

# Animal welfare, etológia és tartástechnológia



## Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 4

Issue 2

Különszám

Gödöllő  
2008



## ADVANCED INTERCROSS LINES KÍSÉRLETI POPULÁCIÓ KIALAKÍTÁSA ÉS TENYÉSZTÉSE

Pinke Orsolya<sup>1,4</sup>, Bakos Katalin<sup>1,2,4</sup>, Veress Gyula<sup>1,4</sup>, Korom Edit<sup>1,5,4</sup>,  
Kovács Balázs<sup>3,4</sup>, Müller Géza<sup>6</sup>, Varga László<sup>2,4</sup>

Szent István Egyetem, <sup>1</sup>Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola, <sup>2</sup>Állattenyésztés-tudományi Intézet, Sertés- és Hobbiallat-tenyésztési Tanszék, <sup>3</sup>Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpont, 2103 Gödöllő, Páter Károly u. 1.

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, <sup>4</sup>Géntérképezés Állatokon Csoport, <sup>5</sup>Paprika Genetikai és Nemesítési Csoport, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4

<sup>6</sup>EGIS Gyógyszergyár Nyrt., 1165 Budapest, Bökényföldi út 116-120.

[pinkeo@gmail.com](mailto:pinkeo@gmail.com)

### Összefoglalás

A *Compact hiperizmolt egér* és a legtöbb duplán izmolt szarvasmarhafajta fenotípusát ugyanabban a génben, a miosztatinban bekövetkezett mutációk, valamint további modifikátor gének határozzák meg. A miosztatin csoportunk az egér 1 kromoszómájára pozicionálta, és megtalálta benne a hiperizmoltságért felelős 12 bp-os deléciót (Mstn<sup>Cmpt-d11Abc</sup>). A Comp9 hiperizmolt homozigóta mutáns, és a normál izomzatú CAST/Ei (*Mus musculus castaneus*) beltenyésztett törzsek keresztezéséből kialakított F2 populáción végeztünk genetikai térképezést. Ennek eredményeként több kromoszómán is kaptunk tágabb régiókat, amelyek még túl sok pozicionálisan esélyes gént tartalmaztak. Az Advanced Intercross Lines (AIL) kísérleti populáció az irodalmi adatok alapján alkalmas a tág régiók szűkítésére. Az AIL egy többgenerációs intercross, amellyel jelentősen meg lehet növelni a rekombinációs események bekövetkezésének az esélyét, így a térképezés hatékonysága is jelentősen nő. A vonalapító párok az előbbieken említett F2 populáció egyedei voltak. A soron következő tenyészgenerációkat szemirandom intercross párosítással hoztuk létre, függetlenül az egyedek fenotípusától és genotípusától. F7 generációtól kezdődően viszont a vad típusú egyedeket a további tenyészgenerációk létrehozásánál mellőztük, így növelve a homozigóta mutánsok részarányát, amelyek nagy hatékonysággal használhatók fel a genetikai térképezésben. A tudatos szelekciós munka eredményeként a mintegy 3100 egyedből álló F11 térképezési generációnak már 91,1%-a homozigóta formában hordozta a Mstn<sup>Cmpt-d11Abc</sup> mutációt.

**Kulcsszavak:** miosztatin, Compact egér, Advanced Intercross Lines (AIL), térképezési populáció

### Advanced intercross lines (AIL): establishment and breeding

#### Abstract

The phenotype of the *hypermuscular Compact mouse* and the majority of the doubled muscled cattle breeds are determined by mutations in the same gene: the Myostatin and also additional modifier genes. Previously, we have mapped the Myostatin gene to mouse chromosome 1 and found the 12 bp deletion (Mstn<sup>Cmpt-d11Abc</sup>), in that essential for hypermuscularity. We performed genetic mapping on the F2 population of an intercross between Comp9, a hypermuscular inbred line homozygous for the mutation, and CAST/EI (*Mus musculus castaneus*), an inbred line showing normal muscularity. Relatively wide regions were found on several chromosomes, incorporating a huge amount of positional candidate genes. The Advanced Intercross Lines (AIL) is a feasible tool to narrow genetic regions, according to literature. AIL is a multi-generation intercross that significantly enhances the chance of recombination, thus enhances the effectiveness of genetic mapping. The line-founder pairs were generated from individuals of the above mentioned F2. Subsequent breeding generations were generated by semirandom intercrossing without considering the individual phenotypes and genotypes.



However, from the F7 generation, the wild type individuals were excluded from breeding, thus increasing the proportion of the homozygous mutants that can be used effectively in genetic mapping. As the result of conscious selection, 91.1 % of about 3100 individuals were homozygote for the ( $Mstn^{Cmpt-d11Abc}$ ) mutation in the F11 mapping generation.

**Keywords:** myostatin, Compact mouse, Advanced Intercross Lines (AIL), mapping population

## Irodalmi áttekintés

A Compact egér mutáns az egész testére kiterjedő hiperizmoltságot mutat. Az általános fejlődésbiológiai és genetikai jelentőségén túl azért is kiemelkedő, mert ez a fenotípus kifejezett hasonlóságot mutat a haszonállat tenyésztésben is közismert „duplán izmolt jelleggel”, amely több háziállatfajban is előfordul, így például a szarvasmarhánál és a sertésnél is.

A Compact egér és egy normál izomzatú (Balb/c) beltenyésztett egértörzs keresztezéséből létrehozott F2 generáción végzett finomtérképezési kísérlet bebizonyította, hogy ezt a fenotípusos jelleget egy főgén, illetve modifikátorok determinálják. Kutatócsoportunk a főgént az 1. kromoszómára térképezte fel, a centromertől 27,7 cM-ra (Varga és mtsai, 1997). A miosztatin gént ezután fedezte fel egy amerikai kutatócsoport (McPerron és mtsai, 1997). Ennek a génnek a funkciója az, hogy a fajra jellemző normális izomtömeget negatív módon regulálja. Ha a gén mutáns, akkor hiperizmolt fenotípus keletkezik, mint ahogy a fehér-kék belga szarvasmarhában is tapasztalták (Kambadur és mtsai, 1997, Grobet és mtsai, 1997, McPherron és mtsai, 1997). A Compact egér esetében is ennek a génnek a mutációja történik, melyet ( $Mstn^{Cmpt-d11Abc}$ ) csoportunk fedezett fel (Szabó és mtsai, 1998).

A modifikátorok a főgénen keresztül hatnak, a fenotípust a normál izomzattól a hiperizmoltságig képesek modulálni. A modifikátorok térképezéséhez létrehozott újabb keresztezés (Comp9 x CAST/Ei) F2 populációjának genetikai analízise kimutatta, hogy hat kromoszóma (3., 5., 7., 11., 16. és az X) is hordoz modifikátorokat tartalmazó régiókat (Varga és mtsai, 2003). Ezek az intervallumok az F2 esetében még túl tágak voltak, és túl sok gén között kellett volna keresni azon esélyes géneket, amelyek a fenotípus kialakításában részt vehetnek. Az egér esetében lehetőség van arra, hogy speciális keresztezésekkel a modifikátor intervallumokat beszűkítsük.

Az Advanced Intercross Lines (AIL) egy ilyen kísérleti populáció. Célja, hogy egy hagyományos intercross keresztezés F2 populációjából kiindulva egymás után létrehozott generációk során nagyszámú rekombinációs eseményt halmozzon fel.



Azt a generációt, amelyben a térképezést kívánjuk elvégezni, felszaporítjuk, megnövelve ezzel generáción belül is a rekombinációk számát. Az AIL létrehozásának két leglényegesebb feltétele, hogy a beltenyésztettség mértéke a minimális legyen, valamint az, hogy adott generációkon belül a családok száma ne csökkenjen 50 alá (Darvasi és Soller, 1995).

## Anyag és módszer

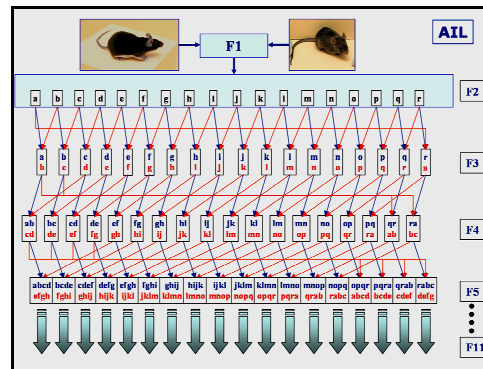
### *Egértörzsek*

A Comp9, a mutációt ( $Mstn^{Cmpt-d11Abc}$ ) homozigóta formában hordozó törzs hím egyedei és a CAST/Ei, a *Mus musculus castaneus*-ből származó, „vad” miosztatin allélt hordozó beltenyésztett törzs nőtény egyedeinek párosításával alakítottuk ki a Cross4 interszubspezifikus keresztezést.

Az állatokat standard körülmények között tartottuk, állandó hőmérséklet ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), páratartalom ( $55\% \pm 10\%$ ) és megvilágítás (12 óra világos és 12 óra sötét) mellett.

### *Advanced Intercross Lines*

Az Advanced Intercross Lines (AIL) kísérleti populáció kialakítását a Cross4 keresztezés F2 generációjából kiindulva kezdtük meg 2002-ben, az F2 generáció továbbtenyésztésével. Az egymást követő tenyészgenerációkat a továbbiakban félig-meddig véletlenszerű (semi-random) intercross-szal hoztunk létre, a beltenyésztés maximális elkerülése mellett, ahol az első és egyik legfontosabb szempont, hogy ne forduljon elő édestestvér párosítás. Az erre a célra kidolgozott párosítási rendszerek közül körkörös rotációs párosítást végeztünk. A kiinduló F2 tenyészpárokat különböző apai nagyapától származó egyedekből hoztuk létre. A kiindulási 65 F2 tenyészpárt létrehozásuk sorrendjében betűkkel jelöltük. A megszülető utódcsoport a két szülő összesített betűjelét kapta. Tehát ha egy F2 „a” hím a „b” nősténnyel kereszteztük, akkor az utódaik betűjele „ab” F3 generációban. Minden generációban ugyanezt az elvet követve az utódoknál először az apai, majd az anyai F2 genomhányadot jelölő betűsört tüntettük fel (1. ábra). Arra törekedtünk, hogy egy családban legalább két-két utódot nyerjünk ivaronként, ezzel biztonságossá téve a tenyésztést. Család alatt azokat a tenyészpárokat értjük amelyeknél az F2 genomhányadokat jelölő betűsor azonos sorrendben fordul elő. A tenyészpárokat az F3-F6 generációkban az ivarérettség elérése után 4-8 hetes életkorban, az F7-F10 generációkban vizuális bírálatot követően az egyedek genotípusának ismeretében 8-10 hetes korban hoztuk létre. Az F11 generációt felszaporítottuk, mivel ebben a generációban terveztük a finomtérképezést.



1. ábra: Advanced Intercross Lines tenyésztési séma

Figure 1. Advanced Intercross Lines (AIL) Breeding Strategy

### Fenotípus meghatározása

A vizuális bírálattal pontozással határoztuk meg, hogy az egyedek milyen mértékben hordozzák a hiperizmolt fenotípust. Annak érdekében, hogy a lehető legpontosabb fenotipizálási eredményt érjük el, már korábban kidolgoztunk egy háromismétléses fenotipizálási rendszert. Ennek az a lényege, hogy az azonos korú egyedeket (6-8 hetes), háromszor, egymástól függetlenül szemrevételezi és pontozza mindig ugyanaz az egy személy (Müller G.). Ez utóbbi az összehasonlíthatóság szempontjából lényeges. A pontozásnál a bíráló figyeli a test és a fark hosszát, a végtagok és a hát izmoltságát. A pontszámok 1-től 5-ig terjednek. Ötös pontszámot azon egyedek kaptak, amelyek rövid, tömörebb testalakulásúak, rövid farkúak, valamint egy normál izomzatú egyedhez képest a mellső lábon, illetve a nagyháti izom és a biceps esetében jelentős hipertrófiát mutattak (Varga és mtsai, 1997). A normál fenotípusú egyedek mindkét ivarban 1-es pontszámot kaptak. Az egyedileg kapott pontszámok átlagaiból 13 fenotípusos kategória alakult ki.

### A térképezésbe bevont utódcsoport-kategóriák

A térképezés szempontjából azon egyedek a leginkább informatívak, amelyek a teljes fenotípusos eloszlás két extrém kategóriájába tartoznak, ezért a szelektív genotípus meghatározás elve szerint elég ezeket a kategóriákat bevonni a térképezésbe (Darvasi és Soller, 1994). Négy extrém kategóriát alakítottunk ki az ivar (M = hím, F = nőstény), a háromszori fenotípusos bírálattal átlag (1 = normál izomzatú, 5 = hiperizmolt fenotípus) és az  $Mstn^{Cmpt-d11Abc}$  genotípus ( $K = Mstn^{Cmpt-d11Abc} / Mstn^{Cmpt-d11Abc}$ ,  $H = Mstn^{Cmpt-d11Abc} / +$ ,  $B = +/+$ ) alapján: M1K, M5K, F1K és F4K (ez utóbbi kategória azért 4-es fenotípus jelű mert a nőstények nem érik el a hímekre jellemző legmagasabb 5-ös szintet).



Mivel először az X kromoszómán található modifikátor régió beszűkítését kívántuk elvégezni, négy olyan vizsgálati csoportot képeztünk (G1, G2, G3, G4), amelyek egyaránt tartalmaztak M1K és M5K egyedeket. A G1 vizsgálati csoportba bevontuk az összes addig megszületett M5K egyedeket születési idejüknek megfelelően és kiválasztottunk hozzá annyi normál fenotípusút (M1K), hogy a csoport 120 egyedből álljon. A G2 csoport kialakításánál a családhatás elkerülése volt a cél. Ezért azon családokból már nem vontunk be M5K egyedeket, amelyek a csoport kialakításának időpontjában rendelkezésünkre álltak ugyan, de olyan családokba tartoztak, ahonnan már két, vagy annál több egyed kiválasztottunk a G1 létrehozásakor, így 19-19 új családból kerültek be egyedek az előző csoporthoz képest. A G3 és a G4 csoportok kialakításánál bevontuk a maradék extrém egyedeket is mind a két fenotípus kategóriából.

## Eredmények és értékelés

A Compact fenotípust modifikáló gének térképezésére a  $Mstn^{Cmpt-d11Abc}$  mutációt homozigóta formában hordozó egyedek használhatók fel a legnagyobb hatékonysággal. Ennek érdekében az F7 generációban újra elkezdjük a fenotipizálást és a genotipizálást. A fenotipizáláshoz elvégeztük a háromszoros vizuális bírálatot. Majd a lebírált egyedeknek meghatároztuk az  $Mstn^{Cmpt-d11Abc}$  genotípusát annak érdekében, hogy a térképezési generációban minden tenyészpártól tudjunk nyerni homozigóta mutáns ( $Mstn^{Cmpt-d11Abc}/Mstn^{Cmpt-d11Abc}$ ) genotípusú utódokat. Célunk az volt, hogy a térképezési generáció legnagyobb részben, esetleg 100%-ban homozigóta mutáns egyedekből álljon. A családok különböző arányban hordozták a  $Mstn^{Cmpt-d11Abc}$  allélt, ebből következően más-más generációkban váltak homozigótává.



**1. táblázat: Fenotípus-kategóriák az F11 generációban**

Hím(1)	B		H		K		Össz(2)
	%	egyed(3)	%	egyed(3)	%	egyed(3)	
1	0	0	5,7	89	10	157	246
1,33	0	0	0	0	0	0	0
1,67	0	0	1,2	18	4,7	73	91
2	0	0	0	0	0,1	1	1
2,33	0	0	0,5	7	5,3	82	89
2,67	0	0	0	0	0,8	12	12
3	0	0	1,5	23	12	182	205
3,33	0	0	0,3	4	7,6	118	122
3,67	0	0	0,1	1	7,2	113	114
4	0	0	0,2	3	13	204	207
4,33	0	0	0	0	8,1	127	127
4,67	0	0	0	0	6,2	97	97
5	0	0	0	0	16	250	250
Össz.(2)	0	0	9	145	91	1416	1561
Nőstény(4)	B		H		K		Össz(2)
	%	egyed(3)	%	egyed(3)	%	egyed(3)	
1	0	0	8,2	125	40	612	737
1,33	0	0	0	0	0	0	0
1,67	0	0	0,1	1	8,6	131	132
2	0	0	0	0	0,1	1	1
2,33	0	0	0,1	2	10	154	156
2,67	0	0	0,1	1	0,5	7	8
3	0	0	0,1	1	19	288	289
3,33	0	0	0	0	4,5	69	69
3,67	0	0	0	0	4,2	64	64
4	0	0	0	0	4,8	73	73
4,33	0	0	0	0	0,1	1	1
4,67	0	0	0	0	0,1	1	1
5	0	0	0	0	0,1	1	1
Össz.(2)	0	0	8,5	130	92	1402	1532

Table 1. Phenotype categories in F11.  
Male(1), altogether(2), individual(3), female(4)



Az F11 térképezési generáció mintegy 3100 egyedének genotípusos és fenotípusos eredménye (I. táblázat) alapján tehát jól látható, hogy a homozigóta mutáns egyedek felszaporítására irányuló tenyésztés sikeres volt. Az AIL F11 generációjában az  $Mstn^{Cmpt-d11Abc}$  deléciót majdnem a teljes populáció (91,1%) homozigóta formában hordozta. Ezen egyedeknek pedig 24 %-a tartozott a normál izomzatú (M1K – 157 egyed, és F1K - 612) fenotípusos kategóriába, míg 10,5 %-a a legerősebb izmoltsági kategóriákba (M5K és F4-5K), amelyek felhasználhatóak a finomtérképezésben a szelektív genotípus meghatározás értelmében. A két ivarban jelentős a fenotípusbeli eltérést tapasztaltunk. Az F11 generációban a hímek közül 246 egyed kapott mind a három fordulóban 1-es bírálati eredményt, amelyek közül 157 egyed, az összes hím 63,82%-a volt homozigóta mutáns. A nőstényeknél az egyedszám jelentősen magasabb, 737 volt az 1-es fenotípusos kategóriában. Ezen egyedeknek a 83%-a hordozta az  $Mstn^{Cmpt-d11Abc}$  deléciót homozigóta formában. A legerősebb izmoltsági kategóriába a nőstényeknél az F11 generáció egyetlen egyede tartozott, ezért a szelektív genotípus meghatározást nőstényeknél a négyes, és annál magasabb fenotípus-átlagot elért egyedeken végeztük. Ezekben a fenotípusos kategóriákban az egyedek 100%-a homozigóta mutáns genotípusú volt mind a két ivarban.

A Compact-AIL térképezési hatékonyságát először az X kromoszóma modifikátor intervallumainak pontos feltérképezésének során mértük le. Harmincegy mikorszatellit keret-marker segítségével, a G1 és G2 utódcsoportok bevonásával határoztuk be durva felbontással a legerősebb hatást mutató kromoszómaregiókat, majd ezeket tovább szűkítettük a G3-G4 csoportok hozzáadásával (Veress és mtsai, 2008).

## Irodalomjegyzék

- Bünger, L., Laidlaw, A., Bulfield, G., Eisen, E.J., Medrano, J.F., Bradford, G.E., Pirchner, F., Renne, U., Schlote, W., Hill, W.G. (2001): Inbred lines of mice derived from long-term growth selected lines: unique resources for mapping growth genes. *Mamm. Genome*, 12. 678-686.
- Darvasi, A., 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., Soller, M. (1995): Advanced intercross lines, an experimental population for fine mapping. *Genetics*, 141. 1199-1207.
- 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-musled phenotype in cattle. *Nat. Genet.*, 17. 71-74.





- Iraqi, F., Clapcott, S.J., Kumari, P., Haley, C.S., Kemp, S.J., Teale, A.J.* (2000): Fine mapping of trypanosomiasis resistance loci in murine advanced intercross lines. *Mamm. Genome*, 11. 645-648.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P., Bass, J.J.* (1997): Mutation in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.*, 7, 910-916.
- McPherron, A.C., Lee, S.J.* (1997): Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12475-12461.
- Varga, L., Müller, G., Szabó, G., Pinke, O., Korom, E., Kovács, B., Patthy, L., Soller, M.* (2003): Mapping modifiers affecting muscularity of the myostatin mutant (Mstn<sup>Cmpt-d11Abc</sup>) compact mouse. *Genetics*, 165. 257-267.
- Varga, L., Szabó, G., 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., Pinke O., Bakos K., Kovács B., Müller G., Varga L.* (2008): Hiperizmoltságra ható, X kromoszómán elhelyezkedő modifikátor gének térképezése. I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok konferencia, április 11-12., Gödöllő.