

## Slutrapport för projekt nr H0947284 Karaktärisering av mekanismer som orsakar melanom hos avblekbar skimmel

### Bakgrund

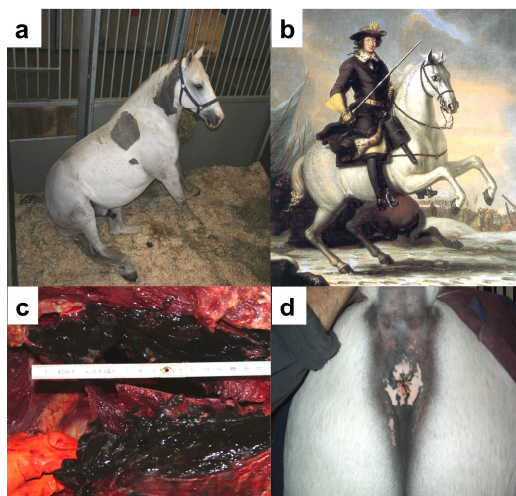
Mutationen som orsakar avblekbar skimmel, som ger en vackert vit häst, kan hittas hos en rad olika hästraser, såsom Arab-, Lipizzaner- och Islandshästen. Denna mutation är den absolut vanligaste orsaken till vit teckning hos hästar och har säkerligen bibehållits genom avel för den prestige som den ger dess ägare (Sponenberg 2003). Skimmel-anlaget är ett dominant anlag gentemot andra standardfärger. En skimmel föds med normal färgteckning, men börjar bli gråhåriga redan under det första levnadsåret. De kan vara helt vita vid 6-8 års ålder, även om stora varitioner förekommer. Noterbart är att hudpigmenteringen förblir oförändrad (Fig 1a).

Dessa avblekbara skimlar drabbas till förbluffande hög andel av melanom med ökande ålder. Det har uppskattats att 80% av vita skimlar som har uppnått en ålder av 15 år har melanom, vilket är en väldigt ovanlig åkomma hos andra hästar (Sutton och Coleman 1997). De drabbade hästarna kan uppvisa ett flertal kraftigt pigmenterade tumörer. Dessa tumörer förekommer vid svansrotens undersida, perineum och läpparna, men också i skelettmuskulerna, artärväggarna eller buk fettet (Seltenhammer et al. 2004). Även om de flesta melanom initialt är av benign karaktär, så kan över 60% av dessa tumörer övergå till malign form. Histologiska och immunohistokemiska studier har visat att hudtumörerna förekommer vid dermis och uppvisar likheter med både humant malignt blå nevu och humant malignt desmoplastisk melanom (Seltenhammer et al. 2004). Ett flertal av de vita skimlarna utvecklar också en vitiligo-liknande avpigmentering av hud, vilket tros vara ett autoimmunt svar på närvaron av melanom (Fig 1d).

### Medicinska och ekonomiska aspekter av melanom hos avblekbar skimmel

Melanom hos skimmel är vanligtvis av benign karaktär, men dess utveckling måste undersökas regelbundet då de kan bli stora och orsaka svårare sekundära hälsoproblem för hästen. Tumörerna kan övergå till malign fas och ge upphov till döttumörer i de interna organen (Fig 1c). Detta leder snabbt till sjukdomsframkallad död eller till avlivning genom veterinärs omsorg. Förutom de negativa hälsoeffekterna hos hästen, så påverkas också ägaren negativt både emotionellt och ekonomiskt (veterinärkostnader och värdeminskning).

Olika behandlingsmetoder har testats, med varierande framgång (Sutton och Coleman, 1997; Champion, 2003). Kirurgist avlägsnande av små tumörer kan vara framgångsrikt, men



**Fig 1.** Skimmel fenotyper . (a) En delvis paralyserad skimmel diagnosticerad med multipla interna melanometastaser. De rakade områdena visar en fullt funktionell pigmentering i huden. (b) Kung Karl XI på en vit skimmel efter slaget i Lund, 1676 (målning av David Ehrenstrahl). (c) Intern melanom hos skimmel. (d) Skimmel med vitiligo, grad 3.

större tumörer är ofta problematiska p.g.a. dess storlek och frekventa återfall. Kemoterapi med cytostatika har prövats med varierande resultat, men har ifrågasatts på grund av den diagnostiska osäkerheten. Vacciner riktade mot tumörer är kostnadskrävande och har hittills inte gett de resultat som önskas. Generellt är det dock så att det är önskvärt med väldigt mycket effektivare behandlingsformer av melanom. Utan tvekan så skulle identifiering av involverade molekyllära mekanismer bana väg för utvecklandet av nya sätt att behandla melanomtumörer hos häst.

### Identifiering av mutationen för skimmelanlaget

Vår grupp har identifierat en kromosomal region, innehållande fyra olika gener, som delades av alla skimlar (Pielberg et al., 2005). Vi har nu identifierat den exakta mutationen som är unikt associerad med den avblekbara skimmel anlaget (Rosengren-Pielberg et al., 2008). Mutationen i sig är en extra kopia (duplicering) av en del av syntaxin 17 (STX17) genen. Denna mutation ändrar inte strukturen av proteinet STX17, utan påverkar istället regleringen av både genen för STX17 och den närliggande genen NR4A3. Vår studie påvisade abnormt höga nivåer av mRNA och protein från de två generna i melanom hos avblekbar skimmel.

STX17 tillhör familjen av syntaxin-proteiner (t-SNAREs), vars proteiner är involverade i intracellulär vesikeltransport. Generellt så är syntaxinerna väl konserverade mellan olika arter och finns hos alla eukaryoter. Den primära proteinstrukturen för STX17 skiljer sig markant från andra syntaxiner (Steehmaier et al. 1998) och väldigt få studier finns på denna atypiska medlem. STX17 finns partiellt vid det endoplasmatiska retikulumet och kan även återfinnas i cellkärnan i vissa cancerceller (Zhang et al. 2005). Vi har också visat att STX17 genen kodar för ett alternativt transkript (STX17\_short), som är signifikant mycket kortare än det normala fullängdstranskriptet (Rosengren-Pielberg et al 2008). Förekomsten av STX17\_short är också den starkt förhöjd i melanomatumörerna, jämförbart med STX17\_long.

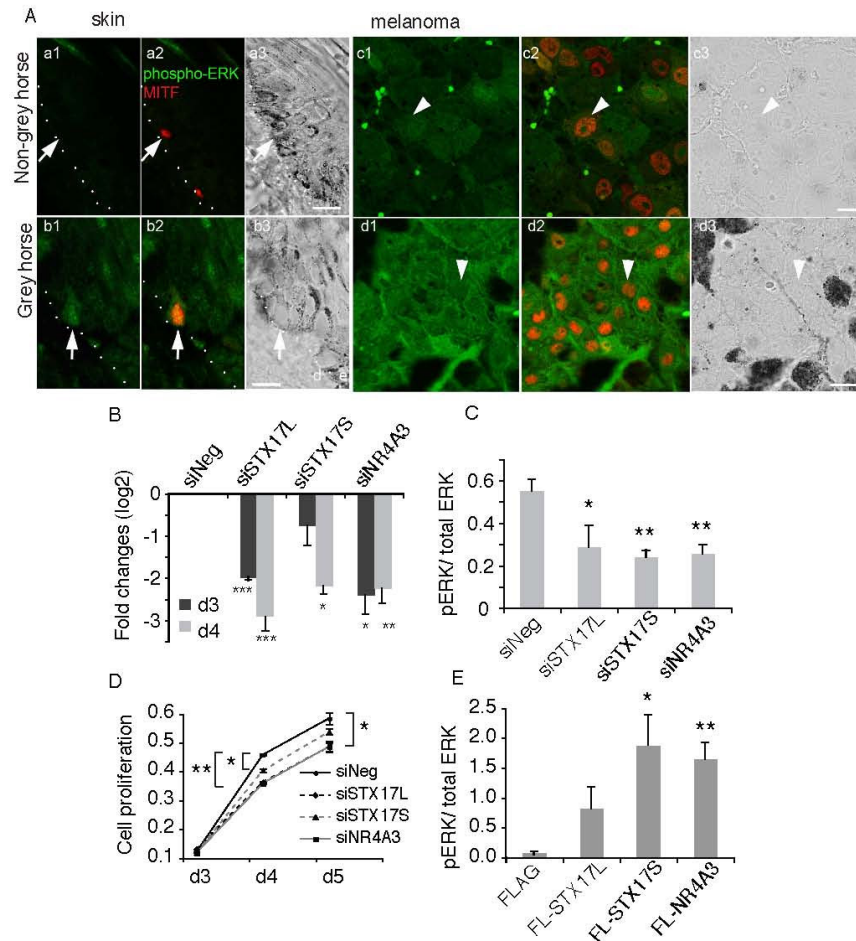
NR4A3 tillhör NR4A-gruppen av nukleära hormonreceptorer; en grupp av proteiner involverade i bl.a. reglering av cell cykeln, programmerad celledöd och initiering av cancertillväxt. Nyligen så visades det att NR4A1 och NR4A2 potentiellt är involverade i processen som följer vid UV-framkallad skada av DNA i melanocytceller (Smith et al. 2008). Inga tidigare studier har kopplat STX17 och NR4A3 till pigmentering eller utveckling av melanom. Våra tidigare studier här i Uppsala påvisade en ny, tidigare okänd, mekanism för reglering av melanocytceller hos däggdjur. Vår hypotes var då att skimmelmutationen stimulerar tillväxten av pigmentceller och att detta utarmar de stamceller som behövs för pigmentering av håren samtidigt som den ökar risken för tumörutveckling av de pigmentceller som ger upphov till pigment i huden. Våra senaste studier av de molekyllära mekanismer involverade i uppkomsten av melanom hos häst stödjer denna hypotes (se nedan).

### **Resultat och Diskussion**

*In vitro/in vivo* studier av intracellulär signalering i skimmel melanom (Jiang et al., 2011, submitterad)

Som vi beskrev i den tidigare ansökan, så har vi upptäckt att MEK/ERK-signalerings kedjan är konstant aktiverad i hästens melanomaceller och vävnad. Denna signaleringskedja spelar en central roll melanocyten normala celledelning och konstant aktivering av ERK1/2 har en stark koppling till utvecklandet av melanom (Davies et al. 2002). Aktiverande mutationer i NRAS och BRAF, två proteiner uppströms i ERK1/2-signaleringskedjan, hittas i 15% och 66%, respektive, all melanom hos människa (Davies et al. 2002). Nivån av aktiv ERK1/2 som vi har sett i häst melanomceller är på samma nivåer som i humana melanomceller med aktiverande BRAF och NRAS; trots att BRAF och NRAS ej är muterade hos häst.

Vi har nu gått vidare med våra *in vitro* studier av ERK-signaleringsvägen i GHM och börjat analysera vad som händer *in vivo*. Vi har kunnat konfirmera att aktivering av ERK sker i 17 olika primära skimmel melanom prover, trots avsaknad av kända somatiska onkogenmutationer (Fig. 2 A) Notervärt är att höga nivåer av aktivt ERK också påvisades i normala epidermala melanocyter från skimmel, men ej i melanocyter från icke-skimmel (Fig. 2A). Detta viktiga fynd kan tolkas som så att möjligen så är alla normala epidermala melanocyter hos skimmel predisponerade för potentiell utveckling av melanom.



**Figur 2.** (A) pERK uttryck hos hudmelanocyter från icke-skimmel (a1, 2) och skimmel (b1, 2). p-ERK1/2 uttryck i melanom hos icke-skimmel (c1, 2) och skimmel (d1, 2). Den totala mängden ERK1/2 är oförändrad i de bägge melanomtyperna (ej visat). a3, b3, c3, d3, är respektive ljusbild av de olika sektionerna. (B,C,D,E) Effekt av under- och överuttryck av STX17 och NR4A3 på aktivering av ERK1/2 och proliferering av melanomceller. (B, C, D) GHM-celler transfekterades med antigen random siRNA (siNeg) eller siRNA specifik för STX17\_long (siSTX17L), STX17\_short (siSTX17S) eller NR4A3 (siNR4A3). (B) Analys med qPCR på random siRNA-normaliserat uttryck av STX17\_long, STX17s\_short eller NR4A3 efter siRNA-behandling. (C) Effekt av siRNA behandling på ERK1/2-aktivering i GHM-celler, uttryckt som mean  $\pm$  s.d i tre oberoende försök utförda i tre biologiska triplikat. (D) Effekten av siRNA-behandling på cell proliferering hos GHM-celler. (D) och (E) Humana melanom M5-celler transfekterades med antigen FLAG-taggad STX17\_long (FL-STX17L), STX17\_short (FL-STX17S), NR4A3 (FL-NR4A3) eller tom vektor (FL) under 24-48 timmar. Aktivering av ERK1/2 bestämdes som i (C).

I ett nästa steg så har vi genom att använda farmaceutiska inhibitorer så visade vi att ERK-signaleringskedjan verkligen är nödvändig för celldelning i hästens melanomceller. Dessa data indikerar att denna signaleringskedja är en potential måltavla för medicinsk behandling av denna typ av melanom hos häst. Vidare så har vi analyserat effekten av uppregerad mängd av STX17 (lång och kort) och NR4A3 på aktiveringsnivån hos ERK1/2 i häst melanomceller och kunde se att alla tre har en aktiverande verkan på ERK-signaleringskedjan (Fig. 2C) och celldelning i dessa celler (Fig 2D). Våra data indikerar att dessa proteiner också har relevans i människa, eftersom överuttryck av STX17 och NR4A3 i humana melanom celler gav en ökad aktivering av ERK-signaleringskedjan. Dessa fynd kan tolkas som så att både NR4A3 och de två isoformerna av STX17 kan agera i det tidigt stadium av GHM och är därför värda att studera som måltavlor för småmolekylära substanser för behandling av GHM.

Två viktiga proteiner i utvecklandet av melanom hos människa och mus är tumörsuppressorererna p16<sup>INK4A</sup> och p53. Ändrade uttrycksmönster av dessa och andra proteiner i dess signaleringskedja har visats vara direkt kopplat till melanombildning. Vi har därför undersökt p16<sup>INK4A</sup> och p53 och dess eventuella roll i utvecklandet av melanom hos både skimmel och icke-skimmel. Våra data visar att ned-reglering av mängden p16<sup>INK4A</sup> är associerad med malignt melanom tumörer både hos skimmel och icke-skimmel och kan alltså ha en viktig roll också för utvecklandet av melanom hos häst. Vi har även indikation på ett ökat uttryck av p53 i de bägga hästmelanomtyperna, men vi har i nuläget inte tillräckligt med data för att kunna styrka en roll för även p53 i utvecklandet av melanom hos häst. Slutsatsen från våra studier styrker en viktig role av ERK-signaleringskedjan i de tidiga faserna av utvecklandet av melanom hos däggdjur, vilket indikerar att melanom hos avlektbar skimmel är en attraktiv modell för generella studier av melanomets olika utvecklingsfaser.

#### In vitro studier i stabila melan-a cellinjer

Som vi har indikerat en tidigare ansökan till SHF, så har vi haft för avsikt att skapa stabilt överuttryckande mus melanocytcellinjer (baserat på en melan-a cellinje från vår samarbetspartner Prof. Bennett, University of London), för att vidare kunna studera de molekylära mekanismer som orsakar avblekning och melanom. Genom att använda två-steps Flp-In systemet (Invitrogen) så har vi kommit ett steg närmare med detta. I det första steget så integreras en målplasmid i cellinjens genom-DNA. I det andra steget så integreras en STX17- eller NR4A3-innehållande DNA-kasset, med ett speciellt enzymssystem, specifikt inuti målvektorn. På detta sätt skapas två separata dottercellinjer där överuttryck av STX17 eller NR4A3 inte påverkas positionellt på det sätt som eventuellt kunde ske om de var integrerade på olika positioner i genomet. Vi har nu skapat modercellinjen och denna kommer användas för att introducera DNA-kassetter för STX17\_short, STX17\_long och NR4A3. De överuttryckande cellinjerna kommer på ett bättre och mer specifikt sätt utvärdera STX17 och NR4A3 roller i de intracellulära signaleringskedjor som orsakar ökad celldelning hos skimmelmelanom.

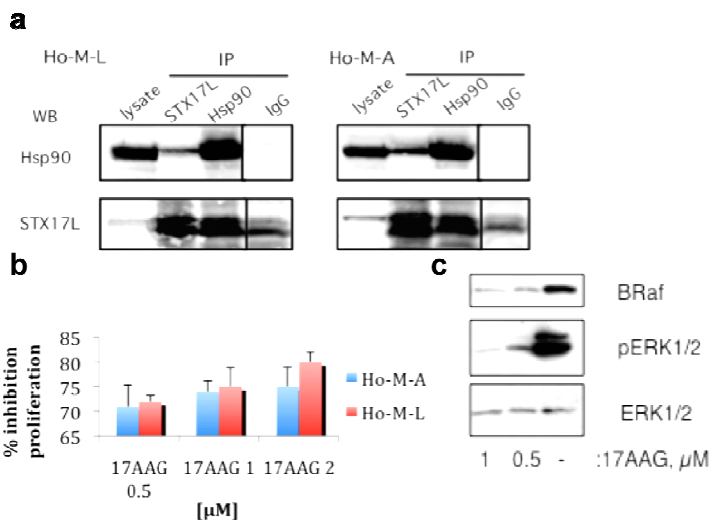
#### Biokemiska studier (Golovko et al., manuskript under preparation)

Vi har tidigare identifierat att proteinet HSP90 direkt kan binda till den C-terminala delen av STX17 i jäst 2-hybrid systemet. Detta var ett riktigt intressant fynd då HSP90 har tilldelats en roll i ett flertal olika cancerformer, inkluderat melanom. Vi har nu med immunoprecipitering sett att denna interaktion sker mellan STX17\_lång och HSP90 i två olika skimmel melanomcellinjer (Fig 3a). Vi kunde dock inte se någon interaktion mellan STX17\_kort och HSP90. En möjlig förklaring till denna skillnad är möjligtvis att

antikroppen mot STX17\_kort binder till samma ställe i den C-terminala delen som HSP90, medan antikroppen mot STX17\_lång binder till den N-terminala delen av proteinet. Vi kommer därför konstruera en vector där STX17\_kort uttrycks i fusion med en tag-epitop för antikroppsbindning och göra om ovan immunoprecipiteringsexperiment för att verifiera bindning också mellan STX17\_kort och HSP90.

För att vidare testa HSP90 i våra system så har vi behandlat skimmel melanomcellinjerna med 17-allylaminogeldanamycin (17AAG), en specifik HSP90-inhibitor. Denna behandling med 17AAG sänkte prolifereringen

med 70% i båda cellinjerna (Fig. 3b), vilket indikerar att HSP90 är viktigt även för proliferering i skimmel melanoceller. Behandlingen med 17AAG minskade också drastiskt aktivering av ERK1/2 (Fig. 3c), vilket indikerar en roll för HSP90 i aktiveringen av signalering av ERK. Andra studier har visat att HSP90 påverkar stabilitet och aktivitet hos flera andra cancerrelaterade proteiner, inkluderat BRAF (Babchia et al, 2008). Vi kunde se att 17AAG-inhibering av HSP90 i skimmel melanocellerna gav signifikant lägre nivåer av BRAF, vilken tydde på att HSP90 interagerar med BRAF även i vårt modellsystem. Vi har nu med immunoprecipitering bekräftat en sådan interaktion i Skimmel melanomcellinjerna. Våra preliminära data visar också att STX17\_lång är i samma komplex som HSP90/BRAF. Vidare så gav behandlingen med 17AAG en signifikant lägre aktiveringsnivå av ERK1/2. Vi håller för närvarande på med djupare analyser av BRAFs roll i ERK-signaleringskedjan och proliferering i skimmel melanom celler. Dessa vidare analyser kommer, som vi tror, stödja vår hypotes att BRAF, HSP90, STX17 och ERK1/2 verkar i samma signaleringskedja som styr proliferering i skimmel melanocellerna.



**Figur 3. (a)** STX17\_lång och HSP90 i komplex. STX17\_lång och HSP90 var co-immunoprecipiterade (IP) från GHM cellinjerna (Ho-M-A och Ho-M-L) med specifika antikroppar och komplexen var immunoblottade (WB) för HSP90 och STX17\_lång. IgG som negativ kontroll vid IP. (b) Inhibering av celledelning hos GHM cellinje vid behandling med 17AAG. (c) 17AAG-inducerad inhibering av BRAF-uttryck och ERK-aktivering (pERK-aktiverat ERK)

### Analys av den regulatoriska potentialen av STX17 duplikationen (Sundström et al., 2001a)

I samarbete med Dr. Tom Becker (University of Sydney, Australia) har vi genererat transgena zebrafiskar som bär på STX17-duplikationen från häst fuserat till en eGFP-reporter och studerat uttrycksmönster under embryoutvecklingen hos zebrafisk. Våra data visar att två kopior av det duplicerade segmentet verkar som en kraftfull förstärkare i neuronala crest celler och har melanoforspecifik aktivitet under zebrafiskens embryogenes (Fig. 4), medan en kopia av det duplicerade segmentet verkar som en svagare förstärkare. Dessa effekter är helt konsistenta med fenotypen av *Grey*-mutationen hos skimmel. Vi har vidare utfört luciferase reporter assays i mus melan-a celler, för att studera de regulatoriska regionerna i



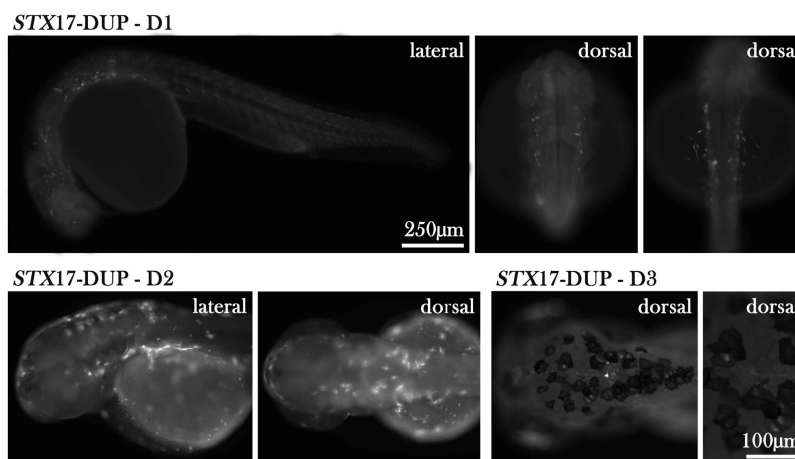
duplikationen och påvisa vävnadsspecifika aktiviteter av dessa element. En av regionerna upreglerade reporter

genen specifikt i melanocyter; en region som innehåller två MTF (Microphthalmia-associated transcription factor) bindningsställen essentiella för aktiviteten. MTF reglerar utveckling av melanocyten och dessa av oss påvisade bindningsställen är väldigt spännande kandidater för mediering av den melanocyt-specifika aktiviteten hos dessa element.

Dessa resultat ger stark support för den mekanistiska funktionen av STX17-duplikationen och ger en förklaring till den melanocyt-specifika effekten hos *Grey* allelen hos avlekt skimmel.

#### Analys av kopietalsvariation av STX17 duplikationen i melanom hos skimmel (Sundström et al., 2001b)

Ett förekommande fenomen är att duplikationer som orsakar en fenotyp, kan finnas i olika kopietal. Ju mer kopior desto starkare fenotyp. Vi har därför studerat om duplikation av STX17 visar kopietalsvariation hos skimmel. Våra data visar entydigt olika kopietal i DNA från blod jämfört med från tumör. De högsta kopietalen förekom i tumörer klassade som aggressiva eller från hästar som avlivats på grund av interna tumörer (Fig 5, tabell 1). Dessa resultat påvisar att mutationen agerar som ett melanomdrivande regulatoriskt element. Vidare så har vi använt sequence capture och nästa-generationens sekvensning för re-sekvensning av hela den 352 kb stora *Grey* haplotypen. Detta gjordes för att utesluta möjligheten att andra polymorfismer visar en associering till fenotypen av STX17 duplikationen, och som då potentiellt skulle kunna bidra till fenotypen. Vi har ej hittat andra mutationer som associerar starkt till fenotypen, vilket konfirmerar att STX17 duplikationen är den enda drivande mutationen hos skimmel.



**Figure 4.** Transgen zebrafisk embryon som uttrycker eGFP under kontroll av den duplicerade (två kopior; STX17-DUP) hästsekvensen uppströms av en zebrafisk *gata2* promotor. Överst: Live bilder från dag 1 efter befruktning (1 dpf; D1) som visar reporter uttryck i neural crest. D, E, F: Bilder vid 2 dpf (D2) som visar uttryck i differentierande melanocyter. D3: Förstoring av dorsala melanoforer, som visar den epitheliala formen på dessa celler och co-uttryck med melanin.

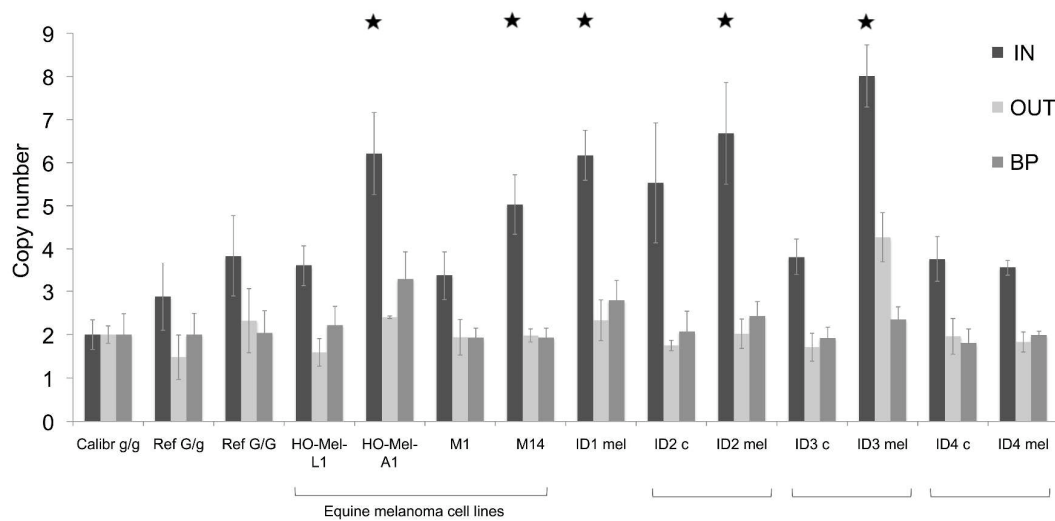


Figure 4. Kopietalsanalys av *STX17* duplikationen i DNA från kontroll (blod) DNA vs. melanoma DNA (c=kontroll DNA, mel=melanom DNA) genom användandet av tre oberoende prober; IN=internt i den duplicerade sekvensen, OUT= utanför den duplicerade sekvensen och BP=gränsen mellan den 5'-flankerade sekvensen och 5'-ändan av duplikationen. Provet "Calibr" är en g/g individ med ett känt kopietal av 2, som används som kalibrator i analysen. Blod DNA från en G/g och en G/G häst testades i analysen och resultatet är visat som en referens för förväntat kopietal för varje genotyp. Rak parentes grupperar häst melanom cellinjerna eller det parvisa DNA:t från blod och melanom prover. Felmarginaler representerar kopietalsfrekvensen erhållit från quadripla prover i varje analys som erhållits från mjukvaran CopyCaller.

ID	Grey	Type	Breed	Comments
Calibrator	<i>g/g</i>	gDNA	Arabian	Calibrator in analysis
Ref G/g	<i>G/g</i>	gDNA	Thoroughbred	Genotype reference
Ref G/G	<i>G/G</i>	gDNA	Lipizzaner	Genotype reference
HO-MelL	<i>G/g</i>	Equine melanoma cell line	Lipizzaner	Normal growth
HO-MelA	<i>G/g</i>	Equine melanoma cell line	Arabian	Malignant
M1	<i>G/g</i>	Equine melanoma cell line	Irish warmblood	Normal growth
M14	<i>G/G</i>	Equine melanoma cell line	Andalusian	Malignant
ID1	<i>G/g</i>	tumour DNA	Thoroughbred	Euthanized due to melanoma tumours
ID2	<i>G/G</i>	gDNA + tumour DNA	Shagya Arabian	Euthanized due to melanoma tumours
ID3	<i>G/g</i>	gDNA + tumour DNA	Swedish warmblood	Euthanized due to melanoma tumours
ID4	<i>G/g</i>	gDNA + tumour DNA	Connemara	Cremello (few pigments), euthanized due to laminatis, very small melanomas

Tabell 1. Prover använda i kopietalsanalys av *Grey*-loket

Detta projekt har erhållit stor uppmärksamhet från vetenskapligt, veterinärer och medicinska sällskap. På olika internationella konferenser och möten blir vi ofta utvalda att ge muntliga presentationer. Under 2011 så deltog huvudsökande på ett årliga återkommande internationella möte, organiserat av The European Society for Pigment Cell and Melanoma Research, och än en gång så fick huvudsökande presentera gruppens vetenskapliga resultat muntligt. De data som presenterade, med SHF som uttrycklig bidragsgivare, fick bra respons och, mer viktigt, ett flertal internationella samarbeten initierades. Bland annat så blev huvudsökande, tillsammans med en projektsamarbetspartner (Dr. Seltenhammer) direkt inbjudna att efter konferensen ge ett seminarium hos en av konferensens organisatörer, Prof. Dot Bennet, University of London, St. Georges, Division of Biochemical Studies. Detta resulterade i en uppstart av ännu ett mycket intressant samarbetsprojekt. Vi håller också på att

förbereda skrivandet av en populärvetenskaplig artikel rörande våra senaste resultat, så fort som våra rent vetenskapliga artiklar har publicerats.

Slutligen, det är väldigt glädjande för projektet och min egen skull att styrkan och framgången i vår forskning, nu har lett till ett flertal initierade samarbeten med internationellt erkända aktörer.

### **Publikationer**

Pielberg,G., Mikko,S., Sandberg,K., and Andersson, L. 2005. Comparative linkage mapping of the *Grey* coat colour gene in horses. *Animal Genetics* 36:390-395.

Rosengren Pielberg,G., Golovko,A., Sundström,E., Curik,I., Lennartsson,J., Seltenhammer,M.H., Druml,T., Binns,M., Fitzsimmons,C., Lindgren,G., Sandberg,K., Baumung,R., Vetterlein,M., Strömberg,S., Grabherr,M., Wade,C., Lindblad-Toh,K., Pontén,F., Heldin,C.-H., Sölkner,J. and Andersson, L. 2008. A cis-acting regulatory mutation causes premature hair greying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nature Genetics* 40: 1004 - 1009.

Jiang, L., Campagne, C., Sundström, E., Rosengren Pielberg, G., Seltenhammer, M., Olsson, M., Egidy, G., Andersson, L., Golovko, A. 2011. Constitutive activation of the ERK pathway is mediated by Syntaxin 17 and NR4A3 in melanoma of Grey horses. *Pigment Cell and Melanoma Research*. Submitterad

Sundström, E., Komisarczuk, A., Jiang, L., Golovko, A., Navratilova, P., Becker, T., Andersson, L. 2011a. Identification of a melanocyte-specific, MITF-dependent regulatory element in the intronic duplication causing hair greying and melanoma in horses. *Pigment Cell and Melanoma Research*. Accepterat för publikation efter vissa tillägg.

Sundström, E., Imsland, F., Mikko, S., Wade, C., Sigurdsson, S., Rosengren Pielberg, G., Golovko, A., Curik, I., Seltenhammer, M., Sölkner, J., Lindblad-Toh, K., Andersson, L. 2011b. Copy number expansion of the STX17 duplication in melanoma tissue from Grey horses. *Pigment Cell and Melanoma Research*. Accepterat för publikation efter vissa tillägg.

### **References**

- Babchia et al. 2008 *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **49**(6):2348-56  
Bennett et al. 1987 *Int J Cancer.* **39**(3):414-8  
Brunberg,E. et al 2006 *BMC Genetics* **7**:46.  
Champion S (2003) <http://www.championvet.com/articles/details.asp?aID=93>  
Comfort, A. (1958). *Nature* **182**, 1531–1532  
Davies et al. 2002 *Nature* **417**: 949-954  
Grbovic et al. 2006 *Proc Natl Acad Sci U S A.***103**(1):57-62.  
Skimmel-Schopfer et al. 2007 *Nature* **445**: 851-857  
Marklund L et al 1996 *Mamm Genome* **7**(12):895-9  
Maxwell and Muscat 2006 *Nucl. Recept. Signal.* **4**: e002  
Miller and Mihm 2006 *N Engl J Med* **355**, 51-65  
Nomiya et al. 2006 *J. Biol. Chem.* **281**: 33467-33476  
Rosengren-Pielberg et al. 2008 *Nature Genetics* **40**:1004 - 1009  
Seltenhammer et al. 2004. *Pigment Cell Res.* **17**, 674-681  
Smith et al. 2008 *J Biol Chem.* **283**(18):12564-70  
Sponenberg 2003 *Equine Coat Color Genetics*, 215. Blackwell, Ames, Iowa  
Stegmaier et al. 1998 *J. Biol. Chem.* **273**, 34171-34179



Sutton and Coleman 1997 Melanoma and the skimmeling horse, 1-34. RIRDC, Barton, Australia.  
Zhang et al. 2005 *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 1371-1382  
Wansa et al. 2003 *J. Biol. Chem.*