



## **Sklonowane cDNA genów pPAG (*porcine Pregnancy-Associated Glycoprotein*) jako użyteczne matryce wykorzystywane do proteomiki i genomiki diagnostycznej**

Grzegorz Panasiewicz, Bożena Szafrąńska  
Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

### **Cloned cDNA of the pPAG genes (*porcine Pregnancy-Associated Glycoprotein*) as useful templates for proteomical and genomic di- agnoses**

#### Summary

The PAG (Pregnancy-Associated Glycoproteins) gene family and chorionic expressions of their products suggest an important role(s) of this glycoprotein family throughout pregnancy in various mammals (pig, cattle, sheep, goat, hourse, zebra, cat and mouse).

Each cloned cDNA is a major source of template for recombinant PAG protein productions, necessitated for requirements at various diagnostic tests of early pregnancy in ruminants. Moreover, each cDNA may be applied as template for preparation of selective genetic tests (i.e. micro-arrays), can provide essential background for estimation of correlations between various PAG genotypes and physiological reproductivity of each animal. Aforementioned genetic tests presumably will allow for pre-selection of young individuals with effective reproductive performances.

#### Key words:

cDNA, pregnancy, pPAG genes, trophoctoderm, aspartic proteinases, trophoblast.

#### Adres do korespondencji

Grzegorz Panasiewicz,  
Katedra Fizjologii Zwierząt,  
Wydział Biologii,  
Uniwersytet  
Warmińsko-Mazurski,  
ul. Oczapowskiego 1A,  
10-719 Olsztyn;  
e-mail:  
panasg@uwm.edu.pl

## 1. Wprowadzenie

Historia identyfikacji rodziny genów kodujących glikoproteiny ciężowe PAG (*Pregnancy-Associated Glycoproteins*) jest stosunkowo krótka i obejmuje ostatnie kilkanaście lat, jednakże kilka różnie nazywanych białek zakwalifikowanych do tej rodziny wyizolowano ok. 20 lat temu. Komplementarne DNA (cDNA) licznych genów PAG dotychczas sklonowano wyłącznie u zwierząt łożyskowych (tab.), geny te nazwano porcine PAG – u świń, bovine PAG – u bydła, ovine PAG – u owiec, caprine PAG – u kóz, equine PAG – u koni, zebra PAG – u zebra, feline PAG – u kotów oraz murine PAG – u myszy, a następnie zdeponowano w międzynarodowej bazie danych GenBank NCBI/NIH (National Center for Biotechnology Information/National Institutes of Health).

Tabela

Przynależność taksonomiczna wybranych łożyskowców, uwzględniająca ich typy łożysk, liczbę sklonowanych cDNA genów z rodziny PAG (zdeponowanych w międzynarodowej bazie danych GenBank) oraz długość kodowanych prekursorów polipeptydowych

Taksonomia			Typ łożyska	Rodzina PAG			Literatura
Rząd	Podrząd	Gatunek		Nazwa genów	Liczba sklonowanych cDNA	Kodowane polipeptydy [aa]	
nieparzystokopytne ( <i>Perissodactyla</i> )	koniokształtne ( <i>Hippomorpha</i> )	koń ( <i>Equus caballus</i> )	rozproszone nabłonkowo- koscówkowe ( <i>Placenta diffusa</i> )	ePAG	1	388	(4)
		zebra ( <i>Equus zebra</i> )		zPAG	1	388	
parzystokopytne ( <i>Artiodactyla</i> )	nieprzeżuwające ( <i>Suina</i> )	świnia ( <i>Sus scrofa</i> )	liścieniowate łączno- koscówkowe ( <i>Placenta cotyledonaria</i> )	pPAG	7	341-389	(2,41-48)
		krowa ( <i>Bos taurus</i> )		bPAG	21	341-381	(1,3,20,55)
	przeżuwające ( <i>Ruminantia</i> )	koza domowa ( <i>Capra hircus</i> L.)	oPAG	cPAG	11	341-386	(5)
		owca ( <i>Ovis aries</i> )		oPAG	9	341-382	(1,3,24)
gryzonie ( <i>Rodentia</i> )	( <i>Myomorpha</i> )	mysz domowa ( <i>Mus musculus</i> )	łożysko tarczowe ( <i>Placenta discoidalis</i> )	mPAG	1	387	(6)
mięsożerne ( <i>Carnivora</i> )	( <i>Fissipedia</i> )	kot ( <i>Felis catus</i> )	łożysko poprzęgowe ( <i>Placenta zonaria</i> )	fPAG	1	388	(7)

Pierwszymi poznanymi przedstawicielami z rodziny PAG były geny bPAG1 i oPAG1, które wykryto w 1991 r. u przeżuwaczy tzn. u bydła i owiec oraz sklonowano ich cDNA (1). W następnych latach sklonowano cDNA genów pPAG1 i pPAG2,

pierwszych przedstawicieli rodziny PAG u *Artiodactyla* (nieprzeżuwające) tzn. u świń (2). Ostatnio sklonowano kolejne geny PAG u przeżuwaczy (3), a także wykryto geny PAG u kłacz i zebry (4), kóz (5), myszy (6) i kotki (7). Dotychczas zidentyfikowano sekwencje nukleotydowe cDNA 21 genów bPAG, 9 genów oPAG, 11 genów cPAG, 7 genów pPAG oraz pojedyncze cDNA genów: ePAG, zPAG, fPAG oraz mPAG. Sekwencje cDNA wszystkich poznanych genów z rodziny PAG, reprezentują liczne transkrypty kodujące różne łańcuchy polipeptydowe prekursorów o zróżnicowanej sekwencji (Acc. No.), długości (tab.) oraz profilu ekspresji w miarę rozwoju ciąży (8). Zastanawia zatem, nieznanne ewolucyjne podłoże i fizjologiczne uzasadnienie występowania tak zróżnicowanej liczby genów PAG u poszczególnych łożyskowców.

Poprzednio sklonowane cDNA genów PAG wykorzystano jako sondy molekularne do stwierdzenia występowania rodziny genów PAG u kolejnych gatunków ssaków. Zastosowanie analizy Southern pozwoliło na wykrycie występowania rodziny genów PAG w genomach wielu dziko żyjących przeżuwaczy oraz gatunków pokrewnych (3), jednakże cDNA tych genów nie zostało dotychczas sklonowane. Ponadto, genomowe DNA wyizolowane z leukocytów krwi obwodowej lub innych źródeł (cebulki włosowe i sperma), a następnie amplifikowane metodą PCR oraz hybrydowane z sondami cDNA znakowanymi radioaktywnym fosforem ( $^{32}\text{P}$ ), wykazało występowanie nie zidentyfikowanych dotychczas genów PAG-podobnych u wielu różnych łożyskowców, np. dzików, żubrów, jeleni, saren, bobrów, szczurów oraz ludzi (9-13).

Rodzina genów PAG koduje różne prekursorzy białek kosmówkowych, wśród których poznano tylko nieliczne, wyizolowane z błon łożyskowych bydła (14) i nazwane specyficznymi białkami ciążowymi B (ang. *PSPB* – *Pregnancy Specific Protein B*). Wśród kosmówkowych białek PAG u świń, nazwanych wcześniej pBP (ang. *porcine Basic Proteins*), wyizolowano tylko nieliczne (15-17), które zidentyfikowano dopiero kilkanaście lat później (18), na podstawie wcześniej poznanych sekwencji cDNA genów pPAG (2). U przeżuwaczy, w kolejnych badaniach doprowadzono do wyizolowania licznych białek PAG, PSPB, PSP60, SBU3, będących dominującymi produktami ekspresji rodziny PAG w różnych tkankach łożyskowych u bydła (19-22), nazywanych również PSP60 (23). U owiec, białka PAG (24) znane były wcześniej pod nazwą SBU3 (25) lub oPSPB (26). Ponadto, białka PAG wyizolowano jedynie z tkanek łożyskowych kóz (27) oraz jeleni i łosi (28).

U ludzi dokonano charakterystyki różnych białek łożyskowych: PAPP-A oraz PAPP-B (ang. *Pregnancy-Associated Plasma Protein A, B*), PS $\beta$ G (ang. *Pregnancy Specific  $\beta$ -Glycoproteins*) oraz SP $_{1-3}$  (ang. *pregnancy Specific Glycoprotein 1, 2, 3*) (29-31), jednak nie udało się dotychczas sklonować cDNA oraz zidentyfikować produktów transkrypcji genów PAG u naczelnych.

## 2. Klasyfikacja rodziny genów PAG

Analiza cyfrowa (*in silico*) zdeponowanych w międzynarodowej bazie danych GenBank sekwencji nukleotydowych cDNA genów kodujących prekursorów polipeptydowe PAG, pozwoliła na zaliczenie ich do rodziny proteinaz aspartylowych (AP). Ponadto, poznanie sekwencji ORF umożliwiło wykazanie znaczącego podobieństwa genealogicznego sekwencji prekursorów polipeptydowych PAG.

Rodzina AP (EC 3.4.23) jest szeroko rozpowszechniona wśród kręgowców (32,33), roślin, grzybów (34) oraz retrowirusów (35). Do rodziny AP należą enzymy proteolityczne, m.in. pepsyna A (EC 3.4.23.1), pepsyna C (EC 3.4.23.3), pepsyna F (EC 3.4.23.1), aspergillopepsyna A (EC 3.4.23.18), candidopepsyna (EC 3.4.23.24), renina (EC 3.4.23.15), chymozyny (EC 3.4.23.4) oraz enzymy lizosomalne: katepsyny D (EC 3.4.23.5), katepsyny E (EC 3.4.23.34) (32,36,37). Ostatnio do rodziny AP zaliczono ludzkie napsyny (38) oraz enzymy pasożytnicze: HAP (ang. *Histo-Aspartic Proteinase*) (39) i plazmepsyny (40).

Prekursory polipeptydowe kodowane przez poznane ORF sklonowanych cDNA, zakwalifikowane do rodziny PAG, mają w swojej sekwencji aminokwasowej (aa) dwa regiony (domeny 1 i 2) wchodzące w skład centrum aktywnego tworzącego kieszeń katalityczną (1-5,24). Zachowanie konserwatywnej sekwencji aa w obu domenach warunkuje zakwalifikowanie prekursora polipeptydowego PAG do podrodziny prekursorów potencjalnie aktywnych katalitycznie. Z kolei, wystąpienie różnych substitucji w ww. domenach sugeruje utratę aktywności, a zatem przynależność do podrodziny potencjalnie nieaktywnych katalitycznie. Poznane sekwencje aa przedstawicieli rodziny PAG u świń warunkowały klasyfikację do podrodziny potencjalnie nieaktywnych katalitycznie (pPAG1, pPAG3 i pPAG5) lub podrodziny aktywnych katalitycznie (pPAG2, pPAG4, pPAG6 i pPAG8) (2,41-48).

## 3. Analiza *in silico* struktury przestrzennej prekursorów oraz białek PAG

W konstrukcji przestrzennych modeli prekursorów PAG wykazano, że przedstawiciele PAG, podobnie jak inne prekursory AP, charakteryzują się dwukolistą strukturą oraz występowaniem wgłębienia (kieszeni), tworzącego katalityczne centrum aktywne do wiązania substratów – krótkich peptydów (49). Katalityczna aktywność rodziny AP związana jest z zachowaniem konserwatywnej sekwencji V/IFD<sub>1</sub>TGSS w domenie pierwszej oraz IVDTG<sub>2</sub>TS w domenie drugiej, które to domeny, stwierdzono w sekwencjach łańcuchów polipeptydowych prekursorów znajdujących się po przeciwległych stronach centrum aktywnego. Szczególnie istotna jest obecność dwóch reszt kwasu asparaginowego (D) znajdujących się w każdej z dwóch domen w przeciwległych wewnętrznych stronach kieszeni (Asp<sup>32</sup> oraz Asp<sup>215</sup>, według numeracji w pepsynie). Sekwencje obu domen zostały konserwatywnie zachowane w dotychczas zidentyfikowanych sekwencjach genów, np. bPAG2 (20), pPAG2,

pPAG4, pPAG6, pPAG8 (2,41,43,45,47,48) oraz ePAG (4). Pojedyncze substytucje aa w domenach centrum aktywnego niektórych przedstawicieli PAG (np. bPAG1, oPAG1, pPAG1, pPAG3, pPAG5), sugerują natomiast utratę zdolności enzymatycznych (1,2,42,46,47). Taka zmiana sekwencji aa, nie musi być jednak związana z utratą właściwości enzymatycznych, ponieważ podobne substytucje aa stwierdzono w sekwencji prekursorów HAP oraz plazmepsyn zarodźca zimnicy podzwrotnikowej (*Plasmodium falciparum*), które nie prowadziły do zahamowania cyklu rozwojowego tego pasożyta. Mechanizm zmiany epitopów tego pasożyta umożliwia infekcję oraz rozwój malarii, jednakże mechanizm pasożytniczego unikania ataku układu immunologicznego gospodarza nie został dotychczas poznany (39). Sklonowano cDNA genów HAP tych ludzkich pasożytów (*P. falciparum*), a następnie wykryto różne ich formy (HAP I i II) (39). Geny HAP są bardziej podobne w swojej sekwencji nukleotydowej (nt) do przedstawicieli PAG, niż do sekwencji nt innych poznanych enzymów należących do rodziny AP. Prekursory polipeptydowe kodowane przez geny HAP, wykazują zamianę konserwatywnego fragmentu sekwencji Asp<sup>32</sup>-Thr<sup>33</sup>-Gly<sup>34</sup> (według numeracji w pepsynie) na fragment o sekwencji His-Thr-Ala. W wyniku takiej substytucji aa polipeptydów HAP, prawdopodobnie uniemożliwiającej standardową aktywność katalityczną AP, wyeliminowany został kwas asparaginowy (Asp<sup>32</sup>) w domenie 1, współtworzącej centrum aktywne. Ponadto należy podkreślić, że substytucje aa, które stwierdzono w sekwencji dwóch domen tworzących kieszeń katalityczną HAP, nie spowodowały zahamowania cyklu rozwojowego zarodźca zimnicy podzwrotnikowej, co potwierdza istnienie nie znanego dotychczas mechanizmu aktywacji prekursorów ostatnio zidentyfikowanych przedstawicieli rodziny AP. Dotychczas nie poznano żadnego białka trofoblastycznego, którego mikrosekwencja umożliwiłaby klasyfikację do podrodziny pPAG1-podobnych, w porównaniu do poznanych prekursorów rodziny AP. Zidentyfikowana wcześniej 26 aa mikrosekwencja białka pBP, stanowiąca NH<sub>2</sub>-terminalny początek dojrzałego białka sekrecyjnego (18), podobna do wewnętrznej sekwencji <sup>53</sup>LSK<sup>55</sup> (numerowanie aa) prekursora pPAG2, pPAG4, pPAG6 (2,41,43,45,47), relatywnie odpowiada zidentyfikowanej sekwencji <sup>6</sup>GLK<sup>8</sup> w sekwencji polipeptydu pPAG5 lub <sup>6</sup>LSK<sup>8</sup> w polipeptydzie pPAG8. Stwierdzona całkowita homologia (pPAG8) lub duże podobieństwo (pPAG5) sekwencji dwóch domen poznanych prekursorów, dodatkowo potwierdza sugestie o istnieniu nieznanych różnych mechanizmów aktywacji polipeptydów pPAG (47), podobnie jak aktywacji pasożytniczych prekursorów proteinaz histoaspartylowych (HAP I i II) oraz 9 dotychczas poznanych plazmepsyn (39,40).

Większość poznanych przedstawicieli rodziny AP wykazuje maksymalną aktywność enzymatyczną w kwaśnym pH, a pepstatyna A jest silnym syntetycznym inhibitorem katalitycznym rodziny AP (32,50). W przeprowadzonej analizie prekursorów polipeptydowych, kodowanych przez cDNA genów PAG (47) w porównaniu do sekwencji cDNA genów poznanych pepsynogenów (51,52), wykazano istnienie 15 aa podobnego peptydu sygnałowego, 38 aa różnego peptydu blokującego kieszeń katalityczną u bydła i owiec (1), 33 aa peptydu u koni (4) oraz 37 aa peptydu u świń

(2,53,54). Krótkie peptydy (33 – 38 aa) są odcinane w procesie posttranslacyjnego dojrzewania prekursorów polipeptydowych PAG, które następnie ulegają posttranslacyjnej modyfikacji (glikozylacje, fosforylacje), pozwalającej na przemianę w białka sekrecyjne PAG. Do sekwencji najbardziej konserwatywnych w prekursorach PAG należą odcinki kodujące peptyd sygnałowy, peptyd blokujący, część domeny pierwszej i drugiej centrum aktywnego oraz fragment końca NH<sub>2</sub>. Rejony konserwatywne występują wewnątrz cząsteczek PAG i prawdopodobnie decydują o strukturze trzeciorzędowej, natomiast 7 rejonów hiperzmiennych tworzy na zewnątrz molekuł prekursorów pętle, które kształtują epitopy – powierzchniowe determinanty antygenowe (49). Wiele rejonów hiperzmiennych wykazuje liczne potencjalne miejsca glikozylacji prekursorów, które dodatkowo przyczyniają się do zwiększenia różnorodności produktów ekspresji rodziny genów PAG.

#### 4. Lokalizacja ekspresji genów z rodziny PAG

Ekspresja rodziny genów PAG rozpoczyna się wyłącznie w trofoblaście, a następnie kontynuowana jest w komórkach nabłonka kosmówki (trofektodermy), w których odbywa się transkrypcja oraz translacja. Kosmówkowa ekspresja mRNA genów PAG u różnych gatunków zwierząt łożyskowych, rozpoczyna się w okresie okołomplantacyjnym i kontynuowana jest w dalszych etapach rozwoju łożyska. U świń, posiadających rozproszone łożysko nabłonkowo-kosmówkowe, w analizie Northern wykazano, że ekspresja genów PAG (mRNA, ~1.7 kb) następuje około 15 dnia ciąży i kontynuowana jest podczas całego przebiegu ciąży (2).

U przeżuwaczy, posiadających łożysko łącznokosmówkowe liścieniowate, rozpoczęcie ekspresji mRNA genów PAG stwierdzono około 17 dnia ciąży (1). Ponadto, u tego gatunku wykazano zróżnicowane profile okresowych ekspresji niektórych transkryptów genów PAG podczas rozwoju ciąży (5,20,55). Geny PAG ulegają okresowej transkrypcji (mRNA) w różnych etapach ciąży i w licznych typach zróżnicowanych komórek trofektodermy, np. ekspresję transkryptów bPAG1-podobnych (bPAG1, bPAG6, bPAG7), stwierdzono w 45, 88, 250 dniu ciąży, natomiast jej brak wykazano w początkowym okresie ciąży (55). U owiec, stwierdzono, że m.in. oPAG 9 ulega ekspresji od 88 do 130 dnia ciąży (3), a u kóz ekspresja mRNA genu cPAG2 następuje tylko w 18 i 19 dniu ciąży (5). Z kolei, ekspresję mRNA genów oPAG2, bPAG2, bPAG8, bPAG10, bPAG11, stwierdzono podczas różnych etapów ciąży: od 25 dnia ciąży do porodu (3,55). W hybrydyzacji *in situ* (ISH), wykonanej na skrawkach tkanek łożyska owiec, bydła i kóz wykazano, że transkrypty genów PAG u przeżuwaczy występują w dwóch typach komórek, tj. jedno- lub dwujądrazystych (1,3,5,55). Jedna grupa transkryptów występuje tylko w komórkach dwujądrazystych (bPAG1, 3 – 7, 9, 14 – 21 oraz oPAG1, 3 – 9, cPAG4). Drugą grupę stanowią geny (bPAG2, 8, 10 – 13, oPAG2, cPAG8) o ekspresji zlokalizowanej zarówno w komórkach dwujądrazystych, jak również jednojądrzastych trofektodermy.

Początkowo sądzono, że ekspresja genów PAG następuje wyłącznie u przeżuwa- czy w komórkach binuklearnych (1), stanowiących 20% komórek trofektodermalnych (56), które ulegają fuzji i prawdopodobnie są zdolne do wnikania w tkanki endome- trialne macicy. Zawartość ziarnistości komórek dwujądrazastych, w tym m.in. białek PAG, uwalniana jest bezpośrednio w okolicy maczynych naczyń krwionośnych i lim- fatycznych (57). Następnie, wykazano zróżnicowane występowanie transkryptów PAG, również u zwierząt nieprzeżuwających, w komórkach trofektodermalnych świń (2) oraz koniowatych (4). Stwierdzono, że w łożysku nabłonkowo-kosmówko- wym klaczy, w którym okresowo występują komórki trójjądrzaste, ekspresja mRNA genu ePAG rozpoczyna się około 32 dnia ciąży w różnych populacjach (2 z 7 typów) komórek trofektodermalnych, szczególnie komórek znajdujących się w okolicy kub- ków endometrialnych (4).

W rozproszonym łożysku nabłonkowo-kosmówkowym świni, ekspresja transkryp- tów genów pPAG1- i pPAG2-podobnych występuje wyłącznie w komórkach trofektod- ermy, szczególnie w rejonach mocno rozwiniętych palczastych fałd trofektoderm- alnych, wnikających w głąb endometrium macicy (2,58). Przypuszcza się, że tran- skrypty pPAG obecne są również w okresie preimplantacyjnym, w normalnych i par- tenogenetycznych blastocystach świń, które uzyskano *in vitro*, izolowano mRNA, a transkrypty amplifikowano metodą RT-PCR (59). Nie stwierdzono natomiast eksp- resji transkryptów pPAG w tkance endometrialnej zarówno świń cyklicznych i pseudo- ciężarnych (2). Ponadto, ekspresję genów pPAG-podobnych wykryto metodą ISH (58) w hodowlach komórek wielojądrzastych trofektodermi świni *in vitro*, których obecności nie stwierdzono dotychczas w skrawkach łożyskowych, podczas wcześ- niejszych badań innych autorów (60-62).

Poznanie kosmówkowej ekspresji mRNA umożliwiło rozpoczęcie badań rodziny białek pPAG. Wykazano, że hodowla skrawków tkanek trofoblastycznych oraz trofektodermalnych w warunkach *in vitro* umożliwia efektywną produkcję sekrecyjnych bia- łek łożyskowych pPAG (53,58). Zastosowanie hodowli *in vitro* zwiększa możliwości ba- dania natywnych białek kosmówkowych, których pozyskiwanie jest wyjątkowo utrud- nione, ponieważ występują w bardzo małej ilości w komórkach trofoblastycznych pod- czas okresu implantacji (54). Otrzymane białka kosmówkowe świń umożliwiły produk- cję różnych przeciwciał poliklonalnych (63), które są wymagane do identyfikacji rodzi- ny białek pPAG, wykazujących różne epitopy powierzchniowe w zależności od za- awansowania ciąży (53,58). Uzyskanie szeregu surowic anty-pPAG warunkowało roz- poczęcie badań posttranslacyjnych modyfikacji rodziny białek pPAG (54).

## 5. Badania struktury i aktywacji genów z rodziny PAG

Dotychczas poznano pełną strukturę organizacyjną tylko dwóch genów PAG: jed- nego u bydła – bPAG1 (64) oraz jednego u świń – pPAG2 (65). Struktura tych ge- nów (bPAG1 i pPAG2) jest podobna i obejmuje 9 eksonów oraz 8 intronów (A–H)

o zbliżonej długości. Wyjątkiem jest znacznie krótszy intron H genu pPAG2 w porównaniu do genu bPAG1. W poznanych genach PAG występują połączenia eksonowo-intronowe (5' i 3') o sekwencji gt-ag, która charakterystyczna jest nie tylko dla proteinaz aspartylowych, ale także dla większości genów u ssaków.

Poznanie mechanizmu aktywacji genów wymaga badań sekwencji promotorowych. Dotychczas poznano sekwencje nukleotydowe odcinków promotorowych jedynie trzech genów z rodziny PAG: bPAG1 (64), pPAG2 (65) oraz ePAG (4). Stwierdzono, że ~1200 rejony prz promotorów bPAG1 (64) i pPAG2 (65) oraz 360 prz promotora ePAG (4) są niepowtarzalne i nie wykazują podobieństwa z promotorami genów z rodziny AP oraz promotorami innych genów kosmówkowych.

Łożysko świń należy do łożysk rozproszonych, nabłonkowo-kosmówkowych oraz nieinwazyjno-dyfuzyjnych, w którym krew matki i płodów jest oddzielona wieloma warstwami komórek (66). Taka dotychczasowa anatomiczna klasyfikacja łożyska koliduje z wynikami ostatnich badań, ponieważ wyłącznym miejscem ekspresji rodziny genów pPAG u świń są komórki preimplantacyjnego trofoblastu oraz postimplantacyjne komórki nabłonka trofektodermy (2,58). Zastanawia zatem, jakie funkcje mogą pełnić obecnie poznane produkty ekspresji rodziny genów pPAG, posiadające aktywność proteolityczną w nieinwazyjnym łożysku świni. Pomimo braku inwazyjności komórek trofoblastycznych pochodzenia zarodkowego w środowisku macicy, trofoblast świń transplantowany poza obszar macicy, w inne miejsce organizmu, wykazuje jednakże znaczące cechy inwazyjne (67). Można przypuszczać, że inwazyjność tę wywołują proteolitycznie aktywne liczne białka pPAG (modyfikowane potranslacyjnie) wydzielane przez komórki kosmówkowe, które są zabezpieczone przed samostrawieniem w sposób podobny do zabezpieczenia komórek głównych gruczołów dennych żołądka przed działaniem pepsyny (dwustopniowa degradacja). Aktywacja pepsynogenów w pepsynie, również następuje przez usunięcie peptydu sygnałowego, a następnie blokującego aktywność enzymatyczną (32), podobnie jak rodziny prekursorów PAG (2-4,58). Dotychczas nie wyjaśniono, jakie czynniki mogą hamować aktywność proteolityczną rodziny białek pPAG w środowisku macicy. Na podstawie wyizolowanych i zsekwencjonowanych białek stwierdzono, że w prekursorach pPAG2-podobnych następuje także podobna aktywacja (2,18). Proces ten powoduje powstanie sekrecyjnych form rodziny białek PAG oraz równoczesne odsłonięcie centrum aktywnego, wiążącego substraty (49). W przypadku rekombinowanego białka ePAG, stwierdzono proces autoaktywacji, która hamowana jest przez pepstatynę A, tzn. syntetyczny inhibitor pepsyny (4). Serpiny, należące do glikoprotein macicznych produkowanych w czasie ciąży, pełnią generalnie funkcje inhibitorów aktywności proteinaz serynowych (68). Pepstatyna wykazuje częściowe podobieństwo do serpin, posiadających charakterystyczny motyw 4 aminokwasów (VVVK), przypuszczalnie miejsce wiązania do proteinaz, hamując ich aktywność proteolityczną, np. rodziny pepsyn oraz innych proteinaz aspartylowych (69). W sekwencji prekursorów pPAG, stwierdzono występowanie bardzo podobnego motywu 4 aminokwasów (<sup>264</sup>VVVG<sup>267</sup>), zlokalizowanego w pobliżu drugiej domeny centrum ak-



tywnego, który występuje jedynie w sekwencji polipeptydów podrodziny pPAG1-podobnych. Prawdopodobnie, wykazane substytucje w domenach centrum aktywnego polipeptydów pPAG1-podobnych zmieniają ich strukturę przestrzenną. Stwierdzone zmiany mogą powodować, że białka pPAG1-podobne, zamiast potencjalnej aktywności proteolitycznej, podobnej do pasożytniczych AP, wykazują działanie inhibitorowe, podobnie jak maciczne serpiny. Potencjalne działanie inhibitorowe podrodziny sekrecyjnych białek pPAG1-podobnych, może być skierowane na hamowanie aktywności białek z podrodziny pPAG2-podobnych. Taka hipoteza może być podstawą do wyjaśnienia nieinwazyjności trofoblastu świni w świetle macicy, natomiast działania inwazyjnego trofoblastu, który przeniesiono w miejsce pozamaciczne. Wewnątrz macicy, białka pPAG1-podobne wspólnie z serpinami mogą prawdopodobnie wykazywać synergistyczne działanie hamujące aktywność białek pPAG2-podobnych. Poza macicą, brak serpin uniemożliwia działanie takiego hipotetycznego mechanizmu, w wyniku którego trofoblast staje się inwazyjny.

## 6. Różnorodność ewolucyjna rodziny genów PAG

Rodzina genów PAG powstała prawdopodobnie w wyniku duplikacji progenu lub jego fuzji, a zdolności reprodukcyjne ssaków mogą być związane z pozytywną selekcją genów PAG podczas ewolucji (70). Na podstawie przeszukiwania bibliotek genomowych oraz wyników analizy Southern przypuszcza się, że w genomie przeżuwaczy może występować ponad 100 genów PAG, a wśród nich prawdopodobnie około 40-80 genów bPAG1-podobnych oraz 30-60 genów bPAG2-podobnych (3). Stwierdzono również występowanie silnych sygnałów hybrydyzacyjnych, wskazujących na występowanie genów bPAG1-podobnych, w genomach dzikich przeżuwaczy, m.in. łosia, bizona, jaka, jelenia białoogoniastego, gazeli impala, antylopy gnu i wielu innych antylop. Ponadto na podstawie wyników hybrydyzacji Southern sugeruje się występowanie genów PAG-podobnych także w genomach pandy, żyrafy, hipopotama i innych zwierząt łożyskowych (3).

W genomie świń stwierdzono występowanie co najmniej 8 genów pPAG2-podobnych (65), natomiast liczba genów pPAG1-podobnych nie została dotychczas poznana. Dowodów potwierdzających występowanie dużej liczebności transkryptów kosmówkowych lub genów PAG w genomie świń dostarczyły badania wydłużania startera, analiza RPA (ang. *Ribonuclease Protection Assay*). Zastosowanie hybrydyzacji metodą Southern potwierdzającej specyfikę amplifikacji PCR fragmentów genów pPAG na różnych matrycach genomowych świni domowej, tzn. gDNA wyizolowane z leukocytów, cebulek włosowych oraz spermy (8,65). W badaniach obejmujących wydłużanie startera stwierdzono produkty o różnej długości, co sugerowało zróżnicowanie miejsca startu transkrypcji, a w konsekwencji występowanie co najmniej kilku różnych mRNA genów pPAG badanych podczas wczesnej ciąży u tego gatunku (65). Z kolei, na podstawie analiz hybrydowych RPA (kosmówkowe mRNA z sondą

cRNA) przeprowadzonych podczas okresu implantacji lub pierwszej połowy ciąży, wykazano obecność transkryptów pPAG o różnej długości, reprezentujących podrodzinę pPAG2-podobnych (47,58,65). Ponadto, w przeprowadzonej analizie Southern amplifikowanych produktów PCR (wybranych fragmentów genów pPAG) na różnych matrycach gDNA (leukocyty, cebulki włosowe, sperma), wykazano obecność licznych genów pPAG1- i pPAG2-podobnych w genomach wielu badanych zwierząt dziko żyjących (m.in. dzików, żubrów, jeleni, saren oraz bobrów), zwierząt domowych, koni (rasy: konik polski oraz folblut) i bydła (rasy: polska nizinna czerwona, limusine i charolaise), a także szczurów i ludzi (9-13).

## 7. Receptory rodziny białek pPAG

Receptory wiążące rodzinę białek PAG nie zostały dotychczas zidentyfikowane u żadnego gatunku zwierząt.

Największa śmiertelność zarodkowa, występująca u świń w okresie implantacji zbiega się z rozpoczęciem ekspresji rodziny genów pPAG (2,58). Białka, jako produkty ekspresji genów pPAG mogą być zatem potencjalnymi „molekułami sygnalizacyjnymi”, które wydzielane są przez tkanki kosmówkowe, a następnie wiązane przez receptory docelowe tych molekuł. Występowanie takich receptorów sugeruje się w nielicznych badaniach. W wyniku zastosowania białek trofoblastycznych lub trofektodermalnych świń, wyprodukowanych *in vitro*, do badania kompetycji radioreceptorowej przeprowadzonej ze znakowanym  $^{125}\text{J-LH/hCG}$ , wykazano ich współzawodnictwo z hCG o gonadotropinowe receptory (pLH/hCG-CL) ciała żółtego świń (71). Największą aktywność w wypieraniu znakowanego  $^{125}\text{J-LH/hCG}$  z receptorów pLH/hCG-CL, wykazały białka trofoblastyczne świń, wyizolowane podczas wczesnej ciąży (dzień 17 i 20). Nie stwierdzono natomiast, współzawodnictwa o receptory pLH/hCG-CL, w stosunku do białek trofektodermalnych (z 77 dnia ciąży) oraz endometrialnych stosowanych jako białka kontrolne (71). Można jednak przypuszczać, że białka pPAG mogą również być wiązane przez pozajajnikowe receptory LH/hCG, których występowanie stwierdzono także w tkankach macicy (72).

## 8. Markery białkowe i genetyczne PAG

Dotychczasowe badania rodziny genów PAG pozwoliły na poznanie ich licznego występowania w genomach różnych zwierząt, a uzyskane wyniki znalazły zastosowanie praktyczne.

Pomimo że funkcja fizjologiczna produktów ekspresji rodziny genów PAG nie została dotychczas poznana, obecność białek PAG we krwi obwodowej wykorzystano w testach radioimmunologicznych (RIA) diagnozujących wczesną ciążę z bardzo wysoką (99%) dokładnością (73), w zależności od zastosowanych surowic anty-PAG

(74). Markery białkowe PAG zastosowano u przeżuwaczy domowych: bydła (26,75-80), owiec (81-84) i kóz (85) oraz u przeżuwaczy dziko żyjących: bizona (86), łosia (87), jelenia białogoniastego (88-90), jelenia czerwonego (91), daniela (92,93) oraz kozicy alpejskiej (78). Zróznicowane profile obwodowej koncentracji rodziny białek PAG podczas przebiegu ciąży, wykorzystano również jako prenatalne markery białkowe do: rozpoznawania ciąży pojedynczych i mnogich (83), określania płci płodów (82), a także badania przeżywalności zarodków i płodów (83,93). Ponadto, różnice w profilach obwodowej koncentracji białek PAG wykorzystano do oceny nieprawidłowości przebiegu ciąży oraz przewidywania poronień (85,94).

Sklonowanie cDNA genów PAG oraz ich identyfikacja u różnych gatunków ssaków łożyskowych umożliwia przygotowanie białek rekombinowanych, które stanowią podstawę do produkcji specyficznych przeciwciał oraz standardów wymaganych do testów RIA, a następnie opracowania nieizotopowych (ELISA) komercyjnych testów diagnostycznych ciąży prawidłowych oraz patologicznych. Ponadto, białka rekombinowane będą wykorzystane do podjęcia efektywnych badań nad fizjologicznym znaczeniem rodziny białek PAG u różnych ssaków łożyskowych.

Dodatkowo można przypuszczać, że duża liczebność oraz zróżnicowanie poznanych cDNA genów z rodziny PAG w genomie każdego badanego gatunku, stanowi interesujący materiał informacyjny do opracowania nowego markera genetycznego, który umożliwi w przyszłości selekcję zwierząt hodowlanych pod względem wydajnych cech reprodukcyjnych (11,12).

## 9. Podsumowanie

Wyniki badań własnych oraz innych autorów, dotyczące rodziny genów PAG oraz produktów ich ekspresji, wskazują na istotną rolę tej rodziny podczas przebiegu ciąży różnych gatunków łożyskowców. Charakterystyka nowych sekwencji cDNA genów pPAG rozszerzyła dotychczasowe informacje o genomie świni domowej. Przeprowadzona obecnie identyfikacja cDNA genów pPAG ma nie tylko znaczenie poznawcze, ale także aplikacyjne. Każde sklonowane cDNA może być wykorzystane do produkcji zrekombinowanych białek pPAG, jako standardowych markerów białkowych, które są konieczne do przygotowania różnych testów diagnozowania ciąży. Ponadto, uzyskane obecnie różne cDNA mogą być również wykorzystane jako standardy lub sondy molekularne do opracowania selekcyjnych testów genetycznych (np. mikrochipów), które będą podstawą do ustalenia korelacji pomiędzy genotypem pPAG oraz fizjologiczną zdolnością młodych zwierząt wybieranych do efektywnej reprodukcji. Sklonowane różne cDNA umożliwią także badania mające na celu określenie nie znanej dotychczas chromosomowej lokalizacji licznej rodziny genów pPAG u świni domowej. Z kolei, zrekombinowane białka pPAG, na podstawie zidentyfikowanych obecnie cDNA, znacznie ułatwią poznanie funkcji tej licznej rodziny glikoprotein ciążowych oraz mechanizmów aktywacji transkryptów w różnych okresach ciąży.

Badania finansowane przez KBN 6 P06D 026-21 oraz UWM 528-0206.0805.

## Literatura

1. Xie S., Low B. G., Nagel R. J., Kramer K. K., Anthony R. V., Zoli A. P., Beckers J-F., Roberts R. M., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10247-10251.
2. Szafrńska B., Xie S., Green J., Roberts R. M., (1995), *Biol. Reprod.*, 53, 21-28.
3. Xie S., Green J., Bixby J. B., Szafrńska B., Demartini J. C., Hecht S., Roberts R. M., (1997a), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12809-12816.
4. Green J., Xie S., Szafrńska B., Newman A., Gan X., McDowell K., Roberts R. M., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 1069-1077.
5. Garbayo J. M., Green J., Manikkam M., Beckers J-F., Kiesling D. O., Ealy A. D., Roberts R. M., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 57, 311-322.
6. Chen X., Rosenfeld C. S., Roberts R. M., Green J. A., (2001), *Biol. Reprod.*, 65, 1092-1101.
7. Gan X., Xie S., Green J., Roberts R. M., (1997), *Biol. Reprod.*, 56 (1): abstr 431, 190.
8. Szafrńska B., (2002), *Rozprawy i Monografie*, 55, 1-96.
9. Borowczyk E., Szafrńska B., Panasiewicz G., Gizejewski Z., (2003), 36<sup>th</sup> Annual Meeting of SSR, (July 19-22), Cincinnati, Ohio, USA, *Biol. Reprod.*, 68, Suppl. 1, 247.
10. Szafrńska B., Panasiewicz G., Borowczyk E., Dąbrowski M., Gizejewski Z., (2001a), *Mat. Konf. 25<sup>th</sup> International Congress of the International Union of Game Biologists I.U.G.B. Wildlife Management in the 21<sup>st</sup> Century*, September 3-7, Lemesos, Cyprus S2, 158.
11. Szafrńska B., Dąbrowski M., Borowczyk E., Panasiewicz G., (2002a), *J. Physiol. Pharm.*, 53 (1), 85.
12. Szafrńska B., Borowczyk E., Panasiewicz G., (2002b), *J. Physiol. Pharm.*, 53 (1), 86.
13. Szafrńska B., Panasiewicz G., Borowczyk E., Gizejewski Z., Zalewski K., (2003a), 26<sup>th</sup> Congress of the International Union of Game Biologists, (September 1-6), Portugalia, 100.
14. Butler J. E., Hamilton W. C., Sasser R. G., Ruder C. A., Hass G. M., Williams R. J., (1982), *Biol. Reprod.*, 26, 925-933.
15. Godkin J. D., Bazer F. W., Lewis G. S., Geisert R. D., Roberts R. M., (1982), *Biol. Reprod.*, 27, 977-987.
16. Godkin J. D., Bazer F. W., Roberts R. M., (1985), *J. Reprod. Fert.*, 74, 377-382.
17. Baumbach G. A., Climer A. H., Bartley N. G., Kattesh H. G., Godkin J. D., (1988), *Biol. Reprod.*, 39, 1171-1182.
18. Dore J. J. Jr, Kattesh H. G., Godkin J. D., (1996), *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 28 (11), 1249-1255.
19. Zoli A. P., Beckers J-F., Woutters-Ballman P., Falmagne P., Ectors F., (1991), *Biol. Reprod.*, 45, 1-10.
20. Xie S., Low B. G., Nagel R. J., Beckers J-F., Roberts R. M., (1994), *Biol. Reprod.*, 51, 1145-1153.
21. Xie S., Nagel R. J., Green J., Beckers J-F., Roberts R. M., (1996), *Biol. Reprod.*, 54, 122-129.
22. Sousa N. M., Remy B., El Amiri B., de Figueiredo J. R., Banga-Mboko H., Dias Goncalves P. B., Beckers J-F., (2002), *Reprod Nutr Dev.*, 42 (3), 227-241.
23. Mialon M. M., Camous S., Renand G., Martal J., Menissier F., (1993), *Reprod. Nutr. Dev.*, 33, 269-282.
24. Xie S., Green J., Bao B., Beckers J-F., Valdez K. E., Hakami L., Roberts R. M., (1997b), *Biol. Reprod.*, 57 (6), 1384-1393.
25. Atkinson Y. H., Gogolin-Ewens K. J., Hounsell E. F., Davies M. J., Brandon M. R., Seamark R. F., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268 (35), 26679-26685.
26. Sasser R. G., Crock J., Ruder-Montgomery C. A., (1989), *J. Reprod. Fert.*, 37, 109-113.
27. Garbayo J. M., Remy B., Alabart J. L., Folch J., Wattiez R., Falmagne P., Beckers J-F., (1998), *Biol. Reprod.*, 58, 109-115.
28. Huang F., Cockrell D. C., Stephenson T. R., Noyes J. H., Sasser R. G., (1999), *Biol. Reprod.*, 61, 1056-1061.
29. Arakawa F., Kuroki M., Misumi Y., Matsuo Y., Matsuoka Y., (1990), *Biochim. Biophys. Acta*, 1048, 303-305.

30. Bohn H., Winckler W., Grundmann U., (1991), Arch. Gynecol. Obstet., 249, 107-118.
31. Overgaard M. T., Oxvig C., Christiansen M., Lawrence J. B., Conover C. A., Gleich G. J., Sottrup-Jensen L., Haaning J., (1999), Biol. Reprod., 61, 1083-1089.
32. Davies D. R., (1990), Annu. Rev. Biophys. Chem., 19, 189-215.
33. Szecsi P. B., (1992), Scand. J. Clin. Lab. Invest., 52 (210), 5-22.
34. Kervinen J., Sarkkinen P., Kalkkinen N., Mikola L., Saarma M., (1993), Phytochemistry, 32 (4), 799-803.
35. Seelmeier S., Schmidt H., Turk V., von der Helm K., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 (18), 6612-6616.
36. Berka R. A., Ward M., Wilson L. J., Hayenga K. J., Kodama K. H., Carlomagno L. P., Thompson S. A., (1990), Gene, 86, 153-162.
37. Tushima H., Mine H., Kawakami Y., Hyodoh F., Ueki A., (1994), Microbiology, 140 (Pt 1), 167-171.
38. Tatnell P. J., Powell D. J., Hill J., Smith T. S., Tew D. G., Kay J., (1998), FEBS Lett., 441 (1), 43-48.
39. Berry C., Humphreys M. J., Matharu P., Granger R., Horrocks P., Moon R. P., Certa U., Ridley R. G., Bur D., Kay J., (1999), FEBS Letters, 447, 149-154.
40. Banerjee R., Liu J., Beatty W., Pelosof L., Klemba M., Goldberg D. E., (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 (2), 990-995.
41. Panasiewicz G., Szafrńska B., (2000), ESDAR Newsletter, 5, 49-50.
42. Panasiewicz G., Szafrńska B., (2001a), BASE, 5, P20, 43.
43. Panasiewicz G., Szafrńska B., (2001b), Mat. Konf. XIV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Genetycznego, Poznań, SX-22-P, 284.
44. Panasiewicz G., Szafrńska B., (2001c), Mat. Konf. II Krajowego Zjazdu TBR, Warszawa, P-III-6, 48.
45. Panasiewicz G., Szafranska B., (2002a), J. Physiol. Pharm., 53 (1), 71.
46. Panasiewicz G., Szafranska B., (2003), X Ogólnopolska Konferencja Cytogenetyczna, (5-6 czerwca), Poznań, 28-29.
47. Panasiewicz G., (2004), *Izolacja i sekwencjonowanie nowych cDNA rodziny genów (porcine Pregnancy-Associated Glycoprotein) u świń*, rozprawa doktorska, 1-152.
48. Panasiewicz G., Szafranska B., (2004), Reprod. Dom. Anim., 39(4), 286-287.
49. Guruprasad K., Blundell T. L., Xie S., Green J., Szafrńska B., Nagel R. J., Mcdowell K., Baker C. B., Roberts R. M., (1996), Protein Engineer., 9 (10), 849-856.
50. Tang J., Wong R. N. S., (1987), J. Cell. Biochem., 33, 53-63.
51. Kageyama T., Tanabe K., Koiwai O., (1990), J. Biol. Chem., 265, 17031-17038.
52. Kageyama T., Ichinose M., Tsukada-Kato S., Omata M., Narita Y., Moriyama A., Yonezawa S., (2000), Biochem. Bioph. Res. Co., 267, 806-812.
53. Szafrńska B., Panasiewicz G., Majewska M., Beckers J-F., (2003b), Reprod. Nutr. Dev., 43, 497-516.
54. Szafrńska B., Majewska M., Panasiewicz G., (2004), Reprod. Biol., 4 (1), 67-89.
55. Green J.A., Xie S., Quan X., Bao B., Gan X., Mathialagan N., Beckers J-F., Roberts R. M., (2000), Biol. Reprod., 62, 1624-1631.
56. Hoffman L. H., Wooding F. B. P., (1993), J. Exp. Zool., 266, 559-577.
57. Wooding F. B. P., (1992), Placenta, 13, 101-113.
58. Szafrńska B., Panasiewicz G., (2002), Anim. Reprod. Sci., 72, 95-113.
59. Do H. J., Kim J. H., Abeydeera L. R., Han Y. M., Matteri R. L., Green J. A., Roberts R. M., Day B. N., Prather R. S., (2001), Zygote, 9 (3), 245-250.
60. Baumbach G. A., Bartley N. G., Kattesh H. G., Godkin J. D., (1990a), Cell Biol. Intern. Rep., 14 (9), 815-821.
61. Baumbach G. A., Bartley N. G., Kattesh H. G., Godkin J. D., (1990b), Anat. Embryol., 182, 563-568.
62. Bartol F. F., Wiley A. A., Spencer T. E., Vallet J. L., Christenson R. K., (1993), J. Reprod. Fert., 48, 99-116.
63. Szafrńska B., Panasiewicz G., (1999), J. Physiol. Pharmacol., 50 (1), 51.
64. Xie S., Green J., Beckers J-F., Roberts R.M., (1995), Gene, 159, 193-197.
65. Szafrńska B., Miura R., Ghosh D., Ezashi T., Xie S., Roberts R. M., Green J., (2001b), Molec. Reprod. Dev., 60, 137-146.

66. King G. J., (1993), *J. Experim. Zool.*, 266, 588-602.
67. Samuel C. A., Perry J. S., (1972), *J. Anat.*, 113 (1), 139-149.
68. Roberts R. M., Xie S., Mathialagan N., (1996), *Biol. Reprod.*, 54, 294-302.
69. Mathialagan N., Hansen T. R., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (24), 13653-13658.
70. Hughes A. L., Green J. A., Garbayo J. M., Roberts R. M., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 7, 3319-3323.
71. Szafrńska B., Zięcik A., Okrasa S., (2002c), *Reproductive Biology*, 2 (2), 187-204.
72. Zięcik A. J., Derecka K., Gawrońska B., Stępień A., Bodek G., (2001), *Semin. Reprod. Med.*, 19 (1), 19-30.
73. Gonzalez F., Sulon J., Garbayo J. M., Batista M., Cabrera F., Calero P., Gracia A., Beckers J-F., (1999), *Theriogenology*, 52, 717-725.
74. Perenyi Z. S., Szenci O., Drion P. V., Banga-Mboko H., Sousa N. M., El Amiri B., Beckers J-F., (2002), *Reprod. Domest. Anim.*, 37 (6), 324-329.
75. Sasser R. G., Ruder C. A., (1987), *J. Reprod. Fert.*, 34, 261-271.
76. Humblot P., Camous S., Martal J., Charlery J., Jeanguyot N., Thibier M., Sasser R. G., (1988a), *J. Reprod. Fert.*, 83, 215-223.
77. Humblot P., Camous S., Martal J., Charlery J., Jeanguyot N., Thibier M., Sasser R. G., (1988b), *Theriogenology*, 30, 257-268.
78. Humblot P., de Montigny G., Jeanguyot N., Tetedoie F., Payen B., Thibier M., Sasser R. G., (1990), *J. Reprod. Fert.*, 89, 205-212.
79. Zoli A. P., Guilbault L. A., Delabaut P., Orates W. E. B., Beckers J-F., (1992b), *Biol. Reprod.*, 46, 83-92.
80. El Amiri B., Sousa N. M., Perenyi Z., Banga-Mboko H., Beckers J-F., (2000), *Theriogenology*, 53 (1), 283.
81. Ruder C. A., Stellflug J. N., Dahmen J. J., Sasser R. G., (1988), *Theriogenology*, 29 (4), 905-911.
82. Ranilla M. J., Sulon J., Carro M. D., Mantecon A. R., Beckers J-F., (1994), *Theriogenology*, 42, 537-545.
83. Willard S. T., White D. R., Wesson C. A. R., Stellflug J., Sasser R. G., (1995), *J. Anim. Sci.*, 73, 960-966.
84. Gajewski Z., Beckers J-F., Melo de Sousa N., Thun R., Sulon J., Faundez R., (1999), *Adv. Cell. Biol.*, 26 (12), 89-96.
85. Fernandez-Arias A., Alabart J. L., Folch J., Beckers J-F., (1999), *Theriogenology*, 51, 1419-1430.
86. Haigh J. C., Gates C., Ruder C. A., Sasser R. G., (1991), *Theriogenology*, 36 (5), 749-754.
87. Haigh J. C., Dalton W. J., Ruder C. A., Sasser R. G., (1993), *Theriogenology*, 40, 905-911.
88. Willard S. T., Sasser R. G., Gillespie J. C., Jaques J. T., Welsh T. H. Jr, Randel R. D., (1994a), *Theriogenology*, 42, 1095-1102.
89. Wood A. K., Short R. E., Darling A., Dusek G. L., Sasser R. G., Ruder C. A., (1986), *J. Wildl. Manage.*, 50, 684-687.
90. Osborn D. A., Beckers J-F., Sulon J., Gassett J. W., Muller L. I., Murphy B. P., Miller K. V., Marchinton R. L., (1996), *J. Wildl. Manage.*, 60, 388-393.
91. Willard S. T., Hughes D. M., Bringans M., Sasser R. G., White D. R., Jaques J. T., Godfrey R. W., Welsh T. H. Jr, Randel R. D., (1996), *Theriogenology*, 46, 779-789.
92. Willard S. T., Sasser R. G., Gillespie J. C., Jaques J. T., Welsh T. H. Jr, Randel R. D., (1994b), *J. Anim. Sci.*, 72 (2), 67.
93. Willard S. T., Sasser R. G., Jaques J. T., White D. R., Neuendorff D. A., Randel R. D., (1998), *Theriogenology*, 49, 861-869.
94. Zarrouk A., Engeland I., Sulon J., Beckers J-F., (1999), *Theriogenology*, 51 (7), 1321-1331.