

## Genetyczny aspekt wysokiej plenności u owiec Cz. II

Grzegorz Smołucha, Agata Piestrzyńska-Kajtoch, Barbara Rejduch

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,  
Dział Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Częstość owulacji i liczba jagniąt w miocie mają główny wpływ na wydajność reprodukcyjną owiec oraz opłacalność produkcji owczarskiej. Na cechy reprodukcyjne mają wpływ zarówno sposób odżywiania, sezonowość rozrodu, jak również genotyp. Tradycyjna selekcja, mająca na celu polepszenie cechy, jaką jest liczba młodych w miocie, jest trudna do prowadzenia, ponieważ cechy związane z rozrodem są zazwyczaj nisko odziedziczalne. W dodatku, brak dokładnej wiedzy na temat liczby genów kontrolujących tę cechę i brak informacji o prawdopodobnej interakcji genów to dodatkowe ograniczenia, które wpływają niekorzystnie na polepszanie cech reprodukcyjnych. Szczegółowa wiedza na temat polimorfizmu genów, mających wpływ lub mogących wpływać na płodność i plenność, jest niezbędna do prawidłowego określenia kierunku selekcji owiec. Dlatego, wciąż na całym świecie wielu badaczy poszukuje nowych genów „kandydujących” lub nowych mutacji w znanych już genach, mogących wpływać pozytywnie na cechy reprodukcyjne u owiec różnych ras.

W ostatnich latach zostały zidentyfikowane mutacje w genie *GDF9*, które są powiązane ze wzrostem częstości owulacji u owiec. Gen ten należy do rodziny TGF- $\beta$  i w odróżnieniu od *BMP-15* jest autosomalnym genem, zlokalizowanym u owiec i ludzi na chromosomie 5 (Notter, 2008), a u myszy na chromosomie 11 (McPherron i Lee, 1993). Owczy gen *GDF9* ma długość 2,5 pz i zawiera dwa egzony (I – 397 pz, II – 968 pz), oddzielone od siebie pojedynczym

intronem o długości 1126 pz. Gen ten koduje peptyd o długości 453 aminokwasów, z którego po obróbce potranslacyjnej powstaje dojrzała forma białka, zawierająca 135 aminokwasów (Bodensteiner i in., 1999; Hanrahan i in., 2004; Chu i in., 2011).

Ekspresja genu *GDF9* u owiec zachodzi w oocytach (Akbarpour i in., 2008). Obecność transkryptu oraz białka stwierdza się w oocycie podczas formowania się pęcherzyka, w pęcherzykach pierwotnych typu I oraz w pęcherzykach, będących w fazie intensywnego wzrostu. Liczne badania, przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, że obecność *GDF9* jest niezbędna do prawidłowego rozwoju pęcherzyka pierwotnego, prawidłowego rozwoju i różnicowania komórek ziarnistych i formowania wzgórka jajonośnego (Gui i Joyce, 2005). *GDF9* blokuje produkcję hormonów poprzez hamowanie zależnej od FSH ekspresji receptorów dla LH (Lin i in., 2003; Vitt i in., 2000). Inną funkcją genu *GDF9* jest oddziaływanie na rozwój i różnicowanie komórek tekalnych. *GDF9* powoduje też wzrost ekspresji StAR mRNA (Steridogenic Acute Regulatory Protein) i jego produktu białka StAR, które umożliwia transport do wnętrza komórek cholesterolu LDL, będącego substratem do produkcji hormonów steroidowych (Galloway i in., 2000; Hanrahan i in., 2004; Juengel i in., 2004 a,b; Rybak-Krzyszowska i in., 2004). Badania, przeprowadzone u owiec przez Hanrahan i in. (2004) dowiodły istnienia ośmiu mutacji punktowych w genie *GDF9* (tab.1). Metoda SSCP pozwoliła na identyfikację SNP

w obrębie egzonu 1 (jedna mutacja), w sekwencji intronu (jedna mutacja) i w obrębie egzonu 2 (pięć mutacji).

Mutacje G2, G3, G5 to mutacje ciche, nie powodujące zmian aminokwasu w sekwencji aminokwasowej białka. Pozostałe mutacje wpływały na sekwencję aminokwasów (Hanrahan i in., 2004). Mutacja *FecG<sup>H</sup>* prowadzi do substytucji seryny przez fenyloalaninę w pozycji 77 dojrzałego peptydu GDF9 (Hanrahan i in., 2004). U heterozygotycznych owiec zwiększa ona częstość owulacji i powoduje bezpłodność u homozygotycznych owiec. Wyniki badań przeprowadzonych na małej ilości owiec sugerują, że efekt mutacji w genie *GDF9* i jego wpływ na częstość owulacji są większe niż u owiec posiadających mutacje w genie *BMP-15*. U heterozygot z *FecB<sup>H</sup>* obserwowano zwiększoną częstość owulacji o około 1,4 u rasy Cambridge i Belclare (Davis, 2004).

Interesujące wydaje się istnienie genu, sprzężonego z chromosomem X i podlegającego imprintingowi u owiec linii Woodlands i Metherell, wywodzących się bezpośrednio z rasy Coopworth z Nowej Zelandii (Davis i in., 2001). Na podstawie sposobu dziedziczenia uznano, że gen Woodlands znajduje się na

chromosomie X, lecz jego dokładna lokalizacja nie jest znana (Feary i in., 2007). Dlatego, postanowiono oznaczać odkrytą mutację nazwą *FecX2<sup>W</sup>* – Woodlands gene. Istnienie genu podlegającego imprintingowi i sprzężonego z chromosomem X oznacza, że tryki mogą odziedziczyć ten gen tylko od matki, natomiast macioriki mogą odziedziczyć go od obydwójga rodziców. W przeciwieństwie do mutacji Inverdale i Hanna, gen Woodlands podlega jednak matczynemu imprintingowi, co oznacza, że podlega ekspresji tylko wówczas, gdy jest dziedziczony od ojca, natomiast kiedy dziedziczony jest od matki, zostaje wyciszony. Co więcej, tylko tryki, które odziedziczyły od matek wyciszony gen Woodlands, mogą produkować owce o wysokiej płodności. Dwie kopie genu Woodlands nie powodują bezpłodności, tak jak to ma miejsce w przypadku genu *BMP-15* (Davis i in., 2001; Davis, 2004). Odkrycie, że płodność u owiec może być dziedziczona nie tylko w wyniku obecności pojedynczego lub współdziałania wielu genów, ale również w wyniku działania mechanizmów epigenetycznych, skłania do ponownego przebadania tych ras owiec, w przypadku których stwierdzono, że wysoka płodność jest dziedziczona poligenicznie.

Tabela 1. Polimorfizm SNP w genie *GDF9* (wg Hanrahan i in., 2004)  
Table 1. SNP polymorphisms in the *GDF9* gene (after Hanrahan et al., 2004)

Wariant Variant	Zamiana nukleotydów Base change	Pozycja w łańcuchu DNA (pz) Coding base (bp)	Pozycja w niedojrzałym białku (aa) Coding residue (aa)	Pozycja w dojrzałym białku (aa) Mature peptide residue (aa)	Zamiana aminokwasów Amino acid change
G1	G-A	260	87	–	R-H
G2	C-T	471	157	–	V
G3	G-A	477	159	–	L
G4	G-A	721	241	–	E-K
G5	A-G	978	326	8	E
G6	G-A	994	332	14	V-I
G7	G-A	1111	371	53	V-M
G8	C-T	1184	395	77	S-F

## Geny kandydujące, mogące wpływać na płodność u owiec

Receptory prolaktyny (*PRLR*) występują w wątrobie, gruczole sutkowym i organach rozrodczych ssaków. U człowieka gen *PRLR* jest zlokalizowany na chromosomie 5 (Arden i in., 1990), u świń na chromosomie 16 (Vincent i in., 1997), a u bydła na długim ramieniu chromosomu 20 (Brym i in., 2005). U owiec gen ten nie został do tej pory zlokalizowany, znana jest natomiast sekwencja mRNA (GenBank Acc No.Y10578.1). Gen kodujący receptor prolaktyny zbudowany jest u ludzi z 10 egzonów o całkowitej długości nieprzekraczającej 100 kpz (Arden i in., 1990). Produkt genu *PRLR* został znaleziony m.in. w jajnikach, macicy, gruczołach płciowych i komórkach gruczołu mlekowego. U świń białko, będące produktem ekspresji genu *PRLR*, występuje również w komórkach ziarnistych, ciała żółtego, osłonce zewnętrznej pęcherzyka jajnikowego, gdzie reguluje procesy zachodzące w jajnikach i macicy. Białka te mogą stymulować transdukcję różnych sygnałów wewnątrz komórki, które z kolei mogą prowadzić do aktywacji specyficznych genów, odpowiedzialnych za cechy reprodukcyjne u zwierząt (Ziółkowska i in., 2010). Badania dowiodły, że receptor prolaktyny (*PRLR*) jest białkiem transbłonowym, należącym do rodziny receptorów cytokinowych klasy I i wykazuje duże podobieństwo do receptora hormonu wzrostu (*GHR*) (Fiedorowicz, 2004).

W ostatnich latach został zbadany związek pomiędzy receptorem prolaktyny a cechami reprodukcyjnymi u świń (Terman, 2005; Barreiras i in., 2009) i kóz (Li i in., 2010). Badania te wykazały, że mutacje w genie *PRLR* mają istotny wpływ na liczbę młodych w miocie. Do tej pory ukazała się jedna praca wskazująca na związek pomiędzy polimorfizmem w genie receptora prolaktyny a ilością młodych w miocie u owiec pochodzących z Chin (Zhu i Du, 2001). Na podstawie uzyskanych w różnych pracach wyników, dotyczących polimorfizmu w genie receptora prolaktyny u świń, kóz i bydła, można uznać go za gen kandydujący, mogący mieć wpływ na cechy reprodukcyjne u owiec.

### *MTNR1A* – Melatonin Receptor 1A

Sezonowość w rozrodzie owiec niektó-

rych ras jest jedną z głównych przeszkód w zwiększaniu wydajności cech reprodukcyjnych. Różnice pomiędzy rasami i wewnątrz ras w regulacji liczby rui w roku wskazują, że wykoty poza sezonem są częściowo pod genetyczną kontrolą, lecz jak dotąd, niewiele wiadomo na temat genów kontrolujących ten aspekt reprodukcji owiec (Mateescu i in., 2009). Wiedza o tych genach lub ich markerach pozwoli na bardziej skuteczny i wydajny program selekcji dla asezonalnej reprodukcji owiec. Sekrecja melatoniny jest ważnym endokrynnym sygnałem, kontrolującym sezonowość u owiec. W procesie tym biorą udział specyficzne receptory melatoniny, lecz tylko receptor melatoniny 1A (*MTNR1A*) wydaje się być zaangażowany w procesy regulujące aktywność reprodukcyjną (Mateescu i in., 2009). Gen kodujący receptor melatoniny (ang. Melatonin Receptor 1A-*MTNR1A*) zlokalizowany jest na chromosomie 26 u owiec i zawiera 2 egzony, rozdzielone pojedynczym intronem o długości około 8 kpz (Reppert i in., 1994). Egzon I koduje domenę transbłonową i międzykomórkową pętlę. Pozostała część receptora kodowana jest poprzez większy egzon II. Dwa polimorfizmy zostały znalezione w rejonie kodującym gen *MTNR1A* i powiązane są z sezonowością u kilku ras owiec: Merinos d'Arles (Pelletier i in., 2000), Dorset, Finnsheep (Notter i in., 2003), Small Tail Hansheep (Chu i in., 2003). Brak powiązania wykazano natomiast u jednej rasy – Ile de France (Hernandez i in., 2005). Gen receptora melatoniny 1A kandyduje jako obiecujący marker do wykluczenia sezonowości u owiec.

Endokrynną regulacją sezonowości obejmuje zmiany we wrażliwości mózgu na negatywne sprzężenie zwrotne hormonów steroidowych. Dlatego, niezbędna jest znajomość mechanizmu interakcji hormonów steroidowych z melatoniną, począwszy od szyszynki. Ostatnie badania nad efektem kisspeptyny i jej powiązania z receptorem GRP54 w podwzgórzcu mogą dostarczyć tych brakujących informacji (Notter, 2008). Kisspeptyna, produkt genu *KiSS1* stymuluje uwalnianie GnRH z podwzgórzca u wielu gatunków zwierząt. Smith i in. (2007) udowodnili obecność receptorów steroidowych *KiSS1* w neuronach w jądrze łukowatym w podwzgórzcu owiec. Udowodniono również, że ekspresja genu *KiSS1* w jądrze łukowatym wzrasta podczas przejścia z rui do wykotu. Doniesienia

o wrażliwości neuronów na *KiSS1*, melatoninę i hormony steroidowe mogą dostarczyć brakujących informacji o szlakach metabolicznych, odpowiedzialnych za zmiany sezonowe we wrażliwości podwzgórza na hormony steroidowe.

## Podsumowanie

Badania prowadzone na wysokoplenych rasach owiec dowodzą, że cechy reprodukcyjne tych zwierząt mają podłoże genetyczne. Znane mutacje w głównych genach odpowie-

dzialnych za płodność mogą być skutecznym markerem do poprawy płodności u tego gatunku. Wzrost ilości jagniąt w miocie, jak również aseasonalność mogą przyczynić się do wzrostu opłacalności hodowli owiec zarówno w Polsce, jak i na świecie. Poprzez przeprowadzenie badań i określoną selekcję jesteśmy w stanie kontrolować cechy reprodukcyjne pożądane przez hodowców. Jednakże, nie we wszystkich rasach owiec znane mutacje w genach odpowiadają za płodność i plenność, dlatego wciąż poszukuje się genów „kandydujących”, które mogą regulować cechy reprodukcyjne u owiec.

## Literatura

- Akbarpour M., Houshmand M., Ghorashi A., Hayat-ghaybi H. (2008). Screening for *FecG<sup>H</sup>* mutation of growth differentiation factor 9 gene in iranian ghezel sheep population, *Int. J. Fert. Steril.*, 2, 3: 139–144.
- Arden K.C., Boutin J.M., Djiane J., Kelly P.A., Cavenee W.K. (1990). The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of human chromosome 5. *Cytogenet. Cell Genet.*, 53 (2–3): 161–165.
- Barreras Serrano A., Herrera Haro J.G., Hori-Oshima S., Gutierrez Espinosa A., Ortega Cerrilla M.E., Perez Perez J., Lemus Flores C., Kinejara Espinosa A.L., Arangure Gonzalez A., Soto Avila J.G. (2009). Prolactin receptor (PRLR) gene polymorphism and associations with reproductive traits in pigs. *J. Anim. Vet. Adv.*, 8: 469–475.
- Bodensteiner K.J., Clay C.M., Moeller C.L., Sawyer H.R. (1999). Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.*, 60: 381–386.
- Brym P., Kamiński S., Wójcik E. (2005). Polymorphism within the bovine prolactin receptor gene (PRLR). *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 23 (1): 61–66.
- Chu M.X., Ji C.L., Chen G.H. (2003). Association between PCR-RFLP of melatonin receptor 1a gene and high prolificacy in small tail han sheep, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 16 (12): 1701–1704.
- Chu M.X., Yang J., Feng T., Cao G.L., Fang L., Di R., Huang D.W., Tang Q.Q., Ma Y.H., Li K., Li N. (2011). *GDF9* as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. *Mol. Biol. Reprod.*, 38 (8): 5199–5204.
- Davis G.H., Dodds K.G., Wheeler R., Jay N.P. (2001). Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. *Biol. Reprod.*, 64: 216–221.
- Davis G.H. (2004). Fecundity genes in sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, 82–83: 247–253.
- Feary E.S., Juengel J.L., Smith P., French M.C., O’Connell A.R., Lawrence S.B., Galloway S.M., Davis G.H., McNatty K.P. (2007). Patterns of expression of messenger RNAs encoding *GDF9*, *BMP15*, *TGFBR1*, *BMPR1B*, and *BMPR2* during follicular development and characterization of ovarian follicular populations in ewes carrying the woodlands *FecX2W* mutation. *Biol. Reprod.*, 77: 990–998.
- Fiedorowicz M. (2004). Układ prolaktynergiczny? Wytwarzanie i rola prolaktyny w mózgu. *Kosmos*, 53 (3–4): 305–314.
- Galloway S.M., McNatty K.P., Cambridge L.M. i in. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.*, 25: 279–283.
- Gui L.-M., Joyce I.M. (2005). RNA interference evidence that growth differentiation Factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. *Biol. Reprod.*, 72: 195–199.
- Hanrahan J.P., Gregan S.M., Mulsant P., Mullen M., Davis G.H., Powell R., Galloway S.M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors

- GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.*, 70: 900–909.
- Hernandez X., Bodin L., Chesneau D., Guillaume D., Allain D., Chemineau P., Malpoux B., Migaud M. (2005). Relationship between MT1 melatonin receptor gene polymorphism and seasonal physiological responses in Ile-de-France ewes. *Reprod. Nutr. Dev.*, 45 (2): 151–162.
- Juengel J.L., Hudson N.L., Whiting L., McNatty K.P. (2004 a). Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.*, 70: 557–561.
- Juengel J.L., Bodensteiner K.J., Heath D.A., Hudson N.L., Moeller C.L., Smith P., Galloway S.M., Davis G.H., Sawyer H.R., McNatty K.P. (2004 b). Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim. Reprod. Sci.*, 82–83: 447–460.
- Li Y.J., Zhang L., Shang L.Q., Wang H.F., Zou H., Zhang H., Ji D.J. (2010). Genetic polymorphisms at three loci of *PRLR* and *FSHR* gene correlate with litter size in Chinese Haimen goat. *J. Anim. Vet. Adv.*, 9 (22): 2835–2838.
- Lin S.Y., Morrison J.R., Phillips D.J., Kretser D.M. de (2003). Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin. *Reproduction*, 126: 133–148.
- Mateescu R.G., Lunsford A.K., Thonney M.L. (2009). Association between melatonin receptor 1A gene polymorphism and reproductive performance in Dorset ewes. *J. Anim. Sci.*, 87: 2485–2488.
- McPherron A.C., Lee S.J. (1993). GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J. Biol. Chem.*, 268: 3444–3449.
- Notter D.R. (2008). Genetic aspects of reproduction in sheep. *Reprod. Domest. Anim.*, 43 (2): 122–128.
- Notter D.R., Cockett N.E., Hadfield T.S. (2003). Evaluation of melatonin receptor 1a as a candidate gene influencing reproduction in an autumn-lambing sheep flock. *J. Anim. Sci.*, 81: 912–917.
- Pelletier J., Bodin L., Hanocq E., Malpoux B., Teyssier J., Thimonier J., Chemineau P. (2000). Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for mella receptor in the ewe. *Biol. Reprod.*, 62: 1096–1101.
- Reppert S.M., Weaver D.R., Ebisawa T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 13 (5): 1177–1185.
- Rybak-Krzyszowska M., Grzyb A., Milewicz T., Krzaczkowska-Sendrakowska M., Krzysiek J. (2004). Primary ovarian insufficiency in infertility clinic. *Pol. J. Endocrin.*, 6: 766–768.
- Smith J.T., Clay C.M., Caraty A., Clarke I.J. (2007). *KISS-1* Messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*, 148 (3): 1150–1157.
- Terman A. (2005). Effect of the polymorphism of prolactin receptor (*PRLR*) and leptin (*LEP*) genes on litter size in Polish pigs. *J. Anim. Breed. Genet.*, 122: 400–404.
- Vincent A.L., Wang L., Tuggle C.K., Robic A., Rothschild M.F. (1997). Prolactin receptor maps to pig chromosome 16. *Mamm. Genome*, 8 (10): 793–794.
- Vitt U.A., Hayashi M., Klein C., Hsueh A.J.W. (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol. Reprod.*, 62: 370–377.
- Zhu J., Du L.X. (2001). The Progress of candidate genes for fecundity in small ham sheep. *Anim. Sci. Vet. Med.*, 24: 31–33.
- Ziółkowska A., Bogodzińska M., Biegiewski J. (2010). Polymorphism of prolactin receptor gene (*PRLR*) in the Polish Landrace and Polish Large White swine population and reproductive traits. *J. Cent. Eur. Agr.*, 11: p. 4.

## GENETIC ASPECT OF HIGH PROLIFICACY IN SHEEP. PART II

### Summary



Genetic studies in sheep have indicated that ovulation rate and litter size can be genetically regulated by the action of single genes with major effect known as fecundity (*Fec*) genes, or alternatively by a set of different genes each having a small effect. Polymorphisms of several genes belonging to the transforming growth factor  $\beta$  superfamily (*BMPR1B*, *GDF9*, *BMP15*) can increase ovulation rates in heterozygous ewes and cause infertility in homozygous ewes. Additionally, we described two genes (*MTNR1A*, *PRLR*) which can have an effect on increased litter size in sheep. In this review we focus on the characteristic genes affecting ovulation rate, litter size in sheep and candidate genes which can be involved in mechanisms controlling prolificacy in sheep.



Cakiel podhalański (fot. W. Puchalski) – *Podhale Zackel*