



Aktywność tyrozynazy w skórze trzech odmian albinotycznych Gekona Lamparciego (*Eublepharis macularius*)

Ryc. 1. Dorosły osobnik gekona lamparciego.

Tony Gamble¹,
Jodi L. Aherns²,
oraz Virginia Card³

1,3 Metropolitan State University,
700 East 7th Street, St. Paul MN 55106
1 Current address: University of Minnesota,
100 Ecology, 1987 Upper Buford Circle,
St. Paul MN 55108
email: gamb1007@umn.edu
2 2946 Thomas Avenue North, Minneapolis
MN 55411

Wstęp

Kolor i wzór na skórze gadów jest tworzony dzięki kombinacji pigmentów i związków strukturalnych. Pigment jest zawarty w trzech typach wyspecjalizowanych komórek skóry, lub inaczej chromatoforów, mianowicie melanoforach, ksantoforach (włączając erytrofory) i irydoforach. Pierwszy typ komórek, melanofory, znajduje się w skórze właściwej i naskórku. Melanofory produkują pigment melaninę, która jest gromadzona w organellach zwanych melanosomami (Bechtel, 1995). Melanina odpowiada za czarny i brązowy kolor, czasami także za ubarwienie żółte i czerwone.

Drugi typ komórek, ksantofory (i erytrofory) są komórkami położonymi głównie w skórze właściwej i produkują pigmenty z rodziny pterydyn, które są gromadzone w pterydosomach, organellach podobnych do

melanosomów. Pterydyny są w przeważającej większości żółte lub pomarańczowe. Ksantofory pełnią także funkcję magazynującą rozpuszczalne w tłuszczach karotenoidy zdobyte z pokarmu. Ksantofory i erytrofory wyróżnia się głównie na podstawie koloru, odpowiednio żółtego i czerwonego, który jest determinowany przez proporcję karotenoidów do pterydyn osobno w każdej komórce.

(Cooper i Greenberg, 1992; Bechtel, 1995). Trzecim rodzajem chromatoforów są irydofory, gromadzące skryzalizowane puryny, ułożone w stosy w organellach nazywanych płytkami refleksyjnymi. Płytki są bezbarwne ale mocno załamują światło, dając różne kolory zależnie od tego jak ułożone są krystaliczne puryny. Irydofory znaleźć można w skórze właściwej i są odpowiedzialne za niebieską barwę gadziej skóry (Bechtel, 1995).

Defekty w normalnej produkcji barwników, mimo że rzadkie, jednak się zdarzają. Prawdopodobnie najbardziej uderzającym z tych defektów jest albinizm, wrodzona wada powodująca niedobór barwnika.



Ryc. 2. Gekon odmiany Tremper albino.



Ryc. 3. Gekon odmiany Rainwater albino.



Ryc. 4. Gekon odmiany Bell albino.

Niezdolność do produkcji normalnej ilości pigmentu przez melanofory nazywana jest amelanizmem, przez ksantoforyksantyzmem, zaś przez erytroforyanerytryzmem. Amelanizm był notowany u wielu gatunków węży, ale u niewielu jaszczurek (Bechtel, 1995).

Z powodu dużej różnorodności chromatoforów w skórze gadów, zazwyczaj defekt w jednym ich typie nie wpływa na funkcjonowanie innych typów chromatoforów.

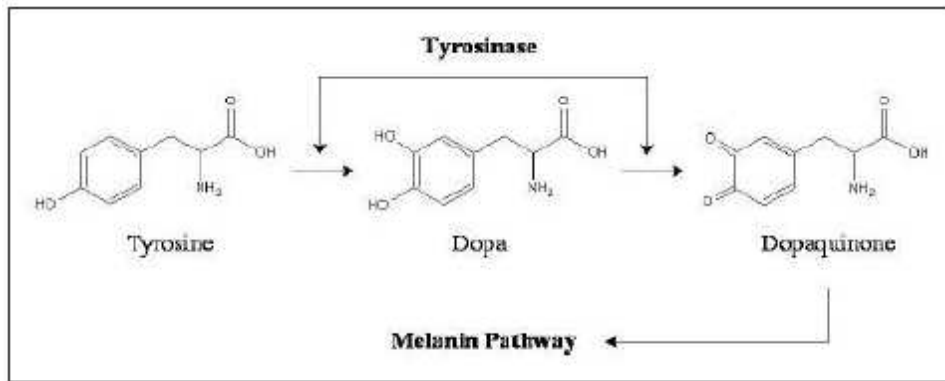
Kontrast występujący pomiędzy skupiskami komórek funkcjonujących normalnie a niepigmentowanymi sprawia, że wiele

albinotycznych gadów jest bardzo kolorowe, szczególnie w porównaniu z albinotycznymi ssakami. Ssaki posiadają wyłącznie melanofory i dobrze znane szczepy albinosów (np. myszy laboratoryjnych i królików) są białe ponieważ nie występują u nich inne komórki pigmentowe, które nadawałyby im kolor.

Gekon lamparci (*Eublepharis macularius*) jest średniej wielkości jaszczurką powszechnie hodowaną jako zwierzę domowe. W ciągu ostatnich dziesięciu lat pojawiło się kilka dziedzicznych mutacji koloru i wzoru. Trzy z takich mutantów, znane jako Tremper albino, Bell albino i Rainwater albino (od nazwisk komercyjnych hodowców którzy spopularyzowali linie) dają amelanistyczne fenotypy (Ryc. 2-4). Wszystkie mutanty wywodzą się od normalnie ubarwionych przodków importowanych z Pakistanu w latach 90' (R. Tremper, przekaz ustny) i uważa się je za niezależne od siebie. Krzyżowanie albinosów pokazało, że każda z linii albinotycznych jest efektem mutacji w pojedynczym recesywnym allelu. (J. Aherns, dane niepublikowane). Krzyżówki testowe wykazały że te trzy linie są między sobą niekompatybilne. Krzyżówka Rainwater albino z Tremper albino dla przykładu daje fenotypowo dzikie osobniki.

Dostępne dowody wskazują na to, że wszystkie odmiany są rezultatem albo mutacji w różnych genach albo mutacji alleli tego samego genu. Cechą charakterystyczną wszystkich mutacji jest redukcja lub eliminacja czarnego pigmentu. Obszary na skórze które powinny być brązowe lub czarne u dziko ubarwionych gekonów są u albinosów zwykle białawe lub koloru lawendy ('lavender'), rzadziej jasnobrązowe.

Produkcja melaniny jest procesem kilkietapowym, kontrolowanym przez wiele genów (Ryc. 5). Pierwszym etapem w szlaku metabolicznym melaniny jest transformacja aminokwasu tyrozyny do L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (dopa). Dopa jest utleniana do dopachinonu, który w końcu przekształcany jest w melaninę. Pierwsze dwa etapy tego procesu katalizuje enzym tyrozynaza. Wszystkie trzy reakcje zachodzą w melanosomach wewnątrz melanoforów. Brak tyrozynazy jest powszechną przyczyną albinizmu u ludzi i zwierząt (Bechtel, 1995).



Ryc. 5. Tyrozinaza katalizuje dwa pierwsze etapy w szlaku syntezy melaniny: hydroksylację aminokwasu tyrozyny do dopy (dihydroksyfenyloalaniny) i następujące po niej utlenienie do dopachinonu. Kolejne reakcje są niezależnych od tyrozyny i prowadzą do powstania polimeru, melaniny.

Jednakże nie wszystkie albinosy są pozbawione tyrozinazy, takie mutanty nazywa się albinosami tyrozinazopozytywnymi (T+). Nieumiejętność produkcji normalnych ilości melaniny u tych osobników jest efektem jakiegoś niezależnego defektu w szlaku syntezy melaniny albo w mechanizmie transportu prekursorów lub produktu (Bechtel, 1995).

Ponieważ albinosy tyrozinazopozytywne wciąż mogą produkować pewną ilość melaniny i/lub jej prekursorów, są one zwykle ciemniej ubarwione niż albinosy nie produkujące tyrozinazy. U dwóch gatunków gadów stwierdzono formy albinotyczne zarówno T+ jak i T- : u węża smugowego *Elaphe obsoleta* i norowca zwyczajnego *Pituophis catenifer* (Bechtel et al., 1980; Bechtel i Bechtel, 1981; Bechtel i Bechtel, 1985). U obu gatunków albinosy tyrozinazopozytywne są bardziej kolorowe i mają bardziej wyraźny wzór niż blade albinosy tyrozinazonegatywne. Aktywność tyrozinazy w skórze może być zmierzona przy użyciu testu dopy, w którym kawałek skóry inkubuje się w roztworze dopy (Bechtel et al., 1980). Albinos tyrozinazonegatywny nie będzie wykazywał reakcji i melanocyty pozostaną niezabarwione. Tyrozinazopozytywny albinos przeciwnie, melanocyty rozwiną silną pigmentację z powodu produkcji melaniny, dzięki reakcji katalizowanej przez tyrozinazę. Test dopy został już wykorzystany do badania aktywności tyrozinazy w skórze albinotycznych węży (Bechtel et al., 1980; Bechtel and Bechtel, 1981; Bechtel and Bechtel, 1985).

W niniejszej pracy przedstawimy wyniki testu dopy na aktywność tyrozinazy u trzech albinotycznych odmian gekona lamparciego i

zasugerujemy pewne wnioski odnośnie tych mutacji.

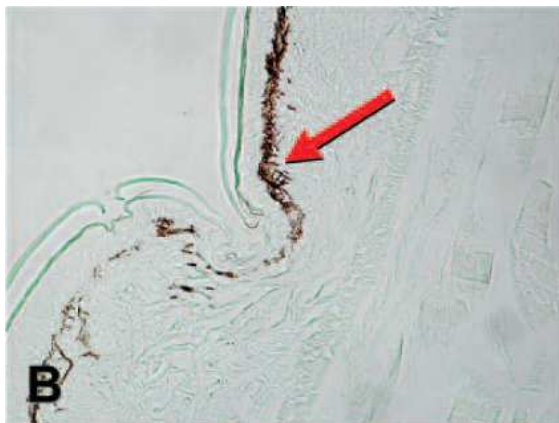
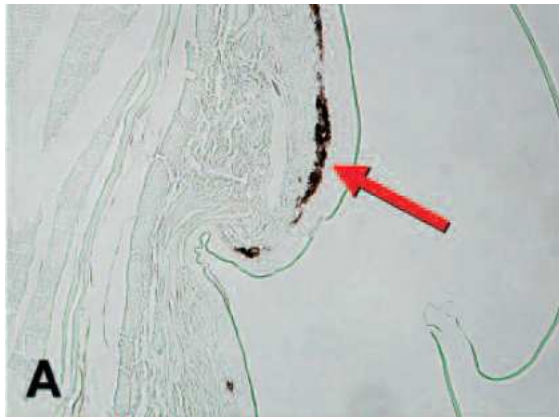
Materiały i metody

Próbki skóry zostały pobrane od czterech osobników: dziko ubarwionego gekona, albinosa odmiany Tremper, Rainwater oraz Bell. Końcówka ogona została usunięta przez odcięcie, następnie przy pomocy skalpela wycięte zostały dwie 3-4mm biopsje. Gekony lamparcie regenerują utracony ogon a sama procedura nie przysparza zwierzętom nadmiernego stresu.

Próbki ogona poddano dwóm schematom postępowania: właściwej reakcji oraz reakcji kontrolnej. Próbki poddane właściwej reakcji eksponowano na działanie dopy tak jak opisano poniżej. Próby kontrolne poddano tym samym zabiegom z wyjątkiem inkubacji w roztworze dopy.

Wszystkie biopsje były inkubowane w 10% roztworze formaliny przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Biopsje poddane reakcji z dopą zostały wyciągnięte i inkubowane w 0,01%, zbuforowanym roztworze dopy. Roztwór dopy wykonano rozpuszczając 0,01g L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (dopy) w 100ml buforu fosforanowego o pH 7.4 (Shimizu et al., 1994). Biopsje mogły ulegać reakcji w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Ten czas reakcji jest trzy razy dłuższy niż rekomendowany przez Bechtela et al. (1980) ale skóra od normalnie ubarwionego gekona (typu dzikiego) nie wykazywała żadnych zmian po 8 godzinach inkubacji. Biopsje kontrolne inkubowane były w czystym buforze fosforanowym bez dopy.

Wszystkie biopsje po inkubacji z powrotem przełożono do formaliny do analizy histologicznej. Próby utrwalono w parafinie, oprawiono i pocięto na mikrotomie. Skrawki osadzono na szkiełkach szklanych i przeanalizowano pod mikroskopem świetlnym. Wykonano przynajmniej po sześć skrawków z każdej próby. Każdy skrawek został przebadany, wykonano też zdjęcia cyfrowe.



Ryc. - Skrawek ogona gekona lamparciego typu dzikiego, kontrola. Strzałka wskazuje obszar z dużą koncentracją melanoforów.

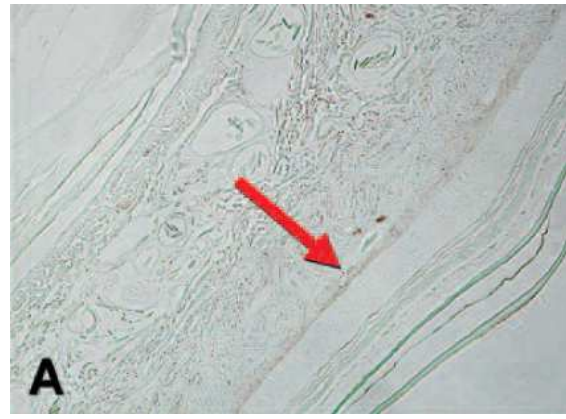
Ryc. 6B - Skrawek ogona gekona lamparciego typu dzikiego, inkubowany z dopą. Strzałka wskazuje na dużą koncentrację melanoforów. Zauważmy zwiększoną widoczność wypustek odchodzących z melanoforów.

Wyniki

Melanofory dziko ubarwionych gekonów traktowane dopą pozostały niezmienione pod względem zabarwienia w porównaniu z kontrolą, natomiast rozgałęzienia którymi komórki się kontaktują stały się dużo bardziej widoczne po reakcji z tym odczynnikiem (Ryciny 6A i 6B).

Melanofory były widoczne u wszystkich trzech odmian albinosów mimo że były one znacznie jaśniejsze niż u typu dzikiego.

Melanofory odmiany Tremper znacznie pociemniały po inkubacji w dopie, ponieważ nastąpiła produkcja melaniny, która potwierdziła obecność tyrozynazy (Ryciny 8A i 8B). Melanofory odmiany Rainwater także były po inkubacji z dopą ciemniejsze niż kontrola, co świadczy o obecności tyrozynazy (Ryciny 8A i 8B). Natomiast melanofory odmiany Bell po inkubacji w dopie były tylko nieznacznie ciemniejsze od kontroli, jednakże



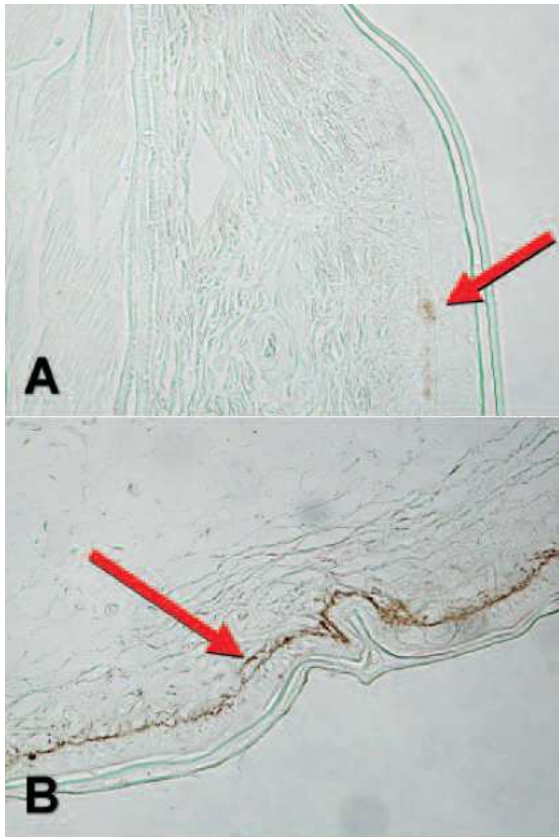
Ryc.7A - Skrawek ogona gekona Tremper albino, kontrola. Strzałka wskazuje obszar z dużą koncentracją melanoforów.

Ryc.7B - Skrawek ogona gekona Tremper albino inkubowany z dopą. Strzałka wskazuje dużą koncentrację melanoforów, które są rozróżnialnie ciemniejsze od melanoforów z próby kontrolnej.

melanofory kontroli dla odmiany Bell były także ciemniejsze niż Tremper i Rainwater. W związku z tym obecność tyrozynazy także została potwierdzona (Ryciny 9A i 9B).

Dyskusja

Wszystkie trzy formy albinotyczne gekona lamparciego poddane testowi okazały się być tyrozynazopoztywne. Zwiększona ilość melaniny, która skutkowałą pociemnieniem melanoforów po traktowaniu dopą potwierdza obecność tyrozynazy. Możliwość dostrzeżenia jasnej pigmentacji melanoforów w kontrolnych skrawkach pochodzących od albinosów także wskazuje na istnienie choćby niewielkiej ilości melaniny przed inkubacją w dopie i dostarcza dodatkowych dowodów, że tyrozynaza jest obecna. Zmniejszona produkcja melaniny mogła być spowodowana mniejszą aktywnością tyrozynazy lub upośledzonym



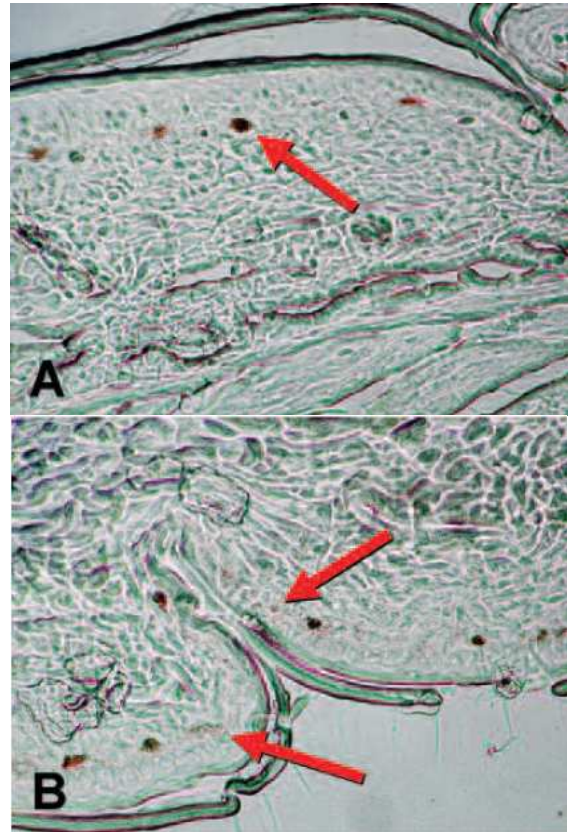
Ryc.8A Skrawek ogona gekona Rainwater albino, kontrola. Strzałka wskazuje wysoką koncentrację melanoforów.

Ryc.8B Skrawek ogona gekona Rainwater albino inkubowany z dopą. Strzałka wskazuje dużą koncentrację melanoforów, które są rozróżnialnie ciemniejsze od melanoforów z próby kontrolnej.

transportem prekursorów melaniny do komórek lub wewnątrz nich.

Potwierdzenie obecności tyrozynazy to ważny etap w opisie różnic pomiędzy trzema typami albinotycznych gekonów lamparcich. Chociaż wszystkie trzy formy są tyrozynazopoztywne, nie oznacza to, że formy te są identyczne.

Niealleliczny albinizm jest dość powszechny, np. u myszy istnieje ogółem 800 alleli w 127 loci, które wpływają na pigmentację (Bennett i Lamoreux, 2003)! Jest także wiele znanych albinosów wśród gadów, na przykład wśród węży smugowych (*Elaphe obsoleta*), grzechotników teksańskich (*Crotalus atrox*) i norowców zwyczajnych (*Pituophis catenifer*) (Bechtel, 1995). Niealleliczne formy albinizmu mogą być wynikiem mutacji w różnych genach odpowiadających za produkcję melaniny albo różnych mutacji w tym samym genie. Albinizm został dobrze opisany u ludzi i myszy i przeprowadzone badania mogą dostarczyć informacji na temat albinizmu u innych gatunków.



Ryc. 9A Skrawek ogona gekona Bell albino, kontrola. Strzałka wskazuje pojedynczy melanofor.

Ryc. 9B - Skrawek ogona gekona Bell albino inkubowany z dopą. Strzałka wskazuje region z intensywniejszym zabarwieniem melanoforów niż w próbie kontrolnej.

Mogą istnieć podobieństwa pomiędzy tyrozynazopozywny albinizmem u gekona lamparciego, a na przykład pewnymi ludzkimi lub mysimi formami bielactwa skórno-ocznego, rodzajem nieprawidłowości związanych z niedostatkim lub brakiem melaniny. Bielactwo skórno-ocznego typu 1 (OCA1) jest spowodowane mutacją w genie tyrozynazy. Jeden z wariantów mutacji (OCA1B) to mutacja powodująca „przeciek”, produkcja tyrozynazy nie jest do końca zahamowana, ale utrzymana na poziomie rzędu 1-10% normalnej produkcji enzymu (Oetting et al., 1996). Osobniki z OCA1B mogą posiadać różną pigmentację, od kompletnego braku pigmentu do piegów a niektóre mogą nabierać do pewnego stopnia opalenizny (Carden et al., 1998). Bielactwo skórno-ocznego typu 2 (OCA2) jest określane mianem T+ ponieważ nie dotyczy ono tyrozynazy ale genu kodującego białko P (Carden et al., 1998). Funkcja białka P jest nieznana ale może być związana z transportem tyrozyny do melanosomów (Rinchik et al., 1993).

Bielactwo skórno-oczne typu 3 (OCA3) jest powodowane przez gen białka tyrozinazopodobnego 1 (TRP-1). TRP-1 stabilizuje tyrozinazę i inne enzymy w melanosomach (Carden et al., 1998). Melanina jest wciąż produkowana przez osobniki z OCA3 ale jest ona zawsze brązowa, więc skóra i włosy są dużo jaśniejsze niż normalnie. Dalsze prace są konieczne by znaleźć konkretny mechanizm molekularny dla mutacji u trzech odmian albinotycznych gekona lamparciego, które zostały tu omówione. Kolejnym krokiem będzie zsekwencjonowanie genów takich jak gen tyrozinazy, gen białka P i TRP-1. Możliwość znalezienia loci zaangażowanych w rozwój albinizmu na poziomie molekularnym da wgląd w mechanizm produkcji melaniny u gadów i w efekcie da odpowiedzi na pytania związane z termoregulacją i behawiorem, związanymi z gadzim ubarwieniem.

Podziękowania

M. Baldel, M. Bell, D. Ferrara i K. Hanley za użyczenie dodatkowych okazów do badań. D. Obberreit, C. Newsom, M. Bell, K. Hanley i R. Tremper za podzielenie się wiedzą na temat odmian albinotycznych gekonów lamparcich. R. Stroebel za pomoc w laboratorium. K. Van Patten za dostarczenie ekspertyz histologicznych.

Artykuł przełożyła na język polski Marzena (Keplianica) Pieronkiewicz. Wszelkie prawa do tego artykułu posiadają jego autorzy, zainteresowanych odsyłam do strony internetowej <http://www.tc.umn.edu/~gamb1007> oraz do oryginału tego artykułu: http://www.tc.umn.edu/~gamb1007/publications/Gamble_etal_2006_Tyrosinase.pdf

Prawa do niniejszego tłumaczenia posiada serwis terrarystyczny terrarium.com.pl

Cytowana literatura

Bechtel, H. B. 1995. Reptile and Amphibian Variants: Colors Patterns and Scales. Kreiger Publishing Company, Malabar, FL, USA.

Bechtel, H. B. and E. Bechtel. 1981. Albinism in the snake *Elaphe obsoleta*. Journal of Herpetology 15:397-402

Bechtel, H. B. and E. Bechtel. 1985. Genetics of color mutations in the snake, *Elaphe obsoleta*. The Journal of Heredity 76: 7-11.

Bechtel, H. B., J. W. Nelson and E. Bechtel. 1980. Histochemical demonstration of two types of albinism in San Diego gophersnakes (*Pituophis melanoleucus annectens*). Copeia 1980: 932-935.

Bennett, D. C. and M. L. Lamoreux. 2003. The color loci of mice—a genetic century. Pigment Cell Research 16: 333-344.

Carden, S. M., R. E. Boissy, P. J. Schoettker and W. V. Good. 1998. Albinism: modern molecular diagnosis. British Journal of Ophthalmology 82: 189-195.

Cooper, W. E. and N. Greenberg. 1992. Reptilian coloration and behavior. (C. Gans and D. Crews, editors) Biology of the Reptilia, Volume 18, Physiology E, Hormones, Brain, and Behavior. University of Chicago Press, Chicago, USA.

Oetting, W. S., M. H. Brilliant and R. A. King. 1996. The clinical spectrum of albinism in humans. Molecular Medicine Today 2(8):330-5.

Rinchik, E. M., S. J. Bultman, B. Horsthemke, S. T. Lee, K. M. Strunk, R. A. Spritz, K. M. Avidano, M. T. Jong and R. D. Nicholls. 1993. A gene for the mouse pinkeyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. Nature 361: 72-76.

Shimizu, H., A. Ishiko, A. Kikuchi, M. Akiyama, K. Suzumori and T. Nishikawa. 1994. Prenatal diagnosis of tyrosinase-negative oculocutaneous albinism by an electron microscopic dopa reaction test of fetal skin. Prenatal Diagnosis 14: 443-450.