

bacute Spongiform Encephalopathies. Virology. Red. B.N. Fields et al., Raven Press, New York 1985. **8. Gajdusek D.C.:** Subacute Spongiform Viruses Encephalopathies Causes by Unconventional Viruses. Subviral Pathogenes of Plants and Animals, Viroids and Prions. Red. K. Maramorosch and McKelvey Jr., Academic Press, New York 1985. **9. Habermüller K.:** Life Sciences and Technology 5 (5), 20-22, 2001. **10. Kimberlin R.H.:** Unconventional „slow” viruses. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Red. M.T. Parker and L.H. Collier. Vol. 4 – Virology; London-Melbourne-Auck-

land 1990. **11. Liberski P.:** Postępy Mikrobiologii 37, 9-32, 1997. **12. Molenda J.:** Medycyna Wet. 56, 355-362, 2000. **13. Polak M.P., Żmudziński J.F.:** Medycyna Wet. 56, 211-213, 2000. **14. Polak M.P., Żmudziński J.F.:** Medycyna Wet. 57, 5-8, 2000. **15. Polak M.P., Żmudziński J.F.:** Medycyna Wet. 57, 228-232, 2001. **16. Prusiner S.B.:** Trends Biochim. Sci. 21, 482-490, 1996. **17. Prusiner S.B., Scott M.R.:** Ann. Rev. Gen. 31, 139, 1997. **18. Stadlbaures E.A.:** Life Sciences 5 (1), 18-19, 2001.

# Najnowsze wyniki badań genetycznego tła wysokiej plenności owiec booroola

Małgorzata K. Charon, Elżbieta Martyniuk

SGGW

Rozwijające się dynamicznie badania genomów zwierząt gospodarskich służą przede wszystkim tworzeniu markerowych map genomowych. Informacje zawarte w tych mapach są wykorzystywane do identyfikacji genów determinujących cechy użytkowe zwierząt lub genów wpływających istotnie na ich fenotypową ekspresję. Pierwsza mapa genomu owcy, opracowana przez Crawford i wsp. [1] na podstawie wyników analizy segregacji 246 polimorficznych markerów genetycznych w trzech pokoleniach pełnego rodzeństwa, miała całkowitą długość równą 2070 cM. Kolejna mapa genomu owcy, skonstruowana została na podstawie segregacji 519 markerów genetycznych [3], a jej długość wynosi 3190 cM.

Do cech użytkowych owiec, które są obiektem najintensywniejszych poszukiwań genów o dużym efekcie należą cechy odporności na choroby i pasożyty, cechy umięśnienia, a przede wszystkim cechy reprodukcyjne. U owiec niektórych ras, wykazujących wysoką plenność, prowadzone są poszukiwania genów, które leżą u podłoża uwarunkowania genetycznego tej cechy. Pierwszym genem wysokiej plenności, którego istnienie wykazała analiza [2] segregacji, był autosomalny gen oznaczony symbolem FecB (Fecundity gene of Booroola).

Dalsze badania segregacji wysokiej plenności w dwunastu rodzinach referencyjnych australijskiego merynosa booroola, wykonane na 379 sztukach potomstwa płci żeńskiej, połączone z badaniami polimorfizmu loci markerowych DNA tych zwierząt oraz analizą homologii między chromosomami owcy, człowieka i bydła umożliwiły lokalizację genu FecB w chromosomie 6 i oszacowanie odległości niektórych loci markerowych od tego locus [8]. W cytowanych badaniach zastosowano nie tylko markery ze stosunkowo mało jeszcze wtedy po-

znanego genomu owcy (10 markerów mikrosatelitarnych, gen albuminy – ALB), ale także pochodzące od innych gatunków, np. z genomu bydła (10 sekwencji mikrosatelitarnych, gen  $\alpha$ -S1-kazeiny – CSN1S1) oraz genomu człowieka (gen nas-kórkowego czynnika wzrostu – EGF, gen  $\alpha$  – receptora czynnika wzrostu pochodzącego z płytek krwi – PDGFRA oraz fosfoproteiny S1 – SPP1). Dzięki zastosowaniu metody hybrydyzacji komórek somatycznych i analizie klonów komórek hybrydowych pochodzących od owcy i chomika ustalono, że mikrosatelity OarAE101 i BM143 można zaliczyć do grupy loci syntenicznych, złożonej z genów: PDGFRA, SPP1 i EGF.

Kolejnym krokiem było zawężenie regionu poszukiwań locus FecB do odcinka chromosomu 6 między 6q23 a 6q21, który jest homologiczny do regionu 4q21-25 genomu człowieka [8]. Opracowany wówczas test identyfikacji obecności genu FecB w genotypie owiec na podstawie polimorfizmu trzech sekwencji mikrosatelitarnych OarAE101, OarHH55 i BM143 został szybko zweryfikowany. Zbyt duża odległość mikrosatelit OarHH55 i BM143 od poszukiwanego locus (około 20 cM) zmusiła badaczy do sięgnięcia po inny marker – BM1329, mikrosatelitę z genomu bydła [6]. Wkrótce do testu dodano trzeci marker, niestety jego sekwencję i lokalizację znali jedynie badacze z Nowej Zelandii z zespołu kierowanego przez Montgomery'ego. Było to jednocześnie sygnałem, że być może w niedługim czasie zostanie poznana dokładna lokalizacja locus FecB.

Wspomniany zespół badaczy nowozelandzkich przeprowadził wszechstronne badania, z wykorzystaniem różnych metod molekularnych, jak też laparoskopowej oceny stopnia owulacji, pomiarów morfometrycznych pecherzyków i oocytów oraz analiz segregacji cech (asocjacja loci markerowych z QTL). Badania wykonano na owcach homozygotycznych w locus FecB, a także na kilku pokoleniach mieszańców pochodzących z krzyżowania wstecznego (tryki FecBFecB x matki ++, następnie córki FecB+ x tryki ++) oraz owcach stanowiących grupę kontrolną, ++. Do badań włączono także owce należące do 6 innych ras, które nie mają genu FecB, jak również owce mieszańcowe (rasa lokalna x booroola) z Arabii Saudyjskiej, Holandii i USA. Wyniki tych kompleksowych badań i analiz zostały ostatnio opublikowane przez Wilson i wsp. [10].

Badaniami molekularnymi objęto region chromosomu 6 długości 20 cM, zidentyfikowany we wcześniejszych badaniach jako zawierający locus FecB. Analiza QTL, metodą Haley'a i wsp. [5], udoskonaloną dla analizy danych uzyskanych

dla wielu pokoleń [4], wykazała, że locus *FecB* znajduje się między loci PDHA2 i JP27 (mikrosatelita), odległych od siebie o około 4 cM. Uzupelnienie tych badań przez analizę haplotypów zwierząt doświadczalnych przyniosło dawno oczekiwany wynik, stwierdzono bowiem ściśle sprzężenie, a więc całkowity brak rekombinacji locus *FecB* z mikrosatelitą JL36, zlokalizowaną w badanym regionie chromosomu w odległości 1,3 cM od locus PDHA2. Wspomniana wcześniej homologia między określonymi regionami chromosomu 6 owcy i chromosomu 4 człowieka upoważniła badaczy do wstępnego wskazania genu receptora białka oznaczonego symbolem BMP-IB (BMPR-IB), zmapowanego już w genomie człowieka jako genu kandydującego.

Na marginesie, parę słów wyjaśnienia dotyczącego białek BMP, w których skład wchodzi białko BMP-IB. Białka BMP (białka morfogenetyczne kości – ang. bone morphogenetic proteins) należą do nadrodziny transformującego czynnika wzrostu –  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) i pełnią wiele ważnych funkcji w rozwijającym się organizmie, m.in. regulują wzrost i różnicowanie wielu typów komórek, ogrywają ważną rolę podczas embriogenezy, jak również podczas rozwoju kości. Razem z aktywnymi w oocytach czynnikami wzrostu, GDF9 i GDF9b, oraz receptorami BMP, znajdującymi się w jajnikach, spełniają bardzo ważną rolę w reprodukcji ssaków.

W celu potwierdzenia obecności genu receptora białka BMP-IB (BMPR-IB) w 6 chromosomie owcy wykorzystano bibliotekę genomu owcy w sztucznym chromosomie drożdżowym (YAC). Średnia długość odcinków chromosomów owcy w każdym sztucznym chromosomie drożdżowym wynosiła ok. 700 kpb. Stosując metodę „spacer po chromosomie” (ang. chromosome walking) przebadano znany już region chromosomu 6 i stwierdzono, że marker JL36 i gen BMPR-IB występują razem, w tym samym odcinku chromosomu 6 w YAC. Wyniki tych badań potwierdziły lokalizację genu BMPR-IB w bezpośrednim sąsiedztwie mikrosatelity JL36. Natomiast badania mRNA wyizolowanego z jajników owiec nosicielek oraz pozbawionych genu *FecB*, przeprowadzone metodą odwrotnej transkrypcji – PCR i hybrydyzacji *in situ*, udokumentowały obecność receptorów BMPR-IB i BMPR-II w komórkach jajnikowych, a także ich wpływ na wzrost oocytów. Analiza sekwencji cDNA genu BMPR-IB pochodzącego od owiec booroola i owiec innych ras ujawniła wystąpienie u owiec booroola mutacji punktowej w 830 nukleotydzie, polegającej na transycji adeniny na guaninę, której konsekwencją jest zamiana aminokwasu glutaminy na argininę w pozycji 249 łańcucha polipeptydowego.

Analiza segregacyjna przeprowadzona na dwóch grupach owiec – mieszańcach wstecznych z merynosem booroola oraz owcach nie posiadających genu *FecB*, wykazała kosegregację mutacji Q249R z genotypem *FecB*. Potwierdzeniem tego były wyniki dodatkowych badań na owcach 6 innych ras, pochodzących z Francji, Niemiec, Hiszpanii i Nowej Zelandii. U żadnej z tych ras nie stwierdzono mutacji Q249R. Natomiast u owiec pochodzących z krzyżowania rasy lokalnej i merynosa boorooli mutacja ta segregowała zgodnie z obserwowanym wzrostem stopnia owulacji.

Obecnie badacze zadają sobie pytanie: Czy u innych ras owiec, u których potwierdzono statystycznie obecność genu o dużym efekcie w plenności, genetycznym podłożem tej cechy jest ta sama czy inna mutacja w obrębie genu BMPR-IB, jak u merynosa boorooli? Podobne zjawisko zaobserwowano przy hipertrofii mięśniowej, występującej u wielu ras bydła, gdzie cecha ta zależy od różnych mutacji w genie miostatyny.

A może mamy do czynienia z mutacją w genie innego białka, należącego do nadrodziny TGF- $\beta$ ? Przykładem może być mutacja w genie jednego z białek morfogenetycznych kości, BMP15 (inna nazwa tego białka to: wzrostowy czynnik różnicowania 9B – GDF9B; ang. growth differentiation factor 9B), którego ekspresja jest ograniczona do jajników i powoduje zwiększoną owulację u owiec rasy romney (gen Inverdale). Locus BMP154 jest zlokalizowany w chromosomie X i jest to, jak dotąd, jedyny znany gen wysokiej plenności sprzężony z płcią. Z genem tym wiąże się także inne odstępstwo. Allel zmutowany wykazuje korzystny wpływ na stopień owulacji jedynie w formie heterozygotycznej, natomiast u osobników homozygotycznych powoduje nieplodność, wynikającą z dysplazji jajników.

Niektóre wątpliwości, dotyczące podłoża plenności owiec zostaną wkrótce wyjaśnione dzięki inicjatywie Georga Davisa, odkrywcy genu Inverdale, który zaproponował przeprowadzenie badań w kierunku nowo odkrytego markera genu *FecB* w kilku populacjach owiec plennych: cambridge, thoka, laucune, jak też owcy olkuskiej. W przypadku owcy olkuskiej jest to bardzo istotne, bowiem dramatycznie niska wielkość populacji bardzo utrudnia analizę statystyczną, a dotychczasowe badania wskazują jednoznacznie na obecność pojedynczo segregującego genu, zwiększającego poziom owulacji [7].

Obszerne badania na ten temat prowadzone są obecnie w ramach grantu KBN pt: „Badania nad uwarunkowaniem wysokiej plenności owcy olkuskiej i jej mieszańców z booroolą”. Wkrótce więc będzie wiadomo, czy wysoka plenność owcy olkuskiej, u której występują nawet mioty siedmioraczków, ma takie samo podłoże genetyczne, jak u owiec booroola.

**Literatura:** 1. Crawford A.M. i wsp.: *Genetics*, 140, 703-724, 1995. 2. Davis G.H., Montgomery G.W., Allison A.J., Kelly R.W., Bray A.R.: *N.Z.J. Agric. Res.*, 25, 525-529, 1982. 3. De Gortari M.J. i wsp.: *Mamm. Genome* 9, 204-209, 1998. 4. Dodds K.G.: *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet.* 13, 313-316, 1999. 5. Haley C.S., Knott S.A., Elsen J.M.: *Genetics* 136, 1195-1207, 1994. 6. Lord E.A., Davis G.H., Dodds K.G., Henry H.M., Lumsden J.M., Montgomery G.W.: Identification of Booroola carriers using microsatellite markers. *Materials of 6<sup>th</sup> World Congr. Anim. Gen. Appl. Liv. Prod.*, Armidale, vol. 27, 19-22, Australia 1998. 7. Martyniuk E.: *Animal Science Papers and Reports*, vol. 14, no 1, 59-66, 1996. 8. Montgomery G.W., Crawford A.M., Penty J.M., Dodds K.G., Ede A.J., Henry H.M., Pierson C.A., Lord E.A., Galloway S.M., Schmack A.E. i inni: *Nat. Genet.* 4, (4), 410-414, 1993. 9. Montgomery G.W., Lord E.A., Penty J.M., Dodds K.G., Broad T.E., Cambridge L., Sunden S.L., Stone R.T., Crawford A.M.: *Genomics*, 22 (1), 148-153, 1994. 10. Wilson T., Xi-Yang Wu, Juengel J.L., Ross I.K., Lumsden J.M., Lord E.A., Dodds K.G., Walling G.A., McEwan J.C., O'Connell A.R., McNatty K.P. and Montgomery G.W.: *Biology of Reproduction*, 64, 1225-1235, 2001.