

AZ X KROMOSZÓMÁN ELHELYEZKEDŐ, HIPERIZMOLTSÁGRA HATÓ GÉNEK AZONOSÍTÁSA

a T043409 nyilvántartási számú, OTKA pályázat zárójelentése

A témavezető neve: Dr. Varga László

A kutatás időszaka: 2003-2006

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont 2007.

1 Bevezetés

A Compact egér hiperizmoltságát alapvetően egy, a miosztatin (Mstn) génben bekövetkezett 12 bázispáros deléció ($Mstn^{Cmpt-d11Abc}$) eredményezi (Varga és mtsai. 1997; Szabó és mtsai. 1998), de az izmoltság mértékét további modifikátor gének is jelentősen befolyásolják. Csoportunk több olyan kromoszómarégiót is feltérképezett a 3, 5, 7, 11, 16 és X kromoszómákon (Varga és mtsai. 2003), melyek feltehetőleg hordoznak modifikátor géneket. E régiók közül a legerősebb hatást az X kromoszómán tapasztaltuk. E pályázatunkban azt a célt tűztük magunk elé, hogy az X kromoszómán a lehető legpontosabban térképezzük fel a feltételezett modifikátor gén(ek)e)t.

A jelen OTKA pályázat eredménye három jól körülhatárolható részre tagolható (2.1, 2.2, 2.3):

Az X kromoszóma (ChrX) térképezése F2-n:

A kutatást a szerződésben leírtaknak megfelelően végeztük a Cross-4 F2 populáción. Összesen 189 F2 utódot 9 mikorszatellit markerre vizsgáltunk. E feladat végrehajtása közben jól kirajzolódott, hogy az X kromoszóma térképezésében a modifikátor hatást tükröző görbe változatlanul a kromoszóma egész hosszában magas értékeket mutat, miközben a kromoszóma közepén éri el a csúcspontját. Ezt okozhatja az a jelenség is, hogy két, egymással szomszédos, nagyhatású modifikátor gén foglal helyet ezen a kromoszómán, de az F2 nem képes ezeknek a szétválasztására, s a valós hatások felderítése helyett a görbe csúcsa a két hatás eredőjére mutat (ghost QTL), ahol valójában nincs semmilyen hatás. Ezért egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy hiába fogunk több és több markert bevinni az F2 térképezésbe, a magas egyedszám mellett sem leszünk képesek a feltételezett modifikátor gének azonosítására, ha nem egy, hanem két-, vagy több, erős modifikátor gén helyezkedik el egymás mellett a ChrX-en. Ezért egy új, előre nem tervezett, jelentős anyagi- és munka ráfordítást igénylő feladatnak: a 3. rész megvalósításának láttunk neki.

Az 1. kromoszóma (Chr1) térképezése F2-n: Miközben a 3. feladathoz szükséges, hosszabb időt igénybe vevő AIL keresztezés végrehajtását elkezdtük, s a ChrX-en e keresztezés elkészültéig amúgy sem tudtunk e téren előrehaladást elérni, kitaláltunk egy új térképezési koncepciót a Chr1-re, amelynek a térképezése ugyan nem szerepelt a tervezett kísérletek között, de ötlet mégis annyira ígéretesnek tűnt, hogy belevágtunk a megvalósításába. Ezt sikeresen is megoldottuk, s egy cikket tudtunk ebből az anyagból készíteni (Varga és mtsai. 2005).

Az X kromoszóma (ChrX) térképezése a Compact-AIL-K F11-en: Ahhoz, hogy a feltételezett modifikátorokat pontosan fel tudjuk térképezni, még a kísérletes munkák korai fázisában belevágtunk egy, az F2 populációból kiinduló többgenerációs térképezési populáció: egy AIL (Advanced Intercross Lines) kialakításába. Ilyen populációból csupán néhány létezik a világon, mert egyrészt új az ötlet, másrészt rendkívül sok munkát és időt igényel az előállítás

s erre kevesen vállalkoztak még, viszont a térképezési ereje kimagasló, s mi ezért döntöttünk a Compact-AIL megvalósítása mellett. Azonos térközökkel pozícionált keret-markerekkel elvégeztük a ChrX térképezést és beigazolódott a feltételezésünk, hogy legalább két nagyhatású modifikátor gén helyezkedik el szomszédosan ezen kromoszómán.

A vizsgálatok tehát még folyamatban vannak, az eredményeket később feltétlenül tudjuk majd publikálni remélhetőleg a korábbi munkáinknak megfelelő színvonalú nemzetközi folyóiratban.

1.1 ChrX térképezés F2-n

Az X kromoszómán korábban összesen 6 mikroszatellit vizsgáltunk 78 olyan egyeden, amelyek a $Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ delécióra homozigóta mutánsok voltak. A 2003-ban elvégzendő feladat az volt, hogy emeljük a térképezésbe vont, $Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ delécióra homozigóta mutánsok számát és a korábban vizsgált mikroszatellitre genotipizáljuk ezeket. Ezzel a lépéssel szándékoztunk pontosítani a legerősebb modifikátor hatást mutató intervallumokat. Kutatási stratégiánk a szelektív genotípus meghatározáson alapult. Az előbbi fogalom azt takarja, hogy nem a teljes populációt, hanem csak a két szélsőségét vizsgáljuk. Esetünkben ez azt jelentette, hogy az $Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ deléciót homozigótán hordozó egyedek ($Mstn^{Cmpt-dl1Abc}/Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ = „K” genotípus) közül az egyik oldalról a normál izomzatú (M1K=normál izomzatú hímek, F1K=normál izomzatú nőtények) a másiktól és hiperizmolt kategóriákat vizsgáljuk (M5K= erőteljesen izmolt hímek, F4K=erőteljesen izmolt nőtények). A keresztezésből folyamatosan keletkeztek az utódok, s amikor a genotipizálás számára összegyűlt egy egyben kezelhető blokk, akkor azt az összes kijelölt markerre egyszerre genotipizáltuk. Eredetileg a 78 egyed számú FIN1 blokk került genotipizálásra, amelyet aztán kiegészítettünk a FIN2 (60 egyed) és FIN3 (51 egyed) blokkokkal. Így, az összességében 189 egyed számú FIN1-2-3 a Cross4 keresztezés teljes F2 nemzedéknek már 7.2%-át tette ki.

A markerek számának növeléséhez igyekeztünk olyan mikroszatelliteket választani amelyeknek fizikai pozíciója megtalálható volt az Ensembl adatbázisban. Ugyanakkor 3 korábban használt markert átcseréltünk az adott genetikai pozíció környékén más markerekre részben a fizikai pozíció hiánya miatt, részben egyéb technikai okokból (a DXMit120-at a DXMit94-re, a DXMit63-at a DXMit40-re és a DXMit116-ot a DXMit970-re). E cserékkel, valamint az újonnan vizsgált mikroszatellitekkel együtt a következő 9 mikroszatellit vizsgáltuk: DXMit56 (5.7 cM / 14.082 Mbp), DXMit105 (14.5cM / 35.608 Mbp), DXMit126 (19.1 cM / 43.299 Mbp), DXMit94 (28.4 cM / 55.256 Mbp), DXMit128 (34.7cM / 76.1 Mbp), DXMit40 (41.0 cM / 86.989 Mbp), DXMit116 (49.5 cM / 96.75 Mbp), DXMit130 (55.0 cM / 113.149 Mbp) és DXMit99 (65.7 cM / 136.816 Mbp). A genetikai és fizikai pozíciók eloszlásából látszik, hogy igyekeztünk a mikroszatelliteket viszonylag egyenes térközökkel kiválasztani. Ez a 9 marker egy igen kiterjedt 60 cM hosszú régiót határoz meg.

Az így kapott genotípus értékeket először összevetettük az elméletileg várt genotípus arányokkal és Chi2 próbával vizsgáltuk azt, hogy ezek szignifikáns mértékben eltérnek egymástól - jelezve a kapcsoltságot -, avagy sem. Ezt követően az adatokat egy speciális géntérképezésre kidolgozott szoftver (Map Manager QTX) segítségével dolgoztuk fel. Mind a Chi2, mind a Map Manager QTX alkalmazásával végzett feldolgozásnál részben ivar szerint különválasztva, részben az összes kiválasztott F2 egyedet együttesen vizsgálva is elvégeztük a számításokat. A kapcsoltság mértékét az ún. LOD score értékkel fejeztük ki. A permutációs teszt eredmények alapján adtuk meg a LOD score értékek szignifikancia szintjeit. Az "esetleges" (suggestive) szintet LOD = 2.8-nál, míg a szignifikánsat LOD = 4.3-nál kaptuk meg. A hímeket és a nőtényeket külön-külön vizsgáltuk. Noha a nőtények eredménye végig

alacsony volt a régió hosszában, ez különösebb jelentőséggel nem bír, hiszen a nőstények egyik X kromoszómáját random érintő kromoszóma ínaktiváció nehezen teszi értelmezhetővé az eredményeket. Ezzel szemben a hímek csupán egy X kromoszómával rendelkeznek, s ez a térképezést egyértelművé teszi. A hímek egy 43 cM hosszú régió keresztül végig a szignifikáns feletti LOD score (4.3) értéket mutatnak. Ennek az elnyúló görbének van egy 12.6 cM hosszú kiugró csúcsa a DXMit94 (28.4 cM / 55.256 Mbp) és DXMit40 (41.0 cM / 86.989 Mbp) markerek között. A görbe a legmagasabb - LOD = 7.52 - értéket a DXMit128-nál (34.7cM / 76.1 Mbp) éri el, mely érték egy igen erős kapcsoltságra utal.

A LOD score görbe ilyen jellegű lefutást azonban okozhatja az is, hogy két, egymással szomszédos, nagyhatású modifikátor gén foglal helyet ezen a kromoszómán, de az F2 nem képes ezeknek a szétválasztására, s a valós hatások felderítése helyett a görbe csúcsa két hatás eredőjére mutat (ghost QTL), ahol valójában nincs is semmilyen hatás. Ezért egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy hiába fogunk több és több markert bevonni az F2 térképezésbe, a magas F2 egyedszám mellett sem leszünk képesek a feltételezett modifikátor gének azonosítására, ha nem egy, hanem két-, vagy több, erős modifikátor gén helyezkedik el egymás mellett a ChrX-en. Ezért egy új, előre nem tervezett, jelentős anyagi- és munka ráfordítást igénylő feladatnak: a 2.3 rész megvalósításának láttunk neki.

1.2 Chr1 térképezés F2-n

Miközben a 2.3 feladathoz szükséges, több évet igénybe vevő AIL keresztezés végrehajtását megkezdtük, s a ChrX-en e keresztezés elkészültéig amúgy sem tudtunk előrehaladást elérni, némileg eltérve a tervezett kutatási iránytól, belevágtunk egy korábban kitalált ígéretesnek tűnő, új térképezési koncepció megvalósításába a Chr1-en.

Ebben a munkánkban kísérletet tettünk az 1. kromoszómán feltételezett modifikátor régió feltérképezésére, amely eleinte megoldhatatlan térképezési feladatnak tűnt. Az alábbiakban ismertetett ötlettel és ennek megvalósításával nem csak feltérképeztük az 1. kromoszómán a modifikátor intervallumot, de megteremtettünk egy új teóriát is az ilyen típusú genetikai problémák általános megoldására. A témából írt, a Genetics folyóiratban leközölt cikk bírálói is elfogadták megközelítésünket új elméletként (Varga és mtsai. 2005).

A modifikátorok térképezésénél különleges figyelmet igényel az a kromoszóma, ahová az a főgén térképeződik, amelyen keresztül a modifikátorok kifejtik a hatásukat a fenotípusra. Ez kevésbé jelent gondot abban a legáltalánosabban előforduló esetben, amikor a modifikátorok a "background" genotípusból származnak. Azokban a ritkább esetekben viszont, amikor a feltérképezendő modifikátor is a főgént hordozó genotípusból származik, kérdéses lehet, hogy feltérképezhető-e egy szintenikus (azonos kromoszómán elhelyezkedő) modifikátor. Ennek az az oka, hogy a modifikátorok hatása általában legtisztábban a major gén homozigóta státuszában vizsgálható, s így kialakított térképezési szubpopulációban ennek következtében minden egyed az adott kromoszómán a főgén pozíciójában 100%-ban mutáns homozigóta. Ez az erőteljes hatás lehetetlenné teheti a modifikátorok detektálását. Emiatt ezt a kromoszómát rendszerint ki is hagyják a teljes genom térképezésből, ahogy mi is kihagytuk a Chr1-et a modifikátorokat kereső teljes genom térképezésből, amelyen az $Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ mutáció található

A vizsgálatokat ugyanannak a $Comp9 \times CAST/Ei$ keresztezésnek (Cross4) az F2, a miosztatin mutációra homozigóta $Mstn^{Cmpt-dl1Abc}/Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ = „K” genotípusú utódcsoportjain hajtottuk végre, amelyeket a korábbi teljes genom térképezés során használtunk. A kiválasztott négy kísérleti csoport (M1K=normál izomzatú hímek, M5K=erőteljesen izmolt hímek, F1K=normál izomzatú nőstények, F4K=erőteljesen izmolt nőstények) egyedeit az $Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ mutációval együtt összesen 9 markerre (D1Mit52, $Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$, D1Mit304,

D1Mit10, D1Mit309, D1Mit262, D1Mit33, D1Mit37, D1Mit154) vizsgáltuk a Chr1 hosszában. Ezek 14.1 cM - 21.7 Mbp átlagfedéssel takarják a Chr1-et az MGD cM, illetve az Ensembl Mbp értékek alapján és a legnagyobb intermarker távolság is 20 cM - 33 Mbp alatt volt. A négy kísérleti populációban az ezeken a markereken talált genotípus frekvenciákat viszonyítani kellett valamilyen várt értékhez. Ehhez kiváló kontroll populációnak kínálkoztak a Cross4 F2 populációjából azok az egyedek, amelyek az Mstn^{Cmpt-d1Abc} mutációra homzigóta vad „B” genotípusúak voltak (s emiatt nem is szerepeltek a korábbi modifikátor térképezésben). Ezeknél az egyedeknél a miosztatintól a kromoszómavégek felé haladva elméletileg semmilyen géninterakciós hatás nem befolyásolhatja a 100% B genotípus átalakulását a normál mendeli genotípus arányok irányába. A markerenkénti minél pontosabb kontroll genotípus frekvencia értékek megbízható megállapítása végett igyekeztünk minél nagyobb egyedszámokat vizsgálni. Összesen 608 (gyakorlatilag az összes) kontroll egyeden végeztünk genotipizálást, s ez a két ivarban a következőképpen oszlott el: M1B = 295, F1B = 313. E két csoportban a homozigóta mutáns (K) genotípus egyenletes csökkenésével arányban a heterozigóta (H) és B genotípusok aránya egyenletesen növekedett. A körülbelüli mendeli arányok az Mstn-től 84.3 cM (MGD) távolságra lévő D1Mit154-es markernél álltak be mind az M1B, mind az F1B csoport eloszlásban. Az M1B és F1B kontroll csoportok alapján ivaronként külön-külön határozzuk meg a kísérleti csoportoknál a várt értékeket, úgy, hogy kontroll B genotípus százalékos arányát a kísérleti csoport K genotípusánál, míg a kontroll K genotípus százalékos arányát a kísérleti csoport B genotípusának számításakor vettük figyelembe. A kontroll csoport H genotípusának százalékos arányát változatlanul a kísérleti csoport H genotípusának számításakor vettük figyelembe. Az így kapott várt értékeket ivaron belül Chi² próbával hasonlítottuk össze a négy kísérleti csoport (M1K, M5K, F1K, F4K) nyolc Chr1 markeren végzett genotípusos adataival. Az M5K csoportban volt a leglassabb a K genotípus átalakulása H és B típusokká és csak ennél az egyetlen csoportnál - az M5K-nál - kaptunk P<0.01-nél kisebb értékeket méghozzá három szomszédos markeren: a D1Mit262-nél (67 cM / 129.5 Mbp), D1Mit33-nál (81.6 cM / 159.0 Mbp) és a D1Mit37-nél (101 cM / 182.6 Mbp). Ugyanakkor a D1Mit262-től proximálisan 3.9 cM távolságra elhelyezkedő D1Mit309 (63.1 cM / 118.5 Mbp) is csak alig van e szignifikancia szint felett (P = 0.0012), s ez az a két marker, amelyek esetében az összesen 50 M5K egyedből mindkét markernél csak egyetlen B genotípus - ugyanaz az egyed - fordul elő és a többi genotípus K vagy H. Ezeknél az K genotípus ~2.5-szerese az H-nak, pedig az M1B és F1B csoportok alapján az H-nak közel egyenlőnek kellene lennie a K-val és a B-nek 10% körül kellene lennie. Az M5K-ban tapasztalt genotípus megoszlás elméletileg összhangban van egy a Compact genomból származó domináns modifikátor jelenlétével. A tőlük proximálisan távolabb lévő D1Mit33 (81.6 cM) és D1Mi37 (101 cM) markereknél ugyan még mindig szignifikánsak az eredmények, de a B genotípus már emelkedő mértékben van jelen (D1Mit33-nál 2; D1Mit37-nél 5) itt a szignifikancia főleg az H-kat még mindig túlszárnyaló K részarányból fakad. Így elmondható, hogy a legerősebb modifikátor hatás az M5K csoportban a D1Mit262 marker körül észlelhető. Feltétlenül említést érdemel, hogy a miogenin (72.3 cM / 134.6 Mbp) amelyről feltételezik, hogy a miosztatint cél génje, a D1Mit262-től disztálisan fizikailag 4 Mbp távolságra helyezkedik el. Ez a vizsgálat tehát a miogenint a pozíció alapján is lehetséges modifikátornak mutatja, noha ez a régió mindenképpen túl tág ahhoz, hogy egyértelmű következtetéseket vonhassunk le belőle, s még további vizsgálatok szükségesek ezen a téren.

1.3 A Compact-AIL-K F11 előállítás

Ahogy ezt a 1.1 részben kifejtettük, még a pályázat korai szakaszában elhatároztuk, hogy létrehozunk egy olyan speciális populációt, amely a Cross-4 F2 nemzedékéhez képest is

sokkal nagyobb erővel és pontossággal be tudja határolni a az X kromoszómás modifikátorokat körbefogó intervallumokat.

Az AIL (Advanced Intercross Lines) egy hagyományos intercross keresztezésből indul ki. Az egyik alapító beltenyésztett vonal hordozza a komplex fenotípusos tulajdonságot, a másik vonal egy ettől genetikailag minél távolabb álló beltenyésztett törzs. A keresztezés nem áll meg az F2 nemzedéknél, amelyen egyébként el lehet végezni a QTL durvafelbontású térképezését, hanem folytatódik további tenyész-generációkon keresztül - a szimulációs kísérletek eredményeinek megfelelően – az F8-F12 nemzedékekig. A rekombinációs események hatására a két alapító törzs kromoszómakészlete egyre kisebb és kisebb mozaik darabokra fragmentálódik az utódnemzedékek egyedeinek kromoszómáin belül. Ettől válik egyre pontosabbá a térképezés. Az F2 nemzedékből véletlenszerűen kell kiválasztani tenyészpárokat. Ebben az első lépésben egy tenyészpár alkot egy családot. Az AIL elrendezés elmélete szerint, a családok száma nem eshet a térképezési populációban 50 alá. Az egyes generációkból született utódokat félig-meddig véletlenszerűen (semi-random intercross) párosítjuk egymással. Ez annyit jelent, hogy elvileg random kellene kereszteznünk, de ugyanakkor figyelniünk kell a beltenyésztettség elkerülésére is. Az AIL tenyésztés végterméke tehát a térképezési-populáció, mely az azt megelőző tenyész-generáció felszaporításából keletkezik. Az addigi tenyész-nemzedék létszámával kapcsolatban csak annyi a követelmény, hogy az egyes családok biztonsággal fennmaradjanak. Azt a kromoszómáregiót, amelyben az adott QTL 95% biztonsággal benne van konfidencia intervallumnak (CI) nevezzük. Ez a 95% CI minden egyes AIL-generáció esetében $\sim t/2$ -vel lesz egyre szűkebb, ahol a t az AIL-generációk számát jelenti. Ez az összefüggés nagyjából a 6-8. generációkig áll fenn, majd azon túl, a nemzedékenkénti intervallum szűkülés inkább már lineáris lesz. Tekintve, hogy a módszert csak néhány évvel ezelőtt találták ki, továbbá, hogy egy AIL létrehozása és térképezése is tetemes időt vesz igénybe, még csak néhány közlemény születhetett eddig e módszer felhasználásával, viszont ezek mind a konfidencia intervallumok jelentős csökkenéséről számoltak be neves nemzetközi lapokban.

1.3.1 A Compact-AIL tenyész-generációk kialakítása

Ennek alapján indítottuk el a gyakorlatban a Compact AIL keresztezésünket. A Cross4 F2-ből véletlenszerűen kiválasztottunk 65 tenyészpárt. Ezeknek a pároknak egy betűjelet adtunk, amelyek a pár genomját jelképezte. Ezek után a következő generációkat úgy hoztuk létre hogy a beltenyésztés maximális elkerülését alkalmazva az „a” család hímjét a „b” család nőstényével kereszteztük. Az e párosításokból született utódok már „ab” jelűek, jelezve, hogy felvették már két alapító pár genomját. Ezt az elvet követve az a cél, hogy minden család a lehető legarányosabban vegye fel az összes alapító pár genomját. A tenyészpárok kiválasztásánál nem vettük figyelembe a Compact fenotípusos értéket. Arra törekedtünk, hogy, egy családban legalább két-két utódot nyerjünk ivaronként, amelyeket F3-F6 generációkban az ivarérettség elérése után, 4-8 hetes életkorban párosítottuk. Tenyészgenerációnként ~ 1000 egyeddel dolgozva jutottunk el az F8 nemzedékig.

Ekkor találtunk ki egy újabb stratégia módosítást, amivel még az AIL térképezés hatékonyságát még tovább tudjuk fokozni: Ahogy azt korábbiakban már bemutattuk, a Cross-4 F2-ben csak a homozigóta mutáns egyedeken térképeztünk és a szelektív genotípus meghatározás értelmében így a populációnak összesen 8%-át használtuk fel. Amennyiben az egész térképezési állomány csak homozigóta mutáns egyedekből állna, akkor négyszer annyi egyed, a populáció 32%-át tudnánk felhasználni a szelektív genotipizáláshoz. Ezért a Compact-AIL-ből – amely vegyesen hordozza a három ($B=+/+$, $H=+/Mstn^{Cmpt-d11Abc}$, $K=Mstn^{Cmpt-d11Abc}/Mstn^{Cmpt-d11Abc}$ genotípust) a további tenyészgenerációk során fokozatosan kialakítottuk az új „Compact-AIL-K” vonalat, amely gyakorlatilag csak az $Mstn^{Cmpt-d11Abc}$

mutációra homozigóta egyedekből állt. Az F8-F9-F10 tenyészgenerációk során tehát a cél az ilyen $K=Mstn^{Cmpt-d11Abc}/Mstn^{Cmpt-d11Abc}$ genotípusú egyedek felszaporítása volt, illetve a mutáció „bevitelére” azokba családokba is, ahol az addig nem volt jelen.

1.3.2 A Compact-AIL-K F11 térképezési populáció kialakítása

Az F11 térképezési generációban összesen 2818 $K=Mstn^{Cmpt-d11Abc}/Mstn^{Cmpt-d11Abc}$ genotípusú egyedeket hoztunk létre. Ebből 1413 hím, s 1405 nőstény volt, a két ivar egyenlő részarányú előfordulásának megfelelően.

Mind a 403 (az összes hím 28,5%-a) megszületett extrém fenotípusú hím egyed: M1K=155 (az összes hím 11,0%-a) és M5K=248 (az összes hím 17,5%-a) szerepelt a további genetikai térképezésben.

A nőstények fenotípusos eloszlása sokkal aránytalanabb volt mint a hímeké, ezért a megszületett extrém fenotípusú nőstények összesen 661 F1K egyedéből (az összes nőstény 47,0%-a) csak 172 (az összes nőstény 12,2%-a) került az analízisbe, viszont mivel a legizmolttabb nőstények is csak a legritkábban esnek az F5K kategóriába, ezért itt a megfelelő számú extrém egyed kiválasztásához össze kellett vonnunk az F3,67K-F5K kategóriákat, s így adódott össze az átfogó kategóriaként „F4K”-nak nevezett 140 (az összes nőstény 10,0%-a) hiperizmoltt egyed. A kiválasztott F1K + F4K kategóriákba így összesen 312 (az összes nőstény 22,2%-a) egyed került.

A fent bemutatott egyedszámok természetesen csak az F11 térképezési populáció végső kiteljesedésekor álltak elő. Azért, hogy a térképezési munkát már ennél hamarabb el lehessen kezdeni, technikai csoportokat hoztunk létre a keletkező F11 utódokból. Tekintve, hogy a ChrX térképezést a hímekre koncentrálni akartuk végrehajtani, az extrém egyedeket tartalmazó csoportokat ehhez a feladathoz, kizárólag hímekből állítottuk össze: 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.

1.4 ChrX térképezés a Compact-AIL-K F11 generációjában

A terveknek megfelelően, a Compact-AIL-K F11 térképezést az X kromoszómával kezdtük el az extrém fenotípusú normál izomzatú (M1K) és hiperizmoltt (M5K) hím, $Mstn^{Cmpt-d11Abc}/Mstn^{Cmpt-d11Abc}=K$ genotípusú egyedek bevonásával.

Az X kromoszóma térképezéséhez a következő lépést a genetikai markerek összeválogatása jelentette. Az AIL modell-kísérletek tanúsága 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 7-9 mikroszatellit markert használtunk, addig az AIL-F11 térképezéséhez e markerek mellé még további 26 markert választottunk, s így összesen 33 keret markerre (framework marker: FWM) alapoztuk az X kromoszóma térképezését. A markerek kiválasztását elvileg az egér genetikai térképére kellett volna alapoznunk, de az egyes markerek genetikai térkép (Jackson Laboratory) alapján kapott pozíciója olyannyira eltért az egér szekvencia alapján kapott fizikai pozícióktól (Ensembl, Build34), hogy inkább ez utóbbira alapoztuk az egész térképezési kísérletet.

Az FWM-ek pozicionálásánál azt a célt tűztük magunk elé, hogy az egyes mikroszatellit markerek ~5 Mbp távolságokra legyenek egymástól, függetlenül a genetikai távolságoktól és az egyes területek génekben való gazdagságától. Ezt az FWM hálót sikerült is ennek megfelelően kialakítani, részben az egér több ezer ismert mikroszatellit markeréből válogatva (MIT markerek), részben az egér genomai szekvencia ismeretében, az általunk tervezett

markerek (Abc markerek) segítségével. Az adott marker pozíción alapuló kiválasztás után, az egyes markerek ún. informatívitását teszteltük, azaz, hogy eltérő allélváltozatokat hordoz-e a Compact-AIL alapító két törzse: a Comp9 és a CAST/Ei. A nem informatív markerek helyett újabb és újabb markereket kellett bevonnunk a vizsgálatokba, majd tesztelnünk azokat. 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 már csak két marker van a 33-ból, amelyeknek nincs meg a G1+G2 genotípus vizsgálata, a többi 31 markerre ezzel már elkészültünk.

A kapott M1K és M5K genotípus értékeket Chi2 próbával hasonlítottuk a várt értékekhez, majd a két csoport összesített adataiból is elvégeztünk a Chi2 próbát. Ezt úgy hajtottuk végre, hogy mivel azt feltételezzük, hogy a hiperizmoltság irányába ható modifikátor allélek a Comp9 oldalról várható, ezt a Comp allélt tekintjük kedvezőnek az M5K csoportban, s ennek ellentettjeként az M1K csoportban a CAST/Ei oldalról jövőt tartjuk kedvezőnek. Az ezzel a módszerrel összevont adatok Chi2 próbával végzett összehasonlítása egy, az X kromoszóma proximális végétől számított 55 Mbp-nál lévő (DXMit126 markernél) és 130 Mbp-nál elhelyezkedő (DXMit37 markernél) két csúcst detektált, a DXMit126-nál 5,53E-06, a DXMit37-nél 8,09E-05 értékekkel. Mindkét érték erősen szignifikáns. Összehasonlítva ezeket a Cross4 F2-ben kapott eredményekkel kitűnik, hogy míg ott a legmagasabb értéket 90 Mbp körül kaptuk, addig itt ugyanebben a pozícióban szignifikancia szint alatti érték mutatkozott.

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

Az X kromoszóma analízise természetesen koránt sincs kész ezzel az előzetes vizsgálattal, mert az AIL nagyon feldarabolja a kromoszómákat és az eddig elvégzett vizsgálatok még csak elsődleges tájékozódási pontokat adnak arról, hogy mely intervallumokba kell majd további és további markereket bevonni a rekombináns utódok számának megfelelően.

A vizsgálatok tehát még folyamatban vannak, az eredményeket később feltétlenül tudjuk majd publikálni remélhetőleg a korábbi munkáinknak megfelelő színvonalú nemzetközi folyóiratokban.

2 Irodalomjegyzék

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.