

Variasi Molekuler Gen Reseptor Melanokortin-4 pada Monyet Ekor Panjang

(MOLECULAR VARIATION OF MELANOCORTIN-4 RECEPTOR GENE
OF CYNOMOLGUS MACAQUE)

I Gusti Agung Arta Putra¹⁾, Dondin Sajuthi²⁾,
Dedy Duryadi Solihin³⁾, Raden Roro Dyah Perwitasari³⁾

¹⁾Lab Anatomi Ternak Fakultas Peternakan, Universitas Udayana,
Jl. Sudirman Denpasar. Telp. (0361-235231. Email : artaputra@gmail.com

²⁾Pusat Studi Satwa Primata, Institut Pertanian Bogor, Bogor

³⁾Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor

ABSTRACT

Melanocortin-4 receptor (MC4R) is one of G protein-coupled receptors that plays an important role in regulation of energy homeostasis. MC4R mutations constitute the most common cause of human obesity. The study was conducted in order to investigate the variation of MC4R gene in *Macaca fascicularis* and its association with obesity as a model of human obesity. Forty eight adult male macaques from Bali (Ubud and Uluwatu), East Java (Alas Purwo and Baluran), and Sumatera island (Palembang) were used in this research. The animals had been anaesthetized using ketamine (10 mg/kg body weight) and xylazine (2mg/kg body weight) before collecting blood samples and phenotypic data (weight, crown rump length. Blood samples were used as source of DNA. To determine MC4R variation, coding region of this gene was amplified and sequenced. The results showed that 20 variations sites were identified and 13 of them were non-synonymous. Among the non-synonymous mutations, five mutations were only found in obese macaque; two mutations were found both in obese and non-obese macaque; and six mutations were only found in non-obese macaque .

Key words : cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*), obesity, melanocortin-4 receptor.

PENDAHULUAN

Reseptor melanokortin-4 (MC4R) adalah satu dari lima reseptor berprotein-G yang mengikat melanokortin dalam peranannya mengatur perilaku makan dan homeostasis energi. Gen penyandi MC4R dilaporkan pertama kali oleh Yeo *et al.*, (1998) sebagai gen yang berkontribusi atau berkaitan dengan obesitas akibat dari adanya mutasi pada gen tersebut. Tao (2005) melaporkan lebih dari 70 jenis mutasi MC4R pada manusia yang menyebabkan berkurang sampai hilangnya fungsi MC4R tersebut. Bila MC4R tidak berfungsi maka tidak ada pengisyrat kekenyangan pada otak sehingga terjadi peningkatan asupan pakan. Peningkatan nafsu makan yang tidak disertai dengan peningkatan penggunaan energi menyebabkan terjadinya penimbunan energi dan mengarah pada obesitas. Mutasi MC4R pada manusia menyebabkan obesitas (Rankinen *et al.*, 2006). Pada babi, adanya mutasi gen MC4R

menyebabkan peningkatan ketebalan lemak punggung (Kim *et al.*, 2000; Kuehn *et al.*, 2007). Demikian juga pada tikus, bila gen MC4R tersebut ditiadakan (*knock out*) maka tikus akan mengalami obesitas (Huszar *et al.*, 1997).

Keadaan obesitas pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) banyak dijumpai pada monyet-monyet tersebut hidup di kawasan wisata di Bali. Monyet-monyet ini menunjukkan tanda-tanda obesitas dengan indeks massa tubuh (IMT) sampai 61,57 kg/m² pada yang jantan dan 60,07 kg/m² pada yang betina (Putra *et al.*, 2006). IMT ini jauh lebih tinggi dibandingkan dengan IMT yang normal yaitu 18,5-24,9 kg/m² (WHO 2005). Secara fenotipe, obesitas dapat dilihat antara lain dari IMT yang ditentukan oleh bobot badan dan tinggi duduk (*crown rump length/CRL*), dan timbunan lemak di daerah perut yang ditunjukkan oleh tebal lipatan kulit. Pada monyet gemuk, timbunan lemak di daerah perut dapat dilihat dari adanya lipatan kulit yang menggantung bila monyet tersebut berdiri atau berjalan. Timbunan lemak

tersebut juga dapat dilihat jelas bila monyet dalam keadaan duduk. Pada posisi tersebut, perut monyet kelihatan buncit sebagai akibat dari adanya timbunan lemak tersebut.

Obesitas pada monyet ekor panjang mirip dengan manusia, namun penelitian mengenai mutasi gen yang terkait dengan obesitas (MC4R) pada monyet ekor panjang belum pernah dilaporkan. Untuk itu perlu dilakukan penelitian tentang variasi molekuler gen MC4R pada monyet ekor panjang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya pola mutasi pada gen MC4R monyet ekor panjang. Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat menunjang pengembangan monyet ekor panjang sebagai hewan model untuk kajian obesitas pada manusia.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Darah

Sebanyak 48 ekor monyet ekor panjang jantan dewasa yang berasal dari Palembang (15 ekor), Baluran (7 ekor), Alas Purwo (4 ekor), Uluwatu (9 ekor) dan Ubud (13 ekor) digunakan dalam penelitian ini. Sampel asal Palembang diambil di Pusat Studi Satwa Primata-Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor (PSSP-LPPM, IPB) sedangkan sampel asal daerah lainnya diambil di lokasi. Pemilihan monyet jantan dewasa didasarkan pada pertimbangan bahwa monyet jantan dewasa menunjukkan gejala obesitas dan tidak ada siklus bunting seperti pada yang betina. Monyet dibius dengan campuran ketamine (10 mg/kg bobot badan) dan xylazine (2 mg/kg bobot badan). Obat bius disuntikkan secara intramuskuler dengan alat bantu berupa tulup atau senapan. Darah diambil dengan spuit dari vena femoralis sebanyak 5 ml dan selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung EDTA (*ethylene diamine tetraacetic*). Darah disimpan pada suhu -20°C sebelum diekstrak untuk mendapatkan DNA (*deoxyribonucleic acid*). Tata cara pengambilan darah mengikuti prosedur yang telah disetujui Komisi Pengawasan Kesejahteraan dan Penggunaan Hewan Penelitian PSSP-LPPM, IPB (ACUC No. 07-A004-IR).

Obesitas monyet ekor panjang ditentukan berdasarkan IMT yang lebih besar atau sama dengan 30 kg/m². IMT dihitung dari bobot badan (kg) dibagi CRL (m²) menurut Kaufman *et al.*, (2005). CRL diukur dari bagian atas kepala

(*vertex*) sampai pangkal ekor. Alat yang digunakan adalah timbangan (skala terkecil 0,1 kg), pita ukur dan kaliper (skala terkecil 1 mm).

Ekstraksi DNA dari Darah

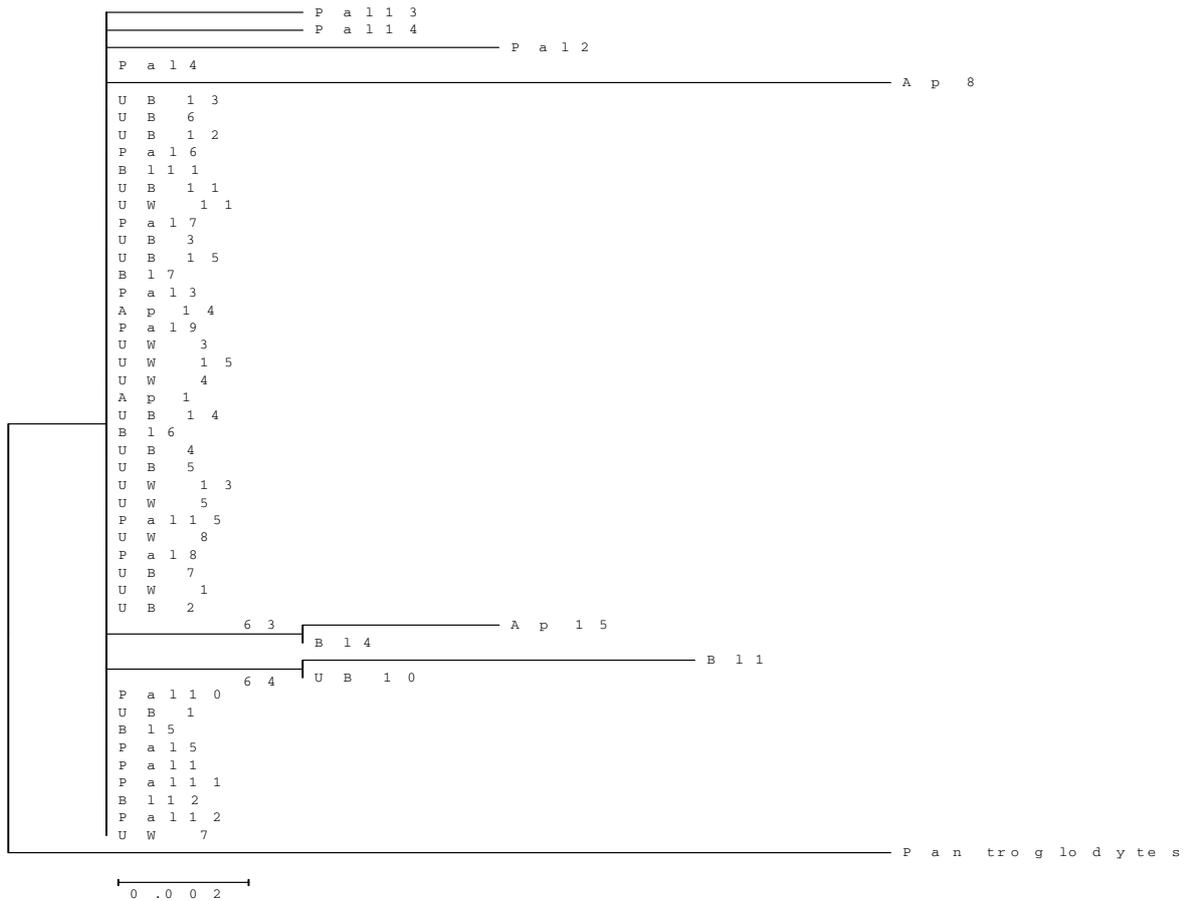
Ekstraksi DNA menggunakan *QIAamp DNA Blood Kits* (Qiagen) dan mengikuti prosedur pada panduan dari pabrik. Hasil ekstraksi dilihat dengan elektroforesis pada gel agarosa 1,2% dalam larutan TBE 1x dalam piranti *Submarine Elettrophoresis* (Hoefer, USA). Fragmen dimunculkan dengan pewarna etidium bromida setelah dimigrasikan selama 40 menit dengan voltase 85 V. Fragmen DNA yang terwarnai dilihat di bawah iluminasi ultraviolet. Konsentrasi DNA ditentukan dengan spektrofotometer. Selanjutnya, DNA dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml dan disimpan pada -20°C untuk proses berikutnya.

Amplifikasi Gen MC4R

Amplifikasi daerah penyandi gen MC4R dilakukan dengan primer *forward* (5'-AATAACTGAGACGACTCCCTGAC-3') dan *reverse* (5'-CAGAAGTACA ATATTCAGGTAG-GG-3') berdasarkan Yeo *et al.*, (1998) dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Setiap tabung untuk satu unit reaksi PCR (50 µl) ditambahkan 5 ml larutan penyangga 10x-1,5 µl MgCl₂ 50 mM, 5 µl dNTP mix 2 mM, primer 10 µM masing-masing 2 µl, 0,25 µl *Taq Polymerase* 5 U/µl, 4 ml DNA (25 ng/µl), dan 30,25 ml ddH₂O. Amplifikasi menggunakan mesin GeneAmp®PCR sistem 2400 (Perkin Elmer) dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 95°C selanjutnya diikuti dengan 35 siklus (95°C selama 45 detik untuk denaturasi, 57°C selama 1 menit untuk penempelan primer, 72°C selama 1 menit untuk pemanjangan); diakhiri 7 menit pada 72°C. Produk PCR dideteksi dengan cara elektroforesis seperti yang dilakukan pada deteksi DNA total. Produk PCR dari gen MC4R adalah sebesar 1146 pb (angka ini diperoleh dengan menjajarkan primer *forward* dan *reverse* dengan urutan MC4R monyet ekor panjang yang ada di *GenBank*).

Pengurutan DNA

Reaksi pengurutan (*sequencing*) dilakukan dalam *MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler* menggunakan *ABI PRISM BigDye TM Terminator Cycle Sequencing Kits* dengan *AmpliTaq DNA polymerase (FS enzyme)* (*Applied Biosystems*) mengikuti prosedur pabrik.



Gambar 1 Filogram monyet ekor panjang menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ) dan model *p distance* dari asam amino (332 asam amino). UB, UW, Ap, Bl, dan Pal menunjukkan asal monyet yaitu Ubud, Uluwatu, Alas Purwo, Baluran dan Palembang

Produk PCR diurut menggunakan primer yang sama dengan yang digunakan untuk amplifikasi. Tahapannya adalah sebagai berikut: fragmen berlabel fluoresen dimurnikan dengan prosedur presipitasi etanol, selanjutnya sampel dilarutkan kembali dalam air terdestilasi dan diurut dalam *ABI 3730XL sequencer* (*Applied Biosystems*).

Analisis Data

Hasil urutan DNA diedit dan disejajarkan dengan menggunakan program *Mega 4.0* (Tamura *et al.*, 2007). Dengan program yang sama, ditentukan *p* (diversitas nukleotida), variasi situs dan pohon filogeni dengan metode *bootstrap Neighbor-Joining* (NJ) dengan 1000 kali pengulangan. Penentuan mutasi yang bersifat transisi dan transversasi menggunakan program *Arlequin 3.11* (Excoffier *et al.*, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 48 sampel diamplifikasi menggunakan primer *MC4R forward* dan *reverse* dengan metode PCR. Produk PCR tersebut berukuran 1146 pb dan di dalamnya mengandung ORF (*open reading frame*) gen *MC4R* secara utuh yaitu sebesar 999 bp yang terdiri atas 332 asam amino dan satu stop kodon.

Seluruh urutan yang diperoleh dalam penelitian ini disejajarkan dan digunakan untuk membuat filogram (Gambar 1). Urutan *MC4R* simpanse (*Pan troglodytes*) yang diunduh dari *GenBank* (kode akses NC006451) digunakan sebagai kelompok luar. Monyet yang digunakan dalam penelitian ini berada dalam satu kelompok dan terpisah dari simpanse. Di samping itu, 40 urutan menunjukkan kesamaan asam amino yang menyusun reseptor melanokortin 4. Hal

Tabel 1. Jumlah substitusi sinonim, nonsinonim, diversitas nukleotida, dan situs beragam pada gen MC4R monyet ekor panjang

Populasi	S	N	π (%)	Situs
Palembang (n=15)	3	4	0,15	S=519C/A, 885A/T, 927G/A N=707G/C, 764T/G, 788T/C, 813T/G
Alas Purwo (n=4)	2	6	0,40	S=165T/C, 927G/A N=7A/C, 698G/C, 749T/C, 899T/G, 983T/G, 985T/G
Baluran (n=7)	1	4	0,14	S=690C/T N= 698G/C, 734T/A, 758T/C, 791A/C
Ubud (n=13)	3	1	0,12	S=519C/A, 885A/T, 927G/A N= 791A/C
Uluwatu (n=9)	3	0	0,09	S=519C/A, 954T/C, 987T/G N=0
Total	12(7)	15(13)	27(20)	

Keterangan: S= mutasi sinonim; N=mutasi nonsinonim; p= diversitas nukleotida.
n = jumlah sampel

Tabel 2. Jumlah substitusi transisi dan transversi pada gen MC4R monyet ekor panjang

Substitusi	Palembang	Alas Purwo	Baluran	Ubud	Uluwatu
Transisi	2	3	2	1	1
Transversi	5	5	3	3	3
Total	7	8	5	4	3

tersebut berarti sebagian besar urutan asam amino dari gen MC4R pada sampel penelitian tersebut adalah sama walau pun ada sebagian kecil yang mengalami perubahan. Kesamaan yang tinggi ini disebabkan oleh posisi urutan DNA terdapat pada daerah penyandi (*coding region*) yang merupakan urutan DNA yang bersifat kekal. Hughes *et al.*, (2009) menyatakan bahwa gen MC4R merupakan gen yang sangat kekal sepanjang sejarah evolusi vertebrata.

Berdasarkan pada penyejajaran seluruh urutan (48 urutan) ditemukan 20 situs nukleotida beragam dan 13 di antaranya adalah nonsinonim (Tabel 1). Mutasi sinonim adalah mutasi pada basa nukleotida tetapi tidak menyebabkan terjadinya perubahan asam amino sedangkan mutasi nonsinonim adalah mutasi yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino. Mutasi sinonim paling banyak ditemukan pada populasi asal Uluwatu, sedangkan mutasi nonsinonim paling banyak terdapat pada populasi asal Alas Purwo. Berdasarkan 20 situs nukleotida beragam, substitusi paling sering pada basa kedua dari triplet kodon, yaitu sebanyak 10 kali, sedangkan pada basa ke satu dari triplet kodon dan basa

ketiga dari triplet kodon masing-masing adalah 2 dan 8 kali. Perubahan pada basa ke dua dari triplet kodon merupakan hal yang paling umum menyebabkan terjadinya perubahan asam amino (Bofkin dan Goldman 2007).

Angka total di dalam kurung menunjukkan jumlah jenis situs setelah dikurangi beberapa situs yang sama yang ditemukan pada asal populasi yang berbeda

Diversitas tertinggi ada pada monyet asal Alas Purwo dan yang terendah ditemukan di Uluwatu (Tabel 1). Rataan diversitas nukleotida adalah 0,18% (0,0018). Diversitas nukleotida pada gen MC4R dalam spesies monyet ekor panjang adalah tergolong kecil. Hal tersebut disebabkan oleh rendahnya mutasi di daerah penyandi. Di samping itu mutasi pada DNA inti adalah lebih kecil dibandingkan dengan mutasi pada DNA mitokondria (Pitman 2008). Lebih jauh, diungkapkan bahwa tingkat diversitas nukleotida adalah berbeda pada daerah gen yang berbeda.

Substitusi nukleotida dapat pula digolongkan ke dalam substitusi transisi dan transversi (Tabel 2). Hasil penelitian menunjukkan bahwa substitusi transversi lebih banyak terjadi dibandingkan dengan substitusi transisi.

Tabel 3. Mutasi asam amino, nukleotida penyandi dan perubahan kodon pada gen MC4R monyet ekor panjang

Mutasi	Nukleotida	Perubahan kodon	Individu	Status
Asn3His	7A>C	AAC→CAC	Ap8	gemuk
Gly233Ala	698G>C	GGT→GCT	Ap15	gemuk
Gly233Ala	698G>C	GGT→GCT	BL4	tidak gemuk
Arg236Pro	707G>C	CGC→CCC	Pal2	tidak gemuk
Ile245Asn	734T>A	ATT→AAT	BL1	tidak gemuk
Leu250Pro	749T>C	CTG→CCG	Ap15	gemuk
Val253Ala	758T>C	GTC→GCC	BL1	tidak gemuk
Val255Gly	764T>G	GTT→GGT	Pal14	tidak gemuk
Leu263Pro	788T>C	CTC→CCC	Pal2	tidak gemuk
His264Pro	791A>C	CAC→CCC	BL1	tidak gemuk
His264Pro	791A>C	CAC→CCC	Ub10	gemuk
Cys271Trp	813T>G	TGT→TGG	Pal13	tidak gemuk
Leu300Arg	899T>G	CTG→CGG	Ap8	gemuk
Leu328Trp	983T>G	TTG→TGG	Ap8	gemuk
Ser329Ala	985T>G	TCT→GCT	Ap8	gemuk

Keterangan :

> : posisi nukleotida (A atau G atau T) ke ... berubah menjadi ... (C atau A atau G)

→ : berubah menjadi

Ap : Alas Purwo; BL : Baluran; Pal : Palembang; Ub : Ubud

Kejadian ini berkaitan dengan komposisi A (alanina) dan T (timina) dan G (guanina) dan C (sitosina) dari urutan gen MC4R. Zhang dan Zhao (2004) menyatakan bahwa kemungkinan substitusi transversasi akan meningkat sesuai dengan peningkatan kandungan basa nukleotida A dan T. Pendapat ini sesuai dengan hasil yang didapatkan pada penelitian ini bahwa rataan komposisi A dan T gen MC4R (54,0%) yang lebih besar dari komposisi G dan C-nya (45,9%).

Mutasi MC4R yang ditemukan hanya pada monyet gemuk adalah Asn3His, Leu250Pro, Leu300Arg, Leu 328Trp, dan Ser329Ala (Tabel 3). Mutasi Asn3His berada pada ujung NH₂ dari reseptor melanokortin-4 (MC4R). Srinivasan *et al.*, (2004) melaporkan bahwa ujung NH₂ sangat penting dalam aktivitas reseptor. Mutasi di daerah ujung NH₂ dapat mengganggu aktivitas MC4R. Di sisi lain, mutasi pada posisi 250 ditemukan pada manusia tetapi perubahan asam aminonya adalah Leu250Gln. Pada manusia, mutan Leu250Gln dinyatakan terperangkap di dalam sel sehingga MC4R tidak dapat berfungsi dan akibatnya timbul obesitas (Tao 2005). Mutan Leu300Arg, Leu328Arg, dan Ser329Ala kemungkinan dapat mengganggu fungsi MC4R karena ke tiga posisi tersebut terletak di bagian MC4R (di dalam sitosol) yang berperan dalam interaksi dengan protein G (Lodish *et al.*, 2004).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa mutasi MC4R terjadi baik pada monyet gemuk mau pun yang tidak gemuk. Sebanyak 26 ekor dari total 48 sampel monyet ekor panjang mengalami obesitas (54,2%) dan 22 ekor tidak gemuk (45,8%). Sebanyak 11,5% (3/26) monyet gemuk dan 22,7% (5/22) monyet yang tidak gemuk adalah pembawa mutan MC4R. Di samping itu, sebanyak 88,5% (23/26) monyet mengalami obesitas tetapi tidak menunjukkan adanya mutasi pada MC4R. Hal tersebut mengindikasikan adanya peran dari gen lain dalam menentukan terjadinya obesitas. Di samping itu, polimorfisme nukleotida di daerah pengatur dari gen MC4R mungkin juga berperan pada obesitas (Lubrano-Berthelie *et al.*, 2003). Mereka menemukan adanya beberapa varian di daerah pengatur yaitu -178 A/C, -360G/T, dan -176 A/G. Varian tersebut ditemukan pada anak-anak, remaja dan dewasa yang mengalami obesitas.

SIMPULAN

Pada penelitian ini, ditemukan 20 situs beragam pada daerah penyandi gen MC4R, 13 di antaranya adalah mutasi nonsinonim. Mutasi MC4R yang hanya ditemukan pada monyet gemuk adalah Asn3His, Leu250Pro, Leu300Arg, Leu 328Trp, dan Ser329Ala.

SARAN

Mengingat obesitas dipengaruhi oleh banyak gen, perlu dilakukan penelitian tentang gen lainnya dalam pengembangan monyet ekor panjang sebagai hewan model.

Perlu dilakukan penelitian apakah monyet ekor panjang asal Bali lebih cepat gemuk daripada monyet yang berasal dari daerah lainnya.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Rektor Unud, APPERI, Hibah Penelitian program Doktor IPB, Yayasan Damandiri dan BPPS Dikti yang telah membantu pendanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bofkin L, Goldman N. 2007. Variation in evolutionary processes at different codon positions. *Mol Biol Evol* 24:513-521.
- Excoffier L, Lavel G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.11: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Hughes DA, Hinney A, H. Brumm H, Wermter AK, Biebermann H, Hebebrand J, Stoneking M. 2009. Increased constraints on MC4R during primate and human evolution. *Hum Genet* 124:633-647.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88:131-141.
- Kaufman D, Smith ELP, Gohil BC, Banerji M, Coplan JD, Kral JG, Rosenblum LA. 2005. Early appearance of the metabolic syndrome in socially reared bonnet macaques. *J Clin Endocrinol Metab* 90:404-408.
- Kim KS, Larsen N, Short T, Plastow G, Rothschild MF. 2000. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mammal Genome* 11:131-135.
- Kuehn LA, Rohrer GA, Nonneman DJ, Thallman RM, Leymaster KA. 2007. Detection of single nucleotide polymorphisms associated with ultrasonic backfat depth in segregating Meishan x White Composite population. *J Anim Sci*. 85:1111-1119.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. 2004. *Molecular cell biology*. Fifth edition. W.H. Freeman and Company. USA.
- Lubrano-Berthelie C, Cavazos M, Le Stunff C, Haas K, Shapiro A, Zhang S, Bougneres P, Vaisse C. 2003. The human MC4R promoter : characterization and role in obesity. *Diabetes* 52:2996-3000.
- Pitman SD. 2008. *DNA Mutation and Evolution*. <http://naturalselection.0catch.com/Files/dnamutationrates.html>. [2 Oktober 2009].
- Putra IGAA, Wandia IN, Soma IG, Sajuthi D. 2006. Indeks massa tubuh dan morfometri monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) di Bali. *Jurnal Veteriner* 7:119-124.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, and C. Bouchard . 2006. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* 14:529-644.
- Srinivasan S, Lubrano-Berthelie C, Govaerts C, Picard F, Santiago P, Conklin BR, Vaisse C. 2004. Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. *J Clin Invest* 114:1158-1164.
- Tamura K, J Dudley, Nei M, Kumar S. 2007. Mega 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599 (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publication>) [9 November 2007]
- Tao YA. 2005. Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity. *Mol Cell Endocrinol* 239:1-14
- [WHO] World Health Organization. 2005. Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311> [17 September 2007]
- Yeo GSH, Farooqi S, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. 1998. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20:111-112.
- Zhang F, Zhao Z. 2004. The influence of neighboring-nucleotide composition on single nucleotide polymorphisms (SNPs) in mouse genome and its comparison with human SNPs. *Genomics* 84:785-795.