

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 4

Issue 2

Különszám

Gödöllő
2008



HIPERIZMOLTSÁGRA HATÓ, X KROMOSZÓMÁN ELHELYEZKEDŐ MODIFIKÁTOR GÉNEK TÉRKÉPEZÉSE

*Veress Gyula^{1,4}, Pinke Orsolya^{1,4}, Bakos Katalin^{1,2,4},
Kovács Balázs^{3,4}, Müller Géza⁵, Varga László^{2,4}*

Szent István Egyetem, ¹Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola, ²Állattenyésztés-tudományi Intézet,
Állatnemesítési, Sertés-, Baromfi és Hobbiállattenyésztési Tanszék,

³Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpont, 2103 Gödöllő, Páter Károly u. 1.

⁴Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Géntérképezés Állatokon Csoport
2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

⁵EGIS Gyógyszergyár Nyrt, 1165 Budapest, Bökényföldi út 116-120.

Összefoglalás

Egy korábban végrehajtott F2 keresztezés genetikai analízise során kimutattuk, hogy a Compact egér mutáns hiperizmolságát egy főgén: a miosztatin, valamint további, az 1, 3, 5, 7, 11, 16 és X kromoszómán elhelyezkedő modifikátor gének együttesen határozzák meg. Mivel a duplán-izmolt szarvasmarha fajták legtöbbszörében ugyancsak miosztatin mutációra vezethető vissza a fenotípus kialakulása, de ugyanakkor a modifikátor hatás is jelentős például a fehér-kék belga esetében, így a modifikátorok felderítése mezőgazdasági szempontból fontos lehet. Az egyik legnagyobb térképezési erővel rendelkező egér keresztezési elrendezés a többgenerációs AIL (Advanced Intercross Lines), ezért létrehoztuk a Compact AIL-t és a legerősebb modifikátor hatást mutató Chr X vizsgálatát ezzel az elrendezéssel kezdtük meg. Az első F2 keresztezésben a rekombinációs események detektálására elég volt csak 9 mikroszatellit markert vizsgálni, de az F2 elrendezés csak egy nagyobb kromoszóma intervallum meghatározására volt alkalmas, amely a legerősebb modifikátor hatást a Chr X közepén mutatta ki. Az AIL elrendezés 11. generációjában végrehajtott térképezés a felhalmozódott rekombinációs események folytán sokkal pontosabb modifikátor intervallum beszűkítést eredményezett a kromoszóma hosszában egyenletesen elhelyezett 31 marker segítségével. Az F2-es esélyes intervallummal szemben, annak a két oldalán határozott meg két esélyes intervallumot (XA és XB) kezelhető számú génnel.

Kulcsszavak: miosztatin, Compact egér, X kromoszóma, modifikátor gén, genetikai térképezés

Mapping hypermuscularity modifiers on chromosome X

Abstract

In the course of a genetic analysis carried out on an F2 cross we have shown, that hypermuscularity of the Compact mouse is determined by a major gene: myostatin and by additional modifier genes residing on chromosomes 1, 3, 5, 7, 11, 16 and X. Since in most of the double-muscled cattle breeds the phenotype can be attributable to a myostatin mutation, but at the same time the modifier effect is also significant for example in case of Belgian Blue, thus the discovery of modifiers is important from an agricultural aspect. The multi-generation AIL (Advanced Intercross Lines) is one of the mouse crossing schemes of the greatest mapping power, so we established the Compact-AIL, and began the examination of Chr X showing the strongest modifier effect. In the first F2 cross it was enough to use only 9 microsatellite markers to detect the recombination events, but at the same time this F2 scheme was suitable only for the detection of larger chromosome intervals. The strongest modifier effect was detected in the middle of Chr X. Mapping in the 11th generation of the AIL resulted the much precise narrowing down of the modifier intervals with the evenly spaced 31 markers along Chr X. In contradiction to the F2 candidate interval, in the AIL two candidate intervals were shown on the two sides of the F2 interval (XA and XB) with limited number of genes.

Keywords: myostatin, Compact mouse, Chromosome X, modifier gene, genetic mapping



Irodalmi áttekintés

A Compact egér hiperizmoltságát alapvetően a miosztatin (Mstn) génben bekövetkezett 12 bázispáros deléció ($Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$) eredményezi (Varga és mtsai, 1997; Szabó és mtsai, 1998), de az izmoltság mértékét további modifikátor gének is jelentősen befolyásolják.

Egy korábban végrehajtott F2 keresztezés (Cross-4) genetikai analízise során több olyan kromoszómaregiót is feltérképeztünk az 1 (Varga és mtsai, 2005), 3, 5, 7, 11, 16 és X kromoszómákra, amelyek feltehetőleg hordoznak modifikátor géneket. E régiók közül a legerősebb hatást az X kromoszómán tapasztaltuk. Az F2 elrendezés csak egy nagyobb kromoszóma intervallum meghatározására volt alkalmas, amely a modifikátor hatást a Chr X közepén mutatta ki (Varga és mtsai, 2003).

Ahhoz, hogy a feltételezett modifikátor géneket pontosan fel tudjuk térképezni, még a kísérletes munkák korai fázisában hozzáfogtunk egy - az F2 populációból kiinduló - többgenerációs AIL (Advanced Intercross Lines) keresztezés: a Compact-AIL kialakításához. Ilyen populációból csupán néhány létezik, mert egyrészt viszonylag új a keresztezési elképzelés (Darvasi és Soller, 1995), másrészt a létrehozása hosszadalmas, körültekintő tenyésztést igényel (Pinke és mtsai, 2008), viszont az AIL térképezési ereje kimagaslóan nagy.

Anyag és módszer

Állatok

A Comp9 (Compact beltenyésztett törzs) és a CAST/Ei (*Mus musculus castaneus*-ből kialakított beltenyésztett törzs) keresztezéséből (Cross-4) kiinduló F2 generációban csak a homozigóta mutáns egyedeken térképeztünk és a szelektív genotípus meghatározás értelmében csak az izmoltság szempontjából extrém egyedeket, a populációnak összesen 8%-át használtuk fel. A Compact-AIL tenyészgenerációit úgy szelektáltuk a vonal kialakítása során, hogy az egyedek az F11 generációra teljes mértékben homozigótává váljanak az $Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ mutációra, így a populációnak már a 32%-a vált alkalmassá a térképezése. Az X kromoszóma genetikai analíziséhez az X inaktiváció miatt csak a hím csoportokat használtuk: összesen 155 M1K és 248 M5K egyed (M = hím, 1 = normál izomzatú egyed, 5 = hiperizmolt egyed, K = homozigóta $Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ mutáns). A ChrX térképezéséhez szükséges genotipizáláshoz a következő technikai csoportokat hoztunk létre az extrém hím F11 utódokból: G1 csoport: 33 M1K + 77 M5K = 110; G2 csoport: 61 M1K + 59 M5K = 120; G3 csoport: 24 M1K + 96 M5K = 120; G4 csoport: 37 M1K + 16 M5K = 53.



Markerek

A vizsgálatokba a következő keret-markereket (FWM = framework marker) vontuk be a megfelelő fizikai térkép pozíciókkal (Marker név: Ensembl, Built34 fizikai pozíció Mbp, aláhúzás = az adott marker az F2 térképezésben is keret marker volt): DXMit101: 4.42, DXMit124a: 7.57, DXMit85: 11.64, DXMit56: 15.15, DXMit90: 20.9, DXMit101: 4.42, DXMit124a: 7.57, DXMit85: 11.64, DXMit56: 15.15, DXMit90: 20.9, DXMit81: 30.82, DXMit50: 35.35, DXMit105: 44.5, DXMit83: 45.45, DXAbc54: 49.83, DXMit75: 51.82, DXMit126: 54.97, DXMit87: 61.32, DXMit94: 66.68, DXMit45: 71.74, DXMit111: 75.76, DXMit93: 81.73, DXMit128: 87.92, DXMit96: 93.83, DXMit40: 98.75, DXMit214: 105.27, DXMit39: 110.4, DXMit172: 116.43, DXMit149: 121.42 (ez a marker a DXMit116 helyett szerepelt), DXMit130: 127.31, DXAbc32: 128.86, DXMit37: 131.23, DXMit4: 133.02, DXMit181: 136.26, DXMit152: 141.18, DXMit10: 144.86, DXMit178: 149.73, DXMit99: 153.31, DXMit21: 157.15, DXMit100: 162.54.

Térképezés

Minden egyes marker genotípus gyakoriságát meghatároztuk a kiválasztott M1K és M5K utódokra. A két csoport gyakorisági értékeit összevontan kezeltük a következő hipotézis szerint: ahhoz, hogy egy egyed az M5K csoportba kerülhessen, a számára kedvező, a hiperizmoltság irányába ható modifikátor allélnak Comp9 (K) eredetűnek kell lennie, míg ahhoz, hogy egy egyed az M1K csoportba kerüljön, számára a normál izomzat kialakulásának kedvező CAST/Ei eredetű allél (B) a kedvező. A legnagyobb modifikátor hatást tehát azoknál a markereknél várhatjuk, ahol az M5K csoport a Compact és az M1K csoport a CAST/Ei allélt hordozza szignifikánsan nagyobb frekvenciával, mint az ellentétes allélt, s ezért a két értéket össze is vonhatjuk: $FAV = M5K-K + M1K-B$ és $UNFAV = M5K-B + M1K-K$. A χ^2 próbát úgy végezzük, hogy az adott markernél kapott FAV és UNFAV értékeket összevetjük a várt egyenlő arányú allélgyakorisági értékekkel. Az X kromoszóma mentén, a fizikai pozíciójuk szerint elhelyezett markerek χ^2 értékeit logaritmikus skálán feltüntetve kapjuk meg a modifikátor hatást érzékelhető χ^2 görbét.

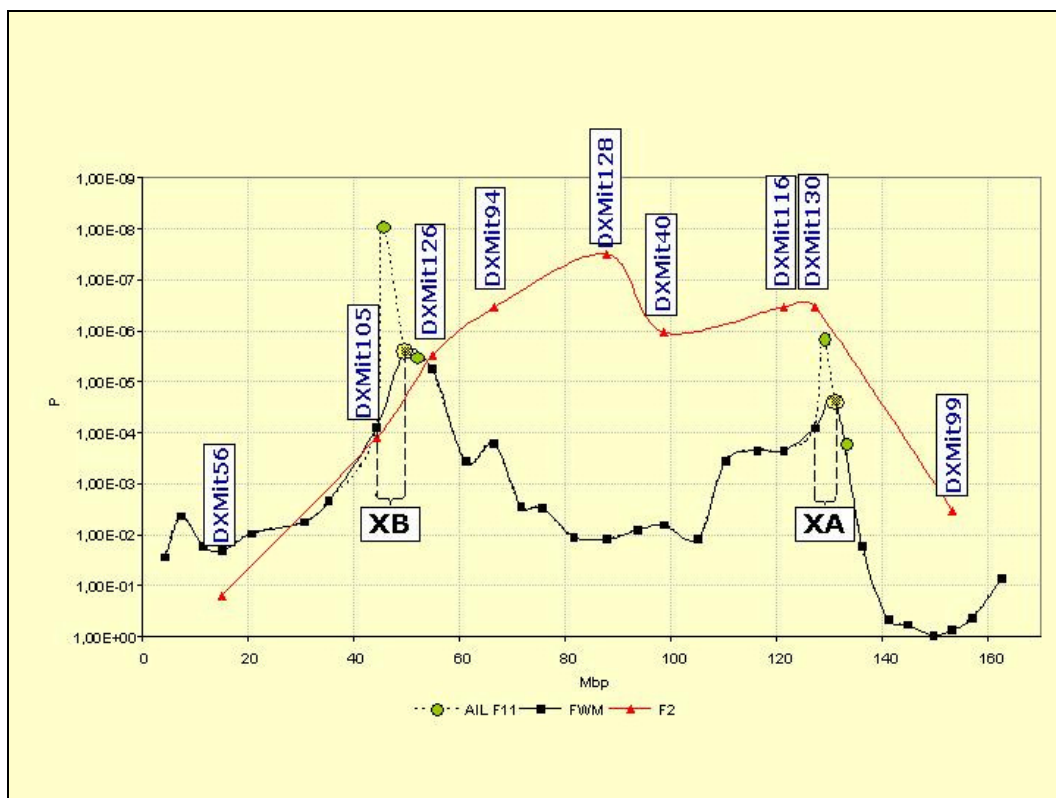
Eredmények és értékelés

Az X kromoszóma térképezéséhez a következő lépést a genetikai markerek összeválogatása jelentette. Az AIL modell-kísérletek tanulsága szerint az AIL térképezéshez ~5x annyi marker kell, mint az F2 térképezéshez, az egymást követő generációkon keresztül felgyülemlett rekombinációs események pontos detektálása végett.



Míg az AIL populáció kiindulási pontját jelentő Cross4 kísérletünk F2 generációjának térképezésekor összesen csak 9 mikroszatellit markert használtunk, addig az AIL-F11 térképezéséhez e markerek mellé még további 24 ismert markert (Mit jelű markerek) választottunk, illetve alakítottunk ki (Abc jelű markerek) úgy, hogy azok ~5 Mbp térközökkel fedjék a Chr X-et, függetlenül a genetikai távolságoktól és az egyes területek génekben való gazdagságától. Végül így létrejött az a 33 markeres FWM háló, amelyben a markerek közötti átlagos távolság jelenleg 4.94 Mbp, miközben a legnagyobb távolság 6,52 Mbp a legkisebb pedig 3,15 Mbp. Ezeket a FWM-eket első lépésben nem az összes kiválasztott egyedre, hanem csak a G1+G2 csoportokra genotipizáljuk, összesen 94 M1K + 136 M5K = 230 egyedre. Jelenleg 31 FWM marker (lásd Markerek) G1+G2 genotípus vizsgálata készült el.

A FAV-UNFAV összevont χ^2 módszerrel kapott hatásgörbe, az X kromoszóma proximális végétől számított 49,83 Mbp-nál lévő DXAbc54 markernél és 131,23 Mbp-nál elhelyezkedő DXMit37 markernél két csúcsot detektált erősen szignifikáns $2,45E-06$, illetve $2,44E-05$ értékekkel.



1. ábra: Az X kromoszóma XA és XB régiója

Figure 1. The XA and XB regions of chromosome X



Ugyanakkor összehasonlítva ezeket az eredményeket a Cross4 F2-ben kapottakkal, kitűnik, hogy míg ott a legmagasabb értéket 90 Mbp körül kaptuk, addig itt ugyanebben a pozícióban a szignifikancia szint alatti érték mutatkozott. Mindkét csúcs esetében egy-egy további markert vontunk be mind proximális mind disztális irányban a legerősebb modifikátor hatás leszűkítése végett. Ebben a szakaszban a G1-G2 utódcsoport mellett már G3-G4 csoportokat is bevontuk a genotipizálásba. A DXMit37 marker disztális oldalán bevont DXMit4 markernél csökkent a χ^2 érték, viszont a proximális oldalon elhelyezkedő DXAbc32 markernél $1,41E-06$ értéket detektáltunk. Ez a legmagasabb csúcsa a DXMit130-DXMit37 markerek által szegélyezett, XA-nak elnevezett régióknak. Ennek hossza 3,92 Mbp az Ensembl Built34 adatai szerint és ~60 gént foglal magába.

A DXAbc54 markernél ugyancsak a disztális oldalon csökkent a χ^2 érték a DXMit75 markernél, viszont nőtt a proximális oldalon elhelyezkedő DXMit83-as markernél $8,55E-09$ értékig. Ez az DXMit105 és DXAbc54 markerek által közrezárt XB régió jelenlegi legmagasabb pontja. E régió 5,33 Mbp (Ensembl Built34) hosszú és ~30 gén helye ismert benne.

Következtetések és javaslatok

Ez az eredmény igazolta azt a feltételezésünket, hogy nem egy, hanem két egymással szomszédos erőteljes hatású modifikátor gén helyezkedik el a ChrX-en. Az AIL vizsgálat képes volt szétbontani ezt a kettős hatást bizonyítva azt, hogy az F2 analízis által megjelölt helyen valójában nincs is jelentős hatás (ghost-QTL).

Mind az XA, mind az XB intervallumban a CAST/Ei-vel elindított keresztezés jóvoltából még van számos további informatív marker az előzetes polimorfizmus vizsgálatainknak megfelelően, így jó esély van arra, hogy az ezekben a régiókban feltételezett modifikátor géneket már genetikailag, más módszerek bevonása nélkül is rendkívül pontosan fel tudjuk térképezni az AIL keresztezésben felgyülemlett rekombinációs események következtében.

Irodalomjegyzék

Darvasi A. és Soller M. (1995): Advanced Intercross Lines, an Experimental Population for Fine Genetic Mapping. *Genetics*, 141. 1199-1207.



- Pinke O., Bakos K., Veress Gy., Korom E., Kovács B., Müller G. és Varga L. (2008)* Advanced intercross lines kísérleti populáció kialakítása és tenyésztése. I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok konferencia, április 11-12., Gödöllő.
- Szabó, Gy., Dallmann, G., Müller, G., Patthy, L., Soller, M., and Varga, L. (1998).* A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mamm. Genome* 9. 671-672.
- Varga, L., Müller, G., Szabó, Gy., Pinke, O., Korom, E., Kovács, B., Patthy, L., and Soller, M. (2003).* Mapping Modifiers Affecting Muscularity of the Myostatin Mutant (MstnCmpt-dl1Abc) Compact Mouse. *Genetics*, 165. 257-267.
- Varga, L., Pinke, O., Müller, G., Kovács, B., Korom, E., Szabó, G., and Soller, M. (2005).* Mapping a syntenic modifier on mouse chromosome 1 influencing the expression of the myostatin mutant MstnCmpt-dl1Abc) Compact mouse. *Genetics*, 169. 161-173.
- Varga, L., Szabó, Gy., Darvasi, A., Müller, G., Sass, M., and Soller, M. (1997).* Inheritance and Mapping of Compact (Cmpt), a New Mutation Causing Hypermuscularity in Mice. *Genetics*, 147. 755-764.