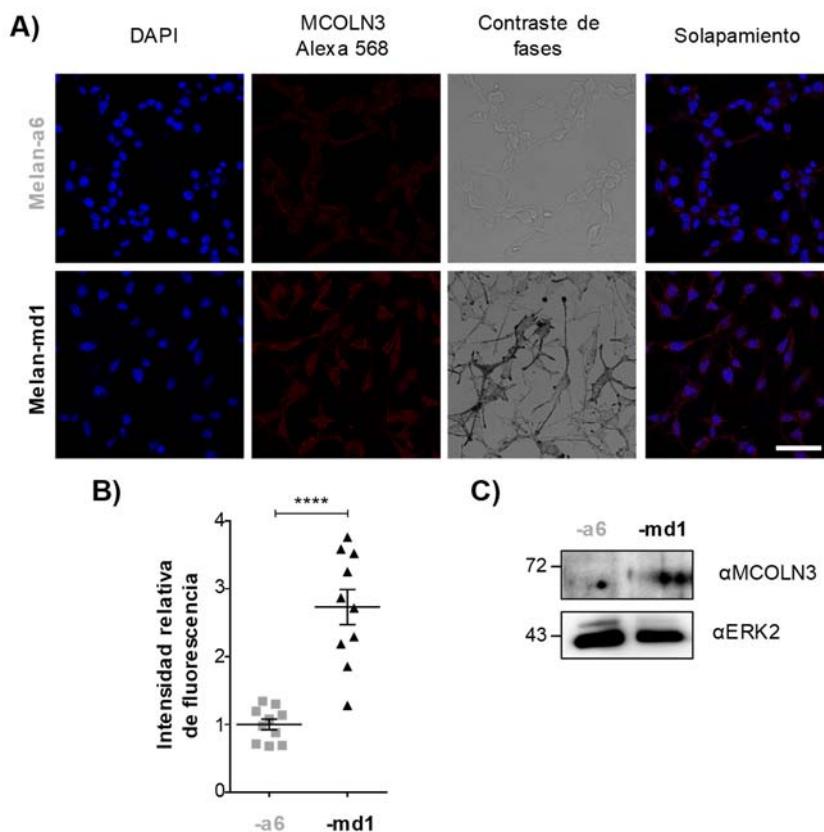


Figura 59. Expresión de la proteína Mcoln3 en células melan-a6 y melan-md1. A) Imágenes de microscopía confocal de células melan-a6 y melan-md1 tras tinción inmunológica de la proteína Mcoln3, B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a Mcoln3 y C) Western blot que muestra el perfil electroforético de la proteína Mcoln3 en células melan-a6 y melan-md1. Como control de carga se utilizó αERK2.

Para estudiar el posible efecto de Mcoln3 como regulador de la actividad tirosina hidroxilasa, tratamos las células melan-a6 y melan-md1 con un activador farmacológico del canal iónico. Usamos el agonista SN-2, activador específico del canal de Ca^{+2} ²⁶⁷. Realizamos ensayos a dos concentraciones diferentes de activador, 50 y 100 μ M, en medio de cultivo completo que se mantuvo durante 24 h, transcurridas las cuales se estimó la actividad tirosina hidroxilasa *in vivo*. Pudimos observar una activación significativa de la actividad de tirosinasa en las células control melan-a6 (**figura 60A**), mientras que en las células *mahoganoideas* no se observaron cambios, posiblemente debido a la alteración de los gradientes de protones y otros iones en estas células o a la alta actividad tirosinasa en ausencia de tratamiento.

Por otro lado, el análisis de la actividad tirosina hidroxilasa tras silenciamiento de *Mcoln3* mediante 3 siRNA específicos distintos (**figura 60C**) mostró una disminución significativa con respecto al control (**figura 60B**), en todas las condiciones ensayadas. Por tanto, el nivel de expresión de *Mcoln3* correlacionó positivamente con la actividad tirosina hidroxilasa, y su alta expresión en células *mahoganoideas* pareció contribuir a la alta actividad tirosinasa en dichas células.

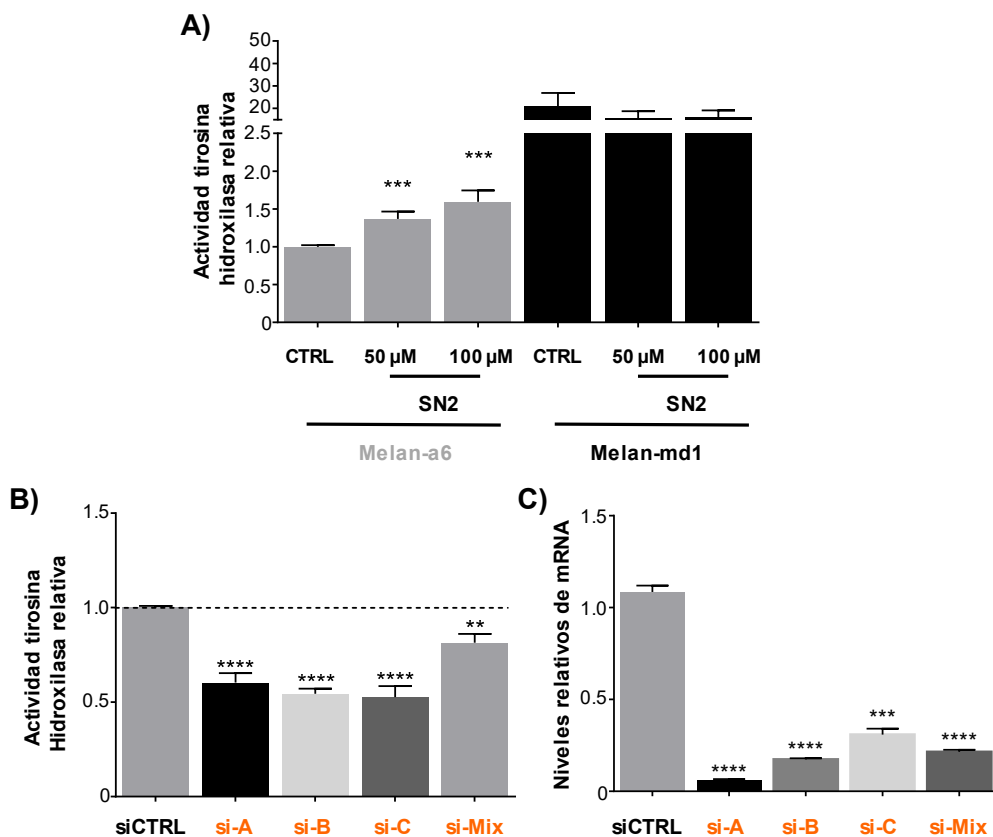


Figura 60. Actividad tirosina hidroxilasa tras activación del canal Mcoln3 en células melan-a6 y -md1 o represión del gen *Mcoln3* en células melan-md1. Actividad tirosina hidroxilasa de A) células melan-a6 y -md1 tratadas con SN2, un activador específico para el canal Mcoln3, durante 24 h; y de B) células melan-md1 tratadas con 3 siRNA específicos y una mezcla de los mismos. C) Verificación del silenciamiento del gen *Mcoln3* en células melan-md1 mediante qPCR. En los paneles A y B, la actividad tirosina hidroxilasa normalizada por cantidad de proteína y determinada en células vivas, se expresa en relación al control correspondiente al que se le dio el valor 1. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con tres réplicas biológicas independientes.

Los resultados expuestos hasta el momento sugieren que la proteína Mcoln3 se localiza en los melanosomas y podría estar implicada en la regulación del pH del orgánulo, ya que al activar su capacidad de transporte de iones o reprimir la expresión del gen observamos cambios en la actividad tirosinasa. Para reforzar esta hipótesis procedimos a comprobar si Mcoln3 se encuentra asociada a los melanosomas.

4.4.1. Localización subcelular de Mcoln3.

Para estudiar la localización subcelular de Mcoln3 recurrimos a experimentos de colocalización con marcadores del melanosoma, AG o el lisosoma. Además, empleamos dos sistemas celulares diferentes: las células heterólogas HEK293T y los melanocitos de ratón.

En primer lugar, se realizaron estudios de microscopía confocal en células HEK293T transfectadas para observar el patrón de colocalización de Mcoln3 y proteínas melanosomales. Para ello se transfectaron de manera transitoria los genes interés *TYR* y *MCOLN3* o el vector vacío

pcDNA3, ya que estas células no expresan proteínas melanosomales al no ser melanocitos. Los resultados muestran una intensa colocalización de MCOLN3 y TYR en las células transfectadas con ambos plásmidos (**figura 61A**). Además, se analizó la actividad tirosina hidroxilasa de estas células para observar si ésta se modulaba en función de la sobreexpresión de Mcoln3 exógena. La **figura 61B** muestra que en células transfectadas con *TYR* y *MCOLN3* la actividad tirosina hidroxilasa es significativamente superior que en células transfectadas con *TYR* y el vector vacío. Estos resultados indicaron que Mcoln3 se localiza en el mismo compartimento subcelular que TYR y que su sobreexpresión potencia la actividad enzimática de ésta, al menos en un sistema celular heterólogo. Sin embargo, no demuestran formalmente la presencia de Mcoln3 en los melanosomas de células melanocíticas.

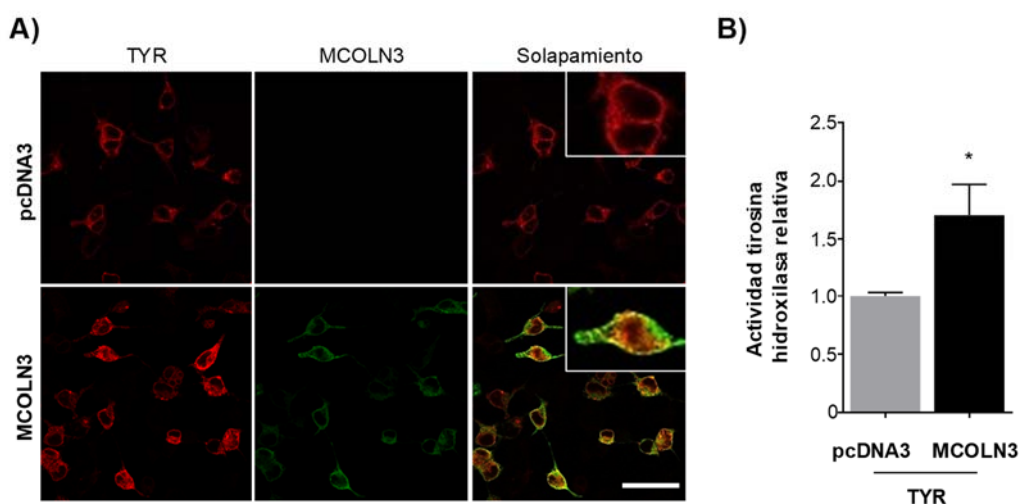


Figura 61. Localización de MCOLN3 y actividad tirosina hidroxilasa *in vivo* en células HEK293T transfectadas con MCOLN3 y TYR. A) Imágenes de microscopía confocal que muestran una colocalización de TYR y MCOLN3 del 80%; y B) Actividad tirosina hidroxilasa *in vivo* de células humanas HEK293T, transfectadas con el plásmido *Mcoln3*-GFP o vector vacío (pcDNA3) y TYR durante 24 h. Los resultados de la medida de actividad *in vivo* se presentan como valores relativos al control transfectado con tirosinasa y vector vacío.

Para ello, seguidamente se realizaron experimentos de microscopía confocal en los melanocitos melan-a6 y melan-md1. En este caso se transfectó de manera transitoria el plásmido *Mcoln3*-GFP y, tras 24 h de sobreexpresión se fijaron las células y se hibridaron con diferentes marcadores organelares endógenos. Empleamos Tyrp1 y Pmel17 como marcadores melanosomales, LAMP1 como marcador lisosomal y TGN38, marcador de una proteína del AG distal (Trans Golgi Network o TGN). Observamos una colocalización detectable de Mcoln3 (verde) y Tyrp1 (rojo) (**figura 62Aa**) en ambas líneas celulares, melan-a6 y melan-md1. Por otro lado, NK1 y HMB45, son anticuerpos que reconocen la proteína premelanosomal Pmel17²⁶⁸, que se consideran marcadores de melanosomas de estadio I y estadio II. Pmel17 es el principal componente de la estructura fibrilar de los premelanosomas. Se cree que esta proteína es procesada en el compartimento post-Golgi por una proproteína convertasa²⁶⁹ y transportada al estadio melanosomal más inmaduro, el estadio I, donde da lugar a las fibrillas internas²⁷⁰. Pero el tráfico intracelular de Pmel17 es complejo, ya que parece implicar a varias vías de transporte

intracelular ²⁷¹, incluyendo el transporte retrógrado de los endosomas al TGN ²⁷². Tras los análisis de las imágenes de fluorescencia se observa colocalización entre Mcoln3 (verde) y Pmel17 marcado con NKI (rojo) (**figura 62Ab**) o con HBM45 (**figura 62Ac**). Esta colocalización ocurre tanto en células control como en células *mahoganoides*. Por tanto, puede concluirse que Mcoln3 se asocia a melanosomas y está presente ya en los estadios iniciales de la maduración del orgánulo.

Como marcador lisosomal utilizamos la proteína de membrana asociada a lisosomas LAMP1 ²⁶. Esta proteína se localiza en orgánulos endocíticos maduros y lisosomas ²⁷³, donde generalmente se acumula en la región alrededor del centro organizador de microtúbulos ^{274,275}. Tras el análisis de las imágenes obtenidas (**figura 62Ad**), observamos que no existe colocalización apreciable entre LAMP1 (rojo) y Mcoln3 (verde). Esto parece indicar que Mcoln3 se asocia preferentemente a melanosomas ya en formación y no en estadios anteriores relacionados con lisosomas, como los endosomas tardíos o con los lisosomas.

También analizamos la relación de Mcoln3 con TGN38. Esta proteína integral de membrana se encuentra en el TGN, pero también en la membrana plasmática, ciclando entre estos dos compartimentos ²⁷⁶. Puede encontrarse en vesículas revestidas de clatrina ²⁷⁷, lo que está de acuerdo con una función en compartimentos de transporte de proteínas de secreción o destinadas a la superficie celular ²⁷⁸. Se observa en las imágenes (**figura 62Ae**) que no pudimos detectar colocalización apreciable entre TGN38 y Mcoln3.

Para validar los estudios de colocalización descritos más arriba, recurrimos a un control positivo y otro negativo, utilizando siempre los anticuerpos empleados en el análisis anterior. Como control negativo comprobamos la ausencia de colocalización de LAMP1 y Pmel17 (marcados con α LAMP1 y NKI, respectivamente) (**figura 62B**). Como control positivo, observamos una colocalización intensa de Tyrp1 y Pmel17 (marcada con α Tyrp1 y HMB45, respectivamente) (**figura 62B**). Los resultados obtenidos fueron los esperados y validaron los datos anteriores.

Concluimos con estos resultados que Mcoln3 es una proteína localizada en la membrana de los melanosomas desde sus primeros estadios. Por lo tanto, es un candidato ideal para mediar el efecto de *Mgrn1* en el pH melanosomal.

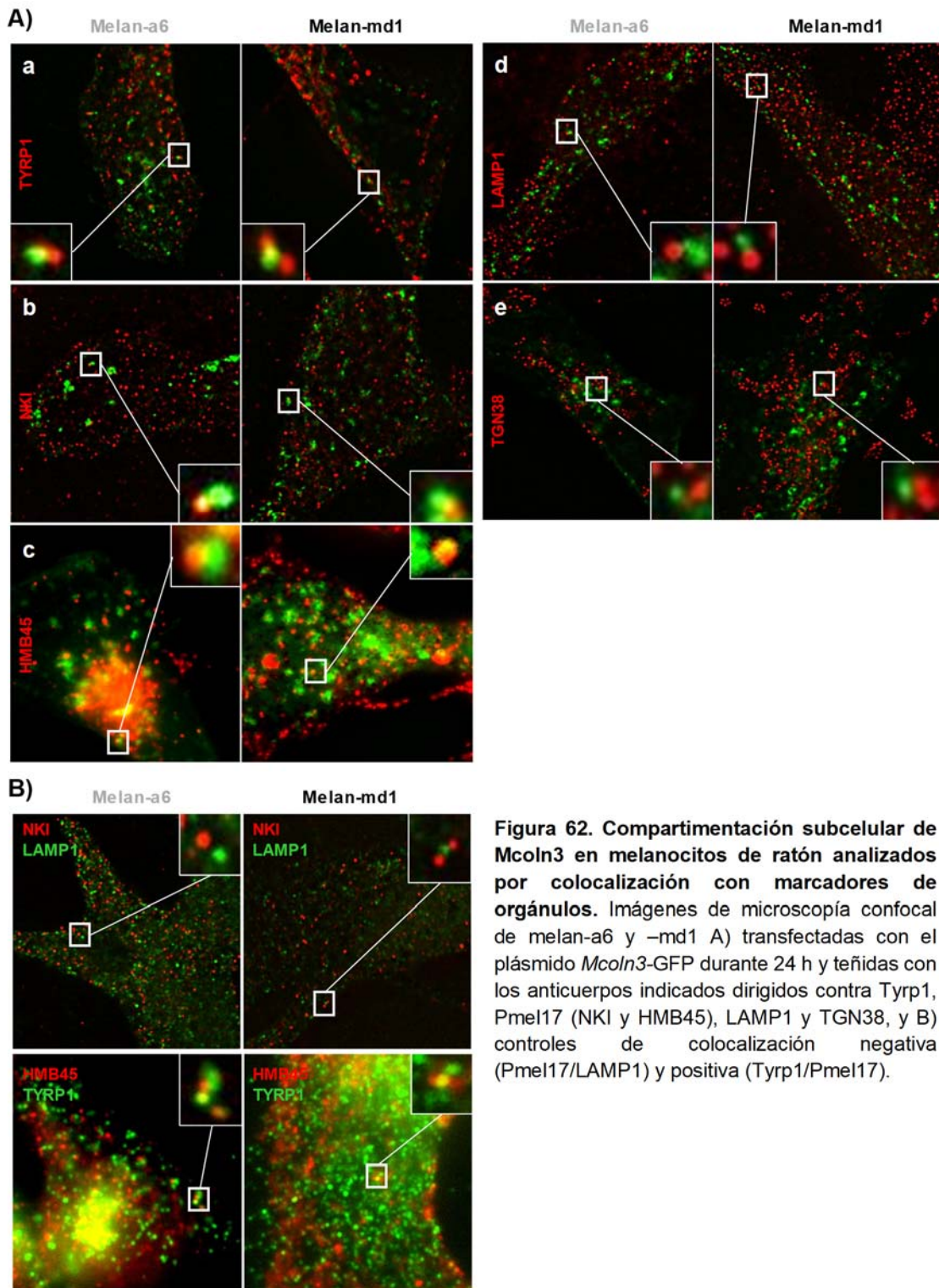


Figura 62. Compartimentación subcelular de Mcoln3 en melanocitos de ratón analizados por colocalización con marcadores de orgánulos. Imágenes de microscopía confocal de melan-a6 y -md1 A) transfectadas con el plásmido *Mcoln3*-GFP durante 24 h y teñidas con los anticuerpos indicados dirigidos contra Tyrp1, Pmel17 (NKI y HMB45), LAMP1 y TGN38, y B) controles de colocalización negativa (Pmel17/LAMP1) y positiva (Tyrp1/Pmel17).

4.4.2. Implicación de *Mcoln3* en la regulación del pH melanosomal.

Para verificar si *Mcoln3* está implicada en la regulación del pH melanosomal y, por tanto, en la eumelanogénesis, realizamos el análisis del pH en los orgánulos intracelulares tras silenciamiento del gen *Mcoln3* en las condiciones ya descritas con anterioridad. Usamos en este caso las dos sondas ya comentadas, DAMP-DNP y AO.

En el primer caso empleando 3 siRNA distintos y una mezcla de los mismos, observamos mayor retención de DAMP-DNP en células con expresión de *Mcoln3* reprimida (**figura 63A**) con respecto a los controles Mock o siCTRL. Tras la cuantificación de la intensidad de fluorescencia (**figura 63B**) se obtuvieron diferencias significativas entre las diferentes condiciones con respecto a los controles. Se obtuvieron resultados similares con el AO (**figura 64A**). En este caso la retención de la sonda también aumentó significativamente en las células silenciadas con los distintos siRNA (**figura 64B**), con respecto a las células tratadas con el siCTRL o las células Mock. Ello confirma que la represión de *Mcoln3* conduce a una acidificación del melanosoma y permite postular que en los melanocitos *mahoganoides* la sobreexpresión de *Mcoln3* contribuye a la basificación del orgánulo.

Adicionalmente se realizaron ensayos en un sistema heterólogo en el que las células HEK293T se transfectaron con plásmido *MCOLN3* para observar si disminuía la retención de AO, simulando las células melan-md1. Se transfectaron las células durante 24 h y posteriormente se incubaron a 37°C con AO 20 min. Tras este periodo se lavaron con PBS y se observaron en el microscopio confocal *in vivo*. El resultado fue el esperado, como se observa en la **figura 65**. Las células transfectadas con el vector vacío *pcDNA3* retuvieron alrededor del doble de AO que las células transfectadas con el plásmido *MCOLN3* (**figura 65A y 65B**).

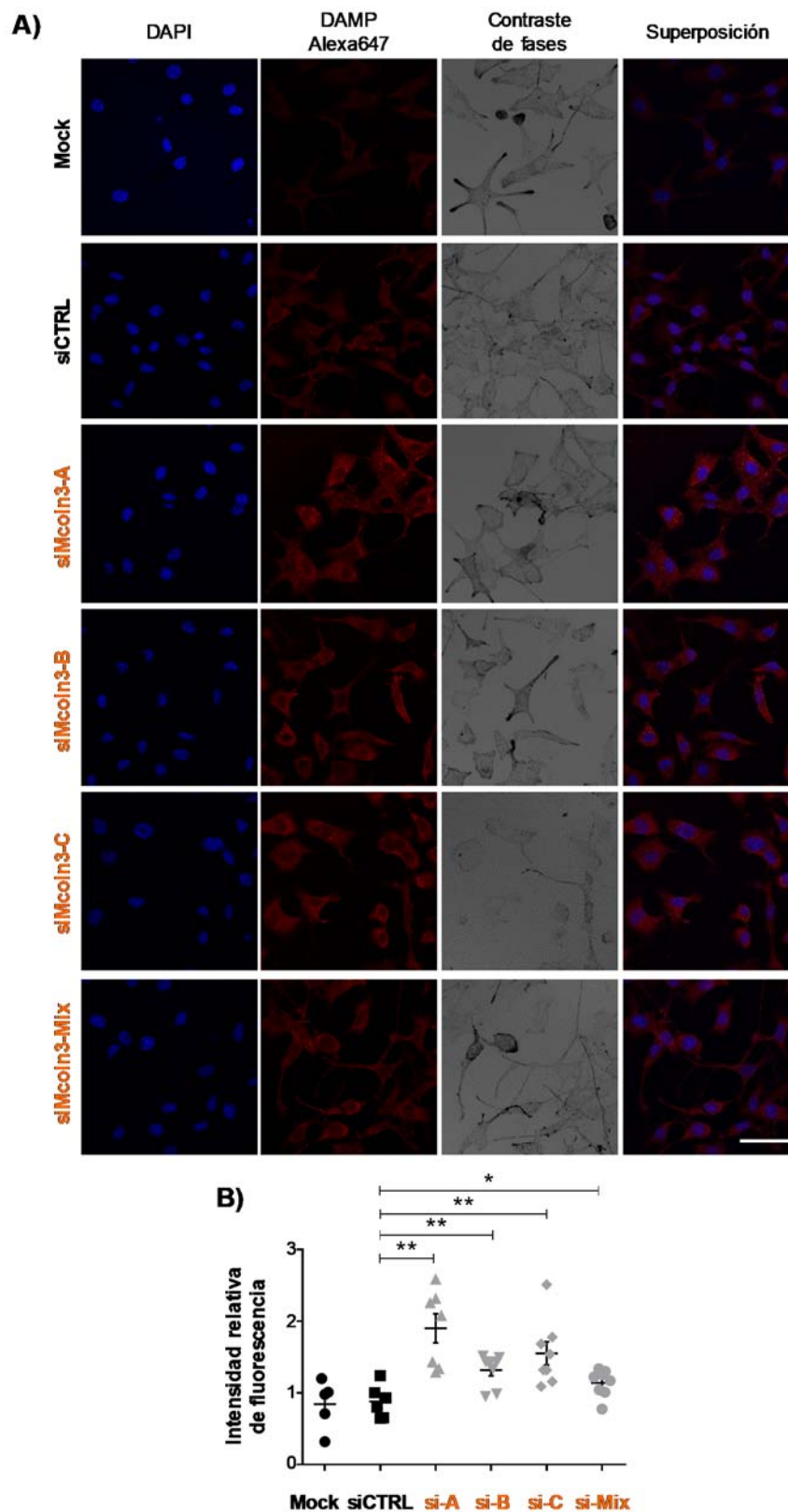


Figura 63. Análisis del pH de los orgánulos intracelulares mediante DAMP-DNP en células melan-md1 tras silenciamiento de *Mcoln3* con siRNA. A) Imágenes de microscopía confocal y B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia normalizada por número de células.

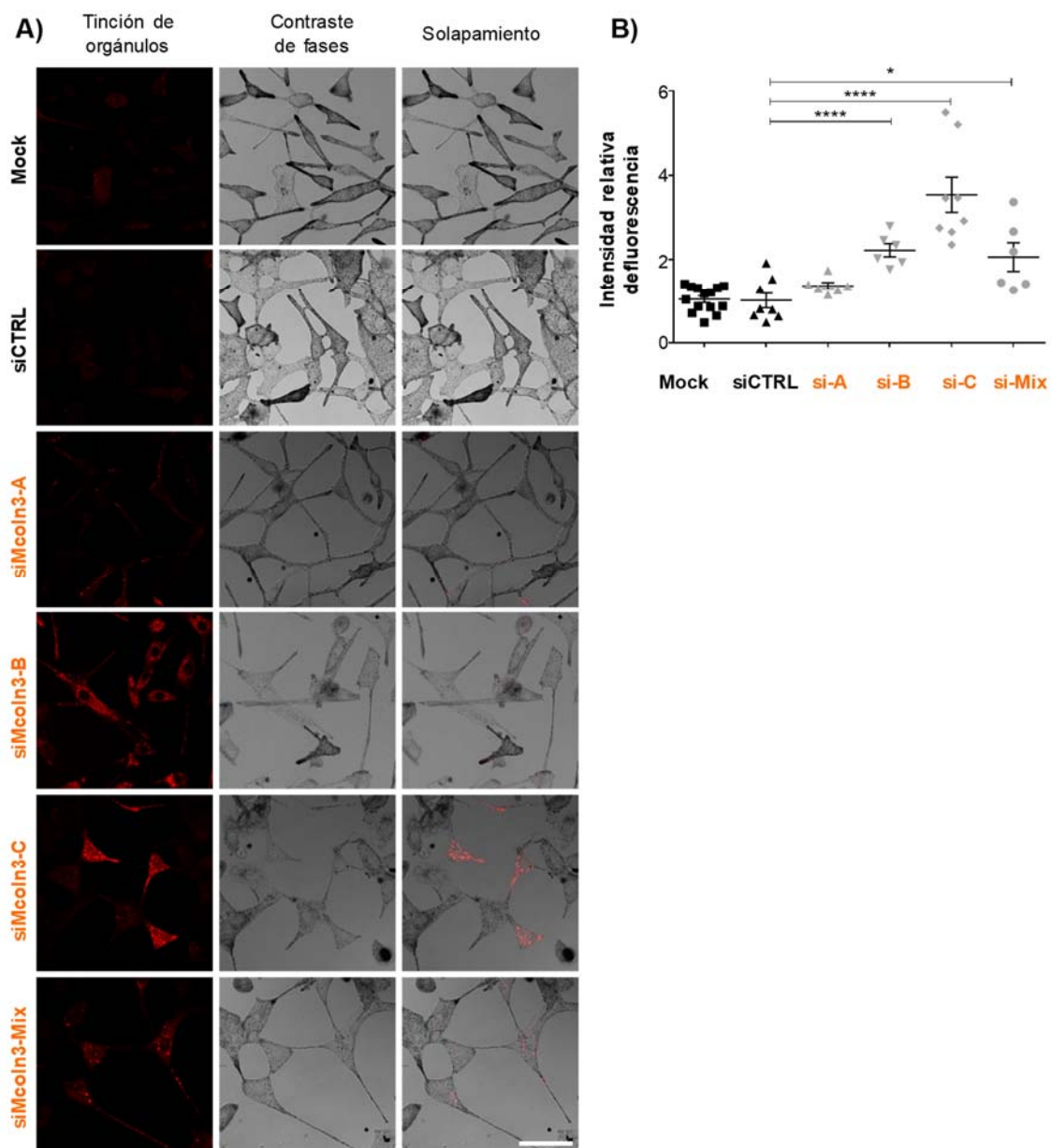


Figura 64. Análisis del pH de los orgánulos intracelulares mediante AO en células melan-md1 tras silenciamiento de *Mcoln3* con siRNA. A) Imágenes de microscopía confocal de células melan-md1 silenciadas para *Mcoln3*, con varios siRNA distintos durante 72 h. (Barra de escala: 50 μ m) B) Intensidad de fluorescencia normalizada por número de células.

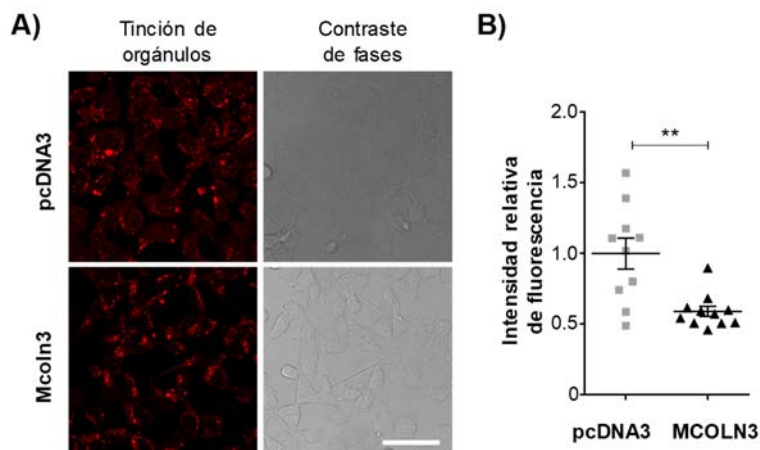


Figura 65. Cambio en el pH de los orgánulos intracelulares en células HEK293T transfectadas con MCOLN3. Las variaciones de pH se estimaron con células vivas, mediante la sonda AO. A) Imágenes de microscopía confocal y B) gráfica de la cuantificación de intensidad de fluorescencia normalizada por número de células humanas HEK293T, transfectadas con un vector vacío (pcDNA3) y con MCOLN3 durante 24 h. Tratadas con AO durante 20 minutos y posteriormente lavadas con PBS1x. (Barra de escala: 50 μ m).

En resumen, estos resultados permiten concluir que MCOLN3 es una proteína implicada en la regulación del pH en los melanosomas y que, con ello, regula también la actividad tirosina hidroxilasa. Además, la modulación de su expresión por *Mgrn1* permite establecer un nexo entre la represión de *Mgrn1* y la basificación del melanosoma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Darido, C., Georgy, S. R. & Jane, S. M. The role of barrier genes in epidermal malignancy. *Oncogene* **35**, 5705–5712 (2016).
2. Bikle, D. D. Vitamin D metabolism and function in the skin. *Mol. Cell. Endocrinol.* **347**, 80–89 (2011).
3. Quevedo, W. C. & Holstein, T. J. General Biology of Mammalian Pigmentation. in *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology, Second Edition* 61–90 (2007). doi:10.1002/9780470987100.ch3
4. Costin, G. E. & Hearing, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* **21**, 976–994 (2007).
5. Vandergriff, T., Bergstresser, P., Bolognia, J., Jorizzo, J. & Schaffer, J. Dermatology. Anatomy and physiology. in *Elsevier Saunders* 43–54 (2012).
6. Lin, J. Y. & Fisher, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **445**, 843–850 (2007).
7. Goding, C. R. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.* **14**, 1712–28 (2000).
8. Goding, C. R. Melanocytes: The new Black. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 275–279 (2007).
9. Buscà, R. & Ballotti, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **13**, 60–69 (2000).
10. Nordlund, J. J. The pigmentary system and inflammation. *Pigment cell Res.* **5**, 362–5 (1992).
11. Thong, H. Y., Jee, S. H., Sun, C. C. & Boissy, R. E. The patterns of melanosome distribution in keratinocytes of human skin as one determining factor of skin colour. *Br. J. Dermatol.* **149**, 498–505 (2003).
12. Abdel-Malek, Z. & Kadekaro, A. L. Human Pigmentation: Its Regulation by Ultraviolet Light and by Endocrine, Paracrine, and Autocrine Factors. in *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology: Second Edition* 410–420 (2007). doi:10.1002/9780470987100.ch20
13. García-Borrón, J. C., Abdel-Malek, Z. A. & 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).
14. Herraiz, C., Garcia-Borrón, J. C., Jiménez-Cervantes, C. & Olivares, C. MC1R signaling. Intracellular partners and pathophysiological implications. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1863**, 2448–2461 (2017).
15. Sehgal, V. N. & Srivastava, G. Vitiligo: Auto-immunity and immune responses. *Int. J. Dermatol.* **45**, 583–590 (2006).
16. 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).
17. Raposo, G. & Marks, M. S. The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic* **3**, 237–48 (2002).
18. Hearing, V. J. Biogenesis of pigment granules: A sensitive way to regulate melanocyte function. *J. Dermatol. Sci.* **37**, 3–14 (2005).
19. Graham, D. G., Tiffany, S. M. & Vogel, F. S. The toxicity of melanin precursors. *J. Invest. Dermatol.* **70**, 113–6 (1978).
20. Wick, M. M. An experimental approach to the chemotherapy of melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **74**, 63–5 (1980).
21. Salinas, C., García-Borrón, J. C., Solano, F. & Lozano, J. A. Dopachrome tautomerase decreases the binding of indolic melanogenesis intermediates to proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1204**, 53–60 (1994).
22. Bhatnagar, V., Anjaiah, S., Puri, N., Darshanam, B. N. A. & Ramaiah, A. pH of Melanosomes of

- B 16 Murine Melanoma Is Acidic: Its Physiological Importance in the Regulation of Melanin Biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 183–192 (1993).
23. Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D. M., Berson, J. F. & Marks, M. S. Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes, Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells. *J. Cell Biol.* **152**, 809–824 (2001).
24. Jimbow, K., Oikawa, O., Sugiyama, S. & Takeuchi, T. Comparison of eumelanogenesis and pheomelanogenesis in retinal and follicular melanocytes; role of vesiculo-globular bodies in melanosome differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **73**, 278–84 (1979).
25. Blott, E. J. & Griffiths, G. M. Secretory lysosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 122–131 (2002).
26. Raposo, G. & Marks, M. S. Melanosomes dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 786–797 (2007).
27. Orlow, S. J. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 3–7 (1995).
28. Maul, G. G. Golgi-melanosome relationship in human melanoma in vitro. *J. Ultrastruct. Res.* **26**, 163–76 (1969).
29. Hurbain, I. *et al.* Electron tomography of early melanosomes: Implications for melanogenesis and the generation of fibrillar amyloid sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 19726–19731 (2008).
30. Seiji, M., Fitzpatrick, T. B., Simpson, R. T. & Birbeck, M. S. Chemical composition and terminology of specialized organelles (melanosomes and melanin granules) in mammalian melanocytes. *Nature* **197**, 1082–4 (1963).
31. Boissy, R. E., Huizing, M. & Gahl, W. A. Biogenesis of Melanosomes. in *The Pigmentary System* 155–170 (2007). doi:10.1002/9780470987100.ch7
32. 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).
33. Marks, M. S. & Seabra, M. C. The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 738–748 (2001).
34. Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A. & Tyminska, A. Skin melanocytes: biology and development. *Adv. Dermatology Allergol.* **1**, 30–41 (2013).
35. Berson, J., Harper, D., Tenza, D., Raposo, G. & Marks, M. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3451–64 (2001).
36. Schiaffino, M. V *et al.* The ocular albinism type 1 gene product is a membrane glycoprotein localized to melanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9055–60 (1996).
37. Schiaffino, M. V. & Tacchetti, C. The ocular albinism type 1 (OA1) protein and the evidence for an intracellular signal transduction system involved in melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res.* **18**, 227–233 (2005).
38. De Mazière, A. M. *et al.* The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. *Traffic* **3**, 678–93 (2002).
39. Sitaram, A. & Marks, M. S. Mechanisms of Protein Delivery to Melanosomes in Pigment Cells. *Physiology* **27**, 85–99 (2012).
40. Halaban, R. *et al.* Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5889–94 (2000).
41. Halaban, R. *et al.* Aberrant retention of tyrosinase in the endoplasmic reticulum mediates accelerated degradation of the enzyme and contributes to the dedifferentiated phenotype of amelanotic melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6210–5 (1997).
42. Toyofuku, K. *et al.* Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Tyrp1 can affect the processing of both mutant and wild-type proteins. *FASEB*

- J.* **15**, 2149–2161 (2001).
43. Valencia, J. C. *et al.* Sialylated Core 1 O -Glycans Influence the Sorting of Pmel17/gp100 and Determine Its Capacity to Form Fibrils. *J. Biol. Chem.* **282**, 11266–11280 (2007).
 44. Barral, D. C. & Seabra, M. C. The Melanosome as a Model to Study Organelle Motility in Mammals. *Pigment Cell Res.* **17**, 111–118 (2004).
 45. Brenner, M. & Hearing, V. J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem. Photobiol.* **84**, 539–549 (2008).
 46. Wasmeier, C., Hume, A. N., Bolasco, G. & Seabra, M. C. Melanosomes at a glance. *J. Cell Sci.* **121**, 3995–3999 (2008).
 47. Huizing, M., Helip-Wooley, A., Westbroek, W., Gunay-Aygun, M. & Gahl, W. A. Disorders of Lysosome-Related Organelle Biogenesis: Clinical and Molecular Genetics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **9**, 359–386 (2008).
 48. Schiaffino, M. V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1094–1104 (2010).
 49. Durchfort, N. *et al.* The Enlarged Lysosomes in beige j Cells Result From Decreased Lysosome Fission and Not Increased Lysosome Fusion. *Traffic* **13**, 108–119 (2012).
 50. Wei, M. L. Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Res.* **19**, 19–42 (2006).
 51. Bellono, N. W. & Oancea, E. V. Ion transport in pigmentation. *Arch. Biochem. Biophys.* **563**, 35–41 (2014).
 52. Newton, J. M. *et al.* Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 981–8 (2001).
 53. Rinchik, E. M. *et al.* A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature* **361**, 72–6 (1993).
 54. Cheng, X., Shen, D., Samie, M. & Xu, H. Mucolipins: Intracellular TRPML1-3 channels. *FEBS Lett.* **584**, 2013–21 (2010).
 55. Lamason, R. L. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science (80)*. **310**, 1782–1786 (2005).
 56. Reissmann, M. & Ludwig, A. Pleiotropic effects of coat colour-associated mutations in humans, mice and other mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 576–586 (2013).
 57. Puri, N., Gardner, J. M. & Brilliant, M. H. Aberrant pH of Melanosomes in Pink-Eyed Dilution (*p*) Mutant Melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 607–613 (2000).
 58. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels.* **222**, (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
 59. Bellono, N. W. & Oancea, E. UV light phototransduction depolarizes human melanocytes. *Channels (Austin)*. **7**, 243–8 (2013).
 60. Stanisz, H. *et al.* ORAI1 Ca(2+) channels control endothelin-1-induced mitogenesis and melanogenesis in primary human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 1443–51 (2012).
 61. Martina, J. A., Lelouvier, B. & Puertollano, R. The calcium channel mucolipin-3 is a novel regulator of trafficking along the endosomal pathway. *Traffic* **10**, 1143–56 (2009).
 62. Choi, S. & Kim, H. J. The Ca²⁺-channel TRPML3 specifically interacts with the mammalian ATG8 homologue GATE16 to regulate autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 56–61 (2014).
 63. Sulem, P. *et al.* Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans. *Nat. Genet.* **40**, 835–837 (2008).

64. Graves, A. R., Curran, P. K., Smith, C. L. & Mindell, J. A. The Cl⁻/H⁺ antiporter CIC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature* **453**, 788–792 (2008).
65. Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 663–700 (1986).
66. Ishida, Y., Nayak, S., Mindell, J. A. & Grabe, M. A model of lysosomal pH regulation. *J. Gen. Physiol.* **141**, 705–20 (2013).
67. Elmonem, M. A. *et al.* Cystinosis: a review. *Orphanet J. Rare Dis.* **11**, 47 (2016).
68. Guillet, G., Sassolas, B., Fromentoux, S., Gobin, E. & Leroy, J. P. Skin storage of cystine and premature skin ageing in cystinosis. *Lancet (London, England)* **352**, 1444–5 (1998).
69. Chiaverini, C. *et al.* Cystinosin is a melanosomal protein that regulates melanin synthesis. *FASEB J.* **26**, 3779–3789 (2012).
70. Simpson, J. *et al.* Quantitative in vivo and ex vivo confocal microscopy analysis of corneal cystine crystals in the Ctns knockout mouse. *Mol. Vis.* **17**, 2212–20 (2011).
71. Stransky, L., Cotter, K. & Forgac, M. The Function of V-ATPases in Cancer. *Physiol. Rev.* **96**, 1071–1091 (2016).
72. Zhao, J., Benlekbir, S. & Rubinstein, J. L. Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature* **521**, 241–5 (2015).
73. Pisoni, R. L., Thoene, J. G. & Christensen, H. N. Detection and characterization of carrier-mediated cationic amino acid transport in lysosomes of normal and cystinotic human fibroblasts. Role in therapeutic cystine removal? *J. Biol. Chem.* **260**, 4791–8 (1985).
74. Sautin, Y. Y., Lu, M., Gaugler, A., Zhang, L. & Gluck, S. L. Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H⁺-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 575–89 (2005).
75. Marshansky, V., Rubinstein, J. L. & Grüber, G. Eukaryotic V-ATPase: Novel structural findings and functional insights. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**, 857–879 (2014).
76. Ancans, J., Hoogduijn, M. J. & Thody, A. J. Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 158–9 (2001).
77. Meyer, H., Vitavska, O. & Wieczorek, H. Identification of an animal sucrose transporter. *J. Cell Sci.* **124**, 1984–91 (2011).
78. Fukamachi, S., Shimada, A. & Shima, A. Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. *Nat. Genet.* **28**, 381–5 (2001).
79. Dooley, C. M. *et al.* Slc45a2 and V-ATPase are regulators of melanosomal pH homeostasis in zebrafish, providing a mechanism for human pigment evolution and disease. *Pigment Cell Melanoma Res.* **26**, 205–217 (2013).
80. Costin, G. E., Valencia, J. C., Vieira, W. D., Lamoreux, M. L. & Hearing, V. J. Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *J. Cell Sci.* **116**, 3203–12 (2003).
81. Ni-Komatsu, L. & Orlow, S. J. Heterologous expression of tyrosinase recapitulates the misprocessing and mistrafficking in oculocutaneous albinism type 2: effects of altering intracellular pH and pink-eyed dilution gene expression. *Exp. Eye Res.* **82**, 519–28 (2006).
82. Beirl, A. J., Linbo, T. H., Cobb, M. J. & Cooper, C. D. oca2 Regulation of chromatophore differentiation and number is cell type specific in zebrafish. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 178–89 (2014).
83. Altimimi, H. F. & Schnetkamp, P. P. M. Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchangers (NCKX): functional properties and physiological roles. *Channels (Austin)*. **1**, 62–9 (2007).

84. Montoliu, L. *et al.* Increasing the complexity: new genes and new types of albinism. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 11–8 (2014).
85. Setty, S. R. G. *et al.* Cell-specific ATP7A transport sustains copper-dependent tyrosinase activity in melanosomes. *Nature* **454**, 1142–6 (2008).
86. Giordano, F., Bonetti, C., Surace, E. M., Marigo, V. & Raposo, G. The ocular albinism type 1 (OA1) G-protein-coupled receptor functions with MART-1 at early stages of melanogenesis to control melanosome identity and composition. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4530–45 (2009).
87. Schiaffino, M. V *et al.* Ocular albinism: evidence for a defect in an intracellular signal transduction system. *Nat. Genet.* **23**, 108–12 (1999).
88. 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**, 162–73 (2002).
89. Cooksey, C. J. *et al.* Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 26226–35 (1997).
90. Lerch, K. Neurospora tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* **52**, 125–38 (1983).
91. Aroca, P., Solano, F., Salinas, C., García-Borrón, J. C. & Lozano, J. A. Regulation of the final phase of mammalian melanogenesis. The role of dopachrome tautomerase and the ratio between 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid and 5,6-dihydroxyindole. *Eur. J. Biochem.* **208**, 155–63 (1992).
92. Jimenez-Cervantes, C., Garcia-Borrón, J. C., Valverde, P., Solano, F. & Lozano, J. A. Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes. 1. Biochemical characterization of two melanosomal tyrosinases from B16 mouse melanoma. *Eur. J. Biochem.* **217**, 549–556 (1993).
93. Kobayashi, T. *et al.* Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J.* **13**, 5818–5825 (1994).
94. Olivares, C., Jiménez-Cervantes, C., Lozano, J. A., Solano, F. & Garcia-Borrón, J. C. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem. J.* **354**, 131–139 (2001).
95. Di, D. P. & Napolitano, A. 1,4-benzothiazines as key intermediates in the biosynthesis of red hair pigment pheomelanins. *Pigment Cell Res.* **16**, 532–539 (2003).
96. Greco, G. *et al.* Isomeric cysteinyl dopas provide a (photo)degradable bulk component and a robust structural element in red human hair pheomelanin. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 319–327 (2009).
97. Hearing, V. J. & Tsukamoto, K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**, 2902–2909 (1991).
98. Jackson, I. J. Evolution and expression of tyrosinase-related proteins. *Pigment cell Res.* **7**, 241–2 (1994).
99. Furumura, M. *et al.* Metal Ligand-Binding Specificities of the Tyrosinase-Related Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 579–585 (1998).
100. Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M. & Dijkstra, B. W. Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 Reveals a Binuclear Zinc Active Site Important for Melanogenesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **56**, 9812–9815 (2017).
101. Olivares, C. & Solano, F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 750–760 (2009).
102. Ando, H., Ichihashi, M. & Hearing, V. Role of the Ubiquitin Proteasome System in Regulating Skin Pigmentation. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 4428–4434 (2009).
103. Oetting, W. S. The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment cell Res.* **13**, 320–5 (2000).

104. Napolitano, A., Panzella, L., Monfrecola, G. & D'Ischia, M. Pheomelanin-induced oxidative stress: bright and dark chemistry bridging red hair phenotype and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 721–733 (2014).
105. Quevedo, W. C., Fitzpatrick, T. B., Pathak, M. A. & Jimbow, K. Role of light in human skin color variation. *Am.J.Phys.Anthropol.* **43**, 393–408 (1975).
106. Fitzpatrick, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch.Dermatol.* **124**, 869–871 (1988).
107. Luttrell, L. M. Reviews in Molecular Biology and Biotechnology: Transmembrane Signaling by G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Biotechnol.* **39**, 239–264 (2008).
108. Garcia-Borrón, J. C., Sánchez-Laorden, B. L. & Jiménez-Cervantes, C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res.* **18**, 393–410 (2005).
109. Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **21**, 90–113 (2000).
110. Nygaard, R. *et al.* The Dynamic Process of β 2-Adrenergic Receptor Activation. *Cell* **152**, 532–542 (2013).
111. Milligan, G. & Kostenis, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* **147**, S46–S55 (2009).
112. Cabrera-Vera, T. M. *et al.* Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocr. Rev.* **24**, 765–781 (2003).
113. Heximer, S. P. A 'new twist' on RGS protein selectivity. *Structure* **21**, 319–320 (2013).
114. Abdel-Malek, Z. A. Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 434–441 (2001).
115. Voisey, J., Carroll, L. & van Daal, A. Melanocortins and their receptors and antagonists. *Curr. Drug Targets* **4**, 586–97 (2003).
116. Cone, R. D. Studies on the Physiological Functions of the Melanocortin System. *Endocr. Rev.* **27**, 736–749 (2006).
117. Gantz, I. & Fong, T. M. The melanocortin system. *Am. J. Physiol. Metab.* **284**, E468–E474 (2003).
118. Slominski, A. Identification of beta-endorphin, alpha-MSH and ACTH peptides in cultured human melanocytes, melanoma and squamous cell carcinoma cells by RP-HPLC. *Exp. Dermatol.* **7**, 213–6 (1998).
119. Slominski, A., Paus, R. & Wortsman, J. On the potential role of proopiomelanocortin in skin physiology and pathology. *Mol. Cell. Endocrinol.* **93**, C1-6 (1993).
120. Böhm, M. *et al.* Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *J.Invest Dermatol.* **126**, 1966–1975 (2006).
121. Corre, S. *et al.* UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J.Biol.Chem.* **279**, 51226–51233 (2004).
122. Cui, R. *et al.* Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* **128**, 853–864 (2007).
123. Chhajlani, V. & Wikberg, J. E. S. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett.* **309**, 417–420 (1992).
124. 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).
125. Donatien, P. D. *et al.* The expression of functional MSH receptors on cultured human melanocytes. *Arch. Dermatol. Res.* **284**, 424–6 (1992).

126. Siegrist, W., Stutz, S. & Eberle, A. N. Homologous and heterologous regulation of alpha-melanocyte-stimulating hormone receptors in human and mouse melanoma cell lines. *Cancer Res.* **54**, 2604–10 (1994).
127. Wallin, E. & von Heijne, G. Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study. *Protein Eng.* **8**, 693–698 (1995).
128. Herraiz, C., Sánchez-Laorden, B. L., Jiménez-Cervantes, C. & Garcia-Borrón, J. C. N-glycosylation of the human melanocortin 1 receptor: occupancy of glycosylation sequons and functional role. *Pigment cell melanoma Res.* **24**, 479–489 (2011).
129. 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).
130. 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).
131. Yang, Y., 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).
132. 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**, 101–132 (1994).
133. Qanbar, R. & Bouvier, M. Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Ther.* **97**, 1–33 (2003).
134. Sanchez-Mas, J., Sanchez-Laorden, B. L., Guillo, L. A., Jimenez-Cervantes, C. & Garcia-Borrón, J. C. The melanocortin-1 receptor carboxyl terminal pentapeptide is essential for MC1R function and expression on the cell surface. *Peptides* **26**, 1848–1857 (2005).
135. Chen, S. *et al.* Palmitoylation-dependent activation of MC1R prevents melanomagenesis. *Nature* **549**, 399–403 (2017).
136. Sánchez-Laorden, B. L., Jiménez-Cervantes, C. & Garcia-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**, 3241–3251 (2007).
137. Vance, K. W. & Goding, C. R. The Transcription Network Regulating Melanocyte Development and Melanoma. *Pigment Cell Res.* **17**, 318–325 (2004).
138. Khaled, M., Levy, C. & Fisher, D. E. Control of melanocyte differentiation by a MITF-PDE4D3 homeostatic circuit. *Genes Dev.* **24**, 2276–2281 (2010).
139. 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).
140. Cao, J. *et al.* MC1R is a potent regulator of PTEN after UV exposure in melanocytes. *Mol. Cell* **51**, 409–422 (2013).
141. Sánchez-Más, J. *et al.* Agonist-independent, high constitutive activity of the human melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Res.* **17**, 386–395 (2004).
142. 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**, 336–343 (2002).
143. Liu, F. *et al.* Genetics of skin color variation in Europeans: genome-wide association studies with functional follow-up. *Hum. Genet.* **134**, 823–835 (2015).
144. 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**, 2255–2262 (2012).
145. Funasaka, Y. *et al.* Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1 α , interleukin-1 β , endothelin-1 and tumour necrosis factor- α . *Br. J. Dermatol.* **139**, 216–224

- (1998).
146. 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**, 433–439 (2002).
 147. Herraiz, C. *et al.* Functional Characterization of MC1R-TUBB3 Intergenic Splice Variants of the Human Melanocortin 1 Receptor. *PLoS one* **10**, (2015).
 148. 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).
 149. Rees, J. L. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 739–751 (2004).
 150. Duffy, D. L. *et al.* Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 447–61 (2004).
 151. Healy, E. *et al.* Melanocortin-1-receptor gene and sun sensitivity in individuals without red hair. *Lancet* **355**, 1072–1073 (2000).
 152. 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).
 153. Healy, E. *et al.* Functional variation of MC1R alleles from red-haired individuals. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2397–2402 (2001).
 154. Sánchez-Laorden, B. *et al.* Dimerization of the human melanocortin 1 receptor: functional consequences and dominant-negative effects. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 172–181 (2006).
 155. 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).
 156. Sánchez-Laorden, B. L. *et al.* Aberrant trafficking of human melanocortin 1 receptor variants associated with red hair and skin cancer: Steady-state retention of mutant forms in the proximal golgi. *J. Cell. Physiol.* **220**, 640–654 (2009).
 157. Zanna, P. T. *et al.* Mechanism of dimerization of the human melanocortin 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 211–216 (2008).
 158. Angers, S., Salahpour, A. & Bouvier, M. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 409–435 (2002).
 159. 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).
 160. 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).
 161. 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**, 1035–1048 (2005).
 162. Rouzaud, F., Kadarko, A. L., Abdel-Malek, Z. A. & Hearing, V. J. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **571**, 133–152 (2005).
 163. Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. & Wortsman, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* **84**, 1155–1228 (2004).
 164. Park, H. Y. & Gilchrist, B. A. Protein kinase C: biochemical characteristics and role in melanocyte biology. *J. Dermatol. Sci.* **6**, 185–93 (1993).
 165. Park, H. Y., Perez, J. M., Laursen, R., Hara, M. & Gilchrist, B. A. Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* **274**,

- 16470–8 (1999).
166. Park, H. Y. *et al.* Topical Application of a Protein Kinase C Inhibitor Reduces Skin and Hair Pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 159–166 (2004).
 167. Delevoye, C. *et al.* AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *J. Cell Biol.* **187**, 247–264 (2009).
 168. Miller, K. A. *et al.* Genetic studies of the mouse mutations mahogany and mahoganoid. *Genetics* **146**, 1407–15 (1997).
 169. Bagher, P., Jiao, J., Owen Smith, C., Cota, C. D. & Gunn, T. M. Characterization of Mahogunin Ring Finger-1 expression in mice. *Pigment Cell Res.* **19**, 635–643 (2006).
 170. 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**, 288–298 (2003).
 171. 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**, 3438–3447 (2006).
 172. He, L. Spongiform Degeneration in mahoganoid Mutant Mice. *Science (80)*. **299**, 710–712 (2003).
 173. 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).
 174. Lange, A. *et al.* Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.* **282**, 5101–5105 (2007).
 175. Benvegnù, S., Mateo, M. I., Palomer, E., Jurado-Arjona, J. & Dotti, C. G. Aging Triggers Cytoplasmic Depletion and Nuclear Translocation of the E3 Ligase Mahogunin: A Function for Ubiquitin in Neuronal Survival. *Mol. Cell* **66**, 358–372.e7 (2017).
 176. 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).
 177. Hicke, L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 195–201 (2001).
 178. Weissman, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 169–178 (2001).
 179. 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**, 1129–1142 (2007).
 180. Majumder, P. & Chakrabarti, O. Mahogunin regulates fusion between amphisomes/MVBs and lysosomes via ubiquitination of TSG101. *Cell Death Dis.* **6**, e1970–e1970 (2015).
 181. Jiao, J. *et al.* Abnormal regulation of TSG101 in mice with spongiform neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1792**, 1027–1035 (2009).
 182. Kaul, Z. & Chakrabarti, O. Tumor susceptibility gene 101 regulates predisposition to apoptosis via ESCRT machinery accessory proteins. *Mol. Biol. Cell* **28**, 2106–2122 (2017).
 183. 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).
 184. Srivastava, D., Mukherjee, R., Mookherjee, D. & Chakrabarti, O. Mahogunin-mediated regulation of α i localisation during mitosis and its effect on spindle positioning. *Biochem. Cell Biol.* **94**, 359–369 (2016).
 185. Mukherjee, R., Majumder, P. & Chakrabarti, O. MGRN1-mediated ubiquitination of α -tubulin regulates microtubule dynamics and intracellular transport. *Traffic* **18**, 791–807 (2017).
 186. Cooray, S. N., Guasti, L. & Clark, A. J. L. The E3 Ubiquitin Ligase Mahogunin Ubiquitinates the

- Melanocortin 2 Receptor. *Endocrinology* **152**, 4224–4231 (2011).
187. Miller, K. A. *et al.* Genetic studies of the mouse mutations mahogany and mahoganoid. *Genetics* **146**, 1407–1415 (1997).
 188. Perez 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**, 811–822 (2009).
 189. Abrisqueta, M. *et al.* Human melanocortin 1 receptor-mediated ubiquitination of nonvisual arrestins. Role of Mahogunin Ring Finger 1 E3 ligase. *Biochim. Biophys. Acta* **1865**, 76–94 (2018).
 190. Raposo, G., Kleijmeer, M., Posthuma, G., Slot, J. W. & Geuze, H. J. Immunogold Labeling of Ultrathin Cryosections : Application in Immunology. in *In Handbook of Experimental Immunology* 11 (1986).
 191. Sviderskaya, E. V *et al.* Complementation of Hypopigmentation in p-Mutant (Pink-Eyed Dilution) Mouse Melanocytes by normal human P cDNA, and defective complementation by OCA2 mutant sequences. *J Invest Dermatology* 30–34 (1997).
 192. Manyonda, I. & Choy, M. Collagen phagocytosis by human extravillous trophoblast: potential role in trophoblastic invasion. *J Soc Gynecol Investig* (1999).
 193. Whittaker, J. R. Quantitative measurement by microdensitometry of tyrosinase (dopa oxidase) development in whole small ascidian embryos. *Histochemistry* **71**, 349–59 (1981).
 194. Mojica, F. & Rodriguez-Valera, F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* (2016). doi:10.1111/febs.13766
 195. Agrotis Alexander, K. R. A new age in functional genomics using CRISPR/Cas9 in arrayed library screening. *Front. Genet.* (2015). doi:10.3389/fgene.2015.00300
 196. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5 (1970).
 197. Pomerantz, S. Tyrosine hydroxylation catalyzed by mammalian tyrosinase: an improved method of assay. *Biochem Biophys Res Commun* (1964).
 198. Winder, A. & Harris, H. New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur J Biochem* (1991).
 199. Jiménez-Cervantes, C. *et al.* Thr40 and Met122 are new partial loss-of-function natural mutations of the human melanocortin 1 receptor. *FEBS Lett.* **508**, 44–48 (2001).
 200. Delevoeye, C. *et al.* Recycling Endosome Tubule Morphogenesis from Sorting Endosomes Requires the Kinesin Motor KIF13A. *Cell Rep.* **6**, 445–454 (2014).
 201. Liou, W., Geuze, H. J. & Slot, J. W. Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem. Cell Biol.* **106**, 41–58 (1996).
 202. Bennett, D. C. & Lamoreux, M. L. The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res.* **16**, 333–344 (2003).
 203. Dessinioti, C., Antoniou, C., Katsambas, A. & Stratigos, A. J. Melanocortin 1 Receptor Variants: Functional Role and Pigmentary Associations. *Photochem. Photobiol.* **87**, 978–987 (2011).
 204. Garcia-Borrón, J. C. & Olivares, C. Melanocortin 1 Receptor And Skin Pathophysiology: Beyond Color, Much More Than Meets The Eye. *Exp. Dermatol.* **23**, 387–388 (2013).
 205. Landi, M. T. *et al.* MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science* (80). **313**, 521–522 (2006).
 206. Pastorino, L. *et al.* Novel MC1R variants in Ligurian melanoma patients and controls. *Hum. Mutat.* **24**, 103–103 (2004).
 207. Herraiz, C., Jiménez-Cervantes, C., Zanna, P. & Garcia-Borrón, J. C. Melanocortin 1 receptor mutations impact differentially on signalling to the cAMP and the ERK mitogen-activated protein

- kinase pathways. *FEBS Lett.* **583**, 3269–3274 (2009).
208. Más, J. S., Gerritsen, I., Hahmann, C., Jiménez-Cervantes, C. & Garcia-Borrón, J. C. Rate limiting factors in melanocortin 1 receptor signalling through the cAMP pathway. *Pigment Cell Res.* **16**, 540–547 (2003).
 209. 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**, 156–158 (2001).
 210. Abrisqueta, M. *et al.* Differential and competitive regulation of human melanocortin 1 receptor signaling by -arrestin isoforms. *J. Cell Sci.* **126**, 3724–3737 (2013).
 211. Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T. & Fisher, D. E. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* **391**, 298–301 (1998).
 212. Kwon, B. S., Haq, A. K., Pomerantz, S. H. & Halaban, R. Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7473–7 (1987).
 213. Kwon, B. S., Wakulchik, M., Haq, A. K., Halaban, R. & Kestler, D. Sequence analysis of mouse tyrosinase cDNA and the effect of melanotropin on its gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1301–9 (1988).
 214. Müller, G., Ruppert, S., Schmid, E. & Schütz, G. Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. *EMBO J.* **7**, 2723–30 (1988).
 215. Yamamoto, H., Takeuchi, S., Kudo, T., Sato, C. & Takeuchi, T. Melanin production in cultured albino melanocytes transfected with mouse tyrosinase cDNA. *Jpn. J. Genet.* **64**, 121–35 (1989).
 216. Jackson, I. J. A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 4392–6 (1988).
 217. Jackson, I. J., Chambers, D. M., Budd, P. S. & Johnson, R. The tyrosinase-related protein-1 gene has a structure and promoter sequence very different from tyrosinase. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3799–804 (1991).
 218. Tsukamoto, K., Jackson, I. J., Urabe, K., Montague, P. M. & Hearing, V. J. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *EMBO J.* **11**, 519–26 (1992).
 219. Jara, J. R., Solano, F. & Lozano, J. A. Assays for mammalian tyrosinase: a comparative study. *Pigment Cell Res.* **1**, 332–9 (1988).
 220. Theos, A. C., Truschel, S. T., Raposo, G. & Marks, M. S. The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. *Pigment Cell Res.* **18**, 322–336 (2005).
 221. Olivares, C., Solano, F. & García-Borrón, J. C. Conformation-dependent Post-translational Glycosylation of Tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 15735–15743 (2003).
 222. Fuller, B. B., Spaulding, D. T. & Smith, D. R. Regulation of the Catalytic Activity of Preexisting Tyrosinase in Black and Caucasian Human Melanocyte Cell Cultures. *Exp. Cell Res.* **262**, 197–208 (2001).
 223. Martínez, J. H. *et al.* The existence of apotyrosinase in the cytosol of Harding-Passey mouse melanoma melanocytes and characteristics of enzyme reconstitution by Cu(II). *Biochim. Biophys. Acta* **923**, 413–20 (1987).
 224. Cheli Y, Luciani F, Khaled M, Beuret L, Bille K, Gounon P, Ortonne J, Berlotto C, B. R. α MSH and Cyclic AMP Elevating Agents Control Melanosome pH through a Protein Kinase A-independent Mechanism. *J. Biol. Chem.* **284**, 18699–18706 (2009).
 225. Gerdemann, C., Eicken, C. & Krebs, B. The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3 Copper Proteins. *Acc. Chem. Res.* **35**, 183–191 (2002).

226. Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C. & Krebs, B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1084–1090 (1998).
227. Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J. A. & Garcia-Borrón, J. C. Tyrosinase isoenzymes: two melanosomal tyrosinases with different kinetic properties and susceptibility to inhibition by calcium. *Pigment Cell Res.* **7**, 291–297 (1994).
228. Oikawa, A., Saeki, H., Akiyama, T. & Matsumoto, J. Electron microscopic evidence for stimulation of melanosomal maturation by lysosomotropic agents and monensin in cultured B16 mouse melanoma cells. *Pigment cell Res.* **1**, 44–50 (1987).
229. Kongshoj, B., Dam Mikkelsen, N., Kobayasi, T., Lerche, C. M. & Wulf, H. C. Ammonium chloride and L-tyrosine enhance melanogenesis in vitro but not in vivo even in combination with ultraviolet radiation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **23**, 197–202 (2007).
230. Hoogduijn, M. J. *et al.* Melanin has a role in Ca²⁺ homeostasis in human melanocytes. *Pigment cell Res.* **16**, 127–32 (2003).
231. Anderson, R. G., Falck, J. R., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Visualization of acidic organelles in intact cells by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4838–42 (1984).
232. Pierzyńska-Mach, A., Janowski, P. A. & Dobrucki, J. W. Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. *Cytom. Part A* **85**, 729–737 (2014).
233. Traganos F, D. Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. *Methods Cell Biol.* **41**, 185–94 (1994).
234. Dobrucki, J. W., Feret, D. & Noatynska, A. Scattering of exciting light by live cells in fluorescence confocal imaging: phototoxic effects and relevance for FRAP studies. *Biophys. J.* **93**, 1778–86 (2007).
235. Cordes, P. *et al.* Expression in non-melanogenic systems and purification of soluble variants of human tyrosinase. *Biol. Chem.* **394**, (2013).
236. Hearing, V. J. & Ekel, T. M. Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem. J.* **157**, 549–557 (1976).
237. Ancans, Janis, Tobin, Desmond J., Hoogduijn, Martin J., Smit, Nico P., Wakamatsu, K. & Thody, A. J. Melanosomal pH Controls Rate of Melanogenesis, Eumelanin/Phaeomelanin Ratio and Melanosome Maturation in Melanocytes and Melanoma Cells. *Exp. Cell Res.* **268**, 26–35 (2001).
238. Matsuo, H. Role of LBPA and Alix in Multivesicular Liposome Formation and Endosome Organization. *Science (80)*. **303**, 531–534 (2004).
239. Gu, F. & Gruenberg, J. ARF1 Regulates pH-dependent COP Functions in the Early Endocytic Pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 8154–8160 (2000).
240. Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El Annan J, Futai M, Sun-Wada G, Bourgoin S, Casanova J, Wildeman A, B. S. V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat. Cell Biol.* **8**, 124–136 (2006).
241. Pelkonen, L., Reinisalo, M., Morin-Picardat, E., Kidron, H. & Urtti, A. Isolation of intact and functional melanosomes from the retinal pigment epithelium. *PLoS One* **11**, 1–13 (2016).
242. Smith, D. R., Spaulding, D. T., Glenn, H. M. & Fuller, B. B. The relationship between Na⁺/H⁺ exchanger expression and tyrosinase activity in human melanocytes. *Exp. Cell Res.* **298**, 521–534 (2004).
243. Tabata H, Kawamura N, Sun-Wada G, W. Y. Vacuolar-type H⁺-ATPase with the α3 isoform is the proton pump on premature melanosomes. *Cell Tissue Res.* **332**, 447–460 (2008).
244. Nuckels, R. J., Ng, A., Darland, T. & Gross, J. M. The Vacuolar-ATPase Complex Regulates Retinoblast Proliferation and Survival, Photoreceptor Morphogenesis, and Pigmentation in the Zebrafish Eye. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **50**, 893 (2009).

245. van der Poel, S. *et al.* Hyperacidification of Trans-Golgi Network and Endo/Lysosomes in Melanocytes by Glucosylceramide-Dependent V-ATPase Activity. *Traffic* **12**, 1634–1647 (2011).
246. Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore S, Gallen D, Gribouval O, Broyer M, Bates G, Hoff W, A. C. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat. Genet.* **18**, 319–324 (1998).
247. Cherqui, S., Kalatzis, V., Trugnan, G. & Antignac, C. The Targeting of Cystinosin to the Lysosomal Membrane Requires a Tyrosine-based Signal and a Novel Sorting Motif. *J. Biol. Chem.* **276**, 13314–13321 (2001).
248. Haq, M. R. Immunolocalization of Cystinosin, the Protein Defective in Cystinosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 2046–2051 (2002).
249. Anikster, Y., Shotelersuk, V. & Gahl, W. A. CTNS mutations in patients with cystinosis. *Hum. Mutat.* **14**, 454–458 (1999).
250. Kalatzis, V. Molecular pathogenesis of cystinosis: effect of CTNS mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosin. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1361–1371 (2004).
251. Gahl, W. A., Thoene, J. G. & Schneider, J. A. Cystinosis. *N. Engl. J. Med.* **347**, 111–121 (2002).
252. Kalatzis, V. & Antignac, C. New aspects of the pathogenesis of cystinosis. *Pediatr. Nephrol.* **18**, 207–15 (2003).
253. 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).
254. Grimm C, Butz E, Chen C-C, Wahl-Schott C, B. M. From mucopolipidosis type IV to Ebola: TRPML and two-pore channels at the crossroads of endo-lysosomal trafficking and disease. *Cell Calcium* **67**, 148–155 (2017).
255. Venkatachalam, K., Wong, C.-O. & Zhu, M. X. The role of TRPMLs in endolysosomal trafficking and function. *Cell Calcium* **58**, 48–56 (2015).
256. Xu, H. & Ren, D. Lysosomal Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **77**, 57–80 (2015).
257. Noben-Trauth, K. The TRPML3 Channel: From Gene to Function. in 229–237 (2011). doi:10.1007/978-94-007-0265-3_13
258. Grimm, C., Hassan, S., Wahl-Schott, C. & Biel, M. Role of TRPML and Two-Pore Channels in Endolysosomal Cation Homeostasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **342**, 236–244 (2012).
259. Zhou X, Li M, Su D, Jia Q, Li H, Li X, Y. J. Cryo-EM structures of the human endolysosomal TRPML3 channel in three distinct states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 1146–1154 (2017).
260. Dong Xian-ping *et al.* PI(3,5)P2 controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca²⁺ release channels in the endolysosome. *Nat. Commun.* **1**, 1–11 (2010).
261. Dong, X.-P., Wang, X. & Xu, H. TRP channels of intracellular membranes. *J. Neurochem.* **113**, 313–328 (2010).
262. Di Palma, F. *et al.* Mutations in Mcoln3 associated with deafness and pigmentation defects in varitint-waddler (Va) mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 14994–14999 (2002).
263. Nagata, K. *et al.* The varitint-waddler (Va) deafness mutation in TRPML3 generates constitutive, inward rectifying currents and causes cell degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 353–358 (2008).
264. Xu H, Delling M, Li L, Dong X, C. D. Activating mutation in a mucolipin transient receptor potential channel leads to melanocyte loss in varitint-waddler mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 18321–18326 (2007).
265. Hyun J, Li Q, Tjon-Kon-Sang S, So I, Kiselyov K, M. S. Gain-of-function Mutation in TRPML3 Causes the Mouse Varitint-Waddler Phenotype. *J. Biol. Chem.* **282**, 36138–36142 (2007).
266. Kim H, Li Q, Tjon-Kon-Sang S, So I, Kiselyov K, Soyombo A, M. S. A novel mode of TRPML3

- regulation by extracytosolic pH absent in the varitint-waddler phenotype. *EMBO J.* **27**, 1197–1205 (2008).
267. Grimm C, Jörs S, Saldanha S.A, G.Obukhov A, Pan B, Oshima K, P.Cuajungco M, Chase P, Hodder P, H. S. Small Molecule Activators of TRPML3. *Chem. Biol.* **17**, 135–148 (2010).
268. Berens, W. *et al.* Different approaches for assaying melanosome transfer. *Pigment Cell Res.* **18**, 370–381 (2005).
269. Berson, J. F. *et al.* Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J. Cell Biol.* **161**, 521–533 (2003).
270. Hoashi T, Muller J, Vieira W, Rouzaud F, Kikuchi K, Tamaki K, H. V. The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers. *J. Biol. Chem.* **281**, 21198–208 (2006).
271. Bonifacino, J. S. & Glick, B. S. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153–66 (2004).
272. Bonifacino, J. S. & Rojas, R. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 568–79 (2006).
273. Falcon-Perez, J. M. Distribution and dynamics of Lamp1-containing endocytic organelles in fibroblasts deficient in BLOC-3. *J. Cell Sci.* **118**, 5243–5255 (2005).
274. Matteoni, R. Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J. Cell Biol.* **105**, 1253–1265 (1987).
275. Mu F, Callaghan J, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton R, Campbell P, McCluskey J, Yeo J, Tock E, T. B. EEA1, an Early Endosome-Associated Protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 13503–13511 (1995).
276. Novikoff, A. B., Essner, E. & Quintana, N. Golgi Apparatus And Lysosomes. *Fed. Proc.* **23**, 1010–22 (1964).
277. Griffiths, G. Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **101**, 949–964 (1985).
278. Bos, K., Wraight, C. & Stanley, K. K. TGN38 is maintained in the trans-Golgi network by a tyrosine-containing motif in the cytoplasmic domain. *EMBO J.* **12**, 2219–28 (1993).

CONCLUSIONES

1. Las variantes alélicas naturales del receptor MC1R encontradas en familias pakistaníes con fenotipo hipopigmentado, p.Y298* y p.V174del, presentan pérdida de función total o parcial, respectivamente, en su acoplamiento a la cascada del AMPc. Ello confirma la relación entre variantes hipomórficas y déficit de pigmentación.
2. La forma p.V174del es capaz de unir agonistas con afinidad comparable al receptor normal, y también de activar la señalización vía AMPc y ERK1/2, pero su expresión en superficie está reducida, por lo que su alteración funcional se relaciona con un tráfico intracelular defectuoso.
3. La pérdida de función completa de p.Y298* se explica por su incapacidad de unir agonistas, además de por su menor expresión en la membrana plasmática.
4. Los melanocitos de ratón melan-md1 o *mahoganoides*, que han perdido la expresión de *Mgrn1*, están más diferenciados y pigmentados que los melanocitos control melan-a6 como consecuencia de un mayor número de melanosomas y del predominio de melanosomas maduros completamente melanizados (estadio IV). El silenciamiento de *Mgrn1* en células melan-a6 mimetiza el fenotipo *mahoganoide* en términos de maduración melanosomal.
5. La mutación *mahoganoide* no altera ni la cantidad ni el procesamiento de las enzimas melanogénicas, en particular tirosinasa, ni su actividad enzimática (tirosina hidroxilasa y DOPA oxidasa) medida *in vitro* con extractos celulares.
6. La actividad tirosina hidroxilasa medida *in vivo* (en las células en cultivo) es un orden de magnitud mayor en los melanocitos melan-md1. Dicha actividad, limitante del flujo a través de la vía melanogénica, aumenta en melanocitos y células de melanoma tras la represión de la expresión de *Mgrn1*. Por lo tanto, *Mgrn1* se comporta como un regulador negativo de la actividad específica de tirosinasa, pero no de su expresión.
7. La represión o anulación de la expresión de *Mgrn1* determina un aumento del pH melanosomal, estimado mediante las sondas DAMP o AO. Esta neutralización del melanosoma explica la mayor actividad específica de tirosinasa en células que no expresan *Mgrn1* e identifica a *Mgrn1* como un nuevo regulador del pH melanosomal.
8. La sobreexpresión de MGRN1 en células heterólogas HEK293T disminuye el pH de los lisosomas y la actividad de tirosinasa expresada ectópicamente, lo que apunta a un papel más general de MGRN1 en la biogénesis de los LRO y no solo de los melanosomas.
9. La comparación de los perfiles de expresión génica de las líneas de melanocitos de ratón melan-md1 y melan-a6 mediante hibridación de micromatrices confirma que *Mgrn1* es un nuevo regulador del pH de los LRO y muestra que algunos genes que codifican proteínas transportadoras de iones y H⁺, tales como *Atp6V0d2*, *Ctns* y *Mcoln3*, están sobreexpresados en células melan-md1.
10. Ensayos de validación funcional demuestran que, si bien la expresión de *Atp6V0d2* y *Ctns* es sensible a los niveles de *Mgrn1*, estos genes no juegan un papel determinante en la basificación del melanosoma tras la represión de *Mgrn1*.

11. El gen *Mcoln3* se induce tras la represión o anulación de *Mgrn1*, su producto se localiza los melanosomas y su silenciamiento disminuye la actividad tirosina hidroxilasa, a la vez que disminuye el pH intramelanosomal. *Mcoln3* parece por tanto implicado en la regulación del pH melanosomal y la actividad melanogénica por *Mgrn1*.
12. La represión de la expresión de *MGRN1* en células de melanoma humano MNT-1 mimetiza parcialmente el fenotipo de pigmentación *mahoganoide*, sugiriendo que la función de *MGRN1* es parecida en melanocitos humanos y murinos.

ANEXOS

Anexo I

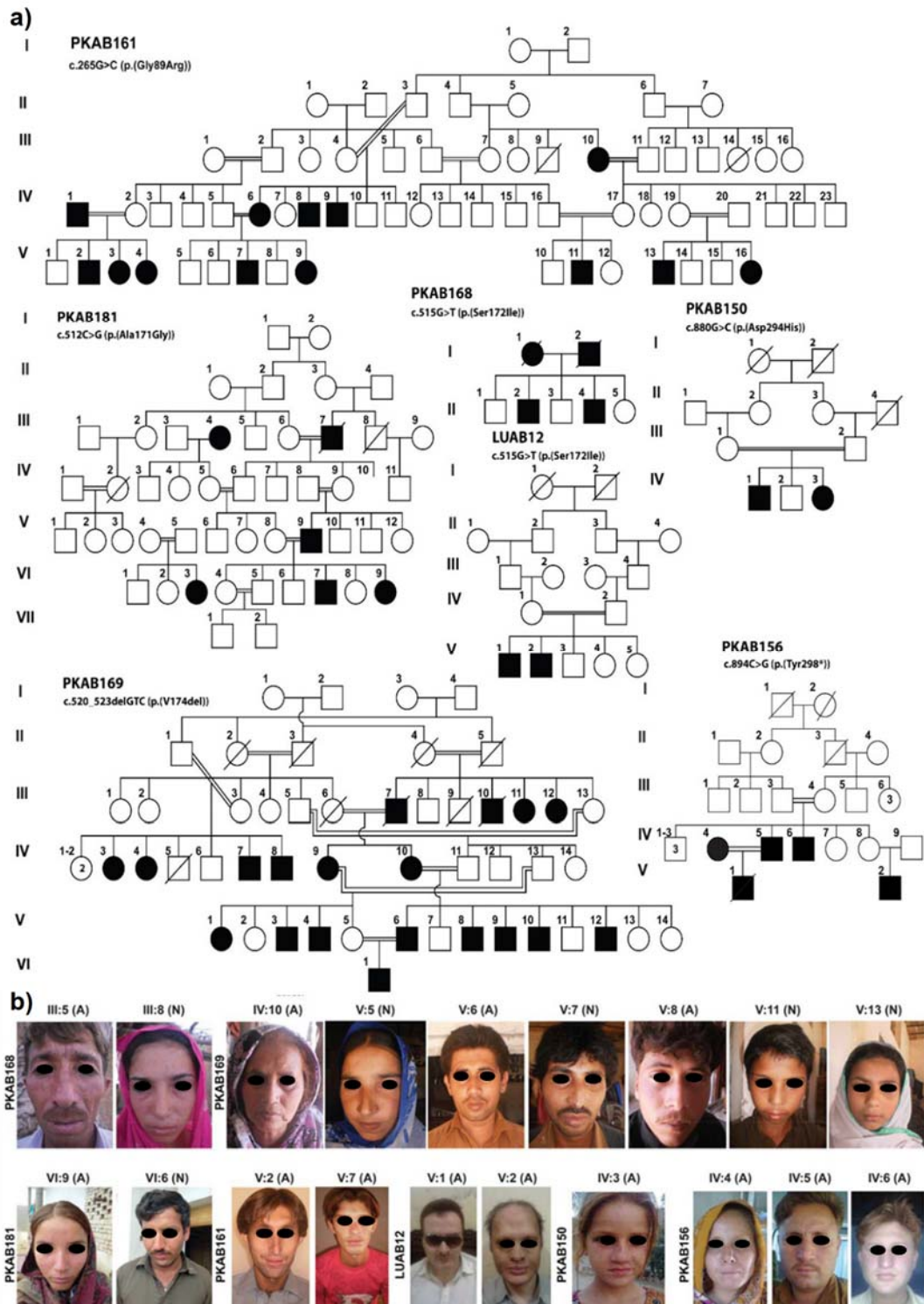


Figura A. Árbol genealógico con cuadro de Punnett de siete familias pakistanias con MC1R mutado. a) Los símbolos llenos y vacíos representan individuos afectados y sanos, respectivamente. Las líneas dobles que unen a individuos representan matrimonio consanguíneo. Las flechas indican individuos afectados, seleccionados vía secuenciación de exoma completo. Los genotipos de los participantes también están incluidos. b) Fotografías de los individuos homocigotos (A) para *MC1R*. Algunos de los primeros pacientes usan tinte capilar. Para comparar con la tonalidad de la piel, se muestran también individuos normales (N) para *MC1R*.

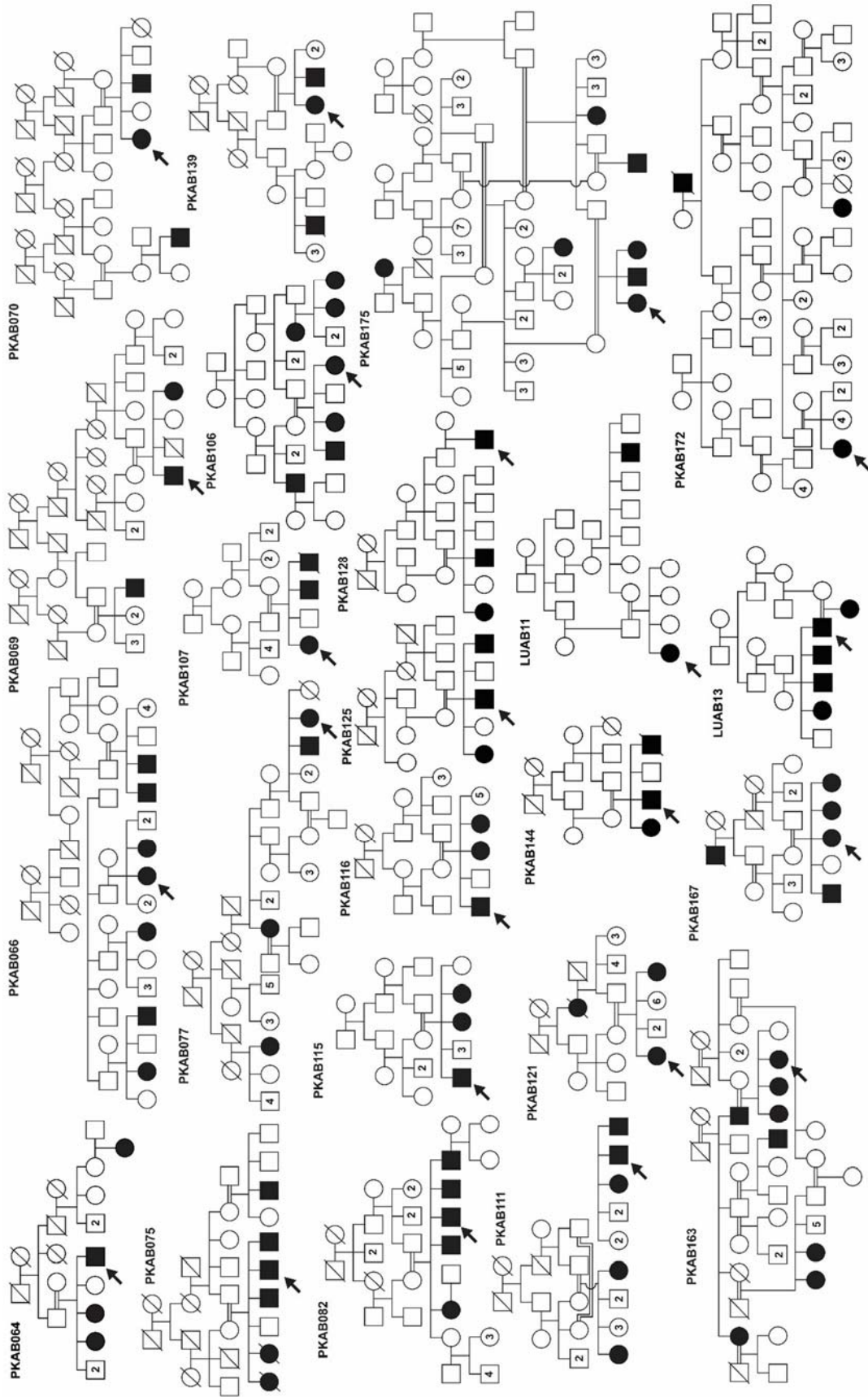


Figura B. Pedigrí de 23 familias con fenotipo hipopigmentado. Los símbolos llenos representan individuos con piel hipopigmentada. Las flechas indican el primer paciente de cada familia. Los datos clínicos de los primeros pacientes se indican en la tabla 1.

Familia	Sexo	Edad	Color Piel	Color Pelo	Color Iris	Fondo	Hipoplasia macular	Foto fobia	Nistagmo
PKAB064	M	10	Blanco	Blanco	Gris/Azul	Albino	Si	Si	Si
PKAB066	F	28	Blanco	Blanco	Gris	Albino	Si	Si	Si
PKAB069	M	12	Blanco	Amarillo	Verde	Albino	Si	Si	Si
PKAB070	F	14	Blanco	Amarillo	Verde	Albino	Si	Si	Si
PKAB075	M	13	Rosáceo Blanco	Blanco	Gris/Azul	Albino	Si	Si	Si
PKAB077	F	20	Blanco	Amarillo	Verde-Marrón	Albino	Si	Si	Si
PKAB082	M	24	Rojo	Blanco	Marrón claro	Albino	Si	Si	Si
PKAB106	F	9	Blanco	Blanco	Gris	Albino	Si	Si	Si
PKAB107	F	28	Blanco	Amarillo Blanco	Gris/Azul	Albino	Si	Si	Si
PKAB111	M	16	Blanco	Gris	Negro	Normal	No	No	No
PKAB115	M	15	Blanco	Amarillo Blanco	Gris/Azul	Albino	Si	Si	Si
PKAB116	M	26	Blanco	Blanco	Gris	Albino	Si	Si	Si
PKAB121	F	8	Blanco	Blanco	Marrón	Albino	Si	Si	No
PKAB125	M	20	Blanco	Amarillo	Marrón	Albino	Si	Si	Si
PKAB128	M	14	Blanco	Amarillo	Marrón	Albino	Si	Si	Si
PKAB139	F	20	Rojo	Rosa Blanco	Marrón oscuro	Albino	Si	Si	No
PKAB144	M	15	Blanco	Amarillo Blanco	Gris/Azul	Albino	Si	Si	Si
PKAB150	M	12	Amarillo Marrón	Rosa Blanco	Verde-Marrón	Normal	No	No	No
PKAB156	M	12	Rojizo Marrón	Rosáceo Blanco	Marrón	Normal	No	No	No
PKAB161	F	50	Rojo	Marrón	Marrón/Negro	Normal	No	No	No
PKAB163	F	20	Marrón	Blanco	Verde-Marrón	Albino	Si	No	Si
PKAB167	F	10	Rojo	Rosa Blanco	Marrón oscuro	Albino	Si	Si	No
PKAB168	M	35	Gris Blanco	Blanco	Marrón	Normal	No	No	No
PKAB169	F	48	Marrón	Blanco	Marrón	Normal	No	No	No
PKAB172	F	17	Blanco	Amarillento Marrón	Marrón	Albino	Si	Si	Si
PKAB175	F	30	Amarillo	Blanco	Marrón	Albino	Si	No	No
PKAB181	M	30	Rojizo Marrón	Rosáceo Blanco	Marrón	Normal	No	No	No
LUAB11	F	18	Blanco	Blanco	Marrón claro	Claro	Si	Si	Si
LUAB12	M	42	BlancoMarrón	Grisáceo Marrón	Marrón claro	Normal	No	No	No
LUAB13	M	29	Rosáceo Blanco	Blanco	Verde-Marrón	Claro	Si	Si	Si

Tabla 1. Fenotipo de los primeros individuos analizados de las familias pakistaníes que presentan hipopigmentación.

Familia	Variantes patógenicas*	Predicción	SIFT	Mutación testada	Frec. alélica	1000 Genome Browser	NHLBI exome variants	Referencias
PKAB161	c.265G>C (p.(Gly89Arg))	Posiblemente maligno	Maligno	Polimorfismo	0/186	0.000	1/12943	(McKenzie et al., 2003)
PKAB181	c.512C>G (p.(Ala171Gly))	Benigno	Maligno	Causa enfermedad	0/186	--	2/12970	Ensembl.org rs376670171
PKAB168, LUAB12	c.515G>T (p.(Ser172Ile))	Posiblemente maligno	Maligno	Polimorfismo	0/186	0.001	1/12969	(Landi et al., 2006)
PKAB169	c.520_523delGTC (p.(V174del))	--	--	Causa enfermedad	0/186	--	--	(Pastorino et al., 2004)
PKAB150	c.880G>C (p.(Asp294His))	Posiblemente maligno	Maligno	Causa enfermedad	0/186	0.003	205/12519	(Valverde et al., 1995)
PKAB156	c.894C>G (p.(Tyr298*))	--	--		0/186	--	2/12666	En este estudio

Tabla 2. Variantes de *MC1R* y su efecto en las proteínas. (McKenzie et al., 2003; Landi et al., 2006; Pastorino et al., 2004; Valverde, Healy, Jackson, Rees, & Thody, 1995)

Anexo II

Composición de los Tampones

A.- Tampones generales:

1. PBS 1x → NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1mM, pH 7.2.
2. TBS 1x → Tris (base) 200mM y NaCl 1.37M pH 7.4.
3. Tampón fosfato → Hidrógeno fosfato (HPO₄⁻²), dihidrógeno fosfato (H₂PO₄⁻).
4. Tripsina/EDTA → 0.5% tripsina, 0.2% EDTA en PBS1x.
5. Tampón de solubilización celular I → PBS 1x, PMSF 100 ng/ml, 1% de Igepal-CA630.
6. Tampón de solubilización celular II → 50 mM Tris-HCl pH 8, 1% Igepal, 1mM EDTA, 0.1 mM PMSF.
7. Cocktail de inhibidores de fosfatasas → imidazol 200 mM, NaF 100 mM, molibdato de sodio 115 mM, o-vanadato de sodio 100 mM y tartrato de sodio dihidratado 400 mM.
8. Tampón de desglucosilación → Tampón fosfato 150mM pH 7, EDTA 30mM y SDS 0.3%.

B.- Tampones de ADN:

9. Tampón de recorrido TAE → Tris 40mM, EDTA 1mM y ácido acético 30mM.

C.- Tampones y reactivos de SDS-PAGE y transferencia Wester:

10. 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.
11. Tampón de recorrido disociante (TGS) → Tris (base) 25mM, Glicina 190mM, SDS 0.1%, pH 8.3.
12. Tampón de transferencia → Tris (base) 48mM, Glicina 39mM, SDS 0.04%, pH 9.2, Metanol 20%.
13. GELES de poliacrilamida: la mezcla acrilamida/bisacrilamida (AA/bAA) se utilizó en la proporción 30:0.8. A continuación se detalla la composición de los geles utilizados habitualmente en SDS-PAGE.

- Gel separador (10% acrilamida)
 - H₂O (1.6 ml)
 - AA/bAA (1.33 ml)
 - Tris-HCl 1.5 M 0.4% SDS pH 8.8 (1.25 ml)
 - (NH₄)₂S₂O₈ 10% (40 µl)
 - TEMED (5 µl)

- Gel hacinador (4% poliacrilamida)
H₂O (1.2 ml)
AA/bAA (270 µl)
Tris-HCl 0.5 M 0.4% SDS pH 6.8 (0.5 ml)
(NH₄)₂S₂O₈ 10% (20 µl)
TEMED (2.5 µl)

D.- Otros tampones:

14. Tampón de lavado → PBS 1x- 1%Tween20 o TBS 1x -1%Tween20.
15. Tampón de bloqueo → TBST con 2%BSA o 5% de Leche o PBS-Tween con 2%BSA o 5% de Leche.
16. Tampón A (tinción DAMP-DNP) → NaH₂PO₄ 10mM; NaCl 150mM y MgCl₂ 2mM a pH 7.4.

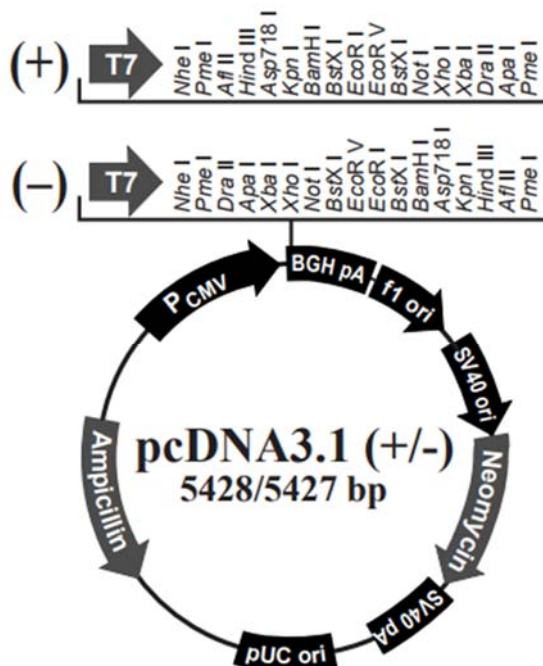
Anexo III

A.- 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):
<https://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 cDNAs y proteínas se localizaron en el NCBI y en el Instituto Sanger:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>
<http://www.ensembl.org/index.html>
- Herramienta para alineamiento de secuencias:
<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

B.- Mapa y sitios de restricción de vector empleado



Anexo IV

The official journal of

INTERNATIONAL FEDERATION OF PIGMENT CELL SOCIETIES · SOCIETY FOR MELANOMA RESEARCH

PIGMENT CELL & MELANOMA Research

Identification and functional characterization of natural human melanocortin 1 receptor mutant alleles in Pakistani population

Mohsin Shahzad, Julia Sires Campos, Nabeela Tariq, Cecilia Herraiz Serrano, Rizwan Yousaf, Celia Jiménez-Cervantes, Sairah Yousaf, Yar M. Waryah, Haseeb A. Dad, Elizabeth M. Blue, Nara Sobreira, Francesc López-Giráldez, University of Washington Center for Mendelian Genomics, Tasleem Kausar, Muhammad Ali, Ali M. Waryah, Saima Riazuddin, Rehan S. Shaikh, José C. García-Borrón and Zubair M. Ahmed

DOI: 10.1111/pcmr.12400

Volume 28, Issue 6, Pages 730–735

If you wish to order reprints of this article, please see the guidelines [here](#)

Supporting Information for this article is freely available [here](#)

EMAIL ALERTS

Receive free email alerts and stay up-to-date on what is published in Pigment Cell & Melanoma Research – [click here](#)

Submit your next paper to PCMR online at <http://mc.manuscriptcentral.com/pcmr>

Subscribe to PCMR and stay up-to-date with the only journal committed to publishing basic research in melanoma and pigment cell biology

As a member of the IFPCS or the SMR you automatically get online access to PCMR. Sign up as a member today at www.ifpcs.org or at www.societymelanomaresarch.org



To take out a personal subscription, please [click here](#)

More information about Pigment Cell & Melanoma Research at www.pigment.org

Identification and functional characterization of natural human melanocortin 1 receptor mutant alleles in Pakistani population

Mohsin Shahzad^{1,*}, Julia Sires Campos^{2,*}, Nabeela Tariq^{3,*}, Cecilia Herraiz Serrano², Rizwan Yousof¹, Celia Jiménez-Cervantes², Sairah Yousof^{1,3}, Yar M. Waryah⁴, Haseeb A. Dad⁵, Elizabeth M. Blue⁶, Nara Sobreira⁷, Francesc López-Giráldez⁸, University of Washington Center for Mendelian Genomics[†], Tasleem Kausar^{3,§}, Muhammad Ali^{3,¶}, Ali M. Waryah⁴, Saima Riazuddin¹, Rehan S. Shaikh³, José C. García-Borrón^{2,*} and Zubair M. Ahmed^{1,*}

1 Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, School of Medicine, University of Maryland, Baltimore, MD, USA **2** Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Murcia and IMIB-Arrixaca, Murcia, Spain **3** Institute of Molecular Biology & Biotechnology, Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan **4** Molecular Biology & Genetics Department, Medical Research Center, Liaquat University of Medical & Health Sciences, Jamshoro, Pakistan **5** Institute of Pharmaceutical Sciences, University of Veterinary & Animal Sciences, Lahore, Pakistan **6** Division of Medical Genetics, Department of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, USA **7** McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA **8** Yale Center for Genome Analysis, Yale University, West Haven, CT, USA [†]Present address: Sardar Bahadur Khan Womens University, Quetta, Pakistan [§]Present address: The Women University, Multan, Pakistan [¶]Present address: Government College University, Faisalabad, Pakistan

KEYWORDS melanocortin 1 receptor/melanocytes/cAMP signaling/hypopigmentation

PUBLICATION DATA Received 10 March 2015, revised and accepted for publication 17 July 2015, published online 21 July 2015

doi: 10.1111/pcmr.12400

CORRESPONDENCE José Carlos García-Borrón and Zubair M. Ahmed, e-mails: gborron@um.es; zahmed@smail.umaryland.edu

*Contributed equally to this work.

[†]Authors from the group University of Washington Center for Mendelian Genomics are given in Supporting Information.

Summary

Melanocortin 1 receptor (MC1R), a Gs protein-coupled receptor of the melanocyte's plasma membrane, is a major determinant of skin pigmentation and phototype. Upon activation by α -melanocyte stimulating hormone, MC1R triggers the cAMP cascade to stimulate eumelanogenesis. We used whole-exome sequencing to identify causative alleles in Pakistani families with skin and hair hypopigmentation. Six *MC1R* mutations segregated with the phenotype in seven families, including a p.Val174del in-frame deletion and a p.Tyr298* nonsense mutation, that were analyzed for function in heterologous HEK293 cells. p.Tyr298* MC1R showed no agonist-induced signaling to the cAMP or ERK pathways, nor detectable agonist binding. Conversely, signaling was comparable for p.Val174del and wild-type in HEK cells overexpressing the proteins, but binding analysis suggested impaired cell surface expression. Flow cytometry and confocal imaging studies revealed reduced plasma membrane expression of p.Val174del and p.Tyr298*. Therefore, p.Tyr298* was a total loss-of-function (LOF) allele, while p.Val174del displayed a partial LOF attribute.

Significance

Here, we documented *MC1R* alleles in Pakistani families segregating skin hypopigmentation. Our data provide further insight on the relationship of MC1R status with human pigmentation and support the current view that functional characterization of new variants might allow for a prediction of phenotypic effects for low frequency alleles that cannot be reliably analyzed by genetic epidemiology association studies, or for mutations not easy to analyze in silico. Our results would be useful for future diagnosis, genetic counseling, molecular epidemiology and functional studies of MC1R-associated skin tone disorders. They also reveal the complexity of determinants of normal MC1R trafficking to the plasma membrane.

Skin pigmentation, one of the most visible phenotypes in humans, is a complex trait regulated by ~120 genes (Bennett and Lamoreux, 2003; Dessinioti et al., 2011). Proteins encoded by these genes subserve many functions that span the gamut from transcription factors (e.g. PAX3, SOX10, MITF) to receptors expressed at the plasma membrane of melanocytes [e.g. melanocortin 1 receptor (MC1R)]. In humans, epidermal melanocytes are the primary melanin-manufacturing units. Melanins are formed within melanosomes, which are transferred to keratinocytes and distributed throughout the skin (Yamaguchi et al., 2007).

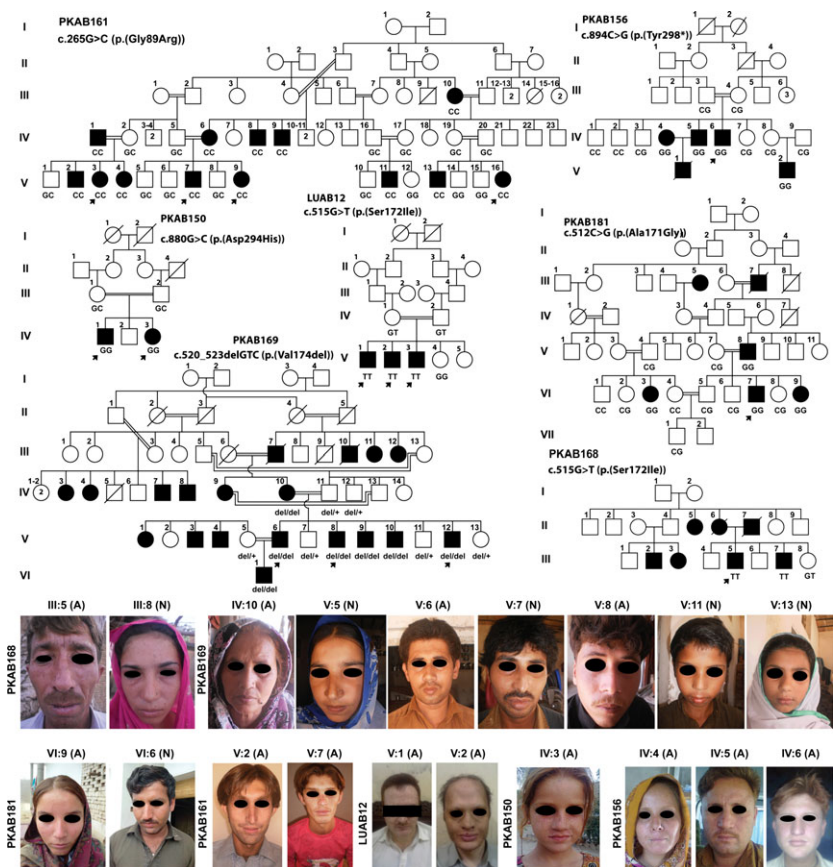
Thirty large families (Figures 1 and S1) with hypopigmentation (Table S1) were recruited from different Pakistani regions after institutional review committees' approval (Methods S1). For genetic screening, we adopted whole-exome enrichment followed by massive parallel sequencing. Bioinformatic analysis of sequencing data identified six *MC1R* variants co-segregating with the phenotype in seven of these families (Figure 1, Table 1). These variants were four missense substitutions, an in-frame deletion and a nonsense mutation (Table 1, Figure S2). The p.Asp294His allele found in family PKAB150 is a well-documented 'red hair color' variant (R allele) in populations of European descent. Similarly, p.Gly89Arg, p.Ser172Ile and p.Val174del alleles have been reported (Landi et al., 2006; Pastorino et al., 2004), and the

p.Ala171Gly variant appears in SNP public databases (Table 1). On the other hand, a c.894C>G (p.Tyr298*) variant which has not yet been reported to the best of our knowledge was found in one *MC1R* family (Table 1). SNPs linked to *MC1R* were genotyped in unrelated affected individuals of families PKAB168 and LUAB12, homozygous for the c.515G>T [p.(Ser172Ile)] mutation, and the flanking haplotype was consistent with a founder effect (Table S2). No mutations in other known pigmentation genes were found in these seven families, segregating *MC1R* alleles.

Affected individuals homozygous for *MC1R* alleles had reddish brown hair, pinkish white skin and light brownish irises, and skin freckles (Figure 1). No retinal degeneration, photophobia or nystagmus was observed. Additionally, a family history and physical and clinical evaluations of the two oldest affected individuals revealed no signs of hypotonia, obesity, impaired vestibular or cognitive abilities, seizures, hearing loss, cataracts or skin cancer.

Consistent with the phenotypes, all missense mutations were predicted damaging (Table 1). However, no reliable in silico predictions could be obtained for the p.Tyr298* mutation and the in-frame single amino acid deletion p.Val174del. *MC1R* contains 317 amino acids, and the p.Tyr298* mutation should delete the cytoplasmic tail bearing the C-terminal pentapeptide (Figure S2B)

Figure 1. Hypopigmentation phenotypes in seven Pakistani families co-segregates with *MC1R* mutations. Filled and empty symbols represent affected and unaffected individuals, respectively. A double line uniting two individuals represents consanguineous marriage. Arrows indicate the affected individuals screened via whole-exome sequencing. Genotypes of all the participating individuals are also shown. Photographs of individuals homozygous for *MC1R* alleles. Some of the probands have used hair dyes. For comparison of skin tone, normal (N) individuals from *MC1R* families are also shown.



required for normal cell surface expression (Sanchez-Mas et al., 2005). We performed functional studies of p.Tyr298* and p.Val174del in transiently transfected HEK293 cells. The electrophoretic pattern of the mutants and wild-type (WT) proteins was comparable, with bands

corresponding to 'de novo' and glycosylated MC1R monomers and dimers (Figure 2A). The intracellular stability of the proteins was assessed by treating transfected cells with 0.1 mM cycloheximide (CHX) for various times (Figure 2B) followed by plotting the intensity of residual

Table 1. MC1R variants and their predicted effect on the encoded protein

Family ID	Pathogenic variants	Polyphen2	SIFT	Mutation taster	Allele frequency	1000 genome browser	NHLBI exome variants	Reference
PKAB161	c.265G>C [p.(Gly89Arg)]	Possibly damaging	Damaging	Polymorphism	0/186	0.000	1/12943	Mckenzie et al. (2003)
PKAB181	c.512C>G [p.(Ala171Gly)]	Benign	Damaging	Disease causing	0/186	–	2/12970	dbSNP141 database <i>rs376670171</i>
PKAB168, LUAB12	c.515G>T [p.(Ser172Ile)]	Probably damaging	Damaging	Polymorphism	0/186	0.001	1/12969	Landi et al. (2006)
PKAB169	c.520_523delGTC [p.(Val174del)]	–	–	Disease causing	0/186	–	–	Pastorino et al. (2004)
PKAB150	c.880G>C [p.(Asp294His)]	Probably damaging	Damaging	Disease causing	0/186	0.003	205/12519	Valverde et al. (1995)
PKAB156	c.894C>G [p.(Tyr298*)]	–	–	–	0/186	–	2/12666	In this study

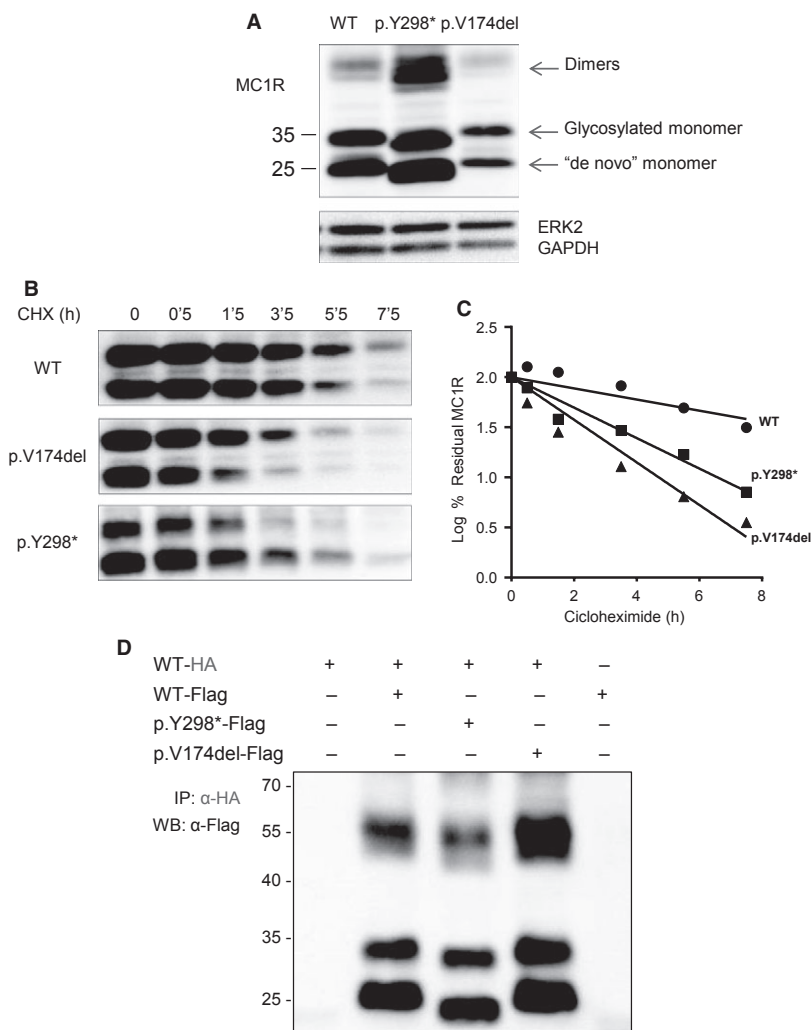


Figure 2. Expression and stability of p.Tyr298* and p.Val174del MC1R. (A) HEK cells transfected with Flag epitope-labeled MC1R forms were detergent-solubilized. Aliquots were Western blotted with an anti-Flag antibody. Comparable loading was ascertained by staining for ERK2 and GAPDH (lower blot). The mobility of p.Tyr298* was slightly higher, consistent with deletion of 19 C-terminal amino acids. (B) Intracellular stability of MC1R variants. Cells expressing the indicated MC1R forms were treated with cycloheximide (CHX) for 30 min to 7.5 h. Residual levels of MC1R were estimated by Western blot. (C) Cells transfected to express WT or mutant MC1R were treated with 0.1 mM cycloheximide (CHX) for times from 0.5 to 7.5 h, washed and detergent-solubilized. Aliquots were electrophoresed and blotted with anti-Flag. The intensity of receptor bands in the blots was quantitated with ImageJ. The residual signals were plotted as a semi-log graph for calculation of half-lives. (D) Co-immunoprecipitation of WT and variant MC1R. HEK cells were transfected with WT MC1R bearing a C-terminal HA tag, alone or in combination with Flag-labeled WT, p.Tyr298* or p.Val174del. Extracts were immunoprecipitated with anti-HA, and the immune complexes were analyzed by Western blot using an anti-Flag. A blot representative of three experiments is shown.

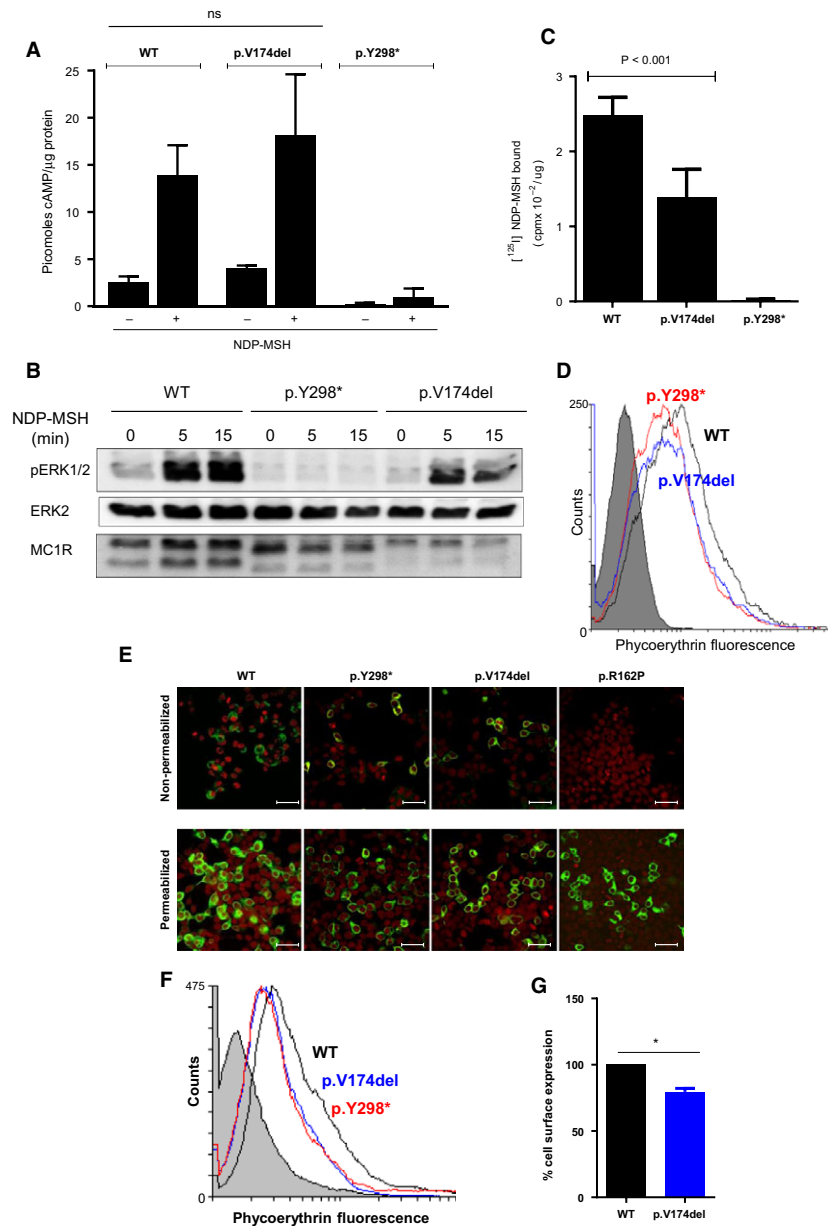


Figure 3. Functional analysis of p.Tyr298* and p.Val174del MC1R. (A) cAMP levels in cells expressing the mutants after stimulation with saturating NDP-MSH (10^{-6} M, 30 min). cAMP was estimated by an enzyme immunoassay (results given as mean \pm SEM, $n = 6$, p values calculated with GraphPad software. ns, not significant). (B) Functional coupling of p.Tyr298* and p.Val174del to the ERKs. PC12 cells expressing the MC1R forms were stimulated with NDP-MSH (10^{-6} M) for the times shown and solubilized in the presence of phosphatase inhibitors. Aliquots were electrophoresed, blotted and probed for phosphorylated ERKs (pERK1/2, upper blot). Membranes were reprobed for ERK2 to ascertain comparable loading (middle) and for MC1R to assess transfection (lower blot). (C) Equilibrium binding of [125 I]NDP-MSH. Transfected cells were incubated with 10^{-9} M [125 I]NDP-MSH for 1 h, washed, and the radioactivity associated was determined (mean \pm SEM, $n = 6$). (D) Flow cytometric analysis of cell surface expression. Non-permeabilized cells expressing the indicated MC1R forms were stained, and 10,000 events were analyzed by flow cytometry. The filled curve is a blank obtained with cells transfected with empty vector. Histograms corresponding to WT and variant MC1R are shown in red for p.Tyr298* (p.Y298*), blue for p.Val174del (p.V174del) and black for WT. Representative histograms out of triplicates are shown. (E) Confocal microscopy demonstration of receptor variants on the cell surface of HEK293 cells. Cells grown on coverslips were transfected as indicated and, if required, permeabilized with 0.5% Igepal, 15 min at 4°C. Cells were stained for MC1R (green) with anti-Flag followed by an Alexa 488-conjugated secondary antibody. Nuclei were stained with 7-AAD (red). The misprocessed and fully retained p.Arg162Pro variant (Sanchez-Laorden et al., 2009) used as control was not stained in non-permeabilized cells. Bar size: 42 μ M. (F) Flow cytometric analysis of cell surface expression of WT and variant MC1R expressed in HBL human melanoma cells. Transfection, analysis and graph as in panel D. (G) Comparison by an ELISA procedure of cell surface expression of WT and p.Val174del expressed in human HBL melanoma cells.

signals as a semi-log graph (Figure 2C) for calculation of half-lives (3.9 h for WT, 2.1 h for p.Tyr298* and 1.6 h for p.Val174del). Therefore, the p.Tyr298* and p.Val174del mutations significantly destabilized the receptor.

Melanocortin 1 receptor undergoes dimerization as an early biosynthetic step (Sanchez-Laorden et al., 2006). To verify whether the mutants were able to heterodimerize with WT receptor, we performed co-immunoprecipitation studies using differentially epitope-labeled MC1R forms. Upon immunoprecipitation of WT, both p.Tyr298* and p.Val174del were detected in the immune pellets, indicating efficient heterodimerization (Figure 2D).

Next, we compared activation of cAMP signaling by WT and mutant receptors. Upon stimulation with NDP-MSH, cells expressing p.Val174del showed cAMP levels as high as WT. Conversely, p.Tyr298* was devoid of agonist-induced signaling to the cAMP pathway (Figure 3A). We also obtained dose–response curves for agonist concentrations from 10^{-11} to 10^{-6} M (Figure S3). Again, p.Tyr298* showed a complete loss-of-function (LOF), whereas dose–response curves were similar for p.Val174del and WT (EC₅₀ ~10 and 30 nM, respectively). Agonist-stimulated MC1R activates the extracellular signal-regulated protein kinases ERK1 and ERK2 independently of cAMP (Herraiz et al., 2009, 2011). Accordingly, we checked the MC1R forms for ERK activation (Figure 3B). WT and p.Val174del comparably activated the ERKs upon stimulation with NDP-MSH, whereas the p.Tyr298* mutant was completely inactive.

To distinguish between inability of p.Tyr298* to bind agonist and, alternatively, failure to undergo an agonist-induced transition to the active state, we performed radioligand binding analysis using [¹²⁵I]NDP-MSH as tracer. p.Tyr298* did not show detectable binding. However, p.Val174del displayed reduced albeit significant binding potential (Figures 3C and S4), with binding affinity comparable with WT (K_d 1.2 ± 0.3 and 3.4 ± 0.7 nM for p.Val174del and WT, respectively), but significantly lower B_{max} (11.7 ± 0.7 and 3.3 ± 0.2 femtomoles/μg protein for WT and p.Val174del, respectively). These data suggested that p.Val174del was able to bind agonist with high affinity but was trafficked to the cell surface less efficiently than WT. Conversely, p.Tyr298* was unable to bind agonist, either because of complete intracellular retention or due to an aberrant conformation with very low affinity for the agonist.

We assessed the plasma membrane expression of the mutants by flow cytometry. We used expression constructs harboring the Flag epitope fused to the extracellular N-terminus, so as to detect specifically cell surface MC1R molecules in non-permeabilized cells. For both mutants, the staining intensity was comparable but lower than WT (Figure 3D), indicating intracellular retention of the variants. Nevertheless, the finding of a staining intensity above background and of residual binding for p.Val174del also suggested partial anterograde trafficking

with significant plasma membrane expression. This was confirmed by confocal laser microscopy (Figure 3E). In this experiment, the misprocessed and fully retained p.Arg162Pro variant (Sanchez-Laorden et al., 2009) used as control was not stained in non-permeabilized cells. Finally, we wanted to confirm mis-trafficking of p.Val174del in melanocytic cells. HBL human melanoma cells were transfected with Flag-labeled WT, p.Val174del or p.Tyr298* as a control. Then, cells were stained with a phycoerythrin-labeled anti-Flag monoclonal and analyzed in a flow cytometer (Figure 3F). In keeping with the results obtained in heterologous HEK cells, both variants showed a comparable staining intensity, markedly lower than WT. We also reacted non-permeabilized HBL cells expressing WT or p.Val174del with a peroxidase-labeled anti-Flag antibody, followed by detection of cell surface receptor using a peroxidase substrate (Figure 3G). This procedure again confirmed reduced cell surface expression of p.Val174del expressed in melanocytic cells.

Overall, our functional analysis showed that p.Tyr298* was a total LOF mutant, significantly mistrafficked and unable to bind agonists. This confirmed previous findings on the importance of the cytosolic extension for normal trafficking (Mas et al., 2003), but shows that residual movement to the cell surface remains possible even in the absence of this major structural determinant. On the other hand, p.Val174del efficiently activated the cAMP and the ERK pathways, but its cell surface expression was reduced according to flow cytometry, confocal microscopy and radioligand binding experiments. This impaired anterograde trafficking did not result in decreased signaling parameters in a heterologous over-expression system where exogenous MC1R should be in excess over downstream components of the signal transduction machinery (Mas et al., 2003). However, in normal melanocytes expressing hundreds or a few thousands receptors per cell, MC1R should be the limiting factor. In these physiological conditions, any reduction in cell surface expression should cause a similar decrease in the intracellular response (Mas et al., 2003). In summary, consistent with the observed pigmentation phenotypes, our functional data allow predicting that p.Tyr298* MC1R should behave as a strong R-type RHC allele, while the p.Val174del mutant might display a partial LOF. Our results would be useful for future diagnosis, genetic counseling, molecular epidemiology and functional studies of MC1R-associated skin tone disorders.

Acknowledgments

We thank the participants for their cooperation. We also thank Thomas Jaworek for technical assistance. The authors acknowledge support of the National Human Genome Research Institute (NHGRI) and the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI). Funding was provided by HG006504 (Yale Center for Mendelian Disorders), HG006542 (Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics) and HG006493 (University of Washington Center for Mendelian Geno-

mics). The work in Pakistan was supported by a research grant (HEC-1262) to RSS from the Higher Education Commission, Islamabad. NT and TK are recipients of PhD fellowship grant from the Higher Education Commission Islamabad, Pakistan. Work in Spain was supported by SAF2012-32134 from the MINECO, Spain and FEDER funds (European Community). This study was supported by National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases (NIAMS/NIH) research grant R56AR065483 to ZMA.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interest.

References

- Bennett, D.C., and Lamoreux, M.L. (2003). The color loci of mice – a genetic century. *Pigment Cell Res.* *16*, 333–344.
- Dessinioti, C., Antoniou, C., Katsambas, A., and Stratigos, A.J. (2011). Melanocortin 1 receptor variants: functional role and pigmentary associations. *Photochem. Photobiol.* *87*, 978–987.
- Herraiz, C., Jimenez-Cervantes, C., Zanna, P., and Garcia-Borron, J.C. (2009). Melanocortin 1 receptor mutations impact differentially on signalling to the cAMP and the ERK mitogen-activated protein kinase pathways. *FEBS Lett.* *583*, 3269–3274.
- Herraiz, C., Journe, F., Abdel-Malek, Z., Ghanem, G., Jimenez-Cervantes, C., and Garcia-Borron, J.C. (2011). Signaling from the human melanocortin 1 receptor to ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases involves transactivation of cKIT. *Mol. Endocrinol.* *25*, 138–156.
- Landi, M.T., Bauer, J., Pfeiffer, R.M., Elder, D.E., Hulley, B., Minghetti, P., Calista, D., Kanetsky, P.A., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2006). MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science* *313*, 521–522.
- Mas, J.S., Gerritsen, I., Hahmann, C., Jimenez-Cervantes, C., and Garcia-Borron, J.C. (2003). Rate limiting factors in melanocortin 1 receptor signalling through the cAMP pathway. *Pigment Cell Res.* *16*, 540–547.
- Mckenzie, C.A., Harding, R.M., Tomlinson, J.B., Ray, A.J., Wakamatsu, K., and Rees, J.L. (2003). Phenotypic expression of melanocortin-1 receptor mutations in Black Jamaicans. *J. Invest. Dermatol.* *121*, 207–208.
- Pastorino, L., Cusano, R., Bruno, W., Lantieri, F., Origone, P., Barile, M., Gliori, S., Shepherd, G.A., Sturm, R.A., and Bianchi-Scarra, G. (2004). Novel MC1R variants in Ligurian melanoma patients and controls. *Hum. Mutat.* *24*, 103.
- Sanchez-Laorden, B.L., Sanchez-Mas, J., Martinez-Alonso, E., Martinez-Menarguez, J.A., Garcia-Borron, J.C., and Jimenez-Cervantes, C. (2006). Dimerization of the human melanocortin 1 receptor: functional consequences and dominant-negative effects. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 172–181.
- Sanchez-Laorden, B.L., Herraiz, C., Valencia, J.C., Hearing, V.J., Jimenez-Cervantes, C., and Garcia-Borron, J.C. (2009). Aberrant trafficking of human melanocortin 1 receptor variants associated with red hair and skin cancer: steady-state retention of mutant forms in the proximal golgi. *J. Cell. Physiol.* *220*, 640–654.
- Sanchez-Mas, J., Sanchez-Laorden, B.L., Guillo, L.A., Jimenez-Cervantes, C., and Garcia-Borron, J.C. (2005). The melanocortin-1 receptor carboxyl terminal pentapeptide is essential for MC1R function and expression on the cell surface. *Peptides* *26*, 1848–1857.
- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J.L., and Thody, A.J. (1995). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet.* *11*, 328–330.
- Yamaguchi, Y., Brenner, M., and Hearing, V.J. (2007). The regulation of skin pigmentation. *J. Biol. Chem.* *282*, 27557–27561.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Methods S1. Families enrollment and functional studies.

Figure S1. Pakistani families segregating hypopigmentation phenotype.

Figure S2. MC1R mutations in Pakistani families.

Figure S3. Dose-response curves for stimulation of cAMP synthesis downstream of WT or mutant MC1R.

Figure S4. Competition radioligand binding analysis.

Table S1. Phenotype of probands of Pakistani families segregating hypopigmentation.

Table S2. SNP genotypes in 1 359 277 bp surrounding MC1R mutation.



Human melanocortin 1 receptor-mediated ubiquitination of nonvisual arrestins. Role of Mahogunin Ring Finger 1 E3 ligase



Marta Abrisqueta, Concepción Olivares, Cecilia Herraiz, María Castejón-Griñán, Julia Sirés-Campos, José C. García-Borrón, Celia Jiménez-Cervantes*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Murcia and Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), El Palmar-30120 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Melanocortin 1 receptor
β-arrestin
MGRN1
Ubiquitination
Internalization
Melanocytes

ABSTRACT

Signaling from the melanocortin 1 receptor (MC1R), a Gs protein-coupled receptor (GPCR) crucial for melanocyte proliferation and differentiation, is regulated by cytosolic β-arrestins (ARRBs). MC1R signaling is also negatively modulated by the E3-ubiquitin ligase Mahogunin Ring Finger-1 (MGRN1), whose mutation causes hyperpigmentation, congenital heart defects and neurodegeneration in mice. We showed previously that although MC1R interacts stably with human ARRB1 or ARRB2, only ARRB2 mediates receptor desensitization and internalization. We analyzed MC1R-dependent ARRB ubiquitination, and the possible role of MGRN1. ARRB1 expressed in heterologous cells or human melanoma cells migrated in SDS-PAGE as a 55 kDa protein whereas ARRB2 migrated as two major bands of apparent molecular weight near 45 and 55 kDa, with an intermediate mobility band occasionally detected. These forms were related by post-translational modification rather than by proteolysis. Presence of MC1R favored expression of the 45 kDa protein, the form that interacted preferentially with MC1R. MC1R also mediated poly- or multimono-ubiquitination of ARRB2. Ubiquitination was agonist-independent, but required a native MC1R conformation and/or normal receptor trafficking to the plasma membrane, as it was not observed for loss-of-function MC1R variants. In a heterologous expression system, MC1R-dependent ARRB ubiquitination was enhanced by overexpression of MGRN1 and was impaired by siRNA-mediated MGRN1 knockdown thus pointing to MGRN1 as the responsible E3-ligase. Co-immunoprecipitation experiments demonstrated interaction of MGRN1 and ARRBs in the presence of MC1R, suggesting a scaffolding role for the GPCR that may determine the selectivity of E3-ubiquitin ligase engagement and the functional outcome of ARRB ubiquitination.

1. Introduction

The melanocortin 1 receptor (MC1R) expressed in epidermal melanocytes is a major determinant of human skin pigmentation, hair color and skin cancer susceptibility [1,2]. MC1R is a plasma membrane Gs protein-coupled receptor (GPCR) responsible for the activation of the cAMP and ERK1/2 pathways by the melanocortin peptides α-melanocyte stimulating hormone (αMSH) and adrenocorticotropin (ACTH). Increased cAMP levels downstream of MC1R promote the synthesis of photoprotective eumelanins within cutaneous melanocytes, whereas absent or inefficient MC1R signaling is associated with pheomelanogenesis, poor photoprotection, high sensitivity to ultraviolet radiation (UVR)-induced skin damage, and increased skin cancer risk [1].

MC1R signaling to the cAMP pathway is regulated by intracellular proteins acting on most GPCRs, in particular the nonvisual arrestins β-arrestin 1 and β-arrestin 2 (also designated ARRB1 and ARRB2) [3], as well as by more specific partners such as the E3 ubiquitin (E3-Ub) ligase Mahogunin Ring Finger 1 (MGRN1) [4,5]. GPCR activation is most frequently followed by phosphorylation of Ser and/or Thr residues in cytosolic domains of the GPCR by members of a family of dedicated protein kinases, the G protein-coupled receptor kinases (GRKs) [6]. Subsequently, members of the ARRB family of cytosolic proteins are recruited to the phosphorylated GPCRs to function as terminators of G protein-dependent signaling [7] and endocytic adaptors acting as scaffolds for components of the coated pit [8]. ARRBs are therefore core components of the GPCR desensitization machinery, and the strength

Abbreviations: ARRB, β-arrestin; β2AR, β2-adrenergic receptor; GRK, G protein-coupled receptor kinase; GPCR, G protein-coupled receptor; LOF, loss-of-function; αMSH, α-melanocyte stimulating hormone; MCR, melanocortin receptor; MC1R, melanocortin 1 receptor; MGRN1, Mahogunin Ring Finger 1; NDP-MSH, norleucine4, D-phenylalanine7-melanocyte-stimulating hormone; NLS, nuclear localization signal; PBS, phosphate buffered saline; Ub, ubiquitin; WT, wild type

* Corresponding author.

E-mail address: celiajim@um.es (C. Jiménez-Cervantes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.09.013>

Received 15 December 2016; Received in revised form 15 September 2017; Accepted 21 September 2017

Available online 22 September 2017

0167-4889/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

and duration of their interactions with internalized GPCRs are key determinants of receptor fate. Agonist-dependent ubiquitination of GPCRs and their ARRB partners has been demonstrated [9] and shown to be involved in ARRB-mediated GPCR internalization. In a pioneering report, Lefkowitz and co-workers showed isoproterenol-dependent ubiquitination of β 2-adrenergic receptor (β 2AR) and ARRB2 [9], and identified Mdm2 as the E3-Ub ligase responsible for this modification. β 2AR ubiquitination was required for degradation of the internalized receptor, whereas abrogation of ARRB ubiquitination had a minor effect on degradation but markedly impaired internalization. This suggested that ubiquitination of the GPCR, on one hand, and its ARRB partners, on the other, have different and complementary roles on β 2AR trafficking and degradation.

We have previously reported that MC1R desensitization displays several unusual features. Inhibition of MC1R functional coupling to the cAMP biosynthetic machinery can be mediated by GRK2 or GRK6 [10], but only GRK6-dependent phosphorylation of Thr308 and Ser316 seemed involved in receptor internalization [11]. We also showed that MC1R efficiently bound both ARRB1 and ARRB2, apparently in an agonist- and Thr308/Ser316 phosphorylation-independent fashion, but only ARRB2 caused functional uncoupling and receptor internalization. Moreover, the effects of ARRB2 on MC1R signaling were biased since this arrestin effectively blocked Gs protein-dependent coupling to the cAMP pathway, but had no detectable effect on activation of the ERK pathway [3].

No data are available on the role of ubiquitination on regulation of MC1R signaling. In this context, we reported that the electrophoretic and functional behavior of wild type (WT) MC1R was essentially the same as the one of a ubiquitination-incompetent mutant, obtained by mutating to Arg all Lys residues located in the cytoplasmic fragments of the receptor [4]. However, ubiquitination of the closely related MC2R has been demonstrated [12]. The E3-Ub ligase responsible for MC2R ubiquitination appears to be Mahogunin Ring Finger 1 (MGRN1), whose gene was identified by positional cloning of the *Mahogunoid* mouse mutation [13]. *Mahogunoid* is a mouse mutation associated with a complex phenotype including mitochondrial dysfunction [14] high embryonic lethality due to congenital heart defects, spongiform neurodegeneration in adult mice and fur darkening similar to Mc1r gain-of-function mutations [15]. Therefore, the physiological roles of MGRN1 are pleiotropic and extend far beyond the regulation of skin pigmentation. On the other hand, MGRN1 attenuated moderately signaling to the cAMP pathway downstream of the MC1R, and this inhibitory effect was attributed to a physical interaction of the GPCR and the E3-Ub ligase with displacement of the Gs protein [4].

In spite of the role of ubiquitination in modulating ARRB function, the possible functional relationships of the E3-Ub ligase MGRN1 and the ARRBs have not yet been addressed. We report here a study of MC1R-dependent ARRB ubiquitination. We show that MC1R triggered ARRB1 and ARRB2 ubiquitination in an agonist-independent manner. The ability of MC1R to increase ARRB ubiquitination was dependent on its functional status and was decreased or absent in natural mutants associated with human pigmentation phenotypes and increased skin cancer risk. ARRB ubiquitination increased upon overexpression of MGRN1 and was blocked by siRNA-mediated MGRN1 knockdown in heterologous cells expressing MC1R. Moreover, WT MC1R orchestrated the formation of stable MC1R-MGRN1-ARRB ternary complexes, thus providing a basis for the inhibitory effect of MGRN1 on MC1R signaling, and a model for MC1R-mediated ARRB ubiquitination.

2. Materials and methods

2.1. Materials

[¹²⁵I]NDP-MSH (2000 Ci/mmol) was from Amersham (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Lipofectamine 2000 was from Invitrogen (Carlsbad, CA). The antibodies employed and the

corresponding working conditions are specified in Supplemental Table 1. The proteasome inhibitor MG132 was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). μ MACs Protein G microbeads were from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Reagents for SDS-PAGE and Western blot were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Other reagents were from Merck (Darmstadt, Germany) or Prolabo (Barcelona, Spain).

2.2. Cell culture and transfection

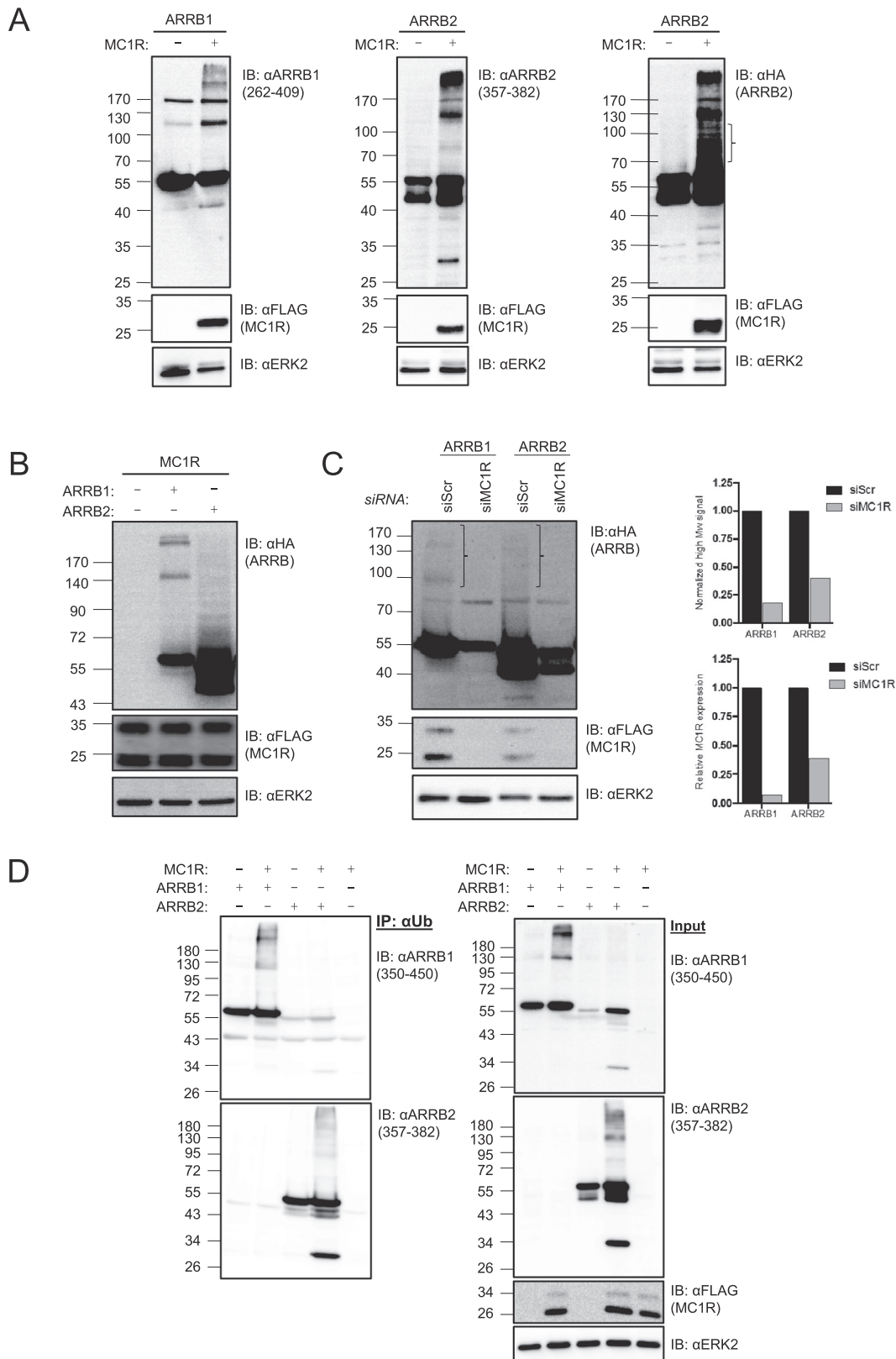
HEK293 cells and HBL cells (LOCE-MM1, established at the Laboratory of Oncology and Experimental Surgery, LOCE, Université Libre de Bruxelles, Belgium, a gift from Prof. G. Ghanem) were grown in DMEM-GlutaMAX™ with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin sulfate. Clones of stably transfected HBL cells were obtained as described [16] and grown in the presence of 2% G418 (Calbiochem). Melan-a6 and melan-md1 immortalized mouse melanocytes [17] were provided by Prof DC Bennett (Molecular and Clinical Sciences Research Institute, St George's, University of London, UK). They were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum, 200 nM TPA and antibiotics as above, in a water-saturated 7.5% CO₂ atmosphere. Cells were transfected with Lipofectamine 2000 according to manufacturer's instructions. For siRNA-mediated knockdown, oligonucleotides targeting MC1R (sc-40107, Santa Cruz Biotechnology) or MGRN1 (Cat n° AM16708, ID 148545, Ambion) were employed. Cells were grown in 12-well plates to ~80% confluence and transfected using Opti-MEM to dilute the siRNA, and Lipofectamine 2000. When siRNA from Santa Cruz Biotechnology was employed, cells were transfected with 100 nM of specific 19–25 nt siRNA. A scrambled negative control siRNA (sc-37007) was used. For transfection with siRNA from Ambion, 21 nt siRNA or negative control siRNA 1 were used at a final concentration of 75 nM/well. Cells were incubated with the siRNA transfection mix 6 h at 37 °C in a CO₂ incubator. Normal growth medium was replaced, and cells were further grown for 72 h. The efficiency of siRNA-mediated knockdown was assessed by quantitative real time PCR (primer sequences available upon request), as described elsewhere [18].

2.3. Expression constructs

MC1R constructs in pcDNA3.0 or 3xHA-ARRB1/2 and FLAG-ARRB2 constructs have been previously described [3,11,19,20]. The HA epitope-tagged ARRB2 mutants were obtained by site-directed mutagenesis, using the QuickChange kit (Stratagene) and WT 3xHA-ARRB2 as a template. The HA-labeled melanocortin receptors (MCnR-HA) and 3xHA- β 2-adrenergic receptor (β 2AR-HA) constructs were from the Missouri University of Science and Technology cDNA Resource Centre (Rolla, MO). A FLAG-labeled wild type ubiquitin construct was a kind gift from Prof R. Peñafiel (University of Murcia). pRK5-HA-Ubiquitin-KO encoding for a Ub mutant with all Lys residues mutated to Arg was a gift from Ted Dawson (Addgene plasmid # 17603) [21]. Constructs were verified by automated sequencing in both strands. Primer sequences are shown in Supplemental Table 2.

2.4. Binding and internalization assays

Internalization assays were performed using an acid wash protocol [11]. Briefly, cells were grown in 12-well plates and transfected as required. 24 h after transfection, cells were incubated (90 min, 37 °C) with [¹²⁵I]-NDP-MSH isotopically diluted to achieve a final concentration of 10⁻⁹ M corresponding to 10⁵ cpm/well. Cells were washed with cold serum-free DMEM followed by two 2–3 min ice-cold acid washes with 0.5 ml of 50 mM glycine and 150 mM NaCl, pH 3.0. The acid washes were pooled and counted to determine the non-internalized ligand. Cells were then collected with 0.5 ml of trypsin (10 mg/ml) and counted to determine the amount of internalized receptor. Internalization index represents the percentage of internalized ligand



(caption on next page)

relative to the total ligand bound.

2.5. cAMP assays

All experiments were performed in independent duplicate or

triplicate dishes of 12-well plates and repeated at least twice. Cells were transfected, serum-deprived (at least 3 h) and stimulated with 10^{-7} M NDP-MSH for 30 min. The medium was aspirated and the cells quickly washed with 800 μ l ice-cold phosphate buffered saline (PBS). Stimulated cells were lysed with 0.1 N HCl preheated at 70 $^{\circ}$ C (200 μ l/

Fig. 1. MC1R-dependent ubiquitination of ARRB1 and ARRB2.

A) Detergent-solubilized extracts of HEK293 cells transiently transfected to express the 3xHA-ARRB isoforms, with or without FLAG-MC1R as indicated, were electrophoresed, blotted and probed with monoclonal antibodies for ARRB1 or ARRB2 (α ARRB1_{262–409} or α ARRB2_{357–382}, left and middle blot), or for the HA epitope in the case of ARRB2 (blot on the right). Expression of MC1R was ascertained by reprobing the blots with peroxidase-conjugated anti-FLAG and detection of ERK2 was used as loading control. Mw markers migration is shown on the left of each blot. The blots are representative of at least 10 experiments. B) Electrophoretic pattern of HA-tagged ARRB isoforms expressed in HBL human melanoma cells stably expressing physiological levels of FLAG-tagged MC1R. C) Effect of MC1R knockdown on the electrophoretic pattern of ARRBs. HBL melanoma cells stably expressing FLAG-MC1R were transfected with HA-labeled ARRB isoforms and treated with an MC1R-specific siRNA or a scrambled control, as indicated. 72 h after transfection, cells were harvested and detergent-solubilized extracts were analyzed by Western blotting and probed with an α HA-peroxidase conjugate (upper blot). Efficient knockdown of MC1R was checked by probing the blot with α FLAG-peroxidase conjugate (middle). Total ERK2 was used as loading control (lower). A representative blot out of 3 is shown. The upper bar graph represents the normalized intensity of the high Mw signals. This was calculated by dividing the intensity of the signal in the region highlighted by parentheses by the one of the 45–55 kDa doublet, followed by normalization for the control samples (siScr) which were given a value of 1. The lower graph represents the relative intensity of the MC1R signal (25 kDa + 35 kDa bands), corrected for loading according to the ERK2 signals. D) MC1R-mediated ubiquitination of ARRBs. HEK293 cells transfected with HA-tagged ARRB1/2, with or without FLAG-MC1R as indicated, were detergent-solubilized 24 h after transfection, immunoprecipitated with an α Ub antibody and blotted for ARRB1 with α ARRB1_{350–450} or ARRB2 with α ARRB2_{357–382} as indicated. Control lysates were analyzed for ARRB isoforms, MC1R and ERK2 as input controls. The blots are representative of 3 independent experiments.

well) and scrapped. The mix was freeze-dried, washed with 100 μ l H₂O and freeze-dried again. cAMP was measured with an enzyme immunoassay kit (R & D Systems) as per instructions. The protein concentration was determined by bicinchoninic acid method in parallel dishes.

2.6. Immunoprecipitation and Western blot

Cells grown on 6 well plates were transfected, washed with PBS and solubilized in 200 μ l solubilization buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Igepal, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10 mM iodoacetamide, 10 mM *N*-ethylmaleimide). Samples were centrifuged (21,000 \times g, 30 min) and a volume of supernatant containing 15 μ g protein was mixed (3:1) with sample buffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 8% SDS, 0.08% bromophenol blue, and 3.2 M β -mercaptoethanol). For immunoprecipitation experiments, 2 \times 10⁶ cells were washed, solubilized and centrifuged as above. Supernatants were precleared with 40 μ l of μ Macs protein G microbeads slurry for 1 h. The mixture was loaded onto a μ Column and the flow-through was incubated with the required antibody (1–2 μ g) and 50 μ l of microbeads (1 h at 4 °C). Samples were applied to the column, washed, and eluted with pre-heated (95 °C) electrophoresis buffer (final concentrations 25 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 4% SDS, 0.04% bromophenol blue, and 1.8 M β -mercaptoethanol). Alternatively, cell extracts were incubated with either EZview™ Red AntiFLAG M2 agarose affinity gel or EZview™ Red AntiHA affinity gel (Sigma-Aldrich), and immunoprecipitations were performed following manufacturer's recommendations. Electrophoresis and Western blotting were performed as described [22]. Comparable loading was ascertained by stripping and reprobing the membranes with an anti-ERK2 antibody. The intensity of bands was quantitated with Image J software. For each membrane, we routinely took several images at different exposure times and care was taken to quantify each band only from images where the corresponding signal was not saturated.

2.7. Statistics

Results are given as mean \pm SEM for experiments performed at least twice, with independent duplicates or triplicates (n \geq 4), unless specified otherwise. Statistical significance was assessed with an unpaired two-tailed Student's *t*-test, when two groups were compared or the one-way ANOVA with Tukey post-test, for multiple comparisons, using the GraphPad Prism package (GraphPad Software, San Diego, CA). *p* values of < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. MC1R-dependent ubiquitination of ARRB1 and ARRB2

Since protein ubiquitination most often results in a smear of poorly resolved high apparent molecular weight (Mw) bands in SDS-PAGE, we looked for MC1R-dependent changes in the electrophoretic pattern of

human ARRB1/2. ARRB constructs tagged with 3 HA epitopes fused in-frame to their N terminus (3xHA-ARRB1/2) were expressed in HEK293 cells with or without MC1R, and analyzed by Western blot. We used commercial monoclonal antibodies raised against a peptide comprising amino acids 262–409 for ARRB1 (α ARRB1_{262–409}) or full-length ARRB2 (Supplemental Table 1). We attempted to identify the relevant epitope for the latter. A series of deleted constructs bearing a 3xHA epitope fused to their N-termini were obtained (see Supplemental Table 2 for primer sequences), with truncation after residues Arg286, Arg357, Thr382 or Arg393 (ARRB2-286*, -357*, -382* and -393*, respectively), or removal of the first 106 N-terminal amino acids (INI107-ARRB2), based on high score proteolytic prediction reports on ExPASy website (ProP 1.0 Server, www.cbs.dtu.dk/services/ProP/). Western blot analysis located the epitope between residues Arg357 and Thr382 of ARRB2, in its C-terminal domain (Supplemental Fig. 1), and accordingly, this antibody was designated α ARRB2_{357–382}.

When expressed in HEK293 cells, 3xHA-ARRB1 migrated as a majority band of Mw \sim 55 kDa (theoretical 50.6 kDa), with a minor band of \sim 45 kDa occasionally detected. 3xHA-ARRB2 migrated as a doublet of two bands of \sim 45 and 55 kDa (theoretical 50 kDa) (Fig. 1A). Accordingly, the electrophoretic pattern of the two ARRBs was qualitatively similar, although the relative level of the lower Mw form was much higher in ARRB2. For ARRB2, but not for ARRB1, co-expression of MC1R also led to accumulation of a \sim 33 kDa peptide, most likely as a result of MC1R-induced ARRB2 proteolytic cleavage. Upon co-expression with MC1R, we detected a smear of high Mw species, consistent with MC1R-dependent poly- or multimonoubiquitination of ARRB1/2. Notably, the electrophoretic pattern of 3xHA-ARRB2 was somewhat different when analyzed with α ARRB2_{357–382} or with an α HA antibody reacting with the N-terminus of the protein, which labeled efficiently a ladder of intermediate Mw bands mostly absent in blots probed with α ARRB2_{357–382} (Fig. 1A). This might be best explained by partial proteolysis of the likely ubiquitinated high Mw species, with loss of C-terminal fragments, although partial masking of the 357–382 epitope cannot be completely ruled out. We also analyzed the occurrence of MC1R-dependent processing of ARRBs at physiological levels of receptor expression by transfecting HBL human melanoma cells (WT for MC1R) with 3xHA-labeled ARRB1/2. A smear of high Mw bands was also detected in HBL cells (Fig. 1B). The intensity of these likely ubiquitinated products strongly decreased following siRNA-mediated knockdown of MC1R, consistent with MC1R-dependent ubiquitination (Fig. 1C). To ascertain that the high Mw species detected with α ARRB1 or α ARRB2_{357–382} were actually ubiquitinated forms, cell lysates from HEK293 cells transfected with ARRB1 or ARRB2 were immunoprecipitated for Ub, followed by Western blot probed for the ARRBs. Pulled-down pellets contained the 55 kDa form and high Mw forms recognized by α ARRB1 or α ARRB2, consistent with ubiquitinated species (Fig. 1D). Of note, the α ARRB1 antibody partially cross-reacted with ARRB2 as previously reported [3].

To further support the identification of high Mw species as ubiquitinated ARRBs, we performed a similar experiment where the ARRBs were immunoprecipitated from extracts of HEK cells transfected to

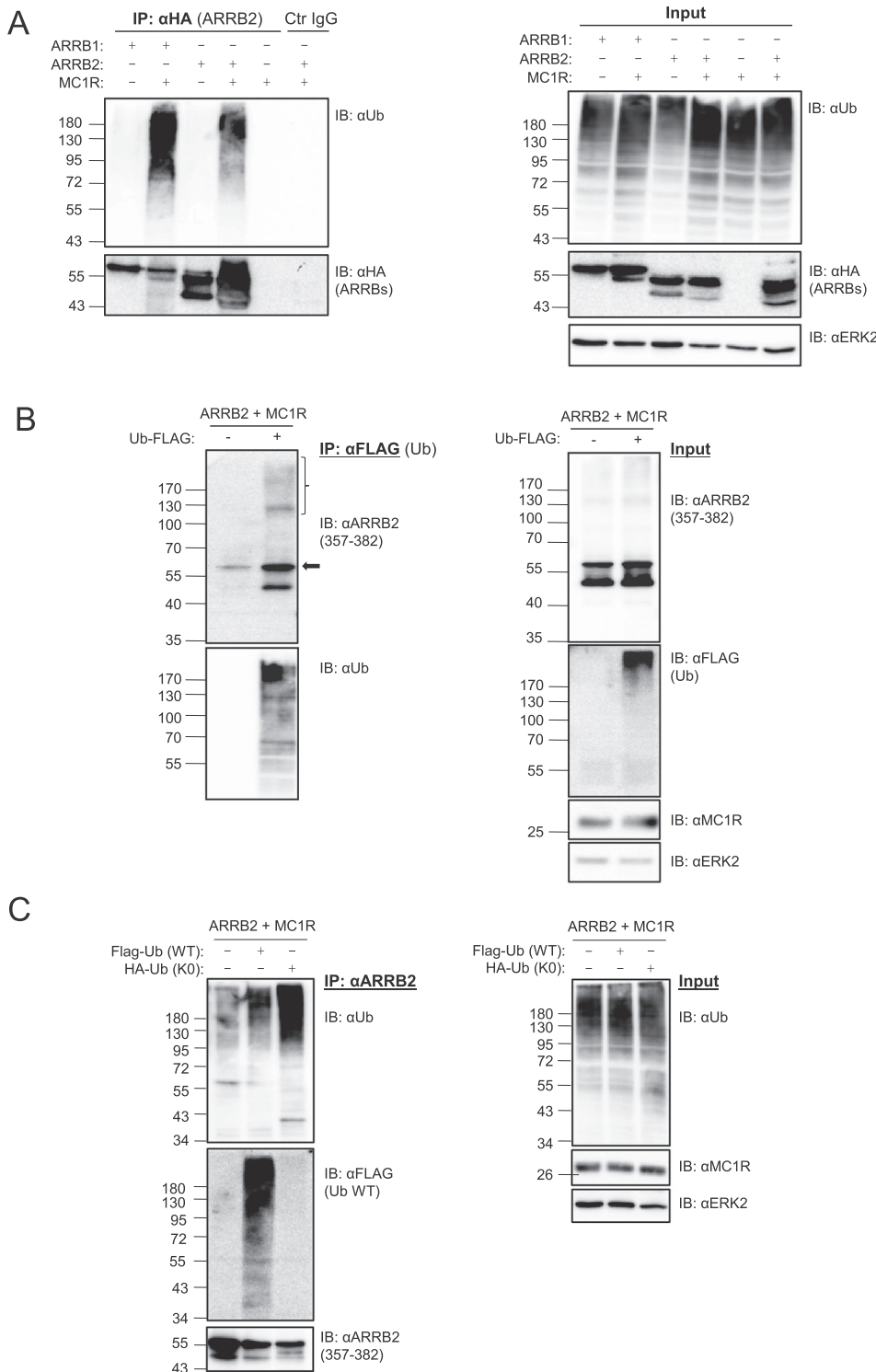


Fig. 2. MC1R expression promotes ARRB1 and ARRB2 ubiquitination.

A) MC1R promotes ubiquitination of ARRBs in HEK293. Cells transfected with HA-tagged ARRB1/2, with or without MC1R (as indicated) were detergent-solubilized 24 h after transfection, immunoprecipitated with an α HA antibody to pull down ARRB1/2, and blotted for ubiquitinated proteins with α Ub antibody (left upper blot), and with α HA to check for immunoprecipitated ARRBs (left lower blot). In these blots the last lane on the left (labeled Ctr IgG) corresponds to a control pre-immune IgG. On the right, blots correspond to control lysates analyzed for total ubiquitinated proteins in extracts and for ARRBs expression. Blots for MC1R and ERK2 expression are also shown as input controls. B) High Mw ARRB2 bands correspond to ubiquitinated forms. HEK293 cells were transfected with MC1R and ARRB2 alone or in combination with FLAG epitope-labeled Ub (FLAG-Ub). Detergent-solubilized extracts were immunoprecipitated for Ub with α FLAG and the pellets were analyzed by Western blot for ARRB2 with α ARRB2₃₅₇₋₃₈₂ and with α Ub for ubiquitinated proteins. Aliquots of cell extracts were analyzed with for ARRB2 (with α ARRB2₃₅₇₋₃₈₂), Ub (with α FLAG-HRP), MC1R and ERK2 as input controls. The arrow shows the higher Mw band in the ARRB2 doublet which is enriched in the immunocomplexes obtained with α FLAG, relative to the inputs. C) Evidence for multi-monoubiquitination of ARRB2. HEK cells were transfected to express HA-ARRB2 and MC1R in suitable combination with Flag-Ub (WT) or the HA-tagged Lys-null Ub mutant HA-Ub (K0). This Lys-null Ub mutant is competent for monoubiquitination but does not allow for formation of polyubiquitin chains. 24 h post transfection, aliquots with equal quantity of protein were immunoprecipitated using α ARRB2₃₅₇₋₃₈₂. The pulled-down samples were immunoblotted for α Ub (upper blot) or α Flag (WT Ub, blot in the middle). ARRB2 was also stained as control for comparable immunoprecipitation (lower blot). The blot on the right shows input controls corresponding to the solubilized cell extracts probed with α Ub, α MC1R or α ERK2, as indicated.

express HA-tagged ARRB1 or ARRB2 alone or in combination with MC1R. The pulled down pellets were immunoblotted for Ub. Again, a smear of bands with Mw higher than 72 kDa was readily detected in extracts from cells co-expressing the ARRBs and MC1R, whereas ubiquitinated proteins were nearly undetectable for cells transfected with the ARRBs alone (Fig. 2A). Moreover, HEK293 cells were transfected with MC1R and ARRB2 alone or in combination with FLAG epitope-labeled Ub (FLAG-Ub). Detergent-solubilized extracts were immunoprecipitated for Ub with α Flag and the pellets were analyzed by Western blot with α ARRB2₃₅₇₋₃₈₂. As described above, α Flag

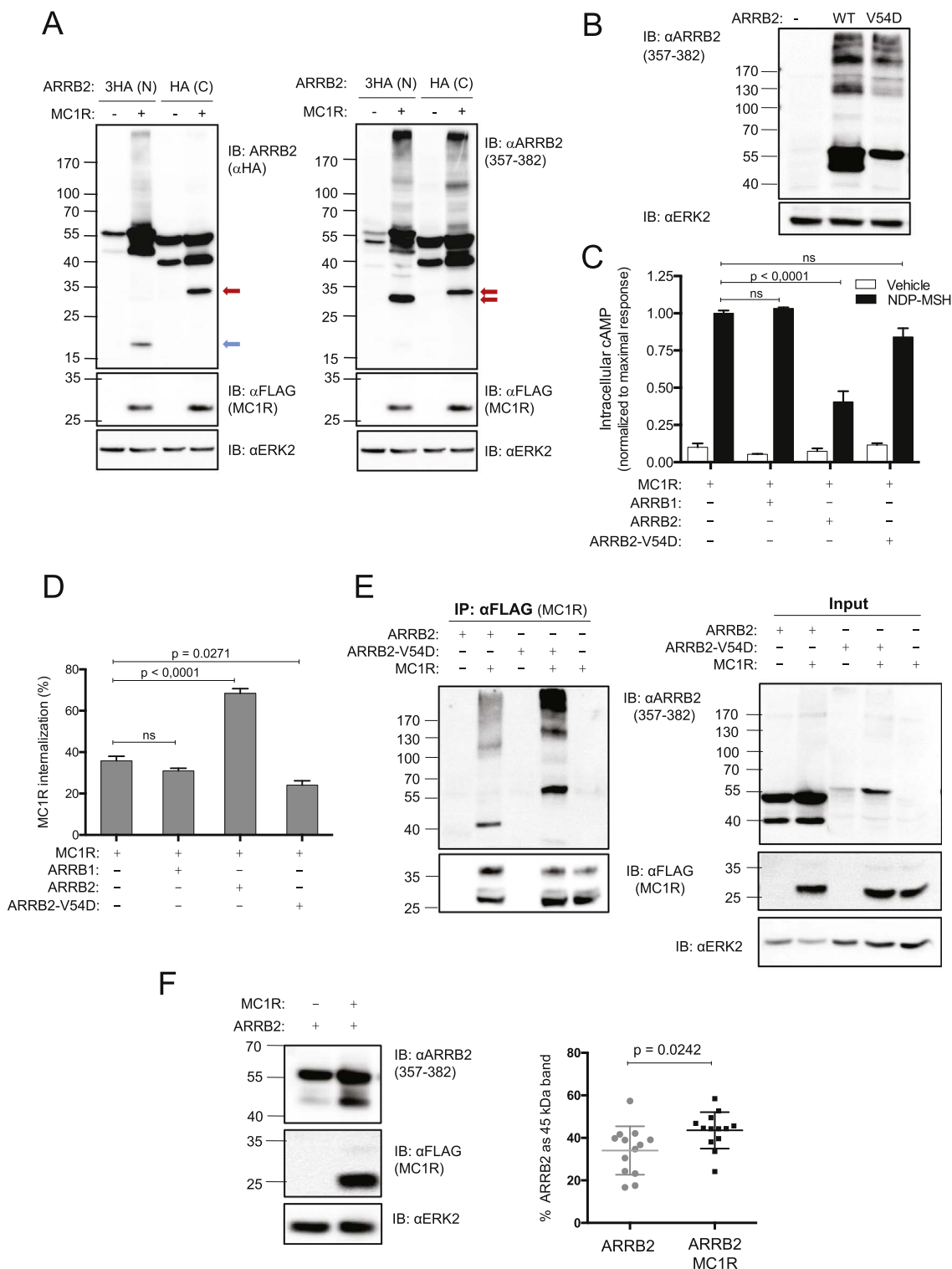
precipitated high Mw α ARRB2₃₅₇₋₃₈₂-reactive bands (Fig. 2B). This confirmed immunoprecipitation of ARRB2 with an antibody targeting ubiquitin, different from the one used above (Fig. 1D), thus making unlikely an artefact of poor antibody specificity. Therefore, MC1R expression led to ubiquitination of ARRB1 and ARRB2, even in the absence of receptor stimulation with melanocortin agonists.

The appearance of high Mw ubiquitinated species might correspond to poly-ubiquitination and/or multiple monoubiquitination of the ARRBs. We attempted to distinguish these possibilities by means of an Ub mutant where all 7 Lys residues are conservatively mutated to Arg

(Ub-K0). Ub-K0 can establish normal isopeptide bonds involving its N-terminus and Lys residues in target proteins, but cannot form polyubiquitin chains owing to the unavailability of free ϵ -amino groups. This approach has been used successfully in similar experiments to demonstrate monoubiquitination of MGRN1 [23] and MGRN1-dependent multi-monoubiquitination of TSG101 [24,25]. Experiments performed with HEK cells expressing ARR2 and MC1R transfected with either Flag-labeled WT Ub or HA-labeled Ub-K0 yielded a similar pattern of MC1R-dependent ARR2 ubiquitination, with extensive

ubiquitination in the presence of Ub-K0 (Fig. 2C). This result suggested that multiple monoubiquitination was a major mechanism accounting for the MC1R-dependent accumulation of ARR2-derived high Mw species.

We also analyzed the ability of other receptors of the MCR subgroup of Class A GPCRs to mediate a similar modification of ARR2 electrophoretic pattern. At least MC2R, MC3R and MC5R behaved essentially as MC1R (Supplemental Fig. 2), whereas expression of MC4R was too low to reach a meaningful conclusion. Interestingly, the intensity of the



(caption on next page)

Fig. 3. Characterization of low Mw ARRB2-derived species.

A) Retention of N- and C-termini in the 45 and 55 kDa ARRB2 forms. ARRB2 constructs tagged with 3 consecutive HA epitopes fused to the N-terminus (3xHA-ARRB2, labeled 3HA (N) in the figure) or with a single HA fused to the C-terminus, labeled HA (C), were transiently expressed in HEK293 cells, in the presence or absence of FLAG-MC1R. Cells extracts were analyzed by Western blot with α HA (left) or α ARRB2_{357–382} (right). Arrows point at bands likely corresponding to ARRB2 proteolytic fragments. Expression of MC1R was confirmed with α FLAG and ERK2 was used as loading control, as indicated. The migration of markers is shown on the left. B) Comparison of the electrophoretic pattern of ARRB2 and its point mutant V54D. HEK cells were transfected with empty vector, WT ARRB2 or the internalization dominant-negative mutant ARRB2-V54D along with MC1R. 24 h after transfection, cells were solubilized and appropriate aliquots of the extracts containing 10 μ g protein were electrophoresed and probed for ARRB2 with α ARRB2_{357–382}. (–), WT and V54D stand for transfection with empty vector, native ARRB2 or the point mutant, respectively. A blot representative of 4 independent analyses is shown. C) Effects of ARRB isoforms and the ARRB2-V54D mutant on functional coupling of MC1R to the cAMP cascade. HEK293 cells grown in 12-well plates transfected with MC1R and the indicated ARRB constructs were serum-deprived for 3 h and stimulated with 10^{-7} M NDP-MSH for 30 min. cAMP levels in resting cells (white bars) or stimulated cells (black bars) were measured by a competition EIA as described in [Materials and methods](#). Results are the mean \pm SEM ($n \geq 4$). D) Effects of ARRB isoforms and the ARRB2-V54D mutant on MC1R internalization. HEK293 cells expressing MC1R and the indicated ARRB forms were incubated with [¹²⁵I]-NDP-MSH for 90 min. Externally bound ligand was distinguished from internalized complexes by an acid-wash procedure. The internalization index represents the percentage of ligand internalized relative to total radioligand bound ($n \geq 4$, error bars are mean \pm SEM). E) Efficient interaction of MC1R and V54D-ARRB2. HEK293 cells expressing WT ARRB2 or the V54D mutant, with or without FLAG-labeled MC1R were detergent-solubilized. Lysates were immunoprecipitated for MC1R with α FLAG and the pulled-down pellets were analyzed by Western blot probed for ARRB2 with α ARRB2_{357–382} (left blot). The membranes were stripped and stained for MC1R with α FLAG-peroxidase conjugate as a control for immunoprecipitation efficiency and specificity. Suitable aliquots of the lysates were Western blotted as input controls, using α ARRB2_{357–382}, α FLAG-peroxidase and α ERK2 (blots on the right). F) Effect of MC1R expression on the relative levels of 45 and 55 kDa ARRB2. The electrophoretic pattern of ARRB2 transiently expressed in HEK293 cells with or without MC1R, was analyzed using equal amounts of detergent-solubilized transfected cells (15 μ g) electrophoresed, blotted and probed with α ARRB2_{357–382} (left blot). Expression of MC1R was confirmed by using the α FLAG-peroxidase conjugate and ERK2 was used as loading control. The intensity of the 45 kDa band and the combined ARRB2 signal in the 45–55 kDa region were estimated with ImageJ in independent blots and the results, expressed as % contribution of the 45 kDa signal, are given as the mean \pm SEM ($n = 13$) in the graph on the right.

putative ubiquitination signal was similar in the presence of members of the MCR family or β 2AR used as positive control [9].

3.2. Relationship of the 45 and 55 kDa ARRB forms

Unexpectedly, the ~55 kDa forms of ARRB1 and ARRB2 were efficiently immunoprecipitated by two different Ub-directed antibodies (Figs. 1D and 2B). For ARRB2, this was the majority band in pulled-down pellets blotted with α ARRB2_{357–382}, whereas the 45 kDa band was much weaker in spite of its comparable relative intensity in the inputs. Identical results were obtained when HA-labeled ARRB2 was detected with α HA (results not shown). Although this might be due to co-immunoprecipitation of native ARRB2 with an ubiquitinated protein partner, this result suggested that the 55 kDa forms might result from MC1R-independent post-translational addition of one or two Ub molecules to the native 45 kDa ARRBs. In support of this possibility, we excluded that the 45 kDa form could arise by limited proteolysis of the 55 kDa ARRB2 protein. We obtained a construct with an HA epitope fused to the C-terminus of native ARRB2 (ARRB2-HA) and we expressed 3xHA-ARRB2 and ARRB2-HA in HEK293 cells (Fig. 3A). Both bands in the ARRB2 doublet reacted with α HA irrespectively of the N or C-terminal location of the HA epitope, thus showing that the 45 and 55 kDa proteins were full-length ARRB2. Consistent with this view, the two forms also reacted with α ARRB2_{357–382} antibody recognizing an epitope near the C-terminus (Fig. 3A), as well as with commercial antibodies raised against peptides corresponding to residues 3–33 and 78–125 in native ARRBs (α ARRB2_{3–33} and α ARRB2_{78–125}, Supplemental Fig. 1).

We have previously reported important differences between the effects of ARRB1 and ARRB2 on MC1R function. In particular, only ARRB2 was found to mediate receptor internalization, even though both ARRBs bound the receptor [3]. We hypothesized that the differential electrophoretic pattern of ARRB1 and ARRB2 might be somehow related to this fact, particularly in the light of reports by others showing that association of ARRBs with deubiquitinases occurs during formation of pits or vesicles [26]. To test this possibility, we obtained and tested the ARRB2-V54D mutant, described as a dominant negative form of ARRB2 for GPCR internalization [27]. This mutant was efficiently ubiquitinated when co-expressed with MC1R in HEK293 cells (Fig. 3B). In agreement with our previous report, ARRB2, but not ARRB1, mediated MC1R uncoupling from the cAMP cascade (Fig. 3C) and receptor internalization (Fig. 3D). Co-expression of the ARRB2-V54D mutant with MC1R decreased the rate of agonist-induced receptor internalization, as expected, but had no significant effect on functional coupling to the cAMP cascade (Fig. 3C–D) despite its physical interaction with MC1R revealed by co-immunoprecipitation experiments

where ARRB2-V54D was pulled-down by antibodies directed against MC1R (Fig. 3E). Interestingly, ARRB2-V54D migrated as a single ~55 kDa band in SDS-PAGE, thus behaving as ARRB1 rather than as the internalization-promoting ARRB2 (Fig. 3B). The observation that the 45 kDa band was absent in ARRB1 or ARRB2-V54D, which did not promote MC1R internalization, further suggested its possible relationship with internalization-dependent deubiquitination of the 55 kDa protein. This possibility, which remains to be proven, was further underscored by a significantly higher relative level of the 45 kDa form detected when ARRB2 was co-expressed with MC1R, as opposed to expression in the absence or receptor (Fig. 3F).

On the other hand, the 33 kDa peptide detected by α ARRB2_{357–382} upon co-expression of ARRB2 forms and MC1R (Fig. 3A, red arrows) corresponded to the C-terminal portion of ARRB2, since it reacted with α HA only when the HA epitope was fused to the C-terminus. In addition, an N-terminal ~18 kDa polypeptide was detected by α HA in extracts from cells expressing 3xHA-ARRB2 (Fig. 3A, blue arrow). The fact that the combined size of these N- and C-terminal peptides accounted for complete ARRB2 length suggested that MC1R-dependent proteolysis of ARRB2 involved a single specific proteolytic event. The size of the proteolytic cleavage products indicated that proteolysis likely occurred in the region encompassing β -strand 11, which connects the N- and C-terminal lobes of the ARRBs. This region becomes exposed, and therefore accessible to proteolysis, upon ARRB activation [28]. The specificity of the proteolytic event for ARRB2, as opposed to ARRB1, was also fully consistent with our previous observation that only ARRB2 was able to desensitize MC1R [3].

3.3. Requirement of active MC1R for MC1R-dependent ARRB ubiquitination

GPCR-dependent ubiquitination of ARRBs is most often induced by activation of the receptor with a suitable agonist. HEK293 cells expressing human ARRBs and WT MC1R were stimulated with NDP-MSH for various times, and ARRB electrophoretic patterns were analyzed. As expected, the intensity of high Mw ubiquitinated bands increased markedly upon co-expression with MC1R. A trend towards a rapid and transient increase was detected, but differences did not reach statistical significance (Fig. 4A). Thus, MC1R-dependent ubiquitination of ARRB1/2 was largely agonist-independent, a feature that might be related with the high constitutive activity of MC1R [19].

The *MC1R* gene is highly polymorphic, and many natural hypomorphic variants associated with cutaneous phenotypes and increased skin cancer risk have been described [1]. We compared the ability of WT and variant MC1R to trigger ARRB ubiquitination. We selected a panel of 11 MC1R variants spanning a wide range of signaling

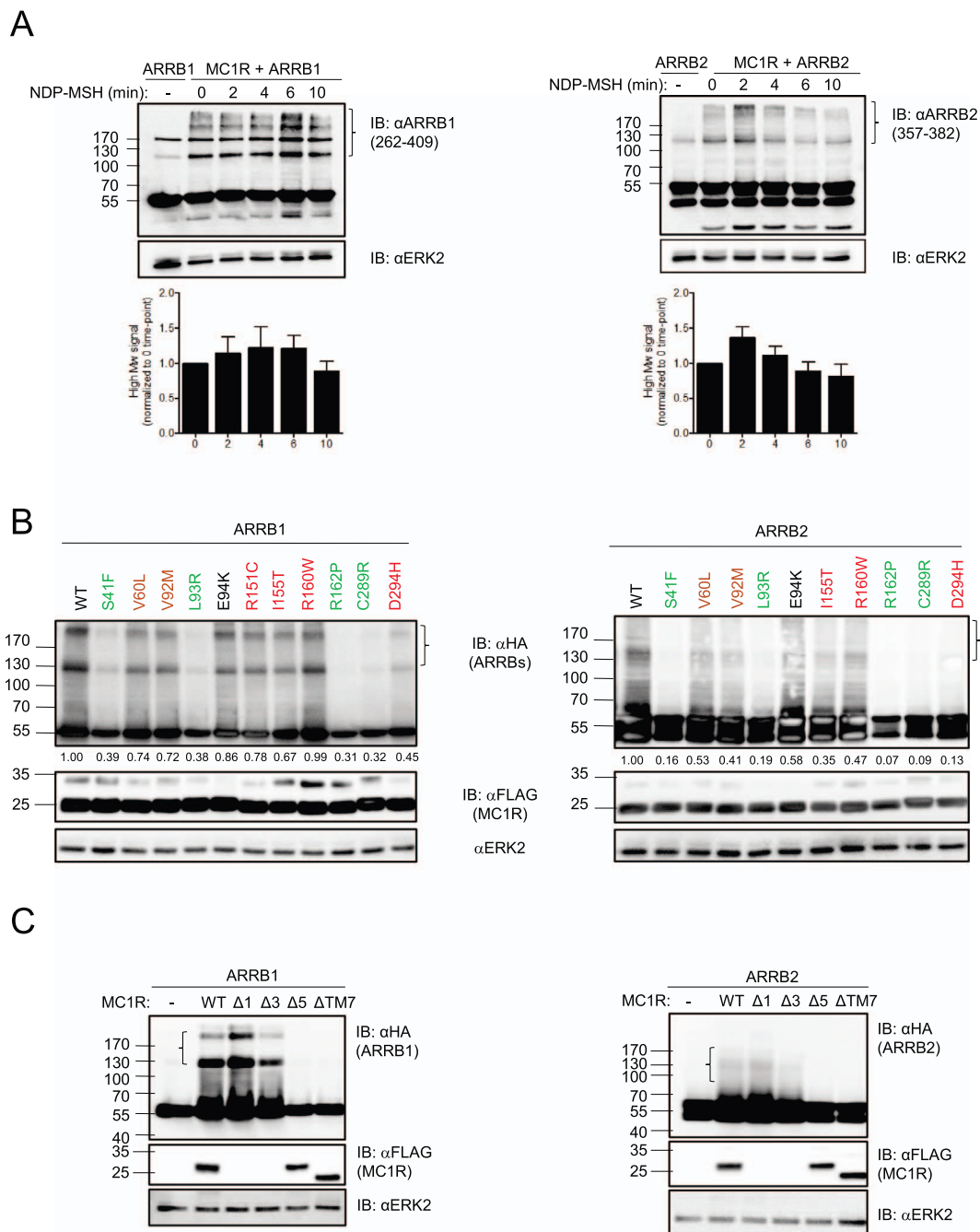


Fig. 4. Relationship of MC1R functional status with MC1R-dependent ARRB ubiquitination.

A) Agonist-independent ubiquitination of ARRBs. 24 h after transfection, HEK293 cells co-expressing MC1R and the 3xHA-tagged ARRB1 (left) or ARRB2 (right) were serum-deprived for at least 3 h, then stimulated with 10^{-7} M NDP-MSH for the times shown. Solubilized extracts were electrophoresed, blotted and probed with αARRB1₂₆₂₋₄₀₉ or αARRB2₃₅₇₋₃₈₂ antibodies. The first lane of both blots corresponds to extracts of cells expressing the ARRB in the absence of MC1R, as a control for background ubiquitination. Total ERK2 was used as loading control (lower blots). The relative intensity of high Mw ARRB bands, highlighted by parentheses, is shown as a bar graph below the corresponding blots, normalized to the vehicle-treated control (0 time-point) after correction for background with the intensity of the signal in the sample devoid of MC1R (error bars mean ± SEM). No significant differences were observed for any time-point. **B)** Induction of ARRB ubiquitination by MC1R mutants. 3xHA-tagged ARRB1 (left) or ARRB2 (right) were co-expressed in HEK293 cells with the FLAG-labeled MC1R variants indicated. Cells were solubilized and the ARRBs electrophoretic patterns were compared by Western blot with αHA-peroxidase conjugate. Efficient and comparable expression of the MC1R variants and equal loading were ascertained by reprobing the membranes with αFLAG-peroxidase conjugate and αERK2 antibodies previously described. Color code: black, fully active forms; brown, partial LOF “r” variants; red, lower residual activity “R-type” variants; green, complete LOF forms. The blots are representative of at least 3 experiments with similar results. Numbers below each lane correspond to the intensity of the high Mw signals corrected for differences in the intensity of the 45–55 kDa bands, calculated as in Fig. 1C. For normalization, a value of 1 was given to the ratio calculated for the WT receptor. **C)** Induction of ARRB ubiquitination by deleted MC1R constructs. The Δ1- and Δ3-MC1R forms, lacking the last 1 or 3C-terminal amino acids, were untagged. Conversely, the Δ5- and ΔTM7 constructs, missing the last 5 amino acids or the seventh transmembrane fragment and cytosolic extension, were FLAG-labeled as the WT protein. HEK293 cells transfected with HA-tagged ARRB isoforms, alone or in combination with MC1R constructs as indicated, were solubilized and analyzed by Western blot for ARRBs (αHA-peroxidase), MC1R (αFLAG-peroxidase), or ERK2 as loading control.

potentials, from the hyperactive form E94K [29,30] to complete loss-of-function (LOF) mutants unable to activate cAMP synthesis such as S41F, L93R, R162P and C289R [31] (labeled in green color in Fig. 4B). This

panel included the frequent “r-type” variants V60L and V92M associated with the red hair color phenotype with low penetrance (labeled in brown color in Fig. 4B), as well as major penetrant “R-type” alleles

such as R151C, I155T, R160W and D294H (labeled in red lettering). The variants were co-transfected with either ARRB1 or ARRB2, and we compared ARRB electrophoretic patterns. For both ARRBs, the intensity of high Mw ubiquitinated species decreased in cells expressing variant MC1R compared with cells expressing the WT receptor, and was the lowest for low residual activity LOF forms including the natural D294H variant [31] (Fig. 4B).

We further probed the relationship between MC1R functionality and ARRB ubiquitination using a series of truncated MC1R mutants lacking the last 1, 3 or 5 C-terminal amino acids, or the complete seventh transmembrane fragment and C-terminal extension ($\Delta 1$ -, $\Delta 3$ - and $\Delta 5$ - and $\Delta TM7$, respectively). We showed previously that removal of the C-terminal Trp residue (in $\Delta 1$) had no detectable effect on agonist-dependent cAMP production, whereas deletion of the terminal $^{315}CSW^{317}$ tripeptide (in $\Delta 3$) reduced maximal cAMP around 50%, and removal of the $^{313}LTCSW^{317}$ pentapeptide or the seventh transmembrane fragment and C-terminal cytosolic tail (in $\Delta 5$ and $\Delta TM7$) led to total LOF [20,32]. MC1R-dependent ARRB ubiquitination was comparable for WT receptor and $\Delta 1$, noticeably lower for $\Delta 3$ and undetectable for $\Delta 5$ or $\Delta TM7$ (Fig. 4C). In summary, MC1R-mediated ARRB ubiquitination was agonist-independent but correlated well with the functional status of MC1R and the integrity of its C-terminal end.

3.4. MC1R-dependent ARRB ubiquitination involved Lys residue(s) in the C-terminal domain of ARRB2

We attempted to identify Lys residues in human ARRB2 ubiquitinated in the presence of MC1R. As a first approximation, we analyzed for function and ubiquitination the deleted constructs INI107-ARRB2, ARRB2-286*, ARRB2-357*, ARRB2-382* and ARRB2-393*, described above. The truncated forms terminating at residues 357, 382 or 393 behaved essentially as full-length ARRB2, in terms of promotion of receptor internalization (Fig. 5A). This result was surprising since the clathrin and AP2 binding motifs presumably required for interaction with the internalization machinery have been mapped between residues R357 and K397 [33]. Conversely, ARRB2-286* had no effect on MC1R internalization, and INI107-ARRB2 inhibited slightly but significantly internalization, indicative of a dominant-negative effect. On the other hand, inhibition of cAMP production after MC1R stimulation decreased gradually with shortening of the C-terminal end, but it was still significant for ARRB2-286* and was completely lost only for the INI107-ARRB2 construct lacking the N-terminal portion of the molecule (Fig. 5B). In keeping with retention of functional effects, all the truncated ARRB2 forms including INI107-ARRB2, interacted with MC1R as shown by co-immunoprecipitation experiments (Fig. 5C). Of note, the 45 kDa form of native ARRB2 was enriched in the pellets obtained by MC1R pull-down (see also Fig. 3E). In agreement with this finding, the lower Mw form of the ARRB2 doublet was also enriched by MC1R pull-down for the ARRB2-357*, -382* and -393* deleted constructs (Fig. 5C). We have consistently observed the same trend in over 10 independent experiments, suggesting that the native 45 kDa protein interacted with the receptor with higher affinity than the modified 55 kDa species. It is also worth noting that high Mw ubiquitinated ARRB2 was again pulled down along with MC1R, indicative of a prolonged interaction with the receptor (Fig. 5C), thus confirming our previous data.

The ubiquitination signals in Western blots probed with $\alpha ARR2_{357-382}$ were at least as intense for INI107, ARRB2-382* and ARRB2-393* as for full-length ARRB2 (Fig. 5C). As expected, no bands were detected for ARRB2-286* and ARRB2-357*, due to absence of the $\alpha ARR2_{357-382}$ epitope. However, fainter ubiquitination signals were obtained for ARRB2-286* when the blots were probed with an αHA antibody reacting readily with the truncated protein (Fig. 5C, middle blot). This confirmed that MC1R-dependent ARRB2 ubiquitination involved several Lys residues, at least one of them located C-terminal to Arg286, in keeping with previous results indicating MC1R-dependent

multi-monoubiquitination of the ARRBs. To try to identify specific ubiquitination sites, all Lys residues C-terminal to Arg 286 (Lys 293, 295, 308, 313, 325, 327, 348, 397 and 400) were mutated to Arg either alone or in combination. We did not observe significant decreases of the intensity of the ubiquitinated species for any of the single mutants tested (results not shown). However, the quadruple ARRB2 mutant Lys293/295/397/400Arg (QM) showed a strong and significant reduction of high Mw ubiquitinated species (Fig. 5D). Taken together, these data are consistent with multi-mono-ubiquitination of ARRB2, where several Lys residues located in the C-terminal portion of the protein would be important, albeit not exclusive, sites of MC1R-mediated ARRB2 ubiquitination.

3.5. Role of MGRN1 E3-Ub ligase in MC1R-dependent ARRB ubiquitination

Our previous work has shown that MC1R interacts with the E3-Ub ligase MGRN1, resulting in competition with Gs [4]. The human MGRN1 locus consists of 17 exons and we showed that human melanoma cells express 4 MGRN1 transcripts differing in the usage of exon 12 and the junction of exons 16 and 17 (Fig. 6A). The corresponding isoforms were named according to the length of the coding sequence (L for long, S for short) and the presence (+) or absence (–) of a nuclear localization signal (NLS) encoded by exon 12. Since MC1R also interacts with the ARRBs, we reasoned that MGRN1 might play a role in their MC1R-dependent ubiquitination. To test this possibility, we co-expressed ARRB1/2 with the 4 Myc-tagged MGRN1 splice variants, in the presence or absence of MC1R (Fig. 6B). None of the MGRN1 isoforms was able to increase significantly ARRB ubiquitination in the absence of MC1R. However, when co-expressed with MC1R, all isoforms cooperated with the receptor to induce a potent and similar increase in high Mw ARRB1/2 species likely corresponding to ubiquitinated forms, to higher levels than those observed in cells transfected with MC1R alone (Fig. 6B). In keeping with these results, work in TM Gunn's laboratory showed that all four Mgrn1 isoforms rescued the pigmentation phenotype of Mgrn1-null mice [34]. Of note, the effects of MGRN1 isoforms on MC1R-dependent ARRB1 and ARRB2 ubiquitination were comparable (Fig. 6B).

Consistent with our previous data on MC1R-induced ARRB ubiquitination, MGRN1 did not enhance ARRB2 ubiquitination when co-transfected with the inactive truncated mutant $\Delta 5$ -MC1R, suggesting that the synergism between MC1R and MGRN1 was dependent on an active receptor conformation (Fig. 6C). Moreover, neither the intensity nor the pattern of ubiquitinated 3xHA-ARRB2 was modified by stimulation of MC1R with an αMSH analogue (Fig. 6D). Accordingly, the increased ubiquitination achieved by MGRN1 displayed the same characteristics as MC1R-induced ubiquitination. We also verified that the ability of MGRN1 to induce ARRB2 ubiquitination was not an MGRN1 over-expression artefact, by means of siRNA-mediated silencing. We treated HEK293 cells expressing MC1R with MGRN1-directed siRNA and analyzed ARRB2 ubiquitination by Western blot. The intensity of high Mw ubiquitinated ARRB2 species decreased in MGRN1-silenced cells (Fig. 6E). Efficient silencing was confirmed by real time PCR comparison of MGRN1 mRNA levels and by transfection with exogenous Myc-labeled MGRN1 followed by siRNA-mediated knock-down. In this case, enrichment with exogenous MGRN1 enhanced ARRB2 ubiquitination, but this increase was efficiently blunted by siRNA-dependent knockdown of the E3 ligase. In summary, although ARRB2 and MC1R were overexpressed in the assay, our data strongly suggest that MGRN1 acted as an E3-Ub ligase for ARRB1/2, albeit only in the presence of MC1R, and that endogenous MGRN1 levels were sufficient to trigger ARRB ubiquitination.

To analyze the molecular basis of the synergistic effect of MC1R and MGRN1 on ARRB ubiquitination and to assess its specificity, we performed a series of experiments using Myc-tagged MGRN1 constructs with progressively larger C-terminal deletions. We deleted the essential RING finger domain and the NLS sequence, coded by exons 10 and 12 of

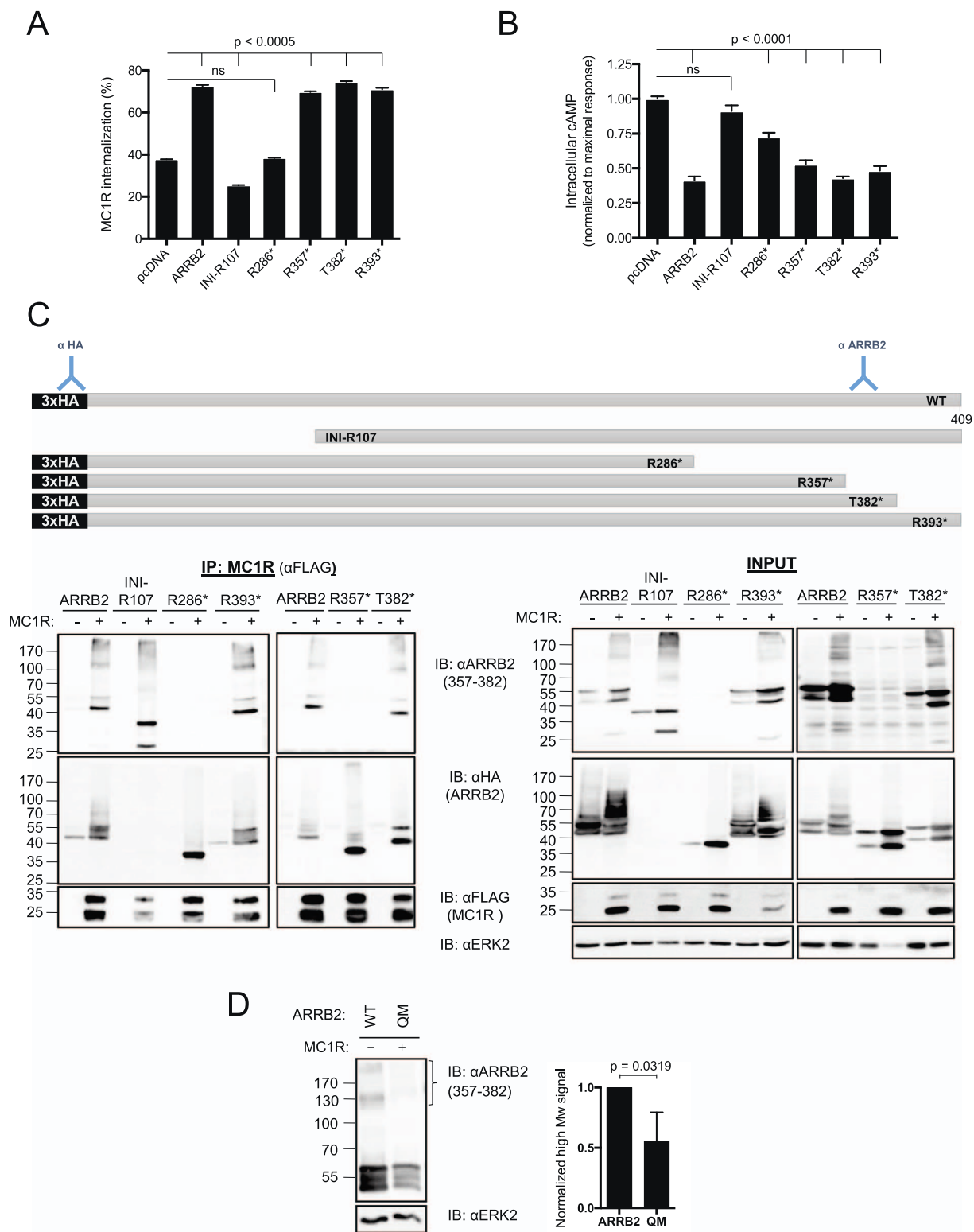
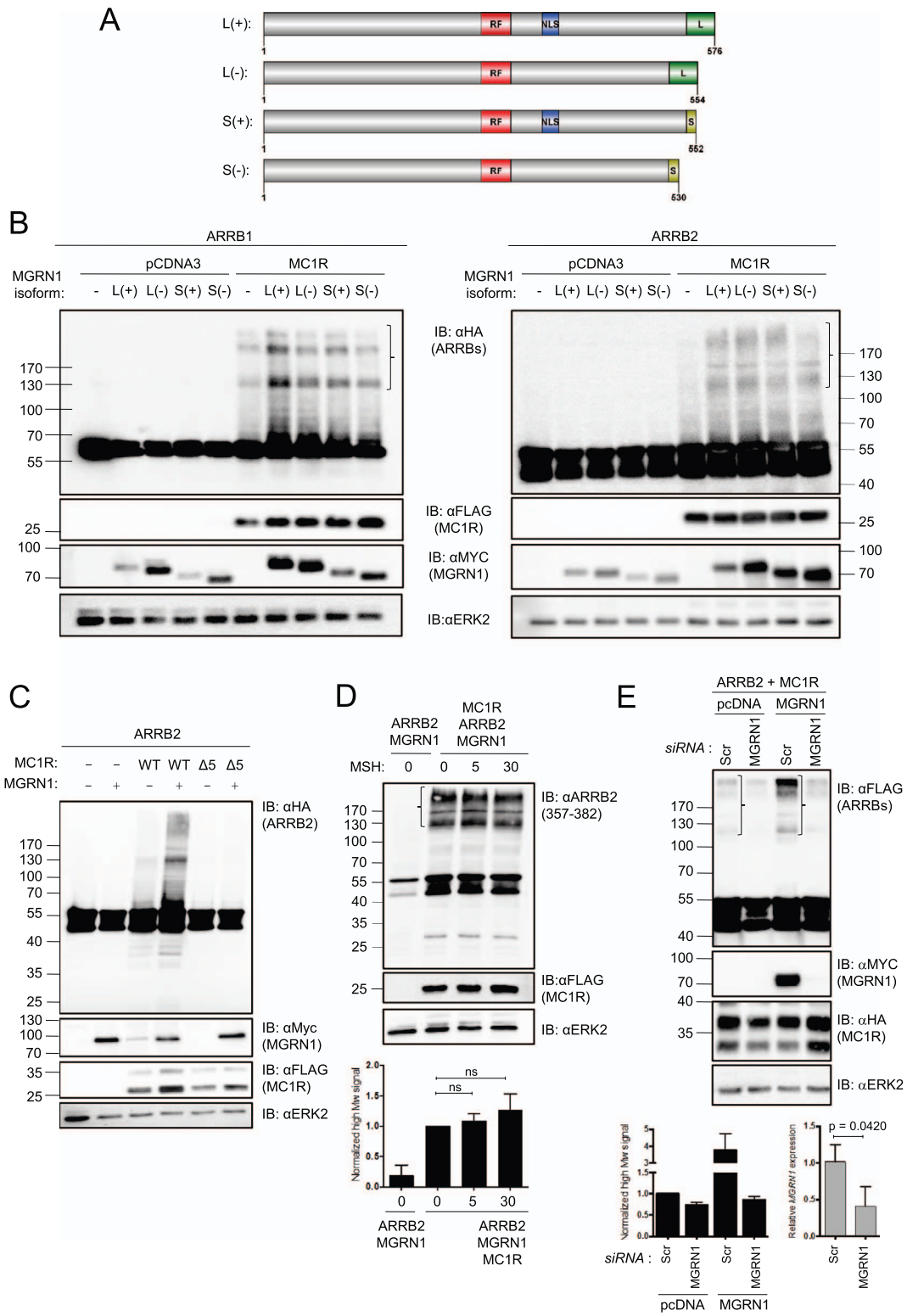


Fig. 5. Involvement of Lys residues in the C-terminal domain of ARRB2 in MC1R-dependent ARRB ubiquitination.

A) Effect of ARRB2 truncated mutants on agonist-induced MC1R internalization. Constructs INI107-ARRB2, missing the 107 N-terminal amino acids, and ARRB2-286*, -357*, -382* and -393*, terminating at residues 286, 357, 382 or 393 respectively, were expressed with MC1R in HEK293 cells. The internalization assays were performed as in Fig. 3D. Data are given as mean ± SEM (n ≥ 3). ns, not significant. B) Effect of truncated ARRB mutants on MC1R functional coupling to cAMP synthesis. Cells transfected as indicated were serum-deprived for 3 h and stimulated with 10⁻⁷ M NDP-MSH for 30 min. cAMP levels in stimulated cells were measured by a competition EIA as described in Materials and methods. Results are the mean ± SEM (n ≥ 6), and are shown as relative to the maximal response (obtained by MC1R expressed alone). ns, not significant. C) Pulldown analysis of the interaction of MC1R with the truncated ARRB2 mutants shown in the upper scheme. HEK293 cells were co-transfected with the indicated HA-tagged ARRB2 constructs, and FLAG-tagged MC1R or empty vector as indicated. Cells were detergent-solubilized 24 h after transfection, immunoprecipitated for MC1R with an αFLAG antibody and the pulled-down pellets blotted for ARRB2-derived species with αARRB2₃₅₇₋₃₈₂ (upper blot) or αHA (middle blot). Efficient and comparable precipitation of MC1R was assessed with αFLAG (lower blot). The blots are representative of 3 experiments. D) Impaired ubiquitination of a Lys293/295/397/400Arg quadruple mutant. This mutant, named QM, was analyzed by Western blot of solubilized extracts of HEK293 cells co-transfected with FLAG-MC1R. Blots were probed for ARRB2 (αARRB2₃₅₇₋₃₈₂) or ERK2 as loading control. The bar graph shows the quantification of the relative intensity of the ubiquitinated forms normalized as described in Fig. 1C and corresponds to the mean ± SEM of 3 independent blots.



(caption on next page)

MGRN1 respectively. The constructs were named, Δ10-17, Δ11-17 and Δ12-17, according to lack of the indicated exons (Fig. 7A). The ability of the deleted MGRN1 mutants to interact with MC1R was analyzed by pulldown experiments (Fig. 7B). Upon co-expression and immunoprecipitation of MC1R, we found comparable levels of WT and Δ12-17 MGRN1 in the pellets, but co-immunoprecipitation was significantly smaller for Δ11-17 and barely detectable for Δ10-17. This

indicated that the C-terminal region of MGRN1, including the sequence encoded by exon 12, was dispensable for binding MC1R whereas the region encoded by exons 10 and 11 was essential for a strong MC1R-MGRN1 interaction. We next compared the ability of L(+), L(-) and the truncated MGRN1 constructs to increase ARRB2 ubiquitination in the presence or absence of MC1R (Fig. 7C). Full-length L(+) and L(-) were equally effective (Fig. 6B) indicating that exon 12, which contains

Fig. 6. Role of MGRN1 in MC1R-dependent ARRB ubiquitination.

A) Scheme of the structural differences of MGRN1 isoforms [52]. RF stands for RING Finger domain, NLS for nuclear localization signal in (+) forms. L and S designate the two possible forms of exon 17. B) Enhanced ubiquitination of ARRB1 and ARRB2 in the presence of MC1R by co-expression of MGRN1 isoforms. HEK293 cells were transfected with 3xHA ARRB1/2, with or without FLAG-tagged MC1R and the MYC-tagged splice variants of human MGRN1, as indicated. 24 h after transfection cells were detergent-solubilized, electrophoresed and blotted for ARRB (α HA-peroxidase, upper blots). Expression of MC1R and MGRN1 was checked by reprobing the membranes with α FLAG-peroxidase and α MYC antibodies, respectively. ERK2 was used as a loading control. The blots are representative of 4 experiments. C) Functional MC1R is required for MGRN1-dependent enhancement of ARRB2 ubiquitination. HEK293 cells were transfected to express ARRB2 alone or in combination with MYC-labeled L(+) MGRN1, FLAG-tagged WT MC1R or its Δ 5-truncated mutant (see text for details). Cell extracts were processed for Western blot analysis with α HA-peroxidase to assess ARRB2 ubiquitination. Blots were reprobed for MGRN1, MC1R and ERK2 as loading control. D) Lack of effect of MC1R stimulation on MGRN1-mediated ubiquitination of ARRB2. HEK293 cells co-expressing 3xHA-ARRB2, MYC-L(+) MGRN1 and FLAG-MC1R were serum-deprived, then stimulated with 10^{-7} M NDP-MSH for the times shown. Solubilized extracts were electrophoresed, blotted and probed with α ARRB2_{357-382}} and α FLAG. The first lane of the left corresponds to cells transfected with ARRB2 and MGRN1, but without MC1R. Total ERK2 was used as comparable loading control. A representative blot is shown along with the quantification of the relative intensity of high Mw ARRB2 bands respect to non-stimulated cells (data given as mean \pm SEM). E) Impairment of ARRB2 ubiquitination upon siRNA-mediated downregulation of MGRN1. HEK293 cells transiently expressing FLAG-ARRB2, HA-MC1R and the MYC-L(+) MGRN1, as indicated, were treated with MGRN1-directed siRNA or a scrambled control for 48 h. Comparable aliquots of detergent-solubilized extracts were electrophoresed and Western blotted. The quantitative analysis (bottom left graph) shows the relative intensity of the ubiquitinated bands (highlighted with parentheses), corrected for the intensity of the 45–55 kDa signal as in Fig. 1C and normalized to the non-treated control expressing ARRB2 and MC1R, but no MGRN1 (top left lane). The data correspond to 3 independent experiments. The bottom right graph represents the relative expression of endogenous MGRN1 mRNA in cells treated with a scrambled control (Scr) or with MGRN1-specific siRNA. *RPS18* mRNA was used as a housekeeping mRNA for normalization of the data.

the NLS, was dispensable for MC1R-dependent ARRB2 ubiquitination. On the other hand, the deleted constructs showed a progressive decrease in their ability to induce MC1R-dependent ARRB2 ubiquitination (Fig. 7C), with Δ 12-17 being comparable with full-length MGRN1, whereas Δ 11-17 and Δ 10-17 were largely inactive. This was consistent with their impaired interaction with MC1R shown in co-immunoprecipitation experiments (Fig. 7B).

We next analyzed whether MC1R, which interacts with MGRN1 on one hand [4] and ARRBs on the other [3], might serve as a scaffold to promote formation of a ternary MGRN1-MC1R-ARRB complex, thereby fostering the proximity of the E3 ligase and its ARRB substrates. HEK293 cells were co-transfected with HA-labeled ARRB1/2, MC1R and L(+) or L(-) MGRN1. The ARRBs were pulled down from detergent-solubilized extracts and the pellets were probed for MGRN1 and for MC1R. As shown in Fig. 7D, the ARRBs interacted weakly with L(+) or L(-) MGRN1 in the absence of MC1R. However, in the presence of the receptor, efficient co-immunoprecipitation of ARRB1/2 with both MGRN1 isoforms was observed. For the samples transfected with L(+) MGRN1 and immunoprecipitated for the ARRBs, expression of MC1R increased 5-fold the amount of ARRB2 and > 10-fold the amount of L(+) present in the pulled-down material. For samples expressing L(-), MC1R increased immunoprecipitation of ARRB2 and L(-) 2- and 10-fold, respectively. Similar quantitative data were found for ARRB1, as well as in other two biological replicates. Therefore, more ARRBs were pulled-down, consistent with MC1R-promoted accumulation of these proteins, but immunoprecipitated MGRN1 increased further. These data are best interpreted in terms of a scaffolding role of MC1R, which has been previously shown to interact with MGRN1 on one hand [4] and with the ARRBs on the other [3]. Thus, MGRN1 promoted ARRB ubiquitination most likely within the framework of a MGRN1-MC1R-ARRB ternary complex.

We attempted to identify the functional effects of MGRN1-mediated ARRB2 ubiquitination. We transfected HEK293 cells with MC1R, ARRB1/2 and MGRN1 in suitable combinations. Cells were stimulated with a saturating concentration of an agonist, and intracellular cAMP was measured. Transfection with ARRB2 alone or co-transfection of ARRB2 and MGRN1 led to a similar impairment of activation of cAMP synthesis (Fig. 8A), suggesting that increasing ARRB2 ubiquitination did not further increase its desensitizing potential. In parallel experiments, we measured receptor internalization by means of an acid wash protocol [11]. We found that neither the rate of internalization nor the concomitant decrease in cell surface expression of agonist binding sites observed upon expression of ARRB2 were further enhanced by MGRN1 (Fig. 8B and C). Thus, increased ubiquitination of ARRB2 in the presence of MGRN1 had no detectable effect on its ability to trigger MC1R desensitization and internalization, despite a stable interaction of the receptor and the ubiquitinated ARRB. This might be due, at least in part, to the presence of endogenous MGRN1 expressed at high enough levels to sustain full functional ubiquitination of the ARRBs.

To test this possibility, we analyzed Mc1r functional coupling and desensitization in mouse *Mgrn1*-null melanocytes and control melan-a6 cells obtained from the same mouse strain [17]. The electrophoretic pattern of ARRB2 was similar in both cell lines, with a trend towards higher intensity of the high Mw signals and lower intensity of the ~55 kDa band in melan-a6 cells which was consistent with data reported thus far but did not reach statistical significance (Fig. 8D). Melan-md1 cells responded to a saturating dose of a Mc1r agonist with much higher increases of intracellular cAMP (Fig. 8E) and a stronger activation of the ERKs (Fig. 8F). However, we observed similar effects when we challenged the cells with the adenylyl cyclase activator FSK. This excluded a simple interpretation of the data in terms of enhanced functional association with downstream effectors such as the Gs protein resulting from absence of *Mgrn1*. We next compared the rates of agonist-dependent Mc1r internalization and desensitization in melan-md1 and control melanocytes. These are processes normally regulated by the interaction of GPCRs with ARRBs, and may therefore be modulated by *Mgrn1*. Melan-md1 cells showed a significantly higher rate of internalization of agonist-Mc1r complexes and a trend towards decreased cell surface expression of the receptor (Fig. 8G). Moreover, the rate of functional desensitization estimated in terms of decreased cAMP response upon continuous exposure to the agonist was also significantly higher in melan-md1 melanocytes (Fig. 8H). These data suggest that the absence of *Mgrn1* might indeed modulate Mc1r-ARRB interactions.

Inspection of most blots presented above showed that, unexpectedly, the intensity of the 45 and 55 kDa ARRB2 signals, or that of the 55 kDa ARRB1 band, increased significantly upon co-expression with MC1R. This trend, indicative of ARRB stabilization in the presence of the receptor was confirmed by quantification of a large number of blots from independent experiments (Fig. 9A). Moreover, upon co-expression of ARRBs, MC1R and MGRN1, a trend towards further increase in intracellular ARRB levels was detected, although it did not reach statistical significance compared with cells transfected with ARRBs and MC1R alone. MC1R-dependent ARRB1/2 stabilization was confirmed by comparison of their rate of decay upon co-expression of the receptor. Cells expressing the ARRBs alone or with MC1R were treated with cycloheximide to block protein synthesis [35,36] and their residual ARRB1/2 contents were compared by Western blot 2 or 4 h after addition of the antibiotic (Fig. 9B and C). MC1R expression decreased the rate of decay of ARRB levels, indicative of protection against proteolysis in live cells. This suggested that MC1R-promoted ARRB ubiquitination did not lead to proteasomal degradation, but may rather be at least partially reversible. To further explore this possibility, HEK cells expressing ARRB2 with or without MC1R were treated with the cell-permeable proteasome inhibitor MG132, and the electrophoretic pattern of ARRB2 was analyzed (Fig. 9D). We found that MG132 led to a dramatic accumulation of ubiquitinated ARRB2 in the absence of MC1R. Conversely, when ARRB2 was co-expressed with MC1R, its electrophoretic pattern did not change substantially upon treatment

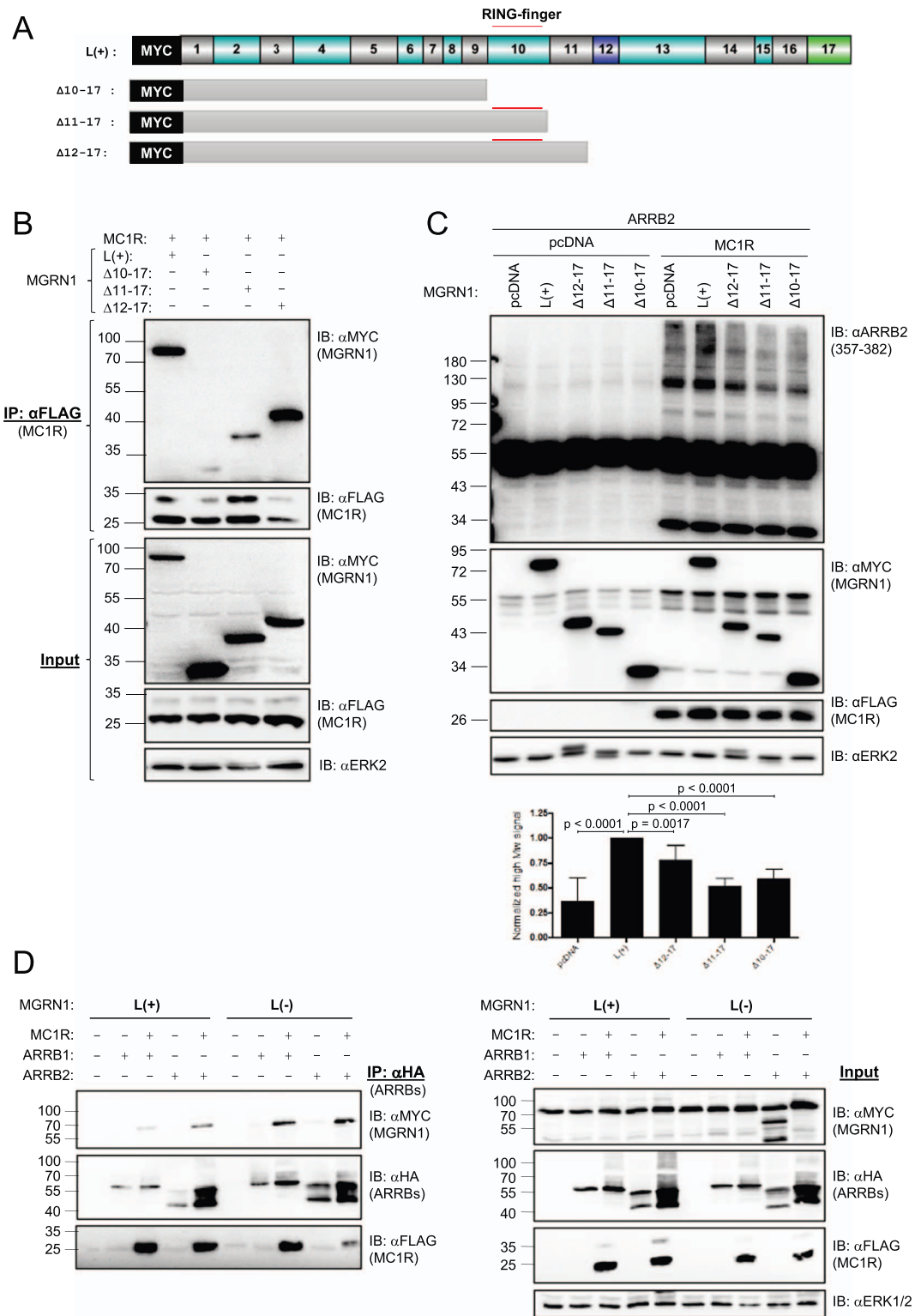
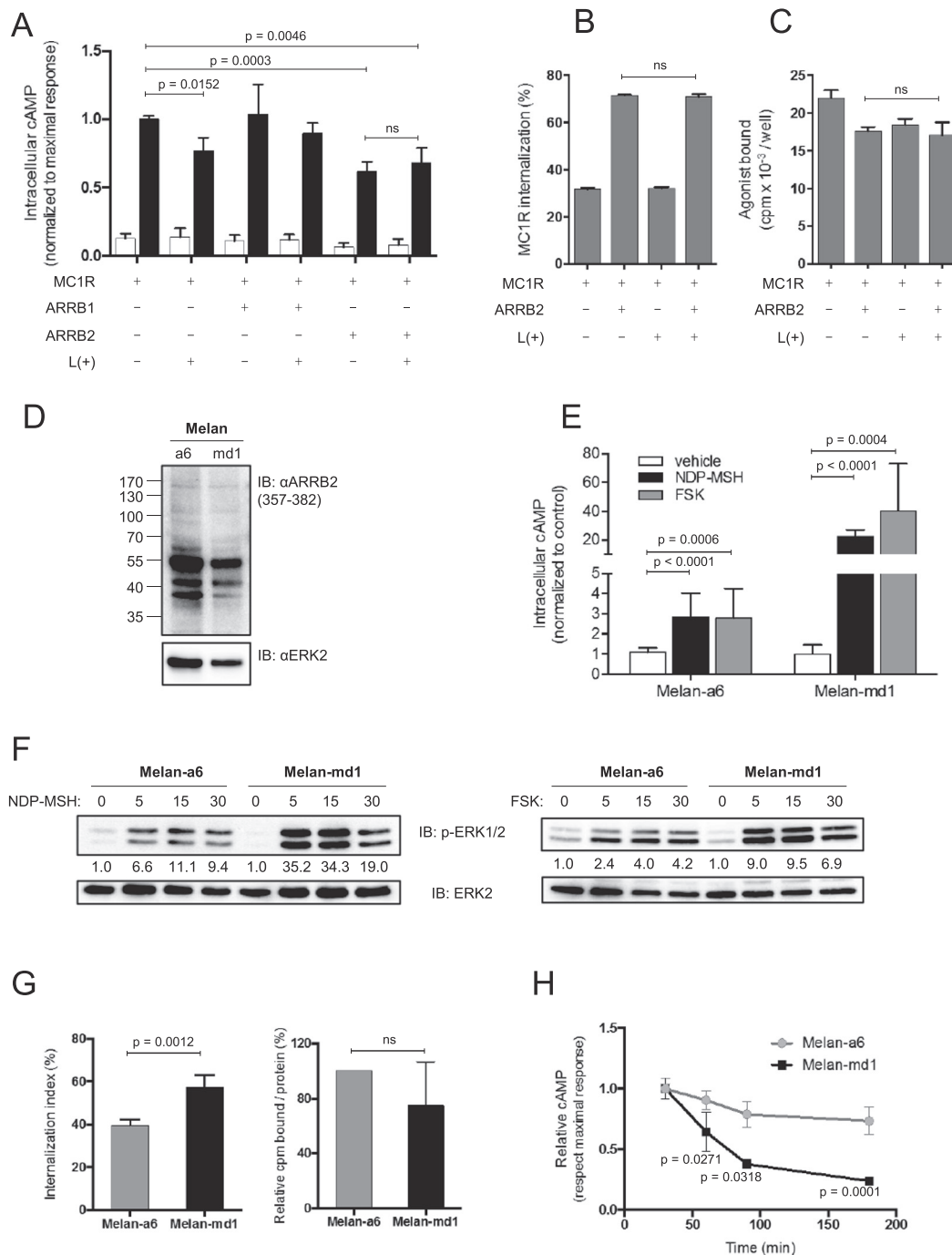


Fig. 7. Biochemical characterization of MGRN1-MC1R-ARRBs interaction.

A) Schematic representation of MYC-tagged MGRN1 deleted constructs. The upper scheme, corresponding to the L(+) isoform, indicates the relative length of the regions encoded by each one of the 17 exons [52]. RF stands for RING Finger domain. The scheme also shows the length of the Δ10-17, Δ11-17 and Δ12-17 truncated forms. B) Interaction with MC1R of deleted MGRN1 constructs. HEK293 cells were transfected with the indicated MYC-tagged MGRN1 constructs and FLAG-MC1R. 24 h after transfection, comparable aliquots of detergent-solubilized extracts were immunoprecipitated for MC1R with an αFLAG monoclonal antibody, and the immune pellets were probed for MGRN1 with αMYC or for MC1R (with αFLAG-peroxidase conjugate) as a control for comparable loading and immunoprecipitation (upper blots). As additional controls for input (lower blots), 12 μg protein aliquots were electrophoresed and blotted as indicated. The blots shown are representative of 3 experiments. C) HEK293 cells grown on 12-well plates were transfected to express ARRB2 and the indicated MYC epitope-labeled MGRN1 constructs, with or without MC1R, and analyzed for ARRB2 by Western blot with the αARRB2₃₅₇₋₃₈₂ antibody. Blots were stripped and probed for MGRN1 isoforms, MC1R and ERK2 as a loading control. A representative blot out of 3 is shown. A quantitative analysis performed as in Fig. 1 C is provided as a graph below the blots, showing the statistical significance of differences between normalized ubiquitination signals (n ≥ 3). D) Detection of ARRB-MC1R-MGRN1 ternary complexes. HEK293 cells grown on 6-well plates and expressing the indicated constructs were lysed and immunoprecipitated for HA-labeled ARRB1 or ARRB2. The pellets were electrophoresed and blotted for MGRN1 with an αMYC antibody (left blot, upper), FLAG-labeled MC1R (left blot, lower), and HA-labeled ARRB isoforms as a control for efficient immunoprecipitation (left blot, middle). Total lysates were also electrophoresed and blotted for ERK2 as input controls (blots on the right). The experiment was performed 3 times with comparable results.



(caption on next page)

with MG132, indicating that MC1R-dependent ARRB2 ubiquitination did not target ARRB2 for proteasomal degradation, at least in a heterologous expression system.

4. Discussion

Following the demonstration that activation of the β2AR promoted ubiquitination of bovine and rat ARRB1 [9], several studies showed that ARRB ubiquitination can modulate GPCR/ARRB interactions, with effects on the rate of receptor internalization and the patterns of intracellular trafficking. It was demonstrated that the kinetics and stability of ARRB ubiquitination were dependent on the type of GPCR. Class A receptors such as β2AR which recycle rapidly triggered transient ARRB ubiquitination, whereas Class B receptors such as V2 vasopressin

receptor, which recycle slowly, mediated stable ubiquitination [37]. Further studies with the AT1aR suggested that ARRB ubiquitination can involve multiple Lys residues becoming accessible in the specific conformation of receptor-bound, activated ARRB, and that ubiquitination at Lys11 and Lys12 was required for sustained ubiquitination and formation of stable AT1aR-ARRB endocytic complexes [38]. We showed previously that the MC1R, a polymorphic Gs-coupled GPCR that regulates the amount and type of melanin pigments synthesized by melanocytes [1], behaved as a Class B receptor since it interacted stably with ARRB2 within internal vesicles [3], suggesting the possibility of a stable MC1R-dependent ubiquitination of ARRB. This possibility was further underscored by our finding that functional coupling of MC1R to the cAMP cascade was negatively regulated by MGRN1 [4], a E3-Ub ligase mutated in the *Mahoganoid* mouse [39]. Accordingly, we analyzed the

Fig. 8. Functional effects of MGRN1-mediated ARRB2 ubiquitination.

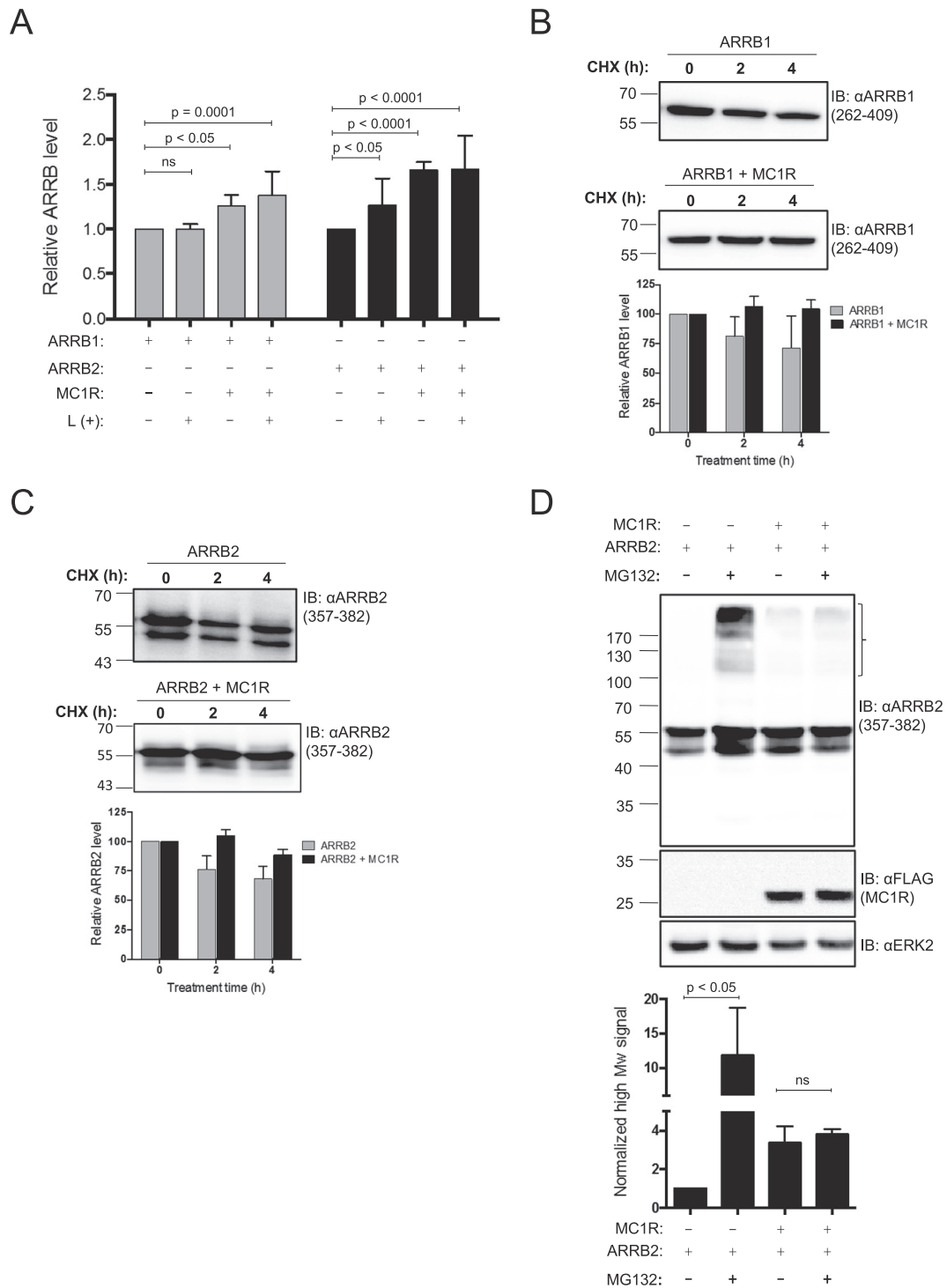
A) Functional coupling of MC1R to the cAMP pathway in the presence of ARRBs isoforms and MGRN1. HEK293 cells grown in 12-well plates were transfected with MC1R, ARRB1 or ARRB2, and L(+) MGRN1, as indicated. Cells were serum-deprived for 3 h before stimulation with 10^{-7} M NDP-MSH for 30 min, then lysed. cAMP was measured as previously described. Empty bars correspond to vehicle-treated controls and filled bars to stimulated cells. Results are expressed as relative cAMP values respect to the maximal response of cells expressing MC1R alone (mean \pm SEM, $n = 4$). B) Lack of effect MGRN1 on ARRB2-mediated internalization of MC1R. HEK293 cells expressing MC1R and the indicated combination of ARRB2 and L(+) MGRN1 were incubated 24 h after transfection with [125 I]-NDP-MSH isotopically diluted as indicated in Materials and Methods. Externally bound ligand was separated from internalized complexes by an acid-wash procedure. Results are expressed as the percentage of ligand internalized with respect to total bound radioligand (internalization index) ($n = 3$, error bars are mean \pm SEM). C) Effects of MGRN1 on cell surface expression of MC1R. HEK293 cells transfected as in panel B were incubated for 90 min with the radioactive ligand, extensively washed with isotonic buffer at neutral pH and counted for total radioactivity. D) Electrophoretic pattern of ARRB2 in mouse melan-md1 and melan-a6 melanocytes. Melan-md1 melanocytes lacking Mgrn1 expression (md1) and control melan-a6 cells (a6) were detergent-solubilized. Suitable aliquots were electrophoresed and blotted using α ARRB2_{357–382}. Loading was compared by reprobing the stripped membrane with α ERK2. E) Functional coupling of Mc1r to the cAMP pathway in melan-md1 and melan-a6 cells. Cells grown in 12-well plates were serum-deprived for 3 h before mock treatment with vehicle (empty bars) or stimulation for 30 min with 10^{-7} M NDP-MSH (black bars) or 10^{-5} M forskolin (FSK, gray bars). Cells were lysed and cAMP measured as described. Results are expressed as relative cAMP values respect to unstimulated cells (mean \pm SEM, $n \geq 3$). F) Kinetics of ERK1/2 phosphorylation in response to NDP-MSH or forskolin. Melan-a6 and melan-md1 cells were starved for at least 3 h prior to stimulation with 10^{-7} M NDP-MSH or 10^{-5} M forskolin (FSK) for the times shown. A Western blot of cell extracts lysed and probed with an anti-phosphorylated ERK1/2 antibody is shown. Membranes were reprobed with α ERK2 as a control for comparable total ERK2 and for quantification purposes. Numbers below the p-ERK1/2 blots represent the intensity of p-ERK signals corrected for total ERK2 signal and normalized to the non-stimulated control cells. A similar trend was obtained in 3 independent experiments. G) Mc1r internalization and cell surface expression in melan-a6 and melan-md1 melanocytes. Cells were treated for 90 min with [125 I]-NDP-MSH isotopically diluted as indicated in Materials and Methods. Externally bound ligand was separated from internalized complexes by an acid-wash procedure. Left panel represents the internalization index expressed as the percentage of ligand internalized with respect to total bound radioligand ($n = 3$, error bars are mean \pm SEM). Right panel shows Mc1r availability, measured as the total counted radioactivity normalized for protein content. G) Desensitization of Mc1r signaling to the cAMP pathway in mouse melanocytes upon continuous stimulation with NDP-MSH. Melan-a6 and melan-d1 cells were serum-starved for 3 h, then stimulated with 10^{-7} M NDP-MSH for the times shown. At these times, cAMP was determined in cell lysates and normalized for protein content. Results (mean \pm SEM, $n = 3$) are normalized with respect to the maximal cAMP level (at 30 min stimulation) for a better comparison of the desensitization kinetics in both cell lines. Statistical significance of the differences between melan-md1 and melan-a6 at each time-point are shown.

possible occurrence of MC1R-dependent ubiquitination of the ARRBs, and we focused on the human proteins given that reports on the behavior of human ARRBs are scarce.

We found that the electrophoretic pattern of ARRB1 and 2 was not identical, despite extensive sequence homology. In the absence of MC1R, ARRB2 migrated as a doublet of Mw 45 and 55 kDa bands, whereas ARRB1 migrated essentially as a single band of 55 kDa. In some blots, an additional band of intermediate mobility was detected between the 45–55 kDa ARRB2 doublet (see Figs. 5E and 7C), and a minor ARRB1 band of \sim 45 was seen (Fig. 1A). Limited proteolysis of the 55 kDa ARRB2 form could not account for the doublet, since the 45 and 55 kDa forms harbored native N and C termini, as shown by reactivity with antibodies directed against both ends. Accordingly, the higher Mw form should arise by a post-translational modification of *de novo*, lower Mw ARRB2. This modification was not phosphorylation, since no phosphatase inhibitors were employed in our solubilization buffers, and prolonged incubation at 37 °C with alkaline phosphatase failed to modify the electrophoretic profile of ARRB2 (not shown). On the other hand, the 55 kDa band was immunoprecipitated with an α Ub antibody much more efficiently than the 45 kDa protein. Moreover, the 55 kDa protein was also precipitated by an α Flag antibody more efficiently than 45 kDa ARRB2 from extracts of cells transfected to express Flag-labeled ubiquitin. Overall, these observations suggested that the 45 kDa species would correspond to the native ARRB2 protein backbone, whereas the 55 kDa forms of ARRB1/2 might result from addition of one or two ubiquitin molecules. Interestingly, both ARRB1 which did not induce MC1R internalization [3], and a ARRB2-V54D mutant behaving as an internalization dominant-negative mutant (Figs. 1A and 3D and [27]) exhibited a majority 55 kDa form with little if any 45 kDa band (Fig. 3B). Conversely, co-expression of ARRB2 with MC1R enabling ARRB2 association with endocytic vesicles, favored the expression of the 45 kDa form. Overall, these observations suggested a model whereby newly synthesized human ARRBs would be rapidly mono- or di-ubiquitinated in an MC1R-independent fashion, to yield the 55 kDa proteins. The 45 kDa ARRB2 might arise mostly through an internalization-dependent deubiquitination event allowing interaction with deubiquitinases during formation of pits or vesicles [26] that would be much less efficient for ARRB1 since this form does not promote MC1R internalization, although this hypothesis remains to be formally proven. However, other scenarios cannot be completely ruled out. It remains possible that a post-translational modification different from mono-ubiquitination would transform the 45 kDa protein in a 55 kDa form and that this later protein could be co-immunoprecipitated by two Ub-

directed antibodies, along with an ubiquitinated partner. In summary, monoubiquitination of the 55 kDa species is suggested by our results but has not yet been formally established and remains to be proven by direct structural analysis.

Aside from this putative MC1R-independent mono- or di-ubiquitination, MC1R promoted the accumulation of high Mw ubiquitinated species derived from ARRB1, ARRB2 and its V54D point mutant. Since only ARRB2 was able to mediate MC1R desensitization and internalization [3], this receptor-mediated ubiquitination most likely did not require the transition of the ARRB towards an activated state. In agreement with this, we also found that MC1R-mediated ARRB1/2 ubiquitination was independent on receptor stimulation, as it was observed with comparable intensity in the absence or the presence of agonist. Interestingly, both ARRB isoforms bound to MC1R in the absence of agonist [3]. Therefore, MC1R engagement seemed sufficient to trigger ubiquitination of ARRB1/2. To further define the mode of MC1R-dependent ubiquitination of the ARRBs, we used a poly-ubiquitination-incompetent Ub mutant designated Ub-K0, where all Lys residues were mutated to Arg, thus preventing the formation of Ub-Ub linkages [23–25]. The similarity of the pattern of high Mw ARRB species observed in the presence of WT Ub or Ub-K0 strongly suggested that MC1R-dependent ubiquitination of ARRB2 was in fact a multi-monoubiquitination. This possibility is consistent with our inability to block ARRB2 ubiquitination by 15 different individual Lys \rightarrow Arg point mutations (Fig. 5E and results not shown). Moreover, deleted mutants lacking large N- or C-terminal fragments containing multiple Lys residues were also ubiquitinated. It is also consistent with reports that multiple mutation of as much as 26 Lys residues in rat β -arrestin2 does not completely block β 2AR-mediated ubiquitination, and that mutation of all 31 residues in this arrestin was required to abolish this modification [40]. However, the ubiquitination system is very complex and some proteins such as Cyclin B1 comprise heterogeneous ubiquitination patterns where multiple monoubiquitination *co*-exists with short poly-ubiquitin chains (reviewed in [41]). Accordingly, to avoid confusions we referred to the high Mw ARRB forms recognized by α Ub and induced upon expression of MC1R as ubiquitinated species. In any case, site-directed mutagenesis experiments showed that MC1R-mediated ARRB2 ubiquitination involved Lys400, located in the C-terminal region of the protein. Given that MC1R was previously shown to interact stably in internal vesicles with ARRB2 [3], it would appear that C-terminal ubiquitination is compatible with such stable interaction. It has been reported that ubiquitination at Lys11 and Lys12, located in the N-terminal domain of the ARRBs was required for sustained



ubiquitination and formation of stable AT1aR-ARRB complexes [38]. Taken together, these data suggest that a specific location of ubiquitination sites may not be a general determinant of the stability of the ubiquitinated ARRB interaction with its GPCR partner.

We investigated the potential role of MGRN1, a MC1R-interacting partner [1,4] in MC1R-dependent ARRB ubiquitination. MGRN1 is a RING Finger-type E3 ligase identified by cloning of the *Mahoganoid* mouse mutation associated with a complex phenotype including mitochondrial dysfunction [14], neurodegeneration [15], congenital heart defects with high embryonic lethality and darker pigmentation [15]. Several potential protein substrates of MGRN1 have been reported, including MC2R, an MC1R homologue expressed in the adrenal gland and responsible for the physiological actions of ACTH [12]. However, MC1R does not appear to be ubiquitinated by MGRN1 [4]. MGRN1 may also ubiquitinate TSG101, a key component of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)-1, to regulate endosomal trafficking [25]. Ubiquitination by MGRN1 of the cytoskeletal α -tubulin was reported to decrease its polymerization, with effects on microtubule stability and mitotic spindle orientation [42]. It has also been described that mouse *Mgrn1* was sequestered by potentially toxic cytosolic forms of prion protein [43], and may target polyglutamine proteins such as huntingtin and ataxin-3 to suppress polyglutamine aggregation and cytotoxicity [44].

A number of E3 ubiquitin ligases have been shown to interact with ARRBs. These include Mdm2 [9], Nedd4 [45], AIP4 [46] and Parkin [36]. However, so far only Mdm2 has been established as a *bona fide* ARRB E3-Ub ligase [9], although other ARRB-interacting E3 ligases might play indirect roles in ARRB ubiquitination. Interestingly, MGRN1 interacts with one of these E3 enzymes, NEDD4, although this interaction does not lead to NEDD4 ubiquitination [23]. Moreover, Parkin apparently modulates the interaction of ARRBs with Mdm2 to suppress arrestin polyubiquitination, which suggests that E3 ligases can cross-talk to support complex and interrelated roles in ARRB ubiquitination [36]. Here we suggest that MGRN1 might promote ubiquitination of the ARRBs in a MC1R-dependent manner. This was shown by enhanced MC1R-dependent ARRB ubiquitination upon forced overexpression of MGRN1 isoforms, on one hand, and impaired ubiquitination following siRNA-mediated MGRN1 knockdown, on the other. The inhibitory effect of MGRN1 silencing further suggested that endogenous MGRN1 contributed significantly to the MC1R-dependent ARRB ubiquitination at physiological levels of expression. In this context, it is worth noting that the ARRB2-V54D mutant does not interact with Mdm2 [47], an E3 ligase shown to catalyze ARRB ubiquitination [9], but it was nevertheless efficiently ubiquitinated when co-expressed with MC1R in HEK293 cells.

MGRN1 isoforms failed to increase ARRB ubiquitination in the absence of MC1R. The essential role of MC1R in enabling MGRN1-mediated ARRB ubiquitination could be due to formation of a tertiary complex involving the ARRBs, MC1R and MGRN1. This complex was readily detected by co-immunoprecipitation experiments, but we could not observe significant ARRB-MGRN1 interactions when pull-down was performed in the absence of MC1R, thus suggesting a scaffolding role of MC1R. Significantly, receptor variants with impaired signaling and/or cell surface expression, and hence with an aberrant conformation, did not promote ARRB ubiquitination. Thus, the native receptor appeared essential for MC1R-dependent ARRB ubiquitination, most likely by enabling specific and simultaneous ARRB and MGRN1 engagement. In addition, we have shown here that other receptors of the melanocortin receptor subfamily of GPCRs also mediated the agonist-independent formation of high Mw, likely ubiquitinated ARRB species, and our previous studies suggested that they are also able to interact with MGRN1 [3]. Thus, it will be interesting to test whether MGRN1 is involved in ARRB ubiquitination downstream of these receptors.

The consequences of ARRB ubiquitination in terms of MC1R function appeared subtle. Ubiquitinated ARRB2 can interact stably with MC1R as shown by efficient co-immunoprecipitation, but neither the

inhibitory effect of the ARRB on functional coupling to the cAMP pathway, nor its activatory effect on MC1R internalization displayed significant changes upon increased ubiquitination because of MGRN1 overexpression. This might be due at least in part to the presence of endogenous MGRN1 expressed at levels high enough to sustain full functional ubiquitination of the ARRBs. Thus, we analyzed Mc1r functional coupling and desensitization in mouse *Mgrn1*-null melanocytes (melan-md1 cells) and control melan-a6 cells [17], where we compared the magnitude and duration of the functional responses to an agonist challenge. These parameters are related with the ability of ARRBs to uncouple agonist-receptor complexes from downstream effectors [7]. Melanocortin-stimulated melan-md1 cells displayed a much higher increase in intracellular cAMP. Since cAMP triggers activation of the ERKs downstream of Mc1r in mouse melanocytes [48], ERK activation was also stronger in melan-md1. However, we obtained similar results when adenylyl cyclase was directly activated with forskolin. Accordingly, these data cannot be readily interpreted in terms of a more efficient functional coupling to the Gs protein in the absence of *Mgrn1*, and may be at least partially explained by a different level of expression of adenylyl cyclase or other proteins of cAMP metabolism. Concerning the duration of the functional response to agonist stimulation, *Mgrn1*-null melan-md1 cells showed a significantly higher rate of internalization of agonist-receptor complexes and a subsequent trend towards decreased agonist binding capacity. Consistently, the rate of functional desensitization was markedly higher in melan-md1 cells, compared with melan-a6 control cells.

The finding that Mc1r desensitization appeared less efficient in melan-a6 cells seems somewhat counterintuitive given the less pigmented phenotype of these mice compared with *Mgrn1*-null mice. However, absence of *Mgrn1* in melanocytes might influence Mc1r signaling in various and often opposing ways. Lack of *Mgrn1* would enhance functional coupling to the Gs protein by eliminating the competition of *Mgrn1* with this protein [4], but on the other it may allow for a more sustained signaling, likely by interfering with normal ARRB ubiquitination (this work). Moreover, *Mgrn1* might equally modulate functional responses to Mc1r antagonists. Studies in mouse models have shown that *Mgrn1* is required for the pigimentary and morphological responses to Agouti Signal Protein (ASP) [49]. ASP is an inverse agonist of Mc1r which decreases agonist-independent activity as well as melanocortin-dependent signaling [50]. Given the relationship of MC1R functional status with ARRB ubiquitination shown here and effect of ASP on ARRB ubiquitination is to be expected.

In summary, the finding of altered rates of functional uncoupling and internalization in *Mgrn1*-null melan-md1 cells supports a role for MGRN1 ubiquitination in normal termination of MC1R responses. However, our data should be interpreted with caution since extrapolating results obtained in a single cell line is risky, particularly in the light of the high adenylyl cyclase activity in melan-md1 cells compared with melan-a6 controls. Moreover, the likely cross-talk established by different ubiquitin ligases [23,36] as well as subtle differences in the functional properties of mouse Mc1r and human MC1R [19,51] may provide further layers of complexity. Accordingly, the overall physiological consequences of the functional interactions of MGRN1 with MC1R and the ARRBs, and their possible relationship with the pigimentary phenotype of *Mahoganoid* mice remain uncertain.

On the other hand, MC1R expression was associated with significant stabilization of the ARRBs, particularly ARRB2, as shown by lower rates of decay and higher steady-state levels of the arrestins. Expression of MGRN1 somewhat enhanced this trend, although the differences did not reach statistical significance as compared with cells expressing ARRBs and MC1R. Taken together, these data indicated that MC1R- and MGRN1-dependent ARRB ubiquitination allowed a stable MC1R-ARRB interaction rather than promoting proteasomal degradation. In support of this possibility, treatment with the proteasomal inhibitor MG132 led to accumulation of ubiquitinated ARRB2 in cells expressing ARRB2 but not MC1R, indicative of a MC1R/MGRN1-independent mode of

ubiquitination leading to rapid proteasomal degradation. Conversely, MG132 had little if any effect on the intensity of the high Mw ubiquitinated forms in cells expressing MC1R, further suggesting that MC1R-induced ARRB2 ubiquitination did not lead to proteasomal degradation. Thus, expression of MC1R switched the pattern of ARRB2 ubiquitination, suggesting that the scaffolding properties of given GPCRs may contribute to select the specific E3-Ub ligase engaged in each case, to determine the functional outcome of ARRB ubiquitination.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.09.013>.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

Work supported by grants SAF2015-67092-R from the MINECO (Spain) and FEDER (European Community) and 19875/GERM/15 from the Fundación Seneca, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM). We thank Prof DC Bennett (University of London) for providing melan-a6 and melan-md1 mouse melanocytes and Prof G Ghanem (Free University of Brussels) for HBL human melanoma cells.

References

- J.C. García-Borrón, Z. Abdel-Malek, C. Jiménez-Cervantes, MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation, *Pigment Cell Melanoma Res.* 27 (2014) 699–720, <http://dx.doi.org/10.1111/pcmr.12257>.
- A. Slominski, J. Wortsman, T. Luger, et al., Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress, *Physiol. Rev.* 80 (2000) 979–1020 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893429> (accessed December 12, 2016).
- M. Abrisqueta, C. Herraiz, A.B. Pérez Oliva, et al., Differential and competitive regulation of human melanocortin 1 receptor signaling by β -arrestin isoforms, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 3724–3737, <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.128322>.
- A.B. Pérez-Oliva, C. Olivares, C. Jiménez-Cervantes, et al., Mahogunin ring finger-1 (MGRN1) E3 ubiquitin ligase inhibits signaling from melanocortin receptor by competition with Galphas, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 31714–31725, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.028100>.
- C. Herraiz, J.C. Garcia-Borrón, C. Jimenez-Cervantes, et al., MC1R signaling. Intracellular partners and pathophysiological implications, *Biochim. Biophys. Acta Mol. basis Dis.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.027>.
- P. Penela, C. Ribas, F. Mayor, Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases, *Cell. Signal.* 15 (2003) 973–981 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499340> (accessed December 13, 2016).
- L.M. Luttrell, R.J. Lefkowitz, The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 455–465 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861753> (accessed March 22, 2016).
- W.E. Miller, R.J. Lefkowitz, Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 139–145 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11248546> (accessed March 22, 2016).
- S.K. Shenoy, P.H. McDonald, T.A. Kohout, et al., Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin, *Science* 294 (2001) 1307–1313, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1063866>.
- J. Sánchez-Más, L.A. Guillo, P. Zanna, et al., Role of G protein-coupled receptor kinases in the homologous desensitization of the human and mouse melanocortin 1 receptors, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 1035–1048, <http://dx.doi.org/10.1210/me.2004-0227>.
- B.L. Sánchez-Laorden, C. Jiménez-Cervantes, J.C. García-Borrón, 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 (2007) 3241–3251, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M606865200>.
- S.N. Cooray, L. Guasti, A.J.L. Clark, The E3 ubiquitin ligase Mahogunin ubiquitinates the melanocortin 2 receptor, *Endocrinology* 152 (2011) 4224–4231, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2011-0147>.
- L.K. Phan, F. Lin, C.A. LeDuc, et al., The mouse mahoganoid coat color mutation disrupts a novel C3HC4 RING domain protein, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 1449–1459, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI16131>.
- K. Sun, B.S. Johnson, T.M. Gunn, Mitochondrial dysfunction precedes neurodegeneration in mahogunin (Mgnr1) mutant mice, *Neurobiol. Aging* 28 (2007) 1840–1852, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.012>.
- L. He, X.-Y. Lu, A.F. Jolly, et al., Spongiform degeneration in mahoganoid mutant mice, *Science* 299 (2003) 710–712, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1079694>.
- J.S. Más, I. Gerritsen, C. Hahmann, et al., Rate limiting factors in melanocortin 1 receptor signalling through the cAMP pathway, *Pigment Cell Res.* 16 (2003) 540–547 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12950734> (accessed March 16, 2016).
- T. Hida, K. Wakamatsu, E.V. Sviderskaya, et al., Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes: a cAMP-independent pathway, *Pigment Cell Melanoma Res.* 22 (2009) 623–634, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00582.x>.
- C. Herraiz, C. Olivares, M. Castejón-Griñán, et al., Functional Characterization of MC1R-TUBB3 Intergenic Splice Variants of the Human Melanocortin 1 Receptor, (2015), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0144757>.
- J. Sánchez-Más, C. Hahmann, I. Gerritsen, et al., Agonist-independent, high constitutive activity of the human melanocortin 1 receptor, *Pigment Cell Res.* 17 (2004) 386–395, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0749.2004.00160.x>.
- J. Sanchez-Mas, B.L. Sanchez-Laorden, L.A. Guillo, et al., The melanocortin-1 receptor carboxyl terminal pentapeptide is essential for MC1R function and expression on the cell surface, *Peptides* 26 (2005) 1848–1857, <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2004.11.030>.
- K.L. Lim, K.C.M. Chew, J.M.M. Tan, et al., Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation, *J. Neurosci.* 25 (2005) 2002–2009, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4474-04.2005>.
- B.L. Sánchez-Laorden, J. Sánchez-Más, M.C. Turpín, et al., Variant amino acids in different domains of the human melanocortin 1 receptor impair cell surface expression, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)* 52 (2006) 39–46 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16914085> (accessed March 16, 2016).
- T.M. Gunn, D. Silvius, P. Bagher, et al., MGRN1-dependent pigment-type switching requires its ubiquitination activity but not its interaction with TSG101 or NEDD4, *Pigment Cell Melanoma Res.* 26 (2013) 263–268, <http://dx.doi.org/10.1111/pcmr.12059>.
- J. Jiao, K. Sun, W.P. Walker, et al., Abnormal regulation of TSG101 in mice with spongiform neurodegeneration, *Biochim. Biophys. Acta Mol. basis Dis.* 1792 (2009) 1027–1035, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.009>.
- B.Y. Kim, J.A. Olzmann, G.S. Barsh, et al., Spongiform neurodegeneration-associated E3 ligase Mahogunin ubiquitylates TSG101 and regulates endosomal trafficking, *Mol. Biol. Cell* 18 (2007) 1129–1142, <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E06-09-0787>.
- S.K. Shenoy, A.S. Modi, A.K. Shukla, et al., Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 6650–6655, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0901083106>.
- S.S. Ferguson, W.E. Downey, A.M. Colapietro, et al., Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization, *Science* 271 (1996) 363–366 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8553074> (accessed November 29, 2016).
- Y.J. Kim, K.P. Hofmann, O.P. Ernst, et al., Crystal structure of pre-activated arrestin p44, *Nature* 497 (2013) 142–146, <http://dx.doi.org/10.1038/nature12133>.
- D. Lu, D.I. Vage, R.D. Cone, A ligand-mimetic model for constitutive activation of the melanocortin-1 receptor, *Mol. Endocrinol.* 12 (1998) 592–604 (Baltimore, Md), <https://doi.org/10.1210/me.12.4.592>.
- J. Sánchez Más, C. Olivares Sánchez, G. Ghanem, 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 (2002) 6133–6141, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03329.x>.
- C. Herraiz, F. Journé, G. Ghanem, et al., 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 (2012) 2244–2252, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.09.008>.
- P.T. Zanna, B.L. Sánchez-Laorden, A.B. Pérez-Oliva, et al., Mechanism of dimerization of the human melanocortin 1 receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368 (2008) 211–216, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.060>.
- J.G. Krupnick, O.B. Goodman, J.H. Keen, et al., Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15011–15016 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9169476> (accessed November 29, 2016).
- J. Jiao, H.Y. Kim, R.R. Liu, et al., Transgenic analysis of the physiological functions of Mahogunin Ring Finger-1 isoforms, *Genesis* 47 (2009) 524–534, <http://dx.doi.org/10.1002/dvg.20529>.
- S. Carreira, J. Goodall, L. Denat, et al., Mitf regulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness, *Genes Dev.* 20 (2006) 3426–3439, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.406406>.
- M.R. Ahmed, X. Zhan, X. Song, et al., Ubiquitin ligase parkin promotes Mdm2-arrestin interaction but inhibits arrestin ubiquitination, *Biochemistry* 50 (2011) 3749–3763, <http://dx.doi.org/10.1021/bi200175q>.
- S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 14498–14506, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209626200>.
- S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, Receptor-specific ubiquitination of β -arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 15315–15324, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M412418200>.
- K.A. Miller, T.M. Gunn, M.M. Carrasquillo, et al., Genetic studies of the mouse mutations mahogany and mahoganoid, *Genetics* 146 (1997) 1407–1415 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1208084&7B&7Dtool=pmcentrez&7B&7Drendertype=abstract>.
- S.K. Shenoy, L.S. Barak, K. Xiao, et al., Ubiquitination of beta-arrestin links seven-

- transmembrane receptor endocytosis and ERK activation, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 29549–29562, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M700852200>.
- [41] D. Komander, The emerging complexity of protein ubiquitination, *Biochem. Soc. Trans.* 37 (2009) 937–953, <http://dx.doi.org/10.1042/BST0370937>.
- [42] D. Srivastava, O. Chakrabarti, Mahogunin-mediated α -tubulin ubiquitination via noncanonical K6 linkage regulates microtubule stability and mitotic spindle orientation, *Cell Death Dis.* 5 (2014) e1064, <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.1>.
- [43] O. Chakrabarti, R.S. Hegde, Functional depletion of mahogunin by cytosolically exposed prion protein contributes to neurodegeneration, *Cell* 137 (2009) 1136–1147, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.042>.
- [44] D. Chhangani, N. Nukina, M. Kurosawa, et al., Mahogunin ring finger 1 suppresses misfolded polyglutamine aggregation and cytotoxicity, *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (2014) 1472–1484, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.014>.
- [45] S.K. Shenoy, K. Xiao, V. Venkataramanan, et al., Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 22166–22176, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M709668200>.
- [46] D. Bhandari, J. Trejo, J.L. Benovic, et al., Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 36971–36979, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M705085200>.
- [47] L. Nogués, A. Salcedo, F. Mayor, et al., Multiple scaffolding functions of β -arrestins in the degradation of G protein-coupled receptor kinase 2, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 1165–1173, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.203406>.
- [48] R. Busca, Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes, *EMBO J.* 19 (2000) 2900–2910, <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.12.2900>.
- [49] W.P. Walker, T.M. Gunn, Shades of meaning: the pigment-type switching system as a tool for discovery, *Pigment Cell Melanoma Res.* 23 (2010) 485–495, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00721.x>.
- [50] M.M. Ollmann, M.L. Lamoreux, B.D. Wilson, et al., Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo, *Genes Dev.* 12 (1998) 316–330, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.12.3.316>.
- [51] C. Herraiz, F. Journé, Z. Abdel-Malek, et al., Signaling from the human melanocortin 1 receptor to ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases involves transactivation of cKIT, *Mol. Endocrinol.* 25 (2011) 138–156, <http://dx.doi.org/10.1210/me.2010-0217>.
- [52] W. Liu, Y. Xie, J. Ma, et al., IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences, *Bioinformatics* 31 (2015) 3359–3361, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv362>.

