

# IHMISEN MELANOKORTIINI-1 RESEPTORIN SÄÄTELYALUEEN KLOONAUUS JA TESTAUS RETINAN PIGMENTTIEPITEELIN SOLUISSA

---

Maija Mutikainen

Pro gradu-tutkielma

Itä-Suomen yliopisto

Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta / biotiede

Helmikuu 2012

Itä-Suomen yliopiston luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta, biotiede

MAIJA MUTIKAINEN

Pro gradu -tutkielma: 75 sivua

Pro gradu -työn ohjaajat: Mika Reinisalo, Sanna Ryhänen

Helmikuu 2012

Ihmisen melanokortiini-1 reseptorin säätelyalueen kloonaus ja testaus retinan pigmenttiepiteelin soluissa

---

**Avainsanat:** *Silmänpohjan ikärappeuma, pigmentaatio, RPE, melanogeneesi, MC1R, MITF-A, OTX2*

Silmänpohjan ikärappeuma, makuladegeneraatio, on ikääntyessä yleistynyt sairaus. Se on länsimaissa merkittävin näkövammaisuutta aiheuttava tarkkanäköisen alueen sairaus. Arviolta joka kymmenes yli 60-vuotias suomalainen kärsii ikärappeumasta. Noin 80 % ikärappeumapotilaista jää ilman tehokasta hoitoa, puutteellisen sairauden patogeneesin ymmärryksen vuoksi. Verkkokalvon pigmenttiepiteelillä (RPE) on silmän toimintoja ylläpitävä ja suojaava vaikutus, mutta sen pigmentaatiossa tapahtuu suuria muutoksia ikääntyessä ja ikärappeuman kehittyessä. Geeni- ja molekyyli-tasoinen tietämys pigmentaation säätelystä ihmisen silmässä ja ikääntyessä tapahtuviin muutoksiin johtavista tekijöistä on vähäistä, sillä aiheutta on tutkittu lähinnä ihon melanosyyteissä ja hiirimalleissa.

Melanokortiini-1 reseptorilla (MC1R) on keskeinen rooli melanogeneesin säätelyssä samoin kuin transkriptiotekijöillä MITF ja OTX2 sekä tyrosinaasilla (TYR). *MC1R*-geeni säätelee pigmentaatiota ihon melanosyyteissä, mutta säätelymekanismeja ei tunneta kovin hyvin RPE:ssä. On kuitenkin oletettu, että samat geenit osallistuvat pigmentaation säätelyyn molemmilla solutyypeillä.

Epidemiologisissa tutkimuksissa on huomattu yhteys RPE:n sisältämän melaniinipigmentin vähäisen määrän ja ikärappeuman välillä. Tämän tiedon perusteella voidaan olettaa, että pigmentaatioon osallistuvilla geneeillä voisi olla yhteys silmänpohjan ikärappeuman patogeneesiin. Tärkeimpinä pigmentaation säätelijöinä pidetään *MC1R*-, *TYR*-, *TRP-1*-, *MITF*- ja *OTX2*- genejä, joista *TYR*:n kohdalla tiedetään pigmentaation säätelyssä olevan eroja melanosyytti- ja RPE-solulinjojen välillä.

Tässä työssä kloonattiin ihmisen *MC1R*-geenin säätelyalue ja tutkittiin geenin toimintaan vaikuttavia tekijöitä verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluissa. ARPE19-, LA1-5s-, SH-EP1-, SH-SY5Y-, WERI-Rb1- ja Y79-soluista mitattiin *MC1R*-, *OTX2*-, *MITF-A*-, *MITF-D*-, *MITF-H*- ja *MITF-M*-geenien mRNA-tasoa.

Tulokset osoittivat, että *MC1R*-mRNA:ta ilmentyy monissa solulinjoissa, erityisesti WERI-Rb1- ja Y79-retinoblastoomasoluissa. *MC1R*-geenin säätelyalueen kloonaus onnistui. Tulokset osoittivat, että *OTX2*:n lisäys ARPE19-soluihin lisäsi *MC1R*-säätelyalueen aktiivisuutta, kun taas *MITF-A*:n lisäys laski sen aktiivisuutta. Säätelyalueelle tehtiin deleetioita, joista kaksi onnistui.

Tällaisenaan koejärjestelmä ei ole kuitenkaan luotettavasti toistettavissa. Tulosten luotettavuuden parantamiseksi koeolosuhteet tulisi optimoida kummallekin käytetylle solulinjalle erikseen ja kokeet tulisi toistaa.

## **ESIPUHE**

Tein pro graduni työosuuden Itä-Suomen yliopiston biofarmasian yksikössä prof. Paavo Honkakosken ryhmässä vuonna 2011. Haluan kiittää pääohjaajanani toiminutta Mika Reinisaloa osaavasta ohjauksesta laboratoriotyöskentelyssä ja kaikista neuvoista matkan varrella. Suuri kiitos myös biofarmasian yksikön muulle henkilökunnalle. Kiitän myös toisena ohjaajanani toiminutta Sanna Ryhästä avustamisesta ja neuvoista liittyen työn kirjallisuus- ja ulkonäköosioon, sekä tarkastajina toimineita Paavo Honkakoskea ja Mikko Lammia. Lopuksi kiitän vielä kaikkia niitä henkilöitä, jotka ovat tukeneet ja kannustaneet minua opintojeni aikana, erityisesti rakkaita vanhempiani ja isoveljeäni, joka olemassaolollaan kannustaa minua koettelemaan rajojani ja tavoittelemaan aina enemmän ja parempaa.

Kuopiossa 29.02.2012

## LYHENTEET

ACTH	Adenokortikotrooppinen hormoni
AGRP	Agouti signaalipeptidin kaltainen proteiini
AMD	Silmänpohjan ikärappeuma
ARPE19	Ihmisen verkkokalvon pigmenttiepiteelisolulinja
ASP	Endogeeninen MC1R:n antagonisti agouti-signaalipeptidi
cAMP	Syklinen adenosinimonofosfaatti
CREB	cAMP:n vaste-elementtiin sitoutuva proteiini
CRX	Homeobox-perheeseen kuuluva tappi- ja sauvasolujen säätelemä geeni
DOPA	Dihydroksifenyylialaniini
FBS	Sikiökautisen naudan seerumi
MC1R	Melanokortiini-1 reseptori
MITF-A	Mikroftalmiaan (pienisilmäisyyteen) liittyvä transkriptiotekijä A
MSH	Melanosyyttejä stimuloiva hormoni
OTX2	Ortodentikaalinen proteiini 2
PBS	Suolapitoinen fosfaattipuskuri
PCR	Polymeraasiketjureaktio
PEI	Polyetyleeni-imiini
POMC	Pro-opiomelanokortiini
qRT-PCR	Kvantitatiivinen tosiaikainen polymeraasiketjureaktio
RPE	Verkkokalvon pigmenttiepiteeli
SNP	Yhden nukleotidin polymorfia
TRP-1	Tyrosinaasin kaltainen proteiini-1
TYR	Tyrosinaasi
Y79	Ihmisen retinoblastoomasolulinja

# SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO .....	7
2 KIRJALLISUUSKATSAUS .....	8
2.1 Melanokorttiinijärjestelmä .....	8
2.1.1 Melanogeneesin säätely .....	10
2.1.2 MC1R-mekanismi, säätely ja ilmeneminen.....	13
2.1.3 Ihmisen MC1R-geenin säätelyalue.....	14
2.1.4 MC1R:n mutaatiot ja sairaudet .....	14
2.2 Verkkokalvon pigmenttiepiteeli ja sen yhteys silmän sairauksiin .....	15
2.2.1 Pigmentaatioon kytkeytyvät verkkokalvon sairaudet .....	17
2.2.2 Silmänpohjan ikärappeuma .....	17
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET .....	20
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	20
4.1 Sekvenssien haku tietokannoista ja homologiavertailut .....	20
4.2 MC1R-sekvenssin analysointi SNP-tietokannoissa .....	21
4.3 hMC1R-säätelyalueen kloonaus .....	22
4.3.1 Polymeerasiketjureaktio .....	23
4.3.2 hMC1R-säätelyalueen liittäminen lusiferaasireportteri-plasmidiin.....	24
4.4 Kvantitatiivinen RT-PCR.....	26
4.5 MC1R-deleetiokonstruktioiden valmistus .....	28
4.6 Soluviljely .....	29
4.7 hMC1R-Luc-plasmidien testaus ARPE19- ja Y79-solulinjoissa.....	30
4.7.1 Käänteistransfektioimenetelmän periaate .....	30
4.7.2 Transfektiokompleksien valmistus ja PEI25-optimointi .....	31
4.7.3 Reportterigeenianalyysi .....	32
4.8 hMC1R-Luc-kloonien sekvensointi.....	32
4.9 Tilastolliset menetelmät .....	33
5 TULOKSET.....	34
5.1 hMC1R-sekvenssin homologiavertailut ja analysointi .....	34
5.2 hMC1R-säätelyalueen kloonaus .....	38

5.3 MC1R-mRNA:n ilmentyminen solulinjoissa.....	39
5.4 Transfektio-olosuhteiden optimointi.....	41
5.5 OTX2:n ja MITF-A:n vaikutus hMC1R-Luc-konstruktioon.....	42
5.5.1 MC1R-säätelyalueen toiminta .....	44
6 POHDINTA.....	47
6.1 Yhteenveto .....	51
7 LÄHTEET .....	53
7.1 Internet lähteet.....	62
LIITTEET .....	63

# 1 JOHDANTO

Silmänpohjan ikärappeuma (AMD), degeneratio maculae senilis, on yleisin, yli 60-vuotiaiden näkövammaisuutta aiheuttava sairaus länsimaissa (Kocur & Resnikoff 2002; Bunce & Wormald 2006; Gehrs ym. 2006; Bunce & Wormald 2010). Sairaus on merkittävä kansanterveydellinen ongelma ja sen tärkein riskitekijä on ikä, minkä vuoksi sen ilmaantuvuus tulee kasvamaan selvästi lähivuosina eliniän odotteen kasvaessa (Rein ym. 2009). Ikärappeuman syynä pidetään verkkokalvon pigmenttiepiteelin (RPE) toiminnan heikkenemistä ja yhtenä sairauden etenemisen kannalta merkittävänä riskitekijänä pidetään RPE:n vähäistä melaniinin määrää (Feeney-Burns ym. 1984; Hu ym. 2008).

RPE-solut ovat yksi tärkeimmistä soluryhmistä näkökyvyn kannalta; ne suojaavat ja huoltavat niitä ympäröiviä solukerroksia (Strunnikova ym. 2010). RPE-soluilla on kyky fagosytoida ja hajottaa valoistinsolujen ulkosegmenttiä. Mikäli RPE-solujen toiminta on häiriintynyt, valoistinsolujen lisäksi myös muut verkkokalvon osat voivat vahingoittua, ja solukerrosten väliin voi muodostua proteiinikertymiä (Anderson ym. 2002; Gehrs ym. 2006), mistä seuraa AMD:lle ominaisia oireita, kuten näön heikkenemistä ja sokeita täpliä näkökentässä (Jager ym. 2008; Noble & Chaudhary 2010). Sairauden patogeneesi on vaikeasti ymmärrettävissä, sillä sen taustalla on geneettisten riskitekijöiden lisäksi aineenvaihdunnallisia ja fysiologisia muutoksia sekä ympäristötekijöitä.

Epidemiologiset tutkimukset ovat osoittaneet, että RPE:n vähäisen melaniinipigmentin määrän ja silmänpohjan ikärappeuman välillä on yhteys (Thompson ym. 2007). Tutkimustulosten valossa on voitu olettaa, että pigmenttaatioon osallistuvilla geneeilla on potentiaalinen yhteys ikärappeuman kehittymiseen.

Tässä tutkimuksessa kloonattiin ja tutkittiin ihmisen *MC1R*-geenin säätelyaluetta AR-PE19- ja Y79-soluissa. Tavoitteena oli selvittää säätelyalueen toiminnan kannalta merkittävimmät säätelytekijät, transkriptiotekijät ja niiden aiheuttamat vaikutukset säätelyalueen toimintaan. Lisäksi tutkittiin, miten tärkeinä pidetyt transkriptiotekijät vaikuttivat säätelyalueen toimintaan.

## 2 KIRJALLISUUSKATSAUS

### 2.1 Melanokorttiinijärjestelmä

Melanokorttiinit ovat ryhmä peptidihormoneja, joihin kuuluvat adrenokortikotrooppinen hormoni (ACTH), sekä  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -muodot pigmenttiä tuottavia soluja, melanosyyttejä, stimuloivasta hormonista ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -MSH) (Rubinstein ym. 1978; Hadley & Haskell-Luevano 1999). Lisäksi melanokorttiinijärjestelmään kuuluu viisi melanokorttiinireseptoria (MC1R-MC5R) (Taulukko 1) ja endogeeninen melanokorttiinivastavaikuttaja, agouti-signaali-peptidi (ASP) ja ASP:n kaltainen proteiini (AGRP). Ihmisessä melanokorttiineja tuotetaan endogeenisesti pro-opiomelanokorttiinista (POMC) aivolisäkkeessä (Hadley & Haskell-Luevano 1999). *POMC*-geeniä ilmentetään pääasiassa keskushermostossa, mutta myös ihon ja hiustupen keratinosyyteissä ja melanosyyteissä (Thody 1999). Melanokorttiinijärjestelmällä on keskeinen rooli ihmiselimistön energiatasapainon säätelyssä (Krude ym. 1998).

Taulukko 1: Melanokorttiinireseptorien kohteet ja toiminta.

Reseptori	Ensisijainen ligandi	Kohdekudokset	Toiminta	Viitteet
MC1R	$\alpha$ -MSH, ACTH	Melanosyytit, immuunipuolustuksen solut, tulehdussolut	Pigmentin tuotannon ja tulehduksen säätely	Abdel-Malek ym. 1995
MC2R	ACTH	Lisämunuaisen kuorikerros	Steroidituotanto	Abdel-Malek 2001; Catania ym. 2004
MC3R	$\alpha$ -MSH, $\beta$ -MSH, $\gamma$ -MSH, ACTH	Makrofagit, keskushermosto	Tulehduksen ja ravinnonoton säätely	Roselli-Rehffuss 1993; Abdel-Malek 2001; Mencarelli ym. 2011
MC4R	$\alpha$ -MSH, ACTH	Keskushermosto	Ravinnonoton ja energiatasapainon sekä seksuaalisen aktiivisuuden säätely	Van der Ploeg ym. 2002
MC5R	$\alpha$ -MSH	Avoeritysrauhaset	Rauhasten toiminnan säätely	Chen ym. 1997; Abdel-Malek 2001

Melanokorttiinit vaikuttavat kohteeseensa sitoutumalla ja aktivoimalla melanokorttiinireseptoreita 1-5; kaikki melanokorttiinit sisältävät aminohapposekvenssin His-Phe-Arg-Trp, joka on välttämätön niiden biologiselle aktiivisuudelle ja erottaa ne muista sa-



man prohormonin tuotteista (Gantz ym. 1993). POMC:n translaation jälkeinen käsittely on kudosspesifistä, mikä mahdollistaa sen, että melanokorttiineilla on lukuisia toisistaan eroavia fysiologisia tehtäviä (Smith & Funder 1988). Niiden toiminta säätelee muun muassa pigmentaatiota, elimistön steroidituotantoa, energiatasapainoa, avoeritystä, seksuaalista käyttäytymistä, tulehdusreaktiota, elimistön lämpötilaa, immunologisia muutoksia, verenpainetta ja hermostollista lihasuudistusta (Catania ym. 2004).

Melanokorttiinireseptorit ovat G-proteiinikytkentäisiä reseptoreita (GPCR), jotka ovat niimensä mukaan solun sisäpuolella kytköksissä G-proteiiniin. Reseptorien toiminta perustuu solunsisäisen  $Ca^{2+}$ -pitoisuuden muutoksiin (Luttrell 2008). Ihmisen melanokorttiini-1 reseptori on 317 aminohapon pituinen GPCR, jossa on solunulkoinen N-terminaalipää, seitsemän solukalvon lävistävää fragmenttia ja solunsisäinen C-terminaalipää (García-Borrón ym. 2005).

Mutaatiot *MC1R*-geenissä johtavat punahiuksisuuteen ja ihon huonoon UV-suojaan. MC1-reseptorin ligandeina toimivat  $\alpha$ -MSH ja ACTH (Abdel-Malek ym. 1995), jotka ovat tehokkaimmat ihon pigmentaatiota aktivoivat melanokorttiinit (Abdel-Malek ym. 2000). Melanokorttiini-2 reseptorin (MC2R) spesifinen ligandi on ACTH, jonka vaikutuksesta steroidituotanto ja vapautuminen lisämunuaiskuorelta verenkiertoon lisääntyvät (Abdel-Malek 2001; Catania ym. 2004). Melanokorttiini-3 reseptorin (MC3R) toiminta säätelee autonomisia toimintoja, kuten ravinnonottoa ja tulehdusta (Abdel-Malek 2001; Mencarelli ym. 2011). Reseptori eroaa muista melanokorttiinireseptoreista sillä, että sillä ei ole spesifistä ligandia; melanokorttiiniligandeista  $\gamma$ -MSH:n sitoutumispotentiaali on hieman suurempi kuin  $\alpha$ -MSH:n,  $\beta$ -MSH:n ja ACTH:n (Roselli-Reh fuss 1993; Abdel-Malek 2001). Melanokorttiini-4 reseptorin (MC4R) ensisijaisia ligandeja ovat  $\alpha$ -MSH ja ACTH, kuten MC1R:lläkin, mutta toiminta muistuttaa suurilta osin MC3R:n toimintaa keskushermostossa. Mutaatiot MC4R:ssa johtavat usein perinnölliseen liikalihavuuteen (Yeo ym. 1998). MC4R:n toiminnalla on havaittu olevan vaikutus myös seksuaaliseen toimintaan (Van der Ploeg ym. 2002). Melanokorttiini-5 reseptorin (MC5R) toiminnan kohteita ovat avoeritysrauhaset ja tietyt immuunipuolustuksen vasteet (Chen ym. 1997). Sen ligandeina toimivat  $\alpha$ -MSH ja ACTH, joista  $\alpha$ -MSH:lla on suurempi sitoutumispotentiaali (Abdel-Malek 2001).

Melanokorttiinireseptoreilla on kaksi vastavaikuttajaa, ASP ja AGRP, jotka osallistuvat melanokorttiinien toiminnan säätelyyn; melanokorttiinien kautta nämä kaksi proteiinia ovat yhteydessä kehon painon ja pigmentaation säätelyyn (Ollmann ym. 1998). Melanokorttiinireseptorien vastavaikutteinen toiminta perustuu reseptorimolekyylien kysteiniirikaaseen häntään (Catania ym. 2004). ASP on kilpaileva vastavaikuttajaproteiini, jolla on suuri sitoutumispotentiaali MC1R:iin ja MC4R:iin, kun taas AGRP on kilpaileva vastavaikuttaja MC3R:lle ja MC4R:lle keskushermostossa (Ollmann ym. 1998).

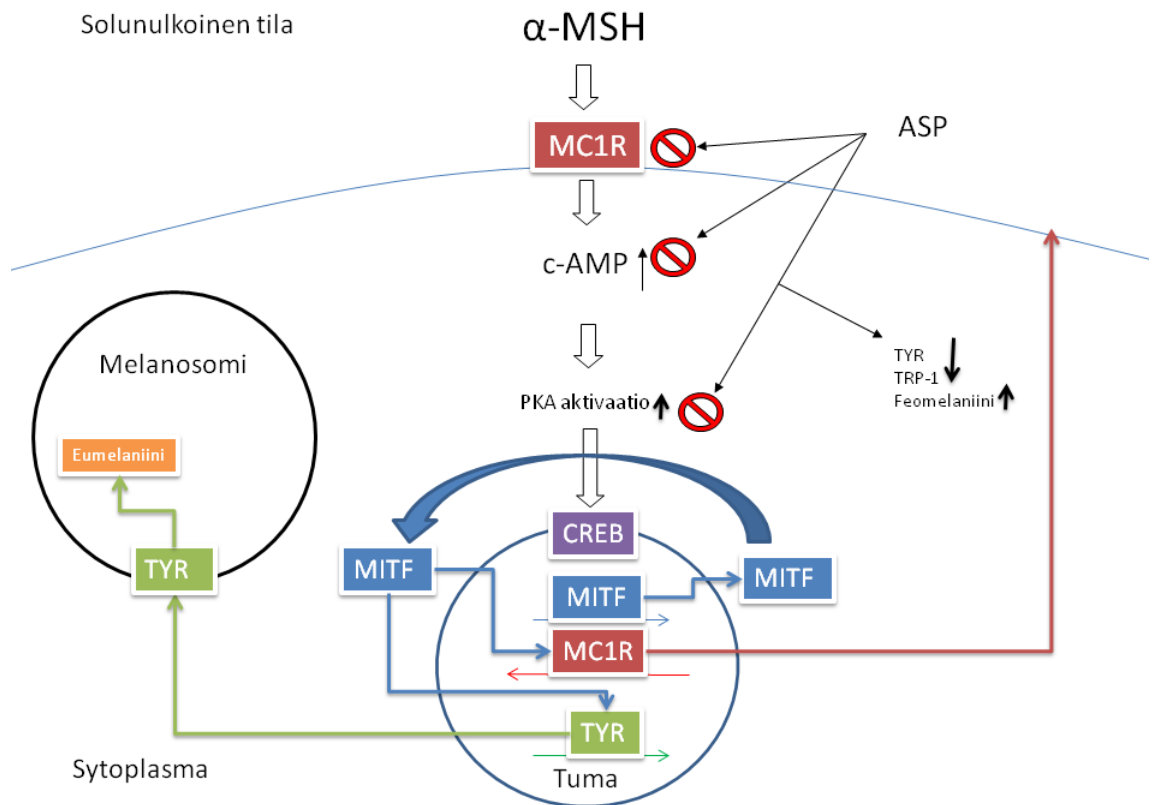
### 2.1.1 Melanogeneesin säätely

Pigmenttipolymeeri melaniini suojaa ihoa ultraviolettia (UV)-säteilyn vahingollisilta vaikutuksilta. Pigmenttiä tuottavissa soluissa, ihon melanosyyteissä, silmän suonikalvon melanosyyteissä ja verkkokalvon pigmenttiepiteelin soluissa on pigmenttijyväsiä, melanosomeja, joissa tyrosiinista tuotetaan ja varastoidaan melaniinipigmenttejä (Wasmeier ym. 2008). Melaniinia on kahdenlaista: eumelaniinia ja feomelaniinia, joista eumelaniinin UV-säteilyltä suojaava potentiaali on suurempi (Menon ym. 1983). UV-suojan lisäksi melanosyytit tuottavat kudoksille ja karvoille niiden väripigmentin; nisäkkäillä ihon, turkin ja karvojen väri määräytyy eumelaniinin ja feomelaniinin välisellä suhteella. Jos melanosyytit tuottavat enemmän eumelaniinia, on pigmentti ruskean tai mustan sävyistä; feomelaniinin tuoton ollessa suurempaa, on pigmentti keltaisen tai punaisen sävyistä, johon tuen lisääntyneestä kysteiniin määrästä (Prota 1980).

Melanogeneesiä eli pigmenttien tuotantoa säätelevät ihmiselimestössä melanokorttiinit  $\alpha$ -MSH ja ACTH, joita tuotetaan pääasiassa aivolisäkkeessä, mutta myös paikallisesti iholla (Thody 1999). Eumelaniinin tuotantoa stimuloi melanosyyteistä ja keratinosyyteistä vapautuva POMC, josta tuotetaan  $\alpha$ -MSH:ta ja ACTH:ta (Schauer ym. 1994; Chakraborty ym. 1996).  $\alpha$ -MSH:n lisääntyminen solussa johtaa muutoksiin solunsisäisen syklisen adenosinimonofosfaatin (cAMP) pitoisuuksissa (García-Borrón ym. 2005). On osoitettu, että tyrosinaasiaktiivisuus ja tyrosinaasin (TYR) sekä tyrosinaasin kaltaisen proteiinin (TRP-1) määrät soluissa pysyvät korkeina ainoastaan silloin, kun cAMP-pitoisuus on riittävän korkea (Im ym. 1998). TYR on melaniinin tuotantoa säätelevä entsyymi, joka aktivoi dihydroksifenyylialaniinin (L-DOPA) muodostumista tyrosiinista. Muodostunut L-DOPA muutetaan pigmenttisoluisissa, kuten melanosyyteissä ja RPE-soluissa, melaniiniksi

(Wang & Hebert 2006; Schraermeyer ym. 2006). Melaniinin tuotanto on mahdotonta ilman TYR-entsyymiaktiivisuutta (Oetting & King 1999).  $\alpha$ -MSH stimuloi TYR:n välityksellä melanogeneesiä aktivoimalla MC1-reseptoria melanosyyttien solukalvolla (Abdel-Malek ym. 1995). MC1R:n aktivaatio johtaa lisääntyneeseen cAMP-riippuvaiseen viestinvälitykseen, mikä johtaa proteiinikinaasi-A:n (PKA) aktivaatioon. PKA fosforyloi cAMP:n vaste-elementtiin sitoutuvan proteiinin (CREB), mikä aktivoi transkriptiotekijöiden ilmentymistä tumassa (Price ym. 1998); tässä tapauksessa mikroftalmiaan eli pienisilmäisyyteen liittyvän transkriptiotekijän (MITF) tuotantoa. *MITF*- ja *TYR*-geeneissä ei ole omia CREB-sitoutumispaikkoja, minkä vuoksi CREB sitoutuu tumakalvolle. *MITF*:n fosforylaatio lisää sen sitoutumista kohdegeeneihinsä, mikä johtaa niiden lisääntyneeseen transkriptioon. (Kuva 1).  $\alpha$ -MSH kilpailee MC1R:n sitoutumispaikoista ASP:n kanssa. ASP estää cAMP-välitteisen aktivaation ja laskee solunsisäistä TYR-pitoisuutta, minkä seurauksena TYR-aktiivisuus ei riitä eumelaniinin tuotannon aktivoimiseen (Suzuki ym. 1997).

Pigmentaation säätelyn kannalta keskeisimpiä geenejä *MC1R*:n (OMIM 155555) lisäksi ovat *TYR* (OMIM 606933), *TRP-1* (OMIM 115501), dopakromi tautomeraasi (*DCT*) (OMIM 191275), melanosyyttispesifinen *PMEL17* (OMIM 155550), G-proteiinikytkentäistä reseptoria 143 ilmentävä geeni (*GPR143*) (OMIM 300808), *MITF* (OMIM 156845) ja ortodentikaalinen proteiini (*OTX2*) (OMIM 600037), sekä  $\beta$ -kateniini (OMIM 116806), jonka tuotanto ja toiminta on välttämätöntä kudoksia ympäröivien epiteelikerrosten olemassaololle. Melanosomit sisältävät kolmea tärkeää pigmentaatioentsyymiä: *TYR*:a, *TRP1*:ta ja *DCT*:a (Kobayashi ym. 1994; Bedito ym. 1997). Näiden entsyymien tuotantoa säätelee *MITF* (Bertolotto ym. 1998). *MITF* säätelee myös melanosomispesifisen rakenneproteiini *PMEL17*:n tuotantoa (Yamaguchi & Hearing 2009). Mutaatiot *GPR143*-geenissä johtavat usein okulaariseen albinismiin, jossa RPE:n pigmentin tuottokyky on vaurioitunut ja verkkokalvon pigmenttiepiteeli huonosti pigmentoitunut (Preising ym. 2011). *MITF*:n ja *OTX2*:n roolia pigmentaation säätelyn ja silmän kehityksen kannalta käsitellään lisää myöhemmin kappaleissa 2.1.4 ja 2.2.



Kuva 1. Melanogeneesiä säätelevät tekijät ihmisen melanosyyttisolussa.  $\alpha$ -MSH aktivoi MC1R:n, mikä aktivoi cAMP-viestinvälitysketjua. Kun cAMP-pitoisuus solun sisällä pysyy riittävän korkeana, myös TYR:n luenta tumassa jatkuu. TYR katalysoi eumelaniinin tuotantoa melanosomeissa ja lisäksi se aktivoi MC1-reseptoria melanosomien solukalvolla, mikä entisestään stimuloi melanogeneesiä. MC1R:n aktivaatio johtaa lisääntyneeseen cAMP-aktiivisuuteen, minkä seurauksena PKA fosforyloi CREB:n, jolloin MITF:n tuotanto tumassa lisääntyy. Tästä seurauksena MITF:n kohdegeenien MC1R:n ja TYR:n transkriptio lisääntyy entisestään. ASP kilpailee sitoutumispaikoista melanosyyttien solukalvolla  $\alpha$ -MSH:n kanssa. Sitoutuessaan solukalvolle ASP estää cAMP-välitteisen viestinvälityksen, minkä seurauksena solunsisäinen TYR-pitoisuus laskee, jolloin pitoisuus ei riitä eumelaniinin tuotannon aktivoimiseen. (Mukaiilu lähteestä Thody 1999).

Melanogeenin mekanismi eroaa riippuen kohdekudoksesta (Wasmeier ym. 2008). Ihon melanosyytit tuottavat jatkuvasti uusia melanosomeja, joissa ne siirtävät tuottamaansa melaniinia naapurisoluilleen, keratinosyyteille, kun taas verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen sikiökaudella tuottama pigmentti säilyy läpi elämän; se varastoidaan melanosomeissa RPE-soluihin ja suonikalvon melanosyytteihin (Lopes ym. 2007). Gargiulon työryhmä on osoittanut, että TYR-geeninsiirron avulla RPE-solut ja suonikalvon melanosyytit pystyvät säilyttämään pigmentaatio-ominaisuutensa myös syntymän jälkeen (Gargiulo ym. 2009). Ihmisen TYR-geenin sisältävä sytomegaloviruspromootori on liitetty AAV2/1-virusvektoriin, minkä jälkeen virusvektori on siirretty albiinohiiriin. AAV-

välitteinen *TYR*-geenin ilmentyminen sai aikaan melanosomien muodostumisen ja melaniinin tuoton aktivoitumisen kaikenikäisissä hiirissä (Gargiulo ym. 2009).

### **2.1.2 MC1R-mekanismi, säätely ja ilmeneminen**

Yli 120 geenin tiedetään säätelevän nisäkkäiden pigmentaatiota (Bennett & Lamoreux 2003; Rouzaud & Hearing 2005). MC1R on ainoa melanosyyteissä ilmentyvä melanokorttiinireseptori. Ihon ja karvatupen melanosyyttisolut ilmentävät MC1-reseptoria, minkä vuoksi juuri MC1R:llä on ratkaiseva rooli ihon ja hiusten pigmentin suhteen. Sen ensisijainen ligandi  $\alpha$ -MSH ja vastavaikuttaja ASP kilpailevat sitoutumispaikoista reseptorin pinnalla. Jos  $\alpha$ -MSH sitoutuu reseptoriin, tuottaa solu eumelaniinia eli tumman ruskeaa pigmenttiä, mutta jos ASP estää  $\alpha$ -MSH:n sitoutumisen, myös MC1R:n ilmentyminen estyy, mikä johtaa feomelaniinin tuotantoon (kuva 1).  $\alpha$ -MSH myös stimuloi melanosyyttien kiinnittymistä solunulkoisiin kalvoproteiineihin, suojaa soluja hapettumisen aiheuttamalta stressiltä ja säätelee typpioksidin tuotantoa (Thody 1999). MC1R:n toiminta ei rajoitu pelkästään melanogeneesin säätelyyn; myös muun muassa sidekudossolut (Böhm ym. 1999), endoteelisolut (Hartmeyer ym. 1997; Böhm ym. 1999), leukosyytit ja anti-geenejä esittelevät solut (Neumann Andersen ym. 2001) ilmentävät MC1-reseptoria.

MC1R:n ilmentyminen lisääntyy UV-säteilyn vaikutuksesta, mikä on todettu soluviljelmissä sekä ihon orvaskesikerroksen soluissa *in vivo* (Corre ym. 2004; Schiller ym. 2004). Ilmentymistä säätelevät muun muassa  $\alpha$ -MSH ja ASP, joiden aktivaation seurauksena valolta suojaavan eumelaniin tai feomelaniinin tuotanto tehostuu.  $\alpha$ -MSH:n aktivaatio nostaa MC1R:n ilmentymistasoja, mikä johtaa eumelaniinin tuotannon lisääntymiseen, kun taas ASP:n aktivaation seurauksena MC1R-tasot laskevat ja eumelaniinin tuotanto vähenee, jolloin eumelaniinin ja feomelaniinin välinen suhde muuttuu feomelaniinin hyväksi (Scott ym. 2002a). Yksi tärkeimmistä MC1R:n ilmentymisen säätelijöistä on MITF (Adachi ym. 2000; Aoki & Moro 2002), jonka on osoitettu olevan myös tärkeä pigmentaation säätelijä (Levy ym. 2006).

### 2.1.3 Ihmisen MC1R-geenin säätelyalue

Ihmisen *MC1R*-geenin säätelyalueesta on sekvensoitu 3201 emäsparia (ep) transkription aloituskohdasta ylävirtaan (Moro ym. 1999). Sekvensointi osoitti, että MC1R:n säätelyalue on GC-rikas. Säätelyalueelta, transkription aloituskohdasta noin 600 emäsparia ylävirtaan kattavalta alueelta löytyi useita transkriptiotekijöiden sitoutumiskohtia, mutta ei yhtään transkription aloituksen kannalta tärkeää TATA-box- tai CAAT-box-elementtiä. Alueelta löytyi kuitenkin MITF-transkriptiotekijän sitoutumispaikka, E-box-elementti (CATGTG) heti 3'-päästä katsottuna ensimmäisestä transkription aloituskohdasta ylävirtaan (Moro ym. 1999). MC1R:n ja sen säätelyalueen ilmentymistä ja säätelyä koskeva tutkimustieto on pääosin peräisin melanosyyteillä tehdyistä tutkimuksista. RPE-soluista ei ole vielä saatu merkittävästi luotettavaa tutkimustietoa.

MC1R:n ilmentymisen kannalta tärkeimpinä transkriptiotekijöinä voidaan pitää MITF:a, OTX2:a ja Sp1:a. Sp1:llä on GGCGGG:n kaltaisia sitoutumiselementtejä, mikä on yksi GC-rikkaan promoottorialueen tuntomerkeistä (Moro ym. 1999). Aokin ja Moron ryhmän tutkimuksissa MC1R-säätelyalueen aktivaatio viisinkertaistui MITF:n läsnäollessa (Aoki & Moro 2002), mikä kertoo MITF:n tärkeydestä säätelyalueen toiminnan kannalta. Kaikki aihetta käsittelevät tutkimukset eivät kuitenkaan tue näkemystä E-box-rakenteen MC1R-säätelyaluetta aktivoivasta vaikutuksesta (Smith ym. 2001). Säätelyalueelta, transkription aloituskohdasta ylävirtaan, on karakterisoitu ainakin kolme Sp1-sitoutumispaikkaa, jotka ovat tärkeiden transkriptiotekijöiden läheisyydessä (Moro ym. 1999).

### 2.1.4 MC1R:n mutaatiot ja sairaudet

Mutaatiot *MC1R*-geenissä ovat hyvin yleisiä; kaikilla punahiuksisilla on ainakin toisessa *MC1R*-geenin alleeleista mutaatio. Tutkimuksissa on löydetty useita muunnelmia *MC1R*:n alleeleista; muun muassa Arg151Cys, Arg160Trp ja Asp294His variantit ovat hyvin yleisiä punahiuksisilla henkilöillä (Box ym. 1997; Scott ym. 2002b). Näiden mutaatioiden seurauksena MC1R:n vaste  $\alpha$ -MSH:lle huononee (Scott ym. 2002b) ja reseptorin ilmentyminen solukalvolla vähenee (García-Borrón ym. 2005), jolloin eumelaniinin tuotanto vähenee huomattavasti.

Ihosityövän riski suurenee, kun *MC1R*-geenin toiminta on heikentynyt mutaation seurauksena, sillä punahiuksisuuden lisäksi monilla *MC1R*-alleelivariantin kantajilla on vaalea ja huonosti ruskettuva iho (Valverde ym. 1995). Eumelaniinilla on merkittävä rooli UV-säteilyltä suojautumisessa; melanosyyteillä, joiden *MC1R* ei toimi normaalilla tavalla, on huonompi kyky suojautua UV-säteilyn aiheuttamilta vaurioilta (Scott ym. 2002b).

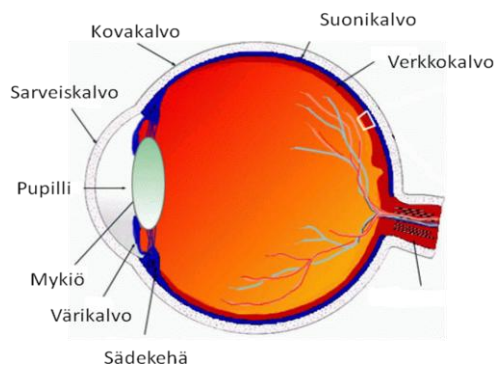
*POMC*-geenissä on havaittu mutaatioita, jotka johtavat ulkoisten tunnusmerkkien lisäksi myös vakavampiin oireisiin. Mutaatiot *POMC*-geenissä johtavat usein mataliin  $\alpha$ -MSH- ja ACTH-tasoihin, mitä ilmentävät punahiuksisuuden lisäksi aineenvaihdunnan poikkeavuudet kuten munuaisten vajaatoiminta ja liikalihavuus. (Krude ym. 1998).

## **2.2 Verkkokalvon pigmenttiepiteeli ja sen yhteys silmän sairauksiin**

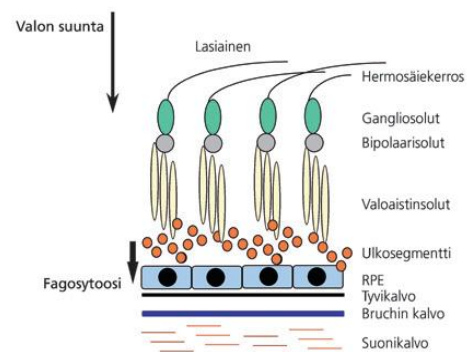
Verkkokalvon pigmenttiepiteeli (RPE) on yksinkertainen pigmenttisolukerros, joka muodostaa verenkierroon ja verkkokalvon sisempien kerrosten välisen veri-retinaesteen (kuva 2). RPE:llä on silmän kehityksen ja toiminnan kannalta merkittävä rooli. RPE vastaa ionien, veden ja aineenvaihduntatuotteiden kuljetuksesta verenkiertoon ja ravintoaineiden kuljetuksesta valoistinsoluille (Strauss 2005). Tärkeimpiin RPE-solujen tehtäviin kuuluu valoreaktiossa syntyneen retinaalin trans-isomeerin kierrätys valoistinsoluilta RPE-soluille, joissa se muutetaan takaisin aktiiviseen cis-muotoon (Strunnikova ym. 2010). Tämän jälkeen retinaalin cis-muoto kierrätetään takaisin valoistinsoluille. Toinen tärkeä RPE-solujen tehtävä on valoistinsolujen eli fotoreseptorien valosensitiivisen ulkosegmentin hajotus fagosytoosilla (Strunnikova ym. 2010). Vanhentuneen ja rappeutuneen ulkosegmentin fagosytoosi mahdollistaa fotoreseptorien uudistumisen ja toimintakunnon säilyttämisen. Solumallilla, jolla RPE:n fagosytoosi on estetty, voidaan havaita fotoreseptorien rappeutumista johtuen ulkosegmentin fagosytoosin heikentymisestä (Strick ym. 2009). RPE-soluilla on myös verisuonten uudismuodostusta säätelevä ominaisuus (Fan ym. 2002). Ikääntymisen aiheuttamien tekijöiden, kuten lipofuskiinien kertymisen seurauksena RPE-solujen toiminta heikkenee ja solut ohjautuvat lopulta apoptoosiin (Wang ym. 2009). Vaurio RPE-soluissa johtaa epäsuorasti valoistinsolujen tuhoon ja näön menetykseen. Osaksi näistä syistä RPE on monien verkkokalvon rappeutumiseen johtavien sairauksien alkuperä ja kohde, sillä RPE:n toiminta vaikuttaa ympäröivien solujen elin-kykyyn ja hyvinvointiin (Cai ym. 2009; Strunnikova ym. 2010).

Melaniini suojaa RPE:tä ja sen alla olevia verkkokalvon solukerroksia valon aiheuttamista vaurioilta suodattamalla silmään saapuvaa valoa tarpeen mukaan (Algvere & Seregard 2002). Lisäksi melaniini toimii antioksidanttina RPE-soluissa (Sundelin ym. 2001). RPE-solujen melaniinipitoisuus kuitenkin pienenee ikääntymisen myötä, jolloin melaniinin haettumisen aiheuttamaa stressiä vastaan suojaava vaikutus vähenee (Strauss 2005).

Tutkimukset ovat osoittaneet, että *MITF*:lla ja *OTX2*:lla on merkittävä rooli verkkokalvon oikeanlaisessa kehityksessä ja pigmentaation säätelyssä geenitasolla (Martínez-Morales ym. 2003; Gelineau-van Waes ym. 2008). Mutaatiot *MITF*:ssa johtavat häiriöihin pigmentaatiossa ja kuulossa, mikä johtuu MITF-transkriptiotekijän ilmentymisestä alkiokehityksellä verkkokalvolla, iholla ja hiustupessa (Tassabehji ym. 1994). MITF myös säätelee *TYR*-geenin ilmentymistä melanosyyteissä (Yasumoto ym. 1994; Yasumoto ym. 1997). *OTX2*:lla on tärkeä rooli verkkokalvon valoa aistivien valoreseptorien kehittämisessä (Henderson ym. 2009). Mutaatiot *OTX2*:ssa johtavat silmän ja pään kehitykseen vaikuttaviin muutoksiin aivoissa.



Kuva 2. Silmän eri kerrokset.  
(Mukailtu lähteestä Schubert 2006)



Kuva 3. Silmänpohjan solu ja väliainekerrokset.  
(Kaarniranta ym. 2003)



### **2.2.1 Pigmentaatioon kytkeytyvät verkkokalvon sairaudet**

Mutaatiot *MITF*-geenissä johtavat pigmentaation häiriöihin silmässä ja iholla ja voivat lisäksi aiheuttaa häiriötä silmän kehityksessä ja kuulon menetystä. *MITF*:n on tutkittu olevan yksi Waardenburgin oireyhtymä tyyppi 2:ta (WS2) aiheuttavista geeneistä. WS2:n oireisiin kuuluvat eritasoiset kuulohäiriöt ja silmien, hiusten ja ihon pigmentaatiohäiriöt. (Tassabehji ym. 1994).

Koroideremia on toinen verkkokalvon rappeutumista aiheuttava REP1-proteiinin toiminnan häiriintymisestä johtuva sairaus. REP1 on Rab-kuljetusproteiini, jolla on merkittävä rooli muun muassa melanosomien kuljetuksessa. Koroideremia vaikuttaa RPE:n lisäksi valoreseptoreihin ja suonikalvoon ainakin melanosomien kuljetuksen häiriintymisen kautta. (Futter 2006)

Albinismi johtuu melaniinin vähäisestä tuotannosta iholla, hiuksissa ja silmissä. Melaniinin tuotannon puutteen vuoksi albinismista kärsivillä yksilöillä on hyvin hauras iho, jonka luontainen UV-suojaa on hyvin huono, sekä hyvin vaaleat tai valkoiset hiukset. Myös näkö on heikentynyt vähäisen melaniinin tuotannon vuoksi, mikä jättää verkkokalvon näön kannalta tärkeät kerrokset suojatta auringon UV-säteilyltä. (Oetting & King 1999).

Silmänpohjan ikärappeuma (AMD) on pigmentaatioon kytkeytyvä verkkokalvon ikääntyessä ilmenevä rappeumasairaus. AMD:ssa verkkokalvon pigmenttiepiteelin (RPE) solukerroksia huoltava potentiaali on selvästi heikentynyt, minkä seurauksena silmänpohjaan muodostuu proteiinikertymiä ja verkkokalvolla voi esiintyä uudisverisuonimuodostusta ja siitä johtuvaa verenvuotoa, joka voi pahimmillaan johtaa näön menetykseen. (deJong 2006).

### **2.2.2 Silmänpohjan ikärappeuma**

AMD on tarkan näkemisen alueen eli makulan sairaus. Makula on silmän tarkan näkemisen alue, joka vastaa myös värinäöstä. Solutason muutokset ilmenevät verkkokalvon ulkokerroksessa olevissa valoreseptoreissa, tappi- ja sauvasoluissa, RPE-soluissa, Bruch:n kalvolla ja suonikalvolla (kuva 3) (de Jong 2006). Silmänpohjan muutokset tarkan näke-

misen alueen (fovean) läheisyydessä ovat yleisesti ottaen yleisempiä valkoihoisessa väestössä (Bressler ym. 2008; Chang ym. 2008). Väestötutkimusten tulokset ovat lisäksi osoittaneet, että valkoihoisen ja aasialaisen väestön kohdalla sairauden esiintyvyys on suurin piirtein samaa luokkaa, kun taas mustaihoisessa ja monissa vähemmistöväestöissä sairaus on harvinaisempi (Kawasaki ym. 2010; Vanderbeek ym. 2011). Suomessa ikärappeumaa sairastaa arviolta 100 000 ja maailmassa noin 50 miljoonaa henkilöä (Resnikoff ym. 2004; Gehrs ym. 2006; Kaarniranta ym. 2009).

Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen toiminnalla on keskeinen rooli silmänpohjan ikärappeuman kehittymisessä. RPE-solut tuottavat valoistinsoluille kasvutekijöitä, sekä välittävät happea ja ravintoaineita suonikalvolta (kuva 3). Terve silmänpohja erittää metaboliatuotteet hajotettaviksi RPE-soluihin; ikääntymisen seurauksena RPE-solujen kyky hajottaa metaboliatuotteita heikkenee, mikä johtaa solunsisäisten lipidi-proteiinikertymien, lipofuskiinien, muodostumiseen. Muodostuneet lipofuskiinit erittävät fluoroforeja, kuten A2E-molekyyliä, joka lisää valon vaikutuksesta happiradikaalien määrää RPE-soluissa vähentäen niiden lysosomaalista ja antioksidatiivista aktiivisuutta (Shamsi & Boulton 2001).

Solunsisäisten proteiinikertymien lisäksi taudin kuvaan liittyy solunulkoisten proteiinikertymien (drusenien) muodostuminen RPE-solujen ja Bruchin kalvon väliin (kuva 3) (de Jong 2006; Kaarniranta ym. 2003). Drusenien määrä ja koko korreloivat kostean ikärappeuman kehittymisen todennäköisyyteen. AMD-potilailla on havaittu myös selkeästi enemmän vapaata rautaa silmän verkkokalvolla terveän henkilön verkkokalvoon verrattuna (Hahn ym. 2006). Rauta on tärkeä kofaktori, mutta suurina pitoisuuksina se johtaa vapaiden radikaalien syntyyn ja hapettumisen aiheuttamaan stressiin.

Sairaudesta on kaksi muotoa: kuiva (osuus 80 %) ja kostea (20 %) (Kaarniranta ym. 2003). Kostealle muodolle luonteenomaista on verisuonten uudismuodostus verkkokalvolle sen takaa suonikalvosta, mikä johtaa verkkokalvon turpoamiseen (Kaarniranta ym. 2009). Uusien verisuonten muodostuminen voi aiheuttaa myös verenvuotoa verkkokalvolla. Kostea muoto etenee verisuonten nopean uudismuodostuksen johdosta nopeasti ja hoitamattomana vaurioittaa silmänpohjaa niin, että näkökyky heikkenee pysyvästi. Hoitomuotoja kosteaan muotoon ovat polttolaserhoito, jolla pyritään vähentämään verisuonten uudismuodostusta polttamalla muodostuneet verisuonet laserilla, ja valoaktivaatiohoi-

to, jolla voidaan lieventää oireita, mutta ei parantaa sairautta (Algvere & Seregard 2002). Kuivassa muodossa ei ilmene verisuonten uudismuodostusta, eikä siihen ole tällä hetkellä tehokasta hoitoa. Kuiva muoto ei yleensä oireile, mutta se voi kehittyä kosteaksi muodoksi ajan kuluessa (Noble & Chaudhary 2010). Uusia hoitomuotoja yritetään löytää jatkuvasti, mutta sairauden moninainen patogeneesi tekee siitä vaikeaa.

Tärkeimpiä silmänpohjan ikärappeuman patogeeneisiä tekijöitä ovat geneettinen alttius, hapettumisen aiheuttama kuormitus (Frank ym. 1999; Beatty ym. 2000), tulehdus sekä solunsisäiset ja solunulkoiset proteiinikertymät ja niiden kertymisen aiheuttama tulehdus (Anderson ym. 2002; Gehrs ym. 2006). Geneettisiä riskitekijöitä on alettu kartoittamaan ja ainakin yksi sellainen on löydetty: tulehdusreaktioon osallistuvaa komplementtitekijä H:ta (CFH) ilmentävän geenin polymorfia on löydetty AMD-potilailta (Patel 2008). Sairauden oireita ovat muun muassa keskeisen näköalueen sumentuminen ja tarkkan näön heikentyminen, kuvan vääristyminen ja sokeiden kohtien ilmaantuminen näkökenttään (Jager ym. 2008; Noble & Chaudhary 2010).

### 3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena oli kloonata osa ihmisen MC1R (hMC1R)-säätelyalueesta ja liittää se lusiferaasireportterialueen sisältävään plasmidiin sekä tutkia sen ilmentymiseen vaikuttavia tekijöitä RPE-soluissa. Tärkeimpinä ilmentymisen säätelijöinä pidettiin transkriptiotekijöitä MITF ja OTX2, jotka säätelevät pään ja silmän kehitystä sekä pigmentaatiota. *MC1R*-geenillä on oleellinen rooli melaniinin tuotannossa; silmänpohjan ikärappeumapotilailla RPE:n tuottaman melaniinin määrä on vähentynyt.

Positiivisia hMC1R-Luc-klooneja oli tarkoitus tutkia reportterigeenianalyysien avulla. Tutkimuksissa käytettiin ARPE19-solulinjaa, joka on lähin mahdollinen solulinja RPE-soluihin, sekä retinoblastooma Y79-solulinjaa, joka voi erilaistua fotoreseptorien suuntaan (Chader 1987).

Kokeiden tavoitteena oli 1) kloonata osa ihmisen *MC1R*-geenin säätelyalueesta, sekä selvittää 2) millä säätelytekijöillä on merkittävä vaikutus säätelyalueen toiminnan kannalta, 3) tutkittavien säätelytekijöiden optimaalista määrää säätelyalueen aktiivisuuden kannalta ja 4) miten yksittäisten säätelytekijöiden sitoutumispaikkojen puuttuminen säätelyalueelta vaikuttaa MC1R-säätelyalueen toimintaan.

### 4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

#### 4.1 Sekvenssien haku tietokannoista ja homologiavertailut

Ihmisen melanokortiinireseptorin (hMC1R) nukleotidisekvenssi (NM\_002386) haettiin NCBI:n (engl. The National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) tietokannasta ja geenihaku tehtiin Entrez-ohjelman avulla. Ihmisen MC1R-säätelyalueen (AF263461) sekvenssille tehtiin homologia vertailut hiiren (AF176016), simpanssin (AF387969), naudan (AF445641) ja koiran (AF064455) vastaavien sekvenssien kanssa NCBI:n Blastn- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ja ClustalW- (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) työkalujen avulla.

## 4.2 MC1R-sekvenssin analysointi SNP-tietokannoissa

Ihmisen *MC1R*-geenin säätelyalueelta paikannettiin NCBI:n SNP-tietokannan (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) avulla SNP:t ja joitakin silmän toiminnan ja pigmentaation sekä neuraalisen kehityksen kannalta tärkeiksi luokiteltuja transkriptiotekijöiden sitoutumispaikkoja TESS-tietokannan (<http://www.cbil.upenn.edu/tess/>) avulla. Tärkeitä sitoutumispaikkoja olivat mikroftalmiaan eli pienisilmäisyyteen liittyvän transkriptiotekijän toimintaa tehostava sitoutumispaikka (MITF E-box) (NM\_198159), spesifisyysproteiini-1 (Sp1) (NM\_138473), ortodentikaalinen proteiini-2 (OTX2) (NM\_021728) ja valo-reseptorispesifinen homeobox-perheeseen kuuluva tappi- ja sauvasolujen säätelemä geeni (*CRX*) (NM\_000554) (taulukko 2). MITF säätelee pigmentaatioon osallistuvia geenejä ja melanosyyttien tuotantoa iholla ja lisäksi se säätelee pään ja silmän kehitystä. *Sp1* on monen geenin ilmentymistä alkionkehityksen varhaisessa vaiheessa säätelevä transkriptiotekijä. OTX2 säätelee pigmentaatioon osallistuvia geenejä silmässä ja lisäksi pään ja silmän kehitystä. CRX on 86 % homologinen OTX2:n kanssa (Furukawa ym. 1997).

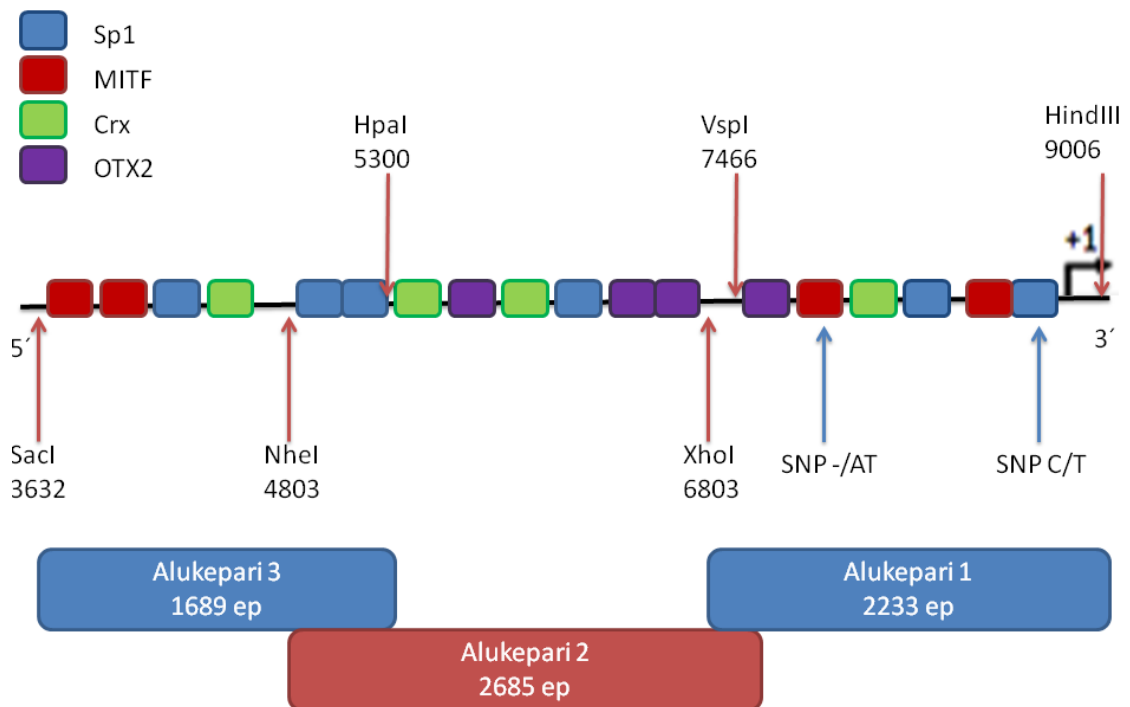
Taulukko 2. Silmän toiminnan, pigmentaation ja neuraalisen kehityksen kannalta tärkeitä *MC1R*-geenin säätelyalueelta löytyviä ihmisen transkriptiotekijöitä. Transkriptiotekijöiden sitoutumissekvenssit on haettu NCBI:n tietokantojen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) avulla.

Transkriptiotekijä	Lyhenne	Tunnusnumero	Sitoutumissekvenssi
Mikroftalmiaan liittyvä transkriptiotekijä	MITF	NM_198159	CANNTG (E-box)
Spesifisyysproteiini-1	Sp1	NM_138473	GGGCGG
Ortodentikaalinen proteiini	OTX2	NM_021728	TAATCC/ TAATCT
Tappi- ja sauvasolujen säätelemä homeobox-perheeseen kuuluva geeni	CRX	NM_000554	GGATTAC/ GTAATTC/ CAATTAA/ CTAAGCT/ CTAATCT

### 4.3 hMC1R-säätelyalueen kloonauk

Noin 6000 ep kattava alue *MC1R*-geenin säätelyalueesta translaation aloituskohdasta ylävirtaan on geneetikkojen mielestä merkittävää aluetta geenin toiminnan säätelyn kannalta (Reinisalon kautta välittyntä julkaisematonta tietoa). Myös promoottorisekvenssistä tehty transkriptiotekijä- ja SNP-analyysi sekä homologiavertailut osoittivat, että 6000 ep on riittävästi kattamaan tärkeimmät säätelyelementit, sillä 6000 ep:n jälkeen ei löytynyt paljon muita kuin Sp1-säätelyelementtejä (liite 1).

Ihmisen genomisesta DNA:sta yritettiin eristää noin 6000 ep:n kokoinen alue *MC1R*:n säätelyalueesta polymeraasiketjureaktion (PCR) avulla. Säätelyalueen monistamiseksi suunniteltiin PCR-alukkeet kolmelle monistettavalle DNA-alueelle, jotka yhdessä kattivat 5374 ep:a ensimmäisestä säätelyalueen transkription aloituskohdasta (+1) (Moro ym. 1999) ylävirtaan (kuva 4).



Kuva 4. Ihmisen *MC1R*-säätelyalueen monistamiseen suunnitellut PCR-alukkeet, sekä säätelyalueelta löytyneet transkriptiotekijöiden sitoutumiskohdat ja restriktioentsyymien katkaisukohdat. Säätelyalue jaettiin kolmeen monistettavaan alueeseen TESS-haussa löytyneiden transkriptiotekijöiden sitoutumiselementtien sijainnin perusteella. Alukkeet suunniteltiin niin, että niistä löytyi restriktioentsyymien paikat pGL3-plasmidiin siirtoa varten. Kuvaan merkitty transkription aloituskohta (+1).

Ihmisen MC1R-säätelyalue eristettiin pKM2L-hMC1R-plasmidista (RDB5515, RIKEN) (<https://database.riken.jp/sw/attribution/cria304u24ria304u944i>) ja liitettiin pGL3-BasicMCS+-plasmidiin (U47295, Promega), joka sisälsi lusiferaasi (Luc)-reportterialueen, ja jolla oli ampicilliiniresistenssi. pGL3-BasicMCS+ -plasmidissa säätelyalueesta leikattujen palasten liittäminen tarkoitettu alue (MCS) on tavallista suurempi ja sisältää enemmän restriktioentsyymien sitoutumispaikkoja. pKM2L-phMC1R- plasmidissa ihmisen istukan soluista eristetystä genomisesta DNA:sta oli PCR-monistettu 1743 bp:n sekvenssi MC1R-säätelyalueesta ja liitetty pKM2L Renilla lusiferaasi-reportterivektoriin (RDB4026), jolla oli kanamysiiniresistenssi.

#### **4.3.1 Polymeraasiketjureaktio**

Ihmisen MC1R-säätelyalueen kloonamiseksi suunniteltiin kuusi PCR-alueparia (ap) (Taulukko 3) OLIGO-ohjelman (Molecular Biology Insights) avulla, ja alukkeet tilattiin Sigmaalta. Alukeparien välisen sulamislämpötilaeron oli oltava alle 2 °C, eikä alukesekvenssi saanut muodostaa voimakkaita sidoksia itsensä tai alukeparinsa kanssa tai epäspesifistä sitoutumista muihin sekvensseihin. Alukkeisiin lisättiin myös suunniteltujen restriktioentsyymien katkaisukohtat siihen päähän aluketta, jossa ei ollut endogeenistä katkaisukohtaa.

Phusion Human Specimen direct PCR-kitin (Finnzymes) alukkeiden ja ohjeen mukaan testattiin PCR-laitteiston (iCycler, Bio-Rad) ja DNA-näytteen toimivuus. DNA-näytteenä käytettiin ihmisen maksasta fenoliuuttomenetelmällä eristettyä genomista DNA:ta. PCR-olosuhteista reaktion denaturaatio-, anniilauksen- ja pidennyslämpötilat ja ajat optimoitiin kullekin alukeparille erikseen. PCR-reaktio tehtiin spesifisiä 25 µM alukkeita (taulukko 3) käyttäen ja Phusion PCR-kitin ohjeen mukaista reaktioseosta soveltaen.

Taulukko 3. OLIGO-ohjelmalla suunnitellut spesifiset PCR-alueparit (ap) hMC1R-säätelyalueen monistamiseen ihmisen genomisesta DNA:sta.

Alukepari	Tuotteen koko (ep)	Tunnusnumero (alukesekvenssin aloituskohta) 5'-pää	Tunnusnumero (alukesekvenssin aloituskohta) 3'-pää
1a	1724	MR0258 (9006) 5'- GGAACAAGCTTGGAGTCG TTGGAGGC -3'	MR0256 (7308) 5'- GGGCTCTCGAGGTGCTGG GATTACAG -3'
1b	1726	MR0258 (9006) 5'- GGAACAAGCTTGGAGTCG TTGGAGGC -3'	MR0257 (7306) 5'- TTGGGCTCGAGAAGTGCT GGGATTAC -3'
1c	2233	MR0264 (8876) 5'- CACCCAAGCTTCTGCCCTC ACACCCTCTC -3'	MR0263 (6672) 5'- CAGCGACTCGAGAATCAC CACTACTCCA -3'
1d	2894	MR0264 (8876) 5'- CACCCAAGCTTCTGCCCT CACACCCTCTC -3'	MR0265 (6011) 5'- GTCCGCTCGGAACGCTGT GTCTGTTGGTC -3'
2	2685	MR0260 (7466) 5'- CACCACTCACAAGCCACC TCCA -3'	MR0259 (4803) 5'- CCAGAGCTAGCATAAACG CAGGAAGA -3'
3	1689	MR0262 (5300) 5'- ATGAGGCCTTTGAGACGG ACG -3'	MR0261 (3632) 5'- ACTCCGAGCTCCACAGAT GTTTTA -3'

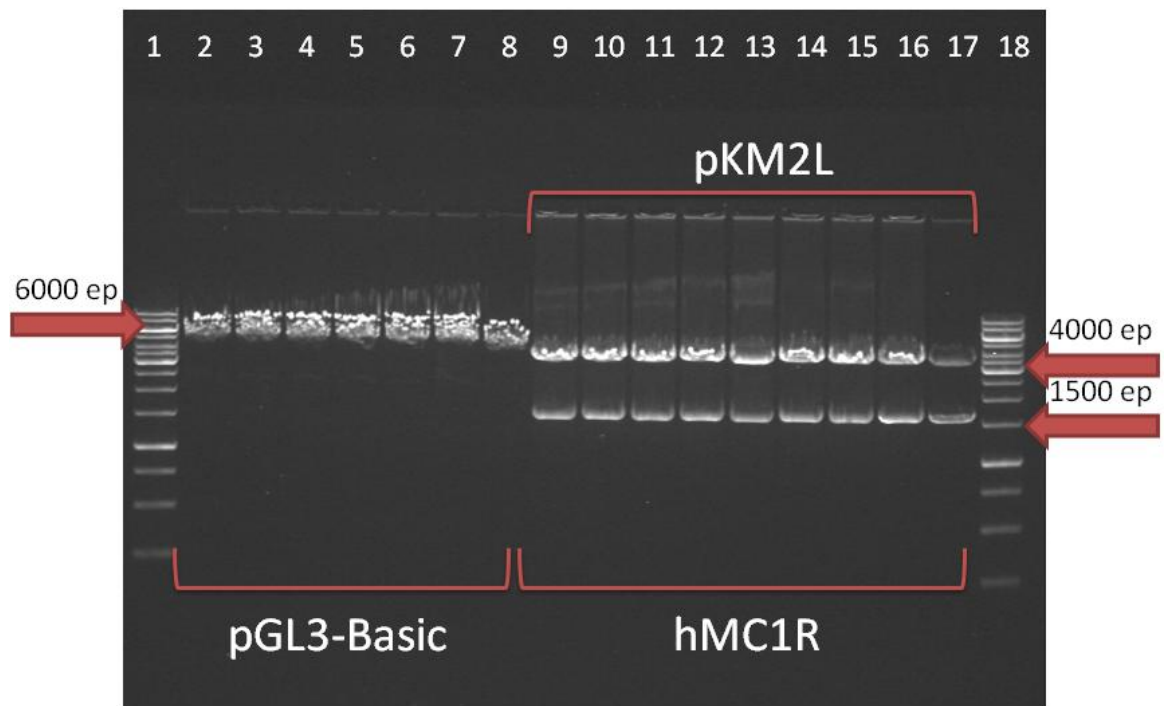
#### 4.3.2 hMC1R-säätelyalueen liittäminen lusiferaasireportteri-plasmidiin

Monistetut PCR-tuotteet eroteltiin 1 % agarosigeelillä 100 V geielektroforeesilla ja oikean kokoiset DNA-vyöhykkeet eristettiin geeliltä fenoliuuton avulla, ja tuotteet leikattiin entsyymeillä, jotka oli suunniteltu kyseessä olevan DNA-alueen (kuva 4) leikkaamiseen. DNA:n pilkkomisen jälkeen tuotteita monistettiin PCR:lla ja ajettiin 1 % agarosigeelille, jolta nähtiin, oliko PCR-monistus onnistunut toivotunlaisesti.



Rikenin pKM2L-phMC1R- plasmidista leikattiin XhoI- ja EcoRI-restriktioentsyymeillä 1789 ep:n kokoinen alue ihmisen MC1R-säätelyalueen 3'-päästä ja liitettiin XhoI-EcoRI-leikattuun pGL3-BasicMCS+-vektoriin (Kuva 5). pKM2L-hMC1R-plasmidia kasvatettiin ohjeen mukaan, ja DNA eristettiin Plasmid Mega-kitin ohjeen mukaan (12183, Qiagen).

pKM2L-hMC1R-plasmidi-DNA:ta ja pGL3-Basic-plasmidi-DNA:ta pilkottiin XhoI- ja EcoRI-restriktioentsyymejä (Fermentas) käyttäen. pGL3-basicMCS+-plasmidista irtosi 4838 ep:n kokoinen fragmentti, kun 49 ep:a leikkaantui XhoI- ja EcoRI-entsyymien välistä (kuva 5). pKM2L-phMC1R-plasmidi leikkaantui 1789 ep:n hMC1R-fragmenttiin ja 4154 ep:n KM2L-fragmenttiin.



Kuva 5. XhoI-EcoRI-pilkotut pGL3-BasicMCS+- ja pKM2L-phMC1R-plasmidit on eroteltu 1 % agarosigeelielektroforeesilla (100 V). Näytepaikka 1: 1 kb DNA ladder (Gene ruler); 2-8: pGL3-BasicMCS+-plasmidista leikkaantunut 4838 ep:n kokoinen fragmentti; 9-17: pKM2L-phMC1R-plasmidista leikkaantuneet 1789 ep:n kokoinen hMC1R-fragmentti ja 4154 ep:n kokoinen KM2L-fragmentti.

XhoI-EcoRI-pilkottu 1789 emäsparin (ep) kokoinen fragmentti hMC1R-säätelyalueesta ja pGL3-BasicMCS+-plasmidista XhoI-EcoRI-leikattu 4838 ep:n kokoinen fragmentti, joka sisälsi lusiferaasireportterialueen, eristettiin geeliltä E.Z.N.A gel extraction-kitin

(D2500-01, Omega) avulla ohjeen mukaan. Geeliltä eristettyä hMC1R-säätelyalueen DNA:ta liitettiin leikattuun pGL3-BasicMCS+-plasmidiin T4 DNA ligaasin (Fermentas) avulla. Ligoitu hMC1R-Luc-konstrukti transformoitiin DH5 $\alpha$ -soluihin, joista eristettiin DNA. Eristetylle DNA:lle tehtiin restriktioentsyymianalyysi käyttäen EheI- ja HindIII-restriktioentsyymejä (Fermentas). Kolme analyysin mukaan positiivista kloonina valittiin jatkotutkimuksiin: sekvensointiin ja käänteistransfektioihin.

#### 4.4 Kvantitatiivinen RT-PCR

Kvantitatiivisen tosiaikaisen polymeraasiketjureaktio (qRT-PCR)-menetelmän avulla tutkittiin, miten MC1R-mRNA ilmeni eri solulinjoissa. Lisäksi tutkittiin endogeenisten transkriptiotekijöiden, OTX2:n ja neljän MITF-variantin (A, D, H ja M) ilmentymistä eri solulinjoissa. MITF-M on spesifinen melanosyyteissä, kun taas muut MITF-variantit vaikuttavat spesifisesti silmässä (Fuse ym. 1996; Bharti ym. 2008).

Ilmentymistä mitattiin qRT-PCR-laitteistolla (ABI Prism 7500, Applied Biosystems) valmistajan ohjeen mukaan. MC1R:n, OTX2:n, MITF-A:n ja MITF-M:n mittauksissa käytetyt yksinkertaiset reaktioseokset sisälsivät 1 $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mixiä (Roche Molecular Systems Inc) ja 1 $\times$  FAM koetinseosta (MC1R: Hs00267168\_s1, OTX2: Hs00222238\_m1, MITF-A: Hs01115553\_m1, MITF-M: Hs00165156\_m1, Applied Biosystems) (taulukko 4). MITF-D:n ja MITF-H:n reaktioseokset sisälsivät 1 $\times$  Power SYBR Green Master Mixiä (Applied Biosystems) ja 100 nM 5'- ja 3'-päiden alukkeita (MITF-D: MR0252-MR0253, MITF-H: MR0254-MR0255, Applied Biosystems) (taulukko 4). Lisäksi qRT-PCR:lla mitattiin  $\beta$ -aktiinin C<sub>T</sub>-arvot, joita käytettiin tutkittujen geenien ilmentymisen normalisoimiseen.  $\beta$ -aktiinin mittauksessa käytetyssä reaktioseoksessa oli 1 $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mixiä (Roche Molecular Systems Inc) ja 1 $\times$  VIC koetinseosta ( $\beta$ -actin: P/N 4326315, Applied Biosystems).

Taulukko 4. Kvantitatiivisella RT-PCR:lla testatut *MC1R*-geeni ja transkriptiotekijät OTX2 ja MITF-variantit. Kokeissa käytettiin Applied Biosystems:n alukkeita.

Testattu geeni	Lyhenne	Alukkeet	Merkkiaine
Melanokortiini-1 reseptori	MC1R	Hs00267168_s1	FAM
Orthodenticle homeobox 2	OTX2	Hs00222238_m1	FAM
Mikroftalmiaan liittyvä transkriptiotekijä A	MITF-A	Hs01115553_m1	FAM
Mikroftalmiaan liittyvä transkriptiotekijä D	MITF-D	MR0252-MR0253	SYBR
Mikroftalmiaan liittyvä transkriptiotekijä H	MITF-H	MR0254-MR0255	SYBR
Mikroftalmiaan liittyvä transkriptiotekijä M	MITF-M	Hs00165156_m1	FAM

MC1R:n ja transkriptiotekijöiden ilmentymistä mitattiin ihmisen verkkokalvon pigmenttiepiteelisolulinja ARPE19- (CRL-2302, ATCC), neuroblastoomasolulinjojen LA1-5s-, SH-EP1- ja SH-SY5Y- (CRL-2266), sekä retinoblastoomasolulinjojen WERI-Rb1- (HTB-169) ja Y79 (HTB-18) komplementaarista DNA (cDNA)-näytteistä. Mittaukset tehtiin kolmena rinnakkaisena 96-kuoppalevyillä, ja testit toistettiin 1-2 kertaa. Solulinjojen cDNA-synteesi tehtiin totaali-RNA:sta ohjeen (Reinisalo ym. 2003) mukaan. RNA oli valmiiksi eristettynä kaikista solulinjoista. Monistusohjelma sisälsi neljä vaihetta FAM-alukkeita (MC1R, OTX2, MITF-A ja MITF-M), sekä VIC-aluketta ( $\beta$ -aktiini) käytettävissä (taulukko 5). PCR-reaktioita inkuboitiin 2 minuuttia 50 °C:ssa ennen alkudenaturaatiota urasiili-DNA glykosylaasin (UNG) kanssa PCR-tuotteiden ja templaatti-DNA:n ristiinsekoittumisen estämiseksi (Tetzner 2009).

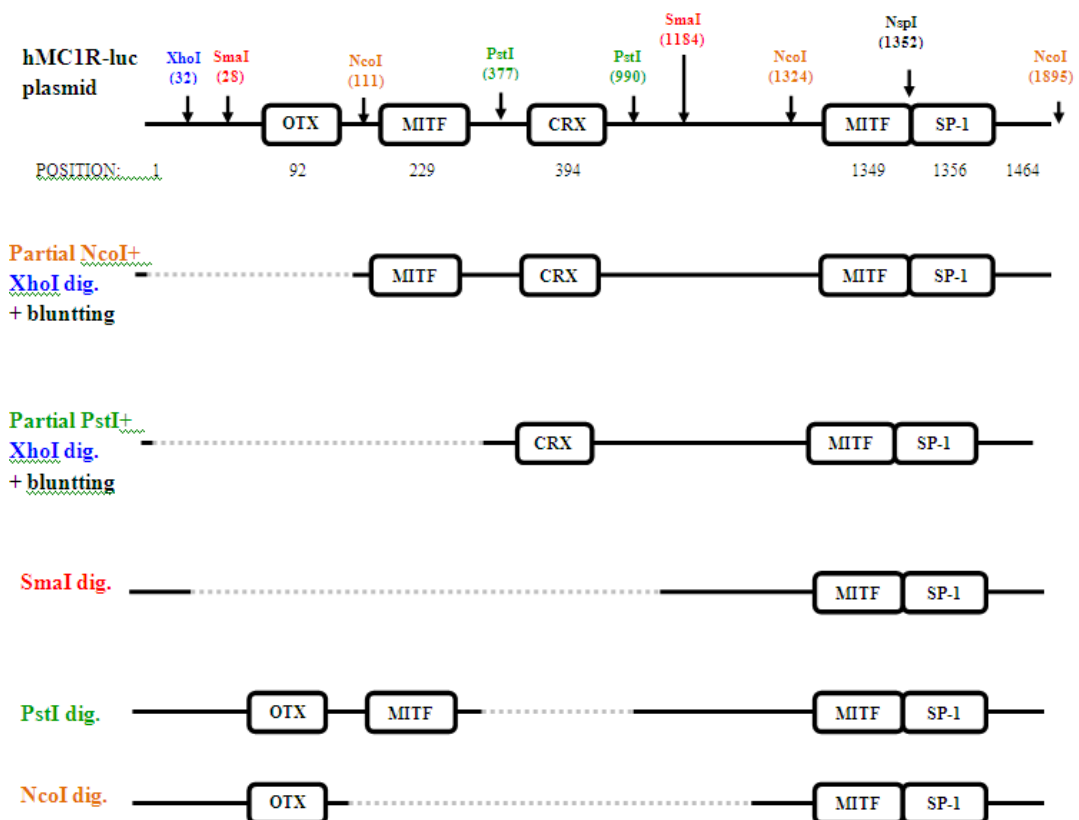
Taulukko 5: Käytetty qRT-PCR-ohjelma.

Monistusvaihe	Lämpötila	Aika
UNG-käsittely	50 °C	2 min
Alkudenaturaatio	95 °C	10 min
DNA-denaturaatio	95 °C	40 x 15 s
Alukkeiden anniilauk ja pidennys	60 °C	40 x 1 min

Mitattujen geenien C<sub>T</sub>-arvot normalisoitiin β-aktiinin C<sub>T</sub>-arvolla; tämä oli tutkittavien geenien normalisointiteknikka. Kuoppalevyiltä saatujen kolmen rinnakkaisen näytteen tuloksista laskettiin keskiarvo. Koska mittaukset oli tehty 1-2 levyllä, lopulliset tulokset saatiin, kun laskettiin normalisoiduista ilmentymisistä keskiarvo; keskiarvoilla laskettiin vielä keskihajonta (SD).

#### 4.5 MC1R-deleetiokonstruktien valmistus

Kloonattuun hMC1R-Luc-konstruktiiin suunniteltiin viisi deleetiota (Kuva 6). Deleetioiden tarkoituksena oli tutkia säätelyaluetta 3'-päädästä alkaen noin 1500 emäsparin laajuudelta, poistaen transkriptiotekijöiden sitoutumiskohtia restriktioentsyymien avulla. Mittaamalla kloonien lusiferaasiaktiivisuuksia käänteistransfektioimenetelmällä, voitiin tutkia yksittäisen transkriptiotekijän tai kahden tekijän yhteisvaikutusta promoottorin toiminnan kannalta.



Kuva 6. hMC1R-Luc-konstruktiiin suunnitellut deleetiot ja suunniteltujen restriktioentsyymien leikkauskohdat. Ylälaidassa on esitetty ihmisen MC1R-säätelyalueen (AF263461) 3'-pää kokonaisena ja siitä löytyvät transkriptiotekijöiden sitoutumispaikat sekä restriktioentsyymien sitoutumiskohdat. Alla on kuvattu hMC1R-säätelyalueeseen suunnitellut deleetiot.

Deleetioista kolme tehtiin yksinkertaisella pilkkomisreaktiolla, ja lisäksi suunniteltiin kaksi osittaista pilkkomisreaktiota. Kaikki pilkkomisreaktiot tehtiin Fermentaksen restriktioentsyymejä (<http://www.fermentas.com>) käyttäen. Osittaisten PstI- ja NcoI-pilkkomisreaktioiden kohdalla DNA:ta pilkottiin ensin XhoI-entsyymillä, ja sen jälkeen PstI- tai NcoI-entsyymillä. Tuotteet eroteltiin 1 % agarosigeelillä (100 V), jolta pilkotut DNA-fragmentit leikattiin ja DNA eristettiin käyttäen Tris-kyllästettyä fenolia.

Plasmidit liitettiin rengasmaisiksi käyttäen itseligaatiota (PstI, SmaI), kohessiivisten päiden ligaatiota (NcoI) ja täyttöligaatiota (osittainen PstI ja -NcoI), jossa digestoidut 3'- ja 5'-päät täytettiin Klenowin fragmenttia käyttäen. Ligaation jälkeen plasmidit transformoitiin kompetentteihin DH5 $\alpha$ -soluihin. Plasmidikloonit tarkistettiin KpnI- ja SacI-restriktioentsyymejä käyttäen. Kolme positiivista kloonia valittiin sekvensointiin ja massakasvatukseen, josta eristettiin DNA jatkotutkimuksia varten.

#### **4.6 Soluviljely**

Tutkimuksessa käytettiin solulinjoja ARPE19 ja Y79. ARPE19-solulinja on ihmisen verkkokalvon pigmenttiepiteelisolulinja, joka kasvaa pohjaan kiinnittyvänä ja Y79 on suspensiona kasvava retinoblastoomasolulinja, jolla on kyky erilaistua fotoreseptorisoluja, neuroneja, gliasoluja ja pigmenttiepiteelisoluja muistuttaviksi soluiksi (Chader 1987). Kasvatusmediumina käytettiin Dulbecco's Modified Eagle's-elatusainetta (DMEM) (31330-038, Invitrogen), johon oli lisätty 100 U/ml penisilliiniä ja 100  $\mu$ g/ml streptomysiiniä (EC B3001D, Euroclone) ja 2mM L-glutamiinia (EC B3000D, Euroclone), sekä 10 % sikiökautisen naudan seerumia (FBS) (10270-106, Invitrogen). Kasvatusolosuhteet oli pidetty optimaalisina solujen kasvun kannalta: lämpötila 37 °C ja hiilidioksidipitoisuus viisi prosenttia. ARPE19-solut jaettiin kerran ja Y79-solut kaksi kertaa viikossa. Solujen jakamisen lisäksi ARPE19-soluille vaihdettiin elatusaine kerran viikossa.

## 4.7 hMC1R-Luc-plasmidien testaus ARPE19- ja Y79-solulinjoissa

MC1R-säätelyalueen sisältävät kloonit testattiin käänteistransfektio menetelmällä ARPE19-soluissa ja Y79-retinoblastoomasoluissa (Reinisalo ym. 2006). Transfektioolosuhteet optimoitiin 96-kuoppalevyllä ARPE19-soluille sopivaksi Huuskon 2011 projektityötä mukailleen (Huusko 2011). DNA-kantaja polyetyleeni-imiinin (PEI), määrä optimoitiin erikseen juuri näille kokeille sopivaksi: optimointi tehtiin ARPE19-soluille, sillä kvantitatiivisen RT-PCR:n tulosten mukaan MC1R:n ilmentyminen oli vähäisempää ARPE19-soluissa (kuva 10).

### 4.7.1 Käänteistransfektio menetelmän periaate

Käänteistransfektio menetelmässä työvaiheiden järjestys on käänteinen verrattuna perinteiseen transfektio menetelmään (Boussif ym. 1995). Toisin sanoen DNA-kantajakompleksi, jolla on positiivinen varaus, kiinnitetään transfektioalustalle ensimmäisenä ja jäädytetään nopeasti, minkä jälkeen alusta kylmäkuivataan jäähdytyslevyjen välissä veden poistamiseksi (Reinisalo ym. 2006). Kantajakompleksi siirretään alustalle vesiliuoksena, mutta pitkään vesiliuoksena ollessaan kompleksissa voi tapahtua hajoamista tai aggregaatiota; kylmäkuivaus pidentää kompleksin säilyvyyttä huomattavasti. Vuorokauden kestävän kylmäkuivauksen jälkeen transfektioalustat säilytetään folioon käärittyinä eksikaattorissa, jossa ne säilyvät kuivina ja käyttökelpoisina useita kuukausia (Reinisalo ym. 2006). Levyjen hyvän säilyvyyden ansiosta solut voidaan lisätä levyille ajankohdasta riippumatta.

Käänteistransfektio menetelmä on osoittautunut perinteistä transfektio menetelmää tehokkaammaksi monilla solulinjoilla, etenkin primäärisoluilla. Suspensiosolujen, kuten WERI-Rb1:n ja Y79:n transfektioissa menetelmä toimii hyvin, koska levyn pohjaan kiinnitetyn ja kuivatun kompleksin positiivinen varaus edesauttaa pinnaltaan negatiivisesti varautuneiden solujen kiinnittymistä kuopan pohjaan. Menetelmä toimii myös elatusaineessa, johon on lisätty seerumia, minkä ansiosta säästytään ylimääräisiltä elatusainenvaihdoilta lisättäessä seerumia sisältävässä elatusaineessa kasvaneita soluja levyille. (Reinisalo ym. 2006).

#### 4.7.2 Transfektiokomplaksien valmistus ja PEI25-optimointi

Yksinkertainen, 50 µl:n DNA-kantajakompleksi sisälsi 0,5 µg tai 1,0 µg DNA:ta 12,5 µl:ssa, 12,5 µl PEI25-kantajaliuosta, sekä 25 µl sakkaroosia. DNA-kantaja, polyetyleniimiini (PEI25, 25 kDa, 40872-7, Sigma-Aldrich) laimennettiin sopivaksi käyttöliuokseksi 0,9 mg/ml kantaliuoksesta: varaussuhde +7: 0,16 mg/ml PEI25; +6: 0,14 mg/ml PEI25; +5: 0,11 mg/ml PEI25; +4: 0,09 mg/ml PEI25; +3: 0,07 mg/ml PEI25; +2: 0,05 mg/ml PEI25. Komplekseja valmistettiin kunkin näytesarjan vaatima määrä; testi tehtiin kolmena rinnakkaisena näytteenä ja toistettiin kolmella levyllä. Kun kompleksit oli saatu levyille, levyt jäähdytettiin heti kuivajään avulla.

Optimointi tehtiin DNA-kantajana toimineelle, kationiselle polymeerille PEI25:lle. PEI25:n varaussuhde optimoitiin levyillä, joille lisättiin kantajaa varaussuhteilla +2 - +7. Komplekseihin lisätty DNA oli pCluc4 plasmidi- DNA:ta, jota lisättiin 0,5 µg tai 1,0 µg 12,5 µl:aan. DNA-kantajakomplekseihin lisättiin 2 % sakkaroosia, ja komplekseja pipetoitiin 96-kuoppalevyille kolmena rinnakkaisena näytteenä kolmelle levyille.

Käänteistransfektio ARPE19-soluihin tehtiin lisäämällä jokaiseen 96-kuoppalevyn kuoppaan, jossa oli kantajakompleksia, noin 200 000 solua, minkä jälkeen levyjen annettiin inkuboitua 48 tuntia 37 °C:ssa 5 % CO<sub>2</sub>:ssa. Inkubaation jälkeen solut hajotettiin lisäämällä lyysipuskuria [25 mM Gly-Gly (Sigma G-7278), 15 mM vedetöntä MgSO<sub>4</sub> (Fluka 63135), 4 mM EGTA (Sigma E-8145), 1 % triton X-100, pH 7.8], johon oli lisätty 1 mM ditiotreitolia (DTT) ja 1 mM fenyylimetyylisulfonyyli fluoridia (PMSF), jotka hajottavat DNA:n muodostamia rikkisiltoja ja estävät proteaasien proteiinia hajottavaa toimintaa. Hajotetut solut säilytettiin -80 °C:ssa.

Transfektiotehokkuus määritettiin mittaamalla levyiltä lusiferaasiaktiivisuudet ja proteiinipitoisuudet aallonpituudella 595 nm. Määrittelyssä käytettiin Victor<sup>2</sup>-1420 monileimalukijaa (Wallac). Lusiferaasimittauksessa 20 µl:aan solulysaattia lisättiin 50 µl lusiferaasireagenssia, ja proteiinimittauksessa 2 µl:aan solulysaattia lisättiin 200 µl proteiinivärijäysliuosta (BioRad Protein Assay Dye Reagent, 500-0006). Lusiferaasiaktiivisuutta verrattiin proteiinipitoisuuteen ja kolme kertaa toistetun kokeen kolmen rinnakkaisen näytteen tuloksista laskettiin keskiarvo. Lopulliset tulokset saatiin, kun näytteiden keskiarvoista laskettiin vielä keskihajonta (SD).

### 4.7.3 Reportterigeenianalyysi

Käänteistransfektioilla testattiin kolme kloonatuista hMC1R-Luc-konstrukteista. Lisäksi menetelmällä testattiin hMC1R-Luc-kloonit, joihin oli tehty deleetioita. Transfektioleveyillä DNA-kantaja PEI25:n varaussuhde oli +4 ja sokeriliuoksena käytettiin 1 % sakka-roosia. Kokonais-DNA:n määrä yksinkertaisessa kompleksissa oli 1,0 µg. Beta-galaktosidaasiaktiivisuuden (β-gal) mittausta varten DNA-kompleksiin lisättiin 0,2 µg pCMV-β-plasmidi-DNA:ta. Käänteistransfektiot Y79-soluihin tehtiin kuten ARPE19-soluille solumäärän ollessa 100 000 solua kuoppaa kohden. Kustakin näytteestä oli kolme rinnakkaista kuoppaa yhtä levyä kohden ja kokeet toistettiin vähintään kahdella levyllä (n ≥ 6).

Hajotetuista soluista mitattiin lusiferaasi- ja beta-galaktosidaasiaktiivisuudet. Lusiferaasiaktiivisuus määritettiin mittaamalla lusiferiinin määrä solulysaatista. β-galaktiivisuus määritettiin mittaamalla orto-nitrofenyyli-β-galaktosidin (ONPG) hajoamisnopeus solulysaatista, johon lisättiin 1x β-gal liuosta (0,1 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.3, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM β-merkaptoetanol, 0,67 mg/ml ONPG). ONPG- levyjä inkuboititiin huoneenlämmössä, kunnes liuos oli muuttunut vaaleankeltaiseksi, minkä jälkeen kuoppiin lisättiin pysäytysliuosta (1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Absorbanssit mitattiin monileimalukijalla, aallonpituudella 405 nm. Lusiferaasiaktiivisuus laskettiin normalisoimalla arvot β-gal-arvoihin ja annettiin plasmidin, jossa ei ollut säätelyaluetta, aktiivisuuden arvoksi 1. Lisäksi rinnakkaisten näytteiden keskiarvoista laskettiin keskihajonta (SD).

### 4.8 hMC1R-Luc-kloonien sekvensointi

Restriktioentsyymianalyysissä kolme hMC1R-Luc-plasmidikloonin osoittautuivat positiivisiksi, joten ne lähetettiin sekvensoitaviksi Yalen yliopiston DNA-analyysipalveluun (<http://dna-analysis.research.yale.edu/>). Sekvensoitaviksi lähetettiin lisäksi 11 positiiviseksi restriktioentsyymianalyysissä osoittautunutta deleetiokloonin (SmaI 2 kpl, PstI 3 kpl, NcoI 3 kpl ja osittainen PstI 3 kpl.). Sekvenssihomologiavertailu tehtiin käyttäen European Bioinformatics institute:n ClustalW- työkalua (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). Sekvenssintalukkeina käytettiin kaupallisia pGL3-Basic-alukkeita (Sigma) (taulukko 6).



Sekvensointia varten DNA:ta tarvittiin 500-550 ng/ 11 µl. Jokaiseen näytteeseen lisättiin joko 5'- tai 3'-päästä sekvensoivaa 4 mM aluketta.

Taulukko 6. pGL3-Basic sekvensointialukkeet.

Aluke	sekvensointisuunta	sekvenssi
tluc-rescueF	5' → 3'	5'- GATAGGTACCGAGCTCTTAC -3'
tluc-rescueR	3' → 5'	5'- GCAGATCTCGAGCCCGGCAC -3'
RVprimer3	5' → 3'	5' CTAGCAAATAGGCTCTCCC -3'
GLprimer2	3' → 5'	5' CTTTATGTTTTTGCGCTTCCA -3'

#### 4.9 Tilastolliset menetelmät

Reportterigeenianalyysillä mitatuista konstrukteista laskettiin keskiarvot ja keskiarvojen keskihajonnat (SD). Tilastolliset testit tehtiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) Excel-tilukossa, sillä testeissä muuttujia oli vain yksi. Tilastollinen merkitsevyys tulkittiin seuraavasti:

$\alpha < 0,05$  (5 %) \*

$\alpha < 0,01$  (1 %) \*\*

$\alpha < 0,001$  (0,1 %) \*\*\*

$\alpha$  kuvaa sattuman todennäköisyyttä.

## 5 TULOKSET

### 5.1 hMC1R-sekvenssin homologiavertailut ja analysointi

Ihmisen MC1R-säätelyalueen sekvenssiä (9045 ep) tutkittiin proteiinin translaation aloituskohdasta ylävirtaan (liite 1). Tarkoituksena oli selvittää homologiaa ihmisen ja muiden lajien (simpanssi, nauta, hiiri ja koira) välillä. Homologia oli selvää ihmisen (AF263461) ja simpanssin (AF387969) välillä säätelyalueen 3'-päässä 1200 – 3650 ep:n alueella ja ennen 5'-pästä katsoen ensimmäistä säätelyalueen transkription aloituskohtaa (+1) 4800 – 9045 ep:n alueella. Ihmisen ja naudan välillä homologia oli suurinta säätelyalueen 3'-päässä 8300 – 9045 ep:n alueella, ihmisen ja hiiren välillä 6600 – 9045 ep:n alueella (kuva 7) ja ihmisen ja koiran välillä 8400 – 9045 ep:n alueella. MC1R-säätelyalueen sekvenssin 5'-pää sisältää myös jonkin verran toistojaksoja.

TESS-tietokannan avulla selvitettiin ihmisen promoottorialueella olevat OTX2-, MITF-A-, Sp1- ja Crx-transkriptiotekijöiden sitoutumispaikat. Lisäksi NCBI:n tietokantojen avulla haettiin SNP:t promoottorialueelta. Sekvenssi sisälsi noin 6000 ep säätelyalueen ensimmäisestä transkription aloituskohdasta (+1) ylävirtaan lukuisia transkriptiotekijöiden sitoutumispaikkoja.

```
HMC1R      TGGTCAACATGGTGAAACCTCATCTCTACAAAAAATACAAAAATAGCCAGGTGTGGTAG 6600
mMC1R      -----GGGAGGTAG 9
                * * :*****

HMC1R      TGGGTGCCGTAGTCCCAGCTAGTTGGGAGGCTGAGGCATAAGTATTGCTTGAATCCAGAA 6660
mMC1R      -GGGTGCCTCATTACACCCAG-TGGCTGCCTGAGGCAGCG----- 48
                ***** * ** .** * ** ** * :* ***** ..

HMC1R      GGTGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGAATGCACCACTACACTCCAGCCTGCGCGACAGAGTGA 6720
mMC1R      -----CAGCCTGAGAGAGAGAG--- 65
                ***** . * . ** ** **

HMC1R      AACTGTCTCAAAATAAATAAATACATAAAAATTATATGTATATATATATATATATATT 6780
mMC1R      -----

HMC1R      TTTTTTTTTTTTGAGACTGTATCTCTGTTTCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGTGATCTCG 6840
mMC1R      -----AAAGGAG----- 72
                * . : ** : *

HMC1R      GCTCACTGCAACCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCAATTCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCT 6900
mMC1R      -----GTTTCAG-----ACAACCCAGG----- 89
                * ** * .                . * . : ***** *

HMC1R      GGGATTATAGGCGTGCGCCACCAGCCTGGCTGATTTTTGTATTTTGTAGTAGAGATGGAG 6960
mMC1R      -----AAAG-----TGATTTTGAAG----- 105
                * : **                ***** : *

HMC1R      TTTCACCATATTACCCAAGCTGGTCTTGAACCTCCTGACCTCATGATCCGCCTGCCTCAGC 7020
mMC1R      -----TGGGCTTG----- 113
                *** ** **
```

HMC1R CTCCCAAAGTGCTGAGATTATAGGGGTGAGCCACTGTGCCCGCAATAATAATTTTTTTT 7080  
mMC1R ---GAGCT-----TTAGGTAGGCCACT----- 133  
\*:\* \*\* \* :.\* \* :\*.\*\*\*\*\*

HMC1R TTTTGAGACAGAGTTTGTCTTGTGCCCAGGCTGGAGTGCAATGGTGCAATCTCGGCT 7140  
mMC1R ---CGGGCAGG---TTCTATTG---AGGTTG---AATG----- 160  
\*.\* \*\* . \* \*\* .\*\*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\*

HMC1R CACGGCAACCTCCGCCTCTCATGTTCAAGCTATTATCCTGACTCAGCTGGGATTACAGGC 7200  
mMC1R -----

HMC1R ACCCACCACCACCTGGCTGATTTTGGTATTTTTTAGTAGAGACGGGTTTCTCCATGTC 7260  
mMC1R -----CCTGAAAGAGATTGGTAAGT----- 180  
\*\*\*\*. :.\* :\*\*\*\*\*. \*

HMC1R GGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAGGTGATCCACCCGCCTTGGGCTCCCAAAGT 7320  
mMC1R -----CACAGG-----GCTTTG----- 193  
\*:\* \*\* \*\* \*\*

HMC1R GCTGGATTA CAGCCCTGAGCCACCATGGCTGACAATAATAAAAAATTTTAAAGCAAAAC 7380  
mMC1R -----

HMC1R TAAAGATTTATAAATTGTAATAATGCGGTTGTAACAAGTATTTACTGTACCAGTAAATATG 7440  
mMC1R -----

HMC1R AAAAAATTAATGTCTCACA CACATC GAGGTGGCTTGTGAGTGGTGTGAGCATTTCATG 7500  
mMC1R -----AACACA AAGGGAGAGGCAAG----- 214  
.\*\*\*\*\*.\*:\*..\*:\*:\*:\*:\*

HMC1R GTCAGAGTTTGGCAGTTGGGCGAGAGACAGGATGGATTTTAACTCGAACATCGCAGACAC 7560  
mMC1R -----

HMC1R AAAACTGAAAACCTGATGCGGTGCCTGCACCGTTGCCTCCTTTCCTGCAGCTGTAAATG 7620  
mMC1R -----ACCCTGTGTGGAG-----TCCAAGCTAGTTTTCCGGTT----- 249  
\*\*\*\*\*: \*\*:\* :\*:. :\*\* : \*\*\*\*\* \*

HMC1R GGACGAGTAATTCATCCCCCTCCCGCTTCCACCCTTACGACAGACGCAGTCTTCAGCA 7680  
mMC1R -----TCTCG----- 254  
\*\* \*\*

HMC1R AGGAAGTGCTGGGAACGCCCTGGAGTGAACCCAGGAAGATGCCTGCAGTGGGTGCCAGGG 7740  
mMC1R -----GTGCTG-----CCT---CTGCCCTTAGAGGCAGCCTG-----GGG 287  
\*\*\*\*\* \*\* \*\*.\*\*\*:\*.\*.\*:\*\*\*\*\* \*\*

HMC1R CCCCTCTCCACCCTCCCTGCTGGCTTCGGGGCCACGCCCGACTGCTGTGAACGGCCTGC 7800  
mMC1R CACTACACATCC-----CTGG----- 303  
\*.\* :\*:\*. :\*\* \*\*\*\*

HMC1R GGAGCACCACGTGCGACGCTGGAGGCGAGAGGTCTGCCTTTGATGTGGCTGTTGGTGCA 7860  
mMC1R -----CACAT-----GCCCATCATGTG----- 320  
\*\*\*.\* \*\*\* :\* \*\*\*\*\*

HMC1R GGGCTGTGGTGCCTTCCGAGCGGAAATGGCGCGCCCGGGGAGGGCGGGAGCAGCG 7920  
mMC1R -----GCACCCTCAGG-----AGGAGGGGC----- 341  
\*\*\*: \*\* \*\*\* .\*\*..\*\*\*\*

HMC1R TCCCGGTGCCCTGTGAGGATGAGCGACGAGATGACTGGAGGGTCCCTGAAGACCTCAC 7980  
mMC1R TCCAGG-----GGATGAGTTAAAGATTAAG-----AGAAAAGCTCCC 379  
\*\*.\* \*\* \*\*\*\*\* \*..\*\*\*\*.\* :\*\*\*.\* \*\*.\*

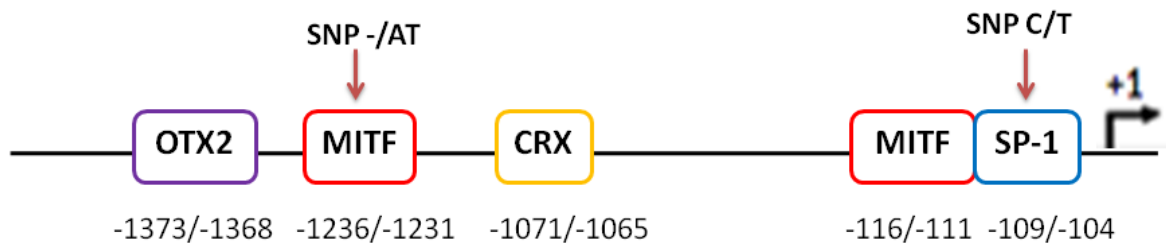
HMC1R TAGGGTGCCCCAGCCGGTCCGCTCCAGGAAGCGACACCCACAGCCCGAGGGCTGCA 8040  
mMC1R TT-----CTTCT-----CCAGAGTCCCG----- 398  
\*:\* \*\* \*:\* \*\*\* \*\* \*\*.

HMC1R GCTGAGGGGGTGCCTACTGGCTGGGCGAGGCTGGGCCCTTGGGGGAGGCGCCAGAGT 8100  
mMC1R -----TCTACCCTGGCTTGGCGAG-----GGAAAGGAACCCAGA-- 431  
\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*..\*\*\*.\*\*\*\*\*

HMC1R GGCCCTCAGGCTCTACAAGATGCCTGAAAACACCAACCTCTCCAGGGCTCACTAGCATTGG 8160  
mMC1R -----



Tärkeimpänä alueena tutkimuksen kannalta pidettiin noin 1400 ep kattavaa aluetta ensimmäisestä transkription aloituskohdasta ylävirtaan. Alueelta löytyi useita Sp1-sitoutumispaikkoja, joista tärkeimpänä pidettiin aivan MTF-sitoutumiskohdan (-116/-111) viereen sijoittuvaa Sp1-sitoutumispaikkaa (-109/-104), sekä kaksi MTF-sitoutumispaikkaa (-116/-111, -1236/-1231), yksi OTX2-sitoutumispaikka (-1373/-1368), sekä yksi Crx-sitoutumispaikka (-1071/-1065) (Kuva 8). Nämä merkittävimmiksi oletetut sitoutumispaikat löytyivät myös muiden lajien, muun muassa hiiren (kuva 7) säätelyalueelta. Lisäksi alueelta löytyi kaksi merkittävää yksittäisen nukleotidin polymorfiaa, joista toinen (CCGCCC → CCGCTC) sijaitsee proksimaalisen MTF:n vieressä olevan Sp1-sitoutumispaikan (-109/-104) keskellä ja toinen (CACATG → CAC—G) distaalisen MTF:n (-1236/-1231) keskellä (kuva 8).

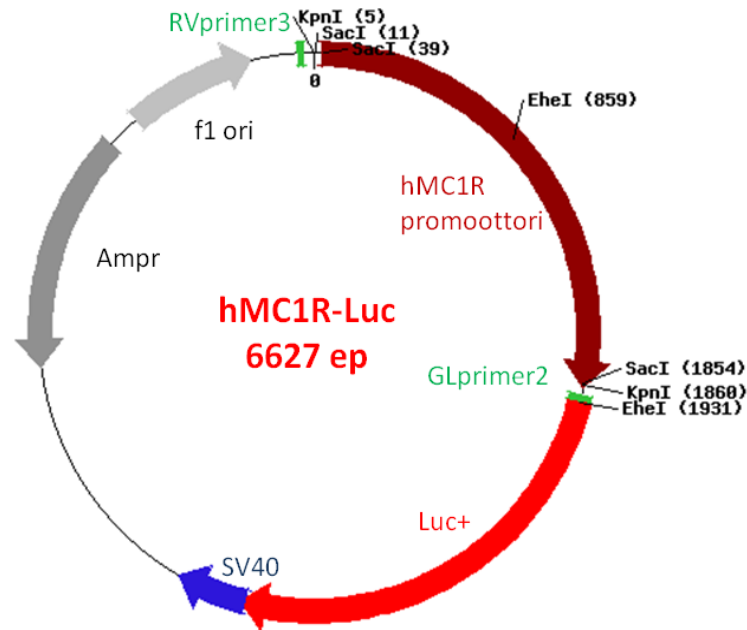


Kuva 8. hMC1R-sekvenssin alkupäästä 1400 ep:n alueelta löytyneet merkittävät transkriptiotekijät ja niiden ryhmittäminen.

## 5.2 hMC1R-säätelyalueen kloonauk

Yksi ensimmäiselle säätelyalueesta monistettavalle jaksolle suunnitelluista PCR-aluepareista toimi toivotusti. 2233 ep:n kokoinen alue hMC1R-säätelyalueen 3'-päästä monistettiin PCR-reaktiolla ihmisen maksasta eristetystä genomisesta DNA:sta sekvenssispesifisellä alueparilla 1c (taulukko 3). Kun PCR-tuote pilkottiin ja tuotetta yritettiin monistaa uudelleen PCR:lla, ei saatu oikeaa PCR-tuotetta.

Ihmisen MC1R-säätelyalueen kloonauk onnistui eristämällä hMC1R-säätelyalue kaupallisesta pKM2L-phMC1R-plasmidista ja liittämällä se pGL3-BasicMCS+-plasmidiin (kuva 9). Kolme hMC1R-Luc kloonaa todettiin positiivisiksi restriktioentsyymianalyysin avulla, ja niistä lähetettiin DNA-näyte sekvensointiin. Lisäksi klooneja testattiin käänteistransfektio menetelmällä.



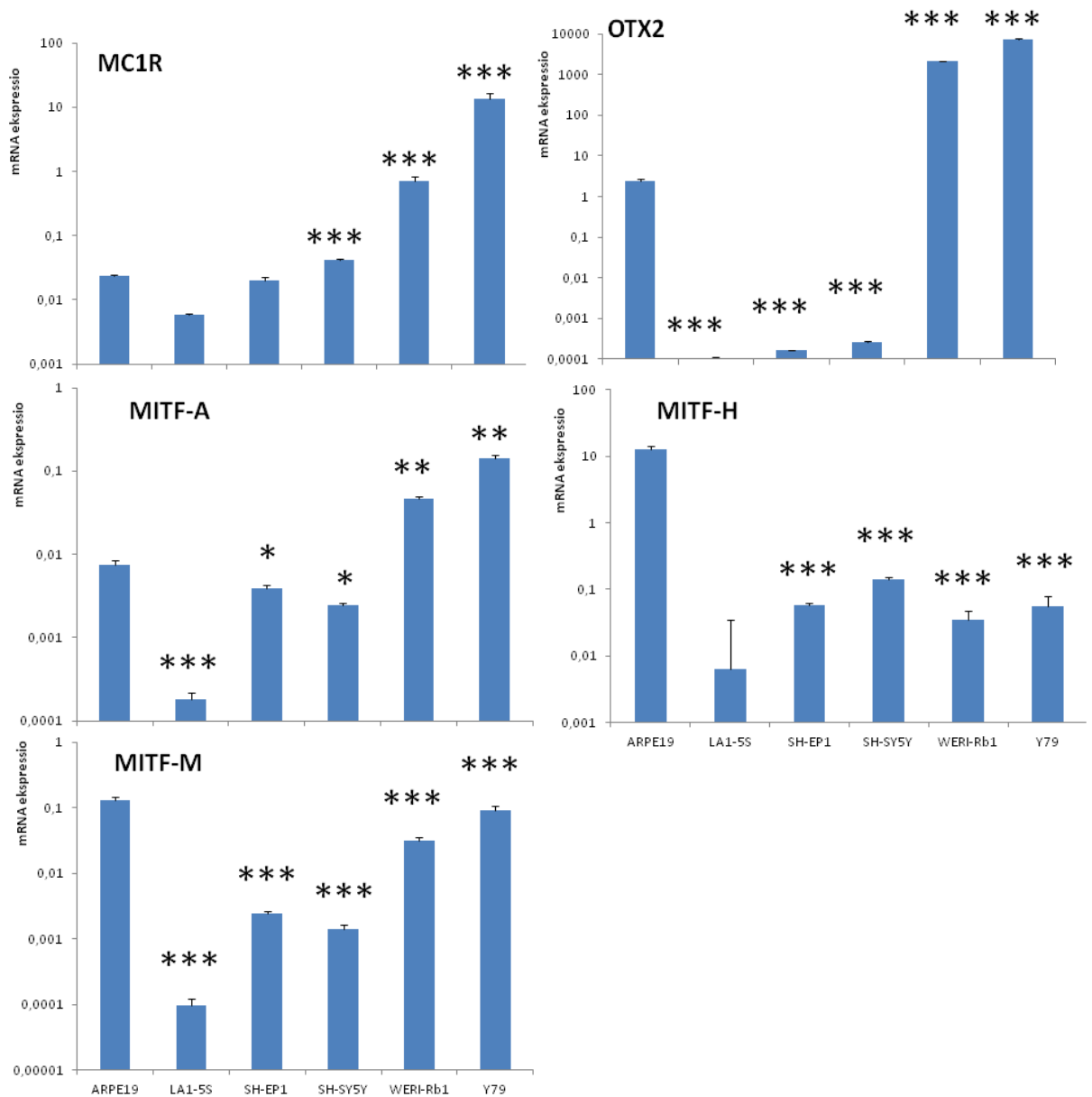
Kuva 9. Kloonattu hMC1R-Luc-konstrukti. Tutkimuksessa käytettyjen restriktioentsyymien leikkauskohdat on merkitty viivoilla ja plasmidista löytyviä, tarkoitukseltaan toisistaan eroavia alueita on havainnollistettu eri väreillä.

### 5.3 MC1R-mRNA:n ilmentyminen solulinjoissa

MC1R:n ja OTX2:n sekä MITF-varianttien mRNA:n ilmentymistä mitattiin ARPE19-, LA1-5s-, SH-EP1-, SH-SY5Y-, WERI-Rb1- ja Y79-solulinjoissa kymmenen päivän kasvatuksen jälkeen kvantitatiivisella RT-PCR-menetelmällä. Tuloksissa näkyi selviä eroja eri solulinjojen välisissä MC1R-mRNA:n määrissä (kuva 10). Ilmeneminen oli selkeästi vahvinta Y79-soluissa. ARPE19-soluissa MC1R:n ilmeneminen oli havaittavalla tasolla, mistä pääteltiin sen soveltuvan hyvin käänteistransfektiomittauksiin.

Endogeenisilla OTX2:n ja MITF-A:n aktiivisuuksilla oli olennainen rooli myöhemmissä kokeissa. Molempien transkriptiotekijöiden ilmentyminen eri solulinjoissa oli samantyylistä MC1R-mRNA:n kanssa (kuva 10). ARPE19-soluissa oli mitattava määrä MITF:n ja OTX2:n mRNA:ta ja Y79-solut ilmensivät transkriptiotekijöitä voimakkaasti, kuten myös WERI-Rb1-solut, joissa tasot olivat kuitenkin hieman alhaisempia.

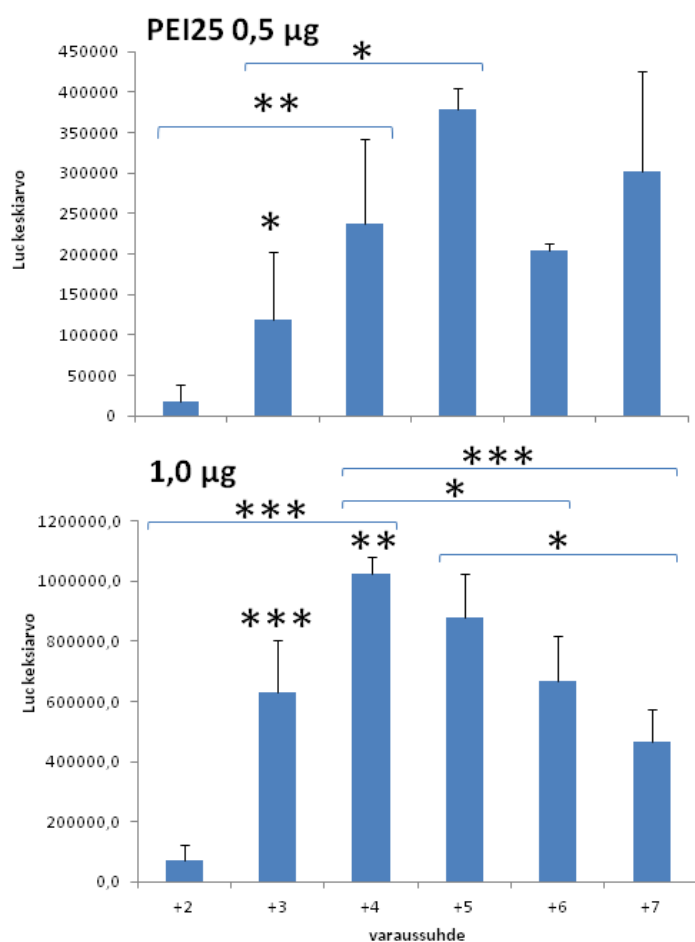
MITF-varianteista MITF-H:n ilmentyminen ARPE19-solulinjassa oli selvästi voimakkaampaa kuin muiden MITF-varianttien (kuva 10). MITF-D-variantin lähetti-RNA:ta ei ilmentynyt juuri ollenkaan missään solulinjassa kymmenen päivän kasvatuksen jälkeen.



Kuva 10. MC1R-, OTX2-, MITF-A, MITF-H- ja MITF-M-mRNA:n ilmeneminen solulinjoissa kymmenen päivän kasvatuksen jälkeen. mRNA:n ilmentymisen keskiarvo laskettiin  $\beta$ -aktiinin  $C_T$ -arvon avulla normalisoiduista  $C_T$ -arvoista ja keskiarvon avulla laskettiin keskihajonta (SD). Tilastollinen merkitsevyys on ilmoitettu verrattaessa vastaaviin tuloksiin ARPE19-solulinjassa: \*  $\alpha < 5\%$ ; \*\*  $\alpha < 1\%$ ; \*\*\*  $\alpha < 0,1\%$ . n = 3-6.

## 5.4 Transfektio-olosuhteiden optimointi

PEI25:n sopiva varaussuhde optimoitiin ARPE19-soluille käänteistransfektio menetelmällä. Varaussuhde +4 oli optimaalisin kyseiselle solulinjalle (kuva 11). Optimoinnissa oli testattu kahta eri DNA-määrää: 0,5 µg ja 1,0 µg, joista 0,5 µg:n DNA-määrä johti suurempaan lusiferaasiaktiivisuuteen 1 mg DNA:ta kohden. Käänteistransfektioissa päädyttiin käyttämään suurempaa DNA-määrää, sillä tulokset olivat johdonmukaisempia ja luotettavampia, kun DNA-määrä oli 1,0 µg. Lisäksi jatkossa oli tarkoitus tehdä transfektioita useammalla plasmidilla samanaikaisesti, jolloin yksittäisten plasmidien määrät jäisivät pieniksi.



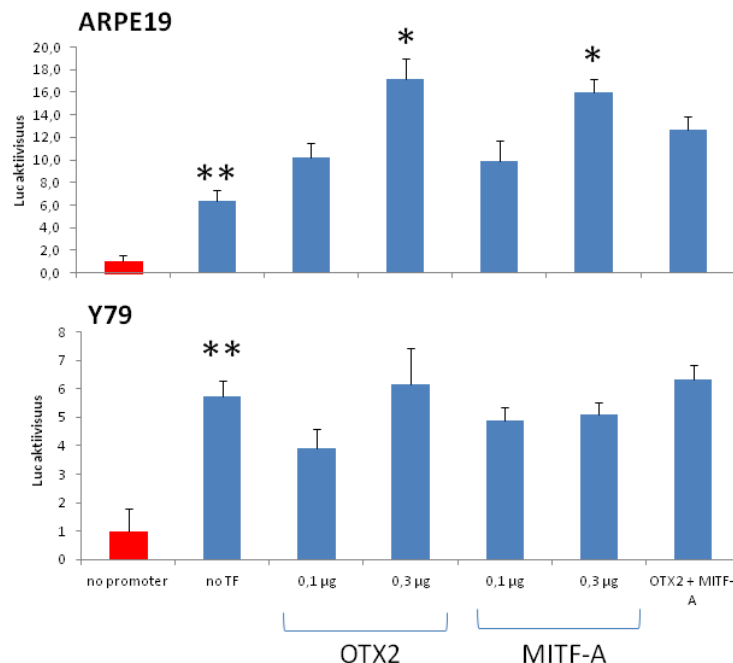
Kuva 11: PEI25-kantajan optimointi ARPE19-solulinjalle. Lusiferaasiaktiivisuuden keskiarvo on ilmoitettu 1 mg proteiinia kohden PEI25-varaussyhteillä +2, +3, +4, +5, +6 ja +7. DNA:n määrä näytteissä oli 0,5 µg - 1,0 µg. Kolme kertaa toistetun kokeen kolmen rinnakkaisen näytteen tuloksista laskettiin keskiarvot, joista laskettiin vielä keskihajonta (SD). Tilastollinen merkitsevyys edelliseen varaussyhteeseen verrattuna on merkitty tähdillä ja hakasuluilla merkittynä niiden osoittamien kahden varaussyhteen välillä: \*  $\alpha < 5\%$ ; \*\*  $\alpha < 1\%$ ; \*\*\*  $\alpha < 0,1\%$ .  $n = 9$ .



## 5.5 OTX2:n ja MITF-A:n vaikutus hMC1R-Luc-konstruktiin

Käänteistransfektiomenetelmällä tutkittiin transkriptiotekijöiden MITF-A ja OTX2 vaikutusta hMC1R-Luc:n ilmentymiseen ARPE19- ja Y79-soluissa, kun transkriptiotekijöitä lisättiin 0,1 - 0,3 µg/ 1,0 µg DNA:ta ja kun molempia testattiin yhdessä pitoisuudella 0,1 + 0,1 µg/ 1,0 µg DNA:ta. Lisäksi haluttiin selvittää OTX2:n ja MITF-A:n optimaaliset määrät hMC1R-säätelyalueen aktiivisuuden kannalta.

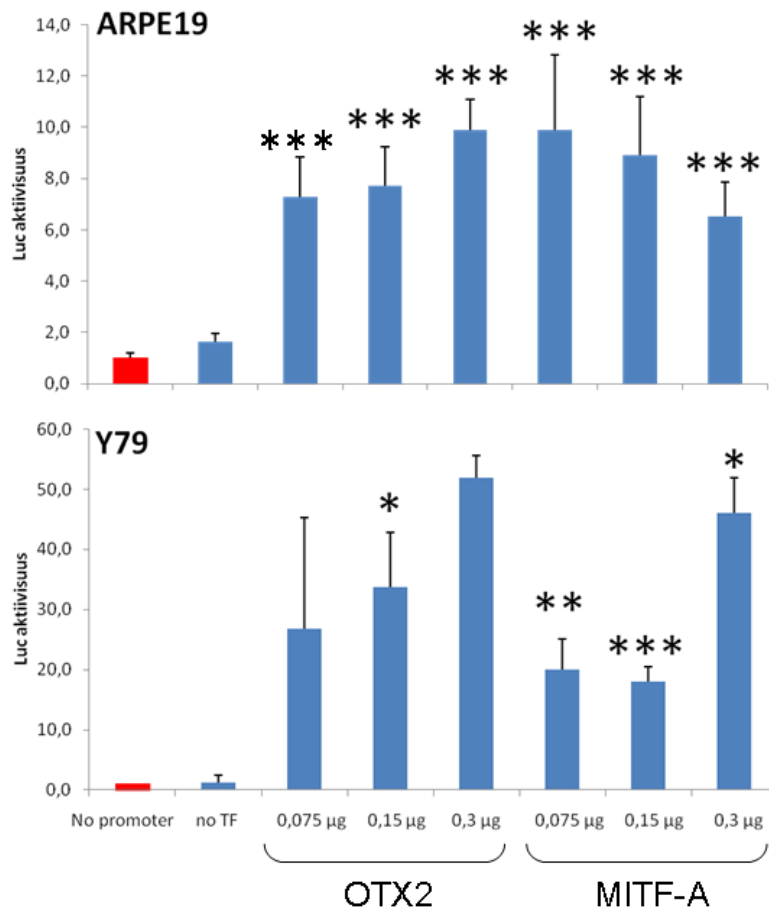
Tulokset osoittivat, että lisättäessä OTX2:n tai MITF-A:n määrää hMC1R-Luc-DNA-seoksessa, voitiin havaita annosvaste lusiferaasiaktiivisuudessa ARPE19-soluissa (kuva 12). Y79-soluissa transkriptiotekijöiden lisäys jopa laski hieman aktiivisuutta. OTX2:n lisäys aiheutti pienen aktiivisuuden nousun suuremmalla pitoisuudella, MITF:n lisäys ei. MITF-A:n ja OTX2:n samanaikainen lisäys ARPE19-soluissa ei nostanut lusiferaasiaktiivisuuden annosvastetta yhtä paljon kuin suurin yksittäisen transkriptiotekijän lisäys ARPE19-soluissa.



Kuva 12. Ihmisen MC1R-Luc:n ilmentyminen lisättäessä transkriptiotekijöitä OTX2:ta ja MITF-A:ta. Transkriptiotekijät kykenevät aktivoimaan hMC1R-promoottorin ARPE19-soluissa. Lusiferaasiaktiivisuus on laskettu normalisoimalla arvot  $\beta$ -gal-arvoihin ja annettu plasmidin, jossa ei ole säätelyaluetta, aktiivisuuden arvoksi 1. Hajonta (SD) on laskettu normalisoitujen arvojen keskiarvoista. Tilastollinen merkitsevyys on laskettu vertaamalla säätelyalueen sisältävää konstruktia tyhjiin plasmidiin. Lisättyä transkriptiotekijää sisältäviä konstruktia on verrattu säätelyalueen sisältävään konstruktiin, johon ei ole lisätty transkriptiotekijää: \*  $\alpha < 5\%$ ; \*\*  $\alpha < 1\%$ ; \*\*\*  $\alpha < 0,1\%$ . n = 6-9.

OTX2:n ja MITF-A:n optimaaliset määrät hMC1R-säätelyalueen aktivoimiseksi määritettiin käänteistransfektioimenetelmän avulla. Mittaustulokset eivät olleet aivan yhtäpitäviä aiemmin saatujen tulosten kanssa (kuva 12). hMC1R-Luc:n, johon ei oltu lisätty transkriptiotekijöitä, lusiferaasitasot jäivät tyhjän pGL3-Basic-plasmidin tasoja alhaisemmiksi (kuva 13), kun ne aiemmin olivat olleet noin kuusinkertaisia (kuva 12).

Tämän kokeen tuloksista voitiin päätellä, että hMC1R-säätelyalueen aktiivisuuden kannalta optimaalisin lisätyn OTX2:n pitoisuus testatuista määristä oli 0,3 µg 1,0 µg:n DNA-seoksessa (kuva 13). OTX2:n kohdalla tulokset olivat samansuuntaisia molempien solulinjojen kohdalla, kun taas MITF-A:n kohdalla tulokset olivat päinvastaiset, mikä johtuu todennäköisesti Y79-solulinjan suuresta endogeenisen MITF-A:n määrästä.



Kuva 13. OTX2- ja MITF-A-transkriptiotekijöiden optimaalisen pitoisuuden määrittäminen hMC1R-Luc-konstruktissa. Lusiferaasiaktiivisuus on laskettu normalisoimalla arvot  $\beta$ -gal-arvoihin ja plasmidin, jossa ei ole säätelyaluetta, aktiivisuuden arvoksi on annettu 1. Lisäksi rinnakkaisten näytteiden keskiarvoista on laskettu keskihajonta (SD). Tilastollinen merkittävyys on laskettu verrattuna konstruktiin, johon ei ole lisätty transkriptiotekijää: \*  $\alpha < 5\%$ ; \*\*  $\alpha < 1\%$ ; \*\*\*  $\alpha < 0,1\%$ . n = 3-9.

Sekvensointiin oli lähetetty kolme hMC1R-Luc kloonina, jotka oli restriktioentsyymianaalysillä todettu positiivisiksi. Sekvensointitulokset varmisti, että kaikki kolme kloonina olivat sekvenssiltään oikeita (liite 2).

### 5.5.1 MC1R-säätelyalueen toiminta

Deleetiokloonit testattiin käänteistransfektiomenetelmällä ARPE19- ja Y79-soluissa. Kaikista deleetioista oli näytesarja, jossa ensimmäinen näyte oli deleetion sisältävä hMC1R-Luc-konstruktio ilman lisättyjä transkriptiotekijöitä, toiseen näytteeseen oli lisätty 0,3 µg OTX2 transkriptiotekijää ja kolmanteen näytteeseen 0,3 µg MITF-A-transkriptiotekijää. Käänteistransfektiomenetelmällä haluttiin tutkia, mitä vaikutusta on tietyn transkriptiotekijän sitoutumispaikan puuttumisella hMC1R-säätelyalueen ilmentymiseen.

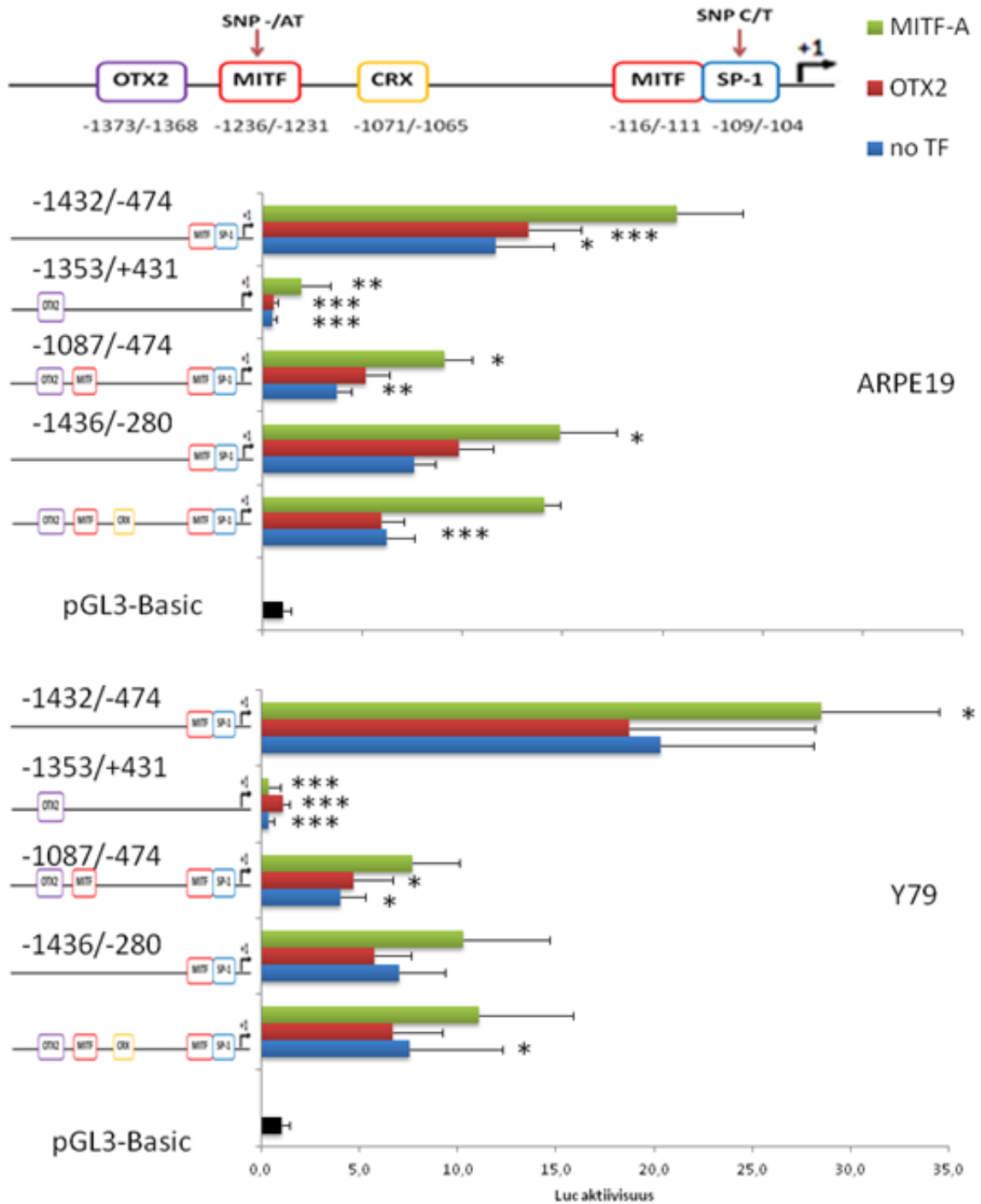
Sekvensointiin oli lähetetty 11 hMC1R-Luc kloonina, joille oli tehty SmaI-, PstI-, NcoI- tai osittainen PstI-deleetio. Kaikki SmaI- ja PstI-deleetioklooneista olivat sekvensointitulosten mukaan oikeita (liite 3). NcoI- ja osittainen PstI-deleetio eivät onnistuneet toivotunlaisesti.

Käänteistransfektiotulokset deleetioklooneilla eivät olleet lusiferaasiaktiivisuuksiltaan yhtä onnistuneita Y79-soluilla, kuin ARPE19-soluilla, joissa lusiferaasi- ja β-gal- arvot olivat huomattavasti suurempia (kuva 14). Y79-soluissa lusiferaasi- ja β-gal-aktiivisuudet olivat hyvin matalia, mistä seurasi, että tulosten luotettavuus kärsi huomattavasti.

Sekvensointitulosten mukaan SmaI-deleetio (-1436/-280) oli onnistunut. Lusiferaasiaktiivisuuksien mukaan deleetio ei ole ainakaan vähentänyt säätelyalueen aktiivisuutta (kuva 14), mikä viittaa siihen, ettei distaalisen MITF-, OTX2- ja Crx-sitoutumispaikkojen menetyksellä ole suurta vaikutusta säätelyalueen toimintaan. Osittaisen PstI-deleetion (-1432/-474) seurauksena myös Crx-sitoutumispaikka on hävinnyt, minkä vuoksi rakenne muistuttaa SmaI-deleetiota ja samankaltaiset tulokset viittaavat edellä mainittuun päätelmään.

Myös PstI-deleetio (-1087/-474) oli sekvensointituloksen mukaan onnistunut. PstI-digestion seurauksena säätelyalueelta oli leikkautunut Crx-sitoutumispaikka, mikä ei vaikuttanut merkittävästi säätelyalueen aktiivisuuteen (kuva 14).

Tarkasteltaessa ARPE19-solulinjalla saatuja reportterigeenianalyysin sekä sekvensoinnin tuloksia, voitiin huomata, että NcoI-deleetion (-1353/+431) seurauksena säätelyalueen transkription aloituskohta (+1) oli hävinnyt, minkä seurauksena säätelyalueen aktiivisuutta ei ollut ollenkaan verrattaessa perustasoon (kuva 14)



Kuva 14. hMC1R-säätelyalueen deleetioiden testaus ARPE19- ja Y79-soluissa. Deleetiokonstrukteihin on lisätty 0,3  $\mu$ g transkriptiotekijää OTX2 tai MITF. Lusiferaasiaktiivisuus on laskettu normalisoimalla arvot  $\beta$ -gal-arvoihin ja plasmidin, jossa ole säätelyaluetta, aktiivisuuden arvoksi on annettu 1. Lisäksi rinnakkaisten näytteiden keskiarvoista on laskettu keskihajonta (SD). Tilastollinen merkitsevyys on laskettu säätelyalueen sisältävälle konstruktille, johon on tehty deleetio, verrattuna konstruktiin, johon ei ole tehty deleetiota ja vastaavaasti konstrukteille, joihin on lisätty transkriptiotekijää OTX2 tai MITF-A: \*  $\alpha < 5$  %; \*\*  $\alpha < 1$  %; \*\*\*  $\alpha < 0,1$  %. Konstruktiota, jossa ei ole deleetiota, on verrattu pGL3-Basic-plasmidiin, johon ei ole liitetty hMC1R-säätelyaluetta. ARPE19: n = 12-27. Y79: n = 6-9.

## 6 POHDINTA

Tämän työn tarkoituksena oli tutkia ihmisen *MC1R*-geenin säätelyaluetta. Säätelyalueen sekvenssi analysoitiin saatavilla olevien transkriptiotekijä- ja SNP-tietokantojen avulla. Tavoitteena oli kloonata *MC1R*-geenin säätelyalue, ja tutkia geenin toimintaan vaikuttavia tekijöitä verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluissa. Lisäksi saatuja tuloksia vertailtiin vastaaviin retinoblastoomasolulinjalla saatuihin tuloksiin. Kvantitatiivisella RT-PCR:lla tutkittiin *MC1R*:n, sekä transkriptiotekijöiden *OTX2*, *MITF-A*, *-D*, *-H* ja *-M* ilmentymistä mRNA-tasolla kuudessa eri solulinjassa. Näiden tulosten perusteella valittiin kaksi sopivinta solulinjaa jatkotutkimuksiin, joissa tutkittiin reportterigeenianalyysillä *OTX2*- ja *MITF-A*-transkriptiotekijöiden eri määrien vaikutusta h*MC1R*-säätelyalueen ilmentymiseen. Lisäksi määritettiin h*MC1R*-säätelyalueen ilmentymisen kannalta optimaaliset *OTX2*- ja *MITF-A*-pitoisuudet reportterigeenianalyysin avulla. Säätelyalueelle tehtiin deleetioita tärkeinä pidettyjen transkriptiotekijöiden sitoutumispaikkojen kohdalle ja tutkittiin transkriptiotekijöiden sitoutumispaikkojen puuttumisen vaikutusta säätelyalueen aktiivisuuteen.

Ihmisen *MC1R*-säätelyalueelta paikannettiin transkriptiotekijöiden *MITF*-, *OTX2*-, *Sp1*- ja *Crx*-sitoutumispaikat NCBI:n SNP-tietokannan ja TESS-tietokannan avulla. Lisäksi ihmisen sekvenssille tehtiin homologiavertailu simpanssin, naudan, hiiren ja koiran sekvenssien kanssa NCBI:n BLASTN- ja ClustalW-työkalujen avulla. Homologiavertailujen tuloksista voitiin päätellä, että säätelyalueen 3'-pään sekvenssi ennen 5'-päästä katsottuna ensimmäistä transkription aloituskohtaa on tärkeintä aluetta geenin toiminnan säätelyn kannalta. Homologiavertailu osoitti myös, että kaikkien vertailussa olleiden lajien kesken säätelyalueen sekvenssin 5'-pää on hyvin vaihtelevaa kauttaaltaan, eikä homologiaa löydy juuri ollenkaan tältä alueelta. 5'-pään sekvenssi sisälsi myös jonkin verran toistojaksoja. 5'-pään sekvenssiä ei tästä syystä pidetty tärkeänä alueena geenin säätelyn kannalta. Tehty analyysi puolsi Moron ryhmän aiemmin, sekvensoimalla tekemää karakterisointia h*MC1R*-sekvenssistä (Moro ym. 1999). Myös homologiavertailun tulos ihmisen ja hiiren sekvenssien välillä oli aiemmin saatua tulosta vastaava (Aoki & Moro 2002).

Homologiavertailu yleisimmän koe-eläinmallin, hiiren sekvenssin kanssa osoitti, että sekvenssien välillä ei ollut juurikaan homologiaa alueella, jolta löytyi paljon geenin sää-

telyn kannalta tärkeinä pidettyjen transkriptiotekijöiden sitoutumiskohtia. Tämä osoittaa, että ihmisen geeni, jota tutkitaan hiirimallilla, ei välttämättä käyttäydy eläinmallissa samalla tavalla, kuin ihmisessä. Tästä syystä tutkimuksessa tulisi käyttää ihmiseltä peräisin olevaa RPE-solumallia ja ihmisen MC1R-säätelyaluetta.

Ihmisen MC1R-säätelyalueen kloonauksen ongelmakohtia olivat oikeiden restriktioentsyymien löytäminen ja mahdollisesti juuri edellä mainitusta syystä johtunut ligaation onnistuminen. hMC1R-säätelyalueen sisältävää plasmidia ja pGL3-Basic:a ehdittiin leikata kolmella eri entsyymiyhdistelmällä, ennen kuin oikea löytyi. XhoI-EcoRI-digestiolla saatiin plasmideista leikattua oikean kokoiset palat ja leikkauskohdat onnistuttiin liittämään takaisin yhteen.

Kvantitatiivisella RT-PCR-menetelmällä mitattiin MC1R:n ja eri säätelytekijöiden mRNA:n ilmentymistä kuudessa eri solulinjassa, joista Y79-soluissa mRNA:n ilmentyminen oli selkeästi voimakkainta MC1R:n ja kaikkien muiden säätelytekijöiden, paitsi MITF-H:n, kohdalla. MITF-D:n mRNA:ta ei ilmentynyt millään solulinjalla 10 päivän kasvatuksen jälkeen. Tulos on verrattavissa aikaisemmin RPE-soluista saatuihin tuloksiin (Reinisalo ym. 2012), joiden mukaan MITF-D:n mRNA:ta alkaa ilmentyä vasta 14 päivän kasvatuksen jälkeen.

Käänteistransfektioiden kannalta optimaalinen PEI25-DNA-kantajan määrä ja varaussuhde selvitettiin reportterigeenianalyysillä ARPE19-soluille, joilla testattiin DNA-määrät 0,5 µg ja 1,0 µg, sekä varaussuhteet +2 - +7. Optimoinnin perusteella käänteistransfektiolevyillä päätettiin käyttää DNA-määrää 1,0 µg ja varaussuhdetta +4. Kun tulosten merkitsevyyksiä analysoitiin, kävi ilmi, että varaussuhde +5 olisi ehkä ollut parempi, sillä varaussuhteiden +4 ja +5 välillä ei ollut merkitsevää eroa ja varaussuhde +5 on yleisesti käytetty varaussuhde kyseisellä solulinjalla.

Kloonatun hMC1R-Luc-konstruktin aktiivisuutta testattiin reportterigeenianalyysien käänteistransfektioimenetelmällä lisäämällä DNA-seokseen 0,1 – 0,3 µg säätelytekijöitä OTX2 tai MITF-A. Käänteistransfektioita tehtiin ARPE19- ja Y79-soluihin, joista mitattiin lusiferaasi- ja β-gal-aktiivisuudet. Lusiferaasi- ja β-gal-aktiivisuusmittausten tulokset viittasivat siihen, etteivät solut olleet transfektoituneet kunnolla, sillä arvot olivat ainakin yhdessä kolmesta toistetusta mittauksesta hyvin alhaiset. Tämä voi myös olla seurausta

transkriptiotekijöiden esteellisestä soluun pääsystä toiminnallisina. Tulosten perusteella arveltiin, ettei käytetty PEI25-varaussuhde ollut sittenkään oikea. Lisäksi Y79-solut transfektoituivat huonosti kaikilla kolmella levyllä, joilla koe toistettiin, mikä johtui todennäköisesti siitä, ettei PEI25-varaussuhdetta oltu optimoitu solulinjalle sopivaksi, vaan kaikilla transfektiolevyillä oli käytetty samaa, ARPE19-solulinjalla optimoitua, PEI25-varaussuhdetta.

Verrattaessa hMC1R-säätelyalueen sisältävää konstruktia pGL3-Basic-plasmidiin, johon ei oltu liitetty säätelyaluetta, voitiin havaita selkeä aktiivisuutta parantava vaikutus molemmissa solulinjoissa. Tulos oli yhtäpitävä kvantitatiivisen RT-PCR:n tulosten kanssa, joiden mukaan MC1R-mRNA:n ilmentyminen oli huomattavaa molemmissa käytetyissä solulinjoissa.

Lisättäessä OTX2- ja MITF-A-säätelytekijöitä ei huomattu merkitsevää eroa lisättävän määrän ollessa 0,1 µg. Lisättävän OTX2:n määrän ollessa 0,3 µg, ero muuttui merkitseväksi ( $\alpha < 5 \%$ ). MITF-A:ta lisättäessä vaikutus oli samanlainen ARPE19-solulinjassa. Y79-soluilla ei saatu merkitsevää eroa minkään näytteen kohdalla. Tulokset olivat ristiriidassa myöhemmin tehdystä titrauksesta saatujen tulosten kanssa. Tämä voi olla seurausta virheellisestä kantajan varaussuhteesta, mikä johtaa solujen huonompaan kasvuun ja epävarmisiin tuloksiin.

Titrauslevyillä DNA-kompleksiin oli lisätty 0,075 – 0,3 µg OTX2- ja MITF-A-säätelytekijöitä. Tarkoituksena oli optimoida lisättävän säätelytekijän määrä MC1R-säätelyalueen kannalta. Tulokset olivat ristiriidassa aiemmin tehtyjen kokeiden kanssa, joissa DNA-kompleksiin oli lisätty 0,1 µg tai 0,3 µg säätelytekijöitä. Titraustulosten mukaan 0,3 µg oli optimaalisin OTX2:n määrä ARPE19-soluilla, mutta MITF-A:ta lisättäessä säätelyalueen aktiivisuus laski, toisin kuin edellisissä kokeissa. Titrauksen tulokset olivat uskottavampia, kun huomioidaan, että endogeenisen MITF-A:n määrä soluissa voi aiheuttaa päinvastaisen reaktion lisättäessä MITF-A:n määrää entisestään. Titraustuloksissa ei havaittu merkitsevää eroa säätelyalueen sisältävän konstruktin ja pelkän pGL3-Basic:n välillä. Tuloksia epäiltiin, sillä aiemmin oli havaittu merkitsevä ero näiden konstruktien välillä.



Reportterigeenianalyysin tuloksista arveltiin ja sekvensointitulosten perusteella varmistettiin siitä, että kaksi hMC1R-Luc-konstruktin tehdyistä deleetioista olivat onnistuneet. SmaI-deleetio (-1436/-280), joka poisti säätelyalueelta OTX2-, MITF-A- ja Crx-transkriptiotekijöiden sitoutumispaikat, osoittautui onnistuneeksi, samoin kuin PstI-deleetio (-1087/-474), joka poisti Crx-sitoutumispaikan. Lisäksi oli tehty kaksi muuta deleetiota, joista osittainen PstI-deleetio (-1432/-474) oli leikannut säätelyalueelta samat transkriptiotekijöiden sitoutumispaikat, kuin SmaI-deleetio. NcoI-deleetio (-1353/+431), oli MITF- ja CRX-sitoutumispaikkojen lisäksi leikannut myös säätelyalueen alkupään MITF- ja Sp1-sitoutumispaikat, joita pidettiin tärkeänä osana säätelyalueen toiminnan kannalta.

Reportterigeenianalyysin tulosten perusteella voitiin päätellä, että yhdessä OTX2-, MITF-A ja Crx-transkriptiotekijöillä, joiden sitoutumispaikat hMC1R-säätelyalueelta oli poistettu SmaI-deleetion avulla, ei ollut suurta merkitystä säätelyalueen toiminnan kannalta. PstI-deleetion tulokset osoittivat, että pelkän Crx-sitoutumispaikan puuttuminen säätelyalueelta laski sen aktiivisuutta melkein merkitsevästi ( $\alpha < 5\%$ ). Tämä tulos on ristiriidassa SmaI-deleetion tuloksen kanssa, paitsi jos Crx-sitoutumispaikka on jotenkin sitoutunut OTX2- tai MITF-A-sitoutumispaikan kanssa, jolloin sen puuttuminen heikentäisi transkriptiotekijöiden toimintaa. Toisena mahdollisuutena voidaan pitää sitä, että jossain kohden sekvenssiä on ”silencer”-alue, joka hiljentää säätelyalueen aktiivisuutta ehjässä promoottorissa.

NcoI-deleetio epäonnistui, ja säätelyalueelta leikkautui MITF-A- ja Crx-sitoutumispaikkojen lisäksi myös säätelyalueen toiminnan kannalta tärkeinä pidetyt proksimaalinen MITF-A ja siihen luultavasti kytkeytynyt Sp-1-sitoutumispaikka, sekä transkription aloituskohta. Transkription aloituskohdan puuttuminen laski säätelyalueen luc-aktiivisuuden automaattisesti alle pGL3-Basic-perustason.

Osittainen PstI-deleetio (-1432/-474) ei ollut onnistunut, vaan OTX2- ja MITF-sitoutumispaikkojen lisäksi myös Crx-sitoutumispaikka oli leikkaantunut pois kaikista kolmesta kloonista. Konstrukti oli siis SmaI-deleetiokonstruktiosta vastaava, mutta toisin kuin SmaI-deleetiokonstruktiosta, osittaisen PstI-deleetion jälkeen säätelyalueen luc-aktiivisuus näytti nousevan. Tulos oli ristiriitainen SmaI-deleetion (-1436/-280) tuloksen kanssa. SmaI- ja PstI-restriktioentsyymien leikkauskohtiin jää 194 bp:n väli, jossa on

mahdollisesti jokin säätelyalueen toiminnan kannalta tärkeä sitoutumispaikka, jonka puuttuminen SmaI-deleetiokonstruktiosta selittäisi lusiferaasiaktiivisuuden laskuun verrattaessa osittaiseen PstI-deleetiokonstruktiin. Tutkituista transkriptiotekijöistä, MC1R-säätelyalueelta, paikkojen -474 ja -280 väliltä löytyy vain Sp1-sitoutumispaikkoja (liite 1), joiden ei oletettu ennen tutkimusta olevan tärkeitä säätelyalueen toiminnan kannalta, sillä ne eivät näytä olevan minkäänlaisessa ryhmässä muiden transkriptiotekijöiden sitoutumispaikkojen kanssa, eikä niiden kohdalla ole SNP: ita.

## 6.1 Yhteenveto

Kaiken kaikkiaan tutkimus onnistui tavoitteenaan kloonata osa ihmisen MC1R-säätelyalueesta ja liittää se luc-reportterialueen sisältävään plasmidiin, jolloin konstruktiota voitiin testata reportterigeenianalyysien avulla. Kaikki kolme tutkimuksessa käytettyä hMC1R-Luc-kloonaa olivat positiivisia, mikä varmistettiin sekvensoimalla.

ARPE19-soluissa OTX2:n lisäys aiheutti lusiferaasiaktiivisuuden lisääntymisen, kun taas MITF-A:n lisäys laski aktiivisuutta, todennäköisesti endogeenisen MITF:n puskuriominaisuuden vaikutuksesta. Yhdessä näillä säätelytekijöillä ei ollut merkitsevää vaikutusta hMC1R-säätelyalueen aktiivisuuteen.

Säätelyalueelle tehdyistä deleetioista kaksi onnistui toivotunlaisesti. Poistettaessa OTX2-, Crx- ja distaalinen MITF-sitoutumispaikka, säätelyalueen aktiivisuus ei muutu merkittävästi, mikä osoittaa, että näillä sitoutumispaikoilla ei ole merkitsevää vaikutusta geenin säätelyn kannalta.

Koetta tehdessä varsinkin käänteistransfektioimenetelmän kohdalla eteen tuli monia odottamattomia tekijöitä, jotka vähensivät tulosten luotettavuutta. Yksi tärkeimmistä kokeiden luotettavuutta laskeva tekijä oli käytetty PEI25:n varaussuhde, joka on todennäköisesti ollut väärä, minkä seurauksena solut eivät transfektoituneet kunnolla ja lusiferaasi- ja  $\beta$ -galaktiivisuudet jäivät alhaisiksi. Tulosten merkitsevyyksien puuttuminen kertoo, ettei koe ollut kunnolla toistettavissa, mikä on toinen syy tulosten luotettavuuden puutteeseen.

Jotta tutkimuksen tuloksia voitaisiin pitää luotettavina, pitäisi koeolosuhteita optimoida ja optimointi tehdä kullekin käytetylle solulinjalle erikseen. Kokeet tulisi toistaa optimoiduissa olosuhteissa, jotta saatuja tuloksia voitaisiin pitää luotettavina. Lisätutkimuksina säätelyalueelle voitaisiin tehdä pistemutaatioita merkittävien SNP:iden kohdalle ja tutkia kyseisen SNP:n vaikutusta säätelyalueen toimintaan.

## 7 LÄHTEET

- Abdel-Malek Z.A, 2001. Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 434-441.
- Abdel-Malek Z, Scott M.C, Suzuki I, Tada A, Im S, Lamoreux L, Ito S, Barsh G & Hearing V.J, 2000. The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Research* 13: 156-162.
- Abdel-Malek Z, Swope V.B, Suzuki I, Akcali C, Harriger M.D, Boyce S.T, Urabe K & Hearing V.J, 1995. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 1789-1793
- Adachi S, Morii E, Kim D, Ogihara H, Jippo T, Ito A, Lee Y & Kitamura Y, 2000. Involvement of mi-transcription factor in expression of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone receptor in cultured mast cells of mice. *The Journal of Immunology* 164: 855-860.
- Algvere P.V & Seregard S, 2002. Age-related maculopathy: pathogenetic features and new treatment modalities. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 80: 136-143.
- Anderson D.H, Mullins R.F, Hageman G.S & Johnson L.V, 2002. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *American Journal of Ophthalmology* 134: 411-431.
- Aoki H & Moro O, 2002. Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R). *Life Sciences* 71: 2171-2179.
- Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D & Boulton M, 2000. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology* 45: 115-134.
- Benedito E, Jiménez-Cervantes C, Pérez D, Cubillana J.D, Solano F, Jiménez-Cervantes J, Meyer zum Gottesberge A.M, Lozano J.A & García-Borrón J.C, 1997. Melanin formation in the inner ear is catalyzed by a new tyrosine hydroxylase kinetically and structurally different from tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1336: 59-72.
- Bennett D.C. & Lamoreux M.L, 2003. The color loci of mice – a genetic century. *Pigment Cell Research* 16: 333-344.

- Bertolotto C, Abbe P, Hemesath J, Bille K, Fisher D.E, Ortonne J & Ballotti R, 1998. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *Journal of Cell Biology* 10: 827-835.
- Bharti K, Liu W, Csermely T, Bertuzzi S & Arnheiter H, 2008. Alternative promoter use in eye development: the complex role and regulation of the transcription factor MITF. *Development* 135: 1169-1178.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta M.A, Mergny M.D, Scherman D, Demeneix B & Behr J, 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7297-7301.
- Box N.F, Wyeth J.R, O'Gorman L.E, Martin N.G & Sturm R.A, 1997. Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Human Molecular Genetics* 6: 1891-1897.
- Bressler S.B, Muñoz B, Solomon S.D & West S.K, 2008. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration, The salisbury eye evaluation (SEE) project. *Archives of Ophthalmology* 126: 241-245.
- Bunce C. & Wormald R, 2006. Leading causes of certification for blindness and partial sight in England & Wales. *BMC Public Health* 6: 58.
- Bunce C. & Wormald R, 2010. Causes of blind and partial sight certifications in England and Wales: April 2007-March 2008. *Eye* 24: 1692-1699.
- Böhm M, Metze D, Schulte U, Becher E, Luger T.A & Brzoska T, 1999. Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and *in situ*. *Experimental Dermatology* 8: 453-461.
- Cai X, Conley S.M & Naash M.I, 2009. RPE65: role in the visual cycle, human retinal disease and gene therapy. *Ophthalmic Genetics* 30: 57-62.
- Catania A, Gatti S, Colombo G & Lipton J.M, 2004. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacological Reviews* 56: 1-29.
- Chader G.J, 1987. Multipotential differentiation of human Y-79 retinoblastoma cells in attachment culture. *Cell Differentiation* 20: 209-216.
- Chakraborty A.K, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek J.M & Ichihashi M, 1996. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* 1313: 130-138.

- Chang M.A, Bressler S.B, Munoz B & West S.K, 2008. Racial differences and other risk factors for incidence and progression of age-related macular degeneration: Salisbury eye evaluation (SEE) project. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49: 2395-2402.
- Chen W, Kelly M.A, Opitz-Araya X, Thomas R.E, Low M.J & Cone R.D, 1997. Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell* 91: 789-798.
- Corre S, Primot A, Sviderskaya E, Bennett D.C, Vaulont S, Goding C.R & Galibert M, 2004. 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). *The Journal of Biological Chemistry* 279: 51226-51233.
- de Jong P.T.V.M, 2006. Age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine* 355: 1474-1485.
- Fan W, Zheng J.J & McLaughlin B.J, 2002. An in vitro model of the back of the eye for studying retinal pigment epithelial-choroidal endothelial interactions. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 38: 228-234.
- Feeney-Burns L, Hilderbrand E.S & Eldridge S, 1984. Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial and peripheral cells. *Investigative Visual Science* 25: 195-200.
- Frank R.N, Amin R.H & Puklin J.E, 1999. Antioxidant enzymes in the macular retinal pigment epithelium of eyes with neovascular age-related macular degeneration. *American Journal of Ophthalmology* 127: 694-709.
- Furukawa T, Morrow E.M & Cepko C.L, 1997. Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91: 531-541.
- Fuse N, Yasumoto K, Suzuki H, Takahashi K & Shibahara S, 1996. Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 219: 702-707.
- Futter C.E, 2006. The molecular regulation of organelle transport in mammalian retinal pigment epithelial cells. *Pigment Cell Research* 19: 104-111.
- Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson S.J, DelValle J & Yamada T, 1993. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 8246-8250.

- García-Borrón J.C, Sánchez-Laorden B.L & Jiménez-Cervantes C, 2005. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Research* 18: 393-410.
- Gargiulo A, Bonetti C, Montefusco S, Neglia S, Di Vicino U, Marrocco E, Della Corte M, Domenici L, Auricchio A & Surace E.M, 2009. AAV-mediated tyrosinase gene transfer restores melanogenesis and retinal function in a model of ocular-cutaneous albinism type 1 (OCA1). *Molecular Therapy* 17: 1347-1354.
- Gehrs K.M, Anderson D.H, Johnson L.V & Hageman G.S, 2006. Age-related macular degeneration – emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Annals of Medicine* 38: 450-471.
- Gelineau-van Waes J, Smith L, van Waes M, Wilberding J, Eudy J.D, Bauer L.K & Maddox J, 2008. Altered expression of the iron transporter Nramp1 (Slc11a1) during fetal development of the retinal pigment epithelium in microphthalmia-associated transcription factor *Mitf<sup>mi</sup>* and *Mitf<sup>vitiligo</sup>* mouse mutants. *Experimental Eye Research* 86: 419-433.
- Hadley M.E & Haskell-Luevano C, 1999. The proopiomelanocortin system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 885: 1-21.
- Hahn P, Ying G, Beard J & Dunaief J.L, 2006. Iron levels in human retina: sex difference and increase with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:13850-13855.
- Hartmeyer M, Scholzen T, Becher E, Bhardwaj R.S, Schwarz T & Luger T.A, 1997. Human dermal microvascular endothelial cells express the melanocortin receptor type 1 and produce increased levels of IL-8 upon stimulation with  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone. *The Journal of Immunology* 159: 1930-1937.
- Henderson R.H, Williamson K.A, Kennedy J.S, Webster A.R, Holder G.E, Robson A.G, FitzPatrick D.R, van Heyningen V & Moore A.T, 2009. A rare de novo nonsense mutation in *OTX2* causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction. *Molecular Vision* 15: 2442-2447.
- Hu D, Simon J.D, Sarna T, 2008. Role of ocular melanin in ophthalmic physiology and pathology. *Photochemistry and Photobiology* 84: 639-644.
- Huusko V, 2011. Käänteistransfektio menetelmän optimointi neuroblastoomasoluille LA1-5s ja SH-EP1. Projektityö. Biotieteiden laitos, Itä-Suomen yliopisto, Kuopio.
- Im S, Moro O, Peng F, Medrano E.E, Cornelius J, Babcock G, Nordlund J.J & Abdel-Malek Z.A, 1998. Activation of the cyclic AMP pathway by  $\alpha$ -melanotropin medi-

- ates response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Research* 58: 47-54.
- Jager R.D, Mieler W.F & Miller J.W, 2008. Age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine* 358: 2606-2617.
- Kaarniranta K, Seitsonen S, Paimela T, Meri S & Immonen I, 2009. Silmänpohjan ikäräppöyrymän patogeneesi. *Duodecim* 125: 145-153.
- Kaarniranta K, Sihvola R, Salminen A, Lammi M, Teräsvirta M & Kontkanen M, 2003. Silmänpohjan ikäräppöyrymä – vaikea ongelma sekä potilaalle että silmälääkärille. *Duodecim* 119: 935-942.
- Kawasaki R, Yasuda M, Song S.J, Cheng S, Jonas J.B, Wang J.J, Mitchell P & Wong T.Y, 2010. The prevalence of age-related macular degeneration in asians: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 117: 921-927.
- Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jiménez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, García-Borrón J.C & Hearing V.J, 1994. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *The EMBO Journal* 13: 5818-5825.
- Kocur I. & Resnikoff S, 2002. Visual impairment and blindness in Europe and their prevention. *British Journal of Ophthalmology* 86: 716-722.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G & Grüters A, 1998. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics* 19: 155-157.
- Levy C, Khaled M & Fisher D.E, 2006. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine* 12: 406-414.
- Lopes V.S, Wasmeier C, Seabra M.C & Futter C.E, 2007. Melanosome maturation defect in Rab38- deficient retinal pigment epithelium results in instability of immature melanosomes during transient melanogenesis. *Molecular Biology of the Cell* 18: 3914-3927.
- Luttrell L.M, 2008. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Molecular Biotechnology* 39:239-264.
- Martínez-Morales J.R, Dolez V, Rodrigo I, Zaccarini R, Leconte L, Bovolenta P & Saule S, 2003. OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 21721-21731.
- Mencarelli M, Dubern B, Alili R, Maestrini S, Benajiba L, Tagliaferri M, Galan P, Rinaldi M, Simon C, Tounian P, Hercberg S, Liuzzi A, Di Blasio A.M & Clement K,



2011. Rare melanocortin-3 receptor mutations with *in vitro* functional consequences are associated with human obesity. *Human Molecular Genetics* 20: 392-399.
- Menon I.A, Persad S, Haberman H.F & Kurian C.J, 1983. A comparative study of the physical and chemical properties of melanins isolated from human black and red hair. *The Journal of Investigative Dermatology* 80: 202-206.
- Moro O, Ideta R & Ifuku O, 1999. Characterization of the promoter region of the human melanocortin-1 receptor (MC1R) gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262: 452-460.
- Neumann Andersen G, Nagaeva O, Mandrika I, Petrovska R, Muceniece R, Mincheva-Nilsson L & Wikberg J.E.S, 2001. MC1 receptors are constitutively expressed on leucocyte subpopulations with antigen presenting and cytotoxic functions. *Clinical and Experimental Immunology* 126: 441-446.
- Noble J. & Chaudhary V, 2010. Age-related macular degeneration. *Canadian Medical Association Journal* 182: 1759.
- Oetting W.S & King R.A, 1999. Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Human Mutation* 13: 99-115.
- Ollmann M.M, Lamoreux M.L, Wilson B.D & Barsh G.S, 1998. Interaction of agouti protein with the melanocortin 1 receptor *in vitro* and *in vivo*. *Genes & Development* 12: 316-330.
- Patel N, Adewoyin T & Chong N.V, 2008. Age-related macular degeneration: a perspective on genetic studies. *Eye* 22: 768-776.
- Preising M.N, Forster H, Gonser M & Lorenz B, 2011. Screening of TYR, OCA2, GPR143 and MC1R in patients with congenital nystagmus, macular hypoplasia and fundus hypopigmentation indicating albinism. *Molecular Vision* 17: 939-948.
- Price E.R, Horstmann M.A, Wells A.G, Weilbaecher K.N, Takemoto C.M, Landis M.W & Fisher D.E, 1998.  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone signaling regulates expression of microphthalmia, a gene deficient in Waardenburg syndrome. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 33042-33047.
- Prota G, 1980. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *The Journal of Investigative Dermatology* 75: 122-127.
- Rein D.B, Wittenborn J.S, Zhang X, Honeycutt A.A, Lesesne S.B & Saaddine J, 2009. Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: the potential impact of new treatments. *Archives of Ophthalmology* 127: 533-540.

- Reinisalo, 2003. Totaali-RNA:n eristys TRI-reagenssilla. Moniste. 3 s.
- Reinisalo M, Putula J, Mannermaa E, Urtti A & Honkakoski P, 2012. Regulation of the human tyrosinase gene in retinal pigment epithelium cells: the significance of transcription factor orthodenticle homeobox 2 and its polymorphic binding site. *Molecular Vision* 18: 38-54.
- Reinisalo M, Urtti A & Honkakoski P, 2006. Freeze-drying of cationic polymer DNA complexes enables their long-term storage and reverse transfection of post-mitotic cells. *Journal of Controlled Release* 110: 437-443
- Resnikoff S, Pascolini D, Etyá'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel G.P & Mariotti S.P, 2004. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization* 82: 844-851.
- Roselli-Reh fuss L, Mountjoy K.G, Robbins L.S, Mortrud M.T, Low M.J, Tatro J.B, Entwistle M.L, Simerly R.B & Cone R.D, 1993. Identification of the receptor for  $\gamma$  melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8856-8860.
- Rouzaud F. & Hearing V.J, 2005. Regulatory elements of the melanocortin 1 receptor. *Peptides* 26: 1858-1870.
- Rubinstein M, Stein S & Udenfriend S, 1978. Characterization of pro-opioid cortin, a precursor to opioid peptides and corticotropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:669-671.
- Schauer E, Trautinger F, Köck A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, Ansel J.C, Schwarz T & Luger T.A, 1994. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 93: 2258-2262.
- Schiller M, Brzoska T, Böhm M, Metze D, Scholzen T.E, Rougier A & Luger T.A, 2004. Solar-simulated ultraviolet radiation-induced upregulation of the melanocortin-1 receptor, proopiomelanocortin and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone in human epidermis *in vivo*. *Journal of Investigative Dermatology* 122: 468-476.
- Schraermeyer U, Kopitz J, Peters S, Henke-Fahle S, Blitgen-Heinecke P, Kokkinou D, Schwarz T & Bartz-Schmidt K, 2006. Tyrosinase biosynthesis in adult mammalian retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research* 83: 315-321.
- Schubert E.F, 2006. Light-emitting diodes. Cambridge university press.

- Scott M.C, Suzuki I & Abdel-Malek Z.A, 2002a. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Research* 15: 433-439.
- Scott M.C, Wakamatsu K, Ito S, Kadakaro A.L, Kobayashi N, Groden J, Kavanagh R, Takakuwa T, Virador V, Hearing V.J & Abdel-Malek Z.A, 2002b. Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *Journal of Cell Science* 115: 2349-2355.
- Shamsi F.A & Boulton M, 2001. Inhibition of RPE lysosomal and antioxidant activity by the age pigment lipofuscin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42: 3041-3046.
- Smith A.G, Box N.F, Marks L.H, Chen W, Smit D.J, Wyeth J.R, Huttley G.A, Eastel S & Sturm R.A, 2001. The human melanocortin-1 receptor locus: analysis of transcription unit, locus polymorphism and haplotype evolution. *Gene* 281: 81-94.
- Smith A.I & Funder J.W, 1988. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues. *Endocrine Reviews* 9: 159-179.
- Strauss O, 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews* 85: 845-881.
- Strick D.J, Feng W & Vollrath D, 2009. Mertk drives myosin II redistribution during retinal pigment epithelial phagocytosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50: 2427-2435.
- Strunnikova N.V, Maminishkis A, Barb J.J, Wang F, Zhi C, Sergeev Y, Chen W, Edwards A.O, Stambolian D, Abecasis G, Swaroop A, Munson P.J & Miller S.S, 2010. Transcriptome analysis and molecular signature of human retinal pigment epithelium. *Human Molecular Genetics* 19: 2468-2486.
- Sundelin S.P, Nilsson S.E.G & Brunk U.T, 2001. Lipofuscin-formation in cultured retinal pigment epithelial cells is related to their melanin content. *Free Radical Biology and Medicine* 30: 74-81.
- Suzuki I, Tada A, Ollmann M.M, Barsh G.A, Im S, Lamoreux M.L, Hearing V.J, Nordlund J.J & Abdel-Malek Z.A, 1997. Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to  $\alpha$ -melanotropin. *Journal of Investigative Dermatology* 108: 838-842.
- Tassabehji M, Newton V.E & Read A.P, 1994. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nature Genetics* 8: 251-255.

- Tetzner R, 2009. Prevention of PCR cross-contamination by UNG treatment og bisulfite-treated DNA. *Methods of Molecular Biology* 507: 357-370.
- Thompson C.L, Jun G, Klein B.E, Capriotti J, Lee K.E & Iyengar S.K, 2007. Genetics of pigment changes and geographic atrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48: 3005-3013.
- Thody A.J, 1999.  $\alpha$ -MSH and the regulation of melanocyte function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 885: 217-229.
- Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees J.L & Thody A.J, 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genetics* 11: 328-330.
- Vanderbeek B.L, Zacks D.N, Talwar N, Nan B, Musch D.C & Stein J.D, 2011. Racial differences in age-related macular degeneration in the United States: a longitudinal analysis of a managed care network. *Ophthalmology* 152: 273-282.
- Van der Ploeg L.H.T, Martin W.J, Howard A.D, Nargund R.P, Austin C.P, Guan X, Drisko J, Cashen D, Sebhat I, Patchett A.A, Figueroa D.J, DiLella A.G, Connolly B.M, Weinberg D.H, Tan C.P, Palyha O.C, Pong S, MacNeil T, Rosenblum C, Vongs A, Tang R, Yu H, Sailer A.W, Fong T.M, Huang C, Tota M.R, Chang R.S, Stearns R, Tamvakopoulos C, Christ G, Drazen D.L, Spar B.D, Nelson R.J & MacIntyre E, 2002. A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 11381-11386.
- Wang N & Hebert D.N, 2006. Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. *Pigment Cell Research* 19: 3-18.
- Wang A.L, Lukas T.J, Yuan M, Du N, Tso M.O, Neufeld A.H, 2009. Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration. *Plos One* 4: 1-13.
- Wasmeier C, Hume A.N, Bolasco G & Seabra M.C, 2008. Melanosomes at a glance. *Journal of Cell Science* 121: 3995-3999.
- Yamaguchi Y & Hearing V.J, 2009. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 35: 193-199.
- Yasumoto K, Yokoyama K, Shibata K, Tomita Y & Shibahara S, 1994. Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Molecular and Cellular Biology* 14: 8058-8070.

- Yasumoto K, Yokoyama K, Takahashi K, Tomita Y & Shibahara S, 1997. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 503-509.
- Yeo G.S.H. Farooqi I.S, Aminian S, Halsall D.J, Stanhope R.C & O'Rahilly S, 1998. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nature Genetics* 20: 111-112.

## 7.1 Internet lähteet

- ClustalW homologiavertailu-työkalu (European Bioinformatics institute). Päivitetty 08.04.2011. Saatavilla: <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>. Viitattu 21.12.2011.
- Fermentaxen kotisivut. Saatavilla: <http://www.fermentas.com>. Viitattu 14.2.2012.
- National Center for Biotechnology Information. NCBI:n DNA- ja RNA-tietokannat. Päivitetty 14.09.2011. Saatavilla: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Viitattu 21.12.2011.
- National Center for Biotechnology Information. NCBI:n homologiavertailutyökalu BLASTn. Päivitetty 14.09.2011. Saatavilla: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Viitattu 21.12.2011.
- National Center for Biotechnology Information. NCBI:n SNP-tietokanta. Päivitetty 14.09.2011. Saatavilla: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Viitattu 21.12.2011.
- Riken:n sivusto, jolta löytyy tilatun pKM2L-hMC1R-plasmidin tiedot. Päivitetty 2.11.2011. Saatavilla: <https://database.riken.jp/sw/attribution/cria304u24ria304u944i>. Viitattu 11.2.2012.
- Transkriptiotekijöiden hakuohjelmisto (TESS). Saatavilla: <http://www.cbil.upenn.edu/tess/>. Viitattu 21.12.2011.
- Yalen yliopiston DNA-analyysipalvelu. Saatavilla: <http://dna-analysis.research.yale.edu/>. Viitattu 23.1.2012.

# LIITTEET

**Liite 1.** Ihmisen MC1R-säätelyalue 9045 ep (AF263461) ja siihen merkittyinä tutkimuksen kannalta merkittävinä pidetyt transkriptiotekijöiden sitoutumispaikat. Ensimmäinen säätelalueen transkription aloituskohta on merkitty +1:ksi ja korostettu punaisella. TATA-box:t on alleviivattu ja merkittäviä transkriptiotekijöiden sitoutumispaikkoja on korostettu eri väreillä:

MITF E-box: CANNTG  
Sp1: (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)  
OTX2: TAATCC/TAATCT  
Crx: GGATTAC/ GTAATTC/ CAATTAA/ CTAAGCT/ CTAATCT

```
1 aagcttctgc cttgcgtaa ggagtgggtg ctgaaggaga cgttgaaact gcagcttttc
61 tgaaaagcaa ggcacctgtg cagtggccga ggatggctgt gggagcctcg ctccggacgc
121 cacgcccgtgcc tcagctgagt tggctctcct catcctgttc ccgctgtcca cagccccacc
181 ctaagctgat gaggaagcct cacgggcccacccggggaatc cagggcctgt gctcagctgc
241 tgctgctctg ccccdtggcg gcccdtccgt gtcctgcga gggaggcagc tggcaggcag
301 ccccgtagc cgggttgggt cccacgagtc tcagttcagt gtcgtttctg acttttcttg
361 actttcttcc aggctaagtc ctatcagcca tggaaacacc attgctctct tcttccggtc
421 actggtgcca aactatacca tggaggtagg ttgagctcgt cccagcccct gcctccccag
481 tgggtgcggg catatccatt ccagtgcgaa tgcttgagc ctcttgaac caggactgtg
541 ccagccggca cagggagcag ggaaggaaa ggctgcattg tgccagtggg gtgccattc
601 tgccggggaa actggggcct gccagatgg tagcagatgc agggccgtga gtcagccggc
661 ctgatcccac tctgtgcctg gcttggctca gacacggcat ttggtttga gagcttctc
721 ctcacagga cctggggagg gttcagggtc cgtgctggg gcaaggcca cctcgggctc
781 cacagtgcct cctgcttggg cccdgggccc ctagtcccag cacagacagc ccccttctca
841 gacatgtccc cttgctgca ggggagaggg ccgaggaagg agtggctggg ggtctgaacc
901 gcaaccaggg cctgaacagg ctgatgctgg ctgtgcgca catgatggcc aacttcacc
961 tcaacgacct ggagcgccg cacgaggacg acgctgagg ggagggggag tgggactgag
1021 cgtccgcaga ggtgaccgaa aagccgtatg atgatgttcc cgatttctct gttggtcgga
1081 gtcggccagt tgctgaagt aggaagctg agtgtgtcgc tccctggtcc actgtttctc
1141 ctataaatgt aatgggtca cgtctgccc tccgcacct ctcctttcgc aggcactga
```

1201 **cgccgtccc**a tgcctcggga ttcgaatcac actcagtcca t**tctcctccc** agtggcttgt  
1261 ggtg**gaggtg gggcd**cagac cccatgcttc ctgtgctccc aggatctggg cac**gggtgga**  
1321 gaa**ggggccc** cacggggtct tcagtgcagg tcctgtctga atgccaaggc cctgggtgca  
1381 cgtcctcctt gaacttgctg tggagttcgt caacagagct gcgtgccttg ttggtagagg  
1441 gtctc**agggc agggc**tggag cagaga**ggcc ca**tatgtggc agccggcctt cagtcttgtt  
1501 cctccaagca agt**gggtg agatgttg**g gtcctttggc tggatgccac tatctgttga  
1561 atctgacaaa ataattttct ttttttttt tgagacaaga gtctcactgt gtcgcgcagg  
1621 ctg**gagtgea** gtggcgcagt ctcggtcac tgca**getcc gctc**ccggg ttcacgccat  
1681 tctcctgcct cagcctccc agtagctggg gctacaggca **ccggc**acca cgcttgcta  
1741 atgtttgtat ttttagtaga gacggggttc caccatgttg gccaggatgg tctcaatctc  
1801 ttgacctcat gat**cgcccg cctggccc** ccacagtgt ggggttacag ctgtgagcca  
1861 ccgcgcttg ctctgcaaaa ataattttat tagagaactt **gagggcagtg cd**cagaattg  
1921 aaggcgaagc cccagaagca tgttttgag agaagtgcc agggaagctc tgagggcca  
1981 tgtagcaaag atcaggggat agtcggtctg aggtgaaatg gccactcgg accaagacc  
2041 cagtctt**ggg ggagggctta** gctggagcag gtctggtcac agttgactga tgggtcacag  
2101 aaccctgca tccac**ggcc ca**acggtgt gacgtgcag **gagggcgga ggc**tgacgc  
2161 agacagcctc agaagccagc gtggttctgg aaggatcgag aacaccaagg tgttagggct  
2221 gcagcaggg tctgtccc tggcaccct ca**cgcccta atct**tttacc cttagaggc  
2281 agcagacacg aggg**ctgcc** cgaggctcta **ggcgg**ccag tgaggcagga aacatgttc  
2341 agccccagct aggtactggt ccgtgga**ccc acd**tcccaga aagcccatca ctgtgtaatc  
2401 gtetaacctg gggctcgcg aggcctgta gttcatcctt ttggcagttc ctggtgtctc  
2461 cttactctgc tcagcatttc c**ggggcgga gcttagg**tg cag**gacctc cca**ggacga  
2521 cgagggcca gtggtccatg acaagagttg gcccgaggg ctgagccacg tgtgcccatc  
2581 tcagacgtgg gcctgagggt gca**gcccgg ccd**gtgtctg gccatttcta ggagccggtg  
2641 ccctgaggtc ccagctgtga tagccccacg ctctgcagga agagatcatg **ggggcgggga**  
2701 gttggtgcct gcggcctcgt tcctctctgc agtgagtga cgatgtttgt ggtcagcagg  
2761 agcctgtggg gagcacagc tggctctcct **ggtgtcccac ccacc**cttt ttccatgggg  
2821 gatc**tgcact catctcca**gg gaagatggtt gggagataac cccagtctgc tctaggt**ccc**  
2881 **cacctcc**ac agccag**gggtg g**tccgtggtg agcttcagcc atcgagatgc gggagtctgc  
2941 tagagtcttc aggtctttt ctctgaaaat gacaggctag caaggagacc tgggtcc**cct**  
3001 **gctctt**cca ttcagatgc cttgagt**cca ccd**aaatagg ggatgtgatg tttggagctg

3061 cagcagccgc cctacggttg ggagtcagag aagagccggt gttccagga caatgcagca  
3121 gaggctgagc ccaggcctgc tgtcctgaga ggtggctgga tcaactgacac tttggcagtg  
3181 gtgctggggt ttatgtcatg acctgcagct gagcctactt ccaatgaccg tgagatctga  
3241 aagactgttt tgagggcgta gctctgcca tgattgtggg gaatgctgtc ctgtttcctc  
3301 ccttgccct gctcagcca gcgagagct gaggcgcacg tggctccccg ggtgccaca  
3361 ggcagcgtgg ctcaccagcc gggccctttt ccaactgagcc agaaccctca aaagccttca  
3421 atgcaggcac cacggtgagc ccacgagaaa cctgcttgcc cacctccac acccccacc  
3481 ccaagttcaa aggaaatggt cctgaacca agggctgaga tcagctgtgg gtccagctgt  
3541 cctggggagc tgtactggag cccaccacgg tgggactgtt ggtccgcggt tgacc cccac  
3601 ctccatgtct gtggccgag ctggacagcc cactccctgg gccacagaga tgttttacct  
3661 ctgcagccc tcgggcacac attgagcaga tgtgtgtgtg tgtgctgtg tgggtgggtg  
3721 cgcatttgtg tgtgctgtg tgtgtgcca tgtgtgtggtg gtgcacgtgt gtgcacgtgt  
3781 gtgggtaaac attgtgtgtg cgcatactgt tgtgggtaaa catttgtatg tgcacgcgtg  
3841 tgtgggtaaa cgtgtgtgag cacgtatgta tgtgtgtaca tttgtatgtg tgtacatttg  
3901 tatgcatgtg tgccctgtgtg tgtgtgcctg tgtgtgtggg tgcacatttg tgtgtgtgtg  
3961 tgtgctgtg tgtgtgtgtg cacgtatgta tgtgtgcaca cttgtatgca tgtgtgctg  
4021 tgtgtgtggg tgcacatttg tgtgtgtgtg cctgtgtgtg tgggtgcaca tttgtgtgtg  
4081 tgggtgcaca tttgtgtgtg tgtgcccctg tgtgggtgca catttgtgtg tgtgtgtgcc  
4141 tgtgtgtgtg cctgtgtgtg tgggtgcctg tgtgtgtggg gcacatttgt gtgtgtgtgt  
4201 gcctgtgtgt ggggtgcacat ttgtgtgtgt gcctctgtgt gtgtgcctgt gtgtgggggt  
4261 gcacatttgt gtgtgcccct gtgtgtgggg gtgcacattt gtgtgtgccc ctgtgtgtgt  
4321 ggggtgcacat ttgtgtgtgt gtgcccctgt gtgtgtgggt gcctgtgtgt tgtgtgggca  
4381 catttgtgtg tgtgtgtgtg cctgtgtgtg ggtgcacatt tgtgtgtgtg cctgtgtgtg  
4441 tgtgctgtg tgtgggggtg cacatttgtg tgtgtgtgtg cctgtgtgtg ggggtgcaca  
4501 tttgtgtgtg tgtgtgcccct tgtgtgtggg tgcacatttg tgtgtgtgtg tgccctgtgtg  
4561 tgtgggtgca catttgtgtg tgtgtgcccct tgtgtgtggg tgcacatttg tgtgtgtgtg  
4621 tgccctgtgtg tgtgggtgca catttgtgtg tgtgcccctg tgtgggtgca catttgtgtg  
4681 tgtgtgcccct tgtgtgtgtg cctgtgtgtg tgggtgcaca tttgtgtgtg tgtgtgcccct  
4741 tgtgtgtggg tgcacatttg tgtgtgtgtg tgtgcccctg tgtgtgtgtg aggcctgga  
4801 tgccagacac tgaataaac caggaagacg tctgtcttca ttctcctcgt gggtcgctgg  
4861 tccagaaaca cctgatgga aagtgtctg caggaacggt gcctctgcct gtggcggga



4921 ccctggtgag cggatgggcc agccccacgt gtcttccggc cactcagcat gcagtgtttc  
4981 caggggcact aagagaccaa aatcgagata **tgattag**ctg taggatgtca **tetaatcaca**  
5041 gatcatcccg aggetaattt atctcccca tgaccataac acatcaaaaa gttgactttt  
5101 tgcagctcgg gctgtgcctc atcttccac gaagccccga caggcacatc cagtgaggaa  
5161 ccacagtggg agtcctgtgg cagggtcacc ccacttccga tgcctccag ctgcatcttg  
5221 gcacgaaaaa ggctgcccag ttctcatgcc ctttcaagtc ccgggctggg gggtagcagt  
5281 gga**ggctggg** gttaaccgcc gtccgtctca aaggcctcat tgtggagctg caaacacgaa  
5341 cgtccttgaa atgtgagggg acagtgtctt **ggggcagggg** ctgctcactg gttcatggcc  
5401 agaggtgagc gggctctggg tctgggtctg tgaggtgctg tggacgtcgg ggggtctcct  
5461 **ggggcagggg cacagcca**g gcctcacac cagtggagcc gtcttccttc ccgaggcaga  
5521 **ggcttggcct** tctcacacct tgggaccctt ctctcccctg tgctcatgct ggaagcacag  
5581 cgtgaggggg caaaggatc gggaggcaaa a**ggctggg**ct gaggccgagg ctct**gtggct**  
5641 **gtggc**ggat accaggtcct **gtgggtgggtg gggcagggc** cgctctctcc tctgagcagc  
5701 ct**ggggctgc** gttgtgtaac agaacaggc ctgccgattt gaagatggtt tgaccaagtc  
5761 tcccaaagct gaagagaggt **ccctgccca**t gtcccc**ggg tgg**caatcca cagacgcacc  
5821 tgtgtccatc agacggatc gttgatagg agtctgaag **cacc**agacg tggctctgtc  
5881 acgccgtgg **a caccac**ggtc tgaggcagac gtttacagcc accggcatag gcgaatctca  
5941 gccagagaga gtgaactggg acaccattca cgtgatgggc cagatgggct ggcagcggct  
6001 cgctggagcc gtcc**gggtgg** gaacgctgtg tctgttggtc tgggtgctgct tatg**tggtc**  
6061 **gttc**aggtct gtcacccgtc aaactgcata ttatcactg gtgcattttc atgtatggtg  
6121 tacct **caatt aa**aacatttt **agggccgggc** gcggtggctc acgcct **ataa tcc**cagcact  
6181 gtgg**gagggc gaggcgg**ag gatcatgagg tcaggagatc aagaccgtcc tggccaacat  
6241 ggtgaaacc catctctact aaaaaaata caaaaatttg ccgggt**gtgg cggca**gccc  
6301 ctgtagttcc agctactcag gaggtgagg tatga**gaatt ad**ttgaacce agtaggcaga  
6361 ggctaccgtg agccaagatc atgccac **ggc actc**cagcct gggtgacagt **gagaatt**cg  
6421 ctcaaaaaa aaaaaaaaaa aattaaag **ca gatgggtgt gggg**gctcat ccct **taatac**  
6481 **t**cagcatttt gggaggct **ga ggcggacc**ga **taccto**agg tcaggagttc aagaccagcc  
6541 tggtaacat ggtgaaacct catctctaca aaaaatacaa aaaaatagcca ggtgtggtag  
6601 tgggtgccgt agtcccagct agttgggagg ctgaggcata agtattgctt gaatccagaa  
6661 ggtggagggt gcagtgagcc aagaatgcac cactacactc cagcctgcgc gacagagtga  
6721 aactgtctca aaataaataa atacataaaa attatatgta tatatatata tatatatatt

6781 tttttttttt ttgagactgt atctctgttt cccaggctgg agtgcagtgg tgtgatctcg  
6841 gctcaactgca aacctcgcct cctgggttca agcaattctg cctcagcctc ccaagtagct  
6901 gggattatag gcgtgcgcca ccacgcctgg ctgatttttg tatttttagt agagatggag  
6961 tttcaccata ttaccaagc tggctttgaa ctctgacct catgatccgc ctgcctcagc  
7021 ctcccaaagt gctgagatta taggggtgag ccaactgtgc cggaataat aatttttttt  
7081 ttttgagaca gagttttgct ctgttgccc aggctggagt gcaatggtgc aatctcggct  
7141 cacggcaacc tccgcctctc atgttcaagc tattatcctg actcagctgg gattataggc  
7201 acccaccacc acacctggct gattttgta tttttagtag agacggggtt tctccatgct  
7261 ggcaggctg gtctcgaact cctgacctca ggtgatccac ccgcttggg ctcccaaagt  
7321 gctgggatta cagccctgag ccacatggc tgacaataat aaaaaatfff aaagcaaaac  
7381 taaagattta taaattgtaa aatgcggttg taacaagtat ttactgtacc agtaaataatg  
7441 aaaaatatta atgtcctcac acacatggag gtggcttgtg agtgggtgga gcatttcatg  
7501 gtcagagttt ggcagttggg cgagagacag gatggatttt aactcgaaca tcgcagacac  
7561 aaaactgaaa accctgatgc ggtgcctgca ccgttgctc ctttctgca gctgtaaagt  
7621 ggacgagtaa ttcacatccc ctccccttc cacccttcag cacagacgca gtcttcagca  
7681 aggaagtgct gggacgccc tggagtgaac ccaggaagat gcctgcagtg ggtgccaggg  
7741 cccctctcca ccgtccctgc tgggcttcgg gccacgccc gactgctgtg aacggcctgc  
7801 ggagcaccac gtgcgacggc tggaggcgag aggtctgcct ttgatgtggc tgttggtgca  
7861 gggcctgttg tgccttccgc agcggaaatg gcgcgcccgc cggggagggc ggagcagcg  
7921 tcccgggtgc cctgtgagg atgagcgacg agatgactgg aggtccctg aagacctcac  
7981 tagggtgcc ccagccggtc cgtcccagg aagcgacacc cccacagccc cagggctgca  
8041 gctgaggggg tcgccactct ggtgggcga gctgggccc ttgggggca ggcagagat  
8101 ggcctcaggc tctacaagat gcctgaaaac accaacctct ccagggtca ctagcattgg  
8161 acgctttcac gctctgccct ggccggaagc cccctcacc cgcgcgatgt gcaaaactct  
8221 gcagggctca ctcagtttcc agaactttaa ttattgaaa gttctcctg gtcagccccc  
8281 caaatctgcc gtgaacgttg acagctgagt tgctgctcca tgcgtgcttt ggtgagagc  
8341 agaggggacc cctgtcctcc ctgagctgct gacgagggga ggggtgaagg gtgggcctc  
8401 tggagagggc aggtcccggg gaagcccga ctctagagg gccggcca gg tgggggccc  
8461 ggtgacca ggacactgtg gtgtttttta acgtaaagga gatcccggtg gtgagggacc  
8521 ccctgggtcc tgcacg ccgcct ggtggcag gccgggccaat ggtggctgt cagccccc  
8581 gcatgtgg ccgccctcag tggaggggctc tgagaacgac tttttaaac gcagagaaaa

+1

8641 gctccattct tcccaggacc tcagcgcagc cctggcccag gaaggcagga gacagaagcc  
8701 aggacggtcc agaggtgtcg aaatgtcctg gggacctgag cagcagccac caggaagag  
8761 gcagggagg agctgaggac caggcttggg tgtgagaatc cctgagccca ggcggtagat  
8821 gccaggaggt gtctggactg gctgggcat gcctgggctg acctgtccag ccagggagag  
8881 ggtgtgagg cagatctggg ggtgccaga tgaaggagg caggcatggg ggacacccaa  
8941 ggccccctgg cagcaccatg aactaagcag gacacctgga ggggaagaac tgtggggacc  
9001 tggaggctc caacgactcc ttctgcttc ctggacagga ctatg CDS →

**Liite 2.** Kolmen hMC1R-Luc-kloonin sekvensointitulokset. Sekvenssianalyysi tehty ClustalW-työkalun avulla.

**Forward-alueella sekvensoituna:**

```

hMC1R-Luc          GGTACCGAGCTCTTACGCGTGTAGCCCGGGCTCGAGCTCTAAGCTTCAC 50
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  -----GGGCTC-----GGCTCGA-CTCTA-GCTTCAC 25
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  -----GGGC-----GGCTCGA-CTCTA-GCTTCAC 23
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  -----GGGTC-----GGCTCGA-CTCTA-GCTTCAC 24
                    * *                               * * * * *
hMC1R-Luc          ATATGCATGCACCTAGTCCCGCCTTGGGCTCCCAAAGTGTGGGATTACAG 100
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  ATATGCATGCACCTAGTCCCGCCTTGGGCTCC- AAAGTGTGGGATTACAG 74
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  ATATGCATGCACCTAGTCCCGCCTTGGGCTCC- AAAGTGTGGGATTACAG 72
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  ATATGCATGCACCTAGTCCCGCCTTGGGCTCC- AAAGTGTGGGATTACAG 73
                    * * * * *
hMC1R-Luc          CCCTGAGCCACCATTGGCTGACAATAATAAAAAATTTTAAAGCAAAACTAA 150
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  CCCTGAGCCACCATTGGCTGACAATAATAAAAAATTTTAAAGCAAAACTAA 124
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  CCCTGAGCCACCATTGGCTGACAATAATAAAAAATTTTAAAGCAAAACTAA 122
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  CCCTGAGCCACCATTGGCTGACAATAATAAAAAATTTTAAAGCAAAACTAA 123
                    * * * * *
hMC1R-Luc          AGATTTATAAATTGTAATAATGCGGTTGTAACAAGTATTTACTGTACCAGT 200
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  AGATTTATAAATTGTAATAATGCGGTTGTAACAAGTATTTACTGTACCAGT 174
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  AGATTTATAAATTGTAATAATGCGGTTGTAACAAGTATTTACTGTACCAGT 172
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  AGATTTATAAATTGTAATAATGCGGTTGTAACAAGTATTTACTGTACCAGT 173
                    * * * * *
hMC1R-Luc          AAATATGAAAAATATTAATGTCCTCACACACATGGAGGTGGCTTGTGAGT 250
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  AAATATGAAAAATATTAATGTCCTCACACACATGGAGGTGGCTTGTGAGT 224
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  AAATATGAAAAATATTAATGTCCTCACACACATGGAGGTGGCTTGTGAGT 222
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  AAATATGAAAAATATTAATGTCCTCACACACATGGAGGTGGCTTGTGAGT 223
                    * * * * *
hMC1R-Luc          GGTGTGAGCATTTTCATGGTCAGAGTTTGGCAGTTGGGCGAGAGACAGGAT 300
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  GGTGTGAGCATTTTCATGGTCAGAGTTTGGCAGTTGGGCGAGAGACAGGAT 274
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  GGTGTGAGCATTTTCATGGTCAGAGTTTGGCAGTTGGGCGAGAGACAGGAT 272
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  GGTGTGAGCATTTTCATGGTCAGAGTTTGGCAGTTGGGCGAGAGACAGGAT 273
                    * * * * *
hMC1R-Luc          GGATTTTAACTCGAACATCGCAGACACAAAACCTGAAAACCTGATGCGGT 350
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  GGATTTTAACTCGAACATCGCAGACACAAAACCTGAAAACCTGATGCGGT 324
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  GGATTTTAACTCGAACATCGCAGACACAAAACCTGAAAACCTGATGCGGT 322
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  GGATTTTAACTCGAACATCGCAGACACAAAACCTGAAAACCTGATGCGGT 323
                    * * * * *
hMC1R-Luc          GCCTGCACCGTTGCCTCCTTTCCTGCAGCTGTAATGGGACGAGTAATTC 400
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  GCCTGCACCGTTGCCTCCTTTCCTGCAGCTGTAATGGGACGAGTAATTC 374
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  GCCTGCACCGTTGCCTCCTTTCCTGCAGCTGTAATGGGACGAGTAATTC 372
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  GCCTGCACCGTTGCCTCCTTTCCTGCAGCTGTAATGGGACGAGTAATTC 373
                    * * * * *
hMC1R-Luc          CATCCCCCTCCCGCTTCCACCCCTTCAGCACAGACGAGTCTTCAGCAAGG 450
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  CATCCCCCTCCCGCTTCCACCCCTTCAGCACAGACGAGTCTTCAGCAAGG 424
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  CATCCCCCTCCCGCTTCCACCCCTTCAGCACAGACGAGTCTTCAGCAAGG 422
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  CATCCCCCTCCCGCTTCCACCCCTTCAGCACAGACGAGTCTTCAGCAAGG 423
                    * * * * *
hMC1R-Luc          AAGTGTGGGAACGCCCTGGAGTGAACCCAGGAAGATGCCTGCAGTGGGT 500
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  AAGTGTGGGAACGCCCTGGAGTGAACCCAGGAAGATGCCTGCAGTGGGT 474
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  AAGTGTGGGAACGCCCTGGAGTGAACCCAGGAAGATGCCTGCAGTGGGT 472
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  AAGTGTGGGAACGCCCTGGAGTGAACCCAGGAAGATGCCTGCAGTGGGT 473
                    * * * * *
hMC1R-Luc          GCCAGGGCCCTCTCCACCGTCCCTGCTGGGCTTCGGGGCCACGCCCGAC 550
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  GCCAGGGCCCTCTCCACCGTCCCTGCTGGGCTTCGGGGCCACGCCCGAC 524
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  GCCAGGGCCCTCTCCACCGTCCCTGCTGGGCTTCGGGGCCACGCCCGAC 522
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  GCCAGGGCCCTCTCCACCGTCCCTGCTGGGCTTCGGGGCCACGCCCGAC 523
                    * * * * *
hMC1R-Luc          TGCTGTGAACGGCCTGCGGAGCACCACGTGCGACGGCTGGAGGCGAGAGG 600
MC1R-Luc_11F-tluc-rescueF  TGCTGTGAACGGCCTGCGGAGCACCACGTGCGACGGCTGGAGGCGAGAGG 574
MC1R-Luc_4F-tluc-rescueF  TGCTGTGAACGGCCTGCGGAGCACCACGTGCGACGGCTGGAGGCGAGAGG 572
MC1R-Luc_9F-tluc-rescueF  TGCTGTGAACGGCCTGCGGAGCACCACGTGCGACGGCTGGAGGCGAGAGG 573
                    * * * * *

```



Reverse- alukkeella sekvensoituna:

```

hMC1R-Luc          TGTCTGGACTGGCTGGGCCATGCCTGGGCTGACCTGTCCAGCCAGGGAGA 1646
hMC1R_Luc_clone_11-Luc_R  TGTCTGGACTGGCTGGGCCATGCCTGGGCTGACCTGTCCAGCCAGGGAGA 805
hMC1R_Luc_clone_9-Luc_R   TGTCTGGACTGGCTGGGCCATGCCTGGGCTGACCTGTCCAGCCAGGGAGA 879
hMC1R_Luc_clone_4-Luc_R   -----NNGGNCNGNCNTNTCCANCCAGGGAGA 27
                        ** * * * * * ** * ** * ** *

hMC1R-Luc          GGGTGTGAGGGCAGATCTGGGGGTGCCCAGATGGAAGGAGGCAGGCATGG 1696
hMC1R_Luc_clone_11-Luc_R  GGGTGTGAGGGCAGATCTGGGGGTGCCCAGATGGAAGGAGGCAGGCATGG 855
hMC1R_Luc_clone_9-Luc_R   GGGTGTGAGGGCAGATCTGGGGGTGCCCAGATGGAAGGAGGCAGGCATGG 929
hMC1R_Luc_clone_4-Luc_R   GGNTGTGAGGGCAGATNATGGGGTGCCCAGANGGAAGGAGGCAGGCATGG 77
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

hMC1R-Luc          GGGACACCCAAGGCCCTGGCAGCACCATGAACTAAGCAGGACACCTGG 1746
hMC1R_Luc_clone_11-Luc_R  GGGACACCCAAGGCCCTGGCAGCACCATGAACTAAGCAGGACACCTGG 905
hMC1R_Luc_clone_9-Luc_R   GGGACACCCAAGGCCCTGGCAGCACCATGAACTAAGCAGGACACCTGG 979
hMC1R_Luc_clone_4-Luc_R   GGGNCACNCAAGNCCCTGGCAGCACCATGAANTAANCNGGACACNTGG 127
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

hMC1R-Luc          AGGGAAGAAGTGTGGGGACCTGGAGGCCTCCAACGACTCCTTCTTGCTT 1796
hMC1R_Luc_clone_11-Luc_R  AGGGAAGAAGTGTGGGGACCTGGAGGCCTCCAACGACTCCTTCTTGCTT 955
hMC1R_Luc_clone_9-Luc_R   AGGGAAGAAGTGTGGGGACCTGGAGGCCTCCAACGACTCCTTCTTGCTT 1029
hMC1R_Luc_clone_4-Luc_R   AGGGAAGAAGTGTGGGGACNTGGAGGCNTNCANNGANTCNTTCNTGNTT 177
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

hMC1R-Luc          CCTGGACAGGACTGTCGACGCGTAGAATTCACCACACTGG----- 1837
hMC1R_Luc_clone_11-Luc_R  CCTGGACAGGACTGTCGACGCGTAGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTT- 1004
hMC1R_Luc_clone_9-Luc_R   CCTGGACAGGACTGTCGACGCGTAGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTT- 1078
hMC1R_Luc_clone_4-Luc_R   NNGGACAGGACTGTNGACGCGTAGANNNNNAGNACNTGGCGGCCGTTA 227
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

hMC1R-Luc          ACTAGTGGATCCGAGCT-CGGTACCAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTGG 1886
hMC1R_Luc_clone_11-Luc_R  ACTAGTGGATCCGAGCT-CGGTACCAAGCT-GNCAT-CCGNNNNNNNNN 1051
hMC1R_Luc_clone_9-Luc_R   ACTAGTGGATCCGAGCT-CGGTACCAAGCT-GGCNN-CNNNNNNNNNN-- 1123
hMC1R_Luc_clone_4-Luc_R   NNTAGTGGATNNNNNNNTNGGTACCAA----- 254
** * ** * ** * ** * ** *

hMC1R-Luc          TAAAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCAT 1936
hMC1R_Luc_clone_11-Luc_R  -----
hMC1R_Luc_clone_9-Luc_R   -----
hMC1R_Luc_clone_4-Luc_R   -----

```

**Liite 3. SmaI- ja PstI-deleetiokloonien sekvensointitulos. Sekvenssianalyysi tehty Clus-  
talW- työkalun avulla.**

**SmaI digestion tuote: restriktioentsyymin sitoutumiskohta: 26-31.**

```

hMC1R-Luc_SmaI -----
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F -----
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F -----
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R NNNNNTCAAANCAAAAANGAAACAAAAACAAANTAGCAAAATAGGGCTGTC 450
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R T-CCATCAAACAAAACGAAACAAAA-CAAACTAGCAAAATAGG-CTGT- 364

hMC1R-Luc_SmaI -----GGTACCG- 7
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F -----NNNNNNNNNNNTCTCTATCGATAGGTACCG- 30
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F -----NNNNNNNNNANNNTCTCTATCGATAGGTACCG- 32
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R CCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCTATCGATAGGTACCG 500
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R CCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCTATCGATAGGTACCG- 413
*****

RE:n sitoutumiskohta: CCGGG
hMC1R-Luc_SmaI AGCTCTTACGCGTGCTAGCCCG-GGGAAGC-CCGGACTCCTAGAGGGGCG 55
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F AGCTCTTACGCGTGCTAGCCCG-GGGAAGCTCCGGACTCCTAGAGGGGCG 79
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F AGCTCTTACGCGTGCTAGCCCG-GGGAAGCTCCGGACTCCTAGAGGGGCG 81
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R AGCTCTTACGCGTGCTAGCCCGGGGAANGCTCCGGACTCCTAGAGGGGCG 550
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R AGCTCTTACGCGTGCTAGCCCGGGGAA-GCTCCGGACTCCTAGAGGGGCG 462
*****

hMC1R-Luc_SmaI GCCAGGTGGGGGCCCTGGTGACCAGGACAGACTGTGGTGTTTTTTAACGT 105
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F GCCAGGTGGGGGCCCTGGTGACCAGGACAGACTGTGGTGTTTTTTAACGT 129
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F GCCAGGTGGGGGCCCTGGTGACCAGGACAGACTGTGGTGTTTTTTAACGT 131
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R GCCAGGTGGGGGCCCTGGNNNCCAGGNCAGACTGTGGTGTNTNNAACGT 600
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R GCCAGGTGGGGGCCCTGGTGACCAGGACAGACTGTGGTGTTTTTTAACGT 512
*****

hMC1R-Luc_SmaI AAAGGAGATCCGCGGTGTGAGGGACCCCTGGGTCTGCACGCCCGCTGG 155
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F AAAGGAGATCCGCGGTGTGAGGGACCCCTGGGTCTGCACGCCCGCTGG 179
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F AAAGGAGATCCGCGGTGTGAGGGACCCCTGGGTCTGCACGCCCGCTGG 181
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R AAAGGAGATCCGCGGTGTGAGGGACCCCTGGGTCTGCACGCCCGCTGG 650
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R AAAGGAGATCCGCGGTGTGAGGGACCCCTGGGTCTGCACGCCCGCTGG 562
*****

hMC1R-Luc_SmaI TGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGTGCTCACGCCCCGGCATGTGGCCGCC 205
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F TGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGTGCTCACGCCCCGGCATGTGGCCGCC 229
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F TGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGTGCTCACGCCCCGGCATGTGGCCGCC 231
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R TGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGTGCTCACGCCCCGGCATGTGGCCGCC 700
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R TGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGTGCTCACGCCCCGGCATGTGGCCGCC 612
*****

hMC1R-Luc_SmaI TCAGTGGGAGGGGCTCTGAGAACGACTTTTTAAAACGCAGAGAAAAGCTC 255
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F TCAGTGGGAGGGGCTCTGAGAACGACTTTTTAAAACGCAGAGAAAAGCTC 279
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F TCAGTGGGAGGGGCTCTGAGAACGACTTTTTAAAACGCAGAGAAAAGCTC 281
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R TCAGTGGGAGGGGCTCTGAGAACGACTTTTTAAAACGCAGAGAAAAGCTC 750
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R TCAGTGGGAGGGGCTCTGAGAACGACTTTTTAAAACGCAGAGAAAAGCTC 662
*****

hMC1R-Luc_SmaI CATTCTTCCCAGGACCTCAGCGCAGCCCTGGCCCAGGAAGGCAGGAGACA 305
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F CATTCTTCCCAGGACCTCAGCGCAGCCCTGGCCCAGGAAGGCAGGAGACA 329
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F CATTCTTCCCAGGACCTCAGCGCAGCCCTGGCCCAGGAAGGCAGGAGACA 331
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R CATTCTTCCCAGGACCTCAGCGCAGCCCTGGCCCAGGAAGGCAGGAGACA 800
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R CATTCTTCCCAGGACCTCAGCGCAGCCCTGGCCCAGGAAGGCAGGAGACA 712
*****

hMC1R-Luc_SmaI GAGGCCAGGACGGTCCAGAGGTGTCGAAATGTCTGGGGACCTGAGCAGC 355
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F GAGGCCAGGACGGTCCAGAGGTGTCGAAATGTCTGGGGACCTGAGCAGC 379
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F GAGGCCAGGACGGTCCAGAGGTGTCGAAATGTCTGGGGACCTGAGCAGC 381
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R GAGGCCAGGACGGTCCAGAGGTGTCGAAATGTCTGGGGACCTGAGCAGC 850
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R GAGGCCAGGACGGTCCAGAGGTGTCGAAATGTCTGGGGACCTGAGCAGC 762
*****

```

```

hMC1R-Luc_SmaI          AGCCACCAGGGAAGAGGCAGGGAGGGAGCTGAGGACCAGGCTTGTTGTG 405
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F  AGCCACCAGGGAAGAGGCAGGGAGGGAGCTGAGGACCAGGCTTGTTGTG 429
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F  AGCCACCAGGGAAGAGGCAGGGAGGGAGCTGAGGACCAGGCTTGTTGTG 431
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R  AGCCACCAGGGAAGAGGCAGGGAGGGAGCTGAGGACCAGGCTTGTTGTG 900
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R  AGCCACCAGGGAAGAGGCAGGGAGGGAGCTGAGGACCAGGCTTGTTGTG 812
*****

hMC1R-Luc_SmaI          AGAATCCCTGAGCCCAGGCGGTAGATGCCAGGAGGTGTCTGGACTGGCTG 455
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F  AGAATCCCTGAGCCCAGGCGGTAGATGCCAGGAGGTGTCTGGACTGGCTG 479
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F  AGAATCCCTGAGCCCAGGCGGTAGATGCCAGGAGGTGTCTGGACTGGCTG 481
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R  AGAATCCCTGAGCCCAGGCGGTAGATGCCAGGAGGTGTCTGGACTGGCTG 950
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R  AGAATCCCTGAGCCCAGGCGGTAGATGCCAGGAGGTGTCTGGACTGGCTG 862
*****

hMC1R-Luc_SmaI          GGCCATGCCTGGGCTGACCTGTCCAGCCAGGGAGAGGGTGTGAGGGCAGA 505
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F  GGCCATGCCTGGGCTGACCTGTCCAGCCAGGGAGAGGGTGTGAGGGCAGA 529
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F  GGCCATGCCTGGGCTGACCTGTCCAGCCAGGGAGAGGGTGTGAGGGCAGA 531
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R  GGCCATGCCTGGGCTGACCTGTCCAGCCAGGGAGAGGGTGTGAGGGCAGA 1000
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R  GGCCATGCCTGGGCTGACCTGTCCAGCCAGGGAGAGGGTGTGAGGGCAGA 912
*****

hMC1R-Luc_SmaI          TCTGGGGGTGCCAGATGGAAGGAGGCAGGCATGGGGGACACCCAAGGCC 555
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F  TCTGGGGGTGCCAGATGGAAGGAGGCAGGCATGGGGGACACCCAAGGCC 579
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F  TCTGGGGGTGCCAGATGGAAGGAGGCAGGCATGGGGGACACCCAAGGCC 581
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R  TCTGGGGGTGCCAGATGGAAGGAGGCAGGCATGGGGGACACCCAAGGCC 1050
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R  TCTGGGGGTGCCAGATGGAAGGAGGCAGGCATGGGGGACACCCAAGGCC 962
*****

hMC1R-Luc_SmaI          CCCTGGCAGCACCATGAACTAAGCAGGACACCTGGAGGGGAAGAAGTGTG 605
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F  CCCTGGCAGCACCATGAACTAAGCAGGACACCTGGAGGGGAAGAAGTGTG 629
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F  CCCTGGCAGCACCATGAACTAAGCAGGACACCTGGAGGGGAAGAAGTGTG 631
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R  CCCTGGCAGCACCATGAACTAAGCAGGACACCTGGAGGGGAAGAAGTGTG 1100
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R  CCCTGGCAGCACCATGAACTAAGCAGGACACCTGGAGGGGAAGAAGTGTG 1012
*****

hMC1R-Luc_SmaI          GGGACCTGGAGGCCTCCAACGACTCCTTCCTGCTTCCTGGACAGGACTGT 655
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F  GGGACCTGGAGGCCTCCAACGACTCCTTCCTGCTTCCTGGACAGGACTGT 679
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F  GGGACCTGGAGGCCTCCAACGACTCCTTCCTGCTTCCTGGACAGGACTGT 681
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R  GGGACCTGGAGGCCTCCAACGACTCCTTCCTGCTTCCTGGACAGGACTGT 1150
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R  GGGACCTGGAGGCCTCCAACGACTCCTTCCTGCTTCCTGGACAGGACTGT 1062
*****

hMC1R-Luc_SmaI          CGACGCGTAGAATTCACACACTGG-----ACTAGTGGATCCGAGC 697
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F  CGACGCGTAGAATTCACACACTGGCGGCGGTTACTAGTGGATCCGAGC 729
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F  CGACGCGTANAATTCACACACTGGCGGCGGTTACTAGTGGATCCGAGC 731
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R  CGACGCGTAGAATTCACACACTGGCGGCGGTTACTAGNGGATCCGAGC 1200
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R  CGACGCGTAGAATTCACACACTGGCGGCGGTTACTAGTGGATCCGAGC 1112
*****

hMC1R-Luc_SmaI          TCGGTACCAAGCTTGGCATTCGGTACTGTGGTAAAGCCACCATGGAAG 747
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_F  TCGGTACCAAGCTTGGCATTCGGTACTGTGGTAAAGCCACCATGGAAG 779
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_F  TCGGTACCAAGCTTGGCATTCGGTACTGTGGTAAAGCCACCATGGAAG 781
hMC1R-Luc_SmaI_dig1-Luc_R  TCGGTACCAANNNNN-----CNNNNNNNNN----- 1225
hMC1R-Luc_SmaI_dig2-Luc_R  TCGGTACCAAGCNGNCAT-----CNNNNNNNNN----- 1141
*****

```





hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_R CTGACGAGGGGAGGGGTGAAGGGTGGGGCCTCTGGAGAGGGCAGGTCCCG 474  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_R CTGACGAGGGGAGGGGTGAAGGGTGGGGCCTCTGGAGAGGGCAGGTCCCG 455  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_R CTGACGAGGGGAGGGGTGAAGGGTGGGGCCTCTGGAGAGGGCAGGTCCCG 461  
hMC1R-Luc\_PstI CTGACGAGGGGAGGGGTGAAGGGTGGGGCCTCTGGAGAGGGCAGGTCCCG 572  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_F CTGACGAGGGGAGGGGTGAAGGGTGGGGCCTCTGGAGAGGGCAGGTCCCG 597  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_F CTGACGAGGGGAGGGGTGAAGGGTGGGGCCTCTGGAGAGGGCAGGTCCCG 596  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_F CTGACGAGGGGAGGGGTGAAGGGTGGGGCCTCTGGAGAGGGCAGGTCCCG 596  
\*\*\*\*\*

hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_R GGGAAAGCTCCGGACTCCTAGAGGGGCGGCCAGGTGGGGGCCCTGGTGACC 524  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_R GGGAAAGCTCCGGACTCCTAGAGGGGCGGCCAGGTGGGGGCCCTGGTGACC 505  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_R GGGAAAGCTCCGGACTCCTAGAGGGGCGGCCAGGTGGGGGCCCTGGTGACC 511  
hMC1R-Luc\_PstI GGGAAAGCTCCGGACTCCTAGAGGGGCGGCCAGGTGGGGGCCCTGGTGACC 621  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_F GGGAAAGCTCCGGACTCCTAGAGGGGCGGCCAGGTGGGGGCCCTGGTGACC 647  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_F GGGAAAGCTCCGGACTCCTAGAGGGGCGGCCAGGTGGGGGCCCTGGTGACC 646  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_F GGGAAAGCTCCGGACTCCTAGAGGGGCGGCCAGGTGGGGGCCCTGGTGACC 646  
\*\*\*\*\*

hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_R AGGACAGACTGTGGTGT TTTTAAACGTAAGGAGATCCCGGTTGTGAGGG 574  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_R AGGACAGACTGTGGTGT TTTTAAACGTAAGGAGATCCCGGTTGTGAGGG 555  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_R AGGACAGACTGTGGTGT TTTTAAACGTAAGGAGATCCCGGTTGTGAGGG 561  
hMC1R-Luc\_PstI AGGACAGACTGTGGTGT TTTTAAACGTAAGGAGATCCCGGTTGTGAGGG 671  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_F AGGACAGACTGTGGTGT TTTTAAACGTAAGGAGATCCCGGTTGTGAGGG 697  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_F AGGACAGACTGTGGTGT TTTTAAACGTAAGGAGATCCCGGTTGTGAGGG 696  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_F AGGACAGACTGTGGTGT TTTTAAACGTAAGGAGATCCCGGTTGTGAGGG 696  
\*\*\*\*\*

hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_R ACCCCCTGGGTCCTGCACGCCGCTGGTGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGT 624  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_R ACCCCCTGGGTCCTGCACGCCGCTGGTGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGT 605  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_R ACCCCCTGGGTCCTGCACGCCGCTGGTGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGT 611  
hMC1R-Luc\_PstI ACCCCCTGGGTCCTGCACGCCGCTGGTGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGT 721  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_F ACCCCCTGGGTCCTGCACGCCGCTGGTGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGT 747  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_F ACCCCCTGGGTCCTGCACGCCGCTGGTGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGT 746  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_F ACCCCCTGGGTCCTGCACGCCGCTGGTGGCAGGCCGGGCCATGGTGGGT 746  
\*\*\*\*\*

hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_R GCTCAGCCCCCGGCATGTGGCCGCCCTCAGTGGGAGGGGCTCTGAGAAC 674  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_R GCTCAGCCCCCGGCATGTGGCCGCCCTCAGTGGGAGGGGCTCTGAGAAC 655  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_R GCTCAGCCCCCGGCATGTGGCCGCCCTCAGTGGGAGGGGCTCTGAGAAC 661  
hMC1R-Luc\_PstI GCTCAGCCCCCGGCATGTGGCCGCCCTCAGTGGGAGGGGCTCTGAGAAC 771  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_F GCTCAGCCCCCGGCATGTGGCCGCCCTCAGTGGGAGGGGCTCTGANAAC 797  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_F GCTCAGCCCCCGGCATGTGGCCGCCCTCAGTGGGAGGGGCTCTGAGAAC 796  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_F GCTCAGCCCCCGGCATGTGGCCGCCCTCAGTGGGAGGGGCTCTGAGAAC 796  
\*\*\*\*\*

hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_R GACTTTTTAAACGCAGAGAAAAGCTCCATTCTTCCCAGGACCTCAGCGC 724  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_R GACTTTTTAAACGCAGAGAAAAGCTCCATTCTTCCCAGGACCTCAGCGC 705  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_R GACTTTTTAAACGCAGAGAAAAGCTCCATTCTTCCCAGGACCTCAGCGC 711  
hMC1R-Luc\_PstI GACTTTTTAAACGCAGAGAAAAGCTCCATTCTTCCCAGGACCTCAGCGC 821  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_F GACTTTTTAAACGCANAGAAAAGCTCCATTCTTCCCAGGACCTCAGCGC 847  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_F GACTTTTTAAACGCANAGAAAAGCTCCATTCTTCCCAGGANCTCAGCGC 846  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_F GACTTTTTAAACGCAGAGAAAAGCTCCATTCTTCCCAGGACCTCAGCGC 846  
\*\*\*\*\*

hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_R AGCCCTGGCCCAGGAAGGCAGGAGACAGAGGCCAGGACGGTCCAGAGGTG 774  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_R AGCCCTGGCCCAGGAAGGCAGGAGACAGAGGCCAGGACGGTCCAGAGGTG 755  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_R AGCCCTGGCCCAGGAAGGCAGGAGACAGAGGCCAGGACGGTCCAGAGGTG 761  
hMC1R-Luc\_PstI AGCCCTGGCCCAGGAAGGCAGGAGACAGAGGCCAGGACGGTCCAGAGGTG 871  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_F AGCCCTGGCCCAGGAAGGCANGANACAGAGGCCAGGACGGTCCAGAGGTG 897  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_F ANCCCTGGCCCAGGAANNNNNG-ANAGAGGCCAGGACGGTCCAGANGTG 895  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_F AGCCCTGGCCCAGGAAGGCAGGAGACAGNN-NCAGGANGGTCCANAGGTG 895  
\*..\*\*\*\*\*.. . . . \* \* \* . \*\*\*\*\* \* ..\*\*\*

hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_R TCGAAATGTCTGGGACCTGAGCAGCAGCCACCAGGGAAGAGGCAGGGA 824  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_R TCGAAATGTCTGGGACCTGAGCAGCAGCCACCAGGGAAGAGGCAGGGA 805  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_R TCGAAATGTCTGGGACCTGAGCAGCAGCCACCAGGGAAGAGGCAGGGA 811  
hMC1R-Luc\_PstI TCGAAATGTCTGGGACCTGAGCAGCAGCCACCAGGGAAGAGGCAGGGA 921  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig1-Luc\_F TCNAATGTCTGGGANCCTGAGCANCANCCACCAGGGAANNNNAGGG-A 946  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig2-Luc\_F TCGAAATGTCTGGGACCTGAGCAGCANCANCCACCAGGGAANAGGNAGG-A 944  
hMC1R-Luc\_PstI\_dig3-Luc\_F TCGAAATGTCTGGGANCCTGAGCAGCAGCCACCAGGGAANANGCAGGGA 945  
\*\*..\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*..\*\*..\*\*\*\*\*.. ..\*\* \*

