

Rodzina genów kodujących receptory melanokortyn (MCR) i związek ich polimorfizmu z cechami zwierząt

Agata Tomaszewska, Sylwia Salamon,
Marek Świtoński

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

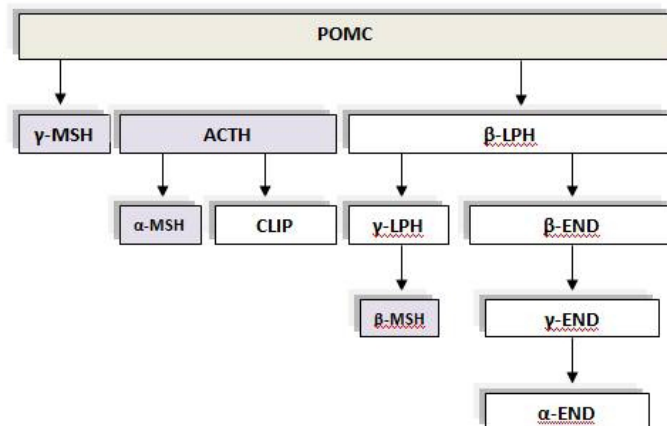
Rodzina genów kodujących receptory melanokortyn (MCR) wchodzi w skład podrodziny GPCR (ang. G Protein-Coupled Receptor) – receptorów sprzężonych z białkiem G oraz cykłązą adenylanową, które pośredniczą w przekazie rozmaitych sygnałów do wnętrza komórki. Istnieje pięć rodzajów receptorów melanokortyn (MC1-MC5) zaangażowanych w różnorodne procesy fizjologiczne oraz patologiczne.

Podwzgórzowy układ melanokortynowy jest jednym z lepiej poznanych szlaków neuronalnych, zaangażowanych w regulację homeostazy energetycznej organizmu. Szlak ten posiada unikalną zdolność odbioru olbrzymiej liczby różnorodnych czynników sygnałowych, m.in. hormonów oraz składników odżywczych. Jest on zintegrowany z długoterminowymi mechanizmami: pobierania pokarmu, adipogenezy i lipolizy, regulowanymi poprzez leptynę i insulinę [6]. Szlak ten jest unikatowy pod względem regulacji, ponieważ dochodzi w nim zarówno do ekspresji agonistów, jak i antagonistów receptorów melanokortynowych. Mowa tu o neuronach syntetyzujących zarówno α -MSH (melanokortynę) – główny czynnik hamujący apetyt o działaniu katabolicznym, jak i związki zwiększające pobieranie pokarmu (oreksyny) o działaniu anabolicznym NPY (neuropeptyd Y) i AgRP (białko Agouti) – antagonistę α -MSH [6].

Powstawanie melanokortyn

Melanokortyny należą do grupy produktów potranslacyjnej obróbki produktu genu proopiomelanokortyny (POMC). Produkty te odgrywają rolę w różnorodnych zjawiskach, m.in. w otyłości, depresji, pigmentacji skóry oraz regulacji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza. [6]. Proopiomelanokortyna jest prekursorem dla melanokortyn (α -, β - i γ -MSH), adrenokortykotropiny (ACTH), β - i γ -lipotropiny, CLIP oraz endorfin (α -, β - i γ -END) – rysunek.

Jednym z aktywnych biologicznie związków powstających w wyniku potranslacyjnego przekształcenia proopiomelanokortyny są melanokortyny. Źródłem melanokortyn są perykariony zlokalizowane w jądrze łukowatym i okołolukowatym podwzgórza. W wyniku defragmentacji POMC powstaje między innymi adrenokortykotropina (ACTH), która poprzez oddziaływanie z receptorami typu 2 melanokortyny (MC2R) odgrywa kluczową rolę w kontroli steroidogenezy nadnerczowej. Hormon ten odpowiada za rozwój, wzrost i czynność kory nadnerczy, pobudza wytwarzanie glikokortykoidów, przez co wpływa pośrednio na gospodarkę węglowodanową, lipidową, białkową i mineralną organizmu [2, 6].



POMC → proopiomelanokortyna; α -, β -, γ -MSH → α -, β - i γ -melanokortyna; ACTH → adrenokortykotropiny; β -, γ -LPH → β -, γ -lipotropina; α -, β -, γ -END → α -, β -, γ -endorfiny

Rys. Powstawanie produktów ekspresji genu proopiomelanokortyny (POMC)

Kolejną istotną grupą peptydów powstających z POMC są melanotropiny (α -, β - i γ -MSH). Najważniejszym hormonem z tej grupy zaangażowanym w kontrolę pobierania pokarmu jest α -MSH. Obecnie dowiedziono, że melanokortyna syntetyzowana na terenie ośrodkowego układu nerwowego (OUN) moduluje apetyt, masę ciała i wydatkowanie energii przez organizm. Efekt ten jest wywołany poprzez oddziaływanie ze specyficznymi receptorami – MC3R oraz MC4R [15].

Dotychczasowe wyniki badań eksperymentalnych, prowadzonych na myszach pozbawionych receptora typu 4 melanokortyny (nokaut genu *MC4R* myszy), wskazują na bardzo istotną rolę układu POMC/melanokortyna w mechanizmie kontroli energetycznej ustroju. Zaburzenia funkcji tego układu mogą prowadzić do hiperfagii i w rezultacie otyłości. Hipotezy te znalazły odzwierciedlenie w badaniach klinicznych, w których wykazano, że podanie do ośrodkowego układu nerwowego melanokortyny powoduje zahamowanie pobierania pokarmu, a także znosi pobudzenie łaknienia wywołane przez naturalnego antagonistę receptorów – białko Agouti.

MSH odpowiada również za aktywację procesu melanogenezy, w wyniku czego komórki barwnikowe – melanocyty, wytwarzają ciemny barwnik – melaninę, zatem melanotropina wykazuje wpływ na umaszczenie oraz kolor oczu. Hormony nadnerczy, kortyzol oraz adrenalina i noradrenalina silnie hamują wydzielanie hormonu melanotropowego [15].

Występowanie i funkcja biologiczna receptorów melanokortyn

Znanych jest pięć typów metabotropowych receptorów melanokortynowych MC1-MC5. Mechanizm funkcjonowania tych receptorów przebiega za pośrednictwem białka G i polega na transdukcji sygnału poprzez podwyższenie stężenia cAMP w neuroplazmie i mobilizację wewnątrzkomórkowych rezerw wapniowych [4].

MC1R jest klasycznym receptorem dla α -MSH, głównie do jego ekspresji dochodzi w melanocytach skóry, ale także w keratynocytach, fibroblastach, komórkach endotelium oraz komórkach prezentujących antygen (APC). Jest on kluczowym białkiem zaangażowanym w melanogenezę, determinując kolor skóry i włosów. MC1R po związaniu z α -MSH inicjuje złożoną kaskadę sygnałową, która prowadzi do produkcji czarnobrazowego barwnika – eumelaniny. W przypadku związania się z anta-

gonistą – białkiem ASIP (Agouti – Signaling Protein), komórka syntetyzuje pigment żółtoczerwony – feomelaninę. Dowiedziano również wystąpienia tego receptora w leukocytach, gdzie pośredniczy on w działaniu przeciwzapalnym melanokortyn [9].

MC2R ulega ekspresji w warstwie siateczkowej oraz pasmowej kory nadnerczy. Jest on wyłącznie receptorem dla adrenokortykotropiny (ACTH) i nie ma żadnego powinowactwa do innych melanokortyn. Główną funkcją tego receptora jest udział w steroidogenezie nadnerczowej. W badaniach prowadzonych na szczurach wykazano, że MC2R występuje również w tkance tłuszczowej i pod wpływem ACTH wywołuje efekt lipolityczny [3].

Receptory typu 3 i 4 melanokortyny (MC3R, MC4R) uczestniczą między innymi w mechanizmach podwzgórzowej kontroli homeostazy energetycznej organizmu, a także regulują przyjmowanie pokarmu oraz pośredniczą w ośrodkowej aktywności adipocytokin. MC3R został zlokalizowany w wielu obszarach ośrodkowego układu nerwowego, a także łożysku i tkance jelit. Jest on receptorem dla wszystkich melanokortyn, jednak największe powinowactwo wykazuje w stosunku do γ -MSH. MC4R jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych receptorów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), występuje głównie w jądrach podwzgórza. Poza głównym miejscem syntezy MC4R zaobserwowano również niewielką ekspresję tego genu w korze nadnerczy, melanocytach oraz łożysku. Model regulacji poprzez MC4R jest związany z oddziaływaniem na ośrodki łaknienia, znajdujące się w podwzgórzu. Leptyna wykazuje stymulujący wpływ na neurony jądra łukowego produkującego α -MSH. Melanotropina α poprzez 4 receptor melanokortyny stymuluje powstawanie w podwzgórzu substancji hamujących łaknienie (kortykoliberyna – CRH, tyreoliberyna – TRH), w wyniku czego, na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego, prowadzi do zmniejszenia pobierania pokarmu i zahamowania magazynowania tkanki tłuszczowej [1, 13, 14].

Ostatni z genów kodujących receptory melanokortynowe – MC5R ulega ekspresji w wielu tkankach, m.in. w nadnerczach, adipocytach i leukocytach. W przeciwieństwie do pozostałych receptorów melanokortyny jest on bardzo słabo rozpowszechniony w OUN. Produkt omawianego genu jest odpowiedzialny za sekrecję egzokrynną oraz bierze udział w wydzielaniu gruczołu łojowego. Badania wskazują ponadto na rolę MC5R w immunomodulacji limfocytów B i T oraz komórek tucznych [4].

Szybki rozwój współczesnej genetyki umożliwił poznanie korelacji pomiędzy zachodzącymi polimorfizmami a istotnymi różnicami wpływającymi na powszechnie obserwowaną zmienność osobniczą. Badania dotyczące polimorfizmów receptorów melanokortyny przyniosły wiele ciekawych informacji na temat mutacji wpływających na różnorodne parametry cech jakościowych oraz ilościowych u zwierząt.

Polimorfizm MC1R i umaszczenie zwierząt

W przypadku zwierząt, jak i ludzi barwa skóry zależy od proporcji w zawartości feomelaniny i eumelaniny. W wielu badaniach potwierdzono związek niektórych polimorfizmów MC1R z funkcjonalnością receptora, mających znamienny wpływ na umaszczenie. Wystąpienie mutacji w sekwencji genu MC1R powoduje zaburzenie w funkcjonowaniu kodowanego przez niego białka, przez co produkcja eumelaniny jest niższa. W sytuacji przewagi poziomu syntetyzowanej w melanocytach feomelaniny i ograniczonej produkcji eumelaniny występuje jasne zabarwienie skóry oraz rude umaszczenie sierści i włosów (fenotyp RHC) [20].

W badaniach myszy laboratoryjnych, psów, bydła i drobiu stwierdzono wpływ różnych wariantów alleli genu MC1R na

zróżnicowane umaszczenie lub barwę upierzenia. Polimorfizmy MC1R oraz ich związek z umaszczeniem są szeroko analizowane wśród gatunków z rodziny psowatych, w obrębie której najwięcej SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu) zidentyfikowano u psa. Kilka z nich posiada udokumentowany związek z umaszczeniem. Mutacji w kodonie 306, skutkującej wystąpieniem kodonu STOP w miejscu argininy (c.916C>T), niektórzy autorzy przypisują znaczącą rolę w procesie melanizacji. Omawiana mutacja powoduje eliminację 12 z 17 aminokwasów tworzących końce cytoplazmatyczne receptora, co skutkuje żółtoczerwonym umaszczeniem osobników ras: golden retriever, labrador żółty oraz seter irlandzki [11]. Kolejną istotną mutacją, polegającą na zamianie metioniny na walinę, zidentyfikowano w pozycji 264 łańcucha polipeptydowego (c.790A>G). Psy będące homozygotami V264 (walina w pozycji 264) lub heterozygotami charakteryzowały się zmianami w pigmentacji. Zmiany te polegały na utworzeniu się czarnej (melanistycznej) maski, czyli przesunięciu się pigmentu na obrzeża ciała, powodujące utworzenie charakterystycznego wzoru na pysku i głowie psa. Homozygoty M264 (metionina w pozycji 264) nie posiadały tego rodzaju umaszczenia [17]. W gronie polimorfizmów zidentyfikowanych u lisa pospolitego warto wspomnieć o zamianie cysteiny na kodon STOP w 125 pozycji łańcucha polipeptydowego (c.373T>C), która warunkuje ujawnienie fenotypu srebrzystego alaskańskiego na skutek konstytutywnej aktywacji receptora MC1R [24]. Ponadto opisano dwie mutacje (Gly5Cys oraz Phe280Cys) występujące tylko u lisa polarnego o niebieskim wariacie umaszczenia [23].

Polimorfizm MC3R i MC4R a cechy produkcyjne zwierząt

Jednym z kluczowych celów w hodowli trzody chlewnej jest poprawa mięsności tuczników, powiązana z ukształtowaniem na optymalnym poziomie zawartości śródmięśniowej tkanki tłuszczowej. Proces odkładania tkanki tłuszczowej jest ściśle związany z wytwarzanymi w mózgu peptydami, które odgrywają bardzo ważną funkcję w modulacji apetytu oraz utrzymywaniu homeostazy energetycznej organizmu. Istotnymi czynnikami regulującymi te procesy są hormony powstające w wyniku obróbki po-translacyjnej białka prekursorowego, powstałego po aktywacji genu proopiomelanokortyny (POMC) oraz receptory tych cząsteczek – MC3R i MC4R. Receptory melanokortyny typu 3 i 4 związane są z zachowaniami żywieniowymi i utrzymaniem homeostazy energetycznej organizmu poprzez regulację pobierania paszy oraz wydatkowanie energii. W wyniku wystąpienia mutacji w genach MC3R i MC4R dochodzić może do różnego typu zaburzeń w odbiorze sygnałów przez ten receptor oraz inhibicję wydzielania substancji odpowiedzialnych za hamowanie łaknienia. Kontrolowanie mechanizmów homeostazy energetycznej organizmu oraz przyswajanie pokarmu zostaje upośledzone. Przejawia się to zwiększeniem pobierania pożywienia oraz wzmożonym odkładaniem tkanki tłuszczowej. Badania przeprowadzone na gryzoniach udowodniły kluczową rolę mutacji w genie MC4R w powstaniu otyłości, natomiast rola mutacji zachodzących w MC3R dotycząca przyjmowania pokarmu oraz wydatkowania energii nie została do końca wyjaśniona [21].

Dotychczas opisano ponad 150 mutacji w genie MC4R i 22 mutacje w genie MC3R człowieka. Okazało się, że najczęstszą przyczyną otyłości monogenowej są mutacje genu MC4R, które dziedziczone są zazwyczaj w sposób autosomalny dominujący [8, 12]. Z tego powodu, w badaniach dotyczących cech użytkowych zwierząt, gen MC4R został genem kandydującym

dla cechy otluszczenia. Badania prowadzone u świń, myszy i psowatych, jak też u ludzi, ujawniły wystąpienie polimorfizmu, który najprawdopodobniej związany jest z tymi cechami. Analiza sekwencji nukleotydowej *MC4R* świni ujawniła transycję guaniny na adeninę, zlokalizowaną w regionie kodującym konserwatywny fragment (pozycja 298 łańcucha polipeptydowego), która powoduje zmianę sekwencji aminokwasów. W rezultacie tej mutacji kwas asparaginowy zastępowany jest przez asparaginę. Dowiedziono, że mutacja zachodząca w genie receptora melanokortyny 4 wykazuje istotny wpływ na pobieranie paszy, otluszczenie oraz wzrost niektórych ras świń [10]. Należy jednak zauważyć, że prace określające efekt jaki mutacja ta powoduje u świń prezentują rozbieżne wyniki [19].

Brak bądź zbyt niska ekspresja *MC3R* u myszy powoduje efektywniejsze przyswajanie pokarmu oraz zwiększenie procesów odkładania tkanki tłuszczowej. Co ciekawe, myszy z nokautem tego genu nie wykazywały zwiększonej masy ciała, a mimo to odnotowano niemal dwukrotnie wyższą zawartość tkanki tłuszczowej oraz obniżoną masę mięśniową w odniesieniu do typu dzikiego myszy. Odpowiedzialne za to okazały się polimorfizmy Thr6Lys oraz Val81Ile powiązane z otyłością [16]. Co ważne, niektóre mutacje prowadzące do utraty funkcji *MC3R* zaobserwowano również u osobników z normalną masą ciała.

Masa ciała jest istotnym parametrem także dla hodowców zwierząt futerkowych, jest ona bowiem pozytywnie skorelowana z wielkością pozyskiwanych skór. Istotne wydaje się więc poszukiwanie polimorfizmów w genach kandydujących dla cech otluszczenia wśród tych gatunków. Badania, które objęły 390 lisów pospolitych ujawniły, że dwa polimorfizmy typu SNP w genie *MC3R* wykazują związek z masą ciała. Były to transwersja adeniny na cytozynę w pozycji 957 nukleotydu (ekson) oraz transycja cytozyny na tyminę w rejonie 3' flankującym (g.*185C>T). Allel C zarówno w pozycji c.957, jak i g.*185 wykazywał związek z podwyższoną masą ciała [18].

Podsumowanie

Polimorfizm genów z rodziny *MCR*, a szczególnie dwóch spośród nich – *MC1R* i *MC4R*, ma istotne znaczenie w hodowli zwierząt, ze względu na związek z ważnymi cechami: umaszczeniem (*MC1R*) i odkładaniem tkanki tłuszczowej (*MC4R*). Interesujące jest to, że bardzo bogaty polimorfizm obu tych genów znany jest u człowieka – ponad 100 alleli odpowiedzialnych za zmianę sekwencji aminokwasów w genie *MC1R* [5] oraz po-

nad 150 takich alleli w genie *MC4R* [22]. Tymczasem polimorfizm tych genów u badanych dotąd gatunków ssaków domowych jest znacznie mniejszy. Przykładowo, w genie *MC4R* świni wykryto dotąd jedynie dwa polimorfizmy zmiany sensu: Asp298Asn, Arg236His [7]. Można przypuszczać, że różnica ta jest efektem prowadzonej selekcji u zwierząt domowych.

Literatura: 1. Butler A., 2000 – *Endocrinology* 9, 3518-3521. 2. Butler A., 2006 – *Peptides* 27, 281-290. 3. Chida D., Nakagawa S., Nagai S., Sagara H., Katsumata H., Imaki T., Suzuki H., Mitani F., Ogishima T., Shimizu C., Kotaki H., Kakuta S., Sudo K., Koike T., Kubo M., Iwakura Y., 2007 – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 18205-18210. 4. Cone R.D., 2005 – *Nature Neuroscience* 5, 571-578. 5. Dessinioti C., Antoniou C., Katsambas A., Stratigos A.J., 2011 – *Photochemistry and Photobiology* 87, 978-987. 6. Ellicott K.L.J., Cone D.R., 2004 – *Resent Progress in Hormone Research* 59, 395-408. 7. Fan B., Onteru S.K., Plastow G.S., Rothschild M.F., 2009 – *Animal Genetics* 40, 401-419. 8. Farooqi I.S., Keogh J.M., Yeo G.S., Lank E.J., Cheetham T., O'Rahilly S., 2003 – *The New England Journal of Medicine* 348, 1085-95. 9. Kadekaro A.L., Leachman S., Kavanagh R.J., Swope V., Cassidy P., Supp D., Sartor M., Schwemberger S., Babcock G., Wakamatsu K., Ito S., Koshoffer A., Boissy R.E., Manga P., Sturm R.A., Abdel-Malek Z.A., 2010 – *The FASEB Journal* 24, 3850-3860. 10. Kim K.S., Larsen N., Short T., Plastow G., Rothschild M.F., 2000 – *Mammalian Genome* 11, 131-135. 11. Newton J.M., Wilkie A.L., He L., Jordan S.A., Metallinos D.L., Holmes N.G., Jackson I.J., Barsh G.S., 2000 – *Mammalian Genome* 11, 24-30. 12. Pichler M., Kollerits B., Heid I.M., Hunt S.C., Adams T.D., Hopkins P.N., Kronenberg F., 2008 – *The American Journal of Clinical Nutrition* 88, 797-800. 13. Pillot B., Duraffourd C., Begeot M., Joly A., Luquet S. et al., 2011 – *PLoS ONE* 6 doi:10.1371/journal.pone.0019107. 14. Raffin-Sanson M.L., Bertherat J., 2001 – *European Journal of Endocrinology* 144, 207-208. 15. Rousseau K., Kauser S., Pritchard L.E., Warhurst A., Oliver R.L., Slominski A., Wei E.T., Thody A.J., Tobin D.J., White A., 2007 – *The FASEB Journal* 21, 1844-1856. 16. Santos J.L., De la Cruz R., Holst C., Grau K., Naranjo C. et al., 2011 – *PLoS ONE* 6, doi:10.1371/journal.pone.0019934. 17. Schmutz S.M., Beryere T.G., Ellinwood N.M., Kerns J.A., Barsh G.S., 2003 – *Journal of Heredity* 94, 69-73. 18. Skorczyk A., Flisikowski K., Szydłowski M., Cieslak J., Fries R., Switonski M., 2011 – *Animal Genetics* 42, 104-107. 19. Stachowiak M., Szydłowski M., Obarzanek-Fojt M., Switonski M., 2006 – *Animal Genetic* 37, 55-57. 20. Stanisz H., Seifert M., Tilgen W., Vogt T., Rass K., 2011 – *Dermato-Endocrinology* 4, 259-265. 21. Tan K., Pogozheva I.D., Yeo G.S., Hadaschik D., Keogh J.M., Haskell-Leuvano C., O'Rahilly S., Mosberg H. I., Farooqi I.S., 2009 – *Endocrinology* 150, 114-125. 22. Tao Y.X., 2010 – *Endocrine Reviews* 31, 506-543. 23. Våge D.I., Fuglei E., Snipstad K., Behheim J., Landsem V.M., Klungland H., 2005 – *Peptides* 26, 1814-1817. 24. Våge D.I., Lu D., Klungland H., Lien S., Adalsteinsson S., Cone R.D., 1997 – *Nature Genetic* 15, 311-315.

Detekcja zmetylowanej cytozyny w DNA

Magdalena Gryzińska¹, Katarzyna Andraszek²,
Aneta Strachecka¹, Ewa Błaszczak¹

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,

²Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

Znajomość sekwencji czterech zasad azotowych nie wystarcza do zrozumienia ekspresji informacji genetycznej zakodowanej w DNA. Brakującym i niezwykle ważnym elementem jest obec-

ność „piątej” zasady, 5-metylocytozyny (m⁵C). Poznanie jej ilości i rozmieszczenia stanowi duży potencjał diagnostyczny [2].

Metody biologii molekularnej pozwalają na analizę metylacji całego genomu, jak i poszczególnych genów. Obecnie istnieje stosunkowo wiele technik umożliwiających jakościowe i ilościowe oznaczanie 5-metylocytozyny. Można je podzielić i sklasyfikować według następujących kryteriów [9]:

- zakres analizowanego materiału (analiza m⁵C w całym genomie lub analiza metylacji pojedynczych genów);
- typ stosowanej techniki:
 - cięcie enzymami restrykcyjnymi, często połączone z hybridacją i PCR,
 - Southern blot,
 - mikromacierze;
- PCR (jakościowa, ilościowa);
- inne.