

## A GPR54 receptor gén szaporodásbiológiai hatásának vizsgálata juhban

Szabó Szilvia – Árnysai Mariann – Jávör András

Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum,

Mezőgazdaságtudományi Kar,

Állattenyésztéstudományi Intézet, Debrecen

adamsz@agr.unideb.hu

### ÖSSZEFOGLALÁS

*A juhtenyésztés gazdaságosságának egyik fő problémája az, hogy az állatok szezonálisitása miatt a folyamatos termékelőállítás nem megoldott. Napjainkban kiterjedt kutatások irányulnak a juhek aszezonálisitásának kialakításában szerepet játszó gének, mutációk azonosítására, azzal a céllal, hogy ismeretükben a gyakorlatban is lehetővé váljon aszezonális ivarzásra képes állományok kialakítása.*

*Jelen ismereteink szerint a GPR54 gén szerepet játszik a GnRH hypothalamusból történő felszabadulásában, és így a szervezet reprodukciós állapotának megváltoztatásában. Kutatásaink annak megállapítására irányulnak, hogy vannak-e a GPR54 génnek olyan allélváltozatai, amelyek különböző mértékben befolyásolják a juhek aszezonális ivarzásra való hajlamát. Ennek érdekében, első lépésként a GPR54 gén juh szekvenciájának megállapításával foglalkozunk.*

**Kulcsszavak:** GPR54, reprodukció, aszezonálisitás

### SUMMARY

*One of the main economical problems of sheep breeding is that continual production is not possible due to the seasonality of animals. Today, genes, mutations that may develop aseasonality in sheep are extensively researched in order to make the establishment of populations capable of aseasonal estrus possible.*

*According to the current knowledge, the GPR54 gene participates in the GnRH release from the hypothalamus, and thus in the alteration of the reproduction state of the organism. Our research is aimed to determine whether the GPR54 gene has allele variations that influence the proneness to aseasonal estrus in sheep in a different extent. Therefore, the GPR54 gene sequence of sheep is first examined.*

**Keywords:** GPR54, reproduction, aseasonality

### BEVEZETÉS

A juhtenyésztésben a szezonálisitás alapvetően befolyásolja a termékelőállítás folyamatosságát. Magyarországon a juhtej döntő hányadát az Awassi Rt. termeli, amely törekszik az aszezonális ivarzásra képes állomány kialakítására a folyamatos tejelőállítás érdekében. A tavaszi ellést követően tejmintákból meghatározott progeszteron-szint segítségével vizsgálják, hogy az egyedek ciklusba kerültek-e. Magyarországon ismereteink szerint eddig csak a Mella receptor gén polimorfizmust és annak szezonálisra gyakorolt hatását vizsgálták (Árnysai et al., 2006).

Előzetes eredményeik összhangban vannak külföldi kutatócsoportok által közölt eredményekkel (Notter et al., 2003; Pelletier et al., 2000). A mi célunk, a marker alapú szelekció hatékonyságának növelése érdekében, olyan egyéb DNS markerek azonosítása, melyek szintén kapcsolatba hozhatók a szezonon kívüli spontán ivarzásra való hajlammal. Az alábbiakban ismertetett nemzetközi kutatási eredmények alapján terelődött figyelmünk a GPR54 receptor génre.

### IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A GPR54 receptort eredetileg mint „árva” receptort azonosították patkányban (Lee et al., 1999). 2001-ben több kutatócsoport is arról számolt be, hogy a GPR54 receptor természetes liganduma a Kiss1 gén 54 aminosavból álló terméke (Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001; Kotani et al., 2001). A Kiss1 gén egy humán metasztázis szuppresszor gén, mely a humán melanóma és mellrák sejtek metasztázisát gátolja. A rákos betegek esetében gyakran a metasztázis vezet halálhoz, mely során rákos sejtek válnak le az elsődleges daganatról, átterjednek a környező szövetekbe, bejutnak a keringésbe, és így távoli szervekben is elburjánzanak. A Kiss1 gén 54 aminosavból álló terméke így a metastatin nevet kapta (Ohtaki et al., 2001).

Revel és mtsai (2006) kifejtették, hogy a szervezet főként úgy változtatja meg reprodukciós állapotát, hogy a GnRH pulzálás gyakoriságát módosítja. A hipofízis által termelt melatonin szabályozza a hypothalamus GnRH szekrécióját, és az LH szekréciót is befolyásolja (Bittman et al., 1985). A jelen kutatások szerint a Kiss1/GPR54 rendszer fontos szerepet tölt be a GnRH hypothalamusból történő kiszabadulásában. Az agy különböző részeiben kimutatták a Kiss1 (Gottsch et al., 2004; Shahab et al., 2005) és a GPR54 (Lee et al., 1999; Shahab et al., 2005; Kinoshita et al., 2005) expresszióját. A GPR54 esetében a GnRH neuronjaiban is sikerült az expresszió igazolása (Irwing et al., 2005; Messenger et al., 2005). Revel és mtsai (2006) munkahipotézise szerint a mediobazális hypothalamusban található Kiss1 neuronok kisspeptint bocsátanak ki, mely GnRH kibocsátást és a HPG (hypothalamus- hipofízis-gonádok) tengely aktiválását váltja ki. Feltételezik, hogy a Kiss1 neuronok aktivitását a melatoninon keresztül a fotoperiódus befolyásolja, hiszen a Kiss1 sejtek is az MBH-ban (mediobazális hypothalamus) találhatóak, ott, ahol a MEL reakció lejátsszódik.

A Kiss1 sejtek a melatonin mellett számos helyről kapnak jeleket: a szexuál hormonok visszacsatolnak a Kiss1 neuronokra, hogy a Kiss1 expressziót csökkentsék; de a test energia raktárai és valószínűleg egyéb jelek (környező hőmérséklet, stressz, feromonok) is befolyásolják a Kiss1 sejtek működését. Feltételezésünk szerint, a GPR54 receptor gének így a szezonális kialakításában is szerepe lehet. Mindezt megerősítik azok a tanulmányok, melyek rávilágítottak, hogy a GPR54-ben bekövetkezett, funkcióvesztéssel járó mutációkkal bíró emberek és egerek fenotípusa megegyezett az ún. „isolated hypothalamic hypogonadism” (IHH) tüneteivel, melyek közé tartozik az abnormális szexuális fejlődés és a pubertáson való átmenet képtelensége (Seminaro et al., 2003; de Roux et al., 2003; Funes et al., 2003; Semple et al., 2005).

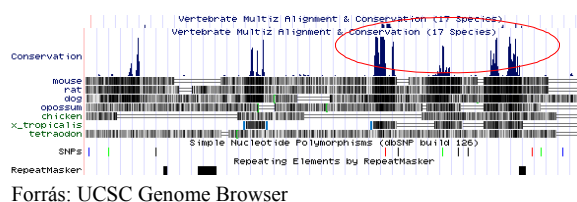
A mutánsok nem képesek az LH/FSH szekréció szabályozására, habár a hypothalamus GnRH neuronjaiban a GnRH szintézis normális, és a hipofízis gonadotróp sejtei változatlanul képesek a külső GnRH-ra reagálni. A funkcióvesztett mutáns egerek és a rövid nappaloknak kitett szíriai vagy szibériai hörcsögök nagy hasonlóságot mutattak abban, hogy mindkét csoportnál a keringő gonadotropinok alacsony szintjét, sorvadtt gonádokat és alacsony szexuál szteroid szintet tapasztaltak. Mind a hörcsögök, mind az egerek normális GnRH expressziót mutattak és GnRH adása LH/FSH kibocsátást váltott ki.

Revel et al. (2006) mindebből arra következtettek, hogy a rendszer a GnRH kibocsátás és nem pedig a szintézis szintjén blokkolt.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

Mivel juh szekvenciát a GPR54 géne még nem publikáltak, az ember és egér szekvenciák összehasonlításával terveztük a primereket. Az 1. ábra a gén szekvenciájának konzerválódását mutatja különböző fajok között. A GPR54 gént 5 exon és 4 intron építi fel. A primereket a hármas és ötös exonokra terveztük, ahol a konzerválódás mértéke a legnagyobb. Ezek a régiók az 1. ábrán a bekeretezett részen láthatóak.

1. ábra: A GPR54 gén konzerváltsága



Forrás: UCSC Genome Browser

Figure 1: Conservation in the GPR54 gene

Az ember és egér szekvenciák egyezőségei alapján tervezett primerek (1. táblázat):

1. táblázat

### Az alkalmazott primerek szekvenciája

Primer neve(1)	Forward Primer	Primer neve(1)	Reverse Primer
F1	3' CTCTGACCGCCATGAGTGT 5'	R1a	3' TGCTGTAGGACATGCAGTGA 5'
		R1b	3' TGCTGTAGGACATGCAGTGAG 5'
F2	3' ATGAGTGTGGACCGCTGGTA 5'	R2	3'GCGGAGTTGCTGTAGGACAT 5'
F3	3' GCTGGTACGTGACGGTGTT 5'	R3	3' CCAGGAAGGCGTAGAGCA 5'

Table 1: Sequences of the applied primers  
name of primer(1)

A PCR kondíciók optimalizálása érdekében gradiens PCR-t alkalmaztunk, és a tapadási hőmérsékletet 47-64 °C között változtattuk.

A PCR elegy összetétele az alábbiak szerint alakult: 6,0 µl dH<sub>2</sub>O, 1,0 µl dNTP (2mM), 1,0 µl 10×Buffer (15mM MgCl<sub>2</sub>-t tartalmaz), 0,4 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,25 µl P1 (10pmol/ul), 0,25 µl P2 (10pmol/ul), 0,1 µl Qiagen Taq (50U/ul). Ez összesen 9,0 µl PCR mixet adott, melyhez reakciónként 1,0 µl DNS-t (50-100ng/ul) adtunk.

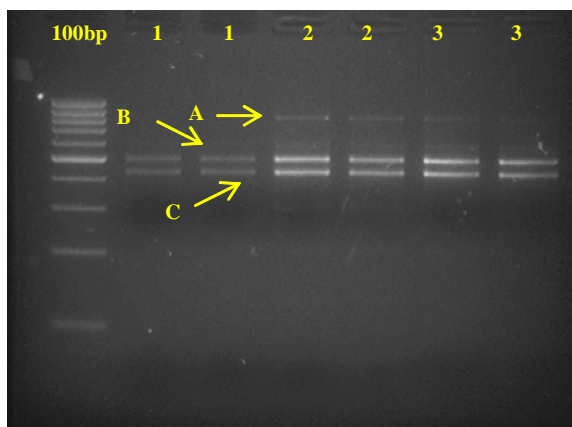
A PCR kondíciók az alábbiak voltak: kezdő denaturáció 95 °C-on 10 perc; ezt követte 94 °C-on 30 mp denaturáció, 47-54 °C-on (ahol a következő hőmérsékleti értékek voltak: 47,0; 48,2; 49,0; 50,0; 51,2; 52,2 °C) 45 mp primer feltapadás, majd 72 °C-on 45 mp elongáció 35 cikluson keresztül; végső elongáció 73 °C-on 5 perc; majd hűtés 10 °C-ra.

A PCR-hez egy awassi, egy gyimesi racka és egy magyar merinó egyed DNS-ét használtuk fel. A PCR termékek jelenlétét gélelektroforézissel ellenőriztük. A PCR termékeket 2% MetaPhor agaróz gélen futtattuk. Az összes primerkombinációt kipróbálva a különböző tapadási hőmérsékleteken csak az F1-R1b primerpár esetén kaptunk terméket. A géleképek alapján a tapadási hőmérsékletek közül a 47 °C-ot találtuk megfelelőnek a további vizsgálatokhoz. A termékeket a gélből való kivágásuk után Gel-M tisztító kit (VIOGENE, CA, USA) segítségével tisztítottuk és készítettük elő szekvenálásra.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az 2. ábrán a három minta F1 és R1b primerekkel végzett PCR termékei láthatók 2%-os agaróz gélen történt futtatás után.

2. ábra: F1 és R1b primerekkel végzett PCR termékei



1, 2, 3 – minták száma(1)  
A, B, C – termékek(2)

Figure 2: Products of PCR with F1 and R1b primers  
sample numbers(1), products(2)

A primertervezés során az említett primerpárra vonatkozó várt termék hosszúság 970bp volt. Ezzel ellentétben, az általunk kapott és szekvenálásra megküldött termékek hossza 400 és 500bp között, 500 illetve 900bp körül alakult. Amennyiben a juh hármás vagy négyes intronja rövidebb, mint az egér és ember megfelelő szekvenciája, az magyarázhatja az általunk nyert PCR termékek rövidebb voltát. A következtetések levonásához azonban mindenképpen szükség van a PCR termékeink pontos bázissorrendjének ismeretére (a szekvenálás jelenleg folyamatban van).

További lépésben a kapott szekvenciákat összevetjük a humán és egér szekvenciákkal. Amennyiben bebizonyosodik, hogy valamelyik beküldött minta valóban a GPR54 gén egy adott régiójának felel meg, úgy a kapott juh szekvenciára specifikus primert tudunk tervezni. Az új primerekkel a gén további szakaszait kívánjuk megszekvenálni és polimorfizmusokat keresni, melyek befolyásolhatják a juh szezonon kívüli spontán ivarzásra való hajlamát.

#### IRODALOM

- Árnyasi, M.-Faigl, V.-Keresztes, M.-Dankó, G.-Kulcsár, M.-Magyar, K.-Czeglédi, L.-Lien, S.-Cseh, S.-Huszenicza, Gy.-Jávör, A. (2006): Mella gene polymorphisms as possible markers for seasonality in sheep. Hungarian studies. "Natural Resources and Sustainable Development" 10-11 October, 2006, Oradea, Romania
- Bittman, E.L.-Kaynard, A.H.-Olster, D.H.-Robinson, J.E.-Yellon, S.M.-Karsch, F.J. (1985): Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology* 40. 409-418.
- de Roux, N.-Genin, E.-Carel, J.C.-Matsuda, F.-Chaussain, J.L.-Milgrom, E. (2003): Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19). 10972-10976.
- Funes, S.-Hedrick, J.A.-Vassileva, G.-Markowitz, L.-Abbondanzo, S.-Golovko, A.-Yang, S.-Monsma, F.J.-Gustafson, E.L. (2003): The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312. 1357-1363.
- Gottsch, M.L.-Cunningham, M.J.-Smith, J.T.-Popa, S.M.-Acohidó, B.V.-Crowley, W.F.-Seminara, S.-Clifton, D.K.-Steiner, R.A. (2004): A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 145. 4073-4077.
- Irwig, M.S.-Fraleigh, G.S.-Smith, J.T.-Acohidó, B.V.-Popa, S.M.-Cunningham, M.J.-Gottsch, M.L.-Clifton, D.K.-Steiner, R.A. (2005): Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*. 80. 264-272.
- Kinoshita, M.-Tsukamura, H.-Adachi, S.-Matsui, H.-Uenoyama, Y.-Iwata, K.-Yamada, S.-Inoue, K.-Ohtaki, T.-Matsumoto, H.-Maeda, K.I. (2005): Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory LH surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology*. 146. 10. 4431-4436.
- Kotani, M.-Detheux, M.-Vandenbogaerde, A.-Communi, D.-Vanderwinden, J.M.-Le Poul, E.-Brezillon, S.-Tyldesley, R.-Suarez-Huerta, N.-Vandeput, F.-Blanpain, C.-Schiffmann, S.N.-Vassart, G.-Parmentier, M. (2001): The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligand of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry*, 276. 34631-34636.
- Lee, D.K.-Nguyen, T.-O'Neill, G.P.-Cheng, R.-Liu, Y.-Howard, A.D.-Coulombe, N.-Tan, C.P.-Tang-Nguyen, A.T.-George, S.R.-O'Dowd, B.F. (1999): Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Letters*, 446(1). 103-107.
- Messenger, S.-Chatzidakis, E.E.-Ma, D.-Hendrick, A.G.-Zahn, D.-Dixon, J.-Thresher, R.R.-Malinge, I.-Lomet, D.-Carlton, M.B.-Colledge, W.H.-Caraty, A.-Aparicio, S.A. (2005): Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102. 1761-1766.
- Muir, A.I.-Chamberlain, L.-Elshourbagy, N.A.-Michalovich, D.-Moore, D.J.-Calamari, A.-Szekeres, P.G.-Sarau, H.M.-Chambers, J.K.-Murdock, P.-Steplewski, K.-Shabon, U.-Miller, J.E.-Middleton, S.E.-Darker, J.G.-Larminie, C.G.-Wilson, S.-Bergsma, D.J.-Emson, P.-Faull, R.-Philpott, K.L.-Harrison, D.C. (2001): AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276. 28969-28975.
- Notter, D.R.-Cockett, N.E.-Hadfield, T.S. (2003): Evaluation of melatonin receptor 1a as a candidate gene influencing reproduction in an autumn-lambing sheep flock. *Journal of Animal Science*. 81. 912-917.
- Ohtaki, T.-Shintani, Y.-Honda, S.-Matsumoto, H.-Hori, A.-Kanehashi, K.-Terao, Y.-Kumano, S.-Takatsu, Y.-Masuda, Y.-Ishibashi, Y.-Watanabe, T.-Asada, M.-Yamada, T.-Suenaga, M.-Kitada, C.-Usuki, S.-Kurokawa, T.-Onda, H.-Nishimura, O.-Fujino, M. (2001): Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411. 613-617.

- Pelletier, J.-Bodin, L.-Hanocq, E.-Malpoux, B.-Teyssier, J.-Thimonier, J.-Chemineau, P. (2000): Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene Mella receptor in the ewe. *Biology of Reproduction*. 62. 1096-1101.
- Revel, F.G.-Saboureaux, M.-Masson-Péret, M.-Péret, P.-Mikkelseu, J.D.-Simouneaux, V. (2006): KiSS-1: A likely candidate for the photoperiodic control of reproduction in seasonal breeders. *Chronobiology International* 23 (1&2): 277-287.
- Seminara, S.B.-Messenger, S.-Chatzidaki, E.E.-Thresher, R.R.-Acierno, J.S. Jr.-Shagoury, J.K.-Bo-Abbas, Y.-Kuohung, W.-Schwinof, K.M.-Hendrick, A.G.-Zahn, D.-Dixon, J.-Kaiser, U.B.-Slaugenhaupt, S.A.-Gusella, J.F.-O'Rahilly, S.-Carlton, M.B.-Crowley, W.F. Jr.-Aparicio, S.A.-Colledge, W.H. (2003): The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England Journal of Medicine*. 349. 1614-1627.
- Semple, R.K.-Achermann, J.C.-Ellery, J.-Farooqi, I.S.-Karet, F.E.-Stanhope, R.G.-O'Rahilly, S.-Aparicio, S.A. (2005): Two Novel Missense Mutations in G Protein-Coupled Receptor 54 in a Patient with Hypogonadotropic Hypogonadism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 90(3). 1849-1855.
- Shahab, M.-Mastronardi, C.-Seminara, S.B.-Crowley, W.F.-Ojeda, S.R.-Plant, T.M. (2005): Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102. 2129-2134.
- UCSC Genome Browser: [www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr19:868358-872013&hgid=85252715&knowGene=pack&hgFind.matches=NM\\_032551](http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr19:868358-872013&hgid=85252715&knowGene=pack&hgFind.matches=NM_032551)