

English version below.

AANMAAK EUMELANINE

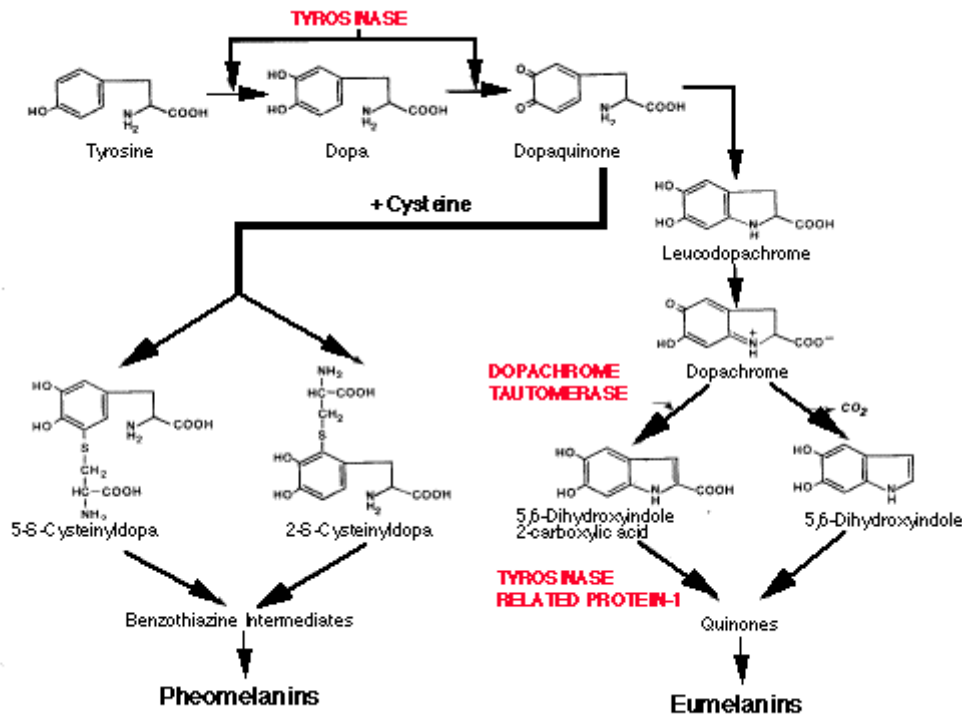
Door Dirk Van den Abeele

02/10/2002

MUTAVI, Research & Advice Group

In de huid van onze vogels bevinden zich cellen die instaan voor het aanmaken van eumelanine en / of phaeomelanine. Deze worden melanocyten of pigmentcellen genoemd. In deze cellen, meer bepaald in het endoplasmatisch reticulum, worden de matrixen van de pigment granules (melanosomen) gevormd. Deze matrixen kan men zich het beste voorstellen als kleurloze vrijwel onzichtbare granules. Deze kleurloze proteïne matrixen worden gevormd uit ten minste vier verschillende eiwitten. Wanneer deze ongekleurde matrixen voltooid zijn, start een chemische reactie die in gang gezet wordt door een bepaald enzym. Een enzym is een stof die een specifieke taak heeft en in dit geval moet het de chemische reactie activeren welke deze matrixen zal zwart kleuren (pigmentsynthese). Dat enzym heet tyrosinase. Tijdens deze chemische reactie zijn er twee mogelijkheden: of er wordt eumelanine gevormd of er wordt phaeomelanine gevormd. Wanneer tijdens het omzettingsproces bij dopaquinone het enzym cysteine wordt bijgevoegd (dit signaal komt van buiten de melanocyt nl. uit de veerfollikel) wordt er in plaats van eumelanine phaeomelanine gevormd. Maar dat is bij papegaaiaachtigen en zeker bij agaporniden niet van toepassing. Wanneer het proces normaal verloopt en de zwarte eumelanine korrels volledig zijn gevormd, wordt door middel van het (transport) enzym myosine de eumelanine granules via lange dendriten in de veer afgezet.

Hier onder een schema waarop dat de vorming van eumelanine en phaeomelanine wordt uitgelegd.



Het enzym tyrosinase bestaat uit 529 verschillende aminozuren bij vogels. Elk aminozuur is op zijn beurt opgebouwd uit 3 verschillende basen. Dus als we een klein rekensommetje maken dan zien we dat $529 \times 3 = 1587$ verschillende basen verantwoordelijk zijn voor het totale proces.

Een ingenieus systeem, maar dat betekent ook dat er dus in principe soms verschillende fouten (mutaties) zich kunnen voordoen wanneer het DNA zich tijdens de diverse celdelingen verdubbeld. Wanneer er met één van deze basen bij het opbouwen van het enzym tyrosinase iets verkeerd gaat betekent dat dan ook dat de tyrosinase activiteit iets zal afwijken van de normale activiteit en dus ook de kwaliteit van de eumelanine dat gevormd wordt. Dat kwaliteitsverschil is zichtbaar aan de kleur van de gevormde eumelanine. Ook kan er een probleem zijn met het "transport" enzym myosine, waardoor de afzetting naar de veer zelf verstoord wordt.

Voornaamste afwijkingen:

We kunnen deze eumelaninemutanten eigenlijk onderverdelen in drie verschillende hoofd vormen. Dat zijn verschillende vormen van albinisme (kwalitatieve reductie) zoals fallows en ino's, pigment verdunning (kwantitatieve reductie) zoals overgoten en gezoomd en leucisme zoals recessief en dominant bont.

Albinisme of kwalitatieve reductie:

Het meest bekende en dus ook de eerste vorm waar we aan denken bij eumelanine mutanten zijn ongetwijfeld de ino vormen. Bij agaporniden hebben we meerdere ino vormen namelijk geslachtsgebonden albinisme (SL ino – Sex-linked ino) , recessief albinisme of NSL ino (Non Sex-linked ino) en de fallows.

Bij recessief albinisme komt pigment synthese niet of nauwelijks op gang. Dat zorgt ervoor dat er lege matrixen gevormd worden. Deze lege matrixen worden echter wel afgezet in de

veer. Dit noemen we tyrosinase negatief albinisme (TYR-neg). Dat proces zien we ook bij de bronze fallow (fallow type 1), maar dan wel in mindere mate. Hier komt de tyrosinase activiteit slechts gedeeltelijk op gang waardoor een mindere kwaliteit pigment gevormd wordt.

Bij het geslachtsgebonden albinisme ontstaan ernstige misvormde en onderontwikkelde matrixen. De tyrosinase activiteit is niet aangetast, integendeel bij de SL ino is er zelfs een twee en een half maal hogere tyrosinase activiteit gevonden dan bij de wildvorm, maar door het feit dat de matrixen te klein en te misvormd zijn heeft dit geen enkel effect. Die vorm van albinisme noemen we daarom tyrosinase positief (TYR-pos).

Er worden dus in beide gevallen melanosomale matrixen aangemaakt die bij NSL ino's in normale aantallen aanwezig zijn maar kleurloos of vrijwel kleurloos blijven en bij SL ino's wel zwart aankleuren maar ernstig misvormd, te klein en te laag in aantal zijn. De myosine doet hier normaal zijn werk en zet de gevormde matrixen af in de veren. De bevedering is dus niet "leeg", maar er zitten of wel lege of heel kleine misvormende matrixen in de bevedering. Er wordt dus bij albinisme geen (voor onze ogen) "zichtbare" eumelanine aangemaakt, onder een elektronenmicroscop is dit wel zichtbaar.

Bij de pale fallow (fallow type 2) zien we ook een aantasting van de kwaliteit van de matrixen. Dat geeft daardoor een kwalitatieve reductie van eumelanine.

Een ander mogelijkheid is bijvoorbeeld dat de kleur tijdens de pigment synthese niet volledig zwart wordt. Dat hebben we bij de cinnamon. Bij cinnamon zien we dat bij de aanmaak van de eumelanine de laatste fase wegvalt. Daardoor is het eindproduct dan 'bruin gekleurde' eumelanine. De matrixen hebben een normale vorm, alleen is de gevormde eumelanine anders gekleurd, ze werden niet zwart. Het is dus een fabeltje te stellen dat er bij cinnamon bruin phaeomelanine wordt afgezet in de veren. Cinnamon heeft niets te maken met phaeomelanine. Zoals u trouwens op voorgaande schema kunt zien zijn het twee verschillende processen.

Al deze vormen kunnen we beschouwen als vormen van kwalitatieve reducties. Albinistische mutaties corresponderen met gemuteerde allelen van loci die betrokken zijn bij het proces van melanisatie, inclusief het metabolisme en de constructie van de melanosomen. Het typerende van een albinistische mutatie – in vergelijking met de twee andere groepen – is de eumelanine reductie zowel in het lichaamweefsel als in de veren. Met andere woorden: zij verliezen de eumelanine in de ogen, de huid, de poten, de snavel en de nagels. Hoewel sommige van deze mutaties als volwassen vogel een donker oog hebben, vertonen ze allen een gereduceerde oogkleur bij het uitkomen. De eumelanine korrels van deze kleurslagen zijn structureel gewijzigd. De wijziging op zich hangt af van de functie van het betrokken locus maar is in ieder geval een kwalitatieve verandering.

Pigment verdunning of kwantitatieve reductie:

Dan hebben we de zogenaamde pigment verdunning of een kwantitatieve reductie van eumelanine. Dit is te wijden aan een defect in de distributie (transport) van eumelanine en heeft te maken met het al of niet aanwezig zijn van functionerende transport middelen zoals normale dendriten en myosine. Alle eumelanine granules worden op een normale manier gevormd maar raken op een of ander manier niet allemaal in de veer. Dat is onder andere het geval bij gezoomd en overgoten. Een andere mogelijkheid is dat tijdens het transport van de normaal gevormde granules iets verkeerd gaat, dat zien we onder andere bij overgoten. Daar zien we dat een mutatie van het 'dilute' locus (gen) er voor zorgt dat de gevormde eumelanine, wanneer die wordt afgezet in de veer, gedeeltelijk gaat samen klonteren. Dat geeft ons de zogenaamde 'macro melanosomen' of 'reuze granules'.

We spreken dan over kwantitatieve verandering van de eumelanine. Het weefsel wordt door deze mutaties niet beïnvloed. Het afzettingsproces in de ogen, de huid en in ander weefsel is verschillend van dat in de veren. Vereenvoudigd: deze loci beïnvloeden de eumelanine afzetting in de huid niet.

Leucisme:

Als laatste is er nog leucisme. Bij leucisme hebben we o.a. te maken met verschillende bontvormen. Dat heeft eigenlijk niets te maken met de tyrosinase en de vorming of het kleuren van de matrixen. Hier ligt de oorzaak in de neurale lijst, de migratie van de melanoblasten naar de huid of het milieu van de huid zelf. Bij leucisme zien we dat in bepaalde huidsectoren de melanocyten bijna volledig ontbreken. Wanneer deze pigmentcellen niet aanwezig zijn in de huid, kan er ook geen pigment worden afgezet. Bij recessief bont is er een defect in distributie van de pigmentcellen vanuit de neurale lijst, de plaats waar de melanoblasten ontstaan, en daardoor arriveren er te weinig en in sommige gebieden geen melanocyten in de huid. Het enzym myosine kan zijn werk doen, maar als er weinig of geen melanocyten zijn kunnen ze ook niet voldoende pigment afzetten waardoor de veer zijn normale kleur zou krijgen.

Bij dominant bont daarentegen zijn bepaalde huidsegmenten genetisch zodanig veranderd dat melanocyten er zich niet kunnen vestigen of afsterven. Hier zien we dan ook dat in de bonte veervelden absoluut geen enkele matrix is afgezet in de veer. Dit noemen we de amelanotische (pigmentloze) gebieden, deze zijn wel "leeg", er zijn zelfs geen kleurloze melanosoom matrixen.

Samengevat kunnen we dus stellen dat er in principe drie manieren zijn waarop de eumelanine afzetting in de veer kan worden gewijzigd.

- Beschadiging van het metabolisme van de eumelanine productie geeft albinisme
- Beschadiging in de sturing van het transport van eumelanine korrels naar de gewenste veerzones veroorzaakt eumelanine pigmentverdunding.
- Beschadiging van cellen verantwoordelijk voor eumelanine productie veroorzaakt leucisme.

Laat ons duidelijk zijn dat dit enkel betrekking heeft op de vorming en de afzetting van de eumelanine. En eumelanine en phaeomelanine zijn twee totaal verschillende zaken. Zoals u op het schema kunt zien is er een groot verschil in de aanmaak van de phaeomelanine met deze van de eumelanine. Ik zet voor alle duidelijkheid de vorming en de verschillen tussen beide even voor u op een rijtje:

Eumelanine	Phaeomelanine
<ul style="list-style-type: none"> • In het endoplasmatisch reticulum van de melanocyt worden kleurloze matrixen gevormd • Vervolgens brengt het enzym tyrosinase de pigmentsynthese op gang. Tyrosinase bestaat uit 529 aminozuren (1587 basen) • Er is geen omschakeling, de pigment synthese gaat gewoon verder 	<ul style="list-style-type: none"> • In het endoplasmatisch reticulum van de melanocyt worden kleurloze matrixen gevormd • Vervolgens brengt het enzym tyrosinase de pigmentsynthese op gang. Tyrosinase bestaat uit 529 aminozuren (1587 basen) • Het genetische signaal dat de omschakeling regelt (bij hoender en



<ul style="list-style-type: none"> • De gevormde eumelanine is zwart. De granules zijn sferisch [rond], ovaal, staafvormig en zelfs naaldvormig • Eumelanine wordt beïnvloed (gebleekt) door direct zonlicht. • Eumelanine is niet oplosbaar in alkalische vloeistoffen 	<p>vinkachtigen) komt van buiten de melanocyt (veerfollikel).</p> <ul style="list-style-type: none"> • De gevormde phaeomelanine is roodbruin van kleur en de vorm is amorf. • Phaeomelanine bleekt niet uit in direct zonlicht • Phaeomelanine is oplosbaar in alkalische vloeistoffen
--	--

Als er een mutatie optreedt bij de aanmaak van de eumelanine lijkt het visueel allemaal 'als oplekking' van de veren, maar zoals u zult gemerkt hebben is het een iets complexer geheel dan dat.

Om op de juiste manier te gaan bepalen over welke mutatie we te maken hebben, moeten we rekening dan ook houden met wat er exact met de eumelanine gebeurt, gecombineerd met het genotype (de genetische achtergrond) van elke mutant. Enkel en alleen op deze manier kunnen we de juiste mutatie gaan bepalen. Het gebeurde vroeger maar al te vaak dat men lukraak een naam ging kleven op een nieuwe mutant. Of het leek er op, of gewoon omdat het een commercieel aantrekkelijke naam was. Dat kan absoluut niet!! Vergeet niet dat er wetenschappelijk al heel wat namen vastliggen en als we willen dat anderen onze hobby ernstig nemen, moeten we het dan ook correct doen.

Dirk Van den Abeele
MUTAVI, Research & Advice Group

Production of Eumelanin and Phaeomelanin

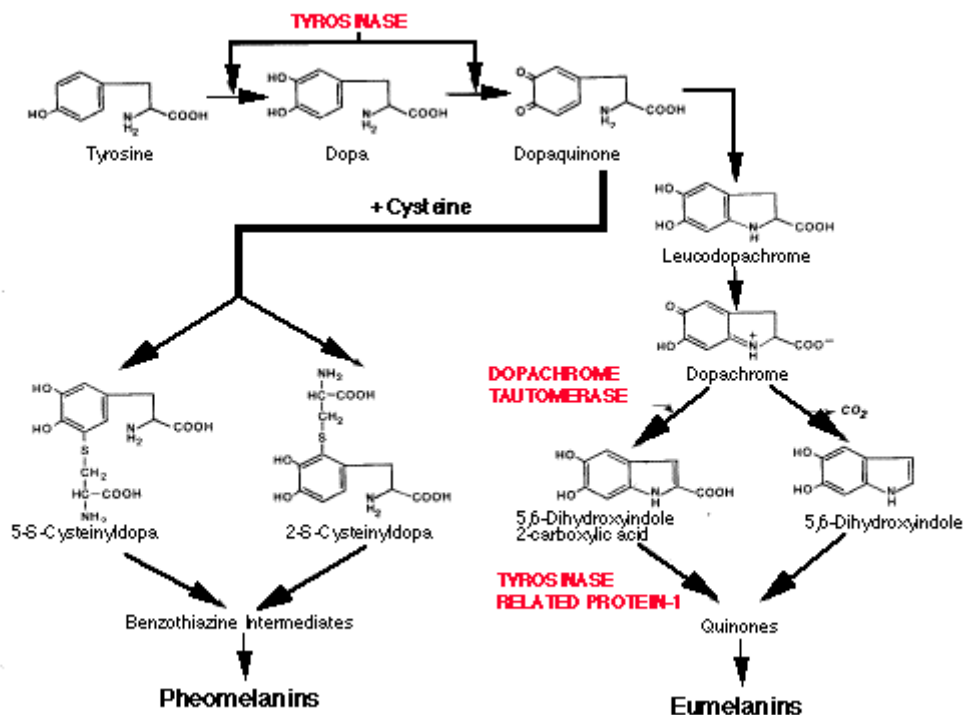
By Dirk Van den Abeele

10/02/2002

MUTAVI, Research & Advice Group

There are cells in the skin of our birds that are responsible for the production of eumelanin and/or phaeomelanin. These are called melanocytes or pigment cells. Within these cells, more precisely in the endoplasmatic reticulum, the matrixes of the pigment granules are produced. These colorless protein matrixes are composed of at least four different proteins. The completion of these colorless matrixes initiates a chemical reaction by a certain enzyme. An enzyme is a substance that has a specific task, and in this case it has to activate the chemical reaction that will give the matrixes a black color (pigment synthesis). This enzyme is called tyrosinase. During this chemical reaction there are two possible outcomes: the production of either eumelanin or phaeomelanin. When during the transition process the enzyme cysteine is added to dopaquinone (this signal originates from outside the melanocyt, namely the feather follicle) the result will be the production of phaeomelanin instead of eumelanin. This is not an issue in parrot-like birds, and certainly not agapornids. When the process runs as it should and the black eumelanin granules are fully developed, the (transport) enzyme myosine drops the eumelanin granules off through long dendrites into the feather.

Here you can see the pathway that shows the chemically forming of eumelanin and pheomelanin:



In birds the enzyme tyrosinase consists of 529 different amino acids. Every amino acid consists in turn of 3 different bases. We can therefore conclude that a total of $529 \times 3 = 1587$ different bases are responsible for the complete process.

A complicated system, but it also means that mistakes can occur when the DNA duplicates itself during the various cell multiplications. When something goes wrong with one of these bases during the build-up of the enzyme tyrosinase, the activity of the tyrosinase will deviate from normal, and consequently a deviation occurs of the quality of the eumelanin that is being produced. This difference in quality could be noticed by the color of the formed eumelanin. Also, when a deviation occurs with the “transport” enzyme myosine, it results in a disturbance of the deposit process into the feather itself.

Primary mutations:

We can sub-divide all eumelanin mutations into three main categories:

1. Different forms of albinism (qualitative reduction) like the fallows and inos.
2. Pigment dilution (quantitative reduction) like dilute and edged.
3. Leucism, like recessive and dominant pied.

1. Albinism or qualitative reduction:

The most well-known, and so the first types we think of when we talk about eumelanin mutations, are the ino-forms. With agapornids we have multiple ino-forms, namely:

Sex-Linked albinism (SL ino), Recessive albinism (NSL ino, or Non-Sex Linked ino), and the fallows.

In recessive albinism there is hardly any pigment synthesis. This results in the production of uncolored matrixes. These “empty” matrixes are however deposited into the feather. This is something we call “tyrosinase negative albinism” (TYR-neg).

This process also plays a role in the bronze fallow (fallow type 1), but less dramatic. Here we see that the tyrosinase activity is only partially decreased, which results in the production of a lesser quality pigment.

In sex-linked albinism we find gravely deformed and underdeveloped matrixes. The tyrosinase activity is not reduced, on the contrary; in the SL inos there is a 2.5 times higher tyrosinase activity found than in the wild type, but because the matrixes are too small, this has no effect whatsoever. We call this type of albinism tyrosinase positive (TYR-pos).

So in both cases melanosome matrixes are produced. In NSL inos these matrixes are produced in normal amounts, but they are colorless or almost totally colorless. Within the SL inos the matrixes are actually black but seriously deformed, too small, and too few. The myosine performs as advertised in these cases and deposits the produced matrixes into the feathers. So the feathers are not “empty”, but there are colorless, small and/or deformed matrixes present in the feathers. There is no visible (for our eyes) production of eumelanin in the most extreme form of albinism; however, under an electron microscope we are indeed able to see its presence.

In the pale fallow (fallow type 2) we also see a decrease in quality of the matrixes. This results in a qualitative reduction of eumelanin.

Another possibility is, for example, a situation in which the color during the pigment synthesis will not turn completely black. This is the case in the “cinnamon”. In cinnamons we see that during the production of eumelanin the final step fails. The result of this is that the end product is brown colored eumelanin. The matrixes have their normal shape, only the color of the eumelanin is different: it did not turn black. The theory that the cinnamon color is the result of brown phaeomelanin can therefore be regarded as a fable. Cinnamon has nothing to do with phaeomelanin; on the diagram displayed on the previous page you can see that we are dealing with two different processes.

All these forms we can regard as forms of qualitative pigment reduction. Albinistic mutations correspond with mutant alleles of loci that are involved in the process of melanisation, including the metabolism and the construction of melanosomes. Typically an albinistic mutation, compared to other mutations, has a reduced eumelanin deposit in both the body tissue as well as in the feathers. In other words: they lose the eumelanin in the eyes, the skin, the legs and toes, the beak, and the nails. Although some of these mutations have dark eyes in adulthood, they all show a reduced eye color at hatching. The eumelanin granules in these mutations are structurally altered. The alteration depends on the function of the related locus, but it is in any case a qualitative change.

Pigment dilution or quantitative reduction:

Then we have the so-called pigment dilution or quantitative reduction of eumelanin. This is due to a defect of the distribution (transport) of eumelanin and has to do with whether the functioning means of transport, like normal dendrites and myosine, are present or not.

All eumelanin granules are developed in a normal manner, but do not all end up in the feather for some reason. This is for example the case in edged and dilute birds. Another possibility is that something goes wrong during the transport of the normally shaped granules; we see this for example in dilute birds. Here we see that a mutation of the “dilute” locus (gene), when the formed eumelanin is deposited in the feathers, results in various eumelanin granules sticking together. This phenomenon results in the so-called “macro melanosomes” or “giant grains”.

We then speak of a quantitative change of eumelanin. The tissues are not influenced by these

mutations. The process of depositing eumelanin in the eyes, skin, and other tissues differs from that of the plumage. Simplified: these loci do not affect eumelanin deposition in the skin.

Leucism:

Finally, there is leucism. With leucism we are confronted, among other things, with different types of pied. This actually has nothing to do with tyrosinase or the deposit of the black color of the matrixes. The cause here lies in the neural crest, the migration of the melanoblasts to the skin, or the skin environment itself. With leucism we see that in certain skin segments the melanocytes are almost completely absent. When these pigment cells are absent in the skin, it is impossible for pigment to be deposited in those areas. In recessive pied there is a defect in the distribution of pigment cells from the neural crest, the location where melanoblasts originate. Consequently too few or no melanocytes arrive in the skin. The enzyme tyrosinase may function normally, but if there are too few or no melanocytes, it is impossible to deposit enough pigment to give the feather its normal color.

With dominant pied however, certain skin segments are genetically changed in such a way that melanocytes are unable to reside there, or even die off. Here we can see that in the pied feather areas there are absolutely no matrixes deposited in the feathers. These are called amelanotic (pigmentless) areas. These are “empty”; there are not even any colorless melanosome matrixes to be found.

To summarize, we can pose that there are in principle three different methods of how eumelanin deposition can be altered or influenced.

- Damage of the metabolism of eumelanin production results in albinism
- Damage in the steering of the transport of eumelanin granules into feather shafts causes pigment dilution.
- Damage of the transport mechanism of cells responsible for eumelanin production results in leucism

Let's make it perfectly clear that this only relates to the production and deposit of eumelanin. Eumelanin and pheomelanin are two completely different matters. As you can see on the graph there is a big difference between the production of pheomelanin and eumelanin. For clarification purposes I will display an overview of the production and differences between the two melanins:

Eumelanin	Pheomelanin
<ul style="list-style-type: none"> • Colorless matrixes are formed in the endoplasmatic reticulum of the melanocyt. • Then the enzyme tyrosinase starts up the pigment synthesis. Avian tyrosinase consists of 529 amino acids (1587 bases). • There is no transition, the pigment synthesis continues • The formed eumelanin is black. The granules are round, oval, rectangular, or even needle shaped. 	<ul style="list-style-type: none"> • Colorless matrixes are formed in the endoplasmatic reticulum of the melanocyt. • Then the enzyme tyrosinase starts up the pigment synthesis. Avian tyrosinase consists of 529 amino acids (1587 bases). • The genetic signal that regulates the transition (in poultry and finches) comes from outside the melanocyt (feather follicle). • The formed pheomelanin has a



<ul style="list-style-type: none"> • Eumelanin is influenced (bleached) by direct sunlight. • Eumelanin cannot be dissolved in alkaline fluids. 	<p>red-brown color and the shape is amorph.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Phaeomelanin does not bleach in direct sunlight. • Phaeomelanin can be dissolved in alkaline fluids.
---	---

If there is a mutation in the process of the production of eumelanin, it phenotypically looks like “bleached” feathers, but as you have noticed, the whole process is a little more complicated than that. To determine what specific mutation it is we are looking at, we have to determine what exactly is happening to the eumelanin, in combination with the genotype (the genetic background). Only in this way we will be able to determine the correct name of the mutation. In the old days it happened too often that people randomly named a particular mutation. This happened for reasons of resemblance, or because the name was merely commercially attractive. This is absolutely unacceptable! Don’t forget that there are many official scientific names readily available, and if we want our hobby to be taken seriously, we have to conduct ourselves in a correct and professional manner.

Dirk Van den Abeele
MUTAVI, Research & Advice Group

Personal Homepage: <http://www.agapornis.be/>
Homepage BVA: <http://www.agapornidenclub.be/>
MUTAVI homepage: <http://www.mutavi.info/>