

Czynnik transkrypcyjny STAT5A a cechy użytkowe bydła

TOMASZ GRZELAK, MAREK KMIEĆ, ARKADIUSZ TERMAN,
INGA KOWALEWSKA-ŁUCZAK

Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR,
ul. Doktora Judy 6, 71-460 Szczecin

Grzelak T., Kmiec M., Terman A., Kowalewska-Łuczak I.

STAT5A transcription factor with reference to production traits in cattle

Summary

STATs (signal transducers and activators of transcription) are latent transcription factors present in the cytoplasm of the majority of animal cells. They are activated by tyrosine phosphorylation and then translocated to the nucleus where they induce transcription of target genes. The STAT5A factor mediates the actions of cytokines and peptide hormones, including prolactin and growth hormone. STAT5A, previously known as MGF (mammary gland factor), is the most important transcription factor mediating the action of ligands on the expression of genes responsible for production traits in cattle.

Keywords: cattle, production traits, STAT5A

Czynniki transkrypcyjne STAT – ogólna charakterystyka

Rodzinę białek STAT (signal transducers and activators of transcription), czyli przekaźniki sygnału i aktywatory transkrypcji, zidentyfikowano na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku jako cytoplazmatyczne czynniki transkrypcyjne biorące udział w przekazywaniu informacji od receptorów cytokin do jądra komórkowego, gdzie wpływają one na transkrypcję wielu genów (13). Dotychczas opisano siedem czynników transkrypcyjnych STAT u ssaków, do których zaliczają się: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6 oraz STAT-D zidentyfikowany u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* (23).

Geny kodujące czynniki transkrypcyjne STAT zlokalizowane są u różnych gatunków ssaków w różnych chromosomach; i tak: geny białek STAT1 i STAT4 u myszy zlokalizowane są w 1 chromosomie, natomiast u człowieka znajdują się one w chromosomie 2. STAT3, STAT5A oraz STAT5B zmapowano u myszy w chromosomie 11, a u człowieka w chromosomie 17, z kolei geny dla czynników transkrypcyjnych STAT2 oraz STAT6 zlokalizowane są w 10 chromosomie u myszy, a u człowieka występują one w chromosomie 12 (2).

Białka z rodziny STAT zbudowane są z podobnej liczby aminokwasów, a mianowicie, dla czynników STAT: 1, 3, 4, 5A oraz 5B zbudowane są z 750-795 aminokwasów, natomiast białka STAT2 oraz STAT6 zbudowane są z 750-850 aminokwasów (4).

Wszystkie czynniki transkrypcyjne STAT charakteryzują się bardzo podobną budową. Posiadają one pięć konserwatywnych domen, a mianowicie: domenę wiążącą DNA, która usytuowana jest w środkowej części białek STAT, domenę SH2 (Src-homology-2-like domain), domenę SH3 (Src-homology-3-like domain). Poza tym białka

STAT zawierają jeszcze dwie terminalne domeny: NH₂ oraz COOH (9).

Domena SH2 jest domeną kluczową dla czynników transkrypcyjnych STAT, ponieważ bierze ona udział w przyłączaniu tych białek do kompleksów receptorowych, a obecność jej wymagana jest także podczas interakcji z kinazami tyrozynowymi JAK. Ponadto domena SH2 bierze udział w dimeryzacji czynników transkrypcyjnych STAT, co jest warunkiem późniejszej zdolności tych białek do wiązania się z DNA (13). Za domeną SH2 w pozycji 694 znajduje się tyrozyna, której fosforylacja jest warunkiem aktywacji białek STAT (22).

Funkcja czynników transkrypcyjnych STAT polega na regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na sygnał od receptorów cytokin, takich, jak na przykład: IFN- α , - β , - γ , interleukiny (2-7, 10-13 i 15) oraz erytropoetyna, trombopoetyna czy prolaktyna i hormon wzrostu. Trzy z poznanych białek STAT są aktywowane tylko poprzez konkretne ligandy: STAT2 aktywowany jest tylko poprzez INF- α , STAT4 w limfocytach aktywuje IL-12 oraz INF- α , natomiast STAT6 aktywowany jest tylko przez IL-4 i IL-16. Czynniki transkrypcyjne, takie jak STAT: 1, 3, 5A czy 5B są aktywowane przez wiele różnych ligandów, co jednocześnie skłania do postawienia pytania, w jak wielu specyficznych odpowiedziach komórkowych biorą udział czynniki STAT (2, 4). W organizmie myszy białka STAT spełniają kluczową rolę i inaktywacja któregoś z nich prowadzi do niepożądanych konsekwencji.

Uproszczony proces aktywacji białek z rodziny STAT wygląda następująco: cytokiny kumulują się i wiążą ze swoimi receptorami występującymi w błonie komórkowej, powodując tym samym pobudzenie kinaz tyrozynowych typu JAK. W receptorach cytokin powstają wtedy miejsca z ufosforylowaną tyrozyną, co wywołuje łączenie czynników transkrypcyjnych STAT z receptorem. Następnie są one fosforylowane, przez wciąż obecne w kom-

Tab. 1. Efekty zaburzenia działania genów STAT u myszy (4)

Inaktywowane czynniki	Objawy
STAT1	Brak wrodzonej odpowiedzi organizmu na infekcje bakteryjne i wirusowe
STAT2	Letalne we wczesnym stadium embrionalnym
STAT3	Letalne we wczesnym stadium embrionalnym; brak gastrulacji
STAT4	Zaburzenia funkcji limfocytów Th1
STAT5A	Brak rozwoju gruczołu sutkowego oraz zaburzenia laktacji
STAT5B	Brak rozwoju gruczołu sutkowego oraz zaburzenia laktacji
STAT6	Zaburzenia funkcji limfocytów Th2

pleksie z receptorem, kinazy JAK. Prowadzi to do dimeryzacji białek STAT poprzez interakcje konserwatywnej domeny SH2 z ufosforylowaną tyrozyną. Dimery białek STAT migrują następnie do jądra komórkowego, gdzie wiążą się z elementami sekwencji GAS (gamma-activated sequence), wpływając na transkrypcję genów docelowych. Sekwencja GAS jest specyficzna dla każdego z białek STAT (15, 21).

Czynnik transkrypcyjny STAT5A

Białko STAT5 wcześniej określane było mianem MGF (mammary gland factor), ponieważ wykryto je w gruczole mlekowym owcy, gdzie uczestniczy w szlaku oddziaływania prolaktyny na ekspresję genów białek mleka (24). STAT5 występuje w postaci dwóch izoform A oraz B, które kodowane są przez dwa różne geny. Homologia między białkiem STAT5A i STAT5B wynosi około 95%. Obie izoformy posiadają tyrozynę w pozycji 694, której ufosforylowanie jest niezbędne do aktywacji obu białek (9).

Choć ufosforylowanie tyrozyny jest procesem obligatoryjnym do aktywowania białek STAT5, to istnieje jeszcze jedna droga aktywacji, polegająca na fosforylacji seryny, jednak jest to proces o charakterze uzupełniającym i droga aktywacji poprzez ten aminokwas nie została jeszcze dobrze poznana (4). W przypadku bezwłosych szczurów hirosaki (HHR) to nie fosforylacja tyrozyny była kluczowym elementem aktywacji białka STAT5A, lecz związek cukrowy o nazwie O-GlcNAc (N-acetyloglukozamina przyłączona do polipeptydu wiązaniem O-glikozydowym) (20).

STAT5 rozpoznaje receptory dla prolaktyny i hormonu wzrostu, a także dla interleukin: IL-2, 7, 9, 15 oraz trompoetyny, erytropoetyny, naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (G-CSF) (11, 12). Niektóre z tych receptorów w czasie różnicowania prezentowane są jednocześnie na różnych komórkach. Na przykład, aktywowany przez erytropoetyne czynnik STAT5 w czerwonych krwinkach, a przez prolaktynę w gruczole mlekowym, może działać w tym samym czasie w dwóch typach tkanek, indukując tym samym transkrypcję genów wpływających na różne cechy (4). Ekspresję czynnika transkrypcyjnego STAT5 oprócz gruczołu mlekowego zaobserwowano także w limfocytach T oraz komórkach szpikowych i miało to przypuszczalnie związek z tym, że myszy wykorzystywane w doświadczeniu cierpiały na białaczkę (12).

Podobnie jak wszystkie białka z rodziny STAT, także białko STAT5A zawiera pięć konserwatywnych domen.

Domena odpowiedzialna za wiązanie tego czynnika transkrypcyjnego z DNA rozpoznaje sekwencję aminokwasową określaną jako GAS (γ -interferon-activated-sequence), na którą składa się motyw następujących aminokwasów: 5' TTCNNNGAA 3' (12, 14). Sekwencja GAS obecna jest, między innymi, w promotorze genu β -kazeiny, ale także w białkach kwaśnej serwatki mleka (WAP-Whey Acidic Protein), β -laktoglobulinie oraz α s1-kazeinie (12, 16). Promotor β -kazeiny ma także miejsce wiązania dla receptora glukokortykoidów i insuliny, co może prawdopodobnie wzmocnić działanie czynnika transkrypcyjnego STAT5

(4, 12).

W 16 eksonie genu STAT5A zlokalizowana jest domena SH2. Jest ona bardzo ważnym elementem białka, ponieważ bierze udział w procesie aktywacji czynnika STAT5A, a konkretnie w jego dimeryzacji (5).

Najmniej konserwatywną domeną jest terminalna domena COOH, która niezbędna jest do pełnej aktywności genu STAT5A. Najbardziej zachowawczą częścią domeny C-końca jest segment czterech aminokwasów (Pro-Met-Ser-Pro) (4). Jednocześnie właśnie w obrębie odcinka C-końca istnieją elementy, które różnią białka STAT5A i STAT5B (22).

Gen czynnika transkrypcyjnego STAT5A zlokalizowano u bydła w 19 chromosomie w obrębie ramienia długiego w pozycji 17 (10). Umiejscowiony jest on wewnątrz *locus* „STAT” o wielkości 40 kpz, gdzie znajdują się również geny STAT3 oraz STAT5B (19, 22). Dla porównania, gen STAT5A u myszy znajduje się w chromosomie 11, u człowieka w chromosomie 17 (2), u kozy, podobnie jak u bydła, w chromosomie 19, natomiast u owiec w chromosomie 11 (10).

Gen czynnika transkrypcyjnego STAT5A u bydła ma długość 15947 pz i zawiera 19 eksonów. W dwóch pierwszych eksonach oraz w ostatnim znajdują się sekwencje oskrzydlające (UTR). W eksonie I i II rejon kodujący 5' UTR mRNA ma długość 187 nukleotydów, natomiast w eksonie ostatnim rejon kodujący 3' UTR mRNA ma długość 846 pz (nukleotydy 15101-15947). Otwarta ramka odczytu (ORF) rozpoczyna się wraz z wystąpieniem sekwencji ATG w pozycji 1025 końca 5' (6).

Wpływ polimorfizmu w genie STAT5A na cechy użytkowe bydła

Badania nad wpływem polimorfizmów w genie czynnika transkrypcyjnego STAT5A na cechy użytkowe bydła prowadzone były, jak dotąd, głównie w kierunku cech użytkowości mięsnej. W 7 eksonie genu STAT5A u bydła wykryto polimorfizm, który powodowany jest transycją C→T w pozycji 6853 (5). Substytucję tę można rozpoznać metodą RFLP, stosując enzymy restrykcyjne, takie jak: *Ava*I lub *Dde*I, uzyskując następujące genotypy: CC, CT oraz TT, przy czym ostatni z wymienionych genotypów wystąpił jedynie u bydła polskiego czerwonego i białogrzbietego. Największy wpływ na cechy mięsności u bydła zaobserwowano u osobników o genotypie CC. Buhaje o genotypie CC STAT5A/*Ava*I były w wieku 9 i 15 miesięcy cięższe, posiadały większą wydajność rzeźną, lepsze parametry tuszy oraz lepiej wykorzystywały paszę

w przeliczeniu na produkcję mięsa niż buhaje o genotypie CT (5).

Z badań, jakie przeprowadził Kmieć i współpracownicy (dane niepublikowane) wynika, iż polimorfizm genu STAT5A/AvaI nie wpływa istotnie na cechy użytkowości mlecznej bydła holsztyńsko-fryzyjskiego odmiany czerwono-białej, choć w pierwszej laktacji nieco wyższymi wartościami wydajności mleka oraz wydajności tłuszczu charakteryzowały się osobniki o genotypie CT. Jednak, jak już wcześniej wspomniano, nie były to różnice statystycznie istotne.

Kolejnym polimorfizmem genu STAT5A jest delecja trinukleotydu CCT w 15 intronie w pozycji od 12549 do 12551 (8). Polimorfizm ten identyfikowano za pomocą metody PCR-heteroduplex (PCR-HD), co pozwoliło określić 3 genotypy: AA, AB oraz BB. Wstępne wyniki wykazały, że w poszczególnych stadach frekwencje genotypów znacznie się różniły, np. genotyp AA u bydła rasy charolaise ujawnił się u 61% osobników, natomiast u bydła fryzyjskiego oraz red angus aż u 83%. Genotyp BB zidentyfikowany został tylko u bydła rasy charolaise oraz limousin, natomiast u bydła fryzyjskiego nie występował (8).

Metodą PCR-RFLP przy użyciu enzymu MspI zidentyfikowano także polimorfizm w 16 eksonie, który polega na substytucji T→C w pozycji 12743 (5). Tranzycja ta zmienia sekwencję aminokwasową w pozycji 686 (walina/alanina). Za istotnością tego polimorfizmu przemawia także fakt, iż wystąpił on w eksonie, który koduje domenę SH2, odpowiedzialną za dimeryzację i aktywację czynnika transkrypcyjnego STAT5A. Zauważono także, że po raz pierwszy genotyp miał wpływ na wiązanie się białek jądrowych. Stwierdzono, że buhaje o genotypie CC wykazywały większe powinowactwo do sondy DNA, którą znakowano [³²P] dCTP niż buhaje o genotypie TT. Sonda DNA zawierała sekwencję GAS (5).

Za pomocą metody SSCP odkryto polimorfizm SNP (single nucleotide polymorphism) polegający na tranzycji adeniny w miejsce guaniny (A→G). Zlokalizowany jest on w 9 intronie genu STAT5A w pozycji 9501 (3). Badania te wykazały, że krowy czarno-białe nie wykazywały statystycznie istotnych powiązań między genotypami a produkcją mleczną, natomiast takie różnice pojawiły się u krów rasy jersey. Najwyższą wydajnością pod względem mleczności charakteryzowały się krowy o genotypie GG, natomiast mleko krów o genotypie AG zawierało więcej białka niż mleko bydła o genotypach AA oraz GG. Co do zawartości tłuszczu w mleku, najwyższy jego poziom podczas 1. i 2. laktacji wykazywały krowy o genotypie AA (3).

W rejonie promotorowym występuje także mutacja polegająca na tranzycji A→G w pozycji 488. Przeprowadzone badania wykazały, że miejsce polimorfizmu jest także miejscem dla wiązania innego czynnika transkrypcyjnego, jakim jest HNF-3 (hepatocyte nuclear factor-3), co może mieć antagonistyczny wpływ na ekspresję czynnika STAT5A (7).

Oprócz wyżej wymienionych polimorfizmów genu STAT5A, odkrytych i opisanych przez polskich naukowców, zidentyfikowano także polimorfizm powtórzeń TG w intronie 12 (22) oraz polimorfizm SSCP w postaci dwóch alleli – A i B oraz trzech genotypów: AA, AB, BB

we fragmencie genu kodującym domenę SH2 (1). Zaobserwowano ostatnio także trzy wzory genotypów SSCP u bydła rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (17).

Badania, jakie prowadzone są nad wpływem polimorfizmu czynnika transkrypcyjnego STAT5A na cechy użytkowe bydła, mogą być przesłanką do stwierdzenia, że gen STAT5A może być potencjalnym markerem cech ilościowych (QTL) u bydła, co jednocześnie wiąże się z koniecznością prowadzenia dalszych badań nad tym genem.

Piśmiennictwo

1. Antoniou E., Hirts B. J., Grosz M., Skidmore C. J.: A single strand conformation polymorphism in the bovine gene STAT5A. *Anim. Genet.* 1999, 30, 225-244.
2. Benekli M., Maria R. B., Baumann H., Wetzler M.: Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 2003, 101, 2940-2954.
3. Brym P., Kamiński S., Ruś A.: New SSCP polymorphism within bovine STAT5A gene and its associations with milk performance traits in Black-and-White and Jersey cattle. *J. Appl. Genet.* 2004, 45, 445-452.
4. Darnell J. E. Jr.: STATs and gene regulation. *Science* 1997, 277, 1630-1635.
5. Flisikowski K., Oprządek J., Dymnicki E., Zwierzchowski L.: New polymorphism in bovine STAT5A gene and its association with meat production traits in beef cattle. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2003b, 21, 147-157.
6. Flisikowski K., Szymanowska M., Zwierzchowski L.: The DNA binding capacity of genetic variants of the bovine STAT5A transcription factor. *Cell. Mole. Biol. Lett.* 2003a, 8, 831-840.
7. Flisikowski K., Starzyński R. R., Zwierzchowski L.: Promoter variant – dependent expression of the STAT5A gene in bovine liver. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1679, 195-199.
8. Flisikowski K., Zwierzchowski L.: Polymerase chain reaction-heteroduplex (PCR-HD) polymorphism within the bovine STAT5A gene. *J. Appl. Genet.* 2003, 44, 185-189.
9. Freeman M. E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G.: Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 2000, 80, 1523-1631.
10. Goldammer T., Meyer L., Seyfert H. M., Brunner R. M., Schwerin M.: STAT5A encoding gene maps to chromosome 19 in cattle and goat and chromosome 11 in sheep. *Mammal Genome* 1997, 8, 705-706.
11. Hendry L., John S.: Regulation of STAT signaling by proteolytic processing. *Eur. J. Biochem.* 2004, 271, 4613-4620.
12. Javnilovitch E., Groner B., Barasch I.: Overexpression and Forced Activation of STATs in Mammary Gland of Transgenic Mice Promotes Cellular Proliferation, Enhances Differentiation, and Delays Postlactational Apoptosis. *Mol. Cancer Res.* 2002, 1, 32-47.
13. Ihle J. N.: STATs: Signal transducers and activators of transcription. *Cell* 1996, 84, 331-334.
14. Joung Y. H., Park J. H., Park T., Lee C. S., Kim O. H., Ye S. H., Yang U. M., Lee K. J., Yang Y. M.: Hypoxia activates signal transducers and activators of transcription 5 (STAT5) and increases its binding activity to the GAS element in mammary epithelial cells. *Exp. Mol. Med.* 2003, 35, 350-357.
15. Jove R.: Preface: STAT signaling. *Oncogene* 2000, 19, 2466-2467.
16. Kazansky A. V., Raught B., Lindsey S. M., Wang Y., Rosen J. M.: Regulation of mammary gland factor/STAT5A during mammary gland development. *Mol. Endocrinol.* 1995, 9, 1598-1609.
17. Lee H., Dekkers J. C. M., Soller M., Malek M., Fernando R. L.: Application of the false discovery rate to quantitative trait loci interval mapping with multiple traits. *Genetics* 2002, 161, 905-914.
18. McCracken J. Y., Molenaar A., Snell R. J., Davey H. W., Wilkins R. J.: Polymorphic TG repeats presents within the bovine STAT5A gene. *Anim. Genet.* 1997, 28, 453-464.
19. Molenaar A., Wheeler T. T., McCracken J. Y., Seyfert H. M.: The STAT 3-encoding gene resides within the 40 kbp gap between the STAT5A- and STAT5B-encoding genes in cattle. *Anim. Genet.* 2000, 31, 333-346.
20. Nanashima N., Asano J., Hayakari M., Nakamura T., Nakano H., Yamada T., Shimizu T., Akita M., Fan Y., Tsuchida S.: Nuclear localization of STAT5 modified with O-linkedN – acetylglucosamine and early involution in the mammary gland of Hirosaki Hairless Rat. *JBC Pap.* 2005 (w druku).
21. Rawlings J. S., Rosler K. M., Harrison D. A.: The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* 2004, 117, 1281-1283.
22. Seyfert H., Pitra C., Meyer L., Brunner R. M., Wheeler T. T., Molenaar A., McCracken J. Y., Herrmann J., Thiesen H., Schwerin M.: Molecular characterization of STAT5A- and STAT5B-encoding genes reveals extended intragenic sequence homogeneity in cattle and mouse and different degrees of divergent evolution of various domains. *J. Molec. Evolution* 2005, 50, 550-561.
23. Wakao H., Schmitt-Ney M., Groner B.: Mammary Gland-specific Nuclear Factor Is Present in Lactating Rodent and Bovine Mammary Tissue and Composed of a Single Polypeptide of 89 kDa. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 16365-16370.
24. Wakao H., Gouilleux F., Groner B.: Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J.* 1994, 13, 2182-2191.

Adres autora: mgr inż. Tomasz Grzelak, ul. Doktora Judyma 6, 71-460 Szczecin; e-mail: tomasz.grzelak@biot.ar.szczecin.pl