

Received: 2011.11.18  
Accepted: 2012.01.11  
Published: 2012.01.30

## Regulacja melanogenezy: rola cAMP i MITF

### Regulation of melanogenesis: the role of cAMP and MITF

Michał Otręba, Jakub Rok, Ewa Buszman, Dorota Wrześniok

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Katedra i Zakład Chemii i Analizy Leków

#### Streszczenie

W artykule przedstawiono przebieg melanogenezy oraz udział cAMP i czynnika transkrypcyjnego MITF w regulacji tego procesu. Produktami melanogenezy są eu- i/lub feomelaniny powstające w wyniku wieloetapowego procesu utleniania i polimeryzacji tyrozyny. W przemianach tych biorą udział następujące enzymy: tyrozynaza (TYR, główny enzym), izoforma I hydroksylazy tyrozynowej (THI) oraz białka związane z tyrozynazą (TRP1 i TRP2). W procesie regulacji syntezy melaniny uczestniczą liczne białka sygnałowe oraz czynniki transkrypcyjne, spośród których najważniejsze znaczenie mają cAMP i MITF. cAMP jest przekaźnikiem drugiego rzędu w wewnątrzkomórkowej kaskadzie sygnalizacyjnej. Syntetyzowany jest z adenosynotrifosforanu (ATP) przez cyklazę adenylanową aktywowaną m.in. przez receptor melanokortynowy oraz podjednostkę  $\alpha_s$  białka G. Przełącznik ten bierze udział w regulacji transkrypcji MITF, TYR, THI, GTP-cyklohydroksylazy I (GTP-CHI) oraz w fosforylacji Ser<sup>16</sup> w hydroksylazie fenyloalaninowej (PAH) przez kinazę białkową A (PKA). Mutacje genów kodujących białka uczestniczące w kaskadzie wykorzystującej cAMP mogą prowadzić do występowania zespołów McCune'a-Albrighta oraz Carneya. MITF jest jednym z najważniejszych jądrowych czynników transkrypcyjnych regulujących proces melanogenezy. Znanych jest 10 izoform MITF, przy czym w melanocytach występują tylko izoformy MITF-M, MITF-Mdel, MITF-A oraz MITF-H. Czynniki transkrypcyjne MITF reguluje melanogenezę poprzez aktywację transkrypcji genów TYR, TRP1 oraz TRP2. MITF wpływa ponadto na ekspresję innych czynników biorących udział w dojrzewaniu, biogenezie i transporcie melanosomów. MITF uczestniczy także w regulacji proliferacji melanocytów i ich ochronie przed apoptozą. Mutacje genu MITF mogą prowadzić do występowania dziedzicznych zespołów Waardenburga typu 2 oraz Tietza.

#### Słowa kluczowe:

melanogeneza • cAMP • MITF • tyrozynaza • THI • TRP1 • TRP2

#### Summary

The article presents the melanogenesis pathway and the role of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and microphthalmia transcription factor (MITF) in regulation of this process. Products of melanogenesis are eu- and/or pheomelanins synthesized in a multistage process of tyrosine oxidation and polymerization. The conversions require the presence of tyrosinase (TYR, key enzyme), tyrosine hydroxylase isoform I (THI) and tyrosinase related proteins (TRP1 and TRP2). Many types of signal molecules and transcription factors participate in regulation of melanin synthesis, but the most important are cAMP and MITF. cAMP is the second messenger in the intracellular signal cascade, which is synthesized from adenosine triphosphate (ATP) by adenylyl cyclase, activated among others by the melanocortin receptor and the  $\alpha_s$  subunit of G protein. The signal molecule cAMP regulates MITF, TYR, THI, GTP-cyclohydroxylase I (GTP-CHI) transcription and phenylalanine hydroxylase (PAH) phosphorylation at Ser<sup>16</sup> by protein kinase A (PKA). Mutations of genes encoding proteins belonging to the cAMP signal cascade may lead to McCune-Albright and Carney syndromes. MITF is one of the most important nuclear

transcription factors regulating melanogenesis. Currently 10 isoforms of human MITF are known, but in melanocytes only MITF-M, MITF-Mdel, MITF-A and MITF-H occur. MITF transcription factor regulates melanogenesis by activation of tyrosinase, TRP1 and TRP2 transcription. It also affects expression of other factors regulating melanosome maturation, biogenesis and transport. Moreover, it regulates melanocyte proliferation and protection against apoptosis. Mutations of the MITF gene may lead to hereditary diseases: Waardenburg type II and Tietz syndromes.

**Key words:** melanogenesis • cAMP • MITF • tyrosinase • THI • TRP1 • TRP2

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=979388>

**Word count:** 2722

**Tables:** –

**Figures:** 1

**References:** 39

**Adres autora:** prof. dr hab. Ewa Buszman, Katedra i Zakład Chemii i Analizy Leków, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec; e-mail: ebuszman@sum.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **ACTH** – hormon adrenokortykotropowy (adrenocorticotropic hormone); **ATP** – adenozyntrifosforan (adenosine triphosphate); **cAMP** – cykliczny adenozyntriofosforan (cyclic adenosine monophosphate); **CBP** – białko wiążące CREB (CREB-binding protein); **CRE** – element odpowiedzi na cAMP (cAMP responsive element); **CREB** – białko wiążące CRE (CRE-binding protein); **DAG** – diacyloglicerol (diacylglycerol); **DCoH** – kofaktor odpowiedzialny za dimeryzację HNF-1 $\alpha$  (dimerisation cofactor of HNF-1 $\alpha$ ); **DCT** – tautomeraza DOPachromu (DOPachrome tautomerase); **DHI** – 5,6-dihydroksyindol (5,6-dihydroxyindole); **DHICA** – kwas 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksylowy (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid); **L-DOPA** – 3,4-dihydroksy-L-feniloalanina (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine); **ERK** – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (extracellular signal-regulated kinase); **GDP** – guanozynodifosforan (guanosine diphosphate); **GPCR** – receptory związane z białkiem G (G protein-coupled receptors); **GSK-3 $\beta$**  – kinaza syntazy glikogenu 3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ); **GTP** – guanozyntrifosforan (guanosine triphosphate); **GTP-CHI** – GTP-cyklohydroksylaza I (GTP-cyclohydroxylase I); **HNF-1 $\alpha$**  – czynnik jądrowy hepatocytów 1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ); **LAT1** – transporter dużych aminokwasów 1 (large amino acid transporter 1); **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogen (mitogen activated protein kinase); **MC1R** – receptor melanokortynowy typu 1 (melanocortin 1 receptor); **MITF** – czynnik transkrypcyjny związany z mikroftalmią (microphthalmia associated transcription factor); **MSH** – hormon stymulujący melanocyty (melanocyte stimulating hormone); **NADPH4** – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (nicotinamide adenine dinucleotide); **NF- $\kappa$ B** – czynnik jądrowy kappa B (nuclear factor kappa B); **p53RE** – element odpowiedzi na p53 (p53 responsive element); **PAH** – hydroksylaza feniloalaninowa (phenylalanine hydroxylase); **PK** – kinaza białkowa (protein kinase); **RACK-I** – receptor aktywowanej kinazy C I (receptor for activated C kinase I); **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **RPE** – nabłonek barwnikowy siatkówki (retinal pigment epithelium); **RSK** – kinaza rybosomalna R6 (ribosomal R6 kinase); **RTK** – kinaza receptora tyrozyny (receptor tyrosine kinase); **THI** – izoforma I hydroksylazy tyrozynowej (tyrosine hydroxylase isoform I); **TRP** – białko związane z tyrozinazą (tyrosinase related protein); **TYR** – tyrozinaza (tyrosinase); **hUBC9** – ludzki enzym sprzęgający ubikwitynę (human ubiquitin conjugating enzyme 9).

## WSTĘP

Melaniny są barwnikami występującymi w organizmach żywych, mającymi zdolność absorbowania i rozpraszania promieniowania UV. Dzięki temu ograniczają powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS – reactive oxygen species), chroniąc komórki przed uszkodzeniami DNA, białek i lipidów [12,20]. Melaniny mają ponadto zdolność

neutralizacji wolnych rodników, czym przypominają właściwości dysmutazy ponadtlenkowej [12]. Synteza melanin odbywa się w wyniku procesu melanogenezy, który zachodzi w wyspecjalizowanych organellach – melanosomach, znajdujących się w komórkach barwnikowych zwanych melanocytami. Regulacja procesu melanogenezy jest niezwykle złożona i obejmuje udział czynników fizycznych (np. promieniowanie UV), biochemicznych: endokrynnych

(np. hormon melanotropowy, adrenokortykotropina, estrogeny), parakrynych (np. epinefryna, endotelina 1, prostatazyna  $F_{2\alpha}$ ) i autokrynych (np. interleukina  $1\alpha$  i  $1\beta$ , leukotrien B<sub>4</sub>) [1,5,23,26]. Wszystkie te czynniki wpływają na aktywność wewnątrzkomórkowych kaskad sygnalizacyjnych prowadząc do regulacji syntezy melaniny w melanocytach. Najważniejsze z punktu widzenia regulacji melanogenezy są kaskady z udziałem cyklicznego adenylozomonofosforanu (cAMP) oraz czynnika transkrypcyjnego związanego z mikroftalmią (MITF).

## MELANOGENEZA

### Biosynteza tyrozyny

Substratem w biosyntezie eu- i feomelaniny jest tyrozyna, która powstaje z L-fenylalaniny. L-fenylalanina dostaje się do wnętrza melanocyta z udziałem transportera LAT1 (large amino acid transporter) i  $Ca^{2+}$ /ATP-azy [26]. Aminokwas ten ulega utlenieniu do L-tyrozyny w obecności hydroksylazy fenylalaninowej (PAH – phenylalanine hydroxylase). PAH jest cytoplazmatycznym enzymem, którego aktywność wymaga obecności kofaktora (6R)-L-erytro-5,6,7,8-tetrahydrobiopteryny ( $6BH_4$ ) i tlenu cząsteczkowego. Aktywacja PAH następuje w wyniku fosforylacji  $Ser^{16}$  przez kinazę białkową A (PKA – protein kinase A), co przedstawiono na ryc. 1A [23,26,30]. Kofaktor  $6BH_4$  powstaje *de novo* z udziałem GTP-cyklohydroksylazy I (GTP-CHI – GTP-cyclohydroxylase I) i pełni funkcję donora elektronu podczas hydroksylacji aminokwasów aromatycznych. W wyniku reakcji powstaje 4a-OH-tetrahydrobiopteryna ( $4a-OH-BH_4$ ), która ulega nieenzymatycznemu przekształceniu do kofaktora (7R)-L-erytro-5,6,7,8-tetrahydrobiopteryny ( $7BH_4$ ) lub pod wpływem dehydratazy  $4a-OH-BH_4$  do chinonoidu dihydrobiopteryny ( $qBH_2$ ).  $qBH_2$  w obecności dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH) ulega następnie redukcji do wyjściowej postaci kofaktora  $6BH_4$ , który razem z L-tyroziną zostaje przetransportowany do melanosomu na zasadzie dyfuzji ułatwionej [28]. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę, że  $6BH_4$  jest jednym z czynników regulujących zabarwienie skóry, czego potwierdzeniem jest korelacja poziomu  $6BH_4$  w skórze z fototypami skóry I–VI [9,27].

### Tyrozynaza

L-tyrozyna ulega w melanosomie przekształceniu do 3,4-dihydroksy-L-fenylalaniny (L-DOPA) z udziałem tyrozynazy (TYR). Enzym ten, zwany także oksydazą tyrozynową, oksydazą DOPA, oksydazą monofenolową lub tlenową oksydoreduktazą L-DOPA, jest glikoproteina, zbudowana z 511 aminokwasów o masie 60–75 kDa [17,20,26,35]. Proces translacji mRNA tyrozynazy w melanocytach przebiega z udziałem rybosomów szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. Powstałe białko jest następnie transportowane do aparatu Golgiego. Tam ulega glikozylacji, co pozwala tyrozynazie uzyskać prawidłową strukturę i funkcję. W kolejnym etapie tyrozynaza zostaje przetransportowana do melanosomów, gdzie uczestniczy w procesie biosyntezy melaniny [35].

W budowie tyrozynazy wyróżnić można trzy główne domeny [2,4,35]:

- N-końcowa, umiejscowiona wewnątrz melanosomu, która stanowi około 90% białka i jest odpowiedzialna za

aktywność katalityczną enzymu oraz syntezę melaniny w melanosomie,

- C-końcowa, znajdująca się w cytoplazmie melanocyta, zbudowana z 30 aminokwasów, w tym 17 cystein, odpowiedzialna za wewnątrzkomórkowy transport tyrozynazy,
- transbłonowa o helikalnej strukturze łącząca domeny N- i C-końcowe.

W domenie C-końcowej znajduje się charakterystyczna dla tyrozynazy sekwencja: kwas glutaminowy-X-X-glutamina-prolina-leucyna-leucyna (X-dowolny aminokwas), która odpowiada za lokalizację oraz aktywność enzymu [23].

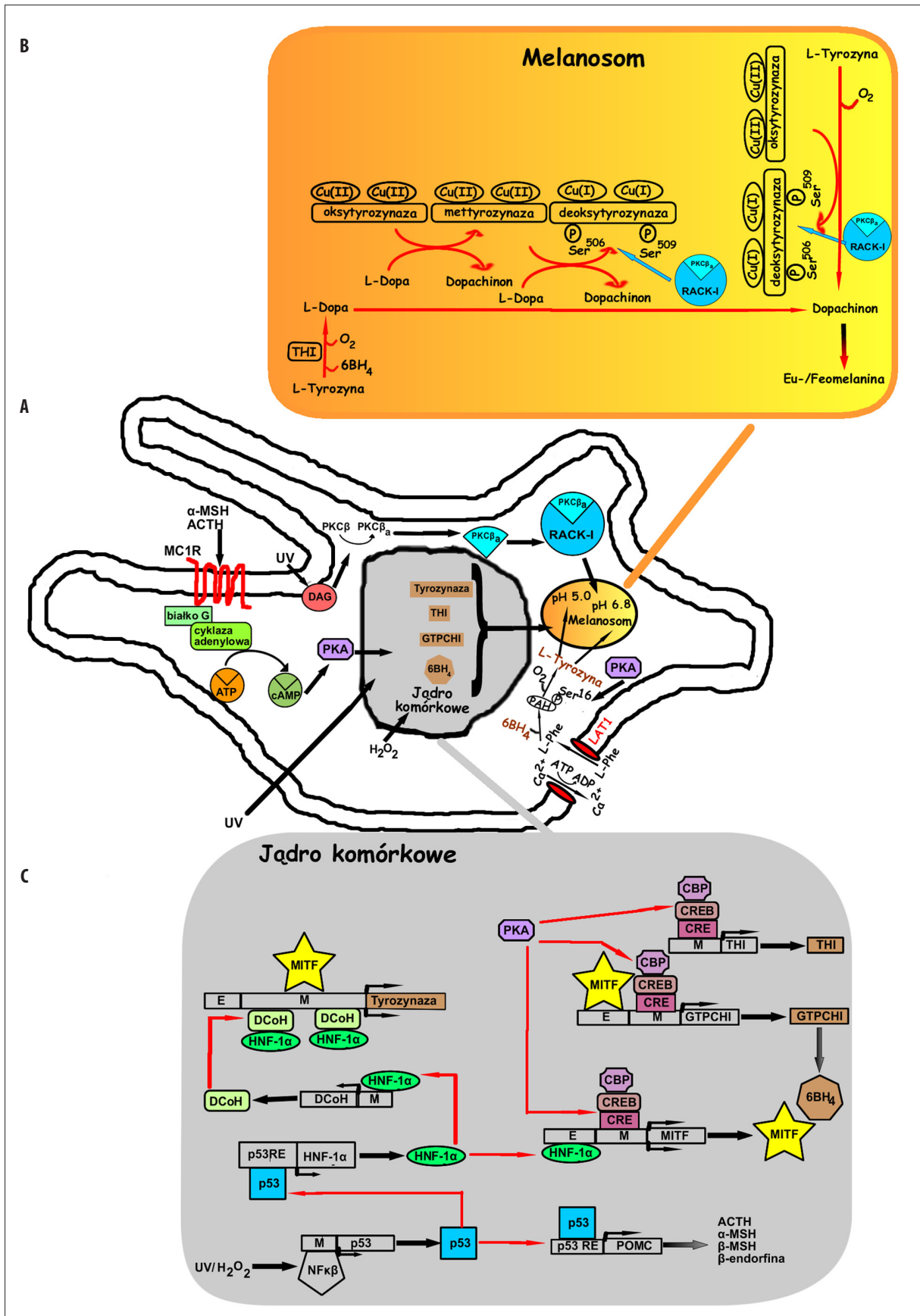
W centrum aktywnym enzymu w domenie N-końcowej znajdują się dwa atomy miedzi, które są związane koordynacyjnie z trzema resztami histydyny [23,26]. W procesie melanogenezy uczestniczą trzy różne formy tyrozynazy [2]:

- oksytyrozynaza, z dwoma atomami miedzi Cu(II), które wiążą cząsteczkę tlenu tworząc mostek nadtlenny,
- metytyrozynaza, z dwoma atomami miedzi Cu(II) połączonymi ligandem zawierającym grupę hydroksylową,
- deoksytyrozynaza, z dwoma atomami miedzi Cu(I).

Aktywacja enzymu wymaga fosforylacji dwóch reszt serynowych ( $Ser^{505}$ ,  $Ser^{509}$ ) na końcu domeny C [26]. Proces ten zachodzi z udziałem kinazy białkowej C $\beta$  (PKC $\beta$ ) oraz receptora aktywowanej kinazy C I (RACK-I – receptor for activated C kinase I). Kinaza PKC $\beta$ , aktywowana przez diacyloglicerol (DAG), tworzy kompleks z receptorem RACK-I, który po przyłączeniu do błony melanosomu, fosforyluje reszty serynowe tyrozynazy [23]. Fosforylacja serynu pozwala na przyłączenie cząsteczki L-tyrozyny do enzymu i rozpoczęcie procesu melanogenezy (ryc. 1A i 1B) [23,26]. Aktywność tyrozynazy jest także regulowana przez obecne w melanosomach kofaktory:  $6BH_4$  oraz jego izomer  $7BH_4$ , które są zdolne do tworzenia z tyrozynazą kompleksu w stosunku 1:1, co powoduje zahamowanie jej aktywności [9,26]. Proces ten jest odwracalny dzięki obecnym w melanosomach hormonom  $\alpha$ -MSH i  $\beta$ -MSH, które mogą spowodować odłączenie wspomnianych wcześniej kofaktorów z wytworzeniem kompleksów:  $\alpha$ -MSH –  $6BH_4$  i  $\beta$ -MSH –  $7BH_4$  i jednoczesnym przywróceniem aktywności enzymu [26].

### TRP1, TRP2

Poza tyrozynazą w procesie melanogenezy uczestniczą również takie enzymy jak białko związane z tyrozynazą 1 (TRP1 – tyrosinase related protein 1; oksydaza DHICA – oksydaza kwasu 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksylowego) i tautomeraza DOPACHromu (DCT – dopachrome tautomerase; TRP2 – tyrosinase related protein 2). Enzymy te są białkami podobnymi strukturalnie do tyrozynazy, wspólnie z nią wykazują 40% homologię aminokwasową oraz podobnie jak tyrozynaza, są umiejscowione w błonie melanosomów [9,23]. TRP1 jest oksydazą biorącą udział w końcowym etapie melanogenezy; może zwiększać stosunek eumelaniny do feomelaniny, a ponadto uczestniczy w aktywacji i stabilizacji tyrozynazy w wyniku tworzenia z nią kompleksu. TRP2 jest tautomerazą odpowiedzialną za przekształcenie DOPACHromu do pochodnej kwasu karboksylowego. W melanosomie tworzy kompleksy z tyrozynazą oraz TRP1. W przeciwieństwie do tyrozynazy, aktywność enzymatyczna TRP2 wymaga obecności głównie jonów  $Zn^{2+}$ , a nie  $Cu^{2+}$  [23].



Ryc. 1. Rola cAMP i MITF w regulacji melanogenezy; **A** – przebieg i regulacja melanogenezy w melanocycie, **B** – przebieg syntezy DOPachinonu w melanosomie, **C** – regulacja ekspresji genów związanych z melanogenezą (wg [1,7, 23, 26] zmodyfikowano)

## Przebieg melanogenezy

Melanogeneza rozpoczyna się przekształceniem L-tyrozyny do DOPACHINONU. Proces ten może zachodzić dwuetapowo z udziałem izoformy I hydroksylazy tyrozynowej THI (tyrosine hydroxylase isoform I) i tyrozynazy lub jednoetapowo z udziałem tyrozynazy.

Przeprowadzone przez Marlesa i wsp. [21] badania wykazały, że utlenianie L-tyrozyny przez THI zachodzi w obecności kofaktora  $6BH_4$  i tlenu cząsteczkowego w środowisku o pH=5,0. Produktem tej reakcji jest L-DOPA, która następnie ulega utlenieniu do DOPACHINONU z udziałem oksytyrozynazy. W wyniku tej reakcji forma oksyenu zostaje przekształcona do met-, która następnie utlenia kolejną cząsteczkę L-DOPA przechodząc w deoksytyrozynazę [2,24,26] (ryc. 1B).

L-tyrozyna może również zostać utleniona do DOPACHINONU w jednoetapowej reakcji katalizowanej przez tyrozynazę i przebiegającej w środowisku o pH=6,8. Reakcji tej towarzyszy przekształcenie enzymu z formy oksy- w deoksy- [2,24,26]. Powstała deoksytyrozynaza przyłącza następnie cząsteczkę tlenu i przechodzi w formę oksy-, zamykając tym samym cykl katalityczny [2,24] (ryc. 1B). Zmiana wartości pH=5,0 na pH=6,8 wewnątrz melanosomu możliwa jest dzięki obecności białka p, które należy do rodziny błonowych transporterów  $Na^+/SO_4^{2-}$  – SLC13 [4,26].

Kolejne przekształcenia DOPACHINONU uzależnione są od obecności związków tiolowych np. cysteiny, czy glutationu. Badania Ito i wsp. [14] wskazują, że głównym czynnikiem decydującym o przekształceniu DOPACHROMU, a tym samym o syntezie feo- lub eumelaniny jest stężenie cysteiny wewnątrz melanosomów. Jeżeli wynosi ono powyżej 0,13  $\mu M$ , to z DOPACHINONU powstaje 3- lub 5-cysteinyloDOPA, których utlenienie z udziałem peroksydazy i polimeryzacja prowadzą do otrzymania żółtoczerwonej feomelaniny [14,31]. Natomiast w przypadku, gdy stężenie cysteiny jest poniżej 0,13  $\mu M$ , to DOPACHINON z udziałem tyrozynazy przekształca się do DOPACHROMU. W kolejnym etapie DOPACHROM może ulec nieenzymatycznej dekarboksylacji do 5,6-dihydroksyindolu (DHI) lub tautomeryzacji z udziałem TRP2 do kwasu 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksylowego (DHICA). Powstałe hydroksylowe pochodne indolu są następnie utleniane odpowiednio do indolo-5,6-chinonu pod wpływem tyrozynazy i/lub peroksydazy oraz do kwasu indolo-5,6-chinono-2-karboksylowego pod wpływem TRP1 [6,19,30,31,39]. Powstałe produkty chinonowe ulegają następnie polimeryzacji, prowadząc do powstania brązowoczarnej eumelaniny [39].

## SYNTEZA cAMP I ROLA W REGULACJI MELANOGENEZY

cAMP jest przekaźnikiem drugiego rzędu w sygnalizacji komórkowej, który powstaje z udziałem cyklazy adenylanowej. Enzym ten, umiejscowiony na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej, katalizuje przekształcenie ATP do cAMP. Aktywacja cyklazy adenylanowej następuje m.in. za pośrednictwem transbłonowego receptora melanokortynowego typu 1 (MC1R – melanocortin 1 receptor), co przedstawiono na ryc. 1A. MC1R należy do receptorów związanych z białkiem GS (GPCR) i może

być aktywowany zarówno przez hormon  $\alpha$  stymulujący melanocyty ( $\alpha$ -MSH) jak i hormon adrenokortykotropowy (ACTH). Białko GS zbudowane jest z trzech podjednostek:  $\alpha_s$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Po związaniu liganda z receptorem następuje zmiana konformacji receptora i aktywacja białka GS, co skutkuje odłączeniem nukleotydu GDP i związaniem GTP do podjednostki  $\alpha_s$ , która następnie zostaje uwolniona z kompleksu i aktywuje cyklazę adenylanową [1,7,33]. Ważną rolę cAMP w regulacji melanogenezy podkreśla mutacja skutkująca aktywacją podjednostki  $\alpha_s$  u pacjentów z zespołem McCune'a-Albrighta, która objawia się m.in. występowaniem na skórze dużych obszarów hiperpigmentacyjnych [16].

Badania przeprowadzone przez Spencera i wsp. [34] wykazały możliwość regulacji melanogenezy przez cAMP w wyniku oddziaływania hormonu  $\beta$ -MSH z receptorem MC4R.

cAMP jest istotnym czynnikiem stymulującym melanogenezę, co następuje poprzez aktywację kinazy białkowej A (PKA) i regulację transkrypcji genów MITF, GTP-CHI oraz THI [1]. Aktywacja PKA następuje przez przyłączenie się cAMP do dwóch podjednostek regulatorowych enzymu, w wyniku czego dochodzi do uwolnienia i aktywacji dwóch podjednostek katalitycznych. Dzięki temu kinaza białkowa jest zdolna do fosforylacji m.in. białek regulatorowych, innych enzymów i kanałów jonowych. Może ona również zostać przetransportowana z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie fosforyluje czynniki transkrypcyjne CREB (cAMP responsive element binding protein). Zaktywowane w ten sposób białka CREB wiążą się z domeną CRE (cAMP responsive element) w obrębie promotora genu. PKA fosforyluje również białka CBP wiążące CREB (CREB-binding protein), które są niezbędne w regulacji transkrypcji genów docelowych [1] (ryc. 1C). Istotne znaczenie PKA w melanogenezie podkreśla mutacja aktywująca genu PKA występująca w zespole Carneya, który objawia się m.in. plamistymi zmianami barwnikowymi skóry [16].

cAMP uczestniczy w regulacji procesu melanogenezy wpływając na transkrypcję genów TYR, THI oraz GTP-CHI, za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych CBP i białek CREB [20,26]. cAMP ponadto bierze udział w aktywacji PAH poprzez PKA, która odpowiada za fosforylację Ser<sup>16</sup> w tym enzymie [20].

Warto zaznaczyć, że wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP prowadzi do aktywacji szlaku Ras/ERK (extracellular signal-regulated kinase). cAMP aktywuje białko Ras, które należy do rodziny białek G i podobnie jak podjednostka  $\alpha_s$  odłącza GDP i wiąże się z GTP. Białko Ras aktywuje następnie kinazę B-Raf odpowiedzialną za fosforylację kinazy MAP (mitogen activated protein kinase), co prowadzi do aktywacji kinaz serynowo-treoninowych ERK1 i ERK2 [1,7]. Kinazy te fosforylują Ser<sup>73</sup> w czynniku MITF, co umożliwia przyłączenie się ludzkiego enzymu sprzęgającego ubikwitynę hUBC9 (human ubiquitin conjugating enzyme) i skierowanie MITF do proteasomów, gdzie zostaje on poddany degradacji [1]. Aktywacja szlaku Ras/ERK przez cAMP prowadzi do zahamowania melanogenezy, a to stanowi mechanizm sprzężenia zwrotnego i zapobiega nadmiernemu wytwarzaniu melaniny, które mogą okazać się toksyczne dla komórek [16].

## MITF – STRUKTURA I FUNKCJE

### Struktura i izoformy MITF

MITF jest czynnikiem transkrypcyjnym, w budowie którego można wyróżnić następujące domeny [1,25]:

- C-kończącą domenę zasadową, odpowiedzialną za wiązanie z DNA i aktywację transkrypcji,
- sekwencję helisa-pętla-helisa z domeną zamka leucynowego (bHLH-LZ) odpowiedzialną za oddziaływania typu białko-białko i tworzenie homo- i heterodimerów,
- N-kończącą domenę transaktywacyjną, znajdującą się powyżej domeny zasadowej.

Ze względu na to, że MITF wykazuje duże podobieństwo strukturalne do innych czynników transkrypcyjnych np. TFEB, TFEB i TFEC, może z nimi tworzyć heterodimery [1]. Zdolność rozpoznawania sekwencji M-box (AGTCATGTGCT) i E-box (CATGTG) genów kodujących enzymy uczestniczące w procesie melanogenezy oraz regulowania transkrypcji genów TYR, TRP1, TRP2 i PKC $\beta$  wykazuje tylko ufosforylowana postać MITF. Fosforylacja MITF następuje poprzez kinazę MAPK oraz kinazę syntazy glikogenu (GSK-3 $\beta$  – glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ), których aktywacja jest zależna od receptorów RTK (receptor tyrosine kinase), np. C-Kit [10,23]. Fosforylacja, oprócz aktywacji czynnika MITF, prowadzi również do obniżenia jego stabilności i degradacji w proteasomach [23]. GSK-3 $\beta$  fosforyluje Ser<sup>298</sup> białka MITF, co umożliwia wiązanie się MITF z DNA [10]. Z kolei fosforylacja Ser<sup>73</sup> i Ser<sup>409</sup> odpowiednio przez kinazę ERK oraz RSK (ribosomal R6 kinase) umożliwia oddziaływanie MITF z enzymem sprzęgającym ubikwitynę hUBC9, co prowadzi do degradacji MITF w proteasomach. [1,16,17,18,20].

Znanych jest 10 izoform czynnika MITF: MITF-A, MITF-B, MITF-C, MITF-D, MITF-E, MITF-H, MITF-J, MITF-M, MITF-Mdel i MITF-Mc, przy czym w melanocytach występują tylko izoformy MITF-M, MITF-Mdel, MITF-A oraz MITF-H. [24,26,39]. Izoformy te zawierają w regionie N-końcowym charakterystyczną dla siebie domenę odpowiednio M, A oraz H. Gen każdej z izoform, oprócz MITF-Mdel, ma charakterystyczną sekwencję promotorową, co sugeruje pełnienie różnych funkcji w zależności od rodzaju komórek, w których ulegają ekspresji [25].

Izoforma MITF-M ulega ekspresji tylko w melanocytach prawidłowych wywodzących się z grzebienia nerwowego oraz w komórkach czerniaka. Spośród wszystkich izoform MITF jest najkrótsza, bo zbudowana z 419 aminokwasów i ma charakterystyczną domenę M zbudowaną z 10 aminokwasów [36]. Niedawno odkrytym wariantem MITF-M jest MITF-Mdel, który powstaje w wyniku alternatywnego składowania genu [38].

W odróżnieniu od MITF-M i MITF-Mdel, pozostałe izoformy zawierają w domenie N-końcowej charakterystyczną domenę B1b zbudowaną z 83 aminokwasów [25].

MITF-A jest najdłuższą izoformą, zbudowaną z 520 aminokwasów. Najwyższy poziom ekspresji tej izoformy występuje w nabłonku barwnikowym siatkówki (RPE – retinal pigment epithelium). Ulega także ekspresji w innych typach komórek barwnikowych, m.in. w melanocytach

prawidłowych i komórkach czerniaka. MITF-A ma charakterystyczną domenę A zbudowaną z 35 aminokwasów [25,36].

MITF-H jest izoformą zbudowaną z 519 aminokwasów i ulega ekspresji wraz z MITF-A w melanocytach prawidłowych oraz komórkach czerniaka. Ma domenę H zbudowaną z 19 aminokwasów [25,36].

W komórkach RPE ekspresji ulega izoforma MITF-C, która nie występuje w melanocytach prawidłowych i komórkach czerniaka. Jest zbudowana z 519 aminokwasów i ma charakterystyczną domenę C zbudowaną z 34 aminokwasów [25,36].

### Funkcje MITF

Ekspresja czynnika transkrypcyjnego MITF regulowana jest bezpośrednio przez czynnik jądrowy HNF-1 $\alpha$  (hepatocyste nuclear factor 1 $\alpha$ ) oraz białko CREB.

Czynnik jądrowy HNF-1 $\alpha$  bierze bezpośrednio udział w indukcji ekspresji genów MITF i tyrozynazy [26]. Inicjacja transkrypcji HNF-1 $\alpha$  jest zależna od białka p53, które przyłącza się do sekwencji p53RE (p53 responsive element) w genie *HNF-1 $\alpha$*  [15,26]. Ekspresja genu p53 regulowana jest m.in. przez jądrowy czynnik NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B). Powstały HNF-1 $\alpha$  wiąże się z sekwencją E-box genu MITF i razem z CREB związanym z sekwencją M-box uczestniczy w transkrypcji MITF [26] (ryc. 1C).

W regulacji ekspresji genu tyrozynazy główną rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne MITF, HNF-1 $\alpha$  oraz kofaktor odpowiedzialny za dimeryzację HNF-1 $\alpha$  (DCoH - dimerisation cofactor of HNF-1 $\alpha$ ). HNF-1 $\alpha$  wiąże się z sekwencją M-box genu kofaktora DCoH, powodując jego transkrypcję. Powstały z udziałem DCoH homodimer HNF-1 $\alpha$  oraz czynnik MITF wiążą się z sekwencją M-box promotora genu tyrozynazy w wyniku rozpoznania 16-zasadowej odwróconej sekwencji palindromowej, prowadząc do jego transkrypcji [26]. Możliwość regulacji ekspresji genów TRP1 oraz TRP2 przez czynnik MITF wynika z obecności sekwencji M-box i E-box w promotorach tych genów [1]. Transkrypcja genu GTP-cyklohydroksylazy I (GTP-CHI) jest możliwa dzięki związaniu się czynnika MITF i białka CREB odpowiednio z sekwencją E-box oraz M-box tego genu. Powstały w ten sposób GTP-CHI jest najważniejszym enzymem w syntezie kofaktora 6BH<sub>4</sub> [3,26] (ryc. 1C).

Czynnik MITF pełni także funkcję głównego regulatora melanogenezy na poziomie transkrypcyjnym w odniesieniu do melanosomów – poprzez możliwość indukcji ekspresji genów biorących udział w biogenezie, dojrzewaniu oraz transporcie melanosomów [21,38]. MITF może ponadto aktywować transkrypcję receptora melanokortynowego typu 1 (MC1R), z którym wiąże się m.in. hormon  $\alpha$ -MSH, odpowiedzialny za regulację procesu melanogenezy oraz proliferację i tworzenie wypustek melanocytów [25,35].

W stosunku do melanocytów MITF może wykazywać zarówno działanie pro-, jak i antyproliferacyjne. Czynnik transkrypcyjny MITF może brać udział w stymulacji proliferacji poprzez indukcję transkrypcji genu cyklinozależnej kinazy 2 lub indukcję ekspresji genu białka

Dial, odpowiedzialnego za kontrolę polimeryzacji aktywny. Aktywne białko Dial może także nasilać degradację cyklinozależnego inhibitora kinazy 1B, co z kolei prowadzi do stymulacji proliferacji komórkowej [26].

Czynnik MITF może także uczestniczyć w inhibicji proliferacji w wyniku stymulacji ekspresji genu czynnika transkrypcyjnego TBX2 (brachyury-related transcription factor) lub cyklinozależnego inhibitora kinazy 1A oraz cyklinozależnego inhibitora kinazy 2A. Czynniki TBX2 odpowiada za hamowanie cyklu komórkowego w wyniku inhibicji ekspresji cyklinozależnego inhibitora kinazy 1A [13,25,26]. Czynniki transkrypcyjne MITF może również aktywować inhibitor cyklu komórkowego INK4A (inhibitor of cyclin-dependent kinase 4A), co zapobiega proliferacji komórek i pozwala na ich dojrzewanie i różnicowanie [13]. Wykazano ponadto udział czynnika MITF w ochronie komórek przed apoptozą przez indukcję ekspresji następujących białek: Bcl-2, inhibitorów apoptozy czerniaka (np. ML-IAP, BIRC7, LIPIN), receptora czynnika wzrostu hepatocytów, endonukleazy APEX1 (apurinic/apirymidinic endonuclease 1), czynnika transkrypcyjnego HIF1A (hypoxia inducible factor 1A) oraz receptora endoteliny [15,25].

### Mutacje MITF

Mutacje genu MITF związane są z występowaniem autosomalnych i dominujących zespołów: Waardenburga typu 2 oraz Tietza. W zespole Waardenburga w wyniku mutacji dochodzi do zamiany Ser<sup>298</sup> na alaninę lub prolinę, co uniemożliwia opisaną wcześniej fosforylację MITF przez kinazę GSK-3β [11,16,37]. Objawy charakterystyczne dla

zespołu Waardenburga (występowanie plam na skórze, zmiany w pigmentacji tęczówki oraz utrata słuchu związana z utratą melanocytów w prążku naczyniowym ślimaka) są konsekwencją zmniejszenia liczby melanocytów [18,25]. Z kolei w zespole Tietza zaobserwowano zamianę Lys<sup>210</sup> na asparaginę oraz delecję Arg<sup>217</sup> [32,36]. Objawami charakterystycznymi dla tego zespołu są: całkowita utrata słuchu, hipopigmentacja [36].

### PODSUMOWANIE

Proces melanogenezy zachodzi w wyspecjalizowanych organellach – melanosomach, które znajdują się w komórkach barwnikowych zwanych melanocytami. Substratem w syntezie melanin jest tyrozyna, która w wyniku wieloetapowego procesu utleniania i polimeryzacji zostaje przekształcona do eu- i/lub feomelaniny. Przemiany te katalizowane są przez następujące enzymy: tyrozinazę (TYR, enzym główny), THI, oraz TRP1 i TRP2. Do najważniejszych czynników regulujących proces melanogenezy należą cAMP oraz MITF, które uczestniczą w regulacji ekspresji genów enzymów biorących udział w syntezie melanin.

cAMP oraz MITF uczestniczą ponadto w dojrzewaniu, biogenezie i transporcie melanosomów, a także w regulacji proliferacji i procesu apoptozy melanocytów. Znajomość przebiegu kaskad związanych z udziałem cAMP oraz czynnika transkrypcyjnego MITF może się przyczynić do lepszego zrozumienia i poznania molekularnych mechanizmów regulacji procesu melanogenezy oraz opracowania terapii dziedzicznych zespołów Waardenburga typu 2, Tietza, McCune'a-Albrighta oraz Carneya.

### PIŚMIENICTWO

- [1] Busca R., Ballotti R.: Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.*, 2000; 13: 60–69
- [2] Chang T.S.: An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2009; 10: 2440–2475
- [3] Chavan B., Gillbro J.M., Rokos H., Schallreuter K.U.: GTP cyclohydrolase feedback regulatory protein controls cofactor 6-tetrahydrobiopterin synthesis in the cytosol and in the nucleus of epidermal keratinocytes and melanocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 2006; 126: 2481–2489
- [4] Cheli Y., Luciani F., Khaled M., Beuret L., Bille K., Gounon P., Ortonne J.P., Bertolotto C., Ballotti R.: αMSH and cyclic AMP elevating agents control melanosome pH through a protein kinase A – independent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 18699–18706
- [5] Costin G.E., Hearing V.J.: Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.*, 2007; 21: 976–994
- [6] Curto E.V., Kwong C., Hermersdorfer H., Glatz H., Santis C., Virador V., Hearing V.J., Dooley J., Dooley T.P.: Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *In vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 1999; 57: 663–672
- [7] Dumaz N., Marais R.: Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. *FEBS J.*, 2005; 272: 3491–3504
- [8] Funasaka Y., Boulton T., Cobb M., Yarden Y., Fan B., Lyman S.D., Williams D.E., Anderson D.M., Zakut R., Mishima Y., Halaban R.: c-Kit kinase induces a cascade of protein tyrosine phosphorylation in normal human melanocytes in response to mast cell growth factor and stimulates mitogen activated protein kinase but is down-regulated in melanomas. *Mol. Biol. Cell*, 1992; 3: 197–209
- [9] Gillbro J.M., Olsson M.J.: The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents – existing and new approaches. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2011; 33: 210–221
- [10] Goding C.R.: Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.*, 2000; 14: 1712–1728
- [11] Hemesath T.J., Steingrímsson E., McGill G., Hansen M.J., Vaught J., Hodgkinson C.A., Arnheiter H., Copeland N.G., Jenkins N.A., Fisher D.E.: Microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes Dev.*, 1994; 8: 2770–2780
- [12] Hoogduijn M.J., Cemeli E., Ross K., Anderson D., Thody A.J., Wood J.M.: Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca<sup>2+</sup>. *Exp. Cell Res.*, 2004; 294: 60–67
- [13] Hoogduijn M.J., Hitchcock I.S., Smit N.M.P., Gillbro J.M., Schallreuter K.U., Genever P.G.: Glutamate receptors on human melanocyte regulate the expression of MITF. *Pigment Cell Res.*, 2005; 19: 58–67
- [14] Ito S., Wakamatsu K.: Chemistry of mixed melanogenesis – pivotal roles of dopaquinone. *Photochem. Photobiol.*, 2008; 84: 582–592
- [15] Kadekaro A.L., Kavanagh R.J., Wakamatsu K., Ito S., Pipitone M.A., Abdel Malek Z.A.: Cutaneous photobiology. The melanocyte vs the sun: Who will win the final round? *Pigment Cell Res.*, 2003; 16: 434–447
- [16] Khaled M., Larrriere L., Bille K., Aberdam E., Ortonne J.P., Ballotti R., Bertolotto C.: Glycogen synthase kinase 3β is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 33690–33697
- [17] Kim D.S., Hwang E.S., Lee J.E., Kim S.Y., Kwon S.B., Park K.C.: Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 1699–1706
- [18] Kim D.S., Park S.H., Kwon S.B., Park E.S., Huh C.H., Youn S.W., Park K.C.: Sphingosylphosphorylcholine-induced ERK activation inhibits melanin synthesis in human melanocytes. *Pigment Cell Res.*, 2006; 19: 146–153
- [19] Kobayashi T., Urabe K., Jimenez-Cervantes C., Imokawa G., Brewington T., Solano F., Garcia-Borron J.C., Hearing V.J.: Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J.*, 1994; 13: 5818–5825

- [20] Liu F., Singh A., Yang Z., Garcia A., Kong Y., Meyskens F.L. Jr.: MITF links Erk 1/2 kinase and p21<sup>CIP1/WAF1</sup> activation after UVC radiation in normal human melanocytes and melanoma cells. *Mol. Cancer*, 2010; 9: 1–12
- [21] Marles L.K., Peters E.M., Tobin D.J., Hibberts N.A., Schallreuter K.U.: Tyrosine hydroxylase isoenzyme I is present in human melanosomes: a possible novel function in pigmentation. *Exp. Dermatol.*, 2003; 12: 61–70
- [22] Miranda F.F., Teigen K., Thóroflsson M., Svebak R.M., Knappskog P.M., Flatmark T., Martínez A.: Phosphorylation and mutations of Ser<sup>16</sup> in human phenylalanine hydroxylase. Kinetic and structural effects. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 40937–40943
- [23] Park H.Y., Kosmadaki M., Yaar M., Gilchrist A.: Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009; 66: 1493–1506
- [24] Ramsden C.A., Riley P.A.: Mechanistic studies of tyrosinase suicide inactivation. *ARKIVOC*, 2010; 260–274
- [25] Šamija I., Lukač J., Kusić Z.: Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) – from Waardenburg syndrome genetics to melanoma therapy. *Acta Med. Acad.*, 2010; 39: 175–193
- [26] Schallreuter K.U., Kothari S., Chavan B., Spencer J.D.: Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. *Exp. Dermatol.*, 2008; 17: 395–404
- [27] Schallreuter K.U., Moore J., Tobin D.J., Gibbons N.J., Marshall H.S., Jenner T., Beazley W.D., Wood J.M.:  $\alpha$ -MSH can control the essential cofactor 6-tetrahydrobiopterin in melanogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1999; 885: 329–341
- [28] Schallreuter K.U., Moore J., Wood J.M., Beazley W.D., Peters E.M., Marles L.K., Behrens-Williams S.C., Dummer R., Blau N., Thöny B.: Epidermal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation alters tetrahydrobiopterin (6BH<sub>4</sub>) recycling in vitiligo: Identification of a general mechanism in regulation of all 6BH<sub>4</sub>-dependent processes? *J. Invest. Dermatol.*, 2001; 116: 167–174
- [29] Shin M.H., Jang J. H., Surh Y.J.: Potential role of NF $\kappa$ B and ERK 1/2 in cytoprotection against oxidative cell death by tetrahydropapaveroline. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 1185–1194
- [30] Slominski A., Wortsman J., Plonka P.M., Schallreuter K.U., Paus R., Tobin D.J.: Hair follicle pigmentation. *J. Invest. Dermatol.*, 2005; 124: 13–21
- [31] Slominski A., Zmijewski M.A., Pawelek J.: L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2011; 25: 14–27
- [32] Smith S.D., Kelley P.M., Kenyon J.B., Hoover D.: Tietz syndrome (hypopigmentation/deafness) caused by mutation of MITF. *J. Med. Genet.*, 2000; 37: 446–448
- [33] Spencer J.D., Chavan B., Marles L.K., Kauser S., Rokos H., Schallreuter K.U.: A novel mechanism in control of human pigmentation by  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone and 7-tetrahydrobiopterin. *J. Endocrinol.*, 2005; 187: 293–302
- [34] Spencer J.D., Schallreuter K.U.: Regulation of pigmentation in human epidermal melanocytes by functional high-affinity  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone/melanocortin-4 receptor signaling. *Endocrinology*, 2009; 150: 1250–1258
- [35] Sulaimon S.S., Kitchell B.E.: The biology of melanocytes. *Vet. Dermatol.*, 2003; 14: 57–65
- [36] Tachibana M.: MITF: A stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res.*, 2000; 13: 230–240
- [37] Takeda K., Takemoto C., Kobayashi I., Watanabe A., Nobukuni Y., Fisher D.E., Tachibana M.: Ser<sup>298</sup> of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Hum. Mol. Genet.*, 2000; 9: 125–132
- [38] Wang Y., Radfar S., Liu S., Riker A.I., Khong H.T.: Mitf-Mdel, a novel melanocyte/melanoma-specific isoform of microphthalmia-associated transcription factor-M, as a candidate biomarker for melanoma. *BMC Med.*, 2010; 8: 14
- [39] Yamaguchi Y., Brenner M., Hearing V.J.: The regulation of skin pigmentation. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 27557–27561

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.