

La estimulación de PGC-1 α a través de MC1R en el melanoma aumenta la biogénesis mitocondrial y la respuesta antioxidante

The PGC-1 α stimulation through MC1R in melanoma increases mitochondrial biogenesis and antioxidant response

Mercedes Nadal^{1,2}, Jorge Sastre^{1,2}, Margalida Torrens^{1,2}, Marta Abrisqueta³, María Castejón³, Jordi Oliver^{1,2}, Pilar Roca^{1,2}

1. Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS-IdISPa), Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Illes Balears, España
2. CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBERObn, CB06/O3) Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España
3. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Universidad de Murcia e IMIB-Arixaca. Campus de Ciencias de la Salud, El Palmar, Murcia.

Correspondencia

Pilar Roca
Dept. Biología Fundamental y Ciencias de la Salud
Universitat de les Illes Balears. Ctra. Valldemossa km 7,5
07122 - Palma de Mallorca
Tel.: 971 17 31 72 – E-mail: pilar.roca@uib.es

Recibido: 9 – II – 2015

Aceptado: 8 – IV – 2015

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.30.02.37

Resumen

Introducción: El receptor de melanocortina 1 (MC1R) es un gen clave para el desarrollo del melanoma, ya que está implicado en la pigmentación de la piel y la protección contra la radiación ultravioleta. Además, estudios recientes sugieren que también podría tener un papel importante en la regulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Objetivo: Nuestro objetivo fue analizar si la estimulación de MC1R afecta a los principales genes implicados en la biogénesis mitocondrial y la respuesta antioxidante.

Material y Métodos: Se estudiaron las líneas celulares de melanoma HBL, con el MC1R salvaje, y A375, con el receptor mutado, y fueron tratadas con un análogo de la hormona estimuladora de melanocitos, la NDP-MSH.

Resultados: Los resultados obtenidos muestran que, en condiciones basales, los niveles de expresión de genes que controlan la biogénesis mitocondrial y la respuesta antioxidante son significativamente mayores en la línea HBL, que presenta el receptor funcional. Además, en estas células la estimulación del MC1R producía un aumento de la expresión de estos genes y una menor producción de ROS, a diferencia de lo observado en la línea A375.

Conclusiones: Por tanto, la funcionalidad del MC1R puede considerarse un factor de riesgo para el desarrollo del melanoma, ya que disminuye los ROS activando la melanogénesis y regulando la biogénesis y función mitocondrial, siendo PGC-1 α una proteína central en ambos procesos.

Palabras clave: Melanoma, MCR1, biogénesis mitocondrial, PGC-1 α , respuesta antioxidante

Abstract

Introduction: Melanocortin 1 receptor (MC1R) is a key gene for melanoma development, since it is involved in skin pigmentation and protection against ultraviolet light. Recent studies suggest that it may also play an important role in the regulation of reactive oxygen species (ROS).

Purpose: Our aim was to study whether the stimulation of MC1R has any effects on the main genes regulating mitochondrial biogenesis and antioxidant response.

Materials and Methods: For this purpose, the melanoma cell lines HBL, which has the wild-type receptor, and A375, with a mutated receptor, were analysed and treated with an agonist of the melanocyte-stimulating hormone, NDP-MSH.

Results: The results show that, under basal conditions, the expression of genes involved in mitochondrial biogenesis and antioxidant response was significantly higher in the HBL cell line, with the functional receptor.

Conclusions: Furthermore, stimulation of MC1R in this cell line, unlike in the A375 line, resulted in an increased expression of these genes and a lower ROS production. In conclusion, functionality of MC1R can be a risk factor for developing melanoma, as it reduces ROS by activating melanogenesis and regulating mitochondrial biogenesis and function, with PGC-1 α as a central protein in both processes.

Keywords: Melanoma, MC1R, mitochondrial biogenesis, PGC-1 α , antioxidant response

Introducción

El melanoma es el tipo de cáncer de piel más peligroso y la causa principal de muerte por enfermedades de la piel. Su incidencia ha aumentado en más del 300% en los últimos 40 años, siendo responsable del 80% de las muertes por cáncer cutáneo. Este crecimiento exponencial de casos podría estar relacionado con la mayor exposición a la radiación solar, principal factor etiopatogénico en el desarrollo del melanoma maligno¹. Es este uno de los motivos por los que la mayor incidencia de melanoma en España se sitúa en las Islas Baleares y las Canarias, zonas asociadas al sol.

El receptor de la melanocortina¹ (MC1R) es uno de los genes mejor caracterizados, ya que se considera un gen de predisposición al melanoma². MC1R responde al estímulo de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la hormona estimulante del melanocito (α -MSH), estimulando la producción de eumelanina. Si el receptor MC1R está inactivo o bloqueado por alguna mutación, se produce feomelanina³. Así, la acción de MC1R como determinante genético del tipo de pigmentación cutánea y, por tanto, de la capacidad de la piel de filtrar la UVR está fuertemente establecida. No obstante, MCR1 parece desempañar otros papeles más complejos y menos conocidos en la carcinogénesis cutánea, relacionados con la participación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). En este sentido, recientemente se ha demostrado que MC1R activa vías de reparación de ADN y estimula mecanismos antioxidantes^{4, 5}. Estos efectos regulados por el MC1R pueden denominarse "no pigmentarios", ya que no dependen directamente de la presencia o ausencia de un determinado tipo de melanina, y podrían estar relacionados con la respuesta al estrés oxidativo y la función mitocondrial, procesos asociados a la etiología y desarrollo del cáncer.

Otto Warburg describió que las células cancerosas experimentan una alteración metabólica hacia un fenotipo glucolítico con el fin de proveer a la célula tumoral de la energía requerida para la proliferación celular, y que era como consecuencia de un daño irreversible de la función mitocondrial⁶. Sin embargo, nuevos indicios apuntan a que la mayoría de las mitocondrias tumorales no son defectuosas en su capacidad para llevar a cabo la fosforilación oxidativa⁷. Parece ser que, durante la proliferación celular, el metabolismo mitocondrial se reprograma para afrontar los requerimientos de síntesis macromolecular, y la célula cancerosa va adquiriendo características de mayor malignidad. Recientes estudios han relacionado el PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), principal regulador de la biogénesis mitocondrial, con el desarrollo del melanoma y la supervivencia en enfermos con esta neoplasia^{8, 9}. Parece ser que pacientes con melanomas negativos para el PGC-1 α presentan una mayor supervivencia que los pacientes positivos para dicho coactivador.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de la estimulación del MC1R sobre los principales genes relacionados con la biogénesis mitocondrial y la respuesta antioxidante. Los resultados indican que la estimulación de estos genes es dependiente de la presencia y activación de MC1R.

Material y métodos

Reactivos

El medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) rico en glucosa se obtuvo de GIBCO (Paisley, UK) y la hormona [Nle4, DPhe7]- α -MSH (NDP-MSH) de Tocris (Bristol, UK). Los reactivos de rutina se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), Roche (Barcelona, España), Panreac (Barcelona, España) i Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU).

Cultivos celulares y tratamientos

Las líneas celulares de melanoma HBL (silvestre para el receptor MC1R) y A375 (mutado para el receptor MC1R) fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS). Las células fueron tratadas con 10⁻⁷ M de NDP-MSH, un potente análogo de la hormona estimulante de melanocitos, durante 4 horas. Tres horas antes del tratamiento se cambió el medio de cultivo por uno libre de suero.

PCR cuantitativa

Se aisló el ARN celular de las células control y tratadas con α -MSH mediante el reactivo TriPure® (Roche, Barcelona, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se retrotranscribió a cDNA 1 μ g de ARN total a 42 °C durante 60 min con la siguiente mix: 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 0,1% Tritón X-100, 2,5 mM MgCl₂, 2,5 μ M de *random hexamers*, 10 U inhibidor de RNasa, 500 μ M de cada dNTP y 25 U de retrotranscriptasa inversa MuLV. Cada cDNA obtenido se diluyó 1/10.

Se analizaron los niveles de expresión de PGC1 α , SIRT1 (*Sirtuin 1*), SIRT3 (*Sirtuin 3*), UCP2 (*Uncoupling protein 2*), GPx (*Glutathione peroxidase*), CAT (*Catalase*), NRF1 (*Nuclear respiratory factor 1*), NRF2 (*Nuclear respiratory factor 2*), mtSSB (*Mitochondrial single stranded DNA-binding protein*), TFAM (*mitochondrial transcription factor A*) y COXIV (*Cytochrome c Oxidase Subunit IV*) con los cebadores especificados en la **Tabla I**, mediante una PCR a tiempo real basada en la tecnología SYBR Green en un termociclador LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). Se añadieron 2,5 μ L de cDNA y 7,5 μ L de Lightcycler® 480 SYBR Green 1 Master (conteniendo 0,5 μ M de los cebadores) y se procedió a la amplificación del cDNA de la siguiente manera: ciclo de desnaturalización del cDNA a 95 °C durante 5 min, 45 ciclos de desnaturalización de 10 s a 95 °C, un ciclo de hibridación de 10 s y a la temperatura específica de cada cebador, y un ciclo de elongación de 12 s a 72 °C. Los

Tabla 1: Secuencia y condiciones de los cebadores de la PCR a tiempo real

Gen	Forward primer (5'- 3') Reverse Primer (3'- 5')	Temperatura de hibridación
18S	ggACACggACAaggATTgACA ACCCACggAATCgAgAAAgA	61
PGC1 α	TCAgTCCTCACTggTggACA TgCTTCgTCgTCAAAAACAg	60
NRF1	CCCgTTACAgggAggTgAg TgTAgCTCCCTgCTgCATCT	60
NRF2	gCgACggaaaGaGTATgAgC gTTggCAgATCCACTggTTT	60
mtSSB	TgTgAAAAAggggTCTCgAA TggCCAAAgAATCATCC	60
TFAM	AgATTggggTCgggTCACT CAAgACAgATgAAAACCACCTC	61
COXIV	AACgAgTggAAgACggTTgT TCATgTCCAgCATCCTCTTg	60
UCP2	ggTggTCggAgATACCAAAG CTCgggCAATgTCTTgTAg	60
GPx	gCggCggCCCAgTCggTgTA gAgCTTggggTCggTCATAA	61
CAT	CATCgCCACATgAATggATA CCAActgggATgAgAgggTA	61

valores Ct y las eficiencias de la reacción se analizaron y se refirieron al total de ADN mediante el programa GenEx Standard (Multi-DAnalyses, Suecia).

Producción de ROS

Para medir la producción intracelular de radicales libres se usó el Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EEUU). Se utilizó un tampón Krebs-Ringer con 50 μ M del reactivo de Amplex red y 0,1 U/mL de peroxidasa de rábano. La fluorescencia fue medida a las longitudes de onda de excitación y emisión de 571 y 585 nm, respectivamente. Se utilizó un fluorímetro para microplacas FLx800 (Bio-Tek Winooski, Vermont, EEUU). Los valores se normalizaron por número de células viables determinados por el ensayo de cristal violeta.

Cristal violeta

La viabilidad celular se analizó con el ensayo de cristal violeta. Las células fueron teñidas durante 10 min con 0,5% (p/v) de cristal violeta en un 30% (v/v) de ácido acético. Después de dos lavados en agua destilada, se añadieron 100 μ L de metanol y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro PowerWave XS (Biotek Instruments, Inc.).

Análisis estadístico

El programa estadístico SPSS (versión 21.0; SPPS Inc, Chicago, IL) se utilizó para todos los análisis estadísticos. Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de seis experimentos independientes. Los datos se referencian al valor del grupo control HBL, atribuyendo en las determinaciones de expresión el valor 1 y en las de producción de ROS el valor 100. Las diferencias estadísticas se analizaron con el análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores ($P < 0,05$). En caso de efecto interactivo, se realizó el test de la t de Student ($P < 0,05$).

Resultados

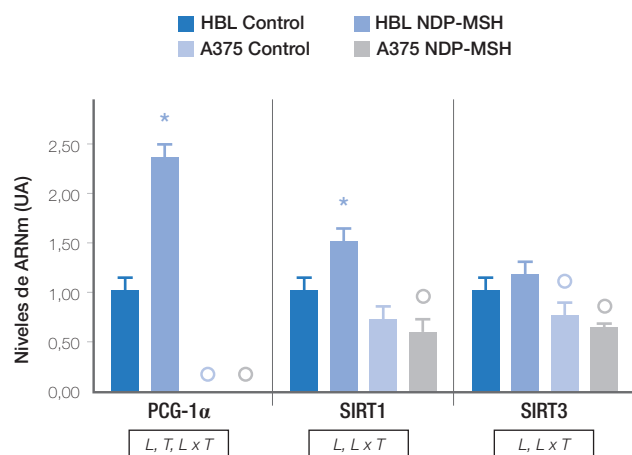
En primer lugar, se determinaron los niveles de la expresión génica de PGC-1 α en las líneas celulares de melanoma HBL y A375, caracterizadas por la presencia de MC1R salvaje y mutado, respectivamente. La **Figura 1** muestra que las células salvajes para MC1R (HBL) presentaban unos mayores niveles de PGC-1 α que las células mutadas para dicho receptor (A375). Además, la activación del receptor mediante el tratamiento con la hormona NDP-MSH, fuerte agonista de MCR1, durante 4 horas aumentó significativamente la expresión de PGC-1 α en las células HBL respecto a las no tratadas. En cambio, las células mutadas A375 no experimentaron ningún cambio tras el tratamiento.

Tras observar las diferencias de expresión de PGC-1 α en ambas líneas celulares, se determinaron los niveles de ARNm de las sirtuinas SIRT1 y SIRT3. Los resultados muestran que el tratamiento con NDP-MSH incrementó en más de un 50% la expresión de SIRT1 en las células HBL, mientras que en las células A375 tratadas con la hormona se observó un comportamiento distinto, mostrando una tendencia a disminuir los niveles de SIRT1 (**Figura 1**). En el caso de SIRT3 el perfil fue similar, observando menores niveles de expresión en la línea celular mutada para el receptor MC1R respecto a la línea salvaje, tanto si las células eran sometidas o no al tratamiento con la hormona NDP-MSH (**Figura 1**).

En la **Figura 2** aparecen representados los niveles génicos de los sistemas antioxidantes UCP2, GPx y catalasa. En primer lugar destacan los menores niveles de UCP2 en las células A375 respecto a las células HBL (<10% frente al 100%, respectivamente), tanto en la situación control como tras el tratamiento con la hormona NDP-MSH. Respecto a los niveles de GPx,

Figure 1: Expresión de PGC-1 α , SIRT1 y SIRT3 en las células de melanoma HBL y A375. Efecto de la hormona NDP-MSH sobre los niveles de expresión

ANOVA: L efecto línea; T efecto tratamiento (con NDP-MSH); y, L x T efecto interactivo. Test t-Student: * Control vs. células tratadas (con NDP-MSH); ° células HBL vs. A375.

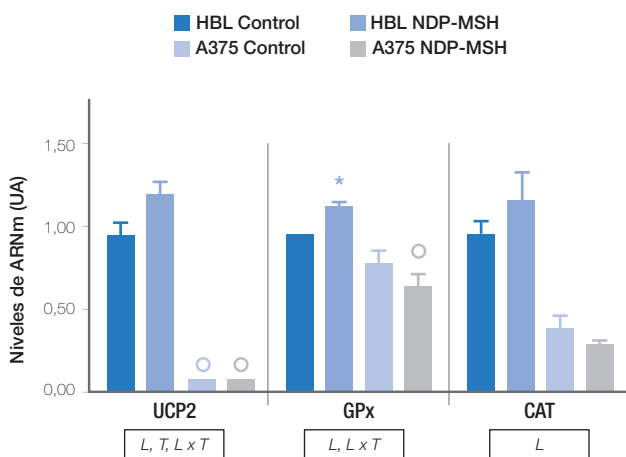


se observó un aumento significativo sólo en las células HBL expuestas a la hormona. Este hecho, al comparar el efecto de la NDP-MSH sobre la expresión de la GPx entre las dos líneas celulares de estudio, se traduce en unos niveles significativamente menores en las células A375. Por último, el análisis de la catalasa muestra que las células HBL presentaban mayores niveles de este enzima antioxidante que las células A375.

Una de las últimas determinaciones del estudio fue analizar los genes relacionados con la biogénesis y función mitocondrial. A modo general, los resultados muestran que las células A375 (caracterizadas por tener MC1R mutado y una expresión baja de PGC-1 α) presentaban niveles de expresión génica de NRF1, TFAM y COX IV significativamente menores respecto a

Figure 2: Niveles de ARNm de UCP2, GPx y catalasa en las células HBL y A375. Efecto de la estimulación de MC1R sobre los sistemas antioxidantes

ANOVA: L efecto línea; T efecto tratamiento (con NDP-MSH); y, L x T efecto interactivo. Test t-Student: * Control vs. células tratadas (con NDP-MSH); ° células HBL vs. A375.



las células HBL (caracterizadas por tener MC1R salvaje y una expresión elevada de PGC-1 α). Por tanto, las células HBL mostraban mayores niveles de estos genes, aumentando aún más su expresión tras ser tratadas con la NDP-MSH. En cambio, en las células A375 los niveles génicos de estos genes se mantuvieron invariables tras el tratamiento con la hormona (Figura 3).

La producción de ROS fue mucho mayor en las células A375 (cerca de un 70%), con y sin estimular el receptor MC1R con la NDP-MSH. En cambio, las células HBL, además de presentar menores niveles de ROS en situación control, experimentaron una caída significativa tras el tratamiento con NDP-MSH (Figura 4).

Discusión

El presente estudio demuestra la importancia de la presencia y activación del receptor de la melanocortina 1 o MC1R en la biogénesis y función mitocondrial, así

Figure 3: Niveles de expresión de los genes relacionados con la biogénesis y función mitocondrial: NRF1, NRF2, mtSSB, TFAM, COX IV. Efecto de la hormona NDP-MSH sobre los niveles de expresión

ANOVA: L efecto línea; T efecto tratamiento (con NDP-MSH); y, L x T efecto interactivo. Test t-Student: * Control vs. células tratadas (con NDP-MSH); ° células HBL vs. A375.

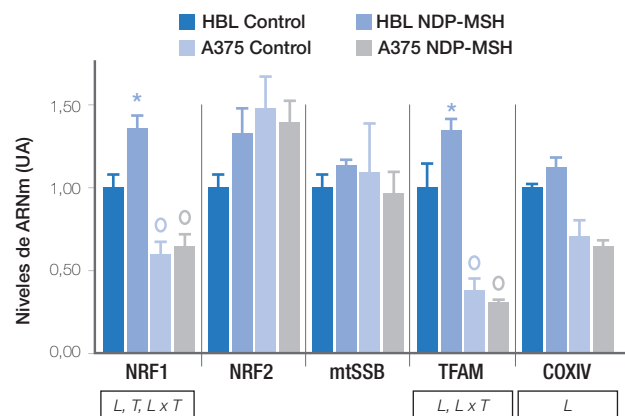
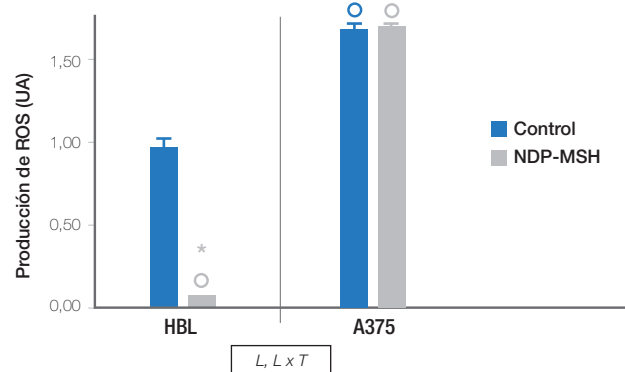


Figure 4: Análisis de la producción de ROS en las células de melanoma HBL y A375. Efecto del tratamiento NDP-MSH sobre la generación de ROS

ANOVA: L efecto línea; T efecto tratamiento (con NDP-MSH); y, L x T efecto interactivo. Test t-Student: * Control vs. células tratadas (con NDP-MSH); ° células HBL vs. A375.



como en la respuesta antioxidante en las células de melanoma HBL y A375. Las células HBL, caracterizadas por tener MC1R salvaje, presentaron mayores niveles de PGC-1 α , NRF1, TFAM, COX IV, UCP2, catalasa, SIRT1 y SIRT3 en comparación con las células A375, mutantes para el receptor. Además, y a diferencia de lo observado en las células A375, la expresión de estos genes aumentó significativamente en las células HBL tras ser tratadas con un potente análogo de la α -MSH, la NDP-MSH, hormona que se une a MC1R activándolo. Las diferencias encontradas en los niveles de expresión de los genes citados entre las dos líneas de melanoma también se hallaron en la regulación de los ROS. Las células A375 se caracterizaron por unos niveles basales de ROS muy superiores a los de las células HBL, las cuales experimentaron una disminución significativa en la producción de ROS tras el tratamiento con NDP-MSH. MC1R juega un papel crucial en la regulación de la pigmentación¹⁰. Es un gen extremadamente polimórfico¹¹,

y la pérdida de su función debido a estas variaciones es uno de los principales factores de riesgo para la sensibilidad a la radiación ultravioleta y el desarrollo de melanoma. Está altamente establecido que la estimulación de MC1R en los melanocitos es un mecanismo de defensa contra el daño en el ADN inducido por la UV mediante la pigmentación³⁻¹². Sin embargo, recientes estudios también sugieren que MC1R podría activar procesos antiapoptóticos y disminuir el daño en el ADN mediante mecanismos no dependientes de la melanogénesis^{4,5}.

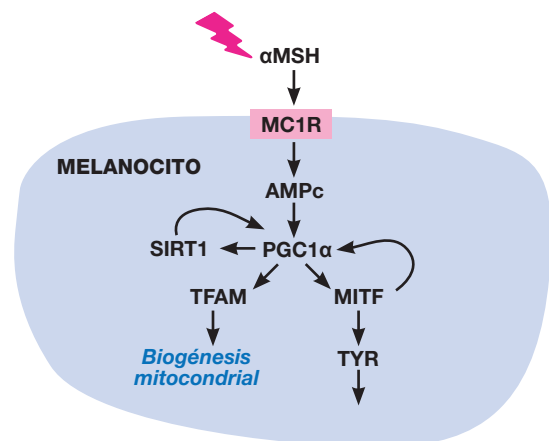
El factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF) es uno de los factores de transcripción más importantes en la regulación de la melanogénesis¹³. Se ha visto que en diversos tipos de melanoma, MITF está sobre-estimulado, regulando directamente a PGC-1 α ¹⁴. Estudios previos en nuestro grupo de investigación, junto a otros de la literatura, demuestran que PGC-1 α , además de regular la melanogénesis, es un factor clave en la biogénesis y función mitocondrial, y en la respuesta antioxidante¹⁵⁻¹⁷. Los resultados del presente estudio muestran como la expresión de los niveles de PGC-1 α ha definido los dos tipos de líneas celulares de estudio, siendo espectacularmente mayores en las células salvajes para MC1R, es decir, en las células HBL. Además, se observó una mayor expresión de algunos de los genes situados corriente abajo en relación a PGC-1 α en las células HBL en comparación con las A375, concretamente de los genes NRF1, TFAM y COX IV. Pero no sólo las células HBL presentaron mayores niveles de los genes relacionados con la biogénesis y función mitocondrial en situación basal, sino que la estimulación del receptor MC1R con la hormona NDP-MSH aumentó significativamente la expresión de estos genes, así como de SIRT1. SIRT1 es una proteína clave en el control e inducción de la biogénesis mitocondrial y en la respuesta metabólica al estrés, estando relacionada con los mecanismos de respuesta que permiten una mayor supervivencia^{18, 19}. Por tanto, estos resultados sugieren que las células con MC1R funcional, las HBL, podrían exhibir un metabolismo mitocondrial mejorado.

El papel de la mitocondria en la producción y regulación de los ROS es crucial para la viabilidad celular²⁰. En este contexto, nuestro estudio indicaría que las células HBL, con niveles de PGC-1 α elevados, podrían ser más resistentes al daño mediado por los ROS, ya que mostraron una mayores niveles de los sistemas antioxidantes UCP2 y catalasa que las células A375. Además, se observó el mismo perfil en la expresión de SIRT3, supresor tumoral que ayuda a preservar la integridad mitocondrial, inhibiendo la producción de ROS y desestabilizando el factor inducible por hipoxia (HIF-1)^{21, 22}. Una vez más, observamos que el tratamiento con la NDP-MSH acentuaba las diferencias entre las células HBL y A375, siendo los valores de expresión mayores en las HBL e inferiores en las A375. Por tanto, la presencia y activación de MC1R y los elevados niveles de PGC-1 α podrían afectar a la capacidad de las células para sobrevivir bajo condiciones de estrés oxidativo.

En este sentido, observamos que, no sólo la producción de ROS en las células HBL era significativamente inferior en comparación con la de las A375, sino como la generación caía tras tratarlas con NDP-MSH. En cambio, en las células A375 la producción se mantuvo.

En definitiva, los resultados presentados sugieren que la presencia y estimulación de MC1R es un factor de riesgo para el desarrollo de melanoma, pero no sólo determinando el fototipo de piel y la sensibilidad a la radiación ultravioleta a través de la activación de la melanogénesis, sino también regulando la biogénesis y función mitocondrial, así como la respuesta antioxidante (**Figura 5**). Esta doble función representaría un mecanismo de defensa contra el daño en el ADN inducido por la UV. Por tanto, una vez desarrollada la enfermedad neoplásica, la mayor expresión de PGC-1 α regulado por la vía de señalización de MC1R implicaría una ventaja para la célula tumoral contra el daño oxidativo. Los datos obtenidos apuntan a PGC-1 α como posible diana para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Figure 5: La estimulación de MC1R determina el fototipo de piel y la sensibilidad a la radiación ultravioleta a través de la activación de la melanogénesis, pero también induce la biogénesis y función mitocondrial, así como la respuesta antioxidante. La mayor expresión de PGC-1 α regulado por la vía de señalización de MC1R determinaría que las células de melanoma presentarían un mayor metabolismo mitocondrial y capacidad antioxidante.



Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado mediante ayudas otorgadas por la AECC-BALEARES 2014, la *Comunitat Autònoma de les Illes Balears* cofinanciado con recursos FEDER ("Una manera de hacer Europa") (AAEE22/2014) y el Fondo de Investigaciones Sanitarias of Instituto de Salud Carlos III (PI12/01827 y PI14/01434) del Gobierno de España cofinanciado por los FEDER-Unión Europea ("Una manera de hacer Europa").

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *The British journal of dermatology*. 2014; 170(1):11-9.
2. Garcia-Borron JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. 2005; 18(6):393-410.
3. Rouzaud F, Kadekaro AL, Abdel-Malek ZA, Hearing VJ. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutation research*. 2005; 571(1-2):133-52.
4. Kadekaro AL, Chen J, Yang J, Chen S, Jameson J, Swope VB, et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses oxidative stress through a p53-mediated signaling pathway in human melanocytes. *Molecular cancer research : MCR*. 2012; 10(6):778-86.
5. Kadekaro AL, Kavanagh R, Kanto H, Terzieva S, Hauser J, Kobayashi N, et al. alpha-Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. *Cancer research*. 2005; 65(10):4292-9.
6. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956; 123(3191):309-14.
7. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer cell*. 2012; 21(3):297-308.
8. Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC-1alpha and MITF. *Cancer cell*. 2013; 23(3):302-15.
9. Vazquez F, Lim JH, Chim H, Bhalla K, Gimun G, Pierce K, et al. PGC-1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer cell*. 2013; 23(3):287-301.
10. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 2007; 445(7130):843-50.
11. Perez Oliva AB, Fernandez LP, Detorre C, Herraiz C, Martinez-Escribano JA, Benitez J, et al. Identification and functional analysis of novel variants of the human melanocortin 1 receptor found in melanoma patients. *Human mutation*. 2009; 30(5):811-22.
12. Song X, Mosby N, Yang J, Xu A, Abdel-Malek Z, Kadekaro AL. alpha-MSH activates immediate defense responses to UV-induced oxidative stress in human melanocytes. *Pigment cell & melanoma research*. 2009; 22(6):809-18.
13. Yasumoto K, Mahalingam H, Suzuki H, Yoshizawa M, Yokoyama K. Transcriptional activation of the melanocyte-specific genes by the human homolog of the mouse Microphthalmia protein. *Journal of biochemistry*. 1995; 118(5):874-81.
14. Ronai Z. The masters talk: the PGC-1alpha-MITF axis as a melanoma energizer. *Pigment cell & melanoma research*. 2013.
15. Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Valle A, Oliver J, Roca P. The effects of 17beta-estradiol on mitochondrial biogenesis and function in breast cancer cell lines are dependent on the ERalpha/ERbeta ratio. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2012; 29(1-2):261-8.
16. Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2012; 23(9):459-66.
17. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006; 127(2):397-408.
18. McGuinness D, McGuinness DH, McCaul JA, Shiels PG. Sirtuins, bioageing, and cancer. *Journal of aging research*. 2011; 2011:235754.
19. Salminen A, Kaamiranta K, Kauppinen A. Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process. *International journal of molecular sciences*. 2013; 14(2):3834-59.
20. Theodosakis N, Micevic G, Kelly DP, Bosenberg M. Mitochondrial function in melanoma. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014; 563:56-9.
21. Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJ, Guarente L. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene*. 2011; 30(26):2986-96.
22. Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, et al. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer cell*. 2010; 17(1):41-52.