

# Nowy wariant genu amelogeniny u bydła<sup>\*)</sup>

GRZEGORZ GRZYBOWSKI, BEATA PRUSAK, JAN TRELA\*

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, 05-552 Wólka Kosowska, ul. Postępu 1

\*Instytut Zootechniki, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice k. Krakowa

Grzybowski G., Prusak B., Trela J.

## New variant of the amelogenin gene in cattle

### Summary

The aim of this work was to search for a sequence polymorphism in the amelogenin gene (AMEL-X) in the region of exon 6. The material covered 653 cows and bulls of variable breeds, typical for their karyotype. The cows used in this study belong to Polish Red (150), Polish Whiteback (72), Red-and-White (72), Black-and-White with Holstein-Friesian blood share (69). The male material used in this study covered 269 sires (Black-and-White with Holstein-Friesian blood share – 125, Polish Red – 12, pure breed Holstein-Friesian – 67, Red-and-White – 30, Simmental – 27 and different meat breeds – 7). Six young bulls of Polish Whiteback and 15 young bulls of Polish Red were also tested. The polymerase chain reaction (PCR) primers used in this study were given by Ennis and Gallagher. The PCR products were separated on ABI PRISM 377 DNA sequencer (AB). For the AMEL-X gene copy the specific PCR product of 278bp was amplified and for the AMEL-Y gene copy the specific PCR product was 215bp long. This typical pattern was observed in cows and bulls of all tested cattle breeds except for the Polish Red. In addition to the typical signal for the chromosome X in 24 cows and 2 bulls of Polish Red a signal for the PCR product of 269bp was detected. This result shows that in an amplified region of AMEL gene in copy on chromosome X the sequence polymorphism is present and its molecular origin is a deletion of 9bp.

**Keywords:** cattle, amelogenin gene

Dobrze uformowane szkliwo jest u ssaków grubą, zmineralizowaną tkanką zapewniającą trwałość zębów i przez to wywiera wpływ na zdolność pobierania pokarmu oraz dobrostan zwierząt. Amelogenina jest głównym komponentem w organicznej macierzy wytwarzanej w zawiązkach zębowych przez ameloblasty, gdzie stanowi 90% ogólnej zawartości białka (4). Najistotniejszym etapem w formowaniu szkliwa jest przekształcanie macierzy w hydroksyapatytowe kryształy. W regulacji tego procesu istotną rolę odgrywa amelogenina, głównie poprzez zapewnienie wodnego środowiska koniecznego do inicjowania i wzrostu kryształów. Szczegółowe mechanizmy tego procesu, a zwłaszcza biologiczna rola poszczególnych domen białka są słabo rozpoznane. Natywna amelogenina samoorganizuje się, tworząc sześciokątne pryzmaty (tzw. nanospheres), które, jak się uważa, są przestrzennymi komponentami bezpośrednio oddziałującymi na biomineralizację (1). U ssaków łóżyskowych amelogeninę opisano jako cząsteczkę składającą się z trzech regionów: N-terminalnej sekwencji (ok. 48 aminokwasów) bogatej w tyrozynę (TRAP – tyrosine-rich amelogenin protein), dużej hydrofobowej sekwencji korowej (ok. 114 aminokwasów) i C-terminalnej hydrofilowej sekwencji liczącej ok. 25 aminokwasów. Uszeregowanie aminokwasów w cząsteczce jest podobne, nawet u taksonów ewolucyjnie od siebie odległych, np. u ssaków łóżyskowych, stekowców, płazów i gadów (16, 18). Dlatego polimorfizm genu i białka amelogeniny wykorzystuje się jako model przydatny do datowania oraz

przebiegu ewolucyjnego procesu różnicowania kładów ssaków (2, 3). Celowość podjęcia weterynaryjnych obserwacji nad genem i białkiem amelogeniny wynika z podobieństwa funkcji tego białka u różnych gatunków, a także z faktu, iż metaboliczne zaburzenia w procesie formowania szkliwa zębowego mogą być następstwem mutacji genowych. W sekwencji ludzkiego genu AMEL rozpoznano już 12 mutacji odpowiedzialnych za różne formy hypoplazji lub wadliwie zmineralizowanego szkliwa (10), określanych zbiorczym mianem *amelogenesis imperfecta* (AI). Częściowo lub całkowicie rozpoznano geny AMEL u ssaków należących do siedmiu rzędów: u czternastu gatunków ssaków łóżyskowych, dwóch gatunków ssaków jajorodnych oraz u jednego gatunku torbacza (3, 17). Uwzględniając fakt, iż dotychczas zaakceptowano istnienie 26 rzędów ssaków, w obrębie których wyodrębniono 4629 gatunków (3), dotychczasowy zasób wiedzy o strukturalnych i funkcjonalnych aspektach genu i białka amelogeniny uznać należy za niewielki. Gen AMEL u ssaków składa się z 7 eksonów, a sekwencja kodująca białko zaczyna się od pierwszego aminokwasu eksonu 2 i kończy się po pierwszym aminokwasie eksonu 7 (3). U bydła, podobnie jak u człowieka oraz małą człokształtnych, zidentyfikowano dwa geny amelogeniny: AMEL-X i AMEL-Y, których *loci* znajdują się w chromosomach płci (6, 7). Różnice w sekwencji tych kopii, będące następstwem ich niezależnej ewolucji, stały się podstawą opracowania rozmaitych testów molekularnych wykorzystywanych do rozpoznawania płci osobników na podstawie analizy śladów biologicznych (13). U bydła możliwe jest prowadzenie na tej pod-

<sup>\*)</sup> Praca wykonana w ramach projektu badawczego P06D 01827 finansowanego przez KBN.

stawie m.in. seksowania zarodków (8, 11, 15). U ssaków łozyskowych przypuszczalnie aktywna jest tylko kopia genu AMEL-X, natomiast charakter zmian w kopii genu AMEL-Y (u bydła i człowieka pozbawiony jest on eksonu 4) upodabnia go do pseudogenu. Opisany u ludzi związek między mutacjami w sekwencji genu amelogeniny a występowaniem wad szkliska zębowego (*amelogenesis imperfecta*) nie jest jedynym elementem wskazującym na znaczenie tego białka u ssaków (19). Głównym mechanizmem decydującym o biologicznej funkcji amelogeniny jest molekularny proces alternatywnego składowania macierzystego transkryptu mRNA (3). W jego wyniku generowane są fragmenty LRAP (leucine-rich amelogenin peptide), którym przypisuje się rolę cząstek regulatorowych niezbędnych w procesie wzrostu kości i chrząstek. Główne miejsce akceptorowe alternatywnego składowania mRNA zidentyfikowano u bydła w obrębie eksonu 6 (2, 3). Jest to region szczególnie ważny w ewolucji ssaków oraz w badaniach związku między strukturą a funkcją genu. Centralny rejon sekwencji tego eksonu uważa się za tzw. gorące miejsce mutacji w amelogeninie ssaków (3, 16). Wyniki analiz ewolucyjnych wskazują, że przypuszczalnie powstał on w wyniku serii niezależnych insercji lub delecji nukleotydowych, co w cząsteczce białka manifestuje się obecnością tandemowo ułożonych trójpeptydów: Pro-X-Glu lub Pro-X-X (2, 3, 15). Ze względu na wspomniany charakter polimorfizmu, będący analogią do polimorfizmu mikrosatelitów DNA, najskuteczniejszą techniką prowadzenia analiz przesiewowych pod kątem rejestrowania ewentualnych mutacji w tym regionie genu jest analiza wielkości fragmentów DNA.

Celem niniejszych badań było poszukiwanie insercji i delecji w eksonie 6 genu AMEL-X u bydła.

### Materiał i metody

Badaniami objęto 653 karyotypowo normalnych krów (XX) i buhajów (XY) różnych ras z krajowej hodowli. Materiał żeński obejmował bydło rasy polskiej czerwonej (150 krów) i bydło białogrzbięte (72 krowy) objęte krajowym programem ochrony zasobów genetycznych oraz krowy rasy czerwono-białej (72 szt.) i czarno-białej (69 szt.) – z udziałem genów bydła hf, utrzymywane w różnych ośrodkach hodowlanych. W grupie osobników męskich analizami objęto 269 buhajów utrzymywanych w zakładach unasienniania (buhaje rasy czarno-białej z różnym udziałem genów bydła rasy hf – 125 szt., polskie czerwone – 12 szt., czystorasowe hf – 67 szt., czerwono-białe – 30 szt., simental – 27 szt. oraz buhaje różnych ras mięsnych – 7 szt.). W grupie młodych samców badaniom poddano 6 zwierząt białogrzbiętych ze stada Akademii Rolniczej w Uhrusku (woj. lubelskie) objętego krajowym programem ochrony zasobów genetycznych bydła oraz 15 buhajków rasy polskiej czerwonej zakupionych w Stacji Badawczej Rolnictwa Ekologicznego i Hodowli Zachowawczej PAN w Popielnie (zwierzęta te utrzymywano w Zakładzie Doświadczalnym IGiHZ PAN w Jeżewicach jako materiał doświadczalny w badaniach projektu PBZ-KBN 113/P06/2005/01).

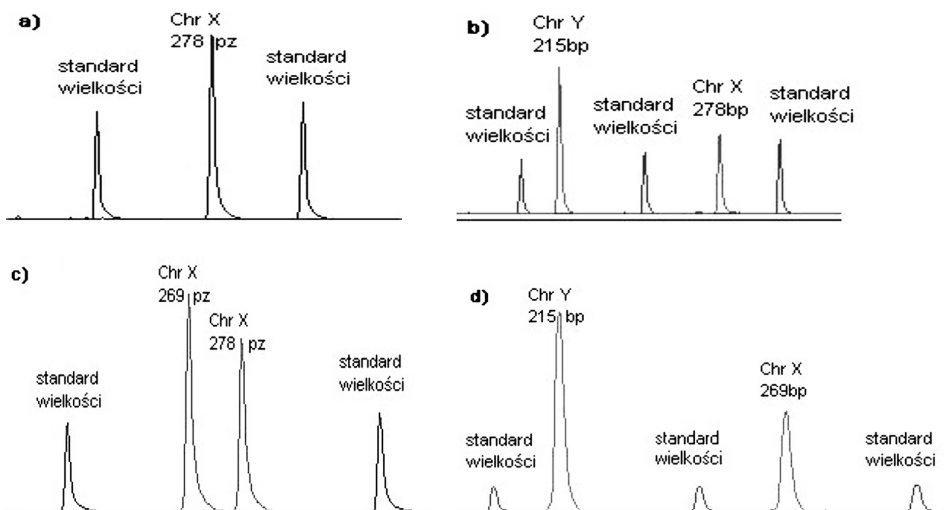
Genomowy DNA ekstrahowano z próbek pełnej krwi wykorzystując zestaw Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Uzyskane próbki rozcieńczano w 50 µl roztworu rehydrującego (10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0)) i wykorzystywano do analiz bezpośrednio po ekstrakcji bądź po dłuższym okresie przechowywania w temperaturze 4°C.

Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems) z wykorzystaniem starterów o sekwencjach podanych przez Ennis i Gallagher (5) i według parametrów podanych przez Lubieniecką i wsp. (12). Mieszana reakcyjna miała objętość 10 µl, a w jej skład wchodziło: 0,2 mM każdego z nukleotydów (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 10 × PCR bufor (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 jednostka polimerazy AmpliTaqGold™ (Applied Biosystems), 5-20 ng genomowego DNA oraz 0,05-0,18 µM starterów. Produkty PCR rozcieńczano sterylną wodą w stosunku 1 : 2. 0,5 µl rozcieńczonego produktu PCR mieszało z 2,0 µl mieszaniny składającej się z dejonizowanego formamidu, wewnętrznego standardu wielkości (GeneScan-500 znakowanego barwnikiem ROX) oraz buforu obciążającego w stosunku 29 : 6 : 5. Tak przygotowane próbki denaturowano w 95°C przez 3-5 minut, po czym nakładano na 5% żel poliakrylamidowy (6 M mocznik, roztwór poliakrylamidowy Long Ranger® o stosunku akrylamidu do bisakrylamidu 19 : 1). Rozdział elektroforetyczny produktów PCR prowadzono przy użyciu automatycznego sekwenatora DNA ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Elektroforezę przeprowadzono przez 2,5 godziny w temperaturze 51°C przy napięciu 3000 V, natężeniu 60 mA, mocy 200 W i mocy lasera 40 mW. Dane zbierano przy użyciu programu Data Collection v2.11. Analizę wielkości fragmentów DNA przeprowadzono z wykorzystaniem programu GeneScan Analysis v3.1 (Applied Biosystems).

### Wyniki i omówienie

Wykorzystywane w badaniach startery reakcji PCR flankowały region sekwencji (ok. 300 pz), w obrębie którego znajduje się w kopii bydłecy genu AMEL-Y charakterystyczna delecja 63 pz (GenBank, numer dostępu Q99004). Dlatego graficzny wynik seksowania przybierał formę odmienną dla płci homogametycznej (XX) i heterogametycznej (XY). Typowy obraz amplifikowanych fragmentów dla osobników o karyotypie XX oraz XY przedstawiono na rycinie 1a, 1b. Dla kopii genu AMEL-X amplifikowany był specyficzny produkt PCR o wielkości 278 pz, a dla kopii AMEL-Y produkt o wielkości 215 pz. Zatem jednoczesne wystąpienie w analizowanej próbce sygnałów detekcji dla dwóch produktów różniących się wielkością (278 pz i 215 pz) oznacza, że pochodzi ona od osobnika męskiego (XY), natomiast obecność pojedynczego sygnału dla produktu o wielkości 278 pz (w istocie są to dwa nakładające się na siebie produkty PCR o identycznej wielkości) oznacza, że próbka pochodzi od osobnika płci żeńskiej. Taka wykładnia wynika z istoty podstawowego, molekularnego testu seksowania próbek biologicznych bydła, wprowadzonego do praktyki hodowlano-weterynaryjnej w połowie lat 90. (5).

Opisany powyżej, typowy obraz wyników seksowania stwierdzono u osobników żeńskich i męskich wszystkich ras, z wyjątkiem bydła rasy polskiej czerwonej. U 24 krów rasy polskiej czerwonej, obok sygnału detekcji dla produktu PCR o wielkości 278 pz, występował silny specyficzny sygnał dla produktu o wielkości zmniejszonej o 9 pz (ryc. 1c). Podobną sytuację zanotowano w przypadku analizy DNA od dwóch buhajków rasy polskiej czerwonej, u których obok sygnału detekcji dla produktu typowego dla kopii AMEL-Y (215 pz) ujawniał się sygnał specyficzny dla kopii AMEL-X, ale o wielkości zmniejszonej o 9 pz (ryc. 1d). Takich przypadków dotychczas nie notowano w badaniach sekwencji bydłecy-



Ryc. 1. Obraz sygnału detekcji produktu PCR genu amelogeniny po elektroforezie w żelu poliakryloamidowym na sekwenatorze ABI Prism 377 uzyskany dla: a) osobnika żeńskiego o genotypie 278/278, b) osobnika męskiego o genotypie 215/278, c) osobnika żeńskiego o genotypie 269/278, d) osobnika męskiego o genotypie 215/269

go genu AMEL. Wynik ten wskazuje, że w obrębie amplifikowanego fragmentu genu AMEL, w kopii umiejscowionej w chromosomie X występuje polimorfizm sekwencji, a jego molekularnym podłożem jest delecja nukleotydowa 9 pz. Nowo zidentyfikowany wariant sekwencji oznaczono jako AMEL-X(269). Ponieważ jego obecność stwierdzono tylko u bydła rasy polskiej czerwonej, może to wskazywać iż jest to marker charakterystyczny dla tej rasy. Wybrana stawka bydła rasy polskiej czerwonej jest w Polsce utrzymywana w hodowli zachowawczej (14), co jest fragmentem realizowanego pod auspicjami FAO, światowego programu ochrony zasobów genetycznych zwierząt (Project MoDAD, <http://www.fao.org/dad-is>). Na tle porównań z innymi rasami hodowanymi w Europie, bydło polskie czerwone charakteryzuje się wysoką zmiennością genetyczną. Topologia drzewa filogenetycznego, oparta na wartościach genetycznego dystansu  $D_{ps}$  uzyskanych z analiz polimorfizmu mikrosatelitów DNA dowodzi, że 80% osobników objętych programem hodowli zachowawczej tworzy genetycznie odrębną, unikalną grupę rasową (9). Uważa się, że bydło rasy polskiej czerwonej pochodzi od tura małego brachycerycznego, tzw. *bos taurus brachyceros*, a polska hodowla tego bydła reprezentuje najstarszą hodowlę zarodową w Europie, prowadzoną w sposób ciągły od roku 1893 (17). Jest prawdopodobne, że w puli genowej współczesnej populacji mogły zachować się unikalne warianty genów, takie jak nowo zidentyfikowany wariant AMEL-X(269), które w wyniku ostrej selekcji na cechy produkcyjne zostały już wyeliminowane z populacji innych ras bydła. Jednocześnie zwraca uwagę fakt, że wariant AMEL-X(269) wystąpił u krów rasy polskiej czerwonej tylko w formie heterozygotycznej, co jest zbieżne z modelem dziedziczenia rozmaitych funkcjonalnych anomalii u bydła. Ogromna większość dziedzicznych anomalii u bydła to cechy recesywne, ujawniające się w genotypach homozygotycznych. Stan ten sprawia, że fenotyp heterozygot (nosicieli mutacji) nie od-

biega od typowego dla zwierząt normalnych. Tak właśnie jest w przypadku krów pc o genotypie normalnym 278/278 i osobników heterozygotycznych 278/269. W analizowanej stawce krów, która obejmowała wszystkie osobniki stada podstawowego bydła rasy polskiej czerwonej z dwóch największych w Polsce ośrodków hodowli zachowawczej z północy i południa kraju (stado O.O. Cystersów w Szczyrzycu, pow. Limanowa oraz stado ze Stacji Badawczej Rolnictwa Ekologicznego i Hodowli Zachowawczej Zwierząt PAN w Popielnie, pow. Pisz), nie zidentyfikowano żadnego osobnika o genotypie homozygotycznym względem wariantu AMEL-X(269). Nie daje to jednak podstaw do wnioskowania na temat ewentualnej funkcjonalnej natury nowo wykrytego

wariantu AMEL-X(269). W tabeli 1 podano frekwencję alleli AMEL-X(278) i AMEL-X(269), a także wartości odnoszące się do frekwencji obserwowanych i spodziewanych genotypów. Odchylenia te nie odbiegają statystycznie istotnie ( $\chi^2 = 1,16$ ) od wartości wynikających z formuły matematycznej Hardy'ego-Weinberga. Daje to podstawę do stwierdzenia, że badana stawka krów pc znajduje się w stanie równowagi genetycznej. Przy frekwencji allelu AMEL-X(269) = 0,08 (tab. 1), można by oczekiwać wystąpienia co najwyżej jednego genotypu homozygotycznego 269/269 (wartość oczekiwana = 0,96). Należy jednak zauważyć że analizowana stawka krów pc nie odpowiada kryteriom populacji Mendelowskiej. Jest bowiem nieliczna, kojarzenia nie są losowe, a samą stawkę wybrano do hodowli zachowawczej nie jako próbę losową populacji, lecz skompletowano na podstawie cech eksterieru arbitralnie uznanego za typowy dla rasy. Brak homozygotycznego genotypu 269/269 w tym materiale może być więc przypadkowy. Z kolei w licznej grupie buhajów reprodukcyjnych różnych ras z krajowych SHiUZ (a więc u osobników podlegających stałemu nadzorowi weterynaryjnemu i weryfikowanych pod względem przydatności do hodowli), wszystkie osobniki posiadały w genomie jedynie typowy wariant amelogeniny AMEL-X(278). Biorąc pod uwagę identyczną funkcję amelogeniny u różnych gatunków ssaków, a zwłaszcza fakt, iż różne mutacje w ludzkim genie AMEL-X prowadziły do istotnych dziedzicznych anomalii AI, celowe byłoby zweryfikowanie, czy i w jakim zakresie bydło białko amelogenina będąca produktem nowo wykrytego wariantu genu AMEL-X(269) ma sekwencję ami-

Tab. 1. Frekwencja alleli i genotypów genu AMEL-X w badanej grupie krów rasy polskiej czerwonej

Krowy pc (n)	Frekwencja alleli		Frekwencja genotypów	Genotypy		
	278	269		278/278	278/269	269/269
150	0,920	0,080	Obserwowana	0,840	0,160	0,000
			Oczekiwana	0,846	0,147	0,006

nokwasową i metaboliczne właściwości analogiczne do typowego wariantu AMEL-X(278). Wydaje się, że wczesne prewencyjne rozpoznanie funkcjonalnej natury tej mutacji byłoby konieczne m.in. ze względu na wspomniane już zagrożenia wynikające z recesywności rozmaitych mutacji genowych. Wydaje się, że byłoby to wskazówką pomocną przy właściwym ukierunkowywaniu programu selekcji i ochronie zasobów genetycznych bydła rasy polskiej czerwonej.

Gibson i wsp. (7) przypuszczają, że białko specyficzne dla kopii AMEL-Y ma funkcję nieco odmienną od kopii AMEL-X, konieczną tylko dla formowania szkliwa zębowego u samców. Jeśli zatem u osobników płci homogametycznej jeden z genów AMEL-X ulega inaktywacji (co byłoby zgodne z normalnym procesem kompensowania dawki genów w genotypach XX i XY), a obydwa *loci* są aktywne u samców, taka charakterystyczna cecha wyróżniałaby geny amelogeniny od innych *loci* zlokalizowanych na chromosomach płci.

Rozpoznane dotychczas defekty genetyczne u ludzi odpowiedzialne za występowanie anomalii *amelogenesis imperfecta*, związane są z mutacjami właśnie w kopii genu AMEL-X. Spośród 12 opisanych dotychczas postaci tej wady dziedzicznej, tylko w przypadku trzech przyczyną są podstawienia aminokwasów w cząsteczce amelogeniny. Pozostałe przypadki *amelogenesis imperfecta* są następstwem delecji nukleotydowych w sekwencji kopii genu AMEL-X, które prowadzą do zmiany ramki odczytu podczas translacji białka (10). Ponieważ przypadek delecji w kodującej sekwencji genu zachodzi w przypadku nowo wykrytego bydłowego wariantu AMEL-X(269), celowe byłoby zweryfikowanie potencjalnych skutków jego obecności w genomie.

U żadnego z gatunków zwierząt gospodarskich nie opisano dotąd wady dziedzicznej etiologicznie podobnej do ludzkich hypoplazji lub wadliwie zmineralizowanego szkliwa zębowego. Nie ma jednak informacji iż obserwacje z tego zakresu kiedykolwiek prowadzono, gdyż stomatologii weterynaryjnej nie wydzielano jako odrębnego działu praktyki klinicznej.

Z porównania sekwencji genu AMEL u gatunków reprezentujących główne linie ssaków (3) wynika, że nowo wykryta delecja 9 pz w bydłowej kopii AMEL-X jest przypuszczalnie zlokalizowana w pobliżu akceptorowego miejsca alternatywnego składania (tzw. splicingu) pierwotnego transkryptu mRNA. Splicing eksonu 6 dokonuje się poprzez intraeksonowe przecięcie miejsca akceptorowego. Jest ono identyfikowane jako sygnał splicingu, ponieważ występuje na granicy intron/ekson. Główne miejsce splicingu zlokalizowane jest w rejonie 3' eksonu 6. U myszy, szczura, bydła i świni taki wewnątrz eksonowy splicing powoduje utworzenie fragmentu LRAP (leucine-rich amelogenin peptide) istotnego w procesie regulowania wzrostu kości i chrząstek (3). Centralny hydrofobowy region cząsteczki bydłowej amelogeniny, analizowany w niniejszej pracy, odpowiadający w przeważającej części nukleotydowej sekwencji eksonu 6, wykazuje u wszystkich gatunków konserwatywność pod względem wysokiej zawartości proliny i glutaminy. Wskazuje to, że obecność tych aminokwasów w cząsteczce ma istotne znaczenie dla funkcji białka. Z kolei konserwatywność niektórych pozycji nukleotydowych

w genie amelogeniny u wszystkich ssaków, zwłaszcza w rejonie poprzedzającym wspomniane miejsce alternatywnego składania mRNA sugeruje, że zachodzące tu mutacje mogą mieć znaczenie dla funkcji białka i przez to mogą oddziaływać na zdolności przystosowawcze określonych genotypów.

Obok potencjalnego, funkcjonalnego znaczenia występowania wariantu AMEL-X(269) w genomie bydła, jego zidentyfikowanie ma wymierne praktyczne znaczenie dla bieżących badań diagnostycznych opartych na analizie DNA. Wyniki prezentowane w niniejszym artykule dowodzą, że seksowanie próbek biologicznych bydła na podstawie polimorfizmu genu AMEL jest bardziej złożone niż sądzono, gdyż specyficzne produkty PCR mogą być mylnie uznawane za artefakty. W szczególności nietrafna okazuje się dotychczas przyjmowana wykładnia wyników seksowania, która zakłada, że płęć homogametyczna bydła (XX) zawsze manifestuje się fenotypem homozygotycznym (jeden sygnał detekcji dla produktu PCR o wielkości 278 pz). Tymczasem obecność w puli genowej populacji nowo wykrytego wariantu AMEL-X(269) sprawia, że wśród kariotypowo normalnych osobników żeńskich mogą występować aż trzy kombinacje wielkości amplifikowanych fragmentów PCR: 278/278, 278/269 i 269/269, a wśród osobników męskich mogą występować dwa genotypy: 278/215 i 269/215.

## Piśmiennictwo

1. Aoba T.: Recent observations on enamel crystal formation during mammalian amelogenesis. *Anat. Rec.* 1996, 245, 208-218.
2. Delgado S., Casane D., Bonnaud L., Laurin M., Sire J.-Y., Girondot M.: Molecular evidence for Precambrian origin of amelogenin, the major protein of vertebrate enamel. *Mol. Biol. Evol.* 2001, 18, 2146-2153.
3. Delgado S., Girondot M., Sire J.-Y.: Molecular evolution of amelogenin in mammals. *J. Mol. Evol.* 2005, 60, 12-30.
4. Deutsch D.: Structure and function of enamel gene products. *Anat. Rec.* 1989, 224, 189-210.
5. Ennis S., Gallagher T. F.: A PCR-based sex determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Anim. Genet.* 1994, 25, 425-427.
6. Gibson C., Golub E., Herold R., Risser M., Ding W., Shimokawa H., Young M., Termine J., Rosenbloom J.: Structure and expression of the bovine amelogenin gene. *Biochemistry* 1991, 30, 1075-1079.
7. Gibson C. W., Golub E. E., Abrams W. R., Shen G., Ding W., Rosenbloom J.: Bovine amelogenin message heterogeneity: Alternative splicing and Y-chromosome gene transcription. *Biochemistry* 1992, 31, 8384-8388.
8. Grzybowski G., Dymnicki E.: Metody oraz ekonomiczne znaczenie sterowania proporcją płci u bydła. *Biotechnologia* 1997, 3, 38-50.
9. Grzybowski G., Prusak B.: Genetic variation in nine European cattle breeds as determined on the basis of microsatellite markers. III. Genetic integrity of the Polish Red cattle included in the breeds preservation programme. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2004, 22, 45-56.
10. Hart P. S., Hart T. C., Simmer J. P., Wright J. T.: A nomenclature for X-linked amelogenesis imperfecta. *Arch. Oral Biol.* 2002, 47, 255-260.
11. Lechniak D., Cumming I. R.: The use of amelogenin gene polymorphism in PCR embryo sexing in bovine IVF embryos. *J. Appl. Genet.* 1997, 38, 45-49.
12. Lubieniecka J., Grzybowski G., Lubieniecki K.: Genetic variation in nine European cattle breeds as determined on the basis of microsatellite markers I. Within-breed variation. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2001, 19, 249-264.
13. Miścicka-Sliwka D., Grzybowski T., Woźniak M.: Optimization of a hexaplex DNA amplification from short tandem repeat and amelogenin loci. *Electrophoresis* 1997, 18, 1627-1632.
14. Reklewski Z.: Hodowla zachowawcza bydła rasy polskiej czerwonej. *Wiadom. Zoot.* 2005, XLIII, 98-101.
15. Reklewski T., Grzybowski G., Lubieniecki K.: Sex identification in cattle on the basis of amelogenin polymorphism. *Zivočišna Výroba* 1996, 41, 504-505.
16. Sire J. Y., Delgado S., Fromentin D., Girondot M.: Amelogenin: lessons from evolution. *Arch. Oral Biol.* 2005, 50, 205-212.
17. Szarek J., Adamczyk K.: Zarys historyczny bydła polskiego czerwonego. *Wiadom. Zoot.* 2005, XLIII, 3-12.
18. Toyosava S., O'Huigin C., Figueroa F., Tichy H., Klein J.: Identification and characterization of amelogenin genes in monotremes, reptiles, and amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 13056-13061.
19. Veis A.: Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003, 60, 38-55.

Adres autora: prof. dr hab. Grzegorz Grzybowski, Jastrzębiec, ul. Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska; e-mail: g.grzybowski@ighz.pl