

**Állatorvostudományi Egyetem**

**Ökológia Tanszék**

A dopamin rendszer bizonyos genetikai polimorfizmusainak elemzése  
széncinegékben: költésbiológiai vonatkozások

**Grób Adél Borbála**

**Témavezető: Dr. Rónai Zsolt**

**Semmelweis Egyetem, Molekuláris Biológiai Tanszék**

**Belső konzulens: Dr. Vili Nóra**

**Állatorvostudományi Egyetem, Ökológiai Tanszék**

2022

# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés .....	3
1.1. Viselkedésgenetika .....	3
1.2. Dopamin szerepe .....	4
1.3. Dopamin receptorok .....	5
1.4. DRD4 gén .....	7
1.5. Széncinege ( <i>Parus major</i> ) .....	9
3. Módszerek .....	12
3.1. A költési siker felmérése .....	12
3.2. Genotipizálás .....	12
3.2.1. Hosszúság polimorfizmusok vizsgálata – „hagyományos módszer” .....	12
3.2.2. Hosszúság polimorfizmusok vizsgálata – RFLP .....	13
3.2.3. Hosszúság polimorfizmusok vizsgálata – real-time PCR .....	15
3.2.4. SNP vizsgálata – RFLP .....	16
3.2.5. PCR és gélelektroforézis .....	17
3.3. Statisztika .....	18
3.3.1. Hardy–Weinberg egyensúly tesztelése .....	18
3.3.4. Genotípusok hatása a költési sikerre .....	19
4. Eredmények .....	20
4.1. Genotipizálás .....	20
4.2. Hardy–Weinberg egyensúly tesztelése .....	20
4.3. Genotípuseloszlások a különböző élőhelyeken .....	22
4.4. A modellek eredményei .....	24
5. Diskusszió .....	28
6. Összefoglalás .....	31
7. Summary .....	32
8. Köszönetnyilvánítás .....	33
9. Irodalomjegyzék .....	34
10. Mellékletek .....	41

# 1.Bevezetés

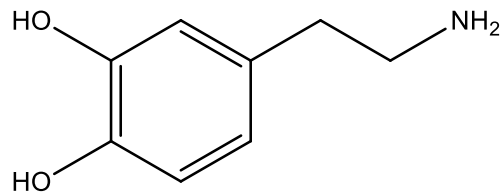
## 1.1. Viselkedésgenetika

A viselkedésgenetika egyre szélesebb körben kutatott ága az etológiának. Elsőként a humán viselkedés örökletes hátterét kezdték el vizsgálni, de mára már számos átfogó kutatás született háziállatokról és vadállatokról is.

Francis Galton volt az első, aki figyelembe vette az emberi viselkedés tanulmányozásában az öröklődést. Charles Darwin A fajok eredete című műve ihlette meg, és emiatt kezdett el családfákat kutatni, valamint ikervizsgálatokat végezni. Ez idő tájt fektette le Mendel az öröklődés törvényeit, amit csak később az 1900-as években fedeztek fel és követői próbáltak egygénés öröklődési mintázatokat komplex emberi viselkedésekhez társítani. Eredményeiket azonban nem tudták megfeleltetni annak, hogy egy gén egyetlen tulajdonság hátterében állhat és nem kódolhatja az összetett viselkedésmintázatokat. Ezért a genetika két ágra szakadt: a kvantitatív genetikusok a komplex tulajdonságokra fókuszáltak és azt vizsgálták, hogy a genetikai tényezők mennyire fontosak az adott jellegzetesség létrejöttében, míg a mások a mendeli genetika törvényszerűségeit követték, ami a gének működését vizsgálta és olyan egyszerű tulajdonságokat választottak, amik kialakulásáért egy gén felelős [1].

Az 1980-as évektől kezdve, a molekuláris genetika fellendülésével azonban a viselkedéstudományok elkezdtek elfogadni a gének hatását bizonyos viselkedésformák megjelenésében. A viselkedésgenetika tehát magában foglalja mind a kvantitatív genetikát (iker és örökbefogadási tanulmányok), mind pedig a molekuláris genetikát. [1] A XXI. században az utóbbi vizsgálatok kerültek előtérbe, hiszen már rendelkezésünkre állnak olyan eszközök, amelyekkel könnyen, gyorsan és egyre olcsóbban vizsgálhatjuk az élőlények genetikai állományát. Így számos kutatás született arról, hogy az agresszió, a függőségek, a tanulási képességek, a memória, a kognitív képességek és bizonyos pszichiátriai betegségek hátterében milyen genetikai tényezők állhatnak [2, 3].

## 1.2. Dopamin szerepe



1. ábra: dopamin

A viselkedésgenetikában leginkább a monoaminerg neurotranszmitter elemeire: a szerotonin és a dopamin anyagcseréjében, valamint hatásának megvalósulásában szerepet játszó fehérjék (receptorok, transzporterek) génjeire szoktak összpontosítani.

A dopamin (2-(3,4-dihidroxi-fenil) -etil-amin) (1.ábra) egy neurotranszmitter, amely számos folyamatot befolyásol a szervezetben. Az emberi agyban a dopaminerg neuronok sejttesteik főként a középagyban helyezkednek el, de axonjaik egyéb agyterületeket is érintenek. A középagyban a fő dopaminerg sejtcsoportok a substantia nigra pars compacta területén (A9 neuronok), ettől mediálisan a ventralis tegmentális területen (A10) és a retrorubalis magban (A8) található [4]. A neuroncsoportokból kiinduló projekciós rendszerek három, anatómiailag és funkcionálisan megkülönböztethető komponensre, nigrostriatalis (vagy mezostratialis), mezolimbikus és meзокortikális pályákra oszthatók fel [5].

A substantia nigrából induló axonok a bazális ganglionokban végződnek (nucleus caudatus és putamen) és ezáltal a dopamin jelentős szerepet játszik az extapyramidalis mozgáskoordinációban, vagyis a motoros funkciók szabályozásában és az új motoros készségek elsajátításában [6]. Emberben például a nigrostriatalis rendszer degradációja a Parkinson kórt okozza [7]. Ez a betegség azonban nem csak mozgási rendellenességet okoz, hanem a kognitív zavarokhoz is vezet, vagyis a mezolimbikus és a mekokortikális rendszer is érintett benne [8]. A mezolimbikus pálya projekciós területei közé az amygdala, a piriform cortex, a laterális septummagok és a nucleus accumbens tartozik [5, 9]. Míg a mekokortikális dopaminerg rendszer rostjai a frontális kéregbe és a septo-hippocampalis régiókba futnak [10]. A dopamin itt a kognitív és az érzelmi funkciók szabályozásában vesz részt, alapvető szerepet játszik a munkamemória és a figyelem fenntartásában [11].

A hipotalamusz arcuatus magja és a retina neuronjai szintén termelnek dopamint. A hipotalamuszból felszabaduló dopamin gátolja a prolaktin szintézisét és felszabadulását az agyalapi mirigy elülső részében [12]. Emellett a periférián is található dopamin a vesében, ahol értágulatot és diurézist hoz létre, valamint a sókiválasztásban is van szerepe [13].

A dopamin még igen fontos szerepet tölt be mindezek mellett az agy jutalmazási rendszerében [14]. Az állat vagy ember számára kellemes helyzetekben felszabadul és ösztönzi az élőlényt, hogy keresse azt a pozitív hatású tevékenységet, ami lehet valamilyen táplálék, szexuális vagy szociális tevékenység, de akár valamilyen drog is, így a függőségek kialakulásában is jelentős szerepe van [15–18]. Emlősökön végzett kutatások összefüggésbe hozták a jutalom-tanulást, -megerősítést és -keresést ezzel a biogén aminnal és habár gerincteleneknél kevésbé kutatott a jutalom kereső viselkedési rendszerek neurobiológiai háttere, bizonyos állatcsoportoknál (fonálférgeknél, laposférgeknél és puhatestűeknél) szintén úgy találták, hogy a dopamin részt vesz a tanulás megerősítésében és jutalmazásában [19]. Ebből a szempontból az ízeltlábúak tekinthetők kivételnek, náluk ugyanis úgy tűnik, hogy az oktopamin fontosabb szerepet tölt be, mint a dopamin [20, 21].

Számos mentális rendellenesség hátterében is állhat a dopamin. Ilyen például a skizofrénia, hiszen azt találták, hogy a dopaminerg transzmisszió hiperaktivitása összefügg ezzel a betegséggel [22]. Bizonyos hangulati zavarokban szintén szerepet játszik, a csökkent dopaminaktivitás mániához vezet, míg a megnövekedett mennyisége a depresszió bizonyos típusaihoz járul hozzá [23]. Továbbá a figyelemhiányos hiperaktivitási-zavar (ADHD) esetén is közrejátszik az alacsony dopaminszint az agyban [24].

A dopaminszintézis kiindulási molekulája vagy közvetlenül a tirozin, vagy a fenilalanin, amely tirozinná alakul a májban, illetve a dopaminerg neuronokban, majd 3,4-dihidroxi-fenilalanint (L-DOPA) képez belőle a tirozin hidroxiláz. Általában ez a lépés határozza meg a szintézis sebességét. Ezt követően az aromás aminosav-dekarboxiláz (AADC, dopadecarboxiláz) alakítja át dopaminná az L-DOPA-t. A dopaminerg neuronokban a neurotransmitter a citoplazmából speciális tároló vezikulákba kerül, majd ezekből szabadul fel a megfelelő inger hatására [25].

### 1.3. Dopamin receptorok

Öt dopamin receptort különböztetünk meg egymástól a fehérjeszerkezetük, az elhelyezkedésük és a jelátvitelük alapján (D1-D5). Ezek mindegyike G-fehérje kapcsolt. Tovább oszthatjuk őket két főbb csoportra: a D1 és a D5 tartozik az első csoportba, mert hasonló a szerkezetük és a drog érzékenységük, a D2, D3 és a D4 pedig a második csoportba, szintén a hasonló struktúrájuk miatt [26]. Abban is különböznek, hogy mekkora az affinitásuk a dopaminhoz, illetve a dopamin agonistához és antagonistához. Általánosságban elmondható, hogy a D2-es típusú receptorok affinitása jóval nagyobb, mint a D1-es típusúaké [27, 28].

Az első típusba tartozók főként  $G_s$ -fehérjéhez kapcsolódnak és adenilát-ciklázst aktiválnak, így növelve a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintjét és aktiválva a proteinkináz A-t. Ezen kívül az intracelluláris kalcium szintet is szabályozzák, például úgy, hogy stimulálják a foszfatidilinozitol-4-5-biszfoszfát hidrolízisét a foszfolipáz C-n keresztül, ezáltal növelve az inozitol-1,4,5-triszfoszfát szintjét, ami mobilizálja a kalcium készleteket, de a kalcium csatornákra egyéb módokon is hatással vannak. Továbbá a kálium csatornákat is befolyásolják, gátló hatással vannak a feszültségfüggő kálium-ion csatornákra, mivel a cAMP közvetlenül kötődik a csatornához, és így növelik a sejt ingerlékenységét [29, 30].

A másik csoportba tartozó receptorok viszont  $G_i$  fehérjéhez kapcsolódva gátolják az adenilát-ciklázst és aktiválják a kálium-ion csatornákat, valamint szintén befolyásolják a sejtben a kalcium szintet, az előző típushoz hasonlóan növelhetik is, habár a D3 és D4 receptorokról eddig csak azt mutatták ki, hogy csökkentik. [28]. Ezen kívül az arachidonsav szintézisének szabályozásában is részt vesznek, kimutatták, hogy a kalcium koncentrációjának emelkedése révén a D2-es típusú receptorok fokozhatják az arachidonsav szintézisét CHO sejtekben [31].

Az idegrendszerben a D1 típusú dopamin receptorok fordulnak elő nagyobb számban. Ezek elhelyezkedését patkány agyban vizsgálták leginkább. Nagyon magas koncentrációban figyelték meg ezen fehérjéket a nucleus accumbens, a putamen nucleus caudatus, a nucleus entopeduncularis (emberben: globus pallidus pars interna), a Calleja szigetek, a tuberculum olfactorium és a substantia nigra pars reticulata területén, ezen kívül pedig igen nagy mennyiségben találhatóak még az amygdala bizonyos részeiben, a claustrum, az endopiriform mag, az entorhinalis és a frontális kéreg, a globus pallidus, a hippocampusz, a subthalamikus és a suprachiasmikus mag, a ventális palladium, és a substantia nigra pars compacta és pars lateralis részén, de egyéb területeken is megtalálhatóak kisebb koncentrációban [32, 33]. Ezen belül a D5 (D1/b) receptorok jelentős része a frontális és parietális kéregben, valamint a hippocampusban és a gyrus dentatusban található [34, 35]. A D1 típusú receptorok jelentős szerepet játszanak a kognitív funkciók szabályozásában, például a munkamemória és a figyelem szabályozásában [13].

A D2 típusú receptorok szintén megtalálhatóak nagy mennyiségben a substantia nigrában, habár annak a pars compacta részében vannak nagyobb számban, a ventrális tegmentális területen, a globus pallidus, a tuberculum olfactorium, a caudate-putamen, a nucleus accumbens, a formatio hippocampalis területén, valamint a kisagyban, a subthalamikus magban, és bizonyos kérgi területeken [36, 37]. Ebben a csoportban a D3 receptorok főként a Calleja szigetek, az archicerebellum, a nucleus accumbens és a tuberculum olfactorium

területén helyezkednek el [38], míg a D4 receptorok nagyrészt szintén az előbb említett három területen (nucleus accumbens, tuberculum olfactorium, cerebellum), valamint a hippocampusban, a nucleus supraopticusban, a substantia nigra pars compacta részén, a caudate-putamen területén és a frontális, valamint a parietális kéregben találhatóak [35, 39]. A D2 típusú receptorokat tartják a legfontosabb poszt-szinaptikus receptornak, amely a viselkedési és extrapiramidális aktivitást közvetíti [13].

#### 1.4. DRD4 gén

A D4-es dopamin receptort kódoló gén, vagyis a DRD4 gén az egyik legintenzívebben kutatott gén a viselkedésgenetika területén. Emberben a 11-es kromoszóma rövid karján helyezkedik el, közel a HRAS génhez [40]. A receptor mind strukturális, mind funkcionális és farmakológiai tulajdonságaiban is nagyon hasonlít a D2-es dopamin receptorhoz. A gén négy exonból áll, és rendkívül sok polimorfizmust tartalmaz [41]. Az egyik leginkább kutatott polimorfizmus a harmadik exonban található 48 bázispár hosszúságú VNTR (variable number of tandem repeats), amely 2-10 ismétlődésben fordul elő a humán DRD4 génben. A leggyakoribb változatban 4 ismétlődést, a második leggyakoribban pedig 7 ismétlődést tartalmaz [42]. Azt találták, hogy a 7-szeres ismétlődési forma kevésbé hatékony a dopamin közvetítette adenilát cikláshoz való kapcsolódásban, mint a 4, vagy 2-szeres ismétlődésű változat [43]. Ez a hosszúságpolimorfizmus a figyelemhiányos hiperaktivitási zavar (ADHD), a Tourette szindróma és szerhasználati zavarok (függőségek) egyik rizikófaktora is lehet [44].

Szintén emberben vizsgálták, hogy bizonyos DRD4 polimorfizmusok, hogyan hatnak a szexuális viselkedésre és azt találták, hogy a 3. exon egy ismétlődő régiója, valamint két, promóter régióban található SNP összefüggött a szexuális vágygal és az izgalommal [45]. Ezekon kívül a már előbb említett 48 bázispáros ismétlődés is kapcsolatban lehet a reprodukív viselkedéssel, például azzal, hogy az adott ember mikor vállal gyereket, vagy létesít először szexuális kapcsolatot [46].

Ehhez hasonló polimorfizmust találtak sok főemlős fajban [47], azonban rágcsálókban például nem [48]. Kutyákban szintén azonosították a kódoló régióban egy hasonló szakaszt, amely egy 27, egy 39 és egy 12 bázispár hosszúságú szakasz ismétlődéséből áll, ami összesen 7 allélt eredményez és ezek is összefüggésbe hozhatók az impulzivitással [49, 50]. Lovaknál pedig egy 18 bázispárhosszú ismétlődést találtak, amely eltérő számban fordul elő az *Equus* nemzetség különböző fajainál és a fajokon belül is vannak különbségek. Ezen kívül lovak esetén is találtak összefüggést a temperamentum és bizonyos DRD4 polimorfizmusok között [51].

Az utóbbi évtizedben már nem csak háziállatoknál, hanem számos vadállatnál, így különböző madaraknál is vizsgálták a DRD4 gén genetikai polimorfizmusainak hatását bizonyos viselkedésekre, személyiségjegyekre, valamint a fitnessre. Igen gyakoriak például az urbanizációhoz kapcsolódó kutatások, amelyeknél azt próbálják felderíteni, hogy vajon a polimorfizmusok szintjén eltérnek-e a városi környezetben, illetve a természetes élőhelyükön élő populációk egyedei. Ilyen vizsgálatot végeztek például Wouter és munkatársai 2015-ben fekete hattyúkkal (*Cygnus atratus*), ahol azt vizsgálták, hogy a hattyúk embertől való félelme, óvatossága összefüggésbe hozható-e a DRD4 és a SERT gén polimorfizmusával, hiszen ez nagyban befolyásolja, hogy milyen valószínűséggel telepednek le városi területeken. Habár a SERT génben nem találtak az egyedek között eltérést, a DRD4 génben előforduló polimorfizmus és az óvatosság között viszont összefüggést mutattak ki, valamint azt találták, hogy a nem városi területen gyakoribbak voltak az óvatos viselkedéshez társított genotípusok [52].

Egyéb madaraknál, például az örvös légykapó (*Ficedula albicollis*) esetében azt találták, hogy összefüggés lehet a felfedező, újdonságkerülő, valamint kockázatvállaló viselkedés és bizonyos DRD4 polimorfizmusok között [53]. Mueller és munkatársai pedig napóleon-szövőmadárnál (*Euplectes afer*) fedeztek fel kapcsolatot az újdonságkereső és az újdonságkerülő aktivitás és két SNP között a DRD4 génben [54].

Az egyik első madarakon végzett viselkedésgenetikai kutatást pedig széncinegékkel (*Parus major*) végezték Fidler és munkatársai 2007-ben, akik összesen 73 polimorfizmust azonosítottak, amiből 66 SNP és 7 hosszúságpolimorfizmus volt. Ők két polimorfizmus hatását vizsgálták és azt találták, hogy a felfedező magatartás és egy, a kódoló régióban megtalálható egypontos nucleotid variáció (SNP830) között lehet valamilyen összefüggés [55]. Azonban nem minden kutatás mutatott ki szignifikáns összefüggést ezen polimorfizmus és a viselkedés között [56].



### 1.5. Széncinege (*Parus major*)



2. ábra: tojó széncinege [57]

Az egyik leggyakrabban vizsgált modellállat viselkedésgenetikai szempontból és az általunk vizsgált faj is a széncinege (2.ábra) volt.

Ez a faj egész Eurázsia és Észak-Afrika területén megtalálható, a Skandináv-félsziget északi részét és Izlandot kivéve. Hazánkban is mindenhol költ. Legideálisabb élőhelye a lomberdő, azon belül is az idősebb tölgyeseket részesíti előnyben, de költ fenyvesekben, városi parkokban, kertekben is [58].

Az időjárástól függően, április elején vagy közepén kezdi meg a tojásrakást és gyakran június elején másodszor is költ, de a másodköltés során rendszerint kevesebb tojást rak le. Azért is annyira kedvelt modellállat, mert mesterséges odúkban is előszeretettel költ, így könnyű vizsgálni. Ezen kívül különböző emberi tárgyokban, például postaládákban, különböző csövekben, kerítésoszlopban is találtak széncinege fészket, de a természetben elhagyatott faodvakba helyezi a fészket [58].

A hím tél végén általában már elfoglalja revírjét és ezt a költési időszak alatt végig védi a fajtársakkal szemben. A revír méretét a környezet befolyásolja, 2000-10000 négyzetméter is lehet. A fészkepítést egyedül végzi a tojó. Fűszálakból és gyökerekből készíti az alapját, amit mohával, szőrrel és különböző puha anyagokkal bélel ki. A tojásaik oválisak és azokat vörös foltok díszítik, de a többi cinege faj tojásaihoz képest láthatóan nagyobbak [59]. A tojások száma rendszerint 6 és 13 között mozog [58]. Egy korábbi vizsgálat során a különböző

lomberdőkben költő 758 fészekaljban az átlagos tojásszám 9,7 volt [60]. Egy másik kutatás a Pilisben 90 fészekaljat vizsgált, ahol az első költés átlagos tojásszáma 10,1, míg a másodköltésé 7,4 volt. A széncinegék számára kevésbé kedvező élőhelyen, egy égeresben pedig 61 fészekalj átlagos tojásszáma csupán 8,7 volt [61]. Úgy találták, hogy az erdeihez képest a városi környezetben kisebb a fészekalj méret, valamint a nagyobb a fiókamortalitás és kevesebb fióka éri el a kirepülési kort, ami részben a kisebb táplálékellátottságnak köszönhető [62].

A kotlás az utolsó tojás lerakását 1-3 nappal megelőzően elkezdődik és 13-15 napig tart. Egyedül a tojó kotlik és az első fióka kikelését követően pedig pár napon belül kikel a többi is. Ezután a szülők felváltva etetik a fiókákat még 20-22 napig, amíg a fiókák ki nem repülnek a fészekből. A legfontosabb élelmet ekkor a hernyók jelentik, főként a lombozatban élőket fogyasztják mint például az araszolókat, vagy a különböző bagolylepkéket. A fiókáknak sokszor úgy adják ezeket az ízeltlábúakat, hogy a kitines fejet lecsípi. A hernyókon kívül igen fontos részét képezik a táplálékuknak a különböző pókok. Ezen kívül kalciumforrásként csigahéjat vagy tojáshéjat is mindig adnak a fiókáknak. Az első költés után a fiókák a fészek közelében maradnak egészen a második költésből származó fiókák kikeléséig. Megfelelő fészkelőhelyek esetén hektáronként 1-4 pár is költhet, de túl sűrű populációban megnőhet a ragadozók, például az erdei sikló, a nagy pele, vagy a menyét által elpusztított fiókák száma [58, 59].

Kóborló és állandó madárfaj is egyben. Magyarországon a gyűrűzött cinegék túlnyomó része nem, kisebbik része viszont messzebbre is elkóborolhat (például Olaszországba) és az északabbra lévő országokban költő egyedek rendszeresen hazánkban töltik a telet [58].

Egyes állatok, köztük a széncinegék is számos eltérő környezethez képesek alkalmazkodni. Ilyen például a városi környezet is, amely sokkal több zavaró tényezőt tartalmaz az énekesmadarak számára. Az ehhez való alkalmazkodás pedig nagyban befolyásolja az egyedek fitneszét [63]. Ezen kívül a városi környezetben a fiókamortalitás általában nagyobb, valamint kisebb a madarak szaporodási sikere [62, 64, 65].

## 2. Célkitűzés

Szakdolgozatom célja az alábbi két kérdésre választ találni:

- Hogyan vizsgálhatók leghatékonyabban és legpontosabban a cinege DRD4 gén polimorfizmusai?
- Van-e összefüggés a madarak költési sikere és a DRD4 gén polimorfizmusainak változatai között?

Összesen hat, három introni (ID7054, ID8489, ID9591), két promóter régióban található (ID1213, ID15) és egy, a 3. exonban elhelyezkedő (SNP830) polimorfizmus vizsgálatát terveztük ezen kérdések megválaszolásához, amikhez részben szakirodalmi leírásokból átvett, részben új, független genotipizáló eljárásokat dolgoztunk ki. Ezáltal a jövőben már egy kidolgozott protokoll szerint, az eddigiekhez képest lényegesen gyorsabbá és könnyebben tervezhetővé válik ezeknek a polimorfizmusoknak a vizsgálata.

A második kérdés megválaszolásához pedig egy, már több éves adatsor (2012-2021) költési adataival hasonlítottam össze a különböző polimorfizmusokat. Eddigi kutatások alapján elmondható, hogy lehet összefüggés a madarak újdonságkereső, valamint kockázatvállaló viselkedése és bizonyos DRD4 polimorfizmusok között [53], ezért is találtuk érdemesnek megvizsgálni, hogy ez befolyással van-e a költési sikerükre, hiszen a különböző környezethez való alkalmazkodásban és a fiókanevelésben igen nagy szerepet játszanak ezek a viselkedésbeli tulajdonságok és korábbi kutatások azt találták, hogy a jobban és a kevésbé kockázatvállaló szülők különböző reprodukív teljesítményt nyújtanak [66].

### 3. Módszerek

#### 3.1. A költési siker felmérése

A széncinegék felmérése összesen hat helyen zajlott, három városi, két erdei és egy szuburbán területen. A városi területek Veszprém, Balatonfüred és Budapest voltak, az erdeiek pedig Szentgál, Vilma-pusztá, míg Gulya-domb volt a szuburbán terület.

A költési siker vizsgálatához rendszeresen ellenőrizték a mesterséges odúkat. Március második felétől heti egyszer történt a fészkek monitorozása, majd pedig az első tojás lerakását követően hetente kétszer ellenőrizték azokat, hogy minél pontosabban meg lehessen határozni a kelés idejét. A szülők azonosítása, valamint a fiókák gyűrűzése is megtörtént a megfelelő időben (14-16 napos korban). Továbbá rögzítették a tojások, az élő és a halott fiókák számát, valamint az első tojás lerakásának idejét. Ezen kívül a széncinege pároktól pár csepp vért vettek a gyűrűzés során, amelyet a felhasználásig 500 µl 96 %-os etanolban, 20°C-on tároltunk.

#### 3.2. Genotipizálás

A genetikai vizsgálatokhoz vérből izolált DNS-t használtunk. Az izolálás az Állatorvostudományi Egyetem Ökológia Tanszékén történt az E.Z.N.A.<sup>®</sup> Tissue DNA Kit (Omega Bio-tek Inc.) DNS izoláló kit segítségével.

A DRD4 gén polimorfizmusainak vizsgálatát pedig a Semmelweis Egyetem Molekuláris Biológiai Tanszékén végeztük. Az SNP830, valamint az ID15 polimorfizmust az irodalomban feltüntetett primerekkel, és az SNP830 esetében az ott leírt restriktációs endonukleázzal vizsgáltuk [55, 67], míg a többi polimorfizmus genotipizálásához új primereket és eljárást dolgoztunk ki Mueller és munkatársai 2013-as cikke alapján [54].

##### *3.2.1. Hosszúság polimorfizmusok vizsgálata – „hagyományos módszer”*

A hosszúság polimorfizmusok, más néven VNTR-ek (Variable number of tandem repeats) genotipizálása rendszerint megvalósítható a vizsgált régió PCR-rel (polimeráz lánreakció) történő amplifikálásával, melynek során a termékek különböző hosszúságúak lesznek, hiszen ezen genetikai variációk esetén a kérdés éppen az ismétlődési szám, vagyis az érintett régió hossza. Ezt a különbséget pedig gélelektroforézis segítségével, a megfelelő molekulatömeg markerek használatával (DNS létra, amely különböző ismert hosszúságú DNS fragmentumokat tartalmaz) optimális esetben láthatóvá tudjuk tenni [68].

Ezzel a módszerrel vizsgáltuk az ID7054, 48 bp-os és az ID8489, 12 bp-os VNTR polimorfizmust. Az 1. táblázatban láthatóak ezen polimorfizmusok elemzése során alkalmazott primerek szekvenciái és a PCR termékek várható mérete.

1. táblázat: Az ID7054 és az ID8489 polimorfizmusok genotipizálása során alkalmazott PCR-primerek és termékek

Polimorfizmus	Primer szekvencia (5' → 3')		Termék mérete (bázispár)
ID7054	forward	ACCAGAATGGGCTGACTTAGAA	427 / 475
	reverse	CTATAAACCCCTTCCCTTCCCCA	
ID8489	forward	GGGTTTGTACCTGGGTGAGA	200 / 212
	reverse	ACCTGGAAATGTTGGCTCTG	

### 3.2.2. Hosszúság polimorfizmusok vizsgálata – RFLP

Két másik hosszúság polimorfizmus esetén eltérő módszert kellett alkalmaztunk, mivel a két változat között kisebb volt a különbség (6 bp és 15 bp), így a hosszú és a rövid változat hagyományos gélelektroforézissel nem volt egyértelműen elkülöníthető. A genotípusok megbízhatóbb elemzése érdekében restriktív endonukleáz alkalmazásán alapuló eljárásokat állítottunk be. Ezek az enzimek a szekvencia meghatározott, rövid (rendszerint 4-8 bp-os) részletét felismerik és egy bizonyos helyen hasítják a DNS láncot [69]. Olyan enzimeket választottunk, melyek felismerő helye az egyik allél esetén jelen van, a másik változatnál azonban eltűnik a polimorf régióban, így a genotípustól függő hasítási mintázatot kaptunk. Ezen módszer során az előzőhöz hasonlóan először PCR segítségével felszaporítottuk azt a régiót, amely az adott polimorfizmust tartalmazta, majd a kapott terméket hasítottuk a megfelelő restriktív endonukleázzal, azután pedig gélelektroforézis segítségével tudtuk vizsgálni. Tehát ezzel a módszerrel már könnyen elkülöníthetőek voltak a rövid és a hosszú változatok, az eltérő hosszúságú hasítási termékeknek köszönhetően.

Ezen eljárással genotipizáltuk az ID1213, 6 bp hosszú és az ID15, 15 bp hosszúságú VNTR polimorfizmusokat. Az ID15 polimorfizmus gélképeinek elemzése során azonban felmerült, hogy a restriktív enzim kontroll hasítóhelyén, 113 bázispárral a VNTR előtt, egy A/G SNP található, így a továbbiakban egyszerre terveztük vizsgálni a két polimorfizmust.

A hozzájuk tartozó primerek szekvenciája, valamint a keletkezett PCR termékek mérete a 2. táblázatban olvasható.

2. táblázat: Az ID1213 és az ID15 polimorfizmusok elemzése során alkalmazott primerek szekvenciái

Polimorfizmus	Primer szekvencia (5' → 3')		Termék mérete (bázispár)
ID1213	forward	TCACATCTGGGCTGAGGTTT	338 / 344
	reverse	GCAGGATGCACTTCAAAGG	
ID15	forward	CCTCTGGAAGCAGAATTTGAGGA	269 / 254
	reverse	GCCCCAAAGTTCCTTACTCTT	

A PCR termékeket 37°C-on 1 órán keresztül emésztettünk. A polimorfizmusok genotipizálása során használt restrikciós endonuleázokat és felismerőhelyeiket, valamint a rövid és a hosszú allélváltozatok jelenléte esetén képződő termékek méretét pedig a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat: Az ID1213 és az ID15 polimorfizmusok elemzése során alkalmazott restrikciós endonukleázok

Polimorfizmus	Restrikciós enzim neve	Felismerőhelye	Keletkezett termék hossza (bázispár)	
ID1213	<i>AluI</i>	AG <sup>^</sup> CT	hosszú	30, 30, 261, 23
			rövid	30, 30, 143, 112, 23
ID15	<i>HpyCH4 V</i>	TG <sup>^</sup> CA	hosszú + G allél	86, 125, 58
			rövid + G allél	86, 168
			hosszú + A allél	211, 58
			rövid + A allél	254

### 3.2.3. Hosszúság polimorfizmusok vizsgálata – real-time PCR

A real-time PCR, vagy valós idejű polimeráz láncreakció kvantitatív meghatározást tesz lehetővé és a képződött termékeket az amplifikáció során folyamatosan detektáljuk. Ez fluoreszcens festékek (interkalátorok) vagy szekvencia-specifikus próbák segítségével valósítható meg, amelyek interkalálódnak a DNS két szála közé, ami által mindegyik ciklus után meghatározható a PCR termék mennyisége, hiszen az is arányosan emelkedik a fluoreszcens szignál növekedésével. Szekvencia specifikus próbák alkalmazása által lehetővé válik a szekvencia-, vagyis az allélfüggő szignál létrehozása és így több, különböző próba alkalmazásával akár multiplex PCR reakció is végrehajtható [70].

Az általunk alkalmazott TaqMan vagy hidrolízis próba (assay) egy olyan egyszálú oligonukleotid molekula, mely kettősen jelölt. Az 5' végén található a fluoreszcens molekula, a riporter, ami által kibocsájtott jelet azonban, intakt próba esetén, a mellette található quencher (kioltó) gátolja. [71]. Általában a riporter és quencher körülbelül 3-6 bp távolságra helyezkedik el egymástól, mivel ennél közelebb az energiaátadás már nem lenne hatékony [72]. A PCR-termékkel arányos intenzitású jel létrehozásának alapja az, hogy a PCR extenziós lépése során a Taq DNS polimeráz exonukleáz aktivitása lebontja a próbát, ha az a specifikus célponthoz, vagyis a bázissorrendjének megfelelően, a két primer által közrefogott szakaszon a minta DNS-hez hibridizálódik. Ekkor a riporter és a quencher elválik egymástól, a quencher gátló hatása megszűnik és egy kimutatható fluoreszcens szignál jön létre. A PCR előrehaladtával, illetve a PCR-termékek keletkezésével párhuzamosan pedig egyre magasabb intenzitású szignál mérhető [73].

Ezt az elvet használtuk ki az ID9591 4bp-os polimorfizmus vizsgálata során. Az igen rövid méretkülönbség miatt a „hagyományos” PCR és azt követő elektroforézis eljárás ebben az esetben sem bizonyult alkalmazhatónak. A rövid és a hosszú változat szekvenciája a fent bemutatott restrikciós endonukleáz alkalmazásán alapuló eljárást sem tette lehetővé, mivel a 4 bázispárnyi szakasszal azonos bázissorrendű régió a rövid változatban is jelen van a polimorfizmus helyén. Sikerült viszont olyan TaqMan próbákat terveznünk, melyek specifikusan a rövid vagy a hosszú változathoz tudnak hibridizálni, így a két allél a real-time PCR során jól elkülöníthető volt egymástól. A reakcióelegy ennek megfelelően a 2 PCR-primer mellett a két különböző allélra specifikus próbát tartalmazta (4. táblázat).

A Quant Studio 12K Flex real-time PCR berendezést használtuk. A termociklus során 10 perc denaturációt követően (95°C) az anneálás és az extenzió egy lépésben történt, 60 °C-on.

Az 4. táblázatban tüntettem fel az ehhez a polimorfizmushoz tartozó primerek és próbák szekvenciáit.

4. táblázat: Az ID9591-es polimorfizmus genotipizálása során alkalmazott primerek és TaqMan próbák

Primer	Szekvencia (5' → 3')
forward	AACACAGCCCTGGATGAGTCA
reverse	CCAGGCCTCGACTGTTTGTA
hosszú allélre specifikus próba	(5'FAM)CTTGTCACTGTCCTTCCCTCCCTCATT(3'BHQ1)
rövid allélre specifikus próba	(5'HEX)CTCCTTGTCACTGCCCTTCCCTCATT(3'BHQ1)

#### 3.2.4. SNP vizsgálata – RFLP

Az egy pontos nukleotid variációk (SNP) kimutatására többféle módszer is létezik. Ilyen például az allél-specifikus amplifikáció, vagy a már korábban bemutatott RFLP (restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus) [68]. Ez utóbbit alkalmaztuk az SNP830 polimorfizmus vizsgálatához. Az eljárás lényege, hogy az egyik allél létrehozza, a másik pedig megszünteti a restrikciós endonukleáz hasítóhelyét, így a régió PCR-amplifikációját és a termékek restrikciós enzimmel történő emésztését (37 °C – 3 óra) követően a gélelektroforézis során allél-specifikus hasítási mintázatot figyelhetünk meg.

Az 5. táblázatban láthatóak azon primerek szekvenciái és a restrikciós enzim, amelyet az SNP830 vizsgálatához használtunk.



5. táblázat: Az SNP830 polimorfizmus elemzése során alkalmazott primerek és restrikciós endonukleáz, valamint a képződő termékek hossza

Primer szekvencia (5' → 3')		Termék mérete (bázispár)	
forward	AAGCTGAGAGGCTGCATCTATGG	222	
reverse	GTTGATCTTGGCCCGCTTGTG		
Restrikciós enzim neve	Felismerőhelye	Keletkezett termékek mérete (bázispár)	
Nae I	GCC <sup>^</sup> GGC	C allél esetén	117, 105
		T allél esetén	222

### 3.2.5. PCR és gélelektroforézis

A genotipizálás során a PCR reakcióelegyek a következő összetevőket tartalmazták: az adott polimorfizmushoz tartozó primerek, 2mM dATP, dCTP, dGTP és dTTP (dezoxiribonukleozid-trifoszfát szubsztrátok), Q-oldat, 10× puffer, amelyek az enzim megfelelő működéséhez szükségesek, víz, 5U/μl HotStarTaq DNS polimeráz, valamint nagyjából 10 ng genomi DNS.

10 μl végtérfogatban állítottuk össze a PCR reakcióelegyet, amely az ID15 polimorfizmus esetén 8 μl mixet és 2 μl hígított (2x-es, 5x-ös, vagy 10x-es hígítás) vagy tömény (a koncentrációtól függően) DNS-t, míg az ID8489, az ID7054, az ID1213, ID9591 és az SNP830 esetében pedig 9 μl mixet és 1 μl DNS-t tartalmazott.

A mérések során a következő termociklusokat alkalmaztuk: 95°C-on 15 perc denaturáció, illetve „hot start” DNS-polimeráz aktiválás, 40-45 ciklus: 94°C-on, 30 másodperc denaturálás; 30 másodperc primertapadás a különböző polimorfizmusnak megfelelő hőmérsékleten (ID7045: 60°C, ID8489: 58°C, ID1213: 58°C, ID15: 58°C, SNP830: 62°C) és 72°C-on, 1 perc extenzió, majd végül 10 perc polimerizáció 72°C-on.

A PCR, illetve az emésztés elvégzése után a keletkező termékeket horizontális agaróz gélelektroforézissel méretük szerint elválasztottuk, és láthatóvá tettük. A termékek várható nagysága alapján kétféle gélt alkalmaztunk (6.táblázat). Egyrészt 2,5%-os agaróz gélt, amely a nagyobb fragmentumok (100 bp-nál hosszabb) elválasztására alkalmas és technikailag

könnyebben kezelhető, mivel nem törékeny. Néhány polimorfizmus esetén azonban kevert, 1,5% agaróz–2% metaphor agaróz gélen futtattuk a mintákat, amely az alacsonyabb mérettartományban (10-500bp) jóval nagyobb felbontású elválasztást is lehetővé tett, így viszonylag kis méretkülönbségek kimutatása is eredményesen megvalósítható volt. A géleket 1× TAE (10 mM Tris-acetát (pH = 8,5) és 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA) puffer alkalmazásával készítettük, ugyanezt az oldatot használtuk az elektroforetikus kádak feltöltésére is.

6. táblázat: Gélelektroforézis beállítások a különböző polimorfizmusok esetén

Polimorfizmus	Gél összetétel	Áramerősség	Futtatás ideje
ID7054	2,5% agaróz	100V	45 perc
ID8489	2% metaphor – 1,5% agaróz	110V	60 perc
ID1213	2,5% agaróz	100V	45 perc
ID15	2% metaphor – 1,5% agaróz	100V	45 perc
SNP830	2% metaphor – 1,5% agaróz	110V	60 perc

A gélelektroforézis után megfestettük géleket egy etídiumbromidot tartalmazó TAE pufferben 15 percen keresztül, majd UV fény segítségével láthatóvá tettük az eredményeket. Ehhez a Bio-Rad Gel-Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories Inc.) rendszert használtuk, amellyel fényképet készítettünk a gélekről és ez alapján végeztük a genotipizálást.

### 3.3. Statisztika

#### 3.3.1. Hardy–Weinberg egyensúly tesztelése

Mindegyik polimorfizmus esetén a kapott allélfrekvenciaértékek alapján a GenA1Ex nevű excel bővítmény [73] segítségével kiszámoltuk a Hardy–Weinberg egyensúly esetén fennálló genotípus eloszlásokat és ezeket  $\chi^2$ -próbával összehasonlítottuk a tényleges értékekkel.

#### 3.3.4. *Genotípusok hatása a költési sikerre*

A költési siker vizsgálatához lineáris kevert modellt készítettünk R statisztikai környezetben. [74]. A következő csomagokat használtuk az elemzésekhez: lme4 [75], performance [76], car [77], nnet [78], epitools [79], emmeans [80].

A modellekben a függő változók a gyűrűzési kort megélt fiókák száma, a kirepült fiókák száma, valamint tojók esetén még a tojások és a kikelt fiókák számai is voltak. A magyarázó változók pedig a polimorfizmusok és azokon kívül a szülők ivara, a költés helyszíne (városi, erdei, szuburbán), és a költési sorrend, vagyis, hogy első, vagy másodköltésből származnak-e a fiókák. Ezeken kívül még az év és a fészek azonosítója mint random hatás szerepelnek a modellekben. A fészek azonosítóval kontrollálni tudtunk arra, hogy egy költőpár hím és tojó tagjának az utódszáma nem független egymástól.

Valamint szintén tojó madaraknál vizsgáltuk a költés megkezdését, vagyis az első tojás lerakásának idejét az első költés és a másodköltés során. Ehhez magyarázó változóink a polimorfizmusok voltak, valamint a helyszín és a random hatás pedig az év.

A genotípusok összehasonlításához még post-hoc tesztek is végeztünk az emmeans függvény segítségével, amelyben FDR (false discovery rate) p-érték korrekciót alkalmaztunk [81].

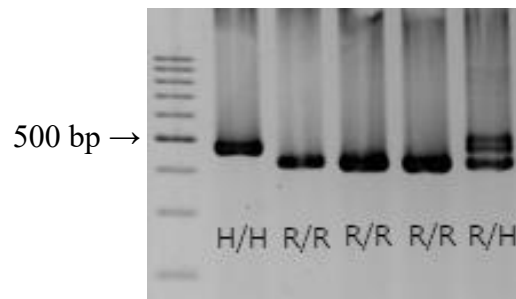
A különböző élőhelyeken költő cinegék genotípuseloszlását Fisher-féle egzakt próbával hasonlítottuk össze és a szignifikanciaszintet minden esetben 5%-nál húztuk meg.

## 4. Eredmények

### 4.1. Genotipizálás

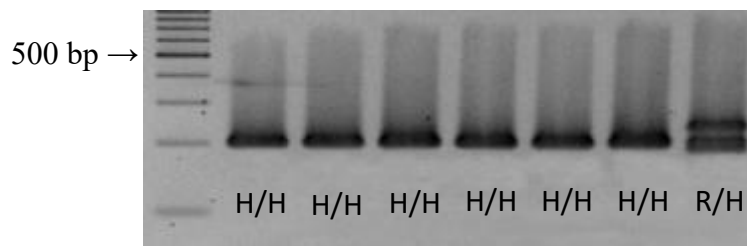
Összesen 198 minta állt rendelkezésünkre (városi területről 100, szuburbán területről 35, erdei helyszínről 63), amelyből mindössze egy volt, amelyet semelyik polimorfizmusra sem sikerült genotipizálnunk. Tehát a genotipizáló eljárások kidolgozása sikeresnek volt mondható, hiszen mind a hat polimorfizmus esetén azonosítani tudtuk a madarak többségének genotípusát, az ID15 közelében található SNP genotipizálásához azonban még további vizsgálatok szükségesek, mert az általunk alkalmazott módszer során nem minden esetben volt egyértelműen azonosítható az adott allélváltozat, így a dolgozatomban csak a biztosabb hosszúságpolimorfizmust vizsgálom.

### 4.2. Hardy–Weinberg egyensúly tesztelése



3. ábra: ID7054 polimorfizmus gélképe

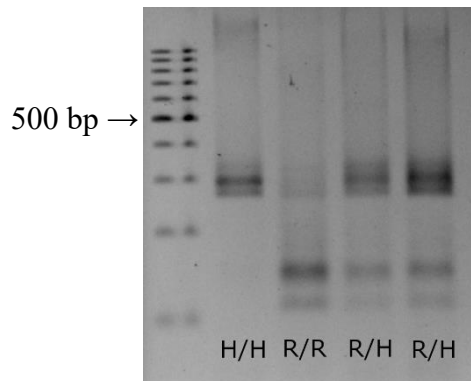
Az ID7054 polimorfizmusnál (3.ábra) 189 egyed genotipizálása volt sikeres. 95 rövid-rövid (R/R) homozigóta, 82 heterozigóta (R/H), és 12 hosszú-hosszú (H/H) homozigóta egyedet azonosítottunk, és ezeket összevetettük a Hardy–Weinberg egyensúly (HWE) alapján várható genotípuseloszlással (R/R: 97,86; R/H: 76,28; H/H: 14,86) és nem találtunk szignifikáns eltérést ( $p = 0,3021$ ) a kapott és a várt értékek között.



4. ábra: ID8489 polimorfizmus gélképe

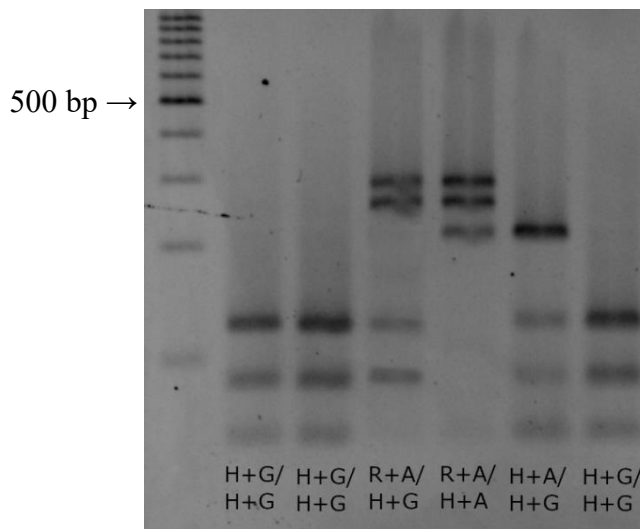
Az ID8489 polimorfizmusnál (4.ábra) 190 mintát sikerült genotipizálnunk, de csupán 1 R/R, míg 31 R/H és 157 H/H genotípusú egyedet azonosítottunk. A HWE mellett várható eloszlástól

(R/R: 1,44; R/H: 30,12; HH: 157,44) nem tér el szignifikánsan a kapott genotípuseloszlás ( $p = 0,6876$ ).



5. ábra: ID1213 polimorfizmus gélképe

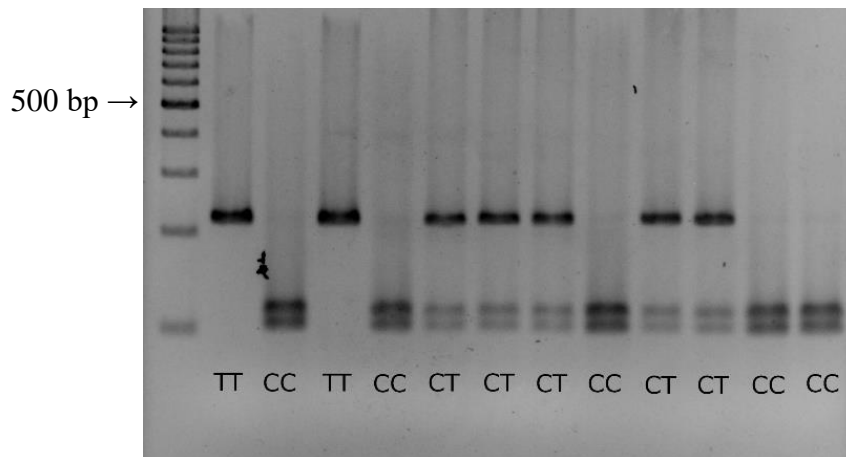
188 mintát genotipizáltunk az ID1213 polimorfizmusnál (5.ábra), ebből 4 R/R, 52 R/H, és 132 H/H genotípusú volt. Összehasonlítva a HWE fennállása esetén várható genotípuseloszlással (R/R: 4,79; R/H: 50,43; H/H: 132,79) itt sem találtunk szignifikáns különbséget ( $p = 0,719$ ).



6. ábra: ID15 polimorfizmus gélképe

(H: hosszú, R: rövid, G: SNP-re nézve G, A: SNP-re nézve A)

Az ID15 polimorfizmusnál (6.ábra) 179 minta azonosítása sikerült, ebből 34 R/R, 36 R/H, és 109 H/H genotípusú volt. Ezt összevetettük a HWE alapján várható eloszlással (R/R: 15,11; R/H: 73,79; H/H: 90,11) és habár szignifikáns eltérést találtunk ( $p < 0,001$ ), mivel a széncinegéknel erősen hat a szelekció, így a további elemzésekben benne hagytam ezt a változót is.

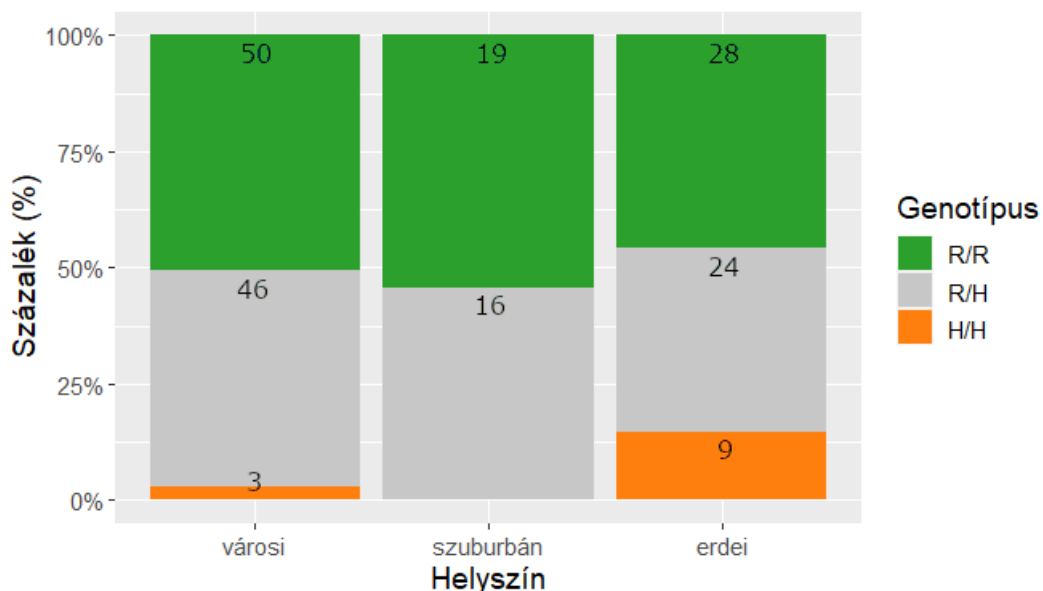


7. ábra: SNP830 gélképe

Az SNP830 polimorfizmus (7.ábra) esetén 191 minta genotipizálása volt sikeres, 72 CC, 96 CT és 23 TT genotípusú egyedeket azonosítottunk. Ez az eloszlás nem tér el szignifikánsan ( $p = 0,2932$ ) a HWE esetén várhatótól (CC: 75,39; CT: 89,21; TT: 26,39).

Az ID9591 polimorfizmusnál 181 mintát sikerült azonosítanunk, ebből mindössze 1 volt H/H és 24 R/H, valamint 156 R/R genotípusú. Ezt összehasonlítva a HWE alapján várható genotípuseloszlással (H/H: 0,93; R/H: 24,13; R/R: 155,93) nem találtunk szignifikáns eltérést a kapott és a várt értékek között ( $p = 0,9411$ ).

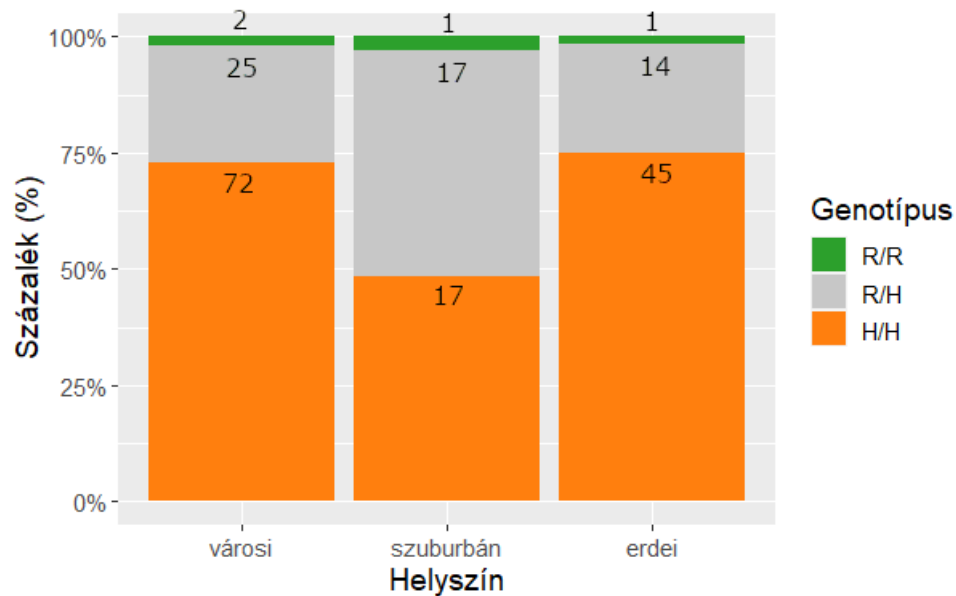
#### 4.3. Genotípuseloszlások a különböző élőhelyeken



8. ábra: ID7054 genotípuseloszlása élőhely szerinti bontásban

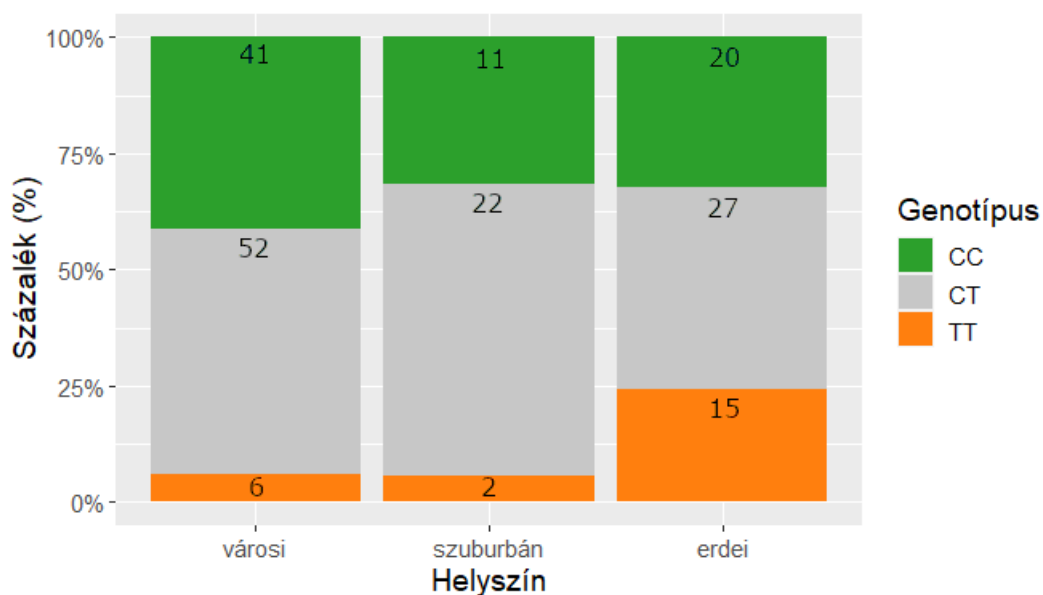
A 8. ábrán látható, hogy szinte csak az erdei élőhelyen találtunk H/H genotípussal rendelkező madarakat, a másik két genotípus hasonló arányban fordult elő a három helyszínen. A Fisher-

féle egzakt próba eredményeül azt kaptuk, hogy az ID7054 polimorfizmus genotípuseloszlása szignifikánsan eltér a különböző élőhelyeken ( $p = 0,0344$ ).



9. ábra: ID1213 genotípuseloszlása élőhely szerinti bontásban

A diagrammon (9.ábra) megfigyelhető, hogy a szuburbán területen a H/H genotípusú madarak kisebb arányban voltak jelen, mint a többi élőhelytípusban és a R/R genotípusú cinegék száma elenyésző mindhárom élőhelyen. A próba alapján elmondható, hogy az ID1213 polimorfizmus genotípusainak eloszlása szignifikánsan függ a helyszíntől ( $p = 0,0473$ ).



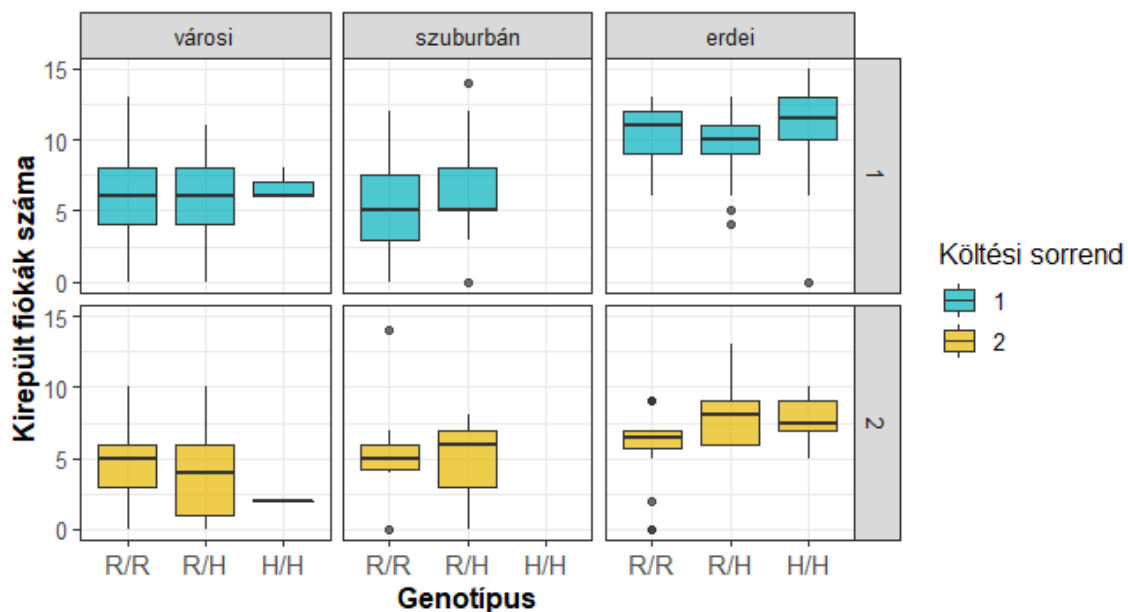
10. ábra: SNP830 genotípuseloszlása élőhely szerinti bontásban

A 10. ábrán látható, hogy a TT genotípus nagyobb számban fordult elő az erdei helyszíneken, és mindenhol a heterozigóták voltak túlsúlyban. Az SNP830 esetén is szignifikáns eltérést kaptunk a genotípuseloszlásban a különböző élőhelyeken ( $p = 0,0094$ ).

Az ID8489 ( $p = 0,7232$ ), az ID15 ( $p = 0,4967$ ) és az ID9591 ( $p = 0,0599$ ) esetében azonban nem találtunk szignifikáns eltérést az egyes élőhelyeken a genotípuseloszlásban.

A különböző élőhelyeken a genotípuseloszlásokat a mellékletben tüntettem fel (7-12. táblázat).

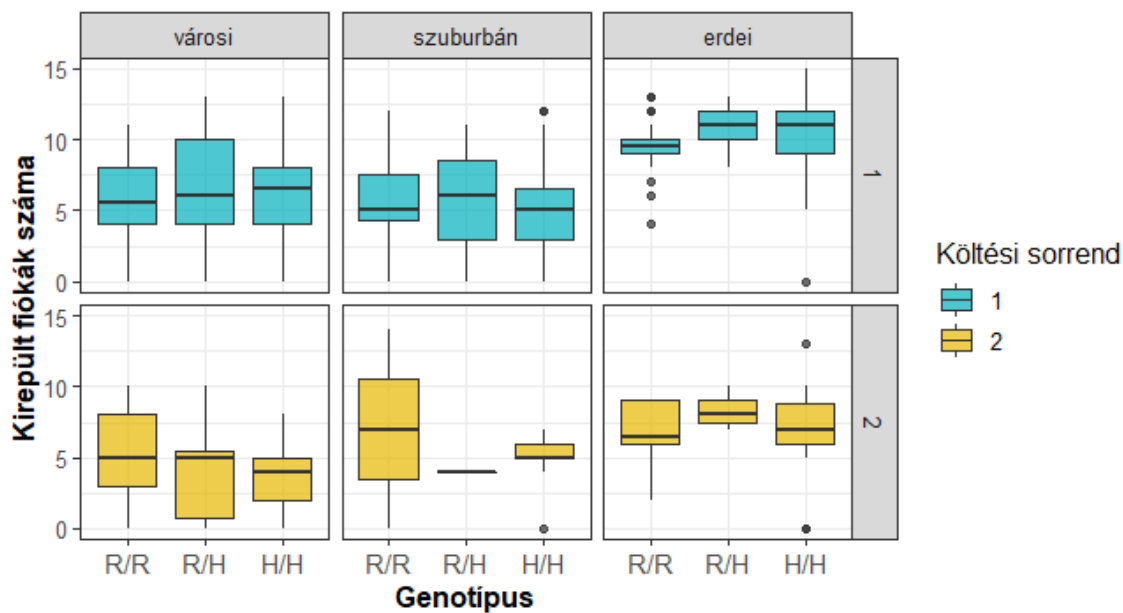
#### 4.4. A modellek eredményei



11. ábra: Kirepült fiókák száma az ID7054 polimorfizmus esetén

A 11. ábrán látható, hogy a városi környezetben a kirepült fiókák számának mediánja hasonló mindhárom genotípus esetén, habár másodköltés alkalmával a R/R genotípusú madaraknál nagyobb volt, mint a másik két változatnál. A szuburbán területen a H/H genotípus hiányzott és a másik két genotípus esetén nem figyelhető meg jelentős eltérés, bár a R/H genotípusnál nagyobb volt a szórás. A boxplotok alapján az erdei helyszínen az első költés esetén a H/H genotípusú madaraknál volt a legtöbb, a heterozigótáknál a legkevesebb kirepült fióka, míg a másodköltésnél a R/H genotípusú madarak voltak főlegnyben a kirepült fiókák számát tekintve.

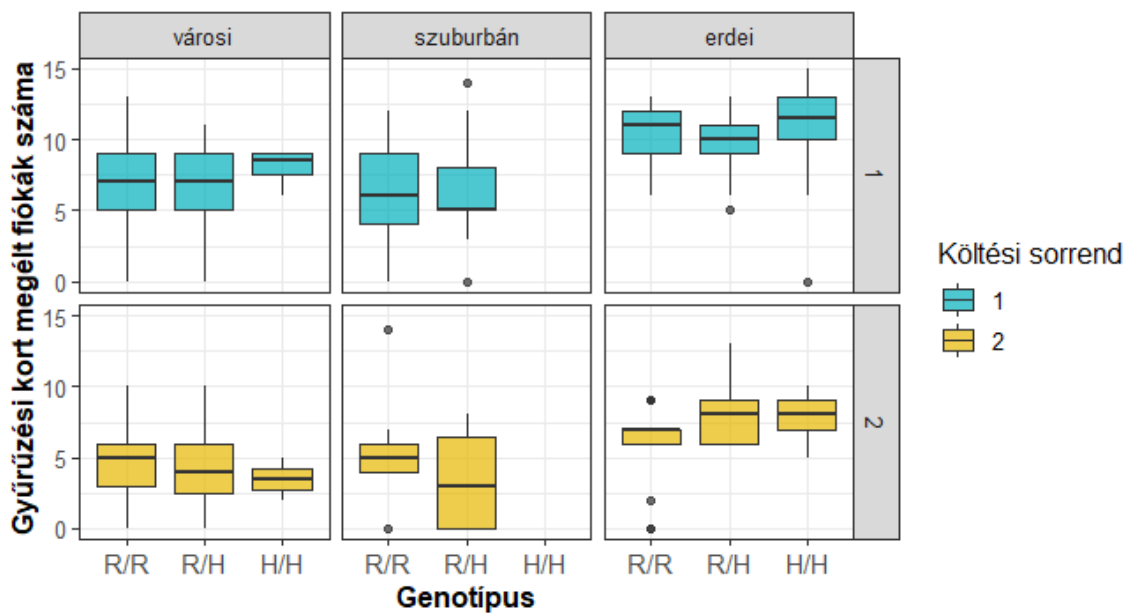




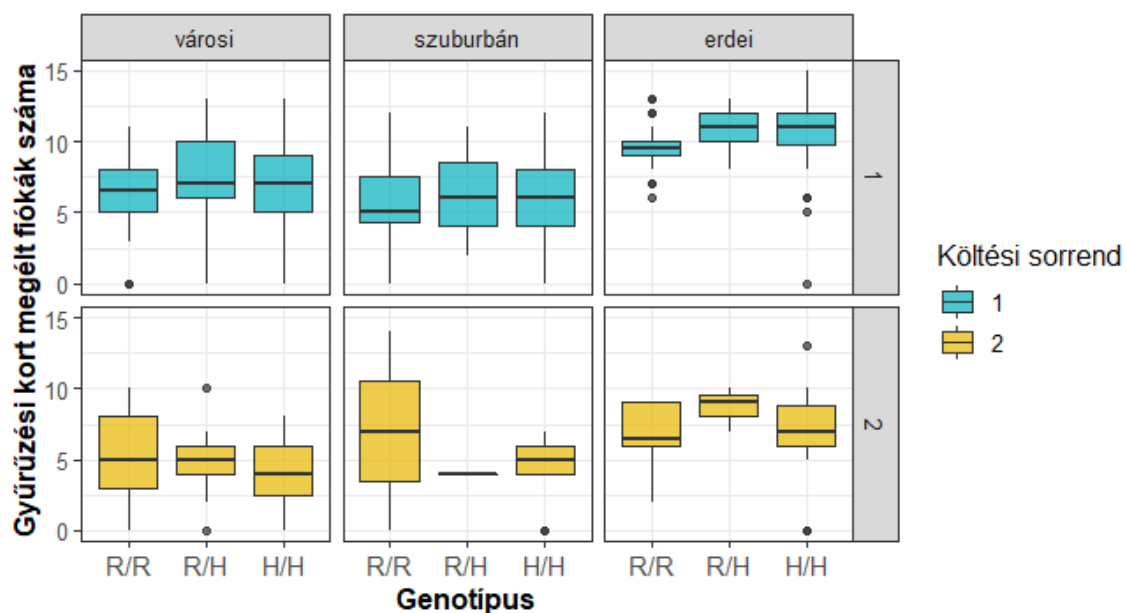
12. ábra: Kirepült fiókák száma az ID15 polimorfizmus esetén

A boxplotokon (12.ábra) megfigyelhető, hogy a H/H genotípus esetén a kirepült fiókák számának mediánja a szuburbán területen kisebb, valamint a másodköltés alkalmával a városban is, mint a R/R genotípus esetén, valamint a R/H genotípusnál a medián a legtöbb esetben nagyobb, mint a másik két változatnál. Ezen kívül látható, hogy az erdei élőhelyen a mind a R/R, mind a H/H genotípusú madarak kirepült fiókáinál több kiugró érték is található.

A lineáris kevert modell alapján a kirepült fiókák száma szignifikánsan kisebbnek bizonyult az ID15 polimorfizmusnál a H/H genotípus esetén ( $p = 0,0106$ ), valamint az ID7054 polimorfizmusnál a R/H genotípus esetén ( $p = 0,0044$ ), mint a R/R genotípusnál. Az erdei élőhelyen ( $p = 0,0426$ ) szignifikánsan magasabb volt a kirepült fiókák száma, valamint a másodköltés alkalmával szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult ez a szám ( $p < 0,001$ ).



13. ábra: A gyűrűzési kort megélt fiókák száma az ID7054 polimorfizmus esetén



14. ábra: A gyűrűzési kort megélt fiókák száma az ID15 polimorfizmus esetén

A gyűrűzési kort megélt fiókák számánál hasonló tendencia figyelhető meg az ID7054 (11. ábra) és az ID15 (12. ábra) polimorfizmusnál is, mint a kirepült fiókák számánál.

A gyűrűzési kort megélt fiókák számára a modell alapján szintén hatása van bizonyos genotípusoknak, az ID15 polimorfizmus esetén a H/H genotípusú ( $p = 0,0127$ ), és az ID7054 polimorfizmusnál a R/H genotípusú ( $p = 0,0049$ ) madaraknál szignifikánsan kisebb volt ezen változó értéke, mint a R/R genotípus esetén. A kirepült fiókákhoz hasonlóan az erdei élőhelyen

szignifikánsan magasabb volt ( $p = 0,0464$ ), valamint szignifikánsan alacsonyabb ( $p < 0,001$ ) volt a másodköltésnél a gyűrűzési kort megélt fiókák száma.

A tojók esetében vizsgált tojásszám és a genotípusok között nem találtunk szignifikáns összefüggést ( $p > 0,05$ ). A tojásszámok szignifikánsan alacsonyabbak ( $p < 0,001$ ) voltak a másodköltés során és az erdei élőhelyen szignifikánsan magasabb ( $p < 0,001$ ) értéket mutattak, mint a városi élőhelyen.

Szintén a tojó madaraknál a modell alapján elmondható, hogy nincs szignifikáns hatása a különböző genotípusoknak a kikelt fiókák számára egyik polimorfizmus esetén sem, azonban ezen változó értéke is szignifikánsan magasabb ( $p < 0,001$ ) volt az erdei élőhelyen, mint a városban és szignifikánsan alacsonyabb ( $p < 0,001$ ) volt a másodköltés során.

A költés kezdetét külön vizsgáltuk az első és a másodköltésre. Eredményül pedig azt kaptuk, hogy az első költés során az ID15 polimorfizmusnál H/H genotípusú madarak szignifikánsan hamarabb rakták le az első tojást, mint a R/R genotípusúak ( $p = 0,0021$ ). Másodköltés esetén azonban szignifikánsan később kezdték el a költést az ID15 polimorfizmusra H/H genotípussal rendelkező egyedek, mint a R/R genotípussal rendelkezők ( $p = 0,0068$ ). A többi polimorfizmus és az első tojás lerakásának ideje között egyik esetben sem találtunk szignifikáns összefüggést ( $p > 0,005$ ).

A genotípusok post-hoc összehasonlításai mindegyik modell esetén megerősítették a kapott eredményeket. A mellékletben olvashatók ezen elemzések pontos eredményei (13-18. táblázat).

## 5. Diszkusszió

Korábbi kutatások azt mutatták, hogy bizonyos DRD4 polimorfizmusoknak hatása lehet a madarak viselkedésére, például kockázatvállalására, valamint újdonságkeresésére [53–55]. Az utóbbi években pedig a széncinege vált az egyik leggyakrabban vizsgált modellállattá ezekben a kutatásokban és náluk is találtak összefüggést ezen gén és bizonyos viselkedésbeli tulajdonságok között [55].

Egy az általunk is vizsgált polimorfizmusról, a 3. exonban található SNP830-ról már korábban kimutatták, hogy a költési időszakban hatással lehet a cinegék viselkedésére, ugyanis azt találták, hogy a hímek a T allél megléte esetén kockázatvállalóbb viselkedést mutattak, tojók esetén viszont nem volt kapcsolat ezen változók között [55, 67]. Korábbi kutatásnál azonban ez az asszociáció nem függött az ivartól [56]. Továbbá azt is találták, hogy a CT heterozigóták szignifikánsan több riasztást produkáltak stresszhelyzetben, mint a homozigóták [82]. Ezek a tulajdonságok hatással lehetnek a költési sikerre is, hiszen például a fészek védelmében, valamint a fészkelési hely kiválasztásában és az utódnevelésben is szerepet játszhatnak. Korábbi kutatások azt találták, hogy kormos légykapóknál (*Ficedula hypoleuca*) a szülő madarak viselkedését jelentősen megváltoztatta, ha stressznek voltak kitéve és ez káros hatással volt az utódokra [83]. Ennek alapján elmondható, hogy a stresszre adott válaszreakció, ami függ a madarak genotípusától is, hatással lehet a költési sikerre. Egy 2018-ban végzett kutatás a SERT génben vizsgált SNP-k és bizonyos szaporodási jellegek, mint például a tojásrakás kezdete, valamint a fiókák száma között talált szignifikáns összefüggést, azonban DRD4 gén polimorfizmusok és a költési siker között eddig még nem mutattak ki kapcsolatot [84]. Esetünkben ezen polimorfizmusról (SNP830) a különböző genotípusoknak közvetlenül nem volt hatása a költési sikerre, azonban az élőhelyek között szignifikáns eltérést találtunk a genotípuseloszlásban, így elképzelhető, hogy az élőhelyválasztásra hatással lehetett, hogy milyen a madarak genotípusa, ami közvetve befolyásolhatta a költési sikert is. Viszont nem kizárható, hogy ezt az eredményt a különböző élőhelyeken eltérő mintaelemszámok idézték elő. Az eddigi tanulmányokkal ellentétben [55, 56, 67] a mi kutatásunkban CC genotípusú madarak fölényben voltak a TT genotípusúakhoz képest, de heterozigóta túlsúly volt megfigyelhető a mi esetünkben is.

Egy másik, a szakirodalomban szintén vizsgált polimorfizmus a promóter régióban található ID15, amelynél Fidler és munkatársai ugyancsak találtak összefüggést a felfedező magatartással [55], azonban nem minden kutatásnak sikerült ezt bizonyítani [56]. Eredményeink alapján elmondható, hogy lehet valamilyen kapcsolat a cinegék ID15

polimorfizmusa és a költési sikere között, ugyanis azt találtuk, hogy mind a kirepült fiókák száma, mind pedig a gyűrűzési kort megélt fiókák száma szignifikánsan kisebb volt a H/H genotípusú egyedeknél, azonban a tojások számában, valamint a kikelt fiókák számában nem találtunk ilyen különbséget az egyes genotípusok között, ami arra utalhat, hogy a fiókanevelés későbbi szakaszában érvényesülhet az a viselkedésbeli eltérés, amely kihat a fiókákra is. Ezen kívül a H/H genotípusú madarak az első költést korábban, míg a második költést később kezdték, mint a R/R genotípusú madarak, de ezen egymásnak ellentmondó eredmények háttérében lévő összefüggés egyelőre még nem tisztázott. A genotípus arányok a mi kutatásunkban is hasonlóan bizonyultak az irodalmi adatokhoz, jelentős H/H fölény volt megfigyelhető, azonban mi a HWE-től szignifikáns eltérést tapasztaltunk, így a kapott eredményeinket fenntartásokkal kell kezelni.

A többi általunk vizsgált polimorfizmus még kevésbé kutatott, így nem volt viszonyítási alapunk az eredményeket illetően.

Az ID7054 polimorfizmus esetében az ID15-höz hasonló eredményeket kaptunk. Ebben az esetben azonban a R/H genotípusú madarak kirepült fiókáinak, valamint gyűrűzési kort megélt fiókáinak száma bizonyult szignifikánsan kisebbnek, mint a R/R genotípusúaké és a tojásszámában, valamint a kikelt fiókák számában itt sem találtunk eltérést a különböző genotípusok között. Szintén hasonló következtetéseket vonhatunk le ebből, vagyis, hogy a fiókanevelésben már lehetett valamilyen különbség a viselkedésükben, ami miatt kevésbé voltak sikeresek a R/H genotípusú egyedek. A különböző élőhelyeken szintén szignifikáns különbséget találtunk a genotípuseloszlásban, azonban itt sem zárhatjuk ki, hogy a különböző mintaelemszámok torzították ezt az eredményt. Ennek ellenére elképzelhető, hogy bizonyos genotípusok, jelen esetben a H/H genotípusú egyedek kevésbé viselik jól a zavarást, hiszen lényegesen kevesebben voltak a városi területen, mint az erdein, a szuburbán élőhelyről pedig teljes mértékben hiányzott ez a genotípus.

Az ID1213 polimorfizmus esetén szintén szignifikáns különbség mutatkozott a vizsgált élőhelyek között, a szuburbán területen kevesebb H/H genotípusú madár volt, mint a másik két területen, azonban a szélsőséges élőhelyek (városi, erdei) között nem látható ilyen eltérés. Meg kell említeni azonban, hogy az R allél alacsony gyakorisága miatt az általunk vizsgálatnál nagyobb létszámú populáció elemzése lenne szükséges az eredmények validálásához.

Az ID8489 és az ID9591 VNTR polimorfizmusok esetén nem találtunk eltérést sem az élőhelyek között, sem a költési sikerben a különböző genotípusok között, így ezek a variációk valószínűleg neutrálisak az általunk vizsgált változókra nézve.

Összességében tehát elmondható, hogy kis mértékben lehet hatása annak, hogy az adott madár milyen változatát hordozza bizonyos polimorfizmusoknak, de természetesen egyetlen gén néhány lókusza, főként az introni polimorfizmusok ritkán határozzák meg szélsőségesen a viselkedést és még számos kutatás szükséges ahhoz, hogy jobban megértsük az egyes polimorfizmusok hatását a madarak költési sikerére. Továbbá a mintaelemszám növelése is szükséges, azon probléma kiküszöböléséhez, hogy bizonyos genotípusokból jelentősen kevesebb található meg, mint a többiből.

Ezen kívül, habár a genotipizáló eljárások kidolgozása és végrehajtása sikeresnek mondható, még sem tudtuk az összes színcinegét genotipizálni mind a hat polimorfizmusra. Ennek oka az izolált DNS minősége is lehetett, de a továbbiakban érdemes lenne fejleszteni ezeket a protokollokat és további eljárásokat dolgozni ki a genotipizálás megkönnyítéséhez, valamint más polimorfizmusokat is vizsgálni, lehetőleg minél nagyobb mintaelemszámban, hogy jobban megérthessük a DRD4 gén költési sikerre gyakorolt hatását.

## 6. Összefoglalás

A megfigyelhető viselkedési mintázatok genetikai hátterének kutatása egyre hangsúlyosabbá vált az elmúlt évtizedekben. Ma már számos kutatást végeznek különböző vadállatokkal is és az egyik leggyakrabban vizsgált modellállat a viselkedésgenetika területén a széncinege (*Parus major*). Kutatásunk során a DRD4 gén polimorfizmusaira fókuszáltunk, amelyekről több esetben is bizonyították már, hogy hatással lehetnek a madarak viselkedésére. A jelen vizsgálat célja volt egyrészt kidolgozni hatékony és megbízható genotipizáló eljárásokat hat DRD4 polimorfizmusra, valamint ezek költési sikerre gyakorolt hatását megvizsgálni. Ehhez három városi, egy szuburbán és két erdei területen történt a mintagyűjtés. Megállapíthatjuk, hogy a vizsgált területek között eltér a genotípuseloszlás három polimorfizmus esetében (ID7054, ID1213, SNP830), vagyis lehet valamilyen összefüggés az élőhelyválasztás és ezen polimorfizmusok között, azonban a mintaelemszám növelése szükséges az eredmények megerősítéséhez. Továbbá eredményeink alapján elmondható, hogy az ID15 és az ID7054 polimorfizmus különböző változatai hatással lehetnek a madarak szaporodási sikerére, hiszen szignifikáns különbséget találtunk a különböző genotípusok között a gyűrűzési kort megélt fiókák, valamint a kirepült fiókák számában, bár a tojásszámában és a kikelt fiókák számában nem mutatkozott ez az eltérés. Fontos megemlíteni azonban, hogy a ritka allél a legtöbb esetben elenyésző számban fordult elő, ami hatással lehetett az elemzéseinkre. Mindazonáltal a genotipizáló eljárások kidolgozása sikeresnek bizonyult, így érdemes további vizsgálatokat végezni ezekkel a polimorfizmusokkal, valamint fényt deríteni arra, hogy milyen viselkedésbeli tulajdonságokkal állhatnak összefüggésben.

## 7. Summary

Research into the genetic basis of observable behavioural patterns has become increasingly important in recent decades. Many studies are now being carried out with wild animals and one of the most commonly studied model animals in the field of behavioural genetics is the great tit (*Parus major*). In our research we focused on polymorphisms in the DRD4 gene, which has been shown in several cases to affect the behaviour of birds. The aim of the present study was to develop efficient and reliable genotyping procedures for six DRD4 polymorphisms and to examine their impact on breeding success. For this purpose, samples were collected in three urban, one suburban and two forest areas. It can be concluded that the genotype distribution differs between the studied areas for three polymorphisms (ID7054, ID1213, SNP830), so there may be some correlation between habitat selection and these polymorphisms, but an increase in sample size is needed to confirm the results. Furthermore, our results suggest that different variants of the ID15 and ID7054 polymorphisms may affect the reproductive success of birds, as we found significant differences between genotypes in the number of nestlings and fledglings, although no such differences were found in number of hatchlings and the clutch size. However, it is important to note, that the rare allele occurred in negligible numbers in most cases, which may have affected our analyses. Nevertheless, the development of genotyping techniques has been successful and it is worthwhile to further investigate these polymorphisms and to shed light on what behavioural traits they may be associated with.



## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek Dr. Rónai Zsoltnak, hogy mindenben segítette a szakdolgozatom megírását, valamint Czikkelyné Dr. Ágh Nórának, aki mind a laboratóriumi munkában, mind pedig a statisztikában rengeteget segített, és a terepi munka eredményeit is rendelkezésemre bocsájtotta. A terepi adatokért köszönet az MTA-PE Evolúciós Ökológiai kutatócsoport minden jelenlegi és volt munkatársának. Hálás vagyok belső konzulensemnek, Dr. Vili Nórának, aki a témabeszámoló és a szakdolgozat írása során nagy segítséget nyújtott a tartalmi és a formai követelmények betartásában. Továbbá köszönet illeti barátaimat és családomat, hogy türelmükkel és meglátásaikkal végig támogattak.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Plomin R (2000) Behavioural genetics in the 21st century. *International Journal of Behavioral Development* 24:30–34. <https://doi.org/10.1080/016502500383449>
2. Rothstein MA (2005) Applications of behavioural genetics: outpacing the science? *Nat Rev Genet* 6:793–798. <https://doi.org/10.1038/nrg1687>
3. Plomin R, Craig I (1997) Human behavioural genetics of cognitive abilities and disabilities. *Bioessays* 19:1117–1124. <https://doi.org/10.1002/bies.950191211>
4. Bentivoglio M, Morelli M (2005) Chapter I The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, pp 1–107
5. Björklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences* 30:194–202. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006>
6. Bjorklund A, Lindvall O (1984) Dopamine-containing systems in the CNS. *Handbook of chemical neuroanatomy Classical transmitters in the CNS, part I*:55–122
7. Simunovic F, Yi M, Wang Y, Macey L, Brown LT, Krichevsky AM, Andersen SL, Stephens RM, Benes FM, Sonntag KC (2009) Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson’s disease pathology. *Brain* 132:1795–1809. <https://doi.org/10.1093/brain/awn323>
8. Zoltán Karádi, Lénárd L., Hahn Z., Szabó Z. (1990) Észlelési és diszkriminációs tanulási zavarok Parkinson szindrómában. *Ideggyógyászati Szemle* 43:11–27
9. Oades RD, Halliday GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Research Reviews* 12:117–165. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(87\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0165-0173(87)90011-7)
10. Albanese A, Minciacchi D (1983) Organization of the ascending projections from the ventral tegmental area: A multiple fluorescent retrograde tracer study in the rat. *J Comp Neurol* 216:406–420. <https://doi.org/10.1002/cne.902160406>
11. Seamans JK, Yang CR (2004) The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in Neurobiology* 74:1–58. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.05.006>
12. Nestler EJ, Kenny PJ, Russo SJ, Schaefer A (2020) Widely Projecting Systems: Monoamines, Acetylcholine, and Orexin. In: Nestler, Hyman & Malenka’s *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*, 4e. McGraw-Hill, New York, NY
13. Ayano G (2016) Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *J Ment Disord Treat* 2:. <https://doi.org/10.4172/2471-271X.1000120>
14. Berridge KC (2007) The debate over dopamine’s role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology* 191:391–431. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0578-x>

15. Ahn S, Phillips AG (1999) Dopaminergic Correlates of Sensory-Specific Satiety in the Medial Prefrontal Cortex and Nucleus Accumbens of the Rat. *J Neurosci* 19:RC29–RC29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-19-j0003.1999>
16. Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481–1489. <https://doi.org/10.1038/nn1579>
17. Fiorino DF, Phillips AG (1999) Facilitation of Sexual Behavior and Enhanced Dopamine Efflux in the Nucleus Accumbens of Male Rats afterd-Amphetamine-Induced Behavioral Sensitization. *J Neurosci* 19:456–463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-01-00456.1999>
18. Tidey JW, Miczek KA (1996) Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. *Brain Research* 721:140–149. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00159-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00159-X)
19. Barron AB, Søvik E, Cornish JL (2010) The Roles of Dopamine and Related Compounds in Reward-Seeking Behavior Across Animal Phyla. *Front Behav Neurosci* 4:. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00163>
20. Roeder T (2005) TYRAMINE AND OCTOPAMINE: Ruling Behavior and Metabolism. *Annu Rev Entomol* 50:447–477. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130404>
21. Barron AB, Maleszka R, Vander Meer RK, Robinson GE (2007) Octopamine modulates honey bee dance behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1703–1707. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610506104>
22. Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D’Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS, Innis RB (1996) Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9235–9240. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9235>
23. Diehl DJ, Gershon S (1992) The role of dopamine in mood disorders. *Comprehensive Psychiatry* 33:115–120. [https://doi.org/10.1016/0010-440X\(92\)90007-D](https://doi.org/10.1016/0010-440X(92)90007-D)
24. Volkow ND, Wang G-J, Kollins SH, Wigal TL, Newcorn JH, Telang F, Fowler JS, Zhu W, Logan J, Ma Y, Pradhan K, Wong C, Swanson JM (2009) Evaluating Dopamine Reward Pathway in ADHD: Clinical Implications. *JAMA* 302:1084. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1308>
25. Elsworth JD, Roth RH (1997) Dopamine Synthesis, Uptake, Metabolism, and Receptors: Relevance to Gene Therapy of Parkinson’s Disease. *Experimental Neurology* 144:4–9. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.6379>
26. Andersen PH, Gingrich JA, Bates MD, Dearry A, Falardeau P, Senogles SE, Caron MG (1990) Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends in Pharmacological Sciences* 11:231–236. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90249-8](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90249-8)

27. Richfield EK, Penney JB, Young AB (1989) Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 30:767–777. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90168-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90168-1)
28. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 78:189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
29. Dong Y, Cooper, D., Nasif, F., Hu, X.T., White, F. J. (2004) Dopamine Modulates Inwardly Rectifying Potassium Currents in Medial Prefrontal Cortex Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience* 24:3077–3085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4715-03.2004>
30. Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H (2004) Dopamine Receptor Signaling. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 24:165–205. <https://doi.org/10.1081/RRS-200029981>
31. Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24:125–132. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00063-9)
32. Aiso M, Shigematsu K, Keabian JW, Potter WZ, Cruciani RA, Saavedra JM (1987) Dopamine D1 receptor in rat brain: a quantitative autoradiographic study with 125I-SCH 23982. *Brain Research* 408:281–285. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90388-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90388-X)
33. Dawson TM, Barone P, Sidhu A, Wamsley JK, Chase TN (1988) The D1 dopamine receptor in the rat brain: Quantitative autoradiographic localization using an iodinated ligand. *Neuroscience* 26:83–100. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90129-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90129-7)
34. Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT, Caron MG (1991) Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7491–7495. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7491>
35. Ariano MA, Wang J, Noblett KL, Larson ER, Sibley DR (1997) Cellular distribution of the rat D1B receptor in central nervous system using anti-receptor antisera. *Brain Research* 746:141–150. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01219-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01219-X)
36. Bouthenet M-L, Martres M-P, Sales N, Schwartz J-C (1987) A detailed mapping of dopamine D-2 receptors in rat central nervous system by autoradiography with [125I]iodosulpride. *Neuroscience* 20:117–155. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90008-X)
37. Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8861–8865. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.8861>
38. Lévesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P (1992) Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8155–8159. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8155>

39. Defagot MC, Malchiodi EL, Villar MJ, Antonelli MC (1997) Distribution of D4 dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. *Molecular Brain Research* 45:1–12. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(96\)00235-5](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(96)00235-5)
40. Gelernter J, Kennedy JL, van Tol HHM, Civelli O, Kidd KK (1992) The D4 dopamine receptor (DRD4) maps to distal 11p close to HRAS. *Genomics* 13:208–210. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90222-E](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90222-E)
41. Tol HHMV, Wu CM, Guan H-C, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V (1992) Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358:149–152. <https://doi.org/10.1038/358149a0>
42. Chang F-M, Kidd JR, Livak KJ, Pakstis AJ, Kidd KK (1996) The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Human Genetics* 98:91–101. <https://doi.org/10.1007/s004390050166>
43. Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HHM (2002) Modulation of Intracellular Cyclic AMP Levels by Different Human Dopamine D4 Receptor Variants. *Journal of Neurochemistry* 65:1157–1165. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65031157.x>
44. Comings DE, Gonzalez N, Wu S, Gade R, Muhleman D, Saucier G, Johnson P, Verde R, Rosenthal RJ, Lesieur HR, Rugle LJ, Miller WB, MacMurray JP (1999) Studies of the 48 bp repeat polymorphism of the DRD4 gene in impulsive, compulsive, addictive behaviors: Tourette syndrome, ADHD, pathological gambling, and substance abuse. *Am J Med Genet* 88:358–368. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19990820\)88:4<358::AID-AJMG13>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19990820)88:4<358::AID-AJMG13>3.0.CO;2-G)
45. Ben Zion IZ, Tessler R, Cohen L, Lerer E, Raz Y, Bachner-Melman R, Gritsenko I, Nemanov L, Zohar AH, Belmaker RH, Benjamin J, Ebstein RP (2006) Polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene (DRD4) contribute to individual differences in human sexual behavior: desire, arousal and sexual function. *Mol Psychiatry* 11:782–786. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001832>
46. Eisenberg DTA, Campbell B, MacKillop J, Modi M, Dang D, Lum JK, Wilson DS (2007) Polymorphisms in the Dopamine D4 and D2 Receptor Genes and Reproductive and Sexual Behaviors. *Evol Psychol* 5:147470490700500. <https://doi.org/10.1177/147470490700500402>
47. Livak KJ, Rogers J, Lichter JB (1995) Variability of dopamine D4 receptor (DRD4) gene sequence within and among nonhuman primate species. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:427–431. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.2.427>
48. Asghari V, Schoots O, van Kats S, Ohara K, Jovanovic V, Guan HC, Bunzow JR, Petronis A, Van Tol HH (1994) Dopamine D4 receptor repeat: analysis of different native and mutant forms of the human and rat genes. *Mol Pharmacol* 46:364–373
49. Niimi Y, Inoue-Murayama\* M, Murayama Y, Ito S, Iwasaki T (1999) Allelic Variation of the D4 Dopamine Receptor Polymorphic Region in Two Dog Breeds, Golden Retriever and Shiba. *J Vet Med Sci* 61:1281–1286. <https://doi.org/10.1292/jvms.61.1281>

50. Hejjas K, Vas J, Topal J, Szantai E, Ronai Z, Szekely A, Kubinyi E, Horvath Z, Sasvari-Szekely M, Miklosi A (2007) Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs: Association of DRD4 gene and activity in dogs. *Animal Genetics* 38:629–633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01657.x>
51. Momozawa Y, Takeuchi Y, Kusunose R, Kikusui T, Mori Y (2005) Association between equine temperament and polymorphisms in dopamine D4 receptor gene. *Mamm Genome* 16:538–544. <https://doi.org/10.1007/s00335-005-0021-3>
52. van Dongen WFD, Robinson RW, Weston MA, Mulder RA, Guay P-J (2015) Variation at the DRD4 locus is associated with wariness and local site selection in urban black swans. *BMC Evol Biol* 15:253. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0533-8>
53. Garamszegi LZ, Mueller JC, Markó G, Szász E, Zsebők S, Herczeg G, Eens M, Török J (2014) The relationship between DRD4 polymorphisms and phenotypic correlations of behaviors in the collared flycatcher. *Ecol Evol* 4:1466–1479. <https://doi.org/10.1002/ece3.1041>
54. Mueller JC, Edelaar P, Carrete M, Serrano D, Potti J, Blas J, Dingemanse NJ, Kempenaers B, Tella JL (2014) Behaviour-related DRD4 polymorphisms in invasive bird populations. *Mol Ecol* 23:2876–2885. <https://doi.org/10.1111/mec.12763>
55. Fidler AE, van Oers K, Drent PJ, Kuhn S, Mueller JC, Kempenaers B (2007) Drd4 gene polymorphisms are associated with personality variation in a passerine bird. *Proc R Soc B* 274:1685–1691. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0337>
56. Korsten P, Mueller JC, Hermannstädter C, Bouwman KM, Dingemanse NJ, Drent PJ, Liedvogel M, Matthysen E, Van OERS K, Van OVERVELD T, Patrick SC, Quinn JL, Sheldon BC, Tinbergen JM, Kempenaers B (2010) Association between DRD4 gene polymorphism and personality variation in great tits: a test across four wild populations: AVIAN PERSONALITY AND DRD4 GENE POLYMORPHISM. *Molecular Ecology* 19:832–843. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04518.x>
57. <https://unsplash.com/s/photos/parus-major>
58. Molnár László, Bankovics Attila, Schmidt Egon, Sterbetz István, Székely Tamás, Barbácsy Zoltán, Barta Zoltán, Bod Péter, Csörgő Tibor, Varga Ferenc, Faragó Sándor, Lőrincz István, Varga Zsolt, Molnár Gyula, Kovács Gábor, Magyar Gábor, Kárpáti László, Horváth Róbert, Márkus Ferenc, Török János, Jakab Béla, Kalocsa Béla, Boros Emil, Kalotás Zsolt, Pellingner Attila, Szép Tibor, Rékási József, Hadarics Tibor (1998) Magyarország madarai. *Mezőgazda Kiadó*
59. László H (2019) Magyarország fészkelő madarainak költésbiológiája. II. kötet. Pro Vértes Nonprofit Zrt.
60. Tóth L., Szentendrey G. (1986) Összehasonlító költésfenológiai vizsgálatok a Pilis hegység és környéke odútelepein. *MM E II Tudományos Ülése, Szeged* 183–188
61. Báldi A., Csörgő T. (1993) Effect of habitat on the clutch size and egg dimensions of the Great Tit (*Parus major*). *Aquila* 100:201–209

62. Seress G, Hammer T, Bókony V, Vincze E, Preiszner B, Pipoly I, Sinkovics C, Evans KL, Liker A (2018) Impact of urbanization on abundance and phenology of caterpillars and consequences for breeding in an insectivorous bird. *Ecol Appl* 28:1143–1156. <https://doi.org/10.1002/eap.1730>
63. Mendl M, Burman OHP, Paul ES (2010) An integrative and functional framework for the study of animal emotion and mood. *Proc R Soc B* 277:2895–2904. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0303>
64. de Satgé J, Strubbe D, Elst J, De Laet J, Adriaensen F, Matthysen E (2019) Urbanisation lowers great tit (*Parus major*) breeding success at multiple spatial scales. *J Avian Biol* 50:jav.02108. <https://doi.org/10.1111/jav.02108>
65. Wawrzyniak J, Gładalski M, Kaliński A, Bańbura M, Markowski M, Skwarska J, Zieliński P, Bańbura J (2020) Differences in the breeding performance of great tits *Parus major* between a forest and an urban area: a long term study on first clutches. *The European Zoological Journal* 87:294–309. <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1766125>
66. Both C, Dingemanse NJ, Drent PJ, Tinbergen JM (2005) Pairs of extreme avian personalities have highest reproductive success. *J Anim Ecology* 74:667–674. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2005.00962.x>
67. Timm K, Tilgar V, Saag P (2015) DRD4 gene polymorphism in great tits: gender-specific association with behavioural variation in the wild. *Behav Ecol Sociobiol* 69:729–735. <https://doi.org/10.1007/s00265-015-1887-z>
68. Marwal A, Sahu AK, Gaur RK (2014) Molecular Markers. In: *Animal Biotechnology*. Elsevier, pp 289–305
69. Pecsénye Katalin (2006) *Populációgenetika*. Pars, Nagykovácsi
70. Cheng J, Zhang, Y., Li, Q. (2004) Real-time PCR genotyping using displacing probes. *Nucleic Acids Research* 32:e61–e61. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh055>
71. Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl Acids Res* 21:3761–3766. <https://doi.org/10.1093/nar/21.16.3761>
72. Michael J. Heller, Poway; Edward J. (1991) 4996143 Fluorescent stokes shift probes for polynucleotide hybridization. *Biotechnology Advances* 9:278. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(91\)90117-E](https://doi.org/10.1016/0734-9750(91)90117-E)
73. Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
74. R Core Team (2021) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
75. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using **lme4**. *J Stat Soft* 67:. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>

76. Lüdecke D, Ben-Shachar M, Patil I, Waggoner P, Makowski D (2021) performance: An R Package for Assessment, Comparison and Testing of Statistical Models. *JOSS* 6:3139. <https://doi.org/10.21105/joss.03139>
77. Fox, John, Weisberg, Sanford (2019) *An {R} Companion to Applied Regression*. Third
78. Venables WN, Ripley BD, Venables WN (2002) *Modern applied statistics with S*, 4th ed. Springer, New York
79. Tomas J. Aragon (2020) *epitools: Epidemiology Tools*
80. Russell V. Lenth (2022) *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means*
81. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57:289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
82. Timm K, Mägi M, Telve K, Tilgar V (2019) The behavioural response of Great Tits to novel environment and handling is affected by the DRD4 gene. *Ibis* 161:91–100. <https://doi.org/10.1111/ibi.12604>
83. Tilgar V, Moks K, Saag P (2011) Predator-induced stress changes parental feeding behavior in pied flycatchers. *Behavioral Ecology* 22:23–28. <https://doi.org/10.1093/beheco/arq164>
84. Timm K, van Oers K, Tilgar V (2018) SERT gene polymorphisms are associated with risk-taking behaviour and breeding parameters in wild great tits. *Journal of Experimental Biology* jeb.171595. <https://doi.org/10.1242/jeb.171595>



## 10. Mellékletek

7. táblázat: Az ID7054 polimorfizmus genotípuseloszlása a különböző élőhelyeken

	városi	szuburbán	erdei
R/R	50	19	28
R/H	46	16	24
H/H	3	0	9

8. táblázat: Az ID8489 polimorfizmus genotípuseloszlása a különböző élőhelyeken

	városi	szuburbán	erdei
R/R	1	0	0
R/H	15	8	9
H/H	83	27	52

9. táblázat: Az ID1213 polimorfizmus genotípuseloszlása a különböző élőhelyeken

	városi	szuburbán	erdei
R/R	2	1	1
R/H	25	17	14
H/H	72	17	45

10. táblázat: Az ID15 polimorfizmus genotípuseloszlása a különböző élőhelyeken

	városi	szuburbán	erdei
R/R	21	12	12
R/H	16	4	8
H/H	59	17	38

11. táblázat: Az ID9591 polimorfizmus genotípuseloszlása a különböző élőhelyeken

	városi	szuburbán	erdei
R/R	0	1	0
R/H	12	8	5
H/H	81	25	54

12. táblázat: Az SNP830 polimorfizmus genotípuseloszlása a különböző élőhelyeken

	városi	szuburbán	erdei
CC	41	11	20
CT	52	22	27
TT	6	2	15

13. táblázat: A kirepült fiókák számának vizsgálatára illesztett modell post-hoc tesztje az ID7054 polimorfizmus esetén

Összehasonlított genotípusok	Becslés	SE	t	p
R/R – H/H	0,0402	0,0672	0,598	0,5688
R/R – R/H	0,0777	0,0266	2,922	0,0130
R/H – H/H	0,0376	0,0657	0,572	0,5688

14. táblázat: A kirepült fiókák számának vizsgálatára illesztett modell post-hoc tesztje az ID15 polimorfizmus esetén

Összehasonlított genotípusok	Becslés	SE	t	p
R/R – H/H	0,0931	0,0356	2,611	0,0314
R/R – R/H	0,0189	0,0448	0,421	0,6748
R/H – H/H	0,0742	0,0374	1,986	0,0749

15. táblázat: A gyűrűzési kort megélt fiókák számának vizsgálatára illesztett modell post-hoc tesztje az ID7054 polimorfizmus esetén

Összehasonlított genotípusok	Becslés	SE	t	p
R/R – H/H	0,0252	0,0618	0,407	0,6847
R/R – R/H	0,0763	0,0264	2,890	0,0143
R/H – H/H	0,0511	0,0613	0,835	0,6089

16. táblázat: A gyűrűzési kort megélt fiókák számának vizsgálatára illesztett modell post-hoc tesztje az ID15 polimorfizmus esetén

Összehasonlított genotípusok	Becslés	SE	t	p
R/R – H/H	0,0895	0,0352	2,544	0,0376
R/R – R/H	0,0148	0,0446	0,333	0,7402
R/H – H/H	0,0747	0,0372	2,008	0,0712

17. táblázat: A költségkezdés vizsgálatára illesztett modell post-hoc tesztje az ID15 polimorfizmus esetén az első költség során

Összehasonlított genotípusok	Becslés	SE	t	p
R/R – H/H	7,184	2,34	3,075	0,0079
R/R – R/H	0,791	3,28	0,241	0,8099
R/H – H/H	6,393	2,70	2,368	0,0294

18. táblázat: A költségkezdés vizsgálatára illesztett modell post-hoc tesztje az ID15 polimorfizmus esetén a másodköltség során

Összehasonlított genotípusok	Becslés	SE	t	p
R/R – H/H	-22,117	7,99	-2,768	0,0120
R/R – R/H	0,493	9,39	0,053	0,9583
R/H – H/H	-22,610	6,26	-3,609	0,0024

# Nyilatkozatok

Alulírott ..... Dr. VILI NÓRA ..... Igazolom, hogy

..... GRÓB ADÉL BORBÁLA ..... (a hallgató neve)

A ..... DOPAMIN RENDSZER BIZONYOS GENETIKAI POLIMORFIZMUSAINAK ELEMZÉSE SZÉKINÉGÉKBEN:  
KÖLTÉSBIOLÓGIAI VONATKOZÁSOK  
című diplomamunkát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2022 ..... 04 ..... 26 .....

.....  
.....

a témavezető neve és aláírása

..... Dr. VILI NÓRA .....

..... Ökológiai Tanszék .....

tanszék

**HuVetA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

Név: .....Grób Adél Borbála.....  
Elérhetőség (e-mail cím):...borigrob@gmail.com.....  
A feltöltendő mű címe:..... A dopamin rendszer bizonyos genetikai polimorfizmusainak elemzése széncinegekben: költésbiológiai vonatkozások.....  
A mű megjelenési adatai:.....2022. Budapest.....  
Az átadott fájlok száma: .....1.....

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrészt mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),


Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2022 . év .....04.....hó .....25...nap

  
aláírás  
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

*A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*