

Genetika, zelulen, molekulen eta eboluzioaren biologiaren esparru barneko esperimentazioaren hastapena

2. Gaia: Aferaren aurkezpena



GAIAREN AURKEZPENA

- Ikerketa bat modu egokian burutzeko, **aferaren egoera ezagutu** eta oraindik erantzunik ez duen **interesezko galdera bat planteatu** behar da.
- Ikastaro honetan, lortzen diren zenbait erantzun gaur egun zientziaren munduak ezagutzen ditu. Gaia, ordea, daukan balio hezigarria dela eta aukeratu da, batez ere ikerketa bat nola gauzatzen den erakusten duelako eta ez horrenbeste lortzen diren emaitzak eta erantzunak zientifikoki berritzaileak direlako.
- Aukeratu den gaia, ugaztunetan **melaninaren sintesiaren bidezidorraren** funtzionamendu eta eraenketan parte hartzen duen gene baten (*MC1R*) mutazioak duen efektu fenotipikoa ezagutzea baimenduko lukeen ikerketa baten planteamendua izango litzateke.
- Hurrengo irudietan, gaiaren inguruko gaur egun ditugun ezagutzak aurkezten dira, hauek beharrezkoak izango dira ikerketa behar bezala burutu ahal izateko.



ZER DA MELANINA?

- **Melanina, melanozitoek** sintetizatzen duten pigmentu bat da, eta larruazalaren zein ilearen **pigmentazioa** determinatzen du eta baita begien kolorea ere.
- **Melanozitoak** ile-folikuluetan eta epidermisan dauden zelulak dira, eta beraien funtzio nagusia, melanina sintetizatzea da
- Melanozitoek 2 motatako melanina sintetizatzen dute: **eumelanina** (kolore marroi edo beltza duena) eta **feomelanina** (kolore horia edo gorria duena); ehun baten pigmentuaren kolorea melanozitoek sintetizatutako bi pigmentu hauen kantitate erlatiboaren arabera izango.
- **Eumelaninak erradiazio ultramoreak sor ditzazkeen kalteetatik babesten du larruazala**, feomelaninak, bere aldetik, ez du horrelakorik egiten, feomelaninan aberatsak diren pertsonak, beraz, eguzki erradiazioa dela eta larruazalen kalte gehiago edukitzeko arrisku handiagoa dute.

PIGMENTAZIO-FENOTIPOA

- Larruazala, begi eta ilearen pigmentazioa, giza-ezaugarri morfologiko nabarienetakoa eta interesgarrienetakoa da, bai ikuspuntu ebolutibo batetik zein ikuspuntu biomediko batetik
- Ikuspuntu ebolutibo batetik, europarren pigmentu-fenotipoa, D bitamina sintetizatzeko beharraren ondorio gisa interpretatu da. D bitamina larruazalen sintetizatzen da UV argiaren erradiazioa eta gero. Eguzki-erradiazio baxua duten latitudeetan larruazal ilun bat D bitaminaren sintesia mugatuko luke, eta horrek eskeletoaren formazio desegokia, intsulinarekiko erresistentzia, odol-presio altua eta sistema immune akastuna eragingo luke (Robins, 1991).



DESPIGMENTAZIOA ETA AZALEKO MELANOMAREN ARRISKUA

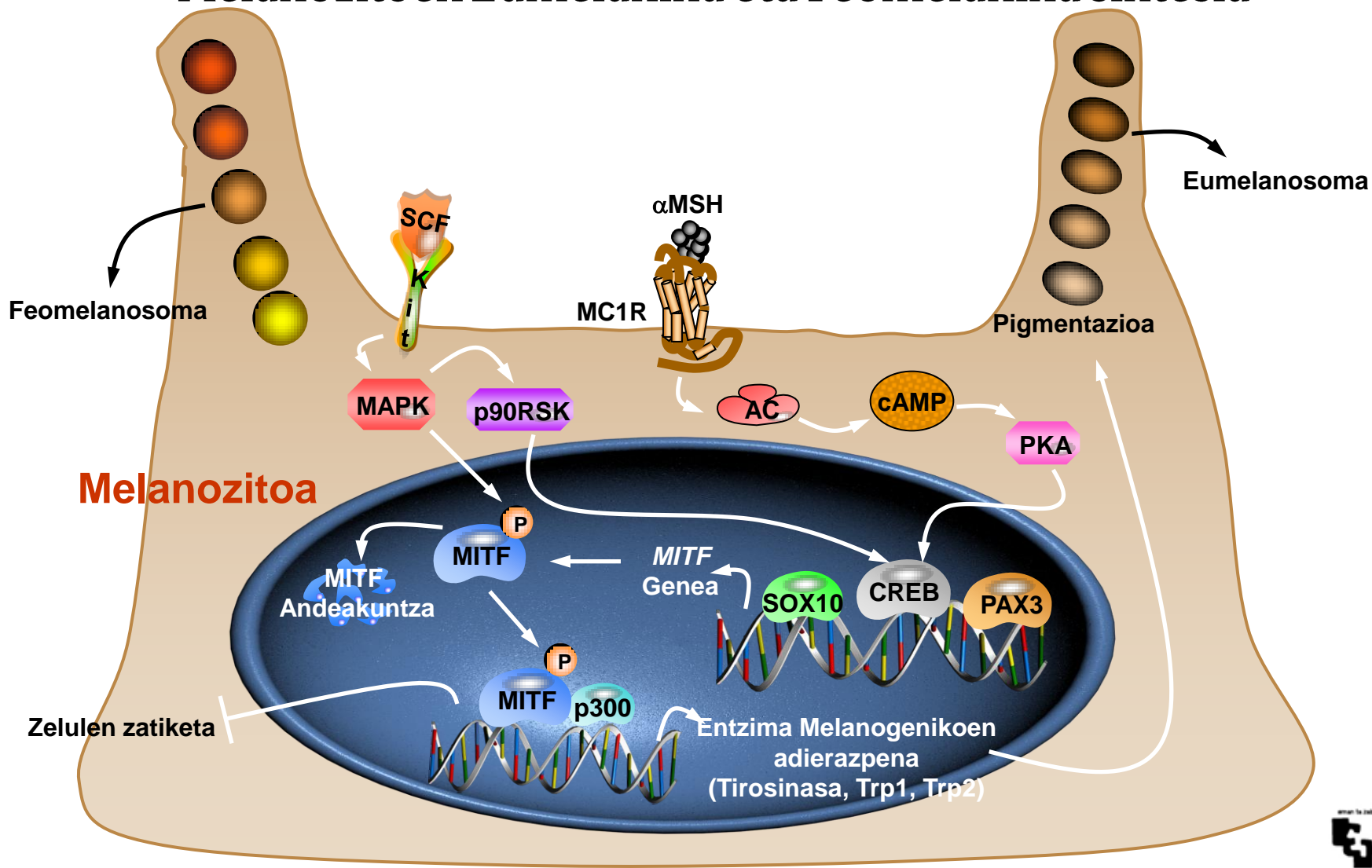
- Despigmmentazioaren ondorio negatibo bat, azaleko melanoma edukitzeko arriskuaren handipen bat izango litzateke, gehiegizko eguzki-erradiazioaren eraginez sortzen den minbizi mota bat zeina melanozitoen transformazio kaltegarria eragiten duen (Robins, 1991).

NOLA SINTETIZATZEN DA MELANINA?

- Melaninaren ekoizpena, **zelulen barneko seinaleztapen** bidezidor konplexu baten azken urratsa da. Bertan, hainbat proteinek (eta genek) parte hartzen dute. Melaninaren sintesiaren gene nagusia, **melanokortinaren 1 hartzailea** (MC1R) kodifikatzen duena da.
- MC1R, **melanozitoen mintzean** agertzen den proteina bat da eta hauek ekoizten duten melanina mota kontrolatzen du. Hartzailea aktibatzen denean, erreakzio kimikoen ur-jauzi bat gertatzen da melanozitoaren barnealdean eta eumelaninaren ekoizpenaren handipenean gauzatzen dira. Hartzailea aktibo ez badago edo **blokeatuta** badago, melanozitoek **eumelanina** sintetizatu beharrean, feomelanina sintetizatzen dute (Garcia-Borrón *et al.*, 2014).

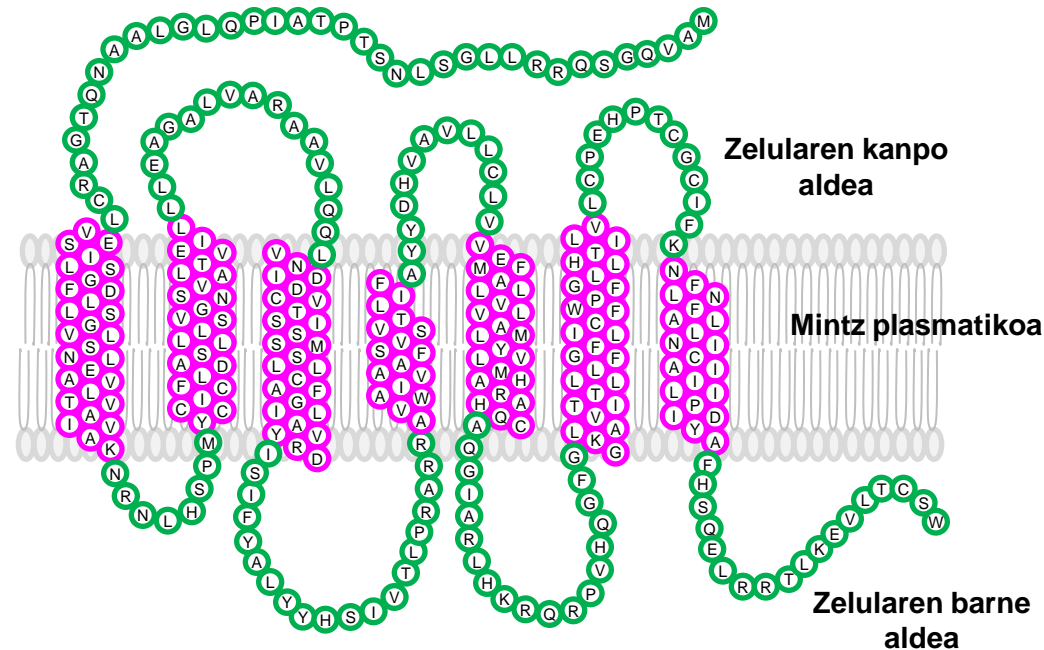


Melanozitoen Eumelanina eta Feomelanina sintesia



MC1R PROTEINA

- MC1R 7 trans-mintz domeinu dituen mintz hartzaile bat da. Bere agonistari lotzen zaionean, α -MSH (**m**elanocyte **s**timulating **h**ormone) hormona, eumelaninaren sintesia eragiten du (Garcia-Borrón *et al.*, 2014).



MC1R-REN BIDEZIDORRA AKTIBATZEN DITUZTEN KINADAK

MC1R-ren aktibazioa eta hartzaile honek eraentzen duen bidezidorraren aktibazioa hainbat faktoreren menpe kitzikatu daiteke:

- Melanizoten hormona estimulatzailea (melanotropina, α -MSH)
- hormona adrenokortikotropikoa (ACTH)
- Argi ultramorea (UVB)

MC1R AKTIBAZIO AURREKO ERANTZUNA

- MC1R-ren kitzikapenak G proteinaren aktibazioa eragiten du, proteinak honek, Adenil ziklasa (AC) entzimaren bitartez, zelula barneko AMPc kontzentrazioen igoera estimulatzen du, eta aldi berean, mikroftalmia transkripzio faktorearena (MITF) ere. Faktore honen adierzpenak tirosinkinasa *Tyr* geneen aktibazioa eragiten du eta amaieran eumelaninaren sintesia. (Sánchez Más *et al.*, 2002).
- Normalen melanogenesiaren aktibazioarekin batera zelulen zatiketaren inhibizioa eragiten du. Honela, MC1R-ren aktibazio batek zatiketa zelularra inhitzen du (Smalley & Eisen, 2000).



Fototipoa melanomaren arrisku-faktore gisa

- Fototipoa (gorputzaren pigmentazio-maila) melanoma izateko arriskuarekin erlazionatuta dago. Larruazal argiko, begi argiko (urdinak/berdeak) eta ile argiko (ilehori/ilegorri) pertsonak azal melanoma bat garatzeko arrisku gehien duten pertsonak dira (Duffy *et al.*, 2010).

	Melanoma Cases		Controls	
	N_inds	%	N_inds	%
Light hair	1265	72.8	2177	53
Dark hair	473	27.2	1931	47
	1738	100.00	4108	100.00

Fisher exact test p-value < 2.2e-16



MC1R eta pigmentu-fototipoa

- Gizakietan, *MC1R* genearen 100 aldakuntza komun (polimorfismoak) baino gehiago detektatu dira.
- Polimorfismo hauetako batzuk, pigmentu-fototipoarekin erlazionaturik daude, eta adibidez, pertsona ilegorri, larruazal argi, eta oreztadunetan maiztasun altuagoetan agertzen dira. Pertsona hauek, eguzki esposiziora sentikorragoak izanik.
- Fenotipo "ilegorria"rekin lotutako aldagai aleliko adibide esanguratsuenak, R151C, R160W eta D294H mutazioak dira. hauek munduan dauden pertsona ilegorrien %60an agertzen dira.



MC1R eta pigmentu-fototipoa

aa variant	rs ID	ODD RATIOS ¹		
		pale vs dark skin (p-val)	blue eyes (p-val)	² light vs dark hair (p-val)
V60L	rs1805005	1.01 (0.85)	1 (0.8)	1.13 (0.008)
D84E	rs1805006	5.19 (<1.0e-5)	1.23 (0.61)	1.74 (0.041)
V92M	rs2228479	1.38 (0.024)	1.06 (0.61)	1.17 (0.016)
R142H	rs11547464	1.31 (0.54)	1.03 (0.71)	1.28 (0.74)
R151C	rs1805007	2.57 (<1.0e-5)	1.09 (0.94)	2.13 (<1.0e-5)
R160W	rs1805008	1.72 (<1.0e-5)	1.12 (0.17)	1.82 (<1.0e-5)
R163Q	rs885479	1.1 (0.53)	1.21 (0.15)	1.12 (-0.014)
D294H	rs1805009	2.88 (<1.0e-5)	1.16 (0.74)	1.68 (<1.0e-5)
³ “R”		3.7 (<1.0e-5)	1.09 (0.43)	2.3 (<1.0e-5)
⁴ “r”		1.84	1.1	1.26

¹ Odds ratio = bi proportzioen proportzio erlatiboa erakusten du: fototipo eta alelo mutatua duten indibiduoena, fototipo jakin (i.e. pale skin) eta alelo mutatu gabekoa (kasu honetan) duten indibiduo kontrolen proportzio ekibalentearekikoa (i.e. dark skin). Gutxi gora behera: zenbat aldiz probableagoa da larruazal argia edukitzea (adibidez) larruazal ilunarekiko baldin eta mutazio berdina badaukazu.

² Light hair=blond, light brown, red.

³ R = High-penetrance red hair color MC1R haplotype: variant at D84E, R142H, R151C, R160W, or D294H.

⁴ r = Low-penetrance red hair color MC1R haplotype: variant at V60L, V92M, or R163Q.

Duffy et al (2010) Journal of Investigative Dermatology 130:520–528-ren datuak



MC1R eta azal melanomaren arriskua

- 3 aldagai aleliko hauek melanomaren arrisku altuagoarekin asoziatu daude eta baita bestelako larruazal minbiziekin.

aa variant	rs ID	ODD RATIOS for CMM ¹ (p-val)
V60L	rs1805005	1.01 (0.80)
D84E	rs1805006	1.61 (0.013)
V92M	rs2228479	1.07 (0.53)
R142H	rs11547464	2.25 (0.055)
R151C	rs1805007	1.58 (7.0e-4)
R160W	rs1805008	1.68 (<1.0e-4)
R163Q	rs885479	1.15 (0.54)
D294H	rs1805009	1.42 (0.019)
2''R''		1.65 (<1.0e-5)
3''r''		1.10

¹ CMM = Cutaneous Malignant Melanoma

² R = High-penetrance red hair color MC1R haplotype: variant at D84E, R142H, R151C, R160W, or D294H.

³ r = Low-penetrance red hair color MC1R haplotype: variant at V60L, V92M, or R163Q.



MC1R genea eta azal melanomaren arriskua

- Aldagai hauen erlazioa melanomarekin, batez ere R151C mutazioa, nahiko onarturik dauden arren, erlazio honen azpian dagoen molekulen mekanismoa konplexua da, eta ez dago guztiz argituta.
- Posible da MC1R proteinen konformazioa aldatzen duten modifikazioek, eta batez ere aminoazido abarren gainekoak eta oso kontsarbaturak daudenak, 151 kasu, funtzio melanigenikoaren gain eragina edukitzea.
- Hau horrela bada, mota honetako mutazioek melaninaren ekoizpenaren gain eragina edukiko lukete, eta pigmentuaren menpeko babesaren gain eragingo lukete. Horrela, melaninaren metaketa txikiago batek fotobabespen txikiagoa eragingo luke, eta ezegonkortasun genomikoa eragingo luke (Sánchez Más *et al.* 2002).



MC1R genea eta azal melanomaren arriskua

- Gainera, aldaketa hauek MC1R eraentzen dituen pigmentu menpeko babes mekanismoak ere blokeatu ditzakete. Beraz, mutazio hauek dituzten melanozitoek, MC1R aktibazioak eragiten duen zatiketa aurkako kitzikapenarekiko erregogorrak izango lirатеke (Smalley *et al.* 2000).

HIPOTESIA

- *MC1R* genean dibertsitate genikoa dago giza populazioetan
- *MC1R* genearen sekuentzia arbasoa eumelaninaren sintesian bukatzen duen seinaleztapen bidezidor baten aktibazioa baimentzen duen proteina funtzional bat kodifikatzen du

Lan honetan planteatzen den **hipotesia** hurrengoa da: *MC1R* proteinaren konformazioa asaldatzen dituzten modifikazioek eta bereziki oso kontserbaturik dauden aminoazido abarrei dagozkienak bere funtzioaren gain eragiten dute.



HELBURU OROKORRAK

1. Kontserbatutako zonaldeetan eragiten duten eta giza populazioetan deskribaturiko aldagai alelikoetako bat, R151C zehazki, MC1R-ren gain modifikazioak eragiten dituen aztertzea, bai melanozitoek eumelanina sintetizatzen duten ahalmenean eta baita zelulen zatiketa blokeatzeko duen ahalmenean.
2. Hau horrela izango balitz eta aldagai alelikoa eguneko giza populazioetan eta iraungita dauden beste *Homo* taldeetan sakabanapen zabala duela kontutan hartuta, hurrengo helburua aldagi honek izan ditzakeen inplikazio ebolutibo eta medikoak aztertze izango litzateke, eumelanina sintetizatzen duen gaitasunarekin erlazionatuz eta MC1R funtzionalki inplikaturik egon litekeen beste funtzio batzuekin.



BIBLIOGRAFIA

- Duffy DL, Zhao ZZ, Sturm RA, Hayward NK, Martin NG, Montgomery GW. Multiple pigmentation gene polymorphisms account for a substantial proportion of risk of cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 2010; 130(2):520-8.
- García-Borrón JC, Abdel-Malek Z, Jiménez-Cervantes C. MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27(5):699-720.
- Robins AH. (1991). Biological perspectives in human pigmentation. Cambridge University Press. ISBN-9780521365147.
- Sánchez Más J, Olivares Sánchez C, Ghanem G, Haycock J, Lozano Teruel JA, García-Borrón JC, Jiménez-Cervantes C. Loss-of-function variants of the human melanocortin-1 receptor gene in melanoma cells define structural determinants of receptor function. *Eur J Biochem.* 2002; 269(24):6133-41.
- Smalley K, Eisen T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. *FEBS Lett.* 2000;476(3):198-202.



GOMENDATUTAKO IRAKURKETAK

- Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymiska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postep Derm Alergol* 2013; 1: 30-41.
- Maresca V, Flori E, Picardo M. Skin phototype: a new perspective. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2015; 28 (4): 378–389.
- Nasti TH, Timares L. MC1R, eumelanin and pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochem Photobiol*. 2015; 91 (1):188-200.
- Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Human Molecular Genetics*, 2009;18: 9-17.
- Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The Regulation of Skin Pigmentation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007. 282, 27557-27561.