

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 9

Issue 3

Különszám/Special Issue

Gödöllő
2013



A SZARVAMARHA PRION FEHÉRJE SZABÁLYOZÓ SNP VIZSGÁLATA TRANSZGÉNIKUS EGÉR MODELLBEN

*Kerekes Andrea¹, Hoffmann Orsolya Ivett¹, Skoda Gabriella¹, Barta Endre²,
Dominique Rocha³, Véronique Lejard³, Hiripi László¹, Bősze Zsuzsanna¹*

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

² Debreceni Egyetem 4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

³ Génétique Animal et Biologie Integrative (GABI) INRA UMR1313, Franciaország
kerekes@abc.hu

Összefoglalás

Kísérleteink során olyan, a szarvasmarha génjein előforduló, szabályozó egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP) vizsgálatát végezzük, melyek expressziós különbségeket is hordoznak. Az intézet bioinformatikai csoportja „*in silico*” módszerekkel kiválasztotta azokat a lehetséges SNP markereket, melyek a gének szabályozó régióiban találhatóak. Az eredményeket tovább szűkítették azokra a polimorfizmusokra, melyek transzkripciós faktor kötőhelyeken találhatóak. A célunk olyan expressziós különbségek keresése, melyek gazdaságilag fontos tulajdonságot befolyásolnak, végső célunk az általunk jellemzett szabályozó SNP-k alkalmazása a tenyésztésben, így a genom alapú szelektációs eljárás eredményesebb használata a szarvasmarha nemesítés során.

Az első vizsgált polimorfizmus a bovine prion fehérje gén (PRNP, BOS_13027) 5' régiójában található Sp1 kötőhelyben bekövetkezett bázis csere. Nakamura és mtsai (2007) „*in vitro*” luciferáz esszé alapján kimutatták, hogy a -6. pozícióban bekövetkező bázis csere (C-ről T-re), csökkenti a szarvasmarha PRNP promóter aktivitását a vad haplotípussal szemben. Azért nagyon fontos ez az eredmény, mert az már bizonyított, hogy a szarvasmarha PRNP gén expressziója kapcsolatba hozható a szarvasmarha szivacsos agyvelő gyulladásának kialakulásával. A prion fehérjét kódoló gén kifejeződésének csökkentésével, alacsonyabb lenne a betegség kialakulásának veszélye is.

Ezt a hatást kívántuk bizonyítani „*in vivo*”, tehát létrehoztunk két olyan transzgenikus egér vonalat, amelyek a szarvasmarha PRNP gén promóterének egy-egy allélváltozatát hordozzák a már leírt rSNP-nek megfelelően. A transzgeniként bevitt promóter mögött egy zöld riporter gén (AcGFP) található. Ahhoz, hogy kizárhassuk az integrációs helyből következő különbségeket egy további (piros, DsRed) riporter gén is helyet kapott a konstrukcióban, egy erős virális promóter irányítása alatt.

Az injektlásokat követően 4 C és 3 T rSNP allélt hordozó alapító született. Az egér vonalak létrehozását követően az F1 generációban vizsgáltuk az expressziós különbségeket.

Kulcsszavak: prion, szivacsos agyvelőgyulladás, génexpresszió, polimorfizmus, SNP



***In vivo* validation of a regulatory SNP in the bovine prion protein gene in transgenic mouse model**

Abstract

Regulatory single nucleotide polymorphisms (SNP) of bovine genes, which show allele specific expression levels were examined. Potential regulatory SNPs were selected with “*in silico*” methods focusing on transcriptional binding site consensus sequences. Our aim was to identify and validate rSNP alleles that cause expression differences in genes which influence economically important traits. The ultimate aim is to select a group of regulatory SNP's and use them in genomic selection. One of the first studied polymorphism was found in a Sp1 binding site of the 5' flanking region of the bovine prion protein gene. Nakamura et al. (2007) cloned both alleles of this rSNP into a luciferase-expressing plasmid, transfected them into N2a cells, and measured the reporter activities. Their results showed decreased expression level in one of the alleles, as a result of C to T transition at -6 position of the bovine PRNP promoter. There is evidence that the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) is associated with high expression of bovine PRNP gene. We may decrease the risk of BSE by selecting for the rSNP allele which results low activity. Our group intended to find *in vivo* evidence, for the role of this regulatory SNP therefore we created transgenic mouse strains carrying an indicator gene under the two different rSNP alleles of the bovine PRNP gene. The transgene construct harbors the green fluorescent gene (AcGFP) under the two different alleles of the bovine PRNP promoter. To normalize the results we used another reporter gene the DsRed, under a strong viral promoter to exclude the differences in the AcGFP expression levels caused by the integration site. We could establish seven transgenic lines (with 4C and 3T rSNP alleles) and measured the expression levels in the individuals of the F1 generation.

Keywords: prion, Bovine Spongiforme Encephalopathie, gene expression, polymorphism, SNP

Bevezetés

A szarvasmarha (*Bos taurus*) gazdasági jelentőségének köszönhetően, az első állatfajok között van, melynek teljes genomja szekvenálásra került, ezt 2006 augusztusában hozták nyilvánosságra (*Internet 1*). A gének szekvenálása során több mint 3 millió feltételezett egypontos nukleotid mutációt (SNP) találtak és írtak le különböző nyilvános adatbázisokban.

Kísérleteink során olyan szabályozó SNP-k (rSNP) vizsgálatát végeztük, melyek gén kifejeződésbeli különbségeket is hordoznak. Más állatfajokban már néhány kísérletet tettek a szabályozó polimorfizmusok (pl. génexpressziós szabályozást befolyásolók) meghatározására, és ezek gyakorlati alkalmazására a nemesítésben. Azonban a hús- és tejipar számára nagy jelentőségű szarvasmarha fajtákban egyelőre kevés rSNP alapú szelekciós markert találtak. Bár az SNP-k többsége nem génekben található, valamint a kapcsoltsági egyensúly hiánya miatt a gazdaságilag fontos tulajdonságokkal kapcsolatos polimorfizmusok nagy valószínűséggel közvetlenül nem járulnak hozzá ezen tulajdonságok kialakulásához. A célunk olyan expressziós különbségek keresése, melyek gazdaságilag fontos tulajdonságot befolyásolnak, így a tej- és hústermelésben hasznosak, valamint betegségekkel/rezisztenciával kapcsolatosak. Végző célunk az általunk jellemzett szabályozó SNP-k alkalmazása a tenyésztésben, így a genom alapú szelekciós eljárás eredményesebb használata a szarvasmarha nemesítés során.



Irodalmi áttekintés

A legkorábbi genetikai markerek látható jegyek voltak (pl. bőrszín, szarv megléte vagy hiánya), továbbá vércsoportok vagy enzim polimorfizmusok (pl. transferrin). Ezek a markerek tulajdonképpen gének allélváltozatai és sem számukban, sem polimorfizmus tekintetében nem elégségesek a megfelelő genetikai térképezéshez. A rekombináns DNS technika megjelenésével fedezték fel a DNS polimorfizmusokat, melyek döntő többsége génektől független kromoszóma szakasz. Így fedezték fel a DNS-marker fajták közül a legfontosabbakat a mikroszatelliteket és az SNP-et. Az SNP-k (single nucleotide polymorphism) pont mutációk, melyek az evolúció során allélek formájában rögzültek, és végül fontos részévé váltak a populációk genetikai sokszínűségének (Heszky és mtsai, 2005). A gének szabályozó régiójába tartozó rSNP-k közül néhányról már bizonyították, hogy alléljai eltérő módon befolyásolják az adott gén kifejeződését. Ez úgy történhet meg, hogy a nukleotid csere következtében megváltozik a transzkripciós faktor kötőhely konszenzus szekvenciája az egyik allélban, és így a transzkripciós faktor nem fog kapcsolódni vagy a módosult kötőhely egy új faktor megtapadását teszi lehetővé. Ennek eredményeképpen a gazdaságilag fontos tulajdonságok is eltérő módon jelenhetnek meg a különböző rSNP variánsokat hordozó egyedekben (Geoff és mtsai, 2010).

Az általunk elsőként vizsgált szarvasmarha prion fehérje gén (PRNP, BOS_13027) szabályozó régiójában több ismert polimorfizmus is van. Német kutatók által a szarvasmarhában jellemzett inszerció/delécio polimorfizmusokról igazolták, hogy befolyásolják a gén expresszióját, valamint a szivacsos agyvelőgyulladásra (BSE, Bovine Spongiforme Encephalopathie) való fogékonysággal is valószínűleg kapcsolatba hozható (Sander és mtsai, 2005).

A fertőző agyvelő-degeneráció formájában fellépő szivacsos encefalopátiák a központi idegrendszer lassan kialakuló degenerációjával járó betegségei, amelyek során az agy- és gerincvelő idegsejtjeiben vakuolumok jelennek meg, az agyvelő állománya szivacsoszerűvé válik, az idegsejtek egy része elhal. Az elhalt idegsejtek hiányzó funkciójának megfelelő tünetek alakulnak ki, amelyek a gazdaszervezet pusztulásához vezetnek. Ilyen jellegű betegség kiskérődzőknél a surlókór, a szarvasfélék krónikus lesóványodással járó betegsége (Chronic Wasting Disease), valamint az embereknél előforduló Creutzfeldt-Jakob betegség (Prusiner és mtsai, 1998).

A prion fehérje gént és annak funkcióját számos kutató csoport vizsgálta. Cheng és mtsai (2005) bizonyították, hogy a sejtfalon található prion fehérjék hatást gyakorolnak a vérképző őssejtek önmegújuló képességére. A PRNP gén promóterében SNP variációk is ismertek. Nakamura és mtsai (2007) kimutatták, hogy a szarvasmarha PRNP gén 5' határoló régiójában egy Sp1 kötőhelyben bekövetkezett báziscsere a -6. pozícióban C → T-re in vitro luciferáz mérés alapján csökkenti a promóter aktivitását, a vad haplotípussal összehasonlítva. Ez azért fontos, mert ismert tény, hogy a BSE iránti fogékonyság egyenes arányban áll a PRNP gén expressziójával.

Anyag és módszer

A kutatás a TET_09_FR_ANR_GEN NKTH-ANR (Franciaország) Pályázat Genomikai alprogram Állati genomika, Genomikai Bioinformatika pályázat keretein belül valósul meg. A projektben olyan SNP-k azonosítását és jellemzését céloztuk meg, amelyek befolyásolják a génexpressziót, és így valószínűleg a fenotípust.

A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont bioinformatikai csoportja „in silico”

módszerekkel kiválasztotta azokat a lehetséges SNP markereket, melyek a gének szabályozó régióiban találhatóak. Az eredményeket tovább szűkítették azokra a polimorfizmusokra, melyek transzkripció faktor kötőhelyeken találhatóak. Ha transzkripció kötőhelyet érint az SNP marker, akkor az nagyobb valószínűséggel hordoz funkcionális különbségeket. Az „*in silico*” kiválasztott polimorfizmusok számát Franciaországban a Génétique Animal et Biologie Integrative (GABI) INRA intézetében dolgozó Dominique Rocha csoportja szűkítette tovább, akik hús- és tejhasznosítású szarvasmarha fajtákban vizsgálták, hogy az adott szabályozó SNP valóban megjelenik-e populációs szinten is. Az első polimorfizmus, melynek szabályozó szerepét „*in vivo*” is bizonyítani kívántuk a Nakamura és mtsai (2007) által már leírt és „*in vitro*” azonosított rSNP volt. A transzgénikus egér vonalak létrehozása előmag mikroinjektálással történt, a transzgén konstrukciók a PRNP egy-egy allélváltozatát tartalmazták. A promóter mögött egy zöld riporter gén (AcGFP) található, illetve egy további riporter gén (piros, DsRed) is helyet kapott a konstrukcióban egy erős virális promóter irányítása alatt (1. ábra). A kettős indikátor génre azért van szükség, hogy kizárhassuk az integrációs helyből fakadó expressziós különbségeket a létrehozott két egér vonalban.

1. ábra: Prnp gén promóterében levő SNP (C/T) vizsgálatára alkalmas transzgénik plazmid térképe

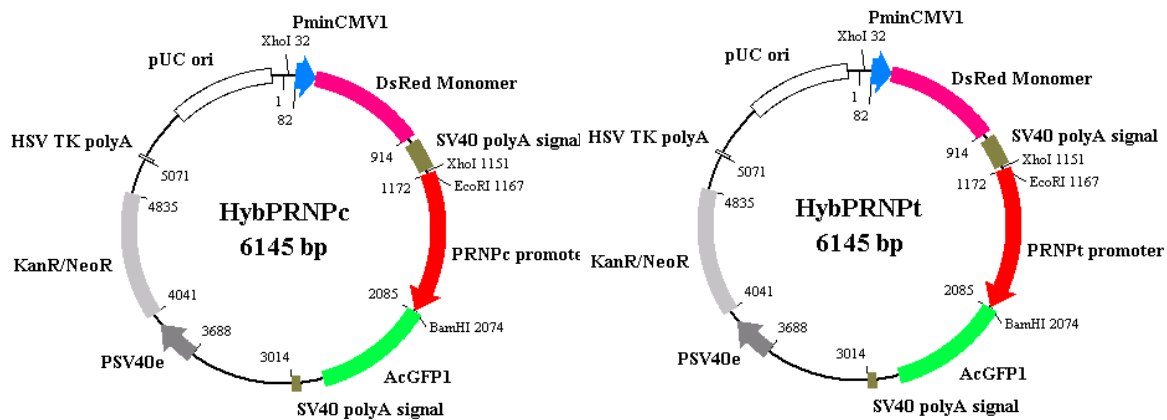


Fig. 1: Plasmid maps harboring the two different variants of the Prnp gene promoter

Az utódok azonosítását PCR módszerrel végeztük, az alapítókól egérvonalakat alakítottunk ki, majd az F1 generációban vizsgáltuk a gén expresszióját az agyban RT-PCR módszerrel, ezt követően kvantitatív real-time PCR-rel.

Eredmények és értékelés

Az injektálások során összesen 4 olyan alapító született, mely a PRNP C alléjét hordozta, valamint 3 olyan, melyekben a T allél volt megtalálható. Az 1. táblázatból jól látszik, hogy az előmag injektált zigóták 39,9%-a született meg, amelyek 4%-a hordozta a transzgént.

**1. táblázat: A Prnp C/T vektorok előmag mikroinjektálásának adatai**

Kimosott embrió (1)	Injektált/beültetett(2)	Megszületett(3)	Transzgénikus(4)
621	436	174 (39,9%)	7 (4%)

Table 1: Pronuclear microinjection data of vectors with PRNP alleles C/T

Flushed embryos(1), injected/transferred(2), born(3), transgenic(4)

4% of the injected embryos gave rise to transgenic founders.

Az alapítókból létrehozott két-két egér vonal (kettő T- kettő C) F1 generációjában vizsgáltuk a gén expresszióját. Az RT-PCR vizsgálatok szerint a PRNP promóter által szabályozott GFP mind a négy egérvonalban megjelent „*in vivo*” az agyban. Így bizonyítást nyert, hogy a promóterek megfelelőképpen működnek. A négy egérvonal két-két egyedének agyából izoláltunk RNS mintákat, majd két technikai ismétlésben Real-time PCR segítségével elvégeztük a kvantitatív expressziós vizsgálatokat. A kísérleti eredményekből látható, hogy kb. 40%-os expressziós szint csökkenést sikerült igazolni a T allél esetében „*in vivo*” körülmények között (2. ábra), ami azt jelenti, hogy a prion fehérjét kódoló gén, szabályozó régiójában található C/T reguláló SNP hatására a T allél esetében kisebb mértékű a prion fehérje gén kifejeződése.

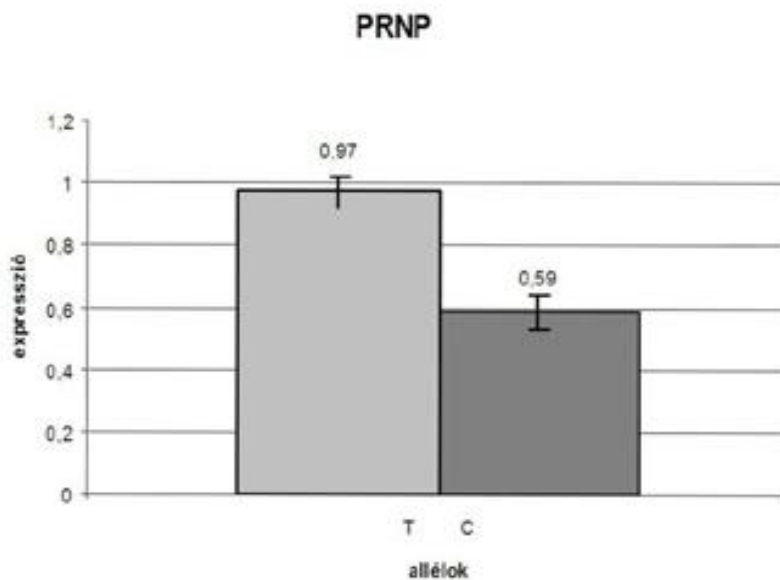
2. ábra: Allélspecifikus expressziószint különbségek

Fig. 2: Allele-specific differences in expression levels

Ez az eredmény azért fontos, mert ismert tény, hogy a BSE iránti fogékonyság egyenes arányban áll a PRNP gén expressziójával. Így, ha csökkentjük az állományokban a prion fehérjét kódoló gén kifejeződését, akkor csökken a betegség kialakulásának veszélye is. Ennek



lehetőségét eddig csak „*in vitro*” sejtenyészetekén történő vizsgálatok igazolták, így elsőként bizonyítottuk, hogy van különbség a két allélt tartalmazó promóter működésében „*in vivo*”.

A fenti vizsgálatot szeretnénk fehérje szinten is igazolni, hogy ezt követően az eredmények hasznosíthatóak legyenek a hazai szarvasmarha-tenyésztésben. A szubsztitúcióra történő tesztelés után szelekciós eljárásokkal ki lehetne válogatni azokat az egyedeket, melyek az SNP T változatát hordozzák, így jelentősen csökkenthető lenne a BSE fertőzés kialakulásának veszélye a szelektált állományokban.

Köszönetnyilvánítás

Ez a munka a TET_09_FR_ANR_GEN NKTH-ANR (Franciaország) Pályázat Genomikai alprogram Állati genomika, Genomikai Bioinformatika pályázat keretein belül valósul meg.

Irodalomjegyzék

- Cheng, C.Z., Andrew, D.S., Susan, L., Harvey, F.L. (2005): Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103. 7. 2184-2189.
- Geoff, M., James, B., Izhak, H., Kowalczyk, A. (2010): is-rSNP: a novel technique for in silico regulatory SNP detection. *Bioinformatics*, 26. 18. 524-530.
- Heszky L., Fésüs L., Hornok L. (2005): *Mezőgazdasági biotechnológia*. Agroinform kiadó, Budapest.
- Internet I: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9913
- 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. 190-196.
- Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J., Cohen, F.E. (1998): Prion protein biology. *Cell*. 93. 337-348.
- Sander, P., Hamann, H., Drögemüller, C., Kashkevich, K., Schiebel, K., Leeb, T. (2005): Bovine prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. *J. Biol. Chem.*, 280. 45. 37408-37414.