

Szent István Egyetem

**AZ X-KROMOSZÓMÁN ELHELYEZKEDŐ
HIPERIZMOLTSÁGRA HATÓ MODIFIKÁTOR GÉNEK
VIZSGÁLATA COMPACT EGÉREN**

Doktori értekezés tézisei

Veress Gyula

Gödöllő

2010

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, MTA doktora

SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Állattudományi Alapok Intézet
Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Varga László
CSc, címzetes egyetemi tanár

A Ph.D értekezés elkészítése alatt:

1) Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,
Géntérképezés Állatokon Kutatócsoport

2) Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és
Környezettudományi Kar, Állattenyésztés-tudományi Intézet,

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A szarvasmarha fajták hiperizmolt, vagyis duplán-izmolt (*double muscling*, vagy *DM*) fenotípusának genetikai heterogenitását számos példa bizonyítja. Kezdetben a genetikai meghatározottságot főként az *mh* (muszkuláris hipertrófia) génnek, mint nagyhatású génnek tulajdonították, amelyet később miosztatin néven írtak le (McPherron és mtsai. 1997). Ez a gén kulcsfontosságú szerepet játszik az izom növekedés mértékének meghatározásában. A szarvasmarha fajban számos mutációja ismert, melyek közül kiemelkedik az a hat, amely a kódolt fehérje inaktív formáját eredményezi (Karim és mtsai. 2000). Ezek homozigóta, illetve egymással kombinált formában alakítják ki a miosztatin „null genotípust” és így számos húsmarha duplán-izmolt jellegét (ilyen, fehérje funkciót gátló természetes miosztatin mutációt több fajban: egérben, emberben, juhban, kutyában és sertésben is leírtak már). A fehér-kék belga szarvasmarha fajtában a duplán-izmolttság tenyészcél és fő fajtajelleg. Charlier és mtsai. (1995) tanulmányából kiderül, hogy a tenyésztés során a fajta izmoltsága sokkal kifejezettebbé vált. Vagyis, az - *mh* gén fixálódását követő - izmoltságra irányuló szelekció során feltehetően további gének (módosító faktorok, modifikátor gének) jutottak szerephez. A hiperizmoltság genetikai háttere, ezért sokkal összetettebb, mint azt korábban gondolták. A következő kutatási eredmények tovább erősítik a duplán-izmolt fenotípus komplex genetikai szemléletét, bemutatva a végleteket, a genotípus-fenotípus kapcsolat két szélsőséges estét.

- **Van** inaktiváló miosztatin **mutáció**, **nincs** duplán-izmolt **fenotípus**: a fehér-kék belga szarvasmarha jellegzetes inaktiváló miosztatin mutációja megtalálható a south devon szarvasmarha fajtában is. Azonban a duplán-izmolt fenotípus és az ahhoz kapcsolódó ellési problémák elleni tudatos tenyésztői munkának köszönhetően a mutációra homozigóta egyedek jól izmoltak, de nem mutattak kimondottan duplán-izmolt fenotípust. Ezt a jelenséget Smith és mtsai. (2000) további lókuszek közreműködésével magyarázták.
- **Nincs** inaktiváló miosztatin **mutáció**, **van** duplán-izmolt **fenotípus**: néhány húsmarha fajta esetében (limousine és blonde d’aquitaine) előfordul, hogy a duplán-izmolt fenotípus ellenére az egyedek nem hordoznak inaktiváló miosztatin mutációt, ami szintén felveti annak a lehetőségét, hogy - a miosztatinon kívül - más faktorok is hatással vannak a muszkuláris hipertrófiára (Grobet és mtsai. 1998).

Tehát, a mutáns miosztatin több fajban is fő meghatározója a túlzott izomtömeg kialakulásának, azonban egy fajon, sőt fajtán belül akár több ható miosztatin mutáció is létezik, melyek hatását további gének módosíthatják. A szarvasmarha ható miosztatin mutációi közül mára már több is ismert, azonban az azokat ténylegesen módosító faktorok ismeretlenek. Ezek a modifikátor gének szintén

nagy jelentőséggel bírnak, mivel megismerésükkel részletesebb kép alkotható az izomfejlődés folyamatáról, annak szabályozásáról, ami így a miosztatin konzervált funkciójának ismeretében még az állattenyésztésben történő felhasználáson is túlmutathat. Genetikai térképezésük a szarvasmarha faj generációs intervalluma, valamint az önmagukban kis hatással bíró módosító faktorok természete miatt időigényes és nehézkes feladat lenne. Az összehasonlító térképezés és a laboratóriumi modellállatok speciális térképezési populációinak használata azonban áttörést hozhat ilyen esetekben is. Ezen a területen végezett kutatásokat, Dr. Varga László Géntérképezés Állatokon kutatócsoportja (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont). Munkájuk során egy természetes hiperizmolt mutáns, az úgynevezett Compact egér genetikai hátterét vizsgálták és térképezték. Korábbi vizsgálataik alapján meghatározták a Compact egér miosztatin gén szekvenciáját és így fedezték fel annak mutációját. Ezt követően elsőként térképezték be az addig ismeretlen pozíciójú miosztatin gént az egér 1. kromoszómájára. Ez a 12 bázispáros miosztatin deléció (*Mstn*^{Cmpt-d11Abc}) nem inaktiváló mutáció (a fehérje propeptid régióját érinti). Tehát az *Mstn*^{Cmpt-d11Abc} szükséges, de nem elégséges feltétele a hiperizmolttság kialakulásának. Genetikai analízisek során a kutatócsoport megállapította, hogy a Compact fenotípust a főgénnel együtt több (1, 3, 5, 7, 11, 16 és X-kromoszómán elhelyezkedő) különböző erősségű modifikátor lókuszt alakítja ki. Ezek közül az X-kromoszómán detektált lókuszt mutatta a legerősebb, de egyben a legkiterjedtebb modifikátor hatást (Varga és mtsai. 1997, Szabó és mtsai. 1998, Varga és mtsai. 2003a, Varga és mtsai. 2005).

Munkám célja:

- Az X-kromoszómás modifikátor régió legerősebb hatású szakaszában található androgén receptor gén (Ar) szekvencia és expressziós szintű vizsgálata Compact egéren. Ez a gén nem csak pozíciója, de funkciója alapján is esélyes miosztatin modifikátor.
- A kiterjedt X-kromoszómás modifikátor régió beszűkítése genetikai térképezéssel. Mérete miatt abban több modifikátor gén együttes jelenléte is elképzelhető. A régió jelentős szűkítése esetén a lehetséges esélyes gének száma is csökken. Ha ez eléri egy olyan szintet, amikor már csak néhány gén szerepel az adott kromoszóma szakaszon, akkor ezeknek mind szekvencia, mind expresszió szintű vizsgálata is a célok közé kerülhet.
- Amennyiben a munka során bármilyen szekvencia, vagy expressziós különbséget sikerül meghatározni, akkor annak vizsgálatára egy speciális, tömegmérétekben is alkalmazható detektálási módszer kialakítása és populáció szintű alkalmazása is szükséges.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

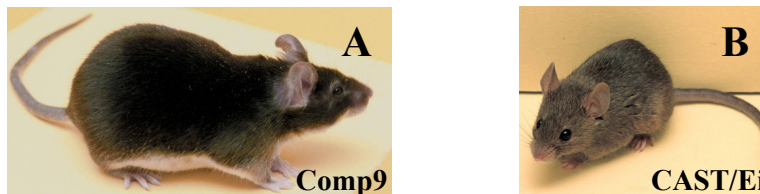
2.1. Bioinformatikai vizsgálatok

Munkám *in silico* (számítógépes) vizsgálataihoz genomikai adatbázisokat (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Ensembl: <http://www.ensembl.org/>; MGI: <http://www.informatics.jax.org/>), primer tervező (SeqVerter, GeneStudio Inc. 1999; Primer3, Rozen és Skaletsky 2000) és szekvencia elemző programcsomagokat (BioEdit, Hall 1997-2004; SeqVISTA, Hu és mtsai. 2003; EMBOSS, Rice és mtsai. 2000) használtam.

2.2. Kísérleti állatok

2.2.1. Az androgén receptor gén szekvencia és expressziós vizsgálatában felhasznált kísérleti állatok

A vizsgálatokhoz a Comp9-es vonalból kialakított beltenyésztett törzset (1. ábra A) és a CAST/Ei beltenyésztett törzset használtam (1. ábra B). A Comp9-es vonalat Dr. Müller Géza hozta létre (tizenhat generáción keresztül tartó testvérpárosítás és szelekció során) az eredeti, németországi Compact törzsből. Ez az *Mstn*^{Comp-dllAbc} delécióra homozigóta, hiperizmolt vonal: feckehasú, nagy termetű, de kevésbé tömör testalkatú. A CAST/Ei törzset az egér *Mus musculus castaneus* alfajából hozták létre beltenyésztés során (www.informatics.jax.org). Az egyedek vad, aguti színűek, feltűnően kis méretűek, normál izomzatúak, nagyon élénkek és érzékenyek a környezeti stresszre.



1. ábra. Az androgén receptor gén szekvencia és expressziós vizsgálatához használt egér törzsek; A: a Comp9-es törzs egy egyede, B: CAST/Ei törzs egy egyede (Varga és mtsai. 2003b)

A szekvencia és expressziós vizsgálatokhoz három hiperizmolt (Comp9) és három normál izomzatú kontroll (CAST/Ei) hím egyed (6-7 hetes) mintáit használtam.

2.2.2. Az X-kromoszómán elhelyezkedő modifikátor intervallum szűkítéséhez felhasznált kísérleti állatok

Korábbi vizsgálatok során kutatócsoportunk létrehozott egy Cross4-nek nevezett, interszubspecifikus keresztezést az *Mstn*^{Comp-dllAbc} delécióra homozigóta Comp9

beltenyésztett vonalból és a CAST/Ei (*Mus musculus castaneus*, vad típusú alfaj) beltenyésztett törzsből. A CAST/Ei keresztezett populációk kialakításában való részvételét és genetikai térképezéshez történő felhasználását az teszi indokoltá, hogy alfajként genetikailag távolabb helyezkedik el más laboratóriumi egér törzsekhez képest, de a keresztezés során szaporodóképes. Ez nagyobb lehetőséget biztosít a genetikai markerek polimorfizmusára, ami hatékonyabbá teszi a térképezést. A Cross4 (Comp9 hím x CAST/Ei nőstény) F2 populációval kutatócsoportunknak sikerült durván pozicionálni, kromoszómához kötni szignifikáns miosztatin modifikátor hatásokat (az 1, 3, 5, 7, 11, 16 és X-kromoszómákon). Ezt követően csoportunk létrehozott egy speciális térképezési populációt, amely lehetőséget ad a kiemelt kromoszómákon elhelyezkedő modifikátort, modifikátorokat tartalmazó intervallumok szűkítésére. Ez a bonyolult keresztezési sémával létrehozott speciális térképezési populáció Advanced Intercross Lines (Darvasi és Soller, 1995), vagyis AIL, amit esetünkben Compact-AIL-ra módosítottunk. A Compact-AIL a modifikátor gének térképezéséhez kialakított Cross4 F2 populációból indul ki. A folyamat során a beltenyésztés maximális elkerülése mellett, egymás utáni tenyésztésgenerációk létrehozása a cél. A nagyobb térképezési erő érdekében a Compact-AIL tenyésztésgenerációit úgy szelektáltuk, hogy az egyedek az F11 generációra (térképezési populáció) teljes mértékben homozigótává váljanak az *Mstn*^{Comp-d11Abc} mutációra. Ennek következtében a populációnak nagyobb része (32%-a) lesz alkalmas a térképezésre. Mivel az AIL tenyésztési módszere növeli a rekombinációs események valószínűségét, eredményeként a kiindulási vonalak genomja nagymértékben fragmentálódik és ez lehetővé teszi a finomtérképezést (Pinke és mtsai. 2008). Az X-kromoszóma genetikai analizéséhez a Compact-AIL F11 normál és hiperizmolt (6-7 hetes) egyedeit vizsgáltuk. Az X-kromoszóma inaktivációs jelensége miatt csak a hím állatok, fenotípusosan szélsőséges csoportjait használtuk fel: összesen 155 M1K és 248 M5K egyed (M = hím, 1 = normál izomzatú egyed, 5 = hiperizmolt egyed, K = homozigóta *Mstn*^{Comp-d11Abc} mutáns). Az X-kromoszóma térképezéséhez szükséges genotipizálás során a 1. táblázatban összefoglalt technikai csoportokat hoztunk létre a extrém hím F11 utódokból.

	M1K	M5K	Csoportonként összesen:
G1 csoport	33	77	110
G2 csoport	61	59	120
G3 csoport	24	96	120
G4 csoport	37	16	53
Összesen:	155	248	403

1. táblázat. A genetikai térképezéshez használt Compact-AIL F11 kísérleti csoportok (G: group). M1K: normál-izomzatú, M5K: hiperizmolt egyedek

A vizsgálatban szereplő 403 állat a 3100 egyedből (Pinke és mtsai. 2008) álló Compact AIL-F11-es generációból vizuális bírálat után (Varga és mtsai. 2002) került kiválasztásra.

2.3. Minták előállítása

A vizsgálatokban felhasznált genomi DNS mintákat (Comp9, CAST/Ei és Compact-AIL F11) sós kicsapásos módszerrel preparáltuk.

A génexpressziós kísérleteimhez a Comp9-es és a CAST/Ei egértörzs egyedeinek (3-3 darab, 6-7 hetes korú hím) hátulsó végtagjából, izom preferencia nélkül, vegyes vázizmot preparáltam. A szövetmintákból TRIZOL (GIBCO) reagens felhasználásával állítottam elő az RNS mintákat. Az RNS mintákból a Stratagene cég ProSTAR Ultra HF RT-PCR System kett felhasználásával, reverz transzkripcióval állítottam elő a cDNS-eket, amelyeket mind a szekvenálások, mind pedig a génexpressziós vizsgálatok során felhasználtam. A DNS mintákat a szekvenálásokhoz és a populációs vizsgálatokhoz használtam.

2.4. Szekvencia meghatározás

A Comp9 és CAST/Ei Ar szekvenálását két részletben cDNS és genomi DNS templátok használatával hajtottam végre. A szekvencia meghatározáshoz a cDNS és DNS templátokat klónoztam (pGEM[®]-T Easy), majd az Applied Biosystems ABI PRISM BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit-jét használtam a gyártó ajánlása szerint. A törzsenkénti (Comp9 és CAST/Ei) 3-3 egyed Ar szekvenciájának meghatározáshoz az ABI PRISM 310 Genetic Analyzer készüléket használtam.

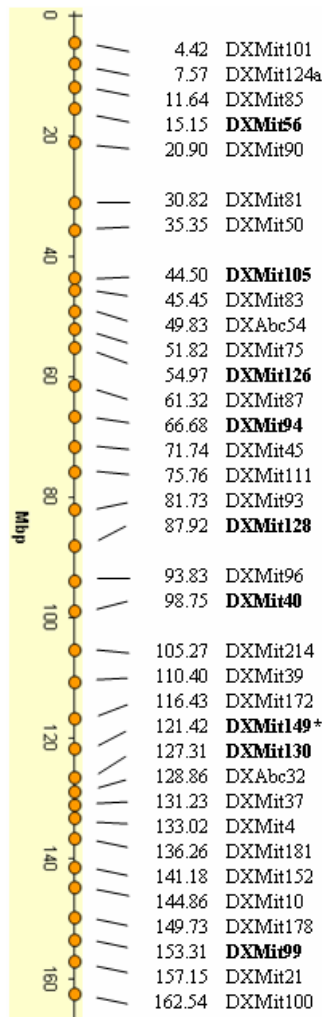
2.5. Génexpressziós vizsgálatok

A valós idejű (real time) kvantitatív PCR kísérletek során a különböző fenotípusú eger törzsek (CAST/Ei és Comp9) 3-3 hím egyedének relatív génexpresszióját (androgén receptor gén; GAPDH és β -aktin, mint háztartási gének) vizsgáltuk, háromszoros hígításban (1-szeres, 4-szeres és 16-szoros) és hígításonként három ismétlésben. A génexpressziós vizsgálathoz SYBR Green (Molecular Probes) módszert használtam, a reakciók ABI 7000-es gépen futottak. A valós idejű PCR eredmények matematikai feldolgozását Pfaffl módszere szerint, belső kontroll génnel kiegyenlített, efficiencia korrekcióval módosított relatív kvantifikációval végeztem (Pfaffl, 2001, Pfaffl és mtsai. 2002). Az adatok elemzéséhez a REST (relative expression software-tool) programot használtam.

2.6. Genetikai térképezés

2.6.1. Genetikai markerek és marker fejlesztés

A vizsgálatokba a 2. ábrán látható keret-markereket (FWM = framework marker) vontuk be az adott fizikai térkép pozíciókkal (fizikai pozíció Mbp-ben Ensembl Built34 alapján és marker név; vastagon szedett = az adott marker a Cross4 F2 térképezésben is keret-marker volt).



2. ábra. A genetikai térképezés során alkalmazott X-kromoszómás mikroszatellit markerek (keretmarkerek: FWM). A Cross4 F2 és a Compact-AIL F11 közös 9 db markere vastagon szedett. * A DXMit149-es marker a DXMit116-os marker helyett lett bevonva. A markerek mellett a fizikai pozíciójuk van feltüntetve Mbp-ben (Ensembl Built34)

Az Abc jelzésű markerek (DXAbc54 és DXAbc32) fejlesztésénél a Bioinformatikai vizsgálatok fejezetben említett programcsomagot és az www.ensembl.org internetes genom adatbázisból lekért egér genom szekvenciákat használtuk.

2.6.2. A vizsgálat során alkalmazott mikroszatellit detektálási módszer

A mikroszatellit markerek detektálása poliakrilamid gélelektroforézissel és ezüstoffestés módszerével történt (Budowle és mtsai. 1991, Varga és mtsai. 1997).

2.6.3. A vizsgálat során alkalmazott adatkezelés

A Compact-AIL F11 genetikai térképezése során a hiperizmoltságot fokozó genetikai hatást a Compact genom elemeitől, míg a normál izomzat kialakulását a CAST/Ei genom elemeitől vártuk a fenotípusnak megfelelően. Így tehát az M5K (hiperizmolt) egyedeknél a hiperizmoltság irányába ható Comp9 allélt, míg az M1K egyedeknél a normál izomzat kialakulását lehetővé tevő CAST/Ei eredetű allélt ítéltük kedvezőnek (favorizálandó). Az M5K-CAST/Ei és M1K-Comp9 fenotípus-genotípus kombinációk az elméletünknek megfelelően nem kedvezőek (nem favorizálandó). Ható mutációval kapcsolt markereknél a fenotípus-genotípus kombinációk eloszlása jelentősen megváltozik, vagyis ilyen esetben az extrém izomzatú egyedeknél (M5K) a Comp9 allél szignifikánsan magasabb frekvenciával fordul elő, mint a CAST/Ei allél és fordítva. A legnagyobb modifikátor hatást tehát azoknál a markereknél vártuk, ahol az M5K csoport a Comp9 és az M1K csoport a CAST/Ei allélt hordozta szignifikánsan nagyobb frekvenciával. Ennek megfelelően a vizsgálatba vont M1K és M5K egyedek adott allélgyakorisági (genotípusgyakorisági) értékeit összevontan kezeltük, vagyis:

- favorizálandó, kedvező fenotípus-genotípus kombinációk
FAV= M5K-Comp9 + M1K-CAST/Ei
- nem favorizálandó, nem kedvező fenotípus-genotípus kombinációk
UNFAV= M5K-CAST/Ei + M1K-Comp9

A χ^2 próbát úgy végeztük, hogy az adott markernél kapott FAV és UNFAV értékeket összevetettük a várt egyenlő arányú allélgyakorisági értékekkel. Ennek eredményeképpen kaptuk meg a modifikátor hatást érzékeltető χ^2 görbét, amely a markerek χ^2 értékeit logaritmikus skálán ábrázolja az X-kromoszóma mentén.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Az Compact egér androgén receptor génjének vizsgálata

3.1.1. Az androgén receptor gén szekvencia vizsgálata Compact és normál izomzatú egereken

Az Ar jelentős (167,4 kb) genomi mérete miatt első lépésben a gén kódoló szakaszait tartalmazó cDNS szekvenciát határoztam meg. A teljes cDNS-t azonban nemtől és törzstől függetlenül nem tudtam átfordítani az mRNS-ről. Ezért a szekvencia meghatározás két részben történt. Először az Ar gén 2-8 exonját tartalmazó cDNS szakasz szekvenciáját határoztam meg, majd a genomi DNS-ből amplifikált 1. exont elemeztem. Így vált lehetővé az Ar gén teljes kódoló szakaszának szekvencia vizsgálata. A törzsenként három-három, egymástól független minta szekvenálását követően, négy darab SNP-t (single nucleotide polymorphism=egy bázispárt érintő polimorfizmus) találtam a CAST/Ei Ar szekvenciában. Ezek a mutációk megtalálhatóak a www.jax.org internetes SNP adatbázisban is a következő rs (reference SNP) azonosítók alatt: rs31851337 (a 324-es kodonnál), rs29087626 (a 346-os kodonnál), rs31851336 (a 388-as kodonnál) és rs29085429 (a 715-ös kodonnál). Az SNP-k közül az rs31851337 és az rs29087626 okoz aminosav cserét. Így a 324-es kodonnál szerin helyett aszparagin és a 346-os kodonnál leucin helyett izoleucin található a CAST/Ei androgén receptor fehérjében. Ezek az aminosav cserék az 1. exonban találhatóak, mely a fehérje, transzkripciót szabályozó amino-terminális doménjét kódolja. A Comp9 kódoló Ar szekvencia teljes mértékben megegyezett a viszonyítási alapként használt Ensembl C57Bl/6 szekvenciával.

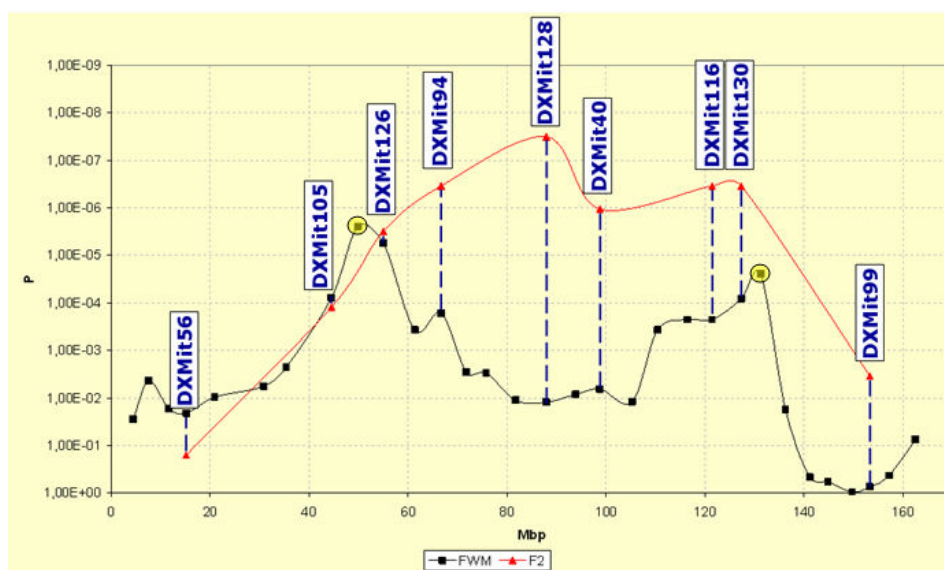
3.1.2. Az androgén receptor gén expressziós vizsgálata Compact és normál izomzatú egereken

Az androgén receptor gén expresszióját valós idejű kvantitatív PCR reakció segítségével vizsgáltam. A vizsgálatokban az 1. és 2. exont átfedő 64 bázispáros szekvenciát használtam. A Comp9 és CAST/Ei Ar génexpressziójának mértékét egymáshoz képest relatív módon fejeztem ki. A vizsgálatok során többszörös génexpresszióra utaló eltérést nem tapasztaltam az egységnyi CAST/Ei Ar expresszió és a hozzá viszonyított Comp9 Ar expresszió között.

3.2. A Compact egér X-kromoszómáján elhelyezkedő, hiperizmoltságot befolyásoló kromoszóma szakasz beszűkítése

3.2.1. Genetikai térképezés az F11 generáción

Az X-kromoszómán elhelyezkedő, hiperizmoltságra ható gén vagy gének térképezéséhez a Compact-AIL kísérleti populáció F11-es generációjának homozigóta mutáns ($Mstn^{Cmpt-dllAbc}/Mstn^{Cmpt-dllAbc}$), izmoltság tekintetében szélsőséges, azaz normál (M1K) és hiperizmoltt (M5K) fenotípusú egyedeket vizsgáltam. Az X-kromoszóma markerenkénti, átlagosan 4,94 Mb-os távolságú (legnagyobb és legkisebb távolság: 6,52 Mbp és 3,15 Mbp), egyenletes lefedéséhez az Ensembl (www.ensembl.org) internetes adatbázisban szereplő (DXMit), valamint az adatbázis szekvencia alapján általunk tervezett (DXAbc) mikroszatellit markereket használtam. A marker szettben szerepelt a korábbi 9db F2-ben vizsgált mikroszatellit marker is. A továbbiakban ezeket közös néven keret-markerként (FWM= framework marker) említem. A keret-markerek genotipizálását, a korábbi F2 eredmények alapján legmagasabb LOD értéket adó DXMit128 markertől kezdtem és innen haladtam tovább mind disztális, mind pedig proximális irányba. A FWM-eket először csak a G1 és G2 csoportra genotipizáltuk. Ez összesen 94 normál izomzatú és 136 hiperizmoltt, homozigóta mutáns hímet jelentett. Így tehát első lépésben ezt a 230 egyedet 31 FWM marker vonatkozásában vizsgáltuk meg. A több mint 7000 genotipizálás eredményeképpen erős hiperizmoltságot befolyásoló hatást detektáltunk az X-kromoszómán 49,83 Mbp-nál a DXAbc54-es és 131,23 Mbp-nál a DXMit37-es mikroszatellitknél (3. ábra, sárga körrel jelölve).

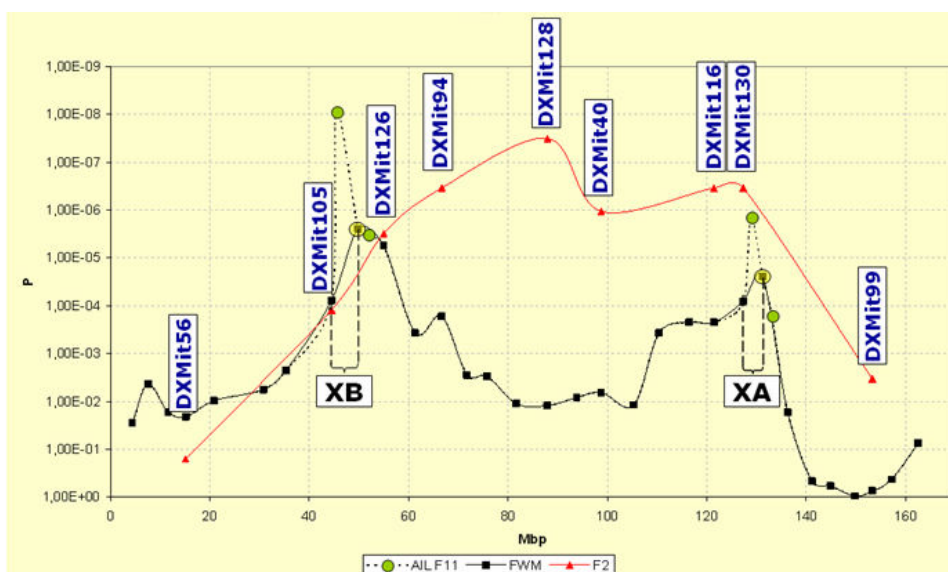


3. ábra. Az X-kromoszóma F11 (n=230) térképezése összevetve az Cross4 F2 (n=85) eredményekkel. F2 markerszám: 9 (piros háromszög), F11 markerszám: 31 (fekete négyzet). A közös markerek kék szaggatott vonallal vannak összekötve. A két sárga körrel jelölt markernél az F11 térképezés során szignifikáns modifikátor hatást tapasztaltunk

A FAV-UNFAV (lásd a Vizsgálat során alkalmazott adatkezelés című fejezetben) összevont χ^2 módszerrel kapott hatásgörbe, ezeknél a pontoknál erős, szignifikáns $2,45E-06$, illetve $2,44E-05$ értéket mutatott.

3.2.2. Az F11-es generációban tapasztalt modifikátor régiók további szűkítése

Mindkét csúcs (DXAbc54; 49,83 Mbp-nál és DXMit37; 131,23 Mbp-nál) esetében egy-egy további markert vontunk be mind proximális, mind disztális irányban (4. ábra, zöld körrel jelölve) a legerősebb modifikátor hatás szűkítéséhez. Ezek a markerek a DXMit37 körül: a DXMit4 (disztális) és a DXAbc32 (proximális), valamint az DXAbc54 körül: a DXMit75 (disztális) és a DXMit83 (proximális). Ebben a szakaszban a mégpontosabb eredmény érdekében megnöveltük a vizsgálati egyedszámot, vagyis a G1-G2 utódcsoportok (összesen $n=230$) mellett már G3-G4 csoportokat (összesen $n=173$) is bevontuk a genotipizálásba. Így ez a vizsgálat már összesen 403 Compact-AIL F11 egyedre érintett (155 M1K és 248 M5K). A további közel 2000 genotipizálás eredményeképpen a DXMit37 marker disztális oldalán bevont DXMit4 markernél csökkent a χ^2 érték, viszont a proximális oldalon elhelyezkedő DXAbc32 markernél $1,41E-06$ értéket kaptunk. Ez a pont (DXAbc32) a legmagasabb csúcsa a DXMit130-DXMit37 markerek által szegélyezett, XA-nak elnevezett régióknak. A DXAbc54 markernél ugyancsak a disztális oldalon csökkent a χ^2 érték a DXMit75 markernél, viszont nőtt a proximális oldalon elhelyezkedő DXMit83-as markernél $8,55E-09$ értékig. Ez a DXMit105 és DXAbc54 markerek által közrezárt XB régió jelenlegi legmagasabb pontja (DXMit83).



4. ábra. Az X-kromoszóma modifikátor intervallumainak szűkítése. Az F11 térképezés során szignifikáns modifikátor hatást mutató markerek (sárga kör) mellé újabb markereket vontunk be (zöld kör), amelyeket nagyobb egyedszám mellett ($n=403$) vizsgáltunk és két esélyes intervallumot (XA és XB) határoztunk meg

3.2.3. Két erősen szignifikáns modifikátor régió meghatározása

A két egymással szomszédos modifikátor régió szűkítéséhez a térképezési populáció további egyedeit vontunk be és újabb markereket is vizsgáltunk. Így két erőteljes hatású, jól definiálható intervallumot határoznunk meg, amelyeket XA-nak és XB-nek neveztük el. Az XA hossza 3,92 Mbp és ~60 gént illetve feltételezett gént foglal magába az Ensembl Built34 adatai szerint. Az XB régió 5,33 Mbp hosszú és ~30 gén illetve feltételezett gén helye ismert (Ensembl Built34) benne.

3.3. Új tudományos eredmények

Munkám során a következő, új tudományos eredmények születtek:

1. Szekvencia vizsgálataim során meghatároztam, a miosztatin modifikátor szerepre esélyesnek tartott androgén receptor gén (Ma és mtsai. 2001, Varga és mtsai. 2003a) cDNS szekvenciáját a Comp9 miosztatin mutáns egértörzsben. Az Ar gén nem mutatott eltérést a vad típusú egértörzshöz viszonyítva.
2. A speciális keresztezési eljárással létrehozott populáció (Compact-AIL) vizsgálata során két modifikátor régióra bontottam a korábbi F2 analízis során azonosított, X-kromoszómán található miosztatin modifikátor régiót, igazolva ezzel az AIL populáció különleges felbontóképességének erejét. Bizonyítottam azt, hogy az F2-ben végzett vizsgálat egy úgynevezett ghost-QTL-t (lásd a Következtetések és javaslatok fejezetben) mutatott ki legerősebb kapcsoltságra utaló pontként, amely a két szomszédos valós QTL együttes látszólagos hatásaként jelent meg. További mikroszatellit markerek bevonásával két szűk, jól definiálható modifikátor régiót sikerült meghatározni az X kromoszómán, amelyeket XA-nak és XB-nek neveztem el.
3. Megállapítottam, hogy a Comp9 egértörzs hiperizmolt fenotípusának kialakításában az androgén receptor gén nagy valószínűséggel nem játszik szerepet, mivel nem a leszűkített XA és XB régiókban található és sem szekvenciája sem expressziója nem különbözik a vad típusú egyedekétől.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. Az androgén receptor gén mint esélyes gén

Munkám során az androgén receptor gént elhelyezkedése (genomi pozíciója az X-kromoszómás modifikátor hatás csúcspontját jelölő DXMit128-as marker közelében van egy F2 térképezési populáció analízise nyomán; Varga és mtsai. 2003a) és izomfejlődésben betöltött szerepe (Ma és mtsai. 2001, Chipuk és mtsai. 2002) miatt, mint esélyes miosztatin modifikátort vizsgáltam.

4.1.1. Az androgén receptor gén szekvencia vizsgálata

A gén kiterjedt genomi mérete miatt, első lépésben a kódoló szekvenciáját határoztam meg három Comp9 (hiperizmolt) és három kontrollként használt CAST/Ei (normál izomzatú) egér esetében. Az eredmények alapján összevettem a Comp9 Ar kódoló szekvenciáját a konszenzus (Ensembl, C57Bl/6) és a CAST/Ei szekvenciával. Az Ar génben nem találtunk Comp9 specifikus mutációt. Csupán az eddig ismert négy CAST/Ei SNP-t mutattuk ki a *Mus musculus castaneus* alfajából kialakított beltenyésztett törzsből. A négy mutációból mindössze kettő okoz aminosav cserét az rs31851337 a 324-es kodonnál és az rs29087626 a 346-os kodonnál. Ezek az aminosav cserét okozó változások a CAST/Ei Ar fehérje transzkripciót szabályozó részében találhatóak. Tehát, ha ezeknek a mutációknak fenotípusos hatása van, akkor ez az Ar fehérje más gének transzkripciójára kifejtett, szabályozó működésében jelenhet meg a CAST/Ei törzs esetében. Mivel a CAST/Ei törzs nem mutat extrém izmolt jelleget ezért valószínűsíthető, hogy a CAST/Ei Ar SNP-k nem játszanak szerepet a hiperizmolt fenotípus kialakításában. Az is megállapítható, hogy a detektált, aminosavcserét okozó SNP-k feltételezhetően alfaji sajátosságok, hiszen a több beltenyésztett egér genom mellett a konszenzus C57Bl/6 genomi szekvencia sem tartalmazza ezeket a mutációkat.

4.1.2. Az androgén receptor gén expressziós vizsgálata

A vizsgálatok során az Ar RNS relatív mennyiségét határoztuk meg 6-7 hetes hím Comp9 (hiperizmolt) és CAST/Ei (normál izomzatú) egerek esetében. A Comp9 Ar relatív expressziója (1,16) megközelítőleg azonosnak bizonyult az egy egységnyi vett CAST/Ei Ar expresszióhoz képest. Ez a kis különbség a 0,001-es *P*-értéket figyelembe véve szignifikánsnak mondható. Összességében azonban a génextpresszió kvantitatív analízise nem mutatott jelentős eltérést a Comp9 (hiperizmolt) és CAST/Ei (normál izomzatú) hím egerek vázizomzati Ar mRNS szintje között.

4.1.3. Az androgén receptor gén esélyes gén szerepének átértékelése

A Cross4 keresztezésből származó (Comp9 x CAST/Ei) F2-generáción végzett modifikátor régió térképezés alapján a legerősebb hatást mutató ponthoz közeli pozícióját, valamint funkcióját tekintve az Ar megfelelt a pozícionálisan esélyes modifikátor gén szerepre. Előzetes eredményeink alapján azonban kijelenthető, hogy sem a kódoló szekvencia szintjén, sem pedig expressziós szinten nem igazolható, az Ar mutáns miosztatin (*Mstn^{Comp-dll^{Abc}}*) modifikátor szerepe (Veress és mtsai. 2009). További fehérjeszintű vizsgálatok során lehetett volna ellenőrizni a mikro RNS-ek esetleges szabályozását a Compact Ar esetében, hiszen bizonyos miRNS-ek hatással lehetnek az androgén receptor jelátviteli rendszerre (Epis és mtsai. 2009), azonban az előzetes vizsgálatok elvégzését követően már rendelkezésünkre állt a nagy felbontóképességű térképezési populáció (Compact-AIL F11). Ezért úgy döntöttünk, hogy a további időigényes és költséges Ar vizsgálatot csak akkor végezzük el, ha a speciális populáció eredményei is igazolják az Ar esélyes gén szerepét.

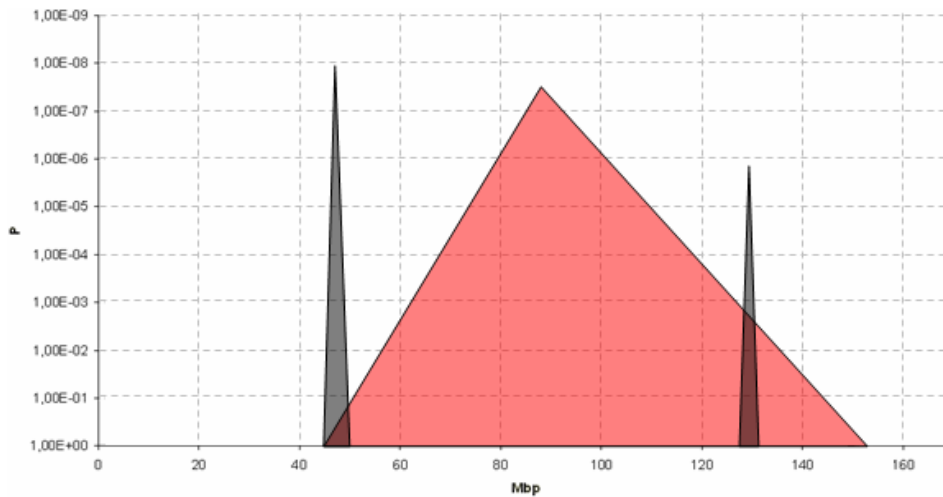
Így a kiterjedt X-kromoszómás modifikátor régió szűkítése vált a fő feladattá a további Ar vizsgálat, illetve az újabb esélyes gén keresése és vizsgálata helyett.

4.2. Genetikai térképezés a Compact-AIL F11 generációban

4.2.1. A Compact-AIL F11 és a Cross4 F2 eredmények összevetése

A több mint 7000 genotipizálást követően lehetőségünk nyílt összehasonlítani a Compact-AIL F11 eredményeket a Cross4 F2-ben kapottakkal. Az eredmények azt mutatták, hogy míg ott a legmagasabb értéket 90 Mbp körül kaptuk, addig itt ugyanebben a pozícióban szignifikancia szint alatti érték mutatkozott. Ez az eredmény továbbá igazolta azt a korábbi feltételezésünket, hogy nem egy, hanem két egymással szomszédos erőteljes hatású modifikátor régió helyezkedik el az X-kromoszómán (5. ábra). A Compact-AIL vizsgálat tehát alkalmas volt arra, hogy szétbontsam ezt a kettős hatást bizonyítva, hogy az F2 analízis által megjelölt helyen valójában nincs is jelentős hatás és az egy úgynevezett: ghost-QTL (Haley és Knott 1992, Martinez és Curnow 1992).

A ghost-QTL egy valótlán kvantitatív tulajdonság lókuszt (QTL) jelöl, ami akkor detektálható, ha két vagy több az adott fenotípusra ható mutáció között nincs vagy nem történt kellő mennyiségű rekombináció és így a két hatás egy kiterjedtebb szakaszon együttesen mutatkozik meg. Mivel az F2 generációig kevés rekombinációs esemény történik (főként az X-kromoszómát tekintve) ezért ez kézenfekvő magyarázata a Cross4-ben tapasztalt eredményeknek.



5. ábra. Az X-kromoszóma F11 (n=230) térképezési eredményeinek összevetése az F2 (n=85) eredményekkel. A piros háromszög az F2, a két fekete háromszög az F11 térképezési eredményt mutatja. Az ábra bal oldalán a szignifikancia mértéke látható P -értékben kifejezve, míg az ábra alatti skála a kromoszóma pontok fizikai távolságát mutatja megabázisban (a proximális végétől a disztális felé)

4.3. Előrelépés az X-kromoszómás modifikátor gének térképezésében

Munkánk során egy bonyolult keresztezési eljárással létrehozott speciális (Compact-AIL F11) térképezési populációt (Pinke és mtsai. 2008) használtunk fel a megközelítőleg 100 Mbp-os X-kromoszómás modifikátor régió beszűkítésére. Egy ilyen populáció a felhalmozódó rekombinációs eseményeknek köszönhetően, a legalkalmasabb eszköz a finom térképezéshez. Nagy felbontó ereje miatt hatékonysága sokszorosa lehet az F2 populáció hatékonyságának.

A Compact-AIL F11 populáción végzett genetikai térképezés során a korábbi F2-es csúcspontnál elhelyezkedő DXMit128-as mikroszatellit marker esetében, illetve - a rekombinációs eseményeknek köszönhetően - a körülötte újonnan bevont markereknél nem tapasztaltunk modifikátor hatást.

Folytatva a genetikai térképezést, két egymással szomszédos modifikátor szakaszt detektáltunk és további markerek bevonásával beszűkítettük ezeket a régiókat. Ezt a két modifikátor régiót XA-nak és XB-nek neveztük el. Ezekben a régiókban további rekombinációk lehetnek, így ezek segítségével a további szűkítésére is lehetőség van, amely megfelelő számú rekombinációs esemény esetén akár a ható mutáció szintjéig is folytatható. Éppen ezért nem volt célunk esélyes géneket megnevezni és azokat sorozatosan tesztelni különböző módszerekkel, a költséges és hosszúságú kísérleti beállítások után.

Amennyiben a jövőben sor kerülhet további X-kromoszómás modifikátor vizsgálatokra, úgy az F2-ben megismert, kiterjedt (~100 Mbp-os) régió helyett már csak annak töredékére egy 3,92 Mbp-os és egy 5,33 Mbp-os szakaszra kell koncentrálni, ami minden tekintetben nagy előrelépésként értékelhető.

4.4. A finomtérképezés további lehetőségei

A CAST/Ei-vel elindított keresztezés jóvoltából mind az XA, mind az XB intervallumban még számos, további informatív marker található az előzetes polimorfizmus vizsgálatainknak megfelelően. Így, a Compact-AIL keresztezésben felhalmozódott rekombinációs események következtében jó eséllyel lehet tovább szűkíteni ezeket a régiókat, amely nagyban segíti a feltételezett modifikátorok térképezését. Abban az esetben, ha ez a folyamat elér egy néhány génes szintre, akkor célszerű ezeknek a géneknek mind a szekvencia szintű mind pedig az expressziós szintű vizsgálatát elvégezni. Ha a munka során bármilyen szekvencia, vagy expressziós különbséget sikerül detektálni, akkor azt populáció szinten is ellenőrizni kell. Ehhez egy speciális, tömegmérésekben is alkalmazható detektálási módszer kialakítása szükséges. Azonban az egyáltalán nem biztos, hogy a modifikáló hatást eredményező mutáció génben van.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Impakt faktoros, idegen nyelvű közlemények:

Veress Gy., Bakos K., Korom E., Pinke O., Kovács B., Varga L. (2009): Sequence and expression analysis of the androgen receptor gene from Compact mouse. *Archiv für Tierzucht*, 2009/52, Issue 2, 212-214. IF: 0,679 (2008)

Korom E., Bakos K., **Veress Gy.**, Pinke O., Reed K. M., Varga L., Kovács B. (2010): Isolation of 11 new polymorphic dinucleotid microsatellites from CA enriched turkey genomic libraries. *Archiv für Tierzucht*, 2010 (elfogadva). IF: 0,679 (2008)

Impakt faktoros, magyar nyelvű közlemények:

Veress Gy., Bakos K. (2009): A miosztatin gén szerepe a különböző háziállatfajták hiperizmoltságának kialakulásában. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2009/8., 131., 483-488. IF: 0,088 (2008)

Lektorált folyóiratban megjelent magyar nyelvű közlemények:

Korom E., Pinke O., **Veress Gy.**, Kovács B., Szabó Gy., Varga L. (2004): A pulyka genetikai vizsgálatára alkalmas tyúk mikroszatellitek. *A Baromfi*, 2004/4, 42-47.

Bakos K., **Veress Gy.**, Korom E., Pinke O., Kovács B., Varga L. (2008): 52 új pulyka mikroszatellit izolálása és térképezése. *Animal welfare, etológia és tartástechnológia*, 2008 Vol 4., Issue 2., 409-415.

Bakos K., **Veress Gy.**, Pinke O., Kovács B., Varga L. (2008): Néhány hiperizmoltságra ható, modifikátor szerepre esélyes gén vizsgálata Compact egéren. *Animal welfare, etológia és tartástechnológia*, 2008 Vol 4., Issue 2., 416-423.

Pinke O., Bakos K., **Veress Gy.**, Korom E., Kovács B., Müller G., Varga L. (2008): Advanced Intercross Lines kísérleti populáció kialakítása és tenyésztése. *Animal welfare, etológia és tartástechnológia*, 2008 Vol 4., Issue 2., 445-452.

Veress Gy., Pinke O., Bakos K., Kovács B., Müller G., Varga L. (2008): Hiperizmoltságra ható, X kromoszómán elhelyezkedő modifikátor gének térképezése. *Animal welfare, etológia és tartástechnológia*, 2008 Vol 4., Issue 2., 462-467.

Nemzetközi konferencia proceedings-ben megjelent közlemények:

Bakos K., Pinke O., **Veress Gy.**, Korom E., Kovács B., Müller G., Varga L. (2009): A mapping strategy for identifying modifier genes affecting the rate of muscularity in the compact mouse. Poster. 1st Central and Eastern European Laboratory Animal Conference-2009 (CEELA-2009) Budapest, 23th May, 2009. (60-61.)

Hazai konferencia proceedings-ben megjelent közlemények:

Pinke O., Bakos K., Korom E., **Veress Gy.**, Kovács B., Varga L. (2005): Többgenerációs géntérképezési populációk egéren. 74. Országos Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Kiállítás, Agrárkutatás 2005, Fiala Kutatók Fóruma, Budapest, szeptember 1.

Pinke O., Bakos K., Huszti K., Korom E., Kovács B., **Veress Gy.**, Szabó Gy. és Varga L. (2005): Két AIL alpopuláció létrehozása genotipizálás segítségével. Biomodellek konferencia 2005, Budapest, november 3.

Veress Gy., Kovács B., Korom E., Bakos K., Pinke O., Varga L. (2006): A miosztatin, valamint néhány modifikátor szerepre esélyes gén szekvencia, és expressziós vizsgálata Compact egéren. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Akadémiai Beszámolók, Állathigiénia, állattenyésztés, genetika, takarmányozástan, Budapest, január 25. (10. oldal)

Pinke O., Bakos K., Müller G., **Veress Gy.**, Korom E., Kovács B., Varga L. (2006): Nagyfelbontású genetikai térképezésre alkalmas speciális populációk – Advanced Intercross Lines – kialakítása. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Akadémiai Beszámolók, Állathigiénia, állattenyésztés, genetika, takarmányozástan, Budapest, január 25. (11. oldal)

Bakos K., **Veress Gy.**, Korom E., Pinke O., Kovács B., Varga L. (2006): Új mikroszatelli-markerek izolálása pulykából CA-ismétlődésre dúsított genomi könyvtár segítségével. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Akadémiai Beszámolók, Állathigiénia, állattenyésztés, genetika, takarmányozástan, Budapest, január 25. (12. oldal)

Veress Gy., Bakos K., Korom E., Pinke O., Kovács B. és Varga L. (2006): Mikroszatellit markerek fejlesztése a pulyka géntérképéhez. MTA székház, Állat-biotechnológiai kutatások Magyarországon, Budapest, szeptember 29. (20. oldal)

- Veress Gy.**, Pinke O., Bakos K., Kovács B., Müller G., Varga L. (2008): Hiperizmoltságra ható, X kromoszómán elhelyezkedő modifikátor gének térképezése, I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok c. tudományos konferencia, Molekuláris genetika és biotechnológia szekció, előadás, Gödöllő, április 11-12. (87. oldal)
- Pinke O., Bakos K., **Veress Gy.**, Korom E., Kovács B., Müller G., Varga L. (2008): Advanced Intercross Lines kísérleti populáció kialakítása és tenyésztése, I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok c. tudományos konferencia, Molekuláris genetika és biotechnológia szekció, előadás, Gödöllő, április 11-12. (93. oldal)
- Bakos K., **Veress Gy.**, Korom E., Pinke O., Kovács B., Varga L. (2008): 52 új pulyka mikroszatellit izolálása és térképezése, I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok c. tudományos konferencia, Molekuláris genetika és biotechnológia szekció, előadás, Gödöllő, április 11-12. (88. oldal)
- Bakos K., **Veress Gy.**, Pinke O., Kovács B., Varga L. (2008): Néhány hiperizmoltságra ható, modifikátor szerepre esélyes gén vizsgálata Compact egéren, I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok c. tudományos konferencia, Molekuláris genetika és biotechnológia szekció, előadás, Gödöllő, április 11-12. (89. oldal)
- Veress Gy.**, Pinke O., Bakos K., Kovács B., Varga L. (2009): Az X-kromoszómán elhelyezkedő, hiperizmoltságra ható modifikátor intervallumok térképezése Compact egéren. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Akadémiai Beszámolók, Állathigiénia, állattenyésztés, genetika, takarmányozástan, Budapest, január 28. (XX. oldal)