

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 4

Issue 2

Különszám

Gödöllő
2008



NÉHÁNY HIPERIZMOLTSÁGRA HATÓ, MODIFIKÁTOR SZEREPRE ESÉLYES GÉN VIZSGÁLATA COMPACT EGÉREN

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

Szent István Egyetem, ¹Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola,

²Állattenyésztés-tudományi Intézet, Sertés- és Hobb állat-tenyésztési Tanszék,

³Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpont

2103 Gödöllő, Páter Károly u. 1.

⁴Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Géntérképezés Állatokon Csoport

2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

Bakos.Katalin@mkk.szie.hu

Összefoglalás

A magyarországi *Compact vonal* – amely egy német szelekciós kísérletből származik – hiperizmoltóságát egy főgén (a miosztatin) és további modifikátor gének határozzák meg. Korábbi kísérleteink során a Compact egér és egy vad típusú, beltenyésztett egértörzs keresztezésével létrehozott F2 populációt vizsgálva azonosítottuk a főgénben található 12 bp-os deléció, ami a fenotípus kialakításáért felelős. A populációban a mutációra homozigóta egyedek fenotípusa a normál izomzatútól a hiperizmolt kategóriáig változik, ami a vizsgálati csoportban szegregáló modifikátor gének szerepére utal. A modifikátor gének azonosítása során hét kromoszómán azonosított, viszonylag tág QTL régiókat vizsgáltunk pozicionálisan esélyes gén megközelítéssel. Irodalmi adatok alapján eddig négy, modifikátor szerepre esélyes gént vizsgáltunk. Meghatároztuk a miogenin, a MyoD1 és a WFIKKNRP2 teljes genomi szekvenciáját, valamint az androgén receptor teljes cDNS szekvenciáját. Az eredményeket összevetve a konszenzus szekvenciával, a miogenin és a MyoD1 gének esetében több, a promóter régióban vagy intronokban elhelyezkedő szubsztitúciót, deléciót illetve inszerciót azonosítottunk, míg a WFIKKNRP2 2. exonjában négy, egyetlen bázist érintő szubsztitúciót találtunk. Ez utóbbi báziscserék azonban minden esetben az aminosavakat kódoló triplet harmadik bázisát érintették és egyetlen esetben sem vezettek aminosavcseréhez. A lehetséges modifikátor gének és a főgén relatív expresszióját kvantitatív real-time PCR-rel vizsgáltuk a vad típusú kontrollhoz képest. Megállapítottuk, hogy valamennyi vizsgált gén expressziója azonosnak tekinthető a vad típusú egérben található gének expressziós szintjével. Az eredmények arra utalnak, hogy az eddig vizsgált gének minden valószínűség szerint nem az általunk keresett modifikátor gének.

Kulcsszavak: miosztatin, Compact egér, pozicionálisan esélyes gén, kvantitatív real-time PCR

Analyses of some candidate modifier genes affecting hypermuscularity in the compact mouse

Abstract

The hypermuscularity of the *Hungarian Compact mouse strain* – originated from a selection experiment in Germany – is determined by a major gene (myostatin) and some modifier genes. Previously we have identified a 12 bp deletion in the major gene responsible for the phenotype by analysing the F2 of a cross of the Compact mouse to a wild-type strain. The phenotypic variation of the mice homozygous for the mutation from normal to hypermuscular categories refer to modifier genes segregating in the population. Positional candidate gene approach was used to find modifier genes in relatively large QTL regions on seven chromosomes. We selected four candidate genes on the basis of literature. The complete genomic sequence of myogenin, MyoD1 and WIKKNRP, and the complete cDNA sequence of androgen receptor were determined. Comparing the results to the consensus sequence, we found several substitutions, deletions and insertions in the introns and promoter regions of myogenin and MyoD1, whereas we found a one-base substitution in the second exon of WIKKNRP.



However, these latter occurred in the third base of the triplet and did not lead to amino-acid substitution. The relative expression of the candidate modifiers and the major gene was examined by quantitative real-time PCR according to the wild-type control, but no difference was found. According to these results, we suppose that none of the examined genes is a putative modifier.

Keywords: myostatin, Compact mouse, positional candidate gene, quantitative real-time PCR

Irodalmi áttekintés

A Compact egeret egy szelekciós kísérlet során fedezték fel Németországban (*Bunger és mtsai*, 2001). A magyarországi Compact vonal a hiperizmolt fenotípust leginkább kifejező állatokból származik. A Compact fenotípusú egyedek jóval izmosabbak a hagyományos értelemben vett laboratóriumi egereknél és nagy fokú hasonlóságot mutatnak a duplán izmolt fenotípusú háziállatokkal.

A Compact vonal genetikai analízise során kimutattuk, hogy a hiperizmoltságot egy – az egér 1. kromoszómájára térképezett – főgén és további modifikátor gének határozzák meg (*Varga és mtsai*, 1997). A főgénről bebizonyítottuk, hogy az a miosztatin (Mstn) (*McPherron és mtsai*, 1997), s a fenotípust a gén propeptid régiójában található 12 bp-os deléció (Mstn^{Cmpt-d11Abc}) okozza (*Szabó és mtsai*, 1998).

A miosztatin az izomfejlődés negatív regulátora. Növekedési és differenciálódási faktor, a TGF- β szupercsalád tagja. Az egyedfejlődés és a felnőtt élet során is jelentős szerepet tölt be a harántcsíktal izomszövetben, hiánya hiperizmoltsághoz vezet, amely a sejtek számának (hiperplázia), valamint méretének megnövekedésében (hipertrófia) egyaránt megmutatkozik (*McPherron és mtsai*, 1997). A hiperizmoltság fokát meghatározó modifikátor gének térképezését egy az Mstn^{Cmpt-d11Abc} deléciót hordozó Compact beltenyésztett törzs (Comp9) és a *Mus musculus castaneus* alfajból kitenyésztett, „vad” típusú miosztatin allélt hordozó beltenyésztett törzs (CAST/Ei) keresztezéséből származó, az Mstn^{Cmpt-d11Abc} delécióra homozigóta, extrém (normál/hiperizmolt) fenotípusú F2 utódjain végeztük. Hét kromoszómán azonosítottunk viszonylag tág QTL (Quantitative Trait Locus) régiókat: az 1, 3, 5, 7, 11, 16 és az X kromoszómákon (*Varga és mtsai*, 2003) (*Varga és mtsai*, 2005).

Az Mstn mellett, a „pozicionálisan esélyes gén megközelítés” értelmében kiválasztottunk néhányat a modifikátor intervallumokban található, irodalmi adatok alapján az izomfejlődésben jelentős szerepet betöltő gént: MyoD1, WFIKKNRP2, androgén receptor gén, hogy ezeket részletes szekvencia és expressziós vizsgálatnak vessük alá.



A miogenin és a MyoD1 a Myo D családba tartozó, izomzatra ható szabályozó faktorok (Muscle regulatory factor, MRF). Az egér 1-es kromoszómáján található miogenin kulcsfontosságú szerepet tölt be a mioblasztok terminális differenciációjában, míg a 7-es kromoszómán található MyoD1 a miogén irányba történő „elköteleződésben” játszik fontos szerepet (Tapscott és mtsai, 1991, Edmondson és Olson, 1993). A nem mutáns miosztatin gátolja a MyoD családba tartozó gének expresszióját (Langley és mtsai, 2002). A WFIKKNRP2 az egér 11-es kromoszómáján található, a szérumban keringve az érett miosztatinhoz vagy a miosztatin propeptidhez kötődve látenciában tartja a miosztatint, valamint gátolja annak aktivációját, így gátolja a miosztatin hatást (Hill és mtsai, 2003).

Az X kromoszómán található androgén receptor nélkülözhetetlen az izomzatban is megmutatkozó szexuális dimorfizmus kialakulásában, növeli az izomtömeget, az izomerőt és serkenti a fehérjeszintézist az izomban. A miogenin expresszióját növelve serkenti az izom irányba történő differenciálódást (Lee, 2002).

Anyag és módszer

Minták

A Comp9, az Mstn^{Cmpt-d11Abc} deléció hordozó Compact beltenyésztett egértörzs egyedeitől származó mintákat vizsgáltuk a CAST/Ei, a Mus musculus castaneus alfajból kitenyésztett, „vad” típusú miosztatin allélt hordozó beltenyésztett törzshöz képest. A DNS-t farokmintából preparáltuk sós kicsapásos módszerrel, az RNS-preparálást guanidin tiocianátos módszerrel végeztük. A cDNS-t reverz transzkriptáz (Roche) enzim segítségével szintetizáltuk.

Primertervezés

A vizsgálandó DNS és cDNS-szakaszokra a szabadon elérhető OligoExplorer program segítségével terveztünk primereket. Szekvencia vizsgálathoz használt primerek (5'-3'): miosztatin - MSTN 1F: TGGCATTACTCAAAGCAAAAAG, MSTN 1R: CATCAATACTCTGCCAAATACCA, MSTN 2F: AAACCCATGAAAGACGGTACA, MSTN 2R: ATGACTTGGGAAGTTTCTAACCT, MSTN 3F: ATCTTGCTGTAACCTTCCCAGG, MSTN 5R: TTGGGTGTGTCTGTCACCTT, MSTN 6F: CTGTGCCGTCTTTGTCATCG, MSTN 8R: GCAGCAATCAGCATGAACAGG, MSTN 14F: CCTTTGGATGGGACTGGAT, MSTN 15R: ACTGGGAGCCACATTCATAGA, miogenin - MGENIN 1F: ATGTGCAGCAACAGCTTAGAGG, MGENIN 1R: GCCTGTAGGCGCTCAATGTAC, MGENIN 2F: CGGCTGCCTAAAGTGGAGA, MGENIN 2R: CAGGACAAAATGGGTAAGGAAGA, MGENIN 3F:



AGTCAGAGCCTCCAGCAACTTC, MGENIN 3R: GCTCTGATAGCAACCAGTCTTTATTC, MyoD1 - MyoD1 1F: ATAGCACTGCCACCGATTTCAT, MyoD1 3R: AGGAGCATCTAGGTATGAGGGAC, MyoD1 2F: CGCTCCAAGTCTCTGATG, MyoD1 4R: CACTGTAGTAGGGCGGTGTCGTA, MyoD1 5R: GCTTCATCTTTTGGGCGTGA, WFIKKNRP2 - WFIKKN 1F: GAAATGTCGCTGGTGTCTGA, WFIKKN 1R: AACTTCGGAGGCTTTACGGG, WFIKKN 2F: TCTGTCCATTCTTGCTTCCTCC, WFIKKN 2R: GTTGTTAGCCTGGGCGTCG, WFIKKN 3F: CCGTCTTAGCCCATGTGGAA, WFIKKN 3R: GGGGCAGCATTCTCATAGGT, WFIKKN 4F: GGGATAAAGGAACAGGGAAAGTG, WFIKKN 4R: ATGCCAACTGGAGCCGACA, WFIKKN 5F: GGGCTTTGGGTATGGATTAGG, WFIKKN 5R: TGCTTTTGGAGAATCTTTTCCC, WFIKKN 6F: GCTCTTGGTGTGATTACAGGGG, WFIKKN 6R: GAGAATGGCTGCTGCCTCAC, androgén receptor - ANDR 1F: GCAGGATAAGGGAATTCGGTG, ANDR 3R: GTCCCTGGTACTGTCCAAACG, ANDR 2F: TGGGACCTTGGATGGAGAAC, ANDR 4R: CCCACCTTGTTCCCTTCC, ANDR 5F: CTCAGAGCAAGAGACGAGGAG, ANDR 8R: CTACTACAAGTTCCGCTGGCT, ANDR 7F: CTCCTCAAGCCCACATCAGA, ANDR 6R: GACTCCCGCCCAATAGAACAA. *Expressziós vizsgálatokhoz használt primerek (5'-3')*: Miosztatin - MSTN 4F: GGCCATGATCTTGCTGTAAC, MSTN 4R: ACACCCAAGAGGTCCCG, miogenin - MGENIN 5F: GCGGCTGCCTAAAGTGGAGA, MGENIN 5R: GTTGCATTCACTGGGCACCAT, MyoD1 - MyoD1 6F: GCTCTGATGGCATGATGGATTA, MyoD1 7R: GTCGTAGCCATTCTGCCGC, androgén receptor - ANDR 2F: TGGGACCTTGGATGGAGAAC, ANDR 3R: GTCCCTGGTACTGTCCAAACG, β -aktin - β -aktin. 1F: TGCCGCATCCTCTTCCCTC, β -aktin. 1R: CCACAGGATTCCATACCCAAG. A belső kontroll génként használt GAPDH-hoz GAPDH hs primerpárt használtunk.

Szekvenálás és real-time PCR vizsgálatok

A vizsgált gének szekvencia analízisét ABI Prism Big Dye Terminator 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit segítségével, ABI Prism 310 Genetic Analyser automata szekvenáló készülékkel végeztük. A szekvenciákat összevetettük egymással valamint a megfelelő konszenzus szekvenciákkal.

Az expressziós vizsgálatokat ABI 7000 típusú real-time PCR készülék segítségével végeztük (Applied Biosystems, 2xSYBR Green PCR Master Mix, 94°C 10 min 1x; 95°C 12 s., 60°C 1 min. 40x). Belső kontroll génként GAPDH és β -aktin gént használtunk. Az eredmények matematikai feldolgozását Pfaffl módszere szerint, belső kontroll génnel kiegyenlített, efficiencia korrekcióval módosított relatív kvantifikációval végeztük (Pfaffl, 2001, Pfaffl és mtsai, 2002).

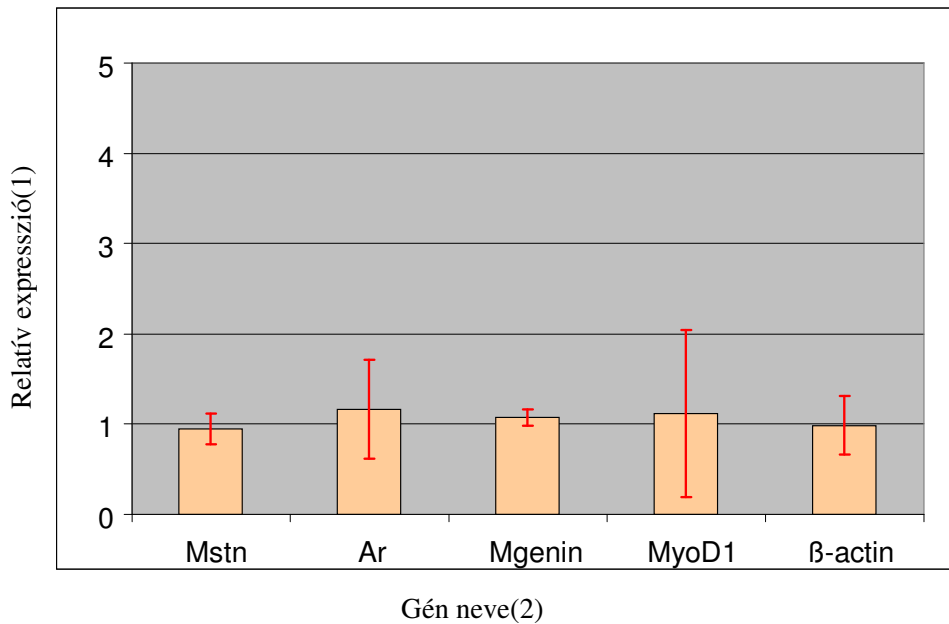


Eredmények és értékelés

A Compact fenotípus kialakulásához elengedhetetlen miosztatin gén szekvencia analízise során megállapítottuk, hogy a három exonból és két intronból álló génben a már ismert, a 2. exonban található 12 bázispáros delécióon kívül nincs eltérés a vizsgált szekvenciák között. A miogenin gén szekvenciájában, mely szintén három exonból és két intronból áll, a promóter régióban valamint az 1. exonban egy, a 2. exonban pedig két egy bázispáros szubsztitúciót azonosítottunk a Comp9 szekvenciában. A MyoD1-et három exon és két intron kódolja. A gén teljes szekvenciáját megvizsgálva a Comp9 szekvencia promóter régiójában egy bázispáros deléciót, míg a 2. exonban egy-egy bázispáros inszerciót találtunk a konszenzus szekvencához és a CAST/Ei szekvenciához képest. A két exonból és egy intronból álló WFIKKNRP2 szekvenciájának vizsgálata során a 2. exonban négy egy bázispáros szubsztitúciót detektáltunk a Compact törzs szekvenciájában.

Az androgén receptor gén vizsgálata során – mivel a gén nyolc exonból és hét intronból áll – csak az exonok szekvenciáját vizsgáltuk részletesen. Megállapítottuk, hogy a gén kódoló régiójában nincs eltérés a vizsgált törzsek és a konszenzus szekvencia között. A miogenin, a MyoD1 és a WFIKKNRP2 génszekvenciákban azonosított egybázispáros eltérések közül azonban egyik sem vezet funkcionális aminosavcserehez, azaz a vizsgált gének közül egyik sem tartalmaz a funkciót befolyásoló mutációt. Az expressziós vizsgálatok során eddig a miogenin, a MyoD1, az androgén receptor, valamint a miosztatin gén expresszióját vizsgáltuk, a WFIKKNRP2 vizsgálata még folyamatban van.

Az eredmények alapján nincs jelentős expressziós eltérés a vizsgált gének között (1. ábra), mivel egyik gén esetében sem tapasztaltunk kétszeres vagy annál nagyobb expressziós különbséget a mutációt hordozó Comp9 és a „vad” típusú Cast/Ei törzs összehasonlítása során. Arra következtetünk, hogy minden valószínűség szerint az eddig vizsgált gének nem az általunk keresett modifikátor gének.



1. ábra: A gének (Mstn-miosztatin, Ar-androgén receptor, Mgenin-miogenin) relatív expressziós szintje a mutációt hordozó Comp9 törzsből a „vad” típusú, Cast/Ei törzsből mért génexpresszióhoz és a GAPDH (belső kontroll gén) expressziójához viszonyítva

Figure 1. Relative expression levels (Mstn-myostatin, Ar-androgen receptor, Mgenin-myogenin) of the genes in the mutant Comp9 strain compared to that of the “wild-type” Cast/Ei strain and to the expression of GAPDH (endogenous control gene)

Relative expression(1), name of the gene(2)

Következtetések és javaslatok

Eddigi vizsgálataink során nem találtunk a Compact fenotípus kialakításáért felelős modifikátor gént.

A pozicionálisan esélyes gén megközelítés alapján a továbbiakban tervezzük még más, az izomfejlődésben szerepet játszó gének vizsgálatát. Ezen kívül a vizsgált két törzsből kialakított speciális, többgenerációs keresztezési eljárással (AIL, Advanced Intercross Lines) létrehozunk egy 11 generációs keresztezést (Pinke és mtsai, 2008). A 11. generáción genetikai térképezéssel beszűkítjük a korábban azonosított modifikátor intervallumokat. Az eredmények alapján további részletes szekvencia és expressziós vizsgálatokat tervezünk.



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.
- Dong, Kun Lee (2002): Androgen receptor enhances myogenin expression and accelerates differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 294. 408-413.
- Edmondson, D.G., Olson, E.N. (1993): Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J. Biol. Chem.*, 268. 755-758.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R. (2003): Myostatin inhibits differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.*, 277. 49831-49840.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J. (1997): Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, 387. 83-90.
- 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 tenyésztéseI. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok konferencia, április 11-12., Gödöllő.
- Szabó, G., 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. *Mamm. Genome*, 9. 671-672.
- Tapscott, S.J., Weintraub, H. (1991): MyoD and the regulation of myogenesis by helix-loop-helix proteins. *J. Clin. Invest.*, 87. 4, 1133-1138.
- Varga, L., Müller, G., Szabó, Gy., Pinke, O., Korom, E., Kovács, B., Patthy, L., Soller, M. (2003): Mapping modifiers affecting muscularity of the myostatin mutant (Mstn^{Cmpt-d11Abc}) compact mouse. *Genetics*, 165. 257-267.
- Varga, L., Pinke, O., Müller, G., Kovács, B., Korom, E., Szabó, Gy., Soller, M. (2005): Mapping a syntetic modifier on mouse chromosome 1 influencing the expressivity of the compact phenotype in the myostatin mutant (Mstn^{Cmpt-d11Abc}) compact mouse. *Genetics*, 169. 489-493.



Varga, L., Szabó, Gy., Darvasi, A., Müller, G., Sass, M., Soller, M. (1997): Inheritance and mapping of the compact (Cmpt), a new mutation causing hypermuscularity in mice. *Genetics*, 147. 755-764.