

Aktualne kierunki badań nad genetycznymi uwarunkowaniami obniżonej płodności ogierów

Monika Stefaniuk-Szmukier, Zenon Podstawski, Magdalena Pieszka, Bogusława Długosz,
Romana Augustyn, Weronika Petrych, Jarosław Łuszczynski

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Instytut Nauk o Zwierzętach, Zakład Hodowli Koni,
al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków; mstefaniuk-szmukier@ar.krakow.pl

Doskonalenie zwierząt hodowlanych, w tym również koni przy użyciu podstawowych metod opartych na fenotypowej obserwacji osobników rodzicielskich oraz analizie rodowodowej przyniosło niekwestionowaną poprawę wielu istotnych cech z punktu widzenia szeroko pojętej hodowli tych zwierząt. Odpowiednio prowadzona praca hodowlana tworzy podstawę programów hodowlanych, których celem nadrzędnym jest przyspieszenie postępu hodowlanego przy zachowaniu maksymalnej zmienności genetycznej (Strabel, 2010). W ostatnich latach jednym z prężnie rozwijających się obszarów badań jest poszukiwanie genetycznego podłoża płodności koni, w tym głównie ogiera, co jest dyktowane możliwościami reprodukcyjnymi, jak i modelem, w którym ogier może pokryć większą liczbę klaczy, natomiast klacz może wydać jednego potomka rocznie. Ponadto, ogiery o obniżonej płodności generują koszty wynikające ze zwiększonych nakładów przypadających na skuteczne krycie klaczy, m.in.: koszty transportu, usług weterynaryjnych, hotelowania klaczy przy nieskutecznym kryciu oraz utrzymania jałowych klaczy (Pycocock i in., 2006). Dlatego też, coraz częściej zwraca się uwagę na genetyczne aspekty płodności ogiera oraz ich ewentualne późniejsze wykorzystanie w selekcji (Hamann i in., 2007).

Ostatnie dwudziestolecie zaowocowało ogromnym rozwojem genetyki koni. Priorytetem było opracowanie zintegrowanych oraz cytogenetycznych map genomu konia, z których pierwsze powstały w oparciu o techniki hybrydyzacji *in situ* z zastosowaniem fluorescencyjnych sond (Chowdhary i Raudsepp, 2000), hybrydyzacji komórek somatycznych (SCH), czy mapowania radiacyjnego (radiation hybrid RH) (Chowdhary

i in., 2003; Raudsepp i in., 2008).

W 1990 r. zainicjowano prace nad poznaniem sekwencji nukleotydowej genomu konia, które były prowadzone przez międzynarodowe konsorcjum i w 2007 r. dokonano jego kompletnej adnotacji (Wade i in., 2009).

Dostępność narzędzi do analizy molekularnej umożliwiła zbadanie genetycznego podłoża konkretnych cech mogących mieć zastosowanie w selekcji, jak również nieprawidłowości leżących u podstaw chorób genetycznych, mających dziedziczne podłoża u koniowatych (Finno i Bannasch, 2014).

U większości zwierząt gospodarskich, w tym również koni wiele uwagi poświęca się na poszukiwanie *loci* cech ilościowych (ang. *Quantitative Trait Loci* – QTL), czyli regionów chromosomowych, w których występują zmiany sekwencji nukleotydowych odpowiedzialne za zmienność cech produkcyjnych, podatność lub oporność na choroby, również choroby genetyczne. Jak dotąd, u koni zidentyfikowano 1245 QTL (1.05.2017, www.animalgenome.org/QTLdb), warunkujących 42 cechy produkcyjne podzielone na klasy: zdrowie 918, eksterier 95, cechy użytkowe 92, wzrost i rozwój 47, behawior 21 oraz 82 QTL, które są związane z cechami reprodukcyjnymi. Cechy reprodukcyjne podzielono na dwie kategorie: związane z płodnością ogiera (MAFERT) oraz z jakością nasienia, w tym: liczba plemników ruchliwych (MOTSCT), objętość nasienia (SEMVOL), koncentracja plemników w ejakulacie (SPCON), liczba plemników w ejakulacie (SPERMCT) oraz ruchliwość plemników (SPERMOT).

Wśród czynników genetycznych mo-

gących wpływać na możliwości reprodukcyjne ogierów oraz ustalać swoistą strukturę genetyczną jest tzw. polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP – *single nucleotide polymorphism*) uwarunkowany punktowymi mutacjami zmieniającymi sekwencję zasad nici DNA.

Jednym z pierwszych badanych genów kandydujących dla cech reprodukcyjnych był *CRISP1* (cysteine-rich secretory protein 1). Wydzielnicze białka bogate w cysteinę (*CRISP*) biorą udział w fuzji plemnika z komórką jajową (Giese i in., 2002). Wykazano, że pełnią one rolę także w procesie dojrzewania plemników oraz interakcji pomiędzy spermatocytami a komórkami Sertoliego. Ponadto, w przeciwieństwie do innych ssaków nasienie ogiera zawiera duże ilości białka kodowanego przez gen *CRISP3*, co może świadczyć o jego nieznannej funkcji w procesie zapłodnienia koni (Schambony i in., 1998). Badania przeprowadzone przez niemiecki zespół na grupie ogierów hanowerskich wykazały obecność mutacji w genie *CRISP3* c.+622G>A powodującej zamianę aminokwasów istotnie powiązaną z płodnością ogierów. Ogiery posiadające jeden allel zmutowanego genu odznaczały się zmniejszoną płodnością, o 7% niższym wskaźnikiem skuteczności zażrebień w jednym cyklu rujowym (PRPC – *pregnancy rate per cycle*) (Hamann i in., 2007).

Kolejnym genem kandydującym dla płodności ogierów jest *PRLR* (*prolactin receptor*), kodujący receptor prolaktyny. Prolaktyna uczestniczy – między innymi wraz z LH (lutropiną) – w syntezie receptorów hormonów luteinizujących w jądrach oraz bierze udział w regulacji spermatogenezy (Hondo i in., 1995). Ponadto, poprzez swój receptor uczestniczy w przekazywaniu sygnałów pomiędzy gonadami a przysadką (Tortonese i in., 2002). Wykazano także, że dwie mutacje w obrębie *locus PRLR* (BIEC2-589441, BIEC2-560860) mają wpływ na komponent ojcowski, jak i komponent embrionalny wartości hodowlanej ogierów (*Breeding Value* – BV). Dodatkowo mutacja BIEC2-560860 wpływa na wskaźnik skuteczności zażrebień w rui (PRPO – *pregnancy rate per oestrus*) (Giesecke i in., 2010 a).

W poszukiwaniu markerów genetycznych związanych z obniżoną płodnością ogierów przeanalizowano także gen kodujący inhibinę beta A (*INHBA*). Inhibiny wraz z estrogenem i pro-

gesteronem kontrolują wydzielanie FSH (Roser, 1997). Giesecke i in. (2010 b) zidentyfikowali dwie nowe mutacje w tym genie oraz potwierdzili obecność czterech wcześniej zgłoszonych. Autorzy ci, prowadząc badania na ogierach hanowerskich wykazali, że zmiany polimorficzne (g.47743C>T, g.47718T>G, g.47617C>G, g.44933A>G oraz g.44899G>T) w genie *INHBA* istotnie wpływały na cechy reprodukcyjne ogierów.

Kolejnym, interesującym pod względem wpływu na płodność ogierów był *SPATA1* (*spermatogenesis associated 1*). Białko kodowane przez ten gen jest wysoko specyficzne dla jąder, bierze udział w procesie formowania główki plemnika podczas spermatogenezy (L'hôte i in., 2007). Wykazano, że mutacja typu SNP (BIEC2-968854) zlokalizowana w 6 intronie tego genu może zaburzać miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego SP1, przez co może mieć wpływ na regulację genu. Analiza asocjacji potwierdziła wpływ mutacji na wskaźnik skuteczności zażrebień w rui (PRPO) (Giesecke i in., 2009).

Dalsze poszukiwania genów kandydujących doprowadziły do wytypowania i oznaczenia kolejnych SNP w takich genach, jak: *ACE* (*angiotensin converting enzyme*), *SP17* (*sperm autoantigenic protein 17*), *FSHB* (*follicle stimulating hormone*). Wszystkie trzy biorą udział w procesie zapłodnienia. Enzym konwertujący angiotensynę ACE jest częścią systemu RAA (*renin-angiotensin-aldosterone system* – układ renina-angiotensyna-aldosteron) i wykazuje największą aktywność w plazmie nasienia ogierów (Ball i in., 2003), SP17 potencjalnie wpływa na połączenie plemnika z osłonką przejrzystą komórki jajowej (Wen i in., 2001), natomiast hormon folikulo-tropowy FSHB wraz z testosteronem stymulują komórki Sertoliego (Roser, 2008). Nie wykazano żadnych mutacji w regionach kodujących w obrębie wspomnianych genów, natomiast w regionie intronów zidentyfikowano szereg SNP oraz sekwencji mikrosatelitarnych, które poprzez modyfikację miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych mogą mieć wpływ na płodność ogierów (Giesecke i in., 2011).

Intensywny rozwój technik z zakresu badań genetycznych, związany z opracowaniem metod masowego sekwencjonowania DNA i rozwojem technologii wysokoprzepustowego geno-

typowania umożliwił redukcję kosztów oznaczeń i zapoczątkował lawinowy przyrost ilości danych, dotyczących zmienności i struktury, opisujących całe genomy zwierząt gospodarskich (Gurgul i in., 2015). Badania asocjacyjne prowadzone w kierunku identyfikacji molekularnego podłoża dziedzicznych różnic fenotypowych, w obrębie cech produkcyjnych i funkcjonalnych zmierzające do precyzyjnej lokalizacji *loci* cech ilościowych oraz do wykrycia polimorfizmów funkcjonalnych, przyczyniły się do wytypowania markerów związanych z płodnością ogierów. W związku z ogromną ilością potencjalnych genów, które mogłyby mieć związek z płodnością ogierów, duże nadzieje pokładano w zastosowaniu metody GWAS (*genome-wide association study*), która w oparciu o asocjację pomiędzy polimorfizmem pojedynczych nukleotydów a zmiennością danej cechy typuje potencjalne markery genetyczne. Dzięki zastosowaniu tej techniki zidentyfikowano region na chromosomie 13 potencjalnie związany z IAR (*Impaired Acrosomal Reaction* – zespół zaburzonej reakcji akrosomalnej), który diagnozowano zarówno u ludzi, jak i u koni z obniżoną płodnością. Dalsza analiza wykazała silny związek z mutacjami w genie *FKBP6* (FK506 binding protein 6) g.11040315G>A i g.11040379C>A (p.166H>N) a ogierami z syndromem IAR (Raudsepp i in., 2012). Kolejne badania potwierdziły wpływ mutacji *FKBP6* g.11040379C>A (p.166H>N) na płodność ogierów hanowerskich. Homozygoty AA charakteryzował o 7,62% niższy wskaźnik skuteczności zażrebień w cyklu rujowym (PRPC) w porównaniu z homozygotami CC (Schrimpf i in., 2015).

W innych badaniach, w celu ustalenia genetycznego podłoża zmienności wskaźni-

ka PRPC dla ogierów wykorzystano technikę GWAS. Wytypowano gen *PLCz1* (*phospholipase C zeta 1*) kodujący kluczowe białko w mechanizmie oscylacji cytoplazmatycznego stężenia wolnych jonów Ca^{2+} w procesie zapłodnienia. Oscylacje te powstają w sposób zależny od 1,4,5-trójfosforanu inozytolu (IP3) produkowanego przez plemnikową izoformę fosfolipazy C – fosfolipazę C zeta (Ajduk, 2007). Niemniej jednak, najbardziej statystycznie istotny efekt SNP dla analizowanej cechy jest zlokalizowany w rejonie intronu. Ma on potencjalny wpływ na miejsce przyłączenia czynnika transkrypcyjnego dla alfa i beta receptora estradiolu (ER-alpha, ER-beta), które to receptory aktywowane przez estradiol wpływają na metabolizm plemników (Schrimpf i in., 2015).

Podsumowanie

U zwierząt gospodarskich podjęto próby wprowadzenia selekcji wspomaganą markerami genetycznymi (MAS – *marker assisted selection*), która pozwala na bardziej efektywny dobór zwierząt pod względem pożądanych cech na podstawie kilku alleli jednocześnie. Jednakże, w praktyce selekcja MAS u koni nie istnieje. Pomimo coraz lepszego poznania genomu konia nie zidentyfikowano dotąd żadnego genu głównego, czyli wykazującego duży efekt fenotypowy. Niemniej jednak, dzięki osiągnięciom współczesnej genetyki markery genetyczne mogą być efektywnym narzędziem wspomagającym selekcję na konkretne cechy. Wybór genów kandydujących, których polimorfizmy mogą wpływać na zmienność cech ilościowych u koni, jest niezwykle trudny i wymaga jeszcze licznych badań oraz współpracy ze środowiskiem hodowców.

Literatura

- Ajduk A. (2007). Rola jonów wapnia w aktywacji rozwoju zarodkowego ssaków. *Post. Biol. Kom.*, 34: 715–729.
- Ball B.A., Gravance C.G., Wessel M.T., Sabeur K. (2003). Activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility. *Theriogenology*, 59 (3): 901–914.
- Chowdhary B.P., Raudsepp T. (2000). Cytogenetics and physical gene maps. In: Bowling A.T., Ruvinsky A. (eds). *The Genetics of the Horse* (pp. 171–242); Wallingford, Oxon: CABI.
- Chowdhary B.P., Raudsepp T., Kata S.R., Goh G., Millon L.V., Allan V., Piumi F., Guérin G., Swinburne J., Binns M., Lear T.L., Mickelson J., Murray J., Antczak D.F., Womack J.E., Skow L.C. (2003). The first-generation whole-genome radiation hybrid map in the horse identifies conserved segments in human and mouse genomes. *Genome Res.*, 13 (4): 742–751.

- Finno C.J., Bannasch D.L. (2014). Applied equine genetics. *Equine Vet. J.*, 46 (5): 538–544.
- Giese A., Jude R., Kuiper H., Piumi F., Schambony A., Guérin G., Leeb T. (2002). Molecular characterization of the equine AEG1 locus. *Gene*, 292 (1): 65–72.
- Giesecke K., Hamann H., Stock K.F., Woehlke A., Sieme H., Distl O. (2009). Evaluation of SPATA1-associated markers for stallion fertility. *Anim. Genet.*, 40 (4): 359–365.
- Giesecke K., Hamann H., Sieme H., Distl O. (2010 a). Evaluation of prolactin receptor (PRLR) as candidate gene for male fertility in Hanoverian warmblood horses. *Reprod. Domest. Anim.*, 45 (5): e124–e130.
- Giesecke K., Hamann H., Sieme H., Distl O. (2010 b). INHBA-associated markers as candidates for stallion fertility. *Reprod. Domest. Anim.*, 45 (2): 342–347.
- Giesecke K., Hamann H., Stock K.F., Klewitz J., Martinsson G., Distl O., Sieme H. (2011). Evaluation of ACE, SP17, and FSHB as candidates for stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Anim. Reprod. Sci.*, 126 (3): 200–206.
- Gurgul A., Ząbek T., Bugno-Poniewierska M. (2015). Wykorzystanie wysoko wydajnych technik analiz genomu w badaniach naukowych i hodowli zwierząt gospodarskich. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 42, 2: 81–91.
- Hamann H., Jude R., Sieme H., Mertens U., Töpfer-Petersen E., Distl O., Leeb T. (2007). A polymorphism within the equine *CRISP3* gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Anim. Genet.*, 38 (3): 259–264.
- Hondo E., Kurohmaru M., Sakai S., Ogawa K., Hayashi Y. (1995). Prolactin receptor expression in rat spermatogenic cells. *Biol. Reprod.*, 52 (6): 1284–1290.
- <http://www.animalgenome.org/QTLdb>
- L'Hôte D., Serres C., Laissue P., Oulmouden A., Rogel-Gaillard C., Montagutelli X., Vaiman D. (2007). Centimorgan-range one-step mapping of fertility traits using interspecific recombinant congenic mice. *Genetics*, 176 (3): 1907–1921.
- Pycocock J., Samper J.C., McKinnon A.O. (2006). Current therapy in equine reproduction. Elsevier Health Sciences.
- Raudsepp T., Gustafson-Seabury A., Durkin K., Wagner M.L., Goh G., Seabury C.M., Brinkmeyer-Langford C., Lee E.J., Agarwala R., Stallknecht-Rice E., Schäffer A.A., Skow L.C., Tozaki T., Yasue H., Penedo M.C., Lyons L.A., Khazanehdari K.A., Binns M.M., MacLeod J.N., Distl O., Guérin G., Leeb T., Mickelson J.R., Chowdhary B.P. (2008). A 4,103-marker integrated physical and comparative map of the horse genome. *Cytogenet. Genome Res.*, 122 (1): 28–36.
- Raudsepp T., McCue M.E., Das P.J., Dobson L., Vishnoi M., Fritz K.L., Varner D.D. (2012). Genome-wide association study implicates testis-sperm specific FKBP6 as a susceptibility locus for impaired acrosome reaction in stallions. *PLoS Genet* 8 (12): e1003139; <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003139>
- Roser J.F. (1997). Endocrine basis for testicular function in the stallion. *Theriogenology*, 48 (5): 883–892.
- Roser J.F. (2008). Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Anim. Reprod. Sci.*, 107 (3): 179–196.
- Schambony A., Gentzel M., Wolfes H., Raida M., Neumann U., Töpfer-Petersen E. (1998). Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochim. Biophys. Acta*, 1387 (1): 206–216.
- Schrimpf R., Dierks C., Martinsson G., Sieme H., Distl O. (2014). Genome-wide association study identifies phospholipase C zeta 1 (PLCz1) as a stallion fertility locus in Hanoverian warmblood horses. *PloS one*, 9 (10), e109675.
- Schrimpf R., Metzger J., Martinsson G., Sieme H., Distl O. (2015). Implication of FKBP6 for male fertility in horses. *Reprod. Domest. Anim.*, 50 (2): 195–199.
- Strabel T. (2010). Selekcja genomowa – nowe narzędzie w doskonaleniu zwierząt. *Post. Nauk Rol.*, 2: 133–149.
- Tortonese D.J., Gregory S.J., Eagle R.C., Sneddon C.L., Young C.L., Townsend J. (2002). The equine hypophysis: a gland for all seasons. *Reprod. Fertil. Dev.*, 13 (8): 591–597.
- Wade C.M., Giulotto E., Sigurdsson S., Zoli M., Gnerre S., Inmsland F., R.R., Blöcker H., Distl O., Edgar R.C., Garber M., Leeb T., Mauceli E., MacLeod J.N., Penedo M.C., Raison J.M., Sharpe T., Vogel J., Andersson L., Antczak D.F., Biagi T., Binns M.M., Chowdhary B.P., Coleman S.J., Della Valle G., Fryc S., Guérin G., Hasegawa T., Hill E.W., Jurka J., Kiiialainen A., Lindgren G., Liu J., Magnani E., Mickelson J.R., Murray J., Nergadze S.G., Onofrio R., Pedroni S., Piras M.F., Raudsepp T., Rocchi M., Røed K.H., Ryder O.A., Searle S., Skow L., Swinburne J.E., Syvänen A.C., Tozaki T., Valberg S.J., Vaudin M., White J.R., Zody M.C. (2009). Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, 326 (5954): 865–867.
- Wen Y.E.N., Richardson R.T., Widgren E.E., Michael G.R. (2001). Characterization of Sp17: a ubiquitous three domain protein that binds heparin. *Biochem. J.*, 35 7(1): 25–31.

CURRENT TRENDS IN RESEARCH ON THE GENETIC DETERMINANTS OF REDUCED STALLION FERTILITY

Summary

In recent years, one of the rapidly developing areas of research is the search for the genetic basis of fertility in horses. The researchers focus mainly on stallion fertility due to the reproduction model in which a stallion can cover a relatively substantial number of mares whereas a mare can produce one foal per season, and the economic loss generated by stallions with reproductive problems is significant. Recent studies applying the latest technology in the field of genetics have revealed genes (*CRISP1*, *CRISP3*, *PRLR*, *INHBA*, *SPATA1*, *ACE*, *FSHB*, *SP17*, *FKBP6*, *PLCz1*) which were analysed in the context of stallion fertility. Our paper is a summary of recent findings concerning the genetic determinants of reduced stallion fertility.

Key words: stallions, genetic basis of reduced fertility



Fot. B. Borys