

Szent István Egyetem

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

Doktori (Ph.D) értekezés

Veress Gyula

Gödöllő

2010

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	3
1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. A szarvasmarha hiperizmolt fenotípusának első írásos dokumentálása	7
2.2. A szarvasmarha hiperizmolt fenotípusának elnevezései	8
2.3. A hiperizmolt fenotínus genetikai háttere	8
2.5. 11 Inperizitori fenoripus generitari natore 2.3.1 A hiperizmoltság öröklődésének vizsgálata a fenotínus alapián	8
2.3.1. A hipolizitolisus oronoucsenek vizsguara a jenonpus atapjan 2.3.2. Génetikai térkénezés és genetikai markerek	8
2.3.2. Generikai terképezes és generikai markerek 2.3.3. Az első genetikai eredmény a hiperizmoltság vizsgálatában	9
2.3.9. Az első generikai eredmeny a hiperizmonság vizsgalatában 2.3.4. A miosztatin felfedezése	9
2.3.5. A miosztatin szerepe és működése	11
2.3.5. A mosztatin szerepe és műkötése 2.3.6. Természetes miosztatin mutációk	13
2.5.0. Termeszeres mosztatin mutaciók 2.4. A Compact fenotípus és a Compact miosztatin mutáció	16
2.4. A Compact fenotípus i allamzása	16
2.4.1. A Compact fenotípus jetienzese 2.4.2. A Compact fenotípus öröklődése és az ivar hatása a HCR és	10
HCI vonalak esetéhen	17
2 A 3 A Compact agár miosztatin mutációia	17
2.4.5. A Compact eger miosziaim matacioja 2.5. Miosztatin modifikátorok	18
2.5. Modifikátor gának	10
2.5.1. Mounikator genek 2.5.2. Miosztatin modifikátorok jalanláta szarvasmarha fajták asatában	10
2.5.2. Miosztatin modifikátorok jelentele szurvasmurna jajiak eseleben	19
2.5.5. Miosziuin moujikulorok jelenlele u niperizmoli Compaci eger	10
2.6 A miosztatin modifikátorok vizsgálata hiporizmolt Compact agáran	20
2.6. A miosztatin mounikatorok vizsgalata inperizmon Compact egeren 2.6.1. A Compact fanotínya öröklődása ás az iyar hatása Comp0	20
2.0.1. A Compact jenotipus orokiouese es uz ivar natasa Comp9	20
Dellenyeszleli vonal eselen 2.6.2. Miggstatin modifikátorok tárkápazása	20
2.0.2. Milosziulin mouljikulorok lerkepezese 2.6.2. A Compact ogén V knomogzéméién allahozakodő modifikéton négié	21
2.0.5. A Compact eger A-kromoszomajan etnetyezkedő modifikator regio	24
2.7. Az androgén receptor gen, mint eseryes miosztatin modifikator	25
2.7.1. Az anarogen receptor mukodese	23
2.7.2. Az androgen receptor hatasa IGF-p eseteben	27
2.8. Specialis populacio letrehozasa a miosztatin modifikatorok terkepezesehez	27
3. AN YAG ES MODSZER	29
3.1. Bioinformatikai vizsgalatok	29
3.1.1. Genterkepezesi, genetikai es genomikai adatbazisok	29
3.1.2. Primer tervezés, tervező programcsomagok	29
3.1.3. Szekvenciákat elemző és összehasonlító programcsomagok	30
3.2. Kísérleti állatok	30
3.2.1. Az androgén receptor gén szekvencia és expressziós vizsgálatában	• •
felhasznált kísérleti állatok	30
3.2.1.1. A Comp9-es vonalból kialakított beltenyésztett törzs	30
3.2.1.2. CAST/Ei beltenyésztett törzs	31
3.2.2. Az X-kromoszómán elhelyezkedő modifikátor intervallum	. .
szűkítéséhez felhasznált kísérleti állatok	31
3.3. Minták előállítása	32
3.3.1. DNS izolálás	32

3.3.2. Izom minták preparálása	33
3.3.3. RNS izolálás	33
3.3.4. cDNS készítés	34
3.4. Szekvencia meghatározás	35
3.4.1. Szekvenálási templát készítése cDNS-ből	35
3.4.2. Szekvenálási templát készítése genomi DNS-ből	35
3.4.3. A templát DNS/cDNS klónozása	36
3.4.3.1. Ligálás	36
3.4.3.2. Transzformálás	36
3.4.3.3. A baktérium kolóniák tesztelése	37
3.4.3.4. Plazmid tisztítás	37
3.4.4. Szekvenáló reakció készítés	38
3.4.5. Szekvencia meghatározás	39
3.5. Génexpressziós vizsgálatok	39
3.5.1. Valós idejű (real time) kvantitatív PCR	39
3.5.2. Relatív kvantifikáció	40
3.6. Genetikai térképezés	40
3.6.1. Genetikai markerek és marker feilesztés	40
3.6.2. A vizsgálat során alkalmazott mikroszatellit detektálási módszer	41
3.6.2.1. Poliakrilamid gélelektroforézis	41
3.6.3. A vizseálat során alkalmazott adatkezelés	42
4. EREDMÉNYEK	43
4.1. A Compact egér androgén receptor géniének vizsgálata	43
4.1.1. Az androgén receptor gén szekvencia vizsgálata Compact és	
normál izomzatú egereken	43
4.1.2. Az androgén receptor gén expressziós vizsgálata Compact és	-
normál izomzatú egereken	43
4.2. A Compact egér X-kromoszómáján elhelyezkedő, hiperizmoltságot	
befolvásoló kromoszóma szakasz beszűkítése	44
4.2.1. Genetikai térképezés az F11 generáción	46
4.2.2. Az F11-es generációban tapasztalt modifikátor régiók	-
további szűkítése	46
4.2.3. Két erősen szignifikáns modifikátor régió meghatározása	48
4.3. Új tudományos eredmények	52
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	53
5.1. Az androgén receptor gén mint esélves gén	53
5.1.1. Az androgén receptor gén szekvencia vizsgálata	53
5.1.2. Az androgén receptor gén expressziós vizsgálata	54
5.1.3. Az androgén receptor gén esélyes gén szerepének átértékelése	54
5.2. Genetikai térképezés a Compact-AIL F11 generációban	54
5.2.1. A Compact-AIL F11 és a Cross4 F2 eredmények összevetése	54
5.3. Előrelépés az X-kromoszómás modifikátor gének térképezésében	55
5.4. A finomtérképezés további lehetőségei	55
6. ÖSSZEFOGLALÁS. SUMMARY	57
7. FÜGGELÉK	61
Oldatok jegyzéke	61
A felhasznált mikroszatellit markerek primer szekvenciája	62
8. IRODALOMJEGYZÉK	63

Rövidítések jegyzéke

AA	aminosav
ActRIIB és ActRIIA	II. típusú activin receptor és alegysége
AIL	Advanced Intercross Lines, egy speciális térképezési populáció
Ala	alanin
APS	ammonium persulphate
Ar	androgén receptor gén
ARE	androge response element
Asn	aszparagin
BALB/c	beltenyésztett egértörzs
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMP	bone morphogenetic protein
bp	bázispár
BSA	Bovine serum albumin
BTA2	szarvasmarha 2. kromoszómája
C1	vad típushoz hasonló, normál izomzatú egyedek
C1F	normál izomzatú nőstény
C1M	normál izomzatú hím
C4F	hiperizmolt nőstrény (Cross2 F2-ben)
C5	leginkább hiperizmolt (Compact fenotípusú) egyedek
C57B1/6	beltenvésztett laboratóriumi egértörzs (fekete színű)
C5M	hiperizmolt hím
CAST/Ei	a <i>Mus musculus castaneus</i> alfaiból kialakított beltenvésztett törzs
cDNS	komplementer (complementary) DNS. az mRNS DNS-re átírt változata
cM	centimorgan, a genetikai térképezés mértékegysége
Cmpt	a Compact fenotípusért felelős lókusz
Comp9	magyarországi beltenvésztett kilences Compact alvonal
Compact-AIL	a Compact modifikátor gének térképezéséhez létrehozott speciális
r	AIL térképezési populáció
Cross1	HCR apa x BALB/c anya keresztezés
Cross2	HCI apa x BALB/c anya keresztezés
Cross4	Comp9 apa x CAST/Ei anva keresztezés
Cvs	cisztein
DEPC	dietil-pirokarbonát
DHT	$5-\alpha$ -dihidrotesztoszteron
DM	duplán-izmolt (double muscling)
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleid trifoszfátok
DW	desztillált víz
DXAbc	saját feilesztésű mikroszatellit marker
EDTA	etilén-diamino-tetra-acetát
EST	expresszált szekvencia által meghatározott hely (expressed sequence
	tag) a komplementer DNS részleges szekvenálásával határozzák meg
	egy gén azonosításához, térképezéséhez, klónozásához használható
F11	tizenegyedik filialis (gyermeki) generáció (genetikailag meghatározott
	párosítást követően), a Compact-AII, esetében térképezési populáció
F2	második filialis (gyermeki) generáció(genetikailag meghatározott
	párosítást követően)

FAV	favorizálandó, kedvező fenotípus-genotípus kombinációk
FLRG	follistatin-related gene
FWM	keret-marker (framework marker)
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GASP-1	GDF associated serum protein-1
GDF-8	miosztatin (growth differentiation factor-8)
Glu	glutamin
Gly	glicin
HĊI	magyarországi beltenyésztett Compact alvonal (Hungarian inbred
	Compact line)
HCR	magyarországi random tenyésztett Compact alvonal (Hungarian
	randombred Compact line)
Ile	izoleucin
IPTG	izopropil-B-D-tiogalaktopiranozid
Leu	leucin
LOD	logarithm of odds: a 10-es alapú logaritmusa annak az esélynek, hogy
	két lókusz genetikailag kapcsolt, összehasonlítva annak az esélyével,
	hogy nem kapcsoltak
Lvs	lizin
M1K	normál izomzatú hím a Compact-AIL F11-ben
M5K	hiperizmolt egyed a Compact-AIL F11-ben
Mbp	mega bázispár (egy millió bázis)
MEF-3	mvocvte enhancer factor 3
mh	muszkuláris hipertrófia gén
miRNS	mikro RNS
MO	milli-O water
mRNS	hirvivő (messenger) RNS
Mstn ^{Cmpt-dl1Abc}	12 bázispáros miosztatin mutáció (Compact egér)
PCR	polimeráz láncreakció
Phe	fenilalanin
OTL	kvantitatív tulajdonság lókusz (quantitative trait locus)
REST	relative expression software-tool
RNS	ribonukleinsav
rs	SNP azonosító (reference SNP)
RT	szobahőmérséklet (room temperature)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
Ser	szerin
SNP	pontmutáció (single nucleotide polymorphism), genetikai markerként
	használható
STR	mikroszatellit (short tandem repeat), genetikai markerként
	használható
Taq	thermus aquaticus baktérium
TEMED	N,N,N',N' tetramethylethylenediamine
TGF-B	transzformáló béta növekedési faktor (transforming growth factor- β)
TRIS	tris-(hidroxi-metil)-amino-metán
Tvr	tirozin
UNFAV	nem favorizálandó, nem kedvező fenotípus-genotípus kombinációk
UTR	nem transzlálódó régió
X-GAL	5-bromo-4-kloro-3-indolil-B-D-galaktopiranozid
λ DNS	lambda fág DNS
	inition ing D115

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

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-izmoltság 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 esetét.

- 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 lókuszok 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

5

mutációi közül mára már több is ismert, azonban az azokat ténylegesen módosító faktorok ismeretlenek.

Ezeknek a modifikátor géneknek az ismerete nagy segítséget nyújthat az állattenyésztésben, akár a duplán-izmolt fajtáknál gyakran előforduló nehéz ellés elleni szelekcióban, illetve a humán orvoslásban például az izomsorvadás célzott kezelése esetén. 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-dl1Abc}*) nem inaktiváló mutáció (a fehérje propeptid régióját érinti). Tehát az Mstn^{Cmpt-dllAbc} szükséges, de nem elégséges feltétele a hiperizmoltság 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 lókusz alakítja ki. Ezek közül az X-kromoszómán detektált lókusz 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 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 elér 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, tömegméretekben is alkalmazható detektálási módszer kialakítása és populáció szintű alkalmazása is szükséges.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szarvasmarha hiperizmolt fenotípusának első írásos dokumentálása

A szarvasmarha fajban megjelenő hiperizmolt fenotípusról legkorábban (1807) a brit George Culley, a kor egyik neves állattenyésztője tesz említést "Observation on Live Stock" című munkájában, amikor bemutatja - az 1850 körül kialakított fehér-kék belga (Friend 1978) egyik ősét - a shorthorn fajtát ("The Short-horned, or DUTCH Kind") és annak történetét (1. és 2. ábra). A fajtákat részletesen bemutató gyakorlati gazda és agráríró e művének feljegyzéseit tekintik jelenleg a duplán-izmolt (*double muscling*, vagy DM) fenotípus első írásos dokumentálásának.



1. ábra. Az Observation on Live Stock 1807-es kiadásának címoldala és a shorthorn szarvasmarha fajta korabeli ábrázolása a műben (http://books.google.hu)

• I once saw a beast of this sort killed, which, after feeding all Summer, had not a pound of fat inside nor out; but it was one of the completest of the kind I ever saw: its two ends, viz. shoulders and buttocks, were heavy, round and coarse, without any hip-bones at all flanding up, and the body quite small; in short, it was more like an ill-made black horse, than an ox or a cow.

2. ábra. Részlet az 1807-es Observation on Live Stock című almanach "The Short-horned, or DUTCH Kind" fejezetéből, amely a shorthorn a fajta eredetének, kialakulásának elbeszélése során a ma ismert hiperizmolt fenotípushoz hasonló küllemű állatról tesz említést (http://books.google.hu)

2.2. A szarvasmarha hiperizmolt fenotípusának elnevezései

A shorthorn fajtában megjelenő duplán-izmoltság, felkeltette az állattenyésztők érdeklődését, melynek következtében hamarosan elterjedt a Brit-szigetekről és egyre több európai húsmarha fajtában fordult elő ilyen egyed. Végül a fenotípus az egész világot meghódította és ennek megfelelően számos elnevezése alakult ki, melyek a következőek: *culard, agroppa dopia, bottle-thighed, doppellender* (vagy *double loin*), *Yorkshire, greyhound belly, Teeswater* és *double rumped* (Bellinge és mtsai. 2005).

2.3. A hiperizmolt fenotípus genetikai háttere

2.3.1. A hiperizmoltság öröklődésének vizsgálata a fenotípus alapján

A szarvasmarha fajban megjelenő duplán-izmolt fenotípus, vagyis a muszkuláris hipertófia (*mh*) genetikai meghatározottságáról korábbi megfigyelések alapján több egymásnak ellentmondó elmélet is született. Először monofaktoriálisnak (Wriedt 1929), majd trifaktoriálisnak (Kronacher 1934) és később difaktoriálisnak (Quesada és Cachafeiro 1971) vélték ezt a tulajdonságot. Az 1980-as évek végére azonban az egygénes, autoszómális recesszív öröklés lett a legelfogadottabb. Ezt az elméletet a heterozigóta hordozók eredményei támasztották alá, melyek fenotípusa a normál és a hiperizmolt egyedek közt helyezkedik el (Kieffert és Cartwright 1980, Baker és Lunt 1990).

2.3.2. Génetikai térképezés és genetikai markerek

A molekuláris genetika rohamos fejlődésével (DNS-szekvenálás, polimerázláncreakció, stb.) azonban lehetővé vált az adott tulajdonságot kialakító genetikai háttér tényleges megismerése, a gének feltérképezése. Ez a folyamat egy arra alkalmas populáción, genetikai markerek felhasználásával történik, ezért az ilyen munkákat mindig megelőzi egy nagyszámú genetikai markert tartalmazó genetikai térkép létrehozása. Fontos, hogy genetikai marker több szempontból is megfelelő legyen. Az ideális genetikai marker kodomináns öröklődésű; nagymértékben polimorf (sok allélváltozata van); egyszerűen, olcsón és gyorsan kimutatható; eloszlása gyakori és egyenletes a genomban. A genetikai térképezéshez többféle marker, például SNP-k (single nucleotide polymorphism=egy bázispárt érintő polimorfizmus), EST-ek (expressed sequence tag) stb. használhatóak, azonban a legáltalánosabban használt genetikai markerek a genom mikroszatellit szekvenciái.

A határoló szekvenciák egyedisége miatt, minden egyes mikroszatellit egy rá jellemző

helyet jelöl a genomban. A mikroszatellitek magszekvenciái rövid DNS motívumok ismétlődéséből állnak (ennek köszönhető a mikroszatellitek másik elnevezése, ami az STR, vagyis short tandem repeat). Egy ilyen motívum néhány bázisból épül fel pl.: C, vagy CA, vagy CAG, vagy CAGT, stb.; vagyis lehet mono-, di-, tri-, tetra nukleotid. A motívumok eltérő számú ismétlődése adja az adott mikroszatellit szekvencia allélváltozatait. A genetikai markerek a genetikai térkép fejlettségétől függően kapcsoltsági csoportokba rendezhetőek, illetve adott kromoszómához köthetőek és így nagy segítséget nyújtanak a keresett gén, gének helyzetének meghatározásában. A genetikai térképezés során használt mértékegység a centimorgan (cM), amely egy kromoszóma két pontja (markere) között lezajló rekombinációk számából ered.

2.3.3. Az első genetikai eredmény a hiperizmoltság vizsgálatában

1995-ben, közel 190 évvel a fenotípus első leírását követően, Charlier és mtsai. a szarvasmarha 2-es kromoszómájának kapcsoltsági csoportjába (BTA2) térképezték a muszkuláris hipertófia lókuszt és az addigi feltételezések után bizonyíthatóan megállapították, hogy a duplán-izmolt fenotípus hátterében egyetlen autoszómális nagy hatású gén áll. A kutatók ennél közelebb azonban nem jutottak és a muszkuláris hipertófia gén továbbra is ismeretlen maradt.

2.3.4. A miosztatin felfedezése

Az 1980-as években a Berlini Műszaki Egyetemen egy egereken végzett magas testtömegre és magas fehérje tartalomra irányuló szelekciós kísérlet során, Major és Schlote a DM szarvasmarháéhoz nagyon hasonló - muszkuláris hipertrófiát figyelt meg néhány egyed esetében. Ezekből az állatokból alakították ki azt a véletlenszerűen (randombred) tenyésztett hiperizmolt egér vonalat, amely a nevét a fenotípusra utaló "Compact" szóból kapta. Ennek a Compact vonalnak az egyedeiből hozta létre Dr. Müller Géza a hiperizmoltság modelljéül szolgáló magyarországi HCR (Hungarian randombred Compact line) alvonalat. Ebben az alvonalban 16 generáción keresztül a legkifejezettebb Compact egyedek random párosítása folyt. A HCR alvonal 16. generációjától, további tizenhat generáción keresztül kizárólag testvérpárosítás és a Compact fenotípusra irányuló szelekció történt. Ennek eredményeként jöttek létre a genetikai térképezéshez használt beltenyésztett vonalak: HCI (Hungarian inbred Compact line, 3. ábra) és Comp9 (kilences vonal, lásd később). A HCI vonalon folyó kutatás során Varga és mtsai. (1997) az egér 1. kromoszómájának egy 8,2 cM-os szakaszára térképezték a Compact fenotípus kialakításában kulcs szerepet játszó lókuszt, melyet a

9

Compact szó után *Cmpt*-nek neveztek el. Az összehasonlító térképezési vizsgálatok során megállapították, hogy a *Cmpt*-t tartalmazó régió legtöbb része megfelel a humán 2-es kromoszóma 2q32 - 2q35 régiójának. Ez a humán 2-es kromoszóma szakasz pedig szintenikus homológiát mutat (több gén tekintetében is homológ) a szarvasmarha 2-es kromoszómáján elhelyezkedő, "*mh*" gént tartalmazó régióval (Charlier és mtsai. 1995, Solinas-Toldo és mtsai. 1995).





Ezekre, az adatokra támaszkodva felmerült annak a lehetősége, hogy a *Cmpt* homológja lehet az "*mh*"-nak (Varga és mtsai. 1997).

Ugyancsak modellállat vizsgálatok során fedezték fel McPherron és mtsai. (1997) a transzformáló béta növekedési faktorok (transforming growth factor- β , vagy TGF- β) szupercsaládjába tartozó miosztatint (growth differentiation factor-8, vagy GDF-8). Gén-kiütéses egér kísérleteikben a DM szarvasmarhákhoz hasonló fenotípust kaptak (4. ábra)





Ezek után egymástól függetlenül több kutató is beszámolt arról, hogy az újonnan felfedezett fehérje génje a szarvasmarha *mh* lókuszába térképeződik (Smith és mtsai. 1997) és megállapították, hogy bizonyos szarvasmarha fajták duplán-izmolt fenotípusáért a miosztatin

mutációi felelősek (Grobet és mtsai. 1997, Kambadur és mtsai. 1997, McPherron és Lee 1997; bővebben lásd a 2.3.4. Természetes miosztatin mutációk című fejezetben).

Ezt követően, Szabó és mtsai. (1998), esélyes génként vizsgálták a Compact egér miosztatin génjét. Munkájuk során azonosították a fenotípusért felelős *Mstn^{Cmpt-dl1Abc}* mutációt és elsőként térképezték fel a miosztatin gént az egér 1. kromoszómájára.

2.3.5. A miosztatin szerepe és működése

A miosztatin a TGF-β szupercsalád tagja, az izomnövekedés negatív szabályozója. Az embriogenezis során a myotom sejtjeiben, majd a további fejlődés alatt a vázizomzatban expresszálódik és megszabja a kialakuló izomrostok végső számát. Kifejlett, felnőtt korban is a vázizomzat a miosztatin fő képződési helye (McPherron és mtsai. 1997).

A transzlációt követően a prekurzor molekula dimerizálódik, majd enzimatikus hatásra egy propeptid (N-terminális) és egy biológiailag aktív (C-terminális) részre hasad (5 és 6. ábra).



5. ábra. A: A szarvasmarha miosztatin génjének (1. kromoszóma) fizikai szerkezete és a gén három exonjának mérete bázispárban (bp) Ensembl Btau_0.4 alapján. B: A szarvasmarha miosztatin fehérje vázlatos szerkezete. A világosszürke téglalap a szignál peptidet, a sávozott téglalap - a fehérje érése során a proteolítikus hasítási helynél levágódó - propeptid részt jelöli. Az aktív peptid (sötétszürke téglalap) a fehérje C-terminális részén helyezkedik el (Joulia-Ekaza és Cabello 2006 nyomán). Az aktív peptid szakasz feletti fekete pontok a kilenc konzervált cisztein helyét jelölik (McPherron és Lee 1997, Thomas és mtsai. 2000). A különböző peptid szakaszok kódoltsági viszonyát és a három exon kódolásban betöltött szerepét a színes (sárga, zöld és kék) téglalapok jelzik

A propeptid a biológiailag aktív részhez kötődve feltételezhetően segíti annak megfelelő folding (érés, szerkezeti kialakulás) folyamatát, valamint az extracelluláris térben további fehérjékkel (follistatin, WFIKKNRP (Trexler és mtsai. 2002) vagy GDF associated serum protein-1, FLRG vagy follistatin-related gene) együtt részt vesz a miosztatin látens (inaktív)

komplexének kialakításában (Lee és McPherron 2001, Lee 2004). A látens komplex a vérben cirkulál és az aktiválódását (további enzimatikus hasítás) követően (6. ábra) II. típusú activin receptorokhoz (ActRIIB) kötődik. A receptor-ligand kötés hatására a receptor dimerizálódik (ActRIIB és ActRIIA alegységek), ami foszforilálja a receptort. Ez a folyamat aktiválja a Smad fehérjéket, amelyek a sejtmagban - transzkripciós faktorokkal és ko-faktorokkal együtt - a célgénekhez kapcsolódva megvalósítják az izomrostok növekedésének szabályozását (Lee és McPherron 2001, Kollias és McDermott 2008).



6. ábra. A miosztatin fehérje érése. A: a prekurzor molekula két hasítása során leválik az N-terminális szignál peptid (világos szürke téglalap) és a propeptid (sávozott téglalap). B: a propeptid (sávozott téglalap) és a diszulfid hídon keresztül kapcsolt C-terminális dimer (sötétszürke téglalapok) egy nem kovalens kötés által kapcsolatban marad és egy látens komplexet hoz létre. C: a látens miosztatin aktiválása a propeptid (sávozott téglalap) egy újabb hasítása során jön létre, amelyet a metalloproteinázok, bone morphogenetic protein (BMP)-1/tolloid családjába tartozó molekulák végeznek. D: ezáltal felbomlik a látens komplex (Lee 2004)

A miosztatin normál funkciója valószínűleg a szatellit sejtek nyugvó állapotban tartása. Ha azonban a körülmények úgy kívánják, hogy az izomnak növekedésre vagy regenerációra van szüksége, akkor az aktív miosztatin gátlásával ezek a nyugvó szatellit sejtek újra belépnek a sejtciklusba, osztódnak és fúzionálnak a meglévő izomrostokkal (McCroskery és mtsai. 2003, Lee 2004). Mindemellett a miosztatin képes hatni a zsír metabolizmusra és a zsírsejtek funkciójára is (Kim és mtsai. 2001, Zimmers és mtsai. 2002, Rebbapragada és mtsai. 2003, Guo és mtsai. 2009). Egy elmélet szerint a vérben cirkuláló miosztatin szintje különböző körülmények között (fizikai aktivitás, betegség, terhesség, öregedés) eltérő lehet, melynek következtében a szervezet képes az adott állapotnak megfelelően megváltoztatni a zsírraktározás és az izomnövekedés közötti belső egyensúlyt (Lee 2004). Az aminosavsorrend és a speciális biológiai funkció mellett a TGF-β szupercsaládra jellemző kilenc esszenciális cisztein molekula is nagymértékben konzervált számos gerinces fajban. Ezek a konzervált ciszteinek igen fontos szerepet töltenek be az intra- és intermolekuláris diszulfid hidak kialakításában (7. ábra), melyek a miosztatin biológiailag aktív formájához nélkülözhetetlenek (McPherron és Lee 1997, Thomas és mtsai. 2000).



7. ábra. A TGF-β szupercsaládra jellemző cisztein csomó sematikus ábrája. A monomerek (A és B) két ujj szerű béta-fonál nyúlványból (világosbarna) és egy alfa-helikális (zöld) részből állnak. Egy monomer esetében 6 cisztein felelős ezért a szerkezetért. A 2-5 és 3-6 számmal jelzett cisztein molekulapárok diszulfid hidak révén egy a monomeren belüli gyűrű formát hoznak létre. Az 1-4 számmal jelzett cisztein molekulapár a gyűrűn átbújó diszulfid hidat alakít ki, létrehozva a cisztein csomót. Ez a szerkezet megerősíti a fehérje hidrofób területeit és megelőzi, hogy egy globuláris szerkezet alakuljon ki. A monomerek közötti dimerizációban is egy cisztein molekulapár vesz részt (ez az ábrán konkrét ismeretek hiányában csak jelezve van, piros vonal). Ezt követően egy még stabilabb úgynevezett pillangó formájú szerkezet jön létre (Berry és mtsai. 2002, www.peprotech.com)

2.3.6. Természetes miosztatin mutációk

A szarvasmarha faj miosztatin génjének mára már számos mutációja ismerté vált (Grobet és mtsai. 1997, Kambadur és mtsai. 1997, McPherron és mtsai. 1997, Georges és mtsai. 1998, Grobet és mtsai. 1998, Cappucio és mtsai. 1998, Smith és mtsai. 2000, Miranda és mtsai. 2000). Ezek közül a legjelentősebb az a hat, amely minden bizonnyal a fehérje inaktív alakját eredményezi (Karim és mtsai. 2000). A természetes mutációk homozigóta, illetve egymással kombinált formában (pl.: nt419(del7-ins10) / E226X a maine-anjou fajta esetében, Grobet 1998, lásd később az 1. táblázatban) alakítják ki a miosztatin null genotípust és így számos húsmarha duplán-izmolt jellegét. Hasonló, a miosztatin működést gátló természetes mutációkat több fajban: egérben (Varga és mtsai. 1997, Szabó és mtsai. 1998, Varga és mtsai. 2003a, Varga és mtsai. 2005), emberben (Schuelke és mtsai. 2004), juhban (Clop és mtsai. 2006, Boman és mtsai. 2009 és 2010), kutyában (Mosher és mtsai. 2007) és sertésben (Stinckens és mtsai. 2008) is leírtak már (8. ábra). A Clop és mtsai. által publikált juh miosztatin mutáció rendkívül érdekes, mivel egy mikro RNS (miRNS) célszekvenciának megfelelő motívumot hoz létre. Ezek a legújabban felfedezett kis nem kódoló RNS-ek a génexpresszió negatív szabályozói (transzláció gátlás és cél mRNS degradáció útján), számos biológiai folyamatban (differenciálódás, osztódás, apoptózis) vesznek részt (Williams 2008). Sokuk szövetspecifikus expressziót mutat, számos miRNS kifejezetten szív- illetve vázizomzatban expresszálódik (Callis és mtsai. 2007 és 2008). Az említett mutációk vázlatos bemutatása az 1. táblázatban látható (Veress és Bakos 2009 nyomán). A gerincesek közötti, magas fokú szekvencia konzerváltság miatt vizsgálat indult halak és madarak miosztatin mutációinak felderítésére is. Néhány, vélhetően hatással nem bíró genetikai polimorfizmus felfedezése mellett, sikerült a nagymértékű homológiát megerősíteni, amely a hasonló hatásmechanizmus alapja lehet (Gu és mtsai. 2002, Mott és Ivarie 2002, De Santis és mtsai. 2008).



8. ábra. A homozigóta, természetes miosztatin mutánsok feotípusai: 1, fehér-kék belga szarvasmarha (www.beefsemenonline.co.uk); 2, piemonti szarvasmarha (www.anaborapi.it); 3, Compact egér, nyúzás után (Varga és mtsai. 1997); 4, humán (Schuelke és mtsai. 2004); 5, beltex juh (www.westmorlandshow.co.uk); 6, wipphet (Mosher és mtsai. 2007); 7, pietrain sertés (www.best-belgium-pietrain-boars.com)

Fajok:	A miosztatin	Fajta, vonal	A miosztatin	A miosztatin	Előnyös tulajdonságok	Hátrányos tulajdonságok
	mutáció jelölése		mutáció(k) tipusa	mutáció(k) hatása	<i>mstn</i> genotipus eseten	<i>mstn</i> genotipus esetén
	nt821(del11)	fehér-kék belga asturiana de los valles rubia gallea parthenaise blonde d'aquitaine limousine south devon	deléció (11bp)	frame-shift, korai STOP kodon	20-25%-al megnövekedett izomtömeg amelynek	csökken a marvanyozottsag (ízanyag romlás) csökken a fertilitás, a szexuális érés kitolódik, ellési nehézségekhez (dystocia), gyakran fejletlen külső genitáliák
Szarvasmarha	C313Y	Piemonti gasconne	pontmutáció (szubsztitúció)	diszulfid híd hiba (313. Cys→Tyr)	jelentős hányada értékes húsrész	csökken a belső szervek
	nt419(del7-ins10)	maine-anjou	deléció (7bp) és inszerció (10bp)	korai STOP kodon	kevesebb csont, zsír és	tömege, tüdő és szív fejlődési rendellenességek
	Q204X	Charolais limousine	pontmutáció (szubsztitúció)	korai STOP kodon	kötőszövet mennyiség	lépnek fel, az újszülött borjú nyelve
	E226X	maine-anjou	pontmutáció (szubsztitúció)	korai STOP kodon		megnagyobbodott
	E291X	marchigiana	pontmutáció (szubsztitúció)	korai STOP kodon		érzékenység a környezet és a stressz iránt
Egér	Mstn ^{Cmpt-dl1Abc}	Compact	deléció (12bp)	5 AA ¹ kiesik, 1 AA ¹ keletkezik	a carcass tömeget 6,8 (\bigcirc) és 9,4 (\bigcirc) %-al növeli, az izom:csont tömeg arányát 1.61-szorosára (\bigcirc) növeli	nem tapasztalható
Ember	$g.IVS1+5 g \rightarrow a$		pontmutáció (szubsztitúció)	missplicing ²	még nem ismert	még nem ismert
Juh	g+6723G-A	belga és brit texel charollais, norvég fehér	pontmutáció (szubsztitúció)	miRNS ³ kötőhely a 3'UTR ⁴ -ben	kitűnő húsformák, jobb vágási százalék	nem tapasztalható, nem ismert
	c.960delG	norvég fehér	deléció (1bp)	korai STOP kód		
Kutya	Mh	whippet (amerikai)	deléció (2bp)	esszenciális Cys helyen korai STOP kodon	megnövekedett verseny teljesítmény	izomgörcsök a váll- és a combtájékon, ~50%-ban hátraharapnak
Sertés	<i>g.447A>G</i> belga pietrain		pontmutáció (szubsztitúció)	MEF-3 ⁵ kötőhely hiba (promóter)	"négysonkás" jelleg, jobb vágási százalék	nem tapasztalható

1. táblázat. A fenotípusos hatással rendelkező természetes miosztatin mutációk bemutatása

1, aminosav; 2, az intron hibás kivágódása a prekurzor mRNS-ből; 3, mikro RNS, amely a transzlációt gátolva megakadályozza a génexpressziót; 4, 3' nem transzlálódó régió; 5, myocyte enhancer factor 3; _____, a mutáció nem aminosavat kódoló régiót érint; _____, a mutáció nem inaktiváló mutáció; (a hivatkozások fajonként az 2.3.6. fejezetben találhatóak)

2.4. A Compact fenotípus és a Compact miosztatin mutáció

2.4.1. A Compact fenotípus jellemzése

A Compact fenotípusú egerek izomzata jóval kifejezettebb a hagyományos laboratóriumi egerekhez képest és megjelenésükben hasonlóak a hiperizmolt gazdasági haszonállatok (pl. fehér-kék belga szarvasmarha) fenotípusához (9. ábra).

Az izmoltság mértéke számszerűsíthető. Például: a HCI apa x BALB/c anya keresztezésből (Cross2) származó F2 generáció esetében - ahol a tulajdonság szegregál - egy vizuális bírálat során az egyedek, izmoltságuknak megfelelően adott kategóriába sorolhatóak. Az izomzatot pontozva (1-5) a hímeknél öt (C1-C5), a nőstényeknél azonban csak négy (C1-C4) kategória alakult ki, mivel azok nem érték el a C5-ös szintet. A C1 csoportba a vad típushoz hasonló, míg a C5 csoportba a leginkább hiperizmolt egyedek kerültek. Ebben a populációban a hiperizmolt fenotípust mutató hímek (C5M) és nőstények (C4F) százalékos carcass (bőr és zsigerek nélküli hasított test) értéke 9,4%-al, valamint 6,8%-al volt nagyobb a normál izomzatú hím és nőstény egyedekhez (C1M és C1F) képest.



9. ábra. A Cross2 keresztezés (HCI apa x BALB/c anya) F2 generációjának hiperizmolt és normál izomzatú egyedei. C1F: normál izomzatú nőstény, C1M: normál izomzatú hím, C4F: hiperizmolt nőstény, C5M: hiperizmolt hím (Varga és mtsai. 1997)

A Compact fenotípust jellemzi továbbá, hogy az izom és a csont tömegének aránya a Compact hímek (HCI) vizsgálata során 1,61-szor nagyobb, mint a normál izomzatú hímek (BALB/c) esetében. Az elvégzett morfometrikus vizsgálatok azonban nem mutattak szignifikáns különbséget a C1 és a C5 állatok között egyik ivarban sem. Ezért feltételezhető, hogy a Compact fenotípust jellemző megnövekedett méretű és tömegű izomzat az izomrostok számbeli megnövekedésének (hiperplázia) köszönhető, bár ennek alátámasztásához részletesebb vizsgálatokra lenne szükség. A vizsgálatokban használt magyarországi Compact szubpopuláció normális életképességgel és fertilitással bírt (Varga és mtsai. 1997).

2.4.2. A Compact fenotípus öröklődése és az ivar hatása a HCR és HCI vonalak esetében

A főgén térképezéséhez létrehozott Cross1 (HCR apa x BALB/c anya) és Cross2 (HCI apa x BALB/c anya) keresztezésekből megállapítható, hogy a Compact fenotípus a hímek esetében részlegesen domináns, míg a nőstényeknél csaknem teljesen recesszív módon öröklődik. Ez azt jelenti, hogy a Compact fenotípus az ivar által meglehetősen befolyásolt. Ezt az is alátámasztja, hogy HCR vonal esetében elvégzett vizuális, izmoltságon alapuló bírálat során a hímeknél 81%, míg a nőstényeknél 35% volt a C5 kategória aránya (10. ábra). Vagyis a Compact tulajdonság a hím ivar esetében kifejezettebb (Varga és mtsai. 1997).



10. ábra. A Compact fenotípus megoszlása a HCR vonal esetében, ivaronként. A zöld szín a legizmoltabb kategóriát (C5) jelöli. Az ábrán jól látható a két ivarban eltérő módon jelentkező hiperizmolt egyedek aránya

2.4.3. A Compact egér miosztatin mutációja

A Compact egér miosztatin gén propeptid régiójában található *Mstn^{Cmpt-dl1Abc}* deléció öt aminosav kiesését (Leu-224, Gly-225, Ile-226, Glu-227, Ile-228) és egy új aminosav keletkezését (Phe) eredményezi (11. ábra). Ez a mutáció tehát a fehérjeérés folyamataiban részt vevő propeptid régióban található, annak funkcióit zavarhatja meg, de közvetlenül nem érinti a miosztatin biológiailag aktív doménjét (Szabó és mtsai. 1998). Ezzel szemben a fehérkék belga és a piedmonti szarvasmarhák mutáns miosztatinja a biológiai aktivitást biztosító doménen belül sérült (Grobet és mtsai. 1997, Kambadur és mtsai. 1997, McPherron és Lee 1997), vagyis ezekben az esetekben a miosztatin nem tudja kifejteni a biológiai aktivitását.



11. ábra. A Compact egér miosztatin génjében található 12-bázispáros deléció (Szabó és mtsai. 1998)

Az egér miosztatin propeptid régiója - a TGF- β szupercsalád tagjaival analógiában szerepet játszik az aktív fehérje helyes térbeli szerkezetének kialakításában (folding), a hatékony szekrécióban és szabályozza a miosztatin érett növekedési faktor doménjének célbajuttatását (targeting) is (Miyazono és mtsai. 1991, Saharinen és mtsai. 1996). A 12 bázispáros deléció (*Mstn^{Cmpt-dl1Abc}*) ezeknek a funkcióknak a hibás működéséhez és esetleg elvesztéséhez is vezethet, ezáltal csökkenhet a miosztatin mennyisége vagy hozzáférhetősége, illetve sérülhet a fehérje célbajuttatása (Szabó és mtsai. 1998). A deléció által érintett szakasz jelentőségét az is jelzi, hogy ez a régió minden ismert gerinces miosztatinjában konzerváltságot mutat (McPherron és Lee 1997). Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a *Mstn^{Cmpt-dl1Abc} / Mstn^{Cmpt-dl1Abc}* mutánsok érett miosztatin aktivitása nem nulla (Szabó és mtsai. 1998).

A feltételezett miosztatin aktivitásbeli különbség ellenére a Compact fenotípus hiperizmoltsága hasonló a szarvasmarhák hiperizmoltságához, mivel mindkét esetben elsősorban hisztológiai hiperpláziáról, vagyis az izomrost szám megnövekedéséről beszélhetünk (Varga és mtsai. 1997).

2.5. Miosztatin modifikátorok

2.5.1. Modifikátor gének

A modifikátor gének hatásának egyik legegyszerűbb példája a gének között fellépő episztázis, amikor egy gén allélja (episztatikus) elfedi egy másik gén (hiposztatikus) fenotípusos hatását. A genetikai modifikátorok többféleképpen is kifejthetik hatásukat, így hathatnak a penetranciára, a dominanciára, az expresszivitásra és a pleiotrópiára is. A fenotípusos hatástól függően a modifikátorok létrehozhatnak sokkal extrémebb, kevésbé

18

extrémebb, teljesen új és normál, vad típusú fenotípust is (Nadeau 2001). Egéren folytatott vizsgálatok során a kutatók több esetben is beszámoltak ható modifikátor génekről (pl.: a farok hosszával kapcsolatban Dunn 1942, szőrszínnel kapcsolatban Moore és mtsai. 1990).

2.5.2. Miosztatin modifikátorok jelenléte szarvasmarha fajták esetében

Bár a szarvasmarha fajban számos inaktivációt nem okozó mutáció ismert a miosztatin 1. és 2. exonjában, az intronokban és a nem transzlálódó régiókban (McPherron és Lee 1997, Grobet és mtsai. 1998, Miranda és mtsai. 2000), ezek közül, kétséget kizáróan csak az említett hat (1. táblázat), inaktív fehérjét eredményező miosztatin mutáció hozható kapcsolatba a duplán-izmolt fenotípussal.

A tulajdonság genetikai heterogenitása azonban ettől jóval nagyobb. Néhány húsmarha fajta esetében (limousine és blonde d'aquitaine) gyakori, hogy a duplán-izmolt fenotípus ellenére nincs jelen inaktiváló mutáció. Ez felvetheti annak a lehetőségét, hogy - a miosztatinon kívül - más faktorok is hatással vannak a muszkuláris hipertrófiára (Grobet és mtsai. 1998). Szintén ezt támasztja alá az az előbbi esettel teljesen ellentétes megfigyelés is, melynek során Smith és mtsai. 2000, a south devon fajtában is megtalálták az nt821(del11) mutációt. Beszámolójuk alapján a mutációra homozigóta egyedek jól izmoltak voltak, de nem mutattak kimondottan duplán-izmolt fenotípust. A jelenséget további lókuszok közreműködésével magyarázták. Ilyen, a miosztatin működését módosító faktorok, modifikátor gének jelenlétére utal az a vizsgálat is, melyben Charlier és mtsai. (1995) egy 20 éves periódust elemezve leírták, hogy a duplán-izmolt fehér-kék belga szarvasmarha izmoltsága sokkal kifejezettebbé vált a korábbi megjelenéséhez viszonyítva. A szerzők szerint a jelenség hátterében a mutáns miosztatin gén fixálódását követő, izmoltságra irányuló több éves szelekció állhat. Hazai viszonylatba a fehér-kék belga magyarországi törzstenyészete (Petőfi Mezőgazdasági Szövetkezet, Ostffyasszonyfa) említi meg fajtaismertetőjében (www.offamgsz.hu/fkb/), hogy a homozigóta egyedek párosítása során az utódok 85-86%-a lesz duplafarú, de a fennmaradó 14% is hordozza a tulajdonság génjét (a mutáns miosztatint), azonban annak hatását modifikátor gének nyomják el.

Ezeket, a szarvasmarha fajban tapasztalt megfigyeléseket, azonban eddig még nem követte a feltételezett modifikátorok azonosítása.

2.5.3. Miosztatin modifikátorok jelenléte a hiperizmolt Compact egér esetében

A Compact egér hiperizmolt fenotípusának monogénes öröklődését már a kezdeti (Cross1, Cross2) keresztezések fenotípusos eloszlása sem bizonyította. Ezek alapján Varga és mtsai. (1997) azt feltételezték, hogy legalább két gén, egy nagyhatású (major) gén és egy vagy több modifikátor gén határozza meg a Compact fenotípus kifejeződésének mértékét és megállapították, hogy a homozigóta Compact genotípus penetranciája mindkét nemben teljes, de expresszivitása változó. Ezek alapján elképzelhetőnek tartották, hogy a Compact fenotípus elsődlegesen egy olyan nagy hatású mutációnak tulajdonítható, amely *de novo* jött létre vagy már jelen volt a berlini szelekciós vonalban, amelyben egy vagy két modifikátor gén szegregált. Majd az extrém izmoltság (Compact fenotípus) kifejeződésére irányuló szelekció során ezek a gének fixálódtak Compact vonalban.

Ezt az elméletet támasztotta alá az a felfedezett 12 bázispáros miosztatin deléció (*Mstn^{Cmpt-dl1Abc}*), amely - mivel a propeptid régiót érinti - feltételezhetően nem inaktiváló mutáció. Így valószínű, hogy a mutáció szükséges, de nem elégséges feltétele a Compact egér hiperizmoltságának (Dr. Varga László, személyes közlés).

2.6. A miosztatin modifikátorok vizsgálata hiperizmolt Compact egéren

A miosztatin modifkátorok térképezéséhez kutatócsoportunk létrehozott egy Cross4nek nevezett, interszubspecifikus keresztezést az *Mstn^{Cmpt-dl1Abc}* delécióra homozigóta Comp9 beltenyésztett vonalból és a vad típusú *Mus musculus castaneus* alfaj egy beltenyésztett törzséből (CAST/Ei). A keresztezésben a hiperizmolt Comp9 egyedek apai partnerként, a normál izomzatú CAST/Ei egyedek anyai partnerként szerepeltek (12. ábra). A miosztatin modifikátorok genetikai térképezéshez kialakított F2 populáció végső egyedszáma 2373 volt (Varga és mtsai. 2003a).



12. ábra. A Cross4 keresztezésben résztvevő beltenyésztett állatok: bal oldalt Comp9 (apai partner), jobb oldalt CAST/Ei (anyai partner) (Varga és mtsai. 2003b)

2.6.1. A Compact fenotípus öröklődése és az ivar hatása Comp9 beltenyésztett vonal esetén

A modifikátor gének térképezéséhez létrehozott Cross4 (Comp9 apa x CAST/Ei anya) F2 populációban a Compact fenotípus mindkét ivar esetében recesszív öröklődés menetet mutatott. Ez valószínűleg a Comp9 beltenyésztett vonal, korábbi vonalaktól (HCR, HCI) eltérő genetikai karakterének tulajdonítható. Az ivar-Compact fenotípus kapcsolat azonban a Comp9 vonal esetében is jelentős, hiszen az egyedenként háromszor, egymástól függetlenül megismételt vizuális bírálat (pontozás 1-től 5-ig) átlaga alapján a hímek 100%-a 5,00, míg a nőstények 69%-a 4,00 és 31%-a 3,67 Compact értéket ért el (13. ábra). Az egyedek egyik ivar esetében sem kerültek a C3,67-es fenotípusos érték alatti kategóriákba



13. ábra. A Compact fenotípus megoszlása a Comp9 vonal esetében, ivaronként. A zöld szín a legizmoltabb kategóriákat jelöli. Az ábrán jól látható a két ivarban eltérő módon jelentkező hiperizmolt egyedek aránya. Az egyedek egyik ivar esetében sem kerültek a C3,67-es fenotípusos érték alatti kategóriákba

Az ivar, fenotípust befolyásoló hatása a Cross4 keresztezésben is megmutatkozott, hiszen az F2 állomány nőstény egyedeinek izmoltsági megoszlásánál, jellemzően a normál izomzat irányába történő eltolódást lehetett megfigyelni, míg a hímek körében a hiperizmolt fenotípus volt gyakoribb.

Ez megerősítette azt, a korábbi - HCR vonal esetében is tapasztalt – megfigyelést (Varga és mtsai. 1997), miszerint a Compact hiperizmoltság, mint tulajdonság nagyobb mértékben fejeződik ki a hím ivarú állatok esetében (Varga és mtsai. 2003a).

2.6.2. Miosztatin modifikátorok térképezése

Varga és mtsai. mindenekelőtt a 12 bp-os delécióra (*Mstn^{Cmpt-dl1Abc}*) genotipizálták a teljes Cross4 F2 populációt. A kapott eredmény nem tért el a mendeli arányoktól. Fenotípus-kategóriánként (1-5) elemezve a genotípus eloszlást kiderült, hogy a legizmosabb csoportban (nőstényeknél 4, hímeknél 5) minden egyed kivétel nélkül homozigóta mutáns volt. Másfelől viszont ez a homozigóta mutáns genotípus jelen volt minden fenotípusos csoportban (1-5), még a normál izomzatú kategóriában is (Varga és mtsai. 2003a). Ebből az következik, hogy a *Mstn^{Cmpt-dl1Abc}* valóban szükséges, de nem elégséges feltétele a hiperizmoltság kialakulásának, ami egyértelműen modifikátor gének jelenlétére utal. A modifikátorok térképezésébe csak a homozigóta mutáns egyedeket vonták be. Tekintve, hogy a hiperizmoltság mértékének

kialakulásában jelentős szerepet játszik az ivari hatás, a két ivart külön-külön vizsgálták. A korábbi kísérleteknek megfelelően az állatokat egy vizuális bírálat során C1-C2-C3-C4-C5 kategóriákba osztották izmoltságuk alapján, ahol a normál izomzatú egyed a C1, a legizmosabb fenotípusú pedig a C5 osztályba került. A statisztikai megbízhatóság növelésére a bírálatot ugyanaz a személy egymástól függetlenül háromszor végezte el (a vizuális bírálat hatékonysága kísérletes módon is igazolt, Fekete és mtsai. 1996). Az egyedenkénti három osztályzat átlaga egy 13 kategóriás fenotípus eloszlást tett lehetővé (14. ábra).



14. ábra. A Compact fenotípus izmoltsági skálájának (1,00 normál izomzat, 5,00 hiperizmolt) lehetséges értékei, a három, egymástól függetlenül megismételt vizuális, fenotípust értékelő (1-5) bírálat után (Varga és mtsai. 2002)

A Cross4 F2 populáción végzett géntérképezési vizsgálatokat főként a két extrém kategória (normál izomzatú és hiperizmolt), 12 bp-os miosztatin deléciót homozigóta formában hordozó egyedeire alapozták (szelektív genotipizálás, Darvasi és Soller 1992). A kísérlet szempontjából az egységes fenotípusú és azonos ivarú egyedek DNS mintáit kisebb csoportokban egyesítették (szelektív DNS-poolozás, Darvasi és Soller 1994). Ezek a szelektív mintakezelések nagy mértékben redukálták a vizsgálatok számát. A teljes genom vizsgálatot 141 mikroszatellit markerrel végezték, melyek átlagosan 10.6 cM-os genomtakarást biztosítottak úgy, hogy a markerek közötti legnagyobb távolság is csak 17 cM volt. Ahol a vizsgálatok allélfrekvencia eltérést mutattak a marker lókuszokon az extrém csoportok kevert DNS mintái (poolok) között, ott egyedi genotipizálást is végeztek. Az így kapott genotípus értékeket először összevetették az elméletileg várt genotípus arányokkal és Chi² próbával vizsgálták azt, hogy ezek szignifikáns mértékben eltérnek-e egymástól - jelezve a kapcsoltságot. Ezt követően az adatokat egy speciális géntérképezésre kidolgozott szoftver a Map Manager QTX (Manly és Olson 1999) segítségével dolgozták fel. Mind a Chi², mind a Map Manager QTX alkalmazásával végzett feldolgozásnál, ivar szerint különválasztva is, valamint az összes kiválasztott F2 egyedet együttesen vizsgálva is elvégezték a számításokat. A kapcsoltság mértékét az ún. LOD score (érték) alapján fejezték ki. A LOD (logarithm of odds, Morton 1955) érték két lókusz kapcsoltsági viszonyát fejezi ki (két lókusz genetikai kapcsoltságának esélye összehasonlítva azzal az eséllyel, hogy azok nem kapcsoltak ad egy

hányadost és ennek 10-es alapú logaritmusa a LOD szám). A LOD értékek szignifikancia szintjeit permutációs teszt eredmények alapján adták meg. Az esetleges szintet LOD = 2.8nál, míg a szignifikánsat LOD = 4.3-nál húzták meg (pl. LOD = 3 azt jelenti, hogy 1000x-es, vagyis 10^3 x a valószínűsége annak, hogy két lókusz együtt öröklődik, mint annak, hogy nem, a LOD = 3 felel meg a *P* = 0,05-ös valószínűségnek). Az egér teljes genomjára kiterjedő genetikai analízis során (szelektív-poolozás és -genotipizálás) a csoport megállapította, hogy a Compact fenotípust a főgénnel együtt több (1, 3, 5, 7, 11, 16 és X-kromoszómán elhelyezkedő) különböző erősségű modifikátor lókusz alakítja ki (15. ábra).



15. ábra. A modifikátor gének térképezése Cross4 F2 állományon. Az egér teljes genomjára kiterjedő (1-19 kromoszóma és X-kromoszóma) vizsgálatban a sárga téglalappal jelölt mikroszatellit markereket genotipizálták. A sárga téglalapokon feltüntetett szám a vele azonos nevű Mit mikroszatellit markert jelöli az adott kromoszómán. A függőleges piros színű vonalak jelzik az F2 vizsgálat során meghatározott modifikátor intervallumokat (1, 3, 5, 7, 11, 16 és X-kromoszóma esetében). Az ábra bal oldalán centimorgan (cM) skála látható (Varga és mtsai. 2003a, 2005)

A modifikátor lókuszok különböző erősségét jól mutatja, hogy a 3, 5, 11, 16 és X kromoszóma egy (D3Mit224), egy (D5Mit26), kettő (D11Mit24, D11Mit41), hat (D16Mit143, D16Mit101, D16Mit136, D16Mit30, D16Mit93, D16Mit50) és nyolc marker (lásd később) esetében mutatott P<0.001 értékű szignifikáns hatást, míg a 3, 5 és 7 kromoszóma midegyike három-három marker esetében mutatott P<0.0092 értékű szignifikáns hatást. Egy másik megközelítésben, szintenikus modifikátor térképezése során az 1-es

kromoszóma D1Mit262-es markernél volt tapasztalható erős modifikátor hatás. Ezek alapján tehát az X-kromoszómán elhelyezkedő lókusz a legkiterjedtebb és egyben a legerősebb modifikátor régió. A térképezési eredmények igazolták azt a hipotézist, miszerint a Compact vonal egyedei már hordozták a hipermuszkularitást erősítő modifikátor alléleket, melyeket az izmoltságra irányuló szelekció során - a miosztatin mutáció jelenlétében - szelekciós nyomás ért és ennek hatására egyre gyakoribbá váltak (Varga és mtsai. 1997, 2003a, 2005; Szabó és mtsai. 1998).

2.6.3. A Compact egér X-kromoszómáján elhelyezkedő modifikátor régió

A hiperizmolt (n=50) és normálizomzatú (n=35) homozigóta mutáns, Cross4 F2 hím egyedek X-kromoszómás térképezési eredményei egy nagy kiterjedésű (~100 Mbp) és az egész genom viszonylatában kiemelkedően erős modifikátor intervallumot határoztak meg, ahol 8 mikroszatellit marker (DXMit105, DXMit126, DXMit94, DXMit128, DXMit40, DXMit116, DXMit130, DXMit99) esetében P< 0.001 szignifikancia értéket tapasztaltak (16. ábra). (Varga és mtsai. 2003a)



16. ábra. Az X-kromoszóma modifikátor térképezésének összesített eredménye extrémen izmolt és normál izomzatú Cross4 F2 hím egyedeken (n=85). A vizsgálatba az ábrán feltüntetett mikroszatellit markereket (9 darab) vonták be. Ezek közül csak a DXMit56-os maradt el a P < 0.001 szignifikancia szinttől. A többi marker egy nagy kiterjedésű és rendkívül erős modifikátor intervallumot határoz meg. Az ábra bal oldalán a szignifikancia mértéke látható *P*-értékben kifejezve, míg az ábra alatti skála a vizsgált pontok (marker helyek) fizikai távolságát mutatja megabázisban (az X-kromoszóma proximális végétől a disztális felé) (Varga és mtsai. 2003a)

Az X-kromoszómán elhelyezkedő modifikátor hatást a hímek és a nőstények esetében külön-külön vizsgálták. Erre azért volt szükség, mert ugyan az egy X-kromoszómával rendelkező hímek genetikai térképezése egyértelmű, azonban a nőstényeket érintő random X-inaktiváció nehezen teszi értelmezhetővé az eredményeket. A vizsgálat igazolta, hogy az X-kromoszómán elhelyezkedő modifikátor nagy valószínűséggel mindkét ivarban hat (Varga személyes közlés), mivel az extrémen izmolt nőstények esetében, az X-kromoszóma térképezéshez használt összes markernél, a heterozigóta mutáns (X^{Comp9} X^{CAST/Ei}) genotípus gyakoribb volt, mint a homozigóta vad (X^{CAST/Ei} X^{CAST/Ei}) genotípus. Továbbá ennek ellenkezője volt tapasztalható a normál izomzatú nőstényeknél (Varga és mtsai. 2003a).

2.7. Az androgén receptor gén, mint esélyes miosztatin modifikátor

Ez a kiterjedt, X-kromoszómán feltérképezett modifikátor régió a DXMit128-as mikroszatellit markernél egy kiugró csúcspontot mutat (16.ábra; Varga és mtsai. 2003a). Ettől a legnagyobb hatást jelző csúcstól mindössze 1,3 cM-ra disztális irányba helyezkedik el az androgén receptor gén (Ar), amelyről irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy miosztatin modifikátor szerepe is van. Egy elmélet szerint Ar-en keresztül megvalósuló közvetlen androgén reguláció hatással lehet a miosztatin expressziójára (Ma és mtsai. 2001), mint ahogy azt az azonos géncsaládba tartozó TGF-β esetében kimutatták (Chipuk és mtsai. 2002).

2.7.1. Az androgén receptor működése

Az Ar (17. ábra) egy sejtmagi hormon receptor családhoz tartozó traszkripciós modifikátor faktor (Faber és mtsai. 1991). Az androgének hatását továbbítja az androgén célgének felé, melynek során azok transzkripcióját közvetlenül befolyásolja. Így kulcsszerepet játszik számos biológiai folyamatban (Chang és mtsai. 1995). Embrionális korban az androgének felelősek a hím fenotípusnak megfelelő ivarszervek kifejlődéséért. A pubertáskor megnövekedett androgén termelése megkezdi a másodlagos nemi jelleg kialakítását. Ezen kívül az androgének hatnak például a társas viselkedésre, a test zsírtartalmának alakulására és egyes autoimmun betegségek fogékonyságra is (Sullivan és Edwards 1997).

Az Ar az androgének hatását genomi és nem genomi úton is képes kifejteni. Az Ar elsődlegesen, főként genomi módon hat. A folyamat során a vérben keringő tesztoszteron átjutva a célsejtek membránján, a citoplazmában az 5-α-reduktáz enzim hatására egy hatékonyabb metabolittá, az 5-α-dihidrotesztoszteronná (DHT) redukálódik (Russell és Wilson 1994). Ezt követően a DHT kapcsolódik az Ar-hez, melynek hatására az Ar konformáció változása jön létre. Ennek következtében az Ar-hez kapcsolódó hősokk fehérjék disszociálnak. Az így kialakult Ar-DHT komplex a citoszolból a sejt magjába diffundál, ahol dimerizálódik (Prescott és Coetzee 2006).



17. ábra. Az androgén receptor fehérje vázlatos szerkezete. A világosszürke téglalap a ligand kötő domént, a fekete téglalap a DNS kötő domént jelöli. Az N-terminális domén a transzkripció szabályozásában vesz részt

Itt az Ar dimerek egy specifikus DNS szekvenciához képesek kötődni, amelyet ARE-nak (androgen response element) hívnak. Ezek az ARE szekvenciák a célgének transzkripciós start pontja előtt és mögött is elhelyezkedhetnek. Az ARE szekvenciához kapcsolódó Ar dimerek kölcsönhatásba lépnek a sejtmag más fehérjéivel, amely a célgének transzkripciójának alul- illetve túlműködését eredményezi (Lee és Chang 2003, Heinlein és Chang 2002, Wang és mtsai. 2005). Végül a megemelkedett transzkripció, illetve a transzkripció aktiválás megnövekedett mRNS szintézishez vezet.

Az Ar azonban képes hatását kifejteni egy másik, nem genomi módon is. Vagyis az Ar, DNS kötés nélkül is képes hatását kifejteni. Ilyenkor az Ar bizonyos szignáltranszdukciós (jelátvitelben résztvevő) fehérjékkel lép kapcsolatba a citoplazmán belül (Heinlein és Chang, 2002, Fix és mtsai. 2004). Ebben az esetben az androgén Ar kapcsolódás gyors változásokat képes létrehozni a sejtfunkciókba (pl.: iontranszport), anélkül hogy megváltoztatná a gének transzkripcióját. Ez a folyamat azonban közvetetten mégis képes kihatni a gének transzkripciójára, azáltal, hogy hatására más transzkripciós faktorok foszforilálódnak.

Hiányában tesztikuláris feminizáció szindróma vagy teljes androgén-inszenzitivitási szindróma alakul ki (Chang és mtsai. 1988, Lubahn és mtsai. 1989, Tilley és mtsai. 1989). Ez azt jelenti, hogy a csecsemőkori herék kialakulnak, azonban a külső nemi szervek női irányba fejlődnek tovább, a betegek petefészek hiányában sterilek (álhermafroditizmus). A gén bizonyos mutációi nem okoznak teljesen inaktív receptor működést, ami egyfajta csökkent maszkulinizációt (Reifenstein szindróma) eredményez (McPhaul és mtsai. 1993).

Patológiai esetekben kimutatták, hogy az androgén receptor bizonyos mikro RNS-ek (miRNS) expresszióját is képes szabályozni (Shi és mtsai. 2008). Ezek a molekulák számos biológiai folyamatban (differenciálódás, osztódás, apoptózis) a transzlációt gátolva, illetve a cél mRNS degradálódását előidézve a génexpresszió negatív szabályozói (Bantounas és mtsai. 2004, Williams 2008). Legtöbbjük szövetspecifikus, így számos miRNS kifejezetten a szívilletve a vázizomzatban expresszálódik (Callis és mtsai. 2007 és 2008). Továbbá már az is megállapítható, hogy bizonyos miRNS-ek pont az androgén receptor jelátviteli rendszerre hatnak (Epis és mtsai. 2009).

2.7.2. Az androgén receptor hatása TGF- β esetében

A humán miosztatin gén 5'regulátor régiójában is van egy androgén receptor kötő elem (ARE), így az Ar közvetítette androgén reguláció befolyásolhatja a miosztatin expresszióját is (Ma és mtsai. 2001), amint ez a TGF-ß-nál már bebizonyosodott (Chipuk és mtsai. 2002). Az androgén receptor gén, mutáns (*Mstn^{Cmpt-dllAbc}*) miosztatin modifikátor szerepe reálisnak tűnik a Compact fenotípus ivar által befolyásolt jellege miatt, továbbá az Xkromoszómán megfigyelhető erőteljes hím modifikátor hatás miatt, amely az Ar genomi pozíciójának közelében csúcsosodik ki (Varga és mtsai. 2003a).

2.8. Speciális populáció létrehozása a miosztatin modifikátorok térképezéséhez

A Cross4 F2 populációval kutatócsoportunknak sikerült durván pozícionálni, kromoszómákhoz kötni szignifikáns miosztatin modifikátor hatásokat, azonban ezek az eredmények még így is nagy kiterjedésű kromoszóma szakaszokat jelölnek.

Az Ar és más esélyes gén(ek) bioinformatikai, szekvencia és expressziós szintű vizsgálata mellett kutatócsoportunk létrehozott egy speciális térképezési populációt, amely lehetőséget ad a kiemelt kromoszómákon (1, 3, 5, 7, 11, 16 és X) elhelyezkedő modifikátort, modifikátorokat tartalmazó intervallumok szűkítésére. Ez a bonyolult keresztezési sémával létrehozott speciális térképezési populáció Advanced Intercross Lines-ként (AIL) ismert a szakirodalomban (Darvasi és Soller, 1995). Esetünkben az elnevezését Compact-AIL-ra módosítottuk. A Compact-AIL a modifikátor gének térképezéséhez kialakított Cross4 (Comp9 apa x CAST/Ei anya) F2 populációból indul ki. A folyamat során a beltenyésztés maximális elkerülése mellett, egymás utáni tenyészgenerációk létrehozása a cél. A nagyobb térképezési erő érdekében a Compact-AIL tenyészgenerációit úgy szelektáltuk, hogy az egyedek az F11 generációra (térképezési populáció) teljes mértékben homozigótává váljanak az *Mstn^{Cmpt-dl1Abc}* 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 így lehetővé teszi a finomtérképezést (Pinke és mtsai. 2008). A régió hosszának jelentős szűkülése esetén a lehetséges esélyes gének száma is lecsökken.

27

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Bioinformatikai vizsgálatok

3.1.1. Géntérképezési, genetikai és genomikai adatbázisok

Az egér genommal foglalkozó géntérképezési, genetikai és genomikai adatbázisokban napról napra újabb információkat közölnek a genom génjeiről és azok funkcióiról. Ezek az adatok elengedhetetlenek az esélyes gének kijelöléséhez és vizsgálatához. Ezért az adatbázisok figyelése, elemzése, naprakész ismerete, az információk gyűjtése és feldolgozása alapvető feladat. Vizsgálataink során a legfontosabb adatbázisok a következők voltak:

NCBI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/;

- tudományos irodalom elérése (PubMed);
- primer szekvenciák BLAST analízise (hasonlóság keresés szekvenciák között)
- gén, fehérje és SNP információk, stb.

Ensembl: <u>http://www.ensembl.org/;</u>

- információ szerzés a folyamatosan frissülő egér genomról;
- genomi szekvenciák kimásolása primer tervezéshez, mikroszatellit marker fejlesztéshez;
- gén, transzkript, fehérje és SNP információk, stb.

MGI: <u>http://www.informatics.jax.org/</u>.

- egértörzsek SNP adatainak elérése és elemzése

Az adatbázisok segítségével *in silico* vizsgálatba vonható a legerősebb modifikátor régióban elhelyezkedő Ar, illetve további esélyes gének is.

3.1.2. Primer tervezés, tervező programcsomagok

Az Ar vizsgálatához, olyan primereket terveztem (kivétel a GAPDH primerek, lásd a 2. táblázatban), amelyekkel lehetővé válik a kérdéses génszakaszok PCR alapú amplifikálása, klónozása, majd szekvenálása, illetve a gén expressziós szintű vizsgálata a Comp9 és kontroll CAST/Ei egértörzsekből (az Ar primerek elhelyezkedése a 23. ábrán látható, az EREDMÉNYEK részben). A primer tervezéshez az előzőekben ismertetett genetikai adatbázisok szekvenciáit, valamint a SeqVerter (GeneStudio, Inc. 1999) és az interneten elérhető Primer3 (Rozen és Skaletsky 2000) programcsomagokat használtam.

Primer név	Primer szekvencia
ANDR_1F	GCAGGATAAGGGAATTCGGTG
ANDR_2F	TGGGACCTTGGATGGAGAAC
ANDR_3R	GTCCCTGGTACTGTCCAAACG
ANDR_4R	CCCACCTTGTTCCCTTTCC
ANDR_INTR_6R	TTGTTCTATTGGGCGGGAGTC
ANDR_7F	CTCCTCAAGCCCACATCAGA
ANDR_8R	CTACAACTTTCCGCTGGCT
β-ACTIN_1F	TGCCGCATCCTCTTCCTC
β-ACTIN_1R	CCACAGGATTCCATACCCAAG
GAPDH_HS_SY_F	TGCACCACCAACTGCTTAGC (Vandesompele és mtsai. 2002)
GAPDH_HS_SY_R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG (Vandesompele és mtsai. 2002)

2. táblázat. Az Ar szekvencia meghatározásához és génexpressziós vizsgálataihoz tervezett primerek (a GAPDH primerek nem saját tervezésűek)

3.1.3. Szekvenciákat elemző és összehasonlító programcsomagok

A szekvenciák összehasonlítását és elemzését a következő ingyenesen elérhető programcsomagok felhasználásával végeztem:

- BioEdit, (Hall 1997-2004)
- SeqVISTA, (Hu és mtsai. 2003)
- EMBOSS (Rice és mtsai. 2000).

3.2. Kísérleti állatok

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

3.2.1.1. A Comp9-es vonalból kialakított beltenyésztett törzs

A Comp9-es vonalat az eredeti németországi Compact törzsből alakította ki Dr. Müller Géza, tizenhat generáción keresztül tartó testvérpárosítás és szelekció során. Színében, méretében, és testformájában a Comp9-es vonal (18. ábra "A" rész) eltér a korábban alkalmazott HCI beltenyésztett vonaltól (18. ábra "B" rész bal oldala).

A főbb különbségek a következők: a bézs színű HCI-vel ellentétben a Comp9-es vonal fecskehasú, lényegesen nagyobb és kevésbé tömör testalkatú. A szekvencia és expressziós vizsgálatokban három darab, 6-7 hetes hím egyed vett részt.



18. ábra. Magyarországi, beltenyészetett Compact egér vonalak, "A" kép: Comp9-es vonal, fecskehasú színezet (Varga és mtsai. 2003b), "B" kép bal oldalt: HCI, bézs szín (Varga és mtsai. 1997), (a "B" kép jobb oldalán a fehér színű BALB/c, normál izomzatú labor egér látható)

3.2.1.2. CAST/Ei beltenyésztett törzs

A CAST/Ei törzset az egér *Mus musculus castaneus* alfajából hozták létre beltenyésztés során (www.informatics.jax.org).



19. ábra. A Mus musculus castaneus alfajából kialakított CAST/Ei egér törzs egyik egyede (Varga és mtsai. 2003b)

Az egyedek vad, aguti színűek, feltűnően kis méretűek, normál izomzatúak, nagyon élénkek és stressz érzékenyek (a zavarást rosszul tűrik, búvóhelyet igényelnek, vagyis viselkedésükben is inkább a vad típushoz állnak közel). A szekvencia és expressziós vizsgálatokban három darab, 6-7 hetes hím egyed vett részt, mint normál izomzatú kontroll.

A keresztezett populációk kialakításában való részvételét és genetikai térképezéshez történő felhasználását az teszi indokolttá, hogy alfajként genetikailag távolabb helyezkedik el a laboratóriumi egér törzsekhez képest, de az utódgeneráció szaporodóképes. Ez nagyobb lehetőséget biztosít a genetikai markerek polimorfizmusára, ami hatékonyabbá teszi a térképezést.

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

Az X-kromoszóma genetikai analíziséhez az irodalmi áttekintésben bemutatott Compact-AIL F11 6-7 hetes korú, normál és hiperizmolt egyedeit vizsgáltuk. Az X- kromoszóma inaktivációs jelensége miatt csak a hím állatok, fenotípusosan szélsőséges csoportjait használtuk: összesen 155 M1K és 248 M5K egyedet (M = hím, 1 = normál izomzatú egyed, 5 = hiperizmolt egyed, K = homozigóta $Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ mutáns). Az X-kromoszóma térképezéséhez szükséges genotipizálás során a 3. 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

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

A vizsgálatban szereplő 403 állat a 3100 egyedből (Pinke és mtsai. 2008) álló Compact AIL-F11-es generációból került kiválasztásra a 2.6.2. fejezetben ismertetett vizuális bírálat után.

3.3. Minták előállítása

3.3.1. DNS izolálás

A vizsgálatokban felhasznált genomi DNS mintákat (Comp9, CAST/Ei és Compact-AIL F11) sós kicsapásos módszerrel preparáltuk. Az izolálás egy mintán bemutatva a következőképpen történt. Az 1,5 ml-es eppendorf csőbe egy kb. 1 cm-es egérfarkat helyeztünk, amelyhez első lépésként 600 µl Tail puffert (függelék) és 400mg Proteinase K-t (Sigma-Aldrich) adtunk, majd a mintát egy éjszakára 55°C-os rázótermosztátba helyeztük. Másnap 15 percig szobahőmérsékleten (RT=room temperature) tartottuk és ezután centrifugáltuk (RT, 13000 rpm, 15 perc) a mintákat. A csapadék feletti fázist egy második 1,5 ml-es eppendorfba pipettáztuk és 20mg RNase A-t (Sigma-Aldrich) mértünk hozzá, majd 20 percig szobahőmérsékleten hagytuk. Ezt követően 300 µl túltelített (5-6 M-os) NaCl-ot és 30 µl 7,5 M-os ammonium acetátot adtunk a mintához, majd vortexel összekevertük és centrifugáltuk (RT, 13000 rpm, 3 perc). Egy harmadik 1,5 ml-es csőbe 400 µl izo-propil alkoholt (Reanal) mértünk, amelyre rápipettáztuk a felülúszót és a DNS kicsapásának érdekében a csövet átforgattuk. Az így kicsapódott DNS-t 10 percig állni hagytuk (RT), majd centrifugáltuk (RT, 13000 rpm, 3 perc). Ezután leszívtuk a folyékony fázist és 300 µl 70%-os alkohollal (Reanal), a cső forgatása közben mostuk a DNS-t. A centrifugálást (RT, 13000 rpm, 3 perc) követően eltávolítottuk a felülúszót és a cső alján elhelyezkedő DNS-t 20 percig szárítottuk. Ezután 50 µl TE (pH 7,5) oldatot (a függelékben) adtunk a mintához és 1 óráig 65°C-ra helyeztük oldódni. A DNS minta minőségének, mennyiségének és tisztaságának meghatározásához spektrofotométert használtunk és az optikai denzitás 260 nm/280 nm-es értékét vettük figyelembe. A mintákat 4°C-on tároltuk.

3.3.2. Izom minták preparálása

Génexpressziós kísérleteimhez a Comp9-es és a CAST/Ei egértörzs egyedeinek (3-3 darab) hátulsó végtagjából, izom preferencia nélkül, vegyes vázizmot preparáltam. Az izom minták preparálása 6-7 hetes egerekből történt. A preparálás kezdete előtt cervicalis dislocatio-t végeztem az állatokon, amely kellő tapasztalat mellett gyors, és kíméletes eljárás, továbbá az izom minták preparálásához is tökéletesen megfelel. A preparálásához RN-áz mentes, steril csipeszt és steril szikét használtam. Az eszközök RN-áz mentesítését a Sigma cég dietil-pirokarbonát (DEPC) vegyszerének oldatával (függelék) végeztem a következő módon: az eszközöket a sterilizáláshoz alufóliába csomagoltam, amelyekbe az RN-áz mentesítés érdekében ezerszeresére hígított DEPC törzsoldat is került, majd ezt követte a DEPC oldattal együtt becsomagolt eszközök autoklávozása. A gyűjtés során a mintát 1,5 mles, steril, azonosító címkével ellátott eppendorf csőbe helyeztem, amit az RNS degradálódás megelőzése miatt, azonnal folyékony nitrogénbe tettem. A gyűjtést követően a mintákat -70°C-os hűtőben tároltam.

3.3.3. RNS izolálás

Az androgénreceptor gén (Ar) expressziós vizsgálatához a Comp9-es és a CAST/Ei egértörzs egyedeinek hátulsó lábából - izom preferencia nélkül - preparált, vázizomzatot használtam.

A preparátumokat mind a két esetben TRIZOL (GIBCO) reagens hozzáadása mellett, kézi homogenizátorral dolgoztam fel. A totál RNS minta előállítása során az izom preparátumok súlyát analitikai mérleggel (Sartorius) megmértem, majd a súlynak megfelelően 100mg-onként 1ml TRIZOL-t pipettáztam a homogenizátorba. A homogenizálást szobahőmérsékleten végeztem, majd a homogén mintát azonos arányban 4 darab 1,5 ml-es eppendorf csőbe mértem szét. A csöveket centrifugáltam (4°C, 12000 rpm, 10 perc), majd csövenként a felülúszót átmértem egy steril 1,5 ml-es eppendorf csőbe és szobahőmérsékleten 5 percig állni hagytam. Ezt követően mintánként 1 ml kiindulási TRIZOL-hoz, 200 µl tömény kloroformot mértem szét a 4 csőbe, majd 10-20 másodpercig összeráztam az elegyeket.

33

Három perc állás után (RT) a csöveket centrifugába helyeztem és a mintákat centrifugáltam (4°C, 12000 rpm, 15 perc). A vizes fázisban lévő RNS-t átmértem egy-egy újabb steril 1,5 ml-es eppendorf csőbe, majd az előzővel egyenértékű kloroform mennyiséget adtam hozzá. Ezt 15-20 másodpercnyi összerázás követte. A csöveket centrifugáltam (4°C, 12000 rpm, 15 perc), majd a felülúszót átmértem egy újabb 1,5 ml-es eppendorf csőbe, amelyhez számított mennyiségű izo-propanolt adtam (500 µl izo-propanol / 1 ml kiindulási TRIZOL). Tíz perc állás után (RT) a csöveket centrifugába helyezve centrifugáltam (4°C, 12000 rpm, 10 perc), majd a felülúszót eltávolítva a kicsapott RNS-t, 75%-os etanollal (Reanal) - 1 ml 75%-os etanol / 1 ml kiindulási TRIZOL - beoldottam. A mintánként kapott 4 darab 1,5 ml-es eppendorf cső közül három csövet későbbi felhasználásra -70°C-os hűtőbe helyeztem és mintánként egy csővel tovább folytattam az RNS tisztítást. A vortexelést követően, a csövet centrifugáltam (4°C, 7500 rpm, 5 perc). Öt-tíz perc beszárítást követően 50 µl RNáz mentes vízben oldottam fel az RNS-t,. Az minta minőségét elektroforézis módszerével, Bioanalyser 2000 készülékkel vizsgáltam, majd a mennyiség és tisztaság meghatározásához spektrofotométerrel megmértem a minta optikai denzitását a 260 nm/280 nm-es értéket figyelembe véve. Végül ezt a mintát is -70°C-ra helyeztem a felhasználásig.

3.3.4. cDNS készítés

Az androgénreceptor gén (Ar) genomiális mérete (~167,4 kbp) meglehetősen nagy, így a szekvenálásához, valamint az expressziós vizsgálatához a gén cDNS-ét használtam. A reverz transzkripciót és a cDNS előállítást a Stratagene cég ProSTAR Ultra HF RT-PCR System kit felhasználásával végeztem. A cDNS készítés előtt az RNS mintákat DN-áz kezelésnek vetettem alá. A 10 µg RNS-re vonatkozó reakció a következő anyagokat tartalmazta: 10 × DN-áz puffer (100 mM Tris pH 7.5, 25 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂), 20 egység DN-áz (Fermentas), 5 egység RN-áz inhibítor (Fermentas), steril desztillált vízzel (DW, Gibco) kiegészítve 100 µl össztérfogatra. A DN-áz kezelés, majd a DN-áz inaktiváció a következő hőmérsékleti kondíciók között történt a PCR készülékben: 37°C 20 perc, 65°C 10 perc, 70°C 5 perc. A reverz transzkripció reakciója a következő anyagokat tartalmazta: 3000 μ g RNS, 10 × RT puffer (StrataScript), 300 nM random primer (R9-mer), 240 mM dNTP mix, steril desztillált vízzel (DW, Gibco) kiegészítve 47,5 µl össztérfogatra. Ezt követően a reakció-elegyet 65°C 5 perc, szobahőmérséklet 10 perc hőmérsékleti kondíciók közé helyeztem. Végül 5 egység StrataScript reverz transzkriptázt adtam a reakcióhoz 50 µl össztérfogatra kiegészítve és 42°C 90 perc, 95°C 1perc (inaktiváció) hőmérsékleti kondícióra helyeztem. Az így kapott cDNS minták minőségének, mennyiségének és tisztaságának

meghatározásához spektrofotométert használtam és az optikai denzitás 260 nm/280 nm-es értékét vettem figyelembe. Majd a mintákat felhasználásig -70°C-os hűtőben tároltam.

3.4. Szekvencia meghatározás

3.4.1. Szekvenálási templát készítése cDNS-ből

A Comp9 és CAST/Ei Ar szekvenálását két részletben cDNS (primerek: ANDR_2F-4R) és genomi DNS (primerek: ANDR_1F-INTR_6R) templátok használatával hajtottam végre. A 2-8 exon szekvenciáját cDNS-ből, a közel 1200 bp-os 1. exon szekvenciáját genomi DNS-ből határoztam meg (20. ábra).



20. ábra: Az Ar szekvencia meghatározáshoz amplifikált fragmentek: A) cDNS (ANDR_2F-ANDR_4R); B) 1. exon (ANDR_1F-ANDR_ INTR_6R), a nem transzlálódó exon szakaszokat fekete szín jelőli; E: exon (fehér téglalapok), I: intron (kék vonal)

A szekvencia meghatározáshoz az Ar 2-8 exonját tartalmazó templátot a következő összetételű, 25 µl-es végtérfogatú PCR reakcióval amplifikáltam: 50ng cDNS, 10 × puffer (Promega), 330-330 nM primer (forward, reverse), 200 nM dNTP, 1,25 U pfu Turbo polimeráz (Prostar ultra), steril desztillált víz (MQ), végtérfogat. A PCR reakció 94°C 1 perc; [94°C 30 mp, 60°C 30 mp, 68°C 2 perc] 40 ciklus; 72°C 7 perc hőmérsékleti körülmények között futottak az MJ Research PTC-200-as PCR gépben. A fragmentek méretét elektroforézis módszerével, 1%-os agaróz gélben vizsgáltam, molekulasúly markernek *Pst*I enzimmel emésztett, λ DNS-t használtam.

3.4.2. Szekvenálási templát készítése genomi DNS-ből

A genetikai térképezéshez és az Ar 1. exon szekvenciájának meghatározáshoz is a sós kicsapásos módszerrel preparált, genomi DNS-t használtam fel.

A szekvencia meghatározásához szükséges templátokat a következő összetételű, 25 μles végtérfogatú PCR reakcióval állítottam elő: 100 ng genomi DNS, 10 × puffer (Promega), 330-330 nM primer (forward, reverse), 200 nM dNTP, 2mM MgCl₂ (Promega), 2,5 egység Taq polimeráz (Promega), steril desztillált víz (MQ), végtérfogat. A PCR reakciók 95°C 2 perc; [95°C 30 mp, 55°C 30 mp, 72°C 1 perc 30 mp] 35 ciklus; 72°C 5 perc hőmérsékleti körülmények között futottak az MJ Research PTC-200-as PCR gépben. A fragmentek méretét elektroforézis módszerével, 1%-os agaróz gélben vizsgáltam, molekulasúly markernek *Pst*I enzimmel emésztett, λ DNS-t használtam.

3.4.3. A templát DNS/cDNS klónozása

3.4.3.1. Ligálás

A DNS (Ar exon 1) és cDNS (Ar exon 2-8) szekvenciák transzformálásához pGEM[®]-T Easy vektort használtam. A reakció mintánként, 10 μl-es végtérfogat mellet a következő volt: ~200ng ligálni kívánt PCR termék, 50 ng pGEM[®]-T Easy vektort, 2× Rapid Ligation puffer, 3 Weiss unit T4 DNS Ligáz, steril desztillált víz (MQ). Az elegyet legalább egy éjszakán át 4°C-on inkubáltam a transzformálás előtt.

3.4.3.2. Transzformálás

A pGEM[®]-T Easy vektorba ligált DNS (Ar exon 1) és cDNS (Ar exon 2-8) szekvenciák transzformáláshoz mintánként 500 μl kompetens sejtet (XL1 BLUE, illetve XL10 GOLD) használtam fel. A baktérium szuszpenziót -70°C-ról jégre tettem, és a felolvadást követően 2,0 μl ligálási reakciót adtam hozzá. Rövid idejű manuális keverést követően, 30 percig jégen inkubáltam a sejteket. Ezután, 45 másodpercig 42°C-ra (blocktherm-be vagy vízfürdőbe) helyeztem a sejteket. A hősokkot követően 2 percig újra jégre tettem a csöveket, majd 1000-1000 ml LB táptalajt adtam hozzájuk. Ezt követően a baktériumokat egy órára 37°C-os termosztátba helyeztem rázatni, 200-as fordulatszámon. A regenerálódott sejteket szelektív, ampicillin (150 μg/ml), X-Gal (40 μg/ml) és IPTG (20 μg/ml) tartalmú LA táptalajra (összetétele a függelékben) szélesztettem.

Mintánként négy petricsészét használtam fel, melyekre a következő mennyiségű baktérium szuszpenzió került: az első petricsészére 10 µl kompetens sejtet, a második petricsészére 100 µl kompetens sejtet, a harmadik petricsészére 250 µl kompetens sejtet, a negyedik petricsészére1 perc 12000 rpm-es centrifugálást követően a maradék sejtet. Végezetül a petricsészéket egy éjszakára 37°C-os termosztátba helyeztem.

3.4.3.3. A baktérium kolóniák tesztelése

A transzformáns sejteket kék-fehér szelekcióval detektáltam. A fehér baktérium telepek, kolóniák szűrését egy úgynevezett "colony PCR" segítségével végeztem, úgy hogy a PCR reakció templátját a steril fogpiszkálóval bemosott fehér telepek jelentették. Ez a PCR reakció a pGEM[®]-T Easy vektor poliklónozó területének két szélére specifikus primer párt (M13F és M13R) tartalmazott, így lehetővé vált a klónozott szekvencia amplifikálása és a klónok azonosítása. A colony PCR reakció - 25 µl-es végtérfogat mellett - egy mintára vetítve a következő összetevőket tartalmazta: bemosott templát DNS, 10 × puffer (Promega), 200-200 nM primer (M13F, M13R), 2mM MgCl₂ (Promega), 320 nM dNTP, 1 egység Taq polimeráz (Promega), steril desztillált víz (MQ). A colony PCR reakció [95°C 2 perc, 55°C 1 perc, 72°C 1 perc 15 mp] 3 ciklus; [95°C 30 mp, 55°C 30 mp, 72°C 1 perc 15 mp] 41 ciklus; 72°C 5 perc hőmérsékleti körülmények között ment végbe az MJ Research PTC-200-as PCR gépben. A kívánt klónok pontos azonosításához, a colony PCR reakcióval párhuzamosan készítettem egy a klónozott szekvencia két végére specifikus primer párt tartalmazó PCR reakciót is. Ezek a primerek azok voltak, amelyekkel korábban a kívánt (DNS és cDNS) szekvenciákat amplifikáltam a ligáláshoz. A klónozott szekvencia két végére specifikus primer párt tartalmazó PCR reakció - 25 µl-es végtérfogat mellett - a következő összetevőket tartalmazta: bemosott templát DNS, 10 × puffer (Promega), 396-396 nM primer (forward, reverse), 2mM MgCl₂ (Promega), 200 nM dNTP, 2,5 egység Taq polimeráz (Promega), steril desztillált víz (MQ). Ez a PCR reakció a colony PCR reakcióval azonos - az előbbiekben már említett - PCR körülmények között ment végbe, azzal azonos időben és azonos PCR gépben.

A fragmentek méretét elektroforézis módszerével, 1%-os agaróz gélben vizsgáltam, molekulasúly markernek *Pst*I enzimmel emésztett, λ DNS-t használtam.

3.4.3.4. Plazmid tisztítás

A vektorra és a klónozott szekvenciára specifikus primerek segítségével meghatároztam azokat a baktérium telepeket, amelyek a vizsgálni kívánt DNS szakaszt tartalmazzák. A plazmid tisztítás ezekből a telepekből indult ki. Első lépésként egy steril kémcsőbe 3 ml LB táptalajt (összetétele a függelékben) töltöttem és 1,5 mg ampicillint adtam hozzá. Ebbe a kémcsőbe oltottam be steril fogpiszkáló segítségével a baktérium kolóniát. Minden plazmid tisztítás alkalmával, készítettem egy beoltás nélküli kontroll csövet is. A beoltást követően a kémcsöveket lezártam és egy éjszakára 37°C-os termosztátba helyeztem rázatni, 200-as fordulatszám mellet. Másnap a kontroll csövet ellenőrizve - ha az nem fertőződött be - megkezdtem a plazmid izolálást a felnövesztett sejtekből. Ehhez a tisztítási

37

folyamathoz az Eppendorf cég Perfectprep Plasmid mini kit-jét használtam, a gyártó előírása szerint. A minta minőségének, mennyiségének és tisztaságának meghatározásához spektrofotométert használtam és az optikai denzitás 260 nm/280 nm-es értékét vettem figyelembe. A mintákat felhasználásig 4°C-on tároltam.

3.4.4. Szekvenáló reakció készítés

A szekvencia meghatározáshoz az Applied Biosystems ABI PRISM BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit-jét a gyártó ajánlása szerint használtam. A 20 µl-es szekvenáló reakció egy mintára vetítve a következő összetételű volt: 150-300 ng tisztított plazmid DNS templát, 2µl Terminator Ready Reaction Mix (v3.1), 160 nM primer, steril desztillált víz (MQ). Ez a reakció 96°C 5 perc; [96°C 30 mp - majd 1°C/mp 50°C-ig, 50°C 15 mp - majd 1°C/mp 55°C-ig, 60°C 4 perc - majd 1°C/mp 96°C-ig] 55 ciklus hőmérsékleti körülmények között ment végbe az MJ Research PTC-200-as PCR gépben. A szekvenáló reakció tisztítása során, az amplifikált DNS kicsapását a következő anyagokat tartalmazó mix hozzáadásával végeztem: 1,5 µl 3 M-os Na-Acetát (pH 5.2), 30,92 µl 95%-os Etanol (Reanal), steril desztillált víz (MQ) 40 µl végtérfogat. A szekvenáló reakció DNS tartalmának kicsapásához ezt a mixet mértem a mintához, majd vortexeltem és egy kis teljesítményű centrifuga segítségével az elegyet összegyűjtöttem a cső aljára. Ezt követően 10 percig jégen inkubáltam a mintát, majd Jouan GR 412-es típusú centrifugával centrifugáltam (10°C, 4000 rpm, 40 perc). A felülúszót kiöntöttem és azt megfordítva papírtörlőt helyeztem alá, majd 2000 rpm-vel 1 percen át kicentrifugáltam a csőben maradt folyadékot. Ezt követően csövenként 250µl, 70%-os etanol (Reanal) hozzáadásával tisztítottam a mintákat. A 70%-os etanolt (Reanal) 1 percig hagytam a lecentrifugált mintán. Ezután megismételtem egy korábbi lépést, azaz a cső tartalmát kiöntöttem és azt megfordítva papírtörlőt helyeztem alá, majd 2000 rpm-vel 1 percen át kicentrifugáltam a csőben maradt folyadékot. A csőben esetleg visszamaradó etanol eltávolítása miatt, steril fülkében 10 percig szárítottam a mintát. A szárítást követően 10µl Hi-Di formamidot (Applied Biosystems) mértem a csőbe, majd vortexeltem és egy kisteljesítményű centrifuga segítségével lekevertem a mintát. A mintát egy éjszakán át, 4°C-on hagytam vissza oldódni.

A szekvencia meghatározás előtt 3 percig 95°C-on denaturáltam a mintát, majd azt azonnal jégre tettem. Pár-perc múlva, vortexeltem és egy kis teljesítményű centrifuga segítségével összegyűjtöttem a cső alján.

38

3.4.5. Szekvencia meghatározás

A törzsenkénti (Comp9 és CAST/Ei) 3-3 egyed Ar szekvenciájának meghatározáshoz ABI PRISM 310 Genetic Analyzer készüléket használtam. A mintákat POP-6 TM polimerben futtattam, 61 cm x 50 μm-es szekvenáló kapillárison keresztül. A futtatás során a következő puffert használtam: Genetic Analyzer 10X Running Buffer with EDTA.

3.5. Génexpressziós vizsgálatok

3.5.1. Valós idejű (real time) kvantitatív PCR

A génexpressziós kísérletek során a különböző fenotípusú egér törzsek (CAST/Ei és Comp9) 3-3 hím egyedének cDNS mintáit háromszoros hígításban (1-szeres, 4-szeres és 16szoros) és hígításonként három ismétlésben vizsgáltuk. Hígítási csoportonként az első CAST/Ei és Comp9 minták reakcióit, valamint ismétléseiket a vizsgált génre (androgén receptor gén) specifikus primer párral (ANDR_2F és ANDR_3R) egészítettem ki. A következő két CAST/Ei és Comp9 minták reakcióját, valamint ismétléseiket a belső kontrollként használt GAPDH és β-aktin háztartási génekre specifikus primer párokkal (GAPDH_HS_SY_R és GAPDH_HS_SY_F, B_act_1_F és B_act_1_R) egészítettem ki (21. ábra).

	CAST/Ei és Comp9 cDNS minták génexpressziós vizsgálatának sémája																									
			1× 4× 16×										4×													
A	ND	DR GAPDH β-aktin						in	ANDR GAPDH b			-akti	n	Α	ND	R	G	APE	H	β·	-akti	in				
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3

21. ábra. A valós idejű kvantitatív PCR kísérleti elrendezése mintánként (Comp9 és CAST/Ei cDNS) háromszoros hígítás három ismétlésben. Androgén receptor specifikus (ANDR) és belsőkonrtoll (GAPDH, β -aktin) specifikus reakciók

Egy mintára vonatkoztatva, a következő összetételű 25 µl-es reakciót használtam: 211,8 ng cDNS templát, 25 ng/ml BSA, DMSO, 10%-os Tween20, 10 × puffer (Promega), 50 × Rox (Molecular Probes), 25 × Sybr Green (Molecular Probes), 800-800 nM primer (ANDR_2F, ANDR_3R), 1,6 mM dNTP, 2 mM MgCl₂ (Promega), 1,25 egység Taq polimeráz (Promega), steril desztillált víz (MQ). A reakciókat az ABI 7000-es gépen futtattam a következő programon: [94°C 10 mp, 95°C 12 mp, 60°C 1 perc] 40 ciklus.

3.5.2. Relatív kvantifikáció

A valós idejű PCR eredmények matematikai feldolgozását Pfafll 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.

3.6. Genetikai térképezés

3.6.1. Genetikai markerek és marker fejlesztés

A vizsgálatokba a 22. 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 az F2 térképezésben is keretmarker volt).



22. ábra. A genetikai térképezés során alkalmazott X-kromoszómás mikroszatellit markerek (keret-markerek: 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 mellet a fizikai pozíciójuk van feltüntetve Mbp-ben (Ensembl Built34)

A markerek primer szekvenciája megtalálható a függelékben. A DXMit149-es marker a DXMit116-os marker helyett lett bevonva. Az Abc jelzésű markerek (DXAbc54 és DXAbc32) fejlesztésénél a primer tervezés fejezetben említett programcsomagot és az www.ensembl.org internetes genom adatbázisból lekért egér genom szekvenciákat használtuk.

3.6.2. A vizsgálat során alkalmazott mikroszatellit detektálási módszer

3.6.2.1. Poliakrilamid gélelektroforézis

A mikroszatellit markerek detektálásához, egységesen a következő PCR reakciót állítottuk össze 5 µl végtérfogatra: 100 ng genomi DNS, 10 × puffer (Promega), 2 µg/µl BSA, 1,5 mM MgCl₂ (Promega), 0,8 mM dNTP, 396-396 nM primer (forward, reverse), 0,5 egység Taq polimeráz (Promega), steril desztillált víz (MQ). A PCR reakciók 94°C 3 perc; [96°C 1 perc, 55°C 1 perc, 72°C 1 perc] 32 ciklus; 72°C 3 perc kondícíók között mentek végbe, MJ Research PTC-200-as PCR gépben. A poliakrilamid gélelektroforézis vizsgálatokat a Bio-Rad cég nagyméretű (Sequi-Gen GT IPC, 38 x 50), vertikális szekvenáló gél rendszerével (Sequi-Gen GT Sequencing Cell-BIORAD készülék) végeztük. A futtatáshoz 1x TBE puffert (függelék) és 6%-os, denaturáló poliakrilamid gélt (akrilamid 38:2, 10M urea, 10xTBE, 0,0085% APS (Serva), TEMED (Sigma), desztillált víz) használtuk (50 cm × 38 cm x 0,4 mm). Gélre történő felvitele előtt a PCR mintákat 4,0 µl STOP pufferrel (függelék) elegyítettük. Az amplifikált mikroszatelliteket a gélen átlagosan két órán keresztül futtattuk.

A mintákat ezüst festés módszerével (Budowle és mtsai. 1991, Varga és mtsai. 1997), több lépésben tettük láthatóvá. A futtatást és a kihűlést követően 500 ml DW-vel 0,5 percig mostuk a gélt. Majd 10%-os METANOL oldattal további 3 percig mostuk. Ezt követően hozzáadtuk a 1%-os HNO₃ oldatot, amelyet 5 percig, hagytunk a gélen. Majd ezt ismét mosás követte DW-vel, 2 x 1 percig. Ezután vittük fel a gélre az ezüstöt (0,012M-os AgNO₃ oldat), amelyet 20 percig a gélen hagytunk. Ismét 500 ml DW-vel mostuk a gélt 1 percig. A következő lépésben került a gélre a hívó folyadék (0,28M Na₂CO₃ és 0,0075% formaldehid tartalmú oldat), amíg láthatóvá nem váltak a fragmentek. Az előhívást követően a fixáló oldatot (10%-os ecetsav oldat) öntöttünk a gélre és végül még egyszer 500 ml DW-vel mostuk. Az eredmény dokumentálásához a gélt egy vákum rendszerrel (Bio-Rad, HydroTech[™] Vacuum Pump) összekapcsolt gélszárító készülékben (Bio-Rad, Model 583 GEL DRYER) 45 percig szárítottuk.

41

3.6.3. 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:

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

A Chi² 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 Chi² görbét, amely a markerek Chi² értékeit logaritmikus skálán ábrázolja az X-kromoszóma mentén.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A Compact egér androgén receptor génjének vizsgálata

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

A gén jelentős (167,4 kbp) genomi mérete miatt első ízben csak az exonok szekvenciáját határoztam meg. Ehhez reverz-transzkripcióval mRNS-ről átfordított cDNS-t használtam. Az Ar gén teljes cDNS-ét azonban nemtől és törzstől függetlenül nem sikerült átfordítani az mRNS-ről. Ezért a szekvencia meghatározás két részben történt (23. ábra). Először az Ar gén 2-8 exonját tartalmazó cDNS szakasz (az ábrán narancssárga) szekvenciáját határoztam meg, majd a genomi DNS-ből amplifikált 1. exont (az ábrán citromsárga) elemeztem. Így vált lehetővé az Ar gén teljes kódoló szakaszának szekvencia vizsgálata.



23. ábra. Az Ar kódoló szekvenciájának meghatározása két részben. A) a 2-8 exont tartalmazó cDNS szekvencia (narancssárga szín). B) az 1. exon szekvencia meghatározásához használt DNS szakasz (citromsárga szín). A két klónozott szakasz szekvenálása vektor specifikus (M13) és gén specifikus (ANDR) belső primerekkel történt. A narancssárga és citromsárga téglalapokban a fekete vonalak az átfedő megszekvenált szakaszokat jelölik. A téglalapok felett a klónozott szakasz hossza látható bázispárban. A zöld színű 64 bázispáros szekvencia (ANDR_2F és ANDR_3R primerekkel sokszorozható) a valós idejű PCR vizsgálatokban vesz részt. A nem transzlálódó exon szakaszokat lila szín jelőli

A törzsenként három-három, egymástól független minta szekvenálását követően, a konszenzus szekvenciához képest (Ensembl, C57Bl/6) 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 fehérjéjében (24. ábra).

1 MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFQSVREAIQNPGPRHPEAANIAPPGACLQQRQET

- $61 \ {\tt Sprrrrqqhtedgspqahirgptgylaleeeqqpsqqqaaseghpessclpepgaatap}$
- $121 \ \mathsf{GKGLPQQPPAPPDQDDSAAPSTLSLLGPTFPGLSSCSADIKDILNEAGTMQLLQQQQQQQ$
- 181 QHQQQHQQHQQQQEVISEGSSARAREATGAPSSSKDSYLGGNSTISDSAKELCKAVSVSM
- 241 GLGVEALEHLSPGEQLRGDCMYASLLGGPPAVRPTPCAPLPECKGLPLDEGPGKSTEETA
- 301 EYSSFKGGYAKGLEGESLGCSGS<mark>S</mark>EAGSSGTLEIPSSLSLYKSGA<mark>L</mark>DEAAAYQNRDYYNF
- 361 PLALSGPPHPPPPTHPHARIKLENPLDYGSAWAAAAAQCRYGDLGSLHGGSVAGPSTGSP
- 421 PATTSSSWHTLFTAEEGQLYGPGGGGGGSSSPSDAGPVAPYGYTRPPQGLTSQESDYSASE
- 481 VWYPGGVVNRVPYPSPNCVKSEMGPWMENYSGPYGDMRLDSTRDHVLPIDYYFPPQKTCL
- 541 ICGDEASGCHYGALTCGSCKVFFKRAAEGKQKYLCASRNDCTIDKFRRKNCPSCRLRKCY
- 601 EAGMTLGARKLKKLGNLKLQEEGENSNAGSPTEDPSQKMTVSHIEGYECQPIFLNVLEAI
- 661 EPGVVCAGHDNNQPDSFAALLSSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYS
- 721 WMGLMVFAMGWRSFTNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKSRMYSQCVRMRHLSQEFGWLQIT
- 781 PQEFLCMKALLLFSIIPVDGLKNQKFFDELRMNYIKELDRIIACKRKNPTSCSRRFYQLT
- 841 KLLDSVQPIARELHQFTFDLLIKSHMVSVDFPEMMAEIISVQVPKILSGKVKPIYFHTQ

24. ábra. Az Ar Ensembl internetes adatbázisban található (C57Bl/6) aminosav sorrendje (teljes hossza 899 aminosav). Az aminosavakat jelölő betűsorozatok fekete és kék színének váltakozása az őket kódoló exonok egymásutániságát fejezi ki. Piros betűvel jelölt az, az aminosav, amelyiken belül történik meg az intron kivágódása. A narancssárga hátterű aminosavaknál a CAST/Ei szekvenciában is megtalálható SNP aminosavcserét okoz (vagyis, non-synonymous SNP). A zöld hátterű aminosavaknál a CAST/Ei szekvenciában is megtalálható snp nem okoz aminosavcserét (vagyis, synonymous SNP)

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.

4.1.2. 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 Ar mRNS-ről reverz transzkripcióval cDNS-re átfordított, 1. és 2. exont átfedő 64 bázispáros szekvenciát (ANDR_2F-ANDR_3R) használtam (ez a 20. ábrán zöld téglalappal jelölt szakasz). A Comp9 és CAST/Ei Ar génexpressziójának mértékét egymáshoz képest relatív módon fejeztem ki. A Comp9 Ar relatív (CAST/Ei Ar-hez képest kifejezett) expresszióját a 25. ábra szemlélteti. A vizsgálat számszerűsített eredményeit az 4. táblázat tartalmazza.



25. ábra. A Comp9 Ar és belső kontroll gén (beta actin) relatív expressziója. A vizsgálatban a CAST/Ei Ar génexpressziót vettem egy egységnek (piros szaggatott vonal) és ehhez képest relatív módon fejeztem ki a Comp9 Ar génexpressziót. Az ábrán látható még a Comp9 beta actin (belső kontroll gén), egységnyi CAST/Ei beta actinhoz képest mért relatív expressziója. A Comp9 Ar és beta actin gének relatív expressziója mellett az adott vizsgálatok szórása is látható (zöld színnel)

	Comp9 Ar	ß-actin	GAPDH
Relatív expresszió	1.16	0.98	1.00
Szórás	0.54	0.32	0.00
P-érték	0.001	0.001	0.001

4. táblázat. A Comp9 Ar és belső kontroll gének (beta actin, GAPDH) relatív expressziója, az eredmények szórása és szignifikanciája. A vizsgálatban a CAST/Ei gének expresszióit egy egységnek vettem és ehhez képest relatív módon fejeztem ki a Comp9 gének expresszióit.

A vizsgálatok során többszörös génexpresszióra utaló eltérést nem tapasztaltam az

egységnyi CAST/Ei Ar expresszió és a hozzá viszonyított Comp9 Ar expresszió között.

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

4.2.1. 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-dl1Abc}/Mstn^{Cmpt-dl1Abc}) izmoltság tekintetében szélsőséges, azaz normál (M1K) és hiperizmolt (M5K) fenotípusú egyedeit 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 hiperizmolt, 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 mikroszatellit markerhez kapcsolt területeken (a 26. ábra, sárga körrel jelölve). A FAV-UNFAV (lásd a Vizsgálat során alkalmazott adatkezelés című fejezetben) összevont Chi² módszerrel kapott hatásgörbe, ezeknél a pontoknál erős, szignifikáns 2,45E-06, illetve 2,44E-05 értéket mutatott.

4.2.2. 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 (27. ábra, zöld kör) 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 még pontosabb 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 genotpizálásba. Így ez a vizsgálat már összesen 403 Compact-AIL F11 egyedet érintett (155 M1K és 248 M5K).



26. ábra. Az X-kromoszóma F11 (n=230) térképezése összevetve az 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 további közel 2000 genotipizálás eredményeképpen a DXMit37 marker disztális oldalán bevont DXMit4 markernél csökkent a Chi² 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 régiónak. A DXAbc54 markernél ugyancsak a disztális oldalon csökkent a Chi² 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).

4.2.3. 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 (28. ábra, az ábraszerkesztés idejére az Ensembl Built34 már nem volt elérhető az adatbázis archívumában ezért a régió ábrázolása az Ensembl Built35 alapján készült). Az XB régió 5,33 Mbp hosszú és ~30 gén illetve feltételezett gén helye ismert (Ensembl Built34) benne (29. ábra, a régió ábrázolása szintén az Ensembl Built35 alapján készült).



27. 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



28. ábra. Az X-kromoszóma modifikátor intervallumai I., XA régió: legmagasabb pontja a DXAbc32 (1,41E-06), hossza 3,92 Mbp, ~60 gént illetve feltételezett gént tartalmaz (Ensembl Built34), az ábraszerkesztés idejére az Ensembl Built34 már nem volt elérhető az adatbázis archívumában ezért a régió ábrázolása az Ensembl Built35 alapján készült



29. ábra. Az X-kromoszóma modifikátor intervallumai II., XB régió: legmagasabb pontja a DXMit83 (8,55E-09), hossza 5,33 Mbp, ~30 gént illetve feltételezett gént tartalmaz (Ensembl Built34), az ábraszerkesztés idejére az Ensembl Built34 már nem volt elérhető az adatbázis archívumában ezért a régió ábrázolása az Ensembl Built35 alapján készült

4.3. Új tudományos eredmények

Munkám során a miosztatin mutáns Compact egér X-kromoszómáján elhelyezkedő, hiperizmoltságra ható modifikátor géneket vizsgáltam, mellyel kapcsolatban a következő, új tudományos eredmények állapíthatóak meg:

- 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 szekvencája sem expressziója nem különbözik a vad típusú egyedekétől.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Az androgén receptor gén mint esélyes gén

5.1.1. Az androgén receptor gén szekvencia vizsgálata

Munkám során az androgén receptor gént elhelyezkedése (genomi pozíciója az Xkromoszómás 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. 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 összevetettem 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 törzsben. 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 találhatók. Tehát, ha ezeknek a mutációknak fenotípusos hatása van, akkor ez az Ar fehérje más gének transzkripciójára kifejtett, szabályozó működésében jelenhet meg a CAST/Ei tözs esetében. Mivel a CAST/Ei tözs nem mutat extrémen 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 (30. ábra).



30. ábra. A CAST/Ei törzs Ar génjében található két, aminosav cserét okozó SNP változatai egértörzsenként. Az rs31851337 tekintetében a CAST/Ei-t leszámítva egységes képet mutatnak a törzsek, míg az rs29087626 esetében a CAST/Ei mellett még két alfaj a *M. m. molossinus* (MOLF/EiJ) és a *M. m. musculus* (PWD/PhJ) genomja is hordozza ezt a mutációt (forrás: phenome.jax.org és jaxmice.jax.org)

5.1.2. 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 egységnyinek vett CAST/Ei Ar expresszióhoz képest. Ez a kis különbség a 0,001-es *P*-értéket figyelembe véve szignifikánsnak mondható. Összességében azonban a génexpresszió kvantitatív analízise nem mutatott jelentős eltérést a Comp9 (hiperizmolt) és CAST/Ei (normál izomzatú) hím egerek vázizomzati Ar mRNS szintje között.

5.1.3. 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^{Cmpt-}* d^{11Abc}) 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.

5.2. Genetikai térképezés a Compact-AIL F11 generációban

5.2.1. 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 (31. 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 valótlan 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.



31. 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)

5.3. 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 hosszas 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.

5.4. 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, tömegméretekben is alkalmazható detektálási módszer kialakítása szükséges. Azonban az egyáltalán nem biztos, hogy a modifikáló hatást eredményező mutáció génben van.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az állattenyésztési ágazat számára gazdasági szempontból jelentős paraméter az egy állatra vetített értékes hústermelés mértéke. Ennek a tenyészcélnak megfelelően hosszas szelekció, rokon- és beltenyésztés után megjelentek az egyre jobban izmolt egyedek. Több háziállat faj esetében (szarvasmarha, juh) ennek a gondos tenyésztői munkának a "csúcsa" az adott fajták fixált, duplán-izmolt fenotípusa. Ez a tulajdonság azonban nemcsak az állattenyésztés számára fontos, a kialakulásával kapcsolatos tudásanyag nagy előrelépést jelenthet a humán orvoslásban is például az izomsorvadás jelenségének megértésében és célzott kezelésében. A fenotípus hátterében meghúzódó génkölcsönhatások, a géneknek és mutációiknak a megismerése tehát több szempontból is jelentőséggel bír. A hiperizmoltság fő meghatározója a miosztatin gén, amely konzerváltságának köszönhetően több fajban (egér, kutya, juh, szarvasmarha, ember) felelős a fenotípusért. Bizonyos esetekben (egérnél és szarvasmarhánál) viszont más genetikai faktorok közreműködésére is lehetett következtetni. Ilyen, a miosztatin működést befolyásoló, módosító gének jelenlétét detektálta kutatócsoportunk a hiperizmolt modellállatként használt Compact egér genetikai térképezése során. A természetes miosztatin mutáns (Mstn^{Cmpt-dl1Abc}) Compact egér hét kromoszómáján (az 1, 3, 5, 7, 11, 16 és X-kromoszóma esetében) mutatkozott különböző erősségű és kiterjedésű modifikátor hatás (Varga és mtsai. 2003a, Varga és mtsai. 2005).

Munkám során az X-kromoszómán elhelyezkedő, hiperizmoltságra ható modifikátor gének vizsgálatát tűztem ki célul. Korábbi vizsgálataink során (Varga és mtsai. 2003a), az Xkromoszómás modifikátor hatás legerősebb csúcspontját a DXMit128-as mikroszatellit markernél detektáltuk. Ennek a markernek a közelében található az androgén receptor gén (Ar). Az Ar egy magi hormon receptor, az androgének hatását továbbítja az androgén célgének felé, melynek során azok transzkripcíóját közvetlenül befolyásolja, így kulcsszerepet játszik számos biológiai folyamatban (Chang és mtsai. 1995). A TGF-β Ar-en keresztül megvalósuló közvetlen androgén regulációja alapján (Chipuk és mtsai. 2002) az Ar ugyancsak hatással lehet a miosztatin expressziójára is (Ma és mtsai. 2001). Pozícióját, valamint funkcióját tekintve az Ar tökéletesen megfelelt az esélyes modifikátor gén szerepre. Ezért első lépésként, mind szekvencia szinten, mind pedig expressziós szinten vizsgáltam a gént 6-7 hetes Comp9 (hiperizmolt, beltenyésztett Compact vonal) és CAST/Ei (normálizomzatú, *Mus musculus castaneus* alfajból kialakított törzs) hím állatok esetében. Eredményeink alapján azonban arra a következtetésre jutottam, hogy sem a kódoló

57

szekvencia vizsgálata sem pedig a génexpressziós vizsgálat nem igazolja, az Ar modifikátor szerepét. Ezért munkám folytatásában a kiterjedt X-kromoszómás modifikátor régió szűkítésére fókuszáltam. A modifikátor intervallumok genetikai térképezéséhez csoportunk létrehozott egy Cross4 F2-ből kiinduló speciális populációt (Compact-AIL). Ez a több év alatt kialakított speciális egér állomány az egyik leghatékonyabb, nagyfelbontású térképezési mód alkalmazását tette lehetővé. A Compact-AIL F11 generációjában közel 10.000 genotipizálást hajtottunk végre az ~5Mbp-onként elhelyezett 31 keret-marker és a további 4, régió szűkítéshez használt marker vizsgálata során. Ennek eredményeképpen két erősen szignifikáns csúcspontot detektáltam DXMit130-DXMit37 és DXMit105-DXAbc54 markerek között. Ezt a két régiót XA-nak és XB-nek neveztük el. Az F2 eredményekhez képest, sikerült a kiterjedt (~100 Mbp-os) X-kromoszómás modifikátor hatást két szűk (3,92 Mbp és 5,33 Mbp; Ensembl Built34) és jól definiálható régióra korlátozni.

Vizsgálataim tehát képesek voltak szétbontani a korábbi, úgynevezett ghost-QTL jelenség következtében kialakuló és az X-kromoszóma közepére mutató kiterjedt modifikátor hatást, így ez alapján azt is bebizonyítottam, hogy nem egy, hanem két egymással szomszédos hiperizmoltságra ható modifikátor régió helyezkedik el a Compact egér X-kromoszómáján. Az XA és XB régiók már kezelhető számú gént tartalmaznak és a régiók további szűkítésére is van elvi lehetőség.

6. SUMMARY

Cutability is one of the most important economic parameters of the livestock sector. According to this breeding goal, due to constant selection and inbreeding more and more muscular individuals appeared. The fixed double-muscled phenotype of some domestic animal species (cattle, sheep) is the "top achievement" of this careful breeding activity. The double muscled character is not only important for livestock production, but the knowledge on how it emerged could also be a major step forward for human medicine in the understanding and targeted treatment of muscular dystrophy. Thus identification of gene interactions and gene mutations underlying this phenotype is important in many aspects. The myostatin gene is the major determinant of hypermuscularity, that - due to its conserved amino acid sequence - is responsible for the extreme phenotype of several species (mouse, dog, sheep, cattle, human). However in some cases (in mice and cattle) contribution of other genetic factors can also be inferred. Our research group has detected the presence of such myostatin modifier genes in the course of genetic mapping of the Compact mouse, a hypermuscled model animal. The natural myostatin mutant (*Mstn^{Cmpt-dl1Abc}*) Compact mouse showed modifier effects on seven (1, 3, 5, 7, 11, 16 and X) chromosomes with different intensity and extension (Varga et al. 2003a, Varga et al. 2005).

The aim of my work was to investigate the hypermuscularity modifier genes located on X-chromosome. In a previous study (Varga et al. 2003a) we detected the strongest peak of modifier effect at the DXMit128 microsatellite on the X-chromosome. This marker is located near the androgen receptor gene (Ar). The Ar is a nuclear hormone receptor which transmits the effect of androgens to androgen target genes, while it affects the transcription of genes directly and therefore plays a key role in many biological processes (Chang et al. 1995). On the basis of direct androgen regulation of TGF- β (Chip et al. 2002) the Ar may also affect the expression of myostatin (Ma et al. 2001). Considering the position and function of the Ar gene it could be one of the prominent candidate modifier genes. First the gene sequence and expression level was studied in 6-7 weeks old Comp9 (hypermuscled, inbred Compact line) and CAST/Ei (normal muscled, *Mus musculus castaneus* subspecies based strain) male individuals. Our results showed that neither the coding sequence nor the gene expression confirms the Ar's modifier role. Therefore, my subsequent work was focused on the narrowing of the large modifier region of the X-chromosome. For the genetic mapping of modifier intervals our group has established a special population (Compact-AIL) based on

59

Cross4 F2. This mouse stock developed through years of breeding enables one of the most powerful, high-resolution mapping strategy. During the mapping we used 31 frame-work markers (~ 5Mbp distance from each other) and 4 additional markers (for the narrowing of the regions) and accordingly we have completed almost 10,000 genotypings in the Compact AIL-F11 generation. As a result, I detected two highly significant peaks between the DXMit130-DXMit37 and DXMit105-DXAbc54 markers. We designated these two regions XA and XB. Compared to the results of F2, we could reduce the extensive X-chromosomal modifier effect (~100 Mbp) to two narrow (3,92 Mbp and 5,33 Mbp; Ensembl Built34) and well-defined regions.

Therefore my studies were able to resolve the former so-called ghost-QTL showing an extensive modifier impact in the middle of the X-chromosome, and on the basis of this, it has also been proven that there are two adjacent modifier regions on the Compact mouse X-chromosome affecting hypermuscularity. The XA and XB regions are now harboring a handleable number of genes, but further refinement of these intervals is still theoretically possible.

7. FÜGGELÉK

Oldatok jegyzéke

Az oldatok az alábbi anyagokat tartalmazták:

Tail puffer:	50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10%-os SDS, majd autoklávozás
<u>TE:</u>	1 M TrisHCl (pH 7,5) ,0,2 M EDTA, majd autoklávozás
<u>LA táptalaj:</u>	10g/l Bacto-tryptone, 5g/l Bacto-yeast extract, 10g/l NaCl, 1,5% Agar, dH ₂ O 1000 ml-ig , majd autoklávozás
<u>LB táptalaj:</u>	10g/l Bacto-tryptone, 5g/l Bacto-yeast extract, 10g/l NaCl, dH ₂ O 1000 ml-ig, majd autoklávozás
<u>SOB táptalaj:</u>	2 % Bacto tryptone, 0,5% Yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 6,7 – 7,0 (cc. HCl-lel), majd autoklávozás
<u>TB puffer:</u>	10 mM PIPES, 15 mM CaCl2, 250 mM KCl, pH 6,7
<u>TBE puffer:</u>	89 mM Tris-Bórát, 2 mM EDTA
STOP 2	

STOP puffer:0,3 % Xilén-cianol, 0,3 % Bróm-fenolkék, 90 % Formamid, 10 mMEDTA

A felhasznált mikroszatellit markerek primer szekvenciája

A Cross4 F2 és a Compact-AIL F11 közös 9 db markere vastagon szedett. A markerek mellet a fizikai pozíciójuk (Mbp-ben) és primer szekvenciáik vannak feltüntetve (Ensembl, Built34).

A marker neve	Primer szekvencia	Primer szekvencia
(fiz. pozíció, Mbp)	(forward)	(reverse)
DXMit101 (4.42)	AGTCTCCACTTATATCTTGCACACC	TGAAAGTGGCTGGATTTTCC
DXMit124a (7.57)	AAGGAGAAGTAGAAGAAAGAAAAGAGG	GGTGTAGCCTCAAAAAAGATGG
DXMit85 (11.64)	ACTACAGAGGGGGCCCAAACT	GCAACATCTCTACTGTGTTATGTGC
DXMit56 (15.15)	GGCTCATTGTAATGGACAAGC	GGGATTTTCATCTTGCCAAA
DXMit90 (20.90)	ATATTGCAAAATCAGAAAAGTAAAAGT	TGTGCTTTTTCTGCGCATAC
DXMit81 (30.82)	GAGGAGCATCAACCTTCTCG	GAGGTGGGGAGAAACAGAGG
DXMit50 (35.35)	AATCTCTCTAGTGTTTGCATTGTG	TGCAATTTATGCCATTCAGG
DXMit105 (44.50)	AAATTGGAGTGACCTCAGATTTG	CCATGTTTCTCACCATGAAGA
DXMit83 (45.45)	TTCTAAACTGCTTTGTAAAGAAGGC	GTGAATGTAGGGAATGTCAAAGG
DXAbc54 (49.83)	AGAAGCAGATCTTGGCGAGT	AAATGTCCTTTGTACCTGCCTA
DXMit75 (51.82)	ACCCTAGCCGGTTACTATCTCC	TCTCTCTCATTCCCCCCC
DXMit126 (54.97)	CCAATATTGTGCTTTACTCTTATTTTT	ACGTGATAGAGAGACCTGACTGC
DXMit87 (61.32)	TGAGAAAAGTGGTGTGTTTCTAGC	CATTACCTAGGCCTACTTGTAGATCC
DXMit94 (66.68)	ATGAGGAACCAAACATTTTTCC	TCTTCCACATGTATAGCATGCC
DXMit45 (71.74)	AATATAGTTGACCTTGCCTTTGTG	GGCATACGCGTGCATATATG
DXMit111 (75.76)	GAGGCTCCACAAGTGTTTTAGA	AAATCAAGTCTGAAAAACAAACAAA
DXMit93 (81.73)	TTGTCAGAATGATCGATTCTTATATC	CACCCAAAGTAGTTAGATCTTATCATT
DXMit128 (87.92)	TGTGTCAAAACTTTCTCTCTTACACA	ATCATTTTCTTAGCACTGTATCATCC
DXMit96 (93.83)	CATGTCAATTGGGATCTTTGG	AGGAGCAAATCCAACCTGG
DXMit40 (98.75)	AACCAATTTTGAAAACGAAACC	TGCCCAATGAAAACATCTAGG
DXMit214 (105.27)	AACAGGTTGAATTTATGTTTATGTACG	GGTGGTGGTGGTGATGGT
DXMit39 (110.40)	GCTAGCATACGCGTGTCCG	ACAAAACAGGTTTACCATTTGG
DXMit172 (116.43)	TACCACAGTTTGAATAAAGATGTGTG	GAAGAAACCATGACTCCTCTTTG
DXMit149*(121.42)	CCAAAGGCTGCTAGTGGAAG	AATAGCATTGCAAAAATTAGATTTAGG
DXMit130 (127.31)	TTCATATCGCCCCAACCTAC	TATTTTGAAACCTCTGCCATTT
DXAbc32 (128.86)	GCTGTATGGAGGCTAGAGAATGAC	GGATATGTGAGGACTTGACGGAG
DXMit37 (131.23)	CCTTGTTTCAATTCTCACTGACA	TTCCTCTTAAAACATCAACACCA
DXMit4 (133.02)	TGGACAGTGCTTGAGGAATG	GCAAAACAGCTACATTTGGG
DXMit181 (136.26)	GCAGAGGAACAAGTAGGTATTGTG	ATGGGCTCCTAGACCTCCTT
DXMit152 (141.18)	TGTGTCTTTCATATCCCATTGC	CACATGTGGCCTAAACTCACA
DXMit10 (144.86)	GAATTACAGGCATGCGTCCT	TGTTTGACTGAGAGGATGCG
DXMit178 (149.73)	CTTTCCTGATATCAGCAGTATTAAACA	CCTGGCATTTCCCTACACAT
DXMit99 (153.31)	GGAATTCAACAAAAGGTATGTGC	ACCTGTCTCCTTTCCTCTCTCC
DXMit21 (157.15)	TGGGACAGAACCAACATCAA	TCAGTTAGGCGCTGAAGGTT
DXMit100 (162.54)	CCATGAAATTTCCTTCACTTCA	CAGTAAGGAAAGGGTGCCAG

* A DXMit149-es marker az F2 vizsgálat során használt DXMit116-os marker helyett lett bevonva az F11 térképezésbe.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Baker J. F. és Lunt D. K. (1990): Comparison of production characteristics from birth through slaughter of calves sired by Angus, Charolais or Piedmontese bulls. *J Anim Sci*, 68: 1562-1568.
- Bantounas I., Phylactou L. A. és Uney J. B. (2004): RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33: 545-557.
- Bellinge R. H. S., Liberles D. A., Iaschi S. P., O'brien P. A., Tay G. K. (2005): Myostatin and its implications on animal breeding: A review. *Animal Genetics*, 36. 1-6.
- Berry C., Thomas M., Langley B., Sharma M. és Kambadur R. (2002): Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283: C135–C141.
- Boman I. A., Klemetsdal G., Blichfeldt T., Nafstad O., Vage D. I. (2009): A frameshift mutation in the coding region of the myostatin gene (MSTN) affects carcass conformation and fatness in Norwegian White Sheep (Ovis Aries). *Animal Genetics*, 40: 418-422.
- Boman I. A., Klemetsdal G., Nafstad O., Blichfeldt T., Vage D. I. (2010): Impact of two myostatin (MSTN) mutations on weight gain and lamb carcass classification in Norwegian White Sheep (Ovis aries). *Genetics Selection Evolution*, 42: 4, doi:10.1186/1297-9686-42-4.
- Budowle B., Chakraborty R., Giusti A. M., Eisenberg A. J. és Allen R. C. (1991) Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet*, 48: 137-144.
- Callis T. E., Chen J. F., Wang D. Z. (2007): MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA Cell Biol*, 26 (4): 219-25.
- Callis T. E., Deng Z., Chen J. F., Wang D. Z. (2008): Muscling through the microRNA world. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233 (2): 131-8.
- Cappucio I., Marchitelli C., Serracchioli A., Nardone A., Filippini F., Ajmone-Marsan P., Valentini A. (1998): A G-T transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophy Marchigiana beef subjects. *Anim Genet*, 29. 51.
- Chang C., Saltzman A., Yeh S., Young W., Keller E., Lee H. J. W. C. és Mizokami A. (1995): Androgen receptor: an overview. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 5. 97-125.
- Chang C., Kokontis J. és Liao S. (1988): Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science*, 240: 324–326.
- Charlier C., Coppieters W., Farnir F., Grobet L., Leroy P., Michaux C., Mni M., Schwers A., Vanmanshoven P., Hanset R., Georges M. (1995): The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2. *Mamm Genet*, 6. 788-792.

- Chipuk J. E., Cornelius S. C., Pultz N. J., Jorgensen J. S., Bonham M. J., Kim S.-J. és Danielpour D. (2002): The androgen receptor represses transforming growth factor-ß signaling through interaction with smad3. *J Biol Chem*, 277. 1240-1248.
- Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibé B., Bouix J., Caiment F., Elsen J.
 M., Eychenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C.,
 Georges M. (2006): A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet*, 38. 813-818.
- Culley G. (1807): Observations on Live Stock. London
- Darvasi A. és Soller M. (1992): Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and a quantitative trait locus. *Theor Appl Genet*, 85: 353-359.
- Darvasi A. és Soller M. (1994): Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics*, 138: 1365-1373.
- Darvasi A. és Soller M. (1995): Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping. *Genetics*, 141: 1199-1207.
- De Santis C., Evans B. S., Smith-Keune C., Jerry D. R. (2008): Molecular characterization, tissue expression and sequence variability of the barramundi (Lates calcarifer) myostatin gene. *BMC Genomics*, 9: 82.
- Dunn L. C. (1942): Changes in the degree of dominance of factors affecting tail-length in the house mouse. *Am Nat*, 76. 552–569.
- Epis M. R., Giles K. M., Barker A., Kendrick T. S., Leedman P. J. (2009): miR-331-3p regulates ERBB-2 expression and androgen receptor signaling in prostate cancer. *J Biol Chem*, 284 (37): 24696-704.
- Faber P.W., King A., van Rooij H. C., Brinkmann A. O., de Both N. J., Trapman J. (1991): The mouse androgen receptor. Functional analysis of the protein and characterization of the gene. *Biochem J*, 278. 269–278.
- Fekete S. Gy., Szakáll I., Andrásofszky E., Kósa E. és Hullár I. (1996): Body composition of mice of different condition score and sex. *Acta Veterinaria Hungarica*, 44 (4): 399-410.
- Fix C., Jordan C., Cano P., Walker W. H. (2004): Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (30): 10919–24.
- Friend J.(1978): Cattle of the World. Poole, UK: Blandford Press Ltd
- GeneStudio, Inc. (1999): SeqVerter software, P.O. Box 857 Suwanee, GA 30024-0857 U.S.A. (http://www.genestudio.com/seqverter.htm)
- Georges M., Grobet L., Poncelet D., Royo L. J., Pirottin D., Brouwers B. (1998): Positional candidate cloning of the bovine mh locus identifies anallelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. Proc. 6th World Cong. *Genetics Applied to Livestock Prod*, 26. 195-204.

- Grobet L., Martin L. J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Ménissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M. (1997): A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat Genet*, 17. 1-4.
- Grobet L., Poncelet D., Royo L. J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux C., Ménissier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M. (1998): Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome*, 9. 210-3.
- Gu Z. L., Zhang H. F., Zhu D. H., Li H. (2002): [Single nucleotide polymorphism analysis of the chicken Myostatin gene in different chicken lines]. *Yi Chuan Xue Bao*, 29(7): 599-606.
- Guo T., Jou W., Chanturiya T., Portas J., Gavrilova O., McPherron A. C. (2009): Myostatin Inhibition in Muscle, but Not Adipose Tissue, Decreases Fat Mass and Improves Insulin Sensitivity. *PLoS ONE* 4 (3): e4937. doi:10.1371/journal.pone.0004937
- Haley C. S. és Knott S. A. (1992): A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, 69: 31 5-324.
- Hall T. (1997-2004): BioEdit software, Ibis Isis Pharmaceuticals 1891, Rutherford Road Carlsbad, CA 92008. (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/)
- Heinlein C. A., Chang C. (2002): Androgen receptor (AR) coregulators an overview. *Endocr Rev*, 23: 175–200.
- Hu Z., Frith M., Niu T. and Weng Z. (2003): SeqVISTA: a graphical tool for sequence feature visualization and comparison. *BMC Bioinformatics*, 4. 1 (http://www.biomedcentral.com/1471-2105/4/1)
- Joulia-Ekaza D., Cabello G. (2006): Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res*, 312(13): 2401-14.
- Kambadur R., Sharma M., Smith T. P., Bass J. J. (1997): Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 7. 910–6.
- Karim L., Coppieters W., Grobet L., Valentini A. and Georges M. (2000): Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligo-nucleotide ligation assay. *Animal Genetics*, 31. 396–9.
- Kieffer K. M. and Cartwright T. C. (1980): Double Muscling in Cattle, Technical Report No.B-1325. The Texas A & M University System, College Station,TX.
- Kim H. S., Liang L., Dean R. G., Hausman D. B., Hartzell D. L., Baile C. A. (2001): Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun*, 281: 902–906.
- Kollias H. D. és McDermott J. C. (2008): Transforming growth factor-β and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 104: 579-587.

- Kronacher C. (1934): Genetik und Tierzuchtung. In: Handbuchde Vererbungwissenschaft (Ed. by E. Baur & M. Hartmann), 3:139. Berlin: Gerbruder Borntraeger
- Lee D.K., Chang C. (2003): Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 84: 41–49.
- Lee S. J. és McPherron A. C. (2001): Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PNAS*, 98. 9306-9311.
- Lee S.J. (2004): Regulation of muscle mass by myostatin. Ann. Rev Cell Dev Biol, 20. 61-86.
- Lewis A. and Redrup L. (2005): Genetic imprinting: conflict at the Callipyge locus. *Curr Biol*, 15. R291–R294.
- Lubahn D. B., Brown T. R., Simental J. A., Higgs H. N., Migeon C. J., Wilson J. M., és French F.S. (1989): Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 9534–9538.
- Ma K., Mallidis C., Artaza J., Taylor W., Gonzalez-Cadavid N. és Bhasin S. (2001): Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281. 1128-1136.
- Manly K. F. és Olson J. M. (1999): Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mamm Genome*, 10. 327-334.
- Marsan P., Valentini A. (1998): A G-T transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophy Marchigiana beef subjects. *Anim Genet*, 29. 51.
- Martinez O. és Curnow R. N. (1992): Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. *Theor Appl Genet*, 85: 480-488.
- McCroskery S., Thomas M., Maxwell L., Sharma M., Kambadur R. (2003): Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol*, 15. 162(6): 1135-47.
- McPhaul M. J., Marcelli M., Zoppi S., Griffin J. E. és Wilson J.D. (1993): The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 76: 17.
- McPherron A. C. és Lee S. J. (1997): Doublemuscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *PNAS*, 94. 12457-61.
- McPherron A. C., Lawler A. M., Lee S.J. (1997): Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387. 83-90.
- Miranda M. E., Dunner S., Amigues Y., Boscher M.-Y., Bourgeois-Bossaert F., Canon J., Cortes O., Georges M., Grobet L., Hanset R., Maugrion P., Menissier F. (2000): SNP screening at the myostatin gene level in European cattle breeds. In: *Proc.* 27th *International Conference on Animal Genetics*, 93.
- Miyazono K., Olofsson A., Colosetti P., Heldin C. H. (1991): A role of the latent TGF-1binding protein in the assembly and secretion of TGF-1. *EMBO J*, 10. 1091–1101.

- Moore K. J., Swing D. A., Copeland N. G. és Jenkins N. A. (1990): Interaction of the murine dilute suppressor gene (dsu) with fourteen color mutations. *Genetics*, 125. 421–430.
- Morton N. E. (1955): Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet*, 20. 277–318.
- Mosher D. S., Quignon P., Bustamante C. D., Sutter N. B., Mellersh C. S., Parker H. G., Ostrander E. A. (2007): A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygous dogs. *PLoS Genetics*, doi: 10.1371/journal.pgen.0030079.
- Mott I., Ivarie R. (2002): Expression of myostatin is not altered in lines of poultry exhibiting myofiber hyper- and hypoplasia. *Poult Sci*, 81(6): 799-804.
- Nadeau J.H. (2001): Modifier genes in mice and humans. Nat Rev Genet, 2(3): 165-74.
- Pfaffl M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29. 2002–2007.
- Pfaffl M. W., Graham W. H., Dempfle L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30. 1-10.
- Pinke O., Bakos K., Veress Gy., Korom E., Kovács B., Müller G., Varga L. (2008): Advanced Intercross Lines kísérleti populáció kialakítása és tenyésztése. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok konferencia, április 11-12., Gödöllő
- Prescott J., Coetzee G. A. (2006): Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. *Cancer Lett*, 231: 12–19.
- Quesada S. A. és Cachafeiro B. M. E. (1971): Reproduction de la femmelle cularde en race Asturienne. 22nd Reunion annuelle, Federation Europeenne de Zootechnie, Annales ge Genetique et de Selection Animale 4, 132.
- Rebbapragada A., Benchabane H., Wrana J. L., Celeste A.J., Attisano L. (2003): Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol*, 23: 7230–7242.
- Rice P., Longden I. és Bleasby A. (2000): "EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite" *Trends in Genetics*, 16. 276-277.
- Rozen S. és Skaletsky H. J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386. (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi)
- Russell D. W., Wilson J. D. (1994): Steroid 5α-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem*, 63: 25–61.
- Saharinen J., Taipale J., Keski-Oja T. (1996): Association of the small latent transforming growth factor with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J*, 15. 245–253.

- Schuelke M., Wagner K., Stolz L., Hübner C., Riebel T., Kömen W., Braun T., Tobin J., Lee S. (2004): Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. N Engl J Med, 350. 2682-2688.
- Shi X. B., Tepper C. G., deVere White R. W. (2008): Cancerous miRNAs and their regulation. *Cell Cycle*, 7 (11): 1529-38.
- Smith J. A., Lewis A. M., Wiener P., Williams J. L. (2000): Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: Allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. *Anim Genet*, 31. 306-309.
- Smith T. P., Lopez-Corrales N. L., Kappes S. M. és Sonstegard T. S. (1997): Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mamm Genome*, 8: 742-744.
- Solinas-Toldo S., Lengauer C. és Fries R. (1995): Comparative genome map of human and cattle. *Genomics*, 27: 489-496.
- Stinckens A., Luyten T., Bijttebier J., Van den Maagdenberg K., Dieltiens D., Janssens S., De Smet S., Georges M., Buys N. (2008): Characterization of the complete porcine MSTN gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity. *Anim Genet*, 39. 586-96.
- Sullivan D. A. és Edwards J. A. (1997): Androgen stimulation of lacrimal gland function in mouse models of Sjögren's syndrome. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 60. Issues 3-4, 237-245.
- Szabó Gy., Dallmann G., Müller G., Patthy L., Soller M., Varga L. (1998): A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mammalian Genome*, 9. 671-672.
- Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J., Kambadur R. (2000): Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*, 275. 40235-43.
- Tilley W. D., Marcelli M., Wilson J. D. és McPhaul M. J. (1989): Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 327–331.
- Trexler M., Bányai L., Patthy L. (2002): Distinct expression pattern of two related human proteins containing multiple types of protease-inhibitory modules. *J Biol Chem*, 383(1): 223-8.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. és Speleman F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3 (7): research 0034.1-0034.11
- Varga L., Müller G. és Szabó Gy. (2002): Miosztatin modifikátor gének térképezése egéren. Magyar Biokémiai Egyesület Mol. Biol. Szakosztálya 7, Munkaértekezlet. Keszthely, 2002 május 14-17.
- Varga L., Müller G., Szabó Gy., Pinke O., Korom E., Kovács B., Patthy L., Soller M. (2003a): Mapping modifiers affecting muscularity of the myostatin mutant (Mstn^{Cmpt-dl1Abc}) compact mouse. *Genetics*, 165. 257-267.

- Varga L., Müller G., Szabó Gy., Pinke O., Korom E., Kovács B., Patthy L. és Soller M. (2003b): A hiperizmoltság genetikai hátterének felderítése Compact egéren.V. Magyar Genetikai Kongresszus. Siófok, 2003.április 13.
- Varga L., Pinke O., Müller G., Kovács B., Korom E., Szabó Gy., Soller M. (2005): Mapping a syntenic modifier on mouse chromosome 1 influencing the expression of the myostatin mutant (Mstn^{Cmpt-dl1Abc}) Compact mouse. *Genetics*, 169. 489-493.
- Varga L., Szabó Gy., Darvasi A., Müller G., Sass M., Soller M. (1997): Inheritance and mapping of Compact (Cmpt), a new mutation causing hypermuscularity in mice. *Genetics*, 147. 755-764.
- Veress Gy. és Bakos K. (2009): A miosztatin gén szerepe a különböző háziállatfajták hiperizmoltságának kialakulásában. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2009/8. 131. 483-488.
- 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 (Analyse der Sequenz und der Genexpression des Compact Maus Androgen-Rezeptor Gens). Archives of Animal Breeding (Archiv für Tierzucht), 2009/52. Issue 2. 212-214.
- Wang L., Hsu C. L., Chang C. (2005): Androgen receptor corepressors an overview. *Prostate*, 63: 117–130.
- Williams A. E. (2008): Functional aspects of animal microRNAs. Cell Mol LifeSci, 65: 545–562.
- Wriedt C. (1929): Die Vererbung des Doppellender–Kharacters die Rindern. Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre, 51. 482–6.
- Zimmers T. A., Davies M. V., Koniaris L. G., Haynes P., Esquela A. F., Tomkinson K. N., McPherron A. C., Wolfman N. M., Lee S. J. (2002): Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*, 296: 1486–1488.

Hivatkozott internetes irodalom és adatbázis jegyzék:

http://books.google.hu http://www.anaborapi.it http://www.beefsemenonline.co.uk http://www.best-belgium-pietrain-boars.com http://www.ensembl.org http://www.informatics.jax.org http://www.informatics.jax.org http://www.jax.org http://www.jax.org http://www.offamgsz.hu/fkb http://www.peprotech.com http://www.westmorlandshow.co.uk

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Sokat köszönhetek témavezetőmnek Dr. Varga Lászlónak a hosszúra nyúlt munkám során nyújtott folyamatos és nélkülözhetetlen segítségéért.

Hálával tartozom Dr. Kovács Balázsnak, Pinke Orsolyának, Bakos Katalinnak, Korom Editnek, Dr. Szabó Gyulának, Sóvári Krisztinának, Galli Györgyné Zsuzsának, vagyis az egész Géntérképezés Állatokon csoportnak a kísérletek megvalósításáért.

Köszönettel tartozom Dr. Müller Gézának a Compact egér, kutatásban történő felhasználásáért.

Külön köszönettel tartozom a családomnak, akik végig mellettem álltak és bíztak abban, hogy eljutok idáig.