
AUTOREFERAT

Małgorzata Szewczuk

Rozprawa habilitacyjna

**Polimorfizm genów kodujących wybrane elementy osi somatotropowej
i ich związek z użytkowością mleczną różnych ras bydła**

Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

1. *Habilitant*

Imię i nazwisko: **Małgorzata Szewczuk**

Adres służbowy: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie
Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających
ul. Doktora Judyma 10, 71-460 Szczecin

Telefon: tel. +4891 449 6802

E-mail: malgorzataszewczuk@zut.edu.pl

2. *Posiadane dyplomy, stopnie naukowe*

24.01.2005	Doktor nauk rolniczych
Dziedzina	Nauki rolnicze
Dyscyplina	Zootechnika
	Akademia Rolnicza w Szczecinie
	Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających
Tytuł pracy	„ <i>Genetyczne i środowiskowe uwarunkowania wzrostu i rozwoju cieląt bydła rasy czarno-białej na terenie Pomorza Zachodniego</i> ” promotor: prof. dr hab. Henryk Kamieniecki
15.06.1999	Magister inżynier
Kierunek	Zootechnika
Specjalność	Profilaktyka i higiena produkcji zwierzęcej
	Akademia Rolnicza w Szczecinie
	Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Katedra Hodowli Bydła i Owiec
Tytuł pracy	„ <i>Badania nad wpływem biopreparatów drożdżowych na zdrowotność i odchów cieląt w gospodarstwie rolnym Dębina</i> ” promotor: prof. dr hab. Henryk Kamieniecki
19.01.1998	Inżynier
Kierunek	Zootechnika

Akademia Rolnicza w Szczecinie
 Wydział Zootechniczny
 Katedra Hodowli Bydła i Owiec

Tytuł pracy *„Wpływ zimnego odchowu cieląt na poziom ich zdrowotności i rozwoju na podstawie badań w ZD Dębina Instytucie Zootechniki Kołbacz”*
 promotor: dr inż. Piotr Sablik

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.02.2014- obecnie	adiunkt Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających Zakład Biostatystyki
01.01.2010 – 31.01.2014	adiunkt Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających Zakład Cytogenetyki Molekularnej
01.01-2009 – 31.12.2009	adiunkt Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających
01.10.2007 – 31.12.2008	adiunkt Akademia Rolnicza w Szczecinie Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających
01.11.2006 - 30.09.2007	asystent z doktoratem Akademia Rolnicza w Szczecinie Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających
03.03.2005 - 31.10.2006	specjalista naukowo – techniczny Akademia Rolnicza w Szczecinie Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

4.1. Osiągnięciem, stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl publikacji powiązanych tematycznie pod tytułem:

Polimorfizm genów kodujących wybrane elementy osi somatotropowej i ich związek z użytkowością mleczną różnych ras bydła

4.2. Publikacje lub inne prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

[H1] Szewczuk M. (2015). Association of a genetic marker at the bovine Janus kinase 2 locus (*JAK2/RsaI*) with milk production traits of four cattle breeds. *Journal of Dairy Research*, 82 (3), 287-292.

IF₂₀₁₅ – 1,500; 30 pkt. MNiSW₂₀₁₅

[H2] Szewczuk M., Zych S., Czerniawska-Piątkowska E. (2011). Association between *IGF1/TasI* polymorphism and milk traits of Polish Holstein Friesian cows. *Archiv für Tierzucht*, 54 (1), 10-17.

IF₂₀₁₁ – 0,416; 25 pkt. MNiSW₂₀₁₁

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wiodącym udziale w planowaniu eksperymentu, przygotowaniu bazy danych do analizy statystycznej, opracowaniu metodyki i jej realizacji, przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, statystycznej analizie wyników, interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu i przygotowaniu manuskryptu do druku. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

[H3] Szewczuk M., Zych S., Czerniawska-Piątkowska E., Wójcik J. (2012). Association between *IGF1R/i16/TaqI* and *IGF1/SnaBI* polymorphisms and milk production traits in Polish Holstein-Friesian cows. *Animal Science Papers and Reports*, 30 (1), 13-24.

IF₂₀₁₂ – 0,918; 20 pkt. MNiSW₂₀₁₂

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wiodącym udziale w planowaniu eksperymentu, przygotowaniu bazy danych do analizy statystycznej, opracowaniu metodyki i jej realizacji, optymalizacji testów molekularnych, przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, statystycznej analizie

wyników, interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu i przygotowaniu manuskryptu do druku. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

[H4] **Szewczuk M.** (2016). Polymorphism in exon 2 encoding the putative ligand binding pocket of the bovine insulin-like growth factor 1 receptor affects milk traits in four different cattle breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. DOI: 10.1111/jbg.12216.

*IF₂₀₁₆ – 1,745; 35 pkt. MNiSW₂₀₁₅**

**liczba punktów wg wykazu czasopism punktowanych MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania (punktacja z dnia 23 grudnia 2015 r.)*

[H5] **Szewczuk M.** (2015). Polymorphism of the Insulin-like growth factor 1 receptor gene (*IGF1R/e10/MspI* and *IGF1R/Re16/RsaI*) in four dairy breeds and its association with milk traits. *Livestock Science*, 181, 43-50.

IF₂₀₁₅ – 1,293; 35 pkt. MNiSW₂₀₁₅

- Ogólna liczba punktów za cykl publikacji powiązanych tematycznie wg czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy (dla pracy H4 - liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW z dnia 23 grudnia 2015 roku) wynosi **145** punktów;
- Sumaryczny współczynnik Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) za cykl publikacji powiązanych tematycznie zgodny z rokiem ukazania się pracy (dla pracy H4 wykazano IF za rok 2015/2016) wynosi **5,872**.

Oświadczenia współautorów przedstawionych powyżej prac naukowych wraz z określeniem ich indywidualnego udziału wykazano w załączniku nr 4.

Halgorzata Szewczuk

4.3. Omówienie celu naukowego w/w publikacji, jak również osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie i cel naukowy

Dzięki określeniu struktury chemicznej i przestrzennej DNA oraz poznaniu podstaw przenoszenia informacji genetycznej rozpoczęła się nowa era badań z zakresu analiz genetycznych w powiązaniu z nowoczesnymi technologiami mogącymi mieć zastosowanie w praktyce hodowlanej. Markery klasy I. (takie jak grupy krwi) stopniowo zostały wyparte przez markery klasy II., takie jak pojedyncze miejsca polimorficzne (SNP, ang. single nucleotide polymorphism) czy sekwencje mini- i mikrosatelitarne (Parmentier i in. 1999).

Identyfikacja genów warunkujących fenotypowe przejawianie się cech ilościowych jest trudna względu na dużą liczbę genów zaangażowanych w powstanie cechy, co w efekcie daje niewielki efekt addytywny. W ciągu ostatnich lat wiele uwagi poświęcono na identyfikację w obrębie całego genomu bydła *loci* cech ilościowych (QTL - ang. Quantitative Trait Loci), istotnych z ekonomicznego punktu widzenia. QTL to dające się łatwo zlokalizować markery genetyczne, które są najczęściej jedynie ściśle sprzężone z genami kontrolującymi interesujące nas cechy. W idealnych warunkach QTL mogą być włączane do programów selekcji wspomaganych markerami genetycznymi (MAS - ang. Marker Assisted Selection) (McClure i in. 2010). Zdaniem Hayes i Goddard (2001) większość QTL ma bardzo niewielki, stąd trudny do oszacowania wpływ. Do końca 2016 zdeponowano ponad 99,7 miliona SNP u *Bos taurus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

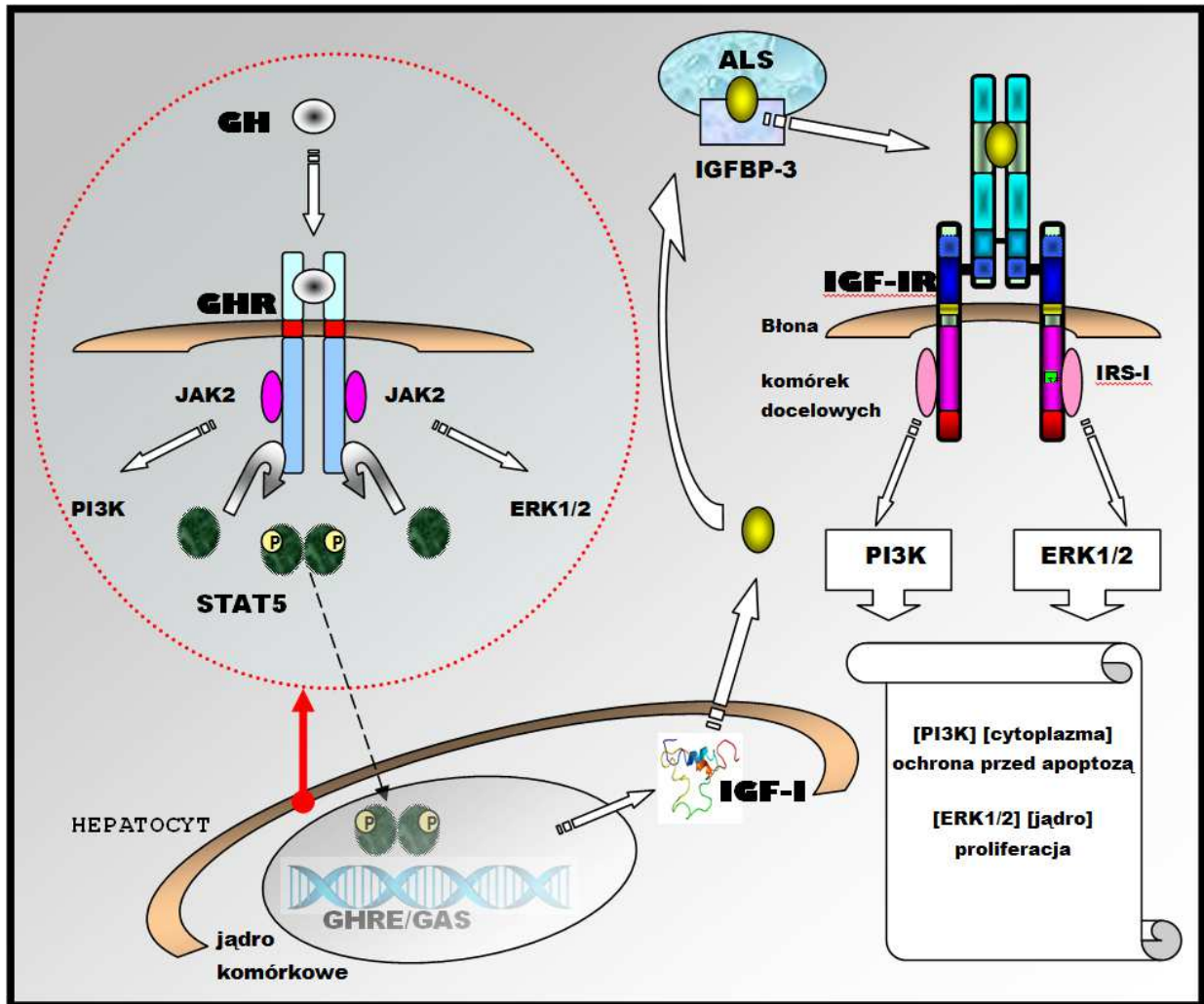
Szansę na urzeczywistnienie w/w koncepcji dają tzw. mikromacierze (chipy DNA), które pozwalają na genotypowanie osobników jednocześnie w tysiącach miejsc polimorficznych danego genomu. Za przykład może posłużyć mikromacierz BovineSNP50 v3 BeadChip (Illumina, San Diego, USA) obejmująca około 53,7 K SNP zebranych na podstawie wieloletnich badań asocjacyjnych bydła mlecznego i mięsnego (Snelling i in. 2010). Umożliwiło to szybki rozwój wiodącego obecnie prym kierunku badań polegającym na wskazywaniu całych regionów genomu istotnie związanych z daną cechą. Technikę, która umożliwia równoczesną identyfikację tysięcy SNP oraz określenie ich związku z daną cechą określa się badaniem asocjacyjnym całego genomu (ang. genome-wide association study; GWAS).

Poszukiwanie *loci* cech ilościowych jest kosztowne i jak dotąd nie przyniosło spektakularnych rezultatów u bydła mlecznego (Weller i Ron 2011). Dotychczas potwierdzono jedynie znaczenie kilkunastu genów, przy czym powtarzalne wyniki dla biosyntezy tłuszczu w mleku opisuje się dla substytucji aminokwasu K232A warunkowanej mutacją w genie kodującym Acyl CoA acylotransferazę diacylglycerolową 1 (*DGATI* na BTA14) (Gautier i in. 2006), zaś dla wydajności mlecznej i białka

wskazywana jest najczęściej substytucja aminokwasu w pozycji F279Y w wyniku mutacji w genie kodującym receptor hormonu wzrostu (*GHR*) zlokalizowanym na BTA20 (Blott i in. 2003).

Pomimo wielu niekwestionowanych zalet, technika GWAS daje tylko orientacyjne wskazówki co do potencjalnych QTL, lecz nie wyjaśnia mechanizmu przyczynowo-skutkowego danego procesu biologicznego. Liczba znanych genów mających wpływ na poszczególne cechy ilościowe nie jest do końca ustalona, stąd konieczne jest ciągle powtarzanie szacowania ewentualnych związków pomiędzy polimorfizmem potencjalnych genów a cechami użytkowości. Ważne jest wówczas genotypowanie zwierząt w oparciu o nowo odkryte SNP, połączone z gromadzeniem informacji umożliwiających ich powiązanie z użytkowością. Stanowi to element kolejnej strategii określanej jako poszukiwanie genów kandydujących (ang. candidate genes) dla danej cechy ilościowej. Podejście to opiera się na wyborze genów, których produkty białkowe biorą bezpośredni udział w konkretnych procesach fizjologicznych.

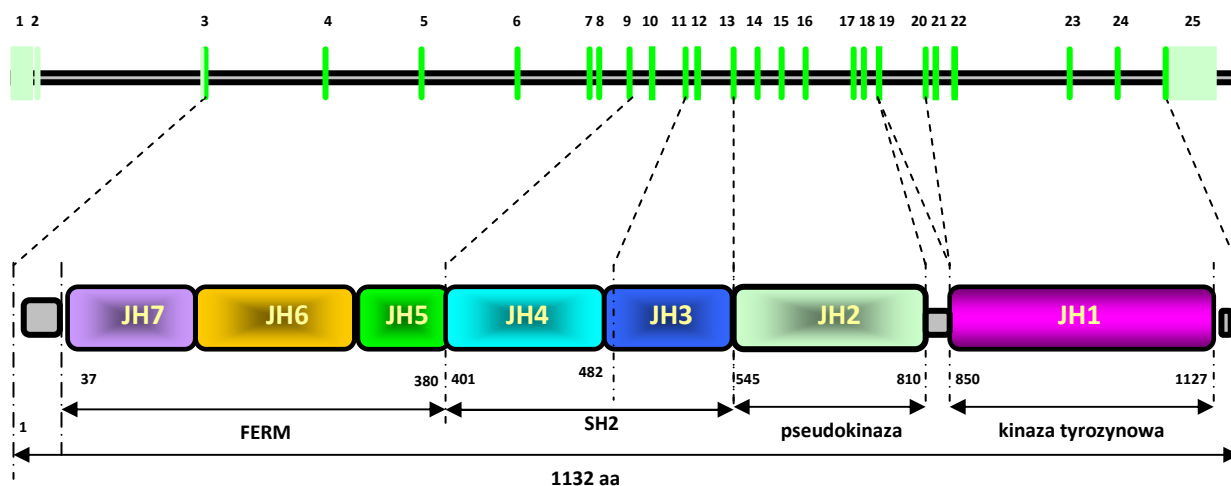
Wiele badań wskazuje, że liczne geny kodujące elementy osi somatotropowej (ang. somatotrophic axis) związane są ze wzrostem, rozwojem i funkcją gruczołu mlecznego, co wskazuje na ich ewentualny związek z użytkowością mleczną krów (Parmentier i in. 1999). Centrum osi somatotropowej stanowi peptydowy hormon wzrostu (GH, ang. growth hormone), który kontroluje metabolizm i wzrost u kręgowców. Rekombinowane GH wykorzystywane było eksperymentalnie do zwiększenia wydajności mlecznej bydła (Castigliero i in. 2010). Działanie GH jest mediowane i regulowane przez liczne białka, które razem składają się na kompleksowy system powiązanych ze sobą interakcji zwany osią somatotropową (Renaville i in. 2002). GH wydzielany jest do systemu przez przedni płat przysadki mózgowej. Sekrecja kontrolowana jest przez dwa neurohormony podwzgórza: somatoliberynę (GHRH, pobudzanie wydzielania) i somatostatynę (SRIF, hamowanie wydzielania) (Salvatori 2004). Po wydzieleniu GH do krwiobiegu następuje dość szybkie jego wiązanie z białkami wiążącymi GH (GHBP) w kompleks, który zwiększa jego okres półtrwania (Bauman 1994). W tkankach docelowych po oddzieleniu się od kompleksu GH wiąże się ze specyficznym receptorem na powierzchni docelowej komórki (GHR, ang. growth hormone receptor). Największe skupiska tych receptorów zgromadzone są w hepatocytach, ale wykryto je również w innych narządach i tkankach w tym w gruczole mlecznym krów (Sinowatz in. 2000; Plath-Gabler i in. 2001; Renaville i in. 2002; Castigliero i in. 2010). Dzięki właściwości katalitycznej domeny wewnątrzkomórkowej GHR (aktywność kinazy tyrozynowej) uruchamiana jest kaskada sygnałowa, w wyniku której dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych genów mediujących sygnał GH. W dalszym przekazywaniu jego sygnału pośredniczy przede wszystkim insulinopodobny czynnik wzrostu I (IGF-I, ang. insulin-like growth factor I) wraz z jego receptorem – IGF-IR (praca **D51**)(rys. 1). Analiza molekularna genów kodujących główne składowe osi somatotropowej, jak i szeregu innych ważnych mediatorów śródkomórkowych powiązanych z nimi, może dostarczyć wielu cennych informacji mających związek z użytkowością i zdrowotnością bydła.



Rys. 1 Schemat osi somatotropowej (opracowanie własne)

Głównymi mediatorami wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych są kinazy tyrozynowe. Do grupy tej należy również rodzina cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych zwanych potocznie JAK. Z uwagi na fakt, iż posiadają jednocześnie dwie podobne do siebie domeny (aktywnej kinazy i pseudokinazy) o przeciwstawnym działaniu, otrzymały rozwinięcie skrótu JAK jako *Janus Kinase*, dla uczczenia imienia rzymskiego boga, który posiadał dwa oblicza. Najaktywniejsza wśród nich, kinaza JAK2, wykazuje aktywność w stosunku do receptorów I i II typu dla cytokin. Struktura pierwszorzędowa każdej z kinaz JAK składa się z siedmiu homologicznych domen oznaczonych JH1-JH7, od końca karboksylowego do aminowego – rys. 2 (Silvennoinen i in. 2013). Najważniejszą funkcję pełni C-końcowa domena kinazowa oznaczona jako JH1, która jest odpowiedzialna za właściwą aktywność enzymatyczną. Rolę inhibitora i regulatora funkcjonowania JH1 pełni domena pseudokinazy (JH2). W środkowej części białek JAK znajduje się tzw. region homologiczny Src2 (ang. SH2) (domeny JH3÷JH4), wiążący się z bezpośrednio z białkami wchodzącymi w interakcję z JAK. Natomiast N-

końcowa część JAK budowana jest przez domenę FERM (JH5-JH7), konserwatywną wśród wielu białek komórkowych, która jest zaangażowana w lokalizacji JAK w odniesieniu do błony komórkowej i cytoszkieletu – w tym wiązanie z docelowymi receptorami, np. GHR (Babon i in. 2014). U bydła gen *JAK2* zlokalizowano na chromosomie 8 (BTA8) i składa się z 25 eksonów poprzedzielanych niekiedy długimi intronami – (rys. 2) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/525246>).

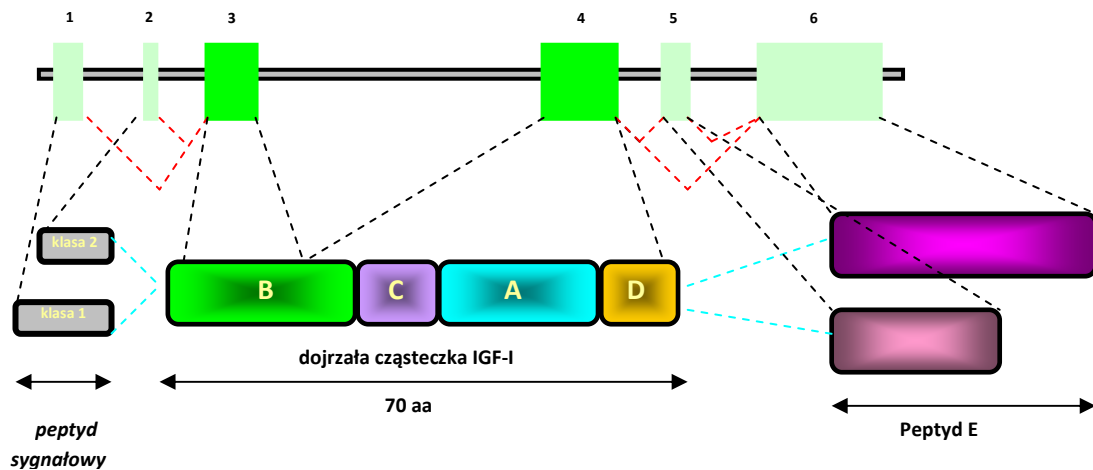


Rys. 2 Organizacja genu i kolejność domen JAK2 (opracowanie własne na podstawie: <http://www.uniprot.org/uniprot/E1BCP6>)

Efektom końcowym przyłączenia JAK2 do GHR jest aktywacja przede wszystkim białek STAT i uruchomienie systemu insulinopodobnego czynnika wzrostu. Na system IGF składają się z trzy ligandy (insulina, IGF-I, IGF-II), trzy receptory (IGF-IR, IGF-IIR, IR), sześć białek wiążących IGF (IGFBP 1-6) oraz 9 białek pokrewnych z IGFBP, tzw. IGFBPr (ang. IGFBP-related protein) (Baumrucker i Erondu 2000).

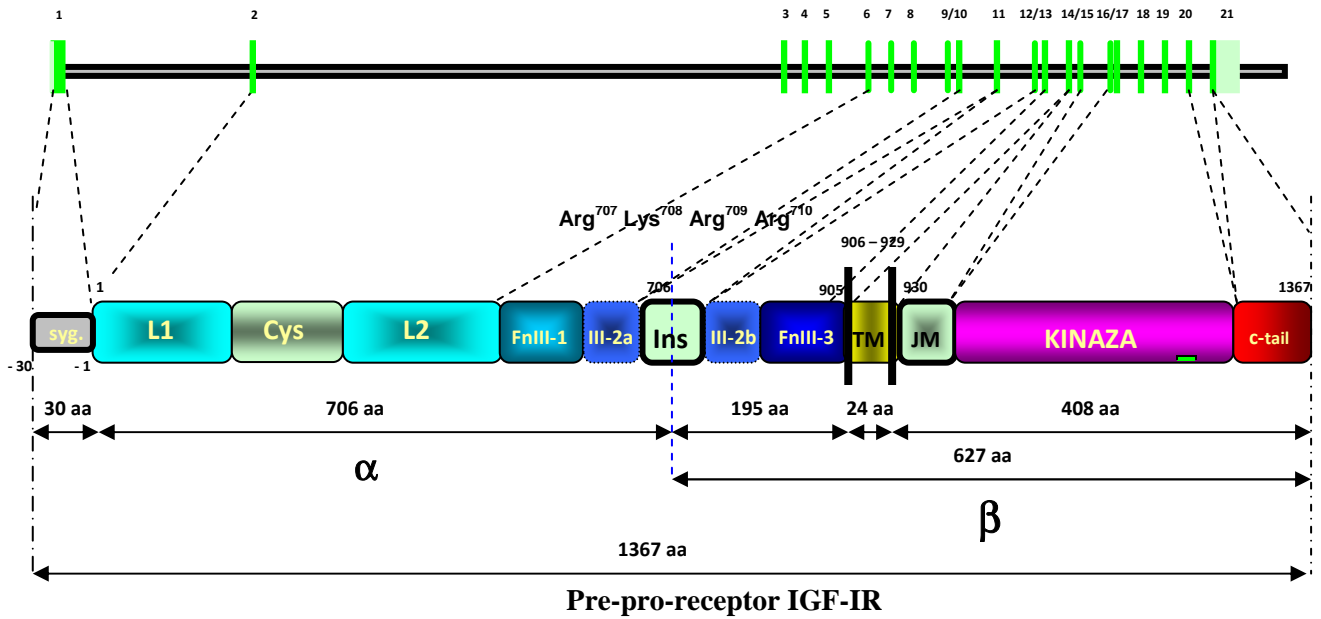
Insulinopodobny czynnik wzrostu I (IGF-I) to polipeptyd zbudowany z 70 aminokwasów. Występuje w dwóch formach prekursorowych IGF-IA (153 aa) i IGF-IB (195 aa) (trzecią formę wykryto jedynie u ludzi). Jednak dojrzała cząsteczka IGF-I jest zawsze identyczna (kodowana tylko przez eksony 3 i 4), konserwatywna wśród wielu gatunków zwierząt, i zawiera cztery domeny: B, C, A i D oraz odszczepiany jest tzw. E peptyd (kodowany przez eksony 5 i 6) (Oberbauer 2013). U bydła gen *IGF1* zmapowano w długim ramieniu chromosomu 5 (BTA5), i składa się z 6 eksonów przedzielonych 5 intronami (Mahchado i in. 2003) (rys. 3). Jego transkrypcja, zarówno u ludzi jak i u bydła, zachodzi z dwóch miejsc promotorowych. Promotor oznaczony jako P1 jest umiejscowiony przed eksonem 1 *IGF1*, natomiast promotor P2 przed eksonem 2 (Reyna i in. 2010). Występowanie zróżnicowanych miejsc startu transkrypcji oraz późniejszy alternatywny splicing pre-mRNA daje w rezultacie zróżnicowane formy transkryptów genu *IGF1* w wątrobie (głównie P2) i innych narządach i tkankach (P1) (Wang i in. 2003). W krwiobiegu IGF-I występuje w formie wolnej bądź związanej z

białkami o wysokim (IGFBP) lub niskim (IGFBP_r) powinowactwie do tego czynnika. U bydła ponad 90% krążącego IGF-I jest związane z IGFBP-3 oraz kwasowo labilną cząsteczką (ALS – Acid Labile Subunit) tworząc kompleks o masie 150 kDa (Baumrucker i Erondu 2000). Zaletą takiego kompleksu jest dłuższy czas półtrwania IGF-I i ochrona przed hipoglikemią. Pozostałą część stanowią kompleksy z innymi białkami wiążącymi, a mniej niż 1% występuje w formie niezwiązanej (Mohan i Bayling 2002).



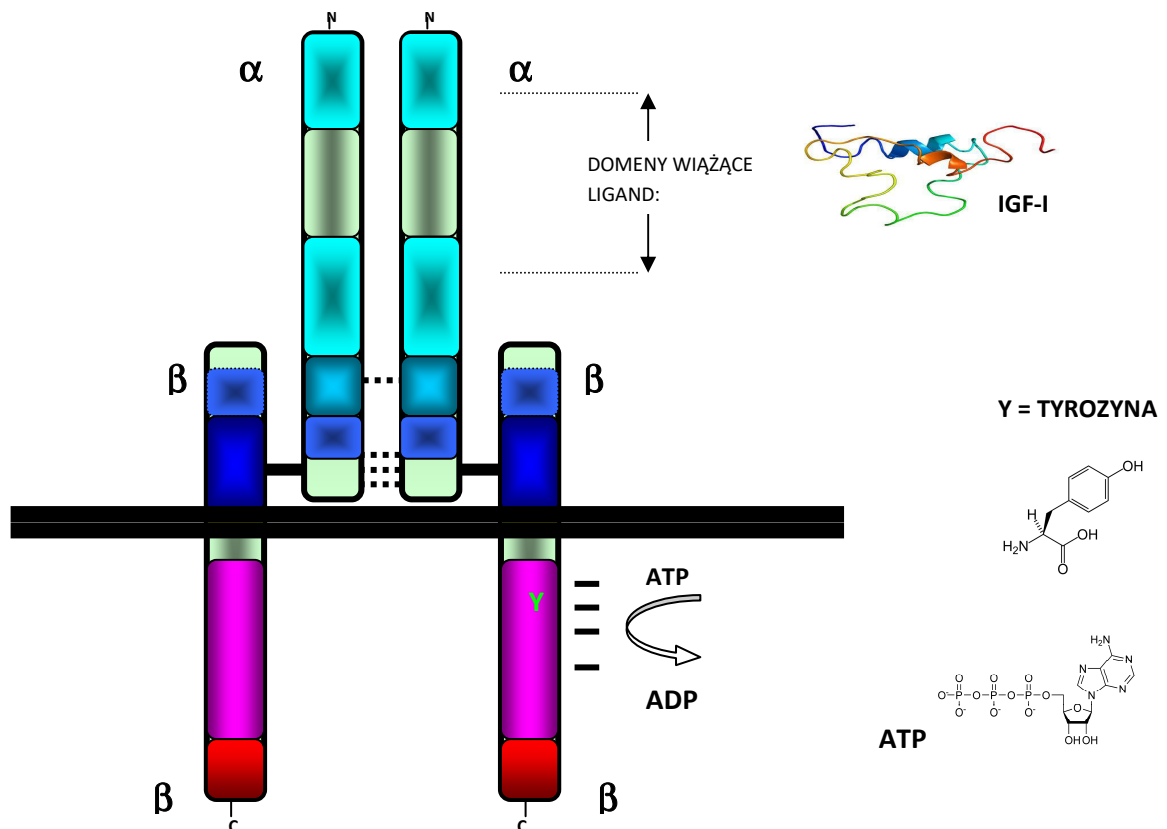
Rys. 3. Struktura genu *IGF1* oraz alternatywne składanie dojrzałej cząsteczki IGF-I (opracowanie własne za Oberbauer 2013)

Wolny IGF-I oddziałuje na komórki tkanek docelowych poprzez jego związanie się ze specyficznym receptorem jakim jest IGF-IR, kodowany przez gen *IGFIR* zmapowany u bydła na chromosomie 21 (BTA21) (Moody i in. 1996). Nadrodzina receptorów związanych z aktywnością kinazy tyrozynowej (RKT; ang. Receptor Tyrosine Kinase), do których zalicza się IGF-IR, obejmuje receptory dla zróżnicowanych substancji sygnałowych takich jak: hormony peptydowe (hormon wzrostu czy też insulina), cytokiny i czynniki wzrostu (np. czynnik wzrostu naskórka – EGF, nerwu – NGF, płytek krwi – PDGF, fibroblastów – FGF, nabłonka naczyń – VEGF, hepatocytów – HGF i wiele innych) (Lemmon i Schlessinger 2010). Dotychczas w piśmiennictwie pojawiło się niewiele wzmianek na temat budowy i funkcji bydłowej cząsteczki IGF-IR. Na bazie analogii do ludzkiego odpowiednika, jest to jeden łańcuch aminokwasów syntetyzowany w postaci pre-pro-receptora zbudowanego z 1367 aminokwasów, który przechodzi następnie szereg modyfikacji potranslacyjnych (Ullrich i in. 1986) (rys. 4 i 5). Wykazano, że IGF-IR strukturalnie podobny jest do receptora insulinowego (IR) (70% homologii w sekwencji aminokwasowej) (Riedemann i Macaulay 2006).



Rys. 4. Struktura genu *IGF1R* oraz podjednostek α i β dojrzałej cząsteczki IGF-IR (opracowanie własne za Adams i in. 2000)

syg. – peptyd sygnałowy; L1, L2 – domeny homologiczne L1 i L2; Cys. - domena bogata w reszty cysteiny; FnIII (1, 2a, 2b, 3) – domeny fibronektyn typu III; Ins – domena insercyjna; TM – region transbłonowy; JM – region proksymalny do błony komórkowej; KINAZA – domena katalityczna o aktywności kinazy tyrozynowej; c-tail – region C-końcowy.



Rys. 5. Budowa dojrzałego receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I (IGF-IR) (opracowanie własne za Ullrich i in. 1986)

Rodzina receptorów dla insuliny (klasa II RKT), obejmująca IR, IGF-IR oraz IRR (ang. orphan insulin receptor-related receptor), cechuje się charakterystycznym schematem budowy. W obrębie sekwencji aminokwasowej receptora można wyróżnić kilkanaście domen, z których trzy mają największe znaczenie dla funkcji receptora. W przypadku IGF-IR obszar składający się z domen bogatej w reszty cysteiny (aminokwasy 148 ÷ 301) z przylegającymi do niej domenami L1 (1 ÷ 147) i L2 (302 ÷ 460) odpowiada za specyficzne wiązanie się z cząsteczką ligandu, przy czym ma największe powinowactwo do IGF-I, sześciokrotnie mniejsze do IGF-II i stukrotnie mniejsze do insuliny (Annunziata i in. 2011). Aminokwasy 461 ÷ 905 budują szereg domen fibronektyn typu III z jednym insertem – tu następuje ciecie pro-receptora i formowanie charakterystycznych podjednostek α i β . Krótka domena transbłonowa o strukturze α helisy (24 aminokwasów, 906 ÷ 929) odpowiada za przekazywanie zewnętrznego sygnału do wnętrza komórki poprzez sąsiadującą domenę przylegającą do błony komórkowej (930 ÷ 968). Natomiast wewnątrzkomórkowa domena katalityczna o właściwości kinazy tyrozynowej (969 ÷ 1244) pełni istotną rolę w przekazywaniu sygnału jako enzym katalizujący przeniesienie grupy fosforanowej z ATP autofosforylując własne tyrozyny jak i inne reszty tyrozynowe, serynowe i/lub treoninowe białek uczestniczących w procesie przekazywania sygnału IGF-I (Li i Miller 2006). Pozostałe aminokwasy formują krótki ogon C – terminalny (rys. 4 i 5; pozycje aminokwasów zgodne z ludzkim IGF-IR: <http://www.uniprot.org/uniprot/> nr dostępu P08069).

Na drodze modyfikacji potranslacyjnych usuwany jest 30 aminokwasowy peptyd sygnałowy, następnie cząsteczka ulega glikozylacji i po rozpoznaniu i wycięciu sekwencji czterech aminokwasów z domeny insercyjnej (Arg⁷⁰⁷-Lys⁷⁰⁸-Arg⁷⁰⁹-Arg⁷¹⁰) przez protezę furynową następuje podział pro-receptora na dwie podjednostki: α (706 aminokwasów) i β (627 aminokwasów). Obie podjednostki połączone zostają ze sobą mostkami dwusiarczkowymi. Kolejnym etapem dojrzewania cząsteczki receptora jest dimeryzacja dwóch cząsteczek $\alpha\beta$ w heterotetramer $\alpha_2\beta_2$ (Adams i in. 2000).

Szlak przekazywania sygnałów w komórce z udziałem receptorów zawierających kinazę tyrozynową przebiega wg wspólnego schematu. Związanie ligandu aktywuje receptor. Dimeryzacja receptora umożliwia interakcję między jego dwiema domenami katalitycznymi i ich wzajemną autofosforylację. Autofosforylacja rozpoczyna się w tzw. pętli aktywacyjnej (ang. activation loop), w której zlokalizowane są trzy położone blisko siebie tyrozyny: Y¹¹³¹, Y¹¹³⁵ i Y¹¹³⁶. Następnie zaktywowany receptor wiąże i fosforyluje tzw. białka adaptorowe, zawierające domeny SH2/SH3 (SH = Src Homology). Zaliczyć do nich możemy białka: IRS1/2, SHC i inne analogi. Białka te z kolei aktywują kolejne elementy różnych kaskad biochemicznych (Iams i Lovly 2015). Domena SH2 białek adapterowych stanowi fragment około 100 aminokwasów identycznych z fragmentem występującym w cytoplazmatycznej kinazie tyrozynowej Src, pełniącej rolę ważnego integratora sygnałów zainicjowanych przez stymulację receptorów różnego typu. Domeny te rozpoznają ufosforylowaną tyrozinę w receptorze, jednak specyficzność wiązania danego białka zależy od sekwencji aminokwasowych otaczających tyrozinę i domenę SH2 (McNally i in. 2016). Natomiast domeny SH3, zawierające około 60 homologicznych aminokwasów, wiążą się z fragmentami białek bogatych w

prolinę (Ruano i in. 2016). Głównym białkiem adapterowym dla IGF-IR jest IRS-1 (ang. Insulin Receptor Substrate 1) posiadające domenę SH2. Fosforylacja IRS-1 prowadzi do aktywacji dwóch głównych szlaków sygnałowych: PI3K-AKT/PKB (w cytoplazmie - metabolizm) i Ras-MAPK (w jądrze komórkowym - wzrost) (rys. 1) (Garwood i in. 2015).

Nadal istnieje potrzeba poszukiwania i identyfikacji genów, których zmienność może mieć bezpośredni lub pośredni związek z cechami użytkowości bydła o mlecznym kierunku użytkowania. W momencie podjęcia prac z omawianego zakresu pojawiły się pierwsze dowody na obecność elementów osi somatotropowej w gruczole mlecznym krów (Sinowatz in. 2000; Plath-Gabler i in. 2001). W związku z tym podjęto się badań molekularnych niedostatecznie poznanych elementów osi somatotropowej, a uzyskane w badaniach własnych wyniki analiz asocjacyjnych zestawiono w cyklu prac powiązanych tematycznie w celu oszacowania, czy genotypy wybranych genów osi somatotropowej (*JAK2*, *IGF1*, *IGF1R*) powiązane są z cechami użytkowości mlecznej ras typowo mlecznych i o dwukierunkowym typie użytkowania. Aby zweryfikować istniejący stan wiedzy oraz uzupełnić go o nowe elementy, na główny cel badawczy złożyły się następujące **cele szczegółowe**:

- walidacja wybranych miejsc polimorficznych w genach *JAK2* i *IGF1* oraz walidacja znanych i poszukiwanie nowych miejsc polimorficznych w stosunkowo słabo poznanym u bydła w genie *IGF1R* w oparciu o odpowiednio liczne stada różnych ras bydła o mlecznym kierunku użytkowania;
- określenie częstości występowania alleli i genotypów tych miejsc polimorficznych, które zlokalizowane były w sekwencji kodującej w/w genów, a w przypadku braku takiego SNP, w części promotorowej genu;
- oszacowanie związku pomiędzy wybranymi wariantami genetycznymi (z uwzględnieniem genotypów kombinowanych) a wybranymi cechami użytkowości mlecznej (wydajność mleka, tłuszczu i białka oraz zawartość tłuszczu i białka w mleku).

Po wstępnej analizie uzyskanych wyników, w badaniach asocjacyjnych uwzględniono następujące miejsca polimorficzne:

- ✓ cichą mutację rs110298451 w eksonie 20 genu kinazy janusowej 2 (*JAK2*), stanowiącą trzecią literę kodonu dla lizyny w pozycji 912 (domena kinazowa JH1), oznaczoną dalej jako *JAK2/e20/RsaI* (metodyka własna);
- ✓ dwie mutacje w potencjalnej sekwencji promotora P1 genu insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (*IGF1*):
 - tranzycja rs109763947 zlokalizowana w pozycji -512 pz od kodonu AUG eksonu 1, oznaczona dalej jako *IGF1/SnaBI* (wg Ge i in. 2001);

- transwersja rs133990633 zlokalizowana w obrębie polimorfizmu mikrosatelitarnego (CA)_n w pozycji -977 pz od kodonu AUG eksonu 1, oznaczona dalej jako *IGF1/TasI* (wg metodyki ustalonej w pracy **A1**);
- ✓ cztery ciche miejsca polimorficzne zlokalizowane w eksonach oraz dwa w intronie genu kodującego receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (*IGF1R*), w tym (wg metodyk własnych):
 - rs134868883 w eksonie 2 w trzeciej literze kodonu dla cysteiny w pozycji 3 domeny L1 podjednostki α łańcucha aminokwasowego, oznaczone dalej jako *IGF1R/e2/MspI*;
 - rs207542405 w eksonie 2 w trzeciej literze kodonu dla treoniny w pozycji 165 domeny bogatej w cysteiny podjednostki α łańcucha aminokwasowego, oznaczone dalej jako *IGF1R/e2/TaqI*;
 - rs210778604 w eksonie 10 w trzeciej literze kodonu dla kwasu asparaginowego w pozycji 645 domeny fibronektyn typu III podjednostki α łańcucha aminokwasowego, oznaczone dalej jako *IGF1R/e10/MspI*;
 - rs208140993 w eksonie 16 w trzeciej literze kodonu dla tyrozyny w pozycji 957 domeny katalitycznej o właściwości kinazy tyrozynowej podjednostki β łańcucha aminokwasowego, oznaczone dalej jako *IGF1R/e16/RsaI*.
 - rs41960582 i rs41960583 w intronie 16.

Sekwencje starterowe do metodyk własnych zaprojektowano w programie Primer3 w oparciu o sekwencje DNA i mRNA dostępne na stronach National Center for Biotechnology - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Sekwencjonowanie uzyskanych fragmentów genów zlecono firmom Oligo (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa) oraz Genomed S.A. (Warszawa). Nowe sekwencje i miejsca polimorficzne systematycznie deponowano do baz NCBI. Analizy restrykcyjne wybranych fragmentów genów ustalano w oparciu o programy WebCutter 2.0 i NEBcutter 2.0. Genotypy określano z zastosowaniem poniższych metod badawczych:

- ❖ łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. polymerase chain reaction);
- ❖ sekwencjonowanie uzyskanych fragmentów DNA;
- ❖ polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych fragmentów DNA powstałych w wyniku trawienia za pomocą enzymów restrykcyjnych (PCR-RFLP, ang. restriction fragments length polymorphism);
- ❖ polimorfizm sztucznie utworzonych miejsc restrykcyjnych powstałych w wyniku amplifikacji DNA z użyciem modyfikowanych sekwencji starterowych, gdy brak było enzymów rozpoznających natywną sekwencję (ACRS, ang. amplification-created restriction site);
- ❖ dwuetapowy gniazdowy (inne synonimy: zagnieżdżony, wewnętrzny) PCR w celu zwiększenia specyficzności standardowej techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. nested PCR) z dodatkowym wykorzystaniem metody ACRS.

Dane użytkowe pochodziły z dokumentacji hodowlanej stad prowadzone w ramach rutynowej kontroli użytkowości mlecznej. Analiza statystyczna przeprowadzona została przy użyciu programu Statistica (StatSoft Polska Sp. z o.o.). Rozpatrywano wydajność mleka, tłuszczu i białka, jak również zawartość tłuszczu i białka w mleku za 305 dniową laktację (kolejne laktacje analizowano oddzielnie).

Uzyskane wyniki

Efektom przeprowadzonych analiz w omawianym okresie było zdeponowanie w bazie dbSNP (NCBI) 11 nowych miejsc polimorficznych w bydlęcym genie receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (*IGF1R*):

w części kodującej genu

- cicha mutacja **Chr21:g.8020617A>G** w eksonie 2 (**rs207542405**) (nr deponowany: ss472333354; data zdeponowania 31.X.2011 r.),
- cicha mutacja **Chr21:g.8231709C>T** w eksonie 10 (**rs210778604**) (nr deponowany: ss472336283; data zdeponowania 09.XI.2011 r.),
- cicha mutacja **Chr21:g.8246309C>T** w eksonie 16 (**rs208140993**) (nr deponowany: ss469414263; data zdeponowania 22.IX.2011 r.),

w części niekodującej genu

- delecja/insercja **Chr21:g.8019954G:g.8019955T>insACAG** w intronie 1 (**rs209090812**) (nr deponowany: ss478881918; data zdeponowania 30.12.2011 r.),
- mutacja **Chr21:g.8020003C>T** w intronie 1 (**rs209137690**) (nr deponowany: ss478881329; data zdeponowania 30.12.2011 r.),
- delecja/insercja **Chr21:g.8020026G:g.8020027T>insT** w intronie 1 (**rs207810614**) (nr deponowany: ss478881923; data zdeponowania 30.12.2011 r.),
- delecja/insercja [-/C] w intronie 2 (ss511151811; 10.04.2012 r.) (uwagi: sekwencja części intronu 2 (**Chr21:g.8020683:g.8020972**) nie została jak dotąd oficjalnie określona na stronach NCBI stąd brak nr refSNP: „rsXXXXXXXXXX”),
- mutacja **Chr21:g.8226848C>G** w intronie 6 (**rs210260405**) (nr deponowany: ss503715516; data zdeponowania 28.III.2012 r.),
- mutacja **Chr21:g.8231913A>G** w intronie 10 (**rs211549206**) (nr deponowany: ss472336284; data zdeponowania 09.XI.2011 r.),
- delecja/insercja **Chr21:g.8241804T>delT** w intronie 14 (**rs211025872**) (nr deponowany: ss501289205; data zdeponowania 21.III.2012 r.),
- delecja/insercja **Chr21:g.8242063T>delT** w intronie 14 (**rs207915466**) (nr deponowany: ss501289214; data zdeponowania 21.III.2012 r.).

Ustalenie częściowej sekwencji kodującej bydłęcego genu receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (*bIGF1R*)

Zdeponowano 8 fragmentów sekwencji kodującej genu *bIGF1R*:

- *Bos taurus* insulin-like growth factor receptor type 1 (*IGF1R*) gene, exon 2 and partial cds (1 210 pz; **HM988958**; sekwencja dostępna od: 10.X.2010 r.),
- *Bos taurus* insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*) gene, exon 7 and partial cds (430 pz; **JQ715681**; sekwencja dostępna od: 22.V.2012 r.),
- *Bos taurus* insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*) gene, exons 9, 10 and partial cds (701 pz; **JN204287**; sekwencja dostępna od: 06.XI.2011 r.),
- *Bos taurus* insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*) gene, exon 11 and partial cds (553 pz; **JQ957798**; sekwencja dostępna od: 23.VII.2012 r.),
- *Bos taurus* insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*) gene, exons 12, 13 and partial cds (790 pz; **JQ924783**; sekwencja dostępna od: 07.VIII.2013 r.),
- *Bos taurus* insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*) gene, exons 14, 15 and partial cds (715 pz; **JQ780476**; sekwencja dostępna od: 10.VI.2012 r.),
- *Bos taurus* insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*) gene, exons 16, 17 and partial cds (878 pz; **GQ487665**; sekwencja dostępna od: 27.IX.2009 r.),
- *Bos taurus* insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*) gene, 3' flanking region (262 pz; **JQ957797**; sekwencja dostępna od: 23.VII.2012 r.).

Powyższe sekwencje stały się częścią:

- PREDICTED: *Bos taurus* insulin like growth factor 1 receptor (*IGF1R*), transcript variant X1, mRNA. (4429 pz; **XM_010816884**; sekwencja dostępna od: 26.I.2016 r.),
- *Bos taurus* insulin like growth factor 1 receptor (*IGF1R*), mRNA (4165 pz; **NM_001244612**; sekwencja dostępna od: 24.IV.2016 r.).

Walidacja znanych miejsc polimorficznych bydłęcego genu receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (*bIGF1R*)

W latach 2010 - 2012 byłam współwykonawcą projektu badawczego „Określenie wpływu polimorfizmu genu receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (*IGF1R*) na cechy użytkowości mlecznej i mięsnej wybranych ras bydła”, wykonywanego w ramach umowy nr: N N311 221738, w którym przeprowadziłam walidację występowania wybranych miejsc polimorficznych w eksonach i intronach u różnych ras bydła za pomocą autorskich protokołów PCR-RFLP i sekwencjonowania pulowanych produktów PCR (Tab. 1). Badania kontynuowano jeszcze w latach 2013 – 2014, w miarę, jak zapełniała się baza zdeponowanych SNP w GenBank. Wykonano łącznie około 5000 oznaczeń.

Tabela 1. Zestawienie miejsc polimorficznych w eksonach i intronach *bIGF1R* objętych walidacją

L.p.	Nr SNP	pozycja *	lokalizacja	metoda**	rok badań	potwierdzono dla ras mlecznych
1	rs434957771	Chr21:g.7967819T>C	Ekson 1 <u>TCG</u> > <u>CCG</u> S [Ser] > P [Pro]	sekwencjonowanie PCR-RFLP Enzym: <i>TaqI</i>	2014	NIE
2	rs451896845	Chr21:g.7967821G>T	Ekson 1 <u>TCG</u> > <u>TCC</u> S [Ser] > S [Ser]	sekwencjonowanie PCR-RFLP Enzym: <i>TaqI</i>	2014	NIE
3	rs209595810	Chr21:g.7967822A>C	Ekson 1 <u>CTC</u> > <u>ATC</u> L [Leu] > I [Ile]	sekwencjonowanie PCR-RFLP Enzym: <i>TaqI</i>	2013	NIE
4	rs41961336	Chr21:g.8226888T>C	Ekson 7 <u>GAC</u> > <u>GAT</u> D [Asp] > D [Asp]	sekwencjonowanie PCR-RFLP Enzym: <i>TaiI</i>	2010	TAK
5	rs135514117	Chr21:g.8226901A>C	Ekson 7 <u>ACC</u> > <u>CCC</u> T [Thr] > P [Pro]	sekwencjonowanie	2010	NIE
6	rs132825686	Chr21:g.8226904T>C	Ekson 7 <u>TCC</u> > <u>CCC</u> S [Ser] > P [Pro]	sekwencjonowanie	2010	NIE
7	rs134699109	Chr21:g.8226907A>C	Ekson 7 <u>ACC</u> > <u>CCC</u> T [Thr] > P [Pro]	sekwencjonowanie	2010	NIE
8	rs41640706	Chr21:g.8236795G>A	Ekson 12 <u>CCA</u> > <u>CCG</u> P [Pro] > P [Pro]	sekwencjonowanie PCR-RFLP Enzym: <i>MspI</i>	2011	TAK
9	rs133373507	Chr21:g.8237406C>T	Ekson 13 <u>TCC</u> > <u>TCT</u> S [Ser] > S [Ser]	sekwencjonowanie PCR-RFLP Enzym: <i>XbaI</i>	2011	NIE
10	rs41960562	Chr21:g.8268525A>G	Ekson 21 / 3'UTR	PCR-RFLP Enzym: <i>TaqI</i>	2011	TAK
11	rs41960620	Chr21:g.8216176C>T	Intron 4	PCR-RFLP Enzym: <i>HinfI</i>	2010	TAK
12	rs41960621	Chr21:g.8216291C>T	Intron 4	PCR-RFLP Enzym: <i>Mph1103I</i>	2010	TAK
13.	rs41960622	Chr21:g.8216945G>A	Intron 5	PCR-RFLP Enzym: <i>AciI</i>	2011	NIE
14.	rs41960623	Chr21:g.8217567G>C	Intron 5	PCR-RFLP Enzym: <i>Hin6I</i>	2011	TAK
15.	rs41960626	Chr21:g.8220222C>T	Intron 5	PCR-RFLP Enzym: <i>NlaIII</i>	2011	NIE
16.	rs41960629	Chr21:g.8220954C>T	Intron 5	PCR-RFLP Enzym: <i>NlaIII</i>	2011	NIE
17.	rs41960630	Chr21:g.8221277G>C	Intron 5	PCR-RFLP Enzym: <i>PstI</i>	2010	TAK
18.	rs41961331	Chr21:g.8221325C>A	Intron 5	PCR-RFLP Enzym: <i>DdeI</i>	2011	NIE

Lp.	Nr SNP	pozycja *	lokalizacja	metoda**	rok badań	potwierdzono dla ras mlecznych
19.	rs41961332	Chr21:g.8222774G>C	Intron 5	PCR-RFLP Enzym: <i>Hae</i> III	2010	TAK
20.	rs41961333	Chr21:g.8224594T>G	Intron 5	PCR-RFLP Enzym: <i>Psh</i> AI	2011	TAK
21.	rs41961335	Chr21:g.8226818T>C	Intron 6	PCR-RFLP Enzym: <i>Bsh</i> 1236I	2011	TAK
22.	rs41961337	Chr21:g.8227552A>G	Intron 7	PCR-RFLP Enzym: <i>Alw</i> 26I	2011	NIE
23.	rs136209662	Chr21:g.8231900G>A	Intron 10	sekwencjonowanie	2011	TAK
24.	rs41640705	Chr21:g.8237085G>A	Intron 12	sekwencjonowanie	2011	TAK
25.	rs110343126	Chr21:g.8237305G>A	Intron 12	sekwencjonowanie	2011	TAK
26.	rs109762729	Chr21:g.8246740T>G	Intron 16	sekwencjonowanie	2012	TAK

* wg AC_000178.1: Bos taurus breed Hereford chromosome 21, Bos taurus_UMD_3.1.1

** badana populacja: HF n=12, MO n=12, JE n=12, SM n=12

Cykl publikacji powiązanych tematycznie

[H1] Autorskie sekwencje starterowe zaprojektowano do powielania całego eksonu 20 bydłowego genu *JAK2* w oparciu o kompletną sekwencję ludzkiego genu (GenBank nr dostępu NG_009904) oraz sekwencji mRNA bydłowego genu *JAK2* (GenBank nr dostępu XM_003586385) i fragmentu genomu bydła (203 kpz) z baz uzyskanych metodą shotgun (GenBank nr dostępu DAAA02022688). Do analiz asocjacyjnych wytypowano miejsce polimorficzne rs110298451 (Chr8:g.39645396A>G) w trzeciej literze kodonu dla lizyny K912, którego istnienie zostało potwierdzone jak dotąd przez 18 niezależnych zespołów badawczych. Wybrane miejsce genotypowano za pomocą metody PCR-RFLP z użyciem enzymu restrykcyjnego *Rsa*I (*JAK2/e20/Rsa*I). Badaniami objęto 904 krowy, w tym rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (PHF, dwa stada o łącznej liczebności n=224), jersey (JE, jedno stado n=234), montbeliard (MO, dwa stada o łącznej liczebności n=211) i simmental (SM, dwa stada o łącznej liczebności n=235). Za wyjątkiem rasy PHF, u której dominował allel G, frekwencje obu alleli były zbliżone. U rasy PHF przeważał genotyp GG (60,7%), natomiast u rasy JE genotyp AA (40,6%). Wśród ras MO i SM najczęściej występowały osobniki heterozygotyczne (odpowiednio 57,8% i 49,4%).

Wykonano analizę związku pomiędzy wydajnością mleczną krow w poszczególnych laktacjach a genotypami *JAK2/e20/Rsa*I. Stwierdzono, że niezależnie od laktacji, krowy rasy PHF o genotypie GG cechowały się największymi średnimi wydajnościami mleka, tłuszczu i białka w porównaniu do osobników o genotypie AA ($P \leq 0,01$), przy czym różnice wynosiły ~1000 kg mleka, ~40 kg tłuszczu i

~30 kg białka. Nieco mniejsze różnice w wydajności mleka (~500 kg), tłuszczu i białka (~15÷25 kg) odnotowano porównując osobniki o genotypie *GG* z heterozygotami ($P \leq 0,01$ dla 1. laktacji i $P \leq 0,05$ w kolejnych laktacjach). Podobne zależności zaobserwowano u osobników ras MO i SM, jednakże dotyczyły głównie wydajności mleka (500÷800 kg – MO; 300÷1200 kg - SM). Dla wydajności tłuszczu i białka odnotowano znaczne zróżnicowanie w zależności od laktacji. Osobniki o genotypie *GG* cechowały się większą wydajnością omawianych parametrów w porównaniu do osobników o genotypie *AA* (różnice na poziomie 10 ÷ 20 kg dla MO i 10 ÷ 50 kg dla SM). Analizując procentową zawartość tłuszczu i białka w mleku nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy analizowanymi genotypami.

W przypadku krów rasy JE genotyp *GG* także warunkował wyższe wydajności, jednak istotne różnice stwierdzono jedynie w 1. laktacji ($P \leq 0,05$). Ze względu na odmienny rozkład frekwencji genotypów z wyraźną przewagą genotypu najmniej preferowanego z punktu widzenia prowadzonej analizy (*AA*), w kolejnych laktacjach średnie wydajności mleka, tłuszczu i białka były bardziej wyrównane w grupach w porównaniu z innymi rasami.

Podsumowując, niezależnie od rasy i kolejności laktacji, genotyp *GG* warunkował wyższą wydajność mleka, tłuszczu i białka w porównaniu do genotypu *AA*. Osobniki heterozygotyczne (*AG*) cechowały się zazwyczaj wartościami pośrednimi badanych cech mleczności, rzadziej zbliżonymi lub nieco wyższymi od osobników o preferowanym genotypie *GG*. [H1] jest pierwszą na świecie pracą odnoszącą się do walidacji występowania miejsca polimorficznego rs110298451 (BTA8:g.39645396A>G) u bydła i pierwszą pracą asocjacyjną z tego zakresu. Dwa miesiące po opublikowaniu ukazała się publikacja autorstwa Usman i in. (2015), potwierdzająca występowanie tego SNP w populacji 468 krów rasy chińskiej holsztyńskiej (70% osobników o genotypie *GG*, 28% heterozygot i tylko 2% krów o genotypie *AA*). Autorzy wykazali związek pomiędzy genotypem *AA* a podatnością na *mastitis*, preferując genotyp *GG*, jednak nie przeprowadzili pełnej analizy użyteczności mlecznej.

[H2] Upřednio zidentyfikowane w pracy (A1) miejsce polimorficzne rs133990633 w obrębie polimorfizmu mikrosatelitarnego (CA)_n w pozycji -977 pz od kodonu start w eksonie 1 genu *IGF1* (tj. promotor P1; Chr5:g66605478A>C) genotypowano w populacji 658 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej przy użyciu metody ACRS-PCR. Starter wsteczny (*reverse*) wprowadzał sztuczne miejsce cięcia, rozpoznawalne przez enzym restrykcyjny *TasI*. Genotyp *AA* występował najczęściej (76,6%), heterozygoty *AC* stanowiły 21,3% badanej populacji, zaś genotyp *CC* pojawiał się niezwykle rzadko (2,1%). Analiza statystyczna wykazała istotne różnice między polimorfizmem *IGF1/TasI*, a analizowanymi cechami w laktacji II. i III. Krowy o rzadkim genotypie *CC* dawały więcej mleka (odpowiednio: +515 kg i + 463 kg), tłuszczu (+22 kg; + 16 kg) i białka (w obu laktacjach +14 kg) w porównaniu do krów o najczęstszym genotypie *AA* ($P \leq 0,01$; $P \leq 0,05$). Zawartość tłuszczu i białka była zbliżona, za wyjątkiem 2. laktacji ($P \leq 0,01$ i $P \leq 0,05$). Omawiana praca była pierwszą z tego zakresu. Następnie badania kontynuowano w pracy (A8) na 191 pierwiastkach rasy polskiej holsztyńsko-

fryzyjskiej i ponownie stwierdzono wysoką frekwencję genotypu AA (69% populacji), natomiast odnotowano najmniejszą ilość osobników o genotypie heterozygotycznym (12,8%). Analizowano jedynie wydajność mleczną krów w pierwszej laktacji i stwierdzono, że najrzadziej występujące heterozygoty AC cechowały się największą wydajnością mleka, tłuszczu i białka (odpowiednio: ~ +700 kg; ~+28 kg; ~ +25 kg; $P \leq 0,01$) w porównaniu z pozostałymi genotypami, przy braku istotnych różnic w procentowej zawartości tłuszczu i białka w mleku. Natomiast Zhang i in. (2014) objęli analizą trzy rasy rodzimego bydła chińskiego: qinchuan (n=95), nanyang (n=216) i chinese holstein (n=95) i stwierdzili, że genotyp AA dominował u każdej z ras (0.84 – 0.94), natomiast najmniej było osobników o genotypie CC (0 - 6%). Analogicznie do pracy [H2] autorzy stwierdzili, że osobniki z allelem C *IGF1/TasI* cechują się istotnie większymi parametrami użyteczności mlecznej, szczególnie wydajnością tłuszczu i białka (3. laktacja; $P \leq 0,05$). Następną pracą z tego zakresu były badania prowadzone w stadzie 163 krów rasy montbeliard (A12). Podobnie jak w pracy [H2], genotyp AA występował najczęściej (75,5%), heterozygoty AC stanowiły 19% badanej populacji, zaś genotyp CC występował sporadycznie (5,5%). Badania asocjacyjne wykazały, że w pierwszej laktacji krowy o genotypie CC charakteryzowały się większą wydajnością mleka (+1000 kg), tłuszczu (+46 kg) i białka (+32 kg) niż heterozygoty AC ($P \leq 0,01$) oraz krowy o genotypie AA (odpowiednio: +600 kg mleka i +32 kg tłuszczu; $P \leq 0,05$). W drugiej laktacji nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w wydajności mleka, tłuszczu i białka. W przypadku procentowej zawartości tłuszczu i białka w mleku w analizowanych genotypach oraz wszystkich analizowanych parametrach związanych z mlecznością w układach genotypów kombinowanych (*IGF1/SnaBI* x *IGF1/TasI*) również nie odnotowano istotnych różnic w obu laktacjach.

[H3] Drugie badane miejsce polimorficzne w promotorze P1 genu *IGF1*, rs109763947 (Chr5:g66605011C>T), zlokalizowane w pozycji -512 pz od kodonu start w eksonie 1, identyfikowano metodą ACRS-PCR z zastosowaniem sekwencji starterowych zaproponowanych przez Ge i in. (2001). Starter wsteczny wprowadzał sztuczne miejsce cięcia, rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *SnaBI*. Autorzy postawili hipotezę, że mutacja może mieć bezpośredni wpływ na poziom ekspresji *IGF1*, a tym samym na koncentrację IGF-I w surowicy i pośrednio na cechy użytkowe bydła. Badaniem objęto populację 201 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. W dostępnym piśmiennictwie początkowo stosowano oznaczenia alleli A i B, następnie C i T, stąd analizując genotypy należy kierować się kluczem: AA (= TT) (cięcie enzymem), AB (= CT) i BB (= CC brak cięcia). I tak, w prezentowanej pracy [H3] frekwencja heterozygot była najwyższa (56,2%), zaś genotypu BB(CC) najniższa – 17,4%, przy zbliżonych częstościach występowania obu alleli ($A(T)=0,55$ i $B(C)=0,45$). Inni autorzy również uzyskiwali zbliżone frekwencje obu alleli u różnych ras należących do *Bos taurus* (Hines i in. 1998, Ge i in. 2001, Klauzińska i in. 2004, Li i in. 2004, Siadkowska i in. 2006, Bonakdar i in. 2010, Mehmannaavaz i in. 2010 oraz praca (A12). Natomiast dla bydła *Bos indicus* zaobserwowano, że frekwencja allelu A(T) jest zdecydowanie niższa (0,20-0,38) (Curi i in. 2005, Pereira i in. 2005, Akis i

in. 2010). W prezentowanej pracy [H3] nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w wydajności mleka, tłuszczu i białka, oraz zawartości tłuszczu i białka w mleku, pomiędzy osobnikami o różnych genotypach *IGF1/SnaBI*. Podobne wyniki uzyskali Hines i in. (1998) dla krów rasy holsztyńskiej, Grzelak i in. (2007) rasy Jersey, Akis i in. (2010) należących do zebru (*Bos indicus*), Polasik i in. (2010) u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, Mehmannaavaz i in. (2010) irańskiej holsztyńskiej oraz w pracy (A12) u krów rasy montbeliard. Jednakże autorzy niektórych prac wskazują, że krowy z minimum jedną kopią allelu *B(C)* charakteryzują się większą wydajnością mleczną. Siadkowska i in. (2006) analizując wydajności dobowe krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej wykazali, że w mleku krów heterozygotycznych stwierdzono o 20 g więcej tłuszczu i 14,5 g więcej białka niż u krów o genotypie *AA(TT)* ($P \leq 0,01$). Jakkolwiek, nie stwierdzono istotnych różnic w dobowej wydajności mleka. Aby porównać uzyskane wyniki autorzy określili standaryzowaną wydajność mleka o zawartości 4% tłuszczu (FCM) i VCM (mleko skorygowane na zawartość tłuszczu i białka), następnie wykazali, że genotyp *AB(CT)* warunkował większą dzienną wydajność mleka (odpowiednio, $P \leq 0,05$ dla FCM i $P \leq 0,01$ dla VCM). W przypadku krów rasy holsztyńskiej Bonakdar i in. (2010) wykazali związek pomiędzy genotypem *AB(CT)* a wyższą wydajnością i zawartością tłuszczu i białka (przy braku istotnych różnic w wydajności mleka i koncentracji IGF-I w surowicy). W pracy (D38) szczegółowo analizowano skład i parametry fizykochemiczne mleka krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej w odniesieniu do genotypów *IGF1/SnaBI*. Heterozygoty charakteryzowały się większymi wydajnościami w porównaniu do osobników o genotypie *AA(TT)* (obserwacje statystycznie nieistotne, prawdopodobnie ze względu na niskie liczebności w grupach przy braku osobników o genotypie *BB(CC)*). Parametry fizykochemiczne mleka i zawartość białek mleka były zbliżone, niezależnie od genotypu. Natomiast w pracy (A8), analizując wydajności pierwiastek rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, autorzy wykazali istotny związek pomiędzy genotypem *BB(CC)*, a większą wydajnością mleka, tłuszczu i białka, w porównaniu do pozostałych genotypów ($P \leq 0,01$). Wiązało się to z mniejszą zawartością tłuszczu i białka w mleku krów o tym genotypie ($P \leq 0,05$). Uzyskane wyniki poparto analizą genotypów kombinowanych (*IGF1/SnaBI* x *IGF1/TasI*), gdzie kombinacja *BB(CC)/AA* warunkowała większą wydajność mleka (+ 1000 ÷ 1600 kg, $P \leq 0,01$), tłuszczu (+40 kg, $P \leq 0,05$) i białka (40 ÷ 45 kg, $P \leq 0,05$) w porównaniu do pozostałych układów genotypów kombinowanych, bez istotnego wpływu na zawartość tłuszczu i białka w mleku.

Drugim badanym miejscem polimorficznym w pracy [H3] była mutacja w genie receptora dla insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (*IGFIR*), złożona z dwóch sąsiadujących SNP zdeponowanych jako rs41960582 (Chr21:g.8246641T>C) i rs41960583 (Chr21:g.8246640C>T). Ówczesnie były to jedne z nielicznie zdeponowanych miejsc polimorficznych u *IGFIR Bos taurus* (220 rekordów w 2011 roku w bazie SNP - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>; obecnie ~12400 zdeponowanych SNP). Autorskie sekwencje starterowe flankowały niemal cały ekson 16 i 17, przedzielone intronem 16, w którym badano występowanie obu SNP. W wyniku analizy PCR-RFLP z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *TaqI* i następnie sekwencjonowaniu wybranych próbek wykazano, że w badanej populacji występowały trzy genotypy (ze względu na jednoczesne trawienie, w

nawiasie podano stwierdzoną po sekwencjonowaniu kombinację genotypów): AA (CC/CC), AB (CT/CC) oraz BB (TT/CC). Przy założeniu, że SNP zostały pierwotnie zdeponowane u bydła mięsnego w orientacji rs41960583 - rs41960582, wykazano, że dla bydła mlecznego istnieje tylko zmienność w rs41960583 przy całkowitym monomorfizmie rs41960582. W badanej populacji najczęściej występował genotyp AB (52% populacji), następnie AA (35%; trawienie tylko w jednym miejscu – kontrola wewnętrzna reakcji) i mniej licznie genotyp BB (13%; trawienie zarówno kontroli wewnętrznej jak i badanego miejsca polimorficznego). Do momentu prezentacji wyników w pracy [H3], w dostępnym piśmiennictwie jedyną opisaną mutacją w *IGF1R* była to miejsce polimorficzne *IGF1R/TaqI* u *Bos indicus* (Moody i in. 1996), analizowane następnie w nielicznych badaniach asocjacyjnych dotyczących użyteczności mięsnej (Curi i in., 2005; Akis i in. 2010). W pracy [H3] podjęto pierwszą próbę usystematyzowania wiedzy z tego zakresu. Za pomocą Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) porównywano sekwencje ówczesnie dostępnych fragmentów genu *IGF1R* z sekwencjami starterowymi Moody i in. (1996). Wykazano, że miejsce polimorficzne specyficzne dla *Bos indicus* zlokalizowane jest w intronie 12. W związku z narastającą liczbą nowo odkrywanych i deponowanych mutacji, generujących podobne nazewnictwo, zaproponowano rozszerzoną nomenklaturę badanych miejsc polimorficznych. I tak, miejscu polimorficznemu *Bos indicus*, opisanemu uprzednio w piśmiennictwie, przypisano oznaczenie *IGF1R/i12/TaqI*, zaś w pracy [H3] zaprezentowano zupełnie nowy i po raz pierwszy dla *Bos taurus* układ *IGF1R/i16/TaqI*.

Analiza statystyczna związku pomiędzy genotypami *IGF1R/i16/TaqI* a cechami użyteczności mlecznej wykazała jedynie istotne różnice w wydajności mleka i zawartości białka w mleku. W badanej populacji osobniki o genotypie BB syntetyzowały więcej mleka (+402 kg) niż osobniki o genotypie AA ($P \leq 0,05$). Natomiast mleko krów o genotypach AA i AB charakteryzowało się większą zawartością białka niż mleko pochodzące od krów z genotypem BB ($P \leq 0,05$). Jak dotąd w dostępnym piśmiennictwie brakuje prac z tego zakresu, dlatego niemożliwe jest porównanie uzyskanych wyników z badaniami innych autorów.

Wysokie frekwencje genotypów obu badanych w pracy [H3] układów polimorficznych umożliwiły dokonanie analizy asocjacyjnej ich kombinacji jako układu genotypów kombinowanych *IGF1R/i16/TaqI* x *IGF1/SnaBI*. Wyniki potwierdziły wstępne obserwacje, ponieważ kombinacja BB/AB(CT) (9% badanej populacji) determinowała istotnie ($P \leq 0,05$) większą wydajność mleka (+ 700 ÷ 1100 kg w porównaniu do pozostałych kombinacji) i tłuszczu (+54 kg i +34 kg, odpowiednio w porównaniu do BB/AA(TT) i AB/AB(CT)). W przypadku wydajności białka nie stwierdzono istotnych różnic. Średnia zawartość tłuszczu w mleku była największa w przypadku osobników o kombinacji AB/AA(TT) i istotnie różniła się od potencjalnie najgorszej kombinacji – AB/AB(CT) ($P \leq 0,05$). Natomiast krowy o genotypach kombinowanych BB/AB(CT) odznaczały się najmniejszą procentową zawartością białka w mleku w porównaniu do osobników o kombinacjach AA/BB(CC) i AB/AA(TT) ($P \leq 0,05$). Również i w tym przypadku nie znaleziono danych na temat analizy omawianego

polimorfizmu w odniesieniu do cech użytkowości mlecznej, dlatego też uzyskane wyniki w przyszłości wymagają weryfikacji poprzez włączenie do analizy innych stad bydła mlecznego.

[H4] Praca opisuje dwa miejsca polimorficzne w części kodującej genu receptora dla insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (*IGF1R*), zlokalizowane w eksonie 2, który wraz z eksonami 3 ÷ 6 koduje zewnątrzkomórkową część receptora formującą potencjalną kieszeń wiązania cząsteczki IGF-I. Do wykrycia zmienności u czterech ras bydła mlecznego (PHF, HF, MO i JE; łącznie przebadano 1169 osobników) ze względu na brak komercyjnych enzymów restrykcyjnych zdolnych do rozpoznawania obu SNP zastosowano dwuetapową metodykę własną, przy czym w pierwszym etapie (metoda: nested PCR) sekwencję eksonu 2 *IGF1R* podzielono na pół i amplifikowano jako oddzielne produkty-matryce dla drugiego etapu (metoda ACRS).

Pierwszym SNP było rs134868883 (Chr21:g.8020131T>C) zlokalizowane na samym początku eksonu 2 w trzeciej literze kodonu dla cysteiny C3 w domenie L1 receptora (cicha mutacja). Wprowadzono sztuczne miejsce cięcia dla enzymu restrykcyjnego *MspI* (układ *IGF1R/e2/MspI*). Niezależnie od rasy, genotyp *CC* występował najrzadziej (2% dla PHF, 6% MO i 9% JE i HF). Wśród osobników rasy PHF najliczniej występowały zwierzęta o genotypie heterozygotycznym (64%), natomiast u pozostałych ras dominował genotyp *TT* (49 ÷ 55%). Zbliżone frekwencje genotypów wynoszące 0,51 dla *TT*, 0,4 dla *CT* oraz 0,09 dla najrzadszego genotypu *CC* – uzyskano w grupie krów rasy SM, w pracy (A14).

Analiza statystyczna uzyskanych wyników pozwoliła na stwierdzenie, że krowy ras: PHF, HF i MO o genotypie *TT* w większości przypadków (niezależnie od laktacji) osiągały większą wydajność mleka oraz tłuszczu i białka w mleku niż osobniki z genotypem *CC* (najczęściej na poziomie $P \leq 0,01$). Osobniki heterozygotyczne cechowały się niemal zawsze średnimi wartościami tych cech. Największe różnice pomiędzy skrajnymi genotypami, a cechami użytkowości mlecznej odnotowano w odniesieniu do krów rasy PHF. W pierwszej laktacji w przypadku wydajności mlecznej różnice wynosiły 2550 kg, w kolejnych laktacjach odpowiednio: 2118 kg i 2195 kg, natomiast dla wydajności tłuszczu odpowiednio 93,3 kg, 80,2 kg i 80,7 kg a dla wydajności białka: 78,8 kg, 63,6 kg i 65,2 kg.

Mniejsze zróżnicowanie zaobserwowano u rasy HF, gdzie różnica w wydajności mleka kształtowała się odpowiednio na poziomie 2086 kg dla pierwszej laktacji, natomiast w dalszych laktacjach obniżyła się niemal o połowę (1240 kg i 1204 kg). Różnica w wydajności tłuszczu w pierwszej laktacji to 78,9 kg, w kolejnej 50,2 kg i trzeciej 33,3 kg (w ostatnim przypadku nie były to statystycznie istotne różnice). Ponadto stwierdzono również najwyższą różnicę w wydajności białka (69,0 kg) w pierwszej laktacji, natomiast w kolejnych różnica utrzymywała się na poziomie $40 \text{ kg} \pm 0,5 \text{ kg}$.

W przypadku rasy MO różnice w wydajności mleka w trzech laktacjach wynosiły odpowiednio: 1188 kg, 729 kg, 958 kg. Pomimo znacznych różnic w wydajności, nie odnotowano statystycznych istotnych różnic w zawartości tłuszczu i białka w mleku. Z każdą kolejną laktacją zacieśniały się różnice

pomiędzy wydajnością mleka, tłuszczu i białka krów o genotypie *CT* i *TT*. Nadal jednak odnotowano istotne różnice pomiędzy wydajnością krów o potencjalnie gorszym genotypie *CC* a w/w faworyzowanymi genotypami.

W przypadku krów rasy JE utrzymywała się podobna tendencja, choć różnice były statystycznie istotne tylko w laktacji pierwszej (± 950 kg mleka, 37,7 kg tłuszczu i 34,4 kg białka). Potwierdzeniem w/w obserwacji mogą być najnowsze wyniki uzyskane w pracy (A14) dla rasy SM. Osobniki o genotypie *TT* w trzech kolejnych laktacjach dawały istotnie więcej mleka oraz białka (w dwóch pierwszych laktacjach) w porównaniu do osobników o genotypie *CC*. Prezentowany układ polimorficzny nie miał większego wpływu na wydajność tłuszczu w mleku krów rasy SM.

Drugim badaniem w pracy [H4] SNP była mutacja rs207542405 (Chr21:g.8020617G>A) zlokalizowana w dystalnej części eksonu 2 *BIGF1R* w trzeciej literze kodonu dla treoniny T165, wchodzącej w skład domeny bogatej w cysteiny dojrzałego łańcucha receptora. W przypadku tego układu polimorficznego wprowadzono sztuczne miejsce cięcia dla enzymu restrykcyjnego *TaqI* (układ *IGF1R/e2/TaqI*). W trzech badanych populacjach krów dominował genotyp *GG*, stanowiący 84% krów PHF, 72% HF i 53% MO. Natomiast w populacji JE liczebność osobników o genotypie *AG* i *GG* była zbliżona (stanowiły odpowiednio 45% i 41% populacji). Frekwencja genotypu *AA* była zazwyczaj najniższa ($0,03 \div 0,13$), za wyjątkiem krów HF, gdzie heterozygoty stanowiły jedynie 13%. W innych badaniach, w stadzie krów rasy SM genotyp *GG* również występował najczęściej (48% badanej populacji) przy stosunkowo wysokiej frekwencji genotypu *AA* – 0,15 (A14).

Analiza związku pomiędzy genotypami *IGF1R/e2/TaqI* a wydajnością mleka, tłuszczu i białka wykazała, że niezależnie od laktacji krowy o genotypie *GG* (PHF, MO i JE) lub o heterozygotycznym genotypie *AG* (HF) cechowały się największymi wartościami analizowanych cech, w porównaniu do krów o genotypie *AA*. W trzech kolejnych laktacjach wydajność mleka krów o genotypie *AA* była istotnie niższa o ok. 1300 \div 1400 kg u rasy PHF, 500 \div 800 kg u MO oraz 1000 \div 2000 kg w przypadku rasy HF. Wyjątek stanowiły jerseye, wśród których osobniki heterozygotyczne w dwóch pierwszych laktacjach dawały najmniej mleka (odpowiednio 822 i 382 kg). W trzeciej laktacji w tej grupie zwierząt odnotowano podobną zależność jak u pozostałych ras (uzyskano średnio 785 kg mniej mleka od krów o genotypie *AA*).

W przypadku wydajności tłuszczu, w pierwszej (PHF, MO i JE) i drugiej (MO i JE) laktacji to heterozygoty cechowały się najgorszymi parametrami w porównaniu z osobnikami o genotypie *GG* (różnice istotne; 21,9 \div 42,1 kg). Odmienny wynik uzyskano u krów HF, gdzie w pierwszej i drugiej laktacji heterozygoty syntetyzowały istotnie więcej tłuszczu (32,4 \div 68,5 kg) niż osobniki o genotypie *AA*. W trzeciej laktacji, już niezależnie od rasy, największe różnice odnotowano pomiędzy osobnikami *AA* (najniższa wydajność) i *GG*.

Analizując wydajność białka w mleku uchwycono analogiczne zależności do uprzednio opisanych przy wydajności mleka. Mianowicie, w każdej laktacji osobniki o genotypie *GG* charakteryzowały się największą wydajnością białka, a osobniki *AA* najmniejszą u rasy PHF (różnice na

poziomie 37,1÷46,2 kg) i u MO (12,4÷35,9 kg). Osobniki heterozygotyczne rasy JE (w pierwszej i drugiej laktacji) oraz homozygoty AA (w trzeciej) syntetyzowały najmniej białka w mleku w porównaniu do faworyzowanych osobników o genotypie GG (różnice odpowiednio 25 kg, 13,1 kg i nieistotna statystycznie różnica 21,6 kg w trzeciej laktacji). Natomiast osobniki heterozygotyczne rasy HF syntetyzowały istotnie więcej białka w mleku niż osobniki z genotypem AA, przy czym różnice kształtowały się odpowiednio w kolejnych laktacjach na poziomie 65,5 kg, 27,1 kg i 24,3 kg. W pracy (A14) potwierdzono opisane powyżej obserwacje, ponieważ krowy rasy SM o genotypie GG syntetyzowały istotnie więcej mleka, tłuszczu i białka w porównaniu do osobników o genotypie AA.

W pracy [H4] wykonano również analizę genotypów kombinowanych obu układów polimorficznych jako *IGF1R/e2/MspI* x *IGF1R/e2/TaqI*. Analiza potwierdziła spostrzeżenia, że w sytuacji gdy u krowy występuje kombinacja genotypów potencjalnie preferowanych w badaniach indywidualnych (*TT/GG*) lub jako układ mieszany z heterozygotami (*TT/AG* i *CT/GG*), to niezależnie od rasy i kolejności laktacji cechowały się one największą wydajnością mleka, tłuszczu i białka w porównaniu do osobników o najmniej preferowanej kombinacji *CC/AA* (lub w układzie z heterozygotami), a przy braku takich grup doświadczalnych (lub ze względu na niskie liczebnie grupy), z kombinacją heterozygot (*CT/AG*), która charakteryzowała się zazwyczaj pośrednimi wartościami analizowanych cech. Co więcej, w pracy (A14) również preferuje się układ *TT/GG*, uzyskując dla rasy SM zależności niemal identyczne jak w pracy [H4] dla ras PHF, MO, JE i HF.

Praca [H4] jest jedną z pierwszych prac badawczych odnoszących się do relacji między wariantami genetycznymi polimorfizmów: *IGF1R/e2/MspI* oraz *IGF1R/e2/TaqI*, a cechami użyteczności mlecznej bydła, przez co niemożliwe jest więc skonfrontowanie uzyskanych w pracy wyników z badaniami innych autorów.

[H5] Ostatnia praca z prezentowanego cyklu publikacji powiązanych tematycznie obejmuje kolejne dwa miejsca polimorficzne w części kodującej genu *IGF1R*. Analogicznie do pracy [H4], szacowano zmienność genetyczną zbliżonej liczebnie populacji 1167 osobników czterech ras bydła mlecznego (PHF, HF, MO i JE). Dla pierwszego układu zastosowano dwuetapową metodykę własną (nested PCR z następującą po niej ACRS) natomiast dla kolejnego klasyczną metodę PCR-RFLP z zastosowaniem autorskich sekwencji starterowych.

Pierwsze badane SNP to rs210778604 (Chr21:g.8231709C>T) zlokalizowane w eksonie 10. Jest to cicha mutacja w trzeciej literze kodonu dla kwasu asparaginowego D645 w domenie fibronektyn typu III, tj. ostatniego fragmentu podjednostki α dojrzałego receptora IGF-IR. Wprowadzono sztuczne miejsce cięcia dla enzymu restrykcyjnego *MspI* (dla jednoznacznego odróżnienia SNP z pracy [H4] w [H5] układ opisywany jest jako *IGF1R/e10/MspI*).

Genotyp *CC* występował najczęściej w populacji krów JE (67%), następnie PHF (45%) i MO (40,1%). W stadzie HF dominowały heterozygoty (~ 64%). Genotyp *TT* charakteryzował się najniższą częstością występowania, w przedziale od 0,08 (JE) do 0,26 (MO). W innych badaniach (A14),

frekwencje genotypów w populacji krów rasy SM były zbliżone do JE: 0,66 dla genotypu *CC*, 0,22 dla *CT* i 0,12 dla *TT*.

Analiza związku pomiędzy genotypami *IGF1R/e10/MspI* a wydajnością mleka, tłuszczu i białka wykazała pewną tendencję w kształtowaniu się wartości średnich rozpatrywanych cech. Niezależnie od rasy i laktacji (z nielicznymi wyjątkami), genotyp *TT* warunkował najwyższą wydajność mleka, tłuszczu i białka w porównaniu do potencjalnie najgorszego genotypu *CC*. Heterozygoty cechowały się zazwyczaj pośrednimi wartościami analizowanych cech.

W przypadku ras wysokowydajnych (PHF, HF), różnice w średnich wydajności mleka osiągały poziomy rzędu 1500 ÷ 2700 kg mleka / laktację. Niższe choć również istotne różnice w wydajności mleka odnotowano dla ras MO i JE (500 ÷ 900 kg mleka/laktację).

Różnice w wydajności tłuszczu w mleku krów ras PHF i HF były widoczne na przestrzeni wszystkich analizowanych laktacji (rzędu 48,0 ÷ 65,8 kg dla PHF i 69,3 ÷ 99,1 kg dla HF na korzyść preferowanego genotypu *TT*). Dla rasy JE różnice w wydajności tłuszczu pomiędzy wspomnianymi genotypami zarysowały się dopiero w drugiej i trzeciej laktacji (na poziomie odpowiednio 39,6 i 52,1 kg). Dla rasy MO istotne różnice w wydajności tłuszczu odnotowano tylko dla trzeciej laktacji i to na stosunkowo niskim poziomie.

Na przestrzeni trzech laktacji, różnica w wydajności białka pomiędzy osobnikami o genotypie *TT* i *CC* kształtowała się analogicznie do różnicy w wydajności tłuszczu: 48,3 ÷ 63,9 kg dla PHF, 68,0 ÷ 97,5 kg dla HF oraz 16,6 ÷ 42,7 kg dla JE. Dla krów rasy MO również odnotowano istotne różnice w wydajności białka, choć utrzymywały się one na niskim poziomie (15 ± 1 kg / laktację).

Uchwyconej w pracy [H5] tendencji dla układu doświadczalnego *IGF1R/e10/MspI* nie potwierdzają wyniki uzyskane w pracy (A14), gdzie w pierwszej laktacji krowy rasy SM o potencjalnie najgorszym genotypie *CC* dawały więcej mleka ($P \leq 0,05$), tłuszczu ($P \leq 0,05$) i białka ($P \leq 0,01$) niż preferowane w pracy [H5] osobniki o genotypie *TT*. Jednakże, w kolejnych laktacjach różnice pomiędzy osobnikami o różnych genotypach zacierają się i nie odnotowano już istotnych statystycznie różnic w wydajności oraz zawartości tłuszczu i białka w mleku. Brak innych prac z tego zakresu nie pozwala skonfrontować uzyskanych wyników. Trzeci układ polimorficzny o zbliżonym oznaczeniu, *IGF1R/e12/MspI* w eksonie 12, opisany i analizowany w pracy (A12), stanowi całkowicie odmienny temat badawczy niż *IGF1R/e2/MspI* w [H4] i *IGF1R/e10/MspI* w [H5] i nie może stanowić podstawy do porównań.

Drugim analizowanym w pracy [H5] miejscem polimorficznym było rs208140993 (Chr21:g.8246309C>T) zlokalizowane w eksonie 16. Pokrywa się ono bezpośrednio z sekwencją rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny *RsaI* (układ *IGF1R/e16/RsaI*). Jest to mutacja cicha, która dotyczy trzeciej litery kodonu dla tyrozyny Y957 w wewnątrzkomórkowej podjednostce β dojrzałej cząsteczki receptora w domenie katalitycznej receptora. Wśród osobników ras: PHF, MO i HF najczęściej występowały heterozygoty *CT*, natomiast w stadzie JE nielicznie występowały osobniki o genotypie *TT* (6%), a niemal połowę populacji stanowiły osobniki o genotypie *CC*, który był

najrzadszym genotypem w przypadku pozostałych ras ($16 \div 21\%$). Niezależne badania w pracy (A14) wykazały, że w populacji krów SM heterozygoty również występowały najczęściej (58%), najrzadziej natomiast homozygoty *TT* (18%).

Analiza związku pomiędzy genotypami *IGF1R/e16/RsaI* a cechami mleczości wykazała analogiczne zależności jak w przypadku układu *IGF1R/e10/MspI*. Niezależnie od rasy i laktacji, genotyp *TT* warunkował najwyższą wydajność mleka, tłuszczu i białka w porównaniu do potencjalnie najgorszego genotypu *CC*, zaś osobniki heterozygotyczne charakteryzowały się pośrednimi wartościami tych cech. Jedyne wyjątkiem stanowiła rasa JE, u której wydajność tłuszczu i białka w mleku krów heterozygotycznych była największa. Osobniki o genotypie *TT* pod względem analizowanych cech w niewielkim stopniu im ustępowały (genotyp *CC* nadal warunkował najgorsze wydajności).

Wśród analizowanych ras, istotne różnice w wydajności mleka pomiędzy potencjalnie preferowanymi osobnikami o genotypie *TT* a potencjalnie najgorszymi o genotypie *CC* kształtowały się od pierwszej do trzeciej laktacji na poziomie $1510 \div 1914$ kg dla PHF, $1508 \div 2513$ kg dla HF oraz $698 \div 1018$ kg dla MO. Różnice w wydajności tłuszczu zarysowywały się na poziomie $48,2 \div 52,0$ kg dla PHF, $42,9 \div 94,8$ kg dla HF, $26,1 \div 39,3$ kg dla MO, natomiast w wydajności białka wynosiły odpowiednio: $46,5 \div 49,5$ kg dla PHF, $46,8 \div 86,1$ kg dla HF oraz $20,0 \div 36,7$ kg dla MO. Pomimo znacznych różnic pomiędzy średnimi wartościami analizowanych cech w przypadku obu polimorfizmów badanych w pracy [H5] różnice w zawartości tłuszczu i białka w przewodzie były statystycznie nieistotne. W dostępnych danych literaturowych z zakresu analizowanych miejsc polimorficznych w odniesieniu do cech użyteczności mlecznej nie znaleziono wyników dotyczących bydła w/w ras. Jedynymi badaniami z tego zakresu, ale dotyczącymi bydła rasy SM są wyniki opublikowane w pracy (A14). Autorka stwierdza, że osobniki o genotypie *CC* cechują się korzystniejszymi wartościami badanych cech. Jednocześnie podaje, że różnice pomiędzy genotypami były niewielkie i dotyczyły głównie laktacji pierwszej ($P \leq 0,01$), następnie zmniejszały się ($P \leq 0,05$) lub przestawały być statystycznie istotne w kolejnych laktacjach (analogicznie do krów rasy JE w pracy [H5]).

Dodatkowo wykonano analizę genotypów kombinowanych obu badanych układów polimorficznych jako kombinacja *IGF1R/e10/MspI* x *IGF1R/e16/RsaI*. Uzyskane wyniki pozwoliły, w sposób powtarzalny spośród osobników analizowanych ras na utworzenie trzech grup różniących się cechami mleczości. Grupę pierwszą, potencjalnie najgorszą, stanowiły przede wszystkim osobniki o kombinacji *CC/CC* oraz kombinacja genotypu *CC* w konfiguracji z genotypem heterozygotycznym (*CT/CC* i *CC/CT*). Grupę pośrednią (tj. o przeciętnych cechach mleczości) w większości stanowiły osobniki heterozygotyczne (*CT/CT*) i sporadycznie występujące kombinacje przeciwstawnych genotypów (*CC/TT* oraz *TT/CC*). Grupa trzecia stanowiła najlepszą populację krów, na którą składały się osobniki o kombinacji *TT/TT* (najlepszej niemal pod każdym względem) oraz kombinacja genotypu *TT* w konfiguracji z genotypem heterozygotycznym (*TT/CT* oraz *CT/TT*). Największe istotne różnice w wydajności mleka zaobserwowano pomiędzy kombinacjami *TT/TT* a *CC/CC*: od 2000 kg (MO) do 3000

kg mleka (PHF, HF) za laktację ($P \leq 0,01$). W przypadku wydajności tłuszczu i białka jednoznacznie nie można było określić wspólnej dla ras kombinacji. Jakkolwiek, największe istotne różnice odnotowano pomiędzy poszczególnymi kombinacjami z preferowanej grupy trzeciej a najgorszą kombinacją CC/CC (rzędu $80 \div 130$ kg tłuszczu i $50 \div 100$ kg białka na laktację, $P \leq 0,01$). Pomimo tak dużych różnic nie wykazano negatywnego wpływu na zawartość tłuszczu i białka w mleku. W przypadku rasy JE niskie liczebności w grupie trzeciej (TT/TT n=2, TT/CT n=5 i CT/TT n=3) nie pozwoliły na weryfikację powyższych obserwacji. Równie niskie liczebności kombinacji zawierających jako składową genotyp TT mogły być przyczyną niejednoznacznych rezultatów analizy kombinacji w pracy (A14) dla rasy SM. W tym stadzie o dość przeciętnej wydajności, zdecydowanie dominowały kombinacje zawierające najmniej preferowany z punktu widzenia pracy [H5] genotyp CC, a różnice statystycznie istotne odnotowane w pierwszej laktacji zacierają się w kolejnych laktacjach.

Prezentacja wyników w dwóch odrębnych manuskryptach [H4 i H5] uniemożliwiła ocenę związku pomiędzy jednoczesnym występowaniem czterech wybranych wariantów polimorficznych genu *IGF1R* w formie genotypów kombinowanych, a docelowo jako preferowanych w selekcji haplotypów. Namiastką tego typu działań była próba uchwycenia w/w zależności w kombinacji tych czterech SNP dla rasy SM (praca A14). Niestety, ze względu na niskie liczebności w grupach ($n < 10$) lub brak istotnych dla porównania grup sprawiło, że wyniki mogą wydawać się zależne od danej laktacji. Jakkolwiek, potwierdzono znaczenie genotypów TT/GG w analizowanych dwóch miejscach polimorficznych w eksonie 2 (praca H4).

Analiza uzyskanych wyników oraz ich ewentualne wykorzystanie

W hodowli zwierząt gospodarskich szczególną rolę odgrywa poznanie podłoża molekularnego zmienności cech produkcyjnych. Z uwagi na fakt, iż procesy z tym związane kontrolowane są poligenowo, masowo pojawiają się informacje o nowych regionach QTL dla danych cech. Liczba rekordów w bazie poświęconej tylko *Bos taurus* osiągnęła niebagatelny poziom 81 652 QTL dla 519 różnych cech użytkowych (Cattle QTLdb aktualizacja z dnia 29 sierpnia 2016 r. (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>), z czego dla cech mleczności wyodrębnić można aż 8455 QTL dotyczących wydajności i składu frakcji tłuszczowej, 3914 wydajności i składu frakcji białkowych oraz 1834 wydajności mlecznej. Jednakże konfrontacja tych przytoczonych liczb popartych lawinowo rosnącą liczbą badań typu GWAS z rzeczywistą liczbą zidentyfikowanych i zwalidowanych mutacji *stricto* odpowiedzialnych za obserwowaną zmienność i mogących wywołać istotny i powtarzalny efekt fenotypowy (tzw. QTN, ang. quantitative trait nucleotide), sugeruje, że jesteśmy nadal na początku drogi poznania organizacji i funkcjonowania genomów, którą zajmuje się genomika. Dopiero połączenie genomiki strukturalnej (lokalizacja genów, ich budowa i zmienność) z genomiką funkcjonalną (głównie ekspresja genów) w połączeniu ze znajomością procesów biochemicznych zwiększa szansę na identyfikację SNP będącą właściwym QTN.

Wiadomym jest, że po podaniu w iniekcji egzogennej GH, obok genów białek mleka i kontrolujących syntezę lipidów, geny kodujące niemal wszystkie elementy osi somatotropowej ulegają ekspresji w gruczole mlecznym (McCoard i in. 2016). Jakkolwiek, szlak GH/GHR/IGF-I/IGF-IR ulega natywnie ekspresji podczas każdego etapu laktacji (Yonekura i in. 2015). W momencie podjęcia prezentowanego tematu, ówczesne prace asocjacyjne skupiały się zazwyczaj na trzech głównych genach osi somatotropowej: *GH*, *GHR* oraz *STAT5*, które zostały już dobrze scharakteryzowane i opisane u bydła. Uzyskane informacje przyczyniły się do poznania pierwszego etapu skomplikowanych kaskad sygnałowych.

W obrębie pierwszej kaskady sygnałowej, pomimo niewątpliwie ogromnego znaczenia w/w genów, gen *JAK2* był i nadal jest niedostatecznie poznany u bydła. W gruczole mlecznym poziom ekspresji mRNA dla *GHR*, *JAK2* i *STAT5* istotnie wzrasta już na wczesnym etapie laktacji, utrzymuje się na najwyższym poziomie w środkowym stadium laktacji i istotnie obniża się podczas późnej laktacji, co może wskazywać na pośredni (synergistycznie ze szlakiem prolaktyny) lub bezpośredni udział hormonu wzrostu w regulacji syntezy mleka (Yonekura i in., 2015). Wspólnym elementem dla obu szlaków jest układ *JAK2/STAT5* i kompleksowy system unikalnych fosforylacji tyrozyn. W dojrzałej cząsteczce wszystkich domen bydłowego *JAK2* wyróżnić można 49 tyrozyn (wg: TPA: *Bos taurus* Janus kinase 2 Acc. No. DAA26915), z czego aktywność około 20 zbadano dotychczas (szerzej opisano w pracy [H1]). Niezależnie od gatunku wykazano, że pętlę aktywacyjną stanowi tandem tyrozyn Y1007/Y1008 w domenie kinazy tyrozynowej (JH1) (McDoom i in. 2008). Wykazano m.in., że fosforylacja Y813 również w domenie JH1 wzmacnia aktywność *JAK2* i *STAT5* w odpowiedzi na GH (Kurzer i in. 2004), a nawet niewielkie zmiany w pobliżu tej lub innych istotnych tyrozyn mogą mieć wpływ na konformację *JAK2* i osiągnięcie jej maksymalnej aktywności (Argetsinger i in. 2010). Z uwagi na fakt, iż badany w pracy [H1] polimorfizm rs110298451 dotyczy trzeciej litery kodonu dla lizyny K912, nie powoduje to ostatecznie zmiany aminokwasu sąsiadującego bezpośrednio z inną kluczową tyrozyną Y913, dla której przypisuje się raczej rolę inhibitora aktywności *JAK2* (Funakoshi-Tago i in. 2008). Pomimo tego, niezależnie od rasy i kolejności laktacji, w pracy [H1] uchwycono potencjalny związek pomiędzy genotypami układu *JAK2/e20/RsaI* a cechami mleczości, gdzie obecność nawet jednej kopii allelu *JAK2^G* warunkowała większą wydajność mleka, tłuszczu i białka w porównaniu z osobnikami o potencjalnie najgorszym genotypie AA. Brak innych badań asocjacyjnych uniemożliwia realną ocenę uchwyconej tendencji, a stanowi jedynie podwalinę dla przyszłych badań z tego zakresu. Badania należy poszerzyć o inne miejsca polimorficzne w genie *JAK2* wymienionych szczegółowo w pracy [H1] jak również stale nowo odkrywane w tym jak i innych sąsiednich genach kandydujących. Ze względu na kluczowe znaczenie *JAK2* w przekazywaniu sygnału min. dwóch laktogennych hormonów (prolaktyny i hormonu wzrostu), można zaliczyć gen *JAK2* do genów kandydujących w odniesieniu do cech mleczości bydła.

W przypadku drugiego etapu kaskady sygnałowej (systemu IGF) w dostępnym piśmiennictwie dobrze opisano jedynie budowę i funkcję IGF-I wraz z wybranymi białkami wiążącymi. Geny *IGF1* i

jego receptora (*IGF1R*) wydają się być konserwatywne nie tylko w obrębie ras, ale również pomiędzy gatunkami zwierząt. Związane jest to prawdopodobnie z ich istotną rolą w życiu osobniczym. Przejawia się to m.in. sporadycznym występowaniem mutacji typu *missense* lub ograniczeniem występowania tego typu mutacji do pojedynczych ras bydła. Poziom ekspresji mRNA *IGF1R* w gruczole mlecznym krów wydaje się być podobny do prolaktyny (choć na istotnie niższym poziomie), przy czym istnieją pewne rozbieżności pomiędzy uzyskanymi wynikami. W jednych badaniach jest najwyższy we wczesnej laktacji, a następnie stopniowo nieznacznie obniża się do końca laktacji (Yonekura i in. 2015), zaś w innych jest wysoki i stały podczas całej laktacji, a nawet istotnie wzrasta podczas inwolucji (Plath-Gabler i in. 2001). Sugeruje to bezpośredni udział endokrynnego IGF-I w kontroli procesu laktacji mediowanej przez lokalnie syntetyzowany receptor. W przypadku bydłowego genu *IGF1R* prace asocjacyjne, jak również dotyczące jego struktury i kodowanego białka, praktycznie nie istniały w momencie podjęcia prezentowanych badań. Co więcej, zdecydowana większość zdeponowanych miejsc polimorficznych posiadała i nadal posiada status niezwalidowanych przez niezależne zespoły badawcze. Z tego powodu w cyklu publikacji powiązanych tematycznie główny nacisk położono właśnie na tym genie. Potwierdzono tym samym istnienie wielu miejsc polimorficznych, wykryto szereg nowych SNP oraz częściowo przyczyniono się do ustalenia sekwencji mRNA *IGF1R* (nr dostępu NM_001244612) oraz sekwencji niekodujących (w tym początkowego fragmentu intronu 2 w sekwencji HM988958, która jest niezdefiniowana w sekwencji chromosomu 21 UMD_3.1.1., a obecna w Btau_5.0.1.1). W badaniach wstępnych, spośród wielu zidentyfikowanych u lokalnych ras miejsc polimorficznych wytypowano cztery o szacunkowo największym potencjale diagnostycznym (prace [H4] i [H5]).

W pracy [H4] zainteresowanie skupiono na domenach IGF-IR bezpośrednio wiążących IGF-I. Oba miejsca polimorficzne to mutacje ciche, więc finalnie nie zmieniające sekwencji aminokwasów dojrzałego białka. Układ *IGF1R/e2/MspI* dotyczy cysteiny w pozycji C3, która jest zdolna do tworzenia mostka dwusiarczkowego z cysteiną w pozycji C22, co ma istotny wpływ na konformację białka i tworzenie przyszłej kieszeni wiążącej IGF-I. Z tego też względu natywna zmiana cysteiny C3 na inny aminokwas jest raczej niemożliwa, ponieważ skutkowałoby to poważnymi konsekwencjami w aktywność receptora. Łańcuch α dojrzałej cząsteczki IGF-IR zawiera 38 cystein, ale tylko kilka z nich zdolnych jest do tworzenia mostków dwusiarczkowych (jak np. cysteiny zlokalizowane na początku i końcu domen L1 i L2). Większość cystein umiejscowiona jest jednak w tzw. domenie bogatej w cysteiny (CR, ang. cysteine-rich) (Ward i in. 2001). W domenie CR zlokalizowana jest treonina T165, której kodon był przedmiotem badań w postaci układu *IGF1R/e2/TaqI*. Cały obszar domen L1 – CR – L2 dzieli się na 8 modułów, które stanowią rodzaj kompleksu „załamań”, przy czym moduł M1 (na obszarze granicznym L1/CR, którą buduje m.in. istotna dla pracy [H4] treonina T165) stanowi „zawias” dla swobodnie poruszającej się domeny L1, która zamyka od zewnątrz związany ligand. Natomiast M2 ÷ M8 tworzą stopniowe zakrzywienie całej domeny CR aż do początku domeny L2. W ten sposób tworzy się najprawdopodobniej „kieszonka” dla IGF-I. Zgodnie z badaniami Keyhanfar i in. (2007), domena C IGF-I wchodzi w interakcję z fenyloalaninami F241 (moduł M5) oraz F251 i F266 (moduł

M6) domeny CR IGF-IR. Tylko odpowiednia konformacja naładowanej ujemnie domeny CR IGF-IR i elektrododatnich domen C i D w cząsteczce IGF-I umożliwia najprawdopodobniej wiązanie, a w konsekwencji powstanie impulsu sygnałowego (Lou i in. 2006). Z tego powodu, zmiana nawet pojedynczego aminokwasu domeny CR może upośledzić jak nie uniemożliwić wiązanie IGF-I, stąd nie ma jak dotąd potwierdzonych mutacji typu *missense* w eksonach 2 ÷ 6 *bIGF1R*. Pomimo cichych podstawień nukleotydów, w pracy [H4] odnotowano wysoce istotne różnice w wydajności krów czterech ras w zależności od układu genotypów obu SNP w eksonie 2 (preferowany układ *TT/GG*, najgorszy *CC/AA*), co dodatkowo potwierdziły badania dla piątej rasy (A14). Przedstawione wyniki wskazują na możliwe wykorzystanie analizowanych polimorfizmów w *bIGF1R* w doskonaleniu cech użytkowych bydła, ale pod warunkiem przeprowadzenia jeszcze wielu badań w oparciu o liczniejsze i składające się z różnych ras bydła populacje co pozwoli zweryfikować uzyskane wyniki.

Dalsze przekazywanie sygnałów przez końcową część podjednostki α połączonej z zewnątrzkomórkową częścią podjednostki β IGF-IR nie jest jeszcze dostatecznie poznane. Na bazie analogii z IR (receptor insuliny), w nieaktywnym dimerze receptora cała zewnątrzkomórkowa część składa się w formę odwróconej litery „V”, gdzie zgięciem (punktem szczytowym) są połączone domeny L2-fibronektyn Fn1 (autoinhibicja). Fibronektyny Fn2 i Fn3 stanowią części mocujące receptor w błonie komórkowej. Dopiero przyłączenie IGF-I może zmienić całą konformację i dać dalszy sygnał do wnętrza komórki (Kavran i in. 2014). W pracy [H5] metodyka *IGF1R/e10/MspI* umożliwiła ocenę wpływu zmienności w trzeciej litrze kodonu dla kwasu asparaginowego Asp645. Aminokwas ten wchodzi w skład domeny insercyjnej (ID) zlokalizowanej na końcu podjednostki α . Domena ID nie stanowi aktywnej części receptora, lecz pełni raczej funkcję strukturalno-organizacyjną. Zawiera miejsce przecięcia niedojrzałego pre-pro-receptora na dwie podjednostki, dzieli domenę fibronektyn Fn2 na dwie części, które zostają następnie lokowane w osobnych podjednostkach oraz finalnie stabilizuje dimer $\alpha_2\beta_2$ receptora poprzez trzy wiązania pomiędzy cysteinami obu ID w dimerze i jednym wiązaniem z Fn3 w podjednostce β . Zmiana nawet pojedynczego aminokwasu może zaburzyć proces dojrzewania receptora, konformację czy stabilność dimeru, co może doprowadzić do spadku jego aktywności.

Drugi analizowany w pracy [H5] polimorficzny układ *IGF1/e16/RsaI* dotyczy jednego z najistotniejszych aminokwasów domeny wewnątrzkomórkowej kinazy tyrozynowej: tyrozyny Y957. W aktywności receptora może brać udział łącznie 15 tyrozyn, z czego osiem (Y943, Y950, Y1131, Y1135, Y1136, Y1250, Y1251 i Y1316) zaklasyfikowano do tyrozyn „fizjologicznych”, o istotnym znaczeniu, zaś pozostałym siedmiu przypisuje się mniejsze znaczenie (analizowana w pracy Y957 oraz Y984, Y1060, Y1095, Y1162, Y1183 i Y 1221). Za pętle aktywacyjną uważa się tyrozyny Y1131, Y1135 i Y1136, natomiast sygnał przejmują dopiero kolejne tyrozyny oraz seryny (Kaushansky i in. 2008). Kluczową rolę przypisuje się także tyrozynie Y950 z sekwencją „NPXY” rozpoznawaną przed dwa podstawowe dla IGF-IR białka adaptorowe: IRS-1 i SHC (Riedemann i Macaulay 2006). Znaczenie tyrozyny Y957, leżącej tuż za Y950, pozostaje nadal nieznane.

Niezależnie od genotypów obu układów pozycje Asp645 i Tyr957 pozostają jednak niezmienione, więc zaobserwowany w pracy [H5] związek pomiędzy kombinacją obu potencjalnie preferowanych genotypów (*TT/TT*) a istotnie większą wydajnością mleka, tłuszczu i białka w porównaniu do osobników o kombinacji *CC/CC* ponownie należy tłumaczyć w inny sposób.

Pomimo uzyskania czasem rewelacyjnych na pierwszy rzut oka wyników w prezentowanym cyklu publikacji powiązanych tematycznie, nie można wyróżnić żadnego polimorfizmu jako typowego QTN. Jakkolwiek, w sytuacji z jaką mamy do czynienia w przypadku pięciu w/w układów polimorficznych, tj. jeżeli nie ma bezpośredniego związku pomiędzy zmianą zasad w mRNA a substytucją aminokwasu w pre-pro-białku (tzw. mutacje ciche, synonimiczne), nie można dosłownie mówić o „cichej” mutacji, czyli bez większego znaczenia diagnostycznego, czego dowodem są manuskrypty z ostatnich lat dotyczące związku pomiędzy mutacjami cichymi a procesami nowotworzenia (Gartner in. 2013; Supek i in. 2014; Zheng i in. 2014). Przyczyn uchwyconych w pracach [H1], [H4] i [H5] istotnych różnic w wydajności krów o różnych genotypach można upatrywać na kilku innych, często złożonych poziomach.

Mutacje ciche najczęściej lokalizuje się na krańcach eksonów (Majewski i Ott 2002). Podobnie jest w przypadku pięciu omawianych SNP, które położone są w odległości maksymalnie 30 ÷ 60 zasad od granic swoich eksonów. Spośród nich na początku eksonu lokalizują się układy polimorficzne *IGF1R/e2/MspI* (< 10 zasad) i *IGF1R/e16/RsaI* (< 6 zasad). Takie położenie może sugerować aktywny udział w procesie alternatywnego składania transkryptu pre-mRNA. Wyróżnić należy przy tym obecność w eksonach zarówno motywów wzmacniających (ESE, ang. exonic splicing enhancer) jak i wyciszających (ESS, ang. exonic splicing silencer) (Parmley i in. 2006), które w postaci heksametrów spotyka się zwykle na początku struktury genu (zwłaszcza eksony 1 ÷ 3) i na końcu genu, choć zdarzają się oczywiście wyjątki (Waldmar i in. 2011). Analogicznie obserwacje można przełożyć na wyniki uzyskane dla eksonu 2 (praca [H4]). Jakkolwiek, ze względu na istotną rolę eksonu 2 w kodowaniu domen wiążących IGF-I, zmiana składania mRNA typu dzikiego na zmutowany niosłaby poważne konsekwencje, nawet letalne, co raczej wyklucza tą przyczynę. Potwierdzeniem tych wniosków są dotychczasowe badania nad ludzkim IGF-IR, gdzie pomimo intensywnych wieloletnich badań znane są tylko dwa alternatywne warianty mRNA *hIGF1R*, różniące się tylko jednym kodonem na początku eksonu 14, niosące niewielką zmianę w kodowaniu zewnątrzkomórkowej części podjednostki β receptora (Vitale i in. 2006).

Z uwagi na fakt, iż *JAK2* i *IGF1R* ulegają ekspresji w gruczole mlecznym krów, ich poziom mRNA może zmieniać się nie tylko w zależności od stadium laktacji ale także może być zróżnicowany osobniczo. Spośród pięciu analizowanych cichych SNP, znane są tylko wyniki dotyczące poziomu mRNA w zależności od genotypów układu *JAK2/e20/RsaI* (rs110298451). Usman i in. (2015) wykazali, że poziom ekspresji *JAK2* u osobników o rzadszym dla bydła wysokomlecznego genotypie AA był przeszło dwukrotnie wyższy niż pozostałych osobników. Jest to zatem sprzeczne z uzyskanymi wynikami, gdzie to genotyp *GG* jest preferowany u wszystkich ras. Jakkolwiek, autorzy ci oparli

badania na całkowitym RNA izolowanym z krwi obwodowej a nie bezpośrednich elementów gruczołu mlecznego jak również nieznana jest stabilność takiego mRNA. Zgodnie z jedną z obowiązujących hipotez, ciche mutacje nie ewoluują w sposób neutralny, lecz ich selekcja w dużej mierze zależy od termodynamicznego poziomu stabilności struktury drugorzędowej nici mRNA (Chamary i Hurst 2005). Oczywiście efekt końcowy nie zależy tylko od jednej cichej mutacji, stąd rozbieżne wyniki dla *JAK2/e20/RsaI* należy traktować ostrożnie i poszerzyć analizę polimorfizmu bydłęcego genu *JAK2* o kolejne SNP jak to zainicjowano w przypadku *IGF1R*.

Cząsteczka mRNA nie występuje bowiem *in vivo* w formie „nagiej”, lecz niemal na każdym etapie swojego istnienia związana jest z kolejnymi białkami, począwszy od utworzenia czapeczki 5' tuż po transkrypcji, z innymi białkami podczas złożonego procesu składania i formowania struktury drugorzędowej nici mRNA następnie kolejne białka decydują o transporcie mRNA przez kanały jądrowe do cytoplazmy, gdzie mRNA bierze udział w procesie translacji (biosyntezie białka) przy udziale kompleksu kolejnych białek (Hieronymus i Silver 2004). Każde z tych białek swoiście rozpoznaje inne fragmenty mRNA, a tym samym nawet ciche zmiany w sekwencji mRNA (*vide* pięć badanych układów polimorficznych) mogą decydować o wydajności tworzenia tzw. kompleksów mRNP (ang. messenger ribonucleoprotein). Część z tych kompleksów mRNP oraz utworzona czapeczka chronią mRNA przed obecnymi w komórce nukleazami. W ten sposób zmienne powinowactwo białka do mRNA może z jednej strony decydować o większej lub mniejszej stabilności cząsteczki mRNA w komórce, co opisuje się jako okres półtrwania mRNA (w zależności od wielkości genu, wynoszący od 30 minut do 24 h) a z drugiej strony zmienia się ilość dostępnego mRNA, a tym samym siła ekspresji danego genu. Cząsteczka mRNA, pozbawiona takiej protekcji, jest stabilna jedynie przez około 2 minuty (Ross 1995; Guhaniyogi i Brewer 2001; Wu i Brewer 2012). Co więcej, cząsteczka mRNA nie występuje jako prosta nić, tylko tworzy drugorzędowe struktury przestrzenne (typu stem-loop), przez co zmiany jej konformacji w wyniku mutacji dodatkowo mogą wpływać na jej stabilność w komórce (Faure i in. 2016).

Mutacje synonimiczne mogą także wpływać na szeroko pojętą wydajność translacji (TE, ang. translational efficiency), czyli jej szybkość i precyzję (Waldmar i in. 2011). Odmiennie kodony dla tego samego aminokwasu wymagają innych transferowych RNA (tRNA), a tym samym cały proces może być zależny od ilości dostępnego tRNA w komórce. Zależność jest wprost proporcjonalna: im więcej dostępnego tRNA, tym proces syntezy np. pre-pro-IGF-IR może być zdecydowanie szybszy/większy. Poprzez analogię do innych receptorów, wiązanie IGF-I do IGF-IR jest wysoce specyficzne i wysycalne, a receptory są obecne w komórkach w ograniczonej ilości. W myśl kinetyki reakcji wiązania ligandu i receptora, przy pewnym stężeniu wolnego IGF-I wszystkie cząsteczki receptora zostaną związane z nim (wysycenie) i tzw. krzywa wiązania w pewnym momencie osiąga stan *plateau*, choć wiązanie jest zawsze odwracalne i dynamiczne (Maguire i in. 2012). Poprzez analogię, proporcjonalnie do ilości dostępnego receptora na błonie komórkowej różnych komórek gruczołu mlecznego, może się przypuszczalnie zwiększyć maksymalny poziom wiązania IGF-I, co może w ogólnym rozrachunku wzmocnić lub

przedłużyć kaskadę sygnałową. Do tej kategorii teoretycznie można przyporządkować każdą z analizowanych mutacji. Jakkolwiek, bez analiz radioizotopowych ocena związku pomiędzy genotypem zwierzęcia a maksymalnym wysyceniem receptora dla IGF-I jest niemożliwa. Dotychczas brak jest tego typu manuskryptów, a uwaga skupiona jest głównie na poziomie ekspresji mRNA w gruczole mlecznym krów.

Wiadomym powszechnie jest, że pierwotną funkcją mRNA jest kodowanie sekwencji aminokwasowej białek. Jakkolwiek, wydajna translacja to jedno, a składanie nowoutworzonego łańcucha aminokwasów w funkcjonalne domeny białkowe to drugie. Nowopowstający łańcuch polipeptydowy, już w momencie wyłaniania się z tunelu rybosomowego do środowiska komórki, podlega skomplikowanemu procesowi fałdowania / zwijania przestrzennego (ang. folding; Cabrita i in. 2010), w postacią wysoko zorganizowanej struktury o stabilnej konformacji. Podobnie jak w zagadnieniu opisanym powyżej, rzadkie kodony, tj. takie których ilość dostępnego tRNA jest stosunkowo niewielka, najczęściej występują w tych sekwencjach mRNA, które kodują miejsca oddzielające składane niezależnie domeny białkowe (Mauger i in. 2013). Wysoce konserwatywne białka są zazwyczaj kodowane przez stabilne konformacyjnie mRNA, a trwająca nieustannie naturalna bądź prowadzona przez człowieka selekcja (tu odgrywają rolę m.in. mutacje ciche) ma m.in. na celu optymalizację stabilności mRNA mierzoną jako energię fałdowania mRNA (ΔG) (Faure i in. 2016). Oczywiście na istotną zmianę tej energii wpływ ma nie jedno a wiele SNP.

Obok potencjalnie bezpośredniego udziału pięciu prezentowanych miejsc polimorficznych w procesie transkrypcji *JAK2* i *IGF1R* i późniejszej translacji do uzyskania funkcjonalnego białka, przyczyn stwierdzonej zmienności wydajności osobniczej należy upatrywać pośrednio, jako związek z innymi mutacjami odpowiedzialnymi za daną cechę, zarówno w tym samym genie jak i sąsiednimi genami. W momencie podjęcia prezentowanych badań, dostępne były prace, w których poszukiwano QTL na mniejszą skalę. Dopiero stosunkowo niedawno w krótkim czasie masowo pojawiły się lawinowo manuskrypty dotyczące GWAS w powiązaniu z cechami mleczności bydła. Biorąc pod uwagę wszystkie procesy rozwojowe gruczołu mlecznego i szlak prolaktyny, Raven i in. (2014a) metodą GWAS wytypowali 64 istotne geny (m.in. *JAK2*, *IGF1* i *IGF1R*) z dziesiątkami SNP, które łącznie wyjaśniają od 9 do 13 % całkowitej zmienności. Polimorfizmy o mniejszym znaczeniu rozproszone są po wszystkich chromosomach poniżej dolnej granicy wykrywalności. Dla BTA21 Shin i in. (2015) zidentyfikowali cały region 4,4 ÷ 4,6 Mbp z genem *GABRA5* zaś Cho i in. (2015) zlokalizowali m.in. SNP (BTA-12959-no-rs; 12 Mbp). Oba regiony położone są stosunkowo blisko *IGF1R* i w pracach tych były istotnie związane z wydajnością mleka bydła rasy holsztyńskiej. Również dla wydajności mleka, Aliloo i in. (2015) w pozycji 71,8 Mbp na BTA5 wyróżnili SNP (rs110106971) w intronie genu *SYN3* położonego w sąsiedztwie *IGF1*. Natomiast dla regionu 9.37 ~ 9.52 BTA21 (tj. w odległości 1,1 Mbp od *IGF1R*) wykazano istotny związek z kilkoma cechami biosyntezy tłuszczów w mleku (C10:0, C12:0, C16:0, C18 index, CLA, SFA, SFA/UFA and UFA) (Li i in. 2014). W kolejnych badaniach, Li i in. (2016) potwierdzili dodatkowo związek pomiędzy wytypowanym uprzednio w GWAS miejscem

polimorficznym rs109763947 (tj. *IGF1/SnaBI* z [H3]) a poziomem C10:0, C12:0, C16 index, CLA, SFA i UFA.

Jednak w zdecydowanej większości pozostałych dostępnych prac geny *JAK2* (BTA8 w pozycji ~ 39,6 Mbp), *IGF1* (BTA5 w pozycji ~ 66,6 Mbp) i *IGF1R* (BTA21 w pozycji ~ 8,2 Mbp) nie są uznawane za istotne geny kandydujące (Kolbehdari i in. 2009; Jiang i in. 2010; Bouwman i in. 2012; Guo i in. 2012; Maxa i in. 2012; Meredith i in. 2012; Wang i in. 2012; Minozzi i in. 2013; Pan i in. 2013; Streit i in. 2013; Buitenhuis i in. 2014; Fang i in. 2014; Jiang i in. 2014; Raven i in. 2014b; Xu i in. 2014; Howard i in. 2015; Buitenhuis i in. 2016; Ibeagha-Awemu i in. 2016; Iso-Touru i in. 2016; Nayeri i in. 2016).

Bez wątplenia metoda GWAS dała nowe spojrzenie na dotychczasowe wieloletnie badania asocjacyjne. Identyfikacja genów przyczynowych czy też całych regionów chromosomalnych związanych z biosyntezą mleka może poprawić wiedzę na temat złożoności tych szlaków warunkowanych poligenowo i w przyszłości może dostarczyć informacji co do sposobności zwiększania wydajności mleka i zmiany jego składu. Istotne zmiany funkcji genów mogą wystąpić wówczas, gdy wiele SNP wystąpi jednocześnie we właściwej kombinacji. Co więcej, wydajność mleka w laktacji i powiązane z nią szlaki metaboliczne nie zależą tylko i wyłącznie od czynników genetycznych. Qin i in. (2014) wykazali m.in., że wysoka jakość mieszanek paszowych może zwiększyć liczbę komórek epitelialnych w gruczole mlecznym, przy jednoczesnym zwiększeniu poziomu ekspresji *IGF1R* i produkcji mleka.

Ze względu na fakt, iż GWAS dostarcza dziesiątek tysięcy danych, a ich obróbka wymaga skomplikowanych analiz komputerowych, ważne jest aby otrzymać wyniki powtarzalne (tzw. true positive) przy jednoczesnej minimalizacji liczby wyników fałszywych (tzw. false positive). Jednoczesne testowanie wielu hipotez stanowi poważny problem. Najczęściej w tego typu badaniach stosowana jest więc korekta Bonferroniego z indywidualnym dopasowaniem wartości „P”. Konieczność postawienia wyraźnej linii odcinającej wyniki istotne na punktowych wykresach typu Manhattan (gdzie pojedyncze wyniki są przedstawiane wg kolejnych chromosomów w postaci funkcji $-\log_{10}P$) oraz ze względu na fakt, że każdy SNP wyjaśnia jedynie mały % zmienności badanej cechy może sprawić, że w efekcie końcowym związek części SNP lub regionów chromosomów może pozostać niezauważony (Shin i in. 2015). Co więcej, analizy asocjacyjne wymagają ustalenia jasnych kryteriów przyjęcia/odrzućenia badanych SNP. Ma to znaczenie zwłaszcza wtedy, gdy fragment DNA zawierający SNP słabo amplifikuje się lub uzyskuje się niskie frekwencje allelu rzadszego (MAF, ang. minor allele frequency) i/lub gdy układy okazują się monomorficzne w badanej populacji, przez co muszą zostać usunięte z dalszych analiz (Kolbehdari i in. 2009). Zastosowanie nowych, zwalidowanych SNP z regionów kodujących genów (takich jak prezentowane w tym powiązonym tematycznie cyklu prac) może zwiększyć czułość i specyficzność przyszłych analiz.

Odmienne zagadnienie stanowią dwa miejsca polimorficzne, zlokalizowane w obrębie promotora P1 genu *IGF1*. W przypadku układu *IGF1/SnaBI* pojawiły się już pierwsze prace w których

wykazano, że polimorfizm ten może mieć istotny wpływ na ekspresję tego genu poprzez zmianę specyfiki wiązania różnych czynników transkrypcyjnych (Ge i in. 2001; Maj i in. 2008; Mullen i in. 2011). Z tego powodu układ ten stał się najczęściej badanym miejscem polimorficznym w *IGF1*, jakkolwiek bez jednoznacznych wyników.

Analogicznie do 5 cichych mutacji opisanych uprzednio, pojedynczy SNP, zarówno *IGF1/SnaBI* jak i *IGF1/TasI*, może tłumaczyć jedynie ułamek zaobserwowanej zmienności przy zapewnieniu prawidłowego żywienia i warunków środowiskowych. Dla przykładu, stres żywieniowy znacząco negatywnie wpływa na poziom ekspresji genu *IGF1* i aktywność hormonalną IGF-I na wielu poziomach jego aktywności (Underwood i in. 1994).

W zależności od pochodzenia aktywnego IGF-I (endokrynną lub syntetyzowaną lokalnie) i stadium wzrostu, ekspresja genu *IGF1* jest regulowana fizjologicznie (Sirotkin i in. 2000). W większości tkanek i narządów zdolnych do biosyntezy IGF-I, mRNA *IGF1* wywodzi się z eksonu 1 (i promotora P1) – tzw. klasa 1 mRNA, podczas gdy w wątrobie, pierwotnym źródle IGF-I, z obu promotorów (P1 i P2), głównie z eksonu 2 (i promotora P2) – tzw. klasa 2 mRNA (Shemer i in. 1992). Peptyd sygnałowy wywodzący się z klasy 1 mRNA jest stosunkowo długi, przez co może utrudniać sekrecję IGF-I (aktywność lokalna). Funkcją promotora P2 i krótkiego peptydu sygnałowego, wywodzącego się z klasy 2 mRNA, jest zapewnienie wydajnego mechanizmu syntezy IGF-I w wątrobie w odpowiedzi na impulsy GH (O'Sullivan i in. 2002).

W ostatnich latach dostarczono wielu dowodów na to, że szlak sygnałowy IGF-I/IGF-IR bierze aktywny udział w rozwoju gruczołu młecznego. Oś GH - IGF-I mediuje rozwój sieci przewodów gruczołu młecznego, zwłaszcza ich zakończenia (tzw. TEB, ang. terminal end bud) (Bonnette i Hadsel 2001) jak również kontroluje rozwój zrazikowo-pęcherzykowy (Łoladze i in. 2006), choć głównym źródłem lokalnego IGF-I jest silnie unaczyniony zrąb tkanki łącznej, zbudowanej z adipocytów i fibroblastów (Weber i in. 2000; Plath-Gabler i in. 2001; McManaman i Neville 2003). Endokrynną IGF-I (tj. syntetyzowaną tylko w wątrobie) jest głównym mediatorem galaktopoetycznej funkcji GH podczas całej laktacji (Schams i in. 1991). Notuje się słabą lokalną ekspresję mRNA *IGF1* podczas mammogenezy i kluczowych stadiów laktacji (Plath-Gabler i in. 2001) oraz każdorazowo istotny wzrost podczas inwolucji (Singh i in. 2016). Sugerować to może na bezpośredni udział lokalnie syntetyzowanego IGF-I w „kształtowaniu” wymienia podczas mammogenezy a następnie przebudowie gruczołu młecznego podczas inwolucji z jednoczesnym marginalnym znaczeniem dla bezpośredniej syntezy mleka podczas laktogenezy i galaktopoezy. Faktem tym tłumaczyć można słabo powtarzalne i często zależne od laktacji wyniki dla układów *IGF1/SnaBI* oraz *IGF1/TasI* (potencjalnie kontrolujących ekspresję klasy 1 mRNA z promotora P1), uzyskane w prezentowanym cyklu publikacji powiązanych tematycznie jak i w manuskryptach innych autorów. Na szczególną uwagę zasługuje układ *IGF1/TasI*, zlokalizowany w „przerwaniu” mikrosatelity (CA)_n położonej blisko kilku miejsc rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne. Wiadomo bowiem, że powtórzenia CA są zdolne do tworzenia struktury Z-DNA i mogą wówczas służyć jako elementy wzmacniające sygnał transkrypcji (Hamada i in. 1984).

Wyższe wydajności osobników o genotypie CC (z „wydłużoną” o 1 serią powtórzeń CA) w pracach [H2] oraz Zhang i in. (2014) jak również w pracy (A12) mogą poniekąd potwierdzić te przypuszczenia.

Podsumowując można stwierdzić, iż przeprowadzone badania własne pozwoliły na wykazanie istotnego związku pomiędzy niektórymi polimorfizmami o charakterze pojedynczego podstawienia nukleotydów w regionach kodujących (*JAK2*, *IGF1R*) i regulatorowych (*IGF1*) genów osi somatotropowej a wybranymi cechami mleczności u różnych ras bydła mlecznego. Co więcej, pomimo pełnej świadomości ograniczeń wynikających z poligenicznej kontroli skomplikowanego procesu biosyntezy mleka, uchwycono pewne tendencje do osiągania wyższych lub niższych wartości danej cechy przez osobniki o określonym genotypie, niezależnie od kolejności laktacji oraz rasy (geny *JAK2* i *IGF1R*). Cykl publikacji powiązanych tematycznie, stanowiący podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, prezentuje w dużej mierze pionierskie wyniki badań asocjacyjnych (geny *JAK2* i *IGF1R*) jak również uzupełniające obecny stan wiedzy (gen *IGF1*), poruszając się w mniej poznanym obszarze osi somatotropowej. Opracowano szereg metodyk własnych z użyciem stosunkowo tanich komercyjnych enzymów restrykcyjnych, które wraz z uzyskanymi wynikami opublikowano w czołowych renomowanych czasopismach z rankingu czasopism kategorii „Agriculture, dairy & animal science”. Uzyskane wyniki badań wniosły istotny wkład w poznanie struktury i polimorfizmu bydłowego genu *IGF1R*. Ze względu na istotny udział w procesie mammogenezy, stadiach laktogenezy, galaktopoezy czy inwolucji, geny *JAK2*, *IGF1* oraz *IGF1R* można uznać za geny kandydujące dla cech użytkowości mlecznej bydła. Poprzez analogię do najpopularniejszych miejsc polimorficznych w badaniach typu GWAS (K232A *DGATI* i F279Y *GHR*), zasadne wydaje się być stwierdzenie, iż badane miejsca polimorficzne warte są uwzględnienia w kolejnych generacjach mikrochipów lub ich skromniejszych odmian typu „custom”. Można również przypuszczać, że wyniki powyższych badań, o ile zostaną potwierdzone przez innych autorów na niezależnych populacjach, mogą w przyszłości zostać uwzględnione w programach hodowlanych bydła mlecznego i przelożyć się na korzyści ekonomiczne dla producentów mleka.

Piśmiennictwo

1. Adams T.E., Epa V.C., Garrett T.P., Ward C.W. (2000) Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol. Life Sci.*, 57, 1050-1093.
2. Akis I., Oztabak K., Gonulalp I., Mengi A., Un C. (2010) IGF-1 and IGF-1R gene polymorphisms in East Anatolian Red and South Anatolian Red cattle breeds. *Russ. J. Genet.*, 46, 497-501.
3. Aliloo H., Pryce J.E., González-Recio O., Cocks B.G., Hayes B.J. (2015) Validation of markers with non-additive effects on milk yield and fertility in Holstein and Jersey cows. *BMC Genet.*, 16, 89.
4. Annunziata M., Granata R., Ghigo E. (2011) The IGF system. *Acta Diabetol.*, 48, 1-9.
5. Argetsinger L.S., Stuckey J.A., Robertson S.A., Koleva R.I., Cline J.M., Marto J.A., Myers Jr. M.G., Carter-Su C. (2010) Tyrosines 868, 966, and 972 in the kinase domain of JAK2 are autophosphorylated and required for maximal JAK2 kinase activity. *Mol. Endocrinol.*, 24, 1062–1076.

6. Babon J.J., Lucet I.S., Murphy J.M., Nicola N.A., Varghese L.N. (2014) The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem. J.*, 462, 1-13.
7. Baumann G. (1994) Growth hormone-binding proteins: state of the art. *J. Endocrinol.*, 141, 1-6.
8. Baumrucker C.R., Erondu N.E. (2000) Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 5, 53-64.
9. Blott S., Kim J.J., Moision S., Schmidt-Küntzel A., Cornet A., Berzi P., Cambisano N., Ford C., Grisart B., Johnson D., Karim L., Simon P., Snell R., Spelman R., Wong J., Vilkki J., Georges M., Farnir F., Coppieters W. (2003) Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics*, 163, 253-266.
10. Bonakdar E., Rahmani H.R., Edriss M.A., Tabatabaei B.E.S. (2010) IGF-I gene polymorphism, but not its blood concentration, is associated with milk fat and protein in Holstein dairy cows. *Genet. Mol. Res.*, 9, 1726-1734.
11. Bonnette S.G., Hadsell D.L. (2001) Targeted disruption of the IGF-I receptor gene decreases cellular proliferation in mammary terminal end buds. *Endocrinol.*, 142, 4937-4945.
12. Bouwman A.C., Visker M.H., Van Arendonk J.A., Bovenhuis H. (2012) Genomic regions associated with bovine milk fatty acids in both summer and winter milk samples. *BMC Genet.*, 13, 93.
13. Buitenhuis B., Janss L.L.G., Poulsen N.A., Larsen L.B., Larsen M.K., Sørensen P. (2014) Genome-wide association and biological pathway analysis for milk-fat composition in Danish Holstein and Danish Jersey cattle. *BMC Genomics*, 15, 1112.
14. Buitenhuis B., Poulsen N.A., Gebreyesus G., Larsen L.B. (2016) Estimation of genetic parameters and detection of chromosomal regions affecting the major milk proteins and their post translational modifications in Danish Holstein and Danish Jersey cattle. *BMC Genetics*, 17, 114.
15. Cabrita L.D., Dobson C.M., Christodoulou J. (2010) Protein folding on the ribosome. *Curr. Opin. Struci. Biol.*, 20, 33-45.
16. Castigliano L., Armani A., Grifoni G., Rosati R., Mazzi M., Gianfaldoni D., Guidi A. (2010) Effects of growth hormone treatment on the expression of somatotropic axis genes in the skeletal muscle of lactating Holstein cows. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 39, 40-53.
17. Chamary J.V., Hurst L.D. (2005) Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals. *Genome Biology*, 6, R75.
18. Cho K.H., Oh J.-D., Kim H.-B., Park K.-D., Lee J.-H. (2015) Genome Wide Association Studies using multiple-lactation breeding value in Holsteins. *Asian. Australas. J. Anim. Sci.*, 28, 328-33.
19. Curi R.A., Oliveira H.N., Silveira A.C., Lopes C.R. (2005) Association between IGFI, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. *Livest. Prod. Sci.*, 94, 159-167.
20. Fang M., Fu W., Jiang D., Zhang Q., Sun D., Ding X., Liu J. (2014) A multiple-SNP approach for Genome-Wide Association Study of milk production traits in Chinese Holstein cattle. *PLoS One*, 9, e99544.
21. Faure G., Ogurtsov A.Y., Shabalina S.A., Koonin E.V. (2016) Role of mRNA structure in the control of protein folding. *Nucleic Acids Res.*, first view Jul 27, 1-14. [Epub ahead of print]
22. Funakoshi-Tago M., Tago K., Kasahara T., Parganas E., Ihle J.N. (2008) Negative regulation of Jak2 by its auto-phosphorylation at tyrosine 913 via the Epo signaling pathway. *Cell. Signal.*, 20, 1995-2001.
23. Gartner J.J., Parker S.C., Prickett T.D., Dutton-Regester K., Stitzel M.L., Lin J.C., Davis S., Simhadri V.L., Jha S., Katagiri N., Gotea V., Teer J.K., Wei X., Morken M.A., Bhanot U.K., Chen G., Elnitski L.L., Davies M.A., Gershenwald J.E., Carter H., Karchin R., Robinson W.,

- Robinson S., Rosenberg S.A., Collins F.S., Parmigiani G., Komar A.A., Kimchi-Sarfaty C., Hayward N.K., Margulies E.H., Samuels Y. (2013) Whole-genome sequencing identifies a recurrent functional synonymous mutation in melanoma. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 13481-13486.
24. Garwood C.J., Ratcliffe L.E., Morgan S.V., Simpson J.E., Owens H., Vazquez-Villaseñor I., Heath P.R., Romero I.A., Ince P.G., Wharton S.B. (2015) Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes in vitro and in vivo; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors. *Mol. Brain*, 8, 51.
25. Gautier M., Barcelona R.R., Fritz S., Grohs C., Druet T., Boichard D., Eggen A., Meuwisen T.H.E. (2006) Fine mapping and physical characterization of two linked QTLs affecting milk fat. *Genetics*, 172, 425-436.
26. Ge W., Davis M.E., Hines H.C., Irvin K.M., Simmen R.C.M. (2001) Association of genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.*, 79, 1757-1762.
27. Grzelak T., Kmieć M., Wojdak-Maksymiec K., Kulig H., Kowalewska-Łuczak I. (2007) *IGF1/SnaBI* gene polymorphism in Jersey cows. *2nd Polish Congress of Genetics*, SGGW Warsaw, 18-20 September. [In Polish, summary in English]
28. Guhaniyogi J., Brewer G. (2001) Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*, 265, 11-23.
29. Guo J., Jorjani H., Carlborg Ö. (2012) A genome-wide association study using international breeding-evaluation data identifies major loci affecting production traits and stature in the Brown Swiss cattle breed. *BMC Genet.*, 13, 82.
30. Hamada H., Petrino M.G., Kakunaga T., Seidman M., Stollar B.D. (1984) Characterization of genomic poly(dTdG).poly(dC-dA) sequences: structure, organization and conformation. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 2610-2621.
31. Hayes B., Goddard M.E. (2001) The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock. *Genet. Sel. Evol.*, 33, 209-229.
32. Hieronymus H., Silver P.A. (2004) A systems view of mRNP biology. *Genes Dev.*, 18, 2845-2860.
33. Hines H.C., Ge W., Zhao Q., Davis M.E. (1998) Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor I loci with lactation traits in Holsteins. *Anim. Genet.*, 29 (suppl. 1), 63.
34. Howard J.T., Haile-Mariam M., Pryce J.E., Maltecca C. (2015) Investigation of regions impacting inbreeding depression and their association with the additive genetic effect for United States and Australia Jersey dairy cattle. *BMC Genomics*, 16, 813.
35. Iams W.T., Lovly CM. (2015) Molecular Pathways: Clinical Applications and Future Direction of Insulin-like Growth Factor-I Receptor Pathway Blockade. *Clin. Cancer Res.*, 21, :4270-4277.
36. Ibeagha-Awemu E.M., Peters S.O., Akwanji K.A., Imumorin I.G., Zhao X. (2016) High density genome wide genotyping-by-sequencing and association identifies common and low frequency SNPs, and novel candidate genes influencing cow milk traits. *Sci Rep.*, 6, 31109.
37. Iso-Touru T., Sahana G., Guldbrandtsen B., Lund M.S., Vilkki J. (2016) Genome-wide association analysis of milk yield traits in Nordic Red Cattle using imputed whole genome sequence variants. *BMC Genet.*, 17, 55.
38. Jiang L., Liu J., Sun D., Ma P., Ding X., Yu Y., Zhang Q. (2010) Genome wide association studies for milk production traits in Chinese Holstein population. *PLoS One*, 5, e13661.
39. Jiang L., Liu X., Yang J., Wang H., Jiang J., Liu L., He S., Ding X., Liu J., Zhang Q. (2014) Targeted resequencing of GWAS loci reveals novel genetic variants for milk production traits. *BMC Genomics*, 15, 1105.

40. Kaushansky A., Gordus A., Chang B., Rush J., MacBeath G. (2008) A quantitative study of the recruitment potential of all intracellular tyrosine residues on EGFR, FGFR1 and IGF1R. *Mol. Biosyst.*, 4, 643–653.
41. Kavran J.M., McCabe J.M., Byrne P.O., Connacher M.K., Wang Z., Ramek A., Sarabipour S., Shan Y., Shaw D.E., Hristova K., Cole P.A., Leahy D.J. (2014) How IGF-1 activates its receptor. *Elife*, 3, 1-28.
42. Keyhanfar, M., Booker, G., Whittaker, J., Wallace, J.C., Forbes, B.E. (2007) Precise mapping of an IGF-I-binding site on the IGF-1R. *Biochem. J.*, 1, 269-277.
43. Klauzińska M., Żurkowski M., Siadkowska E., Szymanowska M., Grochowska R., Zwierzchowski L., Klewicz J. (2004) Analysis of genetic structure in Polish Red and Polish Black-and-White cattle using twelve marker *loci* potentially related to milk or meat production traits. *Anim. Sci. Pap.Rep.*, 22, 153-171.
44. Kolbehdari D., Wang Z., Grant J.R., Murdoch B., Prasad A., Xiu Z., Marques E., Stothard P., Moore S.S. (2009) A whole genome scan to map QTL for milk production traits and somatic cell score in Canadian Holstein bulls. *J. Anim. Breed. Genet.*, 126, 216-227.
45. Kurzer J.H., Argetsinger L.S., Zhou Y.J., Kouadio J-L.K., O'She J.J., Carter-Su C. (2004) Tyrosine 813 is a site of JAK2 autophosphorylation critical for activation of JAK2 by SH2-B. *Mol. Cell. Biol.*, 24, 4557–4570.
46. Lemmon M.A., Schlessinger J. (2010) Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell*, 141, 1117–1134.
47. Li C., Basarab J., Snelling W.M., Benkel B., Murdoch B., Hansen C., Moore S.S. (2004) Assessment of positional candidate genes *MYF5* and *IGF-I* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.*, 82, 1-7.
48. Li W., Miller W.T. (2006) Role of the activation loop tyrosines in regulation of the insulin-like growth factor I receptor-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.*, 281, 23785-23791.
49. Li, C., Sun, D., Zhang, S., Wang, S., Wu, X., Zhang, Q., Liu, L., Li, Y., Qiao, L. (2014) Genome wide association study identifies 20 novel promising genes associated with milk fatty acid traits in Chinese Holstein. *PLoS One*, 9, e96186.
50. Li C., Sun D., Zhang S., Yang S., Alim M.A., Zhang Q., Li Y., Liu L. (2016) Genetic effects of *FASN*, *PPARGC1A*, *ABCG2* and *IGF1* revealing the association with milk fatty acids in a Chinese Holstein cattle population based on a post genome-wide association study. *BMC Genet.*, 17, 110.
51. Loladze A.V., Stull M.A., Rowzee A.M., Demarco J., Lantry J.H. 3rd., Rosen C.J., Leroith D., Wagner K.U., Hennighausen L., Wood T.L. (2006) Epithelial-specific and stage-specific functions of insulin-like growth factor-I during postnatal mammary development. *Endocrinol.*, 147, 5412–5423.
52. Lou M., Garrett, T.P., McKern, N.M., Hoyne, P.A., Epa, V.C., Bentley, J.D., Lovrecz, G.O., Cosgrove, L.J., Frenkel, M.J., Ward, C.W. (2006) The first three domains of the insulin receptor differ structurally from the insulin-like growth factor 1 receptor in the regions governing ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 12429-12434.
53. Machado M.B.B., Alencar M.M., Pereira A.P., Oliveira H.N., Casas E., Coutinho L.L., Regitano C.A. (2003) QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. *Genet. Mol. Biol.*, 26, 259-265.
54. Maguire J.J., Kuc R.E., Davenport A.P. (2012) Radioligand binding assays and their analysis. *Methods Mol Biol.*, 897, 31-77.
55. Maj A., Snochowski M., Siadkowska E., Rowińska B., Lisowski P., Robakowska-Hyzorek D., Oprządek J., Grochowska R., Kochman K., Zwierzchowski L. (2008) Polymorphism in genes of growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and its association with both the IGF-1 expression in liver and its level in blood in Polish Holstein-Friesian cattle. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 29, 981-989.

56. Majewski, J., Ott J. (2002) Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Res.*, 12, 1827–1836.
57. Mauger D.M., Siegfried N.A., Weeks K.M. (2013) The genetic code as expressed through relationships between mRNA structure and protein function. *FEBS Lett.*, 587, 1180-1188.
58. Maxa J., Neuditschko M, Russ I., Förster M., Medugorac I.(2012) Genome-wide association mapping of milk production traits in Braunvieh cattle. *J Dairy Sci.*, 95, 5357-5364.
59. McClure M.C., Morsci N.S., Schnabel R.D., Kim J.W., Yao P., Rolf M.M., McKay S.D., Gregg S.J., Chapple R.H., Northcutt S.L., Taylor J.F. (2010) A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. *Anim. Genet.*, 41, 597-607.
60. McCoard S.A., Hayashi A.A., Sciascia Q., Rounce J., Sinclair B., McNabb W.C., Roy N.C. (2016) Mammary transcriptome analysis of lactating dairy cows following administration of bovine growth hormone. *Animal*, first view May 25:1-10. [Epub ahead of print]
61. McDoom I., Xianyue M., Kirabo A., Kuang-Yung L., Ostrov D.A., Sayeski P.P. (2008) Identification of tyrosine 972 as a novel site of Jak2 tyrosine kinase phosphorylation and its role in Jak2 activation. *Biochemistry*, 47, 8326–8334.
62. McManaman J.L., Neville M.C. (2003) Mammary physiology and milk secretion. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 55, 629-641.
63. McNally R., Toms A.V., Eck M.J. (2016) Crystal structure of the FERM-SH2 module of human JAK2. *PLoS One*, 11, e0156218.
64. Mehmannaavaz Y., Amirinia C., Bonyadi M., Torshizi R.V. (2010) Association of *IGF-1* gene polymorphism with milk production traits and paternal genetic trends in Iranian Holstein bulls. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4, 110-114.
65. Meredith B.K., Kearney F.J., Finlay E.K., Bradley D.G., Fahey A.G., Berry D.P., Lynn D.J. (2012) Genome-wide associations for milk production and somatic cell score in Holstein-Friesian cattle in Ireland. *BMC Genet.*, 13, 21.
66. Minozzi G., Nicolazzi E.L., Stella A., Biffani S., Negrini R., Lazzari B., Ajmone-Marsan P., J.L. (2013) Genome wide analysis of fertility and production traits in Italian Holstein cattle. *PLoS One*, 8, e80219.
67. Mohan S., Baylink D.J. (2002) IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *J. Endocrinol.*, 175, 19-31.
68. Moody D.E., Pomp D., Barendse W. (1996) Linkage mapping of the bovine insulin-like growth factor-1 receptor gene. *Mamm. Genome.*, 7, 168-169.
69. Mullen M.P., Berry D.P., Howard D.J., Diskin M.G., Lynch C.O., Giblin L., Kenny D.A., Magee D.A., Meade K.G., Waters S.M. (2011) Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) gene are associated with performance in Holstein-Friesian dairy cattle. *Front. Genet.*, 2, 1-9.
70. Nayeri S., Sargolzaei M., Abo-Ismael M.K., May N., Miller S.P., Schenkel F., Moore S.S., Stothard P. (2016) Genome-wide association for milk production and female fertility traits in Canadian dairy Holstein cattle. *BMC Genet.*, 17, 75.
71. Oberbauer A.M. (2013) The regulation of IGF-1 gene transcription and splicing during development and aging. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 4, 39.
72. O’Sullivan D.C., Szestak T.A., Pell J.M. (2002) Regulation of hepatic insulin-like growth factor I leader exon usage in lambs: effect of immunization against growth hormone-releasing factor and subsequent growth hormone treatment. *J. Anim. Sci.*, 80, 1074-1082.
73. Pan D., Zhang S., Jiang J., Jiang L., Zhang Q., Liu J. (2013) Genome-wide detection of selective signature in Chinese Holstein. *PLoS One*, 8, e60440.

74. Parmentier I., Portetelle D., Gengler N., Prandi A., Bertozzi C., Vleurick L., Gilson R., Renaville R. (1999) Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. *Domest. Anim. Endocrin.*, 17, 139-148.
75. Parmley J.L., Chamary J.V., Hurst LD. (2006) Evidence for purifying selection against synonymous mutations in mammalian exonic splicing enhancers. *Mol Biol Evol.*, 23, 301-309.
76. Pereira A.P., De Alencar M.M., De Oliveira H.N., Regitano L.C.D. (2005) Association of GH and IGF-1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. *Genet. Mol. Biol.*, 28, 230-236.
77. Plath-Gabler A., Gabler C., Sinowatz F., Berisha B., Schams D. (2001) The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. *J. Endocrinol.*, 168, 39-48.
78. Polasik D., Adamska P., Wojdak-Maksymiec K., Kmiec M., Terman A. (2010) Polimorfizm Genu *IGF-1* u bydła rasy Polska Holsztyńsko-Fryzyska. *Acta Sci. Pol., Zootechnica*, 9, 199-206.
79. Qin T., Wang H., Bu D., Hao H., Wang D., Zhu H. (2014) Effects of two different forage sources on mammary gland growth, mammary cell turnover and activity in early lactation dairy cows. *Anim. Prod. Sci.*, 55, 630-633.
80. Raven L.A., Cocks B.G., Goddard M.E., Pryce J.E., Hayes B.J. (2014a) Genetic variants in mammary development, prolactin signalling and involution pathways explain considerable variation in bovine milk production and milk composition. *Genet. Sel. Evol.*, 46, 29.
81. Raven L.A., Cocks B.G., Hayes B.J. (2014b) Multibreed genome wide association can improve precision of mapping causative variants underlying milk production in dairy cattle. *BMC Genomics*, 15, 62.
82. Renaville R., Hammadi M., Portetelle D. (2002) Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 23, 351-360.
83. Reyna X.F., Montoya H.M., Castellón V.V., Rincón A.M., Bracamonte M.P., Vera W.A. (2010) Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. *Genet. Mol. Res.*, 9, 875-883.
84. Riedemann J., Macaulay V.M. (2006) IGF1R signalling and its inhibition. *Endocr. Relat. Cancer*, Suppl 1, S33-43.
85. Ross J. (1995) mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev.*, 59, 423-450.
86. Ruano Z.A., Cilia E., Couceiro J.R., Ruiz Sanz J., Schymkowitz J., Rousseau F., Luque I., Lenaerts T. (2016) From binding-induced dynamic effects in SH3 structures to evolutionary conserved sectors. *PLoS Comput. Biol.*, 12, e1004938.
87. Salvatori R. (2004) Growth hormone and IGF-1. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 5, 15-23.
88. Schams D., Graf F., Meyer J., Graule B., Mauthner M., Wollny C. (1991) Changes of hormones, metabolites and milk after treatment with sometribove (recombinant methionyl bST) in Deutsches Fleck- and German Black and White cows. *J. Anim. Sci.*, 69, 1583-1592.
89. Shemer J., Adamo M.L., Roberts Jr C.T., LeRoith D. (1992) Tissue-specific transcription start site usage in the leader exons of the rat insulin-like growth factor-I gene - evidence for differential regulation in the developing kidney. *Endocrinol.*, 131, 2793-2799.
90. Shin D., Lee C., Park K.-D., Kim H., Cho K.-H. (2015) Genome-association analysis of Korean Holstein milk traits using genomic estimated breeding value. *Asian. Australas. J. Anim. Sci.*, first view Oct 5. 1-11. [Epub ahead of print]
91. Siadkowska E., Zwierzchowski L., Oprządek J., Strzałkowska N., Bagnicka E., Krzyżewski J. (2006) Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 24, 225-237.
92. Silvennoinen O., Ungureanu D., Niranjan Y., Hammaren H., Bandaranayake R., Hubbard S.R. (2013) New insights into the structure and function of the pseudokinase domain in JAK2. *Bioch. Soc. Trans.*, 41, 1002-1007.

93. Singh K., Vetharaniam I., Dobson J.M., Prewitz M., Oden K., Murney R., Swanson K.M., McDonald R., Henderson H.V., Stelwagen K. (2016) Cell survival signaling in the bovine mammary gland during the transition from lactation to involution. *J. Dairy Sci.*, 99, 7523-7543.
94. Sinowatz F., Schams D., Kolle S., Plath A., Lincoln D., Waters M.J. (2000) Cellular localisation of GH receptor in the bovine mammary gland during mammogenesis, lactation and involution. *J. Endocrinol.*, 166, 503-510.
95. Sirotkin A.V., Chrenek P., Makarevich A.V., Huba J., Bulla J. (2000) Interrelationship between breed, growth hormone genotype, plasma IGF-I level and meat performance in bulls of different ages. *Arch. Tierz.*, 43, 591-596.
96. Snelling W.M., Allan M.F., Keele J.W., Kuehn L.A., McDanel T., Smith T.P., Sonstegard T.S., Thallman R.M., Bennett G.L. (2010) Genome-wide association study of growth in crossbred beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 88, 837-48.
97. Streit M., Reinhardt F, Thaller G, Bennewitz J. (2013) Genome-wide association analysis to identify genotype \times environment interaction for milk protein yield and level of somatic cell score as environmental descriptors in German Holsteins. *J Dairy Sci.*, 96, 7318-7324.
98. Supek F., Miřana B., Valcarcel J., Gabaldon T., Lehner B. (2014) Synonymous mutations frequently act as driver mutations in human cancers. *Cell*, 156, 1324-1335.
99. Ullrich A., Gray A., Tam A.W., Yang-Feng T., Tsubokawa M., Collins C., Henzel W., Le Bon T., Kathuria S., Chen E., Jacobs S., Francke U., Ramachandran J., Fujita-Yamaguchi Y. (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.*, 5, 2503-2512.
100. Underwood L.E., Thissen J.P., Lemozy S., Ketelslegers J.M., Clemmons D.R. (1994) Hormonal and nutritional regulation of IGF-I and its binding proteins. *Horm Res.*, 42, 145-151.
101. Usman T., Wang Y., Liu C., Wang X., Zhang Y., Yu Y. (2015) Association study of single nucleotide polymorphisms in JAK2 and STAT5B genes and their differential mRNA expression with mastitis susceptibility in Chinese Holstein cattle. *Anim. Genet.*, 46, 371–380.
102. Vitale L., Lenzi L., Shane A. Huntsman S.A., Canaider S., Frabetti F., Casadei R., Facchin F., Carinci P., Zannotti M., Coppola D., Strippoli P. (2006) Differential expression of alternatively spliced mRNA forms of the insulin-like growth factor 1 receptor in human neuroendocrine tumors. *Oncology Reports*, 15, 1249-1256.
103. Waldman Y.Y., Tuller T., Keinan A., Ruppin E. (2011) Selection for translation efficiency on synonymous polymorphisms in recent human evolution. *Genome Biol Evol.*, 3, 749-761.
104. Wang Y., Price S.E., Jiang H. (2003) Cloning and characterization of the bovine class 1 and class 2 insulin-like growth factor-I mRNAs. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 25, 315-328.
105. Wang X., Wurmser C., Pausch H., Jung S., Reinhardt F., Tetens J., Thaller G., Fries R. (2012) Identification and dissection of four major QTL affecting milk fat content in the German Holstein-Friesian population. *PLoS One*, 7, e40711.
106. Ward, C.W., Garrett, T.P.J., McKern, N.M., Lou, M., Cosgrove, L.J., Sparrow, L.G., Frenkel, M.J., Hoyne, P.A., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Lawrence, L.J., Tulloch, P.A. (2001) The three dimensional structure of the type I insulin-like growth factor receptor. *J. Clin. Pathol.*, 54, 125-132.
107. Weber M.S., Purup S., Vestergaard M., Akers R.M., Sejrsen K. (2000) Regulation of local synthesis of insulin-like growth factor-I and binding proteins in mammary tissue. *J. Dairy Sci.*, 83, 30-37.
108. Weller J.I., Ron M. (2011) Invited review: quantitative trait nucleotide determination in the era of genomic selection. *J Dairy Sci.*, 94, 1082-1090.
109. Wu X., Brewer G. (2012) The Regulation of mRNA Stability in Mammalian Cells: 2.0 *Gene*, 500, 10–21.

110. Xu L., Cole J.B., Bickhart D.M., Hou Y., Song J., VanRaden P.M., Sonstegard T.S., Van Tassell C.P., Liu G.E. (2014) Genome wide CNV analysis reveals additional variants associated with milk production traits in Holsteins. *BMC Genomics*, 15, 683.
111. Yonekura, S., Miyazaki, H. and Tokutake, Y. (2015) Comparative Expression profiling of lactogenic hormone receptor and its signaling molecules of bovine mammary glands during lactation. *Open J. Anim. Sci.*, 5, 106-113.
112. Zhang L.Z., Ren G., Hua L.S., Lan X.Y., Lei C.Z., Chen H. (2014) Polymorphism in the 5'-UTR of the insulin-like growth factor I gene associated with production traits in Chinese cattle. *Genet. Mol. Res.*, 13, 6899-6905.
113. Zheng S., Kim H., Verhaak R.G. (2014) Silent mutations make some noise. *Cell*, 156, 1129-1131.

Małgorzata Szewczyk

5. Pozostałe formy aktywności naukowo-badawczej

5.1. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Główne kierunki działalności naukowo-badawczej:

5.1.1. analiza wpływu czynników genetycznych i środowiskowych na wzrost, rozwój, produktywność i zdrowotność bydła;

5.1.2 badania nad związkiem między polimorfizmem wybranych genów a użytkowością mleczną i mięsną bydła;

5.1.3. ocena wskaźników użytkowych owiec i kóz w gospodarstwach o ekstensywnym systemie produkcji.

5.1.1. Analiza wpływu czynników genetycznych i środowiskowych na wzrost, rozwój produktywność i zdrowotność bydła

Ważnym kierunkiem mojej działalności naukowo-badawczej były zagadnienia związane z czynnikami genetycznymi i środowiskowymi mogącymi mieć wpływ na wzrost, rozwój oraz produktywność różnych ras bydła. Moje zainteresowania skupiały się przede wszystkim na zagadnieniach związanych z szeroko rozumianym odchowem cieląt w różnych systemach utrzymania.

Powszechnie wiadomo, że wychów cieląt stanowi jeden z istotnych elementów cyklu produkcji mleka i mięsa wołowego. Od tego właśnie okresu, kiedy to młode zwierzęta są najbardziej wrażliwe na działanie czynników środowiska zewnętrznego, w dużej mierze zależy późniejsza użytkowość i opłacalność produkcji. Istnieje wiele czynników wpływających na przebieg porodu, żywotność cieląt oraz wyniki ich odchowu, które szczegółowo opisano w opublikowanych pracach [K2, K4, D1, D3, D9, D44].

Właściwy dobór buhaja, płęć cieląt, wiek krów oraz udział genów bydła rasy HF w ich genotypie, mają wpływ na masę ciała cielęcia przy urodzeniu co ma związek z łatwością wycieleń i żywotnością nowonarodzonych cieląt [D3, K4, D9, D26, D44]. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem udziału genów bydła rasy HF porody były trudniejsze szczególnie u jałówek oraz następowało zwiększenie masy ciała nowonarodzonych cieląt [D3, K4]. W województwie zachodniopomorskim w większości analizowanych stad bydła mlecznego przeważają porody łatwe bez pomocy człowieka lub z jego niewielką pomocą [K4, D42, D26]. Ponadto zauważono, że istnieje powiązanie między porą roku a stopniem trudności porodu [D42, K4, D26], gdzie sezon letni sprzyja łatwym porodom, natomiast w sezonach zimowych wycielenia szczególnie pierwiastek wymagały pomocy.

Pierwsze miesiące życia cieląt są bardzo ważne, bowiem w tym czasie istnieją największe możliwości kształtowania tempa wzrostu i rozwoju organizmu przyszłej krowy, czy buhaja. Ocena prawidłowości tych procesów można przeprowadzić na podstawie zmian masy i wymiarów ciała [D3,

D9]. Stwierdzono, że masa ciała cieląt po urodzeniu oraz w kolejnych miesiącach odchowu powiązana jest z genotypem matki i sezonem wycielenia [D1, D3, D9, D26, D44].

Czynnikiem wpływającym na zróżnicowanie masy ciała cieląt przy urodzeniu i późniejszego tempa wzrostu jest płeć zwierząt. Buhajki rodzą się z reguły cięższe od cieliczek i szybciej rosną w okresie poporodowym [D26]. Nie zawsze tak jest co potwierdziły badania [D9, D2], gdzie zarówno masa ciała jak i przyrosty zasadniczo większe były u jałówek, chociaż nie we wszystkich początkowych miesiącach. Można to tłumaczyć tym, że hodowcy więcej uwagi poświęcali jałówkom jako materiałowi reprodukcyjnemu niż buhajkom, które po upływie 6 miesięcy poddawano ubojowi [D9].

W prawidłowym odchowie cieląt dużą rolę odgrywają warunki utrzymania w pierwszych dniach życia. Cielęta utrzymywane w budkach indywidualnych z wybiegiem charakteryzowały się większą masą oraz przyrostami dobowymi podczas odchowu, w porównaniu ze zwierzętami utrzymywanymi tradycyjnie w cielętniku. Ponadto były wyższe w krzyżu oraz miały bardziej pojemną klatkę piersiową od zwierząt utrzymywanych zbiorowo. Utrzymanie indywidualne cieląt sprzyjało mniejszej zachorowalności na schorzenia układu oddechowego i pokarmowego, ponadto nie zaobserwowano grzybic skóry, co często występuje przy zbiorowym utrzymaniu w cielętniku na wilgotnej ściółce. Stwierdzono pewien związek pomiędzy sezonem urodzenia a zdrowotnością cieląt. Największy procent cieląt chorych zaobserwowano w okresie jesienno-zimowym, natomiast najmniejszy wiosną i latem [K2, D1, D4, D9, D26]

Podstawowym warunkiem zachowania zdrowia cieląt jest zapewnienie im odpowiedniego poziomu biernej odporności przeciwwakażnej przez dostarczenie wraz z siarą potrzebnej ilości immunoglobulin. Nie zawsze jednak siara jest dobrej jakości lub z różnych przyczyn jest jej brak. W takich przypadkach alternatywą mogą być suplementy siary dodawane do mleka, bądź siary gorszej jakości. Z tego względu w kolejnych badaniach podjęto się oceny wpływu dodatku suplementu siary CotosanPlus® na odporność humoralną oraz wzrost i zdrowotność cieląt rasy HF. Stwierdzono korzystny wpływ zadawanego preparatu na zdrowotność i przyrosty masy ciała cieląt. Zwierzęta z grupy doświadczalnej w 3. miesiącu życia osiągnęły istotnie ($P \leq 0,01$) większą masę ciała i przyrosty dobowe za cały okres odchowu w stosunku do cieląt z grupy kontrolnej, które częściej chorowały. Nie stwierdzono znaczącego wpływu preparatu na poziom białka całkowitego oraz frakcji gamma-globulinowej w surowicy cieląt. Zastosowany preparat prawdopodobnie ograniczył wielkość występującego w tym wieku fizjologicznego spadku frakcji gamma-globulinowej w surowicy cieląt. Badania wskazują na konieczność praktycznej oceny jakości siary w celu zapewnienia jej optymalnego poziomu w dawkach pokarmowych dla cieląt rodzących się w różnych warunkach środowiskowych, ponadto wskazują na możliwość i celowość zastosowania tego preparatu szczególnie w przypadku braku siary lub jej złej jakości [A4].

Najlepsza jest kompleksowa ochrona młodych zwierząt jeszcze przed urodzeniem, dlatego też w kolejnych badaniach zastosowano preparat probiotyczny „Efektywne Mikroorganizmy” (EMTM) najpierw przed wycieleniem do oprysku miejsca odchowu cieląt (roztworem EMTM Refresh.), następnie

w sianie, mleku (EMTM Probiotyk) i paszy treściwej CJ (EMTM --Bokashi Probiotyk). Na każdym etapie odchowu średnie masy ciała oraz przyrosty dobowe cieląt z grupy eksperymentalnej (EXP) były znacząco większe od średnich wartości uzyskanych w grupie kontrolnej (C). Zaobserwowano, że cielęta z grupy EXP od urodzenia do 6 miesiąca życia nie chorowały, podczas gdy u cieląt z grupy kontrolnej stwierdzono schorzenia układu pokarmowego oraz zapalenia płuc z charakterystycznym męczącym kaszlem. Można tylko szacować, że dodatek probiotyków z serii EMTM może pozytywnie wpływać na wzrost i rozwój cieląt, a dodatkowy oprysk ściółki preparatem EMTH Refresh poprawia ich zdrowotność oraz daje możliwości wykorzystania obornika do nawożenia pobliskich pól [D43].

Wpływ dodatku preparatu drożdżowego zawierającego biopleksy mineralne Cu, Zn, Mn, Se, Cr (podawanego od 10 do 90 dnia życia) na wzrost, rozwój i zdrowotność cieląt badano w pracy [D2]. Nie stwierdzono korzystnego wpływu preparatu na zdrowotność i przyrosty masy ciała cieląt, co może świadczyć o prawidłowym zbilansowaniu dawki pokarmowej pod względem ilości, jakości i zawartości skarmianych pasz, a szczególnie witamin i składników mineralnych [D2].

We współpracy z Krajową Stacją Badawczą Rolnictwa i Rybactwa w Dummerstorfie prowadzono badania dotyczące porównania aktywności cieląt buhajków rasy cb przeznaczonych do dalszego opasu w zależności od wieku i systemu utrzymania (cielętnik – kojce zbiorowe; budki zbiorowe typu igloo na wolnym powietrzu). Cielęta młodsze charakteryzowały się mniejszą aktywnością w nocy zarówno w cielętniku jak i w igloo, natomiast w dzień aktywność ta wzrastała. Buhajki zarówno w wieku 7-8 tygodni jak i 11-12 tygodni wykazały się zbliżoną aktywnością w porównywanych systemach odchowu. Stwierdzono, że cielęta młodsze były mniej ruchliwe niż starsze [D6]. Wspólnie realizowaliśmy projekt pt. "Wpływ zróżnicowanej intensywności odchowu cieląt na długość użytkowania krów rasy holsztyn niemiecki", następnie uzyskane wyniki opublikowano w pracach dotyczących wzrostu i rozwoju oraz wydajności mlecznej bydła rasy holsztyn niemiecki. Analizowano parametry budowy i rozwoju jałowic w różnych okresach życia (między 7 a 15 miesiącem życia) oraz ocenę kondycji zwierząt (BCS) w różnych systemach utrzymania. Pastwiskowy system utrzymania w stosunku do alkierzowego okazał się lepszy, ponieważ korzystnie wpłynął na osiągnięte wartości masy ciała, wielkość przyrostów dobowych i kondycję zwierząt [D13]. W późniejszych badaniach stwierdzono, że krowy utrzymywane w systemie pastwiskowym łatwiej się wycielają i dawały o 10% więcej mleka w pierwszych 100 dniach laktacji, a ich wydajność mleczna szacowana za 305 dni była również większa [A2].

W pracy [A10] przedstawiono analizę wartości genetycznych cech pokroju krów rasy PHF odmiany czarno-białej w 21 stadach oraz ich korelacji z cechami mleczności. W ocenie wartości hodowlanej zastosowano model mieszany w metodzie BLUP. Uzyskane wyniki wskazują na systematyczny wzrost analizowanych cech (pozytywne tendencje genetyczne), zarówno dla cech mlecznych i cech pokroju (oprócz temperamentu).

Wobec różnych wyników dotychczasowych badań dotyczących zależności między wiekiem pierwszego wycielenia (WPW) a wydajnością i składem mleka postanowiono w kolejnych pracach

ocenić wpływ wieku pierwszego ocielenia na produkcyjność mleczną krów uwzględniając genotyp (różny udział w genotypie zwierząt genów bydła HF [D7] oraz kraj pochodzenia [D10, D14, D21, D36]). Otrzymane wyniki wskazują, że najkorzystniejsze jest krycie jałówek rasy simentalskiej, tak aby ocielenie wystąpiło po ukończeniu 30 miesiąca ich życia, ponieważ od takich zwierząt można uzyskać najwięcej mleka, tłuszczu i białka. Stwierdzono, że w tym przypadku WPW istotnie ($P \leq 0.01$) wpływał na wydajność i skład mleka tylko w pierwszej laktacji, dlatego celowe wydaje się być prowadzenie badań na innych, większych populacjach krów uwzględniając ponadto dodatkowe aspekty jak system chowu, późniejsze laktacje, czy też kondycję i zdrowotność zwierząt [D45]. W miarę zwiększania się w genotypach krów genów bydła HF wydłużał się WPW, ale poprawiały się relacje RTB (różnica między zawartością tłuszczu i białka) i IPB (indeks produkcji białka) [D7]. Zaobserwowano, że zwierzęta importowane cielily się wcześniej od krajowych oraz uzyskiwały korzystniejsze wskaźniki rozrodcze [D10, D14, D21, D36]. Kraj pochodzenia jałowic cielnych miał również związek z WPW zwierząt [D10, D14, D21, D36].

Istotnym nurtem badawczym były obserwacje dotyczące kształtowania się cech użytkowości mlecznej oraz parametrów rozrodczych krów pierwiastek krajowych oraz importowanych z Danii, Holandii, Szwecji i Niemiec [D10, D14, D18, D19, D21, D24, D36, D37]. Badania wykazały, że import zwierząt z krajów Unii Europejskiej w przypadku zapewnienia im odpowiednich warunków podczas transportu, prawidłowego żywienia i utrzymania pozwoli na ujawnienie się ich wysokiego potencjału genetycznego. Stwierdzono, że pierwiastki importowane z Danii, Holandii i Szwecji uzyskały w pierwszej laktacji 305 dniowej większą wydajność mleka, tłuszczu i białka w porównaniu z krowami krajowymi ($P \leq 0,01$ i $P \leq 0,05$) [D10, D14]. Nie zawsze jednak warunki przyrodnicze, w jakich będzie przebywało sprowadzone bydło zapewnią wysoką wydajność i ograniczą problemy związane z płodnością, co potwierdzono w badaniach [D21, D36, D37]. Krowy krajowe uzyskały większą wydajnością mleka o mniejszej zawartości tłuszczu w pierwszej 305-dniowej laktacji w porównaniu z importowanymi z Niemiec. Wydajność białka kształtowała się na tym samym poziomie [D21]. W przypadku importowanych jałowic cielnych ze Szwecji zaobserwowano trudności z aklimatyzacją w nowych warunkach. Krowy krajowe osiągnęły większą wydajność mleka i uzyskały korzystniejsze wartości RTB (różnica między zawartością tłuszczu i białka) i SBT (stosunek zawartości białka do tłuszczu) w obu laktacjach [D36]. W innych badaniach wyniki analizy wydajności mleka, białka oraz tłuszczu wskazały istotną przewagę krów pochodzących z Polski nad importowanymi ze Szwecji i Niemiec. W przypadku parametrów technologicznych mleka okazało się, że krowy z Polski wykazały przewagę nad importowanymi również w odniesieniu do zawartości kazeiny, suchej masy i masy beztłuszczowej mleka. Najwyższy poziom β -laktoglobuliny i albuminy serum stwierdzono w mleku krów pochodzących ze Szwecji, podczas gdy w mleku krów pochodzących z Polski zaobserwowano najwyższy poziom α -laktoalbuminy, laktoferyny i laktoperoksydazy [D37]. Wyżej opisane badania wskazują, że jedynie wprowadzenie zwierząt o wysokim potencjale genetycznym przy zapewnieniu im optymalnych warunków środowiskowych może przynieść wymierne korzyści i przyczynić się do

poprawy jakości mleka. Pochodzenie zwierząt istotnie determinuje skład frakcji białkowej oraz przydatność technologiczną mleka.

Przy imporcie zwierząt ważna jest kontrola parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi po transporcie, ponieważ w badaniach [D19] wykazano znaczne odchylenia od wartości referencyjnych w obu grupach jałówek (Holandia, Szwecja), które mogły być związane ze stresem spowodowanym transportem oraz gorszą adaptacją i aklimatyzacją do nowego środowiska. Kompleksowa opieka zootechniczno-weterynaryjna nad stadami w kolejnych miesiącach mogła przyczynić się do pozytywnej oceny przebiegu procesu adaptacji zwierząt importowanych z Holandii do nowych warunków, o czym świadczy wysoka wydajność mleka, FCM, tłuszczu i białka oraz większa zawartością tłuszczu i białka w mleku. Natomiast, do produkcji serowarskiej i galanterii mleczarskiej bardziej przydatne wydaje się być mleko krów pochodzących ze Szwecji, gdyż charakteryzuje się wyższą koncentracją białka i kazeiny w mleku oraz korzystniejszym stosunkiem białkowo-tłuszczowym [D18, D19]. Zaobserwowano również, że kraj pochodzenia nie miał związku z łatwością wycieleń i masą urodzeniową cieląt [D36].

Moje zainteresowania naukowe związane były również z poszukiwaniem optymalnych metod diagnostycznych pozwalających w łatwy i szybki sposób ocenić stan zdrowia zwierząt utrzymywanych w dużych stadach [D15, A6].

Kontrola stanu zdrowia poprzez wykonanie proteinogramów i określenie na ich podstawie stężenia immunoglobulin oraz stosunku poszczególnych frakcji białkowych jest bardzo ważna i może być przydatna w ocenie stanu odporności i zdrowotności zwierząt hodowlanych, szczególnie wtedy, kiedy nie wystąpiły jeszcze objawy kliniczne. Ma to duże znaczenie zwłaszcza przy grupowym utrzymaniu cieląt w pierwszych miesiącach życia, gdzie istnieje niebezpieczeństwo szybkiego rozprzestrzenienia choroby w wyniku zakażenia wirusowego (np. wystąpienie bronchopneumonii) bądź bakteryjnego (objawiającego się biegunką) co potwierdziły badania [D15].

Powszechnie wiadomo, że enzootyczna białaczka bydła jest zakaźną chorobą bydła, której czynnikiem etiologicznym jest wirus BLV (ang. Bovine Leukemia Virus). Źródłem zakażenia są zarówno zwierzęta chore z objawami klinicznymi jak i zwierzęta w okresie wylegania choroby oraz te u których objawy kliniczne są niewidoczne. Wczesne wykrycie nosicieli nie tylko ma szansę na poprawę zdrowotności stada, ale może znacząco wpłynąć na ekonomikę produkcji, dlatego też oceniono możliwość wykorzystania molekularnego testu multiplex PCR jako alternatywy dla powszechnie stosowanego serologicznego testu ELISA w diagnozowaniu zakażeń wirusem enzootycznej białaczki bydła. Zarówno test serologiczny ELISA jak i genetyczny PCR cechują się dużą czułością. Test ELISA ze względu na czas wykonania i koszty całej analizy powinien być stosowany skryningowo w stadach wielkotowarowych, natomiast test PCR powinien być wykorzystywany w dużych stadach wówczas, gdy w teście ELISA stwierdzono występowanie zwierząt seropozytywnych. Ma to na celu wykrycie prowirusa BLV u osobników z brakiem obecności przeciwciał przeciwko BLV. Hodowca może podjąć decyzję o eliminacji takiego osobnika już w wieku cielęcym, a więc zdecydowanie wcześniej niż w przypadku zastosowania testu ELISA. W stadach wolnych od białaczki przed wprowadzeniem nowych

osobników pochodzących z zakupu powinno się przeprowadzać badanie genetyczne w celu wykluczenia obecności prowirusa BLV w limfocytach mimo negatywnego wyniku testu ELISA [A6].

Badania nad wpływem różnych czynników wpływających na produktywność wysokowydajnych krów HF były również przedmiotem moich badań [D5, D20, D33]. Porównywano jakość mleka surowego pozyskiwanego różnymi systemami doju mechanicznego i stwierdzono, że zarówno system bańkowy jak i przewodowy w analizowanym gospodarstwie pozwoliły na pozyskanie mleka wysokiej jakości spełniającego wymogi jakościowe klasy ekstra. Mleko pozyskiwane systemem bańkowym odznaczało się mniejszą liczbą komórek somatycznych, natomiast pozyskiwane systemem przewodowym zawierało mniej bakterii [D5]. Stwierdzono, że na wydajność i skład mleka ma wpływ sezon i częstotliwość doju. Wykazano różnicę w wydajności dobowej krów przy doju czterokrotnym w porównaniu z dwukrotnym. Różnice istotne ($P \leq 0,01$) stwierdzono w okresie wiosny i lata. Analizując liczbę komórek somatycznych mleka, stwierdzono, że była ona najwyższa w sezonie jesiennym w obu porównywanych grupach ($P \leq 0,01$) [D33]. Wykazano również związek pomiędzy systemem utrzymania a wydajnością mleczną i parametrami rozrodu krów o wysokim potencjale genetycznym [D5, D20]. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że większą życiową wydajność mleka, FCM, tłuszczu i białka, jak również zawartość tłuszczu i białka w mleku osiągnęły krowy utrzymywane wolnostanowiskowo w porównaniu do zwierząt z obory alkierzowej ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,01$). Krowy utrzymywane systemem wolnostanowiskowym uzyskały korzystniejsze wskaźniki płodności, charakteryzowały się łatwiejszymi porodami oraz lepszą żywotnością nowo narodzonych cieląt w porównaniu do krów utrzymywanych alkierzowo na uwięzi [D20]. Natomiast, krowy utrzymywane w systemie pastwiskowo-alkierzowym dawały więcej mleka od utrzymywanych wyłącznie w systemie alkierzowym w oborze ściółkowej na uwięzi [D5].

Zainteresowanie chowem bydła mięsnego w województwie zachodniopomorskim w ostatnich latach wzrosło, co jest związane m.in. z koniecznością wykorzystania dużego areału trwałych użytków zielonych. W gospodarstwach ekologicznych coraz częściej hodowcy decydują się na utrzymanie bydła rasy limousine i mieszańców tej rasy. Krowy czystorasowe cechują się większymi masami ciała, wyższymi wymiarami w krzyżu oraz mniejszym obwodem klatki piersiowej niż mieszańce. Osobniki czystorasowe odznaczały się nieznacznie korzystniejszymi wskaźnikami płodności, dobrą mlecznością, a cielęta wysokimi przyrostami dobowymi w 210 dniu życia [D31].

Na podstawie wyników badań [D32, D34] stwierdzono, że całoroczne utrzymanie mięsnych ras bydła jak: simental, hereford, red angus, limusine w systemie bezbudynkowym, przy dokarmianiu cieląt paszą treściwą daje dobre wyniki odchowu oraz pozwala na osiągnięcie korzystnych jak dla tych ras mas ciała, parametrów wzrostowych, dobrej mleczności matek oraz prawidłowych wskaźników użytkowości rozplodowej.

5.1.2. Badania nad związkiem między polimorfizmem wybranych genów a użytkowością mleczną i mięsną bydła

Ważnym kierunkiem moich badań była walidacja znanych i poszukiwanie nowych miejsc polimorficznych, które w przyszłości mogłyby pełnić rolę markera genetycznego cech użytkowych bydła mięsnego i mlecznego. Moje zainteresowania związane były przede wszystkim z genami kodującymi elementy systemu IGF, jako uzupełnienie cyklu publikacji powiązanych tematycznie (pkt 4.2.).

Z tego względu podjęto pierwsze tego typu badania na *Bos taurus* związane z polimorfizmami w regionie kodującym genu *IGF1R*, których celem było oszacowanie frekwencji alleli i genotypów *IGF1R/MspI* (cicha mutacja w obrębie eksonu 12) i *IGF1R/TaqI* (w obrębie regionu nie ulegającego translacji, 3'UTR) u bydła rasy angus oraz sprawdzenie ewentualnego związku między tymi polimorfizmami a cechami wzrostu (urodzeniową masą ciała, masą ciała standaryzowaną na 210 dzień życia, przyrostami dobowymi od urodzenia do 210 dnia odchowu). Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, że osobniki o genotypie *GG IGF1R/e12/MspI* charakteryzowały się istotnie ($P \leq 0.05$) większymi masami ciała w 210 dniu odchowu (+5.06 kg) w porównaniu z rówieśnikami heterozygotycznymi *AG*. Stwierdzono również, że polimorfizm zlokalizowany w regionie 3'UTR (*IGF1R/TaqI*) nie miał istotnego wpływu na cechy wzrostu. Rozpatrywano również genotypy kombinowane, gdzie największą masę ciała w 210 dniu życia oraz przyrosty dobowe od urodzenia do odsadzenia wykazano u cieląt o układzie *GG/AG*, najmniejszą natomiast w przypadku kombinacji osobników heterozygotycznych *AG/AG* ($P \leq 0.05$) [A7].

Z danych literaturowych wynika, że za wyjątkiem genu *IGF1* jak dotąd nie podjęto szczegółowych badań nad wpływem nowo odkrytych mutacji w genie *IGF1R* w powiązaniu z masą urodzeniową cieląt. Przeprowadzono analizę statystyczną zależności pomiędzy genotypami trzech układów (*IGF1R/e7/TaiI*, *IGF1R/e12/MspI*, *IGF1R/e21/TaqI*) a urodzeniową masą ciała cieląt po I i II wycieleniu krów. W przypadku układu *IGF1R/TaiI* zidentyfikowano obecność tylko dwóch genotypów. Największą średnią urodzeniową masę ciała stwierdzono u cieląt z I i II wycielenia, których matki miały genotyp *CC* w porównaniu do matek heterozygotycznych ($P \leq 0.01$). Analizując polimorfizm *IGF1R/MspI* zauważono, iż podobnie jak w pracy [A7] średnia masa ciała cieląt niezależnie od kolejności wycielenia była największa u osobników o genotypie matek *GG*, najmniejsza natomiast u cieląt po krowach *AA* cielących się pierwszy raz, natomiast *AG* w przypadku II wycielenia ($P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$). W trzecim analizowanym układzie *IGF1R/TaqI*, krowy o genotypie *AA* rodziły zawsze cięższe cielęta. W celu potwierdzenia znaczenia zaobserwowanych zależności, analizowano układy kombinowane genotypów. Najczęstszą frekwencję stwierdzono w przypadku kombinacji *CC/GG/GG*. Tak jak zaobserwowano dla pojedynczych układów krowy o kombinacji *CC/GG/AA*, niezależnie od kolejności wycielenia dawały potomstwo o największej masie urodzeniowej ($P \leq 0.01$). Uzyskane wyniki

mogą sugerować, że *IGF1R* może być uważany za obiecujący gen kandydujący do roli markera genetycznego w poprawie cech związanych z mięsnością u bydła [A11].

W pracy [A13] podjęto badania mające na celu opracowanie metod detekcji cichej mutacji rs 41961336 (C→T) w eksonie 7 genu *bIGF1R* oraz poszukiwanie związku pomiędzy analizowanym miejscem polimorficznym a wzrostem bydła 4 ras (polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, angus, limousine, hereford). Genotyp *CC* występował najczęściej u wszystkich ras ($0,7987 \div 0,9904$). Do dalszych badań asocjacyjnych wybrano rasę angus. W przypadku rodzących się cieląt stwierdzono, że ich masy po urodzeniu były zbliżone, natomiast istotnie ($P \leq 0,05$) większe w 210 dniu odchowu zaobserwowano u osobników o genotypie *CC*. Zauważono, że masa ciała krów cielących się po raz pierwszy była większa u osobników heterozygotycznych *CT* (10,62 kg; $P \leq 0,05$). W niniejszej pracy nie stwierdzono istotnych zależności między polimorfizmem w *IGF1R/TaiI* z przyrostami dobowymi oraz wiekiem pierwszego wycielenia, dlatego istotne jest prowadzenie dalszych badań na większych populacjach.

Zależności pomiędzy genotypami *IGF1* a mlecznością bydła rasy holsztyńsko-fryzyjskiej są tematem prezentowanego cyklu publikacji powiązanych tematycznie (pkt. 4.2.). Badania [A8] poszerzają wiedzę z tego zakresu i wnoszą nowe elementy dotyczące okresu odchowu młodych zwierząt. Celem niniejszej pracy było oszacowanie ewentualnych zależności pomiędzy genotypami insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I (*IGF1/TasI* i *IGF1/SnaBI*) a parametrami wzrostu i rozwoju cieląt (masa ciała, przyrosty dzienne) i ich późniejszą użytkowością mleczną (wydajnością mleka, tłuszczu i białka oraz zawartością tłuszczu i białka). W układzie *IGF1/SnaBI* genotyp *CC* miał korzystny wpływ na masę ciała w 2. miesiącu życia cieląt przyrosty dzienne masy ciała od 1 do 2. miesiąca ($P \leq 0,05$), jak również późniejsze wydajności: mleka, tłuszczu i białka ($P \leq 0,01$). W przypadku polimorfizmu *IGF1/TasI* zaznaczył się wyraźny korzystny wpływ genotypu *AC* na masę ciała w 60 dniu życia i średnie przyrosty dobowe od 2 do 3 miesiąca życia oraz dla całego okresu odchowu ($p \leq 0,05$). Wysokie frekwencje genotypów obu układów umożliwiły przeprowadzenie badań asocjacyjnych genotypów kombinowanych. W przypadku masy ciała młodych zwierząt nie stwierdzono wyraźnych zależności. W okresie od 1 do 2 miesiąca odchowu u osobników z kombinacją genotypów *CC/AA* zauważono największe przyrosty dobowe ($P \leq 0,05$). Najwyższą wydajność mleka ($P \leq 0,01$) oraz tłuszczu i białka ($P \leq 0,05$) wykazano u krów o tej samej kombinacji genotypów. Analizowane polimorfizmy mogłyby być przydatne w selekcji zmierzającej do zwiększenia masy ciała, przyrostów dobowych cieląt w różnych okresach życia oraz późniejszej wydajności i składu mleka. Jednakże wykorzystanie otrzymanych w pracy wyników do zastosowania jako kryterium wczesnej selekcji wymagałoby zweryfikowania w kolejnych badaniach z tego zakresu.

W związku z tym, że system insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 odgrywa kluczową rolę we wzroście i rozwoju gruczołu mlekowego, postanowiono sprawdzić, czy istnieje związek pomiędzy analizowanymi 5 miejscami polimorficznymi w genach *IGF1* (analizowane miejsca polimorficzne szerzej opisano w rozdziale 4.2.) i *IGF1R* (rs41961336, rs41640706 i rs41960562), a wydajnością i składem mleka krów rasy montbeliarde w dwóch 305 dniowych laktacjach. W przypadku 3 miejsc

polimorficznych w genie *IGF1R*, nie ujętych w cyklu publikacji powiązanych tematycznie stwierdzono istotny związek z użytkowością mleczną krów. W odniesieniu do polimorfizmu *IGF1R/TaiI* osobniki z genotypem *CC* wykazały się największą wydajnością mleka (+ 492 kg), tłuszczu (+ 29 kg) i białka w pierwszej laktacji ($P < 0,05$). W układzie *IGF1R/MspI*, u osobników z genotypem *GG* zawsze obserwowano mniejsze wydajności mleka i tłuszczu niezależnie od laktacji. Potwierdzono również istotny związek pomiędzy genotypami *IGF1R/TaqI* a użytkowością mleczną w obu laktacjach (najlepsze były osobniki o genotypie *AA*). Zgodnie z obserwacjami krowy o kombinacji genotypów *TaiI^{CC}/MspI^{AA}/TaqI^{AA}* ($n = 11$ w pracy) cechowały się największą wydajnością mleka, tłuszczu i białka w porównaniu z najliczniejszą grupą osobników w stadzie ($n = 79$) kombinacji *TaiI^{CC}/MspI^{GG}/TaqI^{GG}* [A12].

Kolejne badania [A14] koncentrowały się na rasie simental i dotyczyły miejsc polimorficznych analogicznych do opisanych w pkt. 4.2. cyklu publikacji powiązanych tematycznie, gdzie zacytowano wyniki tej pracy.

Podczas analizy polimorfizmów zlokalizowanych w intronie 4 genu kodującego receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (*IGF1R*) prowadzono badania na stadzie 184 krów rasy holsztyńsko-fryzyskiej. Polimorfizm genu *IGF1R* identyfikowano metodą PCR-RFLP z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych: *HinfI* oraz *Mph1103I*. W układzie *IGF1R/HinfI* stwierdzono najwyższą frekwencję genotypu *BB*, zbliżoną w przypadku genotypu *AB*, a najniższą dla genotypu *AA*. Frekwencja alleli kształtowała się następująco: allel *A* – 0,27, allel *B* – 0,72. Wyniki analizy wskazywały na powiązanie rozpatrywanego polimorfizmu z wydajnością mleka, białka ($p \leq 0,01$) oraz tłuszczu ($p \leq 0,05$) w mleku, faworyzując genotyp *BB*, natomiast dla polimorfizmu *IGF1R/Mph1103I* w przypadku analizowanych parametrów nie wykazano żadnego związku. Statystycznie istotne różnice ($p \leq 0,05$) zaobserwowano jedynie w % zawartości tłuszczu i białka w mleku ze wskazaniem na pozytywny wpływ genotypu *BB*. Ponadto w układzie *IGF1R/Mph1103I* odnotowano brak osobników o genotypie *AA* [D25].

Jakość odżywcza mleka zależy od czynników genetycznych i środowiskowych. Mleko krowie i przetwory mleczne stanowią główne źródło białka zwierzęcego w diecie człowieka. Współczesna genetyka molekularna nieustannie poszukuje markerów genetycznych, które umożliwiłyby bezpośrednią selekcję na cechy użytkowe, co mogłoby znacznie przyspieszyć postęp hodowlany w populacjach zwierząt i ułatwić rozwiązanie wielu problemów natury żywieniowej i zdrowotnej. Kolejnym zagadnieniem badawczym była analiza dwóch wariantów genetycznych *IGF1/SnaBI* i *IGF1R/HinfI* u bydła holsztyńsko-fryzyskiego odmiany czarno-białej oraz poszukiwanie związku pomiędzy tymi polimorfizmami a wydajnością, składem oraz wybranymi parametrami technologicznymi mleka. Dotychczas tego typu badania nie były publikowane. W układzie *IGF1R/HinfI* odnotowano brak osobników o genotypie *AA*, natomiast w przypadku *IGF1/SnaBI* homozygot *BB*. W badaniach stwierdzono, że krowy o genotypie *IGF1/SnaBI AB* charakteryzowały się większą wydajnością mleka, tłuszczu i białka niż krowy o genotypie *AA*. Natomiast genotyp *AA* związany był z większą zawartością

białka, tłuszczu, laktozy i mocznika (193 mg / l) oraz mniejszą ilością komórek somatycznych (SCC - 105 x 1000 w 1 ml³) w mleku. Wykazano korzystny związek między wariantem genetycznym *BB* polimorfizmu *IGF1R/HinfI* a badanymi cechami użytkowości mlecznej (wydajnością mleczną, FCM, wydajnością tłuszczu i białka jak również procentową zawartością tłuszczu, białka w mleku). Analiza parametrów mleka związanych z jego przydatnością technologiczną wykazała, że mleko pochodzące od krów o genotypie *BB* (*IGF1R/HinfI*) oraz *AB* (*IGF1/SnaBI*) cechuje się wyższą koncentracją kazeiny, wyższą kwasowością potencjalną oraz zawartością kwasu cytrynowego. Mleko krów o genotypie *IGF1R/HinfI* *BB* zawierało więcej funkcjonalnych białek serwatkowych, tzn. β -laktoglobuliny (β -LG), α -laktoalbuminy (α - LA), laktoferyny (Lf), laktoperoksydazy (Lp) i lizozymu (Lz), a genotyp *AA* związany był z najniższą zawartością lizozymu ($P \leq 0,05$), natomiast w mleku krów o genotypie *IGF1/SnaBI* *AA* wykazano niższą zawartość β - LG, α - LA, Lp, Lf [38].

Wskazówki dotyczące możliwości wykorzystania informacji o analizowanych miejscach polimorficznych w powiązaniu z doskonaleniem cech związanych z użytkowością mleczną i mięsną bydła powinny być jednak poparte dalszymi badaniami prowadzonymi na większych stadach i różnych rasach bydła.

Istotnym składnikiem mleka odgrywającym dużą rolę w przetwórstwie jest białko. Zwiększenie jego poziomu w mleku możliwe jest na drodze pracy hodowlanej. Szybkim sposobem przyspieszenia tego procesu mogą być najnowsze badania skupiające się na wykorzystaniu narzędzi genetyki molekularnej, a opierające się o polimorfizm białek mleka. Potwierdzono duże znaczenie genów kappa-kazeiny (*CASK*) oraz beta- laktoglobuliny (*BLG*) uznawanych za markery genetyczne przydatności technologicznej mleka.

Analiza polimorfizmu genów kodujących białka mleka *CASK* i *BLG* krów rasy polskiej holsztyńsko fryzyjskiej odmiany czarno - białej wykazała duże zróżnicowanie genetyczne. Genotyp *CASK*^{AA} występował najczęściej. Krowy o tym genotypie charakteryzowały się największą wydajnością mleka, tłuszczu i białka w pierwszej i drugiej laktacji, natomiast genotyp *CASK*^{BB} związany był z największą zawartością tłuszczu i białka w analizowanych laktacjach. Biorąc pod uwagę wyższą zawartość białka w mleku krów o genotypie *BB* można uznać, że stanowi ono surowiec bardziej przydatny do produkcji serów przede wszystkim podpuszczkowych w aspekcie technologicznym i ekonomicznym [D35, D39].

Beta-laktoglobulina jako białko serwatkowe odgrywa ważną rolę w kształtowaniu cech fizykochemicznych mleka i przetworów oraz jako białko antygenowe u niektórych ludzi może być przyczyną alergii. W badaniach prowadzonych na stadach bydła HF stwierdzono występowanie trzech genotypów: *AA*, *AB*, *BB*, przy czym dominowały homozygoty *BLG* *BB*. Otrzymane wyniki wskazują na tendencję do wzrostu wydajności mlecznej krów o genotypie *BLG* *AA* w analizowanych 305 dniowych laktacjach. Największą wydajność tłuszczu i białka osiągnęły krowy rasy HF o genotypie *BLG* *AA* w dwóch laktacjach, natomiast w grupie krów HF importowany ze Szwecji najwyższą zawartość i wydajność tłuszczu stwierdzono u homozygot *BB* we wszystkich badanych laktacjach [D12, D30].

5.1.3. Ocena wskaźników użytkowych owiec i kóz w gospodarstwach o ekstensywnym systemie produkcji

Ważnym kierunkiem badawczym były prace dotyczące aklimatyzacji szorstkowłosych owiec pomorskich (Rauhwollige Pommersche Landschafe - RPL) sprowadzonych w 2004 roku z Rugii (Niemcy) do Polski. W tym czasie powstało szereg prac dotyczących restytucji tej rasy na pradawne tereny jej występowania – Wybrzeże Szczecińskie i ochrona jej przed wymarciem [D47, D48, K9, K13]. Należy wspomnieć, że populacja RPL w Niemczech (główne obszary chowu i hodowli to Rugia i Hiddensee, część wyspy Uznam) objęta jest hodowlą zachowawczą ze względu na małą liczebność i zagrożenie wyginięciem. Początkowo reintrodukowane z Rugii stado liczyło 33 maciorki i 3 tryki w wieku 5 miesięcy [D47, K13]. Na koniec 2009 roku stado liczyło już 87 matek i 5 tryków [K9].

Zwierzęta umieszczono w gospodarstwie ekologicznym w Czarnocinie, woj. zachodniopomorskie, gdzie były wykorzystywane w pielęgnacji krajobrazu Łąk Skoszewskich Basenu Czarnocińskiego - cennych przyrodniczo obszarów Polski włączonych do europejskiej sieci NATURA 2000. Typowymi siedliskami są tam tzw. solniska, okresowo zalewane lekko zasolonymi wodami Zalewu Szczecińskiego porośnięte unikatową roślinnością halofilną, wymagającą do swego istnienia ekstensywnego, okresowego wypasania. W ostatnich latach zaobserwowano ekspansję niepożądaną roślinności i zubożenie flory i fauny tych ekosystemów. Aby temu zapobiec i poprawić bioróżnorodność florystyczną i ornitologiczną wprowadzono ekstensywny wypas kilku gatunków zwierząt gospodarskich (owce, bydło, konie). Zaobserwowano, że RPL wykazują się dobrą zdrowotnością, odpornością na choroby i niekorzystne warunki atmosferyczne, małymi wymaganiami żywieniowymi, dlatego mogą być wykorzystywane do pielęgnacji krajobrazu. Pozostawiają odchody, które sprzyjają wytworzeniu gęstej darni, odpornej na podmywanie, uszczelniającej i chroniącej nasypy. Poza pielęgnacją runi, pasąc się odstraszały swoim głośnym chodem bytujące w sąsiedztwie wodne gryzonie, które drążyły korytarze w umocnieniach ziemnych, co prowadzi do rozszczelnienia i zaburzenia zdolności powstrzymywania wody [D47, D48, D49]. Małopolski Ośrodek Doradztwa Rolniczego w Karniowicach we współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym w Krakowie m.in. w oparciu o nasze doświadczenia rozpoczął projekt badawczy – wdrożeniowy pt. ”Analiza wykorzystania małych zwierząt trawożernych do innowacyjnego, naturalnego utrzymania obwałowań przeciwpowodziowych we właściwym stanie”.

Kolejnym etapem badań było oszacowanie niektórych cech użytkowych owiec tej rasy. Stwierdzono, że średnia masa ciała w 2 i 100 dniu po urodzeniu oraz średnie przyrosty dobowe jagniąt w dwóch badanych latach kształtują się na zbliżonym poziomie. Niestety wskaźnik płodności w stadzie uległ pogorszeniu z 93,6% w 2008 roku do 78,7% w 2009 roku. Zwiększyła się liczba jagniąt w miocie, na co wskazują wysoka jak dla tej rasy wartość wskaźnika plenności powyżej 177%. Troskliwość i opiekuńczość matek wyrażona w odchowcie jagniąt w obu analizowanych latach nie była niższa niż 91,8% [K13]. W innej pracy [K9] ocenie poddano masę ciała zwierząt, niektóre pomiary zoometryczne, grubość i wysadność wełny oraz podstawowe wskaźniki użytkowości reprodukcyjnej maciorek. Zaobserwowano, że analizowane parametry były podobne u obu płci i były zbliżone do

przedstawionych w pracy [D47], co świadczy o dobrej aklimatyzacji zwierząt. Dalsza część obserwacji reintrodukowanego stada polegała na badaniach dotyczących oceny wartości rzeźnej i jakości mięsa jagniąt [D22, D23]. W piśmiennictwie brakuje prac dotyczących wartości rzeźnej i jakości mięsa wymienionej rasy owiec pozyskiwanego w warunkach ekstensywnego żywienia, głównie ze względu na pasze pochodzące z okresowo zatapianych łąk, dlatego przeprowadzono badania [D23] na 20 tuszkach 120-dniowych jagniąt tryczków RLP. Określono wartość rzeźną tuszek i oznaczono jakość mięsa wydzielonego z łopatki, polędwicy i udźca poprzez oznaczenie składu chemicznego, cech fizykochemicznych i sensorycznych. Na podstawie wyników pomiaru barwy mięsa stwierdzono, że mięso z łopatki charakteryzowało się jaśniejszą barwą, mniejszym udziałem barwy czerwonej i żółtej niż mięso z mięśnia najdłuższego i z udźca. Mięso z pochodzące z tych wyrębów cechowało się bardzo dobrą kruchością, soczystością i smakowitością. Również zapach oceniono bardzo dobrze. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że wskaźnik wydajności rzeźnej ocenianych jagniąt w warunkach ekstensywnego żywienia i utrzymania kształtował się na poziomie około 41% oraz, że mięso cechowało się dobrą jakością [D23].

W kolejnych badaniach oceniono wartość rzeźną i jakość mięsa jagniąt RLP pochodzących z dwóch wykotów: wczesnowiosennego i wczesnoletni, odchowywanych w warunkach ograniczonego żywienia do średniej masy ciała około 24 kg. Dokonano pomiarów tuszek, rozbiórki tusz na podstawowe wyręby, przy czym udziec i łopatkę poddano dysekcji na mięso, tłuszcz i kości. W przypadku analiz fizykochemicznych pobrano próby tkanki mięśniowej z łopatki, mięśnia najdłuższego grzbietu oraz udźca. Do osiągnięcia założonej masy ciała jagnięta z wykotów wczesnowiosennych (grupa I) potrzebowały 140 dni, zaś jagnięta wczesnoletnie (grupa II) – 110 dni. Żywienie matek jakościowo słabą paszą (głównie miernej jakości siano) spowodowało wydłużenie okresu potrzebnego jagniętom z urodzeń wczesnowiosennych do osiągnięcia masy ciała 24 kg aż o 4 tygodnie. Uzyskane wyniki wskazały, że tucz ekstensywny, związany ze słabym żywieniem nie pozwala na osiągnięcie optymalnego wzrostu mięśni. Masa podrobów i ich procentowy udział w masie ciała był większy u jagniąt z grupy I. Mięso tych zwierząt miało jaśniejszą barwę, charakteryzowało się wyższym pH₂₄, mniejszym wyciekami cieplnym i mniejszą zawartością wody wolnej. Łopatka jagniąt z grupy II była mniej otłuszczona. Termin wykotów nie miał wpływu na masę i udział w tuszy ocenianych wyrębów oraz na atrakcyjność sensoryczną gotowanego mięsa i bulionu [D22].

Odchów jagniąt stanowi bardzo ważną składową cyklu produkcyjnego. W początkowym okresie życia młode zwierzęta narażone są na wiele czynników stresowych (nowe otoczenie, odłączenie od matki, niewłaściwe warunki zoohigieniczne, zmiana żywienia), które mogą przyczynić się do zaburzeń w funkcjonowaniu układu pokarmowego objawiających się biegunką, a w konsekwencji do zahamowania wzrostu i rozwoju. W doświadczeniu [D29] postanowiono ocenić, czy dodatek odżywczego koncentratu pektynowego o działaniu odpornościowym (KO) produkowany na bazie pektyn jabłkowych może mieć pozytywny wpływ na wyniki odchovu jagniąt rasy suffolk. Preparat zadawano owcom z grupy doświadczalnej w okresie stanówki, ciąży i po wykotach oraz jagniętom od

14 doby (w grupie doświadczalnej). Stwierdzono, że matki obu grup cechowały się podobną i bardzo niską płodnością (54,7–58,2%). Zaobserwowano istotny wpływ preparatu na plenność owiec, oraz odchów jagniąt (100%). Od 1. miesiąca życia do 90 dnia odchowu wykazano istotną przewagę jagniąt z grupy doświadczalnej zarówno w zakresie masy ciała, jak i przyrostów dobowych. W całym doświadczeniu jagnięta z grupy doświadczalnej cechowały się o ok. 26 g większymi przyrostami ($P \leq 0,05$) w porównaniu z jagniętami z grupy pierwszej. Ponadto, warto zauważyć, że w grupie doświadczalnej nie stwierdzono poronień i martwych urodzeń, a przeżywalność młodych jagniąt określana do 7 dnia życia była wysoka (97,87%), co przełożyło się na zdecydowanie mniejszą ilość upadków jagniąt z tej grupy podczas całego doświadczenia. Reasumując, dodatek pektyn może dawać pozytywne rezultaty w żywieniu matek i ich potomstwa.

W Polsce istnieje długoletnia tradycja podejmowania działań na rzecz ochrony zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w tym merynosa polskiego w starym typie [D28] oraz od 2014 roku czarnogłówki [D27]. Merynos starego typu był protoplastą grupy owiec merynosowych charakteryzujących się doskonałą jakością wełny, natomiast owce czarnogłówki odegrały istotną rolę w kształtowaniu cech użytkowości mięsnej tego gatunku, poprzez wykorzystanie tryków do krzyżowania międzyrasowego, celem produkcji jagniąt rzeźnych [D28]. W badaniach prowadzonych na stadzie zachowawczym merynosa polskiego w starym typie analizowano podstawowe wskaźniki produkcyjne i porównano je z wynikami produkcyjnymi całego stada owiec tej rasy utrzymywanych w tym samym gospodarstwie. Ocenie poddano również wzrost i odchów potomstwa za lata 2007–2009. W obu stadach przeważał pojedynczy typ urodzenia matek. Na podstawie ważeń w 2 dniu po urodzeniu, stwierdzono, że jagnięta z rocznika 2009 były najlżejsze, przy czym jagnięta ze stada zachowawczego rodziły się cięższe ($P \leq 0,01$). Również istotnie większą masę ciała w wieku 56 dni osiągnęły w latach 2008–2009 jagnięta ze stada zachowawczego. Dobbowe przyrosty masy ciała w obu stadach wahały się w granicach od 240 g do 333 g i były istotnie ($P \leq 0,01$) lepsze w stadzie zachowawczym. Na przestrzeni lat 2007–2009 wykazano w ocenianych stadach istotny wpływ typu urodzenia i płci jagniąt na ich masę ciała i przyrosty dobowe. Z uwagi na fakt wyselekcjonowania najlepszych owiec do stada zachowawczego uzyskało ono lepsze wyniki produkcyjne w porównaniu do owiec stada podstawowego. Plenność matek wynosiła od 137% w przypadku matek stada podstawowego w roku 2008 do 148% u matek stada zachowawczego w 2009 roku.

Prawidłowy odchów jagniąt wywiera bardzo duży wpływ na ich produktywność w wieku dorosłym, a w przypadku zwierząt przeznaczonych do tuczu decyduje o jego efektywności mierzonej przyrostami masy ciała i wykorzystaniem paszy.

Prowadzono również badania, dotyczące analizy cech użytkowości rozrodczej macierek rasy czarnogłówka i wzrostu ich potomstwa [D27]. Wyniki rozrodu ocenianych macierek kształtowały się na dobrym poziomie, o czym świadczą wartości wskaźników: plenności, odchowu jagniąt oraz wskaźnik użytkowości rozplodowej. Równie wysokie wartości obserwowano w zakresie wzrostu potomstwa ocenianych matek. Do 75 dnia życia masa ciała oraz dzienne przyrosty dobowe osobników z

pojedynczego typu urodzenia były większe niż zwierząt z ciężar mnogich. W okresie od 21-42 dnia odchowu, jagnięta z ciężar bliźniaczych osiągnęły istotnie ($P \leq 0,01$) mniejsze przyrosty dobowe (146 g) w porównaniu z jagniętami (327 g). Tryczki uzyskiwały większą masę ciała oraz przyrosty dobowe w porównaniu z jagniętami w tym samym wieku. Wskazuje to na dobre tempo wzrostu ocenianych zwierząt oraz właściwym sposobie ich utrzymania. Dalszej poprawy wyników rozrodu matek oraz wzrostu ich potomstwa przy zachowaniu obecnego kierunku pracy hodowlanej należałoby upatrywać w poprawie warunków środowiskowych.

Województwo zachodniopomorskie należy do terenów ubogich w selen, dlatego też w wielu stadach owiec, kóz i bydła występuje niedobór tego pierwiastka w diecie, co negatywnie wpływa na ich płodność, produktywność i zdrowotność. Celem kolejnych badań było określenie stężenia selenu w surowicy u RLP utrzymywanych w gospodarstwie ekologicznym i ocena wpływu doustnej suplementacji drożdżami selenowymi na wybrane parametry użytkowe owiec [A9] oraz wyniki odchowu jagnięt [A15]. Przed eksperymentem zaobserwowano w stadzie problemy z rozrodem, poronienia, trudne porody, jagnięta rodziły się bardzo słabe, zdarzały się również jagnięta martwo urodzone.

Przed suplementacją selenową stwierdzono niedobór tego pierwiastka, dlatego grupie doświadczalnej maciorem podano drożdże selenowe na 3 dni przed, 3 dni po kryciu i 7 dni przed porodem. Zastosowanie drożdży selenowych znacznie zwiększyło koncentrację selenu w surowicy u owiec ($P \leq 0,01$). Najwyższe stężenie selenu w surowicy owiec zaobserwowano po drugim podaniu drożdży selenowych. Na skutek podawania preparatu uległy poprawie również parametry rozrodcze. Stwierdzono mniejszy procent maciorem jałowujących (grupa doświadczalna 14,29%; kontrolna 41,18%). W grupie eksperymentalnej, wskaźniki płodności i plenności wynosiły odpowiednio: 85,71% i 142,67%, podczas gdy w grupie kontrolnej były niższe, odpowiednio: 58,82% i 130%. W grupie jagnięt, których matki były poddane suplementacji zaobserwowano niższą śmiertelność w pierwszym tygodniu życia, większą liczbę żywo urodzonych jagnięt, mniej upadków jagnięt w całym okresie odchowu oraz wyższe wartości wskaźnika odchowu jagnięt (kontrolna 76,02%, doświadczalna 97,06%) [A9]. Następnym etapem badań było pobranie krwi od jagnięt z dwóch grup (I grupa - matki otrzymywały drożdże selenowe, II - kontrolna bez dodatku preparatu) 7 oraz 14 dni po urodzeniu. W wyniku zastosowania suplementacji maciorem, stężenie selenu w surowicy ich potomstwa wzrosło ponad 2,5-krotnie. Zaobserwowano bardzo wysoką ($P \leq 0,001$) dodatnią korelację pomiędzy koncentracją Se w surowicy maciorem z grupy eksperymentalnej a koncentracją selenu w surowicy potomstwa zarówno w 7 ($r_{x,y} = 0,779$) i 14 dniu życia ($r_{x,y} = 0,774$). W surowicy jagnięt z grupy doświadczalnej wykazano wyższą koncentrację selenu w 7 i 14 dniu życia ($P \leq 0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną. Jakkolwiek tylko 14,29% jagnięt z tej grupy osiągnęło optymalny poziom tego pierwiastka w pierwszym tygodniu życia, natomiast w drugim tygodniu wykazano niedobór tego pierwiastka lub jego poziom marginalny. W 14 dniu po urodzeniu, żadne z jagnięt nie miało optymalnego stężenia Se w surowicy. Badania wykazały również, że waga urodzeniowa potomstwa po owcach z grupy doświadczalnej była nieznacznie niższa, jednak w 33 i 90 dniu odchowu zaobserwowano odmienne wyniki. Suplementacja owiec mogła mieć wpływ na poprawę

masy ciała. Jagnięta z grupy eksperymentalnej miały istotnie ($P \leq 0,05$) większe dzienne przyrosty masy pomiędzy 33 i 90 dni życia oraz od 1 do 90 dnia życia w porównaniu z rówieśnikami z grupy kontrolnej. Stwierdzono, że stężenie selenu w surowicy dorosłych owiec może być dobrym wskaźnikiem oceny jego ilości w glebie jak i obecności w niej Se słabo przyswajalnego oraz ewentualnego statusu selenu u ich potomstwa. W gospodarstwach ekologicznych, koncentracja selenu u owiec powinna być stale monitorowana. Wdrożenie odpowiednich programów profilaktycznych pomoże utrzymać optymalny poziom Se w organizmie owiec [A15].

Masa ciała i przyrosty dobowe jagniąt są kluczowymi wskaźnikami świadczącym o prawidłowym wzroście, rozwoju młodych zwierząt. Mają na nie wpływ czynniki genetyczne i środowiskowe. Znanych jest wiele genów uczestniczących w procesie wzrostu. Za najważniejsze uważa się geny kodujące elementy osi somatotropowej. Z tego względu podjęto badania mające na celu zbadanie wpływu polimorfizmów zlokalizowanych w genach: *GHR* (receptor hormonu wzrostu), *LEP* (leptyna), *IGF1* (insulinopodobny czynnik wzrostu 1), *IGF1R* (receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1) w powiązaniu z cechami użytkowymi szorstkowłosych owiec pomorskich (masą ciała na dzień 1, 33 i 90; średnimi przyrostami masy ciała w okresach: 1-33, 33-90 i 1-90 dnia życia). Spośród pięciu analizowanych SNP, dwa (g.251G>A w *LEP* i g.122A>G *GHR*) były monomorficzne. Ze względu na niską frekwencję genotypów i alleli do szczegółowych analiz statystycznych wybrano jedynie trzy miejsca polimorficzne zlokalizowane w genie *LEP* (g.367G>A) w *IGF1R* (g.195C>T) i w *IGF1* (g. 271C>T). Analiza statystyczna nie wykazała związku g.367G>A w genie *LEP* i g.271C >T w *IGF1* z wybranymi parametrami użytkowymi. W przeciwieństwie do tego wykazano związek pomiędzy polimorfizmem w genie *IGF1R* a masą ciała i przyrostami dobowymi jagniąt. Stwierdzono, że osobniki o genotypie *TT* osiągały największe masy ciała i przyrosty dobowe w analizowanych okresach, podczas, gdy osobniki o genotypie *CC* pod względem analizowanych parametrów były najgorsze. Wykazano, że g.195C>T *IGF1R*, może być potencjalnym markerem genetycznym dla cech związanych z wzrostem i rozwojem młodych jagniąt, jednakże badania powinny być kontynuowane na innych rasach owiec w celu potwierdzenia, czy analizowane SNP mogą być stosowane w selekcji wspomaganiej markerami genetycznymi [D40].

Moje zainteresowania związane były również z szeroko rozumianym chowem i hodowlą kóz oraz wartością odżywczą i przetwórstwem mleka koziego [D42, K34, K35]. Obecnie obserwuje się powrót do tradycyjnego chowu i hodowli zwierząt oraz tradycyjnego sposobu wytwarzania i konserwacji produktów. W województwie zachodniopomorskim nie ma dużej fermy utrzymującej kozy, natomiast jest kilka gospodarstw ekologicznych zajmujących się lokalnym przetwórstwem mleka. W jednym z nich utrzymywane są kozy rasy saaneńskiej [D41]. Zastosowanie w gospodarstwie systemu żywienia alkierzowo-pastwiskowego oraz ekstensywnego żywienia zimowego pozwoliło na uzyskanie właściwej dla rasy saaneńskiej masy ciała dorosłych kóz i kozłów. W stadzie przeważały urodzenia bliźniacze 69%, następnie pojedyncze 16% i trojaczne 15%. Analizowane stado charakteryzowało się niską płodnością (77,8%), wysoką plennością (180,4%) i bardzo dobrym wskaźnikiem odchowu jagniąt

(100%). Wydajność mleczna ocenianych kóz kształtowała się na średnim poziomie i wynosiła 600 kg mleka o zawartości białka 3,2% i tłuszczu 3,2% (odpowiednio w Polsce w tym roku 672 kg; 3,2% i 3% białka), co mogło być związane z żywieniem wyłącznie paszami własnymi. Z udojonego mleka wyprodukowano dwa warianty jogurtów różniące się rodzajem użytej kultury jogurtowej (YC-X16 lub YE-L811) w celu oceny przeżywalności mikroflory probiotycznej i jogurtowej oraz cech fizykochemicznych, reologicznych i sensorycznych biojogurtów z mleka w czasie chłodniczego przechowywania. Przeprowadzone badania wykazały, że żywotność mikroflory jogurtowej (pałeczek i paciorkowców mlekowych) oraz probiotycznej z gatunku *Lb. acidophilus* w doświadczalnych biojogurtach zależała zarówno od rodzaju użytego startera jak i czasu chłodniczego przechowywania [K35]. Podobne badania wykonano na mleku pochodzącym z innego gospodarstwa ekologicznego. Liczebność komórek bakterii probiotycznych była nieco mniejsza niż klasycznej mikroflory jogurtowej. Zaobserwowano również różnice w kwasowości miareczkowej, pH, twardości oraz cechach sensorycznych w zależności od rodzaju wykorzystanej szczepionki jogurtowej [K34].

Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje łącznie 75 prac naukowych, z których 7 zostało opublikowanych przed i 68 po uzyskaniu stopnia doktora, o łącznej sumie punktów zgodnie z rokiem ukazania się pracy 658 punktów.

Wśród tych prac 20 pozycji stanowią publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) o łącznym Impact Factor (IF) 14,624 i sumie punktów 429. Pozostałe oryginalne prace ukazały się w recenzowanych czasopismach zagranicznych i ogólnokrajowych (45 publikacje). Ponadto jestem współautorem 10 prac przeglądowych i popularnonaukowych oraz jednej znajdującej się w bazie Journal Citation Reports (JCR), 35 komunikatów na krajowe i międzynarodowe konferencje naukowe oraz jednej monografii.

- Sumaryczny Impact Factor (IF) za publikacje naukowe wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy (w przypadku prac z 2016 roku uwzględniono IF za rok 2015/2016) - 14,624, w tym:
 - jednotematyczny cykl publikacji - 5,872;
 - pozostałe publikacje - 8,752;
- Ogólna liczba punktów za publikacje naukowe wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodnie z rokiem ukazania się pracy - 658, w tym:
 - jednotematyczny cykl publikacji – 145;
 - pozostałe publikacje – 513;
- Liczba cytowań publikacji
 - według bazy Web of Science (bez autocytaowań)-16;
- Indeks Hirscha
 - według bazy Web of Science - 4.

Tabela 1. Zestawienie publikacji naukowych z podziałem na oryginalne prace twórcze, artykuły przeglądowe i popularnonaukowe oraz prace i komunikaty konferencyjne

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	IF ^{a)}	Suma punktów wg MNiSW ^{b)}
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z listy JCR <u>wchodzące</u> w skład osiągnięcia naukowego	5	5,872	145
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z listy JCR <u>niewchodzące</u> w skład osiągnięcia naukowego	14	8,543	275
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach spoza listy JCR	45	-	207
Ogółem oryginalne prace twórcze	64	14,415	627
Artykuły przeglądowe opublikowane w czasopismach z listy JCR	1	0,209	9
Artykuły przeglądowe i popularnonaukowe opublikowane w czasopismach spoza listy JCR	10	-	22
Ogółem publikacje przeglądowe i popularnonaukowe	11	0,209	31
Monografie	1	-	-
Prace i doniesienia konferencyjne	35	-	-
Ogółem publikacje naukowe (bez monografii oraz prac i doniesień konferencyjnych)	75	14,624	658

^{a)} współczynnik Impact Factor (IF) zgodny z rokiem ukazania się pracy; dla publikacji z roku 2016 podano IF za lata 2015/2016;

^{b)} liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy; w przypadku publikacji z roku 2016 punkty podano wg wykazu czasopism naukowych MNiSW z dnia 23 grudnia 2015.

Tabela 2. Zestawienie liczbowe czasopism, w których opublikowano prace naukowe

Lp.	Nazwa czasopisma	Liczba publikacji	IF ^{a)}	Suma punktów wg MNiSW ^{b)}
1.	Acta Scientiarum Polonorum, seria Zootechnica	21	-	111
2.	Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis	2	-	4
3.	Acta Veterinaria Brno	2	0,835	40
4.	Archiv für Tierzucht *	6	2,798	125
5.	Animal Science Papers and Reports *	1	0,918	20
6.	Annals of Animal Science	2	0,808	29
7.	Cattle research /Vyzkum v chovu skotu	1	-	1
8.	Современный научный вестник, Серия: биогия Современnyjj nauchnyjj vestnik, serija biogija	2	-	2
9.	Czech Journal of Animal Science	1	0,871	25
10.	Electronic Journal of Polish Agricultural Universties	2	-	14
11.	Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis, Zootechnica, Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Agricultura Alimentaria Piscaria et Zootechnica	6	-	32
12.	Journal of Animal Breeding and Genetics*	1	1,745	35
13.	Journal of Applied Genetics	1	1,902	20
14.	Journal of Dairy Research*	1	1,500	30
15.	Journal of Elementology	1	0,719	15
16.	Livestock Science*	1	1,293	35
17.	Pakistan Veterinary Journal	1	-	25
18.	Postępy Biochemii	1	-	4
19.	Przegląd Hodowlany	3	-	4
20.	Roczniki Naukowe Zootechniki	3	-	10
21.	South African Journal of Animal Science	1	0,511	20
22.	Tarim Bilimleri Dergisi-Journal of Agricultural Science	1	0,408	15
23.	Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences	1	0,316	20
24.	Wiadomości Zootechniczne	3	-	5
25.	Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Szczecinie, Zootechnika	1	-	1

26.	Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego,	2	-	4
27.	Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy, Zootechnika	1	-	3
28.	Zeszyty Naukowe Zootechniki, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Biologia i Hodowla Zwierząt	2	-	9
Razem		71^{c)}	14,624	658

* czasopisma w których opublikowano prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę o ubieganie się o stopień naukowy doktora habilitowanego;

^{a)} sumaryczny IF z roku ukazania się pracy (w przypadku prac z 2016 roku podano IF za rok 2015/2016);

^{b)} suma punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy.

^{c)} nie uwzględniono 4 prac popularnonaukowych spoza listy MNiSW.

Tabela 3. Zestawienie publikacji naukowych z podziałem na oryginalne prace twórcze, artykuły przeglądowe i popularnonaukowe, prace i komunikaty konferencyjne opublikowane przed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Rodzaj publikacji	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z listy JCR	-	19	19
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach spoza listy JCR	6	39	45
Ogółem oryginalne prace twórcze	6	58	64
Artykuły przeglądowe opublikowane w czasopismach z listy JCR	-	1	1
Artykuły przeglądowe i popularnonaukowe opublikowane w czasopismach spoza listy JCR	1	9	10
Ogółem artykuły przeglądowe i popularnonaukowe	-	10	11
Ogółem publikacje naukowe	7	68	75
Monografie	-	1	1
Prace i komunikaty konferencyjne	2	33	35

Zgłoszone rekordy sekwencji nukleotydowych w bazie NCBI

Zdeponowano 8 fragmentów sekwencji kodującej genu *BIGF1R*: HM988958; JQ715681; JN204287; JQ957798; JQ924783; JQ780476; GQ487665; JQ957797.

Powyższe sekwencje stały się częścią sekwencji mRNA: XM_010816884, NM_001244612.

Pozostałe sekwencje: DQ975234; EF210074; EU870373; KJ140106.

Małgorzata Szweduk