

# Animal welfare, etológia és tartástechnológia



## Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 9

Issue 3

Különszám/Special Issue

Gödöllő  
2013



## SZARVASMARHA RCAN2 GÉN SZABÁLYOZÓ RÉGIÓJÁBAN TALÁLHATÓ SNP VIZSGÁLATA TRANZSGÉNIKUS EGÉRMODELLBEN

*Skoda Gabriella<sup>1</sup>, Kerekes Andrea<sup>1</sup>, Hoffmann Orsolya Ivett<sup>1</sup>, Barta Endre<sup>2</sup>,  
Dominique Rocha<sup>3</sup>, Véronique Lejard<sup>3</sup>, Hiripi László<sup>1</sup>, Bősze Zsuzsanna<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Állatbiotechnológiai Intézet  
2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

<sup>2</sup> Debreceni Egyetem, 4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

<sup>3</sup> Génétique Animal et Biologie Integrative (GABI) INRA UMR1313, Franciaország  
[skoda@abc.hu](mailto:skoda@abc.hu)

### Összefoglalás

A szarvasmarha gazdaságilag fontos tulajdonságaiban szerepet játszó gének szabályozó régióinak egy pontos nukleotid-polimorfizmus (rSNP) - vizsgálatát végeztük el transzgenikus egérmodellben egy nemzetközi együttműködés keretében.

A bioinformatikai munkákat követő genotípus/génexpresszió asszociációs vizsgálatok eredményei alapján olyan rSNP-eket választottak ki az együttműködő partnerek a szarvasmarha több ezer szabályozó régióiban lévő egy pontos nukleotid-polimorfizmusai közül, amelyek valószínűleg befolyásolják a hozzájuk tartozó gén kifejeződését. A kiválasztott 13 pár promóterben található SNP különböző módon történő tesztelése után, a markergénekkel (AcGFP, DsRed) ellátott vektor plazmid konstrukciókat egérmodellben teszteltük validálás céljából. A megérkezett plazmidok lineáris DNS-ének egér embrióba juttatásával kívántunk transzgenikus állat modelleket létrehozni. Az egyik vizsgált gén az RCAN2 (regulator of calcineurin) volt, mely elsősorban az agyban, szívben és vázizomban kifejeződő proteint kódol. Az átíródo fehérje a calcineurin szabályozásában játszik szerepet, mellyel calcineurinra érzékeny gének transzkripció faktorának kötődését befolyásolja. A táplálék bevitelt és testsúlyt kontrollálja, ezáltal szerepe van az életkor és diéta indukált elhízásban, tehát gazdasági szempontból fontos tulajdonság szabályozásáért felelős. A projekt részeként szarvasmarha RCAN2 génjének promóterében előforduló két különböző SNP-t tartalmazó plazmidokkal létrehoztunk két transzgenikus egér vonalat (30 és 30M). Az eddig megszülető utódok genotipizálása során 3-3 transzgenikus egyedet azonosítottunk, melyek feldolgozása során qPCR segítségével hasonlítottuk össze a két vonal fluorescens markereinek expressziós szintjét, amely a vártnak megfelelő eredményt hozott. Ezzel alátámasztottuk az RCAN2 gén két rSNP-je által produkált expressziós különbség meglétét *in vivo* körülmények között.

Tehát az SNP-függő génexpresszió ismerete és a kifejlesztett módszerek alkalmazása megkönnyítheti a gazdasági szempontból előnyös tulajdonságokkal rendelkező haszonállatok tenyésztési eljárásainak korszerűsítését.

**Kulcsszavak:** szarvasmarha, rSNP, regulomix, RCAN2, kalcipresszin2, takarmány felvétel szabályozás



## Examination of a regulatory SNP of bovine RCAN2 gene in transgenic mouse model

### Abstract

We examined numerous regulatory single-nucleotide-polymorphisms (rSNP) of bovine genes with economically important traits in transgenic mouse models.

After bioinformatical studies and association surveys of genotypes/gene expressions, several rSNP-s were selected by our colleagues, which probably can regulate linked gene expression. These selected rSNP pairs (13 pair) were tested with different methods, finally we validated the vector plasmid constructions containing two marker genes (AcGFP, DsRed) in mouse model. We produced transgenic animal models through embryo microinjection with linearised plasmid DNAs. One of the examined genes in cattle was RCAN2 (regulator of calcineurin), which is particularly expresses in brain, heart and skeletal muscle. The RCAN2 protein has important role in the calcineurin regulation. This protein has influence to the attachment of transcription factors in the promoter region of calcineurin sensible genes. RCAN2 protein controls the food intake and body weight, hereby it plays an important role in age- and diet-induced obesity. Thus, it can be responsible for the regulation of economically relevant traits.

We created two transgenic mouse lines (30 and 30M) with two alleles of RCAN2 promoter different only in the rSNP studied. After genotyping progenies, we could identify 3-3 transgenic offspring. We compared the expression level of marker genes by qPCR, and we confirmed that there is an expression difference between the examined alleles *in vivo*. Consequently, the study of SNP-dependent gene expression can be relevant in animal breeding.

**Keywords:** bovine, rSNP, regulomix, RCAN2, calcipressin2, regulation of food intake

### Bevezetés

A szarvasmarha szabályozó polimorfizmusainak vizsgálatát egy francia-magyar együttműködés keretében végeztük el az elmúlt évben (Reglomix projekt). Célunk volt egy nagyléptékű regulációs egy pontos nukleotid-polimorfizmus (rSNP) vizsgálat megvalósítása szarvasmarhában, ami fontos lépésnek tekinthető a szarvasmarha genom funkcionális annotációja felé.

Az egy pontos nukleotid-polimorfizmusok olyan DNS szakasz variációk, amelyek csak egy nukleotidban különböznek egymástól. Megkülönböztetünk ún. kapcsolt SNP-ket, melyek a géneken kívül helyezkednek el, ill. a géneken belül található SNP-ket. A kapcsolt polimorfizmusok nincsenek hatással a képződő fehérjék mennyiségére és minőségére, míg a géneken belül található polimorfizmusok befolyásolhatják a termelődő fehérje mennyiségét (nem kódoló SNP, a szabályozó régiókban), és megváltoztathatják a keletkező fehérjék aminosav sorrendjét (kódoló SNP, a szabályozó régióiban).

Vizsgálatunk tárgya: a promóter régiókban található konzervált polimorfizmusok, ezen belül is a transzkripció faktor kötőhelyekhez kapcsolódó SNP-k hatásának tesztelése. Ezek a DNS szekvencia változatok a transzkripció-faktor és transzkripció-faktor kötőhely interakciójának befolyásolásán keresztül lehetnek hatással a képződő fehérjék mennyiségére, illetve a transzkripció mértékére.

Az átfogó nemzetközi program első lépéseként bioinformatikai elemzéseknek vetették alá a kollégák (Barta és mtsai.) a publikus adatbázisokban elérhető, illetve a francia partnerek szekvenálási adataiból nyert szarvasmarha genomszekvenciákat. Ennek eredményeként több mint



6 millió SNP-t azonosítottak a szarvasmarha genomban. (A publikus adatbázisokban (dbSNP) ma kb. 22 millió szarvasmarha SNP-t találhatunk.) Ezen belül megközelítőleg 2800 szabályozó polimorfizmust fedeztek fel. Azt állapították meg, hogy ezek többsége a transzkripció starthelyek közelében helyezkedik el. Egy másik érdekes megfigyelésük, hogy sokszor az reguláló SNP-kben megtalálható variációk megtalálhatóak ugyanebben a pozícióban más fajok ortológ szekvenciáiban is. Ez vagy azt jelenti, hogy más fajokban is SNP van ugyanebben a pozícióban, vagy azt hogy a különböző fajoknál különböző allélok fixálódtak.

A kiszűrt szabályozó polimorfizmusokat a francia csoportok vizsgálták tovább, melynek során elvégezték SNP-k genotipizálását 5 különböző francia szarvasmarha fajta egyedének felhasználásával (kb. 480 egyed). Ezután rSNP genotípus-fenotípus asszociációs vizsgálatokat, illetve genotípus-génexpresszió korrelációs teszteket végeztek. Ezek alapján kiválogatták azokat a szabályozó polimorfizmusokat, melyeknek feltételezhetően valamilyen hatása van a hozzájuk kapcsolódó gének expressziójára. Az így kiszűrt gének reguláló polimorfizmusainak szabályozását tovább vizsgálták *in vitro* sejtenyészetekben. Az SNP-ket tartalmazó promotereket vektor plazmidba építették egy markergén (GFP) elé. A plazmid konstrukció ezen kívül még egy viszonyítási alapként szolgáló CNV promotérral meghajtott dsRed jelzőfehérje gént is tartalmazott. Azokat a plazmidokat, amelyek esetében a sejtekben megfigyeltek GFP expressziós különbségeket, (13 gén két különböző polimorfizmusa esetén találtak különbséget a génexpresszióban) csoportunk tovább vizsgálta *in vivo* körülmények között egérben. A 13 pár SNP-ből csak az érdekesnek tűnő polimorfizmus párokat kaptuk meg, melyekről *in vivo* körülmények között is kívántuk bizonyítani, hogy ténylegesen hatással vannak a fehérjék keletkezésére.

## Irodalmi áttekintés

Az egyik vizsgált szabályozó polimorfizmus, amiről feltételezték, hogy ténylegesen hatással lehet a fehérjetermelésre, az egyik kalcipresszin gén promotérében található. Az kalcipresszin fehérjecsald tagjai képesek megkötni és gátolni a calcineurint, ezáltal befolyásolni egy olyan transzkripció faktor (NFAT) magi áthelyeződését, ami a calcineurinhoz kapcsolt gének kifejeződésében játszik szerepet. Ilyen calcineurin szignál által befolyásolt folyamatok: T-sejt aktiváció, szinaptikus plaszticitás, neuronok apoptózisa és fejlődése, hipertrófia, génszabályozás a váz és szívizomban (*Rothermel és mtsai, 2003*).

Az általunk vizsgált kalcipresszint Miyazaki és munkatársai mutatták ki 1996-ban humán bőr fibroblaszt sejtekből (mint thiroid hormon által indukált transzkriptumot) (*Miyazaki és mtsai, 1996*). A génről 2 splicing variáns íródik át, melyek közül az egyik jelentős mértékben az agyban expresszálódik, míg másiktól kimutatták, hogy az központi idegrendszeren kívül a szív-, vázizomban is kifejeződik .

Fontos szerepe van az életkor és diéta indukált elhízásban, egy leptin útvonaltól független mechanizmusként működik a hipotalamuszban. A táplálék bevitelt és a testsúlyt kontrollálja, ezáltal szabályozza az energia egyensúlyt (*Sun és mtsai, 2011*). Megállapítható a szarvasmarhánál gazdaságilag fontos tulajdonság befolyásolásáért felelős génekben is kimutatható egy feltételezett SNP hatás.

## Anyag és módszer

Laboratóriumunkban a francia csoporttól kapott plazmid konstrukciókat alkalmaztuk transzgenikus egerek előállításához, melyek felépítése az 1. ábrán látható.

Egysejtes FVB/n eger embriók előmágjába injektáltuk a linearizált plazmid DNS-eket, majd a mikroinjektálást túlélő embriókat álvemhes nőtények petevezetőjébe ültettük vissza még egysejtes állapotban.

1. ábra. A beültetett plazmid konstrukció térképe

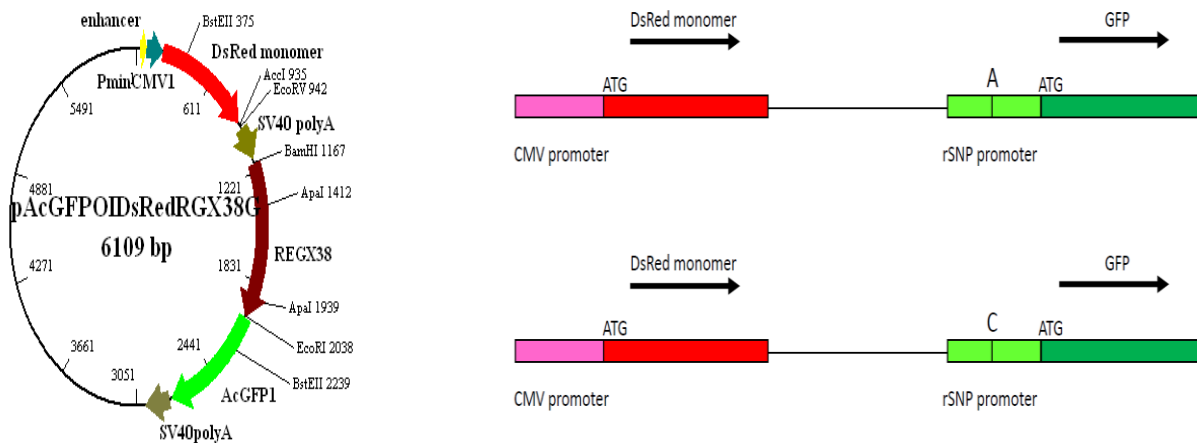


Figure 1. The map of the transfected plasmid construction

A megszülető utódok közül PCR segítségével válogattuk ki a transzgenikus egyedeket, majd a GFP expressziót mRNS szinten kvantitatív PCR alkalmazásával detektáltuk és hasonlítottuk össze a két SNP-t tartalmazó eger vonal között.

A rendszer beállításához egy olyan gén szabályozó régióját választottuk, amiről már irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy az itt található polimorfizmusok hatással vannak a génexpresszióra. Ez a prion protein (PrnP) gén volt (Nakamura és mtsai, 2007). Sikerült elsőként bebizonyítanunk, hogy tényleg van különbség két szabályozó polimorfizmus génkifejeződésre gyakorolt hatásában *in vivo* körülmények között.

Így megkezdhattuk a kísérleteket a számunkra fontos gének reguláló SNP-it tartalmazó vektorokkal. Az 1. táblázatban található azok a gének, melyeknek promóterének szabályozását vizsgáltuk a GFP expresszió keresztül egérben:



**1. táblázat. Projekt kódok és a hozzá tartozó fehérjék típusai, melyek expresszióját szabályozó polimorfizmusait vizsgáltuk egér modellben**

Regulomix kód <sup>8</sup>	Fehérje típus <sup>9</sup>
Rgx 8	Efrin receptor <sup>1</sup>
Rgx 29	Mikrotubulushoz kapcsolt protein <sup>2</sup>
Rgx 30	Kalcipresszin <sup>3</sup>
Rgx 33	Kopin <sup>4</sup>
Rgx 38	Lizoszómához kapcsolt transzmembrán fehérje <sup>5</sup>
Rgx 42	Tenascin <sup>6</sup>
PRNP	Prion fehérje <sup>7</sup>

Table 1. Project codes and the studied rSNP-s affected different types of proteins in transgenic mice.

<sup>1</sup>Ephrin receptor, <sup>2</sup>Microtubulus associated protein, <sup>3</sup>Calcipressin, <sup>4</sup>Copine, <sup>5</sup>Lysosome-associated protein transmembrane, <sup>6</sup> Tenascin, <sup>7</sup> Prion protein, <sup>8</sup> Code in regulomix project, <sup>9</sup>Type of proteins

## Eredmények

Az anyag és módszer fejezetben leírtak alapján eddig 10 transzgénikus egérvonalat sikerült létrehozunk, melyek a fent látható gének promótereit tartalmazták. Az 2. táblázat az egerekkel kapcsolatos munkák eredményeit szemlélteti.

**2. táblázat. Az egér transzgenezis eredményei**

Gének <sup>1</sup>	Kimosott embriók száma <sup>2</sup>	Injektált/beültetett embriók száma <sup>3</sup>	Megszületett utódok száma <sup>4</sup>	Transzgénikus utódok száma <sup>5</sup>
PRNP	621	436	174 (39,9%)	7 (4%)
RCAN2	328	277	84 (30,3%)	4 (4,7%)
TNR	297	236	59 (25%)	6 (10%)
MAPRE2	184	127	21 (16%)	0
EPHA4	347	287	75 (26%)	9 (12%)
CPNE6	722	327	25 (12%)	0
LAPTM4A	241	210	43 (20%)	4 (9%)
Összesen:	2740	1900	481 (25%)	30 (6,2%)

Talbe 2. The results of mouse transgenesis

<sup>1</sup> Genes, <sup>2</sup>Number of embryos, <sup>3</sup>Number of injected/transfected embryos, <sup>4</sup>Number of borned, embryos, <sup>5</sup>Number of transgenic offspring



A legtöbb plazmid mikroinjektálásával sikerült létrehozni alapító egyedeket, amelyekből vonalat tudtunk előállítani. A transzgenikus utódok egy részét feldolgoztuk, és a belőlük nyert RNS mintákat qPCR segítségével hasonlítottuk össze. A legnagyobb eltérést az calcipresszin gén esetében találtuk, ahol egyrészt sikerült kimutatnunk májban és lépben is a GFP kifejeződést. Ezekben az esetekben is jelentős (kb. 8-szoros) expressziós különbségeket tudtunk detektálni (2. ábra). Tehát ezzel alátámasztottuk *in vivo* körülmények között a sejtenyészetekben tapasztalt expressziós különbségeket az rgx 30 esetében.

## 2. ábra: Calcipresszin promóter által meghajtott GFP expresszió különbség májban

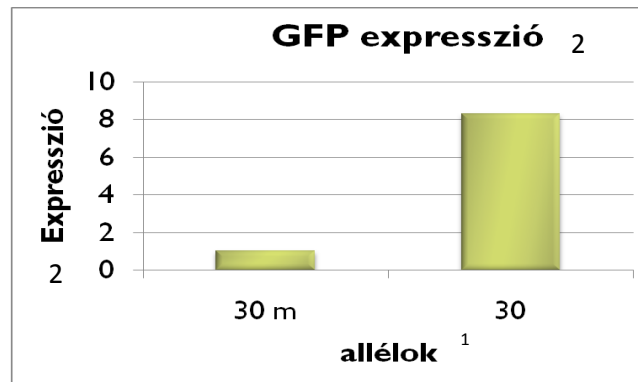


Figure 2: GFP expression's difference in liver. The GFP promoter contains the examined calcipressin SNP-s.

(1): allele (2): expression

## Összefoglalás

A calcipresszin promótere által szabályozott génexpressziót sikerült kimutatnunk máj és lép szövetekben is, emellett bebizonyítottuk egér modellben, hogy jelentős különbség van a különböző SNP-eket tartalmazó szarvasmarha calcipresszin promóter régiók szabályozása között.

Bizonyítottuk, hogy az általunk kifejlesztett módszer alkalmas a szarvasmarha gazdaságilag fontos géneinek kifejeződését befolyásoló szabályozó elemek azonosítására.

A projekt eredményei alapján beláthatjuk, hogy érdemes ezen módszerekkel (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*) új markereket keresni a szarvasmarha-tenyésztésben. A rendszer további vizsgálatok alapjául szolgálhat, hiszen olyan genotípus-fenotípus kapcsolatokra világított rá, amiket eddig nem is feltételeztünk.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni a francia csoportoknak a rengeteg munkáért és energiáért, ami a projekt kivitelezéséhez elengedhetetlen volt. Szeretném megköszönni főnökeimnek, Dr. Bösze Zsuzsannának és Dr. Hiripi Lászlónak, hogy lehetővé tették, hogy részt vehessek a transzgenikus egerekkel történő munkákban, illetve szeretném megköszönni az anyagi támogatást a *Regulomix OMFV- 00312, 0013/2010* kutatási pályázatnak.



## Irodalomjegyzék

- Miyazaki T, Kanou Y, Murata Y, Ohmori S., Niwa T., Maeda K., Yamamura H., Seo H. (1996):* Molecular cloning of a novel thyroid hormone-responsive gene, ZAKI-4, in human skin fibroblasts. *J Biol Chem*, 271.14567–14571
- Nakamura I., Xue G., Sakudo A., Saeki K., Matsumoto Y., Ikuta K., Onodera T. (2007):* Novel single nucleotide polymorphisms in the specific protein 1 binding site of the bovine PRNP promoter in Japanese Black cattle: impairment of its promoter activity. *Intervirology*, 50. 3. 190-196
- Rothermel B.A., Vega R.B., Williams R.S. (2003):* The Role of Modulatory Calcineurin-Interacting Proteins in Calcineurin Signaling. *TCM*, 13.1. 15-21
- Sun X-Y., Hayashi Y., Xu S., Kanou Y., Tang Y-p., Murata Y. (2011):* Inactivation of the Rcan2 Gene in Mice Ameliorates the Age- and Diet-Induced Obesity by Causing a Reduction in Food Intake. *PLoS ONE*, 6. 1. e14605