

# Genetika, zelulen, molekulen eta eboluzioaren biologiaren esparru barneko esperimentazioaren hastapena

## 6. Jardueraren Eraitza



**Ana Isabel Aguirre Escobal**

**Santos Alonso Alegre**

**Ainhoa Iglesias Ara**

**Neskuts Izagirre Arribalzaga**

**Isabel Smith Zubiaga**

**Beñat Zaldibar Aranburu**

**Zientzia eta Teknologia Fakultatea**

**Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea**

**OCW**  
OpenCourseWare



## **Pigmentazioaren fenotipoa jakintzagai anitzeko ikerketa batetarako adibide gisa**

Iglesias Ara A, Alonso Alegre S, Izagirre Arribalzaga N, Smith Zubiaga I, Zaldibar Aranburu B and Aguirre Escobal AI

### LABURPENA

Gizakiotan, pigmentazioari dagokion fenotipoa erradiazio ultramorearekiko babespenarekin erlazonaturiko eragile ebolutiboekin erlazonatu izan ohi da eta, beraz, larruazaleko melanoma pairatzeko arriskuarekin. Fenotipo hau, azken finean, kanpo-eragile batek (erradiazio ultramoreak) bultzatutako prozesu metaboliko konplexu baten ondorioz, melanozitoek ekoiztutako eumelanina kantitatearen emaitza da eta, honen ondorengo, melanokortinaren 1 hartzailea (MC1R) deritzon mintz zeharreko proteinaren aktibazioaren emaitza. Gaur egungo giza populazioetan, *MC1R* genean maiztasunez dagokionez populazioen artean desberdintasunak azaltzen dituzten zenbait mutazio deskribatu dira. Hauetariko batzuk, adibidez R151C deritzona, eumelanina kantitate gutxiagoren ekoizpen eta melanoma arrisku handiagoarekin erlazonatu izan da. Erlazio hau, mutazioa daramaten zelulen erradiazioarekiko babespen txikiagoaren ondorio izan daiteke, melanina ekoizteko ahalmen txikiago edo ugalketa zelularren inhibizioan aldaketaren bat gertatu delako, zeina baldintza normaletan, melanogenesiarekin batera bait doa.

Ikerlan honetan, R151C mutazioak MC1R proteina melanozitoen mintz zelularra heltzea eragozten duela frogatzen dugu, eta ondorioz, baita melanogenesis aktibatzea eta eumelanina sintetizatzea eragozten du. Mutazioak, *MC1R* genearen aldaki aitzindariarekin gertatzen den kinada antiugaltzaileari erantzutea ere eragozten duela frogatu dugu. Mutazio honen eta honen antzeko diren *MC1R* geneko beste mutazio batzuen banapen geografikoaren analisia, bat dator eguzki erradiazio intentsitate altua duten populazioetan, hautespen purifikatzaileak melanogenesisirako alelo ez-funtzionalen agerpena eragozten duela hipotesiarekin, aldiz argi intentsitate baxuagoko eskualdeetan, eumelaninaren sintesirako aldaki ez-funtzional hauen agerpena posible delarik, segur aski baldintza hauetan onuragarriak direlako D bitaminaren sintesirako eta iraupenerako nahitaezkoak diren beste molekula batzuen fotoendakapena eragozteko.

## SARRERA

Melanina larruazala, ile eta begien koloratzearekin erlazionaturik dagoen molekula pigmentarioa da. Azaleko melanina melanozitoek ekoizten dute, melaninaren ekoizpena funtzio nagusizat duten epidermis eta ile-folikuluetan kokatuta dauden zelulak izanik. Melanozitoek, melanina mota bi ekoizten dituzte: eumelanina (kolore marroi edo beltzekoa) eta feomelanina (kolore horizka edo gorria). Ehun baten pigmentuaren kolorea bere melanozitoek ekoiztako bi pigmentu hauen kantitate erlatiboaren arabera emango da. Eumelaninak, erradiazio ultramoreak eragindako kalteetatik babesten du azala, ez ordea feomelaninak. Beraz, feomelanina proportzio handiagoa ekoizten duten pertsonak, eguzki erradiazioak eragindako kalte handiagoak jasateko arriskua dute, eumelanina proportzio handiagoa duten pertsonekin konparatuz (Garcia-Borrón *et al.*, 2014).

Gizakiok, azaleko eskualde berdinetan antzeko melanozito kontzentrazioa dugun arren, gizabanako eta talde etnikoen artean, melaninaren sintesiarako bidezidorraren aktibazioarekin erlazionaturiko kontu genetiko, zein ingurumeneko eragileen menpe dauden desberdintasun fenotipikoak gertatzen dira (Garcia-Borrón *et al.*, 2014; Robins, 1991).

Fenotipo pigmentario edo fototipoa erradiazio ultramorearekiko babespenarekin erlazionaturiko eragile ebolutiboekin erlazionatu da, eta beraz, larruazaleko melanoma pairatzeko arriskuarekin. Europarretan, fototipoa, babes-funtzio eta D bitaminaren sintesiaren, zeina azalean gertatzen den argi ultramorez irradiatu ondoren, konbinazioaren beharizanaren ondorio bezala interpretatu da,. Ideia honen arabera, eguzki-erradiazio eskasa dagoen latitudetan, azal ilunak D bitaminaren sintesiari traba egingo lioke, bere aldetik, eskeletoaren eraketa txarra, intsulinarekiko erresistentzia, odol-presio altua eta funtzio immuneko akatsak sortaraziko lituzkeelarik (Robins, 1991).

Melaninaren ekoizpena, gene sare batek sintetizaturiko proteinek parte hartzen duten zelula-barneko seinaleztapen bidezidor konplexu baten azkenengo pausua da. Garrantzitsuena, MC1R proteina kodifikatzen duen genea da. *MC1R*, melanozitoen mintzean dagoen mintz-zeharreko 7 domeinu dituen proteina bat da. Hartzailea aktibatzen denean, zelula horretan eumelaninaren ekoizpenaren estimulazioa gauzatzen duen melanozito barneko erreakzio-kimiko turrusta bat hasten da; hartzailea ez badago aktibatuta edo blokeatuta badago, melanozitoek feomelanina ekoiztuko dute, eumelanina ordez. *MC1R*, melanozitoen hormona estimulatzaileak (melanotropina  $\alpha$ -MSH) aktibarazi dezake, zeina argi ultramorez induzituta ere izan daitekeelarik (Garcia-Borrón *et al.*, 2014). *MC1R*-ren estimulaziok  $\alpha$ -MSH hormona bidez, G proteinaren aktibazioa eragiten du, zeinak, Adenil-ziklasa (AC) entzimaren bidez, adenosin monofosfato ziklikoaren (AMPC) mailaren emendioa eragiten duen, honek bere aldetik mikroftalmiaren transkripzio faktorea (*MITF*) estimulatuz. *MITF*-en adierazpenak tirosinasa (*TYR*) eta erlazionaturiko beste gene batzuen (hala nola *TYRP1*, *DCT*) aktibazioa eragiten du, eta azkenik, eumelaninaren sintesia (Sánchez Más *et al.*, 2002; Garcia-Borrón *et al.*, 2014).

Baldintza normaletan, melanogenesiaren eragiteak, ugalketa zelularren blokeatzea dakar. Horrela, *MC1R*-ren aktibazioak, melanozitoen ugalketa zelularra inhibitzen duela behatu da (Smalley & Eisen, 2000).

Gizakiotan, 100 aldaki arruntik (polimorfismoak) gora behatu dira *MC1R*n. Hauetariko polimorfismo batzuk fototipo pigmentarioari lotuta doakizkio eta, adibidez, maizago agertzen dira ile gorri, azal argi, orezta eta eguzkitan jartzeari sentikortasun handiagoa dioten pertsonetan. Fenotipo ilegorriari loturiko aldaki alelikoen adibide tipikoak R151C, R160W eta D294H mutazioak dira, zeinak munduko ilegorridun pertsonen %60an agertzen bait dira. Hauen artetik, aipagarria da bai maiztasun eta garrantziagatik R151C mutazioa, zeina melanoma pairatzeko arrisku handiagoarekin erlazionatu bait da (Duffy *et al.*, 2010).

Gaur egun, argitzeke dago, mutazio hauek eta bereziki R151C mutazioak, melanoma pairatzeko arriskuaren emendiorako mekanismo molekularra zein den. Baliteke, *MC1R* proteinaren konformazioari eragiten dioten aldaketek eta bereziki ebolutiboki oso kontserbatuta dauden aminoazido-hondakinei eragiten dietenak, hala nola 151, funtzio melanogenikoari ere eragitea. Hau horrela balitz, melanomaren arriskua pigmentazio-menpeko babespenaren aldaketarekin erlazionaturik egongo litzateke, melanina-ekoizpen murriztazo batek fotobabespen txikiagoa eskainiko luke eta, honek, aldi berean, ezegonkortasun genomikoa eragingo luke. Bestalde, baliteke *MC1R* geneko mutazioek, pigmentazio ez-menpeko babespen mekanismoak blokeatzea, zeinak baldintza normaletan *MC1R* proteinaren estimulazioaren ondoren aktibatzen bait dira (Smalley & Eisen, 2000). Hala bada, mutazio hauek daramatzaten melanozitoak immuneak izan litezke *MC1R* geneak suposatzen duen estimulazio antiugaltzailearekiko.

Lan honen helburua, *MC1R* proteinako R151C mutazioa melanozitoek eumelanina sintetizatzeke gaitasuna eta hazkuntza blokeatzeko aldaketak eragiten dituen maila zelularrean dela, eta mutazio honen banapenak gaur egungo giza populazioetan ondorio ebolutibo eta mediko garrantzitsuak izan ditzakeela frogatzea da.

## MATERIALAK ETA METODOAK

### Zelulen hazkuntza eta tratamendua

B16-F10 sagu-melanomen zelulak, RPMI medioan, fetuaren behi-gazurra (FBG) %10 eta penizilina/estreptomizinarekin gehituta hazi ziren 37°Ctan eta %5eko CO<sub>2</sub> atmosfera batean. Argi ultramorezko tratamendurako, hazkuntzak 75 mJ/cm<sub>2</sub> dositako eraginpean jarri ziren. Horretarako, 270 eta 390 nm uhin luzerak igortzen dituen lanpara batez doitutako erradiazio ganbara batetan sartu ziren, erradiazioaren %60 erradiazio ultramorea (UVB) (280-320 nm) igorpen-espektoaren barne dago.

### hMC1R aitzindari eta mutatuaren adierazpena

Giza *MC1R* sekuentzia aitzindaria (pCDNA3-wt hMC1R) edo *MC1R* sekuentzia muttua (pCDNA3-R151C-hMC1R) eramaileak ziren adierazpen-plasmidoak José Carlos García-Borrón-ek adeitsuki eman zizkigun. Bi gramo pCDNA3-wt hMC1R, pCDNA3-R151C-hMC1R edo bektore hutsa erabili ziren zelulak %60-80ko dentsitatean transfektatzeko, *jetPRIME* transfekzio-erreaktiboa erabiliz.

### Immunohistokimika

B16-F10 zelulak plaketan hazi ziren beirazko estalkien gainean. Dentsitate egokia lortu zutenean, adierazpen-bektorearekin transfektatu ziren eta 24 ordu geroago %10 paraformaldehidotan fixatu ziren, %0,2 Triton X-100-ekin iragazkortu ziren eta 5 mg/ml giza MC1R proteina ezagutzen duen antigorputza eta jarraian, Alexa Fluor 594ri akoplaturiko giza IgG ezagutzen duen antigorputz sekundario batekin inkubatu ziren. DNA, Hoechst 33288 erabiliz tindatu zen eta irudiaren analisisa Olympus Fluoview FVB500 mikroskopia eta Olympus Fluoview 1.7b software erabiliz analizatu zen.

### RT-PCR bitartezko adierazpen genikoaren analisisa

B16-F10 zelulak plaketan hazi ziren eta dentsitate egokia lortu zutenean pCDNA3-wt-hMC1R eta pCDNA3-R151C-hMC1R adierazpen bektore edo bektore hutsaz transfektatu ziren. 24 ordu geroago UVB tratamenduaren eraginpean jarri ziren eta 24 ordu ostean RNA totala erauzi zen *TRIzol* erreaktiboa erabiliz. RNA totalaren 2 µg erabili ziren cDNA sintetizatzeke *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* dela medio. PCRa egiteko *puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* eta 0,5 uM hasle *hMC1R*, *mTyr* eta *mGapdh* geneentzako erabili ziren (1 Taula).

1 Taula: RT-PCRa egiteko erabili diren hasleen sekuentzia

Genea	F (Zuzena)	R (Alderantzizkoa)
<i>hMC1R</i>	GCAGCAGCTGGACAATGTCA	GCCCCAGCAGAGGAAGAAAA
<i>mTyr</i>	CTTGGGGGCTCTGAAATATG	TAGTGGTCCCTCAGGTGTTT
<i>mGapdh</i>	AAGGGCTCATGACCACAGTC	CACATTGGGGGTAGGAACAC

PCRaren produktuak etidiazko bromuroa zuen %2ko agarosazko gele baten elektroforesi bidez 10-15 volt/cm-tan migratu ziren. Irudia UV bidezko detekzio-sistema (Chemo-doc) baten bidez atzeman da. cDNA-en kantitate erlatiboa, *mGapdh* barne-kontrol gisa erabiliz normalizatu zen.

### **Melaninaren kuantifikazioa**

B16-F10 zelulak plaketan hazi ziren eta dentsitate egokia lotu zutenean pCDNA3-wt hMC1R eta pCDNA3-R151C-hMC1R adierazpen bektoreekin edo bektore hutsarekin transfektatu ziren. 24 ordu beranduago UVB tratamendupean jarri ziren eta 24 ordu pasatu ondoren zelulak tripsinadun soluzio entzimatikoko bat erabilita jaso egin ziren. 1N NaOH-tan 60°C-tan inkubatu ziren ordu betez eta 405 nmtako absorbantzia neurtu zen plaken irakurgailu bat erabiliz.

### **Zelulen ugalketa eta bideragarritasun analisiak**

B17-F10 zelulak plaketan hazi ziren eta dentsitate egokia lortu zutenean pCDNA3-wt hMC1R eta pCDNA3-R151C-hMC1R adierazpen bektore edo bektore hutsarekin transfektatu ziren. Zelulen ugalketa eta bideragarritasuna neurtzeko tripsinadun soluzio entzimatikoko batekin tratatu, Trypan urdina bizi-baztertze koloratzailearekin tindatu eta Neubauer ganbara erabiliz zenbakitu ziren.

### **Populazio analisisa**

*MC1R* genearen erreferentzia-sekuentzia Santa Cruz-eko Californiako Unibertsitateko "Genome Browser" dela medio lortu zen. Gene honen haplotipoak Afrika eta Europako populazioetarako 1000 Genomen Proiektuko datu baseetatik lortu ziren. DnaSP software erabili zen (<http://www.ub.edu/dnasp/>) Tajimaren D testa egin eta haplotipoen maiztasunen banapenean hautespenaren eragina estimatzeko.

## EMAITZAK

*hMC1R* genearen aldaki aitzindari eta *hMC1R-R151C* aldaki mutatuarekin transfektaturiko B16-F10 zelulen analisi immunohistokimikoek, zeluletan proteinaren kokapenean aldaketak zeudela adierazi zuten (1 irudia). Honela, *hMC1R* proteina aitzindaria mintz plasmatikoa kokatuta zegoen, aldiz *R151C* mutazioaren eramailea zen aldakia zitoplasman zehar lausoki sakabanatua agertzen zen, mintz plasmatikora heldu ezinik.

*MC1R* proteinaren kokapena mintz zelularrean nahitaezkoa da bere estekatzailak proteina aktibatu dezan eta, ondorioz, gene melanogenikoen adierazpenaren indukzioa eragin dezaten. *hMC1R-R151C* genearen aldaki mutatuak aktibazioan eragiten duen ala ez konprobatzeko, bidezidor honen zati den gene baten (*mTyr* genea) adierazpen transkripzionalaren maila analizatu dugu *hMC1R* genearen aldaki aitzindari eta mutatuarekin transfektaturiko eta argi UVBz estimulatutako B16-F10 sagu zeluletan. Analisi honen emaitzek, 2 irudian ageri direnak, *hMC1R* exogenoaren adierazpen maila altua eta antzekoa bada ere, aldaki aitzindari eta mutatuarekin transfektaturiko zeluletan, *mTyr*-en adierazpena esanguratsuki desberdina da kasu bietan. Beraz, 2 irudian ikusi daiteken bezala, *mTyr* geneak bere adierazpena gutxi gora behera 10 aldiz emendatzen du saguaren zelulak giza sekuentzia aitzindariarekin transfektatzen direnean. Aldiz, saguaren zelulak *hMC1R* genearen aldaki mutatuarekin transfektatzen direnean, bere adierazpena bektore hutsarekin transfektaturiko zelulen antzekoa mantentzen da.

*MC1R*-ek erregulatutako bidezidorraren aktibazioaren azken emaitza melaninaren metaketa denez, lan honetan *hMC1R* genearen aldaki aitzindari eta mutatuak transfektaturiko eta argi UVBz estimulatutako B16-F10 zelulek, pigmentu honen kantitate esanguratsuki desberdinak ekoizten dituzten ala ez ikustea da. 3 irudian azaltzen diren emaitzen arabera, *hMC1R* genearen aldaki aitzindariarekin transfektaturiko zelulek melanina kantitate esanguratsuki gehiago ekoizten dute, kontrolarekin transfektatu diren zelulekin konparatuz; aldiz emendio hau ez da gertatzen zelulak aldaki mutatuarekin transfektatzen direnean.

Lehenago egindako ikerketek, *MC1R*ren aktibazioak, melaninaren sintesia aktibatzeaz gain, hazkuntza zelularra inhibitzen duela adierazten dute (Smalley & Eisen, 2000). *R151C* mutazioak hazkuntza zelularrean nolabaiteko eragina duen aztertzeko, *hMC1R* genearen aldaki aitzindari eta mutatuak transfektaturiko kultiboen hazkuntza aztertu dugu. Analisi honen emaitzek (4 irudia), aldaki aitzindaria daramaten zelulek hazteari uzten diotela UVBz estimulatu ondoren adierazten dute, aldiz aldaki mutatuak adierazten duten zelulek ez diote erantzuten kinada antiproliferatio honi.

Emaitza hauen arabera, *R151C* aleloaren presentziak ondorio negatiboak lituzke, bai melaninaren sintesian, nahiz UVBk eragindako hazkuntzaren blokeoan.

*R151C* mutazioaren banapena gaur egungo giza populazioei dagokionez, eskura ditugun 1000 genomen proiektuko (I fasea) populazioen datuen arabera, mutazio hau ia hutsala dela afrikar populazioetan, baina europar populazioetan maiztasun erlatiboki altua

azaltzen dutela ikusten da (2 Taula). Gainera, mutazio honen maiztasuna aldakorra da europar populazioetan, hortaz, Europaren Hegoaldeko populazioetan (IBS, TSI) R151C aleloaren maiztasuna ia 0,02 da, aldiz Europaren Iparraldeko populazioetan (GBR, FIN, CEU) 0,01 ingurukoa da (2 Taula). Eraitza hauek, mutazio hau afrikar populazioan hautespen negatiboaren eraginpean dagoela adierazten dute, aldiz hautespen hau populazio europarretan lasaitu egin dela dirudi, non mutazioaren maiztasuna, gainera, latitudearekin emendatzen den.

*MC1R* locus osoaren dibertsitate haplotipikoaren eta Tajimaren D testaren bidez egindako hautespenaren eraginaren analisisiek populazio desberdinetan, dibertsitate haplotipikoa afrikar populazioetan altua dela adierazten dute, baina are handiagoa omen da Europaren Iparraldeko populazioetan (3 Taula). Europar populazioetan Tajimaren D testa ez da esanguratsua, *MC1R* genearen aldaki alelikoak populazio hauetan ez daudela hautespenaren eragipean adierazten duelarik Baina, afrikar populazioan probaren balioa negatiboa eta esanguratsua da, gene hau populazio honetan hautespen purifikatzailearen eraginpean dagoela adierazten duelarik, sortu litezkeen aldaki berriak ezabatu egingo liratekelarik.



## EZTABAIDA

Pigmentazioaren fenotipoa, genotipo eta ingurumenaren artean, noizbehinka, gertatzen den harreman konplexuaren adibide bat da: pigmentazio-maila, hala nola, eguzki erradiazio eta melaninaren sintesia bultzatzen duen, melanozitoen barneko gene sare konplexu baten adierazpenaren erregulazio eta erreakzio metabolikoz sortzen den erantzun fisiologikoaren emaitza da. Horrez gain, ezaugarri hau, oso interesgarria da ikuspuntu biologiko batetatik konnotazio ebolutibo garrantzitsuengatik, zeren fenotipo hau hautespen naturalaren eraginpean dago, bai melanoma pairatzeko arriskuaren aurrean melaninaren fotobabespena dela eta, zein zenbait bitaminen, hala nola riboflabinak, karotenoideak, tokoferola eta azido folikoa, fotoendakapena saihesteko ahalmenagatik (Gambichler *et al.*, 2001).

Gaur egungo giza populazioen jatorrirako onartzen diren proposamenen arabera, afrikar kontinentea izango litzateke, planetako eskualde desberdinetan zehar bata bestearen ostean gertaturiko erradiazioen oraindik kopuru zehaztu gabe dauden populazio taldeen irteerarako jatorria (Tishkoff, 2009). Dirudenez, jatorrizko populazio horiek azal iluna izango zuten, gaur egungo afrikar indigenak bezala. Emigratzen ari ziren eta Europa eta Asian, non eguzki erradiazioa ez den hain sendoa, kokatu ziren populazioetan hautespen presioa murriztu zenean, pigmentazio gutxiagoko fenotipoen pixkanakako agerpen eta hedapena suposatuko zuen.

Lan honetan, zein populaziotakoa zaren eta populazio horretako eguzki erradiazioaren intentsitateari dagozkion baldintza klimatikoaren arabera, melanina kantitate handia edukitzearen abantaila eta desabantailaren arteko oreka, neurri batean behintzat, melaninaren sintesian parte hartzen duten geneetan agertzen diren aldaki genetikoei esker, hala nola *MC1R* geneko R151C mutazioa, azaldu daitekeela adierazten dugu.

Gure analisien arabera, *MC1R* proteinaren funtzionamendu zuzenean eragin dezaketen R151C mutazio eta beste polimorfismo batzuen agerpena *MC1R* genean, hautespen purifikatzailearen eraginpean daude afrikar kontinentean. Hautespen hau existitu ezean, Afrikan analizatu diren populazioetan dibertsitate genetiko handiena espero genuke, bai hasierako populazioaren tamaina handiagoa eta eboluzionatzeko denbora gehiago izan dutelako (Durbin, 2012). Hala eta guztiz, ez da hau analisi haplotipikoetan ikusten duguna. Afrikar populazioetan hautespen purifikatzaileak *MC1R* genean *de novo* sortzen diren aldaki alelikoak ezabatu egiten dituela ikusten da, ebolutiboki kaltegarriak izan daitezkelako. Beraz, *MC1R* geneak melaninaren sintesia aktibaziko lituzkeen mutazioak, berehala ezabatuko lirateke eguzki-erradiazio altuko populazioetatik (Ekuatorekoak), eguzki ultramoreak azalean eragindako kaltearen aurrean eumelaninaren babes mekanismoaren galeragatik.

Halere, europar populazioen dibertsitatearen analisien arabera, eguzki-erradiazio maila txikiagoa duten eskualde geografikoetan (europar kontinentean bezalaxe), D bitaminaren sintesian negatiboki eragiten duten *MC1R* geneko mutazioak, eta hain zuzen ere, R151C mutazioa, ez daude hautespen presioaren eraginpean. Honela, *MC1R* geneko mutazioek fenotipo argiago baten agerpena eta hedapena faboratuko zuten gaur egungo europarretan, eguzki-erradiazioaren intentsitatea baxuagoa den ingurune klimatiko batetan D bitamina

sintetizatzen behar diren ondorioz (Tishkoff et al., 2009). D bitamina azalean sintetizatzen da argi UVBz irradiatu ondoren, beraz, eguzki-erradiazio baxuko latitudetan, azal ilunak traba egingo lioke melaninaren sintesiari eta honek ondorio negatiboak izango lituzke osasunean, hala nola eskeletoaren garapen txarra, intsulinarekiko erresistentzia, odol-presio altua eta akatsak funtzio immunean (Robins, 1991). Gainera, ez dugu ahaztu behar, despigmentazioak bere aldetik, azaleko melanoma, melanozitoen bilakaera gaiztoa sortarazten duen gehiegizko eguzki-erradiazioaren ondorioz sortzen den azaleko minbizi mota bat, pairatzeko arriskuaren emendioarekin erlazionaturiko eragin kaltegarriak dituela (Robins, 1991).

Artikulu honetan, R151C mutazio, fenotipo pigmentario eta melanomaren arteko erlazioa azaldu dezakeen mekanismoari buruzko aztarnak bilatzen ditugu. Honela, gure emaitzen arabera, R151C mutazioak MC1R proteinen kokapen egokia melanozitoen mintz plasmatikoa eragozten du, ondorioz alelo mutatu honen presentziak MC1R proteina erretikulutik, Golgiren apartutik zehar, mintz plasmatikorarte translokatzera eragozten du. MC1R proteina mintzera ez heltzea, kokatu beharreko zelularen gunea, melaninaren sintesiaren bidezidorraren funtzio aktibatzailea bete dezan, bat dator R151C aldaki mutatuarekin transfektaturiko eta UVBz estimaturiko zeluletan behatutako *Tyr* genearen adierazpen murriztagoarekin. *Tyr* geneak eumelaniaren sintesirako mugatzailea den entzima bat kodifikatzen du, beraz, bere adierazpen-maila MC1Rrek erregulaturiko bidezidorraren aktibazio-egoeraren sentsore bezala erabili daiteke. Gure emaitzen arabera, *Tyr* geneak bere adierazpena 10 aldiz emendatzen du *MC1R* genearen aldaki aitzindariarekin transfektaturiko zeluletan, bere adierazpena kontrolaren mailan gelditzen delarik zelula aldaki mutatuarekin transfektatuta daudenean, melaninaren sintesirako bidezidorra ez dela *MC1R* genearen aldaki mutatuarekin aktibatzen adierazten digularik.

Melaninaren metaketa *MC1R* bidez erregulaturiko bidezidorraren aktibazioaren azken adierazlea da; lan honetan burututako melaninaren kuantifikazio bat dator aurreko emaitzekin, *MC1R* genearen aldaki mutatuarekin transfektaturiko zeluletan melanina metaketa txikiagoa behatzen delarik, aldaki aitzindaria daramatzatenekin konparatuta.

Aipatu den bezala, harreman estua existitzen da *MC1R* genean R151C mutazioaren eramailea izatea eta melanoma pairatzeko arriskuaren emendioaren artean (Duffy et al., 2010). Gure emaitzen arabera, *MC1R* genearen aldaki aitzindaria daramaten zelulek hazteari usten diote UVBz estimatu ondoren, aldiz R151Cren aldaki mutatua adierazten duten zelulen kasuan ez diote erantzuten kinada antiugaltzaileari. Beraz, lan honetan azaldutako emaitzek, R151C mutazioak melanoma pairatzeko arriskuaren probabilitatea emendatuko lituzkeen bi mekanismoren existentzia proposatzen dute. Alde batetik, R151C mutazioak pigmentazio-menpeko babespena murriztuko luke, R151C mutazioaren eramaileak diren zelulek ezin dutelako UVB argiaren estimuluaren ondorioz melaninaren sintesirako bidezidorra aktibatu. Bestalde, zelula hauek ez diote erantzuten *MC1R* aktibazioaren menpeko kinada antiproliferatiboari, R151C mutazioak melanomaren aurkako babespena ugalketa zelularren kontrolarekin erlazionaturiko beste bide pigmentazio ez-menpeko baten bidez ezabatzen duela adierazten duelarik.

Gure iritziz, emaitza molekular hauek, fenotipo honen bereizlea den ingumenerako moldapen-mekanismoa ulertzeko informazioa eskaintzen dute. Honela, R151C mutazio eta *MC1R*-ren

funtzionalitateari eragiten dioten beste mutazio batzuen agerpenak, melanomaren arriskua emendatuko lukete, baina argi-intentsitate baxuko eskualde geografikoetan ez leudeke hautespen purifikaztailearen eraginpean, ingurumen horretan onuragarriak izango lirakeelako D bitaminaren sintesirako eta beharrezkoak diren beste molekula batzuen fotoendakapena saihesteko. Hala eta guzti, argi-intentsitate sendoagoen eraginpean dauden afrikar populazioetan, melaninaren sintesirako bidezidorraren aktibazioa eragotziko lukeen *MC1R* geneko edozein mutazio, ezabatu egingo da. Datu hauen arabera, R151C aleloaren eramailea den Europaren Iparraldeko gizabanako batek eguzki-erradiazio altuko eskualdeetan biziz gero, melanoma pairatzeko arrisku handiagoa izatea espero daiteke; hau bat letorke Australiako populazio kaukasiarrean (jatorri europarra) ikusten den melanoma intzidentzia altuarekin, australiar aborigenekin konparatzerakoan (azal kolore ilunagokoak) (Rahman *et al.*, 2007). Aldiz, latitude altuetako eguzki-erradiazioaren eraginpean jartzen den azal-kolore iluneko gizabanako batek, D bitaminaren falta azaltzea espero daiteke. Proposamen hau bat dator afroamerikar populazioan behatu den D bitaminaren defizitaren prebalentzia handiagoarekin (Harris, 2016).

Ondorioz, bistakoa da genotipo eta ingurumenaren artean sortzen den harreman konplexua fenotipo pigmentarioari dagokionez eta nola, partzialki behintzat, azaldu daitekeen melaninaren sintesian inplikaturiko proteina baten jardute-mekanismo molekular eta zelularraren bidez, populazioen moldapena fenotipo pigmentarioarekiko ondoko mekanismoen integrazioaren ondorioz: melaninaren ondorio babeslea eguzki-erradiazio intentsuaren eraginpean, oinarrizko molekulen ekoizpenerako beharrezkoa den argiaren bidezko aktibazioa eta bidezidor melanogenikoaren eragina hazkuntza zelularraren kontrolean.

## BIBLIOGRAFIA

1. Duffy DL, Zhao ZZ, Sturm RA, Hayward NK, Martin NG, Montgomery GW. Multiple pigmentation gene polymorphisms account for a substantial proportion of risk of cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 2010; 130(2):520-8.
2. Durbin R. A map of human genome variation population-scale sequencing. *Nature,* 2012; 467: 1061-1073.
3. García-Borrón JC, Abdel-Malek Z, Jiménez-Cervantes C. MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27(5):699-720.
4. Gambichler, Thilo et al. "Serum Folate Levels after UVA Exposure: A Two-Group Parallel Randomised Controlled Trial." *BMC Dermatology.* 2001: 8. *PMC.* Web. 13
5. Harris, SS. Vitamin D and African Americans. *J Nutr.* 2006; 136 (4): 1126-1129.
6. Rahman AM, Selva D, Davis G. Choroidal melanoma with extrascleral extension in an Australian Aboriginal man. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007 ;35(2):187-9.
7. Robins AH. (1991). *Biological perspectives in human pigmentation.* Cambridge University Press. ISBN-9780521365147.
8. Sánchez Más J, Olivares Sánchez C, Ghanem G, Haycock J, Lozano Teruel JA, García-Borrón JC, Jiménez-Cervantes C. Loss-of-function variants of the human melanocortin-1 receptor gene in melanoma cells define structural determinants of receptor function. *Eur J Biochem.* 2002; 269(24):6133-41.
9. Smalley K, Eisen T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. *FEBS Lett.* 2000; 476(3):198-202.
10. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 1989; 123:585-595.
11. Tishkoff, Sarah A. et al. "The Genetic Structure and History of Africans and African Americans." *Science* 2009; 324 (5930): 1035–1044.

## **ESKER ONAK**

Egileek, ikerketa hau aurrera eramateko Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Biologiako Graduoko ikasketen batzordeari eskertzen diote jasotako laguntza. UPV/EHUri berari ere eskertzen diote irakaskuntzarako jasotako diru-laguntza, zeinari esker hemen azaltzen diren emaitzak lortu bait dira. Halaber, José R. García eta Sara López irakaskuntzarako teknikari eta 2012/13 ikasturtean Genetika, Zelulen eta Molekulen Biologia espezialitateko “Gradu Amaiera Laneko ikerkuntzara bideratutako I Modulusa” praktikan jarri zuten ikasleei eskertu nahi diegu, heurenagandik jasotako laguntza.

## **INTERES GATAZKAK**

Autoreek ez dutela inolako gatazka interesik aitortzen dute.

## IRUDIEN TESTUAK

**1 Irudia:** Giza MC1r-ren mikroargazki immunohistokimikoak (goiko ilara) eta pCDNA hutsa (Con), pCDNA-hMC1R (WT) edo pCDNA-R151C-MC1R (R151C) bektoreekin transfektaturiko B16-F10 zelulen DNAREN Hoechst tindaketa (beheko ilara). Hiruki zuriek, MC1R mintz plasmatikoa agertzen dela adierazten dute. Eskala-marra = 25  $\mu$ m.

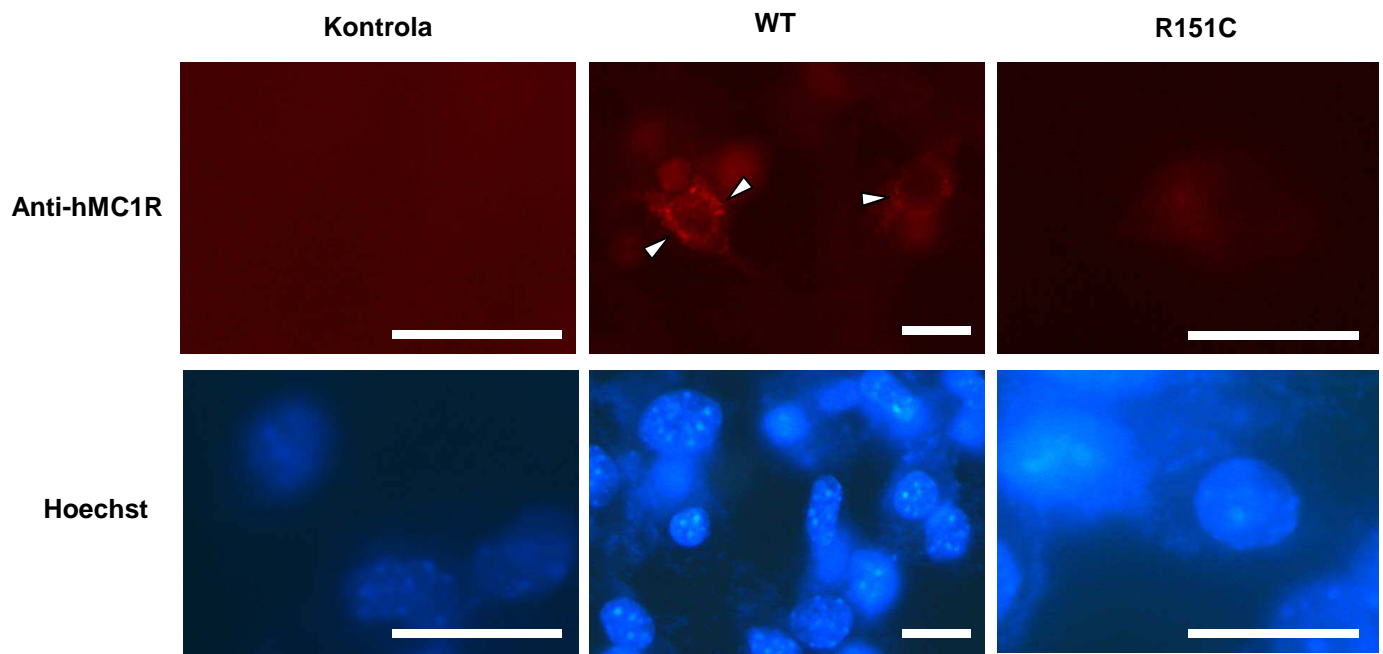
**2 Irudia: A** irudiak, Gapdh barne-kontrol bezala erabiliz, pCDNA hutsa (Con), pCDNA-hMC1R (WT) edo pCDNA-R151C-MC1R (R151C) bektoreekin transfektaturiko eta ondoren UVB erradiazioaren eraginpean jarritako B16-F10 zeluletatik erauzitako RNAkin egindako RT-PCR esperimentu adierazgarri baten emaitzak azaltzen dira. **B** irudiak, RT-PCRko emaitzen kuantifikazioa adierazten du. Guztira 3 esperimentutan barne-kontrolarekiko normalizaturiko eta bektore hutsarekin (Con) transfektaturiko zelulei dagozkien adierazpen balioen batezbestekoak azaltzen dira. Errore-barrak desbideratze estandarra adierazten dute. Emaitzak, T Student proba erabiliz konparatzen dira. \*p < 0.002 vs Con; † p < 0.002 vs WT.

**3 Irudia:** pCDNA hutsa (Con), pCDNA-hMC1R (WT) edo pCDNA-R151C-MC1R (R151C) bektoreekin transfektaturiko eta ondoren UVB erradiazioaren eraginpean jarritako B16-F10 zelulen melanina kantitatearen estimazioa (absorbantziaren neurria/zelula kopurua). Emaitzek, 3 esperimentutan lortutako emaitzen absorbantziaren batezbestekoa. Errore-barrek desbideratze estandarra adierazten dute. Emaitzak, T Student proba erabiliz konparatzen dira. \*p < 0.002 vs Con; † p < 0.002 vs WT.

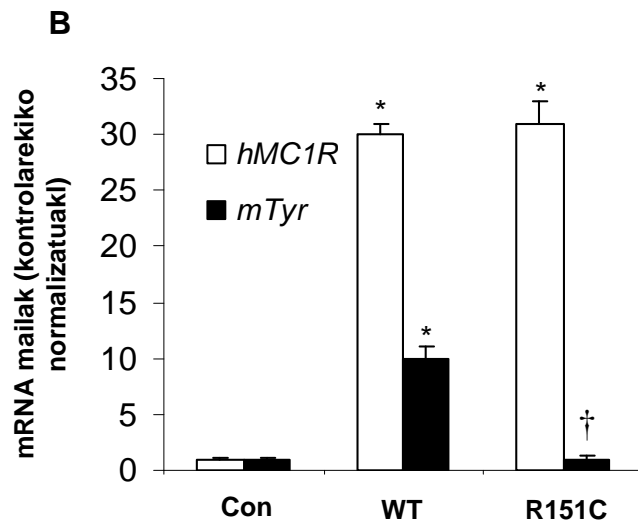
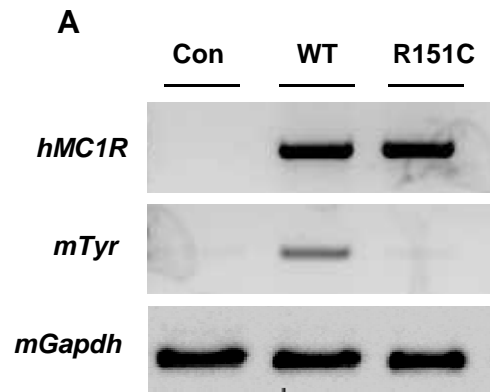
**4 Irudia:** pCDN hutsa (Con), pCDNA-hMC1R (WT) edo pCDNA-R151C-MC1R (R151C)ekin transfektaturiko eta ondoren UVB erradiazioaren eraginpean jarritako B16-F10 zelulen hazkuntza (**A**) eta bideragarritasunaren (**B**) emaitzak (n=3). Emaitzak, T Student proba erabiliz konparatzen dira. \*p < 0.002 vs Con; † p < 0.002 vs WT.

**2 Taula:** Taulak R151Cren maiztasunak 1000G proiektuan analizaturiko populazioetan adierazten du.

**3 Taula:** Taulak **MC1R** locusaren dibertsitate haplotipikoa adierazten du populazio desberdinetan, kasu bakoitzean Tajimaren D balioa azaltzen delarik.

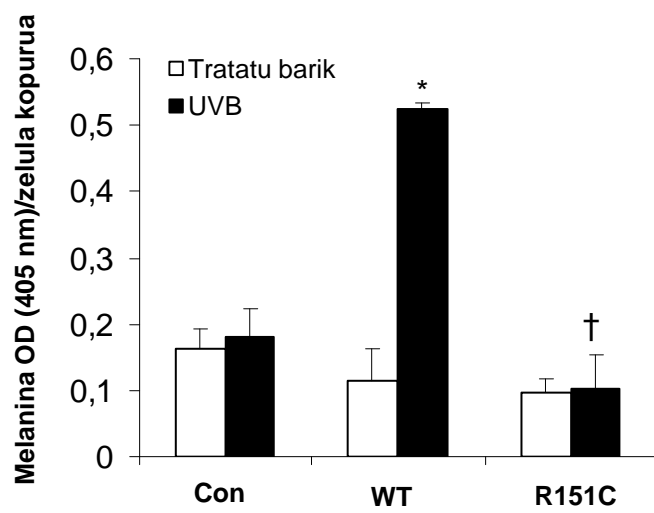


1 irudia

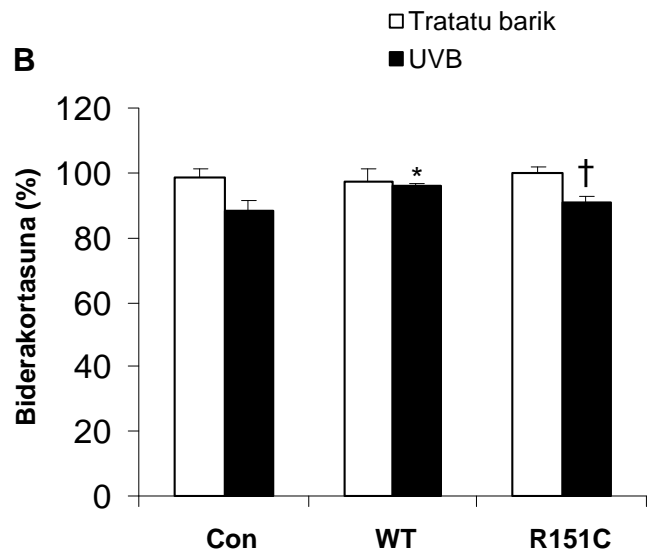
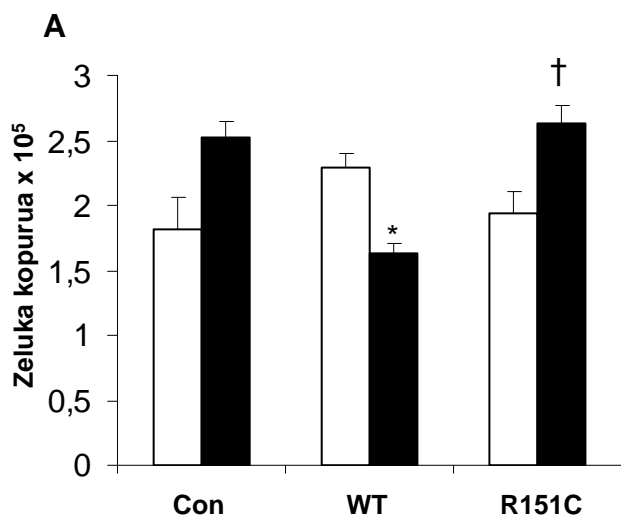


2 irudia





3 irudia



4 irudia

**2 Taula**

<b>POPULAZIOA</b>	<b>R151C MAIZTASUNA</b>
AFRIKA	0.004
EUROPA HEGOALDEA	0.022
EUROPA IPARRALDEA	0.091

**3 Taula**

<b>POPULAZIOA</b>	<b>SEKUENTZIAK N</b>	<b>DIBERTSITATE HAPLOTIPIKOA</b>	<b>TAJIMA-REN D TOKI EZ-SINONIMOAK</b>	<b>P- BALIOA</b>
AFRIKA	492	0.661	-1.804	0.001
EUROPA HEGOALDEA	224	0.578	-1.43	0.055
EUROPA IPARRALDEA	536	0.682	-0.87	0.193