

rozwój i, jak się wydaje, mogą być stopniowo eliminowane z tkanek w czasie rozwoju. W ten sposób urodzony osobnik wywodzi się całkowicie ze zrekonstruowanego blastomeru. Praca opublikowana została w 2006 r. w amerykańskim czasopiśmie „Biology of Reproduction”.

Pomimo dotychczasowych ograniczeń klonowania somatycznego, możliwości jakie stwarzałaby ta technika w hodowli i produkcji zwierzęcej są potencjalnie bardzo duże. Wprawdzie przyspieszenie postępu hodowlanego poprzez uzyskanie w krótkim czasie dużej liczby identycznych zwierząt o najbardziej wartościowych i ściśle określonych genotypach jest, jak na razie, ze względu na koszty (zwłaszcza dla przeciętnych hodowców) nieopłacalne i mało realne, tym niemniej jednak w niektórych krajach, zwłaszcza w USA, przeprowadzane jest u bydła klonowanie osobników o szczególnie wartościowych cechach genetycznych. W 2000 roku dokonano w Kanadzie udanej próby sklonowania jednego z najlepszych (w swoim czasie) buhajów, buhaja Hanoverhill Starbuck. Hanoverhill Starbuck II narodził się w dwa lata po śmierci jego „ojca”. Oprócz potencjalnych możliwości powielania u zwierząt gospodarskich szczególnie cennych okazów ras mlecznych i mięsnych, duże znaczenie dla hodowli miałyby uzyskanie klonów zwierząt cechujących się dużą odpornością na choroby, w tym również na choroby pasożytnicze. W USA podjęto próby klonowania osobników, u których stwierdzono naturalną, genetycznie uwarunkowaną odporność na brucellozę. Zainteresowaniem cieszą się także rasy bydła i owiec pochodzące z geograficznie izolowanych wysp, głównie nowozelandzkich, a także rzadka już dziś rasa owiec gulf coast

native, u których wytworzyła się duża, niespotykana u innych ras, odporność na choroby pasożytnicze.

Dla hodowli i produkcji mięsa bardzo istotna jest obecnie możliwość uzyskania, drogą tzw. sterowanej mutagenezy oraz klonowania somatycznego, zwierząt ze znokautowanym (zinkaktywowanym) genem białka prionowego odpowiedzialnego za powstawanie pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (TSEs – transmissible spongiform encephalopathies), zwłaszcza scrapie u owiec i BSE (bovine spongiform encephalopathy) u bydła. Ma to o tyle istotne znaczenie, oprócz powodów czysto ekonomicznych, że istnieją uzasadnione podejrzenia o zoonotyczne powiązania pomiędzy BSE a nową odmianą choroby Creutzfeldta-Jakoba (nvCJD – new variant Creutzfeldt-Jakob Disease) u ludzi. Pierwsze tak zmodyfikowane genetycznie osobniki u bydła uzyskali niedawno badacze japońscy i amerykańscy.

Niska efektywność klonowania somatycznego (najliczniejsze klony somatyczne liczą u bydła najwyżej 10-13 osobników) z jednej strony, z drugiej zaś możliwości, jakie ta technika stwarza, powodują, że poznanie mechanizmów, które odpowiedzialne są za prawidłowy rozwój rekonstruowanych zarodków jest sprawą absolutnie konieczną. Badania w tym zakresie prowadzone w IGiHZ PAN w Jastrzębcu oraz IZ-PIB w Balicach mogą wnieść istotny wkład w podwyższenie efektywności klonowania oraz poprawę jakości zarodków uzyskiwanych w wyniku klonowania somatycznego.

Badania przeprowadzone w IGiHZ PAN finansowane były z tematu statutowego S.III.1.3, projektu grantowego 2P06D 02626 oraz Sieci Naukowej Biotechnologia Rozrodu.

Funkcjonalna genomika bydła – polimorfizm i ekspresja genów kandydujących na markery genetyczne produkcji mlecznej i mięsnej

Lech Zwierzchowski

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Najważniejszym celem funkcjonalnej genomiki zwierząt gospodarskich jest poszukiwanie genetycznych markerów cech produkcyjnych. Poszukuje się także markerów dla innych cech ważnych z punktu widzenia hodowli zwierząt – płodności i plenności, odporności na choroby, długości użytkowania produkcyjnego, długowieczności.

W jednej z metod identyfikacji markerów cech ilościowych ocenia się wpływ polimorfizmu tzw. genów kandydujących (candidate genes) na fenotypową wartość określonych cech ilościowych. Badania takie dotyczą genów o znanej sekwencji

nukleotydowej i zdefiniowanym udziale w regulacji procesów biochemiczno-fizjologicznych, kształtujących określoną cechę. Występowanie zmienności allelicznej w częściach strukturalnych oraz regulatorowych genów kandydujących może wpływać na zróżnicowanie cech fenotypowych zwierząt.

Zidentyfikowano kilkanaście mutacji o bardzo dużym efekcie fenotypowym, związanym z cechami produktywności mlecznej lub mięsnej bydła, np. mutacje genów kazeiny κ [11], DGAT1 [7] i GHR [3]. Jednym z najbardziej efektywnych osiągnięć genomiki funkcjonalnej bydła było wykrycie „funkcjonalnych” mutacji w genie miostatyny (GD 8 – growth, differentiation factor 8, białko z rodziny czynników TGF β), która jest inhibitorem wzrostu i różnicowania mięśni [8]. W genie miostatyny bydła wykryto kilkanaście mutacji. Niektóre z nich, zlokalizowane w eksonach II i III, powodują powstanie przedwczesnych kodonów „stop” lub przesunięcie ramki odczytu, zatrzymanie translacji i powstanie skróconych, nieaktywnych białek. U niektórych ras bydła prowadzi to do powstania przerostu mięśni – tzw. fenotypu podwójnego umięśnienia (double muscled cattle). Takie bydło charakteryzuje się bardzo dużą produkcją mięsa o dobrej jakości. Mutacje o bardzo dużym efekcie fenotypowym wykryto w genach kozich kazein α S1, α S2 i β . Polimorfizm kazeiny α S1 wpływa na przebieg składowania transkryptu (alternative splicing), translację mRNA i na zawartość kazeiny α w mleku. Wykryto kilkanaście wariantów genu kazeiny α S1 kozy. Warianty „silne” – A, B, C – warunkują dużą zawartość kazeiny α w mleku, warianty „słabe” – małą zawartość, a wariant „0” – całkowity brak tej kazeiny w mleku kóz [17].

Postęp genomiki funkcjonalnej zależy w dużej mierze od poznania genomów zwierząt gospodarskich i innych zwierząt

domowych. Znana jest pełna sekwencja genomu człowieka, myszy, kury i psa. Udostępniono już wstępne wyniki sekwencjonowania genomu bydła (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/cow/index.html>). Sekwencjonowanie genomu świni zostanie przypuszczalnie zakończone w ciągu dwóch lat. W internetowych bazach danych dostępne są sekwencje różnych fragmentów DNA zwierząt gospodarskich i domowych – sekwencje kodujące genów, sekwencje nie-kodujące, w tym regulatorowe, cDNA i inne. W bazie GenBank znajduje się obecnie (wrzesień 2007) następująca liczba zapisów sekwencji dla różnych gatunków zwierząt domowych: bydło – 671 398; kura – 611 068; świnia – 291 808; koń – 23 030; karp – 12 512; owca – 11 656; koza – 2478; pies – 1 984 880; kot – 113 346. Badane są funkcje różnych sekwencji genomowych, przy zastosowaniu nowoczesnych metod molekularnych – transkryptomiki, proteomiki, metabolomiki.

Polimorfizm sekwencji nukleotydowej może istotnie wpływać na funkcje genu. Efekt polimorfizmu zależy od rejonu genu, w jakim jest on zlokalizowany. Mutacje w rejonach promotorowych genów mogą modyfikować wiązanie czynników transkrypcyjnych, wpływać na tempo transkrypcji i na ekspresję genów. Polimorfizm w miejscach składania pierwotnego transkryptu może prowadzić do powstawania różnych transkryptów (alternatywny splicing), a nawet różnych białek. Mutacje w rejonach kodujących genów (eksonach) mogą wpływać modyfikująco na biologiczne właściwości białka – produktu ekspresji genu. Taki funkcjonalny polimorfizm może w efekcie wpływać na ważne cechy fizjologiczne i biochemiczne zwierzęcia (np. zmiany w sekrecji i poziomie hormonów; szlaków metabolicznych) i w efekcie modyfikować ważne cechy produkcyjne (mutacje przyczynowe).

Geny-markery cech ilościowych identyfikuje się zazwyczaj na podstawie wyliczonej matematycznie korelacji między obecnością w genotypie określonych form polimorficznych genu a wystąpieniem, brakiem lub poziomem jakiejś cechy. Taka korelacja nie określa jednak związku przyczynowego między genotypem a cechą. Mimo licznych badań, dostępności sekwencji całych genomów albo znacznych ich fragmentów i innych informacji z różnych obszarów biologii, proces wyjaśniania zależności genotyp-fenotyp jest dopiero w fazie początkowej.

Celem naszych badań, prowadzonych w Zakładzie Biologii Molekularnej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, było poszukiwanie genetycznych markerów cech produkcyjnych u zwierząt gospodarskich. Analizowano polimorfizm genów-kandydatów, wytypowanych na podstawie biologicznej funkcji kodowanych przez nie białek, a następnie starano się określić funkcjonalne zależności pomiędzy genotypem a cechą. Moim zdaniem, takie podejście może nie tylko doprowadzić do opartej na racjonalnych podstawach wytypowania genów-markerów cech produkcyjnych bydła, ale pozwoli także na poznanie niektórych molekularnych mechanizmów oddziaływania genotypu na fenotyp. Badania prowadzone były, między innymi, w ramach projektu zamawianego MNiSW „Identyfikacja polimorfizmu sekwencji kodujących i regulacyjnych genów: hormonu wzrostu, prolaktyny, ich receptorów oraz czynników transkrypcyjnych Pit-1 i STAT5 u bydła – mechanizmy ich oddziaływania na cechy użytkowe”, realizowanego w latach 2001-2004, i obecnie są kontynuowane w ramach skoordynowanego przez nasz Instytut projektu zamawianego „Funkcjonalna genomika bydła – polimorfizm i ekspresja genów uczestniczących w regulacji rozwoju mięśni i związanych z cechami produktywności mięsnej i jakością wołowiny”.

Realizując te projekty postawiliśmy następującą hipotezę badawczą:

- genetycznie uwarunkowane zróżnicowanie w produktywności zwierząt wynika z indywidualnych lub związanych z rasą różnic w sekwencji nukleotydów w genach kluczowych dla regulacji procesów biochemiczno-fizjologicznych, kształtujących określoną cechę;

- kluczową rolę w kształtowaniu cech produkcyjnych mają funkcjonalne mutacje w obrębie tych genów, tzn. takie, które wpływają na ekspresję genu lub na właściwości kodowanych białek;

- zwierzęta o wyraźnie różniącej się użytkowości, np. użytkowości mięsnej lub mlecznej, różnią się profilem ekspresji genów tkankowo specyficznych;

- profil ekspresji genów jest zróżnicowany w poszczególnych okresach rozwoju osobniczego;

- zróżnicowana ekspresja genów może wynikać z polimorfizmu sekwencji nukleotydów w rejonach regulatorowych.

Oczywiście takie założenia są pewnym uproszczeniem. Nie uwzględnia ono faktu, że większość cech produkcyjnych to tzw. cechy ilościowe, determinowane przez dziesiątki, a nawet setki różnych genów. Tym niemniej już obecnie znanych jest co najmniej kilka genów, nazywanych niekiedy genami głównymi, których mutacje mają dla określonych cech znaczenie zasadnicze. Wymienić tu można polimorfizm genu kazeiny κ i związane z nim różnice w jakości mleka krowiego, jako surowca do produkcji serów; polimorfizm genu miostatyny i jego związek z wydajnością i jakością wołowiny; mutacja genu RYR1, wpływająca na jakość mięsa świń, czy polimorfizm genów BMP15 (bone morphogenetic protein) i jego receptora (BMPR-1B-Alk6), leżący u podstaw dużej plenności owiec rasy merynos booroola. Mamy nadzieję, że wynikiem naszych badań także będzie identyfikacja genów o kluczowym znaczeniu dla podstawowych cech produkcyjnych bydła – mleczności i mięsności.

Do badań wytypowano geny, które ze względu na funkcje kodowanych przez nie białek są kandydatami na markery cech produkcyjnych lub cech funkcjonalnych (np. rozrodu) zwierząt gospodarskich. Analizowano więc polimorfizm genów: białek mleka (kazein); hormonu wzrostu (GH); prolaktyny (PRL); receptora GH (GHR); czynnika transkrypcyjnego Pit-1, zawiadującego syntezą GH i PRL w przysadce; czynnika transkrypcyjnego STAT5, uczestniczącego w przekazywaniu sygnału GH i PRL we wnętrzu komórek; miostatyny (MNTN) – białka hamującego rozwój mięśni; leptyny – hormonu związanego z pobraniem, wykorzystaniem paszy i z rozrodem; receptorów estrogenowych α i β (ER α i ER β), związanych z rozrodem oraz regulacją wzrostu i różnicowania komórek i tkanek.

Schemat badań był następujący. Najpierw poszukiwano polimorfizmu w rejonach kodujących i regulatorowych wytypowanych genów. Stosowane były standardowe metody, oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – polymerase chain reaction): polimorfizm konformacyjny pojedynczych nici DNA (SSCP – single-strand conformation polymorphism), PCR-HD (PCR-heteroduplex), sekwencjonowanie i polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – restriction fragment length polymorphism). Następnie badano wpływ znanego polimorfizmu na funkcję genu lub na właściwości biologiczne białka kodowanego przez ten gen. Jeżeli był to polimorfizm zlokalizowany w rejonie regulatorowym genu (promotorze), badano czy wpływa on na wiązanie czynników transkrypcyjnych, białek jądrowych regulujących ekspresję. Wiązanie czynników transkrypcyjnych do DNA analizowano

najpierw teoretycznie, stosując symulacje komputerowe w programach TESS i TRANSFAC (podobieństwo polimorficznej sekwencji DNA do „konsensusu” dla określonego czynnika), a następnie doświadczalnie za pomocą metody EMSA (electromobility shift assay). Ekspresję genu analizowano na poziomie mRNA, za pomocą metod RT-PCR (reverse transcription PCR) lub Real-time PCR, lub na poziomie białka, stosując metodę Western-blotting. Dla polimorfizmów zlokalizowanych w rejonach kodujących genów białek receptorowych (receptora prolaktyny i receptora estrogenów) przeprowadzono analizę parametrów wiązania odpowiednich ligandów stosując metodę Scatcharda, która pozwala na określenie powinowactwa wiązania (stała dysocjacji – K_d) i pojemności wiązania (B_{max}). Badano także wpływ polimorfizmu na parametry sekrecji i poziom hormonów (PRL, GH, IGF1) we krwi bydła. Dla białek będących czynnikami transkrypcyjnymi, np. dla czynnika STAT5A, badano różnice w wiązaniu z DNA. Dla większości znalezionych polimorfizmów analizowano związek z cechami produkcyjnymi bydła. Ta część badań była wykonywana we współpracy z Zakładem Doskonalenia Zwierząt naszego Instytutu. Zakres prowadzonych badań przedstawiono schematycznie na rysunku.

Znaleziono kilkadziesiąt nowych polimorfizmów. W większości były to pojedyncze podstawienia nukleotydów (SNP – single nucleotide polymorphism). Wykrywano także insercje lub delecje pojedynczych lub kilku nukleotydów (mutacje typu InDel) oraz polimorficzne, tandemowe powtórzenia dwóch lub trzech nukleotydów (mikrosatelity), zlokalizowane w intronach lub w promotorach. Niektóre z badanych genów okazały się szczególnie polimorficzne (np. gen STAT5A), w innych dość trudno było wykryć polimorfizm (np. gen GHR). Szczególnie interesujące z punktu widzenia naszych badań były te polimorfizmy rejonów regulatorowych (promotorów), które są zlokalizowane w miejscach potencjalnego wiązania czynników transkrypcyjnych. Dla niektórych z tych polimorfizmów udało się wykazać wyraźny związek z ekspresją genu. Zidentyfikowano także kilka polimorfizmów zlokalizowanych w rejonie kodującym genów, które powodowały podstawienia aminokwasów. Można się było spodziewać, że taki polimorfizm może istotnie zmieniać właściwości białka, szczególnie jeżeli znajduje się on w rejonie genu kodującego ważne domeny funkcjonalne białka – domenę wiążącą DNA w przypadku czynników transkrypcyjnych, czy domenę wiążącą ligand w przypadku receptorów. Takie zależności funkcjonalne również udało się wykryć.

Funkcjonalny polimorfizm genów kazeiny

W naszych badaniach stwierdzono, między innymi, że transycja T/C w pozycji –733 i polimorfizm typu InDel (T/–) w pozycji –728 w promotorze genu bydlęcej kazeiny $\alpha S1$ wpływają na wiązanie czynników transkrypcyjnych i na ekspresję genu. Ponadto delecja T istotnie wpływała na skład mleka krów, zmniejszając stężenie kazeiny $\alpha S1$ w mleku. Stwierdzono także, że substytucja dwóch nukleotydów w promotorze genu kazeiny $\alpha S2$ – AC/CT w poz. –1101/–1100 zmienia powinowactwo do czynnika transkrypcyjnego TR (receptor hormonów tarczycy). Transycja C/T w poz. –186 genu kazeiny $\alpha S2$ wpływała na wiązanie czynników transkrypcyjnych CREB i AP1, natomiast transycja C/T w poz. –1084 wpływa na poziom ekspresji genu w gruczole mlekowym krowy [17, 21, 22, 23].

Polimorfizm i ekspresja genów związanych z „osią somatotropową”

Badano także funkcjonalność polimorfizmu genu hormonu wzrostu (GH) i innych genów związanych z tzw. osią soma-

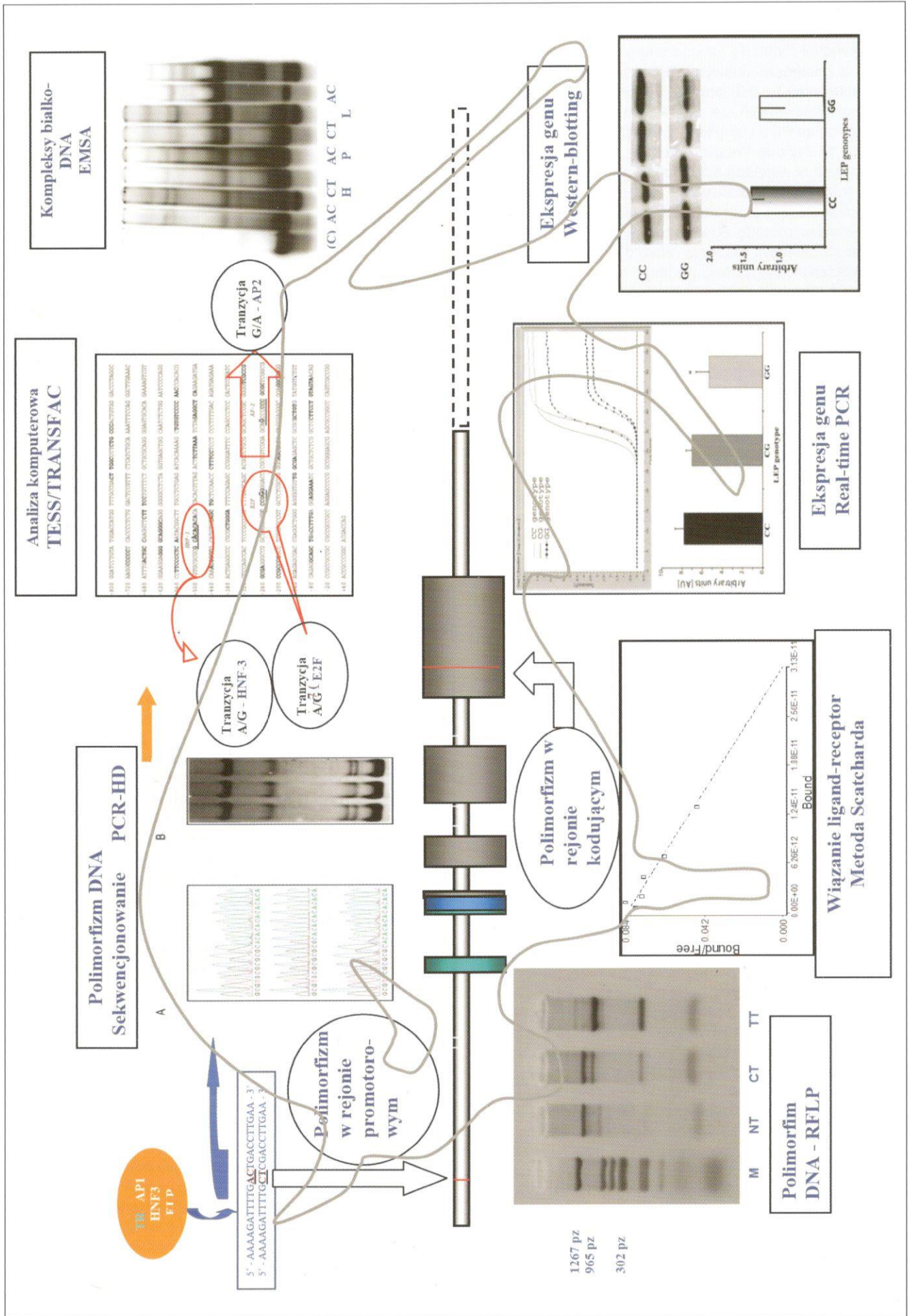
tropową. W rejonie promotorowym genu GH znaleziono trzy nowe polimorfizmy typu SNP, jednak żaden z nich nie leżał w miejscu wiązania czynnika transkrypcyjnego i dlatego nie prowadziliśmy badań nad ich „funkcjonalnością”.

W rejonie promotorowym genu GHR, powyżej promotora P1, wykazano obecność retrotranspononu – elementu powtarzalnego typu LINE-1, o długości 1206 pz. U pięciu krów polskich lokalnych ras (polska czerwona i białogrzbieta) stwierdzono brak elementu LINE-1. U tych zwierząt znaleziono także, w formie heterozygotycznej, haplotyp typowy raczej dla bydła zebu (*Bos indicus*) niż dla bydła europejskiego. Taki sam haplotyp, w formie homo- lub heterozygotycznej, stwierdzono też u niektórych ras bydła z rejonów wschodniej i południowej Europy – podolskiej, siwej ukraińskiej i węgierskiej. Może to świadczyć o „kontaminacji” genotypem „indicus” niektórych ras europejskich [14, 16]. Stwierdzono ponadto różnice w pojemności receptora GH (B_{max}) i jego powinowactwa (K_d) do ligandu (znakowanego ^{125}I GH) u bydła mlecznego o różnych genotypach GHR w odniesieniu do rejonu promotorowego i rejonu kodującego domenę transbłonową [9, 15].

W rejonie regulatorowym genu prolaktyny (PRL) bydła zidentyfikowano siedem nowych mutacji – sześć substytucji i jedną delecję. Wykazano związek tych polimorfizmów z ekspresją genu PRL w przysadce. Najbardziej interesującym okazał się polimorfizm TGTG/del w rejonie promotorowym genu PRL, gdyż delecja TGTG całkowicie likwidowała miejsce wiązania czynnika GR (receptor glikokortykoidów) i wyraźnie wpływała na ekspresję genu PRL; poziom transkryptu PRL i zawartość białka prolaktyny były zawsze większe w przysadkach zwierząt o genotypie z insercją TGTG [12, 13].

W genie STAT5A (signal transducer and activator of transcription) bydła znaleziono łącznie piętnaście nowych miejsc polimorficznych. Mutacje zlokalizowano m.in. w odcinku promotorowym oraz w eksonach kodujących domenę wiązania z DNA i domenę SH2, odpowiedzialną za aktywację tego czynnika transkrypcyjnego. Większość znalezionych mutacji to pojedyncze podstawienia nukleotydów – SNP; znaleziono także dwie mutacje typu InDel w sekwencjach mikrosatelitarnych. Niektóre z mutacji zlokalizowanych w eksonach zmieniają sekwencję aminokwasów w białku [4]. Wykazano różnice w wiązaniu wariantów genetycznych STAT5A z DNA [6]. Ponadto wykazano wpływ mutacji G/A w poz. –488 w promotorze genu STAT5A na ekspresję genu, mierzoną na poziomie mRNA i białka [5].

W badaniach analizowano ekspresję genów IGF1, IGF2 i GHR w różnych okresach rozwoju osobniczego bydła (w życiu płodowym i po urodzeniu), a także ekspresję tych genów w wątrobie buhajków bydła ras wyraźnie zróżnicowanych pod względem typu użytkowania, zawartości mięsa w tuszy i jego jakości (Lisowski i Zwierzchowski, dane niepublikowane). Próbkę wątroby pozyskano z 2-, 5- i 8-miesięcznych płodów bydlęcych oraz od 6-, 9- i 12-miesięcznych buhajków różnych ras (hereford, limousine, czarno-biała i polska czerwona). Stwierdzono, że zmiany ekspresji genów IGF1 i IGF2 w trakcie ontogenezy bydła odzwierciedlają znaną funkcję tych czynników w regulacji wzrostu w okresie pre- i postnatalnym. Ekspresja genu GHR, niemal niewykrywalna w wątrobie płodów bydlęcych, była najwyższa u urodzonych 6-miesięcznych buhajków. Są to pierwsze wyniki obrazujące zmiany ekspresji genów IGF1, IGF2 i GHR u bydła w trakcie rozwoju osobniczego. Ponadto wykazano, że ekspresja genu IGF1 jest wyraźnie większa w wątrobie 12-miesięcznych buhajków ras mlecznych (cb i pc), a ekspresja genu IGF2 jest większa



Rys. Schemat prowadzonych badań

w wątrobie 6-miesięcznych buhajków ras mięsnych. Stwierdzono też istotne różnice międzyrasowe w poziomie ekspresji genu GHR. Uzyskane wyniki wskazują na znaczne zróżnicowanie ekspresji genów GHR, IGF1 i IGF2 u zwierząt różniących się pod względem typu użytkowania i produkcji oraz jakości mięsa, co potwierdza wartość tych genów, jako potencjalnych markerów cech produkcyjnych bydła.

Polimorfizm i ekspresja genów receptorów estrogenowych α i β

Ponieważ pełna sekwencja genów receptorów estrogenowych bydła nie jest znana, w pierwszym etapie badań zsekwenjonowano 2853 pz rejonu 5' genu receptora estrogenowego α (ER α) bydła oraz innych przedstawicieli rodziny *Bovidae* – kozy, owcy, muflona i żubra [19]. W genie ER α wykryto cztery polimorfizmy typu SNP – dwa w rejonie 5', jeden w intronie 6, jeden w eksonie 7. W genie ER β wykryto dwa polimorfizmy; jeden w rejonie 5' i jeden w eksonie 7. Stwierdzono, że transwersja C/A w eksonie 7 genu ER α , zmieniająca sekwencję aminokwasów w domenie LBD (ligand binding domain) receptora, wpływa na parametry wiązania z receptorem liganda, znakowanego trytelem estradiolu [18, 20].

Zbadano poziom ekspresji genów ER α i ER β w różnych tkankach i narządach 12-miesięcznych buhajków rasy cb oraz w wątrobie i macicy 6-miesięcznych jałówek tej samej rasy, a także ekspresję genów ER α i ER β w wątrobie buhajków różnych ras i w różnym wieku, w trakcie intensywnego wzrostu i kształtowania się umięśnienia. Stwierdzono, że poziom ekspresji genu receptora estrogenowego α wykazuje znaczne zmiany w trakcie życia płodowego i po urodzeniu; ekspresja genu ER β zmienia się w znacznie mniejszym stopniu. Ponadto wykazano związane z typem produktywności różnice w poziomie ekspresji genów receptora estrogenowego. Ekspresja ER α jest wyższa w wątrobie zwierząt o typie użytkowym mlecznym niż mięsnym. Zaobserwowano, że ekspresja genów receptora estrogenowego α i β jest tylko nieznacznie wyższa w wątrobie 6-miesięcznych jałówek niż w wątrobie 6-miesięcznych buhajków, co wskazuje na ważną funkcję estrogenów i ich receptorów zarówno u samic, jak i u samców.

Polimorfizm i ekspresja miogennych czynników transkrypcyjnych rodziny MyoD

Wykryto cztery polimorfizmy typu SNP, zlokalizowane w eksonie 1 genu Myf5 bydła. Wszystkie cztery mutacje zawierają się w regionie genu Myf5 kodującym domenę transaktywacyjną N-końca. Analiza występowania poszczególnych genotypów u różnych osobników i różnych ras bydła sugeruje, że trzy z wykrytych polimorfizmów są ze sobą ściśle sprzężone i tworzą prawdopodobnie haplotyp. Lokalizacja znalezionych mutacji sugeruje, że mogą one mieć wpływ na zmianę aktywności biologicznej czynnika Myf5.

Ekspresję genów z rodziny MyoD badano w mięśniach bydła czterech ras, wyraźnie zróżnicowanych pod względem użyteczności mlecznej i mięsnej. Stwierdzono istotne różnice międzyrasowe w ekspresji genu Myf6 w mięśni buhajków w wieku 6 i 12 miesięcy. Największe różnice wystąpiły pomiędzy rasami hereford (najwyższy poziom ekspresji) i limousine (najniższa ekspresja). Podobnie, ekspresja genu Myf5 była najwyższa u bydła rasy hereford. W rozwoju osobniczym wykazano tendencję spadkową poziomu ekspresji genów Myf5, Myf3, Myf4, przy zaobserwowanym stałym poziomie ekspresji genu Myf6. Znalezione różnice, pomiędzy rasami w poziomie ekspresji miogennych czynników transkrypcyjnych, mogą stanowić odzwierciedlenie różnicowania rasowego pod względem produktywności mięsnej i jakości woła-

winy (Robakowska-Hyżorek i Zwierzchowski, dane niepublikowane).

Gen miostatyny

W badaniach poszukiwaliśmy polimorfizmu w rejonie promotorowym genu MSTN bydła. Nową mutację – tranzycję G/C – zidentyfikowano jedynie w rejonie bardzo odległym od miejsca inicjacji transkrypcji, w pozycji –7665, w pobliżu wcześniej opisanego mutacji BTAFJ, gdzie przypuszczalnie znajduje się sekwencja spowalniająca transkrypcję (silencer) [12]. Wykazano związek tej mutacji z zawartością aktywnej formy miostystyny w mięśniach, mierzonej metodą Western-blotting [10].

Gen leptyny

Podczas badań wykryto funkcjonalny polimorfizm – transwersję C/G w pozycji –105 promotora genu leptyny bydła. Analiza komputerowa w programach TESS i TRANSFAC wykazała, że ta mutacja znajduje się w miejscu wiązania czynnika transkrypcyjnego SP1. Metodą EMSA potwierdziliśmy doświadczalnie, że transwersja C/G zmienia powinowactwo promotora genu LEP do czynnika SP1 i wpływa na ekspresję genu leptyny, mierzoną na poziomie mRNA metodą Real-time PCR [1, 2].

Podsumowanie i wnioski

W zaprezentowanych badaniach znaleźliśmy kilkadziesiąt nowych polimorfizmów w bydlęcych genach kazein, GH, GHR, PRL, STAT5A, MSTN, LEP, ER α i ER β . Niektóre z badanych polimorfizmów można nazwać „funkcjonalnymi”, gdyż:

- wpływają na właściwości biologiczne białka, np. wiązanie z DNA (STAT5A) lub wiązanie liganda (GHR, ER α);
- wykazują związek z sekrecją hormonów i ich poziomem we krwi (GH, PRL, GHR);
- wykazują związek z ekspresją genu (kazeiny, PRL, STAT5A, MSTN, LEP, ER α);
- wykazują związek z cechami produkcyjnymi zwierząt.

W badaniach wykazano wpływ polimorfizmu większości analizowanych genów na cechy produkcyjne bydła. Jednak żaden ze znalezionych przez nas „funkcjonalnych” polimorfizmów nie był dla badanych cech ani limitujący, ani decydujący. Stwierdzone asocjacje były raczej niewielkie. Nie udało nam się, jak dotychczas, wykryć mutacji, która byłaby wyraźnie przyczynową dla ważnych cech produkcyjnych bydła – mleczności lub mięsności. Wynika to, jak przypuszczam, z „wielogenowości” badanych cech, czyli z faktu, że jak wszystkie cechy ilościowe, są one determinowane przez wiele genów. Liczę jednak na to, że niektóre ze znalezionych polimorfizmów, po przebadaniu na większych populacjach zwierząt, mogą okazać się wartościowymi markerami cech produkcji mlecznej i mięsnej bydła.

Osoby uczestniczące w realizacji przedstawionych badań: IGiHZ PAN w Jastrzębcu – dr hab. Emilia Bagnicka, prof. Edward Dymnicki, dr Krzysztof Flisikowski (obecnie Technische Universität – Muenchen, Niemcy), dr Renata Grochowska (obecnie Urząd Komitetu Integracji Europejskiej, Warszawa), dr Małgorzata Klauzińska (obecnie National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), prof. Józef Krzyżewski, mgr Paweł Lisowski, dr Andrzej Maj (obecnie Blackhills State University of South Dakota, USA), dr hab. Tadeusz Malewski (obecnie Muzeum i Instytut Zoologii, Warszawa), dr Jolanta Oprządek, mgr Dagmara Robakowska-Hyżorek, mgr Eulalia Siadkowska, dr Rafał Starzyński, dr Nina Strzałkowska, mgr Tomasz Szreder (obecnie Uniwersytet Gdański), dr Małgorzata Szymanowska (obecnie University of Strathelyde, Glasgow, Szkocja), prof. Lech Zwierzchowski; AR w Poznaniu – dr Tatiana Adamowicz (obecnie Technische Universität – Mu-

enchen, Niemcy), prof. Marek Świtoński; IFiZZ PAN w Jablonnie – dr hab. Alina Gajewska, prof. Kazimierz Kochman, dr Marek Snochowski; Wydział Nauk Weterynaryjnych SGGW, Warszawa – dr Michał Jank, prof. Tomasz Motyl i wsp.; Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn – dr Grzegorz Panasiewicz, prof. Bożena Szafrńska.

Literatura: 1. Adamowicz T., 2005 – Polimorfizm wybranych genów bydła: badania filogenetyczne ras oraz związek z wartością hodowlaną cech mlecznych i użytkowością rozplodową buhajów. Rozprawa doktorska, AR w Poznaniu. 2. Adamowicz T., Flisikowski K., Starzyński R., Świtoński M., Zwierzchowski L., 2006 – Mamm. Gen. 17 (1), 77-82. 3. Blott S., Kim J.J., Moisis S., Schmidt-Kuntzel A., Cornet A., Berzi P., Cambisano N., Ford C., Grisart B., Johnson D., Karim L., Simon P., Snell R., Spelman R., Wong J., Viikki J., Georges M., Farnir F., Coppeters W., 2003 – Genetics 163, 253-266. 4. Flisikowski K., 2004 – Wpływ polimorfizmu w regionie regulatorowym i kodującym genu STAT5A bydła na jego ekspresję i funkcję. Rozprawa doktorska, IGiHZ PAN w Jastrzębcu. 5. Flisikowski K., Starzyński R., Zwierzchowski L., 2004 – Biochimica et Biophysica Acta – Gene Structure and Expression 1679 (2), 195-199. 6. Flisikowski K., Szymanowska M., Zwierzchowski L., 2003 – Cel. Mol. Biol. Let. 8, 831-840. 7. Grisart B., Coppeters W., Farnir F., Karim L., Ford C., Berzi P., Cambisano N., Mni M., Reid S., Simon P., Spelman R., Georges M., Snell R., 2002 – Genome Research 12 (2), 222-231. 8. Grobet L., Martin L.J.R., Poncelet D., Royo L.J., Brouwers B., Pirrotin D., Michaux C., Mcnissier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M., 1998 – Mamm. Gen. 9, 210-213. 9. Grochowska R., Gajewska A., Snochowski M., Zwierzchowski L.,

2002 – J. Anim. Feed Sci. 11, 223-236. 10. Jank M., Zwierzchowski L., Siadkowska E., Budasz-Świdorska M., Sadek T., Motyl T., 2006 – J. Anim. Feed Sci. 15, 381-391. 11. Kamiński S., 1996 – J. Appl. Genet. 37, 179-196. 12. Klauzińska M., 2002 – Polimorfizm regionów 5'-flankujących genów GH, GHR, prolaktyny i miostatyny bydła. Rozprawa doktorska, IGiHZ PAN w Jastrzębcu. 13. Klauzińska M., Zwierzchowski L., 2001 – 27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, 30 June – 5 July 2001, Lisbon, Portugal, The FEBS Journal, p. 85, Abstr. PS3-100. 14. Maj A., 2004 – Polimorfizm w regionie regulatorowym i kodującym genu receptora hormonu wzrostu (GHR) bydła i jego wpływ na ekspresję genu i funkcję receptora. Rozprawa doktorska, IGiHZ PAN w Jastrzębcu. 15. Maj A., Gajewska A., Pierzchała M., Kochman K., Zwierzchowski L., 2007 – Neuroendocrinol. Letters 28(4) [Epub ahead of print]. 16. Maj A., Pareek C.S., Klauzińska M., Zwierzchowski L., 2005 – Anim. Breed. Genet. 122, 414-417. 17. Martin P., Szymanowska M., Zwierzchowski L., Leroux C., 2002 – Rep. Nut. Develop. 42, 433-459. 18. Szreder T., 2007 – Polimorfizm genu receptora estrogenu (ER) bydła i jego wykorzystanie jako markera cech produkcyjnych i rozrodu. Rozprawa doktorska, IGiHZ PAN w Jastrzębcu. 19. Szreder T., Zwierzchowski L., 2004 – Applied Genet. 45 (2), 225-236. 20. Szreder T., Żelazowska B., Oprządek J., Zwierzchowski L., 2007 – Mol. Biol. Rep. [Epub ahead of print]. 21. Szymanowska M., 2001 – Wpływ polimorfizmu w regionie 5'-flankującym genów kazeiny bydła na wiązanie czynników transkrypcyjnych i ekspresję genów w gruczole mlekowym. Rozprawa doktorska, IGiHZ PAN w Jastrzębcu. 22. Szymanowska M., Malewski T., Zwierzchowski L., 2004 – Int. Dairy J. 14 (2), 103-115. 23. Szymanowska M., Siadkowska E., Łukaszewicz M., Zwierzchowski L., 2004 – Le Lait 84, 579-590.

Uzyskiwanie zarodków bydłych *in vitro* jako model do badań wdrożeńiowych, biotechnologicznych i podstawowych

Anna M. Duszewska

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

W zespole prowadzonym przez Profesora Z. Reklewskiego, w skład którego wchodzi: doc. dr hab. A.M. Duszewska, lek. wet. J. Wojdan, lek. wet. W. Gawron, mgr A. Rynkowska, mgr inż. E. Muchalska-Wenta, mgr inż. B. Waś i M. Cybulska prowadzone są badania nad uzyskaniem zarodków *in vitro* oraz wykorzystaniem tej biotechniki w hodowli bydła, biotechnologii oraz w badaniach podstawowych.

Uzyskiwanie zarodków bydłych *in vitro* jest podstawową biotechniką, ponieważ umożliwia ona stosowanie pozostałych, takich jak klonowanie, tworzenie transgenicznych osobników i ich klonowanie, a także tworzenie chimer. Uzyskiwa-

nie zarodków *in vitro* jest procedurą wieloetapową (rys.). W pierwszym etapie, zwanym dojrzewaniem oocytów, od dawczyń pobierane są niedojrzałe oocyty. Mogą one być pobierane przyżyciowo lub poubojowo. Proces dojrzewania oocyty przechodzą w warunkach *in vitro*. W kolejnym etapie, zwanym zapłodnieniem *in vitro*, dojrzałe oocyty inkubowane są z plemnikami. Trzecim etapem jest hodowla zarodków *in vitro*. Powstałe w wyniku zapłodnienia zygoty najczęściej hodowane są do stadium blastocysty. W tym stadium zarodki mogą być przeniesione do biorczyń lub też mogą być zamrożone albo wityfikowane i wykorzystane w późniejszym okresie [7]. Po przeniesieniu do biorczyń zarodków otrzymanych *in vitro* otrzymano potomstwo u wszystkich gatunków zwierząt gospodarskich: od owiec w 1987 roku [10], bydła w 1988 [18], świń w 1989 [19], kóz w 1993 [6], koni w 2002 [23]. Również i nasz Zespół uzyskał cielęta po przeniesieniu do biorczyń zarodków uzyskanych *in vitro* [7].

Istnieje wiele możliwości wykorzystania procedury uzyskiwania zarodków *in vitro*. Z pewnością procedura ta może być stosowana komercyjnie, w celu zwiększenia liczby potomstwa. W takich przypadkach mówimy o produkcji zarodków *in vitro* [30]. Jednak, biorąc pod uwagę skuteczność inseminacji oraz programu MOET, stosowanie tej biotechniki nie jest uzasadnione. Natomiast wiele nadziei wiąże się z jej wykorzystaniem w biotechnologii i badaniach podstawowych.

W biotechnologii, to przede wszystkim tworzenie transgenicznego bydła. Przykładem może być uzyskanie transgenicznych krów, charakteryzujących się zwiększonym poziomem β -kazeiny oraz κ -kazeiny w mleku [2] oraz krów odpornych na mastitis, których komórki nabłonkowe gruczolu mlekowego uwalniają lizostafinę działającą bakteriobójczo na