

UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR B E INMUNOLOGÍA



**DETERMINANTES ESTRUCTURALES DEL PROCESAMIENTO
Y LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE TIROSINASA**

Memoria presentada por la Licenciada de Grado
D^a M^a Concepción Olivares Sánchez
para optar al grado de Doctora en Bioquímica

Murcia, Julio de 2003

M^a C. Olivares Sánchez ha disfrutado de una beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario del M.E.C. (2000-2003)

El trabajo experimental expuesto en la presente Memoria ha sido subvencionado con cargo a los proyectos PM99-0138 y BIO2001-0140 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología

Algunos de los resultados expuestos en esta Memoria han dado lugar a los siguientes artículos:

1. **Olivares, C.**, Jiménez-Cervantes, C., Lozano, J. A., Solano, F. y García-Borrón, J. C. (2001) The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem J* **354** (1), 131-139.
2. **Olivares, C.**, García-Borrón, J. C. y Solano, F. (2002) Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* **41** (2), 679-686.
3. **Olivares, C.**, Solano, F. y García-Borrón, J. C. (2003) Conformation-dependent post-translational glycosylation of tyrosinase. Requirement of a specific interaction involving the CuB metal binding site. *J Biol Chem* **278** (18), 15735-15743.
4. **Olivares, C.**, Solano, F. y García-Borrón, J. C. Direct evidence for the ability of the MeA site of Tyrp1 to bind copper and support proper folding and tyrosinase enzymatic activities (Manuscrito en preparación).

A mis padres

ÍNDICE

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ABREVIATURAS..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 1. LA PIEL. ESTRUCTURA Y TIPOS CELULARES..... | 5 |
| 2. LOS MELANOCITOS..... | 5 |
| 3. EL MELANOSOMA..... | 8 |
| 4. MELANINAS: TIPOS, BIOSÍNTESIS Y CARACTERÍSTICAS..... | 10 |
| 4.1. RUTA DE RAPER-MASON. BIOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA DE EUMELANINAS..... | 10 |
| 4.2. BIOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA DE FEOMELANINAS..... | 13 |
| 4.3. FUNCIÓN DE LAS MELANINAS..... | 15 |
| 5. ENZIMAS DE LA MELANOGÉNESIS..... | 16 |
| 5.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES COMUNES A LAS TYRPS..... | 17 |
| 5.2. TIROSINASA (<i>LOCUS ALBINO</i>)..... | 20 |
| 5.3. PROTEÍNA RELACIONADA CON TIROSINASA-1, TYRP1 (<i>LOCUS BROWN</i>)..... | 22 |
| 5.4. PROTEÍNA RELACIONADA CON TIROSINASA-2, TYRP2/DCT (<i>LOCUS SLATY</i>)..... | 22 |
| 6. REGULACIÓN DE LA MELANOGÉNESIS..... | 24 |
| 7. CENTRO ACTIVO Y MECANISMO CATALÍTICO DE TIROSINASA..... | 30 |
| 8. PROCESAMIENTO DE TIROSINASA: N-GLICOSILACIÓN..... | 33 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA..... | 39 |
| | |
| OBJETIVOS..... | 55 |
| | |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 59 |
| 1. REACTIVOS..... | 61 |
| 2. CULTIVO DE CÉLULAS Y PREPARACIÓN DE EXTRACTOS..... | 62 |
| 3. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR..... | 64 |
| 4. MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS..... | 64 |
| 4.1. ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA (TH)..... | 64 |
| 4.2. ACTIVIDAD DOPA OXIDASA (DO)..... | 66 |
| 4.3. ACTIVIDAD DHICA OXIDASA..... | 66 |
| 4.4. ACTIVIDAD DOPACROMO TAUTOMERASA (DCT)..... | 67 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5. CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS..... | 68 |
| 5.1. TIROSINA HIDROXILASA..... | 68 |
| 5.2. DOPA OXIDASA..... | 69 |
| 6. PURIFICACIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA..... | 69 |
| 6.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA..... | 69 |
| 6.2. ELECTROFORESIS DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA..... | 70 |
| 7. CLONACIÓN DE GENES..... | 70 |
| 7.1. AMPLIFICACIÓN DE GENES SILVESTRES A PARTIR DE cDNA..... | 70 |
| 7.2. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES Y QUIMERAS MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA..... | 73 |
| 7.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN..... | 77 |
| 7.4. SELECCIÓN DE RECOMBINANTES..... | 78 |
| 8. EXPRESIÓN DE ENZIMAS MELANOGÉNICAS EN CÉLULAS HETERÓLOGAS..... | 78 |
| 9. TRATAMIENTOS CON ENDOGLICOSIDASAS..... | 79 |
| 10. EXPERIMENTOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN..... | 79 |
| 11. ELECTROFORESIS ANALÍTICA..... | 80 |
| 12. WESTERN BLOT..... | 81 |
| 13. BIBLIOGRAFÍA..... | 83 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 85 |
| CAPÍTULO I: LA ACTIVIDAD DHICA OXIDASA DE LA TIROSINASA HUMANA..... | 87 |
| 1. ACTIVIDADES MELANOGÉNICAS EN CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO QUE EXPRESAN O CARECEN DE TYRP1..... | 90 |
| 2. EL CONSUMO DE DHICA POR EXTRACTOS CELULARES DE MELANOMAS HUMANOS TIENE LUGAR POR OXIDACIÓN Y ACELERA LA FORMACIÓN DE MELANINAS..... | 92 |
| 3. EL DHICA ACTÚA COMO COFACTOR DE TYR DE EXTRACTOS DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO..... | 94 |
| 4. EL DHICA ES OXIDADO POR TYR EXPRESADA TRANSITORIAMENTE EN CÉLULAS COS7..... | 96 |
| 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES..... | 99 |
| CAPÍTULO II: AMINOÁCIDOS DEL CENTRO ACTIVO IMPLICADOS EN LA UNIÓN DEL COFACTOR Y DE LOS SUSTRATOS. CICLO CATALÍTICO DE TIROSINASA..... | 105 |
| 1. CUANTIFICACIÓN Y COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS TIROSINASAS SILVESTRE Y MUTANTES EN CÉLULAS TRANSFECTADAS..... | 108 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2. LAS MUTACIONES Q378H, H389L Y H390Q DEL SITIO CUB TIENEN MAYOR IMPACTO EN LA ACTIVIDAD DE TIROSINASA QUE LAS MUTACIONES S192A Y E193Q DEL SITIO CUA..... | 110 |
| 3. CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE TYR DEBIDOS A MUTACIONES EN CUB NO ESTÁN RELACIONADOS CON UNA ALTERACIÓN SIGNIFICATIVA DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA..... | 112 |
| 4. PARÁMETROS CINÉTICOS Y ESTEREOESPECIFICIDAD DE LAS TIROSINASAS WT Y MUTANTES..... | 114 |
| 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES..... | 117 |
| | |
| CAPÍTULO III: EL PAPEL DE LA N-GLICOSILACIÓN EN LA MADURACIÓN DE TIROSINASA..... | 125 |
| 1. EXPRESIÓN Y PROCESAMIENTO DE TYR Y TYRP1 WT EN CÉLULAS HEK 293T..... | 128 |
| 2. CONSTRUCCIONES QUIMÉRICAS DE TYR Y TYRP1 MUESTRAN LA EXISTENCIA DE SITIOS DE GLICOSILACIÓN DEPENDIENTES DE CONFORMACIÓN..... | 130 |
| 3. EL CORRECTO PROCESAMIENTO DE TYR DEPENDE DE UNA INTERACCIÓN MUY ESPECÍFICA EN LA QUE PARTICIPA EL SITIO CUB..... | 132 |
| 4. LA OCUPACIÓN DEL SECUÓN DEL SITIO CUB NO ES IMPRESCINDIBLE PARA UNA MADURACIÓN COMPLETA DE TYR NI PARA LA UNIÓN DE COFACTOR..... | 135 |
| 5. LA SUSTITUCIÓN DEL CUA DE TYR POR EL CENTRO MEA DE TYRP1 NO IMPIDE LA CORRECTA GLICOSILACIÓN DEL MUTANTE Y ES ENZIMÁTICAMENTE ACTIVO..... | 137 |
| 6. OCUPACIÓN DE LOS SECUONES DE GLICOSILACIÓN EN TIROSINASA..... | 138 |
| 7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES..... | 139 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 149 |
| | |
| CONCLUSIONES..... | 157 |
| | |
| SUMMARY..... | 161 |
| 1. INTRODUCTION..... | 163 |
| 1.1. COMPARISON BETWEEN THE HUMAN AND THE MURINE MELANOGENIC ENZYMES..... | 164 |
| 1.2. ACTIVE SITE RESIDUES OF MOUSE TYROSINASE. CATALYTIC CYCLE..... | 165 |
| 1.3. GLYCOSYLATION OF MOUSE TYROSINASE..... | 167 |
| 1.4. AIMS..... | 168 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| 2. EXPERIMENTAL PROCEDURES..... | 169 |
| 3. RESULTS AND DISCUSSION..... | 173 |
| 3.1. HUMAN (BUT NOT MOUSE) TYR DISPLAYS DHICA OXIDASE ACTIVITY..... | 173 |
| 3.2. FUNCTIONAL INEQUIVALENCE OF THE METAL BINDING SITES IN TYR..... | 178 |
| 3.3. CONFORMATION-DEPENDENT GLYCOSYLATION OF TYROSINASE..... | 186 |
| 4. CONCLUSIONS..... | 195 |
| 5. BIBLIOGRAPHY..... | 196 |

APÉNDICE I..... 201

APÉNDICE II: PUBLICACIONES..... 211

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. OLIVARES, C., JIMÉNEZ-CERVANTES, C., LOZANO, J. A., SOLANO, F. Y GARCÍA-BORRÓN, J. C. (2001) <i>BIOCHEM J</i> 354 (1), 131-139..... | 213 |
| 2. OLIVARES, C., GARCÍA-BORRÓN, J. C. Y SOLANO, F. (2002) <i>BIOCHEMISTRY</i> 41 (2), 679-686..... | 223 |
| 3. OLIVARES, C., SOLANO, F. Y GARCÍA-BORRÓN, J. C. (2003) <i>J BIOL CHEM</i> 278 (18), 15735-15743..... | 233 |

En la siguiente relación de abreviaturas sólo se definen las que, por ser poco comunes o muy específicas del campo de esta Tesis, no están recogidas en la lista recomendada por los comités internacionales de nomenclatura bioquímica (IUPAC-IUBMB), que se puede consultar en <http://www.biochemj.org/bj/bji2a.htm#NOMENCLATURE>.

Siguiendo el criterio internacional, los símbolos de los genes y proteínas humanos se escriben con mayúsculas, y los de ratón con minúsculas.

ACTH: hormona adrenocorticotrópica.

ASIP/ASP: Agouti signal protein.

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico.

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico.

DCT: Dopacromo tautomerasa.

DHI: 5,6-dihidroxiindol.

DHICA: Ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico.

DMEM: Medio mínimo esencial de Dulbecco.

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato.

DO: Dopa oxidasa.

Dopa: 3,4-dihidroxifenilalanina.

DTT: Ditioneitol.

EMEM: Medio mínimo esencial modificado con sales de Earle.

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.

MEM: Medio esencial mínimo.

MC1R/Mc1r: Receptor de melanocortinas 1.

MITF: Factor de transcripción asociado a Microphthalmia.

α MSH: Hormona estimulante del melanocito.

PKA: Proteín quinasa A.

PKC: Proteín quinasa C.

POMC: Proopiomelanocortina.

PTU: Feniltiourea.

SBF: Suero bovino fetal.

TCA: Ácido tricloroacético.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.

TGN: red *trans*-Golgi (*trans*-Golgi network).

TH: Tirosina hidroxilasa.

TNF α : Factor de necrosis tumoral α .

TSH: Hormona estimulante del tiroides.

TYR/Tyr: Tirosinasa.

TYRP/Tyrp: Proteína relacionada con tirosinasa.

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

INTRODUCCIÓN

1. LA PIEL. ESTRUCTURA Y TIPOS CELULARES.

La piel es el órgano más extenso del hombre (entre 2 y 2.5 m²), que recubre y protege toda la superficie del cuerpo. Su función principal es la protección de los tejidos subyacentes contra los agentes externos, aunque su metabolismo es activo y no debe considerarse una simple barrera física. Está compuesta por un tejido conjuntivo, la dermis, y un tejido epitelial, la epidermis, que están separados por una membrana basal (Figura 1).

La dermis está constituida principalmente por fibroblastos, que sintetizan los componentes de la matriz extracelular (fibras de colágeno y de elastina), mientras que la epidermis es un epitelio pluriestratificado y queratinizado que asegura en gran parte la función protectora de la piel y que está constituida por varios tipos celulares: los queratinocitos, que son el tipo celular más abundante (representan un 85-90% de las células epidérmicas) y sintetizan queratinas; las células de Merkel (1-2%), que actúan como receptores sensoriales cutáneos; las células dendríticas (células de Langerhans, 3-4%), mastocitos y macrófagos (1-2%), principales responsables de la respuesta inmunitaria epidérmica; y los melanocitos (4-5%), que son células muy especializadas localizadas a nivel de la membrana basal de la epidermis, y cuya principal función es la producción de pigmentos polifenólicos, las melaninas.¹

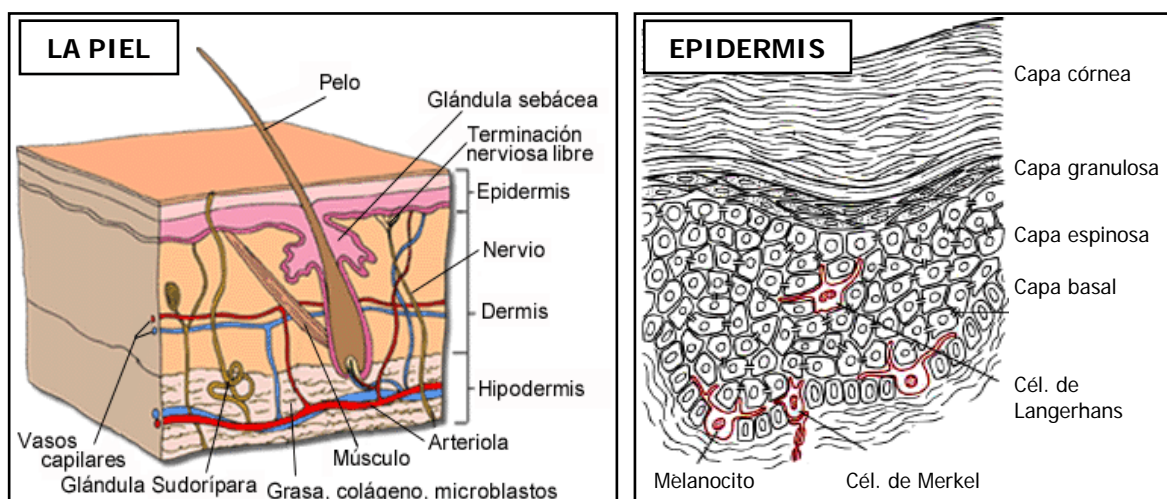


Figura 1. Esquema de organización de la piel (izquierda) y detalle de la epidermis (derecha).

2. LOS MELANOCITOS.

Los melanocitos están localizados en la membrana basal de la epidermis, los folículos pilosos, la cóclea (oído) y la úvea (ojo). Se trata de células altamente especializadas que, junto a las del epitelio retinal pigmentado (consideradas por algunos

autores como un tipo especial de melanocitos), son las únicas capaces de sintetizar y excretar gránulos de melaninas a través de prolongaciones dendríticas. Esta especialización se manifiesta por la expresión exclusiva de determinadas proteínas indispensables para la biosíntesis de melaninas.^{2,3,4,5,6,7} Los melanocitos son de origen ectodérmico y se diferencian a partir de una población de melanoblastos que se originan, al igual que las neuronas, en la cresta neural,⁸ desde donde migran para ir alcanzando las distintas localizaciones corporales. Los melanoblastos que consiguen alcanzar el entorno correcto maduran hasta melanocitos funcionalmente activos, aunque los mecanismos específicos de migración y diferenciación de los melanoblastos todavía no se comprenden completamente.^{9,10}

Los humanos presentan más de veinte millones de melanocitos regularmente distribuidos por toda la superficie epidérmica, y otros tantos localizados en los folículos pilosos, que son los responsables del color del pelo. El tamaño y la forma de los melanocitos epidérmicos en condiciones basales, es decir, en ausencia de estímulos melanogénicos, varía en función de su densidad en un área determinada: en zonas con pocos melanocitos, éstos tienen muchas prolongaciones dendríticas y largas y el cuerpo celular recuerda al de las neuronas del sistema nervioso central, mientras que en regiones donde la densidad de melanocitos es muy alta, éstos presentan menor número de prolongaciones dendríticas, más cortas, y una forma redondeada.¹

Melanocitos y queratinocitos mantienen en la capa basal de la epidermis un íntimo contacto físico. El pigmento melánico se encuentra confinado dentro de unas vesículas membranosas, los melanosomas, que son orgánulos específicos de melanocitos en los que tiene lugar la biosíntesis de melaninas. Los melanosomas son transportados hasta las dendritas de los melanocitos para transferirse después a los queratinocitos. Este proceso de transferencia y distribución de los melanosomas desde los melanocitos hasta los queratinocitos parece transcurrir mediante fagocitosis por los queratinocitos de las dendritas melanocíticas cargadas de melanosomas, si bien el mecanismo por el que tiene lugar no está bien caracterizado.^{11,12,13} Está fuera de duda que los queratinocitos juegan un papel activo en el control de la velocidad de síntesis de las melaninas por los melanocitos, a través de la producción y secreción de factores paracrinos,¹⁴ aunque el tipo y modo de acción de los mismos sea aún poco conocido por su complejidad. Una vez en los queratinocitos, las hidrolasas lisosomales de estas células degradan los melanosomas a la vez que los queratinocitos migran a la superficie de la epidermis, lo que reduce a las melaninas a partículas pequeñas que son más eficaces apantallando la radiación ultravioleta.¹⁵ En su

conjunto, este proceso asegura la distribución de los pigmentos melánicos por toda la piel, a pesar del relativamente escaso número de melanocitos presentes en la misma. Así, puesto que el número de melanocitos apenas varía entre individuos de distintas etnias, el grado de pigmentación de la piel depende del número, tamaño y densidad de los melanosomas en los queratinocitos.

Como resultado de la estrecha relación que cada melanocito epidérmico establece con los queratinocitos con los que contacta a través de sus dendritas, se ha definido el concepto de unidad melano-epidérmica (Figura 2), que contempla un tipo de organización estructural y funcional de ambos tipos celulares a un nivel biológico superior que el de una célula individual. Se estima que cada unidad melano-epidérmica está constituida por un melanocito y 15-20 queratinocitos de la capa basal epidérmica.¹⁶

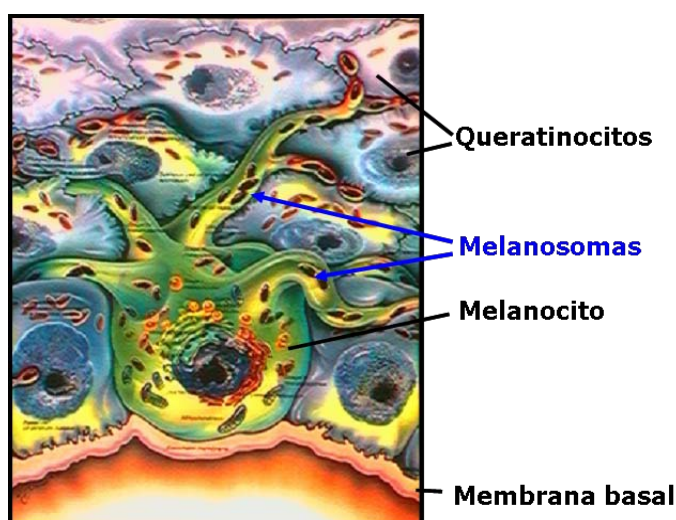


Figura 2. Unidad Melano-Epidérmica. Se muestra un melanocito y varios queratinocitos circundantes.

A pesar de que los melanocitos se hallan mayoritariamente localizados en epidermis y bulbos pilosos, también existe un grupo numeroso de melanocitos extracutáneos, presentes en el oído interno (cóclea) y en el ojo. Los melanocitos oculares, parcialmente responsables del color de los ojos, se han clasificado tradicionalmente en dos grupos: melanocitos uveales y del epitelio retinal pigmentado, pero la afirmación de que estas últimas células sean auténticos melanocitos es bastante controvertida, pues presentan apreciables diferencias morfológicas relacionadas con su origen y desarrollo. También se ha descrito la presencia de melanocitos, aunque en un número muy reducido, en determinadas áreas del cerebro, entre ellas la *substantia nigra* y el *locus ceruleus*, así como en el hígado y la mucosa oral.¹⁷

3. EL MELANOSOMA.

El melanosoma es el orgánulo específico para la síntesis, almacenamiento y transporte de melaninas, por lo que su biogénesis es exclusiva de los melanocitos. La melanogénesis requiere un orgánulo especializado porque en su transcurso tienen lugar reacciones de hidroxilación y oxidación que producen intermedios muy reactivos que, por su carácter oxidante, serían nocivos para los propios componentes celulares si no se encontraran compartimentalizados en los melanosomas,^{18,19,20} y porque el control de la velocidad del proceso depende de un entorno muy característico, como la presencia de pH más o menos ácido,^{21,22} que está controlado dentro de los melanosomas según el patrón de expresión de proteínas que actúan como bombas de protones. Generalmente, los melanocitos epidérmicos contienen dos tipos de melanosomas: los eumelanosomas y los feomelanosomas. Los eumelanosomas son bastante más alargados o elipsoidales, con una matriz proteica muy ordenada que es esencial para la producción de pigmentos marrones y negros (eumelaninas), mientras que los feomelanosomas son más pequeños y redondeados, no presentan matriz ordenada, sino que están constituidos por agregación de vesículas, y en ellos se sintetizan las feomelaninas (rojizas-amarillentas).²³

La biogénesis del melanosoma es un proceso complejo y altamente regulado.^{24,25} Algunos autores sostienen que el melanosoma está íntimamente relacionado con el lisosoma, presente en todo tipo de células y con el que comparte un gran número de características estructurales y bioquímicas, incluyendo la presencia de proteínas lisosomales solubles y de membrana, un pH ácido en el lumen y la capacidad de fusionarse con fagosomas.^{26,27} Así, los melanosomas podrían considerarse lisosomas modificados y no sería necesaria la existencia de una ruta de distribución de proteínas especializada para generarlos. Esta afirmación está apoyada en la presencia de actividad tirosinasa en vesículas cubiertas de clatrina asociadas al TGN²⁸ y por el hecho de que proteínas melanogénicas como tirosinasa y Tyrp1 se localizan en lisosomas y endosomas tardíos al ser transfectadas en células de tipo no pigmentario, exentas de melanosomas.^{29,30} Por el contrario, otros autores sugieren que los melanosomas presentan importantes diferencias en su biogénesis con respecto a los lisosomas, ya que si ambos orgánulos coexisten en los melanocitos su segregación debe mantenerse mediante pautas de diferenciación especializadas. Esta hipótesis está apoyada por la presencia en tirosinasa de señales de distribución distintas a las de las proteínas lisosomales²⁹ y por el hecho de que los melanosomas maduran en etapas claramente diferenciadas, lo que implicaría una ruta específica que asegurara la sucesión de estos pasos discretos del desarrollo del melanosoma.²²

Así, actualmente se acepta que los precursores directos de los melanosomas son orgánulos endosomales tempranos procedentes del TGN, y no vesículas formadas a partir del retículo endoplásmico liso, como se había creído durante muchos años.^{27,31,32} Estos orgánulos constituyen un linaje diferente al de lisosomas y endosomas debido al conjunto de proteínas específicas que presentan²² y a que los melanocitos emplean múltiples estrategias de entrega de las proteínas residentes melanosomales diferentes a las que se emplean en la ruta de los endosomas tardíos y los lisosomas (Figura 3).

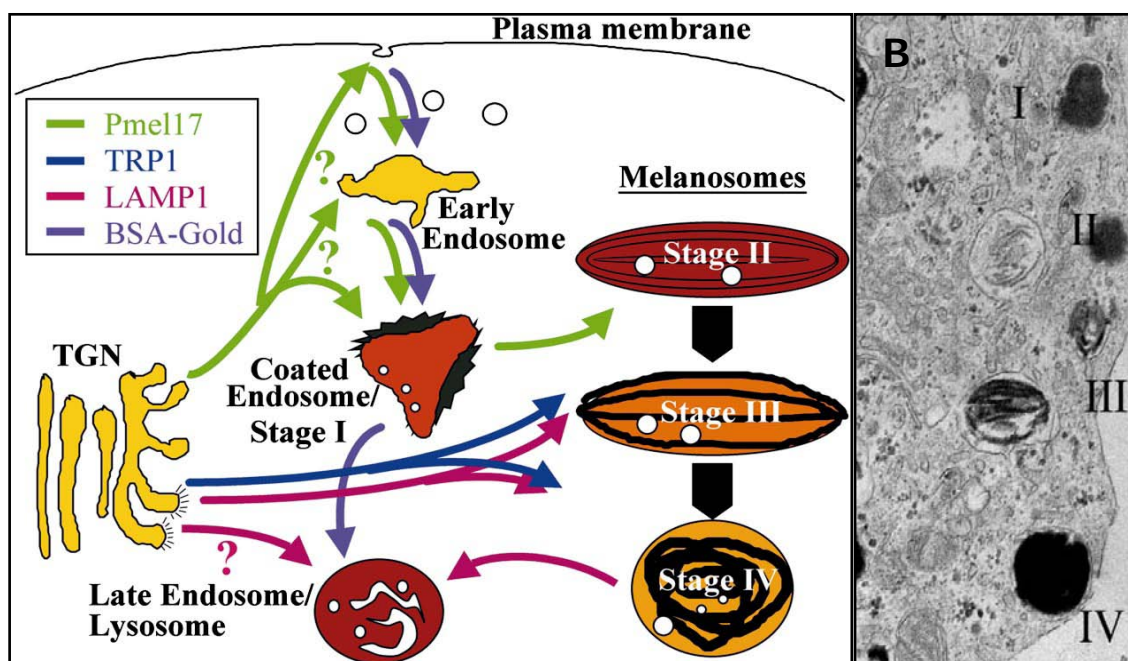


Figura 3. Melanosomas. (A) Modelo para transporte en los sistemas endosomal y melanosomal en células melanocíticas, en el que se representa el tráfico de las proteínas melanosomales entre los distintos orgánulos, así como los estadios de maduración de los melanosomas. Las proteínas del recuadro superior izquierdo representan marcadores de los compartimentos: Pmel17, premelanosoma; Tyrp1, melanosoma maduro; LAMP1, endosoma tardío/lisosoma; y BSA-gold (BSA-oro), que indica la vía endo-lisósomica (Tomado de Raposo et al., 2001).²² (B) Micrografía electrónica de células de melanoma con melanosomas en los cuatro estadios de desarrollo.

Las proteínas enzimáticas necesarias para la síntesis de melaninas, entre ellas tirosinasa, Tyrp1 y Tyrp2/Dct, se van incorporando al premelanosoma, por medio de pequeñas vesículas forradas de clatrina procedentes también del TGN [el procesamiento de las enzimas melanogénicas se comenta con más detalle en el apartado 7 de esta introducción]. Estas vesículas recubiertas transfieren las enzimas a los premelanosomas que contienen ya las proteínas estructurales,²⁸ transformándolos en melanosomas activos, donde comienza el proceso de síntesis y acúmulo del pigmento. Estudios morfológicos de este proceso han conducido al establecimiento de cuatro etapas en el desarrollo y la

maduración de los melanosomas (I a IV): en las etapas iniciales de desarrollo, los premelanosomas carecen de actividad melanogénica y consisten en estructuras vesiculares con membranas internas, muy similares en morfología a los endosomas tempranos (estadio I). Los estadios II y III corresponden a un melanosoma melanogénicamente activo con sus componentes dispuestos de forma ordenada y activo, que se va relleno de melaninas hasta alcanzar el estadio IV, en que es una partícula electrón-densa, completamente cargada de pigmentos y que prácticamente ha perdido la actividad tirosinasa (Figura 3).^{27,33} Los gránulos completamente melanizados, que no presentan diferencias morfológicas con el melanosoma en estadio IV, se concentran en la periferia de la membrana plasmática de los melanocitos, preferentemente en las dendritas, gracias al transporte a lo largo de filamentos de actina mediado por miosina Va y la GTPasa Rab27a.^{34,35} A continuación, son captados por los queratinocitos circundantes, que favorecen su distribución por la epidermis y que, al igual que el número, tipo y tamaño de los melanosomas, están genéticamente controlados.^{36,37}

4. MELANINAS: TIPOS, BIOSÍNTESIS Y CARACTERÍSTICAS.

Las melaninas producidas en los melanocitos de mamífero se clasifican históricamente en tres grupos, en función de su estructura y solubilidad en distintos solventes: eumelaninas, feomelaninas y tricocromos. Las diferencias en las propiedades físico-químicas de los compuestos de cada uno de estos grupos son consecuencia de las etapas finales de la vía biosintética, que determinan su estructura, composición, tamaño y, en última instancia, el color del pigmento.^{38,39}

Las eumelaninas son pigmentos de masa molecular relativamente alta, de color negro o pardo e insolubles en todos los disolventes. Las feomelaninas son solubles en medio básico, tienen un color amarillento-rojizo, y, a diferencia de las eumelaninas, presentan azufre en su composición. Estos dos grupos son los más importantes, ya que los tricocromos, pigmentos de pequeño tamaño y color rojizo muy relacionados con las feomelaninas, son poco frecuentes en mamíferos, por lo que no serán tratados en esta memoria.

Las estructuras y propiedades de los pigmentos melánicos se comprenderán mejor tras una breve descripción de su ruta biosintética.

4.1. Ruta de Raper-Mason. Biosíntesis y estructura de eumelaninas.

La biosíntesis de las melaninas en mamíferos transcurre a través de una ruta enzimática compleja, cuyas líneas generales fueron postuladas inicialmente por Raper (1928)⁴⁰ y confirmadas dos décadas después por Mason (1948),⁴¹ de modo que la ruta se

conoce como vía de Raper-Mason. En ella, sólo se consideraba la participación de la única enzima implicada que se conocía entonces, la tirosinasa, aunque posteriormente se identificaron e incluyeron otras. Así, en mamíferos, las principales proteínas responsables de la catálisis del proceso son tres metaloenzimas muy semejantes entre sí: tirosinasa y las proteínas relacionadas con tirosinasa (Tyrps) 1 y 2. Esta ruta consiste en un conjunto de reacciones todavía no completamente definidas en sus etapas finales (Figura 4), cuyos aspectos esenciales pueden resumirse como sigue.

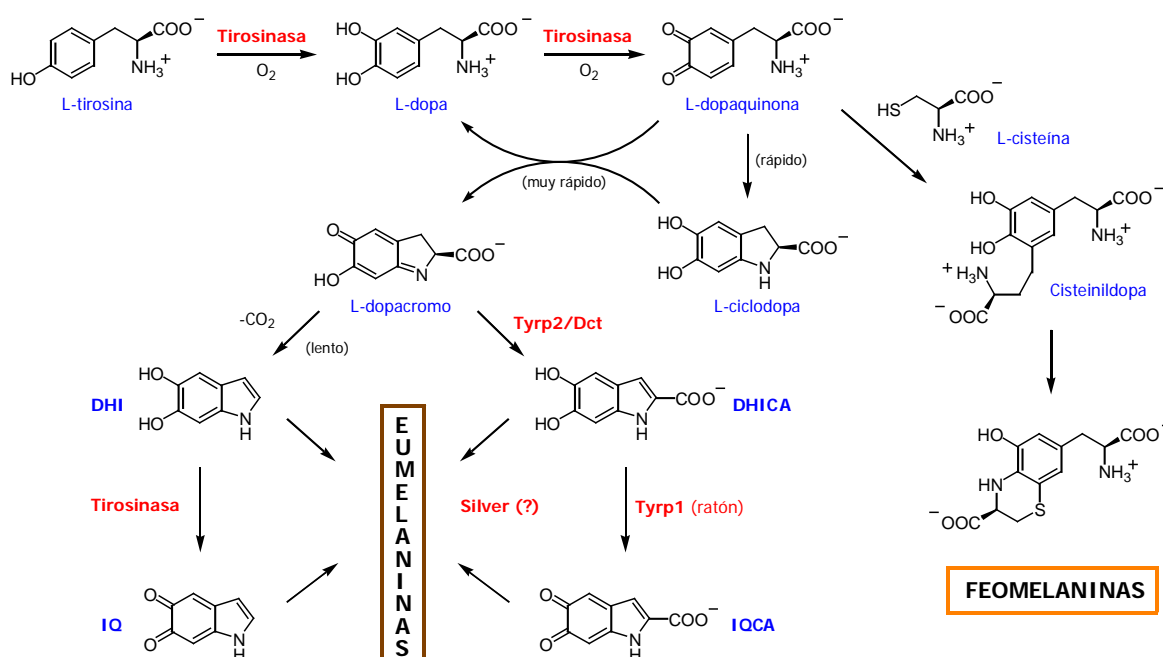


Figura 4. Esquema de la **ruta melanogénica** y estructuras de los principales intermediarios.

La enzima tirosinasa (EC 1.14.18.1), en dos oxidaciones sucesivas, transforma el aminoácido L-tirosina en o-dopaquinona. Estas etapas son comunes a la biosíntesis de eumelaninas y de feomelaninas.⁴² Así, la biosíntesis de ambos tipos de pigmentos comienza con la hidroxilación de L-tirosina para dar L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa), y la oxidación de éste para producir o-dopaquinona. De acuerdo con el mecanismo catalítico aceptado hasta el momento, que se discutirá en el apartado 7 de esta introducción, se trata de dos reacciones acopladas que transcurren sin que tenga lugar la salida del producto intermedio del centro activo de la enzima bifuncional.⁴³

En condiciones de bajo contenido en compuestos con grupos sulfhidrilo, como en los melanosomas eumelánicos, la o-dopaquinona sufre una ciclación espontánea que conduce a leucodopacromo o ciclodopa.^{44,45} A continuación tiene lugar una reacción de dismutación mediante una oxidación-reducción entre dopaquinona (DQ) y leucodopacromo para rendir

dopacromo (DC) y L-dopa.⁴⁵ El DC puede descarboxilarse lenta y espontáneamente hasta 5,6-dihidroxiindol (DHI), o bien puede ser reorganizado rápidamente a ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA) por la enzima dopacromo tautomerasa (E.C. 5.3.3.12) (Dct), también denominada Tyrp2.^{46,47,48} Puesto que el paso de DC a DHI es espontáneo, se obtienen siempre mezclas de DHI y DHICA, tanto más ricas en este último cuanto mayor sea la actividad tautomerasa presente en el medio. Por otra parte, algunos cationes metálicos también aceleran la evolución de DC a mezclas de DHI y DHICA,^{49,50} aunque su eficacia catalítica molar es mucho menor que la de Dct. La enzima es más específica en cuanto al producto obtenido que, a diferencia de los cationes libres, es únicamente DHICA.⁵¹ Posteriormente, la catecol-O-metil transferasa conduce a la formación de derivados metoxilados de DHICA,⁵² cuyos grupos hidroxilo están así protegidos frente a nuevas oxidaciones y son excretados en lugar de incorporados al pigmento melánico. De este modo, es posible detectar en orina estos derivados metoxilados del DHICA, a concentraciones especialmente elevadas en pacientes con melanoma⁵³ y en mucha mayor proporción que el propio DHICA libre.⁵⁴

Las siguientes etapas de la vía, que conducen desde una mezcla de difenoles indólicos hasta el polímero melánico, están peor caracterizadas. Se trata de un conjunto de reacciones de oxidación y polimerización en las que participan muchos de los intermedios ya descritos. Parece claro que el DHI se oxida a indol-5,6-quinona (IQ),⁵⁵ que es un compuesto altamente reactivo que evoluciona espontáneamente a la formación de un "melanocromo" (dímero resultante de la conjugación de dos indoles). Esta reacción puede producirse por dos mecanismos: de forma espontánea, puesto que el DHI es un *o*-difenoil fácilmente oxidable, o catalizada por la propia tirosinasa, que acelera su oxidación y la posterior dimerización de dos unidades.^{56,57}

Por el contrario, el DHICA es un *o*-difenoil más estable que el DHI y su velocidad de oxidación espontánea es baja, sobre todo al pH relativamente ácido que parece existir en el melanosoma,^{21,58} por lo que este mecanismo debe descartarse como explicación a la incorporación del DHICA a las melaninas. Además, DHICA no parece ser reconocido ni oxidado por tirosinasa de ratón,⁵⁹ y aunque sí puede ser oxidado eficientemente *in vitro* por peroxidadas,^{60,61} esta actividad enzimática no se ha detectado en los melanosomas.⁵⁹ Sin embargo, al menos en melanocitos de ratón, Tyrp1 (proteína relacionada con tirosinasa-1) presenta actividad DHICA oxidasa, lo que explicaría la incorporación del DHICA a las melaninas.^{62,63} La situación en melanocitos humanos está aún por aclarar, ya que la especificidad de sustrato de las enzimas tirosinasa y Tyrp1 puede ser distinta en el

hombre y en el ratón, y constituye, por tanto, una de las lagunas en el conocimiento actual de la ruta de biosíntesis de melaninas dentro de la bioquímica comparada. En cualquier caso, el DHICA se incorpora eficientemente a las melaninas,⁶⁴ lo que se refleja en un contenido relativamente elevado de grupos carboxilo en las melaninas naturales, en comparación con las melaninas obtenidas *in vitro* por oxidación del L-dopa.^{65,66}

Dentro del melanosoma, los intermedios melanogénicos polimerizan rápidamente, y con estequiometría variable, para dar lugar a los polímeros que constituyen las eumelaninas. Estudios estructurales demuestran que estos polímeros están constituidos por monómeros de DHI e IQ unidos principalmente por enlaces covalentes 7-7', 4-4', 2-4' y 2-7' (Figura 5), con incorporación de los monómeros carboxilados correspondientes a DHICA o a IQCA que, al tener el grupo carboxilo en posición 2, forma enlaces a través de las posiciones 3, 4 y 7. También aparecen en la estructura unidades no cicladas de DQ y dopa, pero no DC y ciclodopa. La variedad de los enlaces contribuye a la aparente heterogeneidad del polímero melánico que, debido al gran número de componentes aromáticos, posee un grado de conjugación muy elevado. El resultado es una gran absorción en el espectro visible que confiere a las melaninas su coloración negruzca y un espectro de absorción en la región UV/visible caracterizado por una absorción generalizada, sin máximos bien definidos.⁶⁷

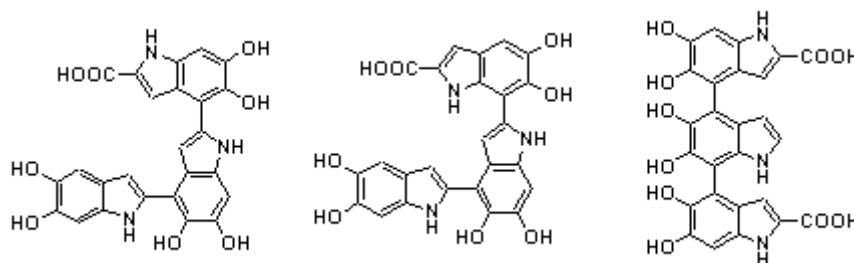


Figura 5. Modelo estructural de las subunidades derivadas de DHI y DHICA que constituyen las eumelaninas, mostrando las unidades indólicas y difenólicas.

4.2. Biosíntesis y estructura de feomelaninas.

La biosíntesis de feomelaninas comparte sus dos primeras etapas con la de las eumelaninas: tirosinasa cataliza la conversión de L-tirosina en o-dopaquinona (Figura 4). A partir de aquí, el principal inductor de la feomelanogénesis parece ser la disponibilidad de compuestos tiólicos de bajo peso molecular, tales como glutatión o cisteína reducidos, con grupos sulfhidrilo libres, que pueden realizar ataque nucleofílico sobre el anillo quinónico, originando cisteinildopas.⁶⁸ Puesto que esta reacción es varios miles de veces más rápida que la ciclación de dopaquinona a ciclodopa al pH relativamente ácido del melanosoma,⁶⁹ el

tipo de melanina formada estaría controlado por la disponibilidad de tioles en el medio.⁷⁰ Se ha sugerido que la actividad de tirosinasa es menor en la feomelanogénesis que en la eumelanogénesis,^{71,72} y que los mecanismos que regulan la síntesis y el procesamiento de la enzima difieren en las dos rutas,⁷³ pero esto puede explicarse si asumimos que la cisteína y el glutatión inhiben la actividad enzimática de tirosinasa, probablemente por interacción de los grupos tioles con el cobre del centro activo de la enzima.⁷⁴

La polimerización de los intermedios feomelanogénicos es un proceso poco conocido y pueden intervenir proteínas enzimáticas aún por caracterizar. En cualquier caso, son menos reactivos que los eumelanogénicos, con una velocidad de polimerización más lenta, lo que explica el menor tamaño de feomelaninas comparadas con las eumelaninas. Al igual que éstas, las feomelaninas son polímeros irregulares (Figura 6), resultado de la unión de unidades obtenidas tras la oxidación de los cisteinil-dopas, procedentes de la adición nucleofílica de cisteína a DQ. Debido a la presencia en el polímero de unidades dihidrobenzotiazilalanina (intermedio de la ruta biosintética tras la ciclación de los cisteinildopas), estos pigmentos tienen menor grado de conjugación que las eumelaninas, por lo que la absorción en el espectro visible es menor y por ello también son menos oscuros.

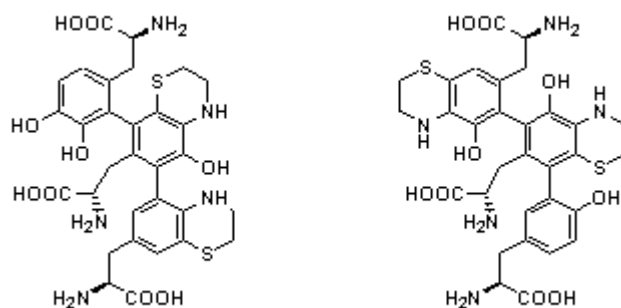


Figura 6. Estructura de algunos de los posibles oligómeros que se forman en las etapas iniciales de oxidación de 5-S-cisteinildopa a feomelaninas, con presencia de unidades fenólicas.

Las melaninas naturales, tanto feo- como eumelánicas, están asociadas generalmente con proteínas, debido a la elevada reactividad de las indolquinonas frente a nucleófilos de las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas, sobre todo cisteínas y lisinas.²⁰ Por lo tanto, es más correcto considerar las melaninas naturales como complejos melanoproteicos mixtos, de elevada masa molecular y composición muy variable.^{75,76}

La ruta biosintética de las melaninas extracutáneas está todavía por aclarar, aunque es posible que no siga un patrón común: en la retina parece transcurrir por una vía similar a la epidérmica,⁷⁷ mientras que en el oído interno presenta características diferentes.⁷⁸

4.3. Función de las melaninas.

Las melaninas pueden realizar múltiples funciones dependiendo de su localización en el organismo. Las funciones que se han asignado hasta ahora a las melaninas son variadas^{79,80,81} y se encuentran aún en discusión, pese a la intensa investigación que se realiza. Las melaninas cutáneas se relacionan tradicionalmente con la fotoprotección. Así, la epidermis de individuos con pigmentación alta es más resistente al eritema producido por radiación ultravioleta que la de individuos con bajo contenido en melanina epidérmica.⁸² Este papel fotoprotector podría explicarse, además de por las propiedades de absorción de radiación UV/Vis de las melaninas en un rango de longitudes de onda muy amplio, por su capacidad para inactivar radicales libres y especies oxigenadas reactivas producidos por la interacción de radiaciones UVA y UVB con la materia o incluso por estrés oxidativo,⁸³ ya que parece participar en reacciones de transferencia de electrones (transducción de energía), convirtiendo energía eléctrica y luminosa en calorífica.⁸⁰ Además, las melaninas parecen inactivar más eficientemente las especies de radicales libres que se forman a mayor velocidad en condiciones de exposición a radiación ionizante, gracias a sus propiedades redox, que permiten deslocalizar electrones a lo largo de su estructura aromática y altamente conjugada.⁸⁴ Esto contribuye a proteger el DNA, puesto que inhibe la formación de fotoproductos inducidos por la radiación UV.⁸⁵

Aunque las melaninas actúen como sustancias fotoprotectoras y captadoras de radicales libres, éstas no pueden ser sus funciones esenciales en localizaciones extracutáneas como el oído interno, donde las melaninas podrían actuar esencialmente como filtro capaz de unir y retener xenobióticos potencialmente tóxicos,⁸⁶ incluyendo metales pesados. Además, al menos en el oído interno, las melaninas, como ya se ha comentado, podrían contribuir a disipar un exceso de energía acústica en forma de calor,⁸⁷ lo que podría explicar la observación de que la pérdida temporal de audición inducida por trauma acústico es más severa en individuos con una pigmentación escasa que en individuos de piel oscura.⁸⁸

Las melaninas del epitelio retinal pigmentado podrían desempeñar funciones variadas, tales como apantallar las células fotorreceptoras de la radiación intensa,⁸¹ neutralizar el elevado número de peróxidos existente, mayor que en otros tejidos debido a la alta presión de oxígeno y facilitar la disponibilidad de zinc, muy abundante en coroides y retina por su importancia como cofactor de numerosas enzimas. Además, la melanina o alguno de sus precursores parece participar en el desarrollo de la fovea y de la trayectoria del nervio óptico.⁸⁹

5. ENZIMAS DE LA MELANOGÉNESIS.

Los mamíferos presentan un gran número de genes implicados en la pigmentación, que codifican para proteínas relacionadas con aspectos tan variados como el desarrollo de los melanoblastos/melanocitos y la biogénesis y transporte de melanosomas, así como proteínas enzimáticas y de señalización y regulación de la melanogénesis. En ratón, se han descrito unos 130 determinantes en más de 50 *loci* del genoma, y mutaciones en algunos de ellos causan anomalías en la pigmentación de los ojos, piel y cabello. En humanos, se han identificado los correspondientes ortólogos en muchos casos, aunque algunos no se han clonado todavía.*

De todos los genes que codifican para enzimas melanogénicas, el más conocido es el *locus c* o *locus albino* que codifica la enzima tirosinasa.^{5,90,91,92} En el ratón, el gen de tirosinasa está situado en el cromosoma 7, con regiones reguladoras (LCR, de *locus control region*) situadas hasta 12 Kb aguas arriba,^{93,94} y en el hombre en el cromosoma 11 (11q14-q21).^{95,96} Durante mucho tiempo, se creyó que ésta era la única enzima relacionada con la regulación de la biosíntesis de melaninas, debido a que pueden obtenerse melaninas *in vitro* por acción de tirosinasa purificada sobre L-tirosina y a que la oxidación aeróbica de L-dopa en ausencia de proteína también produce melaninas. Sin embargo, los análisis químicos probaban que las melaninas naturales eran diferentes de las melaninas formadas *in vitro*, pues aquéllas incorporaban más unidades carboxiladas derivadas del DHICA.^{64,65} Como hemos comentado anteriormente, la incorporación de unidades carboxiladas se explica en la actualidad en el modelo murino por la acción secuencial de otras dos proteínas enzimáticas, Tyrp2 y Tyrp1. Así, son al menos tres las enzimas que participan en la eumelanogénesis.

De los genes relacionados con la pigmentación, en este apartado se comentarán los que codifican proteínas con función enzimática y una estructura muy similar a tirosinasa, denominadas genéricamente proteínas relacionadas con tirosinasa o Tyrps (Tirosinase related proteins). Uno de ellos está asociado al *locus b* (*brown*),^{3,97} localizado en el cromosoma 4 en el ratón y en el 9 (9p23) en el hombre.⁹⁸ Su producto génico se denomina Tyrp1, también conocida como proteína b o gp75 (glicoproteína con una masa molecular aproximada de 75 kDa), con actividad DHICA-oxidasa.⁶² El segundo está asociado al *locus slt* (*slaty*) y se localiza en el cromosoma 14 en el ratón⁴ y en el 13 (13q32) en el hombre.² Éste determina la síntesis de la proteína denominada Tyrp2, con actividad Dct.⁹⁹

* Coat Color Genes (International Federation of Pigment Cell Societies): <http://www.cbc.umn.edu/ifpcs/micemut.htm>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, NIH): <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

Tanto Tyrp1 como Tyrp2, influyen con toda seguridad en la cantidad pero sobre todo en la calidad de la melanina producida por los melanocitos,⁵⁹ y poseen secuencias de aminoácidos, deducidas a partir de la secuencia de los cDNAs correspondientes, similares entre sí, y a su vez similares a tirosinasa. Las características esenciales de las tres enzimas de la familia de tirosinasa se describen a continuación.

5.1. Características estructurales comunes a las Tyrps.

La Figura 7 representa las secuencias alineadas de las proteínas de la familia de tirosinasa, de ratón y humanas. Del análisis de las secuencias de aminoácidos se desprenden las siguientes características generales:

- Se trata de proteínas de un tamaño parecido. Las tres proteínas de la familia de tirosinasa son cadenas polipeptídicas de algo más de 500 aminoácidos y, por tanto, las masas moleculares de las formas *de novo* estarán comprendidas entre 55 y 60 kDa.
- En los tres casos aparecen seis o siete secuencias consenso de N-glicosilación Asn-X-Thr/Ser. Por tanto, las masas moleculares de las formas maduras deben ser superiores a las calculadas para las apoproteínas en función de la estructura primaria y estar comprendidas entre 65 y 80 kDa.
- Las tres proteínas contienen dos dominios de elevada homología con todas las características de centros de unión de iones metálicos, pues en ellos existen residuos de histidina invariantes que parecen constituir los ligandos de los iones metálicos. Por tanto, se trataría, en los tres casos, de metaloproteínas con centros activos muy conservados (Figura 7, zonas sombreadas en amarillo). Como hemos dicho antes, el cofactor es el cobre para tirosinasa, el zinc para Tyrp2 y aún no determinado para Tyrp1.^{100,101}
- Del estudio de sus perfiles de hidrofobicidad se deduce que son proteínas con un único fragmento transmembrana, que se localiza cerca del extremo C-terminal y lejos de los centros de unión para el cofactor metálico. Teniendo en cuenta esta disposición y que la biosíntesis de melaninas transcurre en el interior del melanosoma, la orientación más probable es tipo II, ya que un pequeño fragmento carboxilo terminal de menos de 40 aminoácidos se encuentra expuesto en la cara citosólica de la membrana melanosomal. La proteína cruza una única vez la membrana mediante una hélice α constituida por unos veinte a veinticinco aminoácidos hidrofóbicos, y el núcleo de la proteína, muy compacto y conteniendo el centro activo y el extremo amino terminal, se encontraría en el interior del melanosoma (Figura 8).

- Los residuos de cisteína son numerosos y están también muy conservados. Además, están agrupados en tres dominios en la cara intramelanosomal de la proteína. Dos de ellos se encuentran en la región N-terminal y el tercero entre los dos centros de unión a metal (MeA y MeB). Al menos en tirosinasa, las cisteínas podrían estar implicadas mayoritariamente en la formación de puentes disulfuro lo que contribuiría a la elevada resistencia de la proteína a los agentes caotrópicos y a la desnaturalización térmica. En función del número y de la distribución de los residuos de cisteína, es muy posible que la disposición de los puentes disulfuro esté también conservada entre las proteínas de la familia, o al menos en Tyr y Tyrp1.¹⁰³
- Los residuos de triptófano están también bastante conservados en número y en posición (zona intramelanosomal) y se cree que podrían estar implicados en la formación de interacciones catión- π con residuos de arginina que contribuirían a conformar el centro activo y a mantener la estructura tridimensional de la proteína.
- Además de los residuos de Cys y Trp, tirosinasa y las Tyrps tienen un número elevado de residuos de prolina y glicina conservados. La predicción de estructuras secundarias[†] muestra, consecuentemente, una abundancia de giros- β y una escasez relativa de secuencias en hélice u hoja plegada, distribuidas de forma similar a lo largo del polipéptido, lo que refuerza la idea de una estructura terciaria muy homóloga.
- Aunque los extremos carboxilo terminales (citosólicos) son las regiones menos conservadas, contienen características comunes. El fragmento transmembrana está seguido por unos cuantos aminoácidos básicos, que a su vez preceden, en tirosinasa y Tyrp1 humanas y de ratón, a una secuencia ExxQPLL (que incluye el motivo dileucina, característico de proteínas lisosomales). Esta secuencia se ha encontrado únicamente en las proteínas de la familia de tirosinasa y otras proteínas melanosomales y se especula que podría estar relacionada con su localización subcelular,¹⁰⁴ junto con el motivo basado en tirosina, YXXL, situado a pocos aminoácidos del extremo C-terminal en todas las proteínas de la familia.

[†] Obtenida con el método *Predator*,¹⁰² realizado en el Network Protein Sequence @nalysis del Institut de Biologie et Chimie des Proteines, Lyon, Francia (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>).

En resumen, tirosinasa y las Tyrps aparecen como una familia de proteínas con un grado de homología elevado, probablemente con estructuras terciarias y centros activos muy similares y quizás derivadas de un gen ancestral común.¹⁰⁵

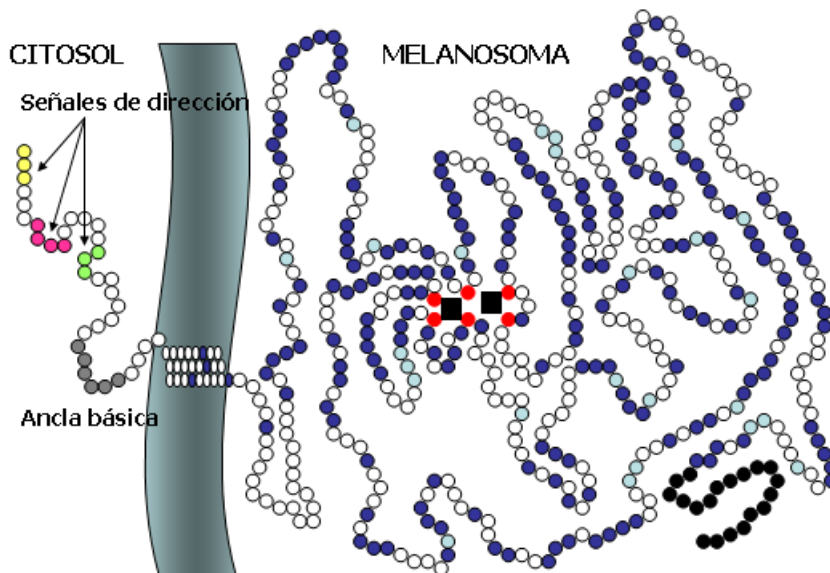


Figura 8. Modelo estructural de Tyr y las Tyrps, representando su anclaje a la membrana melanosomal. Los puntos **rojos** representan las His de unión del cobre (esquematizados como cuadrados negros), los **azules**, las identidades entre las secuencias en ratón, los **celestes**, los aminoácidos conservados y los **negros**, el péptido señal.

5.2. Tirosinasa (*locus albinus*).

Tirosinasa (monofenol-3,4-dihidroxifenilalanina:oxígeno oxidoreductasa, EC 1.14.18.1) es una enzima ampliamente distribuida en la escala filogenética, desde los microorganismos hasta las plantas y animales, por lo que indudablemente apareció en un estadio temprano de la evolución. Se le denomina con nombres diversos como polifenol oxidasa, cresolasa y catecolasa y, de los animales, la de mamíferos ha atraído la máxima atención de los investigadores. La mayoría de los estudios de caracterización de tirosinasa se han llevado a cabo con melanomas pigmentados de animales de laboratorio, sobre todo derivados de las líneas tumorales de ratón B16 y Cloudman S91, pues la concentración de esta enzima en los tejidos epidérmicos normales es muy baja debido a la escasa densidad de melanocitos.

Tirosinasa es una cuproglicoproteína que cataliza las dos primeras etapas de la ruta melanogénica: hidroxilación de L-tirosina a L-DOPA y oxidación de ésta a dopaquinona, utilizando como oxidante el oxígeno molecular. Actualmente se acepta que existe un único centro activo responsable de las dos actividades de la enzima.¹⁰⁶ Esta teoría se basa

esencialmente en el establecimiento de la naturaleza cuproproteica de la enzima y de los estados de oxidación posibles para el cobre en el centro activo. Lerch *et al.* (1988),¹⁰⁷ mediante estudios físicos y químicos de tirosinasa de *Neurospora crassa*, demostraron la existencia en el centro activo de una pareja de iones de cobre acoplados de forma silenciosa (no dan señal EPR) y unidos a la proteína mediante seis histidinas. El cobre se puede encontrar en dos estados de oxidación que, dependiendo también de si la enzima se encuentra uniendo oxígeno o no, pueden dar lugar a tres especies de tirosinasa en equilibrio^{107,108}: *met*-tirosinasa, *oxy*-tirosinasa y *deoxy*-tirosinasa. El mecanismo de acción propuesto para la enzima se discutirá más adelante.

Una vez purificada, tirosinasa es una proteína bastante estable: posee una vida media de más de 5 días a 37°C tras el proceso de purificación.¹⁰⁹ Es además, muy resistente a proteólisis¹¹⁰ y a agentes caotrópicos,¹¹¹ lo que sugiere una estructura muy compacta a la que contribuirán puentes disulfuro intramoleculares y los residuos glicídicos. Sin embargo, *in vivo*, la enzima parece estar bajo un control metabólico activo que implica un proceso de degradación, de modo que su tiempo de vida media biológico se rebaja a 10 horas.^{112,113,114}

Se trata de una proteína con carácter ácido (por su contenido en ácidos siálicos) que presenta varias isoformas tanto solubles como unidas a la membrana del melanosoma, su principal localización subcelular.^{109,115,116} El procesamiento post-traducciona de tirosinasa, destacando de forma especial aspectos como la N-glicosilación, plegamiento, adquisición de cobre y tráfico al orgánulo diana (melanosoma), se comentará en el apartado 8 de esta introducción, ya que el estudio de aspectos concretos del proceso constituye una parte importante del trabajo realizado durante la presente Tesis.

La composición de aminoácidos de la tirosinasa de ratón fue determinada por cinco laboratorios distintos con resultados muy similares^{116,117,118,119,120} previo a la deducción de la secuencia primaria de la proteína tras la clonación del gen correspondiente. Los esfuerzos por intentar determinar la estructura primaria de la proteína por secuenciación directa han sido insatisfactorios debido a que la enzima tiene bloqueado el extremo amino terminal por formación de ácido piroglutámico, lo que impide su secuenciación por la técnica de Edman, y a que su elevada glicosilación y estabilidad conformacional oponen resistencia a la proteólisis parcial, lo que dificulta la obtención de secuencias internas. Debido a ello, la secuencia de aminoácidos de la enzima ha tenido que ser deducida a partir del cDNA correspondiente,^{90,91} y sólo en algún pequeño fragmento corroborada por secuenciación directa.⁹²

5.3. Proteína relacionada con tirosinasa-1, Tyrp1 (*locus brown*).

Los esfuerzos encaminados a desvelar las posibles actividades enzimáticas de Tyrp1 han sido muy numerosos. Se ha postulado que podría tratarse de una enzima con actividad catalasa que protegería a las melaninas de los efectos del H_2O_2 producido durante la melanogénesis,¹²¹ una isoenzima de tirosinasa,^{122,123} una enzima con actividad Dct³⁰ o una enzima con actividad DHI y DHICA oxidasa.^{63,124} Además, se ha sugerido que Tyrp1 tenga una función de estabilización de tirosinasa y Tyrp2 más que una actividad enzimática⁵⁵ y, de hecho, se ha demostrado la formación de heterodímeros Tyr-Tyrp1 *in vitro*.¹²⁵ Los estudios más recientes y más ampliamente aceptados atribuyen a Tyrp1 murina una función DHICA oxidasa,^{62,124} además de actividades tirosina hidroxilasa y dopa oxidasa residuales, sin descartar su efecto estabilizador de tirosinasa.¹²⁶

Tyrp1 cataliza la oxidación del DHICA a su correspondiente o-quinona con una K_M para el DHICA de 0.8 mM, y acelera la formación de un producto de tipo melánico resultado de las reacciones entre el DHICA y la quinona formada. Además, Tyrp1 cataliza aunque menos eficientemente que tirosinasa la oxidación del dopa y la hidroxilación de tirosina, y posee un requerimiento absoluto del cofactor L-dopa para la reacción de hidroxilación. Las K_M para los sustratos L-tirosina y L-dopa (0.23 mM y 1.9 mM, respectivamente) son mayores que las correspondientes a los mismos sustratos para tirosinasa, y sus velocidades de catálisis son menores.⁶² Tyrp1 está presente en mayor concentración que tirosinasa en melanocitos malignos, pero su actividad sólo representa el 20-30 % de la actividad tirosinasa total presente en esta población, de acuerdo con la mayor actividad específica de tirosinasa.¹²³

Las moviidades de Tyrp1 y tirosinasa en SDS-PAGE son muy parecidas, aunque no idénticas,¹²⁷ por lo que poseen masas moleculares muy similares, tal y como se desprende de la estructura primaria deducida a partir de las secuencias de sus cDNAs. A pesar de su homología estructural con tirosinasa, Tyrp1 puede ser separada y purificada combinando solubilización diferencial, precipitación diferencial y técnicas cromatográficas,^{62,127} y la actividad dopa oxidasa de tirosinasa y Tyrp1 se puede determinar de forma independiente por separación en gel de electroforesis y tinción de actividad en presencia de L-dopa.¹²⁸

5.4. Proteína relacionada con tirosinasa-2, Tyrp2/Dct (*locus slaty*).

Dct cataliza la conversión de L-DC en una forma tautomérica de naturaleza indólica, el DHICA. Nuestro grupo purificó parcialmente, a partir de melanoma B16 de ratón, una proteína capaz de decolorar DC. Mediante estudios espectrofotométricos y radiométricos se identificó el producto de reacción como DHICA.⁴⁷ Posteriormente, esta identificación se

confirmó por HPLC y se demostró que la capacidad de la enzima para catalizar la conversión del L-DC es mucho mayor que la de iones metálicos.⁵¹

La enzima está preferentemente asociada a la membrana melanosomal, pero ha sido también encontrada en las fracciones citosólica y microsomal de homogenados celulares.⁴⁷ Es claramente distinta de tirosinasa, y pueden obtenerse preparaciones con una pureza suficiente como para garantizar su caracterización. Su constante de Michaelis para el L-DC es de alrededor de 100 μM y el D-DC no es prácticamente reconocido por su centro activo.¹²⁹ La enzima es altamente específica y requiere de la presencia de un grupo carboxilo en posición 2 de un anillo indólico para reconocer al sustrato.

Tras la clonación del gen que codifica Tyrp2/Dct,^{4,99} se ha deducido la secuencia de la proteína, que presenta un 40% de homología con la de tirosinasa. El porcentaje de homología es aún mayor cuando se la compara con Tyrp1. La proteína presenta varias secuencias consenso de glicosilación, y la porción glicoproteica parece ser muy similar a la de tirosinasa, mientras que la estabilidad de Tyrp2/Dct es sensiblemente inferior.¹³⁰

El papel fisiológico de Tyrp2/Dct está todavía por aclarar definitivamente, aunque algunas hipótesis ya han sido aceptadas. Por una parte, Tyrp2/Dct controlaría el tamaño y el tipo de melanina formada,^{59,131} dando lugar a melaninas más pequeñas, ordenadas y de color marrón más que negro. Por otro lado, como el DHICA es menos reactivo que el DHI, podríamos asumir que Tyrp2/Dct contribuye a disminuir la citotoxicidad inherente a la ruta melanogénica,²⁰ además de que la inclusión de unidades de DHICA en las melaninas conduciría a polímeros con una mayor capacidad quelante. Sin embargo, el posible efecto de esta enzima en la velocidad de síntesis de melaninas es complejo y poco conocido, ya que, en función de las condiciones experimentales, Tyrp2/Dct puede aumentar o disminuir la velocidad de la ruta melanogénica.^{47,59} La mayoría de estos efectos se pueden explicar por la relación de actividades tirosinasa y Tyrp2/Dct en el medio y del tiempo de reacción.

Por otra parte, dada la elevada homología estructural con tirosinasa y Tyrp1, cabe preguntarse por los determinantes estructurales de la distinta especificidad de reacción. Tyrp2/Dct cataliza una tautomerización mientras que Tyr y Tyrp1 catalizan oxidaciones. La razón de estas diferencias parece estar relacionada con el cofactor metálico asociado a las proteínas de la familia, ya que en el caso de tirosinasa, y muy probablemente de Tyrp1, se trata de cobre,¹⁰⁰ un ion capaz de existir en dos estados redox diferentes. Sin embargo, en el caso de Tyrp2/Dct, el cofactor metálico es el zinc, lo que imposibilita su participación en reacciones redox, pero lo hace muy adecuado para llevar a cabo una isomerización.^{101,132}

6. REGULACIÓN DE LA MELANOGÉNESIS.

El proceso de regulación de la melanogénesis y su relación con el crecimiento celular está siendo intensamente estudiado debido, entre otras cosas, a que se utiliza como modelo de control de la relación entre diferenciación y proliferación celular para varios tipos de células de mamíferos de origen neural. Una de las razones por las que los melanocitos son un modelo especialmente apropiado para este estudio es que, especialmente en ratón, existen numerosos fenotipos determinados genéticamente caracterizados por anomalías de la pigmentación. Muchos de ellos sirven como modelo de desórdenes de la pigmentación en humanos, debido a alteraciones producidas a los niveles tisular, celular y subcelular.¹³³ Se dispone, por tanto, de toda una batería de knock-outs naturales para distintos genes reguladores o estructurales, que ofrecen modelos experimentales de primer orden. Por otro lado, alteraciones en el proceso de regulación del sistema melanogénico pueden llevar asociadas anomalías no sólo en la pigmentación, sino también en otras funciones del organismo. Existen algunos agentes fisiológicamente relevantes y bien identificados que inducen la diferenciación de los melanocitos y estimulan la melanogénesis, tales como la hormona α MSH y la luz UV, que también poseen un cierto carácter mitogénico.

Un ejemplo de los knock-outs naturales mencionados antes son los ratones *Agouti*. Durante el ciclo de crecimiento de su pelaje tiene lugar una regulación de la melanogénesis desde los puntos de vista cuantitativo y cualitativo. En un momento determinado del crecimiento capilar, los melanocitos de los folículos pilosos pasan de sintetizar eumelaninas a feomelaninas, resultando una pigmentación de fondo oscura con una banda subterminal amarillenta. Este cambio en el tipo de melaninas sintetizado está controlado por un complejo mecanismo en el que participan de forma decisiva los productos de los *loci extension* y *agouti*, que codifican para el receptor de melanocortinas 1 (Mc1r) y la proteína agouti (ASP), respectivamente. Mc1r es un receptor serpentina de siete fragmentos transmembrana acoplado a proteínas G al que se unen péptidos derivados de POMC tales como α MSH o ACTH.¹³⁴ La unión de la hormona al receptor provoca la activación de la adenilato ciclasa, que induce un incremento de los niveles de cAMP. Mutaciones en el *locus extension* que resulten en un receptor no funcional, incapaz de activar la cascada del cAMP en presencia de α MSH, dan lugar a un ratón de pelaje amarillento, mientras que mutaciones puntuales que produzcan un receptor hiperactivo o constitutivamente activo dan lugar a ratones con coloración negra, más oscura que el animal silvestre.¹³⁵ ASP es un antagonista de α MSH: cuando se une al receptor Mc1r

bloquea la señalización. Sorprendentemente, el homocigoto dominante para *agouti*, que sobreexpresa ASP, es letal.

El cambio a síntesis de eumelaninas parece deberse a un aumento de la expresión y la actividad de las enzimas melanogénicas, en especial Tyrp1 y Tyrp2/Dct, lo que origina un melanosoma eumelanogénico que, en ausencia de esta vía de señalización, es incapaz de madurar y permanece como feomelanosoma (Figura 12). Esta relación de los péptidos de POMC y el cAMP con la regulación de la pigmentación de piel y pelo también se ha encontrado en humanos, incluyendo el efecto sobre el tipo de pigmento sintetizado. Se ha demostrado que el fenotipo pelirrojo, debido a síntesis de feomelaninas más que de eumelaninas, está asociado con mutaciones del receptor MC1R, algunas de las cuales disminuyen su capacidad de respuesta a α MSH.^{136,137,138,139} Por último, tanto en cultivos de melanocitos humanos como de melanoma de ratón, α MSH y ACTH estimulan la melanogénesis y la dendricidad, efectos que se pueden simular con agentes que aumenten la concentración intracelular de cAMP, tales como forskolina, toxina del cólera e IBMX (isobutilmetilxantina).⁵⁷

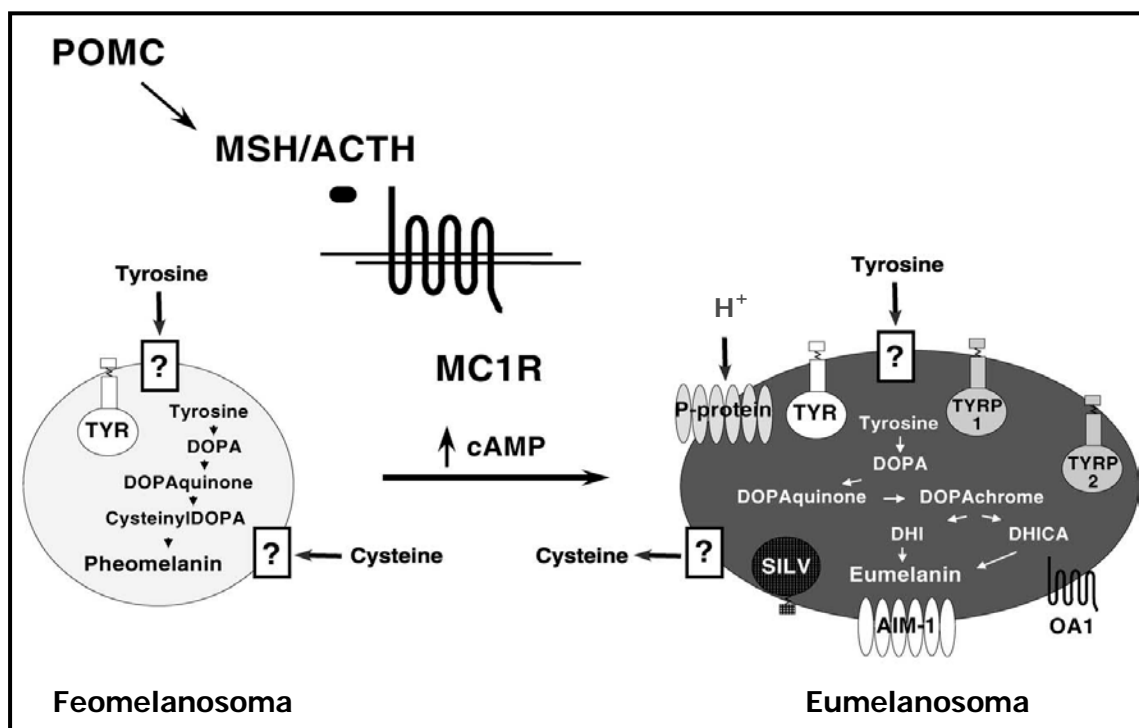


Figura 12. Control del cambio de tipo de pigmento por MC1R. α MSH o ACTH se unen al receptor MC1R, lo que activa la vía de PKA/cAMP. Esto provoca la maduración del feomelanosoma, que contiene sólo TYR, a eumelanosoma, que presenta todas las enzimas melanogénicas. AIM-1 y OA1 son proteínas recientemente identificadas cuya función en el melanosoma no está caracterizada completamente. El posible transporte de tirosina o cisteína se indica con signos de interrogación. Adaptado de Sturm, 2001.¹⁴⁰

Los mecanismos moleculares de la cascada de señalización intracelular del cAMP son bien conocidos: la unión de cAMP a las subunidades reguladoras de PKA permite la liberación de las catalíticas, que fosforilan los sustratos diana, entre los que se encuentran las proteínas nucleares CREB (cAMP responsive element binding protein), que activan la transcripción de genes que contengan en sus promotores las secuencias consenso CRE (cAMP responsive element). Sin embargo, la secuenciación de los promotores de *Tyr*, *Tyrp1* y *Tyrp2* reveló que no presentan estas regiones CRE, sino una secuencia de 10 pares de bases llamada caja M (GTCCATGTGCT), que se cree implicada en la expresión específica en el melanocito de las proteínas melanogénicas.^{141,142} El motivo CATGTG se correlaciona con la secuencia hexámera central CANNTG (denominada caja E), reconocida por factores de transcripción hélice-lazo-hélice básicos (bHLH).

Anteriormente se había descrito que el *locus Microphthalmia (mi)* codifica un factor de transcripción de este tipo que se llamó MITF (microphthalmia associated transcription factor), debido al fenotipo de los ratones mutantes para *mi* cuyos defectos de pigmentación se debían a la ausencia de melanocitos, lo que indicaba que MITF era un factor clave en el desarrollo y supervivencia de los melanocitos.¹⁴³ Esta proteína también ha sido identificada en humanos¹⁴⁴ y las mutaciones en su *locus* están asociadas con el síndrome de Waardenburg tipo 2 (WS2), caracterizado asimismo por alteraciones en la pigmentación. Así, pronto se concluyó que MITF, cuyo promotor sí posee secuencias CRE, podría jugar un papel central en la regulación de la melanogénesis a través de la señalización de cAMP y en concreto inducido por α MSH, hecho que se confirmó poco después.^{145,146} La importancia de este factor queda asimismo patente al demostrar que su expresión en fibroblastos les confiere muchas características típicas de los melanocitos, incluida una morfología dendrítica y la expresión de tirosinasa y *Tyrp1*.¹⁴⁷

Sin embargo, MITF no es el único factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión de proteínas melanogénicas. Existe otro motivo regulador en los promotores de tirosinasa y *Tyrp1* con una secuencia muy próxima a la secuencia que une los factores de transcripción de la familia POU (ATGCAAAT). En melanocitos normales y melanomas se han descrito 4 proteínas de esta familia, Oct-1, N-Oct-2, N-Oct-3, y N-Oct-5. El gen *Brn2* codifica N-Oct-3 y N-Oct-5, que inhiben la expresión de tirosinasa debido a que impiden que los factores de transcripción del tipo hélice-lazo-hélice se unan a la caja E en el sitio de iniciación.¹⁴⁸ Otros factores de transcripción importantes son: TFE3 y TFEB, que aumentan los niveles de TYR y TYRP1;¹⁴⁹ TBX2, que actúa sobre elementos específicos de melanocitos en el promotor de *Tyrp1*, inhibiendo su expresión;¹⁵⁰ y PAX3

(producto del *locus Splotch*), que se une a estos mismo elementos y estimula la expresión de *TYRP1*.¹⁵¹ Así, los datos actuales sugieren que los estímulos melanogénicos actúan por combinación de la actuación de todos estos factores de transcripción.

Los melanocitos epidérmicos son células ya diferenciadas que se distinguen de sus precursores, los melanoblastos, por la adquisición de marcadores de diferenciación específicos, propios de su función, la producción de melaninas. Sin embargo, en condiciones basales, los melanocitos expresan un bajo nivel de marcadores de diferenciación y la producción de pigmentos melánicos transcurre a escasa velocidad. Sólo tras la estimulación con algunos agentes inductores de la diferenciación, como la hormona α MSH o la luz UV, las actividades de las enzimas melanogénicas aumentan y la síntesis de pigmento se activa.¹⁵² Los genes responsables de la regulación a los niveles celular y subcelular afectan la pigmentación mediante dos estrategias:¹⁵³

- Modificación de la estructura y la función de los melanocitos. Algunos de estos genes[†] no son exclusivos de este tipo de células, de manera que los mecanismos por los que operan no están restringidos al sistema pigmentario. Entre ellos destacan los *loci extension* y *agouti*, ya comentados, y los *loci dilute (d)* y *pinkeyed dilution (p)*. El *locus dilute* codifica para la miosina Va, implicada en el transporte de los melanosomas a lo largo de las dendritas,^{34,35} mientras que el *locus pinkeyed dilution* codifica para un transportador iónico que controla el pH ácido del melanosoma.¹⁵⁴
- Alteración selectiva de la producción de melaninas, en cantidad o calidad, por acción directa sobre el nivel y/o la actividad de las proteínas del melanocito implicadas en el proceso, es decir, sobre los *loci albino*, *brown* y *slaty*, que codifican para las enzimas Tyr, Tyrp1 y Tyrp2/Dct, respectivamente. Existe otro grupo que está comprendido por *loci* que contienen genes que codifican proteínas ajenas a la familia de tirosinasa, y que no tienen todavía una función biológica claramente establecida. Entre ellos se encuentra el *locus silver*, que en humanos origina dos proteínas simultáneamente, Pmel17 y gp100 (en ratón, gp87), dependiendo de la maduración alternativa de un mRNA precursor común, cuyas funciones no están del todo caracterizadas, aunque se apunta a un papel estabilizador de enzimas melanogénicas en el melanosoma.^{155,156,157}

En la Tabla 1 se resumen los principales genes relacionados con la pigmentación, indicando la localización de los *loci*, el fenotipo y la función de la proteína que codifican.

[†]Coat Color Genes (International Federation of Pigment Cell Societies): <http://www.cbc.umn.edu/ifpcs/micemut.htm>

| Locus en ratón | Cromosoma de ratón | Locus humano | Cromosoma humano | Proteína | Fenotipo/Característica | Función |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------|---------------|------------------|--------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| Proteínas melanosomales | | | | | | |
| <i>Albino (c)</i> | 7 | <i>TYR</i> | 11q14-q21 | Tirosinasa | OCA1 | Enzima melanogénica (oxidasa) |
| <i>Brown (b)</i> | 4 | <i>TYRP1</i> | 9p23 | Tyrp1 | OCA3 | Enzima melanogénica (oxidasa) |
| <i>Slaty (slt)</i> | 14 | <i>DCT</i> | 13q31-q32 | Tyrp2/Dct | (?) | Enzima melanogénica (tautomerasa) |
| <i>Silver (si)</i> | 10 | <i>SILV</i> | 12q13-q14 | Gp100/Pmel17 | (?) | Polimerización de DHICA (?) |
| <i>Pinkeyed dilute (p)</i> | 7 | <i>P</i> | 15q11.2-q12 | Proteína P | OCA2 | pH del melanosoma |
| <i>Underwhite (uw)</i> | 15 | <i>MATP</i> | 5p14.3-q12.3 | AIM-1 | OCA4 | Homólogo a transportador de azúcares |
| Proteínas de señalización | | | | | | |
| <i>Agouti (a)</i> | 2 | <i>ASIP</i> | 20q11.2-q12 | ASP | (?) | Antagonista de Mc1r |
| <i>Extension (e)</i> | 8 | <i>MC1R</i> | 16q24.3 | Mc1r | Pelo rojo o rubio | Receptor de melanocortinas |
| <i>Pomc1</i> | 12 | <i>POMC</i> | 2p23.3 | ACTH, α MSH | Pelo rojo o rubio | Agonista de Mc1r |
| <i>Oa1</i> | X | <i>OA1</i> | Xp22.3 | Proteína OA1 | OA1 | Receptor acoplado a proteínas G (?) |
| <i>Microphthalmia (mi)</i> | 6 | <i>MITF</i> | 3p12.3-14.1 | Mitf | Síndrome de Waardenburg 2 | Factor de transcripción |
| <i>Spotch (sp)</i> | 1 | <i>PAX3</i> | 2q35 | Pax3 | Síndrome de Waardenburg 1 | Factor de transcripción |
| Transporte de melanosomas/transferencia a queratinocitos | | | | | | |
| <i>Dilute (d)</i> | 9 | <i>MYO5A</i> | 15q21 | Miosina Va | Síndrome de Griscelli | Transporte del melanosoma |
| <i>Ashen (ash)</i> | 9 | <i>RAB27A</i> | 15q21 | Rab27a | Síndrome de Griscelli | Transporte del melanosoma |
| Disponibilidad del cofactor metálico de tirosinasa cobre | | | | | | |
| <i>Mottled (mo)</i> | X | <i>ATP7A</i> | Xq12-q13 | Atp7a | Enfermedad de Menkes | Transporte de cobre |
| <i>Toxic milk (tx)</i> | 8 | <i>ATP7B</i> | 13q14.3-q21.1 | Atp7b | Enfermedad de Wilson | Transporte de cobre |

Tabla 1. Principales genes relacionados con la pigmentación. OCA: Albinismo oculocutáneo. OA: albinismo ocular.

Adaptado de Sturm, R. A., Teasdale, R. D. y Box, N. F. (2001) *Gene* **277** (1-2), 49-62; Coat Color Genes (International Federation of Pigment Cell Societies): <http://www.cbc.umn.edu/ifpcs/micemut.htm>; y Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, NIH): <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

El oscurecimiento de la piel inducido por radiación UV implica un aumento del número de melanocitos así como estimulación de la síntesis de melaninas y de la dendricidad de los melanocitos para facilitar la transferencia de pigmentos a los queratinocitos.¹⁵⁸ Este aumento de la pigmentación tiene un efecto fotoprotector contra los efectos carcinógenos de la luz UV, aunque los mecanismos que median no se conocen bien. Algunas de las hipótesis planteadas son:

- a) Efecto directo: cultivos de melanocitos irradiados con luz UV manifiestan un incremento de la melanogénesis, debido a que aumentan la actividad de tirosinasa¹⁵⁹ y su expresión.¹⁶⁰ Las hipótesis que intentan explicar este efecto apuntan a una alteración de la membrana del melanocito que activaría la vía de la fosfolipasa C y PKC,¹⁶¹ cuya participación en la regulación de la melanogénesis se ha propuesto con anterioridad.¹⁶² También se ha propuesto que la radiación UV puede conducir a la formación de óxido nítrico (NO) y activar la ruta del cGMP.¹⁶³
- b) Efecto indirecto: los queratinocitos circundantes a un melanocito ejercen una regulación paracrina sobre él. Así, melanocitos cultivados en el medio donde previamente se han cultivado queratinocitos responden con un incremento en número, tamaño y dendricidad. El efecto es mayor cuando los queratinocitos se han expuesto previamente a radiación UV, lo que sugiere que éstos secretan factores específicos responsables de la activación de los melanocitos y constituyen, por tanto, un componente celular clave en la respuesta fisiológica a la radiación UV.¹⁶⁴ Algunos de estos factores secretados son las ya comentadas α MSH, ACTH, prostaglandinas como PGE,¹⁶⁵ endotelina-1¹⁶⁶ y NO,¹⁶⁷ que activan las rutas del cAMP y del cGMP. Por otro lado, los queratinocitos también secretan inhibidores de la melanogénesis en respuesta a la luz UV, tales como la interleucina IL1 α ,¹⁶⁸ TNF α ¹⁶⁹ y bFGF,¹⁷⁰ de modo que el balance de todos estos factores permite ajustar el crecimiento y diferenciación del melanocito.

Por todo ello, puede concluirse que la regulación de la melanogénesis es un proceso complejo, que se ejerce a nivel tisular, celular y subcelular, y en el que participan señales estimuladoras e inhibitoras que inciden no sólo sobre las enzimas melanogénicas, sino también sobre otras proteínas del melanosoma y del melanocito. En cualquier caso, el control del nivel de expresión de tirosinasa y de su acción catalítica es, sin duda, un punto esencial de la regulación de la melanogénesis.

7. CENTRO ACTIVO Y MECANISMO CATALÍTICO DE TIROSINASA.

Como se ha comentado anteriormente, la tirosinasa contiene un par de iones de cobre acoplados antiferromagnéticamente en el centro activo de la enzima sin sustrato, llamada forma *met*.^{106,171} Hasta el momento, no hay datos cristalográficos de tirosinasas de mamíferos, pero existen numerosas pruebas indirectas que apuntan a que el centro activo consiste en un bolsillo hidrofóbico cercano a la superficie, delimitado por cuatro hélices α en el que se encuentran los átomos de cobre. También parece clara la implicación de dos regiones ricas en histidinas (llamadas CuA y CuB) en la unión al metal. Algunas de estas pruebas son la alteración de residuos de histidina de una tirosinasa fúngica tras experimentos de fotoinactivación, la similitud entre las secuencias de tirosinasa y hemocianinas^{106,172} y los datos cristalográficos obtenidos recientemente sobre la polifenol oxidasa de batata (1BT1 de Protein Data Bank[§]).¹⁷³ Las dos regiones de unión a metal son muy parecidas entre las tres proteínas melanogénicas, pero la conservación es mayor en el sitio CuB (Figura 8), lo que sugiere que podría ser particularmente importante para la plena actividad enzimática. Además, anteriormente se ha demostrado por estudios de mutagénesis dirigida la implicación de los sitios CuA y CuB de la tirosinasa humana en la unión al cobre.¹⁷⁴

Los dos sitios CuA y CuB contienen tres histidinas perfectamente conservadas que participan en la unión del cobre. Gracias a la estructura tridimensional de la proteína plegada, los dos sitios se encuentran adyacentes y forman el centro activo binuclear de la enzima. A pesar de tener un papel muy parecido en la quelación del cobre, se diferencian en que CuA tiene un motivo **H-x(n)-H-x(8)-H**, mientras que CuB presenta un motivo **H-x(3)-H-x(n)-HH** en el caso de tirosinasa.¹⁰³ En los dos sitios, la distancia entre dos de los ligandos de histidina se conserva, mientras que la de la otra es variable. Esta situación es más compleja en el caso de tirosinasa, pero no para las Tyrps (idéntico motivo para CuA, pero no para el CuB), debido a la presencia de una cuarta histidina adyacente a la tercera. Así, de acuerdo con la secuencia consenso del CuB, la naturaleza de los dos primeros residuos de histidina que participan en la unión del cobre está clara, mientras que quedan dudas acerca de cuál de las dos histidinas contiguas constituye el tercer ligando del cobre. Existen estudios recientes sobre tirosinasa humana¹⁷⁴ que apuntan a que la primera de ellas (H389 en las tirosinasas de ratón y humana) estaría implicada en la unión a cobre de forma más directa, aunque sólo se han encontrado mutaciones de la

[§] Protein Data Bank (PDB): <http://www.rcsb.org/pdb/>

segunda en albinismos humanos, como H390D.** Más recientemente, Nakamura *et al.* (2000)¹⁷⁵ propusieron una nueva estructura de la tirosinasa de *A. oryzae* en la que cada átomo de cobre está unido a cuatro ligandos: CuA estaría unido a una cisteína y tres histidinas y CuB lo estaría a cuatro histidinas, incluyendo las dos consecutivas (H389 y H390 en las enzimas humanas y de ratón).

En cuanto al centro CuB de Tyrp1 y Tyrp2/Dct, presenta un motivo **H-x(3)-H-x(n/2)-H-x(n/2)-LH**. Así, existe una cuarta histidina que se encuentra centrada entre el primer par de histidinas y la última. En la tirosinasa de mamíferos, dicha histidina está sustituida por una glutamina (Q378 en el ratón). Puesto que la distancia al tercer ligando histidina es variable, este residuo central es, en términos estrictamente teóricos, un ligando potencial para el cofactor metálico en las Tyrps. Si éste fuera el caso, los residuos implicados en la unión al metal serían distintos para tirosinasa y Tyrps, lo que explicaría la distinta especificidad de metal de las proteínas.¹⁰⁰ De hecho, proteínas tan poco relacionadas con la melanogénesis como las metaloproteinasas de la matriz, presentan un motivo muy similar al de Tyrp2, **H-E-x-G-H-x(2)-G-x(2)-H-S**, en su centro activo, y también contienen zinc como cofactor.¹⁷⁶

En cuanto al mecanismo de catálisis de la tirosinasa, a pesar de producirse una transformación directa de L-tirosina a L-dopaquinona, está claro que L-dopa es un sustrato alternativo para la enzima, y que las reacciones que conducen a la hidroxilación de la tirosina y la oxidación del dopa deben ser diferentes. Durante mucho tiempo se ha discutido sobre si las actividades hidroxilasa y oxidasa tienen lugar en el mismo centro catalítico. Para la mayoría de los investigadores, se trata de actividades inseparables, por lo que Lerch (1983)¹⁰⁶ propuso un ciclo catalítico integrado considerando un sitio activo único (Figura 9). Sin embargo, estudios cinéticos recientes apuntan a la existencia de ligeras diferencias entre ambas reacciones,^{177,178} lo que sugiere distintos requerimientos del centro activo. En este sentido, la actividad hidroxilasa muestra un período de retardo (lag) característico antes de que la reacción alcance su velocidad máxima, mayor cuanto menor es la concentración de L-dopa,¹⁷⁹ y se inhibe por exceso de L-tirosina,¹⁸⁰ lo que no ocurre en la actividad dopa oxidasa. Además, L-dopa, producto inmediato de la hidroxilación de la tirosina, es cofactor de la reacción y anula el período de *lag* o retardo en cantidades catalíticas, y aún no está claro si es un intermedio de la transformación de L-tirosina en L-dopaquinona que no abandona el centro activo o si, por el contrario, puede ser liberado de éste entre ambas reacciones.

** Base de datos de albinismos (Internacional Albinism Centre, Universidad de Minnesota): www.cbc.umn.edu/tad/

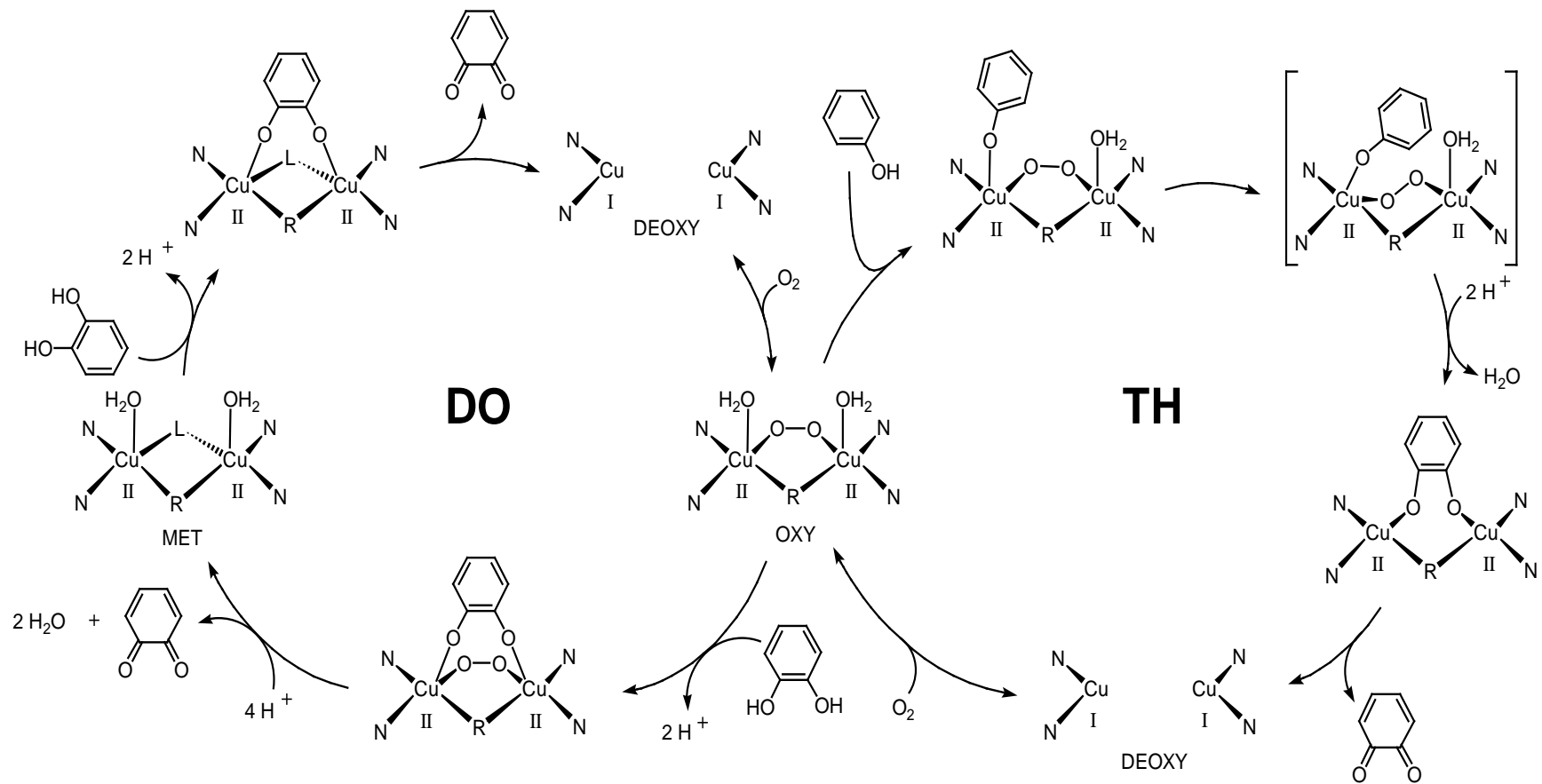


Figura 9. Ciclo catalítico de tirosinasa propuesto por Lerch (1983),¹⁰⁶ donde se describen los mecanismos de las actividades catecolasa (DO) y cresolasa (TH). En el modelo postulado, N representa un ligando His, R un ligando endógeno de la proteína puenteando los ds cobres y L un ligando exógeno.

La afinidad de la tirosinasa de mamíferos por el L-dopa cuando actúa como cofactor de la actividad tirosina hidroxilasa es unos dos órdenes de magnitud mayor que cuando es el sustrato de la actividad oxidasa, lo que sugiere que el dopa podría unirse a dos centros catalíticos distintos en la enzima.¹⁸¹ Esta dualidad del dopa ha complicado la comprensión del mecanismo de acción de la tirosinasa.

8. PROCESAMIENTO DE TIROSINASA: N-GLICOSILACIÓN.

Las enzimas melanogénicas son glicoproteínas transmembranales que sufren un procesamiento post-traducciona complejo antes de alcanzar la membrana del melanosoma en su conformación final activa. Durante la traducción, la cadena polipeptídica naciente es traslocada al RE, donde tienen lugar modificaciones co- y post-traduccionales, incluyendo N-glicosilaciones, formación de puentes disulfuro y, en su caso, oligomerización de proteínas para la adquisición de la estructura terciaria (o cuaternaria) apropiada. A continuación, la proteína correctamente glicosilada y plegada es transportada al Golgi, donde los N-oligosacáridos sufren modificaciones adicionales y probablemente se produce la unión del metal divalente. Por el contrario, las especies que no están bien plegadas son retenidas en este compartimiento gracias a la existencia en el RE de una maquinaria de control de calidad de proteínas, y si esta conformación incorrecta es permanente, las proteínas son conducidas al citosol y degradadas en el proteasoma. Finalmente, las enzimas melanogénicas correctamente plegadas se empaquetan en vesículas antes de la fusión con los premelanosomas.^{28,118}

La importancia del plegamiento de estas enzimas queda de manifiesto por el hecho de que algunas formas de los albinismos oculocutáneos (OCA) tipos 1 y 3, que son enfermedades autosómicas recesivas caracterizadas por ausencia o disminución de la pigmentación y que presentan otros síntomas de diversa seriedad,¹⁸² se consideran causadas por la retención en el retículo endoplásmico de formas mutadas de tirosinasa y Tyrp1, respectivamente, que se pliegan de forma incorrecta y falla su dirección a los melanosomas, siendo por el contrario exportadas al citosol para su degradación por el sistema proteasoma dependiente de ubiquitina.^{183,184} Además, la existencia de alguna mutación de este tipo en una de las dos (tirosinasa o Tyrp1), siendo la otra funcional, afecta también al procesamiento de ésta, al ralentizarse su transporte al melanosoma.¹⁸³ Otros autores han demostrado que algunas formas mutadas de tirosinasa originan enzimas sensibles a la temperatura que presentan cierta actividad residual en zonas del cuerpo menos cálidas (como las extremidades), pero resultan inactivas a la temperatura habitual del humano

(37°C), y se ha comprobado que estas proteínas mutadas se procesan de forma correcta a temperaturas bajas (31°C), pero a otras más elevadas son retenidas en el RE y degradadas por estar mal plegadas.¹⁸⁵ También es importante destacar que una de las causas del frecuente fenotipo amelanótico de melanomas humanos es un procesamiento aberrante de tirosinasa,¹⁸⁶ y muchos otros desórdenes de pigmentación también están causados por defectos en el tráfico intracelular de tirosinasa,^{187,188} como el OCA2, causado por mutaciones del gen *p* (*pinkeyed-dilution*), cuya proteína contribuye al correcto procesamiento de tirosinasa.¹⁸⁹

Dentro de la escala filogenética, sólo las tirosinasas y Tyrps de animales presentan secuencias diana para N-glicosilación (Asn-X-Thr/Ser, siendo X cualquier aminoácido menos Pro). Estos carbohidratos juegan un importante papel en la vía biosintética secretora al ser necesarios para el correcto plegamiento de la proteína,¹⁹⁰ ya que sirven de anclaje a las lectinas del RE calnexina y calreticulina, que controlan el plegamiento y el tráfico de muchas proteínas. La importancia de la fracción glicídica de la enzima se pone de manifiesto al adicionar inhibidores de la glicosilación sobre cultivos de melanocitos de ratón, lo que produce una disminución en la capacidad de pigmentación de los cultivos.¹⁹¹

Calnexina y calreticulina son chaperonas de tipo lectina (interaccionan con N-oligosacáridos unidos a determinadas Asn del polipéptido) del lumen del RE. Poseen secuencias homólogas, con la diferencia de que la calnexina presenta un dominio transmembrana (está ligada a la membrana del RE) y la calreticulina es soluble. Contribuyen a la adquisición de la estructura tridimensional apropiada mediante una interacción transitoria con glicoproteínas monoglucosiladas parcialmente plegadas,^{192,193,194,195} lo que aumenta el tiempo de residencia de la glicoproteína naciente en el RE y permite la acción de otras chaperonas para que la proteína adquiera su conformación final activa. Esta interacción requiere, como mínimo, la presencia de dos N-glicanos monoglucosilados.¹⁹¹

Calnexina y calreticulina forman parte del mecanismo de control de calidad del RE, junto con otras chaperonas de las llamadas clásicas, como BiP (la chaperona Hsp70 del RE), Grp94 (Hsp90), enzimas que catalizan la formación de puentes disulfuro (disulfuro isomerasa (PDI o ERp59) o ERp57) y peptidil prolil isomerasas (PPI), y las enzimas α -glicosidasa II (GlcII) y UDP-glucosa:glicoproteín glucosiltransferasa (GT).^{196,197,198} La inhibición de GT impide que la glicoproteína se asocie con calnexina (o calreticulina) y se produce un plegamiento rápido, de modo que la proteína adopta una conformación incorrecta que es incapaz de captar cobre en el Golgi y resulta inactiva.^{191,199} Existe, pues, un ciclo de

asociación/disociación de glicoproteínas con calnexina y/o calreticulina mediado por des-/reglucosilación (por las enzimas GlcII y GT, respectivamente) que juega un importante papel en el control del plegamiento, ya que estos ciclos sólo acaban y permiten la exportación al Golgi cuando la proteína alcanza una conformación correcta. Además, este sistema contribuye a evitar la agregación proteica y facilita la acción de las demás chaperonas, ya mencionadas (Figura 10).¹⁹⁸

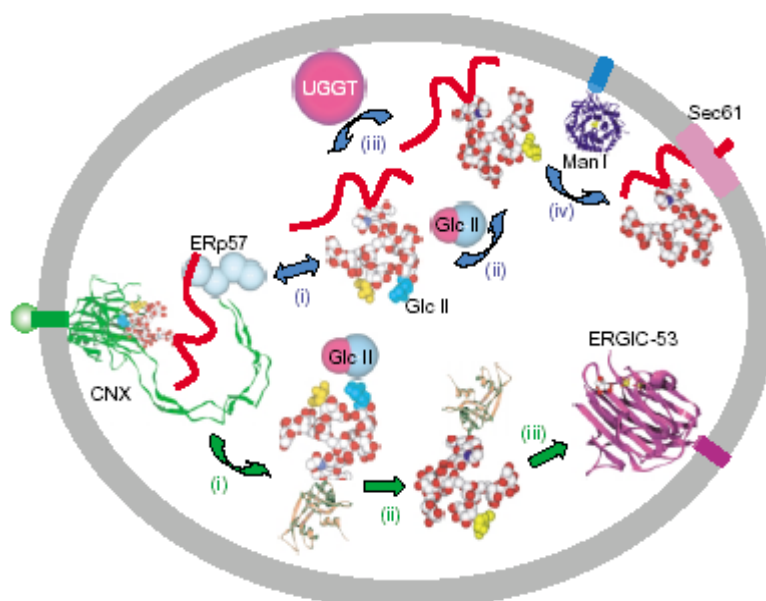


Figura 10. Representación del ciclo de la calnexina. La calnexina (CNX), anclada a membrana, y la calreticulina (CRT), soluble (no mostrada en el esquema), reconocen oligosacáridos ricos en manosa monoglucosilados unidos a proteínas parcialmente plegadas, como la tirosinasa (línea roja). Las interacciones de CNX y CRT con ERp57 facilitan la formación de puentes disulfuro apropiados en la tirosinasa, que, tras liberarse de las lectinas (i), puede seguir dos rutas (flechas verdes y azules). En la ruta azul, la glucosa terminal es eliminada por glucosidasa II (GlcII) (ii), y la tirosinasa que no está correcta o completamente plegada es reglucosilada (iii) por UGGT (UDP-glucosa:glicoproteín glucosiltransferasa), o bien la manosidasa I (ManI) elimina un residuo de manosa (iv). Tras la reglucosilación, tienen lugar ciclos adicionales de unión a CNX o CRT, mientras que la eliminación de manosas “marca” a la tirosinasa mal plegada para que sea translocada y degradada. En la ruta verde, la tirosinasa correctamente plegada se libera de las lectinas y GlcII elimina la glucosa terminal (ii) y la (ERGIC)-53 del compartimento intermedio entre RE y Golgi reconoce la tirosinasa Man₉-(GlcNAc)₂ y la exporta al RE.²⁰⁰

Por tanto, el plegamiento correcto de tirosinasa, así como la adquisición de cobre y la posesión de la actividad catalítica plena, dependen de la interacción con calnexina, aunque algunos autores sostienen que este control de calidad no es imprescindible para el transporte intracelular de tirosinasa, ya que la enzima puede ser transportada a los melanosomas aunque no sea activa.^{199,201} Las glicoproteínas inmaduras, anormalmente plegadas que no

progresan del RE al Golgi son sensibles a digestión con endoglicosidasa H (Endo H) y permanecen asociadas a calnexina en el RE, al detenerse su tráfico intracelular a sus orgánulos diana.¹⁸⁴

En cuanto al número de sitios de glicosilación ocupados en tirosinasa, no existe consenso y varía según los autores. Parece claro que la enzima humana presenta dos formas con distinto grado de glicosilación, con 6 ó 7 secuencias glicosiladas, de un total de 7 potenciales, debido a que la glicosilación de una de las posiciones (Asn290) es ineficiente por la presencia de una prolina proximal (Pro293).²⁰² Se ha demostrado que la forma mayoritaria de tirosinasa presente en células de melanoma es la que tiene 6 N-glicanos, mientras que en melanocitos normales, en los que la velocidad de traducción es 2-3 veces inferior a la de los malignos, predomina la forma con 7 sitios de glicosilación ocupados. Así, disminuyendo la velocidad de traducción en melanocitos en cultivo (temperaturas más bajas o presencia del inhibidor cicloheximida), aumenta la eficiencia de glicosilación de esta posición.²⁰² Por otro lado, se ha propuesto que la forma madura de la tirosinasa de ratón presenta N-glicanos en sólo 4 de los 6 secuencias que posee.¹⁹⁰ Aunque Tyrp1 presenta los mismos sitios de glicosilación ptencial que tirosinasa, en posiciones bastante bien conservadas (Figura 11), se desconoce si su grado de ocupación es el mismo.

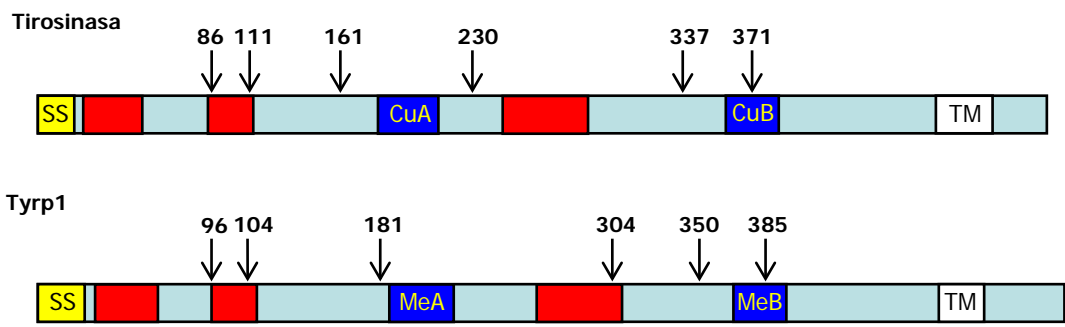


Figura 11. Representación esquemática de las estructuras de tirosinasa (A) y Tyrp1 (B) de ratón, en donde se muestran los dominios de unión a metal divalente (**Cu** (Tyr) o **Me** (Tyrp1)); los segmentos transmembranales (**TM**); los 6 secuencias potenciales de N-glicosilación (numerados según su posición en la cadena polipeptídica, incluyendo el péptido señal (**SS**)) y las tres regiones ricas en cisteínas (sombreadas en rojo).¹⁰³

El proceso de glicosilación añade a las enzimas melanogénicas varias cadenas glicídicas ácidas, lo que supone un total de un 10 a un 15% de la masa molecular de la forma madura. Concretamente, la tirosinasa y Tyrp1 maduras contienen una mezcla de glicanos formados por manosa, glucosamina, galactosa y fucosa además de ácido siálico.²⁰³ Además, tirosinasa presenta una glicofoma homogénea, rica en manosa, ausente en

Tyrp1.^{191,199} En presencia de inhibidores de α -glucosidasas, la maduración de los N-glicanos de tirosinasa se inhibe del todo, mientras que Tyrp1 todavía es capaz de adquirir algunos glicanos complejos, lo que indica que las endomanosidasas tienen preferencia por esta última enzima. Esto sugiere que, a pesar de su similitud estructural, tirosinasa es más sensible que Tyrp1, en términos de maduración, a alteraciones en el procesamiento de sus N-oligosacáridos en etapas tempranas,²⁰⁴ lo que también se refleja en la mayor velocidad de procesamiento de Tyrp1 respecto a la de tirosinasa (30 min y 3 horas, respectivamente).¹⁹¹ Como resultado de la presencia en las células de moléculas de tirosinasa y Tyrp1 recién sintetizadas, glicosiladas maduras, y especies parcialmente hidrolizadas, pueden observarse espectros continuos de isoformas de las enzimas mediante SDS-PAGE.^{116,186}

En cualquier caso, el establecimiento de la función particular de cada glicano es bastante complejo, ya que dentro del mismo polipéptido los distintos carbohidratos parecen desempeñar funciones diferentes, al igual que se ha observado que N-glicanos conservados dentro de la familia de las proteínas melanogénicas podrían realizar funciones diversas relacionadas con la estabilidad de la proteína, el plegamiento a lo largo de la vía secretora-endocítica y la actividad enzimática.²⁰⁵

Las diferencias observadas en el patrón de glicosilación de tirosinasa y Tyrp1, a pesar de la elevada homología de sus secuencias y de la práctica coincidencia de las posiciones de los secuencias de glicosilación, podrían explicarse por la importancia de las distancias entre los sitios de N-glicosilación y el extremo N-terminal²⁰⁶ o la región transmembrana.¹⁹⁷ Los mecanismos de transporte de estas proteínas a los melanosomas también podrían variar, en función de las señales específicas de dirección de cada una.²² Así, se ha propuesto que en el mecanismo de formación de microvesículas para el transporte de tirosinasa desde el *trans*-Golgi a los melanosomas en diversos estados de maduración participa el complejo de proteínas adaptadoras (adaptinas) AP-3, puesto que tirosinasa contiene el motivo dileucina²⁹ que actúa como señal que reconoce la subunidad μ 3 de AP-3. Sin embargo, este complejo no participaría en el tráfico de Tyrp1.^{207,208}

Los mecanismos de incorporación de cofactor a las enzimas melanogénicas varían dentro de la naturaleza, y podría también depender del metal (Tyr/Tyrps).¹⁰¹ El cobre es un elemento citotóxico y sus niveles citosólicos son muy bajos.²⁰⁹ Se conoce muy poco acerca de las chaperonas encargadas de la transferencia de cobre a las cuproproteínas, incluyendo tirosinasa. El primer compartimiento celular donde se detecta actividad dopa

oxidasa es el TGN,²¹⁰ por lo que es presumible que la incorporación de cobre se produzca en este orgánulo. La entrada de cobre al TGN se produce por dos ATPasas de tipo P que son las proteínas de las enfermedades de Menkes (Mnk o ATP7A) y Wilson (ATP7B). Mutaciones en ambas producen los desórdenes de hipopigmentación asociados a los *loci* de ratón *mottled* y *toxic milk*. Se ha demostrado la participación de la proteína Mnk en la transferencia de cobre a la tirosinasa humana,²¹¹ pero si los mecanismos de aporte de cobre a las tirosinasas son poco conocidos, en el caso de las Tyrps la situación es aún más desconocida y no se sabe qué mecanismos operan, ya que se el cofactor de Tyrp1 aún está por determinar y se ignora si, en el caso de Tyrp2, existen ATPasas semejantes a las mencionadas para el zinc.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Camacho, F. (1998) Aspectos anatomofisiológicos cutáneos. En: *Tratado de Dermatología (I)* Armijo, M. y Camacho, F., Eds. Grupo Aula Médica, S.A., Madrid (España), pp. 3-33.
2. Bouchard, B., del Marmol, V., Jackson, I. J., Cherif, D. y Dubertret, L. (1994) Molecular characterization of a human tyrosinase-related-protein-2 cDNA. Patterns of expression in melanocytic cells. *Eur. J. Biochem.* **219** (1), 127-134.
3. Jackson, I. J. (1988) A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* **85** (12), 4392-4396.
4. Jackson, I. J., Chambers, D. M., Tsukamoto, K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. y Hearing, V. (1992) A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J* **11** (2), 527-535.
5. Kwon, B. S., Haq, A. K., Pomerantz, S. y Halaban, R. (1987) Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (21), 7473-7477.
6. Shibahara, S., Tomita, Y., Sakakura, T., Nager, C., Chaudhuri, B. y Muller, R. (1986) Cloning and expression of cDNA encoding mouse tyrosinase. *Nucleic Acids Res.* **14** (6), 2413-2427.
7. King, R.A., Hearing, V.J., Creel, D.J. y Oetting, W.S. (1995) Albinism. En: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Scriver, R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. y Valle, D., Eds. McGraw-Hill, Inc., New York, pp. 4353-4392.
8. Dunker, H.R. (1985) The neural crest. En: *Pigment cell: biological, molecular and clinical aspects*. Bagnara, J.T., Klaus, S., Paul, E. y Scharf, M., Eds. University of Tokio Press, Tokio, pp. 255-269.
9. Reedy, M.V., Parichy, D.M., Erickson, C.A., Mason, K.A. y Frost-Mason, S.K. (1998) Regulation of melanoblast migration and differentiation. En: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. y Ortonne, J.P., Eds. Oxford Univ. Press, NY, USA, pp. 75-95.
10. Goding, C. R. (2000) Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes & Dev.* **14** 1712-1728.
11. Okazaki, K., Uzuka, M., Morikawa, F., Toda, K. y Seiji, M. (1976) Transfer mechanism of melanosomes in epidermal cell culture. *J. Invest. Dermatol.* **67** (4), 541-547.
12. Wolff, K., Jimbow, K. y Fitzpatrick, T. B. (1974) Experimental pigment donation in vivo. *J Ultrastruct Res* **47** (3), 400-419.

13. Jimbow, K. y Sugiyama, S. (1998) Melanosomal translocation and transfer. En: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. y Ortonne, J.P., Eds. Oxford Univ. Press, NY, USA, pp. 107-114.
14. Shih, I. M. y Herlyn, M. (1993) Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **100** (2), 196S-203S.
15. Jimbow, K., Quevedo, W.C., Fitzpatrick, T.B. y Szabo, G. (1993) Biology of melanocytes. En: *Dermatology in general medicine*. Fitzpatrick, T.B., Eds. McGraw-Hill, Inc., New York, pp. 261-269.
16. Nordlund, J. J. (1992) The pigmentary system and inflammation. *Pigment Cell Res* **5** (5 Pt 2), 362-365.
17. Boissy, R.E. (1998) Extracutaneous melanocytes. En: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. y Ortonne, J.P., Eds. Oxford Univ. Press, NY, USA, pp. 59-73.
18. Graham, D. G., Tiffany, S. M. y Vogel, F. S. (1978) The toxicity of melanin precursors. *J. Invest. Dermatol.* **70** (2), 113-116.
19. Wick, M. M. (1980) An experimental approach to the chemotherapy of melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **74** (2), 63-65.
20. Salinas, C., Garcia-Borron, J. C., Solano, F. y Lozano, J. A. (1994) Dopachrome tautomerase decreases the binding of indolic melanogenesis intermediates to proteins. *Biochim Biophys Acta* **1204** (1), 53-60.
21. Bhatnagar, V., Anjaiah, S., Puri, N., Darshanam, B. N. y Ramaiah, A. (1993) pH of melanosomes of B16 murine melanoma is acidic: its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **307** (1), 183-192.
22. Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D. M., Berson, J. F. y Marks, M. S. (2001) Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J. Cell Biol.* **152** (4), 809-824.
23. Jimbow, K. y Takeuchi, T. (1979) Ultrastructural comparison of pheo- and eumelanogenesis in animals. En: *Biologic basis of pigmentation*. Klaus, S., Eds. Oxford University Press, New York, pp. 308-317.
24. Orlow, S.J. (1998) The biogenesis of melanosomes. En: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. y Ortonne, J.P., Eds. Oxford Univ. Press, NY, USA, pp. 97-106.
25. Hearing, V. J. (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J Investig Dermatol Symp Proc* **4** (1), 24-28.
26. Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., Caplan, S. y Bonifacino, J. S. (2000) Lysosome-related organelles. *FASEB J* **14** (10), 1265-1278.

27. Orlow, S. J. (1995) Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J. Invest. Dermatol.* **105** (1), 3-7.
28. Maul, G. G. y Brumbaugh, J. A. (1971) On the possible function of coated vesicles in melanogenesis of the regenerating fowl feather. *J. Cell Biol.* **48** (1), 41-48.
29. Calvo, P. A., Frank, D. W., Bieler, B. M., Berson, J. F. y Marks, M. S. (1999) A cytoplasmic sequence in human tyrosinase defines a second class of dileucine-based sorting signals for late endosomal and lysosomal delivery. *J. Biol. Chem.* **274** (18), 12780-12789.
30. Winder, A. J., Wittbjer, A., Rosengren, E. y Rorsman, H. (1993) The mouse brown (b) locus protein has dopachrome tautomerase activity and is located in lysosomes in transfected fibroblasts. *J. Cell Sci.* **106** (1), 153-166.
31. Maul, G. G. (1969) Golgi-melanosome relationship in human melanoma in vitro. *J Ultrastruct Res* **26** (1), 163-176.
32. Raposo, G. y Marks, M. S. (2002) The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic* **3** (4), 237-248.
33. Seiji, M., Fitzpatrick, T. M., Simpson, R. T. y Birbeck, M. S. C. (1963) Chemical composition and terminology of specialized organelles (melanosomes and melanin granules) in mammalian melanocytes. *Nature* **197** 1082-1084.
34. Nagashima, K., Torii, S., Yi, Z., Igarashi, M., Okamoto, K., Takeuchi, T. y Izumi, T. (2002) Melanophilin directly links Rab27a and myosin Va through its distinct coiled-coil regions. *FEBS Lett* **517** (1-3), 233-238.
35. Wu, X., Bowers, B., Wei, Q., Kocher, B. y Hammer, J. A. (1997) Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *J. Cell Sci.* **110** (7), 847-859.
36. Silvers, W.K. (1979) *The coat colours of mice: a model for mammalian gene action and interaction*. Springer-Verlag, Berlin
37. Szabo, G., Hirobe, H., Flynn, E.A. y García, R.I. (1988) The biology of melanocyte. En: *Advances in Pigment Cell Research*. Bagnara, J.T., Eds. Alan Liss, New York, pp. 463-474.
38. Prota, G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol* **75** (1), 122-127.
39. Prota, G., d'Ischia, M. y Napolitano, A. (1998) The chemistry of melanins and related metabolites. En: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. y Ortonne, J.P., Eds. Oxford Univ. Press, NY, USA, pp. 307-332.
40. Raper, H. S. (1928) The aerobic oxidases. *Physiol. Rev.* **8** 245-258.

41. Mason, H. S. (1948) The chemistry of melanin III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **172** 83-90.
42. Fitzpatrick, T.B., Burnet, P.C. y Kukita, A. (1958) The nature of hair pigment. En: *The biology of hair growth* Motagna, W., Eds. Academic Press, New York, pp. 255-303.
43. Cooksey, C. J., Garratt, P. J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A. y Smit, N. P. (1997) Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **272** (42), 26226-26235.
44. Lerner, A. B. (1950) Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30** 91-126.
45. García-Canovas, F., Garcia-Carmona, F., Sanchez, J. V., Iborra, J. L. y Lozano, J. A. (1982) The role of pH in the melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **257** (15), 8738-8744.
46. Leonard, L. J., Townsend, D. y King, R. A. (1988) Function of dopachrome oxidoreductase and metal ions in dopachrome conversion in the eumelanin pathway. *Biochemistry* **27** (16), 6156-6159.
47. Aroca, P., Garcia-Borron, J. C., Solano, F. y Lozano, J. A. (1990) Regulation of mammalian melanogenesis. I: Partial purification and characterization of a dopachrome converting factor: dopachrome tautomerase. *Biochim Biophys Acta* **1035** (3), 266-275.
48. Pawelek, J. M. (1991) After dopachrome? *Pigment Cell Res* **4** (2), 53-62.
49. Palumbo, A., D'Ischia, M., Misuraca, G. y Prota, G. (1987) Effect of metal ions on the rearrangement of dopachrome. *Biochim Biophys Acta* **925** (2), 203-209.
50. Jara, J. R., Solano, F., Garcia-Borron, J. C., Aroca, P. y Lozano, J. A. (1990) Regulation of mammalian melanogenesis. II: The role of metal cations. *Biochim Biophys Acta* **1035** (3), 276-285.
51. Palumbo, A., Solano, F., Misuraca, G., Aroca, P., Garcia Borron, J. C., Lozano, J. A. y Prota, G. (1991) Comparative action of dopachrome tautomerase and metal ions on the rearrangement of dopachrome. *Biochim Biophys Acta* **1115** (1), 1-5.
52. Smit, N. P., Pavel, S., Kammeyer, A. y Westerhof, W. (1990) Determination of catechol O-methyltransferase activity in relation to melanin metabolism using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal Biochem* **190** (2), 286-291.
53. Westerhof, W., Pavel, S., Kammeyer, A., Beusenberg, F. D. y Cormane, R. (1987) Melanin-related metabolites as markers of the skin pigmentary system. *J. Invest. Dermatol.* **89** (1), 78-81.
54. Hansson, C. (1983) Demonstration of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, a melanin precursor, in normal urine. *Acta Derm Venereol* **63** (2), 147-149.

55. Tsukamoto, K., Jimenez, M. y Hearing, V. J. (1992) The nature of tyrosinase isozymes. *Pigment Cell Res Suppl* **2** 84-89.
56. Korner, A. y Pawelek, J. (1982) Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* **217** (4565), 1163-1165.
57. Hearing, V. J. y Tsukamoto, K. (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J* **5** (14), 2902-2909.
58. Moellman, G., Slominsky, A., Kuklinska, E. y Lerner, A. B. (2003) Regulation of melanogenesis in melanocytes. *Pigment Cell Res Suppl* **1** 79-87.
59. Aroca, P., Solano, F., Salinas, C., Garcia-Borrón, J. C. y Lozano, J. A. (1992) Regulation of the final phase of mammalian melanogenesis. The role of dopachrome tautomerase and the ratio between 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid and 5,6-dihydroxyindole. *Eur. J. Biochem.* **208** (1), 155-163.
60. D'Ischia, M., Napolitano, A. y Prota, G. (1991) Peroxidase as an alternative to tyrosinase in the oxidative polymerization of 5,6-dihydroxyindoles to melanin(s). *Biochim Biophys Acta* **1073** (2), 423-430.
61. Prota, G. (1993) Regulatory mechanisms of melanogenesis: beyond the tyrosinase concept. *J. Invest. Dermatol.* **100** (2), 156S-161S.
62. Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. A. y Garcia-Borrón, J. C. (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.* **269** (27), 17993-18001.
63. Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Tsukamoto, K., Brewington, T., Imokawa, G., Potterf, B. y Hearing, V. J. (1994) DHICA oxidase activity of TRP1 and interactions with other melanogenic enzymes. *Pigment Cell Res* **7** (4), 227-234.
64. Tsukamoto, K., Palumbo, A., D'Ischia, M., Hearing, V. J. y Prota, G. (1992) 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid is incorporated in mammalian melanin. *Biochem J* **286** (2), 491-495.
65. Ito, S. (1986) Reexamination of the structure of eumelanin. *Biochim Biophys Acta* **883** (1), 155-161.
66. Palumbo, A., D'Ischia, M., Misuraca, G., Prota, G. y Schultz, T. M. (1988) Structural modifications in biosynthetic melanins induced by metal ions. *Biochim Biophys Acta* **964** (2), 193-199.
67. Prota, G. (1992) *Melanins and melanogenesis*. Academic Press, New York, pp. 1-290.
68. Ito, S. y Prota, G. (1977) A facile one-step synthesis of cysteinyl dopas using mushroom tyrosinase. *Experientia* **33** (8), 1118-1119.

69. Prota, G. (1980) Cysteine and glutathione in mammalian pigmentation. En: *Natural sulfur compounds*. Cavallini, D., Gaul, G.E. y Zappia, V., Eds. Plenum Press, New York, pp. 391-397.
70. Karg, E., Odh, G., Rosengren, E., Wittbjer, A. y Rorsman, H. (1991) Melanin-related biochemistry of IGR 1 human melanoma cells. *Melanoma Res* **1** (1), 5-13.
71. Burchill, S. A., Thody, A. J. y Ito, S. (1986) Melanocyte-stimulating hormone, tyrosinase activity and the regulation of eumelanogenesis and phaeomelanogenesis in the hair follicular melanocytes of the mouse. *J Endocrinol* **109** (1), 15-21.
72. Ito, S., Wakamatsu, K. y Ozeki, H. (1993) Spectrophotometric assay of eumelanin in tissue samples. *Anal Biochem* **215** (2), 273-277.
73. Burchill, S. A., Virden, R. y Thody, A. J. (1989) Regulation of tyrosinase synthesis and its processing in the hair follicular melanocytes of the mouse during eumelanogenesis and phaeomelanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **93** (2), 236-240.
74. del Marmol, V., Solano, F., Sels, A., Huez, G., Libert, A., Lejeune, F. y Ghanem, G. (1993) Glutathione depletion increases tyrosinase activity in human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **101** (6), 871-874.
75. Garcia-Borron, J. C., Saura, M. D., Solano, F., Iborra, J. L. y Lozano, J. A. (1985) FT-IR spectroscopy of natural melanins isolated from Harding-Passey mouse melanoma. *Physiol Chem Phys Med NMR* **17** (2), 211-218.
76. Nicolaus, R.A. (1968) *Melanins*. Hermann Press, Paris
77. Benedito, E., Jimenez-Cervantes, C., Cubillana, J. D., Solano, F., Lozano, J. A. y Garcia-Borron, J. C. (1995) Biochemical characterization of the melanogenic system in the eye of adult rodents. *Biochim Biophys Acta* **1252** (2), 217-224.
78. Benedito, E., Jimenez-Cervantes, C., Perez, D., Cubillana, J. D., Solano, F., Jimenez-Cervantes, J., Meyer, z. G., Lozano, J. A. y Garcia-Borron, J. C. (1997) Melanin formation in the inner ear is catalyzed by a new tyrosine hydroxylase kinetically and structurally different from tyrosinase. *Biochim Biophys Acta* **1336** (1), 59-72.
79. Prota, G. (1992) *Melanins and melanogenesis*. Academic Press, New York, pp. 1-290.
80. Hill, H. Z. (1992) The function of melanin or six blind people examine an elephant. *Bioessays* **14** (1), 49-56.
81. Riley, P. A. (1992) Materia melanica: further dark thoughts. *Pigment Cell Res* **5** (3), 101-106.

82. Westerhof, W., Estevez-Uscanga, O., Meens, J., Kammeyer, A., Durocq, M. y Cario, I. (1990) The relation between constitutional skin color and photosensitivity estimated from UV-induced erythema and pigmentation dose-response curves. *J. Invest. Dermatol.* **94** (6), 812-816.
83. Sarna, T., Pilas, B., Land, E. J. y Truscott, T. G. (1986) Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochim Biophys Acta* **883** (1), 162-167.
84. Riley, P. A. (1997) Melanin. *Int J Biochem Cell Biol* **29** (11), 1235-1239.
85. Kobayashi, N., Nakagawa, A., Muramatsu, T., Yamashina, Y., Shirai, T., Hashimoto, M. W., Ishigaki, Y., Ohnishi, T. y Mori, T. (1998) Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **110** (5), 806-810.
86. Lyttkens, L., Larsson, B., Goller, H., Englesson, S. y Stahle, J. (1979) Melanin capacity to accumulate drugs in the internal ear. A study on lidocaine, bupivacaine and chlorpromazine. *Acta Otolaryngol* **88** (1-2), 61-73.
87. Crippa, P. R. y Viappiani, C. (1990) Photoacoustic studies of non-radiative relaxation of excited states in melanin. *Eur Biophys J* **17** (6), 299-305.
88. Barrenas, M. L. y Lindgren, F. (1990) The influence of inner ear melanin on susceptibility to TTS in humans. *Scand Audiol* **19** (2), 97-102.
89. Schraermeyer, U. y Heimann, K. (1999) Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Res* **12** (4), 219-236.
90. Kwon, B. S., Wakulchik, M., Haq, A. K., Halaban, R. y Kestler, D. (1988) Sequence analysis of mouse tyrosinase cDNA and the effect of melanotropin on its gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **153** (3), 1301-1309.
91. Muller, G., Ruppert, S., Schmid, E. y Schutz, G. (1988) Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. *EMBO J* **7** (9), 2723-2730.
92. Yamamoto, H., Takeuchi, S., Kudo, T., Makino, K., Nakata, A., Shinoda, T. y Takeuchi, T. (1987) Cloning and sequencing of mouse tyrosinase. *Jpn. J. Genet.* **62** 271-274.
93. Montoliu, L., Umland, T. y Schutz, G. (1996) A locus control region at -12 kb of the tyrosinase gene. *EMBO J* **15** (22), 6026-6034.
94. Giraldo, P. y Montoliu, L. (2002) Artificial chromosome transgenesis in pigmentary research. *Pigment Cell Res* **15** (4), 258-264.
95. Barton, D. E., Kwon, B. S. y Francke, U. (1988) Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14---q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. *Genomics* **3** (1), 17-24.
96. Takeuchi, T. (1992) Molecular structure of the tyrosinase gene. *Pigment Cell Res Suppl* **2** 61-66.

97. Jackson, I. J., Chambers, D. M., Budd, P. S. y Johnson, R. (1991) The tyrosinase-related protein-1 gene has a structure and promoter sequence very different from tyrosinase. *Nucleic Acids Res.* **19** (14), 3799-3804.
98. Abbott, C., Jackson, I. J., Carritt, B. y Povey, S. (1991) The human homolog of the mouse brown gene maps to the short arm of chromosome 9 and extends the known region of homology with mouse chromosome 4. *Genomics* **11** (2), 471-473.
99. Tsukamoto, K., Jackson, I. J., Urabe, K., Montague, P. M. y Hearing, V. J. (1992) A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPachrome tautomerase. *EMBO J* **11** (2), 519-526.
100. Furumura, M., Solano, F., Matsunaga, N., Sakai, C., Spritz, R. A. y Hearing, V. J. (1998) Metal ligand-binding specificities of the tyrosinase-related proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **242** (3), 579-585.
101. Solano, F., Jimenez-Cervantes, C., Martinez-Liarte, J. H., Garcia-Borrón, J. C., Jara, J. R. y Lozano, J. A. (1996) Molecular mechanism for catalysis by a new zinc-enzyme, dopachrome tautomerase. *Biochem J* **313** (2), 447-453.
102. Frishman, D. y Argos, P. (1996) Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng.* **9** (2), 133-142.
103. García-Borrón, J. C. y Solano, F. (2002) Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res* **15** (3), 162-173.
104. Setaluri, V. (2000) Sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: signals, pathways, and mechanisms. *Pigment Cell Res* **13** (3), 128-134.
105. Jackson, I. J. (1994) Evolution and expression of tyrosinase-related proteins. *Pigment Cell Res* **7** (4), 241-242.
106. Lerch, K. (1983) Neurospora tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol Cell Biochem* **52** (2), 125-138.
107. Lerch, K. (1988) Protein and active-site structure of tyrosinase. En: *Advances in Pigment Cell Research*. Bagnara, J.T., Eds. Alan Liss, New York, pp. 85-98.
108. Jolley, R. L., Evans, L. H. y Mason, H. S. (1972) Reversible oxygenation of tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* **46** (2), 878-884.
109. Hearing, V. J. y Jimenez, M. (1987) Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem* **19** (12), 1141-1147.
110. Yurkow, E. J. y Laskin, J. D. (1989) Purification of tyrosinase to homogeneity based on its resistance to sodium dodecyl sulfate-proteinase K digestion. *Arch Biochem Biophys* **275** (1), 122-129.

111. Garcia-Borron, J. C., Solano, F., Iborra, J. L. y Lozano, J. A. (1985) Aggregation equilibria of tyrosinase of Harding-Passey mouse melanoma. *Biochem J* **228** (1), 95-101.
112. Pawelek, J. M. (1985) Studies on the Cloudman melanoma cell line as a model for the action of MSH. *Yale J Biol Med* **58** (6), 571-578.
113. Jimenez, M., Kameyama, K., Maloy, W. M., Tomita, Y. y Hearing, V. J. (1988) Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* **85** (11), 3830-3834.
114. Martinez, J. H., Solano, F., Penafiel, R. y Lozano, J. A. (1988) Half-lives of tyrosinase isozymes from Harding-Passey mouse melanoma. *Cancer Lett* **38** (3), 339-346.
115. Garcia-Borron, J. C., Martinez, J. H., Arocas, A., Solano, F., Vicente, V., Gomez, S., Iborra, J. L. y Lozano, J. A. (1985) Regulation of the cytosolic and melanosome-bound tyrosinase activities in Harding-Passey mouse melanoma. *Int J Biochem* **17** (9), 995-1002.
116. Laskin, J. D. y Piccinini, L. A. (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem.* **261** (35), 16626-16635.
117. Ferrini, U., Mileo, A. M. y Hearing, V. J. (1987) Microheterogeneity of melanosome-bound tyrosinase from the Harding-Passey murine melanoma. *Int J Biochem* **19** (3), 227-234.
118. Hearing, V. J., Ekel, T. M. y Montague, P. M. (1981) Mammalian tyrosinase: isozymic forms of the enzyme. *Int J Biochem* **13** (1), 99-103.
119. Burnett, J. B. (1971) The tyrosinases of mouse melanoma. Isolation and molecular properties. *J Biol Chem* **246** (10), 3079-3091.
120. Pomerantz, S. H. y Li, J. P. (1973) Purification and properties of tyrosinase isoenzymes from hamster melanoma. *Yale J Biol Med* **46** (5), 541-552.
121. Halaban, R. y Moellmann, G. (1990) Murine and Human b Locus Pigmentation Genes Encode a Glycoprotein (gp75) with Catalase Activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **87** (12), 4809-4813.
122. Jimenez, M., Maloy, W. L. y Hearing, V. J. (1989) Specific identification of an authentic clone for mammalian tyrosinase. *J Biol Chem* **264** (6), 3397-3403.
123. Jimenez, M., Tsukamoto, K. y Hearing, V. J. (1991) Tyrosinases from two different loci are expressed by normal and by transformed melanocytes. *J. Biol. Chem.* **266** (2), 1147-1156.
124. Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jimenez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., Garcia-Borron, J. C. y Hearing, V. J. (1994) Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J* **13** (24), 5818-5825.

125. Jimenez-Cervantes, C., Martinez-Esparza, M., Solano, F., Lozano, J. A. y Garcia-Borron, J. C. (1998) Molecular interactions within the melanogenic complex: formation of heterodimers of tyrosinase and TRP1 from B16 mouse melanoma. *Biochem Biophys Res Commun* **253** (3), 761-767.
126. Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D. C. y Hearing, V. J. (1998) Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). *J. Biol. Chem.* **273** (48), 31801-31805.
127. Jimenez-Cervantes, C., Garcia-Borron, J. C., Valverde, P., Solano, F. y Lozano, J. A. (1993) Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes. 1. Biochemical characterization of two melanosomal tyrosinases from B16 mouse melanoma. *Eur. J. Biochem.* **217** (2), 549-556.
128. Jimenez-Cervantes, C., Valverde, P., Garcia-Borron, J. C., Solano, F. y Lozano, J. A. (1993) Improved tyrosinase activity stains in polyacrylamide electrophoresis gels. *Pigment Cell Res* **6** (6), 394-399.
129. Aroca, P., Solano, F., Garcia-Borron, J. C. y Lozano, J. A. (1991) Specificity of dopachrome tautomerase and inhibition by carboxylated indoles. Considerations on the enzyme active site. *Biochem J* **277** (2), 393-397.
130. Aroca, P., Martinez-Liarte, J. H., Solano, F., Garcia-Borron, J. C. y Lozano, J. A. (1992) The action of glycosylases on dopachrome (2-carboxy-2,3-dihydroindole-5,6-quinone) tautomerase. *Biochem J* **284** (1), 109-113.
131. Orlow, S. J., Osber, M. P. y Pawelek, J. M. (1992) Synthesis and characterization of melanins from dihydroxyindole-2-carboxylic acid and dihydroxyindole. *Pigment Cell Res* **5** (3), 113-121.
132. Solano, F., Martinez-Liarte, J. H., Jimenez-Cervantes, C., Garcia-Borron, J. C. y Lozano, J. A. (1994) Dopachrome tautomerase is a zinc-containing enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **204** (3), 1243-1250.
133. Urabe, K., Aroca, P. y Hearing, V. J. (1993) From gene to protein: determination of melanin synthesis. *Pigment Cell Res* **6** (4 Pt 1), 186-192.
134. Barsh, G. S. (1996) The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet* **12** (8), 299-305.
135. Robbins, L. S., Nadeau, J. H., Johnson, K. R., Kelly, M. A., Roselli-Reh fuss, L., Baack, E., Mountjoy, K. G. y Cone, R. D. (1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* **72** (6), 827-834.
136. Scott, M. C., Wakamatsu, K., Ito, S., Kadokaro, A. L., Kobayashi, N., Groden, J., Kavanagh, R., Takakuwa, T., Virador, V., Hearing, V. J. y Abdel-Malek, Z. A. (2002) Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *J Cell Sci.* **115** (Pt 11), 2349-2355.
137. Rees, J. L. (2000) The melanocortin 1 receptor (MC1R): more than just red hair. *Pigment Cell Res* **13** (3), 135-140.

138. Jimenez-Cervantes, C., Germer, S., Gonzalez, P., Sanchez, J., Olivares, C. y Garcia-Borron, J. C. (2001) Thr40 and Met122 are new partial loss-of-function natural mutations of the human melanocortin 1 receptor. *FEBS Lett* **508** (1), 44-48.
139. Sanchez, M. J., Olivares, C., Ghanem, G., Haycock, J., Lozano Teruel, J. A., Garcia-Borron, J. C. y Jimenez-Cervantes, C. (2002) Loss-of-function variants of the human melanocortin-1 receptor gene in melanoma cells define structural determinants of receptor function. *Eur J Biochem* **269** (24), 6133-6141.
140. Sturm, R. A., Teasdale, R. D. y Box, N. F. (2001) Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* **277** (1-2), 49-62.
141. Ganss, R., Schutz, G. y Beermann, F. (1994) The mouse tyrosinase gene. Promoter modulation by positive and negative regulatory elements. *J Biol Chem* **269** (47), 29808-29816.
142. Lowings, P., Yavuzer, U. y Goding, C. R. (1992) Positive and negative elements regulate a melanocyte-specific promoter. *Mol Cell Biol* **12** (8), 3653-3662.
143. Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. y Arnheiter, H. (1993) Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* **74** (2), 395-404.
144. Tachibana, M., Perez-Jurado, L. A., Nakayama, A., Hodgkinson, C. A., Li, X., Schneider, M., Miki, T., Fex, J., Francke, U. y Arnheiter, H. (1994) Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-p12.3. *Hum. Mol Genet* **3** (4), 553-557.
145. Bertolotto, C., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J. P. y Ballotti, R. (1998) Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol Cell Biol* **18** (2), 694-702.
146. Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T. J., Bille, K., Fisher, D. E., Ortonne, J. P. y Ballotti, R. (1998) Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol* **142** (3), 827-835.
147. Tachibana, M., Takeda, K., Nobukuni, Y., Urabe, K., Long, J. E., Meyers, K. A., Aaronson, S. A. y Miki, T. (1996) Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nat. Genet* **14** (1), 50-54.
148. Eisen, T., Easty, D. J., Bennett, D. C. y Goding, C. R. (1995) The POU domain transcription factor Brn-2: elevated expression in malignant melanoma and regulation of melanocyte-specific gene expression. *Oncogene* **11** (10), 2157-2164.

149. Verastegui, C., Bertolotto, C., Bille, K., Abbe, P., Ortonne, J. P. y Ballotti, R. (1999) TFE3 and TFEB as transcription activators of tyrosinase and TRP1 genes. *Pigment Cell Res Suppl* **7** (PP 144),
150. Carreira, S., Dexter, T. J., Yavuzer, U., Easty, D. J. y Goding, C. R. (1998) Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *Mol Cell Biol* **18** (9), 5099-5108.
151. Epstein, D. J., Vekemans, M. y Gros, P. (1991) Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* **67** (4), 767-774.
152. Abdel-Malek, Z.A. (1998) Regulation of human pigmentation by UV light and endocrine, paracrine and autocrine hormones. En: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. y Ortonne, J.P., Eds. Oxford Univ. Press, NY, USA, pp. 115-122.
153. Hearing, V. J. (1993) Unraveling the melanocyte. *Am. J Hum. Genet* **52** (1), 1-7.
154. Puri, N., Gardner, J. M. y Brilliant, M. H. (2000) Aberrant pH of melanosomes in pink-eyed dilution (p) mutant melanocytes. *J Invest Dermatol* **115** (4), 607-613.
155. Adema, G. J., de Boer, A. J., Vogel, A. M., Loenen, W. A. y Figdor, C. G. (1994) Molecular characterization of the melanocyte lineage-specific antigen gp100. *J Biol Chem* **269** (31), 20126-20133.
156. Kwon, B. S., Halaban, R., Ponnazhagan, S., Kim, K., Chintamaneni, C., Bennett, D. y Pickard, R. T. (1995) Mouse silver mutation is caused by a single base insertion in the putative cytoplasmic domain of Pmel 17. *Nucleic Acids Res* **23** (1), 154-158.
157. Solano, F., Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Hill, S. P., Lozano, J. A. y Garcia-Borrón, J. C. (2000) New insights on the structure of the mouse silver locus and on the function of the silver protein. *Pigment Cell Res* **13 Suppl 8** 118-124.
158. Busca, R. y Ballotti, R. (2000) Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* **13** (2), 60-69.
159. Abdel-Malek, Z., Swope, V., Smalara, D., Babcock, G., Dawes, S. y Nordlund, J. (1994) Analysis of the UV-induced melanogenesis and growth arrest of human melanocytes. *Pigment Cell Res* **7** (5), 326-332.
160. Aberdam, E., Romero, C. y Ortonne, J. P. (1993) Repeated UVB irradiations do not have the same potential to promote stimulation of melanogenesis in cultured normal human melanocytes. *J. Cell Sci.* **106** (4), 1015-1022.
161. Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233** (4761), 305-312.

162. Park, H. Y., Perez, J. M., Laursen, R., Hara, M. y Gilchrest, B. A. (1999) Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **274** (23), 16470-16478.
163. Romero-Graillet, C., Aberdam, E., Biagoli, N., Massabni, W., Ortonne, J. P. y Ballotti, R. (1996) Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem* **271** (45), 28052-28056.
164. Gordon, P. R., Mansur, C. P. y Gilchrest, B. A. (1989) Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J. Invest. Dermatol.* **92** (4), 565-572.
165. Abdel-Malek, Z. A., Swope, V. B., Amornsiripanitch, N. y Nordlund, J. J. (1987) In vitro modulation of proliferation and melanization of S91 melanoma cells by prostaglandins. *Cancer Res.* **47** (12), 3141-3146.
166. Hara, M., Yaar, M. y Gilchrest, B. A. (1995) Endothelin-1 of keratinocyte origin is a mediator of melanocyte dendricity. *J. Invest. Dermatol.* **105** (6), 744-748.
167. Romero-Graillet, C., Aberdam, E., Clement, M., Ortonne, J. P. y Ballotti, R. (1997) Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin. Invest* **99** (4), 635-642.
168. Swope, V. B., Abdel-Malek, Z. A., Sauder, D. N. y Nordlund, J. J. (1989) A new role for epidermal cell-derived thymocyte activating factor/IL-1 as an antagonist for distinct epidermal cell function. *J. Immunol.* **142** (6), 1943-1949.
169. Kock, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C. y Luger, T. A. (1990) Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp. Med* **172** (6), 1609-1614.
170. Halaban, R., Langdon, R., Birchall, N., Cuono, C., Baird, A., Scott, G., Moellmann, G. y McGuire, J. (1988) Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J. Cell Biol.* **107** (4), 1611-1619.
171. Lerner, A. B., Fitzpatrick, T. B., Calkins, E. y Summerson, W. H. (1950) Mammalian tyrosinase. The relationship of copper to enzymatic activity. *J Biol Chem* **187** 793-802.
172. Huber, M. y Lerch, K. (1988) Identification of two histidines as copper ligands in *Streptomyces glaucescens* tyrosinase. *Biochemistry* **27** (15), 5610-5615.
173. Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C. y Krebs, B. (1998) Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol* **5** (12), 1084-1090.
174. Spritz, R. A., Ho, L., Furumura, M. y Hearing, V. J. J. (1997) Mutational analysis of copper binding by human tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* **109** (2), 207-212.

175. Nakamura, M., Nakajima, T., Ohba, Y., Yamauchi, S., Lee, B. R. y Ichishima, E. (2000) Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. *Biochem J* **350** (2), 537-545.
176. Somerville, R. P., Oblander, S. A. y Apte, S. S. (2003) Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* **4** (6), 216.1-216.11.
177. Hearing, V. J. y Ekel, T. M. (1976) Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem J* **157** (3), 549-557.
178. Tripathi, R. K., Hearing, V. J., Urabe, K., Aroca, P. y Spritz, R. A. (1992) Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **267** (33), 23707-23712.
179. Pomerantz, S. H. (1966) The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **241** (1), 161-168.
180. Jara, J. R., Solano, F. y Lozano, J. A. (1988) Assays for mammalian tyrosinase: a comparative study. *Pigment Cell Res* **1** (5), 332-339.
181. Pomerantz, S. H. y Warner, M. C. (1967) 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine as the tyrosinase cofactor. Occurrence in melanoma and binding constant. *J. Biol. Chem.* **242** (22), 5308-5314.
182. Oetting, W. S. (2000) The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment Cell Res* **13** (5), 320-325.
183. Toyofuku, K., Wada, I., Valencia, J. C., Kushimoto, T. O., Ferrana, V. J. y Hearing, V. J. (2001) Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Tyrp1 can affect the processing of both mutant and wild-type proteins. *FASEB J* **15** (12), 2149-2161.
184. Toyofuku, K., Wada, I., Spritz, R. A. y Hearing, V. J. (2001) The molecular basis of oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): sorting failure and degradation of mutant tyrosinases results in a lack of pigmentation. *Biochem J* **355** (2), 259-269.
185. Berson, J. F., Frank, D. W., Calvo, P. A., Bieler, B. M. y Marks, M. S. (2000) A common temperature-sensitive allelic form of human tyrosinase is retained in the endoplasmic reticulum at the nonpermissive temperature. *J. Biol. Chem.* **275** (16), 12281-12289.
186. Halaban, R., Cheng, E., Zhang, Y., Moellmann, G., Hanlon, D., Michalak, M., Setaluri, V. y Hebert, D. N. (1997) Aberrant retention of tyrosinase in the endoplasmic reticulum mediates accelerated degradation of the enzyme and contributes to the dedifferentiated phenotype of amelanotic melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (12), 6210-6215.
187. Beermann, F., Orlow, S. J., Boissy, R. E., Schmidt, A., Boissy, Y. L. y Lamoreux, M. L. (1995) Misrouting of tyrosinase with a truncated cytoplasmic tail as a result of the murine platinum (cp) mutation. *Exp Eye Res* **61** (5), 599-607.

188. Chen, K., Manga, P. y Orlow, S. J. (2002) Pink-eyed Dilution Protein Controls the Processing of Tyrosinase. *Mol. Biol. Cell* **13** (6), 1953-1964.
189. Lee, S. T., Nicholls, R. D., Bunday, S., Laxova, R., Musarella, M. y Spritz, R. A. (1994) Mutations of the P Gene in Oculocutaneous Albinism, Ocular Albinism, and Prader-Willi Syndrome Plus Albinism. *N. Engl. J. Med.* **330** (8), 529-534.
190. Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A. J., Garman, E. F., Platt, F. M., Wormald, M. R., Dwek, R. A. y Petrescu, S. M. (2000) Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J. Biol. Chem.* **275** (11), 8169-8175.
191. Petrescu, S. M., Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A. J. y Dwek, R. A. (2000) Tyrosinase and glycoprotein folding: roles of chaperones that recognize glycans. *Biochemistry* **39** (18), 5229-5237.
192. Hammond, C., Braakman, I. y Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** (3), 913-917.
193. Hebert, D. N., Foellmer, B. y Helenius, A. (1995) Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81** (3), 425-433.
194. Hebert, D. N., Foellmer, B. y Helenius, A. (1996) Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO J* **15** (12), 2961-2968.
195. Peterson, J. R., Ora, A., Van, P. N. y Helenius, A. (1995) Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Mol. Biol. Cell* **6** (9), 1173-1184.
196. High, S., Lecomte, F. J., Russell, S. J., Abell, B. M. y Oliver, J. D. (2000) Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett* **476** (1-2), 38-41.
197. Molinari, M. y Helenius, A. (2000) Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* **288** (5464), 331-333.
198. Parodi, A. J. (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J* **348** (1), 1-13.
199. Branza-Nichita, N., Petrescu, A. J., Dwek, R. A., Wormald, M. R., Platt, F. M. y Petrescu, S. M. (1999) Tyrosinase folding and copper loading in vivo: a crucial role for calnexin and alpha-glucosidase II. *Biochem Biophys Res Commun* **261** (3), 720-725.
200. Schrag, J. D., Procopio, D. O., Cygler, M., Thomas, D. Y. y Bergeron, J. J. (2003) Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends Biochem Sci* **28** (1), 49-57.

201. Petrescu, S. M., Petrescu, A. J., Titu, H. N., Dwek, R. A. y Platt, F. M. (1997) Inhibition of N-glycan processing in B16 melanoma cells results in inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome. *J. Biol. Chem.* **272** (25), 15796-15803.
202. Ujvari, A., Aron, R., Eisenhaure, T., Cheng, E., Parag, H. A., Smicun, Y., Halaban, R. y Hebert, D. N. (2001) Translation rate of human tyrosinase determines its N-linked glycosylation level. *J. Biol. Chem.* **276** (8), 5924-5931.
203. Ohkura, T., Yamashita, K., Mishima, Y. y Kobata, A. (1984) Purification of hamster melanoma tyrosinases and structural studies of their asparagine-linked sugar chains. *Arch Biochem Biophys* **235** (1), 63-77.
204. Negroiu, G., Branza-Nichita, N., Petrescu, A. J., Dwek, R. A. y Petrescu, S. M. (1999) Protein specific N-glycosylation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 in B16 mouse melanoma cells. *Biochem J* **344** (3), 659-665.
205. Xu, Y., Bartido, S., Setaluri, V., Qin, J., Yang, G. y Houghton, A. N. (2001) Diverse roles of conserved asparagine-linked glycan sites on tyrosinase family glycoproteins. *Exp Cell Res* **267** (1), 115-125.
206. Nilsson, I. M. y von Heijne, G. (2000) Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *J. Biol. Chem.* **275** (23), 17338-17343.
207. Huizing, M., Sarangarajan, R., Strovel, E., Zhao, Y., Gahl, W. A. y Boissy, R. E. (2001) AP-3 mediates tyrosinase but not TRP-1 trafficking in human melanocytes. *Mol. Biol. Cell* **12** (7), 2075-2085.
208. Spritz, R. A. (1999) Multi-organellar disorders of pigmentation: intracellular traffic jams in mammals, flies and yeast. *Trends Genet* **15** (9), 337-340.
209. Lippard, S. J. (1999) Free copper ions in the cell? *Science* **284** (5415), 748-749.
210. Negroiu, G., Branza-Nichita, N., Costin, G. E., Titu, H., Petrescu, A. J., Dwek, R. A. y Petrescu, S. M. (1999) Investigation of the intracellular transport of tyrosinase and tyrosinase related protein (TRP)-1. The effect of endoplasmic reticulum (ER)-glucosidases inhibition. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45** (7), 1001-1010.
211. Petris, M. J., Strausak, D. y Mercer, J. F. B. (2000) The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum. Mol. Genet.* **9** (19), 2845-2851.

OBJETIVOS

De acuerdo con lo expuesto en la Introducción de esta Memoria, y resumiendo brevemente, se han descrito de forma bastante completa las etapas de la ruta melanogénica y las enzimas que participan en ella, así como muchos aspectos de su maduración post-traducciona l y de la regulación de la vía. Sin embargo, algunas de las diferencias que, a pesar de su elevada homología, existen entre las enzimas de ratón y humanas, no han sido completamente caracterizadas. Por otro lado, tampoco se ha profundizado en la identificación inequívoca de aminoácidos clave en la catálisis enzimática o en la existencia de elementos estructurales responsables del procesamiento de estas enzimas, ya que hemos visto que una de las etapas críticas en el proceso de la pigmentación es que la tirosinasa sintetizada adquiera una conformación que sea reconocida positivamente por el sistema de control de calidad del RE.

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de determinantes estructurales de las enzimas melanogénicas, en particular de tirosinasa, que estén implicados en la actividad catalítica o la maduración de la proteína. Este objetivo genérico se desglosó en los siguientes objetivos particulares:

- 1) Caracterización de las diferencias en la especificidad de sustrato de las enzimas melanogénicas humana y de ratón. En concreto, nos propusimos estudiar la capacidad de TYR de reconocer y oxidar el DHICA, en oposición a la de ratón, puesto que es una etapa de la ruta melanogénica que permanece sin aclarar en los humanos.
- 2) Búsqueda de aminoácidos del centro activo implicados de forma directa en la catálisis enzimática, a través del reconocimiento de los sustratos o de la unión de los cofactores.
- 3) Análisis de la posibilidad de cambios en la especificidad de reacción y/o sustrato de las enzimas melanogénicas, mediante mutagénesis selectiva de residuos del centro activo o intercambio de dominios funcionales entre las proteínas de la familia de tirosinasa.
- 4) Estudio de la glicosilación de la tirosinasa de ratón y su repercusión en el procesamiento de la proteína, la unión de cobre y el tráfico de las enzimas melanogénicas al orgánulo diana, el melanosoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS.

Los reactivos empleados normalmente en este trabajo fueron de grado analítico y se utilizaron sin purificación previa. Las disoluciones fueron preparadas con agua bidestilada y tratada, después de la destilación, con un sistema de desionización MilliQ-Plus de Waters, hasta alcanzar una resistividad final de 18.2 M Ω .cm. La composición de los tampones y medios de cultivo que no se detallan en esta sección (y que se subrayan en el texto) se encuentra recogida en el Apéndice I.

El sustrato radioactivo L-[3,5-³H]-tirosina, actividad específica 51.0 Ci/mmol, fue suministrado por Amersham Pharmacia (Little Chalfont, Inglaterra). El CsCl fue suministrado por USB (Cleveland, OH, EE.UU.). Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EEUU) proporcionó los siguientes reactivos: L- y D-tirosina, L- y D-dopa, tiramina, dopamina, dopa metil éster, PTU, L-mimosina, PMSF, SDS, Igepal CA-630, amido-black, MBTH, 3,3'-diaminobencidina, ácido cítrico y la proteinasa K, así como los antibióticos ampicilina y kanamicina, empleados como marcadores de selección de bacterias transformadas. Merck (Darmstadt, Alemania) suministró: H₂O₂, ácido tricloroacético (TCA), (NH₄)₂SO₄, glicina, glioxal, Tris, EDTA (sal disódica, en todos los casos) y carbón activo. Fluka (Buchs, Suiza) suministró el tiocianato de guanidinio y Celite 545. El sustrato DHICA fue proporcionado por el Prof. S. Ito (Fujita Health University, Toyoake, Japón). Los demás reactivos, principalmente sales, de la máxima pureza disponible, fueron suministrados por Prolabo y Panreac (Barcelona, España), y otros reactivos o kits se especifican en los apartados correspondientes.

Los anticuerpos policlonales α PEP1 y α PEP7, que reconocen péptidos de las secuencias carboxilo terminales de tyrp1 y tirosinasa, respectivamente,^{1,2} fueron amablemente cedidos por el Dr. V. Hearing (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EE.UU.). El anticuerpo policlonal α cnx de cabra contra el C-terminal de calnexina humana se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.), así como la proteína G Plus-agarosa. Los segundos anticuerpos utilizados en detecciones inmunoquímicas contra IgG de conejo (α PEPs) o de cabra (α cnx), estaban marcados con peroxidasa y se purificaron por afinidad, y fueron suministrados por Chemicon (Temecula, EE.UU.).

El kit de ácido bicinonínico, para determinación del contenido en proteína de los extractos fue suministrado por Sigma, con BSA como patrón. Kallestad (Chaska, MN, EE.UU.) suministró Coomassie Brilliant Blue R-250. Bio-Rad (Richmond, CA, EE.UU.) suministró los

reactivos necesarios para la realización de electroforesis de proteínas y Western blot: acrilamida, bisacrilamida, TEMED, Tween 20, persulfato amónico y β -mercaptoetanol, así como los marcadores de peso molecular de proteínas. Para las autorradiografías se emplearon revelador y fijador fotográficos de AGFA (Leverkusen, Alemania).

Los componentes orgánicos de los medios de cultivo de bacterias (triptona y extracto de levadura), así como el agar-agar de los medios sólidos y la agarosa para los geles analíticos y preparativos de DNA procedieron de Pronadisa (Hispanlab, Madrid, España). Fermentas (Hanover, MD, EE.UU.) proporcionó los marcadores de tamaño de DNA.

Todas las enzimas de restricción empleadas fueron de Fermentas (Hanover, MD, EE.UU.) e Invitrogen-Life Technologies (Barcelona, España). La T4 DNA ligasa empleada en las ligaciones también fue de esta casa. Las glicosidasas empleadas (endoglicosidasa H (Endo H) y N-glicosidasa F (PGNasa F)) procedían de Roche (Mannheim, Alemania).

2. CULTIVO DE CÉLULAS Y PREPARACIÓN DE EXTRACTOS.

Los materiales de plástico empleados en los cultivos celulares fueron de Nunc (Roskilde, Dinamarca) o de TPP (Trasadingen, Suiza).

Los medios de cultivo empleados fueron: EMEM, Ham's F12, RPMI 1640 y DMEM, sin glutamina. Tanto los medios de cultivo como el suero bovino fetal (SBF), la glutamina, la tripsina/EDTA y los antibióticos penicilina y estreptomina fueron suministrados por Gibco BRL-Life Technologies (Gaithersburg, EE.UU.). La geneticina (sulfato G418) procedió de Calbiochem (Darmstadt, Alemania).

Los cultivos celulares se realizaron en botellas de 25 o 75 cm², a 37°C en atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂, en un incubador ThermoQuest (Forma Scientific, Marietta, OH, EE.UU.). Salvo cuando se indique lo contrario, las células se cultivaron en el medio más idóneo, enriquecido con un 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Rutinariamente, se sembró una densidad inicial de unas 5 x 10⁵ células por botella de 75 cm², en 10 ml de medio, que se mantuvieron en cultivo hasta llegar a un 80% de confluencia (3-4 días). A continuación, las células se lavaron con PBS previo a su recogida por tratamiento con tripsina/EDTA durante 5 min y posterior centrifugación a 1200 x g, 5 min a 4°C. En la mayoría de los casos, los ensayos de transfección se realizaron en placas de 6 pocillos al 80% de confluencia, en los que se sembró igual número de células.

Las tres líneas de melanoma humano, HBL, BEU y SCL, fueron establecidas en el laboratorio del Prof. G. Ghanem (LOCE, Bruselas, Bélgica).^{3,4} El medio empleado para estas células fue Ham's F12. Las células de melanoma de ratón B16/F10 fueron proporcionadas por Dr. V. Hearing y se cultivaron en EMEM. Para los experimentos de transfección transitoria se cultivaron células COS7 (de riñón de mono), en DMEM, y HEK 293T (de riñón de embrión humano), en RPMI 1640. Ambos tipos celulares expresan el antígeno grande T del virus SV40, lo que permite que los vectores elegidos para las transfecciones transitorias se repliquen episomalmente.

Para la determinación de actividades enzimáticas o la identificación de proteínas, las células lavadas fueron resuspendidas en tampón de solubilización celular, utilizando un volumen aproximado de 1 ml por 10^7 células. Tras agitación vigorosa, las muestras se mantuvieron 30 min a 4°C en agitación suave. Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm en una centrífuga tipo Eppendorf, 20 min a 4°C y se utilizaron los sobrenadantes para la medida de la concentración proteica y de las actividades enzimáticas melanogénicas.

La tirosinasa de melanoma de ratón B16 se purificó a partir de tumores sólidos de ratón mantenidos en ratones C57/Bl, según el protocolo optimizado por Jiménez-Cervantes (1993).⁵ Se preparó un extracto enriquecido en melanosomas por centrifugación diferencial de homogenados de tumor. A continuación se describe brevemente el protocolo empleado, trabajando en todo momento a 4°C. Los tumores se limpiaron, eliminando restos de grasa y tejido conectivo, se trocearon, pesaron y lavaron con el tampón de lavado de tumores. Se homogeneizaron con un homogeneizador de cuchillas politrón en el tampón de homogeneización, utilizando una relación de peso de tumor (g)/volumen de tampón (ml) de 1:2. El homogenado se centrifugó a 700 x g, 10 min a 4°C en un rotor Sorvall SS-34. El precipitado se reextrajo con el mismo volumen empleado para la masa de tumor original y se centrifugó de nuevo. La mezcla de los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se centrifugó a 11000 x g durante 30 min para obtener un precipitado enriquecido en melanosomas, que se solubilizó en un volumen de tampón de solubilización igual a la masa tumoral inicial. La tirosinasa se purificó llevando este extracto crudo melanosomal hasta un 40% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, por adición gota a gota y con agitación continua, y centrifugando a 11000 x g durante 30 min. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se llevó a un 75% de saturación en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se dejó toda la noche a 4°C con agitación suave. Se centrifugó a 105000 x g 1 hora y el precipitado obtenido se resuspendió en un volumen de tampón de solubilización (ml) igual al peso inicial del tumor (g). Las muestras se dializaron toda la noche a 4°C y con

agitación suave frente a 1 litro del tampón de resuspensión (reemplazado dos veces), en membranas de acetato de celulosa Spectrapor de Fisher Scientific con un límite de exclusión de 12-14 kDa. Tras la diálisis, las muestras se sometieron a cromatografía en baño de hidroxapatito para purificar la tirosinasa y se concentraron en células de ultrafiltración de Amicon (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

A continuación, la purificación se completó por cromatografía de tamizado molecular, realizada con una columna de Sephacryl S-300 de 52 x 2.6 cm, equilibrada y lavada con tampón fosfato 50 mM pH 6.8 con Igepal al 1%. La muestra se introdujo en sentido descendente y en las fracciones recogidas, de unos 8 ml, se determinó el contenido en proteína y la actividad dopa oxidasa. Las de mayor actividad específica se combinaron y concentraron para obtener la tirosinasa purificada. En algunos casos, con el fin de obtener una purificación parcial de mayor rendimiento, se realizó un tratamiento térmico a 60°C durante 1 hora para inactivar Tyrp2/Dct, que aparecía como contaminante en las fracciones elegidas y que es termosensible, mientras que tirosinasa es resistente a 60°C.⁶ Tras esta incubación, se eliminaron los agregados proteicos y restos de material insoluble por centrifugación a 105000 x g durante 1 hora y se conservó el sobrenadante con actividad tirosinasa.

3. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR.

La viabilidad celular se determinó por la técnica de exclusión de azul tripano. Las células se incubaron durante un minuto con azul tripano (al 0.4% en PBS), en una proporción 1:1 de suspensión celular:azul tripano. Las células muertas con la membrana deteriorada, permiten el paso del colorante, y se tiñen. El número de células vivas de la muestra se calculó contando al microscopio óptico el número de células no teñidas en un hemocitómetro Neubauer (Alemania) y teniendo en cuenta la dilución realizada.

4. MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

Los distintos ensayos de actividad disponibles para tirosinasa han sido recientemente revisados.⁷ Los métodos empleados se describen brevemente a continuación.

4.1. Actividad tirosina hidroxilasa (TH).

La actividad tirosina hidroxilasa de tirosinasa se determinó radiométricamente mediante el método descrito por Pomerantz (1964),⁸ posteriormente modificado por otros autores.^{9,10} El fundamento de este método consiste en determinar el ³H liberado de una de

las posiciones en orto al hidroxilo del anillo fenólico de tirosina, en forma de agua tritiada. El sustrato de la reacción de hidroxilación es L-[3,5-³H]-tirosina.

El ensayo fue realizado en tubos eppendorf (1.5 ml) y bajo una campana de gases. El sustrato marcado se diluyó isotópicamente con L-tirosina para alcanzar una concentración 0.25 mM, equivalente a 50 μ Ci/ml. Esta disolución se preparó mezclando 475 μ l de una disolución 0.262 mM de L-tirosina no marcada en tampón fosfato 10 mM, pH 6.8, con 25 μ l de tirosina tritiada (51.0 Ci/mmol). Para que la reacción tenga lugar sin el período de retardo característico de tirosinasa, al medio de reacción se le adicionó L-dopa 10 μ M (disuelto también en tampón fosfato 10 mM, pH 6.8), necesario como cofactor.

Un ensayo tipo contiene 10 μ l de sustrato radioactivo, 10 μ l de L-dopa 50 μ M, de 5 a 30 μ l de extracto enzimático y el volumen de tampón de solubilización necesario para completar el volumen final de 50 μ l. Se prepararon además algunos tubos sin extracto enzimático que sirven como referencia de la liberación de radiactividad debida al intercambio isotópico ¹H-³H de la L-tirosina tritiada con el agua.

Las muestras se incubaron a 37°C durante tiempos variables comprendidos entre 1 y 6 horas (habitualmente, 1h), y tras este período se adicionaron 450 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 1% para detener la reacción. A continuación, se trataron con 100 mg de una mezcla 1:1 (p/p) de los adsorbentes Celite 545 y carbón activo, se agitaron suavemente durante 10 min y posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min a 4°C.

La medida del agua tritiada se realizó tomando 100 μ l del sobrenadante de cada tubo y mezclándolos con 2 ml de cóctel de centelleo (Ecoscint H, National Diagnostics, Inglaterra) en un contador de centelleo líquido, Wallac 1409, provisto de un sistema de corrección interno por comparación del espectro de la muestra con el de un patrón de tritio no apantallado. Este sistema permite la transformación directa de cuentas por minuto (cpm) en desintegraciones por minuto (dpm). Las desintegraciones netas de cada ensayo se obtuvieron al restar a las dpm de cada tubo, las dpm del tubo blanco (sin enzima).

Teniendo en cuenta la actividad específica del sustrato, el factor de dilución isotópica y las características de la reacción, se obtiene la siguiente ecuación, que relaciona las desintegraciones netas aparecidas en cada ensayo con la actividad enzimática del extracto:

$$\text{pmoles/min} = 0.0117 \times \text{dpm netas}$$

Los pmoles/min obtenidos en cada caso se normalizaron al dividir por un factor adimensional ($V_{\text{extracto}}(\mu\text{l}) \times t_{\text{reacción}}(\text{h})/30\mu\text{l} \times 1\text{h}$) con el fin de referir las condiciones

experimentales de cada ensayo con respecto a las empleadas en el cálculo del factor 0.0117. Se definió una unidad de actividad tirosina hidroxilasa como la cantidad de enzima que cataliza la aparición de un μmol de agua tritiada por minuto, es decir, la hidroxilación de un μmol de tirosina por minuto en las condiciones descritas.

4.2. Actividad dopa oxidasa (DO).

El método está basado en la alta reactividad de dopaquinona, formada por la oxidación de L-dopa por tirosinasa, y su capacidad para formar un aducto estable y de color rosa oscuro con la hidrazona 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH). El pigmento formado absorbe en el espectro visible a 490 nm, y la reacción de MBTH con dopaquinona es muy rápida en relación con la oxidación catalítica de L-dopa, por lo que puede ser considerada como una medida de la actividad enzimática.¹¹

El ensayo se realizó en cubetas de plástico de 1 cm de paso óptico y de 1 ml de volumen, utilizando como sustrato de la enzima L-dopa a concentración final de 2 mM en el medio de reacción, disuelto en tampón fosfato 10 mM, pH 6.8. Dependiendo del volumen de extracto incorporado, se adicionó el volumen necesario de MBTH 5 mM disuelto en tampón fosfato 10 mM, pH 6.8 hasta completar 1 ml de volumen total. Tanto el L-dopa como la disolución de MBTH fueron previamente atemperados a 37°C. La reacción transcurrió también a 37°C en cámara de medida termostatzada en un espectrofotómetro UV/Visible Hitachi U-2000 o Shimadzu UV-1603.

Teniendo en cuenta que el valor del coeficiente de absortividad molar para el aducto DQ-MBTH es aproximadamente $8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, el incremento de absorbancia por minuto registrado queda relacionado con la actividad dopa oxidasa por la siguiente ecuación:⁵

$$\mu\text{mol L-dopa oxidados/min} = 0.125 \times \Delta A_{490}/\text{min}$$

Una unidad enzimática dopa oxidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar un μmol de dopa por minuto, o lo que es lo mismo, formar un μmol del aducto dopaquinona-MBTH.

4.3. Actividad DHICA oxidasa.

La actividad DHICA oxidasa se midió por tres métodos complementarios, descritos por Jiménez-Cervantes *et al.* (1994):¹²

- a) Determinación de consumo de DHICA por HPLC. Se empleó una columna C18 de Nova-Pack (150 x 3.9 mm) de Waters y el eluyente detallado en el Apéndice I, a una

velocidad de flujo de 0.8 ml/min. La detección se realizó a 313 nm y la concentración de DHICA se calculó por comparación del área de integración del pico de DHICA del cromatograma con la de una disolución patrón de concentración conocida. Las reacciones tuvieron lugar a 37°C, con una concentración de DHICA 0.4 mM. Tras la incubación y antes de la inyección, a las alícuotas de las mezclas de reacción se les añadió el mismo volumen de TCA al 2% y se centrifugaron 2 min a 12000 x g en una centrifuga Eppendorf para eliminar proteínas y material insolubles.

- b) Cuantificación espectrofotométrica a 490 nm de la formación de un aducto coloreado entre el ácido 5,6-indolquinona-2-carboxílico (IQCA) y el MBTH.¹³
- c) Evolución de los espectros de absorción (550 nm) de disoluciones de DHICA en presencia de extractos enzimáticos.

Las disoluciones de DHICA se realizaron en tampón fosfato sódico 10 mM pH 6.0 con EDTA 0.1 mM para minimizar la oxidación espontánea o catalizada por iones metálicos. Para corregir esta oxidación espontánea del DHICA, se realizaron controles en ausencia de enzima bajo las mismas condiciones descritas.

Una unidad de actividad DHICA oxidasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1 μ mol de DHICA por minuto a 37°C.

4.4. Actividad dopacromo tautomerasa (Dct).

La actividad dopacromo tautomerasa se midió de forma rutinaria empleando una determinación espectrofotométrica que estimaba la disminución de absorbancia a 475 nm debida a la desaparición del dopacromo en el medio de reacción a 37°C, con un espectrofotómetro Hitachi U-2000.¹⁴

Los ensayos tipos se llevaron a cabo en un medio de reacción que contenía una concentración de dopacromo 0.1 mM, formado en el momento de su utilización por oxidación de 100 μ l de L-dopa 1 mM con el volumen apropiado de periodato 4 mM para una estequiometría 1:2. El medio se tamponó con fosfato 10 mM pH 6.0 suplementado con EDTA 0.1 mM para evitar el efecto inespecífico sobre el dopacromo de iones metálicos que pudieran estar presentes en el medio de reacción. El volumen se completó hasta 1 ml y, una vez formado el dopacromo, se añadieron 25-50 μ l de extracto enzimático, que fue sustituido por tampón de solubilización en los blancos de las medidas.

Las medidas de actividad se realizaron a partir de las velocidades de reacción registradas. Teniendo en cuenta el valor del coeficiente de absortividad molar para el

dopacromo a 475 nm, podemos escribir la siguiente ecuación que relaciona el incremento de absorbancia con la actividad enzimática:

$$\mu\text{mol dopacromo desaparecidos/min} = 0.277 \times \Delta A_{475}/\text{min}$$

Una unidad de dopacromo tautomerasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la transformación de 1 μmol de dopacromo por minuto.

Puesto que a tiempos cortos la decoloración del dopacromo puede deberse en parte a la transformación en DHI, no catalizada por Tyrp2/Dct, en ocasiones se empleó también otro método más específico y sensible basado en la determinación de producción de DHICA a partir del dopacromo por HPLC.¹⁵ Para ello se emplearon las mismas condiciones (columna, eluyente y velocidad de flujo) que para la determinación de actividad DHICA oxidasa por HPLC (apartado 4.3). Las mezclas de reacción contenían dopacromo 0.1 mM preparado como se describe anteriormente y el extracto enzimático correspondiente, y se incubaron a 37°C durante el transcurso de la reacción (30-60 min). Los picos del cromatograma obtenido se compararon con los correspondientes a dopacromo y DHICA estándares inyectados previamente. En estas condiciones de trabajo, los tiempos de retención fueron 1.9 y 5.7 min para dopacromo y DHICA, respectivamente.

5. CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS.

La cinética de la reacción enzimática se ajustó al modelo de Michaelis-Menten. Para el cálculo de las constantes cinéticas (K_M y velocidad máxima, $V_{m\acute{a}x}$) de las actividades tirosina hidroxilasa y dopa oxidasa de las enzimas estudiadas, se realizaron los ensayos de medida de actividad enzimática descritos en el apartado anterior manteniendo las condiciones experimentales pero variando la concentración de sustrato en un rango amplio y adecuado a cada ensayo. Una vez obtenidos los valores de velocidad inicial para cada concentración de un sustrato dado, se analizó el resultado aplicando la ecuación de las dobles inversas de Lineweaver-Burk y ajustándola por mínimos cuadrados de los puntos experimentales con el software GraphPad Prism 3.1.

5.1. Tirosina hidroxilasa.

Para el cálculo de la K_M y la $V_{m\acute{a}x}$ de la actividad tirosina hidroxilasa se realizó una modificación del protocolo anteriormente descrito en el que la cantidad de tirosina radiactiva se mantuvo fija frente a concentraciones variables de tirosina no marcada. La dilución isotópica final (relación entre tirosina total y tirosina tritiada) de cada punto se tuvo en cuenta en el cálculo de la cantidad de sustrato transformado en cada condición experimental

(dilución isotópica variable). La concentración en el ensayo de la tirosina marcada fue en todos los casos de 0.44 μM (1.12 pCi/ensayo), mientras que la de tirosina no tritiada varió habitualmente entre 10 y 50 μM .

5.2. Dopa oxidasa.

Para el cálculo de la K_M y la $V_{\text{máx}}$ de la actividad dopa oxidasa se empleó un rango de concentraciones de L-dopa y o-difenoles análogos comprendido entre 0.2 y 2.0 mM, conservando el resto de las condiciones descritas anteriormente para este ensayo.

6. PURIFICACIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA.

6.1. Extracción y purificación de RNA.

Para la obtención de RNA total se empleó la técnica de aislamiento en tiocianato de guanidinio y purificación por ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio.¹⁶

La mínima cantidad de células empleadas para aislar RNA fue de 10^6 . Tras el cultivo, las células se recolectaron del modo habitual, y el precipitado celular se resuspendió en 1.25 ml de tampón de lisis. A esta solución se le añadieron 525 mg de CsCl y se agitó hasta su completa disolución. En tubos de ultracentrífuga de polialómero se dispusieron 750 μl de solución generadora de gradiente y sobre ella se añadió el lisado cuidadosamente para evitar perturbaciones que afectaran a la formación del gradiente. Los tubos se ultracentrifugaron 5 horas a 15°C a 55000 rpm en un rotor basculante de titanio (TLS-55 de Beckman), que corresponde a una fuerza centrífuga de 115300 x g en el radio medio y 151000 x g en el máximo. Una vez centrifugado, se descartó el sobrenadante, que contenía lípidos, proteínas y DNA, con cuidado de no tocar el fondo del tubo donde está el RNA. Este precipitado de RNA se resuspendió en 500 μl de tampón de resuspensión de RNA, se le añadieron 30 μg de proteinasa K (para que quedara a 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e incubamos 30 min a 37°C para hidrolizar las proteínas residuales. Posteriormente se realizaron tres extracciones consecutivas e independientes, con fenol, cloroformo y éter, de las que se preservó en cada caso la fase acuosa. La fase acuosa final se recuperó dejando evaporar el éter durante 30 min. Se adicionó 1 ml de etanol absoluto e incubó a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 20 min, el precipitado se lavó con etanol al 70%. El RNA precipitado se liofilizó (liofilizador Speed-Vac Concentrador, SVC100H, Savant) y resuspendió posteriormente en agua estéril para su cuantificación por medida espectrofotométrica a 260 nm (GeneQuant II, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra). La pureza del RNA se estimó por la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm.

6.2. Electroforesis de RNA y síntesis de cDNA.

Para comprobar la calidad del RNA y la fiabilidad de la cuantificación se realizó la electroforesis según el protocolo descrito por McMaster y Carmichael (1977).¹⁷ Se emplearon 10 µg de RNA total por calle en un volumen de 4 µl, a los que se les añadió 16 µl de solución de desnaturalización. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 50°C para desnaturalizar el RNA y, una vez frías, se les añadió 5 µl de sacarosa al 25% para cargarlas en un gel de agarosa al 1% con tampón fosfato 10 mM pH 7.0, utilizando el mismo como tampón de recorrido. El gel se corrió a 100 V durante 2-3 horas con continua recirculación del tampón de recorrido, y se tiñó con una solución de naranja de acridina 6 µg/ml, durante 4 horas a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Se comprobó la integridad del RNA extraído y la cuantificación de las bandas de RNA ribosomal para verificar que la cantidad cargada en cada calle fuera comparable se realizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a una cámara de vídeo (Gel Doc 1000, BioRad) y empleando el software Multi-analyst de BioRad.

La síntesis del cDNA (RT-PCR) se realizó con el kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR de Invitrogen-Life Technologies, según el protocolo descrito por el suministrador. Brevemente, el procedimiento consistió en la desnaturalización del RNA molde, empleando una cantidad de RNA total de partida de 0.5-1.0 µg, durante 1 min a 65°C y en presencia de oligo(dT)₁₂₋₁₈ y dNTPs. La muestra se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente, tras lo cual se añadió el volumen necesario de tampón de la retrotranscriptasa, DTT y MgCl₂ (a las concentraciones recomendadas por el fabricante), se incubaron las muestras 2 min a 42°C y se añadió 1 µl de enzima (2.5 unidades), para un volumen final de 50 µl. La síntesis de cDNA tuvo lugar a 42°C durante 50 min, y se terminó incubando las muestras a 70°C durante 10 min. Para eliminar el RNA se utilizó la RNasa H suministrada por el kit.

7. CLONACIÓN DE GENES.

7.1. Amplificación de genes silvestres a partir de cDNA.

Los oligonucleótidos necesarios para realizar todas las PCRs de este trabajo, tanto para amplificar secuencias codificantes completas como para mutagénesis dirigida, secuenciación u otras manipulaciones de DNA, fueron sintetizados por Amersham Pharmacia Biotech o Genotek (Barcelona, España). Los dNTPs procedieron de Fermentas y la DNA polimerasa empleada con fines preparativos fue *Pfu* (Stratagene, La Jolla,

EE.UU.), con actividad correctora 3'-5' exonucleasa, aunque ocasionalmente se utilizó la polimerasa *Taq* (Biotools, Madrid, España) con fines analíticos.

Para obtener la secuencia codificante completa de las enzimas silvestres humana y de ratón (salvo que se indique otro procedimiento) el cDNA de células B16 (ratón) o HBL (humanas) se amplificó por PCR, y las parejas de oligonucleótidos directo y reverso que se describen en la Tabla 2 según el gen de la proteína melanogénica correspondiente (nombre indicado en cada caso). Estos cebadores contienen los codones de inicio y final de traducción y sitios de restricción para clonar el producto de PCR en un vector plasmídico apropiado.

Las condiciones empleadas para las PCRs a partir de cDNA fueron las mismas para todos los casos: 1 μ l del cDNA obtenido según lo descrito en el apartado 6.2, 0.5 μ g de cada cebador, una concentración de $MgCl_2$ 1.5 mM y 0.2 mM de cada dNTP y 1 unidad de *Pfu*, en un volumen final de 50 μ l. En todos los casos, el programa de amplificación consistió en 25-30 ciclos y, una vez completados éstos, una extensión final de 10 min a 72°C. Cada ciclo de la PCR constó de tres pasos:

- i) Desnaturalización: 1min/95°C.
- ii) Hibridación de los cebadores con el molde: 1 min/ T_m . La temperatura de hibridación (T_m) se calculó para cada oligonucleótido empleando la fórmula: T_m (°C) = $4*(G+C) + 2*(A+T)$, excluyendo del cómputo las bases que definen los sitios de corte de las endonucleasas de restricción, y se eligió la menor de las dos temperaturas calculadas en cada caso.
- iii) Extensión de la cadena naciente: 3 min/72°C. La duración de este tercer paso (t_{ext}) se mantuvo constante, ya que la longitud de los fragmentos a amplificar estuvo siempre comprendida entre 1580 y 1650 nucleótidos.

Una vez terminada la amplificación, se tomó una alícuota de la reacción, se le añadió tampón de carga de muestras de DNA y se aplicó en geles de agarosa de concentración comprendida entre el 1 y el 2% (p/v). La electroforesis se llevó a cabo en tampón de recorrido TAE y el resultado se visualizó mediante tinción del gel en un baño del agente intercalante fluorescente bromuro de etidio (2 μ g/ml). El resto del volumen conteniendo el producto de la PCR, que se emplearía con fines preparativos, se purificó directamente de la mezcla de reacción con columnas de Qiagen (Hilden, Alemania) o Millipore o de los geles de agarosa con el kit GeneClean (BIO101, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del proveedor.

| Nombre | Bases (d/r) | SECUENCIA (5'→3') |
|----------|-------------|-----------------------------------------------------|
| mTyrFw | 30 (d) | TGATGAATTCGAGAAAATGTTCTTGGCTGT (<i>EcoRI</i>) |
| mTyrRv | 30 (r) | GTTTTCTAGAATGTTCAACAGATGGCTCTGA (<i>XbaI</i>) |
| mTyrp1Fw | 32 (d) | GCTGAATTCAGAAATGAAATCTTACAACGTCCT (<i>EcoRI</i>) |
| mTyrp1Rv | 32 (r) | GGGCACTAGTCTATCAGACCATGGAGTGGTTA (<i>SpeI</i>) |
| mTyrp2Fw | 29 (d) | TCCCAAGCTTGAAGGCATGGCCTTGTGG (<i>HindIII</i>) |
| mTyrp2Rv | 28 (r) | AGGTAAGTATGCTAGGCTTCCTCCGT (<i>SpeI</i>) |
| hTyrFw | 30 (d) | GGACAAGCTTAAAGAAATGCTCCTGGCTGTTT (<i>HindIII</i>) |
| hTyrRv | 30 (r) | GCCTCTAGACTTTTATAAATGGCTCTGATA (<i>XbaI</i>) |
| hTyrp1Fw | 30 (d) | TCTTGAATTCACCAGAAATGAGTGCTCCTAA (<i>EcoRI</i>) |
| hTyrp1Rv | 29 (r) | GAGTACTAGITTTGTTAGACCACAGACTG (<i>SpeI</i>) |
| hTyrp2Fw | 28 (d) | TCCCAAGCTTAAAGCCATGAGCCCCCTT (<i>HindIII</i>) |
| hTyrp2Rv | 30 (r) | AGGCACTAGTAACCTAGGCTTCTTCTGTG (<i>SpeI</i>) |

Tabla 2. Cebadores utilizados para clonar la secuencia codificante completa de los genes silvestres. Se indican en nombre del oligonucleótido (cuya primera letra es **m** si es del gen de ratón y **h** si es del gen humano), el tamaño (en número de bases), si es directo (d) o reverso (r) y su secuencia en sentido 5'→3'. La secuencia diana de la enzima de restricción elegida en cada caso para clonar el producto aparece subrayada (nombre de la enzima entre paréntesis). En negrita, los codones de **inicio** y **final** de traducción.

En el caso de la tirosinasa de ratón, como resultado de las reacciones de amplificación, se obtuvieron dos productos de diferente tamaño: la banda mayoritaria, de mayor peso molecular, resultó idéntica a la secuencia de la tirosinasa de ratón silvestre ya publicada [número de acceso del GenBank D00440].¹⁸ La banda minoritaria, de menor tamaño, correspondió a un transcrito alternativo cuya existencia ya había sido constatada por otros autores.¹⁹ Esta forma, llamada $\Delta 3$ tyr, carece del exón 3 (entre las posiciones 1037 y 1184 de la secuencia codificante), lo que origina un cambio en el marco de lectura y un codón de final de traducción prematuro. Así, el producto de 390 aminoácidos correspondiente es enzimáticamente inactivo debido a la ausencia del segundo centro de unión de cobre, y fue aprovechado para usarlo como control negativo en determinaciones de actividades enzimáticas de las células transfectadas.

Exclusivamente para la tirosinasa humana, se empleó como molde de las PCRs la construcción Pmel34, obtenida de la American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.),²⁰ con los cebadores hTyrFw y hTyrRv (Tabla 2), que incluyen el marco de lectura completo del gen *TYR* y dos sitios de restricción añadidos para su clonación. La secuencia del producto clonado coincidió exactamente con la publicada para el gen de *TYR* [número de acceso del GenBank M27160], salvo por un cambio C/A en la posición 575 debido a un polimorfismo ya identificado.²¹

Las construcciones de las proteínas melanogénicas, tanto de las formas silvestres como de los mutantes diseñados, se prepararon en el vector pBluescript II KS (Stratagene, Heidelberg, Alemania) y se subclonaron al vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen, Groningen, Holanda). Los mapas de ambos vectores se recogen en el Apéndice I. En los casos en los que las enzimas de restricción elegidas permitieron la clonación directa en este último vector, se realizó si pasar antes por pBluescript II KS. La identidad de todos los productos clonados fue verificada por secuenciación completa de ambas cadenas, realizada en el Instituto de Investigaciones Biológicas, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, España).

7.2. Construcción de mutantes y quimeras mediante mutagénesis dirigida.

La mutagénesis dirigida de tirosinasa o Tyrp1 de ratón se realizó empleando una metodología basada en la diseñada por Ho y colaboradores en 1989,²² que consistía en realizar dos PCRs solapadas, que se describen a continuación.

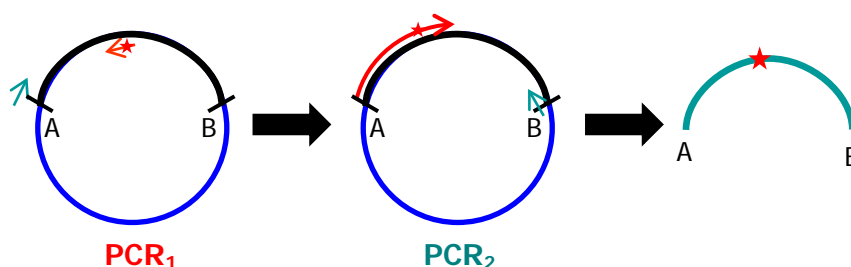


Figura 13. PCRs solapadas empleadas para la mutagénesis dirigida. El oligonucleótido utilizado en la PCR₁ con la mutación puntual deseada se representa con una flecha con una estrella (★) que se conserva en la representación de los productos amplificados que ya la incluyen en su secuencia.

Para cada caso, se sintetizó un oligonucleótido que generara la mutación puntual deseada (Tabla 3) y se realizó una primera PCR (que llamaremos PCR₁) enfrentando este cebador con uno de los utilizados para la amplificación de la secuencia codificante completa de las enzimas silvestres (Tabla 2). Cuando el cebador de la Tabla 3 fue directo, se enfrentó con el reverso correspondiente al molde de la Tabla 2, y viceversa. A continuación, el fragmento amplificado y purificado se empleó como cebador en la segunda PCR (llamada PCR₂) frente al de clonación de la Tabla 2 no utilizado en la PCR₁, es decir, el directo en el ejemplo expuesto, de modo que el fragmento amplificado se pudo clonar con las enzimas de restricción cuyas secuencias de reconocimiento estaban incluidas en los cebadores de la Tabla 2, las mismas empleadas para clonar los productos silvestres. Este procedimiento se muestra esquematizado en la Figura 13.

Las PCR₁ se realizaron tomando como molde 25 ng del plásmido en que estaba clonada la secuencia codificante completa de la enzima sobre la que se deseaba realizar la mutación, con 1 unidad de *Pfu* y 0.5 µg de cada cebador. Las condiciones del termociclador fueron las descritas en el apartado anterior, salvo que el tiempo de extensión (3^{er} paso de cada ciclo) fue de 2 min. Las segundas PCRs (o PCR₂) se realizaron con la misma cantidad de molde, pero con 0.1 µg de cada cebador, ya que uno de los cebadores (producto de PCR₁) era limitante y su longitud era muy variable y mucho mayor que la del oligonucleótido con el que se emparejaba en la PCR₂. Las PCRs constaron de 25 ciclos en los que se conservaron las temperaturas y tiempos de la PCR₁, con la salvedad de que la extensión se realizó en 3 min y la temperatura de hibridación elegida (T_m) fue la calculada para el cebador corto (no el producto de PCR₁).

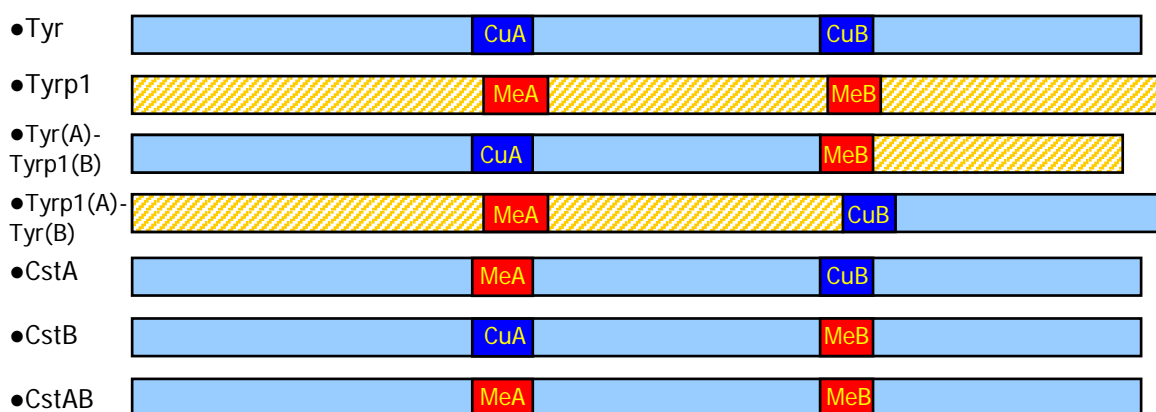


Figura 14. Representación esquemática de las construcciones quiméricas de Tyr y Tyrp1. 1. Tyr. 2. Tyrp1. 3. Tyr(A)-Tyrp1(B). 4. Tyrp1(A)-Tyr(B). 5. CstA. 6. CstB. 7. CstAB.

Las estructuras de las construcciones quiméricas derivadas de las secuencias de Tyr y Tyrp1 se muestran en la Figura 14. Para construir las secuencias codificantes de las quimeras Tyr(A)-Tyrp1(B) y Tyrp1(A)-Tyr(B), eliminamos en primer lugar un sitio de restricción para *SphI* existente en la secuencia de Tyrp1 (posición 361) mediante una substitución silenciosa creada por mutagénesis dirigida empleando la técnica ya descrita con el cebador mTyrp1SS (Tabla 3) y, del mismo modo, creamos un sitio *SphI* nuevo inmediatamente antes del codón correspondiente a la primera His del centro MeB con el oligonucleótido mTyrp1ΔF, ya que en tirosinasa existe un sitio de restricción homólogo en la misma posición que permitiría la fusión de fragmentos, conservando el marco de

lectura. Este *Tyrp1* modificado, que codifica una proteína con un cambio puntual L376M, se clonó en pBluescript II KS y se usó para generar los fragmentos 5' *EcoRI-SphI* y 3' *SphI-XbaI*, que reemplazarían a los fragmentos homólogos en mTyr-pBluescript II KS, para dar lugar a las construcciones Tyrp1(A)-Tyr(B) y Tyr(A)-Tyrp1(B), respectivamente.

| Nombre | Bases (d/r) | SECUENCIA (5'→3') |
|--------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| mQ378H | 21 (d) | GTAC <u>AC</u> GGATCGGCCAACGAT |
| mH389L | 21 (d) | CTT <u>CT</u> CCATGCTTTTGTGGAC |
| mH390Q | 21 (d) | CAC <u>CA</u> GGCTTTTGTGGACAGT |
| mS192A | 20 (r) | TTTC <u>AG</u> CGCCCCCAAGCAGT |
| mE193Q | 20 (r) | ATATTT <u>G</u> AGAGCCCCCAAGC |
| mTyrQGT | 23 (d) | CTTTATG <u>CA</u> AGGAACAATGTCCC |
| mTyr.GG | 26 (r) | CCTGTA <u>CTTGG</u> CCCCCTGTTCCATTC |
| mTyrp1SS | 20 (r) | TTCTGGTTGC <u>AC</u> GCAGCTCC |
| mTyrp1ΔF | 21 (d) | GTTCGAAG <u>CA</u> TGCACAACCTG (crear <i>SphI</i> en mTyrp1) |
| mCstB-Tyrp1 | 20 (d) | CCTATTTTTGT <u>C</u> CTTCTCCA |
| mCstB.MS | 28 (r) | AATGGGTTTGT <u>IGACAT</u> CGTTCCATTCCAG |
| mCstB.M.glic | 18 (r) | TCCATT <u>CA</u> TGAAGAGGTG |
| mCstB.HH | 19 (r) | CAAAAGC <u>ATGGT</u> GGAGGAC |
| mCuAHindFw | 56 (d) | GA <u>AAGCTTT</u> GGGGACGTTGATTTTTCCCATGAAGGACCAGC GTTTCTGACTTGGC |
| mCuAHindRv | 66 (r) | CCA <u>AAGCTTT</u> CCTTGACCGGTCCCAAGGAATGTTTTCTTTACC GAATAGTAATGCATCCATACAAAG |
| mTyrp1QGT | 20 (d) | CCTCTTCCTG <u>CA</u> AGGAACGG |

Tabla 3. Cebadores utilizados para la construcción de mutantes. Se indican el nombre del oligonucleótido (cuya primera letra es **m** si es del gen de ratón y **h** si es del gen humano), el tamaño (en número de bases), si es directo (d) o reverso (r) y su secuencia en sentido 5'→3'. Los codones que generan una mutación puntual están subrayados, y se destacan en negrita las bases que son **diferentes** respecto a la secuencia silvestre. En los oligonucleótidos mCuAHind Fw y Rv sólo se subraya la secuencia de restricción de *HindIII* (detalles en el texto).

Otro grupo de construcciones quiméricas lo constituyen aquellas en las que sólo la secuencia correspondiente a los aminoácidos de los centros de unión a cobre de tirosinasa (CuA y CuB) se substituyó por la secuencia homóloga de *Tyrp1* (MeA y MeB), en el sitio A (CstA), en el B (CstB) o en ambos (CstAB). Estas regiones CuA/B (*Tyr*) y MeA/B (*Tyrp1*) fueron definidas como las comprendidas entre las histidinas H180-H211 (CuA), H363-H390 (CuB), H192-H224 (MeA) y H377-H404 (MeB). Las condiciones optimizadas para estas PCRs se resumen en la Tabla 4.

| Quimera | | Condiciones de las PCRs | | | |
|---------|------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------|
| | | Cebadores | Molde | T _m (°C) | t _{ext} (72°C) |
| CstA | A | mTyrFw/mCuAHindRv | <i>Tyr</i> | 58 | 1.5 min |
| | B | mCuAHindFw/mTyrRv | <i>Tyr</i> | 58 | 2.5 min |
| CstB | PCR ₁ | mCstB-Tyrp1/mTyrRv | <i>H389L</i> | 50 | 1.0 min |
| | PCR ₂ | mTyrFw/PCR ₁ | <i>Tyr(A)-Tyrp1(B)</i> | 50 | 3.0 min |

Tabla 4. Cebadores, moldes y condiciones de las PCRs (temperatura de hibridación (T_m) y tiempo de extensión (t_{ext})) para la construcción de CstA y CstB.

Para la PCR₁ para obtener la quimera *CstB* se utilizó la construcción *Tyr-H389L* como molde, puesto que hay mayor grado de homología entre la región 3' del CuB de *Tyr-H389L* y la de MeB de *Tyrp1*. Para la PCR₂ se utilizó el producto de amplificación como cebador y se eligió *Tyr(A)-Tyrp1(B)* como molde, así como condiciones de baja astringencia que permitieran la hibridación, ya que, debido al origen del producto de PCR₁, sólo unas pocas bases en 5' eran perfectamente complementarias al molde (alrededor de un 5% de la longitud total).

La quimera *CstA* se construyó en dos etapas: en primer lugar, se construyó el fragmento que llamamos "A", que incluía desde el extremo 5' de tirosinasa hasta la posición 624 de *Tyrp1* (aproximadamente, hacia la mitad de MeA), que presenta un sitio de reconocimiento para *HindIII* inexistente en tirosinasa. Este fragmento se clonó con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* en el vector pET-15b (Novagen, Darmstadt, Alemania) de forma transitoria, y a continuación de éste se subclonó el fragmento que llamamos "B", comprendido entre dicho sitio *HindIII* (incluido) de MeA y el extremo 3' de tirosinasa con las enzimas *HindIII* y *XbaI*. Finalmente, la secuencia completa (*EcoRI-XbaI*) se subclonó en el vector de expresión pcDNA3.1.

La quimera *CstAB* se construyó aprovechando el sitio de restricción *SphI* para clonar a ambos lados los correspondientes fragmentos de *CstA* (5') y de *CstB* (3').

La presencia de todas las mutaciones deseadas en los productos clonados, tanto puntuales como las de construcciones quiméricas, fue verificada por secuenciación completa de ambas cadenas, realizada en el Instituto de Investigaciones Biológicas, del CSIC (Madrid, España).

Por norma general, las digestiones con enzimas de restricción se realizaron durante 2 horas a 37°C empleando el 90% del volumen de la PCR, con el tampón suministrado por el proveedor en cada caso y 1-2 unidades de cada endonucleasa. Los fragmentos

digeridos se purificaron con el kit Geneclean (empleado también para los productos de PCR) y se cuantificaron en gel.

Las ligaciones se realizaron en un volumen final de 18 μ l, con 40 ng de vector y una proporción molar de inserto/vector de 2:1, con 3 μ l del tampón 5x suministrado con la ligasa y 2 unidades de ésta. Para cada ligación se realizó un control de recircularización del vector empleado para clonar el inserto de interés, en las mismas condiciones pero sin añadir inserto. Las muestras se incubaron a 15°C durante 18 horas y se clonaron en células competentes de la cepa bacteriana *Escherichia coli* DH5 α F' (resistente a kanamicina, sensible a ampicilina y deficiente en el operón de la lactosa), cedida por el Dr. Marc Parmentier (IRIBHN, Universidad Libre de Bruselas).

7.3. Obtención de células competentes y transformación.

Para la obtención de células competentes de *E. coli* DH5 α F' se emplearon cultivos en crecimiento exponencial (densidad óptica a 550 nm de 0.5 aproximadamente). Para ello se sembró una colonia en 20 ml de medio LB con kanamicina y se mantuvo en agitación (200 rpm) a 37°C toda la noche. Para obtener un cultivo en fase exponencial se inoculó 1 ml del crecido durante la noche en 100 ml de SOB y se mantuvo 3 horas a 37°C y en agitación. Este cultivo fue el que se empleó para su posterior transformación según el método de Hanahan *et al.* (1991).²³ Para ello, 50 ml del cultivo se incubaron en hielo durante 15 min antes de centrifugarlos 10 min a 3000 rpm en cámara fría. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron cuidadosamente y en frío en 16.5 ml de tampón de transformación, tras lo que se repitió la centrifugación y posterior resuspensión del pellet celular, esta vez en 4 ml de tampón de transformación frío. A continuación se añadieron 140 μ l de DMSO, gota a gota y agitando lentamente, se incubó en hielo 5 min; después se adicionaron 140 μ l de una solución de DTT (también poco a poco y agitando con suavidad), se incubó 10 min en hielo, y finalmente se repitió la adición de DMSO.

Para transformar las bacterias, se añadieron 200 μ l de la suspensión celular a tubos de cultivo que contenían 6 μ l de las mezclas de ligación (incluyendo un control de transformación con 1 ng de vector pBlueScript II KS circularizado). Los tubos se mantuvieron 25 min en hielo con agitación ocasional, y a continuación en una mezcla agua/hielo 5 min más. Los tubos se incubaron 90 s a 42°C para provocar un choque térmico, y se enfriaron rápidamente en hielo durante 1 min. Para recuperar las bacterias, se les añadió 800 μ l de SOC y se incubaron 45 min a 37°C con agitación muy suave.

Tras esta incubación, se sembraron distintas diluciones de las bacterias en placas Petri con SOB-agar y ampicilina como marcador de selección, y se crecieron toda la noche en un incubador a 37°C. En las transformaciones con pBlueScript II KS el medio de las placas incluyó X-Gal (concentración final de 40 µg/ml) e IPTG (10 µg/ml), lo que facilitó la identificación de las colonias con plásmido recombinante (blancas) frente a las que portaban el plásmido nativo (azules). Tras seleccionar los recombinantes positivos, las colonias de interés se conservaron en criotubos a -80°C en un 20% de glicerol.

7.4. Selección de recombinantes.

Tras cada experimento de clonación se seleccionaron varias colonias cuyos plásmidos se analizaron por restricción con las endonucleasas apropiadas o por secuenciación con el fin de seleccionar los recombinantes positivos. Para ello, estas colonias se inocularon en medio LB con ampicilina y se crecieron los minicultivos a 37°C con agitación vigorosa durante la noche. A continuación, se aislaron los plásmidos por el sistema de extracción por lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979)²⁴ descrito por Maniatis *et al.* (1986)²⁵ con pequeñas modificaciones.

Brevemente, el método consistió en resuspender las bacterias del cultivo "overnight" en un tampón de resuspensión adecuado, lisarlas con un tampón de lisis que contiene SDS y NaOH y, tras añadir a las muestras una solución de neutralización, centrifugar los tubos a 12000 rpm durante 5 min en una centrifuga de mesa Eppendorf. Se descarta el precipitado de DNA genómico y se extraen las proteínas con fenol/cloroformo. Los plásmidos (fase acuosa) se precipitan con etanol absoluto, se lavan con etanol al 70% y se resuspenden en 40 µl de agua con 20 µg/ml de RNAsa libre de DNAsas. El plásmido obtenido ya está en condiciones de ser analizado por restricción para elegir clones positivos.

Para la obtención de los plásmidos que se emplearían en los experimentos de transfección se utilizó el kit Plasmix Midipreps de Talent (Trieste, Italia).

8. EXPRESIÓN DE ENZIMAS MELANOGÉNICAS EN CÉLULAS HETERÓLOGAS

Las construcciones descritas, una vez subclonadas a pcDNA3, se emplearon para transfectar de forma transitoria células COS7 o HEK 293T con el reactivo de transfección Superfect (SFTR) de Qiagen o, en algunas ocasiones, Lipofectamine 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Habitualmente, las transfecciones se realizaron en placas de 6 pocillos (8 µg de plásmido por pocillo) y por duplicado en cada

experimento. Las células se recogieron 20 horas después de la transfección mediante tripsinización y se procesaron para determinación de actividades enzimáticas o Western blot como se describe en otros apartados de esta sección.

9. TRATAMIENTOS CON ENDOGLICOSIDASAS.

Para los estudios de desglicosilación, los extractos (unos 5-10 μg de proteína total) se incubaron a 37°C durante 4 horas en tampón de desglicosilación con 2 unidades de N-glicosidasa F (PGNasa F) o 15 miliunidades de endoglicosidasa H (Endo H). Tomamos la definición de unidad de actividad enzimática empleada por el proveedor.

Por otro lado, la digestión parcial con PGNasa F, que permitió estudiar el número de secuencias de glicosilación ocupadas, se realizó incubando 10 μg de proteína total de los extractos enzimáticos con distintas cantidades limitantes de la glicosidasa (15 miliunidades) y se siguió la cinética de la reacción (tomando muestras a distintos tiempos, comprendidos entre 30 min y 3 horas).

En el caso particular de las digestiones con PGNasa F, previo a la incubación a 37°C y adición de la enzima, las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min para desnaturalizar la proteína y favorecer su desglicosilación completa.

10. EXPERIMENTOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN.

Para los experimentos de inmunoprecipitación, se utilizaron 2×10^6 células que se lavaron dos veces con PBS antes de resuspenderlas en 200 μl de tampón de lisis frío. Las células se lisaron por agitación vigorosa en cámara fría y los lisados celulares se centrifugaron a 12000 rpm 15 min a 4°C en una centrifuga Eppendorf, tras lo que se descartó el precipitado y conservó el sobrenadante.

Previo a su utilización en cualquiera de las etapas de la inmunoprecipitación, la suspensión de proteína G-agarosa se lavó dos veces con tampón de lisis frío (200 μl para 20 μl de proteína G) y se resuspendió en el mismo volumen de este tampón que había inicialmente de dicha suspensión. Las incubaciones descritas a continuación se realizaron siempre en cámara fría y con agitación orbital.

El pre-aclarado del lisado celular se realizó incubando los 200 μl de lisado obtenidos anteriormente con 20 μl de proteína G durante una hora. Estas muestras se centrifugaron 10 min a 12000 rpm y se conservó el sobrenadante para añadirlo más tarde a la mezcla de 2 μg del anticuerpo αcnx con 20 μl de proteína G, preincubados durante una hora. La incubación de estos tres componentes (lisado, anticuerpo y proteína G) se mantuvo durante 3-5 horas,

tras las que se centrifugaron 30 segundos a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet de partículas se lavó 5 veces con 250 μ l del tampón de lavados.

Tras el último lavado, se eliminó cuidadosamente todo el sobrenadante y se añadieron 15 μ l de tampón de muestra para SDS-PAGE (3x) (con β -mercaptoetanol) y 10 de agua. Las muestras se incubaron 10 min a 95°C, se centrifugaron y el sobrenadante se cargó en un gel de poliacrilamida para electroforesis SDS-PAGE y posterior Western blot con α PEP7.

11. ELECTROFORESIS ANALÍTICA.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se realizó mediante el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970),²⁶ con algunas modificaciones, con una cubeta Mini Protean II y una fuente de alimentación 3000 Xi, ambos de BioRad. El gel hacinador fue de 1 cm de altura, aproximadamente, con una concentración final de acrilamida del 4%, y el gel separador era de unos 6 cm de altura, con un porcentaje de acrilamida del 8-10%. Los geles polimerizan por la acción del TEMED y del persulfato amónico sobre una disolución de acrilamida y bisacrilamida. Previamente al desarrollo de la electroforesis, las muestras fueron diluidas en tampón de muestra (3x), con o sin β -mercaptoetanol. El volumen máximo de muestra aplicado en cada calle fue de 25 μ l, con una cantidad de proteína celular comprendida entre 5 y 20 μ g. El tampón de recorrido se describe en el Apéndice I.

La intensidad de corriente aplicada durante la electroforesis fue 15 mA/gel hasta que el frente de la muestra entró en el gel separador y posteriormente fue aumentada hasta 30 mA/gel. Para la tinción específica de bandas con actividad dopa oxidasa, la electroforesis se montó en un baño de hielo, para preservar la enzima lo máximo posible y evitar su termodesnaturalización, y se empleó además un tampón de muestra exento de β -mercaptoetanol. Tras la electroforesis, los geles se incubaron en tampón fosfato 50 mM, pH 6.0 durante 10 min a temperatura ambiente, con el fin de neutralizar su pH básico y reducir al máximo la oxidación espontánea de L-dopa. Posteriormente, el gel fue sumergido en una disolución de L-dopa 2.0 mM en tampón fosfato 10 mM, pH 6.8 suplementado con MBTH 5 mM. Tras 15-30 min de incubación a 37°C, las bandas de actividad dopa oxidasa fueron visibles y la reacción fue detenida mediante un lavado con agua bidestilada. Posteriormente, el gel fue secado en un secador de geles al vacío (modelo 443, BioRad), lo que incrementa notablemente la intensidad de las bandas de actividad. El método en su conjunto es tan sensible como los métodos fluorográficos que se basan en la incorporación a melaninas de trazadores radioactivos.²⁷

Para la detección inmunoquímica de las enzimas posterior a su separación electroforética, se eligió un tampón de muestra con β -mercaptoetanol, y éstas se incubaron a 95°C durante 5 min antes de realizar la electroforesis a temperatura ambiente.

12. WESTERN BLOT.

La presencia y cantidad de tirosinasa y tyrp1 en extractos celulares se analizó mediante Western blot utilizando los anticuerpos específicos α PEP7 y α PEP1 respectivamente. Una vez finalizada la electroforesis en condiciones reductoras, el gel fue transferido a una membrana de PVDF (Immobilon-P) de 0.45 μ m de tamaño de poro (Millipore), previamente tratada según las especificaciones de la casa proveedora e incubada en tampón de transferencia durante 10 min, utilizando una unidad de transferencia semi-seca de Bio-Rad. Tras 1 hora de transferencia a 22 V (que corresponden a unos 0.12 A/gel al inicio de la transferencia y a unos 0.4 A/gel al final), la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con leche desnatada en polvo al 5% en PBS, en agitación orbital muy suave. Posteriormente se incubó durante toda la noche a 4°C (o, excepcionalmente, 3 horas a temperatura ambiente) en agitación orbital suave con el primer anticuerpo, y se empleó una dilución final de 1:10000 para ambos anticuerpos en el tampón de unión más idóneo para cada uno. Antes de incubar con el segundo anticuerpo, la membrana fue lavada tres veces con tampón de lavado y a continuación se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con el segundo anticuerpo, anti IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano, que se utilizó a una dilución final de 1:10000 en el tampón de unión adecuado. Finalmente, antes del revelado, la membrana fue lavada de nuevo tres veces con el mismo medio descrito anteriormente. Para revelar la membrana se realizó una tinción con diaminobencidina (DAB) o se empleó el kit de quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. La emisión se registró en una película de autorradiografía Hyperfilm ECL (Amersham), en cámara oscura. Para su revelado se emplearon líquidos de revelado y fijado de AGFA y la cuantificación se realizó en un sistema de BioRad anteriormente descrito. La homogeneidad de la carga total de proteínas en las distintas calles del gel se comprobó por corte del cuarto inferior del filtro, tras la transferencia pero antes del bloqueo, y tinción del mismo con amido-black 0.1% disuelto en 45% de metanol y ácido acético al 10%.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Jimenez, M., Maloy, W. L. y Hearing, V. J. (1989) Specific identification of an authentic clone for mammalian tyrosinase. *J Biol Chem* **264** (6), 3397-3403.
2. Jimenez, M., Tsukamoto, K. y Hearing, V. J. (1991) Tyrosinases from two different loci are expressed by normal and by transformed melanocytes. *J. Biol. Chem.* **266** (2), 1147-1156.
3. Bouchard, B., del Marmol, V., Jackson, I. J., Cherif, D. y Dubertret, L. (1994) Molecular characterization of a human tyrosinase-related-protein-2 cDNA. Patterns of expression in melanocytic cells. *Eur. J. Biochem.* **219** (1), 127-134.
4. del Marmol, V., Ito, S., Jackson, I., Vachtenheim, J., Berr, P., Ghanem, G., Morandini, R., Wakamatsu, K. y Huez, G. (1993) TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. *FEBS Lett* **327** (3), 307-310.
5. Jimenez-Cervantes, C., Garcia-Borrón, J. C., Valverde, P., Solano, F. y Lozano, J. A. (1993) Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes. 1. Biochemical characterization of two melanosomal tyrosinases from B16 mouse melanoma. *Eur. J. Biochem.* **217** (2), 549-556.
6. Valverde, P., Jimenez-Cervantes, C., Salinas, C., Garcia-Borrón, J. C., Solano, F. y Lozano, J. A. (1993) Preparation of purified tyrosinase devoid of dopachrome tautomerase from mammalian malignant melanocytes. *Pigment Cell Res* **6** (3), 158-164.
7. Solano, F. y García-Borrón, J.C. (1998) Advances in enzymatic analysis of melanogenesis. En: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. y Ortonne, J.P., Eds. Oxford Univ. Press, NY, USA, pp. 461-471.
8. Pomerantz, S. H. (1964) Tyrosine hydroxylation catalyzed by mammalian tyrosinase: an improved method of assay. *Biochem Biophys Res Commun* **16** (2), 188-194.
9. Hearing, V. J. y Ekel, T. M. (1976) Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem J* **157** (3), 549-557.
10. Jara, J. R., Solano, F. y Lozano, J. A. (1988) Assays for mammalian tyrosinase: a comparative study. *Pigment Cell Res* **1** (5), 332-339.
11. Winder, A. J. y Harris, H. (1991) New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **198** (2), 317-326.
12. Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. A. y Garcia-Borrón, J. C. (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6- dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase- related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.* **269** (27), 17993-18001.
13. Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jimenez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., Garcia-Borrón, J. C. y Hearing, V. J. (1994) Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J* **13** (24), 5818-5825.

14. Aroca, P., Garcia-Borrón, J. C., Solano, F. y Lozano, J. A. (1990) Regulation of mammalian melanogenesis. I: Partial purification and characterization of a dopachrome converting factor: dopachrome tautomerase. *Biochim Biophys Acta* **1035** (3), 266-275.
15. Palumbo, A., D'Ischia, M., Misuraca, G. y Prota, G. (1987) Effect of metal ions on the rearrangement of dopachrome. *Biochim Biophys Acta* **925** (2), 203-209.
16. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. y Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18** (24), 5294-5299.
17. McMaster, G. K. y Carmichael, G. G. (1977) Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci USA* **74** (11), 4835-4838.
18. Yamamoto, H., Takeuchi, S., Kudo, T., Makino, K., Nakata, A., Shinoda, T. y Takeuchi, T. (1987) Cloning and sequencing of mouse tyrosinase. *Jpn. J. Genet.* **62** 271-274.
19. Kelsall, S. R., Le Fur, N. y Mintz, B. (1997) Qualitative and quantitative catalog of tyrosinase alternative transcripts in normal murine skin melanocytes as a basis for detecting melanoma-specific changes. *Biochem Biophys Res Commun* **236** (1), 173-177.
20. Kwon, B. S., Haq, A. K., Pomerantz, S. y Halaban, R. (1987) Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (21), 7473-7477.
21. Giebel, L. B. y Spritz, R. A. (1990) RFLP for MboI in the human tyrosinase (TYR) gene detected by PCR. *Nucleic Acids Res.* **18** (10), 3103-3103.
22. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. y Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77** (1), 51-59.
23. Hanahan, D., Jessee, J. y Bloom, F. R. (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204** 63-113.
24. Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** (6), 1513-
25. Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1986) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
26. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (259), 680-685.
27. Jimenez-Cervantes, C., Valverde, P., Garcia-Borrón, J. C., Solano, F. y Lozano, J. A. (1993) Improved tyrosinase activity stains in polyacrylamide electrophoresis gels. *Pigment Cell Res* **6** (6), 394-399.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

LA ACTIVIDAD DHICA OXIDASA DE LA TIROSINASA HUMANA

CAPÍTULO I

LA ACTIVIDAD DHICA OXIDASA DE LA TIROSINASA HUMANA

A pesar del alto grado de similitud entre las secuencias de tirosinasa y Tyrp1 (40% de aminoácidos idénticos y un 70% de homología), estas dos enzimas muestran sensibles diferencias en sus parámetros cinéticos y de especificidad de sustrato, al menos en ratón.¹ Asimismo, y aunque las propiedades cinéticas de las enzimas melanogénicas humanas están peor caracterizadas, sí lo están lo suficiente para que se hayan detectado algunas discrepancias entre las capacidades catalíticas de estas enzimas con respecto a las de ratón. No obstante, a menudo se comportan de forma muy similar y con frecuencia se extrapolan los resultados obtenidos con las enzimas murinas a las humanas.²

Así, como ya hemos comentado, una de las principales diferencias entre la tirosinasa y Tyrp1 de ratón es que esta última presenta actividad DHICA oxidasa responsable de la incorporación de las unidades carboxiladas a las eumelaninas, mientras que la tirosinasa no es capaz de oxidar el DHICA.^{3,4} Por otro lado, se ha señalado que TYRP1 resulta incapaz de oxidar DHICA,⁵ y se ha atribuido a la tirosinasa humana expresada en fibroblastos una actividad DHICA convertasa,⁶ aunque sin caracterizar el producto de reacción, lo que señala la posibilidad de que la tirosinasa humana reconociera y oxidara el DHICA para su incorporación a la melanina.

Con el fin de llevar a cabo una comparación *vis-a-vis* de las propiedades catalíticas de las tirosinasas humana y de ratón bajo idénticas condiciones experimentales, empleamos dos estrategias alternativas y complementarias para el estudio de sus especificidades de sustrato y sus comportamientos cinéticos: i) comparación de las cinéticas de las reacciones de tirosinasa y/o Tyrp1 humanas en extractos procedentes de líneas celulares de melanoma humano que expresan todo el conjunto de enzimas melanogénicas o que son deficientes en una o más de ellas, una circunstancia frecuente en células de melanoma humano,⁷ y ii) expresión de los genes correspondientes en células no melanocíticas y medida de las actividades, para evitar posibles interferencias de las otras proteínas melanogénicas.

En primer lugar, analizamos la capacidad para utilizar DHICA como sustrato de las enzimas de dos líneas celulares de melanoma humano que expresan tirosinasa, Tyrp1 y Tyrp2/Dct (HBL y SCL) y de una que es defectiva en Tyrp1 (BEU). En la segunda aproximación, se estudiaron las actividades melanogénicas de extractos de células COS7 transfectadas de forma transitoria con el gen *TYR* humano y con el gen *Tyr* de ratón.

1. Actividades melanogénicas en células de melanoma humano que expresan o carecen de TYRP1.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la primera parte de este trabajo consistió en la caracterización de las actividades melanogénicas de las líneas celulares empleadas. Así, se midieron las actividades tirosina hidroxilasa (TH), dopa oxidasa (DO) y dopacromo tautomerasa (Dct) de las tres líneas de células de melanoma humano (BEU, HBL y SCL) y se comprobó que todas ellas presentaban niveles significativos de las tres actividades (Figura 15A).

La presencia de tirosinasa enzimáticamente activa se analizó por SDS-PAGE en condiciones no reductoras seguida de tinción del gel para detectar actividad dopa oxidasa.⁸ Como refleja la Figura 15B, las células de melanoma humano dieron una banda de tirosinasa única, cuya movilidad electroforética fue la misma en todos los casos, y ligeramente inferior a la de la tirosinasa purificada de células de melanoma de ratón B16.

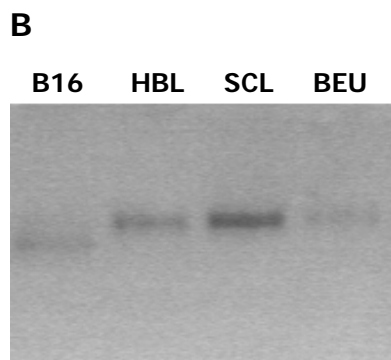
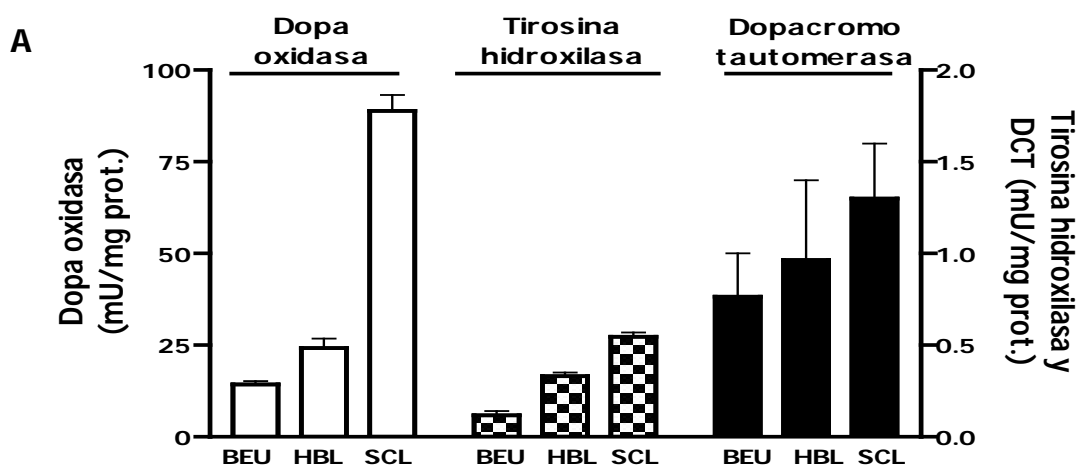


Figura 15. Actividades melanogénicas de las enzimas de tres líneas de melanoma humano. (A) Actividades melanogénicas. Los resultados son la media \pm desviación estándar de 3 ensayos independientes con diferentes extractos celulares, realizados por duplicado. **(B)** Perfil electroforético de la tirosinasa purificada (de melanoma de ratón B16) y la enzima humana de células de melanoma HBL, SCL y BEU. Los extractos crudos se resolvieron por SDS-PAGE no reductora y el gel se tiñó con la actividad dopa oxidasa.

Puesto que anteriormente se ha descrito que las células BEU, HBL y SCL expresan el gen de *TYR*, pero mediante análisis por Northern blot de las células BEU se ha sugerido que estas células carecen de TYRP1,⁹ decidimos confirmar la ausencia de TYRP1

intentando detectar tanto el mRNA como la proteína, por la importancia de este hecho para nuestros fines.

La expresión de la proteína TYRP1 fue estudiada mediante Western blot (Figura 16A), con el antisuero α PEP1 contra un epitopo localizado en el pentadecapéptido C-terminal de Tyrp1 de ratón. Aunque otros autores han señalado que α PEP1 es específico de la enzima de ratón, la conservación de 10 de los 15 aminoácidos en las secuencias C-terminal de ratón y humana parece conferir a este antisuero una afinidad significativa por la proteína humana, por lo que, cuando se emplea a concentraciones relativamente altas, puede ser utilizado para detectar TYRP1 humana. α PEP1 reaccionó con una proteína de unos 75 kDa presente en extractos de células SCL y, en menor medida, HBL, pero no en los de células BEU. Como era de esperar, el control positivo incluido en el ensayo, un extracto crudo de melanoma de ratón B16, reaccionó con α PEP1 dando una banda de la movilidad electroforética descrita,¹⁰ y extractos de fibroblastos humanos, incluidos como control negativo, no dieron banda alguna en el Western blot con α PEP1, lo que prueba la especificidad de la unión al anticuerpo bajo las mismas condiciones experimentales.

La ausencia de expresión de TYRP1 en células BEU se confirmó más tarde mediante RT-PCR, utilizando cebadores diseñados para amplificar la secuencia completa del gen (Figura 16B). No se obtuvieron productos de amplificación con cDNA sintetizado a partir del RNA total extraído de las células BEU, mientras que sí se obtuvo uno del tamaño esperado (unas 1.6 kb) usando cDNA de células HBL como control positivo.

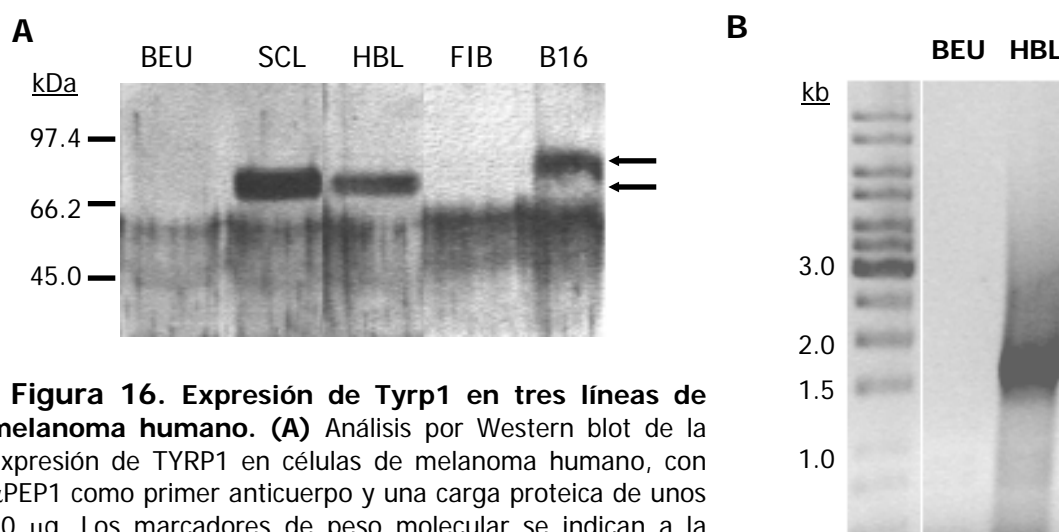


Figura 16. Expresión de Tyrp1 en tres líneas de melanoma humano. (A) Análisis por Western blot de la expresión de TYRP1 en células de melanoma humano, con α PEP1 como primer anticuerpo y una carga proteica de unos 30 μ g. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda. Las flechas señalan la posición de las bandas de diferente movilidad electroforética de las enzimas humana y de ratón. B16 y FIB designan extractos crudos de células de melanoma de ratón B16 y fibroblastos humanos (controles positivo y negativo, respectivamente). **(B)** RT-PCR que prueba la expresión del gen *TYRP1* en las células HBL y la ausencia de expresión en las BEU.

Por otra parte, la calidad del cDNA obtenido de las células BEU se comprobó por amplificación del gen *TYR* (resultados no mostrados), lo que probó que el hecho de no detectar transcritos de *TYRP1* no se relacionaba con deficiencias en el material de partida.

Por tanto, a partir de estos resultados podemos concluir que las células BEU poseen actividades TH, DO y Dct en ausencia de *TYRP1*.

2. El consumo de DHICA por extractos celulares de melanomas humanos tiene lugar por oxidación y acelera la formación de melaninas.

El siguiente objetivo fue comparar la capacidad de metabolizar el DHICA de las células SCL y HBL, que presentan *TYRP1*, con la de las células BEU, que carecen de *TYRP1*. Los extractos de cada línea celular se incubaron a 37°C con DHICA 0.5 mM, bajo condiciones de actividad dopa oxidasa comparables, y se determinaron los niveles de DHICA residual a diferentes tiempos de reacción por HPLC.

El consumo de DHICA por extractos de células BEU fue bajo pero detectable y significativamente diferente ($p > 0.001$) que el del blanco, determinado en ausencia de extracto celular para tener una medida de la desaparición espontánea de DHICA. Las líneas celulares HBL y SCL, que expresan todo el conjunto de enzimas melanogénicas, mostraron un mayor consumo de DHICA (Figura 17).

Estos datos prueban que el DHICA es transformado por extractos de células de melanoma humano, tanto en presencia como en ausencia de *TYRP1*, pero no informan sobre la naturaleza de los productos de reacción. Por tanto, el siguiente paso consistió en diseñar experimentos que establecieran si el consumo de DHICA era debido, como parece lógico suponer, a su oxidación y la consiguiente incorporación a las melaninas.

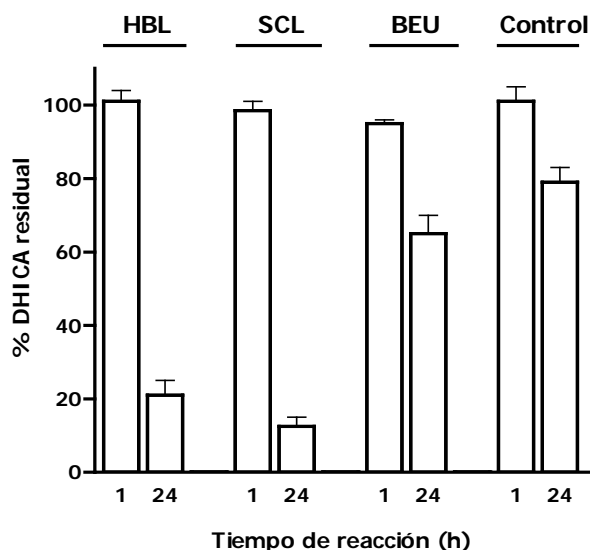


Figura 17. Determinación del consumo de DHICA por extractos celulares de melanoma humano. Una solución de DHICA 0.5 mM se incubó a 37°C en presencia de extractos de células HBL, BEU y SCL con actividades dopa oxidasa comparables (1.8, 1.1 y 1.0 mU, respectivamente). La concentración residual de DHICA se analizó por HPLC a los tiempos indicados. También se muestra el control, en ausencia de extracto celular (reemplazado por tampón), para ilustrar la estabilidad relativa del DHICA en las condiciones descritas.

Así, se siguió la evolución de los espectros de disoluciones de DHICA en presencia de estos extractos celulares. Las tres líneas celulares humanas fueron capaces de acelerar la formación de eumelaninas a partir del DHICA, tal y como demuestra el incremento de absorbancia a 550 nm (Figura 18A), que es una longitud de onda indicativa de formación de dímeros de dihidroxiindoles conocidos como melanocromos.¹¹

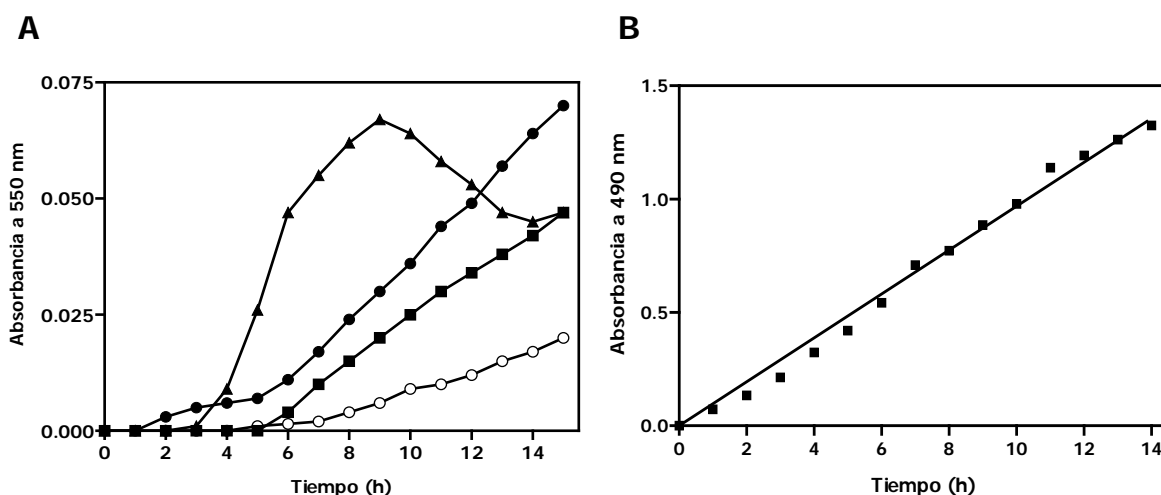


Figura 18. (A) Producción de melanina a partir del DHICA. Se midió la absorbancia de las disoluciones de DHICA a 550 nm (concentración final 150 μ M) en presencia de extractos de células de melanoma humano a diferentes tiempos de reacción en un espectrofotómetro a 37°C frente a un blanco con la misma cantidad de extracto pero sin DHICA. Extractos celulares de SCL (▲), BEU (●), y HBL (■). En el blanco (○) se sustituyó el extracto celular de las muestras anteriores por el mismo volumen de tampón de solubilización. Las actividades enzimáticas presentes en el medio de reacción, en términos de actividad dopa oxidasa, fueron 1.1, 1.2 y 2.0 mU para las células SCL, BEU y HBL, respectivamente. **(B) Oxidación del DHICA.** Los espectros Vis de disoluciones que contenían DHICA 800 μ M y MBTH 2 mM se registraron a intervalos de 1 hora en presencia de una cantidad de extracto de células BEU correspondiente a 1.15 mU de actividad dopa oxidasa, aunque se representa sólo el incremento de la absorbancia a 490 nm (pico de absorción del aducto del MBTH con la quinona del DHICA). La cubeta de referencia contenía una disolución idéntica a la de la muestra, salvo que el extracto enzimático fue sustituido por una cantidad equivalente de proteína de células COS7 transfectadas con la forma inactiva Δ 3Tyr.

Con cantidades comparables de los extractos, el efecto fue semejante para BEU y HBL y más rápido para las células SCL, de acuerdo con la mayor actividad oxidativa en esta línea celular (Figura 15A). En todos los casos se detectó una fase inicial de retardo, que podría corresponderse con la reacción inicial de la quinona derivada del DHICA (IQCA) por grupos tioles y otros reactivos nucleófilos presentes en el extracto que impedirían la dimerización hasta el agotamiento de estos compuestos. La caída de absorbancia a 550 nm observada en extractos de SCL tras períodos de incubación prolongados puede explicarse por una transformación de los dímeros de dihidroxiindol a oligómeros y especies poliméricas, que pierden absorción en la banda centrada a 550 nm

a costa de dar una absorción generalizada de la luz visible sin picos de longitudes de onda discretas (ver Figura 18A). Esto provoca que la disolución se oscurezca y disminuya el pico de absorbancia centrado en 550 nm.¹¹ Cantidades catalíticamente comparables de tirosinasa purificada de células de ratón B16 no aceleraron la evolución espectral de estas disoluciones (resultados no mostrados en la figura). La incapacidad de la tirosinasa de ratón para metabolizar el DHICA es consistente con los resultados obtenidos previamente por el grupo de investigación en el que se ha realizado esta Tesis.³

Aunque la formación de melaninas debe tener lugar mediante oxidación de los correspondientes precursores, se buscó una confirmación directa de la producción de IQCA empleando el agente atrapador de quinonas MBTH (hidrazona de Besthorn), que habitualmente se utiliza en los ensayos de medida de actividad dopa oxidasa por su capacidad de formar cromóforos con *o*-quinonas.^{3,4,12} El experimento se realizó con células BEU para evitar posibles interferencias con TYRP1. La Figura 18B muestra que los extractos de BEU catalizaron la formación de un aducto coloreado en presencia de DHICA y MBTH, cuyo espectro de absorción fue muy similar al del aducto dopaquinona-MBTH.³ En conjunto, estos resultados demuestran que el DHICA puede ser oxidado e incorporado al polímero de melanina por extractos de melanocitos humanos completamente carentes de TYRP1, si bien es cierto que no prueban totalmente que la enzima responsable de esta reacción en humanos sea la tirosinasa.

3. El DHICA actúa como cofactor de TYR de extractos de células de melanoma humano.

Como ya hemos comentado anteriormente por ser característico del mecanismo de acción de la tirosinasa,¹³ el dopa es al mismo tiempo sustrato de tirosinasa en la actividad dopa oxidasa y cofactor, a bajas concentraciones, de su actividad tirosina hidroxilasa. Por ello, a partir de ciertas concentraciones, el efecto como cofactor empieza a ser reemplazado por su papel de sustrato de la enzima. La abundancia de dopa mantiene moléculas de enzima ocupadas en la actividad dopa oxidasa, por lo que se detecta una inhibición progresiva de la actividad tirosina hidroxilasa a concentraciones elevadas del difenol en comparación con tirosina. Puesto que el dopa y el DHICA son *o*-difenoles, un comportamiento similar del DHICA sobre la actividad tirosina hidroxilasa de la tirosinasa humana podría señalar una interacción directa con el centro activo de la enzima. Para estudiar la posibilidad de que el DHICA fuera o no reconocido como sustrato/cofactor de

TYR, analizamos su capacidad para actuar como cofactor y/o inhibidor de la hidroxilación de tirosina empleando extractos de células BEU y HBL como fuente de la tirosinasa.

En primer lugar, la actividad tirosina hidroxilasa se midió en presencia de L-dopa 10 μM como cofactor y de distintas concentraciones de DHICA comparativamente altas. Como muestra la Figura 19, la actividad tirosina hidroxilasa de los extractos de ambas líneas celulares disminuyó en ambos casos en presencia de concentraciones de DHICA superiores a 250 μM . Esta inhibición fue dependiente de la concentración e incluso mayor en células BEU, que carecen de TYRP1, que en HBL.

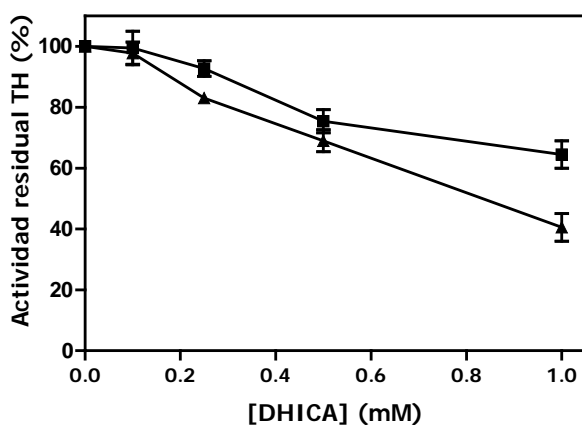


Figura 19. Inhibición por el DHICA de la actividad tirosina hidroxilasa de extractos de células de melanoma humano positivas (HBL) o negativas (BEU) para TYRP1. Se midió la actividad tirosina hidroxilasa de extractos de HBL (■) y BEU (▲) en presencia de L-tirosina 50 μM , L-dopa 10 μM como cofactor y concentraciones crecientes de DHICA. Los resultados (media \pm desviación, n=2) aparecen como actividad residual respecto a controles realizados sin DHICA.

De forma complementaria, una característica bien conocida de tirosinasas de diversos orígenes es que la catálisis de la hidroxilación de tirosina presenta un período de retardo o "lag" en ausencia de cofactores apropiados.^{1,14,10} El sustrato L-dopa, ya sea exógeno o generado *in situ* por desproporción entre L-dopaquinona y L-ciclodopa (Figura 4), es capaz de actuar como cofactor de la tirosinasa, lo que se atribuye a la conversión de la *met*-tirosinasa a la forma activa *oxy*- (capaz de hidroxilar tirosina) tras producirse la oxidación del *o*-difeno.¹⁵ De este modo, los compuestos difenólicos que son sustratos de la tirosinasa deberían ser capaces de sustituir al L-dopa como cofactor en la reacción de la tirosina hidroxilasa. Siguiendo este razonamiento, se midió la capacidad de hidroxilar tirosina de los extractos de las células de melanoma humano mencionadas en presencia de DHICA como posible cofactor, empleando mezclas de reacción carentes de L-dopa y con diversas concentraciones de DHICA. Estos resultados se compararon con los obtenidos en condiciones estándar, es decir, en presencia de L-dopa 10 μM y sin DHICA (Tabla 5).

Según lo esperado, los extractos de las tres líneas celulares mostraron una actividad tirosina hidroxilasa muy baja en ausencia de L-dopa o DHICA. Asimismo, en presencia de DHICA, la actividad tirosina hidroxilasa aumentó de forma dependiente con la concentración. De los resultados obtenidos se desprende que la capacidad del DHICA para actuar como cofactor fue similar para las tres líneas, sin afectar por tanto la presencia o no de TYRP1. Sin embargo, el DHICA fue menos eficiente que el L-dopa, ya que una concentración de 100 μM del dihidroxiindol carboxilado sólo permitió alcanzar el 40% de la actividad obtenida con L-dopa a una concentración 10 veces inferior (10 μM). No se ensayaron concentraciones mayores de DHICA porque, tal como vimos antes, inhiben esta reacción por predominar su papel de sustrato sobre el de cofactor.

| DHICA (μM) | % actividad tirosina hidroxilasa máxima | | |
|----------------------------|-----------------------------------------|----------------|----------------|
| | BEU | HBL | SCL |
| 0 | 5.4 \pm 3.3 | 9.8 \pm 3.2 | 3.1 \pm 2.3 |
| 10 | 10.2 \pm 5.3 | 19.5 \pm 4.3 | nd |
| 100 | 32.5 \pm 8.7 | 40.3 \pm 7.5 | 39.5 \pm 9.2 |

Tabla 5. Actividad tirosina hidroxilasa utilizando DHICA como *o*-difenoil cofactor de extractos de células de melanoma humano. Medidas realizadas en presencia de L-tirosina 50 μM y las concentraciones de DHICA indicadas, pero en ausencia de L-dopa. Los resultados representan el porcentaje (media \pm desviación, n=2) de la actividad obtenida en los ensayos control (con L-dopa 10 μM como cofactor y sin DHICA). "nd" indica "no determinado".

4. El DHICA es oxidado por TYR expresada transitoriamente en células COS7.

Hasta el momento, los resultados prueban que las células BEU, que carecen de TYRP1, son capaces de catalizar el consumo de DHICA, muy probablemente por un mecanismo oxidativo, y que el DHICA es capaz de interactuar con TYR. Estas observaciones sugieren que TYR es la enzima responsable del consumo del DHICA en humanos. Sin embargo, no se pueden descartar otras posibilidades, tales como la implicación de otra(s) proteína(s) melanogénica(s). De hecho, otros autores han señalado la posibilidad de que la proteína silver tenga algún papel en el metabolismo del DHICA.^{16,17} Con el fin de demostrar sin ambigüedades la capacidad de TYR para transformar el DHICA y caracterizar el producto de reacción, se transfectaron células COS7 con los genes de tirosinasa de ratón (*Tyr*) y humana (*TYR*).

Para comprobar que ambas proteínas se habían expresado eficientemente, se determinaron las actividades tirosina hidroxilasa y dopa oxidasa de los extractos y se realizó un Western blot, empleando el antisuero αPEP7 , que reconoce de forma específica tirosinasa (Tabla 6 y Figura 20). Los extractos de las células transfectadas con el gen *Tyr*

mostraron dos bandas principales inmunorreactivas de pesos moleculares aparentes de 52 y 65 kDa, y dos minoritarias de mayor tamaño (aproximadamente 147 y 169 kDa). Las bandas de 52 y 65 kDa probablemente correspondan a formas de la enzima con distinto grado de maduración y glicosilación, mientras que las mayores podrían ser productos de agregación de la proteína, como se ha detectado anteriormente en SDS-PAGE de tirosinasas de mamíferos.^{1,2}

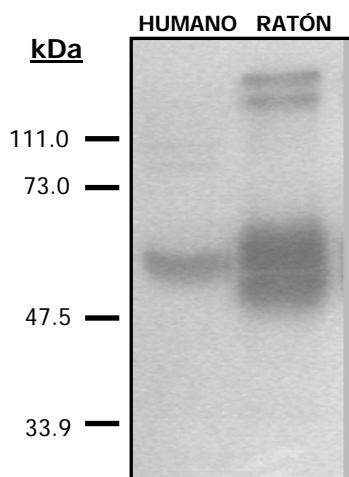


Figura 20. Expresión de las tirosinasas humana y de ratón en células COS7. La eficacia de la expresión de los genes de tirosinasa de ratón y humana en células COS7 se comprobó por Western blot. Las células se recogieron 24 horas después de la transfección, y se analizó la expresión de la tirosinasa en una alícuota del extracto solubilizado mediante Western blot, con α PEP7 como primer anticuerpo. Los marcadores de tamaño se muestran a la derecha. La carga de proteína fue de 10 y 37.5 μ g para las células transfectadas con los genes de ratón y humano, respectivamente.

Por el contrario, los extractos de células transfectadas con *TYR* mostraron una única banda de 58 kDa, cuya menor intensidad, comparada con la de ratón, fue reproducida en dos experimentos de transfección independientes. Esto puede reflejar una menor eficacia de transfección, una traducción menos eficiente y/o una menor afinidad de α PEP7 por la enzima humana, ya que, al igual que ocurría con α PEP1, el antisuero se obtuvo contra la secuencia de un epítipo C-terminal de la enzima murina. Sin embargo, la homología entre las regiones C-terminales de las tirosinasas de ratón y humana es todavía mayor que entre las Tyrp1 (Figura 7), lo que podría favorecer la interacción entre α PEP7 y la tirosinasa humana.

En cualquier caso, las células COS7 transfectadas con *TYR* mostraron niveles de actividades tirosina hidroxilasa y dopa oxidasa suficientes para utilizar esta estrategia y contrastar de forma precisa los resultados obtenidos en los apartados anteriores con las diferentes líneas de melanocitos (Tabla 6). De hecho, estos niveles se encontraban en el mismo rango de actividad que los medidos generalmente para los melanocitos B16.^{1,18} El cálculo de las unidades de DHICA oxidasa se realizó a partir del $\Delta A_{490}/\text{min}$ en presencia de MBTH, considerando como coeficiente de absorción molar para el aducto IQCA-MBTH el mismo que el de DQ-MBTH.³

| Gen | Tirosina hidroxilasa ($\mu\text{U}/\text{mg}$ proteína) | Dopa oxidasa (mU/mg proteína) | DHICA oxidasa ($\mu\text{U}/\text{mg}$ proteína) |
|------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <i>TYR</i> | 98 ± 4 | 5.6 ± 0.2 | 88 ± 8 |
| <i>Tyr</i> | 1110 ± 50 | 60 ± 3 | no detectado |
| B16 | 136.0 ± 16 | 8.1 ± 2.6 | no determinado |

Tabla 6. Actividades melanogénicas en células COS7 transfectadas con los genes *TYR* y *Tyr* y comparadas con las de B16. Los resultados son la media \pm desviación de dos ensayos independientes. Todas las medidas se realizaron bajo las condiciones estándar descritas en el texto frente a blancos que contenían una cantidad de proteína total equivalente a la de las muestras, pero de células COS7 transfectadas con la forma inactiva $\Delta 3\text{Tyr}$.

El análisis espectrofotométrico de la evolución del DHICA demostró que los extractos crudos de las células transfectadas con el gen humano aceleran la desaparición del DHICA. El producto generado fue IQCA, como indica la formación del aducto coloreado con MBTH que absorbe a 490 nm (Figura 21A). Una vez más, la tirosinasa de ratón no fue capaz de oxidar DHICA a IQCA en el ensayo en presencia de MBTH, incluso cuando se emplearon cantidades catalíticas más de 10 veces superiores a la tirosinasa humana (en términos de actividad dopa oxidasa), lo que confirma nuestros resultados anteriores.^{3,4}

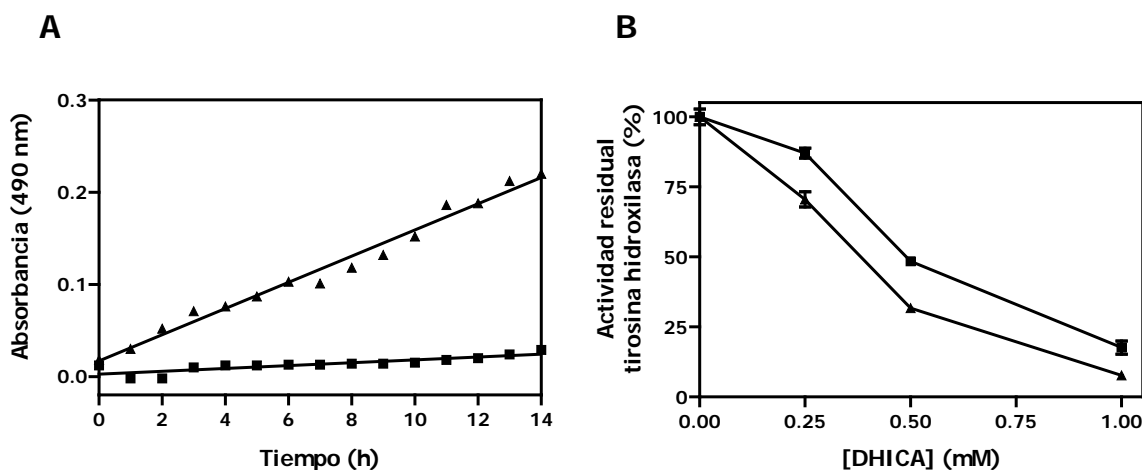


Figura 21. Reconocimiento y oxidación de DHICA por la tirosinasa humana, pero no por la de ratón. (A) Medida espectrofotométrica de la oxidación del DHICA. Los espectros VIS de disoluciones de DHICA 800 μM con MBTH 2 mM se registraron a intervalos de 1 hora en presencia de 0.6 ó 6.9 mU de actividad dopa oxidasa de la tirosinasa humana (▲) y de ratón (■) expresadas transitoriamente en células COS7. La cubeta de referencia contenía una disolución idéntica a la de la muestra, salvo que el extracto de la enzima activa fue sustituido por una cantidad equivalente de proteína de células control que expresaban $\Delta 3\text{Tyr}$. En la figura se muestra la absorbancia a 490 nm (pico de absorción del aducto MBTH-IQCA). (B) Inhibición de la actividad tirosina hidroxilasa de las tirosinasas de ratón y humana expresadas en células COS7. Las condiciones experimentales son las descritas en la Figura 19. Los extractos contenían 0.4 y 2.9 μU de actividad TH de las enzimas humana (▲) y de ratón (■), respectivamente. Los resultados son la media \pm desviación de dos medidas independientes.

Por último, la actividad tirosina hidroxilasa de TYR, medida en presencia de L-dopa cofactor 10 μ M, se vio inhibida por el DHICA de forma dependiente de la concentración (Figura 21B), y esta inhibición fue aún mayor que la detectada en extractos de melanocitos malignos humanos (Figura 19). Por otro lado, también se observó una inhibición similar de la actividad tirosina hidroxilasa de la enzima de ratón en presencia de concentraciones crecientes de DHICA.

5. Discusión y conclusiones.

Las eumelaninas naturales son polímeros polifenólicos heterogéneos que contienen unidades monoméricas derivadas tanto del DHICA como del DHI, el producto de la descarboxilación espontánea del dopacromo.¹⁹ Las proporciones relativas de las unidades carboxiladas derivadas del DHICA y de las descarboxiladas procedentes del DHI en estos polímeros varían ampliamente de un tipo de pigmento natural a otro.^{20,21} Aunque los pigmentos de los roedores parecen ser más ricos en DHICA, el contenido de estas unidades en humanos es también relativamente elevado, de modo que, según distintos autores, pueden llegar a suponer entre un 10% y un 40% del total de los monómeros indólicos incorporados.^{21,22} La presencia de grupos carboxilos en las melaninas derivadas del DHICA tiene un fuerte efecto sobre las propiedades del pigmento. Así, las melaninas ricas en DHICA podrían poseer una mayor capacidad quelante y, debido a la limitación del número de posiciones de polimerización disponibles en este anillo indólico, por estar bloqueada la posición 2, se considera que son más pequeñas, ordenadas y coloreadas que los pigmentos con mayor cantidad de DHI.^{23,24,25} Por tanto, el metabolismo y la incorporación del DHICA a las melaninas en melanocitos de mamíferos es un aspecto de la melanogénesis con relevancia fisiológica.

El DHICA es el producto de la tautomerización de dopacromo, reacción catalizada por la Dct,^{26,27} y su incorporación a la melanina en los melanocitos de ratón se lleva a cabo mediante oxidación catalizada por Tyrp1 a la quinona correspondiente.³ Además de esta probada capacidad de Tyrp1 de ratón para oxidar el DHICA, se ha propuesto que la proteína melanosomal derivada del locus *silver* podría estar también implicada en el metabolismo del DHICA por mecanismos que aún no se han caracterizado.¹⁶

La situación está menos clara en los melanocitos humanos, ya que, a pesar del alto grado de similitud con la secuencia de la Tyrp1 murina, se han detectado importantes diferencias entre las capacidades catalíticas de las dos especies: TYRP1 no posee

actividad DHICA oxidasa y sí se ha detectado consumo de DHICA en líneas celulares que carecen de TYRP1.⁵ Además, se ha descrito una actividad DHICA convertasa en la tirosinasa humana.⁶ Estos datos apuntan a que el metabolismo del DHICA podría tener lugar mediante su oxidación catalizada por TYR e independiente de TYRP1, pero hasta el momento esta hipótesis no había sido demostrada. Los datos disponibles hasta este trabajo indicaban un consumo de DHICA pero no su oxidación, y/o además se realizaron en sistemas en los que podía haber interferencias de otras proteínas melanogénicas.

Los resultados presentados en este capítulo confirman las diferencias en las actividades catalíticas de las enzimas melanogénicas de ratón y humana que ya se habían mencionado con anterioridad^{5,21} y que el DHICA puede ser reconocido por extractos de melanocitos humanos carentes de TYRP1. Además, como nuevas aportaciones, se demuestra que:

1. El DHICA inhibe la actividad tirosina hidroxilasa de la tirosinasa humana expresada en células no melanocíticas, de forma dependiente de la concentración.
2. El DHICA puede asimismo sustituir parcialmente al L-dopa como cofactor en dicha actividad enzimática, independientemente de la presencia o ausencia de TYRP1.
3. El consumo de DHICA por células de melanoma humano viene acompañado de formación de melaninas.
4. TYR es la enzima responsable de catalizar la desaparición de DHICA del medio.
5. El DHICA es un auténtico sustrato para TYR, ya que extractos celulares de melanomas humanos que no expresan TYRP1 y TYR expresada en células COS7 son capaces de oxidarlo a su quinona correspondiente. En este último sistema, no hay interferencias con otras proteínas melanogénicas que pudieran metabolizar el DHICA, en particular la derivada del locus *silver*.^{16,17}

Globalmente, estas observaciones prueban de forma inequívoca que, en humanos, la tirosinasa presenta actividad DHICA oxidasa: reconoce y oxida el DHICA, promoviendo así su incorporación a las eumelaninas.

En cuanto a su magnitud, la actividad DHICA oxidasa de TYR, aunque se puede detectar con cierta facilidad, parece ser relativamente baja y, en cualquier caso, menor que la de Tyrp1 de ratón. De hecho, se encuentra en el mismo rango que la actividad tirosina hidroxilasa, limitante del flujo, lo que plantea la importancia de esta etapa de la ruta melanogénica en las células humanas. Por otro lado, la actividad dopacromo

tautomerasa es también menor en los melanocitos humanos que en los de ratón,²⁸ por lo que la baja actividad DHICA oxidasa de la enzima humana podría ser suficiente para oxidar el DHICA producido en condiciones fisiológicas y podría explicar en parte las diferencias entre la composición de los pigmentos en roedores y humanos. En efecto, algunos estudios de degradación química de pigmentos melánicos sugieren que, en el ratón, puede haber hasta tres veces más unidades de DHICA que de DHI en el ratón (59-96%) comparado con el hombre (19-42%).^{20,21}

Sin embargo, un análisis más profundo de los resultados presentados en las Figuras 18B y 21B revela que los extractos de células BEU catalizan la oxidación del DHICA con una eficiencia mayor, aproximadamente el triple, que cantidades catalíticas equivalentes (en términos de actividad dopa oxidasa) de células COS7 transfectadas con *TYR*. Esta observación ofrece dos posibilidades: primero, la eficacia de catálisis del DHICA de *TYR* expresada de forma transitoria podría ser menor que la de la enzima obtenida del melanocito por causa de procesamientos intracelulares diferentes. En segundo lugar, los extractos de melanocitos pueden contener factores adicionales que catalicen la oxidación del DHICA y que aún no han sido caracterizados, y/o que incrementen la actividad DHICA oxidasa de *TYR*. Entre estos últimos, cabe destacar la presencia del resto de las proteínas melanogénicas, que forman un complejo con tirosinasa en el melanosoma y contribuyen a su estabilización.²⁹ Evidentemente, estas dos posibilidades no son excluyentes, y las dos pueden contribuir de forma conjunta al efecto observado.

Otro aspecto del estudio afecta a las capacidades catalíticas de la *TYRP1*. Según estos resultados, la capacidad de los extractos de células de melanomas humanos de metabolizar el DHICA se correlaciona con sus actividades tirosina hidroxilasa y dopa oxidasa, siendo mayor para las SCL y menor para las BEU. Por tanto, la actividad que transforma el DHICA en melanocitos humanos parece correlacionarse con su contenido en *TYR*. Esto indica, aunque no lo prueba totalmente, que la contribución de *TYRP1* a la oxidación del DHICA sería muy escasa, si no nula, coincidiendo con otros trabajos que señalan su incapacidad para oxidar DHICA.⁵

Desgraciadamente, este punto no pudo comprobarse mediante transfección de *TYRP1* en células heterólogas COS7, seguido de análisis de actividades enzimáticas melanogénicas en los extractos enzimáticos, ya que éstos resultaron totalmente inactivos en los ensayos de actividad tirosina hidroxilasa, dopa oxidasa y DHICA oxidasa. La razón de esta falta de actividad podría ser un procesamiento aberrante de *TYRP1* en las células

heterólogas, a juzgar por una glicosilación deficiente de la enzima (resultados no mostrados). Resulta interesante resaltar que tampoco fue posible detectar actividad dopacromo tautomerasa en células transfectadas con *TYRP2*, clonado de forma análoga a *TYR* y utilizando un protocolo de transfección idéntico. Esto parece indicar que el procesamiento hasta una forma enzimáticamente activa es distinto para *TYR*, por un lado, y las *TYRPs*, por otro, de manera que las células COS7 son un modelo poco apropiado para la expresión de estas últimas.

Por otra parte, en extractos de células de melanoma humano sólo se detectó una banda activa en los geles de actividad dopa oxidasa, incluso cuando la carga de proteína fue muy elevada, mientras que en los extractos de melanoma de ratón aparecen dos bandas que presumiblemente corresponden a la tirosinasa y la *Tyrp1* murinas.³ La diferencia de los pesos moleculares de *TYRP1* (Figura 16) y *TYR* expresada en células COS7 (Figura 20), deducida de sus Western blots, parece suficiente como para esperar su separación electroforética incluso en las condiciones no reductoras empleadas en los geles de actividad, por lo que una sola banda de actividad en extractos de células de melanoma humano sugiere que *TYRP1* carece también de actividad dopa oxidasa.³⁰ No obstante, no se pueden descartar otras opciones, tales como una mínima actividad residual no detectable en las condiciones de ensayo empleadas o baja estabilidad de la enzima en los extractos solubilizados.

En cualquier caso, los datos disponibles indican que *TYRP1* es menos eficiente desde el punto de vista catalítico que la *Tyrp1* de ratón, de modo que su función en los melanocitos estaría más relacionada con la estabilidad que confiere a *TYR* al interaccionar con ella.³¹ De acuerdo con esta idea y quizás como consecuencia de ello, las células BEU presentaron las menores actividades tirosina hidroxilasa y dopa oxidasa de las otras células de melanoma humano empleadas en este estudio. Sería interesante comprobar el nivel de expresión del gen *TYR* en las tres líneas celulares mediante análisis por Northern blot. En caso de encontrar niveles de mRNA comparables, la idea de que la menor actividad tirosinasa de BEU se correlacione con una menor estabilidad intracelular de la proteína cobraría fuerza. También serían de interés otros experimentos como la determinación de la velocidad de degradación de *TYR* mediante experimentos de pulso y caza, o el posible efecto sobre la misma y sobre la actividad enzimática de la transfección de células BEU con *TYRP1*.

En cuanto a la inhibición por DHICA de la actividad tirosina hidroxilasa de tirosinasa, ésta era esperable en la proteína humana, basándonos en la observación de que DHICA es también sustrato para la enzima y en trabajos previos. Sin embargo, en contra de lo esperado inicialmente, el DHICA también pudo inhibir la actividad tirosina hidroxilasa de la tirosinasa de ratón, a pesar de que esta enzima es incapaz de catalizar su oxidación.⁶ Esto significa que el DHICA se une a la enzima de ratón sin ser oxidado. Así, parece que los determinantes estructurales responsables de la unión de ligandos están más conservados entre las proteínas de ratón y humana que los implicados en la transformación del sustrato. En el centro activo de la tirosinasa destacan los dos centros de unión al cobre (CuA y CuB),^{15,32} que aunque están distantes en la estructura primaria de la proteína, se aproximan en su estructura tridimensional para poder unir el oxígeno molecular cosustrato de la reacción, mediante la interacción entre los dos átomos de la molécula de oxígeno con los dos átomos de cobre.³³

La secuencia de aminoácidos de las enzimas de ratón y humana presenta un alto grado de homología (en torno al 78%) en toda la proteína, y en el CuB es idéntica excepto por un cambio F/Y en posición 369. No obstante, 4 de los 32 aminoácidos del CuA son diferentes en la tirosinasa de ratón y la humana (Figura 22) y podrían jugar un papel importante en la determinación de estas diferencias entre las enzimas.

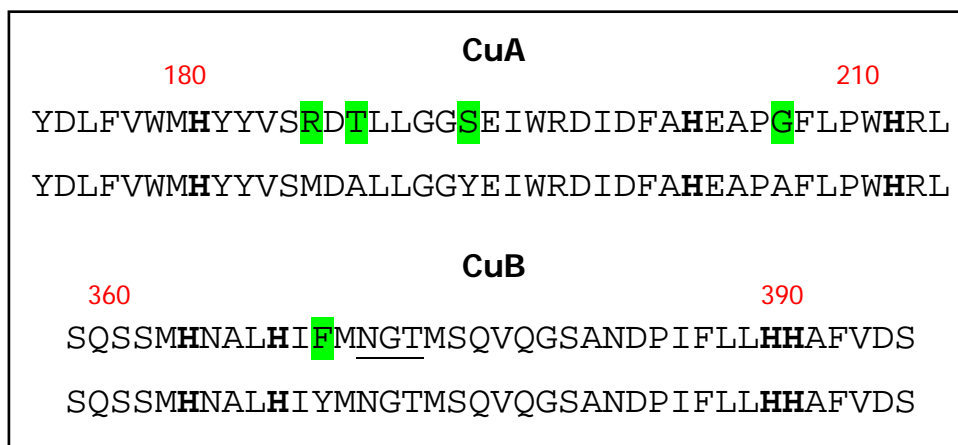


Figura 22. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los centros de unión de cobre, CuA y CuB, de las tirosinasas de ratón (línea superior) y humana (línea inferior), en el entorno de las histidinas fundamentales en cada centro, que se muestran en negrita; el sitio de glicosilación putativo y conservado del CuB está subrayado y las variantes no conservadas de los aminoácidos aparecen sombreadas en verde en la secuencia superior, correspondiente a la enzima de ratón.

Aunque las repercusiones funcionales de estas diferencias de la secuencia primaria no se han podido establecer aún de forma sistemática, a la vista de lo expuesto parece interesante proponer que los determinantes estructurales para el reconocimiento de sustratos, al menos de los σ -difenoles y, por tanto, de la unión del DHICA, podrían estar más localizados en el CuB, altamente conservado entre las especies. Por el contrario, la mayor divergencia del CuA podría estar relacionada con los diversos potenciales catalíticos de las enzimas humana y de ratón. La implicación de cada uno de los centros de unión de metales en los diferentes aspectos de la catálisis por tirosinasa se analizó por mutagénesis dirigida de residuos específicos, según se detalla en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO II

**AMINOÁCIDOS DEL CENTRO ACTIVO IMPLICADOS EN LA UNIÓN DEL
COFACTOR Y DE LOS SUSTRATOS. CICLO CATALÍTICO DE TIROSINASA**

CAPÍTULO II

AMINOÁCIDOS DEL CENTRO ACTIVO IMPLICADOS EN LA UNIÓN DEL COFACTOR Y DE LOS SUSTRATOS. CICLO CATALÍTICO DE TIROSINASA

Para alcanzar una mayor comprensión de los determinantes estructurales de la función enzimática de la familia de tirosinasa en mamíferos, se realizó un estudio por mutagénesis dirigida sobre determinados residuos de tirosinasa de ratón situados en los centros de unión a cobre (Figura 23). Los aminoácidos a mutar se eligieron basándonos en al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Su grado de conservación en un amplio rango de tirosinasas, incluida la humana, con el fin de identificar residuos clave en la catálisis.
- ii) Su substitución por residuos no-conservativos en las Tyrps, ya que estas diferencias, dado del alto grado de homología entre las proteínas de la familia, podrían ser indicativas de divergencias en las capacidades catalíticas.
- iii) En particular, se buscaron funciones muy concretas para residuos de los sitios de unión a metal CuA y CuB, tales como la posibilidad de que alguno de estos aminoácidos fuera un ligando directo del cobre, específico de tirosinasa (CuA), y la identificación directa de las histidinas ligando de cobre (CuB).

| <u>1^{er} sitio de unión a metal (MeA)</u> | |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| TYR | ¹⁸⁰ HYYVSM DALLG-GSEIWRDIDFAHEAPAF L PWH ²¹² |
| Tyr | ¹⁸⁰ HYYVSRD TLLG-G SE IWRDIDFAHEAPGFLPWH ²¹² |
| Tyrp1 | ¹⁹² HYYSVKK TFLGTGQESFGDVDFSHEGPAFLTWH ²²⁵ |
| Tyrp2 | ¹⁹⁰ HYYSVRD TLLGPGRP-YKAIDFSHQGPAFVTWH ²²² |
| <u>2^o sitio de unión a metal (MeB)</u> | |
| TYR | ³⁶³ HNALHIYMNGTMSQVQGSANDP I FLLHH ³⁹⁰ |
| Tyr | ³⁶³ HNALHIFMNGTMSQV Q GSANDP I FLL HH ³⁹⁰ |
| Tyrp1 | ³⁷⁷ HNL A H L F L N G T G G Q T H L S P N D P I F V L L H ⁴⁰⁴ |
| Tyrp2 | ³⁷⁰ HNL A H S F L N G T N A L P H S A A N D P V F V V L H ³⁹⁷ |

Figura 23. Alineamiento de las regiones de unión a metal MeA y MeB de TYR (humana) y Tyr, Tyrp1 y Tyrp2/Dct (de ratón). Los cinco aminoácidos mutados en este capítulo aparecen en negrita.

1. Cuantificación y comparación de los niveles de expresión de las tirosinasas silvestre y mutantes en células transfectadas.

El principal objetivo de este estudio fue analizar el efecto de determinadas mutaciones en la actividad enzimática de tirosinasa. En función de los criterios de selección de los residuos a mutar, era presumible que estas mutaciones condujeran a una pérdida parcial o total de la función catalítica de la proteína, por lo que fue imprescindible definir dos parámetros esenciales para realizar el estudio:

- Establecer un método fiable para poder cuantificar y comparar los niveles de expresión de las formas mutantes.
- Lograr una expresión elevada y reproducible de las proteínas silvestre y mutantes.

Así, la fiabilidad de la cuantificación de los niveles de expresión relativos de las proteínas se comprobó por Western blot. Para ello, diluciones seriadas de extractos de células COS7 transfectadas con *Tyr* se analizaron con el anticuerpo específico de tirosinasa α PEP7. La intensidad de la banda frente a la cantidad de proteína total cargada en el gel era lineal en una escala logarítmica en un rango comprendido entre 1 y 20 μ g, pero a valores mayores de carga proteica, la señal densitométrica se saturaba, como se aprecia de forma evidente para el valor máximo probado, 52 μ g (Figura 24). Así, todos los experimentos se realizaron con una cantidad de proteína total comprendida entre 10 y 20 μ g para normalizar las medidas enzimáticas. En estas condiciones, los niveles más bajos de tirosinasa que se pudieron detectar por Western blot correspondieron a una actividad enzimática tirosina hidroxilasa de aproximadamente 0.36 μ U.

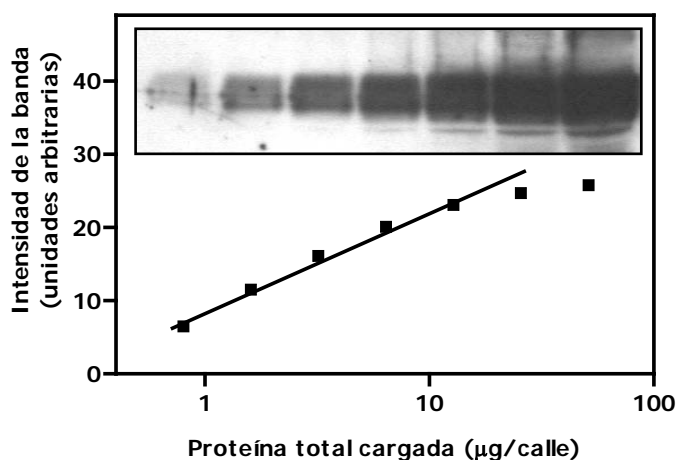


Figura 24. Detección cuantitativa de *Tyr* expresada transitoriamente. Diluciones seriadas de extractos de células COS7 transfectadas con *Tyr* silvestre se analizaron por Western blot, con anticuerpo α PEP7.

Por tanto, en adelante utilizamos este método para lograr una detección sensible de la expresión de tirosinasa y sus mutantes y una comparación precisa de los niveles de expresión de las distintas muestras, necesaria para normalizar las medidas de actividad enzimática. Como controles adicionales, no se detectaron las actividades DHICA oxidasa y dopacromo tautomerasa en las células transfectadas. Además, como era de esperar, tampoco se registró actividad TH o DO en las células transfectadas con $\Delta 3 Tyr$, que carece de la región CuB.

A continuación, analizamos con esta misma técnica si la expresión de diferentes construcciones era comparable, así como la posible existencia de alteraciones relevantes en la estructura o el tamaño de las proteínas mutantes. La eficacia de expresión de la proteína silvestre y de los mutantes, tanto los del sitio CuA como los del CuB, fue comparable, y sus movilidades electroforéticas fueron indistinguibles (Figura 25), por lo que cualquier cambio observado en la actividad de las tirosinasas mutantes estaría relacionado con la función catalítica de los residuos mutados y no con artefactos debidos a alteraciones en el plegamiento o procesamiento de las proteínas.³⁴

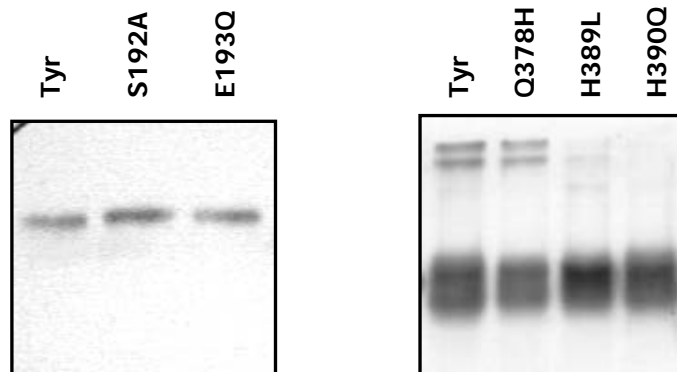


Figura 25. Comparación de los niveles de expresión de Tyr y de los mutantes S192A y E193Q (izquierda) y Q378H, H389L y H390Q (derecha). En cada experimento se cargó la misma cantidad de proteína para SDS-PAGE (10 μ g en el de las mutaciones en el sitio CuA y 25 μ g en el de las mutaciones en CuB) y tras la transferencia a membranas de PVDF se hizo un Western blot con el anticuerpo α PEP7. En cinco experimentos independientes se detectaron variaciones menores del 30%.

Las actividades enzimáticas, tanto TH como DO, de los extractos de células COS7 transfectadas con *Tyr* fueron mucho mayores que los detectados en las células de melanoma de ratón B16 (Tabla 7). Otros experimentos preliminares demostraron que la eficacia de transfección permanecía aproximadamente constante al emplear una relación constante de cantidad de DNA frente a número de células, y que los niveles de expresión

de Tyr fueron similares con COS7 y con HEK 293T como células huésped, tanto en términos de actividad enzimática como de movilidad electroforética de las proteínas expresadas, por lo que todos los experimentos de este capítulo se realizaron en células COS7 de forma habitual. Los niveles de expresión elevados y reproducibles permitieron la detección y determinación de actividad enzimática en las formas mutantes con capacidad catalítica inferior a la de la enzima silvestre (que en adelante denominaremos wt, del inglés *wild type*), por lo que no fue necesario cotransfectar con calnexina para mejorar el procesamiento de tirosinasa, tal y como apuntan otros autores.^{34,35}

| | TH ($\mu\text{U}/\text{mg}$) | DO (mU/mg) | $10^3 \cdot \text{TH}/\text{DO}$ |
|---------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| B16 | 136.0 \pm 16.0 | 8.1 \pm 2.6 | 16.8 |
| Tyr wt | 711.3 \pm 163.5 (100%) | 29.9 \pm 6.5 (100%) | 23.2 |
| S192A | 649.6 \pm 97.6 (93%) | 27.5 \pm 4.3 (92%) | 23.6 |
| E193Q | 687.4 \pm 85.4 (98%) | 28.2 \pm 4.9 (94%) | 24.4 |
| Q378H | 121.2 \pm 26.7 (17%) | 2.7 \pm 0.7 (9%) | 44.9 |
| H389L | 129.0 \pm 25.5 (18%) | 5.7 \pm 1.4 (19%) | 22.6 |
| H390Q | 0.0 (0%) | 0.0 (0%) | --- |

Tabla 7. Actividad enzimática residual de los mutantes transfectados en COS7, frente a Tyr wt y a las células de melanoma de ratón B16. En todos los casos, los datos presentados corresponden a la media \pm desviación estándar, con $n \geq 4$. En estos ensayos, las actividades enzimáticas registradas fueron inferiores a las descritas en el Capítulo anterior por la diferencia entre las eficacias de transfección de los dos reactivos empleados.

2. Las mutaciones Q378H, H389L y H390Q del sitio CuB tienen mayor impacto en la actividad de tirosinasa que las mutaciones S192A y E193Q del sitio CuA.

La Tabla 7 recoge una comparación entre las actividades específicas de las Tyr mutantes normalizadas por proteína, cuantificada por Western Blot. Las dos mutaciones del sitio CuA, S192A y E193Q, fueron sustituciones isostéricas para detectar una posible participación de residuos de la proteína como ligandos endógenos que puedan puentear los dos cobres del centro activo binuclear. La existencia de este ligando endógeno oxigenado fue postulada por otros autores basándose en estudios espectroscópicos de los centros activos de hemocianina y tirosinasa.^{13,36} Este puente putativo proporcionaría un acoplamiento antiferromagnético entre ambos iones, que conduciría a la desaparición de señal EPR.³⁷ De acuerdo con el modelo de hemocianina,³⁸ este ligando debería ser la cadena lateral de un residuo ubicado en la región comprendida entre las dos hélices a las que pertenecen las H del CuA. El alineamiento de todas las secuencias de tirosinasa

disponibles apuntaba a un candidato hidroxilado, S192 en el ratón, un aminoácido muy expuesto, ya que sigue a un motivo GG. Esta posición presenta un polimorfismo conservativo en humanos, S192Y,³⁹ y tanto S como Y poseen un –OH que podría actuar como puente entre los átomos de cobre. Además, el residuo E193 cambia a Q en Tyrp1 y a R en Tyrp2/Dct (Figura 23), y la mutación en esa arginina en Tyrp2/Dct disminuye en gran medida su actividad y es responsable del fenotipo *slaty*.^{40,41} Teniendo en cuenta que el cofactor de Tyr es cobre y el de Tyrp2/Dct es zinc, donde no existe puente endógeno,⁴² decidimos asimismo estudiar el posible papel de este residuo. Sin embargo, ninguno de estos mutantes (S192A y E193Q) mostró diferencias significativas en su capacidad catalítica, comparados con la proteína silvestre. Por tanto, el estudio de mutaciones en el sitio CuA de unión a cobre apuntó a que la existencia de un residuo que una los dos cobres del centro activo de tirosinasa es muy improbable. Recientemente se ha llegado a esta misma conclusión para la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus*,⁴³ reforzando la idea de que la no-existencia de un puente endógeno entre los dos cobres es una característica común a todas las tirosinasas.

Por otro lado, las tres mutaciones del sitio CuB provocaron importantes cambios en la actividad de las proteínas resultantes. Los mutantes Q378H y H389L conservaron niveles de actividad bajos pero significativos, tanto en la actividad TH como en DO (10-20%), suficientemente altos para permitir el análisis de varios aspectos cinéticos. Sin embargo, el mutante H390Q carecía por completo de actividad enzimática de ningún tipo, y ninguno de los tres mutantes mostró actividad dopacromo tautomerasa. Cabe destacar que la forma Q378H presentó una relación TH/DO que fue casi el doble de la presentada por la enzima silvestre y el resto de las mutantes.

La actividad residual de los mutantes Q378H y H389L apoya la suposición de que son todavía capaces de unir cobre en sus respectivos centros activos, y apuntan a que uno de los ligandos del cobre en el sitio CuB es la H390. Así, la segunda H del par HH del final del motivo conservado en el CuB de tirosinasa es muy probablemente el tercer ligando del CuB en las tirosinasas de mamíferos, al igual que lo es en las tirosinasas de bacterias y hongos.^{13,44} Nótese que las dos primeras mutaciones descritas acercan la secuencia del sitio CuB de Tyr a las de las Tyrps, de modo que la observación de que H389L, pero no H390Q, es catalíticamente activa, es consistente con que también en el centro activo de las Tyrps haya unión a metal, a pesar del par LH del final de la secuencia consenso del sitio CuB de Tyrps.

3. Cambios en la actividad de Tyr debidos a mutaciones en CuB no están relacionados con una alteración significativa de la estructura de la proteína.

A continuación analizamos si la disminución en la actividad específica de los mutantes Q378H y H389L se debía a efectos no relacionados directamente con la actividad catalítica, tales como disminución de la estabilidad de la proteína o una alteración de su plegamiento. Éstas y otras posibilidades se analizaron mediante:

- Estudio de la resistencia a agentes caotrópicos mediante medida de actividad dopa oxidasa por tinción de geles de SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras.
- Análisis de la estabilidad térmica y susceptibilidad a digestión proteolítica.
- Inhibición enzimática operada por compuestos quelantes del cofactor metálico del centro activo.
- Análisis del patrón de glicosilación mediante digestión con endoglicosidasas: las glicoproteínas inmaduras anormalmente plegadas que no progresan del RE al Golgi son sensibles a digestión con endoglicosidasa H (Endo H), mientras que las enzimas correctamente plegadas adquieren resistencia a la glicosidasa. Por otro lado, la digestión con N-glicosidasa F (PGNasa F) permite comprobar el tamaño de la cadena polipeptídica, ya que hidroliza todos los glicanos del mismo.

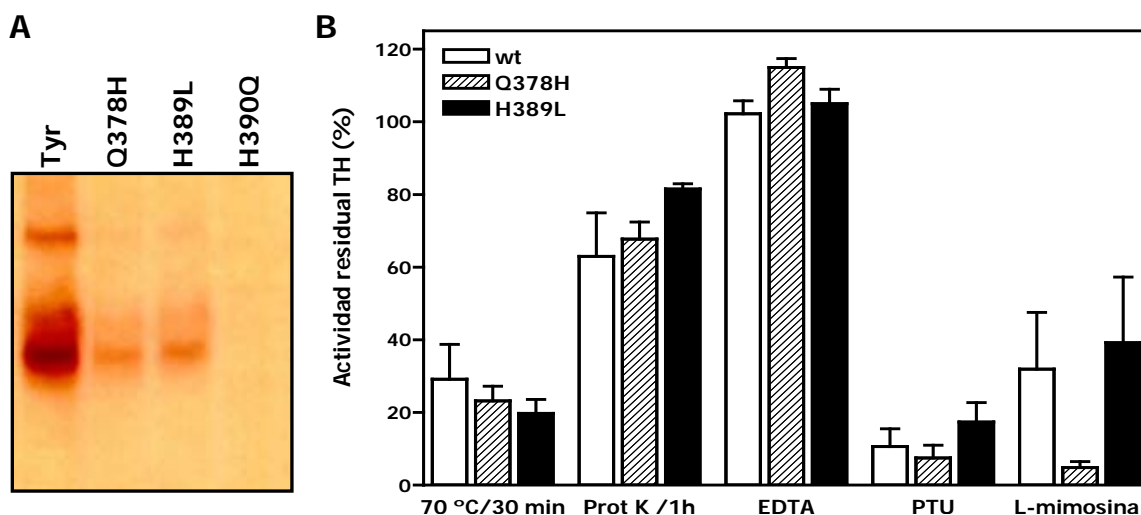


Figura 26. (A) Tinción de actividad DO en gel de las formas wt y mutantes de tirosinasa indicadas. Todas las calles se cargaron con igual cantidad de proteína para correlacionar intensidad relativa de las bandas con actividad enzimática residual de los mutantes. La forma H390Q no poseía actividad enzimática, mientras que las otras presentaron una movilidad electroforética parecida. **(B)** Resistencia de Tyr (wt) y los mutantes Q378H y H389L a inactivación térmica (70°C, 30 min), digestión con proteinasa K (1 mg/ml, 1 h) y tratamientos con EDTA (2 mM, 3 h) y los inhibidores de tirosinasa PTU (0.5 mM) y L-mimosina (0.5 mM). Los resultados son la media \pm desviación de dos medidas independientes.

La actividad DO residual de los mutantes Q378H y H389L, determinada mediante SDS-PAGE seguida de tinción específica de geles,⁸ estuvo dentro del rango de la obtenida por el método espectrofotométrico habitual (10-20% de la enzima silvestre), evidenciando que los dos son resistentes a SDS en la misma medida que la silvestre (Figura 26A). Como era de esperar, la forma H390Q resultó también inactiva en este ensayo. Las especies H389L y Q378H conservaron niveles de actividad enzimática residual semejantes a los de la proteína silvestre después de choques térmicos y tratamientos con proteinasa K, lo que hace pensar en la existencia de un plegamiento compacto de la proteína. Por otro lado, tanto la enzima silvestre como el mutante H389L presentaron una resistencia semejante a concentraciones de EDTA, un quelante de cobre, de hasta 2 mM (Figura 26B), lo que indica que ambas proteínas presentan una afinidad semejante por el cobre, confirmando una vez más que H390 es la candidata a ligando del cobre del par ³⁸⁹HH³⁹⁰. Asimismo, las actividades residuales de las enzimas wt y H389L tras la incubación con feniltiourea (PTU) y L-mimosina, inhibidores específicos de tirosinasa, también son comparables y corroboran la suposición de una estructura y accesibilidad del centro activo similares para las dos.

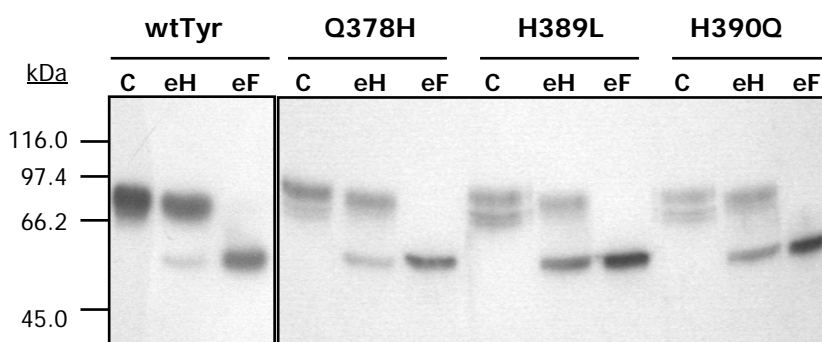


Figura 27. Patrón de glicosilación de Tyr wt y los mutantes estudiados, mediante análisis por Western blot de extractos control (calles C) y tratados con Endo H (eH) o PNGasa F (eF).

Por último, el tratamiento con Endo H de los tres mutantes del sitio CuB (Q378H, H389L y H390Q) demuestra que la proteína nativa es mayoritariamente una forma resistente a la digestión con Endo H, correctamente glicosilada y plegada, por lo que la disminución en la capacidad catalítica de las que presentan actividad residual no puede achacarse a problemas de procesamiento (Figura 27). En conjunto, estos resultados sugieren que las conformaciones de la proteína silvestre y las formas mutantes son muy similares, lo que coincide con otros datos que establecen que, en general, las mutaciones que afectan al plegamiento de tirosinasa conducen a formas que se retienen en el RE y son degradadas.³⁴ Así, la disminución de los valores de actividad específica de los

mutantes respecto al wt está directamente relacionada con una alteración del potencial catalítico de estas proteínas, no con fallos en su plegamiento y tráfico intracelular.

4. Parámetros cinéticos y estereoespecificidad de las tirosinasas wt y mutantes.

Con el fin de comprender las bases estructurales de la menor actividad específica de los mutantes de tirosinasa en el CuB, se analizaron los parámetros cinéticos (K_M , V_{max} y eficacia catalítica (relación V_{max}/K_M)) de estas enzimas para L-tirosina y diversos sustratos σ -difenólicos (Tabla 8).

En cuanto a los σ -difenoles, la afinidad de la tirosinasa silvestre por su sustrato disminuye alrededor de cuatro veces cuando éste está decarboxilado (dopamina), lo que corroboraría el papel del grupo carboxilo en el reconocimiento del sustrato. Cuando se conserva este grupo carboxilo pero con conformación estereoespacial diferente, la afinidad disminuye aún más como refleja la comparación entre las K_M para D-dopa y L-dopa (unas 10 veces mayor para D-dopa). Sin embargo, la esterificación del grupo carboxilo (L-dopametiléster) sólo ejerce un pequeño efecto en la pérdida de afinidad por el sustrato, lo que excluiría la posibilidad de interacciones electrostáticas entre la enzima y el sustrato a través del grupo carboxilato del σ -difenol. Las eficacias catalíticas para los diferentes sustratos difenólicos se correlacionan bien con las afinidades por los mismos, siendo la menor la de D-dopa.

| Sustrato | Tyr | | | H389L | | | Q378H | | |
|-------------------|-------|-----------|---------------|-------|-----------|---------------|-----------------|-----------|---------------|
| | K_M | V_{max} | V_{max}/K_M | K_M | V_{max} | V_{max}/K_M | K_M | V_{max} | V_{max}/K_M |
| L-dopa | 0.46 | 38.8 | 84.3 | 1.83 | 38.9 | 21.2 | 22.2 | 32.7 | 1.5 |
| Dopamina | 1.46 | 23.4 | 14.3 | 2.01 | 36.4 | 18.1 | nd ^c | nd | nd |
| D-dopa | 4.57 | 41.3 | 9.1 | 2.41 | 31.5 | 13.1 | nd | nd | nd |
| L-dopa metiléster | 0.58 | 44.6 | 76.9 | 2.26 | 41.6 | 18.4 | nd | nd | nd |
| L-tirosina | 0.079 | 0.90 | 11.4 | 0.106 | 0.88 | 8.3 | 0.076 | 1.47 | 19.3 |

Tabla 8. K_M (mM), V_{max} (mU/mg) y eficacia catalítica (relación V_{max}/K_M) de las tirosinasas silvestre y mutantes (H389L y Q378H) para cuatro σ -difenoles^a y L-tirosina^b. ^aDO: media de dos determinaciones; ^bTH: media de tres determinaciones; ^cnd: no determinado.

Las diferencias entre los parámetros cinéticos de los cuatro *o*-difenoles fueron mucho menores para el mutante H389L. La sustitución de la histidina H389 por una leucina hidrofóbica, tal y como presentan las Tyrps, disminuyó la afinidad de la enzima por L-dopa, pero la aumentó para D-dopa en comparación con la proteína wt. Esto confirma que H389 está implicada en la interacción estereoespecífica de la enzima con el grupo carboxilo del sustrato más que en la unión a cobre. Por otro lado, el mutante Q378H mostró una afinidad por L-dopa muy baja (unas 50 veces menor que la de la enzima wt), lo que puede explicarse porque la presencia del grupo imidazol en esa posición suponga un serio impedimento estérico para la unión de L-dopa al centro activo. Las K_M para el resto de *o*-difenoles no se pudieron calcular de forma precisa debido a que las velocidades de reacción eran demasiado bajas para el ensayo, sobre todo a las concentraciones de sustrato menores.

El comportamiento de la mutación H389L observado en el reconocimiento estereoespecífico del *o*-difenoel (L-dopa) nos condujo a estudiar su efecto en la actividad TH. La primera diferencia respecto a los datos obtenidos para la actividad DO fue que las K_M para L-tirosina de las enzimas wt y H389L fueron muy similares. Así, este efecto diferencial de la mutación en la afinidad de la enzima por sus sustratos (para L-dopa pero no para L-tirosina) conduce a la hipótesis de que los residuos localizados en el sitio CuB están más directamente relacionados con la actividad DO que con la TH.

También estudiamos el comportamiento cinético respecto al derivado descarboxilado de tirosina (tiramina) y a D-tirosina. Desde el punto de vista experimental, los sustratos monofenólicos presentaron dificultades adicionales, comparados con los *o*-difenoles. Como la actividad TH presenta un número de recambio menor que DO,^{45,46} la velocidad de la reacción debe medirse empleando un ensayo radiométrico con L-[3,5-³H]-tirosina como sustrato,^{47,48} pero no existen D-tirosina o tiramina comerciales marcadas radiactivamente. Así, estudiamos la hidroxilación de D-tirosina y tiramina por un método indirecto, basado en que si estos compuestos son reconocidos por la enzima, se comportarán como inhibidores competitivos de la liberación de agua tritiada a partir de la L-[3,5-³H]-tirosina disponible en el medio. Ambos sustratos, D-tirosina y tiramina, no fueron buenos inhibidores de la actividad TH de la tirosinasa wt. La D-tirosina, a una concentración de 0.2 mM, no fue capaz de inhibir la hidroxilación de L-tirosina en las condiciones estándar del ensayo, y sólo se detectó una ligera inhibición de la velocidad de catálisis a concentraciones 20 veces superiores (1 mM) a las de L-tirosina (Figura 28A). Por tanto, tirosinasa wt también presenta estereoespecificidad hacia L-tirosina, tal y como

ya se había publicado para la tirosinasa de champiñón.⁴⁹ La inhibición por tiramina fue mayor. El orden de afinidad de la enzima por los monofenoles ensayados por este procedimiento indirecto fue, por tanto, forma L>forma descarboxilada>forma D, igual que para los *o*-difenoles.

Inesperadamente, el mutante H389L presentó el mismo comportamiento en cuanto a su actividad TH con distintos sustratos que el wt. Las dos enzimas mostraron una estereoespecificidad por los monofenoles (Figura 28B), apuntando a dos aspectos relevantes de la catálisis:

i) Las actividades monofenol hidroxilasa y difenol oxidasa de tirosinasa presentan diferentes requerimientos estructurales. Así, el mutante H378Q mostró un aumento significativo en la eficacia catalítica por L-tirosina (Tabla 8), por lo que fue más efectivo para la TH que la especie wt, en base al parámetro de eficacia catalítica $V_{m\acute{a}x}/K_M$.

ii) En segundo lugar, H389 participa en la unión del *o*-difenoal al centro dicúprico. La estereoespecificidad de tirosinasa por los monofenoles debe residir en residuos diferentes, aún por identificar.

Por último, también se estudió la eficacia de D-dopa como cofactor de la actividad TH, ya que se ha postulado que D-dopa podría sustituir a L-dopa como cofactor sin competir en la reacción DO.¹² Esto sugiere que el comportamiento de L-dopa como cofactor de TH o sustrato de DO sería distinto. Así, comparamos los resultados obtenidos empleando ambos compuestos como cofactor en una proporción 1:1 respecto tirosina (50 μ M) y encontramos que D-dopa fue menos eficiente que L-dopa para la enzima silvestre, pero no para el mutante H389L (Figura 28C). De este modo, la pérdida de estereoespecificidad del mutante H389L está relacionada con la actividad DO y la unión de dopa como cofactor, pero no con la reacción TH.

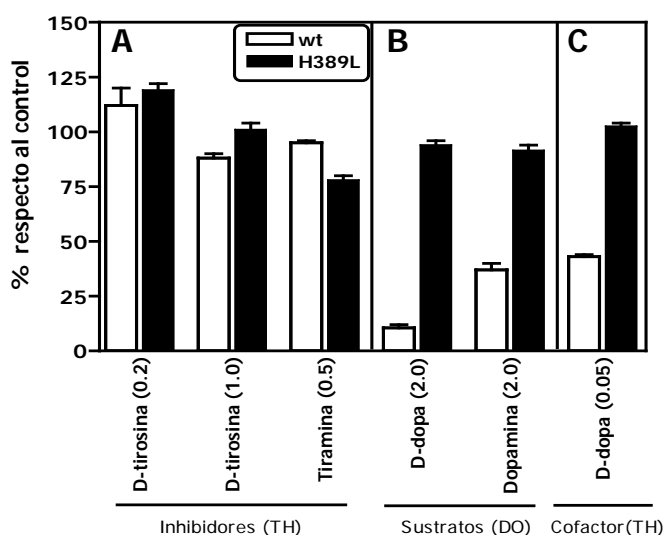


Figura 28. Estereoespecificidad de las tirosinasas wt y H389L para diferentes sustratos. Se representan los porcentajes de actividad enzimática frente al control, realizado en las condiciones estándar. **(A)** Adición de D-tirosina (0.2 y 1 mM) y tiramina (0.5 mM) al ensayo estándar de TH con L-tirosina radioactiva; **(B)** Sustitución del sustrato L-dopa (control) por D-dopa y dopamina (2 mM) en el ensayo estándar de DO. **(C)** Sustitución del cofactor L-dopa (control) por D-dopa en el ensayo estándar de TH, con L-tirosina y L- o D-dopa 50 μ M.

5. Discusión y conclusiones.

En este capítulo hemos analizado el efecto de determinadas mutaciones en la actividad enzimática de tirosinasa con el fin de alcanzar una mayor comprensión de los determinantes estructurales de la función enzimática de las proteínas de esta familia, al menos en mamíferos. Las principales conclusiones obtenidas son las siguientes:

1. Dentro del par $^{389}\text{HH}^{390}$, situado al final del segundo centro de unión a cobre de tirosinasa (CuB), H390, y no H389, constituye el auténtico tercer ligando de unión al metal en las tirosinasas de mamíferos.
2. H389 participa en la interacción estereoespecífica con el grupo carboxilo del sustrato *o*-difenólico en el ciclo dopa oxidasa, pero parece no ser capaz de interaccionar con monofenoles *o*, al menos, de distinguir entre los isómeros L y D.
3. Las dos regiones de unión a cobre son estéricamente distintas, y la unión de mono- y difenoles al centro activo es, por tanto, diferencial. De acuerdo con lo propuesto recientemente por otros autores, parece que no existe un residuo endógeno puenteando el par de iones cobre.⁴³

La primera de las conclusiones de este trabajo establece que la segunda H del par HH del final del motivo conservado en el CuB de tirosinasa es el tercer ligando del CuB en las tirosinasas de mamíferos, al igual que lo es en las tirosinasas de bacterias y hongos.^{13,44} Sin embargo, este resultado y su interpretación contrastan con los datos existentes sobre unión directa de ^{67}Cu a tirosinasas silvestre y mutantes humanas.⁵⁰ En dicho trabajo, las dos especies mutantes, H389A y H390A, fueron enzimáticamente inactivas, aunque H390A fue capaz de unir el doble de ^{67}Cu que la TYR silvestre. Esta discrepancia puede explicarse desde al menos tres puntos de vista:

- a) En primer lugar, es posible que la distinta naturaleza de las células empleadas en los dos estudios (HeLa⁵⁰ frente a COS7) sea la causa de estas diferencias, puesto que el conjunto de chaperonas de ambas líneas celulares probablemente sea distinto. Así, se ha descrito que las células HeLa suponen un sistema más bien ineficiente en el procesamiento de TYR y su transporte del RE al Golgi.⁵¹ En este trabajo se han realizado los controles pertinentes para establecer que el plegamiento y procesamiento de las formas mutantes es correcto y muy similar al de la forma salvaje, mientras que en los trabajos citados no se han presentado controles de este tipo.

- b) En segundo lugar, también sería interesante considerar las diferencias en la naturaleza y la estabilidad de las enzimas de ratón y humana. Como hemos visto en el capítulo anterior, la enzima humana, pero no la de ratón, muestra actividad DHICA oxidasa, lo que demuestra que pequeños cambios en los centros activos de las enzimas de ambas especies tienen gran repercusión en la función de la proteína. Además, durante nuestros ensayos las actividades de extractos de tirosinasa de células transfectadas mostraron alta inestabilidad, que podría deberse a la ausencia de Tyrp1 en células no-melanocíticas. Esta proteína tiene un importante efecto estabilizador sobre tirosinasa,²⁹ por lo que su ausencia podría repercutir en la actividad de tirosinasa, de modo que resultara inferior al límite de detección cuando la eficacia del sistema de expresión fuera menor que la descrita en este trabajo.
- c) Por último, los ensayos de unión a cobre deben ser interpretados con cierta cautela, ya que puede haber proteínas que sean inactivas por estar mal plegadas pero que a pesar de esto sigan siendo capaces de unir cobre. Este artefacto en la unión del metal podría producirse por medio de residuos que están fuera del centro activo pero que en una conformación tridimensional anómala se dispongan de forma que puedan quelatar el metal, lo que conduciría a cantidades de metal unido mayores en los mutantes que en las proteínas silvestres. Así, Tsai *et al.*⁵² también obtuvieron datos de difícil interpretación acerca de la unión a cobre en tirosinasas mutantes de *Streptomyces*, donde cada uno de los 6 residuos de H de los sitios CuA y CuB fueron sustituidos por Q. Los tres mutantes del CuA y uno del CuB eran incapaces de unir cobre y su actividad enzimática quedaba anulada, pero los otros dos mutantes en el CuB (incluyendo el homólogo a la mutación H390 humana y de ratón) sí eran capaces de unir metal.

Por otro lado, como ya se ha comentado anteriormente, la tirosinasa contiene un par de iones de cobre acoplados antiferromagnéticamente en el centro activo de la enzima sin sustrato (*met*-Tyr).^{13,53} Aunque no hay datos cristalográficos de tirosinasas de mamíferos, numerosas pruebas indirectas apuntan a que el centro activo consiste en un bolsillo hidrofóbico cercano a la superficie, delimitado por cuatro hélices α en el que se encuentran los átomos de cobre quelatados por las seis His altamente conservadas de las regiones CuA y CuB, de forma muy semejante al centro activo de la catecol oxidasa de la batata, que sí se ha cristalizado (Figura 29).⁵⁴

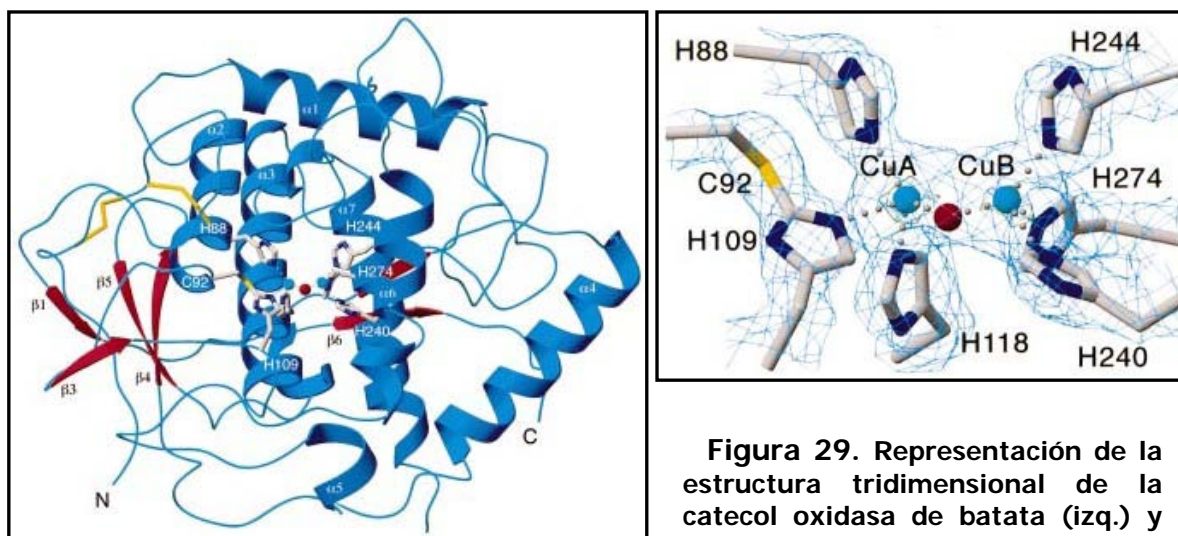


Figura 29. Representación de la estructura tridimensional de la catecol oxidasa de batata (izq.) y del centro activo (dcha). Esta figura

se ha incluido en la memoria con el fin de facilitar la comprensión de la descripción del centro activo de tirosinasa, ya que se asume que es muy similar al de la mencionada catecol oxidasa, dada la elevada homología de estas regiones. A la izquierda se puede apreciar el bolsillo hidrofóbico delimitado por cuatro hélices α , y a la derecha se representa un detalle del centro activo, con los cobres, las His ligandos y un puente procedente del disolvente entre los dos átomos metálicos (numeración de los aminoácidos de la catecol oxidasa de batata, 1BT1-3 de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>)).

Trabajos recientes sugieren que, aunque la tirosinasa tenga un único centro de unión para L-tirosina y L-dopa, la diferencia entre la catálisis de las reacciones que tienen lugar sobre cada sustrato podría estribar en los elementos estructurales responsables de la unión a sustratos mono- y difenólicos.⁵⁵ De hecho, en la especie *met*-o estado libre de la enzima, los dos átomos de cobre se encuentran pentacoordinados adoptando una geometría de pirámide cuadrangular distorsionada en la que la disposición de la unión con el ligando apical es aproximadamente perpendicular a este plano, lo que podría afectar a la accesibilidad de los sustratos mono- y difenólicos al centro activo. Hasta el momento no se han caracterizado de forma adecuada los determinantes estructurales de la unión a metales distintos ni de la existencia de actividades enzimáticas diferentes entre tirosinasa y las Tyrps, así como los residuos involucrados en una interacción diferencial con mono- y difenoles.

Estos resultados permiten proponer un mecanismo de reacción para tirosinasa (Figura 30) que incluye algunas modificaciones respecto a modelos anteriores,^{13,56} según los cuales la forma enzimática más abundante es *oxy*-Tyr y los sustratos, L-tirosina y L-dopa, inician los ciclos de la tirosina hidroxilasa y la dopa oxidasa, respectivamente, a partir de ésta. Lo más probable es que ambos fenoles se unan al centro catalítico con una

orientación axial, pero L-tirosina se une al sitio CuA de forma preferente, mientras que L-dopa se uniría al sitio CuB. Hay varios hechos que apoyan esta hipótesis:

i) Como se ha expuesto anteriormente, la mutación H389L en el sitio CuB de la tirosinasa de ratón anula la estereoespecificidad para L-dopa, pero no afecta al reconocimiento de L-tirosina.

ii) El cambio A206T en el CuA de la tirosinasa humana incrementa la actividad tirosina hidroxilasa de la enzima al 200% a la temperatura a la que se produce un correcto procesamiento de la proteína, pero no afecta a la actividad dopa oxidasa.⁵⁵

iii) La preferencia de especificidad de la tirosinasa de champiñón para la serie de monofenoles es distinta que para la de difenoles.⁵⁷

iv) Los datos cristalográficos disponibles para la catecol oxidasa de batata indican que el centro activo de esta enzima presenta un residuo aromático (F261) que bloquea el acceso al centro CuA.⁵⁴ Además, todas las catecol oxidasas de plantas secuenciadas hasta el momento presentan este aminoácido aromático en la posición equivalente impidiendo el paso a los sustratos hacia el CuA, y no presentan actividad tirosina hidroxilasa. Por el contrario, las tirosinasas animales y fúngicas no tienen este residuo y sí poseen actividad tirosina hidroxilasa.

En el ciclo de tirosina hidroxilasa (TH) el monofenol debilitaría la unión del oxígeno al centro activo al aproximarse lateralmente al centro activo.³⁷ La molécula resultante, polarizada, sería entonces capaz de *orto*-hidroxilar el monofenol para dar el *o*-difeno, que sufriría una pseudorrotación de Berry para adoptar una posición ecuatorial.⁵⁸ A continuación tendría lugar la oxidación del *o*-difeno y la *o*-quinona abandonaría el sitio dicuproso reducido, permitiendo la entrada de una nueva molécula de oxígeno para recuperar la conformación inicial.⁵⁶

En el ciclo dopa oxidasa (DO), el *o*-difeno unido al centro CuB también debilita la unión del oxígeno, produciéndose la oxidación del sustrato orgánico y la liberación de L-DQ. La enzima quedaría en un estado dicúprico, *met*-Tyr. Esta forma puede entonces unir L-tirosina o L-dopa con mayor afinidad que la forma *oxy*-Tyr, ya que el centro activo no está ocupado por el oxígeno, y todos los sustratos e inhibidores aromáticos tales como la mimosina y la feniltiourea compiten con el oxígeno por el mismo centro activo.⁵⁴

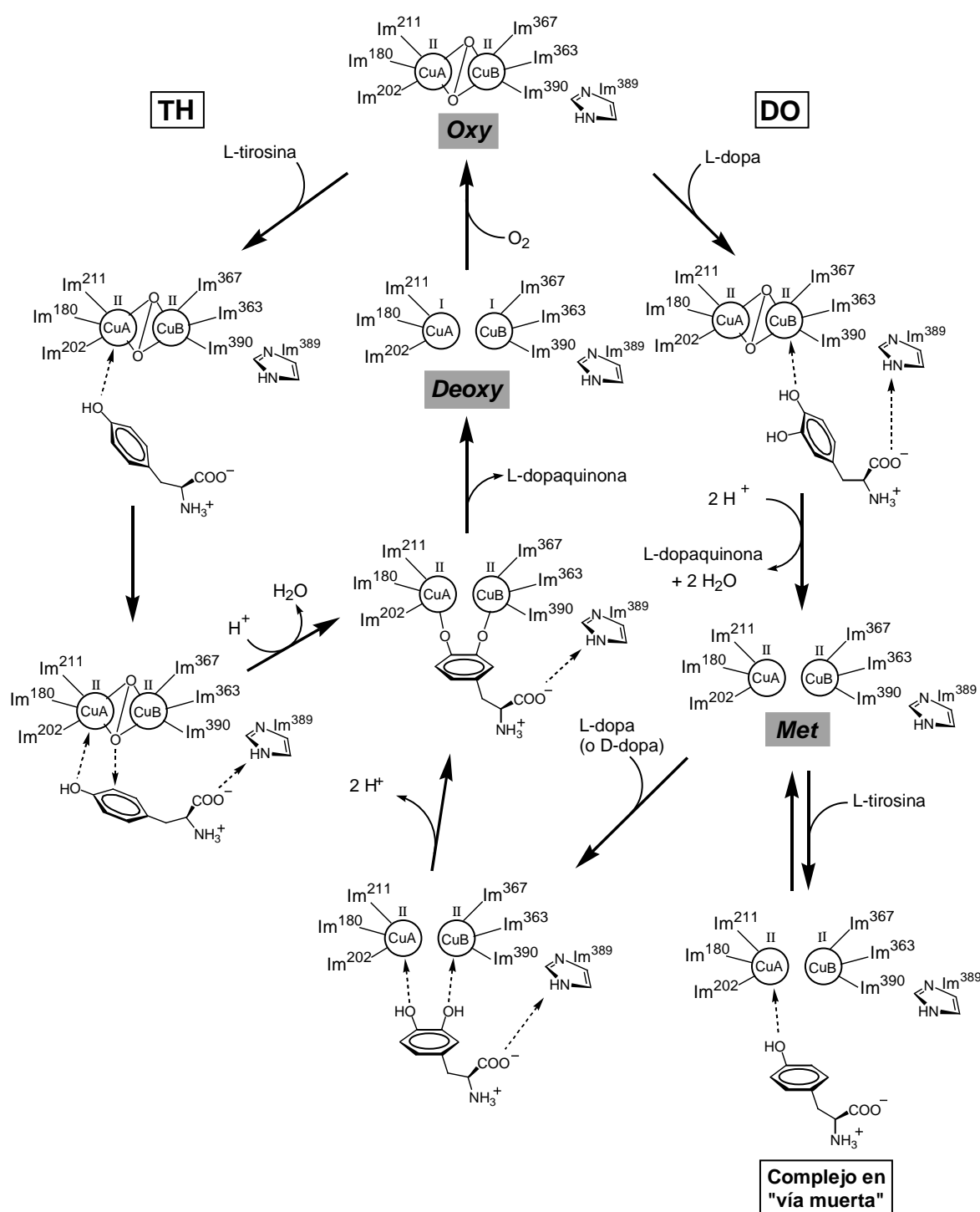


Figura 30. Representación de los ciclos catalíticos propuestos para las actividades TH y DO de tirosinasa. La enzima presenta dos formas (*oxy*- y *met*-Tyr) con distintas afinidades y requerimientos estructurales para ambos sustratos. La tirosina actúa como sustrato para la forma *oxy*-Tyr, y también como inhibidor de la catálisis al unirse a *met*-Tyr y formar el complejo en "vía muerta", incapaz de progresar en la reacción. El L-dopa actúa como sustrato al unirse a la forma *oxy*-Tyr y como cofactor para la forma *met*-. H389 es esencial para el reconocimiento de L-dopa y orientación hacia el CuB, pero no participa en la unión de la L-tirosina al CuA.

La unión de L-dopa a la forma *met*-Tyr se realiza a través de los dos hidroxilos y con más afinidad que cuando la unión se realiza sólo a través del CuB (forma *oxy*-Tyr). Esto supondría una explicación a que la constante de afinidad K_a medida para el L-dopa actuando como cofactor de la actividad TH esté en el rango de μM ,⁴⁶ dos órdenes de magnitud por encima de la afinidad de la enzima por los *o*-difenoles como sustratos (representada por la K_M). La diferencia de afinidad de las formas enzimáticas *met*- y *oxy*- por el sustrato *o*-difenólico también se refleja, como hemos expuesto anteriormente, en que el D-dopa es un cofactor relativamente bueno, pero un sustrato muy malo.¹² La unión de ambos hidroxilos a los iones cobre facilita la transferencia de dos electrones del *o*-difenol al sitio binuclear, dando lugar a la quinona y a la forma reducida *deoxy*-, que se reoxida con la unión de una molécula de oxígeno.

La unión de L-tirosina a la forma *met*-Tyr conduciría al complejo en "vía muerta" (*dead-end complex*). Como este enlace puede producirse, al menos en teoría, por cualquiera de los dos cobres, aunque con distintas afinidades, podría tener lugar la unión axial de dos L-tirosinas al centro activo, lo que bloquearía la progresión del ciclo catalítico. Esto proporciona una explicación plausible para la inhibición de tirosinasa causada por un exceso de sustrato,^{48,59} aunque para confirmarlo es necesario aclarar qué orientación de los anillos aromáticos es compatible con la unión a los cobres de los hidroxilos, de forma que sea estéricamente posible la entrada de dos moléculas de L-tirosina al centro activo en la forma *met*-.

La competición de L-tirosina y L-dopa por esta forma enzimática también explicaría el período de retardo o "lag" característico de la actividad tirosina hidroxilasa en ausencia de cofactor.^{45,60,61} L-dopa se genera *in situ* como consecuencia de la reacción entre L-DQ y L-ciclodopa durante la ruta melanogénica,⁶² de modo que la relación L-dopa/L-tirosina va creciendo de forma continua conforme progresa la reacción, lo que conlleva una disminución de la fracción de enzima capturada en el complejo en "vía muerta", ya que esta conformación es reversible. Por tanto, la proporción de moléculas de tirosinasa que no podían participar en la catálisis es cada vez menor y se produce un aumento de la velocidad de la reacción tirosina hidroxilasa.

En resumen, el mecanismo que muestra la Figura 30 recoge la mayoría de las observaciones cinéticas descritas hasta el momento y resuelve algunas discrepancias de mecanismos anteriores.^{13,56,57} Además, identifica algunas de las diferencias físicas responsables de los distintos requerimientos para las actividades TH y DO, que se habían descrito con anterioridad.^{47,55} En este mecanismo se propone que los monofenoles se unirían al sitio CuA del centro activo de la tirosinasa, mientras que los *o*-difenoles lo harían al sitio CuB. La inequivalencia de los dos centros de unión a cobre ya había sido descrita, basándose en datos obtenidos por espectroscopía XANES (*X-ray absorption near edge structure*).⁶³ De este modo, esta distinta unión espacial de mono- y *o*-difenoles al centro activo de tirosinasa podría ser un determinante esencial en el curso del ciclo catalítico, ya que la presencia de dos grupos hidroxilos en el *o*-difenol orientaría su unión al CuB, si bien aún quedaría por determinar qué residuos son los implicados en esta orientación. Por otro lado, la ausencia del segundo grupo hidroxilo en los sustratos monofenólicos permitiría la interacción con CuA. En este caso, la fuerza impulsora de la reacción redox provendría de la existencia de un grupo negativo-básico en el entorno de CuA⁵⁸ que fuera capaz de captar el protón fenólico. Aunque se ignora de qué aminoácido se trata, este residuo jugaría sin duda un papel importante en la catálisis de la hidroxilación de la tirosina.

CAPÍTULO III

EL PAPEL DE LA N-GLICOSILACIÓN EN LA MADURACIÓN DE TIROSINASA

CAPÍTULO III

EL PAPEL DE LA N-GLICOSILACIÓN EN LA MADURACIÓN DE TIROSINASA

En los dos capítulos anteriores hemos esclarecido algunas de las diferencias entre las enzimas melanogénicas de ratón y humana y hemos analizado las propiedades cinéticas de tirosinasa, identificando algunos residuos clave para la unión del cofactor metálico y para su mecanismo catalítico. En este capítulo se abordará otro aspecto crítico para la correcta función de tirosinasa, como es su procesamiento post-traducciona.

Numerosos trastornos de pigmentación están relacionados con defectos de tráfico y procesamiento de las enzimas melanogénicas.^{34,64,65,66,67} Según pruebas recientes, la tirosinasa recién sintetizada es retenida por la maquinaria de control de calidad del RE hasta que se adquiere una conformación apropiada. Entonces, la tirosinasa correctamente glicosilada y plegada es transportada al Golgi, donde los N-oligosacáridos continúan transformándose y probablemente se produce la unión del cobre. Uno de los sitios potenciales de N-glicosilación, localizado en el centro CuB, parece especialmente relevante, ya que se encuentra perfectamente conservado en tirosinasa y Tyrps humanas y de ratón y su ocupación se ha relacionado con una correcta unión a cofactor y adquisición de plena actividad enzimática.⁶⁸ Además, una mutación natural que anula dicho sitio de glicosilación está asociada con OCA1.⁶⁹

Así, una de las etapas críticas en el proceso de la pigmentación es que la tirosinasa sintetizada adquiera una conformación que sea reconocida positivamente por el sistema de control de calidad del RE. Sin embargo, los requerimientos estructurales mínimos que permiten esta salida del RE aún no han sido identificados para tirosinasa ni otras proteínas melanosomales, lo que permitiría esclarecer las bases moleculares del albinismo asociado a estos defectos. Asimismo, debido a la probable relación entre los distintos procesos post-traduccionales, como glicosilación, unión de metal y tráfico entre compartimentos celulares, este estudio permitiría proporcionar un modelo para otras metaloproteínas que sigan la vía biosintética secretora.

Aquí hemos enfocado el estudio analizando la actividad enzimática y el patrón de glicosilación de mutantes puntuales de tirosinasa y proteínas quiméricas en las que regiones concretas de tirosinasa se sustituyeron por los fragmentos homólogos de Tyrp1, con el fin de identificar los determinantes estructurales del plegamiento de tirosinasa y otras enzimas melanogénicas.

1. Expresión y procesamiento de Tyr y Tyrp1 wt en células HEK 293T.

Como hemos visto en el capítulo anterior, el análisis de las relaciones estructura-función en las proteínas de la familia de tirosinasa requiere un sistema de expresión eficiente. Algunas de las células heterólogas, carentes de enzimas melanogénicas endógenas, empleadas para la expresión estable o transitoria de los correspondientes genes son las células COS7,^{34,70} CHO⁶⁸ o HeLa.^{50,51} En el caso del presente trabajo, hemos empleado hasta el momento células COS7, ya que los niveles de expresión y el procesamiento de las tirosinasas silvestre y mutantes analizadas eran satisfactorios. Sin embargo, cuando nos planteamos estudiar los elementos estructurales de Tyrp1 relacionados con su actividad enzimática o procesamiento mediante transfección en células COS7 del gen *Tyrp1* obtuvimos una maduración ineficiente de la proteína, evidenciada por un patrón de N-glicosilación incompleto, como pudimos comprobar mediante comparación de la movilidad electroforética de Tyrp1 de células de melanoma de ratón B16 y la proteína transfectada, así como por la sensibilidad a la endoglicosidasa H (Endo H) mostrada por la enzima expresada en el sistema heterólogo de COS7 (Figura 31). Endo H libera de forma selectiva glicanos ricos en manosa, característicos de glicoproteínas cuyo procesamiento es incompleto y son retenidas en el RE.⁷¹ Sin embargo, tras la maduración de los glicanos a estructuras más complejas por eliminación de manosas y adición de moléculas de ácido siálico y galactosa en el Golgi medial, las glicoproteínas se hacen resistentes a la digestión con Endo H, por lo que la sensibilidad a Endo H constituye un criterio para distinguir formas tempranas no completamente procesadas y residentes en el RE de las proteínas en estudio de las formas maduras de las enzimas.^{34,64,65,72}

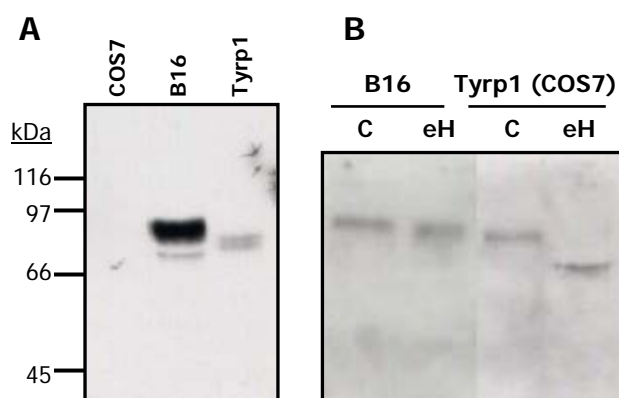


Figura 31. (A) Western blot con α PEP1 de extractos de células COS7 (como control negativo), células de melanoma de ratón B16 y Tyrp1 transfectada en COS7. La diferencia de movilidad entre las dos últimas sugiere que la proteína transfectada no se glicosila de igual forma que la de B16. **(B)** Patrón de glicosilación de Tyrp1 en B16 y transfectada en células 293T, mediante análisis por Western blot de extractos control (calles C) y tratados con Endo H (eH).

La observación de un procesamiento aberrante de *Tyrp1* es consecuente con nuestra incapacidad de detectar actividades enzimáticas melanogénicas en extractos de células transfectadas con *Tyrp1*. Además, tal y como comentamos anteriormente, también podría relacionarse con la falta de actividad dopacromo tautomerasa en células COS7 transfectadas con *Tyrp2* o *TYRP2*.

Este resultado apunta a que los requerimientos de maduración y plegamiento de las proteínas puede variar entre las distintas proteínas aun empleando un sistema de expresión común. El objetivo de este capítulo es la identificación de determinantes estructurales del plegamiento de las enzimas melanogénicas, y se centra especialmente en *Tyr* y *Tyrp1*, ya que son las que presentan mayor homología y la detección de diferencias en sus procesamientos post-traduccionales, a pesar de la alta similitud entre sus secuencias y estructura de la proteína madura, podría arrojar luz sobre este aspecto. Por tanto, la búsqueda de un sistema de expresión igualmente eficiente para ambas enzimas es indispensable para llevar a cabo esta comparación.

Así, elegimos las células HEK 293T para estudiar la expresión de *Tyr* y *Tyrp1* de ratón mediante transfección transitoria de los genes *Tyr* y *Tyrp1* y posterior análisis de sus actividades enzimáticas y procesamiento, mediante digestión con las glicosidasas Endo H y N-glicosidasa F (PGNasa F) seguida de Western blot. Ya hemos comentado que la sensibilidad a Endo H constituye un criterio para distinguir las formas inmaduras de las glicoproteínas de aquéllas completamente procesadas. Por otro lado, PGNasa F elimina todos los tipos de glicano presentes en la molécula, independientemente de su grado de maduración, lo que permite estimar el tamaño del esqueleto polipeptídico de la glicoproteína.

El Western blot de tirosinasa nativa expresada en células HEK 293T mostró una banda mayoritaria de peso molecular aparente 78.4 ± 0.9 kDa ($n \geq 5$) y otra minoritaria que migraba a mayor velocidad ($M_r 69.5 \pm 0.5$ kDa, $n \geq 5$) (Figura 32A). Tras el tratamiento con PGNasa F resultó una banda única de 55.5 ± 1.5 kDa que correspondía al polipéptido totalmente desglicosilado. Por tanto, las dos bandas que se veían en el extracto nativo correspondían a distintas formas de glicosilación, de las cuales la mayoritaria de menor movilidad electroforética era resistente a Endo H, lo que demuestra que es una forma madura, mientras que la minoritaria era sensible a Endo H (Figura 32A). La actividad enzimática de los extractos crudos de las células HEK 293T transfectadas con *Tyr* fue incluso superior a la de extractos de células de melanoma de

ratón B16: para TH, presentó $526 \pm 26 \mu\text{U}/\text{mg}$ proteína frente a $305 \pm 27 \mu\text{U}/\text{mg}$ en células B16, mientras que la actividad DO fue de $51 \pm 2 \text{ mU}/\text{mg}$ frente a $32 \pm 4 \text{ mU}/\text{mg}$. Estos valores son consistentes con una expresión, plegamiento y procesamiento eficientes de la proteína.

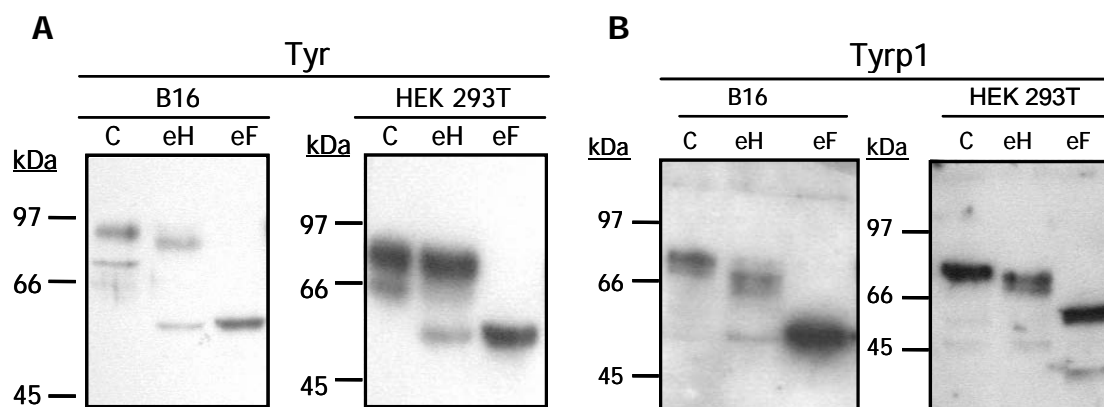


Figura 32. Glicosilación y procesamiento eficientes de Tyr y Tyrp1 de HEK 293T. Expresión de Tyr (A) y Tyrp1 (B) de extractos de células B16 y de células HEK 293T transfectadas con los genes *Tyr* y *Tyrp1*, respectivamente. Se realizaron Western blots con αPEP7 y αPEP1 de los extractos control (calles C) y tratados con Endo H (eH) o PNGasa F (eF).

En cuanto a Tyrp1, también fue procesada de forma correcta y resultó mayoritariamente resistente a la digestión con Endo H cuando la proteína se expresó en las células HEK 293T: la proteína nativa mostró un peso molecular aparente de $78.1 \pm 1.2 \text{ kDa}$ ($n \geq 3$) y el polipéptido, tras el tratamiento con PNGasa F, tuvo un tamaño de $57.4 \pm 0.9 \text{ kDa}$ (Figura 32B).

Por tanto, las células HEK 293T expresan y procesan de forma correcta Tyr y Tyrp1, por lo que constituyen un modelo apropiado para estudiar los determinantes del plegamiento de las enzimas melanogénicas.

2. Construcciones quiméricas de Tyr y Tyrp1 muestran la existencia de sitios de glicosilación dependientes de conformación.

Con el fin de identificar elementos estructurales específicos de cada proteína de la familia de tirosinasa y distinguirlos de elementos comunes a todos los miembros de la familia, construimos y analizamos varias proteínas quiméricas. En experimentos preliminares, estudiamos dos construcciones que designamos Tyr(A)/Tyrp1(B) y Tyrp1(A)/Tyr(B). Tyr(A)/Tyrp1(B) comprende la región N-terminal de Tyr hasta el residuo 362 que precede a la primera His del sitio CuB, H363, y a continuación el sitio CuB y la región C-terminal de Tyrp1, incluyendo la cola citosólica que contiene todas las señales de

dirección y tráfico intracelular necesarias.⁷³ De forma análoga, Tyrp1(A)/Tyr(B) presenta la distribución contraria, es decir, la región N-terminal de Tyrp1 seguida del sitio CuB y la parte C-terminal de Tyr (Figura 33). El tamaño del polipéptido de ambas proteínas quiméricas es semejante, con 523 aminoácidos para Tyr(A)/Tyrp1(B) y 547 para Tyrp1(A)Tyr(B), comparados con los 533 y 537 aminoácidos que tienen Tyr y Tyrp1, respectivamente. Por tanto, si los procesos de N-glicosilación y procesamiento post-traduccional son similares para las proteínas parentales y las quimeras, las movilidades electroforéticas de todas ellas en SDS-PAGE deberían ser también muy parecidas.

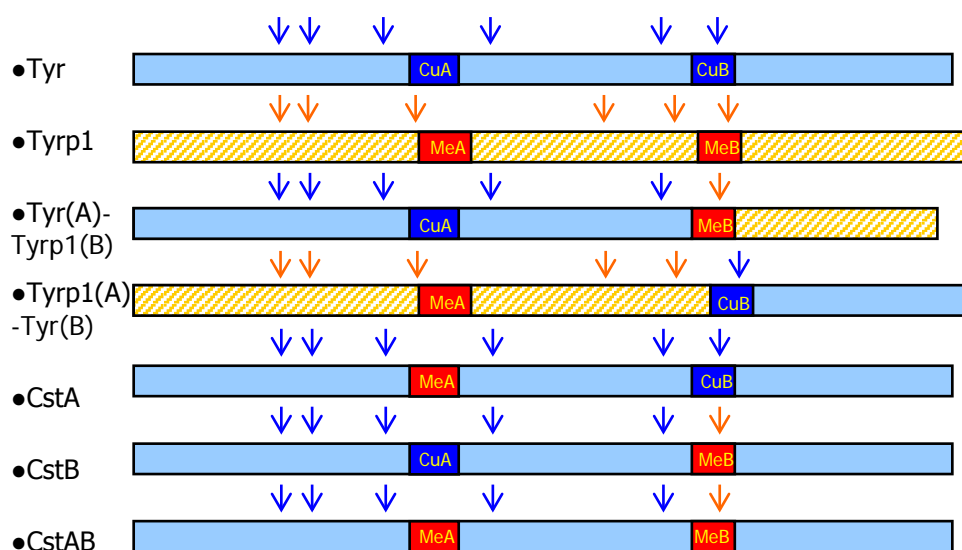


Figura 33. Representación esquemática de las construcciones quiméricas analizadas en este capítulo y sus correspondientes proteínas parentales. Las flechas indican los secuencias de glicosilación de **Tyr** (flechas oscuras) y **Tyrp1** (flechas claras), y su conservación en las quimeras que contengan las regiones adecuadas de las proteínas parentales.

Sin embargo, se observó un patrón electroforético anómalo, con una única banda de movilidad mayor a la esperada para ambas quimeras (Figura 34), de pesos moleculares aparentes de 65.3 y 64.1 kDa para Tyrp1(A)/Tyr(B) y Tyr(A)/Tyrp1(B), respectivamente. Tras tratamiento con Endo H o PGNasa F, las dos quimeras dieron bandas de 55.6 y 59.1 kDa de peso molecular, respectivamente, consistentes con el tamaño teórico esperable y con el de las proteínas parentales. Esto demostró que la mayor movilidad electroforética de las quimeras nativas se debe a una glicosilación considerablemente incompleta respecto a Tyr y Tyrp1. Además, su sensibilidad a Endo H sugiere que estas proteínas no se pliegan correctamente y, como consecuencia de esta conformación aberrante, son retenidas en el RE, donde las cadenas de N-glicanos no pueden procesarse a

oligosacáridos complejos. De manera consistente con este procesamiento incompleto, las quimeras no presentaron ninguna de las actividades enzimáticas típicas de tirosinasa.

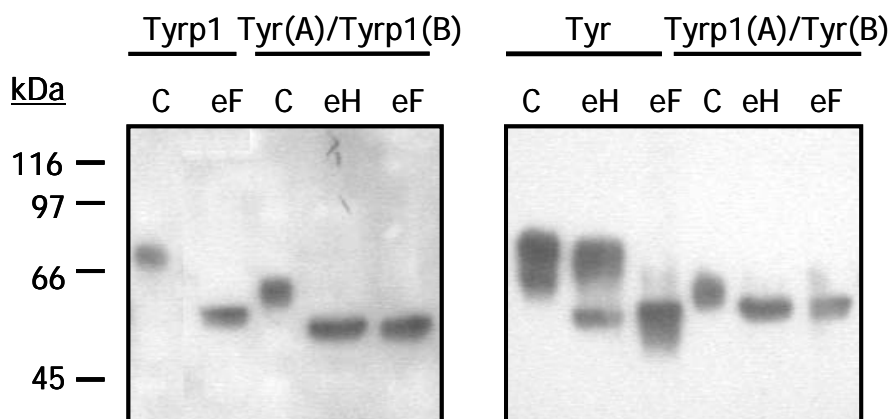


Figura 34. Patrón de glicosilación de las proteínas quiméricas Tyr(A)/Tyrp1(B) y Tyrp1(A)Tyr(B)Tyr. Las proteínas parentales Tyrp1 y Tyr y las quimeras Tyr(A)/Tyrp1(B) y Tyrp1(A)Tyr(B) se expresaron de forma transitoria en células HEK 293T. Los extractos control (calles C) y tratados con Endo H (eH) o PNGasa F (eF) se analizaron por Western blot, para los que se utilizaron α PEP1 para la detección de Tyrp1 y Tyr(A)/Tyrp1(B) y α PEP7 para la de Tyr y Tyrp1(A)Tyr(B). Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

Tyr, Tyrp1 y las dos quimeras poseen el mismo número de secuencias de N-glicosilación (Figura 33). Por tanto, la diferencia de movilidad electroforética de las construcciones quiméricas y las proteínas silvestres estará probablemente causada por la no utilización de alguno(s) de estos secuencias potenciales que en las proteínas silvestres (wt) sí lo están, más que por la ausencia de secuencias en la secuencia primaria. Así, el patrón de glicosilación de las proteínas quiméricas indica fuertemente que Tyr y Tyrp1 presentan secuencias de glicosilación dependientes de conformación, es decir, que no se ocupan de forma co-traducciona, sino que lo hacen cuando la proteína adopta una conformación compatible con su glicosilación. Muy probablemente, las quimeras no logran adquirir esta conformación particular debido a un plegamiento aberrante.

3. El correcto procesamiento de Tyr depende de una interacción muy específica en la que participa el sitio CuB.

El siguiente objetivo a abordar fue acotar una o varias regiones de la molécula que estuvieran implicadas en el establecimiento de una conformación que permita la glicosilación correcta y completa de la proteína. Para ello, construimos otra proteína quimérica formada por la molécula de Tyr completa salvo el sitio CuB, definido entre las His H363 y H390, que se reemplazó por la región homóloga correspondiente de Tyrp1.

Esta construcción se denominó CstB, de "casete B", puesto que consistía en la sustitución de un casete de aminoácidos por otro (Figura 33), y se estudiaron sus capacidades catalíticas y su patrón de glicosilación y movilidad electroforética tras la transfección transitoria en células HEK 293T.

CstB no presentó actividad enzimática y resultó incapaz de seguir un procesamiento normal, como pudimos comprobar por su sensibilidad a la digestión con Endo H y la falta de glicosilación respecto a lo esperable en función de sus secuencias potenciales. Así, la proteína nativa presentó un peso molecular aparente de 68.5 ± 1.6 kDa, frente a los 78.4 ± 0.9 kDa de Tyr (Figura 35A), a pesar de que la distribución de secuencias y el tamaño del polipéptido son idénticos, como demuestra la digestión con PGNasa F (banda única de 55.9 ± 2.8 kDa para CstB y de 55.5 ± 1.5 kDa para Tyr).

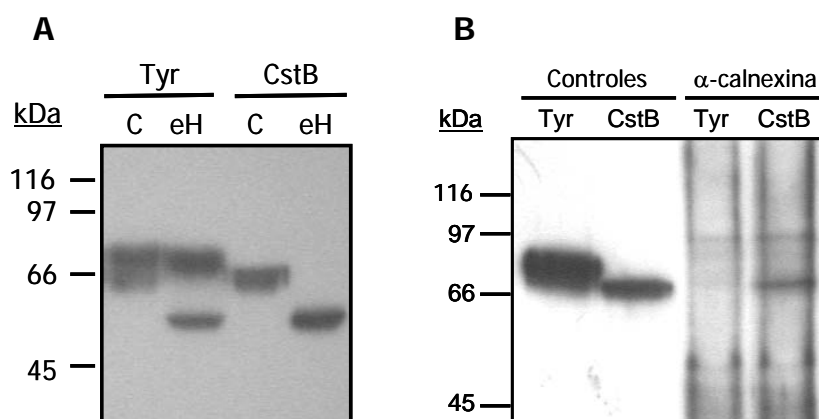


Figura 35. (A) Glicosilación de la construcción CstB. Tyr y el CstB se expresaron transitoriamente en células HEK 293T. Se analizaron cantidades idénticas de extractos control (C) y los tratados con Endo H (eH), mediante SDS-PAGE y Western blot con α PEP7. La mayor movilidad electroforética de la muestra nativa de CstB respecto a Tyr y la ausencia de formas resistentes a Endo H indica que el grado de glicosilación es menor. **(B) Inmunoprecipitación (IP) con α -calnexina.** Cantidades de proteína idénticas de extractos como los anteriores se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-calnexina. Las calles del Western blot con (PEP7 marcadas como "Controles" corresponden a los sobrenadantes pre-aclarados, antes de la IP (4% del total), y las " α -calnexina" indican las muestras a las que se les realizó la IP.

Además, de acuerdo con un patrón de glicosilación incompleto y una probable retención de la glicoproteína en el RE, CstB mostró una interacción con calnexina mayor que Tyr, evidenciada mediante experimentos de coimmunoprecipitación con un anticuerpo anti-calnexina (Figura 35B). Así, sustituir la secuencia del sitio CuB tiene el mismo efecto sobre la proteína que el cambio de la región C-terminal completa desde dicho sitio CuB, ya que causa un procesamiento aberrante que impide alcanzar una conformación compatible con una N-glicosilación plena y conduce a la retención de la proteína en el RE.

Con el fin de recuperar el patrón de plegamiento correcto, al menos parcialmente, y la actividad enzimática tirosinasa, creamos dos nuevos mutantes sobre la propia construcción CstB que trataban de acercar su secuencia un poco más a la de la tirosinasa silvestre, basándonos en dos supuestos:

- El par GG que sigue al secución del sitio CuB en Tyrp1, pero no en Tyr, podría ser el causante de la no glicosilación de esta posición en el CstB, ya que podría producir una torsión en el polipéptido y dar lugar a una estructura tridimensional que bloqueara la glicosilación en esta posición.
- Por otro lado, como hemos discutido en el Capítulo II, la sustitución del par HH del final del sitio CuB de Tyr por el par LH característico de las Tyrps (mutante H389L) disminuye la actividad de la enzima hasta un 20% y determina que haya una fracción mayoritaria que es sensible a Endo H (Figura 27). Así, la presencia de esta leucina en la secuencia de la construcción CstB también podría influir en la pérdida de actividad y plegamiento incorrecto descritas.

De este modo, analizamos el patrón de glicosilación y resistencia a Endo H de las construcciones CstB-MS, en el que el motivo GG ya comentado se reemplazó por el MS presente en Tyr, y Cst-HH, y en el que el par LH se sustituyó por el HH característico de Tyr, de modo que la diferencia entre esta construcción y la Tyr original se limitaba a 11 aminoácidos, 5 de los cuales son conservativos. Sin embargo, ninguna de ellas fue capaz de experimentar un procesamiento adecuado, como muestra la sensibilidad a Endo H (Figura 36) y la ausencia de actividad enzimática de ningún tipo, por lo que no fue posible restaurar el patrón de glicosilación adecuado o la actividad de la proteína quimérica.

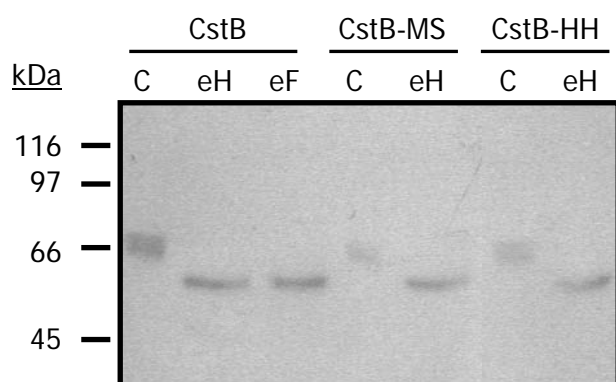


Figura 37. (A) Glicosilación de las construcciones CstB, CstB-MS y CstB-HH. Cantidades idénticas de extractos control (C) y tratados con Endo H (eH), así como con PGNasa F (eF) en el caso del CstB, se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot con α PEP7, probando la sensibilidad a Endo H de los tres mutantes, señal de un procesamiento deficiente que era coherente con la ausencia de actividad enzimática de estas proteínas.

4. La ocupación del secuón del sitio CuB no es imprescindible para una maduración completa de Tyr ni para la unión de cofactor.

Puesto que el sitio CuB contiene un secuón altamente conservado, resultaba tentador achacar la falta de glicosilación del CstB respecto a Tyr a esta posición, por lo que investigamos esta posibilidad mediante la construcción de dos nuevos mutantes a partir de Tyr y CstB, anulando dicho secuón (el sexto en la secuencia de la proteína) en ambas, con el fin de analizar su ocupación. Estas construcciones se nombraron $\Delta 6$ -Tyr y $\Delta 6$ -CstB, respectivamente, y se obtuvieron mediante una sustitución conservativa N371Q. En contra de lo esperado, la comparación de la movilidad electroforética de las proteínas expresadas en el sistema descrito demostró que el secuón del sitio CuB estaba ocupado no sólo en la tirosinasa silvestre, sino también en el CstB (Figura 37).

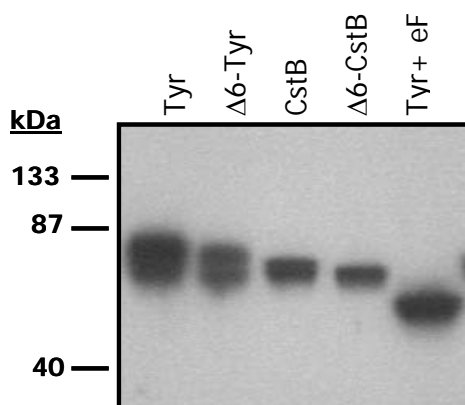


Figura 37. El secuón del sitio CuB está ocupado en la tirosinasa wt (Tyr) y en la construcción quimérica CstB, como demuestra la escalera en el Western blot realizado con cantidades idénticas de proteína de extractos de células HEK 293T transfectadas transitoriamente con los genes que codifican para las proteínas indicadas. En la última calle se muestra el tamaño del polipéptido completamente desglicosilado, por incubación de Tyr wt con PGNasa F (eF).

También estudiamos si el mutante $\Delta 6$ -Tyr, no glicosilado en el secuón de CuB, era capaz de madurar a una forma resistente a Endo H y si, además, era enzimáticamente activa. Así, la forma $\Delta 6$ -Tyr era resistente a Endo H y su comportamiento electroforético en ausencia del agente reductor 2-mercaptoetanol (comprobada en el ensayo de actividad dopa oxidasa en gel) también fue normal, salvo por la movilidad ligeramente superior a la de Tyr por la diferencia de un N-glicano (Figura 38).

$\Delta 6$ -Tyr conservó una actividad residual considerable y sus constantes cinéticas fueron muy similares a las de Tyr (Tabla 9). En conjunto, estos datos demuestran que el secuón del CuB está ocupado en la enzima nativa Tyr y en la construcción CstB, y confirman la importancia de la glicosilación de esta posición para alcanzar el 100% de actividad enzimática que ya habían apuntado otros autores.⁶⁸ Por otro lado, también prueban que su ocupación no es imprescindible para el procesamiento posterior,

incluyendo la salida del RE y la adquisición del cofactor metálico. Por tanto, el procesamiento incorrecto de CstB y las otras quimeras no se puede explicar por la falta de glicosilación del secuón ³⁷¹NGT³⁷³.

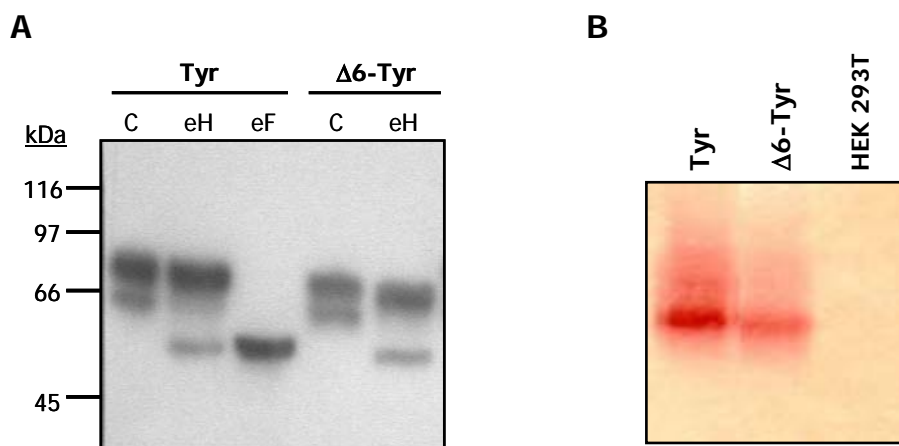


Figura 38. (A) Glicosilación de la construcción Tyr-Δ6. Tyr y la forma Tyr-Δ6, que carece del sexto secuón de tirosinasa (localizado en el sitio CuB), se expresaron transitoriamente en células HEK 293T. Se analizaron cantidades idénticas de extractos control (C) y tratados con Endo H (eH), así como con PGNasa F (eF) en el caso de Tyr, mediante SDS-PAGE y Western blot con α PEP7. La movilidad electroforética ligeramente superior de Tyr-Δ6 confirma la ausencia de este secuón y su resistencia a Endo H es coherente con un correcto procesamiento, al menos parcial, que se refleja en la actividad enzimática residual detectada en los ensayos in vitro y de **tinción dopa oxidasa en gel (B)**.

| | Actividad TH residual (%) | Actividad DO residual (%) | K_M (μ M) | $V_{m\acute{a}x}^*$ | $V_{m\acute{a}x}/K_M$ |
|--------|---------------------------|---------------------------|------------------|---------------------|-----------------------|
| Tyr wt | 100 | 100 | 77 ± 14 | 11.1 ± 1.0 | 0.14 |
| Δ6-Tyr | 58 ± 5 | 51 ± 2 | 69 ± 5 | 9.1 ± 0.7 | 0.13 |

Tabla 9. Actividades TH y DO residuales y constantes cinéticas de la construcción Δ6-Tyr frente a la forma silvestre (Tyr wt). Los valores presentados corresponden a la media \pm desviación estándar, con $n \geq 3$. (*) $V_{m\acute{a}x}$ se expresa en unidades arbitrarias y normalizada según la cantidad de enzima estimada en los Western blots.

5. La sustitución del CuA de Tyr por el centro MeA de Tyrp1 no impide la correcta glicosilación del mutante y es enzimáticamente activo.

Puesto que reemplazar el sitio CuB de Tyr por la región homóloga de Tyrp1 conducía a un procesamiento aberrante y pérdida de actividad del mutante obtenido (CstB), nos propusimos analizar las consecuencias sobre la enzima de la sustitución del otro centro de unión a cobre, CuA, por el sitio MeA de Tyrp1, así como la de ambos sitios CuA y CuB por los correspondientes MeA y MeB de Tyrp1. De forma análoga a la construcción CstB, se diseñaron dos nuevas construcciones quiméricas que denominamos CstA y CstAB, respectivamente (Figura 33), y estudiamos su actividad enzimática, movilidad electroforética y patrón de glicosilación según lo anteriormente descrito.

Así, la construcción CstA conservaba cierta actividad enzimática residual (un 25% de TH y un 10% de DO, comparadas con Tyr en condiciones estándar) y se glicosilaba eficientemente, mientras que el CstAB se comportó de forma idéntica al CstB en cuanto a carencia de actividad enzimática y al procesamiento (Figura 39). Esto prueba que el sitio MeA de Tyrp1 es capaz de unir cobre y llevar a cabo las actividades enzimáticas características de tirosinasa, así como que el sitio CuB de Tyr es necesario para un plegamiento correcto y adquisición de una conformación enzimáticamente activa. Además, es la primera vez que se demuestra la capacidad del centro de unión a metal MeA de Tyrp1 para quelatar cobre.

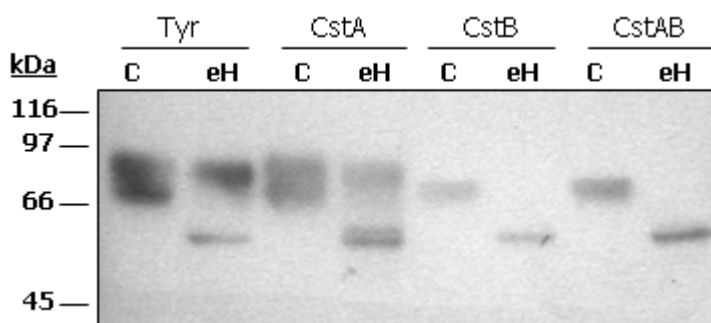


Figura 39. Patrón de glicosilación de las construcciones tipo "casete" (CstA, CstB y CstAB) comparadas con Tyr. Tyr, CstA, CstB y CstAB se expresaron transitoriamente en células HEK 293T y se analizaron cantidades idénticas de extractos control (C) y los tratados con Endo H (eH), mediante SDS-PAGE y Western blot con α PEP7. La mayor movilidad electroforética de CstB y CstAB respecto a Tyr, así como la ausencia de formas resistentes a Endo H, indica que el grado de glicosilación es menor, mientras que CstA se procesa de forma correcta, aunque la fracción de proteína sensible a Endo H es mayor que la de Tyr.

6. Ocupación de los secuencias de glicosilación de tirosinasa.

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la tirosinasa expresada en células HEK 293T presenta, como mínimo, dos formas con distinto grado de glicosilación. Sin embargo, no permiten determinar con exactitud el número de sitios glicosilados en cada una de las isoformas, que es otro de los aspectos del procesamiento de tirosinasa que todavía permanece sin concretar. Basándonos en trabajos de otros autores, podríamos especular que la banda madura, de menor movilidad, podría presentar cuatro cadenas de N-glicanos. Branza-Nichita et al. (2000) construyeron y analizaron diversos mutantes en los que suprimieron de forma sistemática los diversos secuencias de tirosinasa, y concluyeron que Tyr expresada en células CHO presentaba, de las seis posiciones de glicosilación potenciales, cuatro ocupadas y dos libres.⁶⁸ De estos cuatro secuencias ocupadas, habría dos (Asn86 y Asn371) que deben estar necesariamente ocupadas para poder alcanzar el 100% de actividad enzimática, lo cual es consistente con nuestros datos obtenidos con la construcción que hemos denominado $\Delta 6$ -Tyr. El mismo resultado se ha encontrado para la tirosinasa de hámster (cuatro secuencias ocupadas).⁷⁴

Nosotros analizamos la ocupación de los secuencias de Tyr en nuestro sistema de expresión y lo comparamos con el de células de melanoma de ratón B16 mediante desglicosilación incompleta con PGNasa F de extractos de las células transfectadas con la enzima silvestre y de células B16, ya que es posible que las diferencias entre los diferentes sistemas de expresión heteróloga también constituyan el origen de ligeras diferencias entre la ocupación de secuencias y de las distintas formas finales de procesamiento de tirosinasa detectadas. Asimismo, también realizamos el ensayo sobre extractos de células HEK 293T transfectadas con las construcciones $\Delta 6$ -Tyr y CstB, para corroborar nuestra hipótesis de que las tres formas difieren entre sí en la ocupación de un sitio de glicosilación (Tyr respecto $\Delta 6$ -Tyr y ésta respecto CstB).

El resultado de este experimento prueba claramente que la tirosinasa expresada en células HEK 293T presenta una forma madura, probablemente responsable de la plena actividad enzimática, de menor movilidad electroforética en la que los seis secuencias disponibles se encuentran glicosilados, y otra(s) isoforma(s) de mayor movilidad con cuatro (o menos) de los seis secuencias potenciales ocupadas (Figura 40). Además, se confirma que la forma $\Delta 6$ -Tyr tiene un sitio de glicosilación ocupado menos que la enzima silvestre, el localizado en el sitio CuB, y también presenta isoformas con dos posiciones de glicosilación menos que la forma de máxima maduración, mientras que el CstB sólo

presenta una forma nativa, con cuatro secuencias ocupadas, ya que probablemente no es capaz de adquirir una conformación tridimensional que permita la glicosilación, algo más tardía en el proceso de modificación post-traducciona de la proteína y dependiente de conformación, de los otros dos secuencias disponibles. Asimismo, las células B16 presentaron una ocupación de los secuencias de Tyr idéntica a la de nuestro sistema de expresión, confirmando así la adecuación del modelo elegido a nuestros objetivos.

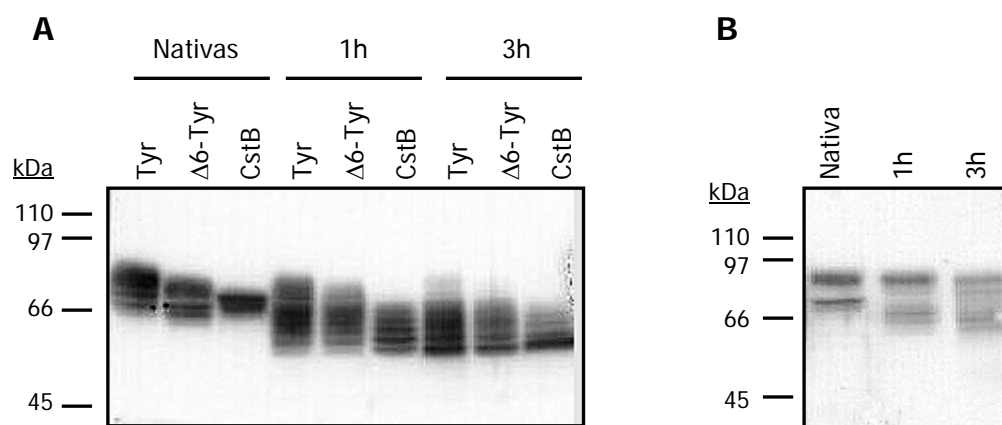


Figura 40. Cinética de desglicosilación con PGNasa F de extractos de células HEK 293T transfectadas transitoriamente con *Tyr*, $\Delta 6$ -*Tyr* y *CstB* (A) y de células B16 (B). El tratamiento de los extractos de *Tyr*, $\Delta 6$ -*Tyr* y *CstB* expresadas en células HEK 293T y de células de melanoma de ratón B16 con cantidades limitantes de PGNasa F condujo a una desglicosilación parcial de las proteínas, comprobada mediante SDS-PAGE y Western blot con α PEP7, que permitió determinar el número de secuencias de glicosilación ocupadas en cada caso. Los tiempos empleados en la digestión fueron de 1 y 3h, además de un control no tratado, con una cantidad de proteína total de 10 μ g en todos los casos.

7. Conclusiones y discusión.

El interés cada vez mayor por los mecanismos de procesamiento y transporte de la tirosinasa se debe al descubrimiento relativamente reciente de que cuando estos procesos no tienen lugar de forma adecuada, se interrumpe la síntesis de melaninas, lo que conduce a un fenotipo albino o amelanótico, una hipótesis reforzada por el elevado número de resultados descritos en este sentido en los últimos años.^{64,65,67,72} Además, la tirosinasa se considera un modelo excelente para estudiar la relación entre chaperonas de tipo lectina del RE y el plegamiento de glicoproteínas, así como el papel de los sistemas de control de calidad del RE en el procesamiento de las glicoproteínas de la ruta biosintética-secretora.⁷⁵ A pesar de esto, apenas se conocen los requerimientos estructurales para el plegamiento de la tirosinasa en el RE y los datos existentes se refieren principalmente al papel de los N-glicanos,^{68,76,77} mientras que hay muy poca información sobre interacciones inter- o intramoleculares del esqueleto polipeptídico.

En este trabajo hemos enfocado este aspecto mediante el análisis del patrón de glicosilación y la actividad enzimática de mutantes de tirosinasa y de proteínas quiméricas derivadas de Tyr y Tyrp1. Las construcciones se expresaron transitoriamente en células HEK 293T, un sistema de expresión heterólogo muy eficiente en el correcto procesamiento de las enzimas melanogénicas, en contraste con otros que han resultado ineficaces en el plegamiento de las proteínas transfectadas y han necesitado, por ejemplo, cotransfección con calnexina (COS7) para aumentar la eficacia del proceso.³⁵

La tirosinasa expresada en células HEK 293T suele aparecer como un doblete en los Western blots con α PEP7 (Figura 35). Esta característica es común a muchos tipos celulares, incluyendo sistemas heterólogos⁵¹ y células melanocíticas tales como células de melanoma de ratón B16,⁷⁶ melanocitos humanos⁷⁸ y células de melanoma humano.^{72,78} Hay un elevado número de evidencias experimentales que señalan una relación precursor-producto entre ambas bandas.^{29,78} De acuerdo con esto, en nuestro sistema estas dos bandas corresponden a dos isoformas glicosiladas de manera diferencial como prueba la obtención de una banda única de mayor movilidad electroforética que cualquiera de las de la proteína nativa en los Western blots realizados tras la desglicosilación del extracto con PGNasa F. Además, la banda de mayor movilidad de la forma nativa es sensible a Endo H, y la tinción de actividad dopa oxidasa en geles tras la SDS-PAGE en condiciones no reductoras mostró una banda única, y no un doblete (Figura 38). En conjunto, estas observaciones indican que la forma de mayor movilidad corresponde a una proteína parcialmente glicosilada de procesamiento incompleto que resulta enzimáticamente inactiva, a partir de la cual se obtendría la forma de menor movilidad, resistente a Endo H, por posterior glicosilación.

Con respecto a la distinta ocupación de las dos formas de tirosinasa, los experimentos preliminares realizados con el mutante $\Delta 6$ -Tyr demuestran que la diferencia de ocupación entre ellas es, al menos, de dos posiciones no ocupadas respecto a la forma madura, ya que la movilidad de la especie $\Delta 6$ -Tyr, que carece de una posición de glicosilación, es intermedia entre las dos isoformas de Tyr wt (Figura 35), e incluso en ocasiones es posible detectar una segunda isoforma en esta proteína $\Delta 6$ -Tyr de movilidad ligeramente mayor a la de cualquiera de las descritas hasta ahora en nuestros ensayos con estas dos proteínas.

Los experimentos de desglicosilación parcial con PGNasa F, destinados a determinar el número de sitios de glicosilación ocupados en tirosinasa, confirman que el número de secuencias utilizadas en la tirosinasa de ratón expresada en células HEK 293T es seis, es decir,

todos los disponibles, y coincide con el que presenta la tirosinasa de B16. Se ha descrito que la enzima humana, por su parte, presenta dos formas con distinto grado de glicosilación, con 6 ó 7 secuencias glicosiladas, de un total de 7 potenciales, debido a que la glicosilación de una de las posiciones (Asn290) es ineficiente por la presencia de una prolina proximal (Pro293).⁷⁹ También se ha demostrado que la forma mayoritaria de tirosinasa presente en células de melanoma humano es la que tiene 6 N-glicanos, mientras que en melanocitos normales, en los que la velocidad de traducción es 2-3 veces inferior a la de los malignos, predomina la forma con 7 sitios de glicosilación ocupados. Así, disminuyendo la velocidad de traducción en melanocitos en cultivo (temperaturas más bajas o presencia del inhibidor cicloheximida), aumenta la eficiencia de glicosilación de esta posición.⁷⁹ Los resultados que se presentan aquí sobre la tirosinasa de ratón contrastan con los de Branza-Nichita y colaboradores (2000),⁶⁸ quienes detectan glicanos en sólo cuatro de los seis secuencias de glicosilación que posee esta enzima, expresada en células CHO. El mismo resultado se ha encontrado para la tirosinasa de hámster,⁷⁴ pero las diferencias observadas en el número de secuencias ocupadas y en el procesamiento de las enzimas entre los distintos sistemas podrían deberse a la diversidad de maquinarias responsables de las modificaciones post-traduccionales entre los distintos sistemas de expresión, ya constatada anteriormente. Por otro lado, Tyrp1 expresada en fibroblastos de ratón L929, está glicosilada en cinco de sus seis secuencias potenciales, puesto que el ¹⁰⁴NFS¹⁰⁶, curiosamente el menos conservado de todos en la familia y en la escala filogenético, no está ocupado.⁷⁷

Nuestros resultados prueban que la traducción completa de Tyr para dar lugar a un polipéptido que comprende todos los aminoácidos de la secuencia, incluidos los del extremo C-terminal que reconoce α PEP7, puede tener lugar a pesar de que no se produzca la glicosilación co-traduccionales de la proteína de forma completa. Esto sugiere que Tyr presenta dos tipos de sitios aceptores de N-glicanos distinguibles en función de su cinética de ocupación: por un lado, secuencias de glicosilación rápida y co-traduccionales y, por otra, secuencias cuya ocupación es más lenta y dependiente de la conformación de la glicoproteína naciente. De hecho, el procesamiento completo de Tyr es un proceso relativamente lento, comparado con otras proteínas y, en particular, con la tan homóloga Tyrp1, ya que puede llegar a tardar 3 horas, frente a los 30 min que requiere Tyrp1.⁷⁵

Por otro lado, las construcciones quiméricas Tyr(A)/Tyrp1(B) y Tyrp1(A)/Tyr(B) no se glicosilaron ni plegaron de forma correcta, como prueba una única banda sensible a Endo H y de movilidad claramente inferior a la de Tyr o Tyrp1, lo que una vez más apunta a que presentan varias secuencias no ocupadas, a pesar de que contienen los mismos

secuencias potenciales que las proteínas parentales, donde sí que están ocupadas, y en la misma distribución. Tanto Tyr como Tyrp1 presentan seis secuencias, de los cuales todos se localizan N-terminales respecto al sexto y último, perfectamente conservado, que se encuentra en el sitio CuB de unión a metal. El primero también es absolutamente invariante en las tirosinasas y Tyrp1 humanas y de ratón, y está situado en una región muy conservada en general: entre las dos zonas ricas en Cys del dominio homólogo a EGF (Figura 7). De acuerdo con ello, las quimeras Tyr(A)/Tyrp1(B) y Tyrp1(A)/Tyr(B) tienen también seis secuencias potenciales, al igual que las proteínas parentales. Además, como muestra la Figura 33, debido al diseño de las quimeras, todas las señales de glicosilación potenciales en Tyr(A)/Tyrp1(B) están situadas en los mismos sitios que las de Tyr, mientras que las de Tyrp1(A)/Tyr(B) presentan la misma distribución N-terminal que las de Tyrp1.

Puesto que la falta de glicosilación de las quimeras no se deba a falta de señales diana ni a un cambio a su distribución relativa al extremo N-terminal, la interpretación más probable es que debe provenir de un fallo en la ocupación de sitios dependientes de conformación. En este caso, la no-glicosilación de las proteínas quiméricas sería una consecuencia de su incapacidad para adoptar una conformación que permitiera el reconocimiento de más de una posición de glicosilación. Las quimeras están formadas por la región N-terminal de cada una de las proteínas parentales, hasta la primera His del sitio CuB, seguida del sitio CuB y la región C-terminal de la otra, por lo que la adquisición de la conformación competente con una glicosilación correcta podría residir en interacciones intramoleculares específicas entre estas dos regiones que, lógicamente, no tienen lugar en las quimeras.

Para definir con mayor precisión los elementos estructurales que participan en esta interacción, se construyó y analizó una quimera más selectiva denominada CstB, en la que sólo se sustituyó el sitio CuB de Tyr (entre los aminoácidos H363 y H390) por el homólogo de Tyrp1. Esta proteína quimérica, una vez expresada en células HEK 293T, resultó enzimáticamente inactiva, no glicosilada en más de una posición, al igual que las otras dos construcciones quiméricas, más divergentes, y se retuvo en el RE, como demuestra la sensibilidad a Endo H y la fuerte asociación con calnexina (Figura 35). Por tanto, al reemplazar únicamente el sitio CuB de Tyr por el correspondiente de Tyrp1 se obtuvo el mismo resultado que al sustituir toda la región C-terminal desde el CuB (incluido). Esto indica que el sitio CuB es, muy probablemente, la zona perteneciente a la región C-terminal de la proteína responsable de la formación de una conformación que

permite la maduración total de la proteína y su salida del RE. En este caso, lo más probable sea que la interacción establecida a través de este sitio que permite un correcto plegamiento implique el sitio CuA y la formación de la cavidad del centro activo de la enzima. Esta interacción debe ser muy específica, ya que de los 28 aminoácidos reemplazados en la construcción CstB con respecto a la enzima silvestre Tyr, 16 de las posiciones son invariantes y sólo quedan 12 distintas, la mayoría de las cuales son conservativas (Figura 23).

Sin embargo, antes de abordar esta hipótesis, cabe considerar que una de las explicaciones posibles de que la construcción CstB careciera de actividad enzimática era que su procesamiento deficiente se debiera a una incapacidad para unir cobre. De hecho, la unión al cofactor provoca un cambio conformacional en la mayoría, si no todas, las enzimas dependientes de cofactor, por lo que era posible que esta circunstancia repercutiera en el plegamiento de la glicoproteína. Así, estudiamos si este comportamiento del CstB en cuanto a su plegamiento y retención en RE podía ser imitado por eliminación de ligandos de cobre mediante mutagénesis de alguna de las His implicadas en la unión del cobre. También examinamos si un procesamiento incorrecto se correlacionaba con el grado de pérdida de actividad de diversos mutantes de Tyr en el sitio CuB. Para ello empleamos los tres mutantes caracterizados en el Capítulo II (Q378H, H389L y H390Q) y estudiamos su patrón de glicosilación y resistencia a Endo H. En la Figura 27 se puede comprobar que todos ellos fueron capaces de progresar, al menos parcialmente, a una forma resistente a Endo H, aunque en todos los casos una fracción de la proteína expresada permaneció sensible a Endo H.

Además, a pesar de que Q378H y H389L presentan una actividad residual muy semejante (un 20% de TH respecto al wt), el mutante Q378H mostró una banda mayoritaria correspondiente a una forma resistente a Endo H y, por tanto, posterior al RE, mientras que H389L fue más sensible a Endo H y más probablemente retenido en el RE. Así, la adquisición de resistencia a Endo H por los mutantes de Tyr, representativa de salida del RE al Golgi, no se correlaciona de forma estricta con la actividad enzimática residual. Por otro lado, el mutante H390Q también maduró de forma mayoritaria a una forma resistente a Endo H (Figura 27), a pesar de su falta absoluta de actividad debida a su incapacidad para unir cobre, ya que carece de una His imprescindible en la quelación del metal por el sitio CuB, por lo que también se puede concluir que el procesamiento más allá del RE no requiere la unión de cobre.

Tras estas consideraciones, la hipótesis del establecimiento de una interacción temprana entre las dos regiones de unión a cobre CuA y CuB cobra fuerza, y explicaría la interesante pero hasta ahora inexplicada observación de que los sustratos L-dopa y L-tirosina promueven el plegamiento de TYR y su salida del RE hacia el Golgi,⁷⁸ lo que implica que los sustratos son capaces de unirse a formas de la proteína presentes en el RE, incluso antes de una maduración completa. Además, el establecimiento del centro activo en etapas tempranas del procesamiento de Tyr concuerda con lo descrito recientemente sobre los mecanismos de adquisición de cofactor por metaloenzimas.⁸⁰ Debido a su elevada toxicidad, la concentración de cobre se mantiene muy baja en las células de mamíferos. Los metales se unen a chaperonas y se transfieren directamente a los centros aceptores de la metaloproteína diana en procesos en los que la fuerza impulsora de la transferencia del metal es la mayor afinidad por éste de la enzima aceptora que de la chaperona.⁸⁰ Por tanto, la formación de este sitio aceptor de metal de alta afinidad debe ser previa a la transferencia del cofactor. Así, aunque se ha identificado un transportador de cobre en la membrana del RE⁸¹ y se ha sugerido la posibilidad de que TYR capte cobre en este compartimento,⁷⁸ el primer orgánulo donde se detecta actividad dopa oxidasa es el TGN,^{72,82} donde el transporte de cobre se realiza por la acción de las proteínas de las enfermedades de Menkes y Wilson, dos ATPasas de tipo P⁸³ cuyas mutaciones causan desórdenes hipopigmentantes. Además, se ha confirmado la participación de la proteína de Menkes en la entrega de cobre a tirosinasa.⁸⁴

Por tanto, lo más probable es que Tyr adquiriera una conformación capaz de captar cobre con alta afinidad antes de llegar al Golgi. Además, la unión de cobre y la maduración completa de la proteína parecen ser acontecimientos independientes, en vista de los resultados obtenidos con el mutante de Tyr H390Q. Este mutante no tiene ninguna actividad enzimática debido a que no puede quelatar el cobre porque carece de uno de los ligandos imidazólicos del sitio CuB. Sin embargo, se procesa al menos parcialmente a una forma madura resistente a Endo H (Figura 27), y en niveles muy semejantes a los de otros mutantes del CuB que conservaban un alto porcentaje de actividad residual, lo que también sugiere que no hay una relación directa y estricta entre pérdida de actividad enzimática TH y retención de la proteína en RE.

La construcción CstB, junto con el resto de mutantes diseñados para eliminar el secúnculo del sitio CuB, nos permitió estudiar la relación entre la ocupación de dicha posición de glicosilación, adquisición de cobre y salida del RE al Golgi. El secúnculo ³⁷¹NGT³⁷³ estaba

ocupado en la enzima silvestre, así como en el CstB, como confirma el desplazamiento en las movilidades electroforéticas de las formas $\Delta 6$ -Tyr y $\Delta 6$ -CstB. La ocupación de este secuón había sido descrita por otros autores en Tyr expresada en células CHO,⁶⁸ y es muy probable que esté también ocupado *in vivo*, en un entorno melanocítico.^{77,85} De hecho, nuestros resultados acerca de la ocupación de la totalidad de los secuones disponibles en células de melanoma de ratón B16 confirman este punto. Más sorprendente fue que la mutación N371Q generada en el entorno del CstB también diera lugar a una proteína de mayor movilidad electroforética que el propio CstB, lo que indica que el secuón ³⁷¹NGT³⁷³ también está ocupado en esta quimera. Por tanto, esta posición no parece ser uno de los sitios dependientes de conformación postulados a partir del comportamiento electroforético de las quimeras Tyr(A)/Tyrp1(B) y Tyrp1(A)/Tyr(B).

En cuanto a la maduración y actividad enzimática de las proteínas con la mutación N371Q, $\Delta 6$ -Tyr se procesó a una forma madura resistente a Endo H aproximadamente en la misma medida que Tyr, y presentó niveles considerables de actividad residual TH y DO. Un aspecto de particular relevancia es que los valores de $V_{m\acute{a}x}$ de las dos enzimas, Tyr y $\Delta 6$ -Tyr, estaban dentro del mismo rango, lo que apoya la idea de que ambas formas unen cobre en un grado similar, pues una hipotética carga inferior en el caso de $\Delta 6$ -Tyr disminuiría significativamente su $V_{m\acute{a}x}$. Además, los valores de K_M para la actividad TH también fueron comparables, lo que prueba que la presencia de una cadena de carbohidrato en esa posición no tiene un efecto importante sobre la afinidad por el sustrato L-tirosina. Por tanto, no es necesario que el secuón ³⁷¹NGT³⁷³ esté ocupado para que la glicoproteína sea capaz de adquirir una conformación que permita su salida del RE, así como la maduración de los glicanos a formas complejas resistentes a Endo H, unión del cofactor metálico y posesión de actividad enzimática. Es interesante destacar que la mutación natural consistente en un cambio de T a K en la posición 373 de TYR también anula la glicosilación de este secuón y se asocia con OCA I y con un procesamiento aberrante de la proteína mutada.^{85,86} Por tanto, la mutación T373K de TYR tiene un efecto más grave que el cambio N371Q en Tyr, a pesar de que ambas anulan la glicosilación de la misma posición que sí está ocupada en la proteína silvestre. Por lo tanto, esta mayor repercusión funcional podría estar más relacionada con el cambio específico de aminoácido que con la mera pérdida de glicosilación del secuón.

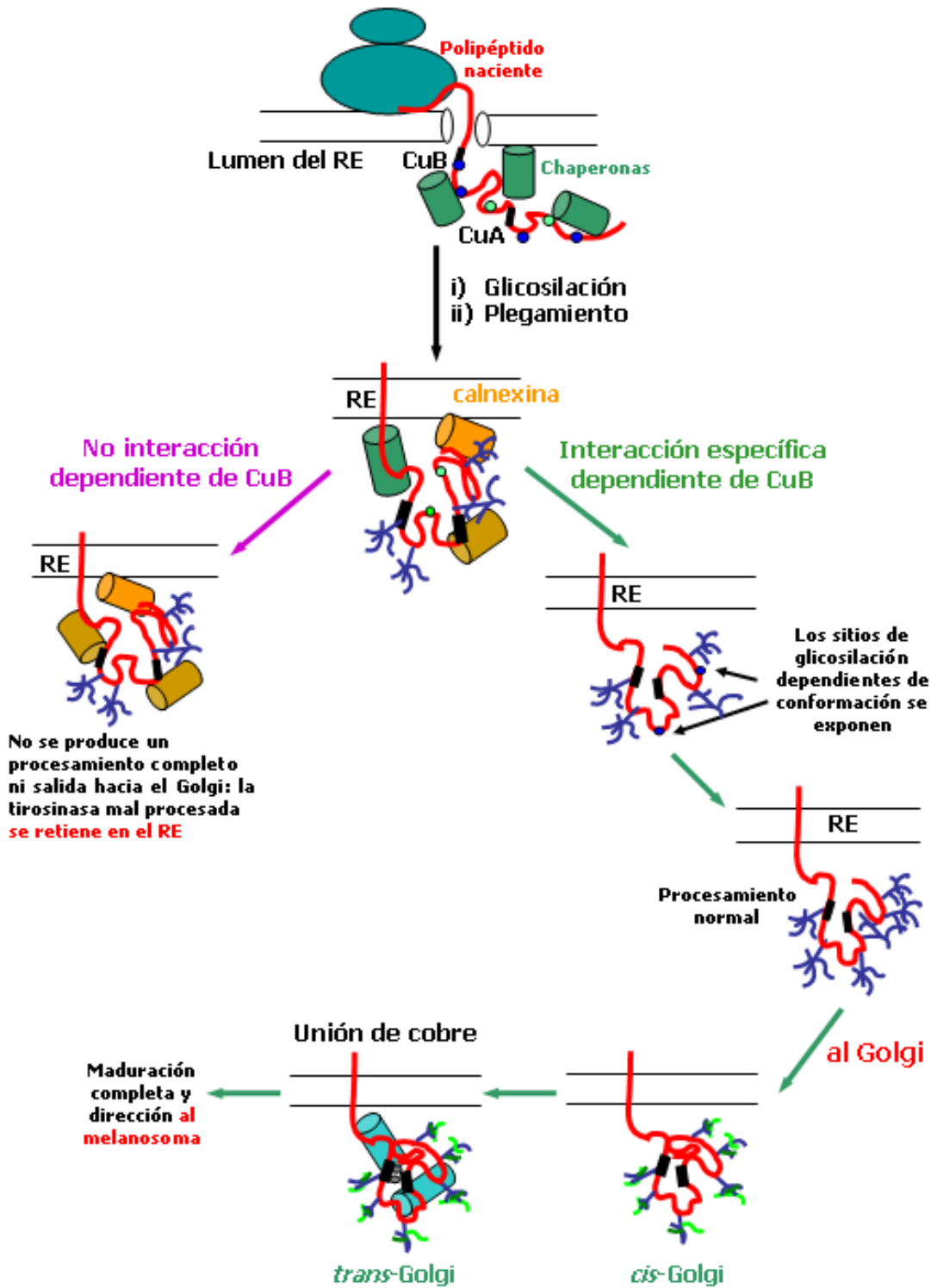


Figura 41. Modelo de N-glicosilación y plegamiento de tirosinasa. Los puntos azules del polipéptido representan los secuencias de glicosilación expuestas y los verdes los no expuestos (dependientes de conformación). La interacción intramolecular en la que participa CuB provocaría un cambio conformacional tal que estos últimos secuencias quedarían en zonas de la periferia más accesibles y se ocuparían, permitiendo el progreso de la glicoproteína al Golgi para su completa maduración, adquisición de cobre y dirección al melanosoma. Nótese que las posiciones de los secuencias de ocupación dependiente de conformación son arbitrarias, ya que de nuestro estudio sólo se desprende que son dos y que el situado en el sitio CuB no es uno de ellos.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo, de forma congruente con los obtenidos simultáneamente por otros autores, sugieren un modelo para el plegamiento *in vivo* de Tyr en el que la molécula presenta cuatro secuencias de N-glicosilación cuya ocupación es independiente de la conformación, y probablemente co-traduccionales (Figura 41). Uno de estos sitios debe ser el ³⁷¹NGT³⁷³ del sitio CuB, altamente conservado. La interacción específica entre las regiones peptídicas de unión de cobre CuA y CuB asistida por chaperonas generaría un centro activo sin cobre pero capaz de unir sustratos. Además, este cambio conformacional permitiría la ocupación de dos nuevos sitios de glicosilación dependientes de conformación. La apoenzima plegada saldría del RE y uniría el cofactor metálico en el TGN. Las mutaciones que impiden esta interacción intramolecular que crea el centro activo causarían, por tanto, un procesamiento incorrecto y la retención de la proteína en el RE. Por el contrario, aquellas compatibles con el cambio conformacional promovido por esta interacción intramolecular permitirían el tráfico del RE al Golgi, independientemente del grado de actividad enzimática residual.

BIBLIOGRAFÍA DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Jimenez-Cervantes, C., Garcia-Borron, J. C., Valverde, P., Solano, F. y Lozano, J. A. (1993) Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes. 1. Biochemical characterization of two melanosomal tyrosinases from B16 mouse melanoma. *Eur. J. Biochem.* **217** (2), 549-556.
2. Laskin, J. D. y Piccinini, L. A. (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem.* **261** (35), 16626-16635.
3. Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. A. y Garcia-Borron, J. C. (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6- dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase- related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.* **269** (27), 17993-18001.
4. Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jimenez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., Garcia-Borron, J. C. y Hearing, V. J. (1994) Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J* **13** (24), 5818-5825.
5. Boissy, R. E., Sakai, C., Zhao, H., Kobayashi, T. y Hearing, V. J. (1998) Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. *Exp Dermatol* **7** (4), 198-204.
6. Wilczek, A. y Mishima, Y. (1995) Inhibitory effects of melanin monomers, dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) and dihydroxyindole (DHI) on mammalian tyrosinase, with a special reference to the role of DHICA/DHI ratio in melanogenesis. *Pigment Cell Res* **8** (2), 105-112.
7. Eberle, J., Garbe, C., Wang, N. y Orfanos, C. E. (1995) Incomplete expression of the tyrosinase gene family (tyrosinase, TRP-1, and TRP-2) in human malignant melanoma cells in vitro. *Pigment Cell Res* **8** (6), 307-313.
8. Jimenez-Cervantes, C., Valverde, P., Garcia-Borron, J. C., Solano, F. y Lozano, J. A. (1993) Improved tyrosinase activity stains in polyacrylamide electrophoresis gels. *Pigment Cell Res* **6** (6), 394-399.
9. del Marmol, V., Ito, S., Jackson, I., Vachtenheim, J., Berr, P., Ghanem, G., Morandini, R., Wakamatsu, K. y Huez, G. (1993) TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. *FEBS Lett* **327** (3), 307-310.
10. Jimenez, M., Tsukamoto, K. y Hearing, V. J. (1991) Tyrosinases from two different loci are expressed by normal and by transformed melanocytes. *J. Biol. Chem.* **266** (2), 1147-1156.
11. Bu'Lock, J. D. (1960) Intermediates of melanin formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **91** 189-193.
12. Winder, A. J. y Harris, H. (1991) New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **198** (2), 317-326.

13. Lerch, K. (1983) Neurospora tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol Cell Biochem* **52** (2), 125-138.
14. Cooksey, C. J., Garratt, P. J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A. y Smit, N. P. (1997) Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **272** (42), 26226-26235.
15. Riley, P. A. (1999) The great DOPA mystery: the source and significance of DOPA in phase I melanogenesis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45** (7), 951-960.
16. Chakraborty, A. K., Platt, J. T., Kim, K. K., Kwon, B. S., Bennett, D. C. y Pawelek, J. M. (1996) Polymerization of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin by the pmel 17/silver locus protein. *Eur. J. Biochem.* **236** (1), 180-188.
17. Lee, Z. H., Hou, L., Moellmann, G., Kuklinska, E., Antol, K., Fraser, M., Halaban, R. y Kwon, B. S. (1996) Characterization and subcellular localization of human Pmel 17/silver, a 110-kDa (pre)melanosomal membrane protein associated with 5,6,- dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) converting activity. *J. Invest. Dermatol.* **106** (4), 605-610.
18. Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Beermann, F., Aparicio, P., Lozano, J. A. y Garcia-Borron, J. C. (1997) Transforming growth factor-beta 1 inhibits basal melanogenesis in B16/F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1. *J. Biol. Chem.* **272** (7), 3967-3972.
19. Ito, S. y Wakamatsu, K. (1989) Melanin chemistry and melanin precursors in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **92** (5), 261S-265S.
20. Ozeki, H., Ito, S., Wakamatsu, K. y Hirobe, T. (1995) Chemical characterization of hair melanins in various coat-color mutants of mice. *J. Invest. Dermatol.* **105** (3), 361-366.
21. Wilczek, A., Kondoh, H. y Mishima, Y. (1996) Composition of mammalian eumelanins: analyses of DHICA-derived units in pigments from hair and melanoma cells. *Pigment Cell Res* **9** (2), 63-67.
22. Ito, S. (1986) Reexamination of the structure of eumelanin. *Biochim Biophys Acta* **883** (1), 155-161.
23. Aroca, P., Solano, F., Salinas, C., Garcia-Borron, J. C. y Lozano, J. A. (1992) Regulation of the final phase of mammalian melanogenesis. The role of dopachrome tautomerase and the ratio between 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid and 5,6-dihydroxyindole. *Eur. J. Biochem.* **208** (1), 155-163.
24. Palumbo, A., D'Ischia, M. y Prota, G. (1987) Tyrosinase-promoted oxidation of 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin. Isolation and characterization of oligomer intermediates. *Tetrahedron* **43** (18), 4203-4206.

25. Orlow, S. J., Osber, M. P. y Pawelek, J. M. (1992) Synthesis and characterization of melanins from dihydroxyindole-2-carboxylic acid and dihydroxyindole. *Pigment Cell Res* **5** (3), 113-121.
26. Aroca, P., Garcia-Borron, J. C., Solano, F. y Lozano, J. A. (1990) Regulation of mammalian melanogenesis. I: Partial purification and characterization of a dopachrome converting factor: dopachrome tautomerase. *Biochim Biophys Acta* **1035** (3), 266-275.
27. Tsukamoto, K., Jackson, I. J., Urabe, K., Montague, P. M. y Hearing, V. J. (1992) A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPACHrome tautomerase. *EMBO J* **11** (2), 519-526.
28. Bernd, A., Ramirez-Bosca, A., Kippenberger, S., Martinez-Liarte, J. H., Holzmann, H. y Solano, F. (1994) Levels of dopachrome tautomerase in human melanocytes cultured in vitro. *Melanoma Res* **4** (5), 287-291.
29. Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D. C. y Hearing, V. J. (1998) Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). *J. Biol. Chem.* **273** (48), 31801-31805.
30. Zhao, H., Zhao, Y., Nordlund, J. J. y Boissy, R. E. (1994) Human TRP-1 has tyrosine hydroxylase but no dopa oxidase activity. *Pigment Cell Res* **7** (3), 131-140.
31. Jimenez-Cervantes, C., Martinez-Esparza, M., Solano, F., Lozano, J. A. y Garcia-Borron, J. C. (1998) Molecular interactions within the melanogenic complex: formation of heterodimers of tyrosinase and TRP1 from B16 mouse melanoma. *Biochem Biophys Res Commun* **253** (3), 761-767.
32. Prota, G. (1992) *Melanins and melanogenesis*. Academic Press, New York, pp. 1-290.
33. Lowery, M. D. y Solomon, E. I. (1993) Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science* **259** (5101), 1575-1581.
34. Toyofuku, K., Wada, I., Spritz, R. A. y Hearing, V. J. (2001) The molecular basis of oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): sorting failure and degradation of mutant tyrosinases results in a lack of pigmentation. *Biochem J* **355** (2), 259-269.
35. Toyofuku, K., Wada, I., Hirosaki, K., Park, J. S., Hori, Y. y Jimbow, K. (1999) Promotion of tyrosinase folding in COS 7 cells by calnexin. *J Biochem (Tokyo)* **125** (1), 82-89.
36. Himmelwright, R. S., Eickman, N. C., Lubien, C. D., Lerch, K. y Solomon, E. I. (1980) Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: Comparison to hemocyanins. *J Am Chem Soc* **102** (24), 7339-7344.
37. Solomon, E. I. y Lowery, M. D. (1993) Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science* **259** (5101), 1575-1581.

38. Oetting, W.S. (1998) Anatomy of pigment cell genes acting at the subcellular level. En: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. y Ortonne, J.P., Eds. Oxford Univ. Press, NY, USA, pp. 231-249.
39. Oetting, W. S. y King, R. A. (1999) Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum Mutat* **13** (2), 99-115.
40. Jackson, I. J., Chambers, D. M., Tsukamoto, K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. y Hearing, V. (1992) A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J* **11** (2), 527-535.
41. Kroumpouzou, G., Urabe, K., Kobayashi, T., Sakai, C. y Hearing, V. J. (1994) Functional analysis of the slaty gene product (TRP2) as dopachrome tautomerase and the effect of a point mutation on its catalytic function. *Biochem Biophys Res Commun* **202** (2), 1060-1068.
42. Solano, F., Jimenez-Cervantes, C., Martinez-Liarte, J. H., Garcia-Borron, J. C., Jara, J. R. y Lozano, J. A. (1996) Molecular mechanism for catalysis by a new zinc-enzyme, dopachrome tautomerase. *Biochem J* **313** (2), 447-453.
43. Bubacco, L., Salgado, J., Tepper, A. W., Vijgenboom, E. y Canters, G. W. (1999) ¹H NMR spectroscopy of the binuclear Cu(II) active site of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *FEBS Lett* **442** (2-3), 215-220.
44. Huber, M. y Lerch, K. (1988) Identification of two histidines as copper ligands in *Streptomyces glaucescens* tyrosinase. *Biochemistry* **27** (15), 5610-5615.
45. Pomerantz, S. H. (1966) The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **241** (1), 161-168.
46. Pomerantz, S. H. y Warner, M. C. (1967) 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine as the tyrosinase cofactor. Occurrence in melanoma and binding constant. *J. Biol. Chem.* **242** (22), 5308-5314.
47. Hearing, V. J. y Ekel, T. M. (1976) Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem J* **157** (3), 549-557.
48. Jara, J. R., Solano, F. y Lozano, J. A. (1988) Assays for mammalian tyrosinase: a comparative study. *Pigment Cell Res* **1** (5), 332-339.
49. Espin, J. C., Garcia-Ruiz, P. A., Tudela, J. y Garcia-Canovas, F. (1998) Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase. *Biochem J* **331** (2), 547-551.
50. Spritz, R. A., Ho, L., Furumura, M. y Hearing, V. J. J. (1997) Mutational analysis of copper binding by human tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* **109** (2), 207-212.
51. Berson, J. F., Frank, D. W., Calvo, P. A., Bieler, B. M. y Marks, M. S. (2000) A common temperature-sensitive allelic form of human tyrosinase is retained in

- the endoplasmic reticulum at the nonpermissive temperature. *J. Biol. Chem.* **275** (16), 12281-12289.
52. Tsai, T. Y. y Lee, Y. H. W. (1998) Roles of Copper Ligands in the Activation and Secretion of Streptomyces Tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **273** (30), 19243-19250.
 53. Lerner, A. B., Fitzpatrick, T. B., Calkins, E. y Summerson, W. H. (1950) Mammalian tyrosinase. The relationship of copper to enzymatic activity. *J Biol Chem* **187** 793-802.
 54. Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C. y Krebs, B. (1998) Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol* **5** (12), 1084-1090.
 55. Tripathi, R. K., Hearing, V. J., Urabe, K., Aroca, P. y Spritz, R. A. (1992) Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **267** (33), 23707-23712.
 56. Winkler, M. E., Lerch, K. y Solomon, E. I. (1981) Competitive inhibitor binding to the binuclear copper active site in tyrosinase. *J Am Chem Soc* **103** (23), 7001-7003.
 57. Espin, J. C., Varon, R., Fenoll, L. G., Gilabert, M. A., Garcia-Ruiz, P. A., Tudela, J. y Garcia-Canovas, F. (2000) Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **267** (5), 1270-1279.
 58. van Gastel, M., Bubacco, L., Groenen, E. J., Vijgenboom, E. y Canters, G. W. (2000) EPR study of the dinuclear active copper site of tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *FEBS Lett* **474** (2-3), 228-232.
 59. Devi, C. C., Tripathi, R. K. y Ramaiah, A. (1987) pH-dependent interconvertible allosteric forms of murine melanoma tyrosinase. Physiological implications. *Eur. J. Biochem.* **166** (3), 705-711.
 60. Naish-Byfield, S. y Riley, P. A. (1998) Tyrosinase autoactivation and the problem of the lag period. *Pigment Cell Res* **11** (3), 127-133.
 61. Lerner, A. B., Fitzpatrick, T. B., Calkins, E. y Summerson, W. H. (1949) Mammalian tyrosinase: preparation and properties. *J. Biol. Chem.* **178** 185-195.
 62. Prota, G., d'Ischia, M. y Napolitano, A. (1998) The chemistry of melanins and related metabolites. En: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. y Ortonne, J.P., Eds. Oxford Univ. Press, NY, USA, pp. 307-332.
 63. Longa, S. D., Ascone, I., Bianconi, A., Bonfigli, A., Castellano, A. C., Zarivi, O. y Miranda, M. (1996) The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **271** (35), 21025-21030.

64. Toyofuku, K., Wada, I., Valencia, J. C., Kushimoto, T. O., Ferrana, V. J. y Hearing, V. J. (2001) Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Tyrp1 can affect the processing of both mutant and wild-type proteins. *FASEB J* **15** (12), 2149-2161.
65. Halaban, R., Svedine, S., Cheng, E., Smicun, Y., Aron, R. y Hebert, D. N. (2000) Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** (11), 5889-5894.
66. Chen, K., Manga, P. y Orlow, S. J. (2002) Pink-eyed dilution protein controls the processing of tyrosinase. *Mol. Biol. Cell* **13** (6), 1953-1964.
67. Beermann, F., Orlow, S. J., Boissy, R. E., Schmidt, A., Boissy, Y. L. y Lamoreux, M. L. (1995) Misrouting of tyrosinase with a truncated cytoplasmic tail as a result of the murine platinum (cp) mutation. *Exp Eye Res* **61** (5), 599-607.
68. Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A. J., Garman, E. F., Platt, F. M., Wormald, M. R., Dwek, R. A. y Petrescu, S. M. (2000) Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J. Biol. Chem.* **275** (11), 8169-8175.
69. Spritz, R. A., Strunk, K. M., Giebel, L. B. y King, R. A. (1990) Detection of mutations in the tyrosinase gene in a patient with type IA oculocutaneous albinism. *N. Engl. J. Med.* **322** (24), 1724-1728.
70. Wang, Y. y Androlewicz, M. J. (2000) Oligosaccharide trimming plays a role in the endoplasmic reticulum-associated degradation of tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* **271** (1), 22-27.
71. Parodi, A. J. (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **69** (1), 69-93.
72. Halaban, R., Cheng, E., Zhang, Y., Moellmann, G., Hanlon, D., Michalak, M., Setaluri, V. y Hebert, D. N. (1997) Aberrant retention of tyrosinase in the endoplasmic reticulum mediates accelerated degradation of the enzyme and contributes to the dedifferentiated phenotype of amelanotic melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (12), 6210-6215.
73. García-Borrón, J. C. y Solano, F. (2002) Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res* **15** (3), 162-173.
74. Ohkura, T., Yamashita, K., Mishima, Y. y Kobata, A. (1984) Purification of hamster melanoma tyrosinases and structural studies of their asparagine-linked sugar chains. *Arch Biochem Biophys* **235** (1), 63-77.
75. Petrescu, S. M., Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A. J. y Dwek, R. A. (2000) Tyrosinase and glycoprotein folding: roles of chaperones that recognize glycans. *Biochemistry* **39** (18), 5229-5237.
76. Petrescu, S. M., Petrescu, A. J., Titu, H. N., Dwek, R. A. y Platt, F. M. (1997) Inhibition of N-glycan processing in B16 melanoma cells results in

- inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome. *J. Biol. Chem.* **272** (25), 15796-15803.
77. Xu, Y., Bartido, S., Setaluri, V., Qin, J., Yang, G. y Houghton, A. N. (2001) Diverse roles of conserved asparagine-linked glycan sites on tyrosinase family glycoproteins. *Exp Cell Res* **267** (1), 115-125.
 78. Halaban, R., Cheng, E., Svedine, S., Aron, R. y Hebert, D. N. (2001) Proper folding and endoplasmic reticulum to Golgi transport of tyrosinase are induced by its substrates, DOPA and tyrosine. *J. Biol. Chem.* **276** (15), 11933-11938.
 79. Ujvari, A., Aron, R., Eisenhaure, T., Cheng, E., Parag, H. A., Smicun, Y., Halaban, R. y Hebert, D. N. (2001) Translation rate of human tyrosinase determines its N-linked glycosylation level. *J. Biol. Chem.* **276** (8), 5924-5931.
 80. Harrison, M. D., Jones, C. E., Solioz, M. y Dameron, C. T. (2000) Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci* **25** (1), 29-32.
 81. Bingham, M. J., Burchell, A. y McArdle, H. J. (1995) Identification of an ATP-dependent copper transport system in endoplasmic reticulum vesicles isolated from rat liver. *J. Physiol.* **482** (3), 583-587.
 82. Negroiu, G., Branza-Nichita, N., Costin, G. E., Titu, H., Petrescu, A. J., Dwek, R. A. y Petrescu, S. M. (1999) Investigation of the intracellular transport of tyrosinase and tyrosinase related protein (TRP)-1. The effect of endoplasmic reticulum (ER)-glucosidases inhibition. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45** (7), 1001-1010.
 83. Lutsenko, S. y Kaplan, J. H. (1995) Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry* **34** (48), 15607-15613.
 84. Petris, M. J., Strausak, D. y Mercer, J. F. (2000) The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum. Mol. Genet.* **9** (19), 2845-2851.
 85. Park, H. Y., Perez, J. M., Laursen, R., Hara, M. y Gilchrist, B. A. (1999) Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **274** (23), 16470-16478.
 86. Lee, S. T., Nicholls, R. D., Bundey, S., Laxova, R., Musarella, M. y Spritz, R. A. (1994) Mutations of the P gene in oculocutaneous albinism, ocular albinism, and Prader-Willi syndrome plus albinism. *N. Engl. J. Med.* **330** (8), 529-534.

CONCLUSIONES

1. Las actividades catalíticas de las enzimas melanogénicas Tyr y Tyrp1 de ratón y TYR y TYRPP1 humanas son diferentes: TYR es capaz de catalizar el consumo de DHICA, mientras que Tyr no (la oxidación de DHICA la realiza Tyrp1 en ratón). Esta actividad DHICA convertasa de TYR es una actividad oxidasa, de modo que la reacción conduce a la formación de melaninas.
2. De las dos histidinas del par $^{389}\text{HH}^{390}$, situado al final de la segunda secuencia consenso de unión a cobre de tirosinasa human y de ratón (sitio CuB), es la histidina H390, y no la H389, la que constituye el auténtico tercer ligando del cobre.
3. Las dos regiones peptídicas de unión a cobre son estéricamente diferentes, por lo que la unión de los sustratos mono- y difenólicos al centro activo es diferencial. Parece descartada la existencia de un puente endógeno entre los dos cobres, propuesto anteriormente.
4. H389 participa en la interacción estereoespecífica con el grupo carboxilo del sustrato difenólico en el ciclo catecol oxidasa (o dopa oxidasa), pero parece no interactuar con dicho grupo en los sustratos monofenólicos. En base a esto, se propone una modificación del ciclo catalítico propuesto por Lerch *et al.* (1983) que permite explicar algunas diferencias entre las actividades TH y DO hasta ahora no justificadas.
5. La glicosilación del secunón situado en el sitio CuB y la unión de cobre **no** son condiciones *sine qua non* para que se produzca la maduración de tirosinasa y el procesamiento posterior al retículo endoplásmico.
6. El sitio MeA de Tyrp1, en el contexto de Tyr, es capaz de unir cobre y realizar las actividades enzimáticas de tirosinasa.
7. En la tirosinasa de ratón se encuentran ocupados seis sitios de N-glicosilación, es decir, el total de los secunones potenciales presentes en su secuencia, tanto en células B16 como en sistemas de expresión heterólogos como las células HEK293T.
8. Tirosinasa contiene dos secunones cuya ocupación es post-traducciona y dependiente de conformación. Éste es uno de los escasos ejemplos de este tipo de N-glicosilación descritos en la literatura hasta el momento que cuestiona el modelo de glicosilación lineal que tiene lugar cuando el polipéptido naciente entra al RE.

9. Para que tenga lugar el plegamiento de la proteína a una conformación competente con la glicosilación completa de la enzima y su tránsito del retículo endoplásmico al aparato de Golgi, es necesario que se produzca una interacción altamente específica entre la zona CuB y elementos estructurales que probablemente se encuentran en la región N-terminal de la proteína, muy probablemente el CuA.

SUMMARY

1. INTRODUCTION.

Melanogenesis is the biochemical pathway responsible for melanin synthesis. It is a complex pathway involving both enzymatic steps and chemical reactions, which, in mammals, is restricted to melanosomes, a melanocyte-specific organelle. At least three related and highly similar metalloenzymes, tyrosinase (called **Tyr** throughout this work) and the tyrosinase-related proteins (Tyrs) 1 and 2, are involved in the catalytic control of the process. Their cDNAs have been cloned and sequenced^{1,2,3,4,5} and the genes mapped to the mouse *albino*, *brown* and *slaty* loci, respectively. The melanogenic pathway starts with the Tyr-catalyzed conversion of L-tyrosine into L-dopaquinone (L-DQ), so that mutations in the *Tyr* gene are associated with type I human oculocutaneous albinism (OCA1).⁶ The reaction involves two consecutive steps, the rate limiting hydroxylation of L-tyrosine to L-dopa and the oxidation of this intermediate o-diphenol to yield L-DQ. It has been proposed that Tyr catalyses the direct transformation of L-tyrosine into L-DQ in a single step without the release of L-dopa.^{7,8} L-DQ is a reactive intermediate that, in the absence of thiol compounds, spontaneously undergoes cyclization and further rearrangement yielding L-dopachrome.⁹ Tyrp2, also called dopachrome tautomerase (Dct), catalyses the tautomerization of dopachrome into the more stable intermediate 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA).^{10,11} Alternatively, spontaneous decarboxylation of dopachrome yields 5,6-dihydroxyindole (DHI).^{10,11}

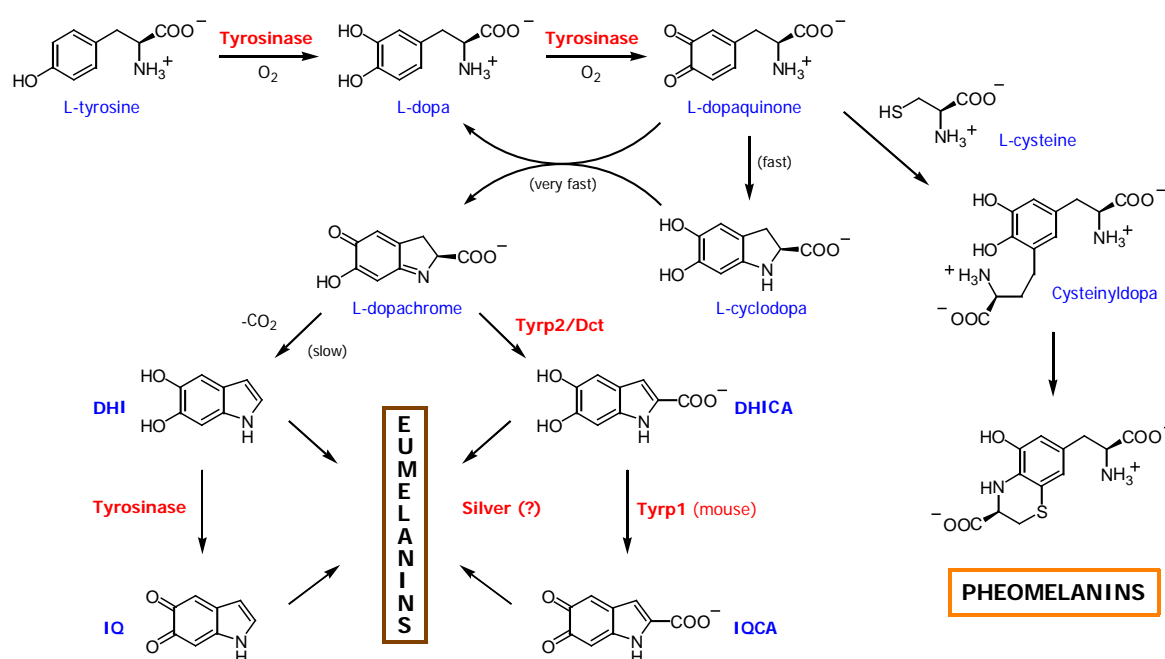


Figure 1. Melanogenic pathway in mammals.

Although the enzymatic function(s) of Tyrp1 is still somewhat controversial, the protein purified from mouse melanocytes has been reported to be a low specific activity Tyr isozyme with both tyrosine hydroxylase (**TH**) and dopa oxidase (**DO**) activities,^{12,13} that catalyses the oxidation of DHICA^{14,15} thus promoting its incorporation into the eumelanin polymer. Pheomelanins are synthesized when thiol compounds, such as cysteine, react with L-DQ and are included into the polymer (Figure 1).¹⁶

Sequence comparison of Tyr, Tyrp1 and Dct reveals that the three proteins share many key structural features, due to their common origin from a single ancestral gene. They display a single membrane-spanning fragment near their C-terminus and two very similar metal ion binding sites. They also undergo post-translational processing, including several N-glycosylation steps (in highly conserved N-glycosylation sites¹⁷) that appear to be crucial for acquisition of full enzymatic activity.¹⁸ However, in spite of their extensive sequence similarity (40% amino acid identities and approximately 70% amino acid homologies), these proteins show remarkable differences in their metal ion binding and enzymatic properties, at least in the murine system,¹² where the enzymatic capabilities of the melanogenic enzymes are better characterised. Therefore, the Tyr family is an excellent model to study structure-function relationships as well as the molecular basis of divergent functional evolution.

In order to study these structure-function relationships in mammalian melanogenic enzymes, we have focused on three related aspects of this family of proteins, which will be introduced before stating the aims of the work.

1.1. Comparison between the human and the murine melanogenic enzymes.

Some of the reported studies on the kinetic properties of the human melanogenic enzymes, performed either with relatively crude extracts or with purified enzyme preparations, pointed out important similarities between the mouse and human melanogenic enzymes.^{19,20} Therefore, it has been generally assumed that their kinetic behaviour should be very similar,²¹ and results obtained with the murine model are often extrapolated to human melanocytes. However, recent data suggest that the catalytic properties of the human and mouse melanogenic enzymes could display some differences. For instance, affinity-purified TYRP1 appears to possess TH, but not DO activity.²² Interestingly, it has been recently reported that TYRP1 seems also unable to oxidise DHICA.²³ Accordingly, the human protein might share the TH activity with the mouse enzyme, but might miss the o-diphenol and dihydroxyindole oxidase activities of murine Tyrp1.

On the other hand, DHICA monomers are actually incorporated into natural human melanin, and a DHICA converting activity has been attributed to human tyrosinase (TYR) expressed in fibroblasts, but this activity was determined from DHICA consumption experiments and the reaction product was not characterised. These observations raise the possibility that TYR might recognise and oxidise DHICA, accounting for its incorporation into the melanin biopolymer. In any case, the catalytic properties of human and mouse tyrosinases could display subtle differences, but a *vis-a-vis* comparison of the two enzymes, under identical experimental conditions, has not yet been performed.

1.2. Active site residues of mouse tyrosinase. Catalytic cycle.

Tyr contains a pair of antiferromagnetically coupled copper ions at the active site.²⁴ So far, authentic Tyr has not been crystallized, but some data based on the damage of His residues (H) after photoinactivation of fungal Tyr, the sequence similarity among Tyr and hemocyanins,^{25,24} and the recently available crystallographic data on a plant catechol oxidase²⁶ indicate that two H-rich regions named CuA and CuB are involved in binding of the two copper ions. Both sites are highly similar in Tyr and Tyrps, but the conservation is higher in the CuB site (Figure 2), thus suggesting that this region is particularly important for full enzymatic activity. Moreover, the involvement of human TYR CuA and CuB sites in copper binding has been demonstrated by site directed mutagenesis studies.²⁷

Both CuA and CuB sites contain three conserved H residues that cooperate in copper binding. By virtue of the folding of the protein, both sites are adjacent and form the binuclear enzyme's active site. In spite of their similar role, the two sites are quite different in that CuA has a H-x(n)-H-x(8)-H motif whereas CuB has a H-x(3)-H-x(n)-HH motif. In both cases, the distances between two of the H ligands are constant, whereas the position of the third H is variable. The situation is further complicated by the presence in the CuB site of Tyr, but not of the Tyrps, of a fourth H residue, vicinal to the third one. Therefore, according to the consensus sequence of the CuB site, the nature of the two firsts H residues involved in CuB binding is clear, but there are some doubts as to which one of the two vicinal H is the authentic third copper ligand. Recent mutagenesis studies on human TYR²⁷ would suggest that the first one (H389 in the mouse and human enzymes) is more directly involved in copper binding. More recently, Nakamura *et al.* proposed a new structure of the active site of *A. oryzae* Tyr, where each copper atom is in fact bound to 4 ligands.²⁸ CuA would be bound to 1 Cys and 3 His residues, and CuB would be bound to 4 H residues, including the two consecutive ones corresponding to H389 and H390 in mouse and human Tyr.

| | <u>1st metal binding site (MeA)</u> |
|--------------|---------------------------------------------------------------------|
| TYR | ¹⁸⁰ HYYVSMDALLG-GSEIWRDIDFAHEAPAFLLPWH ²¹² |
| Tyr | ¹⁸⁰ HYYVSRDTLLG-GSEIWRDIDFAHEAPGFLPWH ²¹² |
| Tyrp1 | ¹⁹² HYYSVKKTFLGTGQESFGDVDFSHEGPAFLTWH ²²⁵ |
| Tyrp2 | ¹⁹⁰ HYYSVRDTLLGPGRP-YKAIDFSHQGPAFVTWH ²²² |
| | <u>2nd metal binding site (MeB)</u> |
| TYR | ³⁶³ HNALHIY NGT MSQVQGSANDPIFLLHH ³⁹⁰ |
| Tyr | ³⁶³ HNALHIF MNGT MSQVQGSANDPIFLLHH ³⁹⁰ |
| Tyrp1 | ³⁷⁷ HNLHLFL NGT GGQTHLSPNDPIFVLLH ⁴⁰⁴ |
| Tyrp2 | ³⁷⁰ HNLHSFL NGT NALPHSAANDPVFVVLH ³⁹⁷ |

Figure 2. Alignment of the MeA and MeB binding sites (usually called CuA and CuB for tyrosinase) of human TYR and mouse Tyr, Tyrp1 and Tyrp2/Dct. The potential glycosylation site located in the CuB site and conserved in human and mouse Tyr and Tyrps is shown in bold (**NGT**).

Tyrp1 and Tyrp2/Dct display a **H-x(3)-H-x(n/2)-H-x(n/2)-LH** motif. Therefore, they have an additional fourth H located centrally between the first H pair and the last H. In mammalian Tyr, this central H is replaced by Q (Q378 in Figure 2). Since the distance to the third H ligand is variable, the central H residue is, on theoretical grounds, another potential metal ion ligand in Tyrps. Should this be the case, the residues involved in metal ion binding could be different in Tyr and the Tyrps, and this could account for the different metal specificity of the proteins.²⁹

Returning to the Tyr catalytic mechanism, in spite of the direct transformation of L-tyrosine into L-DQ, L-dopa is also an alternative substrate, and the reactions underlying tyrosine hydroxylation and dopa oxidation must differ. It has long been debated whether the hydroxylase and oxidase activities of Tyr share a common catalytic site. Both activities have been usually inseparable for most of researchers. However, several early studies pointed out subtle differences between both reactions,³⁰ suggesting different requirements at the reaction site. In this regard, the hydroxylase activity shows a characteristic lag period before the reaction reaches maximal rate,³¹ whose length increases with the concentration of L-tyrosine. L-dopa, the immediate product of L-tyrosine hydroxylation, is also a cofactor for this reaction, and catalytic amounts of the o-diphenol abrogate the lag period.³² The affinity of mammalian Tyr is about two orders of magnitude higher for L-dopa acting as cofactor for TH than as substrate for DO, suggesting that dopa might bind to two catalytic sites of the enzyme.³² The dual role of L-dopa as substrate for the DO activity but cofactor for the TH activity has greatly complicated the understanding of the Tyr mechanism of reaction. Current evidences suggest that although the enzyme would have a single binding site for L-tyrosine and L-

dopa, monophenol substrates would bind through different structural elements than o-diphenols.³³ Up to date, in summary, neither the structural determinants of the different metal ion binding and catalytic capabilities of Tyr and the Tyrps nor the residues involved in a possible differential interaction with monophenols and o-diphenols are adequately characterized.

1.3. Glycosylation of mouse tyrosinase.

Tyr and the Tyrps are transmembrane glycoproteins whose final destination is the melanosome. They undergo a complex post-translational processing before reaching the melanosomal membrane in their final catalytically active conformational state. In the mouse, Tyr processing includes N-glycosylation in at least four of the six available glycosylation sites.³⁴ TYR, displaying seven potential glycosylation sites, can appear as a protein with six or seven glycans, depending on the translation rate.³⁵ During its post-translational processing, the mammalian enzyme also undergoes movement from the ER to the Golgi apparatus, binding of copper to the CuA and CuB sites, and finally sorting to the melanosomes.

The importance of Tyr post-translational processing is highlighted by several observations. Aberrant processing is causally related to the depigmented phenotype of human melanomas.³⁶ Furthermore, OCA1 is associated with mutations in the *Tyr* gene,³⁷ and some forms of OCA1³⁸ and other pigmentary syndromes are accounted for by processing/trafficking defects.³⁹ In this respect it has recently been shown that OCA2, the most common form of albinism worldwide, results from mutations in the *pink-eyed dilution (p)* gene, whose protein contributes to correct processing of Tyr and to its traffic to the melanosome. Accordingly, correct processing and intracellular trafficking of Tyr seems to be critical to normal pigmentation.

According to current evidence, recently synthesized Tyr is retained by the ER quality control machinery until the proper conformation is acquired. Then, glycosylated and correctly folded Tyr is exported to the Golgi, where N-linked oligosaccharide chains are further processed, and copper is likely bound. One of the potential glycosylation sites, located in the CuB site, appears particularly relevant. It is conserved in human and mouse Tyr and Tyrps (Figure 2) and its glycosylation has been reported to correlate with proper cofactor binding and full enzymatic activity.³⁴ Moreover, a natural mutation destroying this glycosylation sequon results in OCA1.⁴⁰ Therefore, a critical step in pigmentation is the acquisition by tyrosinase of a conformation recognized positively by the ER quality control system, although the minimal structural requirements allowing for exit from the ER have not yet been identified for Tyr or for other melanosomal proteins.

1.4. Aims.

Bearing in mind the previous considerations, this work aimed at the characterization of:

- 1) Differences in substrate specificity between human and mouse tyrosinases. Particularly, we have studied the capability of TYR to oxidise DHICA as opposed to its murine counterpart.
- 2) The active site residues involved in substrate and metal cofactor binding and their implications to the catalytic cycle of mouse tyrosinase: by comparing the sequences of Tyr and Tyrp1 throughout the phylogenetic scale, we selected highly conserved residues, likely involved in copper or substrate binding in Tyr, which were mutated, and the kinetic properties of the mutants were studied.
- 3) Glycosylation of mouse tyrosinase as related to Tyrp1, and copper binding, folding and processing of Tyr, with emphasis on the role of the CuB glycosylation sequon.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES.

Reagents. The radioactive substrate L-[3,5-³H]-tyrosine, 51 Ci/mmol, was obtained from Amesham Pharmacia (England). DHICA was a gift from Prof. S. Ito (Fujita Health University, Japan). The α PEP1 and α PEP7 antisera, recognising the C-terminal cytosolic extension of mouse Tyrp1 and Tyr, respectively, were a kind gift from Dr. V. Hearing (NIH, USA). The goat polyclonal antibody against the carboxyl terminus of calnexin (α cnx) was from Santa Cruz Biotechnology (USA). Electrophoresis and Western blot materials were from BioRad (USA). Reagents and plasticware for cell culture were obtained from Nunc (Denmark), Gibco (USA) or TPP (Switzerland). Enzymes for DNA cleavage and modification were from Invitrogen (Spain) or Fermentas (USA). Endoglycosidase H (Endo H) and N-glycosidase F (PGNase F) were from Roche (Germany). Substrates, inhibitors and other reagents were from Sigma (USA), Merck (Germany) or Prolabo (Spain).

Cell culture and preparation of crude solubilized extracts. Human melanoma cells were grown in Ham's F12 supplemented with 1 % streptomycin, 1 % penicillin and 10 % fetal calf serum. These three lines, HBL, SCL and BEU, were originally established in the LOCE (Belgium) by Prof. G. Ghanem.^{41,42} B16 mouse melanoma cells were cultured as previously described.⁴³ HEK293T and COS7 cells were grown in RPMI-1640 and DMEM, respectively. B16 mouse melanoma tyrosinase was purified from solid tumours as previously described.¹² Transfections were performed with Superfect reagent (Qiagen, Germany), according to the manufacturer's instructions. Cells were harvested 20 h after transfection and solubilized in 10 mM sodium phosphate, pH 6.8, containing 1 % Igepal CA-630, 0.1 mM EDTA and 0.1 mM PMSF.

Enzyme activity determinations. Tyrosine hydroxylase activity was determined by a radiometric method described elsewhere.⁴⁴ Dopa oxidase activity was measured spectrophotometrically in the presence of 3-methyl-2-benzothiazolinone (MBTH), as described by Winder and Harris⁴⁵ with minor modifications. DHICA oxidase activity was determined by either one of three complementary methods: i) HPLC determination of DHICA consumption, ii) spectrophotometric quantitation of the formation of a coloured adduct of 5,6-indolequinone-2-carboxylic acid (IQCA) and MBTH, iii) spectral evolution of DHICA solutions in the UV/Vis range in the presence of enzyme extracts.¹⁴

Deglycosylation studies. The extracts were incubated at 37°C for 4 h in the presence of either 15 mU of endoglycosidase H (Endo H) or 2 U of N-glycosidase F (PGNase F) in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 10 mM EDTA and 0.1% SDS.

Electrophoretic and immunochemical procedures. Analytical SDS-PAGE was performed as described,¹² in 8-10% acrylamide gels under non reducing conditions and electrophoresis was run at 4°C to preserve tyrosinase activity. Samples were mixed with sample buffer 3x (0.18 M Tris-HCl, pH 6.8, 15% glycerol, 0.075% bromophenol blue, 9% SDS). A highly sensitive and specific DO activity stain was carried out by incubation at 37°C in L-dopa/MBTH.⁴⁶ For immunochemical detection of Tyr or Tyrp1, samples were mixed with the same sample buffer as above, but containing 2-mercaptoethanol, and heated at 95°C for 5 min before electrophoresis. Gels were transferred to PVDF membranes, and the specific α PEP7 or α PEP1 antiserum was used as previously described.⁴⁷ Staining of immunoreactive bands was mostly done with a chemiluminescent substrate from Amersham.

Immunoprecipitation. Cells were solubilized in 0.4 M KCl, 2% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer with protease inhibitors. 200 μ l of cell lysate ($\sim 2 \times 10^6$ cells) were precleared by incubation with 20 μ l of prewashed Protein G PLUS-agarose slurry (Santa Cruz Biotechnology), for 1 h on ice. Immunoprecipitation was then performed by incubating 2 μ g of α cnx with 20 μ l of Protein G slurry (1h at 4°C, continuous shaking), followed by addition of the precleared lysate and further incubation overnight at 4°C. Beads were washed 4 times with a 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 0.5 M KCl, 0.3 M NaCl and 0.05% Triton X-100. 20 μ l of 1.5x sample buffer for SDS-PAGE with 2-mercaptoethanol were added to the beads, and incubated 10 min at 95°C. Supernatants were processed for SDS-PAGE and Western blotting with α PEP7 as previously described.

Transient expression of human and mouse tyrosinase in HEK 293T cells. Expression constructs for human and mouse tyrosinases were prepared in the pcDNA3 expression vector (Invitrogen, The Netherlands). For mouse Tyr, cDNA from B16 cells was obtained as described elsewhere,⁴⁸ and amplified by PCR, using the proofreading *Pfu* polymerase (Stratagene, USA) and the primers mTyrFw and mTyrRv (Table 1). Amplification reactions yielded two products of different size, which were cloned into pBluescript KS II (Stratagene). The majority band, of higher molecular size, was identical to the published wild type (**wt**) sequence of the mouse enzyme.⁴⁹ The minority band, of smaller size, corresponded to an alternative splicing variant whose occurrence has been reported by others.⁵⁰ This form ($\Delta 3$ Tyr) lacks exon 3, thus generating a frameshift and a premature stop codon. Since the corresponding 390 amino acids product is enzymatically inactive, it was used as a negative control for all determinations of enzyme activity in

transfected cells. For human *TYR*, the pMEL34 construct,³ obtained from the ATCC (USA) was used as target in PCR reactions using primers hTyrFw and hTyrRv (Table 1). The cloned product matched exactly the sequence published for the *TYR* gene except for a C/A change at position 575 that corresponds to a yet described polymorphism.⁵¹ These genes were subcloned into pcDNA3 and used for transfection, as well as all mutants designed throughout this work.

| No. | Name | Bases (f/r) | SEQUENCE (5'→3') |
|-----|--------------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | mTyrFw | 30 (f) | TGAT <u>G</u> AATTCGAGAAAATGTTCTTGGCTGT (<i>EcoRI</i>) |
| 2 | mTyrRv | 30 (r) | GTTT <u>T</u> CTAGAATGTTACAGATGGCTCTGA (<i>XbaI</i>) |
| 3 | mTyrp1Fw | 32 (f) | GCT <u>G</u> AATTCAGAATGAAATCTTACAACGTCCT (<i>EcoRI</i>) |
| 4 | mTyrp1Rv | 32 (r) | GGGCACTAGTCTATCAGACCATGGAGTGGTTA (<i>SpeI</i>) |
| 5 | mTyrp2Fw | 29 (f) | TCCC <u>A</u> AGCTTGAAGGCATGGGCCTTGTGG (<i>HindIII</i>) |
| 6 | mTyrp2Rv | 28 (r) | AGGTA <u>C</u> TAGTATGCTAGGCTTCCTCCGT (<i>SpeI</i>) |
| 7 | hTyrFw | 30 (f) | GGACA <u>A</u> GCCTTAAGAATGCTCCTGGCTGTTT (<i>HindIII</i>) |
| 8 | hTyrRv | 30 (r) | GCCTCTAGACTTTTATAAATGGCTCTGATA (<i>XbaI</i>) |
| 9 | mQ378H | 21 (f) | GTACACGGATCGGCCAACGAT |
| 10 | mH389L | 21 (f) | CTTCTCCATGCTTTTGTGGAC |
| 11 | mH390Q | 21 (f) | CACCAGGCTTTTGTGGACAGT |
| 12 | mS192A | 20 (r) | TTTCAGCGCCCCAAGCAGT |
| 13 | mE193Q | 20 (r) | ATATTTGAGAGCCCCAAGC |
| 14 | mTyrQGT | 23 (f) | CTTTATGCAAGGAACAATGTCCC |
| 15 | mTyr.GG | 26 (r) | CCTGTA <u>C</u> TTGGCC <u>C</u> CTGTTCCATTC |
| 16 | mCstB-Tyrp1 | 20 (f) | CCTATTTTTGTCTTCTCCA |
| 17 | mCstB.MS | 28 (r) | AATGGGTTTGTGACATCGTTCCATTAG |
| 18 | mCstB.M.glic | 18 (r) | TCCATTCATGAAGAGGTG |
| 19 | mCstB.HH | 19 (r) | CAAAGCATGGTGGAGGAC |
| 20 | mCuAHindFw | 56 (f) | GAAAGCTTTGGGGACGTTGATTTTTCCCATGAAGGACC AGCGTTTCTGACTTGGC (<i>HindIII</i>) |
| 21 | mCuAHindRv | 66 (r) | CCAAAGCTTCTTGACCGGTCCCAAGGAATGTTTTCTT TACCGAATAGTAATGCATCCATACAAAG (<i>HindIII</i>) |
| 22 | mTyrp1QGT | 20 (f) | CCTCTTCTGCAAGGAACGG |

Table 1. Primers used throughout this study. The pairs used for the ORF of wt Tyr and Tyrps are numbers 1 to 8. The name of the oligo (beginning with **m** for mouse and **h** for human constructs and showing the amino acid change), the size (indicating if it is forward (f) or reverse (r)) and the 5'→3' sequence are shown in the table. Underlined sequences denote a restrictase site for cloning (name of the enzyme in brackets), the **start** and **stop** codons are in blue and red, respectively, and the modified bases to create a mutations are in bold (primers 9 to 22, except for 20 and 22, which have a special design).

Site directed mutagenesis and construction of chimeric products. For murine mutant species, fragments with point mutations were obtained by PCR. Each mutation was introduced with the appropriate primer mutated at the desired codon (Table 1). Concerning the chimeric constructs derived from *Tyr* and *Tyrp1* sequences, their structures are summarized in Figure 3. Regarding the Tyr(A)-Tyrp1(B) and Tyrp1(A)-Tyr(B) chimerae, we first abolished an existing *SphI* restriction site in the wt *Tyrp1* with a silent single base substitution within the target sequence and created a new *SphI* site immediately before the codon corresponding to the first His in CuB. A homologous restriction site is present at this position in wt *Tyr*, thus allowing for the fusion of the upstream and downstream portions of the *Tyr* and *Tyrp1* genes conserving the protein reading frames. The modified *Tyrp1* was cloned into pBlueScript KSII, and used to generate 5' *EcoRI-SphI* or 3' *SphI-XbaI* fragments, that were used to replace the homologous fragments of *Tyr*. The full-length chimerae were subsequently subcloned into pcDNA3. The CstA, CstB and CstAB chimerae were constructed by PCR, replacing the CuA, CuB or both sites from Tyr for the corresponding MeA and/or MeB from Tyrp1.

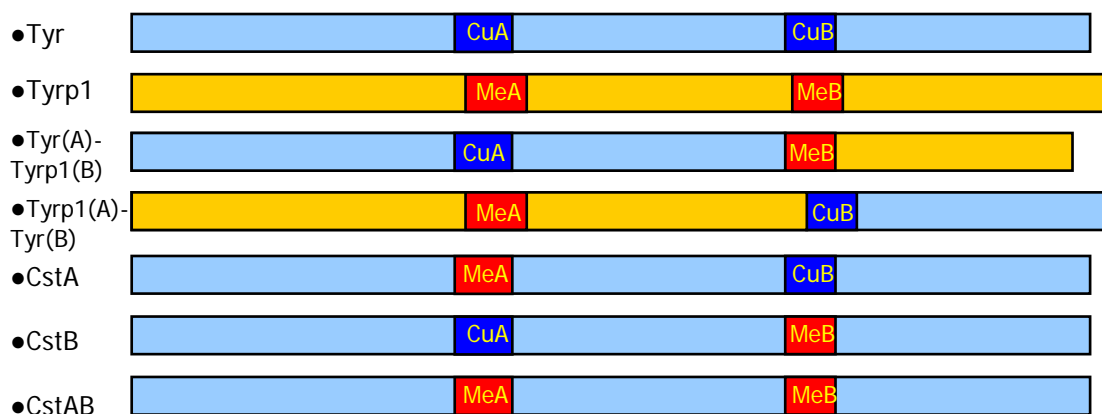


Figure 3. Chimeric constructs derived from *Tyr* and *Tyrp1*. The CuA, CuB, MeA and MeB regions comprise the amino acids between the first and the third His of each metal binding consensus (see Introduction, section 1.2). "Cst" stands for "cassette", since it refers to the interchange of the metal His-rich cassette between the two proteins.

3. RESULTS AND DISCUSSION.

3.1. HUMAN (BUT NOT MOUSE) TYR DISPLAYS DHICA OXIDASE ACTIVITY

i) Melanogenic activities in TYRP1 positive and negative human melanoma cells

Natural eumelanins are heterogeneous polymers containing monomeric units derived from both DHICA and DHI.⁵² The relative proportions of these monomers vary widely from one natural pigment to another.⁵³ The presence of a carboxyl group in DHICA-derived units is believed to have a strong effect on the properties of the pigment, so that DHICA-rich melanins might have a higher chelating capacity and they are thought to be smaller, more ordered and lighter in colour than DHI-rich pigments.^{54,55} Therefore, DHICA metabolism in mammalian melanocytes is physiologically relevant.

In mouse melanocytes, incorporation of DHICA into melanin is accounted for by oxidation to the corresponding quinone by Tyrp1.^{14,15} The situation is less clear in human melanocytes: in spite of extensive sequence similarity with its mouse counterpart, TYRP1 has been reported to lack DHICA oxidase activity²³ and a DHICA converting activity has been demonstrated for TYR,⁵⁶ suggesting that DHICA oxidation in human melanocytes can be accounted for by a TYRP1-independent, TYR-catalysed reaction.

Two alternative and complementary strategies to study TYR and TYRP1 substrate specificity and kinetic behaviour were used: i) comparison of the kinetics of the TYR and/or TYRP1 reactions in extracts from human melanoma cell lines expressing the complete set of melanogenic enzymes or defective in one or more of the proteins, a frequent situation in human melanoma cells, and ii) expression of the corresponding genes in non-melanocytic cells, to avoid of possible interferences from other melanogenic proteins.

We first checked that the three human melanoma cells lines (BEU, HBL and SCL) used in this study displayed significant levels of the TH, DO and Dct activities (data not shown) and confirmed at the protein and mRNA levels that although all these cell lines have been reported to express the *TYR* gene, BEU cells are TYRP1 negative.⁴² The occurrence of enzymatically active TYR was analysed by non-reducing SDS-PAGE followed by DO activity stain (Figure 4A),⁴⁶ and expression of TYRP1 protein was analysed by:

- a) Western blot with the α PEP1 antiserum (Figure 4B), yielding a protein of approximately 75 kDa in extracts from SCL and HBL cells but not from BEU cells.
- b) RT-PCR using primers designed to amplify the complete coding sequence of the gene (Figure 4C), where no amplification products were obtained with cDNA

synthesised from total RNA extracted from BEU cells, but an amplicon of expected size (~1.6 kb) was detected using cDNA from HBL cells as positive control.

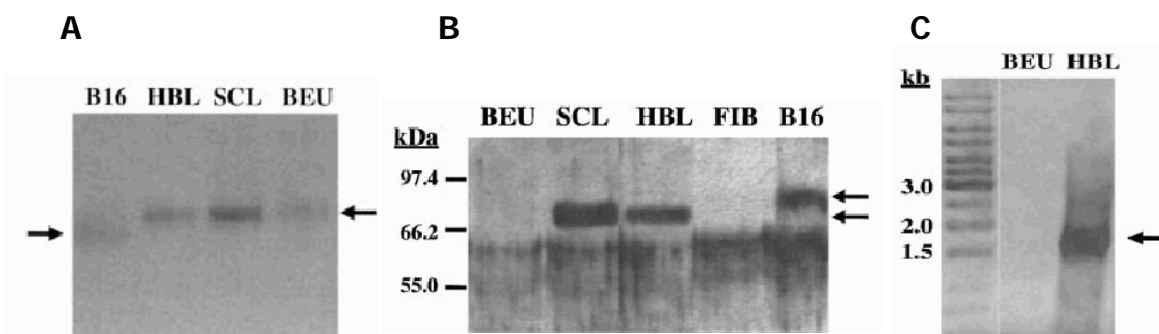


Figure 4. Melanogenic activities and enzyme expression in three human melanoma cell lines. **(A)** Electrophoretic profile of purified Tyr from B16 mouse melanoma and the human enzyme from HBL, SCL and BEU melanoma cells. Crude extracts electrophoresed and stained for DO activity. **(B)** Western blot analysis of TYRP1 expression in human melanoma cells. B16 and FIB stand for crude extracts from mouse B16 melanoma cells and human fibroblasts, employed as positive and negative controls respectively. **(C)** Lack of expression of the *TYRP1* gene in BEU cells. cDNA from BEU and HBL cells was amplified using primers encompassing the complete coding sequence of the *TYRP1* gene (amplification product of 1644 bp).

Therefore, BEU cells possess TH, DO and Dct activities in the absence of TYRP1.

ii) DHICA consumption by human melanoma cell extracts proceeds with oxidation and accelerated melanin formation.

Extracts from the human cell lines accelerated eumelanin formation from DHICA solutions as measured by an increase in absorbance at 550 nm (Figure 5), indicative of dihydroxyindole dimers and pigment formation.⁵⁷ For comparable amounts of extract, the effect was faster for SCL cells, and comparable for BEU and HBL cells. Comparable catalytic amounts of purified B16 melanoma tyrosinase did not accelerate the spectral evolution of DHICA solutions (data not shown), which is fully consistent with previous reports.¹⁴

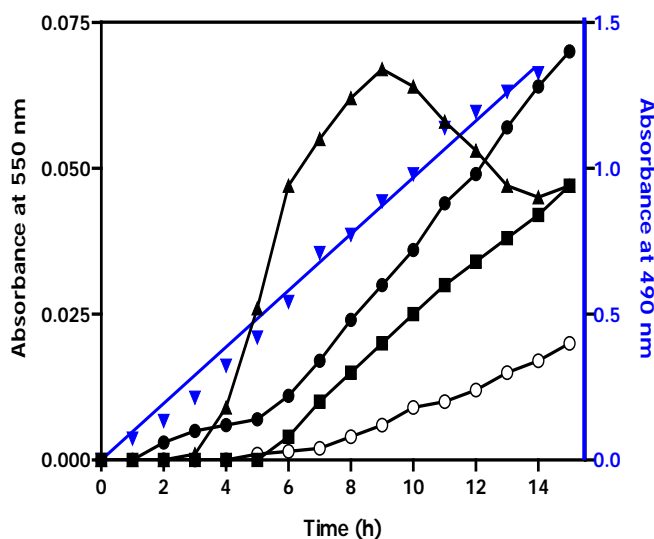


Figure 5. Spectrophotometric analysis of DHICA evolution in the presence of human melanoma cell extracts. Melanin production from DHICA (absorbance at 550 nm of 150 μ M DHICA) in the presence of: (\blacktriangle), SCL; (\bullet), BEU and (\blacksquare), HBL cell extracts; (\circ), blank, obtained by adding to the DHICA solution a volume of solubilization buffer identical to the one of enzyme extracts. The enzymatic activities present in the reaction media, in terms of DO activity, were 1.1, 1.2 and 2.0 mU for SCL, BEU and HBL cells respectively. (\blacktriangledown) BEU extracts (1.2 mU of DO activity) catalyse the oxidation of DHICA (800 μ M) to IQCA, in the presence of MBTH (left Y-axis).

Although melanin formation should proceed through the oxidation of the corresponding precursors, we wished for direct confirmation of IQCA production by using the quinone-trapping reagent MBTH.^{14,15,45} This experiment was performed with BEU cells in order to avoid possible interference from TYRP1. Figure 5 also shows that BEU extracts catalysed the formation of a coloured adduct, in the presence of DHICA and MBTH (absorbance measurement at 490 nm). Overall, these results prove that DHICA can be oxidised and incorporated into a melanin polymer by human melanocyte extracts completely lacking TYRP1, yet they do not demonstrate that TYR is the enzyme responsible of DHICA oxidation.

iii) DHICA is recognised by TYR from human melanoma cell extracts.

We also analysed DHICA's ability to act as an inhibitor of tyrosine hydroxylation, using extracts from HBL and BEU cells as a source of enzyme. TH activity was measured in the presence of 10 μ M L-dopa as cofactor and of comparatively high concentrations of DHICA, and it was found that TH activity of extracts from both cell lines decreased in the presence of DHICA concentrations higher than 250 μ M. The inhibition was concentration dependent and higher for the TYRP1 negative BEU cells.

iv) DHICA is oxidised by TYR transiently expressed into COS7 cells.

The results shown thus far prove that the TYRP1 negative BEU cells are able to catalyse DHICA consumption and that DHICA is able to interact with TYR. These data strongly suggest that, in humans, TYR is the enzyme responsible for DHICA oxidation. However, other melanogenic protein(s) could be involved. In order to unambiguously demonstrate the ability of TYR to transform DHICA, we transfected COS7 cells with the human *TYR* and mouse *tyr* genes.

Efficient expression of the human and mouse tyrosinase proteins was ascertained by determination of the TH and DO activities of cell extracts (Table 2) and by Western blot, using the tyrosinase-directed α PEP7 as primary antiserum, yielding the expected bands (data not shown).

| Gene | Tyrosine hydroxylase (μ U/mg protein) | Dopa oxidase (mU/mg protein) | DHICA oxidase (μ U/mg protein) |
|------------|-----------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|
| <i>TYR</i> | 98 \pm 4 | 5.6 \pm 0.2 | 88 \pm 8 |
| <i>Tyr</i> | 1110 \pm 50 | 60 \pm 3 | not detectable |

Table 2. Melanogenic activities in COS7 cells transiently transfected with the human (*TYR*) and mouse (*Tyr*) genes. Results are the mean \pm range for two independent transfection experiments. For the blanks, COS7 cells transfected with the enzymatically inactive $\Delta 3$ *Tyr*. DHICA oxidase units were calculated from the ΔA_{490} in the presence of MBTH, by assuming an absorption coefficient for the IQCA-MBTH adduct identical to the one of DQ-MBTH.¹⁴

Spectrophotometric analysis of DHICA evolution demonstrated that crude extracts from cells transfected with the human gene accelerated DHICA disappearance. The product formed was IQCA, as shown by formation of a coloured adduct with MBTH, monitored at 490 nm (Figure 6A). Again, Tyr failed to oxidise DHICA to IQCA, according to the MBTH assay, even if present in catalytic amounts more than 10-fold higher than TYR, thus confirming previous reports.^{14,15} Finally, the TH activity of TYR, measured with a 10 μ M concentration of the cofactor L-dopa, was inhibited by DHICA in a concentration dependent manner (Figure 6B). Surprisingly, a similar inhibition was also observed for Tyr.

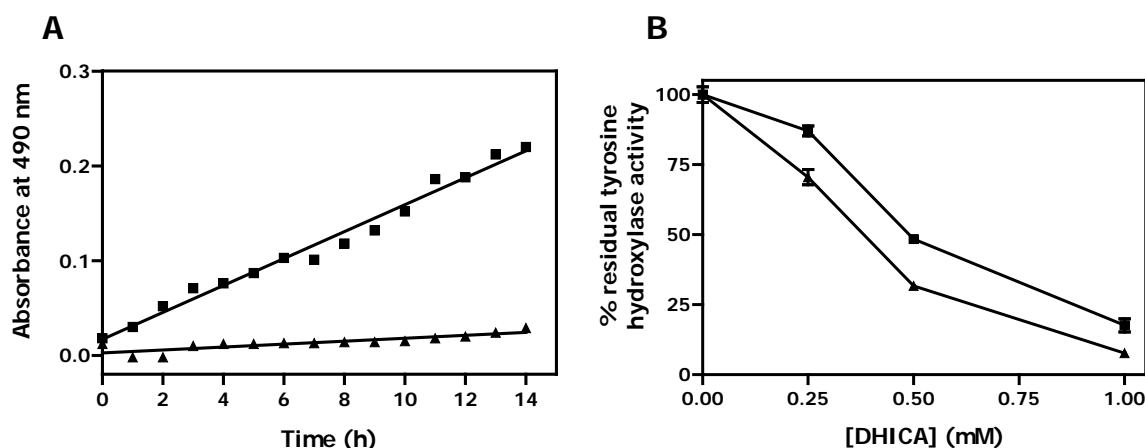


Figure 6. Recognition and oxidation of DHICA. **(A)** Spectrophotometric demonstration of DHICA oxidation by human, but not mouse, tyrosinase. The Vis spectra of 800 μ M DHICA, 2 mM MBTH solutions were serially recorded at 1h intervals, in the presence of 0.6 or 6.9 mU of DO activity from human (■) and mouse (▲) tyrosinase transiently expressed in COS7 cells. The reference cuvette contained an identical solution, except that enzymatically active tyrosinase was replaced by an equivalent amount of protein from control cells expressing the inactive Δ 3Tyr. The absorbance at 490 nm, corresponding to the absorption peak of the MBTH-IQCA adduct, is shown. **(B)** Inhibition of the TH activity of human and mouse tyrosinase expressed in COS7 cells. The extracts contained 0.4 and 2.9 μ U of TH activity for the human (■) and mouse (▲) enzymes, respectively.

The results presented herein confirm the differences in catalytic activities of mouse and human melanogenic enzymes suggested by others.^{23,53} Moreover, TYR expressed in non-melanocytic cells is able to catalyse DHICA consumption and its TH activity is inhibited by DHICA. In addition, we show that: i) DHICA consumption by human melanoma cells is accompanied by melanin formation, ii) DHICA can partially substitute L-dopa as a cofactor of the TH activity of TYR, irrespective of the presence or absence of TYRP1, and, more conclusively, iii) DHICA is an authentic substrate of TYR, since it is oxidised to its quinone by human melanoma cell extracts lacking TYRP1 and by TYR expressed in non-melanocytic cells, where no interference by other melanocytic proteins is expected. Overall, these observations prove that TYR recognises and oxidises DHICA.

The DHICA oxidase specific activity of TYR, although easily detectable, appears low and probably smaller than the one of mouse Tyrp1, but could be sufficient to oxidise DHICA under conditions of low production of this dihydroxyindole, since Dct activity is also lower in human than in mouse melanocytes.⁵⁸ This would therefore account for the observed differences in composition of the rodent and human pigment.^{53,54}

A second question refers to the actual enzymatic capabilities of TYRP1. Our results prove that the ability of human melanoma cell extracts to metabolise DHICA correlates approximately with their TH and DO activities, which would also correlate with their TYR content. This suggests, but does not prove, that TYRP1 contributes little, if any, to the DHICA oxidase activity. Moreover, in human melanoma cell extracts, only a single activity band was detected in SDS-PAGE gels stained for DO activity (Figure 4A), while the difference in molecular weight observed from the Western blots between TYRP1 (Figure 4B) and TYR (not shown) appeared high enough to reasonably expect their electrophoretic separation. Therefore, these findings suggest that TYRP1 lacks DO activity, as reported by others.²² However, other possibilities such as a low residual DO activity or a low stability in solubilized extracts cannot be ruled out. In any case, the available evidence suggests that TYRP1 should be less catalytically efficient than mouse Tyrp1. Accordingly, its role might be more directly related to an ability to interact with and stabilise tyrosinase.^{47,59} Consistent with this, BEU cells displayed the lowest tyrosinase activity among the human melanoma cells employed in this study.

Finally, DHICA was surprisingly found to inhibit the TH activity of mouse tyrosinase, in spite of the complete inability of the enzyme to catalyse its oxidation. A competitive inhibition TH activity of TYR by DHICA was expected, based on our observation that DHICA is a substrate for the enzyme and on previous data.⁵⁶ Since DHICA binds to the mouse enzyme without being oxidised, it appears that the structural determinants responsible for ligand binding are more conserved between the human and mouse proteins than those involved in substrate transformation. The amino acid sequence of the CuB binding site is identical in the mouse and human enzyme, except for a F/Y change at position 369, while, in spite of extensive sequence similarity (around 78%), 4 out of 32 amino acids in the CuA site are different in human and murine tyrosinase (Figure 2). Therefore, the structural determinants for DHICA binding and substrate recognition might be located in the highly conserved CuB site, while the more divergent CuA site could be related to the different catalytic potentials of the murine and human enzymes.

3.2. FUNCTIONAL INEQUIVALENCE OF THE METAL BINDING SITES IN TYR

i) High, comparable and quantifiable expression of wt and mutant Tyr in transfected cells.

To gain further insight on the structural determinants of the enzymatic function of the mammalian Tyr family, we have performed a site-directed mutagenesis study of selected residues in the mouse enzyme. In order to analyse the effect of these mutations on the Tyr activities, which are likely to result in partial or total loss of function, we first ascertained high and reproducible expression and set up an accurate method for quantitation and comparison of the expression levels of the wt and mutant forms. The feasibility of an accurate quantification of the relative expression levels was checked by Western blot, resulting in linear correlation (in a log scale) between the intensity of the resulting bands with total protein amounts ranging from 1 to 20 μ g to normalize enzymatic rates. The expression efficiencies of wt and all CuA and CuB mutant Tyrs were also comparable, and their electrophoretic mobilities identical (data not shown). Since no major alterations in the structure or size of the mutated proteins were noticeable, changes in activity should be related to the catalytic role of the mutated residues rather than to alterations in protein folding and/or processing.⁶⁰

ii) The Q378H, H389L and H390Q mutations in the CuB site have a higher impact on Tyr activity than the S192A and E193Q mutations in CuA.

A comparison of the specific activities of the mutant Tyrs normalized by Western blot determination of the protein amount, is shown in Table 3. The enzymatic activities of extracts from COS7 cells transfected with wt Tyr were higher than those normally found in B16 mouse melanoma cells. The two mutations at the CuA site, S192A and E193Q, were isosteric substitutions to detect the possible involvement of the native residues as endogenous ligands bridging the two coppers in the binuclear active site. The existence of an oxygenated endogenous ligand bridging the two copper ions was postulated on the basis of spectroscopic studies on hemocyanin and Tyr active site,^{24,61} and this ligand should be the side chain of a residue located in the coil fragment between the two helical regions containing the H bound to CuA.⁶² Alignment of all Tyr sequences pointed out to a hydroxylated candidate, S192 in the mouse, which is highly exposed and shows a polymorphism in human TYR, S192Y.⁶ Taking into account that Tyr is a copper-enzyme but Tyrp2/Dct is a zinc-enzyme lacking this endogenous bridge,⁶³ we also explore residue E193 that changes to Q in Tyrp1 and to R in Tyrp2/Dct (Figure 2), whose mutation is

responsible for the *slaty* phenotype.² However, neither the S192A nor the E193Q mutants showed significant differences in their catalytic activities as compared to wt Tyr. Thus, mutations on CuA binding-site indicated that the existence of a residue bridging the two copper ions at the Tyr active site is very doubtful. The same conclusion was recently reported for Tyr from *Streptomyces antibioticus*.⁶⁴

| | TH (μ U/mg) | DO (mU/mg) | 10^3 *TH/DO ratio |
|---------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| B16 | 136.0 \pm 16.0 | 8.1 \pm 2.6 | 16.8 |
| wt Tyr | 711.3 \pm 163.5 (100%) | 29.9 \pm 6.5 (100%) | 23.2 |
| S192A | 649.6 \pm 97.6 (93%) | 27.5 \pm 4.3 (92%) | 23.6 |
| E193Q | 687.4 \pm 85.4 (98%) | 28.2 \pm 4.9 (94%) | 24.4 |
| Q378H | 121.2 \pm 26.7 (17%) | 2.7 \pm 0.7 (9%) | 44.9 |
| H389L | 129.0 \pm 25.5 (18%) | 5.7 \pm 1.4 (19%) | 22.6 |
| H390Q | 0.0 (0%) | 0.0 (0%) | --- |

Table 3. Comparison of the specific activities (% relative to wt Tyr expressed in COS7 cells) of wt and mutant species, normalized by Western blot, with $n \geq 4$.

On the other hand, the 3 mutations in the CuB site resulted in major enzymatic activity changes. The Q378H and H389L mutants retained low but significant levels of both TH and DO activities (10-20%), enough for analysis of some kinetic aspects. H390Q Tyr was totally devoid of any measurable enzymatic activity. The residual activity of the Q378H and H389L mutants strongly supported that they are still able to bind copper ions at their respective active site, and pointed to H390 (the second H within the HH pair found at the end of the CuB motif) as the actual third copper ligand in mammalian Tyr, as described for the microbial and fungal enzyme.^{24,25}

However, this interpretation is in contrast with data on direct ⁶⁷Cu binding to wt and mutant human TYRs.²⁷ In this study, the H389A and H390A mutant species were both enzymatically inactive, but the H390A was able to bind twice as much ⁶⁷Cu as wt. There are several possible explanations accounting for this discrepancy. For instance, differences in the nature of transfected cells: HeLa cells have recently been described as an inefficient system for human Tyr processing.⁶⁵ Furthermore, Tyr activities showed a remarkable unstability in transfected extracts, likely due to the absence of Tyrp1, that has a marked stabilizing effect on Tyr,⁵⁹ in non-melanocytic cells. Finally, direct copper binding assays should be interpreted with caution, because protein misfolding could yield enzymatically inactive species which nevertheless could be still able to bind copper by means of residues located outside the active site.

iii) Changes in Tyr activity caused by CuB mutations are not related to a significant alteration of the protein structure.

We further examined whether the reduced specific activity of the Q378H and H389L mutants could be due to kinetically irrelevant effects such as decreased stability. These and other possibilities were explored by:

- Checking the resistance to chaotropic agents by specific activity stain of SDS-PAGE gels run under non-reducing conditions.⁴⁶
- Analysis of the thermal stability (70°C) and susceptibility to proteolytic digestion (proteinase K) and copper chelators (EDTA).
- Inhibition by active site-directed chelating compounds (phenylthiourea (PTU) and L-mimosine).
- Glycosidase digestion with Endo H and PNGase F followed by Western blot, in order to examine their folding and processing.

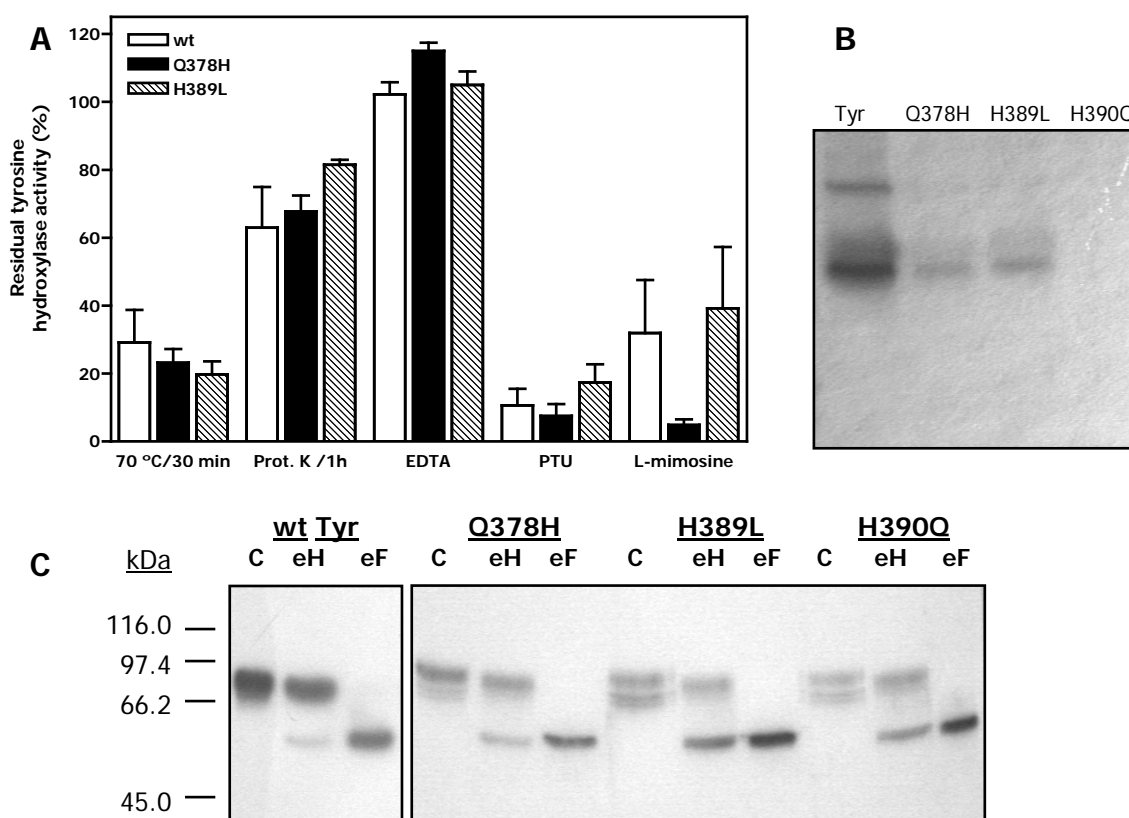


Figure 7. (A) Resistance of wt Tyr, Q378H and H389L mutant forms to thermal inactivation (70°C, 30 min), proteinase K digestion (1mg/ml, 1h), EDTA (2 mM, 3h) and the active site-directed inhibitors, phenylthiourea (0.5 mM) and L-mimosine (0.5 mM). **(B)** Gel staining for DO oxidase activity of wt Tyr and mutant Tyr species. Equal protein amounts were resolved by non-denaturing SDS-PAGE to correlate relative intensity of the bands to residual enzymatic activities of the mutant forms. H390Q mutant was devoid of enzymatic activity, whereas the others forms displayed similar mobility. **(C)** Glycosylation status of the wt and mutant Tyrs. Control extracts (lanes labelled C) and extracts treated with Endo H (eH) or PNGase F (eF) were analysed by Western blot.

All these experiments proved that the H389L and Q378H mutant Tyrs were equally resistant to SDS than the wt form (Figure 7B) and retained residual activity levels comparable to wt Tyr after thermal shock or treatment with proteinase K, suggesting a compact protein folding (Figure 7A). The comparable resistance of wt and H389L Tyrs to EDTA (Figure 7A) indicates a similar affinity of the two proteins for copper, again pointing to H390 as the actual copper-binding residue of the ³⁸⁹HH³⁹⁰ pair, and the residual activities of H389L and wt Tyrs after treatment with phenylthiourea or L-mimosine also supported a similar structure and accessibility to the active site. Partial resistance to Endo H digestion showed by a fraction of the Q378H, H389L and H390Q mutant proteins (Figure 7C) supports efficient glycosylation and processing. Therefore, the conformation of the wt and mutant Tyrs are very similar and the lower specific activities of H389L and Q378H Tyrs actually reflect impairment in their catalytic potential.

iv) Kinetic parameters and stereospecific properties of wt and mutated Tyrs.

To understand the structural basis for the low specific activity of Tyr mutants at CuB, the K_M , V_{max} and catalytic efficiency (V_{max}/K_M ratio) parameters of wt and mutant Tyrs for several *o*-diphenolic substrates and the monophenol L-tyrosine were analyzed (Table 4). Concerning *o*-diphenols, the affinity and catalytic efficiency of wt Tyr is decreased by decarboxylation (around 4-fold), supporting the role of the carboxyl group in substrate recognition, and even more by changing the stereospatial conformation of $C\alpha$, as shown by comparison of the K_M for D-dopa and L-dopa (approximately 10 times higher for D-dopa). However, esterification of the carboxyl group has a poor effect, thus excluding an electrostatic enzyme-substrate interaction.

| Substrate | wt Tyr | | | H389L | | | Q378H | | |
|--------------------|--------|-----------|---------------|-------|-----------|---------------|-----------------|-----------|---------------|
| | K_M | V_{max} | V_{max}/K_M | K_M | V_{max} | V_{max}/K_M | K_M | V_{max} | V_{max}/K_M |
| L-dopa | 0.46 | 38.8 | 84.3 | 1.83 | 38.9 | 21.2 | 22.2 | 32.7 | 1.5 |
| Dopamine | 1.46 | 23.4 | 14.3 | 2.01 | 36.4 | 18.1 | nd ^c | nd | nd |
| D-dopa | 4.57 | 41.3 | 9.1 | 2.41 | 31.5 | 13.1 | nd | nd | nd |
| L-dopa methylester | 0.58 | 44.6 | 76.9 | 2.26 | 41.6 | 18.4 | nd | nd | nd |
| L-tyrosine | 0.079 | 0.90 | 11.4 | 0.106 | 0.88 | 8.3 | 0.076 | 1.47 | 19.3 |

Table 4. K_M (mM), V_{max} (mU/mg) and V_{max}/K_M ratio for wt Tyr and the H389L and Q378H mutant Tyr species for four *o*-diphenols (DO activity, mean of 2 determinations) and L-tyrosine (TH, mean of 3 determinations). nd: not determined (very slow reaction rates).

The differences in the kinetic parameters for the 4 diphenols were much smaller for the H389L mutant species. The replacement of the 389H by a hydrophobic L (resembling Tyrps), decreased the affinity of Tyr for L-dopa, but increased it for D-dopa in comparison to wt Tyr. This confirms that H389 is involved in a stereospecific interaction with the carboxyl group of the substrate, rather than in copper binding. The Q378H mutant showed a 50 times lower affinity for L-dopa, suggesting that the imidazole group at that position would create a strong steric hindrance that impairs L-dopa docking.

Regarding TH activity, the K_M for L-tyrosine of the wt and the mutant Tyrs were very similar, supporting that the residues located in the CuB site are more closely related to DO than to TH activity. Comparing the kinetic pattern of the decarboxylated analog tyramine and D-tyrosine to *o*-diphenols, the monophenolic substrates presented additional difficulties, due to non-availability of the radioactively labelled tyramine or D-tyrosine that would be necessary for the assay.^{30,44} Thus, we assayed tyramine and D-tyrosine hydroxylation by an indirect method based on their competition with L-[3,5-³H]-tyrosine. Both compounds inhibited TH activity of the wt Tyr at high concentrations (Figure 8A), and the order of affinity for the monophenols tested was the same than with *o*-diphenols: L-substrate>decarboxylated substrate>D-substrate. Surprisingly, the H389L mutant showed the same behaviour in the TH assay than the wt. The stereospecificity for monophenols displayed by both forms (Figure 8B) points out two relevant aspects of the catalysis: the monophenol hydroxylase and diphenol oxidase activities have different structural requirements and H389 is involved in *o*-diphenol docking to the bicopper center, but not in monophenol docking. Finally, the efficiency of D-dopa as cofactor for the TH activity, using L- or D-dopa in a 1:1 ratio to L-tyrosine (50 μ M both), was lower than that of L-dopa for wt Tyr, but not for the H389L mutant species (Figure 8C).

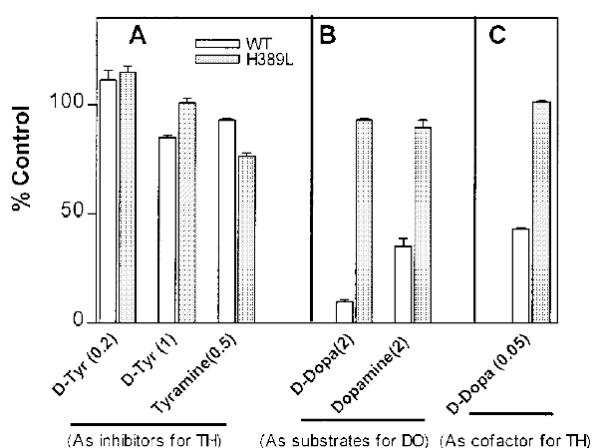


Figure 8. Stereospecificity of wt and H389L Tyr species for different substrates. Data are expressed as % of the control reaction rates. **(A)** Addition of D-tyrosine (0.2 and 1 mM) and tyramine (0.5 mM) referred to the TH standard assay with L-[3,5-³H]-tyrosine; **(B)** Replacement of the substrate L-dopa (control) by D-dopa and dopamine (2 mM) in the DO standard assay. **(C)** Replacement of the cofactor L-dopa (control) by D-dopa in the TH assay using 50 μ M L-tyrosine and L or D-dopa. H389L loses the stereospecificity for the DO activity and dopa binding as cofactor, but it does not for the TH reaction.

v) A model for the catalytic cycles of Tyr activities.

Our results allow for the proposal of a reaction mechanism (Figure 9) that modifies former models,²⁴ where the most abundant enzymatic form is *oxy*-Tyr and the substrates, L-tyrosine and L-dopa, initiate the TH or DO cycles, respectively. Both phenols probably bind to the catalytic center in an axial orientation, but L-tyrosine binds preferentially to the CuA site, whereas L-dopa binds to CuB. The following data support this view:

- (i) The results on H389L Tyr stereospecificity presented in this work.
- (ii) The A206T mutation in human TYR at CuA increases TH activity 200% at the permissive temperature for correct folding, but does not increase DO.³³
- (iii) Crystallographic data for the sweet potato catechol oxidase show that the active site of this enzyme has an aromatic residue (F261) blocking the CuA access.²⁶ Interestingly, all plant catechol oxidases sequenced have an aromatic residue in the equivalent blocking position, and do not display TH activity, while fungal or animal Tyrs have no blocking residue at the equivalent position and they show TH activity.

In the TH cycle, monophenol would labilize the oxygen bound in the catalytic center in a side-on manner,⁶¹ being then *ortho*-hydroxylated and undergoing pseudorotation to an equatorial position. After oxidation of the *o*-diphenolic product, the *o*-quinone would leave the reduced bicuprous site, allowing the entrance of a new oxygen molecule.

In the DO cycle, the *o*-diphenol bound to CuB would also labilize the oxygen, resulting in oxidation of the organic substrate and release of L-DQ. The enzyme is left in a bicupric state, *met*-Tyr, that can bind L-tyrosine or L-dopa with higher affinity than *oxy*-Tyr since the active center is not occupied by oxygen (competition of all substrates and aromatic inhibitors).²⁶ L-dopa would dock to the 2 copper ions by both hydroxyl groups, with higher affinity than when the binding proceeds only through CuB, confirmed by the fact that the affinity of L-dopa as cofactor (*met*-Tyr) is approximately 100-fold higher than as a diphenolic substrate (*oxy*-Tyr),³² and also accounting for the fact that D-dopa is a relatively efficient cofactor but a poor substrate. The binding of both hydroxyl groups to the copper ions allows for an easy transfer of two electrons from the *o*-diphenol to the binuclear site, leading to the oxidized quinone and the reduced *deoxy*-Tyr, which is reoxidized upon oxygen binding.

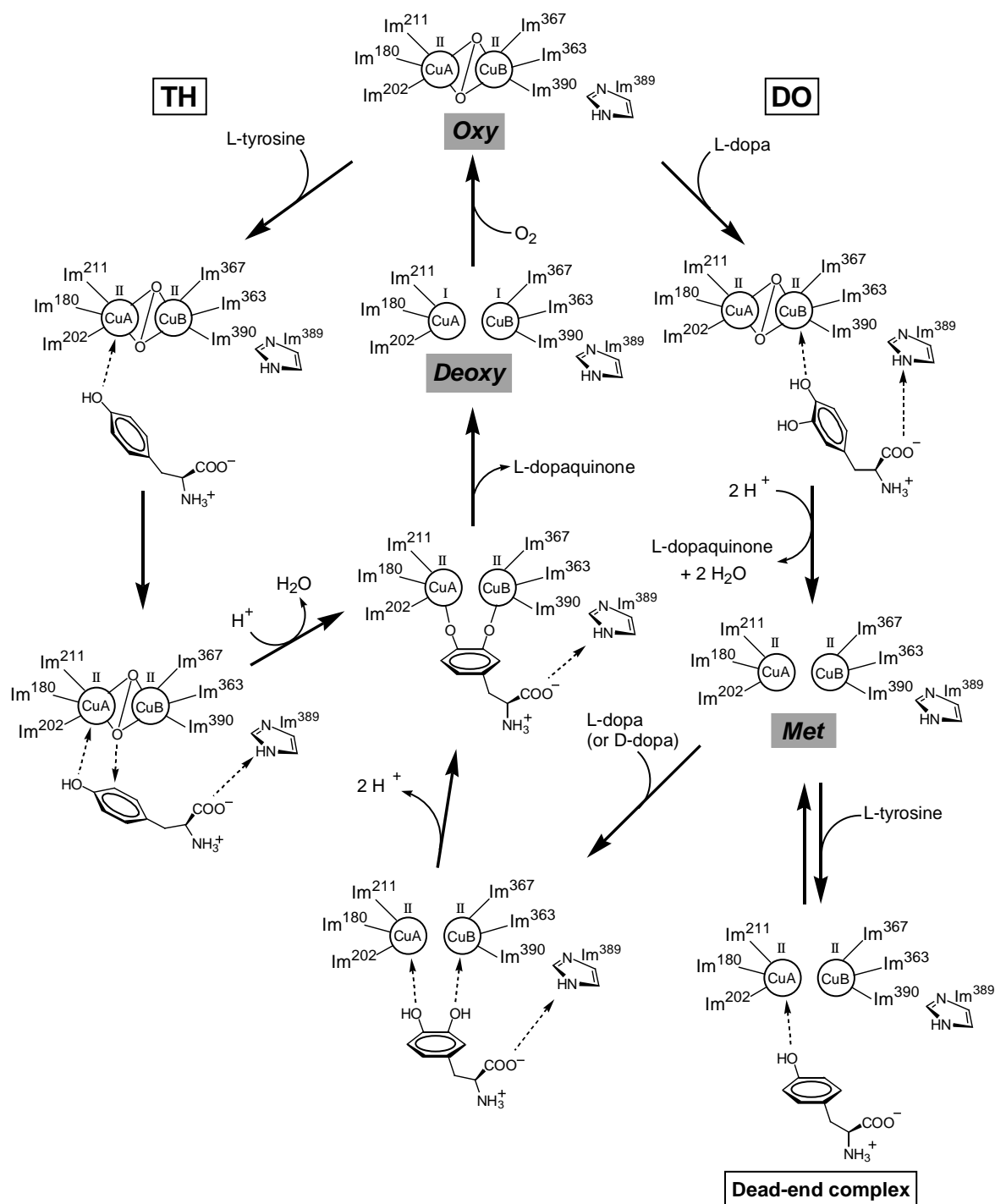


Figure 9. Proposed catalytic cycles for TH and DO to differentiate both activities. Tyr presents two forms (*oxy*- and *met*-Tyr) with different affinities and structural requirements for both substrates. Tyrosine acts as substrate for the *oxy*-Tyr, and also as a dead-end inhibitor for *met*-Tyr. Dopa acts as cofactor when bound to the *met*-form and competes with tyrosine for the inhibition of this species. H389 is essential for L-dopa recognition and orientation to CuB, but it is not involved in the docking of L-tyrosine to CuA.

Docking of L-tyrosine to *met*-Tyr, by axial binding of two molecules of L-tyrosine to each copper at the catalytic center, would lead to a dead-end complex. This might also account for the inhibition by substrate excess that has been reported for Tyr.⁴⁴ The competition of L-tyrosine and L-dopa for *met*-Tyr also explains the characteristic lag period of the TH activity in the absence of cofactor.^{8,31} Therefore, the L-dopa/L-tyrosine ratio increases continuously as a consequence of L-dopa generation *in situ* in the reaction of L-DQ and L-cyclodopa, and this leads to a parallel decrease in the fraction of enzymatic species reversibly captured in the dead-end complex.

In summary, this mechanism accounts for most kinetic features of Tyr so far described and reconciles some discrepancies in former mechanisms.^{24,66} It also contains the evidence for the actual occurrence of physical differences in the catalytic requirements of TH and DO activities previously suggested.^{30,33} We propose that monophenols would dock to CuA but *o*-diphenols would dock to CuB at the Tyr active site and that H389 is one of the CuB residues involved in stereospecific binding of diphenols. Other residue(s) responsible for these orientations remain to be determined.

3.3. CONFORMATION-DEPENDENT GLYCOSYLATION OF TYROSINASE

i) Expression and processing of wt Tyr and Tyrp1 in HEK 293T cells.

Analysis of the structure-function relationships in the Tyr family proteins by site-directed mutagenesis requires an efficient expression system. Preliminary experiments suggested that Tyrp1 was not adequately processed in COS7 cells. Therefore, we looked for a heterologous expression system for both Tyr and Tyrp1. We have found that HEK 293T cells efficiently express Tyr, yielding high levels of the active enzyme. We examined Tyr folding and processing in these cells, by means of glycosidase digestion with endoglycosidase H (Endo H) and N-glycosidase F (PGNase F), followed by Western blot. Endo H efficiently cleaves high mannose glycans, such as the ones found in incompletely processed glycoproteins present in the ER.⁶⁷ However, upon further processing to complex glycans in the medial Golgi, glycoproteins become resistant to Endo H. Accordingly, sensitivity to Endo H provides a criterion to distinguish early forms of ER-resident, incompletely processed Tyr from mature forms of the enzyme. PGNase F removes all forms of glycans, irrespective of their degree of processing and trimming, thus allowing for an estimation of the size of the polypeptide backbone of glycoproteins.

Figure 10. Efficient glycosylation and processing of wt Tyr and Tyrp1 in HEK 293T cells. Extracts were electrophoresed, blotted, and probed with α PEP7 (for detection of Tyr) or α PEP1 (for detection of Tyrp1). For each blot, the migration of molecular weight markers is shown on the left. C stands for untreated control extracts, and eH and eF for extracts digested with Endo H or PGNase F, respectively. The protein load was comparable for control and glycosidase-treated samples.

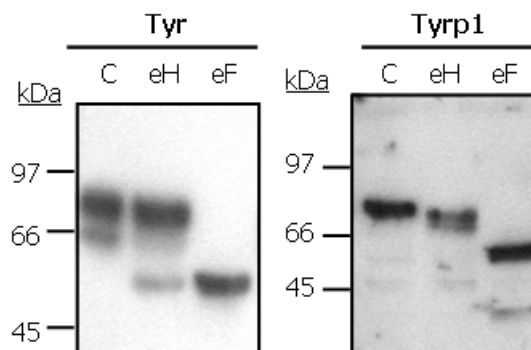


Figure 10 shows Western blots of native and glycosidase-treated wt Tyr and Tyrp1 expressed in HEK 293T cells, and their patterns were almost identical to those in B16 mouse melanoma cells (data not shown). The two bands present in the native extracts of Tyr corresponded to different glycosylation forms, since upon treatment with PGNase F only a single band was seen, corresponding to the deglycosylated protein backbone. The expressed Tyr protein was mostly resistant to Endo H, thus showing that it is a mature, post-ER form. The enzymatic activity of crude extracts from transfected HEK 293T cells was higher than in B16 mouse melanoma cells, consistent with an efficient expression, folding and processing of the protein. Tyrp1 was also processed to an Endo H-resistant protein that could be deglycosylated by PGNase F.

ii) Chimeric constructs reveal conformation-dependent glycosylation sites in Tyr and Tyrp1.

In the course of a study aiming to define structural elements specific for the proteins of the Tyr family, we constructed and analysed several chimeric proteins (Figure 3).

In preliminary experiments, the two constructs designated Tyr(A)/Tyrp1(B) and Tyrp1(A)/Tyr(B) were studied. The size of the polypeptide backbone of the two chimeric proteins is similar, with 523 amino acids for Tyr(A)/Tyrp1(B) and 547 for Tyrp1(A)/Tyr(B), as compared to 533 and 537 amino acids for Tyr and Tyrp1, respectively. Thus, should glycosylation and post-translational processing of the constructs and wt proteins be comparable, the electrophoretic mobility of the chimeric and the parent proteins in reducing SDS gels would also be very similar. However, we detected an abnormal electrophoretic pattern, with a single band of higher mobility than expected (Figure 11), corresponding to apparent molecular weights of 65.3 (Tyrp1(A)/Tyr(B)) and 64.1 kDa (Tyr(A)/Tyrp1(B)). Upon treatment with either PGNase F or Endo H, both chimerae yielded a single band of apparent molecular weight of 55.6 and 59.1 kDa, respectively, consistent with the *de novo* size. Thus, the higher electrophoretic mobility of the native chimeric proteins is accounted for by a severe underglycosylation as compared to Tyr or Tyrp1. Moreover, their sensitivity to Endo H strongly suggested that these chimeric proteins do not fold correctly and are retained in the ER. Consistent with an impaired processing, the chimerae were completely devoid of the typical enzymatic activities.

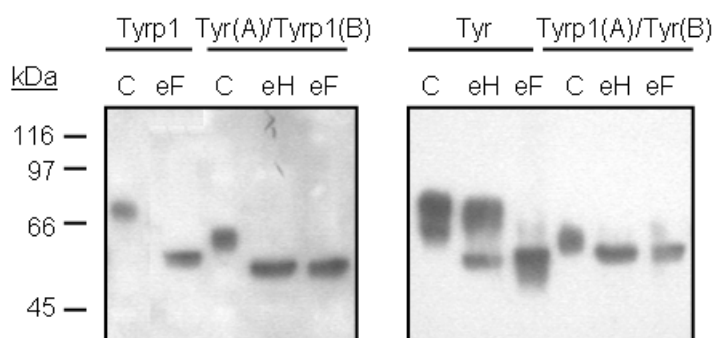


Figure 11. Glycosylation status of the chimeric constructs Tyr(A)/Tyrp1(B) and Tyrp1(A)/Tyr(B). Wt Tyr and Tyrp1, and the chimeric constructs mentioned were transiently expressed in HEK 293T cells. Control extracts (lanes labelled C), and extracts treated with Endo H (labelled eH) or PGNase F (labelled eF) were analysed by Western blot. α PEP7 was used for the detection of Tyr and Tyrp1(A)/Tyr(B), since these proteins share the C-terminus of Tyr, whereas α PEP1 was employed to detect Tyrp1 and Tyr(A)/Tyrp1(B).

Tyr, Tyrp1 and the two chimerae possess the same number of N-glycosylation sequons. Therefore, the different electrophoretic mobility of the chimeric constructs and

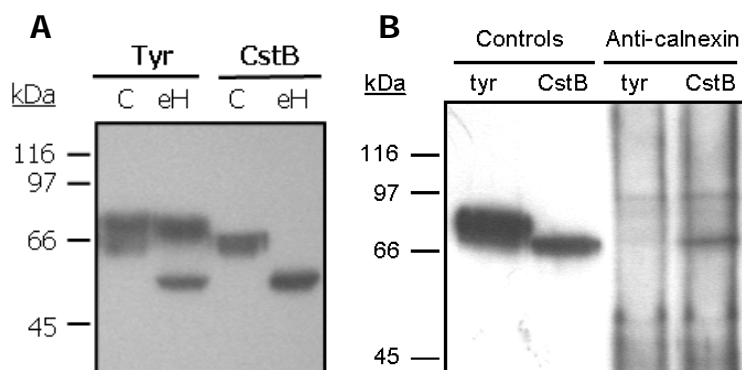
the parental proteins must be due to lack of utilization of potential sequon(s) normally occupied in the wt proteins. The glycosylation pattern of these constructs strongly suggested that Tyr and Tyrp1 display conformation-dependent N-glycan acceptor sequons that would not reach a glycosylation-competent conformation in the chimeric proteins, due to an aberrant folding.

iii) Normal processing and complete glycosylation of Tyr is dependent on a highly specific intramolecular interaction involving the CuB site.

In order to further define the region of the molecule involved in the establishment of a normal glycosylation-competent conformer, we designed the CstB construct (Figure 3), and its enzymatic activity, electrophoretic mobility and glycosylation pattern were also analysed. This construct is identical to Tyr except for the replacement of the CuB site of the protein with the MeB site of Tyrp1.

CstB was devoid of enzymatic activity and failed to undergo normal processing, in spite of the identical distribution of sequons and size of the protein moiety, as shown by sensitivity to Endo H and underglycosylation as compared to the wt Tyr (Figure 12A). In agreement with the similarity of the protein backbones, PGNase F treatment decreased the molecular weight of the CstB to a value almost identical to the size observed for wt Tyr (data not shown). Moreover, in keeping with the aberrant glycosylation pattern, suggesting ER retention, CstB was shown to interact with calnexin to a much higher extent than Tyr, in coimmunoprecipitation experiments performed with an anti-calnexin antibody (Figure 12B). Therefore, replacement of the CuB site sequence had the same effect than the change of the complete C-terminal half of the protein (Tyr(A)/Tyrp1(B) construct), and caused aberrant processing and ER retention.

Figure 12. (A) Replacement of the Tyr CuB site by the homologous sequence in Tyrp1 (construct CstB) abolishes normal N-glycosylation. For wt Tyr and CstB proteins, identical amounts of total protein from control extracts (C) or extracts treated with Endo H (eH) were analysed by Western blot, probed with α PEP7. **(B)** Association of CstB, but not Tyr, with calnexin. Extracts from HEK 293T cells transiently expressing Tyr or CstB, as indicated on top of each lane, were immunoprecipitated with an antibody against calnexin, followed by Western blotting probed with α PEP7. Lanes labelled "Controls" correspond to the precleared supernatants, before immunoprecipitation (IP), and those labelled "Anti-calnexin" to samples submitted to the complete IP procedure.



iv) Occupancy of the CuB sequon is not required for complete maturation of Tyr nor for cofactor binding.

Since the CuB site contains a conserved sequon, it was tempting to speculate that underglycosylation of CstB in comparison to wt Tyr could arise directly from lack of occupancy of this site. Therefore, we constructed two point mutants bearing a conservative N371Q substitution in order to explore the occupancy of the CuB sequon in both wt Tyr and the mutant protein. These constructs were designated $\Delta 6$ -Tyr and $\Delta 6$ -CstB, since the mutation abolishes the sixth glycosylation signal in both cases. Surprisingly, comparison of the electrophoretic mobility of the expressed proteins proved that the sequon in the CuB site was occupied in both wt Tyr and CstB (Figure 13A).

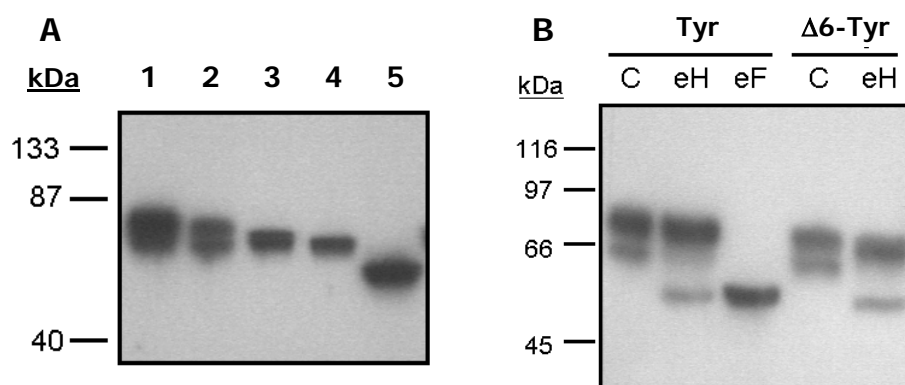


Figure 13. (A) The sequon on CuB site is occupied in wt Tyr and the CstB chimeric protein. Equal protein loads of crude extracts were analysed by Western blot and probed with α PEP7. (1) Tyr; (2) CstB; (3) $\Delta 6$ -Tyr; (4) $\Delta 6$ -CstB; (5) Tyr + PGNase F, showing the electrophoretic pattern of wt Tyr, after complete deglycosylation. **(B)** Wt Tyr and the $\Delta 6$ -Tyr mutant were transiently expressed and their electrophoretic mobility under reducing conditions was probed by Western blot with α PEP7 for control cell extracts (lanes labelled C) and for equivalent protein amounts of extracts treated with Endo H (labelled eH) or PGNase F (labelled eF).

We also assessed the ability of the CuB glycosylation-deficient $\Delta 6$ -Tyr mutant to mature to an Endo H resistant form and to become enzymatically active. $\Delta 6$ -Tyr was processed to an Endo H resistant protein (Figure 13B) and retained considerable enzymatic activity, and its kinetic constants were also very similar to those of wt Tyr. Taken together, these data prove that the CuB glycosylation sequon is occupied in native wt Tyr and in the CstB construct. They also confirm the importance of CuB site glycosylation for full enzymatic activity reported by others.³⁴ In turn, they demonstrated that its occupancy is not a sine qua non requirement for further processing, including exit from the ER and binding of the metal cofactor. Therefore, the aberrant processing of the CstB and other chimeric constructs can not be explained in terms of lack of occupancy of the ³⁷¹NGT³⁷³ sequon.

On the other hand, as shown in Figure 7C, the Q378H, H389L and H390Q mutants were all able to proceed, at least partially, to an Endo H mature form. In spite of a similar residual activity (around 20% of the TH activity of wt Tyr), the Q378H mutant yielded a majority band corresponding to an Endo H resistant form, whereas the H389L mutant was more sensitive to Endo H, and thus very likely retained in the ER. Therefore, acquisition of Endo H resistance by Tyr mutants does not strictly correlate with residual enzymatic activity. Interestingly, the H390Q protein was also able to undergo substantial maturation to an Endo H resistant form, although it is unable to bind copper and therefore is absolutely devoid of enzymatic activity. Accordingly, it can be concluded that processing beyond the ER is not dependent on copper binding.

v) CstA does not impair normal glycosylation and processing of the mutant, and is enzymatically active.

We also analysed the effect on Tyr of replacing the CuA site by the MeA from Tyrp1, or both CuA and CuB sites by MeA and MeB from Tyrp1, since the construct CstB resulted in loss of function and aberrant processing of the protein. For this purpose, we designed two new chimeric proteins, designated CstA and CstAB respectively (Figure 3), and their enzymatic activity, electrophoretic mobility and glycosylation pattern were analysed. Surprisingly, the CstA construct retained some residual enzymatic activity (25% TH and 10% DO) and was efficiently glycosylated, while CstAB behaved exactly like CstB regarding enzymatic capabilities and processing (Figure 14). This shows that the MeA site of Tyrp1 is able to bind copper and sustain the typical Tyr enzymatic activities, while CuB from Tyr is required for proper folding and acquisition of an enzymatically active conformation. Note that this is the first time in which the ability of MeA site of Tyrp1 to bind copper is proved.

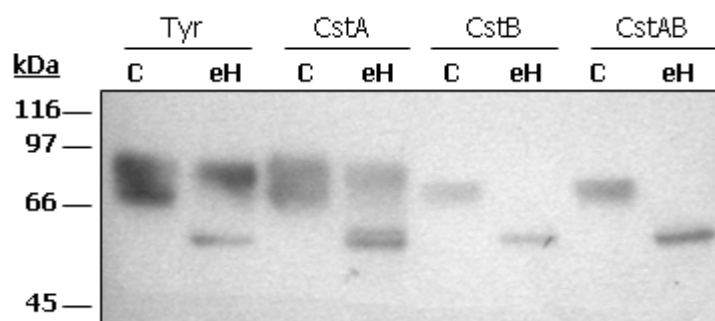


Figure 14. Wt Tyr, CstA, CstB and CstAB were transiently expressed and their electrophoretic mobility under reducing conditions was probed by Western blot with α PEP7 for control cell extracts (lanes labelled C) and for equivalent protein amounts of extracts treated with Endo H (labelled eH).

vi) Brief discussion of the results.

Interest in the mechanisms of tyrosinase processing and transport has been recently fostered by the realization that impairment of these processes disrupts melanin synthesis, leading to an amelanotic or albino phenotype.^{38,39,68} However, knowledge of the structural requirements for tyrosinase folding and processing in the ER is still incomplete, and mostly limited to the role of N-glycan chains,^{34,69,70} with very little information on the intramolecular interactions within the protein backbone.

We addressed this question by analysing the glycosylation pattern and enzymatic activity of Tyr mutants and chimeric proteins based on fragments from the Tyr and Tyrp1 sequences. Tyr expressed in HEK 293T cells appeared as a doublet in Western blots probed with α PEP7. The finding of two Tyr bands is a common feature in most cell types, including heterologous systems⁶⁵ and melanocytic cells such as B16 mouse melanoma cells,⁶⁹ human melanocytes⁷¹ and human melanoma cells.^{71,68} The precursor-product relationship of the two bands is suggested by experimental data corresponding to differentially glycosylated isoforms as shown by treatment with PGNase F, which yielded a single band of higher electrophoretic mobility than any one of the original forms. These observations suggest that the higher mobility form is a partially glycosylated, and gives rise to the lower mobility band upon further glycosylation.

However, our data do not allow determining exactly the number of glycosylation signals occupied in each one of the isoforms. Based on studies by others, it can be speculated that the mature, lower mobility band could contain four N-glycan chains. Indeed, using several mutants with abolished specific N-glycosylation sequons, it was shown that wt Tyr expressed in CHO cells bears four occupied and two unoccupied sequons.³⁴ Four occupied sequons were also found in hamster tyrosinase,⁷² and it has been shown for TYR that, when the rate of protein synthesis is high, a partially processed protein with two unoccupied N-glycosylation sites is present.³⁵ However, it is also possible that the different heterologous cellular systems employed for Tyr transient expression might yield to different processing. Therefore, a higher degree of occupancy of N-glycosylation sequons in any of the experimental systems cannot be ruled out.

The experiments performed with the $\Delta 6$ -Tyr mutant prove that the lower occupancy form should bear at least two additional unoccupied sequons as compared to the mature form. This is demonstrated by the observation that the mobility of $\Delta 6$ -Tyr, lacking one sequon at CuB site, is intermediate between that of the two glycosylation isoforms observed for the wt protein (Figure 13). In any case, our data show that complete Tyr

translation yielding a full length polypeptide backbone recognizable by the C-terminus directed α PEP7 antiserum can occur without a complete co-translational N-glycosylation of the protein. Therefore, it appears that Tyr contains two types of N-glycan acceptor sites, distinguishable on the basis of their kinetics of occupancy: sites of rapid, co-translational glycosylation, and sites of slow, conformation-dependent occupancy. Interestingly, complete processing of Tyr is a relatively slow process as compared to other proteins, and particularly to the highly similar Tyrp1.⁷³

On the other hand, Tyr(A)/Tyrp1(B) and Tyrp1(A)/Tyr(B) were blocked in an underglycosylated and misfolded state as shown by the presence of a single Endo H-sensitive band of lower molecular weight than either Tyr or Tyrp1. This inability to progress to a fully mature protein is in contrast with the presence within the chimeric and parent proteins of the same number of sequons (six), with an identical distribution with respect to the N-terminus. Moreover, all the potential sequons in Tyr(A)/Tyrp1(B) are identically located with respect to the N-terminus than in Tyr, and the same holds for Tyrp1(A)/Tyr(B) as compared to Tyrp1.

Since underglycosylation of the chimerae is not related to the withdrawal of target sequons or to a change in their distribution, the most likely interpretation is that it must arise from failure to occupy conformation-dependent sites: underglycosylation of the chimeric constructs would result from their inability to reach a conformation supporting the recognition of more than one N-glycosylation signal. Thus, the acquisition of the correct glycosylation-competent conformation should rely on specific intramolecular interactions between the two regions of Tyr, which are negated in chimeric constructs.

CstB was also enzymatically inactive and underglycosylated in more than one site and retained in the ER, as shown by sensitivity to Endo H and strong association with calnexin (Figure 12). Therefore, replacement of only the CuB site by MeB yielded a protein with the same behaviour than replacement of the complete C-terminal region, starting from H363. These observations strongly suggest that the structural element located in the C-terminal half of Tyr mainly responsible for the formation of the export-competent conformer is the CuB site, and it would likely involve the formation of the active site cavity. This implies that the interaction CuA-CuB that must be highly specific since, within the 28 amino acid stretch replaced in CstB as compared to Tyr, 16 positions are invariant, thus leaving a total of only 12 differences in the primary sequence, of which the majority are conservative (Figure 2). This is supported by the intriguing observation that the substrates L-dopa and L-tyrosine promote folding of TYR and export of the

enzyme from the ER to the Golgi.⁷¹ Indeed, this effect implies that the substrates are able to bind to the ER-resident form(s) of the protein, where the active site should be already shaped.

Moreover, the establishment of an active site early during Tyr processing is also consistent with current views of the mechanisms of acquisition of the metal cofactor by metalloenzymes. Metal ions are bound to chaperones, and transferred directly to the acceptor sites of metalloproteins in a process requiring that the affinity for the metal cofactor is higher in the acceptor enzyme than in the chaperone.⁷⁴ Thus, formation of a high affinity metal binding acceptor site must occur before acquisition of the metal cofactor. The first DO positive compartment is the *trans*-Golgi network (TGN),⁷⁵ where copper is likely delivered by the Menkes and Wilson disease proteins, two P-type ATPases whose mutations cause hypopigmentary disorders.⁷⁶ The involvement of the Menkes protein in copper delivery to tyrosinase has been demonstrated.⁷⁷

The CstB construct and the related point mutants where the CuB site sequon was abolished also enabled us to investigate the relationships between occupancy of this sequon, copper acquisition and export from the ER to the Golgi. The ³⁷¹NGT³⁷³ glycosylation sequon was occupied in the wt Tyr, as shown by the shift in electrophoretic mobility of the $\Delta 6$ -Tyr mutant. Surprisingly, the $\Delta 6$ -CstB construct also showed increased electrophoretic mobility, thus suggesting that the sequon is also occupied in the CstB protein. Therefore, this site does not appear to be one of the conformation-dependent sites whose existence was shown by the electrophoretic behaviour of the chimeric constructs. Concerning the maturation and enzymatic activity of the CuB site glycosylation-deficient mutant, $\Delta 6$ -Tyr was processed to an Endo H resistant form in a very similar way than wt Tyr and displayed a Vmax value within the same range and considerable TH and DO residual activities. This strongly suggests a similar degree of copper binding to the active site is similar for both forms, since a diminished metal load for $\Delta 6$ -Tyr would decrease significantly its Vmax. Moreover, the comparable K_M value proves that the presence of the sugar chain in the CuB site of Tyr has no noticeable effect on the affinity for the L-tyrosine. Therefore, occupancy of the ³⁷¹NGT³⁷³ site by a glycan chain is not required for acquisition of an ER exit-competent conformation, maturation to complex-type Endo H-resistant oligosaccharides, binding of the metal cofactor and enzymatic activity.

In summary, our results support a model for *in vivo* folding of Tyr, in which the molecule displays two N-glycosylation sites whose occupancy is conformation-independent and probably co-translational. Interestingly, it has been proposed that calnexin is either

divalent or dimeric during its interaction with Tyr.⁷³ The chaperone-assisted specific interaction between the CuA and CuB domains would generate an active site devoid of copper atoms, but yet able to bind substrates. Moreover, the ensuing conformational change will allow for the occupancy of two new conformation-dependent glycosylation sequons. The folded protein will leave the ER in an apoenzymatic form and will bind the metal cofactor in the TGN. Mutations that would prevent to shape the active site will therefore cause aberrant processing and ER retention. Conversely, those compatible with the CuB site promoted conformational change will allow for transit from the ER to the Golgi, irrespective of the degree of enzymatic activity.

4. CONCLUSIONS.

1. The catalytic activities of mouse (Tyr and Tyrps) and human (TYR and TYRPS) melanogenic enzymes are different: TYR is able to catalyze DHICA consumption, whereas Tyr is not (Tyrp1 accounts for DHICA oxidation in the mouse). As expected on the basis of tyrosinase catalytic activity, the DHICA converting activity of TYR is an oxidase activity. Consequently, the reaction is accompanied by melanin formation.
2. Within the ³⁸⁹HH³⁹⁰ pair located at the edge of the second copper binding consensus sequence of Tyr (CuB site), H390, rather than H389, is the actual third copper-binding residue.
3. H389 is involved in a stereospecific interaction with the carboxyl group of the diphenolic substrate in the catechol oxidase cycle, but does not appear to interact with monophenols.
4. The two copper-binding regions in Tyr are sterically different, and docking of mono- and diphenols to the active site is therefore differential. It seems that there is no endogenous residue bridging the copper pair, as previously proposed.
5. Neither glycosylation of the CuB sequon nor copper binding are *sine qua non* requirements for maturation of Tyr and processing beyond the ER.
6. The MeA site from Tyrp1, in the context of Tyr, is able to bind copper and sustain the typical Tyr enzymatic activities.
7. Tyrosinase contains at least two sequons whose occupancy is posttranslational and conformation-dependent. This is one of the very few examples of this type of glycosylation described in the literature.
8. A specific interaction involving the CuB site and probably structural elements located N-terminal to this site is necessary for proper shaping of the active site and folding of the protein to the glycosylation-competent conformation.

5. BIBLIOGRAPHY

1. Jackson, I. J. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85** (12), 4392-4396.
2. Jackson, I. J., Chambers, D. M., Tsukamoto, K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Hearing, V. (1992) *EMBO J* **11** (2), 527-535.
3. Kwon, B. S., Haq, A. K., Pomerantz, S. and Halaban, R. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (21), 7473-7477.
4. Shibahara, S., Tomita, Y., Sakakura, T., Nager, C., Chaudhuri, B. and Muller, R. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14** (6), 2413-2427.
5. Tsukamoto, K., Jackson, I. J., Urabe, K., Montague, P. M. and Hearing, V. J. (1992) *EMBO J* **11** (2), 519-526.
6. Oetting, W. S. and King, R. A. (1999) *Hum Mutat* **13** (2), 99-115.
7. Cooksey, C. J., Garratt, P. J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A. and Smit, N. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** (42), 26226-26235.
8. Naish-Byfield, S. and Riley, P. A. (1998) *Pigment Cell Res* **11** (3), 127-133.
9. Prota, G. (1992) *Melanins and melanogenesis*. Academic Press, New York, pp. 1-290.
10. Aroca, P., Garcia-Borrón, J. C., Solano, F. and Lozano, J. A. (1990) *Biochim Biophys Acta* **1035** (3), 266-275.
11. Palumbo, A., Solano, F., Misuraca, G., Aroca, P., Garcia Borrón, J. C., Lozano, J. A. and Prota, G. (1991) *Biochim Biophys Acta* **1115** (1), 1-5.
12. Jimenez-Cervantes, C., Garcia-Borrón, J. C., Valverde, P., Solano, F. and Lozano, J. A. (1993) *Eur. J. Biochem.* **217** (2), 549-556.
13. Jimenez, M., Tsukamoto, K. and Hearing, V. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266** (2), 1147-1156.
14. Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. A. and Garcia-Borrón, J. C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** (27), 17993-18001.
15. Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jimenez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., Garcia-Borrón, J. C. and Hearing, V. J. (1994) *EMBO J* **13** (24), 5818-5825.
16. Rorsman, H., Agrup, G., Hansson, C., Rosengren, M. and Rosengren, E. (1979) *Pigment Cell* **4** 244-252.
17. García-Borrón, J. C. and Solano, F. (2002) *Pigment Cell Res* **15** (3), 162-173.
18. Halaban, R., Svedine, S., Cheng, E., Smicun, Y., Aron, R. and Hebert, D. N. (2000)

Proc Natl Acad Sci USA **97** (11), 5889-5894.

19. Nishioka, K. (1977) *FEBS Lett* **80** (1), 225-228.
20. Jergil, B., Lindbladh, C., Rorsman, H. and Rosengren, E. (1983) *Acta Derm Venereol* **63** (6), 468-475.
21. Laskin, J. D. and Piccinini, L. A. (1986) *J. Biol. Chem.* **261** (35), 16626-16635.
22. Zhao, H., Zhao, Y., Nordlund, J. J. and Boissy, R. E. (1994) *Pigment Cell Res* **7** (3), 131-140.
23. Boissy, R. E., Sakai, C., Zhao, H., Kobayashi, T. and Hearing, V. J. (1998) *Exp Dermatol* **7** (4), 198-204.
24. Lerch, K. (1983) *Mol Cell Biochem* **52** (2), 125-138.
25. Huber, M. and Lerch, K. (1988) *Biochemistry* **27** (15), 5610-5615.
26. Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C. and Krebs, B. (1998) *Nat Struct Biol* **5** (12), 1084-1090.
27. Spritz, R. A., Ho, L., Furumura, M. and Hearing, V. J. J. (1997) *J. Invest. Dermatol.* **109** (2), 207-212.
28. Nakamura, M., Nakajima, T., Ohba, Y., Yamauchi, S., Lee, B. R. and Ichishima, E. (2000) *Biochem J* **350** (2), 537-545.
29. Furumura, M., Solano, F., Matsunaga, N., Sakai, C., Spritz, R. A. and Hearing, V. J. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **242** (3), 579-585.
30. Hearing, V. J. and Ekel, T. M. (1976) *Biochem J* **157** (3), 549-557.
31. Pomerantz, S. H. (1966) *J. Biol. Chem.* **241** (1), 161-168.
32. Pomerantz, S. H. and Warner, M. C. (1967) *J. Biol. Chem.* **242** (22), 5308-5314.
33. Tripathi, R. K., Hearing, V. J., Urabe, K., Aroca, P. and Spritz, R. A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** (33), 23707-23712.
34. Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A. J., Garman, E. F., Platt, F. M., Wormald, M. R., Dwek, R. A. and Petrescu, S. M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275** (11), 8169-8175.
35. Ujvari, A., Aron, R., Eisenhaure, T., Cheng, E., Parag, H. A., Smicun, Y., Halaban, R. and Hebert, D. N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276** (8), 5924-5931.
36. Halaban, R., Cheng, E., Zhang, Y., Moellmann, G., Hanlon, D., Michalak, M., Setaluri, V. and Hebert, D. N. (1997) *PNAS* **94** (12), 6210-6215.
37. Oetting, W. S. (2000) *Pigment Cell Res* **13** (5), 320-325.
38. Toyofuku, K., Wada, I., Valencia, J. C., Kushimoto, T. O., Ferrana, V. J. and

- Hearing, V. J. (2001) *FASEB J* **15** (12), 2149-2161.
39. Beermann, F., Orlow, S. J., Boissy, R. E., Schmidt, A., Boissy, Y. L. and Lamoreux, M. L. (1995) *Exp Eye Res* **61** (5), 599-607.
40. Spritz, R. A., Strunk, K. M., Giebel, L. B. and King, R. A. (1990) *N. Engl. J. Med.* **322** (24), 1724-1728.
41. Bouchard, B., del Marmol, V., Jackson, I. J., Cherif, D. and Dubertret, L. (1994) *Eur. J. Biochem.* **219** (1), 127-134.
42. del Marmol, V., Ito, S., Jackson, I., Vachtenheim, J., Berr, P., Ghanem, G., Morandini, R., Wakamatsu, K. and Huez, G. (1993) *FEBS Lett* **327** (3), 307-310.
43. Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Beermann, F., Aparicio, P., Lozano, J. A. and Garcia-Borrón, J. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** (7), 3967-3972.
44. Jara, J. R., Solano, F. and Lozano, J. A. (1988) *Pigment Cell Res* **1** (5), 332-339.
45. Winder, A. J. and Harris, H. (1991) *Eur. J. Biochem.* **198** (2), 317-326.
46. Jimenez-Cervantes, C., Valverde, P., Garcia-Borrón, J. C., Solano, F. and Lozano, J. A. (1993) *Pigment Cell Res* **6** (6), 394-399.
47. Jimenez-Cervantes, C., Martinez-Esparza, M., Solano, F., Lozano, J. A. and Garcia-Borrón, J. C. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **253** (3), 761-767.
48. Loir, B., Perez Sanchez, C., Ghanem, G., Lozano, J. A., Garcia-Borrón, J. C. and Jimenez-Cervantes, C. (1999) *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45** (7), 1083-1092.
49. Yamamoto, H., Takeuchi, S., Kudo, T., Makino, K., Nakata, A., Shinoda, T. and Takeuchi, T. (1987) *Jpn. J. Genet.* **62** 271-274.
50. Kelsall, S. R., Le Fur, N. and Mintz, B. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **236** (1), 173-177.
51. Giebel, L. B. and Spritz, R. A. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18** (10), 3103-3103.
52. Ito, S. and Wakamatsu, K. (1989) *J. Invest. Dermatol.* **92** (5), 261S-265S.
53. Wilczek, A., Kondoh, H. and Mishima, Y. (1996) *Pigment Cell Res* **9** (2), 63-67.
54. Palumbo, A., D'Ischia, M. and Prota, G. (1987) *Tetrahedron* **43** (18), 4203-4206.
55. Orlow, S. J., Osber, M. P. and Pawelek, J. M. (1992) *Pigment Cell Res* **5** (3), 113-121.
56. Wilczek, A. and Mishima, Y. (1995) *Pigment Cell Res* **8** (2), 105-112.
57. Bu'Lock, J. D. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* **91** 189-193.

58. Bernd, A., Ramirez-Bosca, A., Kippenberger, S., Martinez-Liarte, J. H., Holzmann, H. and Solano, F. (1994) *Melanoma Res* **4** (5), 287-291.
59. Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D. C. and Hearing, V. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** (48), 31801-31805.
60. Toyofuku, K., Wada, I., Spritz, R. A. and Hearing, V. J. (2001) *Biochem J* **355** (2), 259-269.
61. Solomon, E. I. and Lowery, M. D. (1993) *Science* **259** (5101), 1575-1581.
62. Oetting, W.S. (1998) *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology.* Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. and Ortonne, J.P., Eds. Oxford Univ. Press, NY, USA, pp. 231-249.
63. Solano, F., Jimenez-Cervantes, C., Martinez-Liarte, J. H., Garcia-Borron, J. C., Jara, J. R. and Lozano, J. A. (1996) *Biochem J* **313** (2), 447-453.
64. Bubacco, L., Salgado, J., Tepper, A. W., Vijgenboom, E. and Canters, G. W. (1999) *FEBS Lett* **442** (2-3), 215-220.
65. Berson, J. F., Frank, D. W., Calvo, P. A., Bieler, B. M. and Marks, M. S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275** (16), 12281-12289.
66. Espin, J. C., Varon, R., Fenoll, L. G., Gilabert, M. A., Garcia-Ruiz, P. A., Tudela, J. and Garcia-Canovas, F. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267** (5), 1270-1279.
67. Parodi, A. J. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* **69** (1), 69-93.
68. Halaban, R., Cheng, E., Zhang, Y., Moellmann, G., Hanlon, D., Michalak, M., Setaluri, V. and Hebert, D. N. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (12), 6210-6215.
69. Petrescu, S. M., Petrescu, A. J., Titu, H. N., Dwek, R. A. and Platt, F. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** (25), 15796-15803.
70. Xu, Y., Bartido, S., Setaluri, V., Qin, J., Yang, G. and Houghton, A. N. (2001) *Exp Cell Res* **267** (1), 115-125.
71. Halaban, R., Cheng, E., Svedine, S., Aron, R. and Hebert, D. N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276** (15), 11933-11938.
72. Ohkura, T., Yamashita, K., Mishima, Y. and Kobata, A. (1984) *Arch Biochem Biophys* **235** (1), 63-77.
73. Petrescu, S. M., Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A. J. and Dwek, R. A. (2000) *Biochemistry* **39** (18), 5229-5237.
74. Harrison, M. D., Jones, C. E., Solioz, M. and Dameron, C. T. (2000) *Trends Biochem Sci* **25** (1), 29-32.
75. Negroiu, G., Branza-Nichita, N., Costin, G. E., Titu, H., Petrescu, A. J., Dwek, R. A. and Petrescu, S. M. (1999) *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45** (7), 1001-1010.

76. Lutsenko, S. and Kaplan, J. H. (1995) *Biochemistry* **34** (48), 15607-15613.
77. Petris, M. J., Strausak, D. and Mercer, J. F. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9** (19), 2845-2851.

APÉNDICE I

1. Tampones.

a) Generales.

PBS (pH 7.2):

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

Tampón de solubilización (células y tumores):

| | | |
|--------------------------------------------------------------------|--------|--------|
| Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ | 10 mM | pH 6.8 |
| Igepal-CA630 | 1% | |
| PMSF | 0.1 mM | |

Tampón de lavado de tumores:

| | | |
|--------------------------------------------------------------------|--------|--------|
| Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ | 10 mM | pH 6.8 |
| Sacarosa | 0.25M | |
| EDTA | 0.1 mM | |

Tampón de homogeneización: tampón de lavado + PMSF 0.1 mM.

Tampón para actividades TH y DO: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 10 mM, pH 6.8.

Eluyente para HPLC (DHICA):

25% metanol
75% tetraborato sódico 0.1 M, EDTA 0.1 mM
(ajustado a pH 2.5 con HCl)

Tampón de desglicosilación:

| | | |
|--------------------------------------------------------------------|-------|--------|
| Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ | 50 mM | pH 7.0 |
| EDTA | 10 mM | |
| SDS | 0.1% | |

b) RNA.

Tampón de lisis:

| | | |
|--------------------------|------------|--------|
| Tiocianato de guanidinio | 4 M | |
| Citrato sódico | 25 mM | pH 7.0 |
| β-mercaptoetanol | 5.6% (v/v) | |

Disolución generadora de gradiente:

| | | |
|------|-------|--------|
| CsCl | 5.7 M | |
| EDTA | 0.1 M | pH 7.0 |

Para preparar 30 ml, se pesan 28.8 g de CsCl y 1.12 g de EDTA (sal disódica). Se añaden 4 gotas de dietilpirocarbonato y se ajusta el pH a 7.0 en un volumen de unos 20 ml. Esta disolución se hierve durante 1 min y se completa el volumen a 30 ml.

Tampón de resuspensión (RNA):

| | |
|------|-------|
| NaCl | 0.3 M |
| SDS | 0.1% |

Solución de desnaturalización (carga de muestras en gel):

| | |
|------------------------------|--------|
| Glioxal desionizado | 100 µl |
| DMSO | 250 µl |
| Tampón fosfato 100 mM pH 7.0 | 50 µl |

Tampón de recorrido de electroforesis: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7.0.

c) DNA.

Tampón de carga de muestras (5x):

| | | |
|--------------------|-------|--------|
| Ficoll 400 | 20% | |
| Azul de bromofenol | 0.05% | |
| Azul xileno | 0.05% | |
| EDTA | 50 mM | pH 7.2 |

Tampón de recorrido de electroforesis (TAE):

| | |
|---------------|--------------------|
| Tris | 40 mM |
| EDTA | 1.0 mM |
| Ácido acético | 30 mM (0.175% v/v) |

d) Inmunoprecipitación.

Tampón de lisis:

| | | |
|--------------|---------|--------|
| Tris HCl | 50 mM | pH 7.5 |
| EDTA | 0.1 mM | |
| KCl | 400 mM | |
| Triton X-100 | 2% | |
| PMSF | 1.0 mM | |
| Leupeptina | 1 µg/ml | |
| Pepstatina | 1 µg/ml | |

Tampón de lavados:

| | | |
|--------------|--------|--------|
| Tris HCl | 10 mM | pH 7.5 |
| KCl | 500 mM | |
| NaCl | 300 mM | |
| Triton X-100 | 0.05% | |

e) Obtención de bacterias competentes y transformación.

Tampón de transformación:

| | | |
|---------------------------------------------------|--------|--------|
| MES | 10 mM | pH 6.2 |
| KCl | 100 mM | |
| MnCl ₂ 4H ₂ O | 45 mM | |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 10 mM | |
| CoCl ₃ (NH ₃) ₆ | 3 mM | |

DTT para transformar: DTT 2.25 M en acetato potásico 40 mM pH 6.0.

X-Gal: 20 mg/ml en dimetilformamida.

IPTG: 24 mg/ml en agua, esterilizado por filtración.

f) Minipreps por lisis alcalina.

Tampón de resuspensión (DNA):

| | | |
|----------|-------|--------|
| Tris HCl | 25 mM | pH 8.0 |
| EDTA | 10 mM | |
| Glucosa | 50 mM | |

Tampón de lisis:

| | |
|------|-------|
| NaOH | 0.2 N |
| SDS | 1% |

Tampón de neutralización:

| | |
|------------------|-----|
| Ácido acético | 2 M |
| Acetato potásico | 3 M |

Fenol/cloroformo: en proporción 1:1 (v/v), con 0.05% de hidroxiquinoleína.

2. Medios de cultivo de bacterias.

La composición de los medios de cultivo empleados para bacterias se detalla por litro de medio.* El pH se ajusta a 7.5 con NaOH y el medio tamponado se esteriliza en autoclave. A continuación, al SOB se le añaden 10 ml de MgSO₄ 1 M y 10 ml de MgCl₂ 1 M esterilizados por separado en autoclave (de modo que ambas quedan a una concentración final de 10 mM). También es conveniente dejar enfriar el medio hasta 55°C antes de añadir cualquier antibiótico. Los medios sólidos se preparan añadiendo 1.8 g de agar-agar por cada 100 ml de medio.

El **SOB** se prepara a partir del SOB añadiendo 1 ml de glucosa 2 M esterilizada por filtración por 100 ml de SOB, también estériles (concentración final de glucosa: 20 mM).

| Componente | LB | SOB |
|----------------------|------|-------|
| Extracto de levadura | 5 g | 5 g |
| Triptona | 10 g | 20 g |
| NaCl | 10 g | 0.5 g |

Los antibióticos empleados como marcadores de selección (ampicilina y kanamicina) se prepararon a las concentraciones stock recomendadas, se esterilizaron por filtración y se mantuvieron a -20°C. La concentración final en los medios también fue la recomendada para este tipo de cultivo:

| Antibiótico | Stock (mg/ml) | µg/ml (medio) |
|-------------|---------------|---------------|
| Ampicilina | 25 | 50 |
| Kanamicina | 10 | 50 |

* Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1986) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

3. Medios de cultivo de células eucariotas.

Se indica la composición de los medios empleados en mg/l, tal y como aparece en el catálogo de medios de cultivo de GIBCO (2003).

Salvo cuando se indique lo contrario, el medio se suplementó con un 10% de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

Para tripsinizar las células se empleó tripsina (0.1 mg/ml) y EDTA (0.2 mg/ml) en PBS.

| Componentes | DMEM | EMEM | Ham's F12 | RPMI 1640 |
|-----------------------------------------------------|--------|--------|-----------|-----------|
| Sales inorgánicas | | | | |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 264.0 | 264.0 | 44.0 | |
| Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O | | | | 100.0 |
| CuSO ₄ 5H ₂ O | | | 0.0024 | |
| FeNO ₃ ·9H ₂ O | 0.1 | | | |
| FeSO ₄ 7H ₂ O | | | 0.83 | |
| KCl | 400.0 | 400.0 | 223.6 | 400.0 |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | | | 122.0 | |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 200.0 | 200.0 | | 100.0 |
| NaCl | 6400.0 | 6300.0 | 7599.0 | 5500.0 |
| NaHCO ₃ | 3700.0 | 2200.0 | 1176.0 | 2000.0 |
| NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O | 140.0 | 158.0 | | |
| Na ₂ HPO ₄ anhidro | | | 142.0 | 800.0 |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | | | 0.86 | |
| Aminoácidos | | | | |
| L-Ala | 35.6 | | 8.9 | |
| L-Arg | 84.0 | 126.4 | 211 | 240.0 |
| L-Asn | 60.0 | | 13 | 50.0 |
| L-Asp | 53.0 | | 13.3 | 20.0 |
| L-Cys | | | 36.0 | |
| L-cistina | 48.0 | 24.0 | | 50.0 |
| L-Glu | 59.0 | | 14.7 | 20.0 |
| Gly-L-Gln | | | | 10.0 |
| Gly | 30.0 | | 7.5 | 10.0 |
| L-His | 42.0 | 42.0 | 21.0 | 15.0 |
| L-hPro | | | | 20.0 |
| L-Ile | 105.0 | 52.5 | 4.0 | 50.0 |
| L-Leu | 105.0 | 52.5 | 13.0 | 50.0 |
| L-Lys | 146.0 | 73.1 | 36.5 | 40.0 |
| L-Met | 30.0 | 14.9 | 4.5 | 15.0 |
| L-Phe | 66.0 | 33.0 | 5.0 | 15.0 |
| L-Pro | 46.0 | | 34.5 | 20.0 |
| L-Ser | 42.0 | | 10.5 | 30.0 |
| L-Thr | 95.0 | 47.6 | 12.0 | 20.0 |
| L-Trp | 16.0 | 10.2 | 2.0 | 5.0 |
| L-Tyr | 72.0 | 36.2 | 5.4 | 20.0 |
| L-Val | 94.0 | 46.9 | 11.7 | 20.0 |

| Componentes | DMEM | EMEM | Ham's F12 | RPMI 1640 |
|--------------------------|--------|--------|-----------|-----------|
| Vitaminas | | | | |
| Biotina | | | 0.0073 | 0.2 |
| Ác. pantoténico | 4.0 | 1.0 | .05 | 0.25 |
| Cloruro de colina | 4.0 | 1.0 | 14.0 | 3.0 |
| Ác. fólico | 4.0 | 1.0 | 1.3 | 1.0 |
| i-Inositol | 7.2 | 2.0 | 18.0 | 35.0 |
| Nicotinamida | 4.0 | 1.0 | 0.036 | 1.0 |
| Ác. p-aminobenzoico | | | | 1.0 |
| Piridoxina | 4.0 | 1.0 | 0.06 | 1.0 |
| Riboflavina | 0.4 | 0.1 | 0.037 | 0.2 |
| Tiamina | 4.0 | 1.0 | 0.3 | 1.0 |
| Vitamina B ₁₂ | | | 1.4 | 0.005 |
| Otros componentes | | | | |
| D-glucosa | 4500.0 | 1000.0 | 1802.0 | 2000.0 |
| Rojo fenol | 17.0 | 10.0 | 1.2 | 5.0 |
| Hipoxantina | | | 4.0 | |
| Glutación (reducido) | | | | 1.0 |
| Ác. linoleico | | | 0.084 | |
| Putrescina HCl | | | 0.161 | |
| Piruvato sódico | | | 110.0 | |
| HEPES | | 5960.0 | | 5958.0 |
| Timidina | | | 0.7 | |
| Ácido tióctico | | | 0.2 | |

4. SDS-PAGE y Western Blot.

a) SDS-PAGE.

GELES de poliacrilamida: la mezcla acrilamida/bisacrilamida (AA/bAA) se utilizó en la proporción 30:0.8. A continuación se detalla la composición de los geles utilizados habitualmente en SDS-PAGE.

Gel separador

| Componente | Porcentaje de poliacrilamida | | |
|------------------------|------------------------------|---------|---------|
| | 8% | 9% | 10% |
| H ₂ O | 2.35 ml | 2.18 ml | 2.01 ml |
| AA/bAA | 1.33 ml | 1.5 ml | 1.67 ml |
| Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 | 1.25 ml (375 mM) | | |
| SDS 10% | 50 µl (0.1%) | | |
| Persulfato amónico 10% | 20 µl | | |
| TEMED | 2 µl | | |

Gel hacinador (4% poliacrilamida)

| | |
|-----------------------|-----------------|
| H ₂ O | 1.20 ml |
| AA/bAA | 280 µl |
| Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 | 0.5 ml (125 mM) |
| SDS 10% | 20 µl (0.1%) |
| Persulf. amónico 10% | 20 µl |
| TEMED | 2 µl |

Tampón de muestra (3x):

| | | |
|--------------------|--------|------------------------------------|
| Tris HCl | 0.18 M | pH 6.8 |
| Glicerol | 15% | |
| SDS | 9% | |
| Azul de bromofenol | 0.075% | |
| β-mercaptoetanol | 7.5% | (sólo para condiciones reductoras) |

Tampón de recorrido:

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

b) Western Blot.

Tampón de transferencia:

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

Tampón de unión del 1^{er} anticuerpo:

| | | | |
|-----------------|--------|-----------------|--------|
| • <u>αPEP1:</u> | | • <u>αPEP7:</u> | |
| PBS | | PBS | |
| Tween 20 | 0.2% | Tween 20 | 0.1% |
| NaCl | 100 mM | NaCl | 100 mM |
| BSA | 1% | | |

Tampón de unión del 2^o anticuerpo y de lavados:

| | |
|----------|--------|
| PBS | |
| Tween 20 | 0.1% |
| NaCl | 100 mM |

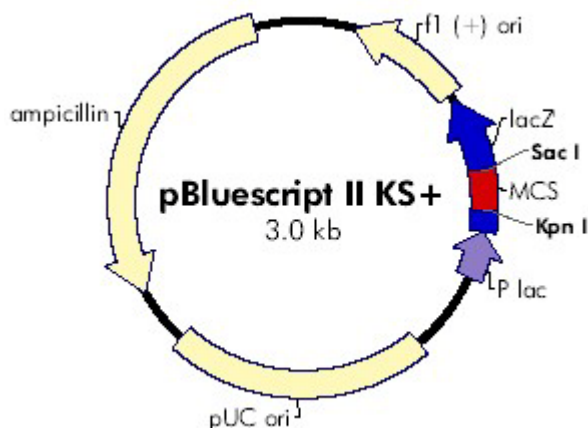
Disolución de DAB:

| | |
|-------------------------------|-----------|
| PBS | |
| 3,3'-diaminobencidina | 0.6 mg/ml |
| CoCl ₂ | 0.03% |
| H ₂ O ₂ | 0.001% |

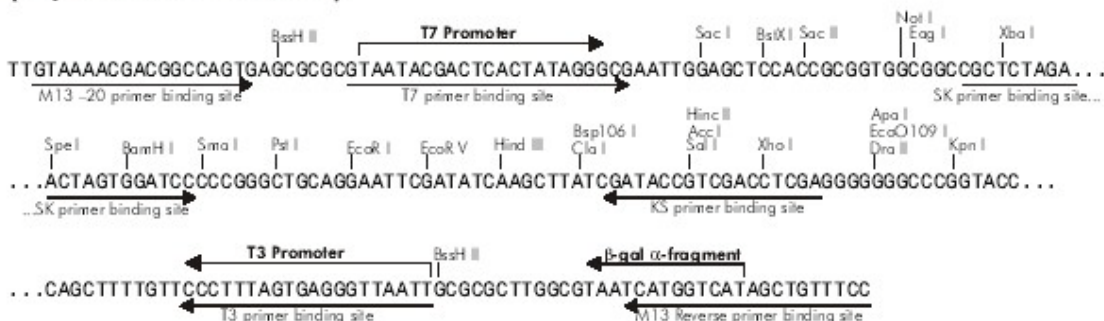
5. Mapas y sitios de restricción de los vectores empleados.

a) *pBluescript II KS.*

f1 (+) origin 135–441
β-galactosidase α-fragment 460–816
multiple cloning site 653–760
lac promoter 817–938
pUC origin 1158–1825
ampicillin resistance (bla) ORF 1976–2833



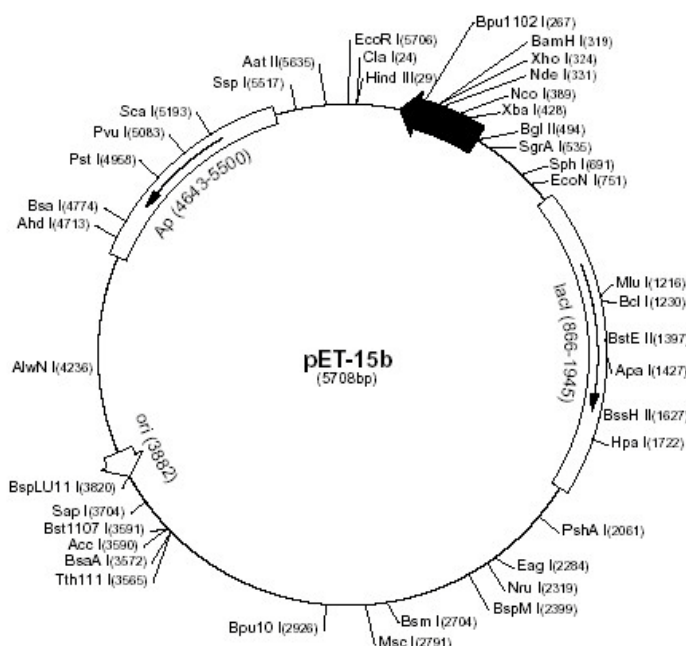
pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)



<http://www.stratagene.com/vectors/selection/plasmid1.htm>

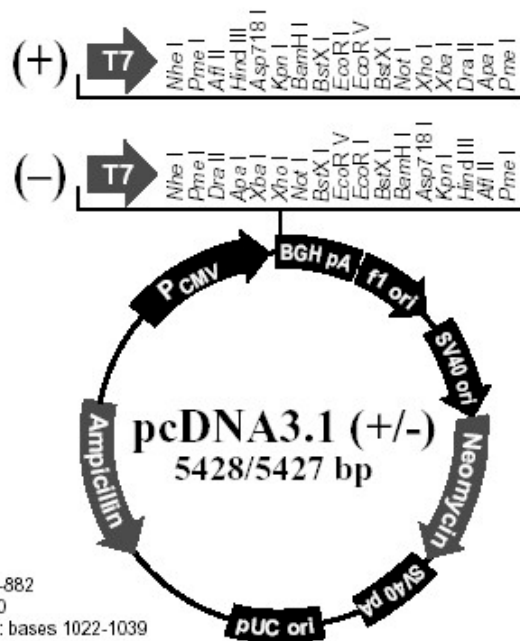
b) *pET-15b.*

| pET-15b sequence landmarks | |
|--------------------------------------------|------------|
| T7 promoter | 453-469 |
| T7 transcription start | 452 |
| His* Tag coding sequence | 362-380 |
| Multiple cloning sites (Nde I - BamH I) | 319-335 |
| T7 terminator | 213-259 |
| lacI coding sequence | (866-1945) |
| pBR322 origin | 3882 |
| bla coding sequence | 4643-5500 |



http://www.novagen.com/SharedImages/TechnicalLiterature/7_TB045.pdf

c) ***pcDNA3.1.***



Comments for pcDNA3.1 (+)
5428 nucleotides

- CMV promoter: bases 232-819
- T7 promoter/priming site: bases 863-882
- Multiple cloning site: bases 895-1010
- pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
- BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252
- f1 origin: bases 1298-1726
- SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074
- Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930
- SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234
- pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)
- Ampicillin resistance gene (bla): bases 4432-5428 (complementary strand)
- ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)
- Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)
- bla promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)

<http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna3.1+.pdf>

6. Búsqueda de bibliografía y secuencias.

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

- Biblioteca de Ciencias y Medicina de la Universidad de Stanford:
<http://highwire.stanford.edu/cgi/search/>
- Centro Nacional para la Información Biotecnológica de Bethesda (NCBI):
<http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>
- Biblioteca de la Universidad de Murcia:
http://www.um.es/biblioteca/bibl_electr/revistas/azlist/index.html

Asimismo, las secuencias de cDNAs y proteínas se localizaron en el NCBI:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>

APÉNDICE II: PUBLICACIONES

The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase

Concepción OLIVARES, Celia JIMÉNEZ-CERVANTES, José Antonio LOZANO, Francisco SOLANO and José Carlos GARCÍA-BORRÓN¹

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Murcia, Apto 4021, Campus Espinardo, 30100 Murcia, Spain

Melanin synthesis in mammals is catalysed by at least three enzymic proteins, tyrosinase (monophenol dihydroxyphenylalanine:oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1) and tyrosinase-related proteins (tyrps) 1 and 2, whose genes map to the *albino*, *brown* and *slaty* loci in mice, respectively. Tyrosinase catalyses the rate-limiting generation of L-dopaquinone from L-tyrosine and is also able to oxidize L-dopa to L-dopaquinone. Conversely, mouse *tyrp1*, but not tyrosinase, catalyses the oxidation of the indolic intermediate 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) into the corresponding 5,6-indolequinone-2-carboxylic acid, thus promoting the incorporation of DHICA units into eumelanin. The catalytic activities of the human melanogenic enzymes are still debated. TYRP1 has been reported to lack DHICA oxidase activity, whereas tyrosinase appears to ac-

celerate DHICA consumption, thus raising the question of DHICA metabolism in human melanocytes. Here we have used two different approaches, comparison of the catalytic activities of human melanocytic cell lines expressing the full set of melanogenic enzymes or deficient in TYRP1, and transient expression of *TYR* and *tyr* genes in COS7 cells, to demonstrate that human tyrosinase actually functions as a DHICA oxidase, as opposed to the mouse enzyme. Therefore, human tyrosinase displays a broader substrate specificity than its mouse counterpart, and might be at least partially responsible for the incorporation of DHICA units into human eumelanins.

Key words: melanin, melanocyte, melanogenesis, tyrosinase-related protein 1.

INTRODUCTION

Melanogenesis is the biochemical pathway responsible for melanin synthesis. In mammals, three related and highly similar metalloenzymes, tyrosinase (monophenol dihydroxyphenylalanine:oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1) and the tyrosinase-related proteins (tyrps) 1 and 2 are involved in the catalytic control of the process. Their cDNAs have been cloned and sequenced [1–6] and, in the mouse, the corresponding genes have been mapped to the *albino*, *brown* and *slaty* loci, respectively. The amino acid L-tyrosine is the metabolic precursor of the pigment. Tyrosinase catalyses the hydroxylation of L-tyrosine and the oxidation of the intermediate L-dopa to L-dopaquinone (L-DQ) [7]. L-DQ is a reactive intermediate that, in the absence of thiol compounds, spontaneously undergoes cyclization and further rearrangement, yielding L-dopachrome [8]. *tyrp2* (dopachrome Δ^2, Δ^7 -isomerase, EC 5.3.3.12), also called dopachrome tautomerase, catalyses the tautomerization of dopachrome into the more stable intermediate 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) [9,10]. *tyrp1* from mouse melanocytes has been reported to be a low-specific-activity tyrosinase isoenzyme with both tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities [11,12]. Moreover, this enzyme catalyses the oxidation of DHICA [13,14], thus promoting its incorporation into the eumelanin polymer. Therefore, in mouse melanocytes, the eumelanogenic pathway proceeds as shown in Scheme 1.

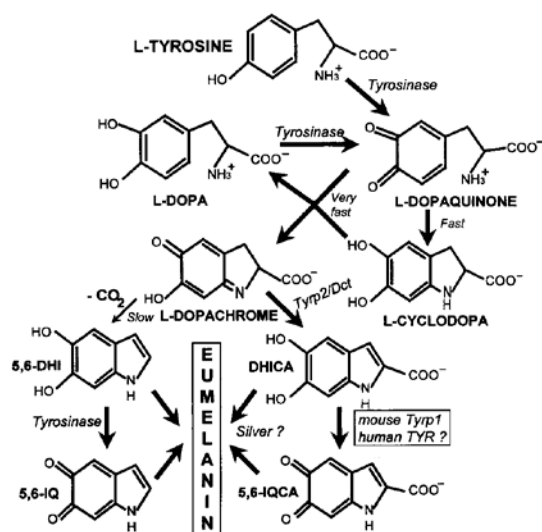
In spite of their extensive sequence similarities (40% amino acid identities and approx. 70% amino acid homologies), tyrosinase and *tyrp1* display dramatic differences in their kinetic parameters and substrate specificities, at least in the murine system [11], where the enzymic capabilities of the melanogenic enzymes are better characterized. We have previously reported

that purified tyrosinase and *tyrp1* from mouse melanoma have different K_m values for both L-tyrosine and L-dopa substrates, as well as different requirements for the cofactor L-dopa needed in the hydroxylation of L-tyrosine. In addition, even though mouse *tyrp1* is able to recognize DHICA and transform it into the corresponding quinone [13,14], mouse tyrosinase does not display significant DHICA oxidase activity.

On the other hand, the kinetic properties of the human melanogenic enzymes are less well characterized, probably due to the difficulty in obtaining enough biological material to attempt their large-scale purification. Some of the reported studies, performed either with relatively crude extracts or with purified enzyme preparations, have pointed out important similarities between the mouse and human melanogenic enzymes [15,16]. Therefore, it has been generally assumed that their kinetic behaviour should be very similar [17], and results obtained with the murine model are often extrapolated to human melanocytes. However, recent data suggest that the catalytic properties of the human and mouse melanogenic enzymes could display significant differences. For instance, affinity-purified human TYRP1 appears to possess tyrosine hydroxylase, but not dopa oxidase activity [18]. Interestingly, it has been reported recently that TYRP1 seems also unable to oxidize DHICA [19]. Accordingly, the human protein might share the tyrosine hydroxylase activity with the mouse enzyme, but might miss the *o*-diphenol and dihydroxyindole oxidase activities of murine *tyrp1*. On the other hand, DHICA monomers are actually incorporated into natural human melanin [20,21], and a DHICA converting activity has been attributed to human tyrosinase (TYROSINASE) expressed in fibroblasts [22]. However, this activity was determined from DHICA consumption experiments, and the reaction product was not characterized. These observations raise the possibility that

Abbreviations used: DHI, 5,6-dihydroxyindole; DHICA, 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid; L-DQ, L-dopaquinone; IQCA, 5,6-indolequinone-2-carboxylic acid; LFDM, low-fat dry milk; MBTH, 3-methyl-2-benzothiazolinone; *tyrp*, tyrosinase-related protein.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail gborron@um.es).



Scheme 1 Current view of the eumelanogenic pathway

The functions shown for the melanogenic enzymes, particularly tyrp1, are those demonstrated in murine melanocytes. Dct, dopachrome tautomerase; 5,6-DHI, 5,6-dihydroxyindole; 5,6-IQ, 5,6-indolequinone; 5,6-IQCA, 5,6-indolequinone-2-carboxylic acid.

TYROSINASE might recognize and oxidize DHICA, accounting for its incorporation into the melanin biopolymer. In any case, the catalytic properties of human and mouse tyrosinases could display subtle differences, but a comparison of the two enzymes, under identical experimental conditions, has not yet been performed.

Owing to the low availability of human melanogenic tissues, the purification of TYROSINASE and TYRP1 is hardly feasible. Alternative and complementary strategies to study their substrate specificities and kinetic behaviour are (i) comparison of the kinetics of the TYROSINASE and/or TYRP1 reactions in extracts from human melanoma cell lines expressing the complete set of melanogenic enzymes or defective in one or more of the proteins, a frequent situation in human melanoma cells [23–25] and (ii) expression of the corresponding genes in non-melanocytic cells, to avoid of possible interferences from other melanogenic proteins.

Using two melanoma cell lines expressing TYROSINASE, TYRP1 and dopachrome tautomerase, and one cell line defective in TYRP1, we have analysed the ability of the human enzymes to use DHICA as substrate. We show that extracts from human melanoma cells lacking TYRP1 are able to oxidize and metabolize DHICA. Moreover, at low concentration, DHICA acts as a cofactor for their tyrosine hydroxylase activities, whereas at higher concentrations, it inhibits tyrosine hydroxylation. Regarding the second approach, extracts of COS7 cells transiently transfected with the human *TYR* gene display DHICA oxidase activity, but those transfected with the mouse *tyr* gene do not. Overall, these results show that human TYROSINASE, as opposed to the mouse enzyme, is able to carry out DHICA oxidation and to promote the incorporation of carboxylated dihydroxyindoles into the eumelanin polymer.

EXPERIMENTAL

Reagents

The radioactive substrate L-[3,5-³H]-tyrosine, specific activity 50 Ci/mmol, was obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Bucks, U.K.). DHICA was a gift from Professor S. Ito (Fujita Health University, Toyoake, Japan). The specific α PEP1 and α PEP7 antisera, recognizing the C-terminal cytosolic extension of mouse tyrp1 and tyrosinase respectively, were a kind gift from Dr V. Hearing (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.). Electrophoresis and Western-blotting reagents and materials were from Bio-Rad (Hercules, CA, U.S.A.), unless otherwise specified. Reagents and plasticware for cell culture were obtained from either Nunc (Roskilde, Denmark) or Gibco (Gaithersburg, MD, U.S.A.). Other reagents were from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.), Merck (Darmstadt, Germany) or Prolabo (Barcelona, Spain).

Cell culture and preparation of crude solubilized extracts

Human melanoma cells were grown in Ham's F12 medium supplemented with 1% streptomycin, 1% penicillin, 1% kanamycin, 2% ultrosor and 10% fetal calf serum. The three lines, HBL, SCL and BEU, were originally established in the laboratory of Dr G. Ghanem (Laboratoire d'Oncologie et Chirurgie Experimentale, Brussels, Belgium) [23,24]. B16 mouse melanoma cells were cultured as described previously [26]. Cells were seeded in 75 cm² flasks at a density of 5 × 10⁵ cells/flask, and allowed to grow to approx. 80% confluence. Cells were harvested by trypsin treatment, washed twice with PBS, and solubilized in 10 mM sodium phosphate, pH 6.8, containing 1% Igepal CA-630, 0.1 mM EDTA and 0.1 mM PMSF using approx. 1 ml of solubilization buffer/10⁷ cells. The extracts were then centrifuged at 20000 g for 30 min to remove particulate material. The cleared supernatants were used for enzyme activity determinations. B16 mouse melanoma tyrosinase was purified from solid tumours maintained in C57/Bl mice as described previously [11,13].

Enzyme activity determinations

Tyrosine hydroxylase activity was determined by a radiometric method described elsewhere [27]. One unit was defined as the amount of enzyme catalysing the hydroxylation of 1 μ mol of L-tyrosine/min, in the presence of a 50 μ M concentration of the substrate and 10 μ M L-dopa as cofactor.

Dopa oxidase activity was measured spectrophotometrically in the presence of 3-methyl-2-benzothiazolinone (MBTH), as described by Winder and Harris [28] with minor modifications, using final concentrations of L-dopa and MBTH of 3.0 and 3.25 mM, respectively.

DHICA oxidase activity was determined by either one of three complementary methods: (i) HPLC determination of DHICA consumption [13], (ii) spectrophotometric quantification of the formation of a coloured adduct of 5,6-indolequinone-2-carboxylic acid (IQCA) and MBTH [13,14], and (iii) spectral evolution of DHICA solutions in the UV/visible range in the presence of enzyme extracts [13]. DHICA was dissolved in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, containing 0.1 mM EDTA to minimize spontaneous or metal-ion-catalysed oxidation.

Electrophoretic procedures

Analytical SDS/PAGE was performed as described in [11], in 12% acrylamide gels, but without 2-mercaptoethanol and heat-

ing to preserve tyrosinase activity. Samples were mixed in a 2:1 ratio with sample buffer (0.18 M Tris/HCl, pH 6.8/15% glycerol/0.075% Bromophenol Blue/9% SDS), and electrophoresis was run at 4 °C. A highly sensitive and specific dopa oxidase activity stain was carried out by equilibrating the gels at pH 6.0 with 50 mM sodium phosphate buffer, followed by incubation at 37 °C in 1.5 mM L-dopa/4 mM MBTH, in 10 mM phosphate buffer, pH 6.8, from 15 to 30 min [29].

Immunochemical techniques

SDS/PAGE gels were run as described above, except for the presence of 2-mercaptoethanol in the sample buffer. Transfer to PVDF membranes (PolyScreen, NEN, Boston, MA, U.S.A.) was done in a semi-dry unit, and checked by Coomassie Brilliant Blue staining of the gel. For detection of tyrosinase with α PEP7, filters were blocked with 1% low-fat dry milk (LFD) in PBS, maintained for 1 h at room temperature and incubated overnight with a 1:1000 dilution of α PEP7 in binding buffer 1 (10 mM Tris/HCl, pH 7.5/140 mM NaCl/5% LFD). Membranes were washed three times for 5 min with washing buffer 1 (10 mM Tris/HCl, pH 7.5/140 mM NaCl/0.5% LFD/0.5% Tween 20). Following incubation with a peroxidase-labelled secondary antibody (from Chemicon, Temecula, CA, U.S.A.; 1:2500 dilution in binding buffer 1), the filters were washed four times with washing buffer 1. For detection of TYRP1 using α PEP1 (final dilution of 1:100), a similar procedure was employed, but the antibody-binding buffer was PBS containing 1% BSA, 0.1 M NaCl and 0.2% Tween 20. Staining was done with a chemiluminescent substrate (Amersham Pharmacia Biotech), or with 3,3'-diaminobenzidine (0.6 mg/ml), CoCl_2 (0.03%) and H_2O_2 (0.001%).

Transient expression of human and mouse tyrosinase in COS7 cells

Expression constructs for human and mouse tyrosinases were prepared in the pcDNA3 expression vector (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). For mouse tyrosinase, cDNA from B16 cells was obtained as described elsewhere [30], and amplified by PCR, using the proofreading *Pfu* polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.) and the following primers, 5'-TGA-TGAATTCGAGAAAATGTTCTTGGCTGT-3' (forward) and 5'-GTTTTCTAGAATGTTTCACAGATGGCTCTGA-3' (reverse), encompassing the start and stop codons (shown in bold), and containing added *Eco*RI and *Xba*I restriction sites (underlined). Amplification reactions yielded two products of different sizes that were cloned into pBluescript KS II (Stratagene, Heidelberg, Germany) using the restriction sites mentioned above. The identity of the products was verified by complete sequencing. The major band, of higher molecular size, was identical with the published wild-type sequence of the mouse enzyme ([31], GenBank accession number D00440). The minor band, of smaller size, corresponded to an alternative splicing variant whose occurrence has been reported by others [32]. This form, called $\Delta 3\text{tyr}$, lacks exon 3, between positions 1037 and 1184 of the coding sequence, thus generating a frameshift and a premature stop codon. Since the corresponding 390-amino-acid product is enzymically inactive due to the lack of the second copper-binding site, it was used as a negative control for all determinations of enzyme activity in transfected cells. For human TYROSINASE, the pMEL34 construct [33], obtained from the ATTC (Rockville, MD, U.S.A.) was used as target in PCR reactions using primers 5'-GGACAAGCTTAAGAATGCTCCTGGCTGTT-3' (forward) and 5'-CAGGICTAGAGGCCCTACTCTATTGCCTA-

A-3' (reverse), encompassing the complete reading frame of the *TYR* gene and containing added *Hind*III and *Xba*I restriction sites (underlined) for cloning into pBluescript. The cloned product was sequenced and found to match exactly the sequence published for the *TYR* gene (GenBank accession number M27160) except for a C/A change at position 575 that corresponds to an already identified polymorphism [34]. The *tyr* (mouse, full-length tyrosinase), $\Delta 3\text{tyr}$ (mouse, inactive alternatively spliced tyrosinase) and *TYR* (human, full-length tyrosinase) genes were subcloned into pcDNA3, and used to transfect COS7 cells with the Superfect reagent (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Cells were trypsin-harvested 24 h after transfection and processed for enzyme activity determinations or Western blotting as described above.

RESULTS

Melanogenic activities in TYRP1-positive and -negative human melanoma cells

The tyrosine hydroxylase, dopa oxidase and dopachrome tautomerase activities in three human melanoma cell lines (BEU, HBL and SCL) are shown in Figure 1(A). All the cell lines displayed significant levels of the three activities. Since BEU, HBL and SCL cells have been reported to express the *TYR* gene, but Northern-blot analysis of BEU cells suggests them to be TYRP1-negative [23], we wished for confirmation of these data at the protein and mRNA levels. The occurrence of enzymically active TYROSINASE protein was analysed by non-reducing SDS/PAGE followed by dopa oxidase activity stain [29]. As shown in Figure 1(B), human melanoma cells yielded a single tyrosinase activity band, whose electrophoretic mobility was identical in all cases, but markedly lower than the one of purified B16 melanoma tyrosinase. Expression of TYRP1 protein was analysed by Western blotting, with the mouse *tyrp1*-directed α PEP1 antiserum (Figure 1C). This antiserum reacts with an epitope located in the C-terminal pentadecapeptide of *tyrp1*. Although α PEP1 has been shown by others to be specific for the mouse enzyme, the conservation of 10 out of 15 amino acids between the mouse and the human C-terminal sequences appeared to confer on the antiserum a significant affinity for the human protein. Therefore, the antiserum could be used to detect TYRP1, under high-concentration conditions, to compensate for the lower affinity as compared with the mouse protein. α PEP1 reacted with a protein of approx. 75 kDa in extracts from SCL and, to a lesser extent, HBL cells, but not from BEU cells or human fibroblasts, thus proving the specificity of antibody binding under the experimental conditions employed to detect the human protein. Lack of expression of TYRP1 in BEU cells was further confirmed by reverse transcriptase PCR, using primers designed to amplify the complete coding sequence of the gene (Figure 1D). No amplification products were obtained with cDNA synthesized from total RNA extracted from BEU cells. However, an amplicon of the expected size (about 1.6 kb) was detected using cDNA from HBL cells as a positive control. Therefore, it is clear that BEU cells possess tyrosine hydroxylase, dopa oxidase and dopachrome tautomerase activities in the absence of TYRP1.

DHICA consumption by human melanoma cell extracts proceeds with oxidation and accelerated melanin formation

We compared the TYRP1-positive HBL and SCL cells, and the TYRP1-negative BEU cells, for their ability to metabolize DHICA. Extracts from each cell line were incubated at 37 °C with 0.5 mM DHICA, under conditions of comparable catalytic

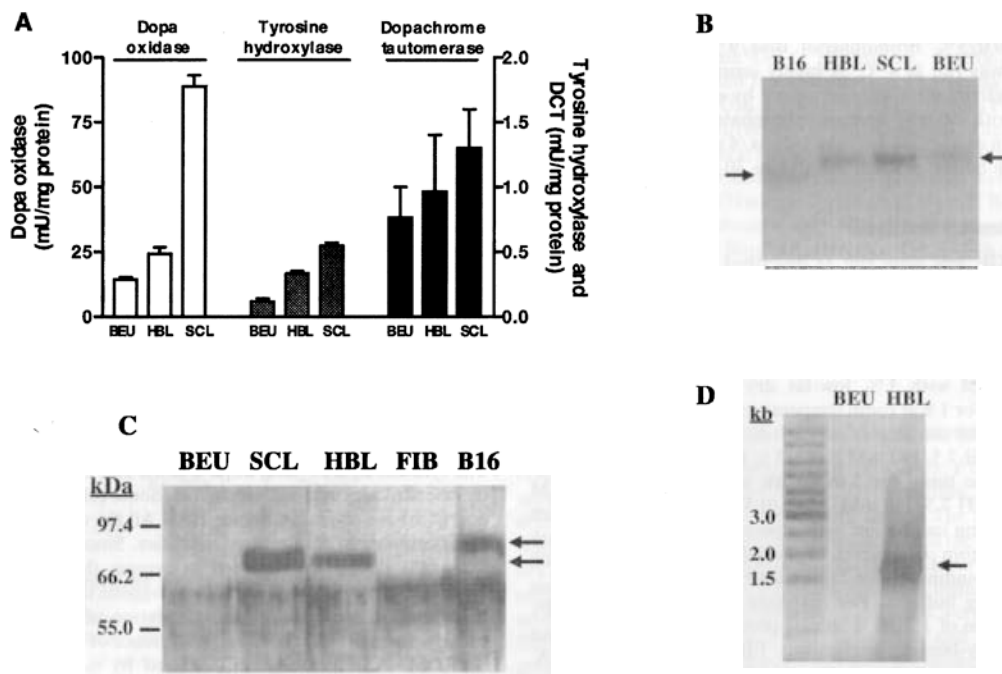


Figure 1 Melanogenic activities and enzyme expression in three human melanoma cell lines

(A) Melanogenic activities. DCT, dopachrome tautomerase. Results are the means ± SD from three independent assays with different cell extracts, each performed in duplicate. (B) Electrophoretic profile of purified tyrosinase (from B16 mouse melanoma) and the human enzyme from HBL, SCL and BEU melanoma cells. Crude extracts (30 µg of protein/lane) were resolved by non-reducing SDS/PAGE and stained for tyrosinase activity [29]. The left-hand arrow indicates the activity band corresponding to tyrosinase, whereas the right-hand arrow points to the activity band observed in the human melanoma cell extracts. (C) Western-blot analysis of TYRP1 expression in human melanoma cells. TYRP1 was detected with αPEP1 as primary antibody. The protein load was approx. 30 µg/lane. Molecular-mass standards are shown on the left. Arrows (lower and upper respectively) pointing to the human- and mouse-specific bands highlight the different electrophoretic mobilities of each protein. B16 and FIB designate crude extracts from mouse B16 melanoma cells and human fibroblasts, employed as positive and negative controls, respectively. (D) Lack of expression of the *TYRP1* gene in BEU cells. cDNA from BEU and HBL cells was amplified using primers encompassing the complete coding sequence of the *TYRP1* gene, and designed to yield an amplification product of 1644 bp. An aliquot of the amplification reaction was electrophoresed in a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. The arrow points to the single specific amplification product obtained.

dopa oxidase activity, and residual levels of DHICA were determined at different reaction times by HPLC. DHICA consumption by BEU extracts was low but detectable and significantly different ($P < 0.001$) from the blank (Figure 2). The HBL and SCL cell lines, expressing the complete set of melanogenic enzymes, exhibited a higher DHICA consumption activity. These data prove that DHICA is metabolized by human melanoma cell extracts, either in the presence or absence of TYRP1, but do not inform as to the nature of the reaction products. Therefore, experiments were carried out to establish whether DHICA consumption proceeds by oxidation and incorporation into melanins.

The evolution of DHICA solutions in the presence of human melanoma cell extracts was followed spectrophotometrically. Extracts from the three human cell lines accelerated eumelanin formation from DHICA, as measured by an increase in absorbance at 550 nm (Figure 3A), a wavelength indicative of dihydroxyindole dimers and pigment formation [35]. For comparable amounts of extract, the effect was faster for SCL cells, and comparable for BEU and HBL cells. In all cases, a lag phase was detected. This might correspond to initial trapping of the DHICA-derived quinone, IQCA, by thiol groups and other reactive nucleophiles present in the extract that would prevent

dimer formation until they are exhausted. The decay in absorbance at 550 nm observed for SCL extracts after long incubation times is probably due to an accelerated progression of dihydroxyindole dimers to oligomers and polymeric species, resulting from the high melanogenic activity found in this cell line (see Figure 1A). This progression causes a darkening of the solution, and renders the absorbance peak centred at 550 nm flatter and lower [35]. Comparable catalytic amounts of purified B16 melanoma tyrosinase did not accelerate the spectral evolution of DHICA solutions (results not shown). This inability of mouse tyrosinase to accelerate DHICA evolution is fully consistent with previous reports from our group [13].

Although melanin formation should proceed through the oxidation of the corresponding precursors, we wished for direct confirmation of IQCA production by using the quinone-trapping reagent MBTH [13,14,28]. This experiment was performed with BEU cells to avoid possible interference from TYRP1. Figure 3(B) shows that BEU extracts catalysed the formation of a coloured adduct, in the presence of DHICA and MBTH. The absorption spectrum of this product was very similar to the one of the DQ-MBTH adduct [13,28]. Overall, these results prove that DHICA can be oxidized and incorporated into a melanin polymer by human melanocyte extracts completely lacking

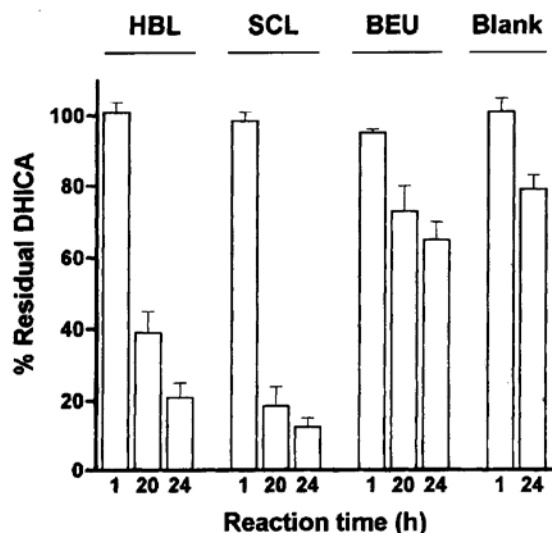


Figure 2 HPLC demonstration of DHICA consumption by human melanoma cell lines

Reaction mixtures containing 0.5 mM DHICA and amounts of extracts from HBL, BEU and SCL cells with comparable dopa oxidase activities (1.8, 1.1 and 1.0 m-units respectively) were incubated at 37 °C. The residual concentration of DHICA was analysed by HPLC at the times shown. A blank performed in the absence of cell extract is also shown to illustrate relative DHICA stability.

TYRP1, yet they do not demonstrate that TYROSINASE is the enzyme responsible for DHICA oxidation.

DHICA is recognized by TYROSINASE from human melanoma cell extracts

In order to obtain further evidence proving that DHICA is actually recognized by TYROSINASE, we analysed its ability to act as a cofactor and/or an inhibitor of tyrosine hydroxylation, using extracts from HBL and BEU cells as a source of enzyme. First, tyrosine hydroxylase activity was measured in the presence of 10 μM L-dopa as cofactor, and of comparatively high concentrations of DHICA. As shown in Figure 4, the tyrosine hydroxylase activity of extracts from both cell lines was decreased in the presence of DHICA concentrations higher than 250 μM. The inhibition was concentration-dependent and even higher for the TYRP1-negative BEU cells.

On the other hand, it is well known that the tyrosine hydroxylation reaction catalysed by tyrosinases from different sources displays a prolonged lag phase in the absence of appropriate cofactors [7,11,12]. The ability of L-dopa (either exogenous or generated *in situ* by disproportion between L-DQ and L-cyclodopa, as shown in Scheme 1) to act as a cofactor is attributed to the recruitment of *met*-tyrosinase to the active *oxy* form, upon oxidation of the diphenol [36]. Therefore, dihydroxy compounds serving as substrates for tyrosinase should be able to substitute L-dopa as a cofactor for the tyrosine hydroxylase reaction. According to this rationale, we measured the rate of tyrosine hydroxylation by human melanoma cell extracts in the presence of DHICA as putative cofactor, using reaction mixtures devoid of L-dopa and with various concentrations of DHICA. The results were compared with those found in standard con-

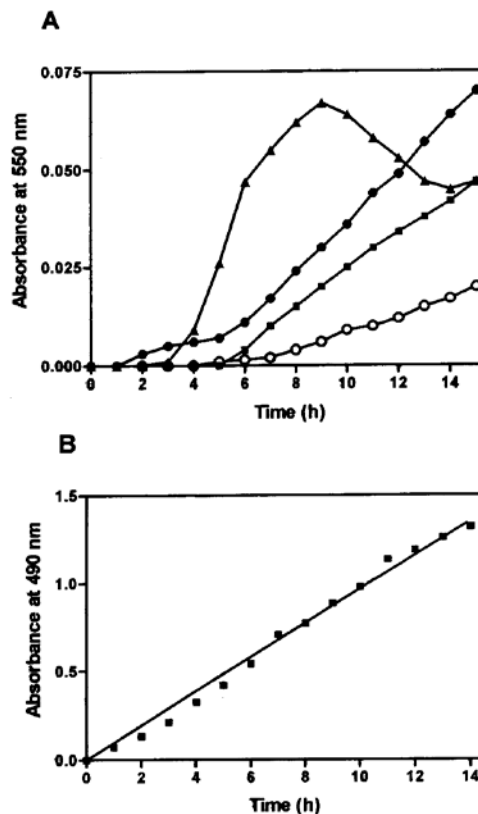


Figure 3 Spectrophotometric analysis of DHICA evolution in the presence of human melanoma cell extracts

(A) Melanin production from DHICA. The absorbance at 550 nm of DHICA solutions (150 μM final concentration) in 10 mM phosphate buffer, pH 6.0/0.1 mM EDTA, in the presence of human melanoma cells extracts, was measured at different times in a double-beam spectrophotometer at 37 °C, against a blank containing an identical amount of extract but no DHICA. ▲, SCL; ●, BEU and ■, HBL cell extracts; ○, blank obtained by adding to the DHICA solution a volume of solubilization buffer identical with the volume of enzyme extracts. The enzymic activities present in the reaction media, in terms of dopa oxidase activity, were 1.1, 1.2 and 2.0 m-units for SCL, BEU and HBL cells respectively. (B) BEU extracts catalyse the oxidation of DHICA to IQCA. The visible spectra of DHICA solutions (800 μM final concentration) in 10 mM phosphate buffer, pH 6.0/0.1 mM EDTA/2 mM MBTH, were serially recorded at 1 h intervals, in the presence of 1.15 m-units of dopa oxidase activity. The increase in absorbance at 490 nm, corresponding to the absorption peak of the MBTH-IQCA adduct, is shown. The reference cuvette contained an identical solution, except that the enzyme extract was replaced by an equivalent amount of protein from COS7 cells transfected with the inactive Δ3/yr.

ditions, in the presence of 10 μM L-dopa and in the absence of DHICA (Table 1). As expected, extracts from the three cell lines exhibited very low tyrosine hydroxylase activity in the absence of DHICA or L-dopa. In the presence of DHICA, the tyrosine hydroxylase activity increased in a concentration-dependent manner. The ability of DHICA to serve as a cofactor was similar for the three cell lines, irrespective of the presence or absence of TYRP1. However, DHICA was less efficient than L-dopa, since a 100 μM concentration of the dihydroxyindole only achieved about 40% of the activity obtained with 10 μM dopa. Higher

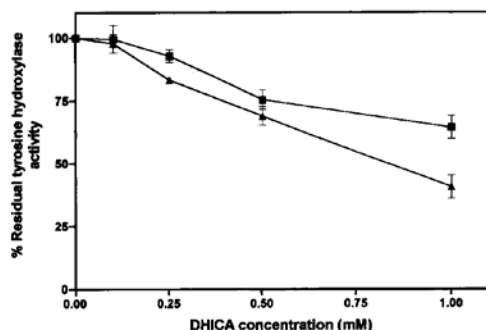


Figure 4 Inhibition by DHICA of the tyrosine hydroxylase activities of extracts from TYRP1-positive (HBL, ■) or -negative (BEU, ▲) human melanoma cells

The tyrosine hydroxylase activities of extracts from HBL (■) or BEU (▲) were measured in the presence of 10 μM L-dopa as cofactor, 50 μM L-tyrosine and increasing concentrations of DHICA. Results (means ± range, n = 2) are expressed as residual activity with respect to controls performed in the absence of DHICA.

Table 1 Ability of DHICA to act as cofactor of the tyrosine hydroxylase activity of human melanoma cell extracts

The tyrosine hydroxylase activity of human melanoma cell extracts was measured in the presence of 50 μM L-tyrosine and of the indicated concentrations of DHICA, but in the absence of L-dopa. Results are expressed as a percentage of the activity achieved with 10 μM L-dopa as cofactor, which was determined in parallel assays, in the absence of DHICA (means ± range, n = 2). Incubations were performed at 37 °C for 90 min.

| DHICA (μM) | Maximal tyrosine hydroxylase activity (%) | | |
|------------|-------------------------------------------|------------|----------------|
| | BEU | HBL | SCL |
| 0 | 5.4 ± 3.3 | 9.8 ± 3.2 | 3.1 ± 2.3 |
| 10 | 10.2 ± 5.3 | 19.5 ± 4.3 | Not determined |
| 100 | 32.5 ± 8.7 | 40.3 ± 7.5 | 39.5 ± 9.2 |

concentrations of DHICA were not tested, since, as shown above, they inhibit the rate of tyrosine hydroxylation.

DHICA is oxidized by TYROSINASE transiently expressed in COS7 cells

The results shown thus far prove that the TYRP1-negative BEU cells are able to catalyse DHICA consumption, most likely by an oxidative mechanism, and that DHICA is able to interact with TYROSINASE. These observations strongly suggest that TYROSINASE is the enzyme responsible for DHICA consumption. However, further possibilities, like the involvement of other melanogenic protein(s) cannot be ruled out. In fact, evidence has been presented by others pointing to a possible role of the *silver* locus protein in DHICA metabolism [37,38]. In an attempt to unambiguously demonstrate the ability of TYROSINASE to transform DHICA, and to characterize the reaction product, we transfected COS7 cells with the human *TYR* and mouse *tyr* genes.

Efficient expression of the TYROSINASE and tyrosinase proteins was ascertained by determination of the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of cell extracts and by Western

Table 2 Melanogenic activities in COS7 cells transiently transfected with the human (*TYR*) and mouse (*tyr*) genes

Results are the means ± range for two independent transfection experiments. All measurements were performed under the standard conditions described in the text with blanks performed with an amount of total protein equivalent to that of the samples, but from COS7 cells transfected with the enzymically inactive Δ3*tyr*. DHICA oxidase units were calculated from the ΔA₄₉₀ in the presence of MBTH, by assuming a molar absorption coefficient for the IQCA-MBTH adduct identical with the one of DQ-MBTH [13].

| Gene | Tyrosine hydroxylase (μ-units/mg of protein) | Dopa oxidase (m-units/mg of protein) | DHICA oxidase (μ-units/mg of protein) |
|------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>TYR</i> | 98 ± 4 | 5.6 ± 0.2 | 88 ± 8 |
| <i>tyr</i> | 1110 ± 50 | 60 ± 3 | Not detectable |

blotting, using the tyrosinase-directed αPEP7 as primary antiserum (Table 2 and Figure 5A). Extracts from *tyr*-transfected cells displayed two major immunoreactive bands with apparent molecular masses of 52 and 63 kDa, and two minor bands of higher sizes, approx. 147 and 169 kDa. The 52 and 63 kDa bands probably correspond to the *de novo* form and mature, glycosylated form, respectively. The higher-molecular-mass forms are, most probably, aggregation products. The presence of aggregated forms of mammalian tyrosinases in SDS/PAGE has already been reported [11,17].

Conversely, extracts from *TYR*-transfected cells showed a single 58 kDa band. Its lower intensity, as compared with the mouse gene product, was reproducibly observed in two independent transfection experiments. This might reflect a lower transfection efficiency, a less efficient translation, and/or a lower affinity of the tyrosinase-directed αPEP7 towards the human enzyme. In any case, COS7 cells transfected with the *TYR* gene displayed sufficient enzymic activity levels for accurate analysis (Table 2) within the range of those reported for B16 melanocytes [11,26].

Spectrophotometric analysis of DHICA evolution demonstrated that crude extracts from cells transfected with the human gene accelerated DHICA disappearance. The product formed was IQCA, as shown by formation of a coloured adduct with MBTH, monitored at 490 nm (Figure 5B). Again, mouse tyrosinase failed to oxidize DHICA to IQCA, according to the MBTH assay, even if present in catalytic amounts more than 10-fold higher than TYROSINASE, in terms of dopa oxidase activity, thus confirming previous reports [13,14]. Finally, the tyrosine hydroxylase activity of TYROSINASE, measured with a 10 μM concentration of the cofactor L-dopa, was inhibited by DHICA in a concentration-dependent manner (Figure 5C). This inhibition was even more potent than for human melanoma cell extracts. Surprisingly, a similar inhibition was also observed for the mouse protein.

DISCUSSION

Natural eumelanins are heterogeneous polymers containing monomeric units derived from both DHICA and 5,6-dihydroxyindole (DHI), the product of the spontaneous decarboxylation of dopachrome [39]. The relative proportions of DHICA-derived carboxylated units and DHI-derived decarboxylated monomers vary widely from one type of natural pigment to another [20,40]. Although rodent pigments seem richer in DHICA, the contents of these units in human pigments is nonetheless high, accounting for up to 20% of the total monomers [20]. The presence of a carboxy group in DHICA-derived monomers is believed to have a strong effect on the properties of the pigment. DHICA-rich

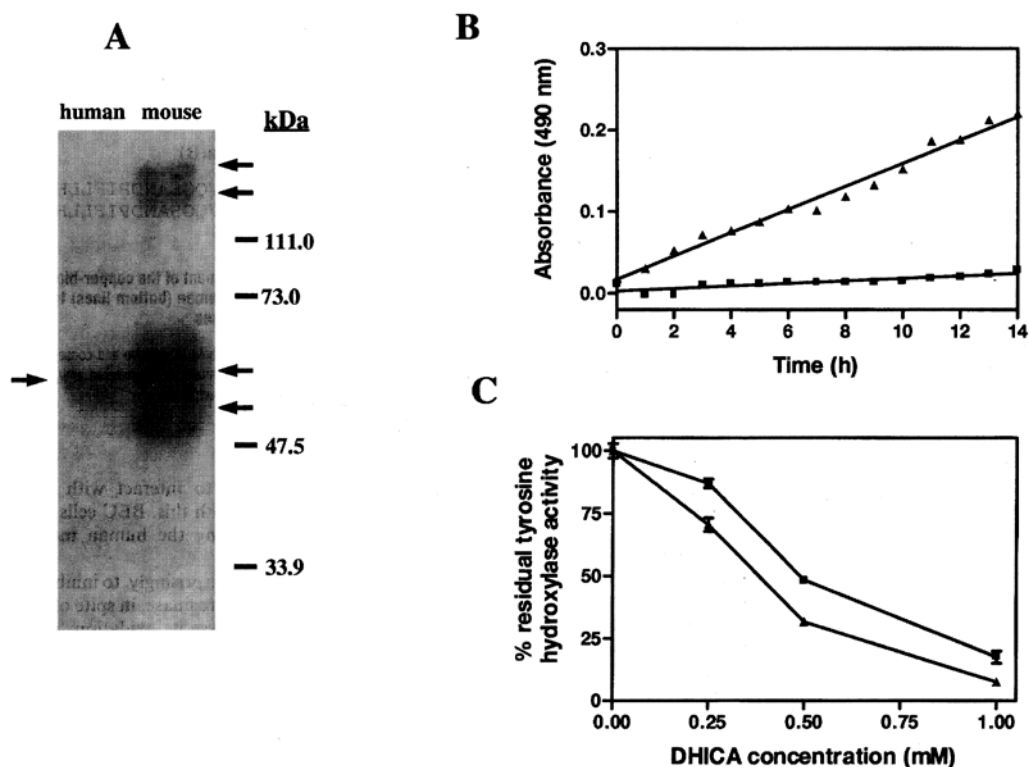


Figure 5 Recognition and oxidation of DHICA by the product of the human, but not the mouse, tyrosinase gene expressed in COS7 cells

(A) Efficient expression of the mouse and human tyrosinase gene in COS7 cells. Cells were harvested 24 h after transfection. An aliquot of the solubilized extract was analysed for tyrosinase expression by Western blotting, with α PEP7 as primary antibody. Molecular-mass markers are shown on the right. Arrows on the right point to the four discrete immunoreactive bands detected in cells transfected with the mouse gene, and on the left to the single band detected after transfection with the human gene. Total protein loads were 10 and 37.5 μ g for cells transfected with the mouse and human genes, respectively. (B) Spectrophotometric demonstration of DHICA oxidation by human, but not mouse, tyrosinase. The visible spectra of 200 μ M DHICA solutions in 10 mM phosphate buffer, pH 6.0/0.1 mM EDTA/2 mM MBTH, were recorded serially at 1 h intervals, in the presence of 0.6 or 6.9 m-units of dopa oxidase activity from human (▲) and mouse (■) tyrosinase transiently expressed in COS7 cells. The reference cuvette contained an identical solution, except that enzymically active tyrosinase was replaced by an equivalent amount of protein from control cells expressing the inactive Δ 3tyr. The absorbance at 490 nm, corresponding to the absorption peak of the MBTH-IOCA adduct, is shown. (C) Inhibition of the tyrosine hydroxylase activity of human and mouse tyrosinase expressed in COS7 cells. Experimental conditions were as described for Figure 4. The extracts contained 0.4 and 2.9 μ -units of tyrosine hydroxylase activity for the human (■) and mouse (▲) enzymes, respectively. Results shown are the means \pm range for two measurements.

melanins might have a higher chelating capacity, and, owing to the limitation of the number of polymerization positions available in the indole ring, they are thought to be smaller, more ordered and lighter in colour than DHI-rich pigments [41–43]. Therefore, the question of DHICA metabolism and incorporation into melanin in mammalian melanocytes is physiologically relevant.

In mouse melanocytes, DHICA is formed by the dopachrome tautomerase-catalysed tautomerization of L-dopachrome [5,9], and its incorporation into melanin is accounted for by oxidation to the corresponding and unstable quinone by tyrp1 [13,14]. Moreover, in addition to the proven ability of mouse tyrp1 to oxidize DHICA, the melanosomal protein derived from the *silver* locus could also be involved in DHICA metabolism by still uncharacterized mechanisms [37,38]. The situation is less clear in human melanocytes. In spite of extensive sequence similarity with its mouse counterpart, TYRP1 has been reported to lack DHICA oxidase activity [19], and DHICA consumption is catalysed by extracts from a human cell line completely lacking

expression of TYRP1 [19]. Moreover, a DHICA-converting activity has been demonstrated for TYROSINASE, whose tyrosine hydroxylase activity is, in addition, inhibited by DHICA [22]. These data suggest that DHICA metabolism in human melanocytes can be accounted for by a TYRP1-independent, TYROSINASE-catalysed oxidation of the carboxylated dihydroxyindole. However, this hypothesis has not yet been demonstrated, since the experiments reported so far describe DHICA consumption rather than DHICA oxidation, and/or have been performed in systems where possible interference from other melanogenic proteins, such as the *silver* locus product, cannot be ruled out.

The results presented herein confirm the differences in catalytic activities of mouse and human melanogenic enzymes suggested by others [19,20], and that DHICA consumption can be catalysed by extracts from human melanocytes lacking TYRP1. Moreover, the tyrosine hydroxylase activity of TYROSINASE expressed in non-melanocytic cells is inhibited by DHICA and

the enzyme is able to catalyse DHICA consumption. In addition, we have shown that (i) DHICA consumption by human melanoma cells is accompanied by melanin formation, (ii) DHICA can partially substitute L-dopa as a cofactor of the tyrosine hydroxylase activity of TYROSINASE, irrespective of the presence or absence of TYRP1, and, more conclusively, (iii) DHICA is an authentic substrate of TYROSINASE, since it is oxidized to its quinone by human melanoma cell extracts lacking TYRP1 and by TYROSINASE expressed in COS7 cells. In this latter system, no interference by other DHICA-metabolizing melanocytic proteins, particularly the *silver* locus product [37,38], is expected. Overall, these observations prove clearly that TYROSINASE recognizes and oxidizes DHICA, thus promoting its incorporation into the melanin polymer.

The DHICA oxidase-specific activity of TYROSINASE, although easily detectable, appears low and probably smaller than the one of mouse tyrp1 [13,14]. In fact, it is within the range of the rate-limiting tyrosine hydroxylase activity, thus raising the question of its relevance in human cells. However, dopachrome tautomerase activity is also lower in human than in mouse melanocytes [44]. Thus the small DHICA oxidase activity of the human enzyme could be sufficient to oxidize DHICA under conditions of low production of the dihydroxyindole. The lower dopachrome tautomerase and DHICA oxidase activities in human cells would therefore account for the observed differences in composition of the rodent and human pigment [20,40]. However the data presented in Figures 3(B) and 5(B) show that BEU cell extracts are more efficient in catalysing the oxidation of DHICA than equivalent catalytic amounts (in terms of dopa oxidase activity) from TYR-transfected COS7 cells. This observation raises two possibilities. First, the catalytic efficiency towards DHICA might be lower for transiently expressed TYROSINASE than for the enzyme obtained from the melanocyte, probably as a result of a different intracellular processing. Second, melanocyte extracts might contain still uncharacterized factors catalysing DHICA oxidation, and/or co-operating with TYROSINASE to increase its DHICA oxidase activity. Both possibilities are currently being analysed in our laboratory.

A second, and related, question refers to the actual enzymic capabilities of TYRP1. Our results prove that the ability of human melanoma cell extracts to metabolize DHICA correlates approximately with their tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities, being the highest for SCL cells and the lowest for BEU cells. Therefore, the DHICA-converting activity of human melanocytes appears to correlate with their TYROSINASE contents. This suggests, but does not prove, that TYRP1 contributes little, if any, DHICA oxidase activity, consistent with previous reports of its lack of DHICA-converting activity [19]. Moreover, in human melanoma cell extracts, only a single activity band was detected in SDS/PAGE gels stained for dopa oxidase activity, even in highly overloaded gels. Conversely, two well-resolved bands, thought to correspond to tyrosinase and tyrp1, are usually found in mouse melanoma cells [11,13]. From the Western blots of TYRP1 (Figure 1) and TYROSINASE expressed in COS7 cells (Figure 5), the difference in molecular mass for the two human proteins appears high enough to reasonably expect their electrophoretic separation, even under the non-reducing conditions employed for activity stains. Therefore, the finding of a single activity band in human melanoma cell extracts suggests that TYRP1 lacks dopa oxidase activity, as reported by others [18]. However, other possibilities such as a low residual dopa oxidase activity or a low stability in solubilized extracts cannot be ruled out. In any case, the available evidence suggests that TYRP1 should be, at the least, less catalytically efficient than mouse tyrp1. Accordingly, its role might be more

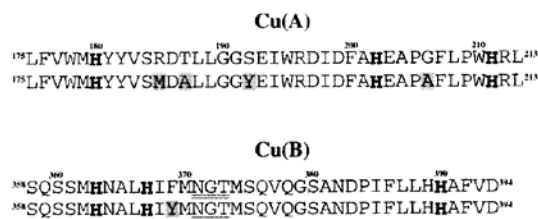


Figure 6 Amino acid sequence alignment of the copper-binding sites, Cu(A) and Cu(B), of mouse (top lines) and human (bottom lines) tyrosinases, from the first to the third essential histidines

Essential histidines in each site are shown in bold. A putative and conserved N-glycosylation site in the Cu(B) site is double underlined. Variant, non-conserved amino acids are shaded in the lower sequence, corresponding to the human enzyme.

directly related to an ability to interact with and stabilize tyrosinase [45,46]. Consistent with this, BEU cells displayed the lowest tyrosinase activity among the human melanoma cells employed in this study.

Finally, DHICA was found, surprisingly, to inhibit the tyrosine hydroxylase activity of mouse tyrosinase, in spite of the complete inability of the enzyme to catalyse its oxidation. A competitive inhibition of TYROSINASE tyrosine hydroxylase activity by DHICA was expected, based on our observation that DHICA is a substrate for the enzyme and on previous data [22]. Since DHICA binds to the mouse enzyme without being oxidized, it appears that the structural determinants responsible for ligand binding are more conserved between the human and mouse proteins than those involved in substrate transformation. The active site of tyrosinases is composed of two Cu-binding sites, designated Cu(A) and Cu(B) [8,36]. Both sites are located far apart in the primary structure of the protein, but come close enough to bind oxygen through the two copper atoms, as a result of the tridimensional folding of the molecule [47]. Interestingly, the amino acid sequence of the Cu(B) binding site is identical in the mouse and human enzymes, except for a F/Y change at position 369. However, in spite of extensive overall sequence similarity (approx. 78%), four out of 32 amino acids in the Cu(A) site are different in human and murine tyrosinase (Figure 6). The possible functional effects of these differences have not yet been assessed, but it is interesting to speculate that the structural determinants for DHICA binding and substrate recognition could be located in the highly conserved Cu(B) site. Conversely, the more divergent Cu(A) site could be involved in the different catalytic potentials of the murine and human enzyme. This possibility is being analysed by site-directed mutagenesis of selected residues located in both sites.

Work was supported by grants PB97-1060, PM99-0138 and 1FD97-0576 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), Plan Nacional I+D, Spain. C.O. is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. C.J.-C. was holder of a postdoctoral return fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

REFERENCES

- Müller, G., Ruppert, S., Schmid, E. and Schutz, G. (1988) Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcript. *EMBO J.* **7**, 2723–2730.
- Kwon, B. S., Wakulchik, M., Haq, A. K., Halaban, R. and Kestler, D. (1988) Sequence analysis of mouse tyrosinase cDNA and the effect of melanotropin on its gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1301–1309.

- 3 Shibahara, S., Tomita, Y., Sakakura, T., Nager, C., Chaudhuri, B. and Muller, R. (1986) Cloning and expression of cDNA encoding mouse tyrosinase. *Nucleic Acids Res.* **14**, 2413–2427
- 4 Jackson, I. J. (1988) A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 4392–4396
- 5 Tsukamoto, K., Jackson, I. J., Urabe, K., Montague, P. M. and Hearing, V. J. (1992) A second tyrosinase related protein (TRP-2) is a melanogenic enzyme termed dopachrome tautomerase. *EMBO J.* **11**, 519–526
- 6 Jackson, I. J., Chambers, D. M., Tsukamoto, K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Hearing, V. J. (1992) A second tyrosinase related protein, TRP-2 maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J.* **11**, 527–535
- 7 Cooksey, C., Garrat, P., Land, E., Pavel, S., Ramsden, C., Riley, P. and Smit, N. (1997) Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 26226–26235
- 8 Prota, G. (1992) An introduction to melanin research. In *Melanins and Melanogenesis*, pp. 1–290, Academic Press, New York
- 9 Aroca, P., García-Borrón, J. C., Solano, F. and Lozano, J. A. (1990) Regulation of distal mammalian melanogenesis. I. Partial purification and characterization of a dopachrome converting factor: dopachrome tautomerase. *Biochim. Biophys. Acta* **1035**, 266–275
- 10 Palumbo, A., Solano, F., Misuraca, G., Aroca, P., García-Borrón, J. C., Lozano, J. A. and Prota, G. (1991) Comparative actions of dopachrome tautomerase and metal ions on the rearrangement of dopachrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1115**, 1–5
- 11 Jiménez-Cervantes, C., García-Borrón, J. C., Valverde, P., Solano, F. and Lozano, J. A. (1993) Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes. I. Biochemical characterization of two melanosomal tyrosinases from B16 mouse melanoma. *Eur. J. Biochem.* **217**, 549–556
- 12 Jiménez, M., Tsukamoto, K. and Hearing, V. (1991) Tyrosinases from two different loci are expressed by normal and by transformed melanocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 1147–1156
- 13 Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. A. and García-Borrón, J. C. (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway: the DHICA oxidase activity of tyrosinase related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.* **269**, 17993–18001
- 14 Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jiménez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., García-Borrón, J. C. and Hearing, V. (1994) Tyrosinase-related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J.* **13**, 5818–5825
- 15 Nishioka, K. (1977) Conversion of particulate tyrosinase to soluble form and to desialylated tyrosinase in human malignant melanoma. *FEBS Lett.* **80**, 225–229
- 16 Jergil, B., Lindbladh, C., Rorsman, H. and Rosengren, E. (1983) Dopa oxidation and tyrosine oxygenation by human melanoma tyrosinase. *Acta Derm. Venereol. (Stockholm)* **63**, 468–475
- 17 Laskin, J. D. and Piccinini, L. (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/c3 melanoma. *J. Biol. Chem.* **261**, 16626–16635
- 18 Zhao, H., Zhao, Y., Nordlund, J. and Boissy, R. (1994) Human TRP-1 has tyrosine hydroxylase but no dopa oxidase activity. *Pigment Cell Res.* **7**, 131–140
- 19 Boissy, R., Sakai, C., Zhao, H., Kobayashi, T. and Hearing, V. (1998) Human tyrosinase related protein-1 (TYRP1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TYRP1. *Exp. Dermatol.* **7**, 198–204
- 20 Wilczek, A., Kondoh, H. and Mishima, Y. (1996) Composition of mammalian eumelanins: analyses of DHICA-derived units in pigments from hair and melanoma cells. *Pigment Cell Res.* **9**, 63–67
- 21 Hunt, G., Kyne, S., Ito, S., Wakamatsu, K., Todd, C. and Thody, A. J. (1995) Eumelanin and pheomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes. *Pigment Cell Res.* **8**, 202–208
- 22 Wilczek, A. and Mishima, Y. (1995) Inhibitory effects of melanin monomers, dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) and dihydroxyindole (DHI) on mammalian tyrosinase, with a special reference to the role of DHICA/DHI ratio in melanogenesis. *Pigment Cell Res.* **8**, 105–112
- 23 Del Marmol, V., Ito, S., Jackson, I. J., Vachtenheim, J., Berr, P., Ghanem, G., Morandini, R., Wakamatsu, K. and Huez, G. (1993) TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. *FEBS Lett.* **327**, 307–310
- 24 Bouchard, B., del Marmol, V., Jackson, I. J., Cherif, D. and Dubertret, L. (1994) Molecular characterization of a human tyrosinase-related protein-2 cDNA. Patterns of expression in melanocytic cells. *Eur. J. Biochem.* **219**, 127–134
- 25 Eberle, J., Garbe, C., Wang, N. and Orlanos, C. (1995) Incomplete expression of the tyrosinase gene family (tyrosinase, TYRP1 and TYRP-2) in human malignant melanoma cells *in vitro*. *Pigment Cell Res.* **8**, 307–313
- 26 Martínez-Esparza, M., Jiménez-Cervantes, C., Beermann, F., Aparicio, P., Lozano, J. A. and García-Borrón, J. C. (1997) Transforming growth factor- β 1 inhibits basal melanogenesis in B16/F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1. *J. Biol. Chem.* **272**, 3967–3972
- 27 Jara, J. R., Solano, F. and Lozano, J. A. (1988) Assays for mammalian tyrosinase: a comparative study. *Pigment Cell Res.* **1**, 332–339
- 28 Winder, A. J. and Harris, H. (1991) New assays for tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **198**, 317–326
- 29 Jiménez-Cervantes, C., Valverde, P., García-Borrón, J. C., Solano, F. and Lozano, J. A. (1993) Improved tyrosinase activity stains in polyacrylamide electrophoresis gels. *Pigment Cell Res.* **6**, 394–399
- 30 Loir, B., Pérez Sánchez, C., Ghanem, G., Lozano, J. A., García-Borrón, J. C. and Jiménez-Cervantes, C. (1999) Expression of the MC1 receptor gene in normal and malignant human melanocytes. A semiquantitative RT-PCR study. *Cell. Mol. Biol.* **45**, 1083–1092
- 31 Yamamoto, H., Takeuchi, S., Kudo, T., Makino, K., Nakata, A., Shinoda, T. and Takeuchi, T. (1987) Cloning and sequencing of mouse tyrosinase cDNA. *Jpn. J. Genet.* **62**, 271–274
- 32 Kelsall, S. R., Le Fur, N. and Mintz, B. (1997) Qualitative and quantitative catalog of tyrosinase alternative transcripts in normal murine skin melanocytes as a basis for detecting melanoma-specific changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 173–177
- 33 Kwon, B., Haq, A., Pomerantz, S. and Halaban, R. (1987) Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse *c-albino* locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7473–7477
- 34 Giebel, L. B. and Spritz, R. A. (1990) RFLP for Mbo I in the human tyrosinase (TYROSINASE) gene detected by PCR. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3103
- 35 Bu'Lock, J. D. (1960) Intermediates of melanin formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 189–193
- 36 Riley, P. (1999) The great DOPA mystery: the source and significance of DOPA in phase I melanogenesis. *Cell. Mol. Biol.* **45**, 951–960
- 37 Chakraborty, A. K., Platt, J., Kim, K., Kwon, B., Bennett, D. and Pawelek, J. M. (1996) Polymerization of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin by the *pml17/silver* locus protein. *Eur. J. Biochem.* **236**, 180–188
- 38 Lee, Z., Hou, L., Moellmann, G., Kubilinska, E., Antol, K., Fraser, M., Halaban, R. and Kwon, B. (1996) Characterization and subcellular localization of human *Pmel17/silver*, a 100 kDa (pre)melanosomal membrane protein associated with 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) converting activity. *J. Invest. Dermatol.* **106**, 605–610
- 39 Ito, S. and Wakamatsu, K. (1989) Melanin chemistry and melanin precursors in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 261S–265S
- 40 Ozeki, H., Ito, S., Kakamatsu, K. and Hirobe, T. (1995) Chemical characterization of hair melanins in various coat-color mutants of mice. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 361–366
- 41 Palumbo, A., d'Ischia, M. and Prota, G. (1987) Tyrosinase-promoted oxidation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin. Isolation and characterization of oligomer intermediates. *Tetrahedron* **43**, 4203–4206
- 42 Aroca, P., Solano, F., Salinas, C., García-Borrón, J. C. and Lozano, J. A. (1992) Regulation of the final phase of mammalian melanogenesis. The role of dopachrome tautomerase and the ratio between 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid and 5,6-dihydroxyindole. *Eur. J. Biochem.* **208**, 155–163
- 43 Orlov, S., Osber, M. and Pawelek, J. (1992) Synthesis and characterization of melanins from dihydroxyindole-2-carboxylic acid and dihydroxyindole. *Pigment Cell Res.* **5**, 113–121
- 44 Bernd, A., Ramírez-Bosca, A., Kippenberger, S., Martínez Liarle, J. H., Holzmann, H. and Solano, F. (1994) Levels of dopachrome tautomerase in human melanocytes cultured *in vitro*. *Melanoma Res.* **4**, 287–291
- 45 Jiménez-Cervantes, C., Martínez-Esparza, M., Solano, F., Lozano, J. A. and García-Borrón, J. C. (1998) Molecular interactions within the melanogenic complex: formation of heterodimers of tyrosinase and TRP1 from B16 mouse melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 761–767
- 46 Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D. and Hearing, V. J. (1998) Tyrosinase stabilization by *tyrp1* (the brown locus protein). *J. Biol. Chem.* **273**, 31801–31805
- 47 Lowery, M. D. and Solomon, E. I. (1993) Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science* **259**, 1575–1581

Received 14 June 2000/24 October 2000; accepted 15 November 2000

**Identification of Active Site Residues
Involved in Metal Cofactor Binding and
Stereospecific Substrate Recognition in
Mammalian Tyrosinase. Implications
to the Catalytic Cycle**

Concepción Olivares, José C. García-Borrón, and Francisco Solano

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of
Medicine, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

Biochemistry[®]

Reprinted from
Volume 41, Number 2, Pages 679–686

Identification of Active Site Residues Involved in Metal Cofactor Binding and Stereospecific Substrate Recognition in Mammalian Tyrosinase. Implications to the Catalytic Cycle[†]

Concepción Olivares, José C. García-Borrón, and Francisco Solano*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

Received July 23, 2001; Revised Manuscript Received October 1, 2001

ABSTRACT: Tyrosinase (Tyr) and tyrosinase-related proteins (Typrs) 1 and 2 are the enzymes responsible for mammalian melanogenesis. They display high similarity but different substrate and reaction specificities. Loss-of-function mutations lead to several forms of albinism or other pigmentation disorders. They share two conserved metal binding sites (CuA and CuB) which, in Tyr, bind copper. To define some structural determinants for these differences, we mutated Tyr at selected residues on the basis of (i) conservation of the original residues in most tyrosinases, (ii) their nonconservative substitution in the Typrs, and (iii) their possible involvement as an endogenous bridge between the copper pair. Two mutations at the CuA site, S192A and E193Q, did not affect Tyr activities, thus excluding S192 and E193 as endogenous ligands of the copper pair. Concerning CuB, the H390Q mutation completely abolished Tyr activity, whereas Q378H and H389L mutants showed 10–20% residual specific activities. Their kinetic behavior suggests that (i) H390 is the actual third ligand for CuB, (ii) H389 is critical for stereospecific recognition of *o*-diphenols but not monophenols, and (iii) the involvement in metal binding of the central extra H residue at the Typrs CuB site is unlikely. However, replacement of Q (in Tyr) by H (in Typrs) greatly diminished the affinity for L-dopa, consistent with the low/null tyrosinase activity of the Typrs. These are the first data showing a physical difference in docking of mono- and *o*-diphenols to the Tyr active site, and they are used to propose a revised scheme of the catalytic cycle.

Melanin synthesis is a complex pathway involving enzymatic and chemical reactions, which, in mammals, is restricted to melanocytes. At least three enzymes, tyrosinase (Tyr)¹ and the tyrosinase-related proteins Tyrp1 and Tyrp2 (Dct) are involved. The melanogenic pathway starts with the Tyr-catalyzed conversion of L-tyrosine into L-dopa quinone (L-DQ), so that mutations in the Tyr gene are associated with type I human oculocutaneous albinism (1). The reaction involves two steps, the rate-limiting hydroxylation of L-tyrosine to L-dopa (monophenolase activity, so that Tyr is described as EC 1.14.18.1) and the oxidation of this intermediate *o*-diphenol to L-DQ (*o*-diphenol oxidase activity, so that Tyr is also described as EC 1.10.3.1). It has been shown that Tyr catalyzes the direct transformation of L-tyrosine into L-DQ without releasing L-dopa (2, 3). L-DQ evolves to several intermediates which polymerize with the involvement of Dct and Tyrp1 to finally render melanins (4, 5).

Sequence comparison of Tyr, Tyrp1, and Dct reveals that these proteins share many key structural features, due to their

common origin from a single ancestral gene (6). They display a single membrane-spanning fragment near their C-terminus and two very similar metal ion binding sites. They also undergo posttranslational processing, including several glycosylation steps that appear to be crucial for acquisition of full enzymatic activity (7). Despite their extensive sequence similarity, Tyr, Tyrp1, and Dct show remarkable differences in their metal ion binding and enzymatic properties. As far as the mouse proteins are concerned, Tyrp1 displays a residual dopa oxidase activity but is able to oxidize DHICA (8, 9), whereas Tyr is efficient in tyrosine hydroxylation but does not oxidize the carboxylated indole. Finally, Dct is not involved in redox reactions but catalyzes a tautomerization. Therefore, the Tyr family is a good model to study structure–function relationships as well as divergent functional evolution.

Tyr contains a pair of coupled copper ions at the active site (10, 11). Some data based on the damage of H residues after photoinactivation of fungal Tyr, the sequence similarity among Tyr and hemocyanins (11, 12), and the recently available crystallographic data of a plant catechol oxidase (13) indicate that two H-rich regions named CuA and CuB are involved in copper binding. The involvement of human TYR CuA and CuB sites in copper binding has also been demonstrated by site-directed mutagenesis studies (14). Both sites are similar in Tyr and Typrs, but the conservation is higher in the CuB site (Figure 1), thus suggesting that this site is particularly important for full enzymatic activity.

[†] This work was supported by Grants PB97-1160 and PM99-138 from the CICYT, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, Spain. C.O. is recipient of a predoctoral fellowship from MEC (Ministerio de Educación y Cultura, Madrid).

* Corresponding author. E-mail: psolano@um.es. Fax: 34-968-364150.

¹ Abbreviations: Dct, dopachrome tautomerase; dopa, 3,4-dihydroxyphenylalanine; DO, dopa oxidase; DQ, dopa quinone; MBTH, 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone; TH, tyrosine hydroxylase; Tyr(s), tyrosinase(s); Tyrp(s), tyrosinase-related protein(s); wt, wild type.

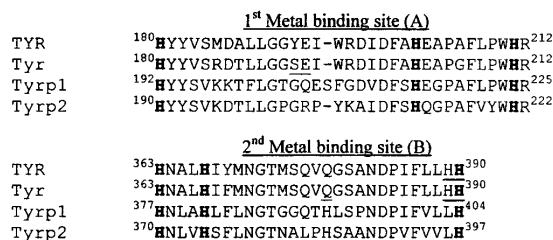


FIGURE 1: Alignment of the CuA and CuB binding sites of human TYR and mouse Tyr, Tyrp1, and Tyrp2 (Dct). The five amino acids mutated in this study are underlined, and the H copper ligands are shown in bold.

Both CuA and CuB sites contain three conserved H residues bound to copper. By virtue of the folding of the protein, both sites are adjacent and form the enzyme active center. The two sites differ in that CuA has a H-x(n)-H-x(8)-H motif whereas CuB has a H-x(3)-H-x(n)-HH motif. In both cases, the distances between two H ligands (shown in bold) are constant, whereas the position of the other H is variable. The situation is further complicated by the presence in the CuB site of Tyr, but not of the Tyrps, of a fourth H residue vicinal to the third one. According to the consensus sequence of the CuB site, the nature of the first pair of H residues is clear, but there are some doubts as to which one of the two vicinal H's is the authentic third copper ligand. Mutagenesis studies on human TYR (14) would suggest that the first one (H389 in the mouse and human enzymes) is more directly involved in copper binding. Recently, Nakamura et al. (15) proposed a new structure of the active site of *Aspergillus oryzae* Tyr where each copper would be in fact bound to four ligands. CuA would be bound to one Cys and three His residues, and CuB would be bound to four His including the two vicinal corresponding to H389 and H390 in mouse and human Tyr.

Tyrp1 and Dct display a H-x(3)-H-x(n/2)-H-x(n/2)-LH CuB motif. Therefore, they have the additional fourth H centered between the first H pair and the last H. In Tyr the central H is replaced by Q378 (Figure 1). This central H residue is, on theoretical grounds, another potential metal ion ligand in Tyrps. Should this be the case, the residues involved in metal binding might be different in Tyr and Tyrps, and this might account for the different metal specificity (16).

Despite the direct transformation of L-tyrosine into L-DQ by Tyr, it is clear that L-dopa is an alternative substrate and that the reactions underlying tyrosine hydroxylation (TH) and dopa oxidation (DO) must differ. It has long been debated whether the hydroxylase and oxidase activities of Tyr share a common catalytic site. Both activities have been usually inseparable, but early studies pointed out subtle differences between both reactions (17, 18), suggesting different requirements at the reaction site. In this regard, TH activity shows a lag period before the reaction reaches maximal rate, whose length increases with the concentration of L-tyrosine (19, 20). L-Dopa, the immediate product of L-tyrosine hydroxylation, is also a cofactor for TH, and low amounts of the *o*-diphenol abrogate the lag period (21). The affinity of Tyr is about 100-fold higher for L-dopa acting as cofactor for TH than as substrate for DO, suggesting that dopa might bind to two sites of the enzyme (21). The dual role of L-dopa as substrate

Table 1: Primers Used throughout This Study^a

| Name | Sequence |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|
| mTyrFw | ⁻¹⁶ TGATGAATTCGAGAAAATGTTCTTGCTGT ¹⁴ |
| mTyrRv | ¹⁶¹⁶ GTTTTCTAGAATGTT CAC AGATGGCTCTGA ¹⁵⁸⁷ |
| 378HFw | ¹¹²⁹ GT AC CGGATCGCCAACGAT ¹¹⁴⁹ |
| 389LFw | ¹¹⁶² CTT CT CCATGCTTTTGTGGAC ¹¹⁸² |
| 390QFw | ¹¹⁶⁵ CAC CAG GCTTTTGTGGACAGT ¹¹⁸⁵ |
| 192ARv | ⁵⁸⁰ TT CAG CGCCCCAAGCAGT ⁵⁶¹ |
| 193QRv | ⁵⁸³ ATAT TTG AGACCCCCAAG ⁵⁶⁵ |
| SF5Fw | ⁸⁶⁷ CGATGGAACACCTGAGG ⁸⁸³ |

^a Names make reference to the mutated amino acid position, and Fw and Rv mean respectively forward and reverse orientations in PCR. The mutated codons are in bold, except for mTyrFw and mTyrRv, where bold characters indicate respectively the start and stop codons. Underlined sequences denote a restrictase site for cloning. SF5Fw was used as the paired primer to CuB mutagenic primers.

for DO activity but cofactor for TH activity has greatly complicated the understanding of the Tyr mechanism of reaction. Current evidence suggests that although the enzyme has a single binding site for both substrates, monophenols would bind through different structural elements than *o*-diphenols (22). In summary, neither the structural determinants of the metal ion binding nor the residues involved in a possible differential interaction with monophenols and *o*-diphenols are adequately characterized. To gain further insight on these points, we performed a site-directed mutagenesis study of selected residues in mouse Tyr. The mutated amino acids were selected mainly on the basis of their conservation in a wide range of Tyrs including human, but being nonconservatively replaced in the Tyrps.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents. The radioactive substrate L-[3,5-³H₂]tyrosine, specific activity 50 Ci/mmol, was obtained from Amersham Pharmacia (Little Chalfont, England). The specific αPEP7 antiserum recognizing the C-terminal tail of mouse Tyr was a gift from Dr. V. J. Hearing (NIH, Bethesda, MD). Electrophoresis and Western blot reagents and materials were from Bio-Rad (Hercules, CA) or Amersham Pharmacia. Reagents and plasticware for cell culture were obtained from either Nunc (Roskilde, Denmark) or Gibco (Gaithersburg, MD). Proteinase K, restrictases, and other plasmidic DNA-handling enzymes were from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). Substrates, inhibitors, and other reagents were from Sigma (St. Louis, MO), Merck (Darmstadt, Germany), or Prolabo (Barcelona, Spain).

Site-Directed Mutagenesis. Expression constructs for wt-Tyr (full-length tyrosinase), Δ3Tyr [inactive alternatively spliced Tyr lacking exon 3 (23)], and all mutant Tyr were directly prepared or subcloned in the pcDNA3 expression vector (Invitrogen, Amsterdam, The Netherlands). For wtTyr and the Δ3Tyr, cDNA from B16 cells was obtained and amplified by PCR, using the proofreading *pfu* polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) as previously described (5). Both were cloned into pBKSII (Stratagene, Mannheim, Germany) and then subcloned into pcDNA3. For mutant species, fragments with point mutations were obtained by PCR, using wtTyr-pBKSII as template. Each mutation was introduced with the appropriate primer mutated at the desired codon (Table 1). Amplicons were digested with *Sph*I and *Xba*I (for CuB mutations) or with *Eco*RI and *Sph*I (for CuA mutations)

Stereospecific Substrate Recognition by Tyrosinase

and cloned into wtTyr-pBKSII after removing the corresponding homologous wild-type fragment with the same restriction enzyme pair. The mutated genes were subcloned into pcDNA3. Mutations and identity of the products were always checked by complete sequencing.

Cell Culture, Transfection, and Preparation of Crude Solubilized Extracts. B16 and COS7 cells were grown in DMEM supplemented with 1% streptomycin, 1% penicillin, and 5% fetal calf serum. HEK 293T cells were grown in RPMI-1640 containing the same antibiotics plus 1% fungizone and 10% fetal calf serum. Cells (10^4 cells/cm²) were seeded in six-well plates, incubated at 37 °C in a water-saturated 5% CO₂ atmosphere, and allowed to grow to approximately 80% confluence. Transfection was performed with the SuperFect transfection reagent (Qiagen, Hilden, Germany). Cells were trypsin-harvested 24 h after transfection, washed twice with saline phosphate buffer, and solubilized in 10 mM sodium phosphate, pH 6.8, containing 1% Igepal CA-630 and 0.1 mM PMSF using a ratio of approximately 1 mL solubilization buffer/10⁷ cells. The extracts were centrifuged at 20000g for 10 min, and the supernatants were used for enzyme activity determinations and Western blotting. Protein concentration was determined by the bicin-chonic acid assay.

Enzyme Activity Determinations. TH activity was determined by a radiometric method described elsewhere (18, 24). One unit was defined as the amount of enzyme catalyzing the hydroxylation of 1 μmol of L-tyrosine/min, in the presence of 50 μM L-tyrosine and 10 μM L-dopa as cofactor. When appropriate, other conditions were used as detailed. DO activity was measured spectrophotometrically at 500 nm in the presence of MBTH (25) using final concentrations of L-dopa and MBTH of 2.0 and 3.8 mM, respectively.

Electrophoretic and Immunochemical Procedures. For activity stain of SDS-PAGE gels, electrophoresis was performed in 9% or 12% acrylamide gels under nonreducing conditions and at 4 °C to preserve enzymatic activity. Samples were mixed in a 2:1 ratio with sample buffer (0.18 M Tris-HCl, pH 6.8, 15% glycerol, 0.075% bromophenol blue, 9% SDS). A sensitive and specific DO stain was carried out by equilibrating the gels at pH 6.0 with 50 mM sodium phosphate buffer, followed by incubation at 37 °C in 1.5 mM L-dopa and 4 mM MBTH, in 10 mM phosphate buffer, pH 6.8, from 15 to 30 min (26). For immunochemical detection and quantification of Tyr, samples were mixed with the same sample buffer as above, but containing 2-mercaptoethanol, and heated at 95 °C for 5 min before electrophoresis. Gels were transferred to PVDF membranes, and the specific αPEP7 antiserum was used as previously described (5). Before blocking, the lower portion of the membrane was cut and stained for total protein with Amido Black to ascertain comparable loading and transfer. Staining of immunoreactive bands was done with a chemiluminescent substrate from Amersham Pharmacia and quantitation was performed in a Gel Doc system (Bio-Rad, Hercules, CA).

RESULTS AND DISCUSSION

High, Comparable, and Quantifiable Expression of wt and Mutant Tyr in Transfected Cells. The major aim of this study was to analyze the effect of selected mutations on the Tyr activities. Such mutations are likely to result in partial or

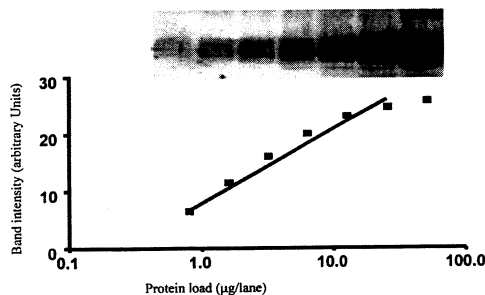


FIGURE 2: Quantitative detection of transiently expressed Tyr. Serial dilutions of COS7 cell extracts transfected with wtTyr were analyzed by Western blot, using the αPEP7 antiserum.

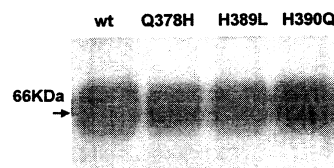


FIGURE 3: Comparison of the expression levels of wtTyr versus Q378H, H389L, and H390Q constructs. An equal protein amount (15 μg) was electrophoresed, transferred to PVDF membranes, and probed with αPEP7. Bands were visualized with a chemiluminescence detection kit. Variations lower than 30% were found in five independent experiments.

total loss of function. Therefore, two essential prerequisites for such a study are (i) to set up an accurate method for quantitation and comparison of the expression levels of mutant forms and (ii) to ascertain high and reproducible expression of wt and mutant proteins.

The feasibility of an accurate quantification of the relative expression levels was checked by Western blot. Serial dilutions of extracts from COS7 cells transfected with the wt gene were analyzed using the Tyr-specific αPEP7 antiserum. The intensity of the resulting band was linear for protein loads (in a log scale) ranging approximately from 1 to 20 μg, but densitometric measurements suffered a saturation for higher loads, evident for the maximal amount tested, 52 μg (Figure 2). We performed all experiments with total protein amounts ranging from 10 to 20 μg to normalize enzymatic rates. Under our conditions, the lowest levels of Tyr protein that could be detected by Western blot corresponded to an enzymatic activity of approximately 0.36 microunits of TH. In addition, TH and DO activities were not detected in cells transfected with Δ3Tyr lacking the CuB region. Thus, this method allowed for a sensitive detection of Tyr expression and for an accurate comparison of the expression levels in different samples. As expected, neither DHICA oxidase nor Dct activities were found in transfected cells.

We next examined by the same technique whether expression of the different constructs was comparably effective and checked for possible major alterations in the structure or size of the mutated proteins. The expression efficiencies of the wt and all CuB mutant Tyrs were comparable, and their electrophoretic mobilities were indistinguishable (Figure 3). Similar results were obtained for mutants in the CuA site (data not shown). Therefore, any activity changes observed for the mutant Tyrs should be related to the catalytic role of

Table 2: Comparison of the Specific Activities (% Relative to wtTyr Expressed in COS7) of wtTyr and Mutant Tyr Species^a

| wtTyr | TH (microunits/mg) ^b | DO (milliunits/mg) ^b | TH × 10 ³ / DO ratio |
|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| in B16 | 136 ± 16 (19) | 8.1 ± 2.9 (27) | 16.8 |
| in COS7 | 711.3 ± 163.5 (100) | 29.9 ± 6.5 (100) | 23.2 |
| mutant Tyr (in COS7) | | | |
| S192A | 649.6 ± 97.6 (93) | 27.5 ± 4.3 (92) | 23.6 |
| E193Q | 687.4 ± 85.4 (98) | 28.2 ± 4.9 (94) | 24.4 |
| Q378H | 121.2 ± 26.8 (17) | 2.7 ± 0.7 (9) | 44.9 |
| H389L | 129.0 ± 25.5 (18) | 5.7 ± 1.4 (19) | 22.6 |
| H390Q | 0 | 0 | |

^a Relative expression levels were normalized by Western blots.^b Values in parentheses are in percent.

the mutated residues rather than to artifacts arising from alterations in protein folding and/or processing (27).

The enzymatic activities of extracts from COS7 cells transfected with wtTyr were much higher than those normally found in B16 mouse melanoma cells (711 ± 163 versus 136 ± 16 microunits/mg for TH activity and 30 ± 6.5 versus 8.1 ± 2.9 milliunits/mg for DO, $n \geq 4$; see Table 2). Further preliminary experiments showed that the efficiency remained constant by using a constant ratio of DNA amount to cell number. The Tyr expression levels using COS7 and HEK 293 cells as hosts were also compared. Similar results in terms of enzymatic activities and electrophoretic mobility of the expressed protein were obtained. Therefore, COS7 cells were routinely used in this work. The high and reproducible levels permitted the determination of enzymatic activities in mutant forms with diminished or residual catalytic capabilities, so that cotransfection of COS7 with calnexin was not necessary to improve Tyr processing (27, 28).

The Q378H, H389L, and H390Q Mutations in the CuB Site Have a Higher Impact on Tyr Activity Than the S192A and E193Q Mutations in CuA. A comparison of the specific activities of the mutant Tyr species normalized by Western blot determination of the protein amount is shown in Table 2. The two mutations at the CuA site, S192A and E193Q, were isosteric substitutions to detect the possible involvement of the native residues as endogenous ligands bridging the two coppers in the binuclear active site. The existence of an oxygenated endogenous ligand bridging the two copper ions was postulated on the basis of spectroscopic studies on the hemocyanin and Tyr active site (11, 29). This putative bridge would provide an antiferromagnetic coupling and thus would account for the lack of a detectable EPR signal (30). According to the hemocyanin model (31), the ligand should be the side chain of a residue located in the coil fragment between the two helical regions containing the H bound to CuA. Alignment of all Tyr sequences pointed out to a hydroxylated candidate, the S192 in the mouse enzyme. This residue is highly exposed since it follows a GG motif and it shows a polymorphism in human TYR, S192Y (1). Both amino acids contain a hydroxyl/phenolic group, enabling them to act as the postulated bridge. Furthermore, the next residue E193 changes to Q in Tyrp1 and to R in Dct (Figure 1). Mutation in Dct 193R greatly decreases its activity and is responsible for the *slaty* phenotype (32, 33). Taking into account the fact that Tyr is a copper enzyme but Dct is a zinc enzyme lacking the endogenous bridge (34), it was also

reasonable to explore this residue. However, neither the S192A nor the E193Q mutants showed significant differences in their catalytic activities as compared to wtTyr. Thus, mutations on the CuA binding site indicated that the existence of a residue bridging the two copper ions at the Tyr active site is very doubtful. The same conclusion was recently reported for Tyr from *Streptomyces antibioticus* (35). The lack of an endogenous bridge at the dicopper center seems to be a general feature of all Tyr.

On the other hand, the three mutations in the CuB site resulted in major enzymatic activity changes. The Q378H and H389L mutants retained low but significant levels of both TH and DO activities (10–20%), enough for analysis of some kinetic aspects. H390Q Tyr was totally devoid of any measurable enzymatic activity. None of the mutants displayed detectable Dct activity. Interestingly, the Q378H mutant showed a TH/DO ratio about twice as high as that of the wt and other mutant forms.

The residual activity of the Q378H and H389L mutants strongly supported the fact that they are still able to bind copper ions at their respective active site and pointed to H390 as the actual third copper ligand. Thus, the second H within the HH pair found at the end of the CuB motif is most likely the copper ligand in mammalian Tyr, as described for the microbial and fungal enzyme (11, 12). Note that the two first mutations make the CuB site of Tyr more similar to Tyrps. The observation that H389L, but not H390Q, Tyr is catalytically active is consistent with the binding of a metal ion to Tyrps active site despite the LH sequence found at their CuB site.

However, this interpretation is in contrast with data on direct ⁶⁷Cu binding to wt and mutant human TYRs (14). In this study, the H389A and H390A mutant species were both enzymatically inactive, but the H390A was able to bind twice as much ⁶⁷Cu as wt. At least three possible explanations may account for this discrepancy. The first one relies in differences in the nature of transfected cells, HeLa (14) versus COS7 cells (this work). The chaperone repertoire in both systems is likely different, and HeLa cells have recently been described as an inefficient system for human Tyr processing and exit from the endoplasmic reticulum (36). Second, differences in the nature and stability of mouse Tyr and human TYR should also be considered. We have recently reported that the human, but not the mouse, enzyme shows DHICA oxidase activity (5), indicating subtle differences at the active site of both species. In addition, and in our hands, Tyr activities showed a remarkable instability in transfected extracts, likely due to the absence of Tyrp1 in nonmelanocytic cells. This last protein has a marked stabilizing effect on Tyr (37, 38), and its absence might lead to Tyr activity levels below the detection limit when the efficiency of the expression system is not as high as the one reported here. Third, direct copper binding assays should be interpreted with caution, because protein misfolding could yield enzymatically inactive species, which, nevertheless, could still be able to bind copper. This artifactual binding could even involve residues located outside the active site, thus accounting for higher metal loads in mutant proteins as compared to wtTyr. In keeping with this, Tsai et al. (39) also obtained controversial data on copper binding to mutant *Streptomyces* Tyr, where each of the six H residues of the copper sites were replaced by Q. The three mutations in CuA and one in CuB

Stereospecific Substrate Recognition by Tyrosinase

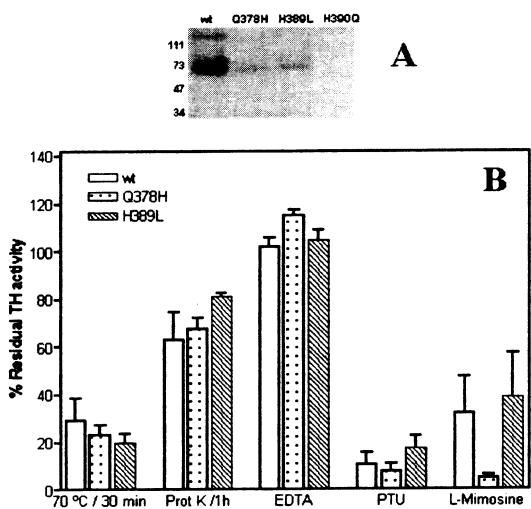


FIGURE 4: (A) Gel staining for DO activity of wtTyr and mutant Tyr species. Equal protein amounts were resolved by nondenaturing SDS-PAGE to correlate relative intensity of the bands to residual enzymatic activities of the mutant forms. The H390Q mutant was devoid of enzymatic activity, whereas the other forms displayed similar mobility. (B) Resistance of wtTyr (empty bars), Q378H (dotted bars), and H389L (dashed bars) mutant forms to thermal inactivation (70 °C, 30 min), proteinase K digestion (1 mg/mL, 1 h), EDTA (2 mM, 3 h), and the active site-directed inhibitors phenylthiourea (0.5 mM) and L-mimosine (0.5 mM).

blocked copper incorporation and abolished enzymatic activity, but, conversely, mutation of the two remaining H in CuB (including the one homologous to the human/mouse H390) was still compatible with copper binding to the enzyme.

Changes in Tyr Activity Caused by CuB Mutations Are Not Related to a Significant Alteration of the Protein Structure. We further examined whether the reduced specific activity of the Q378H and H389L mutants could be due to kinetically irrelevant effects such as decreased stability. These and other possibilities were explored by (i) probing the resistance to chaotropic agents by specific activity stain of SDS-PAGE gels run under nonreducing conditions, (ii) analysis of the thermal stability and susceptibility to proteolytic digestion, and (iii) inhibition by active site directed chelating compounds. The residual DO activity of the Q378H and H389L mutants, as determined by SDS-PAGE followed by a specific activity stain (26), was within the range of the one obtained by the usual spectrophotometric method (around 10–20% of the wt enzyme), thus showing that these mutant Tyrs are equally resistant to SDS than the wt form (Figure 4A). The H389L and Q378H species retained residual activity levels comparable to those of wtTyr after thermal shock or treatment with proteinase K, suggesting a compact protein folding. The comparable resistance of wt and H389L Tyrs to 2 mM EDTA (Figure 4B) indicates a similar affinity of the two proteins for copper, pointing again to H390 as the actual copper binding residue of the ³⁸⁹HH³⁹⁰ pair. Finally, the residual activities of H389L and wtTyrs after treatment with phenylthiourea or L-mimosine also supported a similar structure and accessibility of the active site. Taken together, these data show that the conformations of the wt and mutant Tyrs are very similar. This agrees with recent results reporting that, generally, mutations affecting Tyr folding

produce ER retention and degradation of the protein (27). Thus, the lower specific activities of H389L and Q378H Tyrs actually reflect an impairment in the catalytic potential of the mutants.

Kinetic Parameters and Stereospecific Properties of wt and Mutated Tyrs. To understand the structural basis for the low specific activity of Tyr mutants at CuB, the K_M , V_{max} , and catalytic efficiency (V_{max}/K_M ratio) parameters of wt and mutant Tyrs for several *o*-diphenolic substrates and L-tyrosine were analyzed (Table 3). Concerning *o*-diphenols, the affinity of wtTyr is decreased by decarboxylation (around 4-fold), supporting the role of the carboxyl group in substrate recognition. The maintenance of the carboxyl group on the substrate, but with different stereospatial conformation, decreases the affinity even more, as shown by comparison of the K_M for D-dopa and L-dopa (approximately 10 times higher for D-dopa). However, esterification of the carboxyl group has a poor effect, thus excluding an electrostatic enzyme-substrate interaction. Catalytic efficiencies for the different substrates correlate with affinities, D-dopa being the poorest substrate.

The differences in the kinetic parameters for the four *o*-diphenols were much smaller for the H389L mutant species. The replacement of the 389H by a hydrophobic L (resembling Tyrps) decreased the affinity of Tyr for L-dopa but increased it for D-dopa in comparison to wtTyr. This confirms that H389 is involved in a stereospecific interaction with the carboxyl group of the substrate, rather than in copper binding. On the other hand, the Q378H mutant showed a very low affinity for L-dopa (around 50 times lower), suggesting that the imidazole group at that position would create a strong steric hindrance that impairs L-dopa docking. The K_M for the other *o*-diphenols could not be accurately estimated due to the very slow reaction rates.

The effect of the H389L mutation on the stereospecificity for L-dopa prompted us to investigate its effect on TH activity. The first difference with DO was the similar K_M for L-tyrosine of the wtTyr and the mutant forms. The strong effect of the mutations on the K_M for L-dopa but not for L-tyrosine supports the fact that the residues located in the CuB site are more closely related to DO than to TH activity.

We next tested the kinetic pattern of the decarboxylated analogue tyramine and D-tyrosine. As compared to *o*-diphenols, the monophenolic substrates presented additional difficulties. As TH activity has a lower turnover number than DO (19, 20), the reaction rates must be measured by radiometric assays using L-[3,5-³H₂]tyrosine as substrate (18, 24), but radioactively labeled tyramine and D-tyrosine are not commercially available. Thus, we assayed tyramine and D-tyrosine hydroxylation by an indirect method based on the rationale that, if these substrates are recognized by Tyr, then they should behave as competitive inhibitors of tritium release from L-[3,5-³H₂]tyrosine. D-Tyrosine and tyramine were not good inhibitors of the TH activity of wtTyr. D-Tyrosine (0.2 mM) did not inhibit at all the hydroxylation reaction of L-tyrosine under standard conditions, and a 20-fold molar excess of D-tyrosine over L-tyrosine (1 mM versus 50 μM) was needed to detect a noticeable slight inhibition of the reaction rate (Figure 5A). Therefore, wtTyr is also stereospecific for L-tyrosine. The same behavior was found for mushroom Tyr (40). The inhibition by tyramine was more significant. The order of affinity for the monophenols tested

Table 3: K_M (mM), V_{max} (milliunits/mg), and V_{max}/K_M Ratio for wtTyr and the H389L and Q378H Mutant Tyr Species for Four *o*-Diphenols^a and L-Tyrosine^b

| | wtTyr | | | H389L | | | H378Q | | |
|---------------------|-------|-----------|---------------|-------|-----------|---------------|-----------------|-----------|---------------|
| | K_M | V_{max} | V_{max}/K_M | K_M | V_{max} | V_{max}/K_M | K_M | V_{max} | V_{max}/K_M |
| L-dopa | 0.46 | 38.8 | 84.34 | 1.83 | 38.9 | 21.25 | 22.2 | 32.67 | 1.47 |
| dopamine | 1.64 | 23.4 | 14.27 | 2.01 | 36.43 | 18.12 | nd ^c | nd | nd |
| D-dopa | 4.57 | 41.3 | 9.09 | 2.41 | 31.50 | 13.06 | nd | nd | nd |
| L-dopa methyl ester | 0.58 | 44.6 | 76.90 | 2.26 | 41.62 | 18.42 | nd | nd | nd |
| L-tyrosine | 0.079 | 0.9 | 11.39 | 0.106 | 0.88 | 8.30 | 0.076 | 1.47 | 19.34 |

^a DO activity; values are the mean of two determinations. ^b TH; values are the mean of three determinations. ^c nd = not determined.

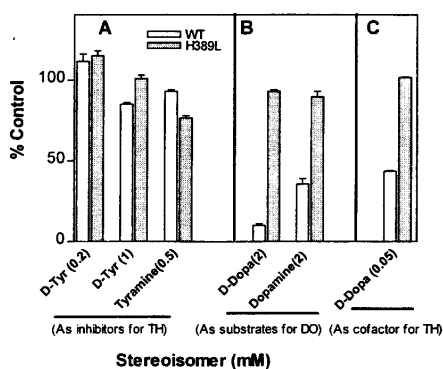


FIGURE 5: Stereospecificity of wtTyr and H389L Tyr species for different substrates. Data are expressed as percent of the control reaction rates. (A) Addition of D-tyrosine (0.2 and 1 mM) and tyramine (0.5 mM) referred to the TH standard assay using radioactive L-tyrosine. (B) Replacement of the substrate L-dopa (control) by D-dopa and dopamine (2 mM) in the DO standard assay. (C) Replacement of the cofactor L-dopa (control) by D-dopa in the TH assay using 50 M L-tyrosine and L- or D-dopa. H389L loses the stereospecificity for the DO activity and dopa binding as cofactor, but it does not for the TH reaction.

was L-substrate > decarboxylated substrate > D-substrate, the same as with *o*-diphenols.

Surprisingly, the H389L mutant showed the same behavior in the TH assay as wtTyr. Both forms displayed stereospecificity for monophenols (Figure 5B), pointing out two relevant aspects of the catalysis. First, the monophenol hydroxylase and diphenol oxidase activities have different structural requirements. In agreement with that, the H378Q mutant presented a significant increase in the catalytic efficiency for L-Tyr (Table 3), being more efficient for the TH activity than for the wtTyr. Second, H389 is involved in *o*-diphenol docking to the bicopper center but not in monophenol docking. The stereospecificity of Tyr for monophenols should reside in residue(s) different from H389, yet to be identified.

Finally, we also explored the efficiency of D-dopa as cofactor for the TH activity. It has been reported that D-dopa can substitute L-dopa as cofactor of the hydroxylase reaction without competing significantly as alternative substrate for DO (25). This suggested that the behavior of L-dopa acting as cofactor for TH or as substrate for DO would be different. We compared the results obtained using L- or D-dopa in a 1:1 ratio to L-tyrosine (50 μM both). D-Dopa was less efficient than L-dopa for wtTyr but not for the H389L mutant species (Figure 5C).

A Model for the Catalytic Cycles of Tyr Activities. Our results allow for the proposal of a reaction mechanism (Figure 6) that includes some modifications to former models

(11, 30). According to those models, the most abundant enzymatic form is oxy-Tyr, and the substrates, L-tyrosine and L-dopa, initiate the TH or DO cycles, respectively. Both phenols probably bind to the catalytic center in an axial orientation, but L-tyrosine binds preferentially to the CuA site, whereas L-dopa binds to CuB. The following data support this view: (i) H389Q mutation in mouse Tyr (at CuB) abolishes stereospecificity for L-dopa but does not for L-tyrosine (this work), (ii) the A206T mutation in human TYR (at CuA) increases TH activity 200% at the permissive temperature for correct Tyr folding but does not increase DO (22), (iii) the order of specificity of mushroom Tyr toward a series of monophenols is different from that of *o*-diphenols (41), and (iv) crystallographic data for the sweet potato catechol oxidase show that the active site of this enzyme has an aromatic residue (F261) blocking the CuA access (13). Accordingly, all plant catechol oxidases so far sequenced have an aromatic residue in the equivalent blocking position, and they do not display TH activity. Conversely, fungal or animal Tyrs have no blocking aromatic residue at the equivalent position, and they do show TH activity.

In the TH cycle, monophenol would labilize the oxygen bound in the catalytic center in a side-on manner (42). The resulting polarized molecule can ortho-hydroxylate the monophenol, and the substrate undergoes a Berry pseudorotation to an equatorial position (43). Oxidation of the *o*-diphenolic product would then occur at the equatorial position and the *o*-quinone would leave the reduced bicuprous site (30), allowing the entrance of a new oxygen molecule.

In the DO cycle, the *o*-diphenol bound to CuB would also labilize the oxygen, resulting in oxidation of the organic substrate and release of L-DQ. The enzyme is left in a bicupric state, met-Tyr. This species can next bind L-tyrosine or L-dopa with higher affinity than oxy-Tyr since the active center is not occupied by oxygen, and all substrates and aromatic inhibitors such as L-mimosine or phenylthiourea compete for the same binding site than oxygen (13). L-Dopa would dock to the two copper ions by both hydroxyl groups, with higher affinity than when the binding proceeds only through CuB. This higher affinity would account for the observation that the K_a measured for L-dopa as cofactor is in the micromolar range (21), approximately 100-fold higher than the K_M for diphenolic substrates, that is related to their affinity for oxy-Tyr. The different affinity ratio of the met and oxy enzymatic forms also accounts for the fact that D-dopa is a relatively efficient cofactor but a poor substrate (25, this work). The binding of both hydroxyl groups to the copper ions allows for an easy transfer of two electrons from

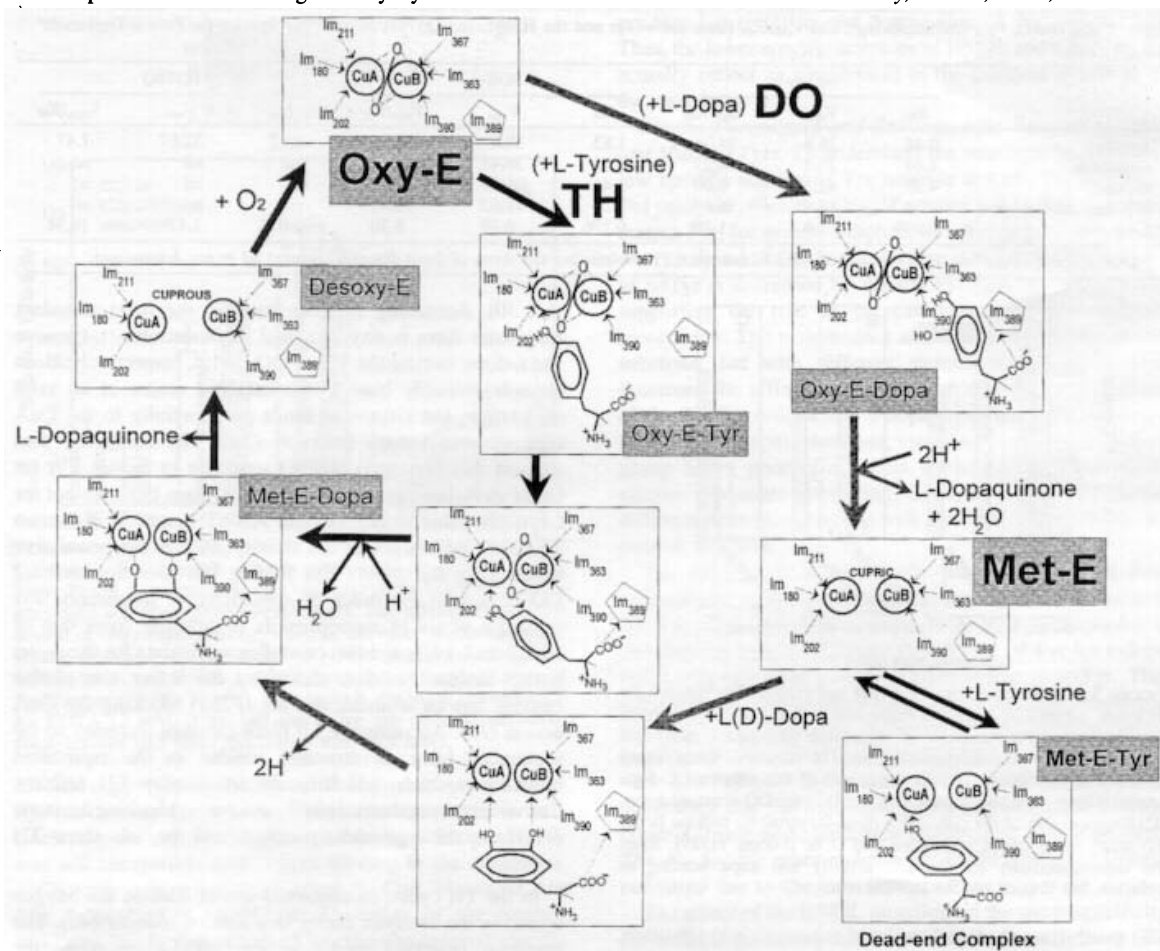


FIGURE 6: Proposed catalytic cycles for TH and DO to differentiate both activities. Tyr presents two forms (oxy- and met-Tyr) with different affinities and structural requirements for both substrates. Tyrosine acts as substrate for the oxy-Tyr and also as a dead-end inhibitor for met-Tyr. Dopa acts as cofactor when bound to the met form and competes with tyrosine for the inhibition of this species. H389 is essential for L-dopa recognition and orientation to CuB, but it is not involved in the docking of L-tyrosine to CuA.

the *o*-diphenol to the binuclear site, leading to the oxidized quinone and the reduced deoxy form, which is again oxidized upon oxygen binding.

Docking of L-tyrosine to met-Tyr would lead to a dead-end complex. As L-tyrosine binding to met-Tyr could theoretically occur through any copper ion, although with different affinities, the axial binding of two molecules of L-tyrosine to each copper at the catalytic center is also possible. This might also account for the inhibition by substrate excess that has been reported for Tyr (24, 44), but such a possibility should be further explored by determining whether two aromatic rings could be located in a distance compatible with the binding of each molecule to each one of the copper ions in the met form.

The competition of L-tyrosine and L-dopa for met-Tyr also explains the characteristic lag period of the TH activity in the absence of cofactor (3, 19, 20). L-Dopa is generated in situ as a consequence of the reaction of L-DQ and L-cyclodopa during the melanogenic pathway (4, 5). Therefore, the L-dopa/L-tyrosine ratio increases continuously as the reaction proceeds, and this leads to a parallel decrease in

the fraction of enzymatic species reversibly captured in the dead-end complex. Thus, the proportion of Tyr molecules recruited to the productive catalytic cycle rises with the subsequent acceleration of the hydroxylase reaction rate.

In summary, the mechanism outlined at Figure 6 accounts for all kinetic features of Tyr so far described and reconciles some discrepancies in former mechanisms (11, 30, 41). It also contains evidence for the actual occurrence of physical differences in the catalytic requirements of TH and DO activities previously suggested (18, 22). We propose that monophenols would dock to CuA but *o*-diphenols would dock to CuB at the Tyr active site. The inequivalence of the two copper ions was already reported by XANES (X-ray absorption near edge structure) spectra (45). Thus, the different spatial docking of mono- and *o*-diphenols to the Tyr active site would be an essential determinant for the course of the catalytic cycle. This means that the existence of two hydroxyl groups on the *o*-diphenol substrate orientates the binding of one of them to CuB. The interactions and residue(s) responsible for this orientation remain to be determined. On the other hand, the absence of a second

hydroxyl group in monophenolic substrates allows the interaction with CuA. In this case, the driving force for the high redox potential process would come from the presence of a negative group around CuA (43) and the concomitant uptake of the hydroxyl proton. The nature of this group, which is also a candidate to be directly involved in TH activity, remains to be determined too. Experiments are underway to determine those crucial residues.

REFERENCES

- Oetting, W. S., and King, R. A. (1999) *Hum. Mutat.* 13, 99–115.
- Cooksey, C. J., Garratt, P. J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A., and Smit, N. P. M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 26226–26235.
- Naish-Byfield, S., and Riley, P. (1998) *Pigment Cell Res.* 11, 127–133.
- Prota, G., D'Ischia, M., and Napolitano, A. (1998) in *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology* (Nordlund, J. J., Boissy, R. E., Hearing, V. J., King, R. A., and Ortonne, J. P., Eds.) pp 307–332, Oxford University Press, New York.
- Olivares, C., Jiménez-Cervantes, C., Lozano, J. A., Solano, F., and García-Borrón, J. C. (2001) *Biochem. J.* 354, 131–139.
- Jackson, I. J. (1994) *Pigment Cell Res.* 7, 241–242.
- Halaban, R., Svedine, S., Cheng, E., Smicun, Y., Aron, R., and Hebert, D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5889–5894.
- Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. A., and García-Borrón, J. C. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 17993–18001.
- Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A. J., Jiménez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., García-Borrón, J. C., and Hearing, V. J. (1994) *EMBO J.* 13, 5818–5825.
- Lerner, A. B., Fitzpatrick, T. B., Calkins, E., and Summerson, W. H. (1950) *J. Biol. Chem.* 187, 793–802.
- Lerch, K. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* 52, 125–138.
- Huber, M., and Lerch, K. (1988) *Biochemistry* 27, 5610–5615.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchetti, J. C., and Krebs, B. (1998) *Nat. Struct. Biol.* 5, 1084–1090.
- Spritz, R. A., Ho, L., Furumura, M., and Hearing, V. J. (1997) *J. Invest. Dermatol.* 109, 207–212.
- Nakamura, M., Nakayima, T., Ohba, Y., Yamauchi, S., Lee, B. R., and Ichishima, E. (2000) *Biochem. J.* 350, 537–545.
- Furumura, M., Solano, F., Matsunaga, N., Sakai, C., Spritz, R. A., and Hearing, V. J. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 579–585.
- Lerner, A. B. (1954) *Adv. Enzymol.* 14, 73–128.
- Hearing, V. J., and Ekel, T. M. (1976) *Biochem. J.* 157, 549–557.
- Lerner, A. B., Fitzpatrick, T. B., Calkins, E., and Summerson, W. H. (1949) *J. Biol. Chem.* 178, 185–195.
- Pomerantz, S. H. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 161–168.
- Pomerantz, S. H., and Warner, M. C. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 5308–5314.
- Tripathi, R. K., Hearing, V. J., Urabe, K., Aroca, P., and Spritz, R. A. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 23707–23712.
- Kelsall, S. R., LeFur, N., and Mintz, B. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 173–177.
- Jara, J. R., Solano, F., and Lozano, J. A. (1988) *Pigment Cell Res.* 1, 332–339.
- Winder, A. J., and Harris, H. (1991) *Eur. J. Biochem.* 198, 317–326.
- Jiménez-Cervantes, C., Valverde, P., García-Borrón, J. C., Solano, F., and Lozano, J. A. (1993) *Pigment Cell Res.* 6, 394–399.
- Toyofuku, K., Wada, I., Spritz, R. A., and Hearing, V. J. (2001) *Biochem. J.* 355, 259–269.
- Toyofuku, K., Wada, I., Hirosaki, K., Park, J. S., Hori, Y., and Jimbow, K. (1999) *J. Biochem. (Tokyo)* 125, 82–89.
- Himmelwright, R. S., Eickman, N. C., Lubien, C. D., Lerch, K., and Solomon, E. I. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102, 7339–7344.
- Winkler, M. E., Lerch, K., and Solomon, E. I. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103, 7001–7003.
- Oetting, W. S. (1998) in *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology* (Nordlund, J. J., Boissy, R. E., Hearing, V. J., King, R. A., and Ortonne, J. P., Eds.) pp 231–249, Oxford University Press, New York.
- Kroupouzou, G., Urabe, K., Kobayashi, T., Sakai, C., and Hearing, V. J. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 1060–1068.
- Jackson, I. J., Chambers, D. M., Tsukamoto, K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., and Hearing, V. J. (1992) *EMBO J.* 11, 527–535.
- Solano, F., Jiménez-Cervantes, C., Martínez-Liarte, J. H., García-Borrón, J. C., Jara, J. R., and Lozano, J. A. (1996) *Biochem. J.* 313, 447–453.
- Bubacco, L., Salgado, J., Tepper, A. W., Vijgenboom, E., and Canters, G. W. (1999) *FEBS Lett.* 442, 215–220.
- Berson, J. F., Frank, D. W., Calvo, P. A., Bieler, B. M., and Marks, M. S. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 12281–12289.
- Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D. C., and Hearing, V. J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 31801–31805.
- Manga, P., Sato, K., Ye, L., Beermann, F., Lamoreux, M. L., and Orlow, S. J. (2000) *Pigment Cell Res.* 13, 364–374.
- Tsai, T. Y., and Lee, Y. H. W. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 19243–19250.
- Espin, J. C., García-Ruiz, P. A., Tudela, J., and García-Cánovas, F. (1998) *Biochem. J.* 331, 547–551.
- Espin, J. C., Varon, R., Fenoll, L. G., Gilbert, M. A., García-Ruiz, P. A., Tudela, J., and García-Cánovas, F. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267, 1270–1279.
- Solomon, E. I., and Lowery, M. D. (1993) *Science* 259, 1575–1581.
- Van Gastel, M., Bubacco, L., Groenen, E. J. J., Vijgenboom, E., and Canters, G. W. (2000) *FEBS Lett.* 474, 228–232.
- Devi, C. C., Tripathi, R. K., and Ramaiah, A. (1987) *Eur. J. Biochem.* 166, 705–711.
- Della Longa, S., Ascone, I., Bianconi, A., Bonfigli, A., Castellano, A. C., Zaviri, O., and Miranda, M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 21025–21030.

BI011535N

Conformation-dependent Post-translational Glycosylation of Tyrosinase

REQUIREMENT OF A SPECIFIC INTERACTION INVOLVING THE CuB METAL BINDING SITE*

Received for publication, January 21, 2003, and in revised form, February 19, 2003
Published, JBC Papers in Press, February 20, 2003, DOI 10.1074/jbc.M300658200

Concepcion Olivares‡, Francisco Solano, and Jose C. García-Borrón§

From the Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Murcia, Apto 4021, Campus Espinardo, Murcia 30100, Spain

Tyrosinase, the rate-limiting enzyme in mammalian melanogenesis, is a copper-containing transmembrane glycoprotein. Tyrosinase undergoes a complex post-translational processing before reaching the melanosomal membrane. This processing involves *N*-glycosylation in several sites, including one located in the CuB copper binding site, movement from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi, copper binding, and sorting to the melanosome. Aberrant processing is causally related to the depigmented phenotype of human melanomas. Moreover, some forms of albinism and several other pigmentary syndromes are considered ER retention diseases or trafficking defects. A critical step in tyrosinase maturation is the acquisition of an ER export-competent conformation recognized positively by the ER quality control system. However, the minimal structural requirements allowing exit from the ER to the Golgi have not yet been identified for tyrosinase or other melanosomal proteins. We addressed this question by analyzing the enzymatic activity and glycosylation pattern of mouse tyrosinase point mutants and chimeric constructs, where selected portions of tyrosinase were replaced by the homologous fragments of the highly similar tyrosinase-related protein 1. We show that a completely inactive tyrosinase point mutant lacking a critical histidine residue involved in copper binding is nevertheless able to exit from the ER and undergo further processing. Moreover, we demonstrate that tyrosinase displays at least two sites whose glycosylation is post-translational and most likely conformation-dependent and that a highly specific interaction involving the CuB site is essential not only for correct glycosylation but also for exit from the ER and enzymatic activity.

Melanogenesis is the biochemical pathway responsible for melanin synthesis. In mammals, three related and highly sim-

ilar metalloenzymes, tyrosinase (Tyr^{1,2}; monophenol dihydroxyphenylalanine:oxygen oxidoreductase; EC 1.14.18.1), and the tyrosinase-related proteins (Tyrops) 1 and 2 are involved in the catalytic control of the process. Their cDNAs have been cloned and sequenced (1–6), and the genes have been mapped to the mouse *albino*, *brown*, and *slaty* loci, respectively. The amino acid L-tyrosine is the metabolic precursor of the pigment. In the presence of catalytic amounts of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), Tyr catalyzes L-tyrosine conversion into L-dopaquinone (7). This reactive intermediate undergoes spontaneous cyclization and rearrangement to L-dopachrome in the absence of thiol compounds (8). Tyrp2 (dopachrome Δ^2, Δ^7 -isomerase; EC 5.3.3.12), also called dopachrome tautomerase, catalyzes the tautomerization of dopachrome into the more stable intermediate 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (9, 10). Although the enzymatic function(s) of Tyrp1 is still somewhat controversial, the protein purified from mouse melanocytes has been reported to be a low specific activity Tyr isozyme with both tyrosine hydroxylase and DOPA oxidase activities (11, 12), that catalyzes the oxidation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (13, 14) and promotes its incorporation into the eumelanin polymer. Sequence similarity between Tyr and the Tyrops is higher in the metal ion binding sites (Fig. 1), but the proteins also share several conserved *N*-glycosylation sites (reviewed in Ref. 15).

Tyr and the Tyrops are transmembrane glycoproteins whose final destination is the melanosome, a melanocyte-specific organelle where melanin synthesis is confined. The proteins of the family undergo a complex post-translational processing before reaching the melanosomal membrane in their final catalytically active conformational state. In the mouse, Tyr processing includes *N*-glycosylation in at least four of the six available glycosylation sites (16) (Fig. 1). Human TYR, displaying seven potential glycosylation sites, can appear as a protein with six or seven glycans, depending on the translation rate (17). During its post-translational processing, the mammalian enzyme also undergoes movement from the ER to the Golgi apparatus, binding of the copper cofactor to two sites designated CuA and CuB (18) and finally sorting to the melanosomes.

The importance of Tyr post-translational processing is highlighted by several observations. Aberrant processing is causally related to the depigmented phenotype of human melanomas

* This work was supported by Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Spain, Grants PM99-0138 (to J. C. G.-B.) and BIO2001-0140 (to F. S.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Cultura, Spain.

§ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Murcia, Apto 4021, Murcia 30100, Spain. Tel.: 34-968-364676; Fax: 34-968-830950; E-mail: gborron@um.es.

¹ The abbreviations used are: Tyr, tyrosinase; Tyrp, tyrosinase-related protein; DOPA, L-3,4-dihydroxyphenylalanine; Endo F, *N*-glycosidase F; Endo H, endoglycosidase H; ER, endoplasmic reticulum.

² According to current conventions, mouse and human tyrosinase are designated Tyr and TYR, respectively. However, we have used the full term "tyrosinase" in sentences referring to a general behavior of the mammalian enzyme, rather than to one particular species.

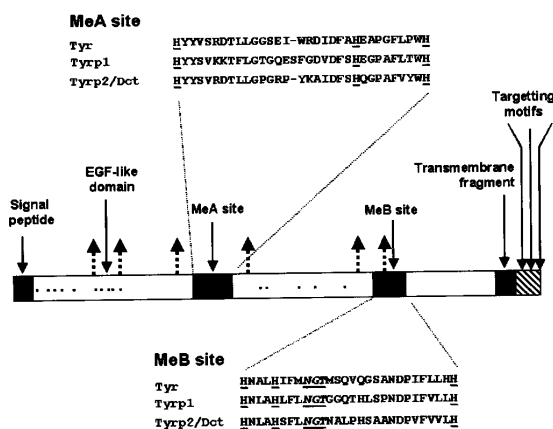


FIG. 1. Schematic representation of tyrosinase structure, highlighting the similarity of the metal ion binding sites in mouse Tyr and Tyrps. The dots indicate cysteine residues, and the broken arrows pointing upward indicate the positions of the N-glycosylation sequons. Other relevant structural elements are indicated as appropriate. The metal binding sites are labeled as MeA and MeB, rather than CuA and CuB, because the nature of the metal cofactor is different in Tyr (copper) and Tyrp2/Dct (zinc), whereas the metal cofactor of Tyrp1 has not yet been convincingly characterized. In the amino acid sequence of the metal binding sites, histidine residues thought to be responsible for metal binding are underlined. Within the MeB site, the conserved N-glycosylation sequon is shown in italic and underlined characters.

(19). On the other hand, oculocutaneous albinism type 1 is an autosomal recessive disease characterized by the absence of pigment in hair, skin, and eyes, with other common features such as severe nystagmus, photophobia, and reduced visual acuity, associated with mutations in the Tyr gene (reviewed in Ref. 20). Some forms of oculocutaneous albinism type 1 are considered ER retention diseases (21–23), and several other pigmentary syndromes are accounted for by processing/trafficking defects (24, 25). In this respect, it has recently been shown that the most common form of albinism worldwide, oculocutaneous albinism type 2, results from mutations in the pink-eyed dilution (p) gene (26) and that the p protein contributes to the correct processing of Tyr and to its traffic to the melanosome (25). Therefore, correct processing and intracellular trafficking of Tyr and also probably of Tyrps is critical to normal pigmentation.

According to current evidence, recently synthesized Tyr is retained by the ER quality control machinery until the proper conformation is acquired. Then glycosylated and correctly folded Tyr is exported to the Golgi, where N-linked oligosaccharide chains are further processed and copper is probably bound. One of the potential glycosylation sites, located in the CuB site, appears particularly relevant. It is conserved in human and mouse Tyr and Tyrps (Fig. 1), and its glycosylation has been reported to correlate with proper cofactor binding and full enzymatic activity (16). Moreover, a natural mutation destroying this glycosylation sequon results in oculocutaneous albinism type 1 (27).

Therefore, a critical step in pigmentation is the acquisition by tyrosinase of a conformation recognized positively by the ER quality control system. However, the minimal structural requirements allowing for exit from the ER have not yet been identified for Tyr or for other melanosomal proteins. This knowledge would help understand the molecular basis of albinism. Moreover, due to the likely relationships of different post-translational processes such as glycosylation, metal cofactor binding and movement between intracellular compartments, a description of these requirements may also provide a

model for other metalloproteins that follow the secretory sorting pathway.

We have addressed this question by analyzing the enzymatic activity and glycosylation pattern of Tyr point mutants and chimeric constructs, where selected portions of the Tyr molecule were replaced by the homologous fragments of Tyrp1. With this approach, we show that although glycosylation of the CuB acceptor sequon is necessary for full enzymatic activity, it is not a "sine qua non" requirement for ER export, copper binding, and complete maturation. Moreover, mutation of a critical histidine residue involved in copper binding and abolishing completely Tyr activity does not block completely Tyr processing to a mature form. Finally, our results prove that a specific interaction involving the CuB site is essential for processing beyond the ER and for the conformation-dependent N-glycan addition to at least two glycosylation sequons.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—The radioactive substrate L-[3,5-³H]-tyrosine, specific activity 50 Ci/mmol, was obtained from Amersham Biosciences. The specific αPEP1 and αPEP7 antisera, recognizing the C-terminal cytosolic extension of mouse Tyrp1 and Tyr, respectively, were a kind gift from Dr. V. Hearing (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The goat polyclonal antibody against the carboxyl terminus of calnexin was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Electrophoresis and Western blot reagents and materials were from Bio-Rad, unless otherwise specified. Reagents and plasticware for cell culture were obtained from Nunc (Roskilde, Denmark) or Invitrogen. Other reagents were from Sigma, Merck, or Prolabo (Barcelona, Spain). Enzymes for DNA cleavage and modification were from Invitrogen or Fermentas (Hanover, MD). Endoglycosidase H (Endo H) and N-glycosidase F (Endo F) were from Roche Molecular Biochemicals.

Preparation of Wild Type, Mutant, and Chimeric Expression Constructs—All expression constructs were prepared in the pcDNA3 expression vector (Invitrogen) and were based on the mouse Tyr and Tyrp1 clones obtained as described elsewhere (33). Point mutants were created by PCR with the mutagenic primers shown in Table I, as described (33). Concerning the chimeric constructs derived from Tyr and Tyrp1 sequences, their structures are summarized in Fig. 2. Regarding the Tyr(A)-Tyrp1(B) and Tyrp1(A)-Tyr(B) chimerae, we first abolished an existing SphI restriction site at position 361 in the wild type Tyrp1 with a silent single base substitution within the target sequence (primer number 10) and created a new SphI site immediately before the codon corresponding to the first His in CuB (primer number 11). A homologous restriction site is present at this position in wild type Tyr, thus allowing for the fusion of the upstream and downstream portions of the Tyr and Tyrp1 genes with conservation of the protein reading frame. The modified Tyrp1 (coding for a protein carrying one amino acid substitution, L376M) was cloned into pBlueScript KSII and used to generate 5' EcoRI-SphI or 3' SphI-XbaI fragments that were used to replace the homologous fragments of Tyr, cloned into pBlueScript KSII. The full-length chimeric constructs were subsequently subcloned into pcDNA3. The Tyr-MeB chimera was constructed by PCR, using primers 2 and 12 with the H389L Tyr construct as template. This amplicon was then purified and used as a reverse primer, with forward primer 1 and the Tyr(A)-Tyrp1(B) construct as a template, under low stringency conditions compatible with primer extension. All constructs were verified by automated sequencing of both strands, performed at the core facility of the Instituto de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, Spain).

Transfection of HEK 293T cells was performed with the Superfect reagent (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Cells were harvested 20 h after transfection and processed for enzyme activity determinations or Western blot as described below.

Cell Culture and Preparation of Crude Solubilized Extracts—B16 mouse melanoma cells were cultured as described previously (28) in 75-cm² flasks and allowed to grow to ~80% confluence. Cells were harvested with trypsin, washed twice with saline phosphate buffer, and solubilized in 10 mM sodium phosphate, pH 6.8, containing 1% Igepal CA-630, 0.1 mM EDTA, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, using a ratio of ~1 ml solubilization buffer/10⁷ cells. For expression studies, HEK 293T cells were employed. This is a SV40 T antigen-transformed subline of the permanent line of primary human embryonal kidney cells HEK 293 (ATCC number CRL-1573), widely used for

Conformation-dependent Glycosylation of Tyrosinase

15737

TABLE I
Oligonucleotides employed in the preparation of the chimeric constructs and point mutants

| Number | Name ^a | Sequence ^b |
|--------|-------------------|---------------------------------------------------|
| 1 | TyrFw (f) | TGATGAATTCGAGAAAATGTTCTTGGCTGT (<i>Eco</i> RI) |
| 2 | TyrRv (r) | GTTTTCTAGAATGTTTCACAGATGGCTCTGA (<i>Xba</i> I) |
| 3 | O378H (f) | GTACACGGATCGGCCAACGAT |
| 4 | H389L (f) | CTTCTCCATGCTTTTGTGGAC |
| 5 | H390Q (f) | CACCAGGCTTTTGTGGACAGT |
| 6 | SF5 (f) | CGATGGAACACCTGAGG |
| 7 | Δ6-Tyr (f) | CTTTATGCAAGGAACAATGTCCC |
| 8 | Tyrp1Fw (f) | GCTGAATTCAGAATGAAATCTTACAACGTCT (<i>Eco</i> RI) |
| 9 | Tyrp1Rv (r) | GGGCAC TAGTCTATCAGACCATGGAGTGGTTA (<i>Spe</i> I) |
| 10 | Tyrp1SS (r) | TTCTGGTTGCACGCAGCTCC |
| 11 | Tyrp1ΔF (f) | GTTCGAAGCATGCACAACCTG (<i>Sph</i> I) |
| 12 | Tyr-MeB-Fw (f) | CCTATTTTGTCTCTCCA |
| 13 | Δ6-Tyrp1 (f) | CCTCTCTGCAAGGAACGG |

^a The name of the primers refers to the construct that they generate, when possible. Forward and reverse primers are indicated (f and r, respectively).

^b When appropriate, the mutagenic substituted base is highlighted in boldface characters, and artificial restriction sites are underlined. In this last case, the corresponding restriction enzyme is specified in parentheses.

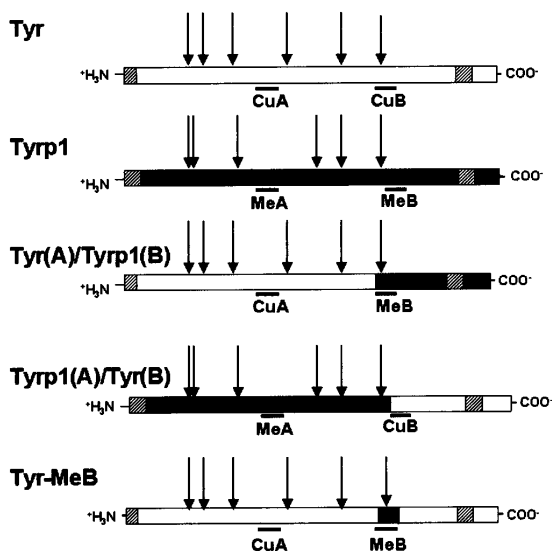


FIG. 2. Schematic representation of the quimeric constructs analyzed in this study. The arrows pointing downward indicate the location of the glycosylation sequons. The positions of the metal binding sites (labeled *CuA* and *CuB* for Tyr-derived sequences or *MeA* and *MeB* for Tyrp1-derived fragments) is also shown. The hatched boxes located at the N and C termini in each diagram refer to the signal peptide and transmembrane fragment, respectively. Regions corresponding to the Tyr sequence are shown as an open box, and those pertaining to Tyrp1 are shown as a solid black box.

the transient expression of genes cloned into vectors carrying the SV40 origin such as pcDNA3. HEK 293T cells were grown in six-well plates with RPMI 1640, 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin, as described elsewhere (29). Crude extracts were prepared as for B16 cells. The protein content of the extracts was determined by the bicinchoninic acid method, using bovine serum albumin as a standard.

Enzyme Activity Determinations—The tyrosine hydroxylase activity of tyrosinase was determined by a radiometric method (30). One unit was defined as the amount of enzyme catalyzing the hydroxylation of 1 μmol of L-tyrosine/min, in the presence of a 50 μM concentration of the substrate and 10 μM DOPA as cofactor. DOPA oxidase activity was measured spectrophotometrically in the presence of 4 mM 3-methyl-2-benzothiazolinone, as described by others (31) with a final concentration of 2.0 mM DOPA.

Electrophoretic Procedures—Analytical SDS-PAGE was performed as described (32) in 12% acrylamide gels. Samples were mixed in a 2:1 ratio with 3× sample buffer (0.18 M Tris-HCl, pH 6.8, 15% glycerol, 0.075% bromphenol blue, 9% SDS, with or without 3 M 2-mercaptoeth-

anol), and electrophoresed at 4 °C. A highly sensitive and specific DOPA oxidase activity stain was carried out by equilibrating gels run under nonreducing conditions at pH 6.0, with 50 mM sodium phosphate buffer, followed by incubation at 37 °C in 2 mM DOPA, 4 mM 3-methyl-2-benzothiazolinone, in 10 mM phosphate buffer, pH 6.8, for 15–30 min (32).

For deglycosylation studies, the extracts were incubated at 37 °C for 4 h in the presence of 5 units of either Endo H or Endo F in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 10 mM EDTA and 0.1% SDS. Samples for Endo F digestion were heated at 95 °C for 5 min prior to incubation at 37 °C and processed as previously described for electrophoresis.

Immunochemical Techniques—For Western blots, SDS-PAGE gels were run under nonreducing conditions, as described above. Transfer to polyvinylidene difluoride membranes (PolyScreen; PerkinElmer Life Sciences) was done in a semidry unit. Immunodetection of Tyr, Tyrp1, and the mutant proteins was performed with the αPEP7 or αPEP1 antisera, as appropriate, following previously published procedures (33, 34). Staining and detection were done with the ECL Plus chemiluminescent substrate (Amersham Biosciences). The relative intensities of the specific bands were quantified in a Gel Doc system (Bio-Rad), using the Multi-Analyst software.

For immunoprecipitation experiments, cells were solubilized in 400 mM KCl, 2% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, buffer with 1× protease inhibitor mixture (50 μg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/ml leupeptin, and 1 μg/ml pepstatin). 200 μl of cell lysate (~2 × 10⁶ cells) were precleared by incubation with 20 μl of prewashed Protein G PLUS-agarose slurry (Santa Cruz Biotechnology) for 1 h on ice. Immunoprecipitation was then performed by incubating 2 μg of calnexin C-20 goat polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology) with 20 μl of Protein G PLUS-agarose for 1 h at 4 °C with continuous shaking, followed by the addition of the precleared lysate and further incubation from 2 h to overnight at 4 °C. Beads were washed four times with a 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 500 mM KCl, 400 mM NaCl, and 0.05% Triton X-100. 20 μl of 1.5× sample buffer for SDS-PAGE with 2-mercaptoethanol were added to the beads and incubated for 10 min at 95 °C. Supernatants were processed for SDS-PAGE and Western blotting with αPEP7 as previously described.

RESULTS

Expression and Processing of Wild Type Tyr and Tyrp1 in HEK 293T Cells—Analysis of the structure-function relationships in the Tyr family proteins by site-directed mutagenesis requires an efficient expression system. To date, a variety of heterologous cells devoid of endogenous melanogenic enzymes have been used for the stable or transient expression of the corresponding genes. Recent studies employed COS7 (23, 34, 35), Chinese hamster ovary (16), or HeLa cells (18, 36). We have found that HEK 293T cells transfected with wild type and mutant Tyr constructs cloned into pcDNA3 transiently express very high levels of active Tyr (33). Therefore, we examined Tyr folding and processing in these cells by means of glycosidase digestion with Endo H and Endo F, followed by Western blot. Endo H efficiently cleaves high mannose glycans, such as the

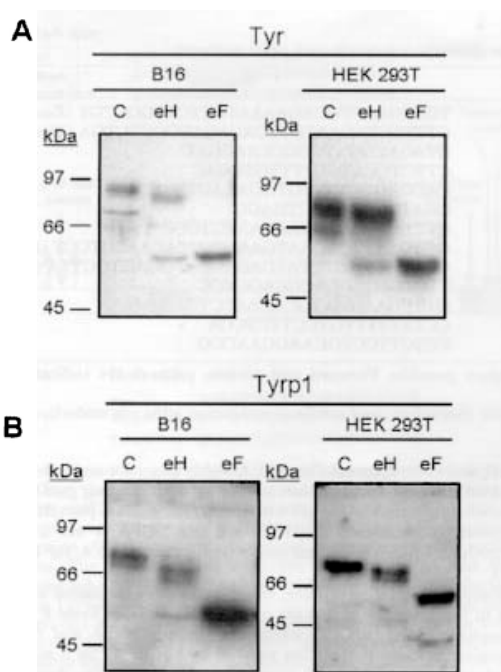


FIG. 3. Efficient glycosylation and processing of wild type Tyr (A) and Tyrp1 (B) in HEK 293T cells. Extracts from B16 mouse melanoma cells (8 μ g of total protein/lane) or from HEK 293T cells transfected with the wild type *Tyr* and *Tyrp1* genes cloned into pcDNA3 (20 μ g of total protein/lane) were electrophoresed, blotted, and probed with α PEP7 (for detection of Tyr) or α PEP1 (for detection of Tyrp1). For each blot, the migration of molecular weight markers is shown on the left. C, untreated control extracts; eH and eF, extracts digested with Endo H and Endo F, respectively. The protein load was the same for control and glycosidase-treated samples.

ones found in incompletely processed glycoproteins present in the ER (37). However, upon further processing to complex glycans in the medial Golgi, glycoproteins become resistant to Endo H. Accordingly, sensitivity to Endo H provides a criterion to distinguish early forms of ER-resident, incompletely processed tyrosinase from mature forms of the enzyme (19, 21–23). On the other hand, Endo F removes all forms of glycans, irrespective of their degree of processing and trimming, thus allowing for an estimation of the size of the polypeptide backbone of glycoproteins.

Western blots of native and glycosidase-treated wild type Tyr expressed in HEK 293T cells showed a major band (apparent M_r 78.4 \pm 0.9 kDa, $n \geq 5$) and a faster migrating minor band (M_r 69.5 \pm 0.5 kDa, $n \geq 5$) (Fig. 3A). Upon treatment with Endo F, a single band of 55.5 \pm 1.5 kDa was seen, corresponding to the deglycosylated protein backbone. Therefore, the two bands present in the native extracts corresponded to different glycosylation forms. The expressed Tyr protein was mostly resistant to Endo H, thus showing that it is a mature, post-ER form (Fig. 3A). The enzymatic activity of crude extracts from transfected HEK 293T cells was higher than in B16 mouse melanoma cells (for tyrosine hydroxylase activity, 526 \pm 26 microunits/mg protein versus 305 \pm 27 microunits/mg in B16 melanoma cells, and for DOPA oxidase activity 51 \pm 2 milliunits/mg versus 32 \pm 4 milliunits/mg), consistent with an efficient expression, folding, and processing of the protein. In keeping with the behavior of Tyr, wild type Tyrp1 was also processed to an Endo H-resistant protein of 78.1 \pm 1.2 kDa ($n \geq 3$) that could be deglycosylated by Endo F to yield a 57.4 \pm 0.9-kDa protein core

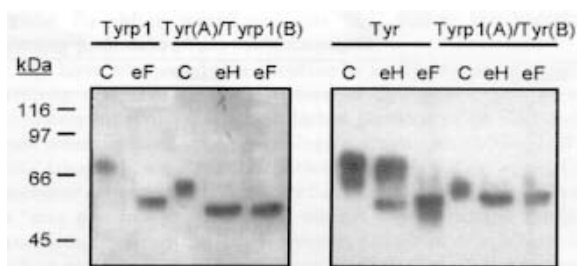


FIG. 4. Glycosylation status of the chimeric constructs Tyr(A)/Tyrp1(B) and Tyrp1(A)/Tyr1(B). Wild type Tyr and Tyrp1 and the chimeric constructs Tyrp1(A)/Tyr1(B) and Tyr(A)/Tyrp1(B) were transiently expressed in HEK 293T cells. Control extracts (lanes labeled C) and extracts treated with Endo H (eH) or Endo F (eF) were analyzed by Western blot, with a protein load of 10 μ g/lane. α PEP7 was used for the detection of Tyr and Tyrp1(A)/Tyr1(B), since these proteins share the C terminus of Tyr, whereas α PEP1 was employed to detect Tyrp1 and Tyr(A)/Tyrp1(B). The migration of molecular weight markers is shown on the left.

(Fig. 3B).

Therefore, HEK 293T cells efficiently express and process both Tyr and Tyrp1 and constitute a suitable model to study the folding determinants of the Tyr family proteins.

Chimeric Constructs Reveal Conformation-dependent Glycosylation Sites in Tyr and Tyrp1—In the course of a study aiming to define structural elements specific for each protein of the Tyr family and to differentiate them from common elements that can fulfill their function within any member of the family, we constructed and analyzed several chimeric proteins. In preliminary experiments, two constructs designated Tyr(A)/Tyrp1(B) and Tyrp1(A)/Tyr1(B) were studied. Tyr(A)/Tyrp1(B) comprises the complete N-terminal portion of Tyr, up to residue 362 (the residue preceding the first His ligand in the CuB site, His³⁶³), and then the complete CuB and C-terminal portion of Tyrp1, including the cytosolic tail, which bears all of their necessary sorting and trafficking signals (reviewed in Ref. 15). Conversely, Tyrp1(A)/Tyr1(B) contains an opposite distribution, with the N-terminal moiety of Tyrp1 followed by the in-frame CuB site and C terminus of Tyr (Fig. 2). The size of the polypeptide backbone of the two chimeric proteins is similar, with 523 amino acids for Tyr(A)/Tyrp1(B) and 547 for Tyrp1(A)/Tyr1(B), as compared with 533 and 537 amino acids for Tyr and Tyrp1, respectively. Thus, should glycosylation and post-translational processing of the constructs and wild type proteins be comparable, the electrophoretic mobility of the chimeric and the parent proteins in reducing SDS gels would also be very similar. However, we detected an abnormal electrophoretic pattern, with a single band of higher mobility than expected (Fig. 4), corresponding to apparent molecular masses of 65.3 \pm 1.2 ($n = 3$) and 64.1 \pm 0.8 ($n = 3$) kDa for the Tyrp1(A)/Tyr1(B) and Tyr(A)/Tyrp1(B) chimerae, respectively. Upon treatment with either Endo F or Endo H, both chimerae yielded a single band of apparent molecular weight of 55.6 and 59.1 kDa, respectively, consistent with their expected size and with the one of the parent proteins. This showed that the higher electrophoretic mobility of the untreated chimeric constructs is accounted for by a severe underglycosylation as compared with Tyr or Tyrp1. Moreover, their sensitivity to Endo H strongly suggested that these chimeric proteins do not fold correctly and, as a result of an aberrant conformation, are retained in the ER, where the N-glycan chains are not processed to complex-type oligosaccharides. Consistent with an improper and incomplete processing, the chimerae were completely devoid of the typical tyrosinase enzymatic activities.

Tyr, Tyrp1, and the two chimerae possess the same number of glycosylation sites (Fig. 2). Therefore, the different electro-

Conformation-dependent Glycosylation of Tyrosinase

15739

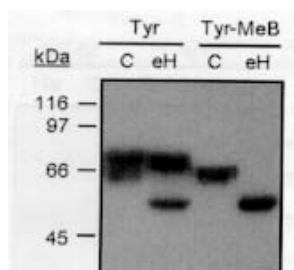


FIG. 5. Replacement of the Tyr CuB site by the homologous sequence in Tyrp1 abolishes normal N-glycosylation. Wild type Tyr or the Tyr-MeB construct, identical to Tyr except for the replacement of the CuB site by the homologous fragment of Tyrp1, was transiently expressed in HEK 293T cells. For both proteins, identical amounts of total protein (8 μ g/lane) from control extracts (C) or extracts treated with Endo H (eH) were analyzed by Western blot, probed with α PEP7. Note the higher electrophoretic mobility of the control, untreated Tyr-MeB construct, indicative of a lower degree of glycosylation, and the complete lack of an Endo H-resistant form for this protein.

phoretic mobility of the chimeric constructs and the parental proteins must be due to lack of utilization of potential glycosylation site(s) normally occupied in the wild type proteins, as opposed to the withdrawal of N-glycosylation sequons from their primary sequences. Thus, the glycosylation pattern of the chimeric constructs strongly suggested that Tyr and Tyrp1 display conformation-dependent N-glycan acceptor sites. These sites would not reach a glycosylation-competent conformation in the chimeric proteins, due to an aberrant folding.

Normal Processing and Complete Glycosylation of Tyr Is Dependent on a Highly Specific Interaction Involving the CuB Site—In an attempt to further define the region of the molecule involved in the establishment of a normal glycosylation-competent conformer, we constructed a more refined chimera consisting of the complete Tyr molecule, except for the replacement of the CuB site (residues His³⁶³–His³⁹⁰; see Fig. 1) by the homologous fragment of Tyrp1. This construct was designated Tyr-MeB (Fig. 2), and its enzymatic activity, electrophoretic mobility, and glycosylation pattern were also analyzed after transient expression in HEK 293T cells. Tyr-MeB was devoid of enzymatic activity and failed to undergo normal processing, as shown by sensitivity to Endo H and underglycosylation, with an apparent molecular mass of 68.5 ± 1.6 kDa ($n = 3$) in control extracts, versus 78.4 ± 0.9 kDa ($n = 7$) for the wild type Tyr (Fig. 5), despite the identical distribution of N-glycosylation sequons and size of the protein moiety. In agreement with the similarity of the protein backbones, Endo H treatment decreased the molecular weight of the Tyr-MeB construct to 55.9 ± 2.8 , a value that compared well with the 55.5 ± 1.5 -kDa size observed for wild type Tyr. Moreover, in keeping with the aberrant glycosylation pattern, suggesting ER retention, Tyr-MeB was shown to interact with calnexin to a much higher extent than Tyr, in coimmunoprecipitation experiments performed with an anti-calnexin antibody (Fig. 6). Therefore, replacement of the CuB site sequence had the same effect as the change of the complete C-terminal half of the protein and caused aberrant processing, inability to reach a full N-glycosylation-competent conformation, and ER retention.

Glycosylation of the CuB Sequon Is Not Required for Complete Maturation of Tyr or for Cofactor Binding—Since the CuB site contains a conserved N-glycosylation site, it was tempting to speculate that underglycosylation of Tyr-MeB in comparison with wild type Tyr could arise directly from lack of N-glycan addition to this sequon. Therefore, we explored the glycosylation status of the CuB sequon in both wild type Tyr and the mutant protein. For this purpose, we constructed two point mutants bearing a conservative N371Q substitution, using the

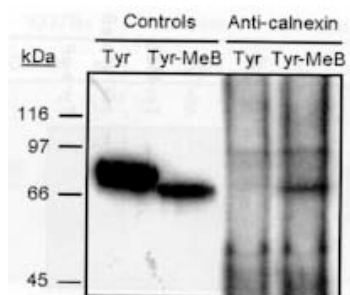


FIG. 6. Association of Tyr-MeB, but not Tyr, with calnexin. Extracts from HEK 293T cells transiently expressing wild type Tyr or the Tyr-MeB construct, as indicated at the top of each lane, were immunoprecipitated with a polyclonal antibody against calnexin, followed by Western blotting probed with α PEP7. Lanes labeled Controls correspond to the precleared supernatants, before immunoprecipitation (protein load of 10 μ g/lane), and those labeled Anti-calnexin correspond to samples submitted to the complete immunoprecipitation procedure. The amount of starting total protein was the same for extracts from cells transfected with either Tyr or Tyr-MeB. The blot shows an experiment representative of three.

wild type or Tyr-MeB cDNAs as starting material. Since this mutation abolishes the sixth glycosylation signal in both cases, the constructs were designated $\Delta 6$ -Tyr and $\Delta 6$ -Tyr-MeB. Surprisingly, comparison of the electrophoretic mobility of the expressed proteins proved that the glycosylation sequon located in the CuB site was occupied not only in wild type Tyr but also in Tyr-MeB (Fig. 7).

We also assessed the ability of the CuB glycosylation-deficient $\Delta 6$ -Tyr mutant to mature to an Endo H-resistant form and to become enzymatically active. $\Delta 6$ -Tyr was processed to an Endo H-resistant protein, and its electrophoretic behavior in the absence of the reducing agent mercaptoethanol was also normal, except for the slightly higher electrophoretic mobility due to the absence of the N-glycan chain (Fig. 8). $\Delta 6$ -Tyr retained considerable enzymatic activity, and its kinetic constants were also very similar to those of wild type Tyr (Table II). Taken together, these data prove that the CuB glycosylation sequon is occupied in native wild type Tyr and in the Tyr-MeB construct. They also confirm the importance of CuB site glycosylation for full enzymatic activity reported by others (16). However, they demonstrate that N-glycan addition to this site is not required for further processing, including exit from the ER and binding of the metal cofactor. Therefore, the aberrant processing of the Tyr-MeB and other chimeric constructs cannot be explained in terms of lack of glycosylation of the ³⁷¹NGT³⁷³ sequon.

Acquisition of Endo H Resistance by Transiently Expressed Tyr Mutants Does Not Correlate Strictly with Residual Enzymatic Activity and Is Not Abolished by Mutation of Histidine Residues Involved in Copper Binding—Since the Tyr-MeB construct is lacking enzymatic activity, the possibility was considered that its deficient processing could be related to inability to bind the metal cofactor. Indeed, cofactor binding promotes a conformational change in most if not all cofactor-dependent enzymes. Therefore, we examined whether improper Tyr-MeB processing and the resulting ER retention could be mimicked by mutation of critical histidine residues involved in copper binding to the CuB site (18, 34). We also wished to determine whether improper processing correlated with the degree of activity loss for several CuB site Tyr point mutants. We used three kinetically well characterized constructs obtained by artificial mutagenesis of selected residues in the CuB site (34). As shown in Fig. 9, the Q378H, H389L, and H390Q mutants were all able to progress, at least partially, to an Endo H mature

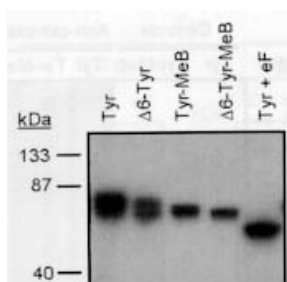


FIG. 7. The CuB site glycosylation sequon is occupied in wild type Tyr and in the Tyr-MeB chimeric protein. Wild type Tyr and Tyr-MeB, along with the corresponding N371Q point mutants where the glycosylation sequon located in the CuB site was abolished (designated $\Delta 6$ -Tyr and $\Delta 6$ -Tyr-MeB), were transiently expressed in HEK 293T cells. Equal protein loads of crude extracts (12 μ g/lane) were analyzed by Western blot and probed with α PEP7. Note the higher electrophoretic mobility of $\Delta 6$ -Tyr-MeB as compared with Tyr-MeB, indicative of *N*-glycan addition to the CuB site *N*-glycosylation sequon in this latter protein. For comparison, the last lane on the right shows the electrophoretic pattern of wild type Tyr, after complete deglycosylation by Endo F treatment (lane labeled Tyr + eF). The mobility of molecular weight markers is shown on the left.

form, although, in all cases, a sizable fraction of the expressed protein remained Endo H-sensitive. Despite a similar residual activity (around 20% of the tyrosine hydroxylase activity of wild type Tyr), the Q378H mutant yielded a majority band corresponding to the post-ER, Endo H-resistant form, whereas the H389L mutant was more sensitive to Endo H and thus very likely retained in the ER. Therefore, acquisition of Endo H resistance by transiently expressed Tyr mutants, indicative of exit from the ER to the Golgi, does not strictly correlate with residual enzymatic activity. Interestingly, the H390Q protein was also able to undergo substantial maturation to an Endo H-resistant form (Fig. 9). This mutant is absolutely devoid of enzymatic activity, most likely as a result of its inability to bind the metal cofactor due to the absence of one of the His imidazole ligands of the copper atom in the CuB site (34). Accordingly, it can be concluded that processing beyond the ER is not dependent on copper binding.

DISCUSSION

Interest in the mechanisms of tyrosinase processing and transport has been recently fostered by the realization that impairment of these processes disrupts melanin synthesis, leading to an amelanotic or albino phenotype. Evidence supporting this view has accumulated rapidly (19, 21–25). Moreover, tyrosinase is considered an excellent model to study the relationship between lectin-like ER chaperones and glycoprotein folding and the role of ER quality control systems in the processing of secretory proteins (reviewed in Ref. 38). However, knowledge of the structural requirements for tyrosinase folding and processing in the ER is still incomplete and mostly limited to the role of *N*-glycan chains (16, 39, 40) with very little information on the interactions within the protein backbone.

We addressed this question by analyzing the glycosylation pattern and enzymatic activity of Tyr mutants and chimeric proteins based on the Tyr and Tyrp1 sequences. These were transiently expressed in HEK 293T cells, a heterologous cell system that proved to be highly efficient in processing wild type Tyr to an enzymatically active form, with a kinetic behavior comparable with the enzyme in its natural melanocytic environment (34). This system was selected because other heterologous cell types employed in previous studies failed to yield an optimal processing of Tyr. For instance, Tyr is apparently poorly processed by COS7 cells, and high yields of enzymati-

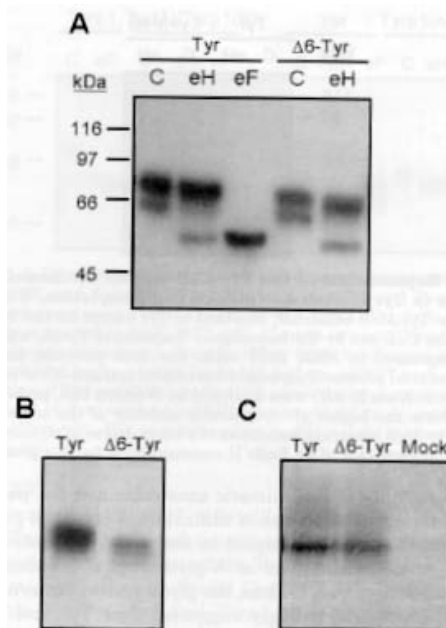


FIG. 8. A CuB glycosylation-deficient Tyr point mutant is processed to an Endo H-resistant, enzymatically active form. Wild type Tyr and the $\Delta 6$ -Tyr mutant, where the *N*-glycosylation sequon located in the CuB site was abolished by the N371Q substitution, were transiently expressed, and their electrophoretic mobility was probed by Western blot with α PEP7. In A, electrophoresis was performed under reducing conditions, for control cell extracts (lanes labeled C) and for equivalent protein amounts (10 μ g/lane) of extracts treated with Endo H (eH) or Endo F (eF). The electrophoretic mobility of molecular weight standards is shown on the left. In B, the electrophoretic mobility of the wild type Tyr and $\Delta 6$ -Tyr proteins under nonreducing conditions is compared by Western blot. Protein loads were the same as in A. C shows a specific in-gel DOPA oxidase activity stain after nonreducing electrophoretic separation of extracts from cells transfected with wild type enzyme (Tyr), the glycosylation-deficient mutant ($\Delta 6$ -Tyr), or empty vector (mock), as blank. In this case, the protein load was 20 μ g/lane.

cally active, fully mature protein could only be achieved after cotransfection with the ER-resident, lectin-like chaperone calnexin (41). HeLa cells may also be inefficient in the folding of tyrosinase, resulting in the appearance of temperature-sensitive, incompletely processed forms of the protein and in an exaggeration of the trafficking defects associated with certain mutations such as the temperature-sensitive R402Q (36).

Tyr expressed in HEK 293T cells appeared as a doublet in Western blots probed with α PEP7, a specific antibody directed against its C terminus (12). The finding of two Tyr bands is a common feature in most cell types, including heterologous systems (36) and melanocytic cells such as B16 mouse melanoma cells (39), human melanocytes (42), and human melanoma cells (19, 42). The precursor-product relationship of the two bands is suggested by a wealth of experimental data reported by others (42, 43). Accordingly, in our system, both bands correspond to differentially glycosylated isoforms as shown by treatment with Endo F, which yielded a single band of higher electrophoretic mobility than any one of the original forms. Moreover, the higher mobility band appeared Endo H-sensitive and non-reducing SDS-PAGE gels followed by DOPA oxidase activity stain show a single band instead of a doublet (Fig. 8). Taken together, these observations prove that the higher mobility form corresponds to a partially glycosylated, incompletely processed and enzymatically inactive protein that may give rise to the lower mobility band upon further glycosylation. However,

Conformation-dependent Glycosylation of Tyrosinase

15741

TABLE II
Residual tyrosine hydroxylase activity and kinetic constants of the $\Delta 6$ -Tyr mutant lacking the sixth potential *N*-glycosylation sequon located in the CuB site

Values are given as mean \pm S.D. for at least three independent experiments.

| Protein | Residual activity (%) | K_M | V_{max}^a |
|-----------------|-----------------------|-------------|-----------------|
| | | μM | |
| Wild type Tyr | 100 | 77 ± 14 | 1.11 ± 0.10 |
| $\Delta 6$ -Tyr | 58 ± 5 | 69 ± 5 | 0.91 ± 0.07 |

^a Expressed in arbitrary units and normalized to relative enzyme concentration estimated from the intensities of the specific band detected in Western blots, as described (34).

our data do not allow us to determine exactly the number of glycosylation signals occupied in each one of the isoforms. Based on studies by others, it can be speculated that the mature, lower mobility band could contain four *N*-glycan chains. Indeed, using several mutants where specific *N*-glycosylation sequons were abolished, it was shown that wild type Tyr expressed in Chinese hamster ovary cells bears four glycosylated and two unglycosylated sequons (16). Four occupied sequons were also found in hamster tyrosinase (44), and it has been shown for TYR that, when the rate of protein synthesis is high, a partially processed protein with an unoccupied *N*-glycosylation site is present (17). However, it is also possible that the different heterologous cellular systems employed for transient expression of tyrosinase might yield a slightly different processing, and therefore, a higher degree of *N*-glycosylation in our experimental system cannot be ruled out.

Concerning the different glycosylation pattern of the two Tyr species, the experiments performed with the $\Delta 6$ -Tyr mutant show that the higher electrophoretic mobility form should bear at least two additional unglycosylated sequons as compared with the mature form. This is demonstrated by the observation that the mobility of $\Delta 6$ -Tyr, lacking one glycosylation site, is intermediate between that of the two glycosylation isoforms observed for the wild type protein (Fig. 7). In any case, our data show that complete Tyr translation yielding a full-length polypeptide backbone recognizable by the C terminus directed α PEP7 antiserum can occur without a complete co-translational *N*-glycosylation of the protein. Therefore, it appears that Tyr contains two types of *N*-glycan acceptor sites, distinguishable on the basis of their kinetics of glycosylation: sites of rapid, co-translational glycosylation and sites of slow, conformation-dependent glycosylation. Interestingly, complete processing of Tyr is a relatively slow process as compared with other proteins and particularly as compared with the highly similar Tyrp1 (reviewed in Ref. 38). However, the initial glycosylation events must be very rapid, since a native, completely unglycosylated protein is never seen in control samples. This is fully consistent with the co-translational nature of the early glycosylation processes.

On the other hand, chimeric constructs Tyr(A)/Tyrp1(B) and Tyrp1(A)/Tyr(B) were blocked in an underglycosylated and misfolded state as shown by the presence of a single Endo H-sensitive band of lower molecular weight than either Tyr or Tyrp1. Again, the electrophoretic mobility of the chimeric proteins proved that they failed to undergo *N*-glycosylation in more than one site normally occupied in the parent protein. This inability to progress to a fully mature protein is in contrast with the presence within the chimeric and parent proteins of the same number of *N*-glycosylation signals, with an identical distribution with respect to the N terminus. Both Tyr and Tyrp1 display six glycosylation sequons. Five of them are located N-terminal to the perfectly conserved sixth site that lies within the CuB metal binding site. The first glycosylation site

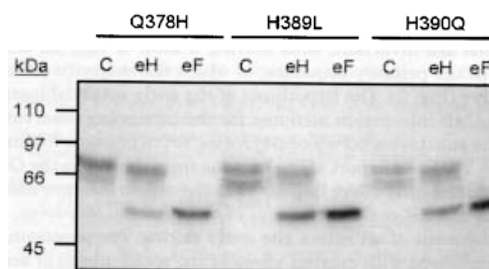


FIG. 9. CuB active site Tyr mutants are processed to an Endo H-resistant, mature form. HEK 293T cells were transfected with the three constructs shown. Equal amounts of cell extracts (10 μ g) were treated with Endo H (lanes labeled eH) or Endo F (eF) and analyzed by Western blot using α PEP7 for specific detection. C, control, untreated extracts. The mobility of molecular weight markers is shown on the left. All mutants displayed a significant fraction of Endo H-resistant protein.

is also invariant within mouse and human tyrosinase and Tyrps and is located in a region of high sequence similarity in the boundary between the two N-terminal Cys clusters of the epidermal growth factor-like domain (Fig. 1). Accordingly, the chimeric constructs Tyr(A)/Tyrp1(B) and Tyrp1(A)/Tyr1(B) both display six potential *N*-glycosylation sites (*i.e.* the same number of sites as the parental proteins). Moreover, as shown in Fig. 2, and due to the strict conservation of the *N*-glycosylation sequon in the CuB site, all of the potential glycosylation signals in Tyr(A)/Tyrp1(B) are identically located with respect to the N terminus as in Tyr, and the same holds for Tyrp1(A)/Tyr1(B) as compared with Tyrp1.

Since underglycosylation of the chimeras is not related to the withdrawal of target sequons or to a change in their distribution relative to the N terminus, the most likely interpretation is that it must arise from failure of conformation-dependent sites to undergo normal *N*-glycosylation. Should this be the case, underglycosylation of the chimeric constructs would result from their inability to reach a conformation supporting the recognition of more than one *N*-glycosylation signal. The chimeric constructs are formed by the N-terminal half of each parental protein, up to the first histidine residue of the CuB site, followed by the in-frame MeB site and C-terminal fragment of the other protein. Thus, the acquisition of the correct glycosylation-competent conformation most likely relies on specific intramolecular interactions between these two parts, that are negated in chimeric constructs.

We attempted to define further the structural elements involved in this interaction, by constructing and analyzing a more selective chimera designated Tyr-MeB. In this construct, exclusively the CuB site of Tyr, comprising amino acids His³⁶³-His³⁹⁰, was replaced by the homologous fragment of Tyrp1. When expressed in HEK 293T cells, the Tyr-MeB construct was enzymatically inactive, underglycosylated in more than one site, to the same extent as the more divergent chimeric constructs and was retained in the ER, as shown by sensitivity to Endo H and strong association with calnexin (Figs. 5 and 6). Therefore, replacement of only the CuB site or of the complete C-terminal part, starting from His³⁶³, yielded proteins with the same behavior. These observations strongly suggest that the structural element located in the C-terminal half of the protein and mainly responsible for the formation of the export-competent conformer is the CuB site. Should this be the case, the most likely scenario would be that the interaction established by this site and responsible for the correct folding would involve the CuA site and the formation of the active site cavity. This interaction must be highly specific, since, within the 28-amino

acid stretch replaced in Tyr-MeB as compared with Tyr, 16 positions are invariant, thus leaving a total of only 12 differences in the primary sequence, of which the majority are conservative (Fig. 2). The hypothesis of the early establishment of a CuA-CuB interaction accounts for the intriguing observation that the substrates DOPA and L-tyrosine act to promote folding of human TYR and export of the enzyme from the ER to the Golgi (42). Indeed, this effect implies that the substrates are able to bind to the ER-resident form(s) of the protein. Moreover, the establishment of an active site early during Tyr processing is also consistent with current views of the mechanisms of acquisition of the metal cofactor by metalloenzymes (45). Due to its toxicity, the concentration of free copper is kept exceedingly low in mammalian cells. Metal ions are bound to chaperones and transferred directly to the acceptor sites of metalloproteins in a process requiring that the affinity for the metal cofactor be higher in the acceptor enzyme than in the chaperone (45). Thus, formation of a high affinity metal binding acceptor site must occur before acquisition of the metal cofactor. Although a copper transporter has been localized to the ER membrane (46), and the possibility that copper loading to TYR could occur in this compartment has been mentioned (42), the first DOPA oxidase-positive compartment is the trans-Golgi network (19, 47). Within this compartment, copper is probably delivered by the Menkes and Wilson disease proteins, two P-type ATPases (48), whose mutations cause hypopigmentary disorders. The involvement of the Menkes protein in copper delivery to tyrosinase has been demonstrated (49).

Therefore, Tyr most likely acquires a conformation competent for high affinity copper binding before reaching the Golgi apparatus. Moreover, copper binding and maturation appear to be independent events, based on the results obtained for the H390Q Tyr mutant. This mutant, which is enzymatically inactive most likely as a result of impeded or abnormal binding of the copper cofactor (18, 34), is nevertheless partially processed to a mature, Endo H-resistant form. Interestingly, steady state levels of the correctly processed, Endo H-resistant form of H390Q were similar to those of other point mutants in the CuB site retaining considerable enzymatic activity (Fig. 9). This proves that, at least in these cases, there is no strict relationship between the degree of Tyr enzymatic activity impairment and the extent of ER retention.

The Tyr-MeB construct, together with the related point mutants where the CuB site glycosylation sequon was abolished, also enabled us to investigate the relationships between glycosylation of the CuB sequon, enzymatic activity as an index of copper loading, and export from the ER to the Golgi. The ³⁷¹NGT³⁷³ site was glycosylated in the wild type enzyme, as shown by the shift in electrophoretic mobility of the Δ6-Tyr mutant. Glycosylation of this site in Tyr expressed in Chinese hamster ovary cells has been previously shown by others (16), and this position is also very likely occupied *in vivo*, within a melanocytic environment (50) (reviewed in Ref. 40). Surprisingly, the N371Q mutation generated within the background of the Tyr-MeB construct also yielded a protein of increased electrophoretic mobility, thus suggesting that the ³⁷¹NGT³⁷³ site is occupied in this chimeric protein. Therefore, this site does not appear to be one of the conformation-dependent sites whose existence was shown by the electrophoretic behavior of the chimeric constructs. Concerning the maturation and enzymatic activity of the CuB site glycosylation-deficient mutant, Δ6-Tyr and the wild type enzyme were processed to an Endo H-resistant form in a very similar way. In addition, this mutant protein displayed considerable tyrosine hydroxylase and DOPA oxidase residual activities. Of particular relevance is the fact that the V_{max} values for both the mutant and wild type Tyr were

within the same range. This strongly suggests that the degree of copper binding to the active site is similar for both forms, since a diminished cofactor load for Δ6-Tyr would decrease significantly its V_{max} . Moreover, the comparable K_m value proves that the presence of the sugar chain in the CuB site of Tyr has no noticeable effect on the affinity for the monophenolic substrate L-tyrosine. Therefore, occupancy of the ³⁷¹NGT³⁷³ site by a glycan chain is not required for acquisition of an ER exit-competent conformation, maturation of the N-glycan chains to complex-type Endo H-resistant oligosaccharides, binding of the metal cofactor, and enzymatic activity. Interestingly, a natural mutation causing the change from Thr to Lys at position 373 in TYR, thus abolishing glycosylation of the CuB site, is associated with oculocutaneous albinism type 1 and aberrant processing of the mutant protein (26, 50). Therefore, the T373K mutation in TYR seems to have a much more dramatic effect than the N371Q change in Tyr, despite their common effect of abolishing one glycosylation site normally occupied in the wild type protein. This higher functional impairment should be related to a specific effect of the amino acid change, instead of to the mere loss of the N-glycosylation site.

In summary, our results and those of others support a model for *in vivo* folding of Tyr, where the molecule displays at least two N-glycosylation sites whose occupancy is conformation-independent and probably co-translational. One of these sites appears to be the conserved ³⁷¹NGT³⁷³ site located within the CuB region. Interestingly, it has been proposed that calnexin is either divalent or dimeric during its interaction with Tyr (38), and two glycan chains are also needed for stable binding of the chaperone to other proteins such as RNase (51). A chaperone-assisted specific interaction between the CuA and CuB domains will then generate an active site devoid of copper atoms but able to bind substrates. Moreover, the ensuing conformational change will allow for the post-translational N-glycan addition to new conformation-dependent glycosylation sequons. Although post-translational, as opposed to co-translational, N-glycosylation events appear very rare, at least one case involving peptidylglycine α-amidating monooxygenase has been rigorously documented (52). The folded tyrosinase protein will leave the ER in an apoenzymatic form and will bind the metal cofactor in the trans-Golgi network. Mutations that would prevent the specific interaction generating the active site will therefore cause aberrant processing and ER retention. Conversely, those compatible with the CuB site-promoted conformational change will allow for transit of at least a fraction of the newly synthesized Tyr molecules from the ER to the Golgi, irrespective of the degree of residual enzymatic activity.

REFERENCES

- Müller, G., Ruppert, S., Schmid, E., and Schutz, G. (1988) *EMBO J.* **7**, 2723-2730
- Kwon, B. S., Wakulchik, M., Haq, A. K., Halaban, R., and Kestler, D. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1301-1309
- Shibahara, S., Tomita, Y., Sakakura, T., Nager, C., Chaudhuri, B., and Müller, R. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 2413-2427
- Jackson, I. J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 4392-4396
- Tsukamoto, K., Jackson, I. J., Urabe, K., Montague, P. M., and Hearing, V. J. (1992) *EMBO J.* **11**, 519-526
- Jackson, I. J., Chambers, D. M., Tsukamoto, K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., and Hearing, V. (1992) *EMBO J.* **11**, 527-535
- Cooksey, C. J., Garratt, P. J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A., and Smit, N. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26226-26235
- Prota, G. (1992) *Melanins and Melanogenesis*, Academic Press, Inc., New York
- Aroca, P., García-Borrón, J. C., Solano, F., and Lozano, J. A. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1035**, 266-275
- Palumbo, A., Solano, F., Misuraca, G., Aroca, P., García-Borrón, J. C., Lozano, J. A., and Prota, G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1115**, 1-5
- Jiménez-Cervantes, C., García-Borrón, J. C., Valverde, P., Solano, F., and Lozano, J. A. (1993) *Eur. J. Biochem.* **217**, 549-556
- Jiménez, M., Tsukamoto, K., and Hearing, V. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1147-1156
- Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. A., and García-Borrón, J. C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17993-18000

Conformation-dependent Glycosylation of Tyrosinase

15743

14. Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jiménez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., García-Borrón, J. C., and Hearing, V. J. (1994) *EMBO J.* **13**, 5818–5825
15. García-Borrón, J. C., and Solano, F. (2002) *Pigment Cell Res.* **15**, 162–173
16. Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A. J., Garman, E. F., Platt, F. M., Wormald, M. R., Dwek, R. A., and Petrescu, S. M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 8169–8175
17. Ujvari, A., Aron, R., Eisenhaure, T., Cheng, E., Parag, H. A., Smicun, Y., Halaban, R., and Hebert, D. N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 5924–5931
18. Spritz, R. A., Ho, L., Furumura, M., and Hearing, V. J. (1997) *J. Invest. Dermatol.* **109**, 207–212
19. Halaban, R., Cheng, E., Zhang, Y., Moellmann, G., Hanlon, D., Michalak, M., Setaluri, V., and Hebert, D. N. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6210–6215
20. Oetting, W. S. (2000) *Pigment Cell Res.* **13**, 320–325
21. Halaban, R., Svedine, S., Cheng, E., Smicun, Y., Aron, R., and Hebert, D. N. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5889–5894
22. Toyofuku, K. O., Wada, I. O., Valencia, J. C., Kushimoto, T. O., Ferrans, V. J., and Hearing, V. J. (2001) *FASEB J.* **15**, 2149–2161
23. Toyofuku, K., Wada, I., Spritz, R. A., and Hearing, V. J. (2001) *Biochem. J.* **355**, 259–269
24. Beermann, F., Orlov, S. J., Boissy, R. E., Schmidt, A., Boissy, Y. L., and Lamoreux, M. L. (1995) *Exp. Eye Res.* **61**, 599–607
25. Chen, K., Manga, P., and Orlov, S. J. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 1953–1964
26. Lee, S. T., Nicholls, R. D., Bunday, S., Laxova, R., Musarella, M., and Spritz, R. A. (1994) *N. Engl. J. Med.* **330**, 529–534
27. Spritz, R. A., Strunk, K. M., Giebel, L. B., and King, R. A. (1990) *N. Eng. J. Med.* **322**, 1724–1728
28. Martínez-Esparza, M., Jiménez-Cervantes, C., Beermann, F., Aparicio, P., Lozano, J. A., and García-Borrón, J. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 3967–3972
29. Jiménez-Cervantes, C., Germer, S., González, P., Sánchez, J., Olivares, C., and García-Borrón, J. C. (2001) *FEBS Lett.* **508**, 44–48
30. Jara, J. R., Solano, F., and Lozano, J. A. (1988) *Pigment Cell Res.* **1**, 332–339
31. Winder, A. J., and Harris, H. (1991) *Eur. J. Biochem.* **198**, 317–326
32. Jiménez-Cervantes, C., Valverde, P., García-Borrón, J. C., Solano, F., and Lozano, J. A. (1993) *Pigment Cell Res.* **6**, 394–399
33. Olivares, C., Jiménez-Cervantes, C., Lozano, J. A., Solano, F., and García-Borrón, J. C. (2001) *Biochem. J.* **354**, 131–139
34. Olivares, C., García-Borrón, J. C., and Solano, F. (2002) *Biochemistry* **41**, 679–686
35. Wang, Y., and Androlewicz, M. J. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 22–27
36. Berson, J. F., Frank, D. W., Calvo, P. A., Bieler, B. M., and Marks, M. S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 12281–12289
37. Parodi, A. J. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 69–93
38. Petrescu, S. M., Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A. J., and Dwek, R. A. (2000) *Biochemistry* **39**, 5229–5237
39. Petrescu, S. M., Petrescu, A. J., Titu, H. N., Dwek, R. A., and Platt, F. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15796–15803
40. Xu, Y., Bartido, S., Setaluri, V., Qin, J., Yang, G., and Houghton, A. N. (2001) *Exp. Cell Res.* **267**, 115–125
41. Toyofuku, K., Wada, I., Hirotsaki, K., Park, J. S., Hori, Y., and Jimbow, K. (1999) *J. Biochem. (Tokyo)* **125**, 82–89
42. Halaban, R., Cheng, E., Svedine, S., Aron, R., and Hebert, D. N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 11933–11938
43. Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D. C., and Hearing, V. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 31801–31805
44. Ohkura, T., Yamashita, K., Mishima, Y., and Kobata, A. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* **235**, 63–77
45. Harrison, M. D., Jones, C. E., Solioz, M., and Dameron, C. T. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 29–32
46. Bingham, M. J., Burchell, A., and McArdle, H. J. (1995) *J. Physiol.* **482**, 583–587
47. Negroiu, G., Branza-Nichita, N., Costin, G. E., Titu, H., Petrescu, A. J., Dwek, R. A., and Petrescu, S. M. (1999) *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **45**, 1001–1010
48. Lutsenko, S., and Kaplan, J. H. (1995) *Biochemistry* **34**, 15608–15613
49. Petris, M. J., Strausak, D., and Mercer, J. F. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2845–2851
50. Park, K. C., Chintamaneni, C. D., Halaban, R., Witkop, C. J., and Kwon, B. S. (1993) *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 406–413
51. Rodan, A. R., Simons, J. F., Trombetta, E. S., and Helenius, A. (1996) *EMBO J.* **15**, 6921–6930
52. Kolhekar, A. P., Quon, A. S. W., Berard, C. A., Mains, R. E., and Eipper, B. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 23012–23018