

ZASTOSOWANIE TECHNIKI NOKAUTU GENOWEGO, ANALIZY SEKWENCJI MIKROSATELITARNYCH ORAZ SZCZEPÓW WSOBNYCH MYSZY W MAPOWANIU GENÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA SPERMATOGENEZĘ

Dorota Bederska

Instytut Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego, Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa,
32-083 Balice k. Krakowa

W poniższej pracy opisano techniki mapowania genów warunkujących prawidłową spermatogenezę u ssaków. Przedstawiono dwie najczęściej stosowane metody polegające na nokaucie genowym oraz analizie sekwencji mikrosatelitarnych w wybranych szczepach wsobnych myszy. Lokalizacja sekwencji wpływających na proces gametogenezy mogłaby stać się niezwykle pomocnym narzędziem w utrzymaniu niezaburzonego rozrodo zwierząt hodowlanych. Stosunkowo dobrze poznany jest już wpływ genów na płodność u myszy i ludzi. Coraz częściej badaniami obejmuje się także zwierzęta hodowlane.

Ważnym aspektem badań zajmujących się rozrodem ludzi i zwierząt jest poznanie sekwencji genowych warunkujących niezaburzoną spermatogenezę. Ich zlokalizowanie na chromosomie Y (Krzanowska, 1969), jak i na autosomach (Huhtaniemi, 2006) mogłoby pomóc zarówno w uniknięciu ekonomicznych strat w produkcji zwierząt hodowlanych związanych z problemami w rozrodzie, jak i w wyborze prawidłowego leczenia u ludzi. Szerokie zastosowanie znalazły tutaj szczepy wsobne myszy z nokautami genowymi, które umożliwiają określenie wpływu deficytu danego białka w organizmie, a zarazem ustalenie jego biologicznej funkcji. Istotne stało się również odkrycie i wykorzystanie markerów genetycznych klasy II, czyli sekwencji mikrosatelitarnych, do procesu mapowania genów czy analizy hetero- lub homozygotyczności. W pracy poruszono problem niepłodności związanej z czynnikiem samczym i przedstawiono próby wyjaśnienia jej genetycznej etiologii.

Mysz laboratoryjna

Małe wymagania hodowlane, szybki rozwój osobniczy, duża liczba młodych w miocie oraz wysoki procent podobieństwa genomu z ludzkim uczyniły mysz jednym

z najpopularniejszych zwierząt wykorzystywanych w laboratoriach na całym świecie. Mysz wykorzystywana jest w badaniach od XIX wieku, a jej wkład w odkrycia naukowe jest nieoceniony. Stworzenie zwierzęcych modeli chorób człowieka umożliwiło ich szybsze analizowanie, sprawniejsze poznawanie przyczyn oraz wdrażanie nowych metod terapeutycznych. Na przestrzeni lat wyselekcjonowano wiele różnorodnych szczepów myszy laboratoryjnych, które służą jako materiał do badań specjalistycznych. Obecnie ich największa baza znajduje się w Jackson Laboratory (www.jax.org) mającego swoje oddziały w USA i Kanadzie.

Szczepy wsobne

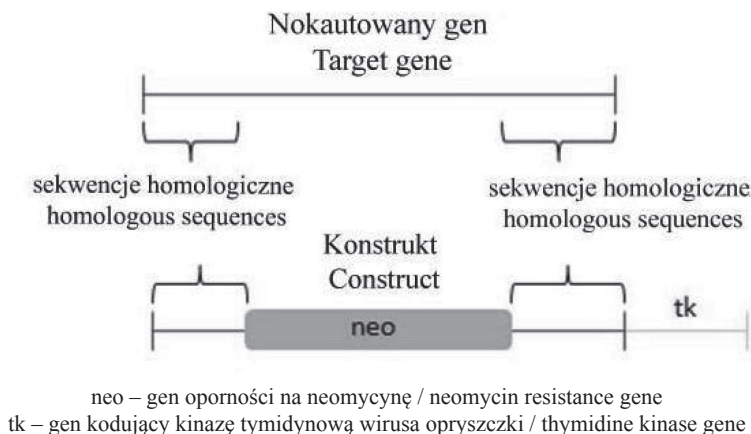
Standardowo, szczepy wsobne uzyskuje się poprzez kojarzenie siostry z bratem przez kolejnych 20 pokoleń. Procent homozygotycznych genów określa współczynnik inbrodu, który w ostatnim pokoleniu szacuje się na 98,6% (Brylińska i Kwiatkowska, 1996). Zadanie to jest utrudnione przez fakt, iż wraz ze wzrostem homozygotyczności kolejnych pokoleń dochodzi do tzw. depresji inbredowej, w wyniku której u zwierząt obserwuje się obniżenie płodności, żywotności oraz odporności. Ze względu na geny koloru sierści myszy ze szczepów: 129/Sv i C57BL są zwykle wykorzystywane do uzyskania osobników z nokautem określonych genów.

Szczep 129/Sv o genotypie AABBC (aguti) został uzyskany w Jackson Laboratory na początku XX wieku. Posiada on kolor sierści aguti w przeciwieństwie do innych szczepów 129 pozyskanych w innych laboratoriach, które są kremowe (www.animalab.pl). Szczepy 129 swoje szerokie zastosowanie zawdzięczają dużej liczbie bezmielinowych aksonów motoneuronów lędźwiowych oraz częstemu występowaniu potworniaka jądra (www.animalab.pl). Z kolei szczep C57BL o genotypie aaBBCC (czarny) charakteryzują wysoka płodność, znaczna żywotność oraz mała podatność na nowotwory. Tworzenie szczepów wsobnych myszy z nokautem genowym daje nadzieję, że w przyszłości uda się poznać sekwencje warunkujące niezaburzoną spermatogenezę.

Technika nokautu

Tworzenie modeli zwierzęcych chorób człowieka opiera się na dwóch głównych metodach: transgenezie i nokaucie genowym. Otworzyły one przed naukowcami szereg nowych możliwości badań chorób genetycznych. Transgeneza polega na wprowadzeniu do komórek licznych kopii genu, często innego gatunku, za pomocą mikroinjekcji lub wektorów (np. wirusowych). Tak uzyskane osobniki zyskują ekspresję wprowadzonych genów i produkują obcogatunkowe białka. Technika nokautu polega na zniszczeniu ciągłości wybranego genu, w wyniku czego można prześledzić (na poziomie komórki, tkanki czy całego organizmu) zmiany fenotypowe towarzyszące brakowi danego białka. Z mysiej blastocysty pochodzącej ze skojarzenia osobników o kolorze agouti (genotyp AA) należy pobrać pluripotencjalne komórki macierzyste. Do komórek tych, np. poprzez proces elektroporacji, wprowadza się konstrukt zbudowany z dwóch podstawowych części (rys. 1): genu oporności na antybiotyki, taki jak np. neomycyna (neo) oraz genu kodującego kinazę tymidynową (tk) z wirusa opryszczki (*Herpes simplex*). Gen oporności na antybiotyki otoczony jest sekwencjami homologicznymi do tych, które występują w genie, który chcemy inaktywować.

Gen kodujący kinazę tymidynową wbuduje się do genomu myszy jedynie w wyniku przypadkowego, nieprawidłowego włączenia konstrukt w obrębie DNA i spowoduje aktywację toksycznego gancyklowiru (Górska i Kowalski, 1997).



Rys. 1. Schemat budowy konstrukt wykorzystywanego do przeprowadzenia techniki nokautu
Fig. 1. The scheme of the construct used for knockout technique

W kolejnym kroku komórki poddaje się podwójnej selekcji: pozytywnej i negatywnej. Początkowo komórki traktuje się antybiotykiem – neomycyną, w wyniku czego giną te komórki, które w ogóle nie wbudowały konstrukt. Następnie działa się gancyklowirem, powodując eliminację wszystkich tych komórek, które wbudowały cały konstrukt w dowolnym, niepożądanym miejscu genomu. Pozostaną komórki z nokautem genu, który miał zostać inaktywowany. Tak przygotowane komórki wprowadza się poprzez mikroiniekcję do blastocyst uzyskanych ze skojarzenia myszy czarnych, które następnie implantuje się w macicy matki zastępczej.

W pokoleniu pierwszym otrzymane zostaną tzw. osobniki chimerowe (łaciate). Samce chimerowe kojarzy się z samicą o kolorze czarnym, a w pokoleniu F2 z częstością 25% pojawiają się osobniki ze znokautowanym allelem danego genu (Górska i Kowalski, 1997). Posłużą one następnie do kojarzeń typu siostra x brat, w wyniku których otrzyma się pokolenie homozygotyczne z nokautem genowym.

U tak uzyskanych zwierząt na podstawie zmian w fenotypie można określić funkcję białek kodowanych przez nokautowane geny. Jeśli osobniki z nokautem danego genu są żywotne, można pozwolić sobie na utrzymywanie tej hodowli w postaci homozygotycznej (szczep wsobny, w którym wszystkie osobniki posiadają nokaut genu). Może się jednak okazać, że nokaut ten u różnych szczepów wsobnych daje różne efekty fenotypowe. Produkty innych genów mogą bowiem maskować niedobory związane z wyłączeniem konkretnego genu, co powoduje trudności w identyfikacji jego roli. Efekt ten zwany jest homeostazą rozwojową. Przykładem mogą tu być geny *Trp53* czy *Tex18*, których nokaut nie zawsze powoduje zaburzenia w fenotypie (Paul i in., 2007; Jaroszynski i in., 2007). Bardzo często na skutek nokautu genu osobniki

mają mocno zaburzone parametry rozrodu – wtedy hodowlę taką utrzymuje się na heterozygotycznym tle genetycznym, umożliwiającym zachowanie płodności i utrzymanie szczepu z nokautem genowym w hodowli. Z tego też powodu istnieje potrzeba okresowego badania stopnia heterozygotyczności posiadanych szczepów, np. poprzez analizę sekwencji mikrosatelitarnych.

Sekwencje mikrosatelitarne

Wiadomo, iż geny odpowiedzialne za spermatogenezę leżą zarówno na chromosomie Y (Krzanowska, 1969), jak i na autosomach (np. geny kodujące hormony płciowe oraz ich receptory) (Huhtaniemi, 2006). Jednak bardziej szczegółowa wiedza na ten temat w dalszym ciągu nie jest dostatecznie znana i wymaga kolejnych analiz i badań. Kolejną z technik umożliwiającą zlokalizowanie genów kontrolujących jakość nasienia opiera się na badaniu sekwencji mikrosatelitarnych w szczepach wsobnych rekombinacyjnych (RI; ang. recombinant inbred). Ludzki genom składa się z ponad 20 000 genów. Sekwencje kodujące stanowią zaledwie około 3%, natomiast sekwencje związane z genami, takie jak introny, promotory czy pseudogeny – 27%. Pozostałe 70% to sekwencje unikatowe (ok. 55%) oraz sekwencje repetytywne (powtarzalne) (15%). Wśród sekwencji powtarzalnych można wyróżnić dwie grupy. Do pierwszej zalicza się kilka rodzin rozproszonych sekwencji jądrowych, wśród nich najbardziej znane są długie (LINEs; ang. long interspersed nuclear element) oraz krótkie (SINEs; ang. short interspersed nuclear elements) rozproszone sekwencje (Bennett, 2000). Elementy te w czasie procesu transpozycji występują w postaci RNA. Transpozycja jest procesem zachodzącym w obecności ruchomej jednostki genetycznej (transpozozonu lub retrotranspozozonu w przypadku cząsteczek SINEs i LINEs), która posiada zdolność przemieszczania do innego miejsca w genomie (Gadzalski i Sakowicz, 2008).

LINEs to sekwencje o długości około 5000–6400 pz (par zasad), natomiast SINEs posiadają około 100–400 pz i stanowią więcej niż 5% całkowitego DNA. Najbardziej znaną krótką rozproszoną sekwencją jądrową u naczelnych jest sekwencja Alu. Podczas gdy elementy LINEs posiadają zdolność do autonomicznej transpozycji, cząsteczki SINEs zmuszone są wykorzystywać do tego procesu enzymy kodowane przez inne retrotranspozony (np. LINEs) (Gadzalski i Sakowicz, 2008). Drugą grupę sekwencji powtarzalnych tworzą tandemowe sekwencje repetytywne, które ze względu na długość jednostki podstawowej oraz częstotliwość jej występowania zostały podzielone na trzy podgrupy: satelity, minisatelity oraz mikrosatelity. DNA satelitarne stał się niezwykle ważny w badaniach nad mapowaniem genomu, kryminalistyce, a także w badaniach związanych z określaniem pokrewieństwa. Tak szerokie zastosowanie wynika z jednej, bardzo istotnej cechy – dużego polimorfizmu długości w danych loci. Szczególnie ważne okazały się tu mikrosatelity. Jednostka powtarzalna sekwencji satelitarnych zbudowana jest z od pięciu do kilku tysięcy par zasad, a całkowita wielkość wynosi od 100 kilo par zasad do kilku mega par zasad (Bennett, 2000). W ludzkim genomie satelity nie ulegają transkrypcji i zlokalizowane są w obrębie heterochromatyny, a szczególnie w heterochromatynie centromerowej. Obecnie nie ma żadnych dowodów, które dowodziłyby, iż te repetytywne sekwencje spełniają znaczącą funkcję we wspomnianych regionach. Ze względów na duże rozmiary cząsteczek satelity nie są wykorzystywane w praktyce.

W przeciwieństwie do sekwencji satelitarnych, minisatelity znalazły zastosowanie w badaniach naukowych. Dzieli się je na dwie podgrupy: minisatelity telomerowe oraz hiperprzemienne (VNTRs). Pierwsza grupa to powtórzenia tandemowe głównie „TTAGGG” dodawane do odcinków telomerowych chromosomów dzięki specjalnemu enzymowi – telomerazie. Minisatelity spełniają tutaj bardzo istotną funkcję, chroniąc końcowe odcinki chromosomów przed uszkodzeniem. Odgrywają także ważną rolę w procesie parowania się chromosomów oraz podczas podziału komórkowego. Minisatelity hiperprzemienne budują jednostki rdzeniowe o długości 6–50 nukleotydów powtarzane od dwóch do kilkuset razy w pojedynczym locus. Ich wysoce polimorficzna natura (obecna m.in. dzięki nierównemu crossing-over pomiędzy tandemowymi powtórzeniami) sprawiła, iż zostały one użyte do indentyfikacji indywidualnej wykorzystywanej w badaniach pokrewieństwa, poradnictwie genetycznym, transplantologii oraz w sprawach sądowych (DNA fingerprinting) (Jeffreys, 2005). Dziś są jednak zastępowane przez sekwencje mikrosatelitarne. W przeciwieństwie do satelit mających tendencję do skupiania się w obrębie chromatyny centromerowej, VNTRs występują zwykle w regionach telomerowych. Mimo że nie ma dowodów sugerujących, że ich lokalizacja jest związana z pełnieniem jakichkolwiek funkcji, minisatelity są uważane za gorące miejsca rekombinacji homologicznej.

Mikrosatelity są obecnie najważniejszą i najszerzej wykorzystywaną grupą spośród DNA satelitarnego. Szacuje się, iż stanowią one 3% ludzkiego genomu (Lygo i in., 1994). Składają się z mono-, di-, tri-, tetra-, penta- lub heksanukleotydowych sekwencji powtórzonych od 2 do 100 razy. W przypadkach patologicznych liczba ta może sięgać setek, a nawet tysięcy (Bal, 1998). STR (ang. short tandem repeat) zwykle występują w regionach euchromatyny, jednak część sekwencji jest zlokalizowanych w centromerach i telomerach. Występują w postaci powtórzeń jednakowych sekwencji lub przedzielone kilku nukleotydowymi wstawkami. Większość mikrosatelit umiejscowionych jest w obrębie intronów, wyjątek stanowią powtórzenia tri- i heksanukleotydowe, które są charakterystyczne głównie dla eksonów, przez co istnieje przypuszczenie, iż pełnią one nie do końca poznaną jeszcze funkcję. Stawia to w nowym świetle hipotezę sugerującą przynależność większości sekwencji STR do tzw. „śmieciewego DNA”. Dzięki dużemu polimorfizmowi sekwencje mikrosatelitarne mogą być wykorzystywane jako markery różnicujące osobniki. Jest to możliwe dzięki skłonnościom STR do ulegania mutacjom, w wyniku których otrzymujemy różne formy mikrosatelit w danym locus w populacji. Mutacje, którym najczęściej podlegają sekwencje STR, polegają na addycji lub delecji podstawowej jednostki repetytywnej – ma się wtedy do czynienia z tzw. polimorfizmem długości. Nieco rzadziej w wyniku mutacji może dojść do powstania niepełnego elementu rdzeniowego lub mutacji punktowej (Möller i in., 1994). W przypadku zwiększenia lub zmniejszenia sekwencji mikrosatelitarnej o 1 powtórzenie mówimy o tzw. SSM (ang. stepwise mutation model), gdy dochodzi do zwiększenia większej ilości powtórzeń – two-phase model.

Krótkie powtórzenia tandemowe zawdzięczają swoją różnorodność dwóm procesom: dużej podatności na błędy w czasie procesu replikacji oraz nierównomiernemu crossing-over. W trakcie pierwszego procesu często dochodzi do nieprawidłowego działania polimerazy, w wyniku którego zostaje dobudowany lub odcięty motyw. Jest to tzw. „ślizganie się polimerazy” (ang. polymerase slippage). Enzym opuszcza lub

dobudowuje pojedynczą jednostkę rdzeniową, zależnie od tego, czy do pomyłki doszło na nici matrycowej, czy potomnej. Wykazano, iż sekwencje trójnukleotydowe rzadziej ulegają tego typu błędom niż np. sekwencje dwunukleotydowe. W czasie mejozy może zadziałać drugi czynnik wpływający na zmiany w danym locus mikrosatelitarnym – nierównomierny crossing-over. W wyniku błędnego sparowania chromosomów homologicznych w obrębie powtarzalnych sekwencji tandemowych, a następnie wymiany fragmentów chromatyd, może dojść do wymiany odcinków o różnej długości, co w efekcie doprowadzi do powstania 2 różnych alleli (Sołtyszewski i in., 2006).

Sekwencje mikrosatelitarne, ze względu na prosty schemat dziedziczenia, wysoki polimorfizm i szerokie występowanie w obrębie euchromatyny, wyparły analizę innych typów satelitarnego DNA w badaniach pokrewieństwa, kryminalistyce etc. i okazały się idealnymi markerami różnicującymi osobniki. Główną metodą pozwalającą analizować odcinki STR jest łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (ang. polymerase chain reaction). Po namnożeniu odpowiedniej sekwencji mikrosatelitarnej rozdziela się elektroforetycznie otrzymane produkty w żelu, uzyskując informację o długości mikrosatelity występującej u danego osobnika w analizowanym locus.

Zastosowanie sekwencji mikrosatelitarnych w mapowaniu genów kontrolujących jakość nasienia

Proces mapowania genów rozpoczyna się od opracowania markerów genetycznych (np. mikrosatelitów) różniących się ilością jednostek repetytywnych (długością) w dwóch homozygotycznych szczepach wsobnych, z których chce się otrzymać szczepy rekombinacyjne. Należy też poddać analizie odpowiednie cechy tych szczepów wsobnych, np.:

- liczbę martwych lub żywych plemników,
- obecność lub brak kropli cytoplazmatycznej (świadcząca o stopniu dojrzałości),
- ruchliwość,
- odsetek morfologicznie nieprawidłowych plemników,
- integralność błony cytoplazmatycznej witki plemnika.

Najlepiej, jeśli ma się do czynienia z dwoma szczepami różniącymi się parametrami, których geny chcemy mapować (np. szczep z dużym oraz szczep z małym procentem amorficznych główek). Zwierzęta krzyżuje się i metodami hodowlanymi uzyskuje się tzw. szczepy wsobne rekombinacyjne. Następnie u otrzymanego potomstwa porównuje się wzór rozkładu cechy (SDP; ang. strain distribution pattern) z wzorem rozkładu mikrosatelit różnicujących dwa szczepy wsobne wyjściowe. W ten sposób, np. przy pomocy programu MapManager QTX, ustala się obszar chromosomu, w obrębie którego znajduje się gen odpowiedzialny za daną cechę. Badania te mają na celu wskazanie roli różnego rodzaju białek w spermatogenezie i jednocześnie pokazanie, jak duży wpływ na jakość plemników ma tło genetyczne, czyli geny zlokalizowane na autosomach.

Dzięki zastosowaniu szczepów wsobnych myszy z nokautami genowymi potwierdzono obecność wielu genów zaangażowanych w proces gametogenezy. Należą do nich m.in. geny: *Tnp2* (ang. transition protein 2; Adham, 2001), *Acr* (ang. proacrosin; Nayernia, 2002), *Creb3l4* (Adham i in., 2005) czy *Trp53* (Yin i in. 1998; Paul i in.,

2007). W przypadku inaktywacji genu dla enzymu proakrozyny dochodziło do znacznego opóźnienia penetracji otoczki przejrzystej w wyniku niesprawnego przebiegu reakcji akrosomowej. Plemniki takie w warunkach *in vitro* nie miały szans na zapłodnienie, konkurując z prawidłowymi gametami. O 20% mniej plemników w nasieniu zaobserwowano u myszy z wyłączonym genem *Creb3l4*, podczas gdy pozostałe parametry pozostawały w normie. Znaczny wzrost odsetka gamet o amorficznej główce występował u myszy 129/Sv z unieczynnionym genem *Tnp2*. Za wady morfologii odpowiadał nieprawidłowo zbudowany akrosom uniemożliwiający zapłodnienie. Nasienie tak zmodyfikowanych myszy wykazywało również zmniejszoną liczbę plemników w ejakulacie oraz upośledzoną ruchliwość. Stopień nasilenia tego zjawiska był jednak zależny od tła genetycznego i w niektórych szczepach nie powodował żadnych zaburzeń. Przykładem genu, który przejawia podobną zależność, jest gen *p53*. Jego inaktywacja w niektórych szczepach nie wpływa znacząco na pogorszenie parametrów płodności podczas gdy u samców 129/Sv powoduje całkowitą niepłodność (Rotter, 1993).

Dane literaturowe podają, że m.in. na chromosomach 3, 6, 11 i 12 zlokalizowane są geny kontrolujące spermiogenezę u myszy (L'Hote i in., 2007). Za pomocą szczepów wsobnych wyjściowych KE oraz CBA/Kw potwierdzono obecność 3 regionów chromosomowych biorących udział w spermatogenezie, znajdujących się na autosomalnych: 6, 11 oraz 18 (Gołas i in., 2008). Region q15.6 chromosomu 6 związany jest z pojawieniem się amorficznych główek plemników. Zlokalizowano w nim m.in. 2 geny: *Hipk2* oraz *Casp2*, których produkty kontrolują proliferację oraz apoptozę komórek odbiegających od normy w czasie powstawania plemników. W chromosomie 11 wyróżniono region 11q24 – 11q31, a w nim 6 genów leżących u podstaw regulacji jakości nasienia oraz gen *Sparc* kontrolujący rozwój jąder. Pozostałe 6 genów to: *Kit3a* oraz *Tekt3* związane są z mikrotubulami i ich prawidłowym rozwojem, *Aurkb*, który ulega ekspresji w diplotenie, wpływając na segregację w trakcie procesu mejozy i procent normalnie ukształtowanych główek oraz geny *Hist3h2ba*, *Hist3h2bb* i *Hist3h2a* kodujące trzy podjednostki histonowe.

Nowe techniki wspomagania rozrodu u zwierząt hodowlanych

Prawidłowy rozród zwierząt hodowlanych jest ważnym aspektem ekonomicznym oraz istotnym etapem w przypadku chęci utrzymania planu hodowlanego ukierunkowanego na pożądaną cechę użytkową czy eksterierową. Płodność uwarunkowana jest zarówno przez czynniki genetyczne, jak i środowiskowe. Wśród knurów całkowicie niezdolnych do zapłodnienia najczęstszą przyczyną są nieprawidłowe parametry jakości nasienia: brak plemników w ejakulacie, zbyt duży odsetek plemników o patologicznej budowie (Gasiński, 2002). Prawidłowa jakość nasienia jest szczególnie istotna w przypadku wprowadzenia sztucznego zapłodnienia. Użycie nasienia o obniżonych parametrach płodności do zapłodnienia loch przyniosłoby ogromne straty. Do oceny seminologicznej zwierząt hodowlanych bierze się pod uwagę, takie cechy jak: koncentrację spermy, ruchliwość oraz liczbę morfologicznie prawidłowych plemników (Colenbrander i in., 1993). Jednak uzyskiwane z laboratoriów dane wykazują duże rozbieżności i nie rozstrzygają ostatecznie o zdolności rozrodczej zwierzęcia (Braundmeier i Miller, 2001). Z pomocą przychodzą tutaj zaawansowane techniki molekular-

ne. Dzięki analizie potencjalnych genów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg spermatogenezy można by w sposób bardziej precyzyjny określić płodność samców. Kwestia płodności loch jest dużo lepiej zbadana, jako że samice mają większy wpływ na prawidłowy rozród, jednak coraz częściej zwraca się również uwagę na zdolności reprodukcyjne samców. Obecnie do genów – kandydatów, mogących świadczyć o potencjale rozplodowym knura, zalicza się geny: *HSP70.2* (ang. heat shock protein 70.2), *RYR1* (ang. ryanodine receptor gene), *OPN* (ang. osteopontin gene), *RBP4* (ang. retinol-binding protein 4). Doświadczenie wykonane przez Lina i in. (2005) potwierdziło wpływ dodatkowych genów, takich jak: *GnRHR* (ang. gonadotropin releasing hormone receptor), *INHBA* (ang. inhibin beta A), *INHBB* (ang. inhibin beta B) (Lin i in., 2005). Locus *GNRHR* wykazuje znaczące oddziaływanie na ruchliwość, obecność kropli cytoplazmatycznej (świadczącej o niedojrzałości komórek rozrodczych) oraz odsetek nieprawidłowych morfologicznie plemników. Podobne obserwacje dotyczą również nieplodnych mężczyzn (Layman i in., 1997). W przypadku bydła duży postęp poczyniono nie tylko w zrozumieniu genetycznego podłoża mleczości, chorób genetycznych, ale także płodności. Liczbę genów kandydatów zaangażowanych w prawidłowy proces gametogenezy u buhaja określa się na 200 (Leeb i in., 2007). Wśród nich typuje się geny: *TNPI*, *CRISP2*, *PRND*, *TNFA*, *CATSPER2*, *CNGA3*, *STAT5A*. Jednak ostatnie wyniki badań donoszą, iż markerów płodności należy szukać nie tylko w obrębie genomu jądrowego, ale także mitochondrialnego (Crepaldi i in., 2010).

Mniejszy postęp w zakresie powyższych badań obserwuje się w przypadku owiec czy ogierów, ze względu na ich mniejsze znaczenie ekonomiczne, jednak otrzymane wyniki mogą być ekstrapolowane na wyżej wymienione gatunki. Niektóre aberracje chromosomowe występujące u ludzi czy myszy są także spotykane u nieplodnych ogierów. Mimo że brak jest oficjalnych danych na temat genetycznych markerów płodności w tej grupie, cel ten może zostać osiągnięty w najbliższej przyszłości. Już dziś takimi genami – kandydatami są geny: *CRISP1*, *CRISP2*, *CRISP3* (Giese i in., 2002 a, b). Wśród koni zlokalizowanie takich markerów byłoby szczególnie cenne w przypadku najbardziej wartościowych ogierów hodowlanych.

Podsumowanie

Opracowanie genów płodności jest ważne w procesie określanym jako MAS (ang. marker assisted selection), czyli selekcji wspomagananej markerami. Mogłaby ona rozstrzygać o potencjale rozrodczym już we wczesnych etapach życia i pomóc w podjęciu szybkiej decyzji o przynależności zwierzęcia do określonej grupy produkcyjnej. Zadanie to jest realizowane dzięki zastosowaniu szczepów wsobnych myszy z nokautami genowymi lub przy użyciu sekwencji mikrosatelitanych. Wskazano już na obecność wielu genów związanych ze spermatogenezą położonych zarówno na autosomach, jak i chromosomach płci. Efekt ich działania nie zawsze jest taki sam, w znacznym stopniu zależy od tła genetycznego, co utrudnia proces mapowania. Jednak możliwość wykorzystania genów jako obiektywnego wskaźnika płodności wy-

daje się być obiecująca. Poprzez prawidłowy dobór hodowlany mogłaby wpłynąć na ograniczenie strat ekonomicznych ponoszonych przez hodowców w przypadku przeniesienia do reprodukcji samca o słabych parametrach rozrodczych.

Piśmiennictwo

- Adham I.M., Nayernia K., Burkhardt-Gottges E., Topaloglu O., Dixkens C., Holstein A.F., Engel W. (2001). Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol. Hum. Reprod.*, 7: 513–520.
- Adham I.M., Eck T.J., Mierau K., Muller N., Sallam M.A., Paprotta I., Schubert S., Hoyer-Fender S., Engel W. (2005). Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-Deficient Mice. *Mol. Cell Biol.*, 25: 7657–7664.
- Bal J. (1998). *Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie*. Springer, PWN.
- Bennett P. (2000). Demystified microsatellites. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.*, 53: 177–183.
- Braundmeier A.G., Miller D. (2001). The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *J. Dairy Sci.*, 84: 1915–1925.
- Brylińska J., Kwiatkowska J. (1996). *Zwierzęta laboratoryjne. Metody hodowli i doświadczeń*. Kraków, Universitas, ss. 36–40.
- Colenbrander B., Feitsma H., Grooten H.J. (1993). Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J. Reprod. Fertil.*, 48: 207–215.
- Crepaldi P., Nicoloso L., Milanesi E., Santus E., Negrini R. (2010). Towards the understanding of bull fertility: phenotypic traits description and candidate gene approach. *It. J. Anim. Sci.*, 8: 60–62.
- Gadzalski M., Sakowicz T. (2008). SINE – rozproszone elementy genomów eukaryota. *Post. Biol. Kom.*, 35: 153–167.
- Gasiński M. (2002). Zaburzenia w rozrodzie trzody chlewnej. *Trz. Chl.*, 40: 20–22.
- Giese A., Jude R., Kuiper H., Piumi F., Schambony A., Guérin G., Distl O., Töpfer-Petersen E., Leeb T. (2002 a). Molecular characterization of the equine AEG1 locus. *Gene*, 292: 65–72.
- Giese A., Jude R., Kuiper H., Raudsepp T., Piumi F., Schambony A., Guérin G., Chowdhary B.P., Distl O., Töpfer-Petersen E., Leeb T. (2002 b). Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Gene*, 299: 101–109.
- Gołas A., Dzieza A., Kuzniarz K., Styrna J. (2008). Gene mapping of sperm quality parameters in recombinant inbred strains of mice. *Int. J. Dev. Biol.*, 52: 287–293.
- Górska M., Kowalski L.M. (1997). Knock-out genoway – zastosowanie w badaniach medycznych. *Alergia Astma Immunol.*, 3: 162–169.
- Huhtaniemi I. (2006). Mutations along the pituitary-gonadal axis affecting sexual maturation: Novel information from transgenic and knockout mice. *Mol. Cell Endocrinol.*, 254–255: 84–90.
- Jaroszynski L., Dev A., Li M., Meinhardt A., De Rooij D.G., Mueller C., Bohm D., Wolf S., Adham I.M., Wulf G., Engel W., Nayernia K. (2007). Asthenoteratozoospermia in mice lacking testis expressed gene 18 (Tex18). *Mol. Hum. Reprod.*, 13: 155–163.
- Jeffreys A.J. (2005). Genetic fingerprinting. *Nat. Med.*, 11: 1035–1039.
- Krzanowska H. (1969). Factor responsible for spermatozoan abnormality located on the Y chromosome in mice. *Genet. Res.*, 13: 17–24.
- 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: 1907–1921.
- Layman L.C., Peak D.B., Xie J., Sohn S.H., Reindollar R.H., Gray M.R. (1997). Mutation analysis of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil. Steril.*, 68: 1079–1085.
- Leeb T., Sieme H., Töpfer-Petersen E. (2007). The horse genome project—sequence based insights into male reproductive mechanisms. *Anim. Reprod. Sci.*, 89: 21–29.

- Lin C.L., Ponsuksili S., Tholen E., Jennen D.G.J., Schellander K., Wimmers K. (2005). Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar. *Anim. Reprod. Sci.*, 92: 349–363.
- Lygo J.E., Johnson P.E., Holdaway D.J., Woodroffe S., Whitaker J.P., Clayton T.M., Kimpton C.P., Gill P. (1994). The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int. J. Leg. Med.*, 107: 77–89.
- Möller A., Meyer E., Brinkmann B. (1994). Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int. J. Hum. Med.*, 106: 319–323.
- Nayernia K., Adham I.M., Shamsadin R., Muller C., Sanccken U., Engel W. (2002). Proacrosin-deficient mice and zona pellucida modifications in an experimental model of multifactorial infertility. *Mol. Hum. Reprod.*, 8: 434–440.
- Paul C., Povey J.E., Lawrence N.J., Selfridge J., Melton D.W., Saunders P.T.K. (2007). Deletion of genes implicated in protecting the integrity of male germ cells has differential effects on the incidence of DNA breaks and germ cell loss. *PLoS*, 10, p. e989.
- Rotter V., Schwartz D., Almon E., Goldfinger N., Kapon A. (1993). Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc. National Acad. Sci. USA*, 90: 9075–9079.
- Sołtyszewski I., Purzycka J.K., Powierska-Czarny J., Olewiecki I. (2006). Zmiany nowotworowe – implikacje w genetycznej identyfikacji osób. *Problemy Kryminalistyki*, 253: 6–9.
- Yin Y., Stahl B.C., DeWolf W.C., Morgentaler A. (1998). p53-mediated germ cell quality control in spermatogenesis. *Dev. Biol.*, 204: 165–171.
- www.animalab.pl
www.jax.org

Zatwierdzono do druku 19 IV 2011

DOROTA BEDERSKA

Application of gene knockout techniques, analysis of microsatellite sequences and inbred strains of mice in mapping genes responsible for spermatogenesis

SUMMARY

This review describes mapping techniques of the genes responsible for mammalian spermatogenesis. Two most frequent methods: knockout and analysis of microsatellite sequences in chosen inbred strains are presented. Identification of the sequences that influence gametogenesis could be a useful tool to maintain undisturbed reproduction of farm animals. The effect of genes on fertility has been adequately studied in mice and humans, but also farm animals are increasingly investigated.

Key words: microsatellite sequences, gene mapping, spermatogenesis, inbred mouse strains