

# Zależność między polimorfizmem w genie leptyny a liczbą komórek somatycznych i cechami użytkowości mlecznej krów

HANNA KULIG, MAREK KMIEĆ, INGA KOWALEWSKA-ŁUCZAK,  
KATARZYNA WOJDAK-MAKSYMIEC, KATARZYNA TORCHAŁA-BIELASZEWSKA

Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR,  
ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin

Kulig H., Kmieć M., Kowalewska-Łuczak I., Wojdak-Maksymiec K., Torchała-Bielaszewska K.

## Association between leptin gene polymorphism, somatic cell count, and milk production traits in cows

### Summary

The aim of the study was to investigate how leptin R4C single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin gene affects the somatic cell count (SCC) in milk as well as milk production traits such as daily milk yield, fat content, protein content, lactose content, and dry matter content in milk. A total of 162 Polish Holstein-Friesian (Red-White strain) cows were used in this study. The genotype and allele frequencies were as follows: CC – 0.26, CT – 0.56, TT – 0.18, C – 0.54, T – 0.46. Statistical analysis revealed that the studied polymorphism significantly affected the daily milk yield ( $P \leq 0.05$ ). The results indicate that selection of R4C TT animals might contribute to increased milk yield in Holstein-Friesian cattle.

**Keywords:** cattle, leptin, somatic cells, milk production

Jednym z najważniejszych celów współczesnej genetyki zwierząt gospodarskich jest poszukiwanie mutacji genowych wpływających na zmienność cech użytkowych. Cechami podlegającymi ciągłemu doskonaleniu u bydła mlecznego są, z racji kierunku użytkowego, wydajność i jakość mleka. Ostatnio coraz większą uwagę przywiązuje się także do obniżania liczby komórek somatycznych w mleku; należy przy tym uwzględnić, żeby nie zostały przekroczone granice uważane za fizjologiczne (25-50 tysięcy w 1 ml). Takie podejście może przyczynić się do zmniejszenia podatności na zapalenie wymienia (*mastitis*), które jest głównym i bardzo kosztownym schorzeniem bydła mlecznego. Przyczynia się do strat ekonomicznych w przemyśle mlecznym, powodując obniżenie wydajności mleka oraz zmianę jego składu. Zapaleniu wymienia towarzyszy zwiększenie liczby komórek somatycznych w mleku, dzięki czemu stały się one wskaźnikiem zdrowotności wymienia.

Rozwój i doskonalenie narzędzi genetyki molekularnej stwarza możliwość efektywnej identyfikacji pożądaných genotypów, a tym samym genów warunkujących określone cechy ilościowe. Jedną ze stosowanych strategii jest identyfikacja mutacji w genach kandydujących, co ułatwia odkrywanie i lokalizowanie genów o dużym efekcie (a w szczególności muta-

cji funkcjonalnych) dla cech użytkowych (18). Jednym z proponowanych genów kandydujących dla cech użytkowości mlecznej bydła jest gen kodujący leptynę.

Leptyna jest hormonem polipeptydowym o masie cząsteczkowej 16 kDa, produkowanym głównie przez komórki tłuszczowe, jak również gruczoł mlekowy w czasie laktacji (2, 19). Jej receptory ulegają ekspresji w wielu tkankach i komórkach, w tym w komórkach układu immunologicznego. Dowiedziono, że leptyna wpływa na szereg procesów zachodzących w organizmie, a w szczególności bierze udział w utrzymaniu bilansu energetycznego poprzez regulację pobierania pokarmu i wydatkowania energii. Zaangażowana jest ponadto w procesy związane z reprodukcją, a także w funkcjonowanie układu immunologicznego (6). Wykazano, że leptyna odgrywa znaczącą rolę w odpowiedzi immunologicznej, pośredniczy w proliferacyjnej oraz antyapoptotycznej aktywności limfocytów T i monocytów, a także przyczynia się do opóźnienia apoptozy neutrofilii i do wydzielania prozapalnych cytokin (3, 13). Stwierdzono również podwyższone stężenie leptyny we krwi w czasie infekcji i procesów zapalnych (1).

Gen kodujący leptynę zmapowano w chromosomie 4 bydła (14), a w jego obrębie zidentyfikowano wiele miejsc polimorficznych (8, 14). Stwierdzono, że u róż-

nych ras była istniejąca zależność między niektórymi podstawieniami pojedynczych nukleotydów (SNP – single nucleotide polymorphism) w obrębie genu leptyny i cechami użyteczności mlecznej (5, 7, 9, 10, 12, 20), a także liczbą komórek somatycznych w mleku (5, badania własne nie publikowane).

Celem badań było określenie częstości występowania genotypów leptyny (R4C) oraz ocena zależności między nimi a liczbą komórek somatycznych i wartością cech użyteczności mlecznej bydła.

### Materiał i metody

Badaniami objęto 162 krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej, odmiany czerwono-białej. Krowy utrzymywane były w gospodarstwie na terenie Pomorza Zachodniego w identycznych warunkach, żywione standardowymi dawkami, pojone *ad libitum*. Zwierzęta urodzone były w latach 1994-2001 i pochodziły od 43 ojców.

Materiał badawczy stanowiła krew z żyły szyjnej zewnętrznej pobrana do próbek zawierających  $K_3EDTA$ . Izolację DNA z pełnej krwi obwodowej przeprowadzono z użyciem zestawu MasterPure (Epicentre®), zgodnie z instrukcjami producenta. Analizowano miejsce polimorficzne zlokalizowane w trzecim eksonie. Zachodzi w nim transycja C/T, która na poziomie białka powoduje zamianę argininy w cysteinę (polimorfizm R4C). Amplifikacja fragmentu genu o długości 94 par zasad przeprowadzona została przy użyciu pary następujących starterów: 5'-ATG CGC TGT GGA CCC CTG TAT-3' oraz 5'-TGG TGT CAT CCT GGA CCT TCC-3' (4). Produkty amplifikacji trawiono 5 U enzymu restrykcyjnego Kpn2I. Uzyskane fragmenty restrykcyjne rozdzielane były następnie w żelach agarozowych z dodatkiem bromku etydyny ( $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), w obecności odpowiedniego wzorca DNA. Uzyskane produkty trawienia były wizualizowane, a następnie oceniane i opisane z użyciem systemu archiwizacji rozdziałów elektroforetycznych firmy Vilber Lourmat.

Kolejnym krokiem było określenie częstości występowania alleli i genotypów leptyny. Ponadto oszacowano, czy istnieją zależności między genotypami a liczbą komórek somatycznych (ln) oraz wartością następujących cech użyteczności mlecznej krow: dobowej wydajności mleka (kg), zawartości białka, tłuszczu i laktozy w mleku (%), a także zawartości suchej masy (%). Dane użytkowe badanych zwierząt pochodziły z dokumentacji hodowlanej prowadzo-

nej dla każdego stada w ramach oceny użyteczności mlecznej (karta jałówki-krowy, tabulogram).

W badaniach zastosowano model wieloczynnikowy, mieszany, hierarchicznie zagnieżdżony, z pakietu GLM – General Linear Model (17):

$$y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l(a_i) + e(\text{HF}) + f(\text{LT}) + g_{ijkl}$$

gdzie:  $y_{ijkl}$  – wartość obserwowanej cechy u osobnika;  $\mu$  – średnia wartość cechy dla stada;  $a_i$  – efekt genotypu ( $i = 1, 2, 3$ );  $b_j$  – efekt roku urodzenia/miesiąca urodzenia ( $j = 1, 2, \dots, 45$ );  $c_k$  – efekt laktacji ( $k = 1, \dots, 9$ );  $d_l(a_i)$  – efekt krowy, czynnik zagnieżdżony w genotypie leptyny ( $m = 1, 2, \dots, 162$ );  $e(\text{HF})$  – współczynnik regresji udziału % HF na wartość cechy;  $f(\text{LT})$  – współczynnik regresji dnia laktacji na wartość cechy;  $g_{ijkl}$  – błąd.

Różnice między średnimi wartościami cech zostały przeanalizowane przy pomocy testu wielokrotnego rozstępu Duncana.

### Wyniki i omówienie

Analiza restrykcyjna po zastosowaniu enzymu Kpn2I umożliwiła rozróżnienie trzech genotypów w badanym stadzie krow rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej, odmiany czerwono-białej. Długości uzyskanych w wyniku trawienia fragmentów dla poszczególnych alleli były następujące: 94 pary zasad (brak miejsca rozpoznawanego przez enzym) dla allelu C oraz 75 i 19 par zasad dla allelu T. Wykazano, że częstość występowania alleli w badanym stadzie krow wynosiła: C – 0,54, T – 0,46. Genotyp CT występował z najwyższą częstością, której wartość kształtowała się na poziomie 0,56, natomiast pozostałe genotypy występowały, odpowiednio, z częstością: 0,26 – genotyp CC oraz 0,18 – genotyp TT. Wyniki zbliżone są do uzyskanych w badaniach prowadzonych na innych stadach bydła tej rasy (5, 11, 12).

Analiza wariancji wykazała, że efekt roku urodzenia/miesiąca urodzenia oraz efekt krowy miały istotny wpływ na wartość wszystkich badanych cech użyteczności mlecznej, natomiast efekt laktacji wpływał istotnie na dobową wydajność mleka, zawartość białka i laktozy w mleku oraz liczbę komórek somatycznych (LKS).

W tab. 1 przedstawiono średnie wartości badanych cech u krow o różnych genotypach leptyny. Wyniki badań wykazały statystycznie istotne różnice ( $p \leq 0,05$ )

Tab. 1. Cechy użyteczności mlecznej krow z różnymi genotypami leptyny ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

Cecha	Genotyp (n)			Średnio
	CC (894)	CT (1841)	TT (657)	
Dobowa wyd. mleka (kg)	23,87 ± 7,67	23,40 ± 7,15 <sup>a</sup>	24,35 ± 7,99 <sup>b</sup>	23,69 ± 7,47
Zawartość tłuszczu (%)	4,43 ± 1,02	4,38 ± 1,01	4,30 ± 0,99	4,37 ± 1,01
Zawartość białka (%)	3,35 ± 0,41	3,34 ± 0,42	3,39 ± 0,37	3,35 ± 0,41
Zawartość laktozy (%)	5,74 ± 1,25	5,67 ± 1,17	5,74 ± 1,21	5,71 ± 1,20
LKS (ln)	4,78 ± 0,23	4,81 ± 0,26	4,82 ± 0,25	4,80 ± 0,25
Zawartość suchej masy (%)	13,45 ± 1,26	13,42 ± 1,27	13,37 ± 1,30	13,42 ± 1,27

Objaśnienia: a, b – średnie wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się między sobą istotnie przy  $p \leq 0,05$

w dobowej wydajności mleka między osobnikami o różnych genotypach. Stwierdzono, że wyższą wartością tej cechy charakteryzowały się krowy o genotypie TT w porównaniu z krowami o heterozygotycznym genotypie CT, przy czym różnica wynosiła 0,95%.

W przypadku pozostałych analizowanych cech, mianowicie: dobowej wydajności mleka, zawartości tłuszczu, białka i laktozy w mleku oraz LKS i suchej

masy w mleku, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy krowami o różnych genotypach leptyny (tab. 1).

Badania zależności między SNPs w genach kandydujących dla cech użytkowych bydła a wartościami tych cech prowadzone są na szeroka skalę. Analizowany był także wpływ polimorfizmu różnych genów (m.in. BoLA-DRB3 i laktoferyny) na liczbę komórek somatycznych w mleku (15, 16). Wyniki dotyczące zależności między polimorfizmem R4C w genie leptyny a liczbą komórek somatycznych w mleku oraz wartościami cech użytkowości mlecznej są dość skromne. Prezentowane badania wykazały, że istnieje zależność między genotypami R4C leptyny a dobową wydajnością mleka u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, odmiany czerwono-białej. Potwierdzone zostały tym samym wyniki badań Buchanan i wsp. (5), którzy stwierdzili istotny wpływ SNP R4C na dobową wydajność mleka, szczególnie w początkowym stadium laktacji, u bydła rasy holsztyńskiej; osobniki o genotypie TT charakteryzowały się istotnie wyższą wartością tej cechy w porównaniu z osobnikami o genotypie CC, a ponadto u krów homozygotycznych TT stwierdzono istotnie wyższą wydajność białka w pierwszych 100 dniach laktacji niż u osobników o genotypie CC. Badano także wpływ polimorfizmu R4C na wartość hodowlaną dla cech mleczności u buhajów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, odmiany czarno-białej. Komisarek i wsp. (7) stwierdzili, że samce homozygotyczne TT charakteryzowały się istotnie wyższą wartością hodowlaną dla wydajności mleka i białka oraz zawartości tłuszczu w mleku niż buhaje o genotypie CC. Madeja i wsp. (12) nie wykazali natomiast istotnych zależności między SNP a wartością hodowlaną dla cech użytkowości mlecznej w badanym stadzie buhajów.

W prezentowanych badaniach nie stwierdzono istotnych różnic w liczbie komórek somatycznych między krowami o różnych genotypach. Nie zostały tym samym potwierdzone wyniki badań Buchanan i wsp. (5), którzy, badając krowy rasy holsztyńskiej, stwierdzili istotnie większą liczbę komórek somatycznych w mleku osobników homozygotycznych TT w porównaniu z osobnikami o genotypie CC. Te niejednoznaczne wyniki mogą wynikać ze specyfiki badanego stada. Warto zatem przeprowadzić podobne badania w innych stadach, a nawet rasach bydła mlecznego, aby móc zweryfikować otrzymane wyniki. Jest to tym bardziej uzasadnione, że nie ma danych literaturowych z tego zakresu, które dotyczyłyby ras bydła mlecznego hodowanego w Polsce.

Polimorfizm R4C generuje niekonserwatywne przedstawienie argininy cysteiną w sekwencji aminokwasów w cząsteczce leptyny. Może to prawdopodobnie wpływać na strukturę i funkcję białka (np. zakłócenie wiązania do receptora, destabilizacja mostka dwusiarczkowego), co sugeruje funkcjonalny efekt omawianego polimorfizmu (4).

## Podsumowanie

Wyniki badań wykazały, że istnieje zależność między genotypami R4C leptyny a dobową wydajnością mleka u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, odmiany czerwono-białej. Sugeruje to, że jeśli programy hodowlane opracowywane byłyby w oparciu o powyższy polimorfizm, preferowanie w hodowli osobników o genotypie R4C TT mogłoby przyczynić się do polepszenia wydajności mleka. Uzasadnione jest kontynuowanie badań w tym kierunku, ponieważ istnieje ciągła potrzeba niezależnej weryfikacji otrzymanych wyników przed ich wykorzystaniem w programach selekcji bydła mlecznego.

## Piśmiennictwo

- Bernotiene E., Palmer G., Gabay C.: The role of leptin in innate and adaptive immune responses. *Arthritis Res. Ther.* 2006, 8, 217-226.
- Bonnet M., Delavaud C., Laud K., Gourdou I., Leroux C., Djiane J., Chilliard Y.: Mammary leptin synthesis, milk leptin and their putative physiological roles. *Reprod. Nutr. Dev.* 2002, 42, 399-413.
- Bruno A., Conus S., Schmid I., Simon H.-U.: Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils. *J. Immunol.* 2005, 174, 8090-8096.
- Buchanan F. C., Fitzsimmons C. J., Van Kessel A. G., Thue T. D., Winkelmann-Sim D. C., Schmutz S. M.: Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet. Sel. Evol.* 2002, 34, 105-116.
- Buchanan F. C., Van Kessel A. G., Waldner C., Christensen D. A., Laarveld B., Schmutz S. M.: Hot Topic: An association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *J. Dairy Sci.* 2003, 86, 3164-3166.
- Houseknecht K. L., Baile C. A., Matteri R. L., Spurlock M. E.: The Biology of leptin: a review. *J. Anim. Sci.* 1998, 76, 1405-1420.
- Komisarek J., Szyda J., Michalak A., Dorynek Z.: Impact of leptin gene polymorphism on breeding value for milk production traits in cattle. *J. Anim. Feed Sci.* 2005, 14, 491-500.
- Konfortov B. A., Licence V. E., Miller J. R.: Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. *Mamm. Genome* 1999, 10, 1142-1145.
- Kulig H.: Association between leptin gene polymorphism and some performance traits of cattle. *J. Anim. Feed Sci.* 2005, 14, 235-243.
- Liefers S. C., te Pas M. F., Veerkamp R. F., van der Lende T.: Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 1633-1638.
- Liefers S. C., Veerkamp R. F., te Pas M. F. W., Delavaud C., Chilliard Y., van der Lende T.: Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and estrus in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2003, 86, 799-807.
- Madeja Z., Adamowicz T., Chmurzyńska A., Jankowski T., Melonek J., Świtońska M., Strabel T.: Short communication: Effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. *J. Dairy Sci.* 2004, 87, 3925-3927.
- Matarese G., Moschos S., Mantzoros C. S.: Leptin in immunology. *J. Immunol.* 2005, 173, 3137-3142.
- Pomp D., Zou T., Clutter A. C., Barendse W.: Rapid communication: Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *J. Anim. Sci.* 1997, 75, 427.
- Sender G., Korwin-Kossakowska A., Galak B.: Wpływ polimorfizmu genu BoLA-DRB3 na występowanie mastitis u krów. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 540-542.
- Sender G., Korwin-Kossakowska A., Hameid K. G. A., Prusak B.: Ocena wpływu polimorfizmu wybranych genów na występowanie mastitis u krów. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 563-565.
- Statistica, wersja 7.1., 2006, StatSoft Polska.
- Wu X.-L., MacNeil M. D., De S., Xiao Q.-J., Michal J. J., Gaskins C. T., Reeves J. J., Busboom J. R., Wright Jr. R. W., Jiang Z.: Evaluation of candidate gene effect for beef backfat via Bayesian model selection. *Genetica* 2005, 125, 103-113.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J. M.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994, 372, 425-432.
- Zwierchowski L., Krzyżewski J., Strzałkowska N., Siadkowska E., Ryniewicz Z.: Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black-and-White cows. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2002, 20, 213-227.

Adres autora: dr Hanna Kulig, ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin;  
e-mail: hanna.kulig@biot.ar.szczecin.pl