



Struktura, funkcja i polimorfizm genu receptora hormonu wzrostu zwierząt i człowieka

Andrzej Maj, Lech Zwierchowski

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Polska Akademia Nauk
Jastrzębiec

Structure, function, and polymorphism of the growth hormone receptor gene in humans and in animals

Summary

Growth hormone (GH) plays a central role in the regulation of growth and metabolism in animals and in humans. At the tissue levels, the pleiotropic actions of GH are mediated through their cell-surface receptor – GHR. The GHR belongs to the hematopoietic receptor superfamily. In mammals, GHR is the product of a single gene. In all studied, species GHR gene characterizes a complex structure of exon 1, coding for the 5'-untranslated region (5'-UTR). Several transcripts from the GHR gene were found differing by the presence of various length 5'-UTRs, resulting from the alternative splicing of the exon 1 fragments to a common splice site located 11-bp in the human and in bovine GHR gene exon 2. Numerous nucleotide sequence polymorphisms were found in the human GHR gene; some of them, those associated to GH resistance, were identified as the causative mutations of growth retardation, e.g. Larons syndrome. In farm animals, genes coding for GH and GHR are obvious candidates for quantitative trait markers. Several polymorphic sites have been identified in the bovine GHR gene. At least in two cases, an association was reported between GHR gene polymorphism and performance traits. Detection of additional polymorphisms is necessary to help investigating the role of GHR variation in the production traits of the cattle. This article includes a review of literature on structure, function and polymorphism within GHR gene. Also, there are mentioned new data concerning the polymorphism recently identified by authors in the bovine GHR gene.

Adres do korespondencji

Andrzej Maj,
Instytut Genetyki
i Hodowli Zwierząt,
Polska Akademia Nauk,
Jastrzębiec,
05-552 Wólka Kosowska.

Key words:

GH, receptor, gene, structure, function, polymorphism.

1. Wstęp

Wytwarzany w przednim płacie przysadki hormon wzrostu (GH) jest niezbędny do postnatalnego wzrostu i regulacji metabolizmu lipidów, węglowodanów i białek u zwierząt i człowieka. Na poziomie komórkowym to plejotropowe działanie hormonu wzrostu jest wynikiem interakcji pomiędzy hormonem i jego receptorem (1). Receptor hormonu wzrostu (GHR) należy do rodziny receptorów cytokinowych, do której należą także receptory prolaktyny, hematopoetyny, erytropoetyny, trombo-poetyny, interferonów, interleukin i inne. Receptory te charakteryzują się obecnością pojedynczej domeny transbłonowej (2). Chociaż same nie mają aktywności kinazowej, są ściśle związane i współdziałają z kinazą tyrozynową JAK. W czasie aktywacji, po połączeniu z ligandem, fosforylacji ulegają zarówno receptor jak i kinaza JAK. Zaktywowana kinaza fosforyluje różne przekaźniki wewnątrzkomórkowe (2-4). W przypadku receptora GH jest to przede wszystkim czynnik transkrypcyjny STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*), który pośredniczy w działaniu GH na ekspresję genów.

U myszy *knock-out* genu receptora GH, kodującego także rozpuszczalne białko wiążące GH (GHBP), prowadzi do poważnych zaburzeń w rozrodzie, chociaż zarówno samce jak i samice są płodne. Brak receptora GH prowadzi do powstania pełnej oporności na działanie GH, co objawia się m.in. zanikiem receptorów GH w wątrobie, wzrostem poziomu GH we krwi obwodowej i redukcją poziomu insulinopodobnego czynnika wzrostu-I (IGF-I) w plazmie krwi (5).

Największy poziom ekspresji GHR wykryto w wątrobie, tkance tłuszczowej i nerkach; w mniejszym stopniu ekspresja zachodzi w innych tkankach i narządach: w mięśniach, płucach, gruczole mlekowym, łożysku (6-8). W wątrobie GHR pośredniczy w działaniu GH na syntezę i sekrecję IGF-I, regulatora wzrostu i przebiegu licznych procesów metabolicznych (5,9). W innych tkankach GHR pośredniczy w działaniu GH na proliferację i różnicowanie komórek (10-13). Chociaż ekspresja GHR wzrasta gwałtownie w okresie postnatalnym (8), funkcjonalny GHR wykryto także we wczesnych zarodkach (14) i płodach (15,16), co sugeruje rolę GH/GHR w czasie embriogenezy (17).

Białko wiążące hormon wzrostu (GHBP), rozpuszczalna forma receptora GH, odpowiada zewnątrzkomórkowej, wiążącej hormon, domenie receptora GH, i jest produktem tego samego genu, chociaż u różnych gatunków powstaje w różny sposób (18,19). GHBP znaleziono u wielu kręgowców – od ryb do człowieka (20-25). U ssaków (oprócz gryzoni), a także u kur, wytwarzanie GHBP polega na proteolitycznym rozpadzie białka GHR o pełnej długości (18,26-29). Natomiast u gryzoni, różne formy mRNA, kodujące GHR i GHBP, powstają przez alternatywne składanie (*splicing*) wspólnego podstawowego transkryptu (30-35). Jednak u jednego gatunku – małpy makaka – wykryto oba sposoby powstania GHBP – przez proteolizę białka i przez alternatywne składanie mRNA (36). Proces proteolizy GHR, prowadzący do odrzucenia znacznej części cząsteczki białka, nazywa się w języku angielskim *shedding*. Rolę

„sheddazy” GHBP prawdopodobnie pełni metaloproteaza TACE, białko transbłonowe należące do podrodziny ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*) z rodziny adamalizyn (37,38).

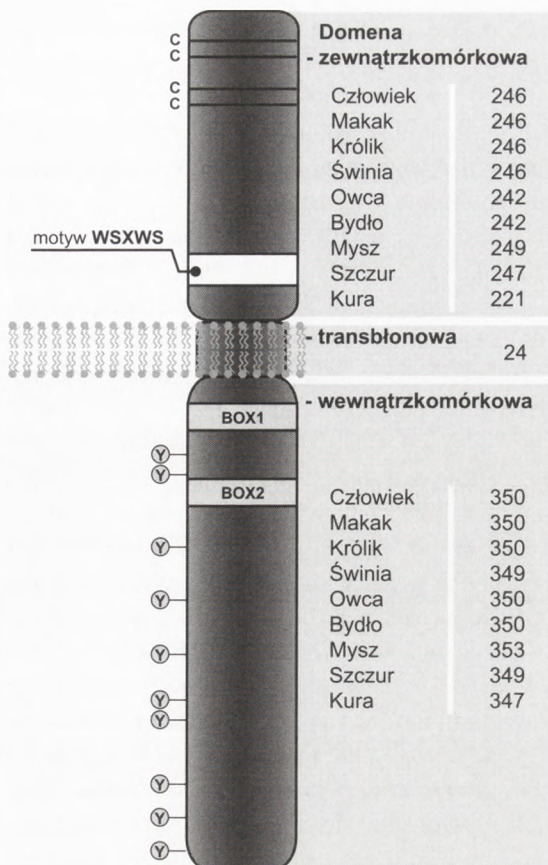
Chociaż fizjologiczna rola GHBP nie jest w pełni znana, ewolucyjny konserwatywność tych białek, a także istnienie dwóch różnych mechanizmów jego wytwarzania, wskazują na ich ważną rolę w działaniu GH. Stanowią one m.in. rezerwar GH w płazmie krwi, gdzie GHBP występuje w kompleksie z GH (19). Białko wiążące chroni GH przed degradacją, przedłuża okres jego rozpadu (39,40). GHBP może także działać jako modulator/inhibitor działania GH na poziomie tkankowym, tworząc nieproduktywne heterodimery GHR-GHBP, niezdolne do przekazywania sygnału (41). Wreszcie, powstawanie GHBP z GHR przez proteolizę, może być mechanizmem regulacji poziomu GHR i usuwania jego nadmiaru (37).

U człowieka wykryto także 2 krótkie, związane z błoną komórkową, izoformy receptora GH (42-45). Jednak zawsze najobficiej występującą formą jest GHR o pełnej długości. Skrócona forma, pozbawiona 97,5% domeny wewnątrzkomórkowej (GHRtr, *truncated*) powstaje przez alternatywne składanie mRNA. Chociaż zawartość GHRtr w wątrobie jest mała w stosunku do GHR, białko wiążące GH (GHBP) powstaje w większym stopniu z izoformy GHRtr, niż z GHR o normalnej długości (28,46-48). W tkance tłuszczowej ekspresja obydwu form receptora zachodzi na podobnym poziomie (45).

Znana jest sekwencja aminokwasowa białka GHR piętnastu gatunków ssaków, w tym człowieka, królika (18), myszy (31), szczura (8,30), bydła (49), owcy (50), świni (51), makaka (36) i pawiana (52); a także ptaków: kury (53), gołębia (54), gadów (55), płazów (56), ryb (57-59). Średnio białko to składa się z 620 aminokwasów, ale dokładna ich liczba jest uzależniona od gatunku. GHR człowieka zawiera 638 aminokwasów (włączając w to peptyd sygnałowy o długości 18 aminokwasów) i składa się z domeny zewnątrzkomórkowej, wiążącej hormon (246 aminokwasów), domeny transbłonowej (24 aminokwasów), i domeny wewnątrzkomórkowej zbudowanej z 350 aminokwasów (18). Strukturalnie domena zewnątrzkomórkowa jest podzielona na dwie subdomeny typu „sandwich” (domena 1, aminokwasów 1-123; domena 2, aminokwasów 128-238), połączonych ze sobą przez 4 aminokwasów (60).

Chociaż sekwencja aminokwasowa białka GHR różni się pomiędzy gatunkami, są w nim regiony wysokokonserwatywne (2,61). To są 4 reszty cysteinowe w domenie zewnątrzkomórkowej uczestniczące w formowaniu mostków disiarczkowych; motyw typu WSX¹WS (Trp, Ser, X¹, Trp, Ser) w proksymalnej części tej domeny, mający decydujące znaczenie dla wiązania ligandu. W białku GHR ssaków sekwencja tego motywu jest YX¹X¹FS (u człowieka – YGEFS). W domenie wewnątrzkomórkowej znajduje się region bogaty w prolinę – tzw. Box1 (u ssaków jest to sekwencja ILPPVPVP), niezbędny do wiązania i aktywacji kinazy tyrozynowej JAK2; mniej konserwatywny region Box2, zbudowany z 15 aminokwasów, położony jest w odle-

¹ X – oznacza jakikolwiek aminokwas.



Rys. 1. Struktura receptora GH różnych gatunków zwierząt. Zaznaczono: liczbę aminokwasów w domenach – zewnątrzkomórkowej, transbłonowej i wewnątrzkomórkowej – różnych gatunków ssaków i kury. cc – reszty cysteinowe tworzące mostki disiarczkowe; ⊕ – miejsca fosforylacji; motyw WSXWS, mający decydujące znaczenie dla wiązania ligandu; Box1, region bogaty na prolinę, niezbędny do wiązania i aktywacji kinazy tyrozynowej JAK2; Box2, niezbędny do przekazywania sygnału GH.

głości 30 aminokwasów od sekwencji Box1. W wyniku delecji lub mutacji w obrębie tego regionu aktywacja kinazy JAK i dalsze przekazywanie sygnału GH nie następuje. Także w tej domenie znajdują się reszty tyrozynowe mające podstawowe znaczenie dla przekazywania sygnału przez czynnik transkrypcyjny STAT5.

Na rysunku 1 przedstawiono strukturę białka GHR, zaznaczając długość domeny zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej u różnych gatunków zwierząt i człowieka.

Za pomocą analizy northern blot stwierdzono, że podstawowy mRNA, kodujący receptor GH o pełnej długości, zbudowany jest z 4600 nukleotydów (nt), chociaż długość transkryptu różni się nieco u różnych gatunków (tab. 1).

Najmniejszą ze zbadanych cząsteczek mRNA GHR (3900 nt) ma mysz (31); największą (5000 nt) – makak (36). W tabeli 1 porównano rozmiary transkryptów GHR dziewięciu gatunków ssaków. U wszystkich tych gatunków podstawowy transkrypt GHR jest ponad dwukrotnie dłuższy niż minimalny, o długości 1900 nt, niezbędny do kodowania cząsteczki białka receptora o długości 640 aminokwasów. Ten „nadmiar” długości mRNA wynika z obecności w mRNA nie ulegającego translacji regionu

3'-UTR (*untranslated region*) o długości około 2000 nt (18). Chociaż dokładna funkcja tak długiego rejonu 3'-UTR w transkryptach GHR nie została zbadana, uważa się, że ma on prawdopodobnie wpływ na tempo degradacji mRNA, a także na inicjację translacji (62,63).

Tabela 1

Długość transkryptów GHR różnych gatunków ssaków (wg Edens i Talamantes (35); uzupełnione)

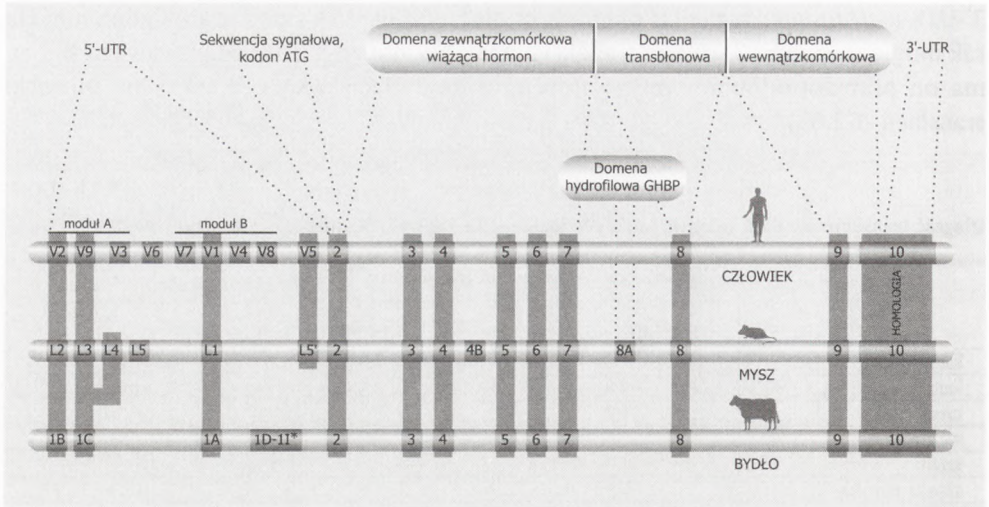
Gatunek	Długość podstawowego transkryptu GHR (tys. nt)	Transkrypty GHR o innej długości (tys. nt)	Literatura
karaś złocisty	b.d.	2,5	(58)
kura	4,6	4,0; 3,2; 2,1; 1,7; 0,8	(27,53,64,65)
mysz	4,0	8,0 ^a ; 1,3	(66,67)
szczur	4,6	2,6; 1,2	(30,68,69)
królik	4,7	3,1; 1,8	(18,70)
świnka morska	b.d.	1,9	(71)
owca	4,5	8,1 ^a ; 5,5 ^a ; 2,5; 1,8	(15,27,72,73)
bydło	4,5		(49)
świnia	4,5		(27)
makak	5,0	2,8; 1,7	(36)
człowiek	4,7	2,8	(18,74)

^a transkrypty znalezione tylko w okresie ciąży; b.d. – brak danych

2. Struktura genów GHR

Receptor GH człowieka – i wszystkich zbadanych dotychczas pod tym względem gatunków zwierząt – kodowany jest przez pojedynczy gen. U człowieka gen ten znajduje się w chromosomie 5p13.1-12 (18,75,76), u bydła w chromosomie 20 (77), u owcy – w chromosomie 16 (78), a u kury w płciowym chromosomie Z (53). Sklonowano region kodujący genu GHR człowieka (76,79), kury (80) i myszy (32,81,82). Znana już jest także sekwencja nukleotydowa regionu kodującego genu GHR niektórych gatunków ryb (57), płazów (56) i gadów (55). Ogólna organizacja genu GHR jest typowa dla genów receptorów cytokinowych.

Na rysunku 2 pokazano strukturę genów GHR człowieka, myszy i bydła. Wspólną cechą genu GHR wszystkich zbadanych gatunków jest obecność kilku eksonów 1, których transkrypty ulegają alternatywnemu składaniu, łącząc się z transkryptem drugiego eksonu (35). W obrębie eksonu 2 znajduje się kodon inicjacji translacji ATG. Powstałe w ten sposób fragmenty mRNA uważa się za alternatywne warianty eksonu pierwszego. Ponieważ ekson pierwszy i pierwsze 11 nukleotydów eksonu drugiego kodują region 5'-UTR mRNA (nie podlegający translacji), niezależnie od tego, jaki fragment eksonu pierwszego znajduje się w transkrypcie, sekwencja aminokwasowa białka nie ulega zmianie. Innymi słowy, wszystkie warianty mRNA, będące produktami transkrypcji różnych wariantów eksonu 1, kodują to samo



Rys. 2. Struktura genów receptora GH człowieka, myszy i bydła. Zaznaczono: podobieństwo sekwencji (homologię) eksonów; alternatywne eksony 1, kodujące różne warianty 5'-UTR mRNA; eksony kodujące domeny zewnątrzkomórkową, transbłonową i wewnątrzkomórkową GHR, oraz kodujące domenę hydrofilową białka wiążącego GH (GHBP). W regionie 5' genu GHR bydła znana jest tylko lokalizacja eksonów 1B, 1C i 1A eksonu 1. Pozycja alternatywnych eksonów 1D, 1E, 1F, 1G, 1H i 1I nie została dotychczas określona (*). Siedem z 8 alternatywnych eksonów 1 w genie GHR człowieka jest zgrupowanych w postaci dwóch modułów (moduły A i B) o różniących się wzorach ekspresji.

białko. Miejsce składania transkryptów wszystkich wariantów eksonu 1 i eksonu 2 jest wspólne i znajduje się 9-11 nt powyżej kodonu inicjacji translacji ATG. Chociaż liczba eksonów kodujących 5'-UTR jest odmienna u różnych gatunków, pozycja miejsca składania w stosunku do kodonu ATG jest stała (1).

W przeprowadzonej u człowieka analizie końca 5' mRNA GHR, wykonanej metodami RT-PCR i następnie sekwencjonowania produktu, wykazano istnienie 9 różniących się eksonów kodujących 5'-UTR (V1-V9). Sklonowano 40 Kpz regionu odpowiadającego 5'-UTR ludzkiego genu GHR i precyzyjnie zmapowano wszystkie warianty 5'-UTR. Ciekawym aspektem budowy regionu 5'-flankującego genu GHR człowieka jest aranżacja siedmiu eksonów do dwóch modułów o różniących się wzorach ekspresji. Eksony V2, V9 i V3, zlokalizowane w module A o długości 1,6 Kpz i leżącym 36 Kpz powyżej eksonu drugiego, wykazują ekspresję zarówno w tkankach zarodkowych jak i postnatalnych. Eksony V7, V1, V4 i V8 są zgrupowane w liczącym 2 Kpz module B, leżącym 18 Kpz powyżej eksonu drugiego, i wykazują ekspresję tylko w postnatalnej wątrobie. Wariant V6 znajduje się pomiędzy modułami A i B, natomiast V5 leży bezpośrednio przed eksonem 2. Długość regionu ludzkiego genu GHR kodującego 5'-UTR wynosi około 40 Kpz (83).

Za alternatywnymi wariantami eksonu 1 znajduje się 9 eksonów kodujących białko (eksony 2-10). U człowieka ekson 2 koduje końcowe 11 pz rejonu 5'-UTR, sygnałową

sekwencję 18 aminokwasów, i pierwsze 5 aminokwasów domeny zewnątrzkomórkowej, wiążącej hormon. Eksony 3-7 kodują większość domeny wiążącej hormon. Ekson 8 koduje końcowe 3 aminokwasy domeny wiążącej hormon oraz 24-aminokwasową hydrofobową domenę transbłonową. Eksony 9 i 10 razem kodują pozostałe 346 aminokwasów domeny wewnątrzkomórkowej. Ekson 10 koduje także 2-Kpz 3'-UTR mRNA. Całkowita długość części kodującej genu GHR człowieka wynosi 87 Kpz (35,76).

Różne warianty mRNA powstałe w drodze alternatywnego składania wykryto także dla regionów kodujących genu GHR. Istnienie różnych klonów cDNA genu GHR człowieka, świadczy o różnicach w obrębie regionu kodującego genu. Po raz pierwszy donieśli o tym Godowski i wsp. (76). Opisali oni trzy izoformy ludzkiego receptora hormonu wzrostu. Pierwsza, GHRfl – receptor o pełnej długości (*full*) jest kodowana przez eksony 2-10 genu GHR. Druga forma, GHRd3, – powstaje na skutek utraty 66 nukleotydów eksonu trzeciego. W tej formie receptora brakuje 22 aminokwasów domeny zewnątrzkomórkowej i wykazuje ona mniejsze powinowactwo do hormonu wzrostu (84). Trzecia forma, GHRtr (*truncated*) powstaje przez alternatywne składanie, którego skutkiem jest utrata 26 nukleotydów w eksonie dziewiątym. Wynikiem tego jest pojawienie kodonu stop w pozycji 280, co prowadzi do utraty 97,5% domeny wewnątrzkomórkowej receptora (28). Dla tej formy GHR wykryto zwiększoną zdolność generacji rozpuszczalnego GHBP w tkankach człowieka (46).

Przez długi czas powstanie izoformy GHRd3 tłumaczono alternatywnym składaniem pierwotnego transkryptu, w wyniku którego mogła powstawać izoforma GHRfl, o pełnej długości, albo izoforma z delecją eksonu 3 – GHRd3 (84). Jednak w późniejszych badaniach Pantel i wsp. (44) wykazali, że ta druga forma powstaje w sposób inny niż alternatywne składanie. Ekson 3 genu GHR człowieka jest otoczony przez 2 elementy powtarzalne o długości 251 pz, o charakterze LTR (*long terminal repeats*). Te elementy znajdują się 577 pz powyżej i 1821 pz poniżej eksonu 3 w orientacji przeciwległej do transkrypcji genu GHR; wykazują one między sobą 99% podobieństwa i składają się z fragmentu LTR o długości 171 pz pochodzącego z retrowirusa (*human endogenous retrovirus*), należącego do rodziny HERV-P, i sekwencji powtarzalnej typu MER4 o długości 80 pz. Delecja eksonu 3 zachodzi w wyniku homologicznej rekombinacji pomiędzy obiema sekwencjami LTR. Istnieją dwa allele genu GHR człowieka. Allel GHRfl zawiera normalny ekson 2 razem z dwoma flankującymi elementami typu „retro”, allel GHRd3 zawiera tylko 1 „retroelement” i nie ma w nim eksonu 3. W zbadanej populacji 150 osób, 58% było homozygotami GHRfl, 9% – homozygotami GHRd3, i 33% było heterozygotami GHRfl/GHRd3. W ten sposób, u człowieka izoforma GHRd3 powstaje w wyniku transkrypcji allelu GHRd3, a pełna forma GHR – w wyniku transkrypcji allelu GHRfl. Powstanie izoformy GHRd3 w wyniku delecji fragmentu genu, a nie alternatywnego składania transkryptu, potwierdzono także w badaniach Seidel i wsp. (85).

Obecność powtarzalnych „retroelementów” w regionie eksonu 3 genu GHR badano także u innych gatunków. Jednak podobne sekwencje pochodzące z retrowirusów, flankujące ekson 3, wykryto tylko u małp człekokształtnych.

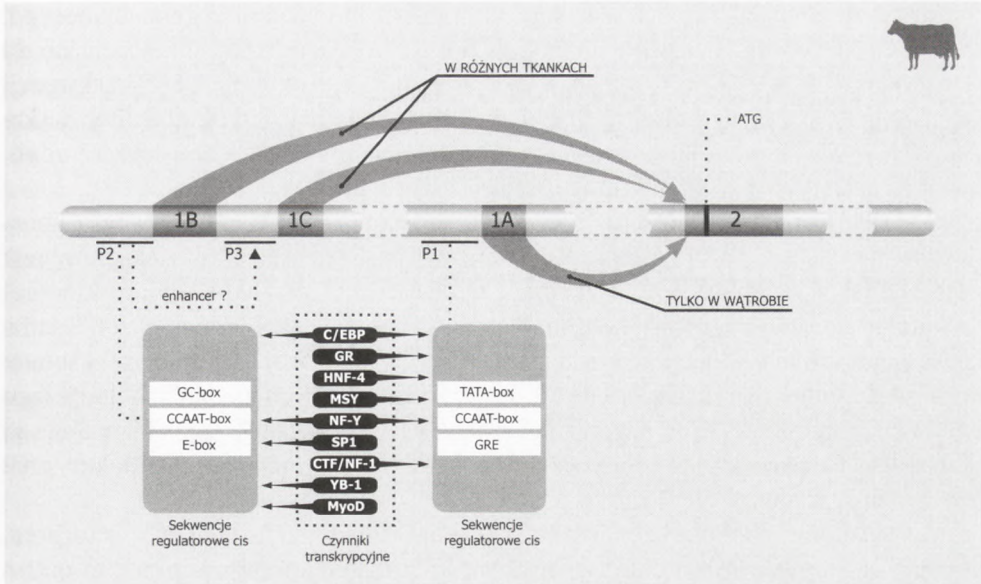
U myszy zidentyfikowano 5 różnych 5'-UTR genu GHR, określane jako L1, L2, L3, L4 i L5 (1,86). Dwa różne warianty UTR były niezależnie opisane przez Moffart i wsp. (86), Menon i wsp. (1) i nazwane jako L5, chociaż oba te warianty różnią się między sobą. Ekson L5 opisany przez Moffart i wsp. znajduje się bezpośrednio poniżej eksonu L4, natomiast wariant L5 opisany przez Menon i wsp. leży kilka tysięcy par zasad niżej, w kierunku 3', bezpośrednio przed eksonem 2. Ten zidentyfikowany później wariant L5 oznaczyliśmy jako L5'. Warianty L1, L2, L5' są homologiczne odpowiednio do V1, V2, V5 człowieka (1). Pomiedzy wariantem L3 myszy i wariantem V9 człowieka stwierdzono 62% podobieństwa sekwencji nukleotydów, pomiedzy wariantami L2 i V2 – 84%, wariantami L1 i V1 – 83%, a wariantami L5' i V5 – 65% (83). W odległości 480 pz powyżej miejsca startu transkrypcji eksonu L2 myszy leży element LINE-1 o długości 320 pz (87). Tak jak u człowieka, wariant L5' 5'-UTR znajduje się bezpośrednio przed eksonem 2; forma mRNA zawierająca L5' stanowi 5-15% ogólnej liczby transkryptów GHR w różnych tkankach myszy (1).

W genie GHR myszy, za alternatywnym eksonem 1 znajduje się jedenaście eksonów kodujących: eksony 2-4, ekson 4B, eksony 5-7, ekson 8A, eksony 8-10. Dziewięć z nich (eksony 2-10) jest podobnych pod względem rozmiarów i sekwencji do odpowiednich eksonów genu GHR człowieka. Tak na przykład, ekson 8, zarówno u człowieka jak i u myszy koduje 24-aminokwasową domenę transbłonową białka GHR, ostatnie 3 aminokwasy domeny zewnątrzkomórkowej i pierwsze 4 aminokwasy domeny wewnątrzkomórkowej. Eksony 4B i 8A myszy nie mają swoich odpowiedników w ludzkim genie GHR. Ekson 4B koduje u myszy 8-aminokwasowy segment domeny zewnątrzkomórkowej. Pozostałe gatunki, których sekwencja genu GHR jest znana, łącznie ze szczurem, nie mają tego eksonu (35,87).

Ekson 8A koduje hydrofilowy „ogon” GHBP i 3'-UTR jego mRNA, i także nie ma odpowiednika w ludzkim genie GHR. Mieści się on w segmencie o długości 2 Kpz, rozdzielającym eksony 7 i 8. Eksony 7, 8A i 8 mogą ulegać alternatywnemu składaniu, tworząc transkrypty GHR i GHBP. Przy składaniu, którego wynikiem jest połączenie transkryptów kodowanych przez eksony 7 i 8A, powstaje mRNA o długości 1200 nt, kodujące GHBP, natomiast składanie transkryptów eksonu 7 i 8 prowadzi do powstania mRNA o długości 4000 nt kodujące GHR (35,87).

U szczura wykryto 5 wariantów pierwszego eksonu – GHR 1-5 (88). Podobnie jak u myszy, eksony 7, 8A i 8 mogą ulegać alternatywnemu składaniu, tworząc transkrypty GHR i GHBP (87).

U bydła wykryto 9 wariantów 5'-UTR mRNA – 1A - 1I. Ekspresję wariantu 1F wykryto w tkance mięśniowej i w wątrobie płodu, wariantów 1B, 1C, 1H, 1I – w różnych tkankach, włączając w to mięśnie i wątrobę, wariantu 1A – tylko w wątrobie dorosłych zwierząt. Warianty 1A, 1B i 1C są głównymi wariantami mRNA GHR bydła, podczas gdy warianty 1D, 1E, 1F, 1G, 1H i 1I, stanowią tylko 10% ogólnej puli mRNA (89). Ekson 1A jest homologiem ludzkiego V1 (87% podobieństwa), L1 myszy i GHR1 szczura (65%), 1A owcy (97%) (90); ekson 1B jest homologiem eksonu V2 człowieka (82%), L2 myszy, GHR2 szczura i 1B owcy (83). Ekson 1C bydła jest homologiem ek-



Rys. 3. Alternatywne składowanie fragmentów eksonu 1 genu GHR bydła, prowadzące do powstania wariantów mRNA różniących się długością 5'-UTR. Transkrypty eksonów 1A, 1B i 1C ulegają alternatywnemu składowaniu łącząc się z transkryptem drugiego eksonu, w obrębie którego znajduje się kodon inicjacji translacji ATG. Każdy z alternatywnych eksonów 1 poprzedzony jest swoim promotorem – P1, P2 i P3. Na rysunku zaznaczono sekwencje regulatorowe *cis* znalezione w poszczególnych promotorach i czynniki transkrypcyjne, które wiążą się z tymi sekwencjami. Promotor P2, w którym nie znaleziono dotychczas miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych, działa przypuszczalnie jako enhancer dla promotora P3.

sonu GHR4 szczura i L4 myszy, do których wykazuje 74% podobieństwa (83). Dla pozostałych wariantów bydłowego eksonu pierwszego homologów u innych gatunków nie znaleziono. Na ogół, nomenklatura wariantów 5'-UTR genu GHR odpowiada kolejności ich identyfikowania u odpowiednich gatunków i nie jest związana z pozycją w genie. U bydła, eksony 1A, 1B, 1C mają odpowiednio promotory – P1, P2, P3 (17). Bezpośrednio przed promotorem P1 leży element powtarzalny typu LINE-1 o długości 1206 pz, ale u *Bos indicus* (91) i u niektórych osobników *Bos taurus* (Maj i Zwierzchowski, nie publikowane), ten element nie występuje.

U bydła transkrypt 1A jest główną formą mRNA GHR. Jest najobficiej reprezentowanym wariantem mRNA GHR w wątrobie, a jego poziom jest wysoko skorelowany z poziomem IGF-I we krwi w różnych warunkach fizjologicznych. Miejsce startu transkrypcji bydłowego eksonu 1A znajduje się 19 pz poniżej TATA-box, podobnie jak u owcy, myszy i człowieka. Za eksonem 1 znajduje się 9 eksonów kodujących eksony 2-10 (92).

Schemat alternatywnego składowania wariantów eksonu 1 w genie GHR bydła pokazano na rysunku 3.

Struktura genu GHR owcy jest bardzo podobna do struktury genu bydłowego. U owcy wykryto dotychczas 2 warianty 5'-UTR – 1A i 1B (50,93), homologiczne do odpowiednich 1A i 1B bydła. Analiza komputerowa w programie BLAST sekwencji GHR bydła i owcy powyżej i poniżej eksonu 1A umożliwiła wykrycie regionów wykazujących 74-83% homologii do eksonów V7, V4, V8 człowieka, co sugeruje, że odpowiedniki eksonów V7, V4, V8 mogą istnieć u tych gatunków (83).

Gen GHR kury został częściowo zsekwencjonowany (80). W porównaniu z genami ssaków, ma on stosunkowo krótkie introny, natomiast struktura eksonów jest podobna jak w genie człowieka. Eksony genu GHR kury zostały ponumerowane odpowiednio do homologicznych eksonów genu GHR człowieka. Jednak ekson 3 ludzkiego genu nie ma odpowiednika w genie kury. U kury bezpośrednio za eksonem drugim znajduje się ekson czwarty. W przeprowadzonych badaniach ludzkiego genu GHR i receptora GH wykazano, że aminokwasy kodowane przez ekson 3 nie są niezbędne dla wiązania hormonu wzrostu (44). W transkryptach genu GHR kury znaleziono dwa warianty 5'-UTR.

W wątrobie jednego ze zbadanych pod tym względem gatunku ryb – turbota, stwierdzono mRNA GHR o długości 1,038 nt (57). Białko kodowane przez to mRNA składa się z 346 aminokwasów i ma charakterystyczną budowę: hydrofobową domenę transbłonową z 24 aminokwasów, domenę zewnątrzkomórkową z 252 aminokwasów, motywy wewnątrzkomórkowe Box 1 i Box2. Budowa GHR ryb, analogiczna do budowy GHR ssaków, wskazuje na to, że mechanizmy przekazywania sygnału GHR przez aktywację kinaz tyrozynowych JAK są konserwatywne i zachowały się w drodze ewolucji kręgowców.

3. Regulacja ekspresji genu GHR

Ekspresja genu GHR podlega regulacji w trakcie ontogenezy. U większości ssaków jego ekspresja jest bardzo mała w tkankach płodowych, wzrasta znacznie po porodzie, szczególnie w wątrobie, i osiąga maksimum podczas ciąży. Ekspresję genu GHR regulują także hormony – GH i steroidy oraz poziom żywienia (94). Niedożywienie wywołuje z reguły stan oporności na GH, z czym wiąże się wzrost stężenia GH we krwi i spadek stężenia IGF-I. Jednak pierwotną przyczyną tych zmian jest zmniejszenie liczby receptorów GH w wątrobie, przypuszczalnie spowodowany mniejszym niż normalny poziomem ekspresji genu GHR. Zmniejszenie ekspresji i mniejszą aktywność receptorów GH w wątrobie obserwowano także u ludzi chorych na typ 1 cukrzycy (zależnej od insuliny) i u zwierząt z doświadczalnie wywołaną cukrzycą. Także i w tym przypadku zmniejszenie liczby receptorów wiązało się z opornością na GH.

Wspomniano już, że u bydła i owcy ekspresja genu GHR pod kontrolą promotora P1 zachodzi specyficznie w wątrobie; tylko w wątrobie znajdowano transkrypty GHR z 5'-UTR 1A (50). W przeciwieństwie do promotora P2, który nie zawiera

TATA-box, w promotorze P1 leżącym przed eksonem 1A, w pozycji -35 (owca) i -19 (bydło), znajduje się typowa sekwencja TATA-box. W promotorze P1 w genie GHR owcy zidentyfikowano miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych występujących głównie w wątrobie, m.in. cztery miejsca C/EBP, dwa miejsca GRE, wiążące receptor dla glikokortykoidów, a także miejsce wiązania dla HNF-5. Sekwencja regionu 5' genu GHR bydła jest bardzo podobna do odpowiedniej sekwencji genu owcy. Dlatego uważa się, że eksony 1A i 1B w genie GHR owcy są funkcjonalnymi odpowiednikami eksonów 1A i 1B bydła, i że poprzedzające je promotory P1 i P2 mogą zawierać podobne miejsca regulatorowe (rys. 3). Stosując metodę *footprint* zidentyfikowano w bydłym promotorze P1 potencjalne miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego HNF-4, występującego głównie w wątrobie. W przeprowadzonej analizie EMSA (*electromobility shift assay*) i *supershift* potwierdzono wiązanie HNF-4 z ekstraktów białek bydłowej wątroby z odpowiednim fragmentem promotora P1 (95). Rolę czynnika HNF-4 potwierdzono także transfekując różne linie komórkowe wektorami ekspresyjnymi z sekwencjami HNF-4 i konstrukcjami genowymi z promotorem P1; nadekspresja HNF-4 znacznie zwiększała ekspresję genów reporterowych przyłączonych do promotora P1. Na działanie HNF-4 nie reagował promotor P1 ze zmutowanym miejscem wiązania tego czynnika. Dlatego autorzy sugerują, że czynnik HNF-4 może pełnić rolę regulatora ekspresji genu GHR w wątrobie bydła podczas rozwoju, pod działaniem hormonów lub czynników żywieniowych. Z jego obecnością związana jest także specyficzna dla wątroby ekspresja wariantu 1A mRNA GHR. Promotor P1 zawiera także potencjalne miejsca wiązania czynnika C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*). Jednak w tym przypadku, także stosując metody EMSA i *supershift* nie udało się, jak dotąd, potwierdzić doświadczalnie roli białek C/EBP α lub β jako czynników regulujących ekspresję genu GHR w wątrobie bydła. Miejsca regulatorowe CCAAT (C/EBP), GRE zlokalizowano także w promotorach L1 myszy i GHR1 szczura, będących odpowiednikami promotora P1 u owcy i bydła (94). Wykazano wiązanie czynników transkrypcyjnych MSY-1 i NF-Y do sekwencji CCAAT, zlokalizowanej w mysim genie GHR w pozycji -350 od miejsca inicjacji transkrypcji mRNA L1. Sekwencja ta jest odpowiednikiem sekwencji CCAAT znalezionej w pozycji -510 w promotorze P1 genu GHR owcy.

W przeciwieństwie do mRNA GHR 1A, którego transkrypcja pod kontrolą promotora P1 zachodzi niemal wyłącznie w wątrobie, forma mRNA z 5'-UTR 1B występuje w wielu tkankach, co sugeruje jego regulację przez powszechnie występujące (*ubiquitous*) czynniki transkrypcyjne. W badaniach przeprowadzonych na promotorze P2 genu GHR myszy (96), owcy (97) i bydła (98) wykazano obecność funkcjonalnych miejsc wiążących dla czynnika SP1. Czynnik ten reguluje aktywność promotora P2 wiążąc się z sekwencją GGGCGG (GC-box) w regionie proksymalnym promotora P2. Mysi promotor L2 zawiera funkcjonalne miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych SP1 i SP3, co potwierdzono doświadczalnie testem ekspresji genu lucyferazy (*luc*) połączonego z promotorem L2 ze zmutowanym miejscem wiązania czynnika SP1 (96). W przeciwieństwie do mysiego promotora L2 i owczego P2, u bydła ten re-

gion nie wiąże czynnika SP3 (98). Autorzy sugerują, że u bydła to właśnie czynnik SP1 warunkuje ekspresję GHR 1B w różnych tkankach. Na podstawie delekcji regionu GC-box w promotorze P2 wykazano, że czynnik SP1 jest ważnym, ale nie jedynym regulatorem ekspresji wariantu 1B mRNA. W dalszych badaniach wskazuje się na rolę różnych czynników wiążących się z sekwencją CCAAT-box, takich jak CTF/NF-1, NF-Y, YB-1 (92), co jednak wymaga potwierdzenia doświadczalnego. W genie GH owcy region leżący bezpośrednio przed eksonem 1B (promotor P2) zawiera sekwencje regulatorowe – CCAAT-box i GC-box, wiążące powszechnie występujące czynniki transkrypcyjne CTF i SP1. Metodą EMSA wykazano obecność co najmniej czterech potencjalnych miejsc wiązania czynników SP1 i SP3; mutacja tych miejsc w różnym stopniu zmniejszała ekspresję połączonego z promotorem P2 genu reporternego *luc* w transfekowanych komórkach CHO (97). W tym regionie znajdują się ponadto potencjalne inne miejsca regulatorowe, takie jak E-box (miejsce wiązania dla specyficznego dla komórek mięśniowych czynnika MyoD), i miejsce wiązania czynnika C/EBP (35).

Najmniej wiadomo o mechanizmach regulacji ekspresji genu GHR bydła rozpoczynającej się od eksonu 1C, kierowanej przez promotor P3. Promotor P3 jest bogaty w powtórzenia GC i, podobnie jak P2, nie zawiera sekwencji TATA-box. W tym promotorze nie zidentyfikowano, jak dotąd, żadnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych. Ponieważ promotor P3 jest położony tylko 700 pz „poniżej” promotora P2, możliwe, że oba korzystają z tych samych elementów regulatorowych, i że promotor P2 może funkcjonować jako enhancer dla P3 (92).

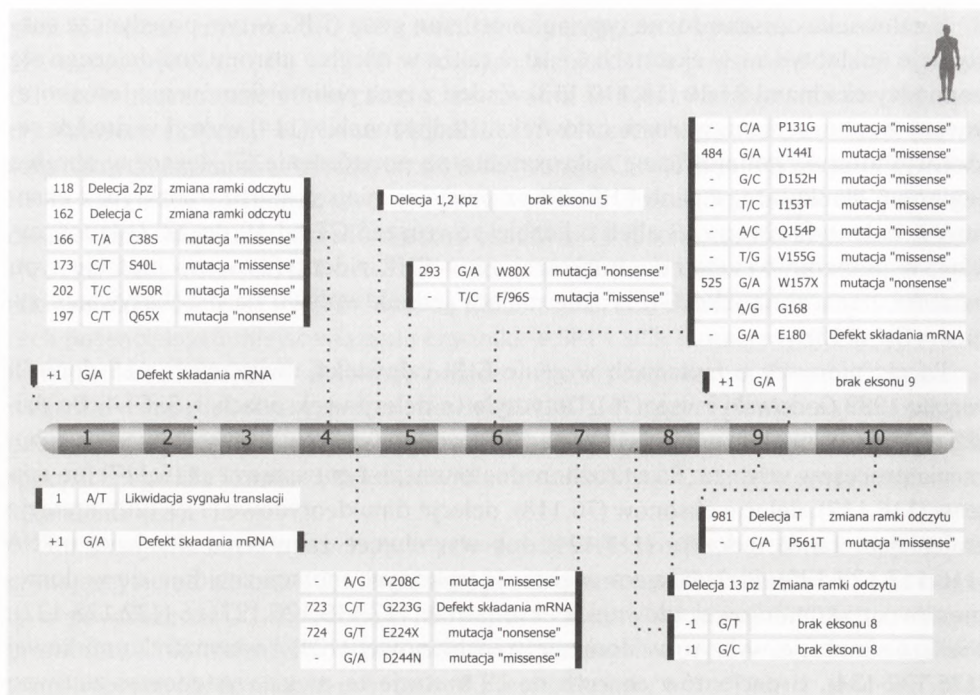
4. Polimorfizm genu GHR

Polimorfizm genów wynika ze zmian sekwencji nukleotydowych powstałych w trakcie ewolucji w drodze mutacji DNA. Są to na ogół podstawienia nukleotydów – transwersje i tranzycje, a także delekcje lub insercje jednego lub kilku nukleotydów. Niektóre mutacje genu receptora hormonu wzrostu mogą spowodować negatywne zmiany w jego zdolności do przekazywania sygnału GH. Osobniki z takimi mutacjami mają normalny poziom hormonu wzrostu we krwi, ale zaburzenia w przekazywaniu sygnału są powodem zmniejszonej masy ciała, zredukowanego wzrostu kości; u ludzi i zwierząt towarzyszy temu także opóźnione dojrzewanie płciowe (99-101), a u ptaków zmniejszona produkcja i jakość jaj (102,103). U ssaków te zaburzenia procesów wzrostu osobników opornych na hormon wzrostu (związanej z mutacjami genu GHR) nazywają się karłowatością (zespołem) Laron (LS), a u ptaków karłowatością związaną z płcią (*sex linked dwarfizm, SLD*) (53,99,102,104-106). Wiadomo obecnie, że w obu przypadkach przyczyny wystąpienia karłowatości są niejednorodne; są one wynikiem różnych delekcji lub mutacji punktowych, zmniejszających ekspresję genu GHR, lub mutacji powodujących zaburzenia wiązania ligandu, dimeryzacji receptora, czy przekazywania sygnału (53,64,80,107-109).

U człowieka opisano różne typy polimorfizmu genu GHR, w tym pojedyncze substytucje nukleotydów w eksonach 6 i 10, a także w obrębie intronu znajdującego się pomiędzy eksonami 9 i 10 (18,110-113). Żaden z tych polimorfizmów nie jest skorelowany z zaburzeniami wzrostu człowieka. Hadjiyannakis (114) wykrył w drodze sekwencjonowania polimorficzne mikrosatelitarne powtórzenie GT, leżące w obrębie regionu 5'-flankującego genu GHR, 87 pz powyżej miejsca startu transkrypcji eksonu V9. Zidentyfikowano 13 alleli o liczbie powtórzeń GT od 19 do 32. U Japończyków, w domenie wewnątrzkomórkowej genu GHR zidentyfikowano mutację typu *missense*, oznaczoną jako C422F, nie mającą jednak wpływu na przekazywanie sygnału GH (115).

Po raz pierwszy o mutacjach w genie GHR człowieka, związanych z LS donieśli w roku 1989 Godowski i wsp. (76). Dotyczyło to delecji w eksonach 3, 5, 6 i 4. Do dzisiaj wykryto w ludzkim genie GHR ponad 30 różnego typu mutacji wywołujących zaburzenia procesów wzrostu. Są to różnorodne mutacje: typu *nonsense* (116,117) lub *missense* (116,117), delecje eksonów (76,118), delecje dinukleotydowe (119,120), mutacje zmieniające ramkę odczytu (117,121), lub wywołujące zaburzenia składania mRNA (116,117,122-125). Przeważająca większość wykrytych mutacji znajduje się w domenie zewnątrzkomórkowej, głównie w eksonach 4 (117,119,126,127) i 6 (122,128-132). Nieliczne mutacje wykryto w domenie transbłonowej (121) i wewnątrzkomórkowej (125,132-134). U pacjentów chorych na LS mutacje te mogą występować zarówno w układzie homozygotycznym jak i heterozygotycznym. Na przykład mutacje opisane przez Ayling i wsp. (123), lida i wsp. (125), występujące tylko w stanie heterozygotycznym, wywołują efekt dominujący negatywny. Przyczyną takiego efektu jest to, że zmutowany receptor tworzy heterodimery z normalną, niezmutowaną formą receptora, działając jako inhibitor. Mutacje genu GHR mogą mieć różnorodny wpływ na funkcję receptora: wpływ na wiązanie ligandu (127,132), na dimeryzację receptora (128), oraz na dalsze przekazywanie sygnału (128). W roku 2002 Quinteiro i wsp. (135) opisali mutację polegającą na transwersji A/T w kodonie ATG eksonu 2, która anuluje sygnał inicjacji translacji. Mutacje wykryte w regionie kodującym genu GHR człowieka zaznaczono schematycznie na rysunku 4.

W populacji kur z SLD (*sex linked dwarfizm*) wykryto substytucję T/C w pozycji 370 genu GHR, która powoduje zamianę fenyloalaniny na serynę w pozycji 112 białka, w domenie zewnątrzkomórkowej receptora. U człowieka, królika i szczura w tej pozycji znajduje się fenyloalanina, co może sugerować znaczenie tego aminokwasu dla normalnej funkcji GHR. Niewykluczone, że u kur mutacja ta może zmniejszać zdolność do wiązania się GH z receptorem (53,136). Agarwal i wsp. (80) wykryli u kur, obciążonych SLD, mutację polegającą na delecji 1773 pz na 3' końcu genu GHR. Wynikiem tej mutacji jest zmiana ramki odczytu prowadzącej do substytucji 27 konserwatywnych aminokwasów i dodania 26 nowych aminokwasów na końcu 3' białka. U kur leghorn wykryto substytucję G/C w pozycji 186 i 187 genu GHR. Mutacje te powodują podstawienia aminokwasów – asparagina/leucyna i lizyna/walina w domenie zewnątrzkomórkowej receptora (136,137). U białych leghornów znaleziono



Rys. 4. Polimorfizm regionu kodującego genu GHR człowieka. Zaznaczono pozycję mutacji (tam gdzie jest znana), rodzaj mutacji, symbol mutacji, oraz jej wpływ na ekspresję genu GHR. Ciemniejszym kolorem zaznaczono eksony, jaśniejszym – introny. Wykonany na podstawie danych zebranych z różnych publikacji (101,116-135).

polimorfizm typu RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) w intronie 2 genu GHR. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym *HindIII* odpowiedniego fragmentu DNA zidentyfikowano 2 allele – H⁺ i H⁻. Znalaziono korelacje pomiędzy wykrytymi allelami w *locus* GHR i masą ciała młodych ptaków, a także wiekiem znoszenia pierwszego jaja. Osobniki z allelem H⁻ charakteryzowały się mniejszą masą ciała i później zaczęły się nieść (138).

W eksonie 10 genu GHR lokalnej chińskiej rasy kur (*native Chinese chickens*) wykryto polimorfizm RFLP po trawieniu enzymem restrykcyjnym *AluI*. Stwierdzono, że ten polimorfizm polega na substytucji G/A 924 pz poniżej kodonu ATG, startu translacji mRNA. Ta substytucja nukleotydów nie powoduje zmiany sekwencji aminokwasów w kodowanym białku (139).

Większość doniesień o polimorfizmie genu GHR była dotyczy regionu 5'-flankującego, znajdującego się powyżej eksonu 1A, a także eksonu 10 razem z regionem 3'-flankującym (rys. 5). Polimorficzne mikrosatelitarne powtórzenie dinukleotydu GT zidentyfikowano w obrębie promotora P1 eksonu 1A, 90 pz powyżej miejsca startu transkrypcji (91,140). Wykryto 5 alleli z liczbą powtórzeń GT – 11, 16, 17, 18



Rys. 5. Polimorfizm regionu flankującego 5' (A) oraz eksonu 10 (B) genu GHRL. Zaznaczono pozycję mutacji, rodzaj mutacji, metodę wykrywania mutacji: SNP (*single nucleotide polymorphism*), wykrywany przez sekwencjonowanie DNA oraz/lub metodą RFLP z wykorzystaniem wskazanego enzymu restrykcyjnego. Zaznaczono także pozycje: elementu LINE-1, którego obecność stwierdzono u bydła europejskiego *Bos taurus* (elementu LINE-1 nie znaleziono u *Bos indicus*, żubra – *Bison bonasus*, oraz u kilku osobników lokalnego bydła polskiego – czerwonej polskiej i biało-żółtej); sekwencji TATA-box; promotora P1; eksonu 1A. W nawiasach kwadratowych podano pozycję w spisie literatury: [c] – Maj & Zwierzchowski, nie publikowane; [d] – Shneider i wsp., GenBank AY053520/AY053545.

i 20. Zaobserwowano, że liczba powtórzeń GT jest skorelowana z brakiem lub z obecnością powtarzalnego elementu LINE-1 (retrotranspon) o długości 1,2 Kpz powyżej promotora P1. Wykryto, że krótki allel z 11 powtórzeniami występuje u osobników należących do *Bos indicus*, które nie mają LINE-1. Osobniki z liczbą powtórzeń 16, 17, 18 i 20 (długie allele), należące do *Bos taurus*, miały element LINE-1 w regionie 5'-flankującym genu GHR. Analizując 64 buhaje rasy angus znaleziono 6 osobników heterozygotycznych, które miały krótki allel 11-pz i jeden z długich alleli. Stwierdzono, że osobniki homozygotyczne z jednym z długich alleli GHR miały, w porównaniu do osobników heterozygotycznych, średnio większą masę ciała (140).

W przeprowadzonej przez nas za pomocą komputerowego programu Repeat-Masker analizie regionu 5'-flankującego genu GHR była także wykazano obecność retrotransponu – elementu powtarzalnego typu LINE-1. Porównując sekwencję tego regionu z sekwencjami znajdującymi się w bazie Rep-Base Update, version 7.4; ([141]; <http://www.girinst.org>) potwierdzono obecność elementu LINE-1 o długości 1160 pz, położonego 512 pz powyżej miejsca startu transkrypcji exonu 1A. Obecność elementów LINE-1 o znacznym podobieństwie sekwencji stwierdzono także w innych genach była: genie trypsynogenu (1059 pz; 95% podobieństwa do LINE-1 genu GHR), genie lizozymu (1042 pz; 94% podobieństwa), i pseudogenie α -laktoalbuminy (968 pz; 96% podobieństwa). Rzeczywista długość elementu LINE-1 w genie GHR była to 1206 pz. Na jego końcach 5' i 3' znaleziono dodatkowe sekwencje nukleotydów, odpowiednio – T₁₁CCAA i TC₃AGAAGT₄A₃. Ponadto, na obu końcach elementu LINE-1 znaleziono powtórzone 11-nukleotydowe sekwencje TSD (*target site duplications*; (142)).

Trzy miejsca polimorficzne w regionie 5'-flankującym genu GHR była, rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne *AluI*, *AcclI* i *StuI* opisali Aggrey i wsp. (143). Sekwencjonując różne warianty DNA wykazano, że polimorfizm ten wynika, odpowiednio, z podstawień nukleotydów – A/T w pozycji -1177, C/T (-887) i C/T (-226). Polimorfizm wykrywalny przez enzym restrykcyjny *AluI* był u była skorelowany z cechami młeczności (143,144). W przeprowadzonej przez nas analizie polimorficznego regionu 5' genu GHR była za pomocą programu komputerowego Repeat-Masker wykazano, że miejsca polimorficzne dla *AluI* i *AcclI* znajdują się w obrębie elementu powtarzalnego LINE-1, powyżej promotora P1. Trzeci opisany przez Aggrey i wsp. (143) polimorfizm RFLP, rozpoznawany przez *StuI* znajduje się w promotorze P1. Podobnie, substytucja A/G, rozpoznawalna przez enzym restrykcyjny *NsiI*, wykryta przez Ge i wsp. (145; GenBank AF126288), jest zlokalizowana w promotorze P1, -154 nukleotydów przed miejscem inicjacji transkrypcji.

W obrębie elementu LINE-1, przez trawienie enzymem *Fnu4HI*, zidentyfikowaliśmy nowy polimorfizm typu RFLP (146). W wyniku sekwencjonowania polimorficznego fragmentu wykazano, że jest to substytucja C/T w pozycji -1104 genu GHR. Ta substytucja jest także rozpoznawana przez enzym *TseI*.

Gen GHR była okazał się także polimorficzny pod względem obecności lub braku elementu LINE-1. Osobniki ras była pochodzących od zebu (*Bos indicus*) nie po-

siadają tego retrotranspozonu w regionie promotorowym (91). U wszystkich osobników bydła domowego (*Bos taurus*) stwierdzano dotychczas tylko „długą” formę genu GHR, z elementem LINE-1 poprzedzającym promotor P1. W naszych badaniach wykazano jednak, że także u bydła domowego spotyka się osobniki z delecją LINE-1. Z analizowanych przez nas 251 zwierząt różnych ras, u 3 krów rasy czerwona polska i 2 rasy białogrzbietka (polskie lokalne rasy) element LINE-1 występował tylko na jednej nici DNA (w stanie heterozygotycznym). Występowaniu elementu LINE towarzyszy także substytucja C/T w pozycji -262 (140); u bydła, *B. indicus* (bez elementu LINE) w tym miejscu znajduje się tymina, zaś u bydła *B. taurus* (z LINE-1) – cytozyna. Co ciekawe, w naszych badaniach wykazano, że osobniki należące do gatunku *B. taurus*, heterozygotyczne pod względem obecności LINE-1, są także heterozygotyczne pod względem substytucji nukleotydów w pozycji -262. Substytucja ta jest rozpoznawana przez enzym restrykcyjny *Sau96I* (Maj i Zwierzchowski, nie publikowane). Dlatego, przeprowadzono porównawczą analizę tego regionu genu GHR u bydła europejskiego (*B. taurus*) i u pochodzącego od *B. indicus* bydła nguni. U wszystkich przebadanych dotychczas ras bydła europejskiego delecję LINE1 stwierdziliśmy tylko u przedstawicieli polskich lokalnych ras – czerwonej polskiej i rasy nadwiślańskiej (białogrzbietka). Ponadto, te osobniki posiadały w regionie promotorowym genu GHR mutacje (substytucje nukleotydów) typowe dla genomu *B. indicus*. Z sześciu zbadanych próbek DNA bydła nguni w dwóch wykryto delecję w układzie homozygotycznym, a cztery były heterozygotami. We wstępnych badaniach wykazano obecność podobnego haplotypu (delecja LINE-1 i mutacje) u żubra (*Bison bonasus*). Przeprowadzono sekwencjonowanie regionu flankującego 5' genu GHR żubra, obejmującego ekson 1A i promotor P1 (GenBank, AY243962). Stwierdzono znaczne podobieństwo (98,6%) do odpowiedniej sekwencji genu GHR bydła; na około 410 nukleotydów tylko 2 były inne niż w DNA u bydła czerwonego polskiego z delecją LINE-1 ([146]; Maj i Zwierzchowski, dane nie publikowane).

Obecność lub brak elementu LINE1, a także specyficzne substytucje nukleotydów w regionie 5' wskazują na istnienie dwóch haplotypów genu GHR – typowego dla *B. taurus* lub *B. indicus*. W naszych badaniach wykazano, że haplotyp *indicus* spotyka się także (w formie heterozygotycznej) u przedstawicieli bydła europejskiego. Istnieją doniesienia wskazujące na wpływ genotypu *taurus* i *indicus* na cechy produkcyjne. Lagziel i wsp. (147) wykazali, że obecność sekwencji typu *indicus* w genie hormonu wzrostu (GH) europejskiego bydła jest dodatnio skorelowana ze stężeniem białka w mleku. Autorzy sugerują, że w przypadku niektórych *loci* haplotyp *indicus* mógłby służyć do doskonalenia bydła europejskiego *B. taurus*. Z kolei Hale i wsp. (140) donoszą, że typ *indicus* powtórzeń dinukleotydu TG w genie GHR (11 lub mniej powtórzeń), spotykany u około 5% bydła aberdeen angus, niekorzystnie wpływa na tempo wzrostu. W porównawczych badaniach różnych gatunków *Bovidae* prześledzono występowanie tej delecji elementu LINE-1 u różnych ras bydła europejskiego i zebu, a także u spokrewnionych z bydlęciem gatunków rodziny *Bovidae*, m.in. żubrów, jaków, bawołów, owiec i kóz. Pozwoliłoby to ustalić na jakim etapie ewolucji

parzystokopytnych powstał haplotyp charakterystyczny dla *B. taurus* i czy, jak przypuszczamy pierwotna forma genu GHR była bez elementu LINE-1, a jego insercja nastąpiła przy wyodrębnieniu się gatunku *B. taurus*. Ze względu na przytoczone doniesienia o wpływie haplotypów *taurus* i *indicus* na produktywność zwierząt, takie badania mogą mieć nie tylko poznawczy charakter.

Analizowano także polimorfizm regionu kodującego genu GHR bydła. Najwięcej badań prowadzono na eksonie 10, przypuszczalnie, dlatego że sekwencja tego właśnie eksonu jest dostępna w bazie GenBank. Co ciekawe, region genu GHR bydła okazał się bardzo polimorficzny. Cztery podstawienia pojedynczych nukleotydów (SNP; *single nucleotide polymorphism*) wykryto sekwencjonując 450-nukleotydowy fragment eksonu 10 genu GHR bydła ([148], GenBank AF140284). Okazało się, że zmiana sekwencji nukleotydów umożliwia identyfikację tych miejsc polimorficznych metodą RFLP. Są to: substytucja C/T (rozpoznawalna przez enzym *Maell*), A/G (*Narl*), C/T (*NlaIII*) i A/G (*AluI*). Dwie z tych mutacji zmieniają ramkę odczytu mRNA i sekwencję aminokwasów w białku. Podstawienie A→G (*Narl*) zmienia kodon ACC (kodujący Thr) na GCC (kodujący Ala), a drugie podstawienie A/G (*AluI*) – kodon AGC (kodujący Ser) na GUC (kodujący Gly). Pozostałe tranzycje są nieme – nie mają wpływu na sekwencję aminokwasów w białku.

W wyniku sekwencjonowania u *Bos indicus* 528-nukleotydowego fragmentu tegoż eksonu 10 genu GHR wykryto 10 mutacji (Schneider i wsp., GenBank AY053520 – GenBank AY053545). Są to tranzycje T/C w pozycjach 41, 149, 169, 229, 310, 379, 512, 516 i A/G w pozycjach 52, 73 (numeracja na podstawie sekwencji GenBank – AF140284).

Fragment eksonu 10 zawierający 30 pz sekwencji kodującej i 273 pz regionu 3'-flankującego został zbadany przez Moisiso i wsp. (149). Znalezione 3 warianty genetyczne różniące się długością regionu 3'-flankującego (GHR₃₁₁, GHR₃₂₀ i GHR₃₂₅). Wszystkie te warianty zostały zsekwencjonowane. Wykryto, że w porównaniu z sekwencją cDNA, opublikowaną przez Hauser i wsp. (49) wszystkie zawierały insercję 8 pz (TGTTGAAA). U osobników z wariantem GHR₃₂₀ występowała ponadto delekcja 5 par zasad (ATATT), a u osobników GHR₃₂₀ i GHR₃₂₅ – insercja 14 par zasad (TTAGTGGCAGTAAT). Wykryto także transwersję C/G w pozycji 703 (numeracja – wg GenBank AF140284).

Falaki i wsp. (150) donieśli o wykryciu polimorfizmu RFLP-*TaqI* w obrębie sekwencji genu GHR kodującej wewnątrzkomórkową, C-końcową część receptora. U włoskiego bydła holsztyńsko-fryzjskiego opisano 9 różnych alleli genu GHR; polimorfizm ten miał znaczący wpływ na cechy mleczości. Blott i wsp. (151) wykryli w regionie genu GHR kodującym domenę transbłonową receptora mutację, skutkiem której jest substytucja aminokwasów F/Y. Mutacja ta miała wpływ na cechy mleczości bydła.

5. Podsumowanie

Hormon wzrostu (GH) jest regulatorem postnatalnego wzrostu, metabolizmu lipidów, węglowodanów i białek u zwierząt i człowieka. Na poziomie komórkowym działanie hormonu wzrostu jest wynikiem interakcji pomiędzy hormonem i jego receptorem. Receptor hormonu wzrostu (GHR) należy do rodziny receptorów cytokinowych. Receptory te charakteryzują się obecnością pojedynczej domeny transbłonowej. GHR jest kodowany przez pojedynczy gen, który charakteryzuje się skomplikowaną budową eksonu 1, kodującego fragment mRNA nie podlegający translacji – 5'-UTR. U wszystkich zbadanych gatunków zwierząt znaleziono kilka transkryptów genu GHR, różniących się długością fragmentu 5'-UTR. Powstają one na drodze alternatywnego składania transkryptów eksonu 1 do wspólnego miejsca znajdującego się u człowieka i bydła 11 pz przed kodonem ATG w eksonie 2. W genie GHR człowieka znaleziono wiele miejsc polimorficznych, powstałych przez podstawienie, delecję lub insercję nukleotydów. Niektóre z tych mutacji powodują oporność na GH i są przyczyną zahamowania wzrostu (np. zespół Larona). U zwierząt gospodarskich geny GH i GHR kandydują do roli genów markerów związanych z cechami tempa wzrostu i mleczości. Co najmniej w trzech przypadkach stwierdzono u bydła związek pomiędzy polimorfizmem genu GHR a cechami produktywności mlecznej. Niemniej jednak, konieczna jest identyfikacja nowych miejsc polimorficznych w genie GHR bydła, świń i innych zwierząt gospodarskich. W artykule tym przedstawiono aktualny zakres wiedzy na temat budowy, funkcji oraz polimorfizmu w obrębie genu receptora GH. Przedstawiono także najnowsze wyniki badań autorów nad polimorfizmem genu GHR bydła.

Literatura

1. Menon R. K., Shaufli A., Yu J. H., Stephan D. A., Friday R. P., (2001), *Mol. Cell. Endocrinol.*, 172, 135-146.
2. Zhu T., Goh Eyleen L. K., Graichen R., Ling Ling, Lobie P. E., (2001), *Cell. Signalling*, 13, 599-616.
3. Carter-Su C., Rui L., Herrington J., (2000), *Pediatr. Nephrol.*, 14, 550-557.
4. Herrington J., Smit L. S., Schwartz J., Carter-Su C., (2000), *Oncogene*, 19, 2585-2597.
5. Zhou Y., Xu B. C., Maheshwari H. G., He L., Reed M., Lozykowski M., Okada S., Cataldo L., Coschigamo K., Wagner T. E., Baumann G., Kopchick J. J., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13215-13220.
6. Kelly P. A., Ali S., Rozakis M., Goujon L., Nagano M., Pellegrini I., Gould D., Djiane J., Edery M., Finedori J., Postel-Vinay M. C., (1993), *Rec. Prog. Horm. Res.*, 48, 123-164.
7. Harvey S., Hull K. L., (1995), in: *Growth Hormone*, Eds. S. Harvey, C. G. Scanes, W. H. Daughaday, Boca Raton, FL, CRC Press, Inc., 303.
8. Mathews L. S., Enberg B., Norstedt G., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 9905-9910.
9. Kelly P. A., Djiane J., Postal-Vinay M. C., Edery M., (1991), *Endocrinol. Rev.*, 12, 235-251.
10. Billestrup N., Nielsen J. H., (1991), *Endocrinology*, 129, 883-888.
11. Florini J. R., Ewton D. Z., Coolican S. A., (1996), *Endocrinol. Rev.*, 17, 481-517.
12. Nguyen A. P., Chandorkar A., Gupta C., (1996), *Endocrinology*, 137, 3659-3666.
13. Jux C., Leiber K., Hugel U., Blum W., Ohlsson C., Klaus G., Mehls O., (1998), *Endocrinology*, 139, 3296-3305.

14. Pantaleon M., Whiteside E. J., Harvey M. B., Barnard R. T., Waters M. J., Kaye P. L., (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 5125-5130.
15. Adams T. E., (1995), Mol. Cell. Endocrinol., 108, 23-33.
16. Li J., Owens J. A., Owens P. C., Saunders J. C., Fowden A. L., Gilmour R. S., (1996), Endocrinology, 137, 1650-1657.
17. Jiang H., Okamura C. S., Lucy M. C., (1999), J. Biol. Chem., 274, 7893-7900.
18. Leung D. W., Spencer S. A., Cachianes G., Hammonds R. G., Collins C., Henzel W. J., Barnard R., Waters M. J., Wood W. I., (1987), Nature, 330, 537-543.
19. Baumann G., Amburn K., Shaw M. A., (1988), Endocrinology, 122, 976-984.
20. Vasilatos-Younken R., Andersen B. J., Rosebrough R. W., McMurtry J. P., Bacon W. L., (1991), J. Endocrinol., 130, 115-122.
21. Davis S. L., Graf M., Morrison C. A., Hall T. R., Swift P. J., (1992), J. Anim. Sci., 70, 773-780.
22. Baumann G., (1994), J. Endocrinol., 141, 1-6.
23. Sotelo A. I., Partata W. A., Marques M., Turyn D., (1997), Arch. Physiol. Biochem., 105, 167-174.
24. Baumann G., (1999), in: *Growth Hormone*, Eds. B. A. Bengtsson, S. Melmed, Endocrine Update Series, Kluwer Academic Publishers, Boston, 37-57.
25. Sohm F., Manfroid I., Pezet A., Rentier-Delrue F., Rand-Weaver M., Kelly P. A., Boeuf G., Postel-Vinay M. C., de Luze A., Edery M., (1998), Gen. Comp. Endocrinol., 111, 216-224.
26. Sotiropoulos A., Goujon L., Simonin G., Kelly P. A., Postel-Vinay M. C., Finidori J., (1993), Endocrinology, 132, 1863-1865.
27. Bingham B., Oldham E. R., Baumbach W. R., (1994), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 206, 195-199.
28. Dastot F., Sobrier M-L., Duquesnoy P., Duriez B., Goossens M., Amselem S., (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10723-10728.
29. Baumann G., (2001), J. Ped. Endocrinol. Metab., 14, 355-375.
30. Baumbach W. R., Horner D. L., Logan J. S., (1989), Gene. Develop., 3, 1199-1201.
31. Smith W. C., Kuniyoshi J., Talamantes F., (1989), Mol. Endocrinol., 3, 984-990.
32. Edens A., Southard J. N., Talamantes F., (1994), Endocrinology, 135, 2802-2805.
33. Sadeghi H., Wang, B. S., Lumanglas A. L., Logan J. S., Baumbach W. R., (1990), Mol. Endocrinol., 4, 1799-1805.
34. Hull K. L., Janssens W. C. J., Baumbach W. R. Harvey S., (1996), Growth Regulation, 6, 165-175.
35. Edens A., Talamantes F., (1998), Endocrine Rev., 19, 559-583.
36. Martini J. F., Pezet A., Guezennec C. Y., Edery M., Postel-Vinay M. C., Kelly P. A., (1997), J. Biol. Chem., 272, 18951-18958.
37. Zhang Y., J. Jiang, Black R. A., Baumann G., Frank S. J., (2000), Endocrinology, 141, 4342-4348.
38. Wang X., He K., Gerhart, M., Huang, Y., Jiang, J., Paxton, R. J., Yang, S., Lu, C., Menon, R. K., Black, R. A., Baumann, G., Frank, S. J., (2002), J. Biol. Chem., 277, 50510-50519.
39. Baumann G., Amburn K. D., Buchanan T. A., (1987), J. Clin. Endocrinol. Metab., 64, 657-660.
40. Clark R. G., Mortensen D. L., Carlsson L. M., Spencer S. A., McKay P., Mulkerrin M., Moore J., Cunningham B. C., (1996), Endocrinology, 137, 4308-4315.
41. Mannon D. A., Winer L. M., Shaw M. A., Baumann G., (1991), J. Clin. Endocrinol. Metab., 73, 30-34.
42. Wickelgren R. B., Landin K. L. L., Ohlsson C., Carlsson L. M. S., (1995), J. Clin. Endocrinol. Metab., 80, 2154-2157.
43. Zogopoulos G., Figueiredo R., Jenab A., Ali Z., Lefebvre Y., Goodyer C. G., (1996), J. Clin. Endocrinol. Metab., 81, 775-782.
44. Pantel J., K. Machinis, Sobrier M., Duquesnoy P., Goossens M., Serge A., (2000), J. Biol. Chem., 275, 18664-18669.
45. Fisker S., Kristensen K., Rosenfalck A. M., Pedersen S. B., Ebdrup L., Richelsen B., Hilsted J., Christiansen J. S., Jorgensen J. O. L., (2001), J. Clin. Endocrinol. Metab., 86, 792-796.
46. Ross R. J. M., Esposito N., Shen X. Y., (1997), Mol. Endocrinol., 11, 265-273.
47. Amit T., Bergman T., Dastot F., Youdim M. B. H., Amselem S., Hochberg Z., (1997), J. Clin. Endocrinol. Metab., 82, 3813-3817.
48. Amit T., Youdim M. B. H., Hochberg Z., (2000), J. Clin. Endocrinol. Metab., 85, 927-932.

49. Hauser S. D., McGrath M. F., Collier R. J., Krivi G. G., (1990), *Mol. Cell Endocrinol.*, 72, 187-200.
50. Adams T. E., Baker L., Fiddes R. J., Brandon M. R., (1990), *Mol. Cell Endocrinol.*, 73, 135-145.
51. Cioffi J. A., Wang X., Kopchick J. J., (1990), *Nucl. Acid. Res.*, 18, 6451.
52. Zogopoulos G., Nathanielsz P., Hendy G. N., Goodyer C. G., (1999), *J. Mol. Endocrinol.*, 23, 67-75.
53. Burnside J., Liou S. S., Cogburn L. A., (1991), *Endocrinology*, 128, 3183-3192.
54. Ohkubo T., Tsukada A., Tanaka M., Nakashima K., (1998), *Biochem. Mol. Biol.*, 120 (3), 449-455.
55. Zhang X., Lu X., Jing N., Zhu S., (2000), *Gen. Comp. Endocrinol.*, 119, 265-275.
56. Huang H., Brown D. D., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 190-194.
57. Calduch-Giner J. A., Duval H., Chesnel F., Boeuf G., Perez-Sanchez J., Boujard D., (2000), *Endocrinology*, 142, 3269-3273.
58. Lee L. T., Nong G., Chan Y. H., Tse D. L., (2001), *Gene*, 270, 121-129.
59. Tse D. L. Y., Tse M. C. L., Chan C. B., Deng L., Zhang W. M., Lin H. R., Cheng C. H. K., (2003), *Biochim. Biophys. Acta.*, 1625, 64-76.
60. de Vos A. M., Ultsch M., Kossiakoff A. A., (1992), *Science*, 255, 306-312.
61. Bole-Feyssot C., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly P. A., (1998), *Endocrine Rev.*, 19(3), 225-268.
62. Decker C. J., Parker R., (1995), *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 7, 386-393.
63. Jacobson A., Peltz S. W., (1996), *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 693-739.
64. Huang N., Cogburn L. A., Agarwal S. K., Marks H. L., Burnside J., (1993), *Mol. Endocrinol.*, 7, 1391-1398.
65. Oldham E. R., Bingham B., Baumbach W. R., (1993), *Mol. Endocrinol.*, 7, 1379-1390.
66. Cramer S. D., Barnard R., Engbers C., Ogren L., Talamantes F., (1992), *Endocrinology*, 131, 876-882.
67. Smith W. C., Linzer D. I. H., Talamantes F., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 9576-9579.
68. Frick G. P., Goodman H. M., (1992), *Endocrinology*, 131, 3083-3090.
69. Tiong T. S., Herington A. C., (1992), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180, 489-495.
70. Tiong T. S., Freed K. A., Herington A. C., (1989), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 158, 141-148.
71. Adkins R. M., Vandenberg J., Li W. H., (2000), *Gene*, 246 (1-2), 357-363.
72. Klempt M., Bingham B., Breier B. H., Baumbach W. R., Gluckman P. D., (1993), *Endocrinology*, 132, 1071-1077.
73. Pratt S. L., Anthony R. V., (1995), *Endocrinology*, 136, 2150-2155.
74. Delehay-Zervas M. C., Mertani H., Martini J. F., Nihoul-Fekete C., Morel G., Postel-Vinay M. C., (1994), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78, 1473-1480.
75. Barton D. E., Foellmer B. E., Wood W. I., Francke U., (1989), *Cytogenet. Cell. Genet.*, 50, 137-141.
76. Godowski P. J., Leung D. W., Meacham L. R., Galgani J. P., Keret R., Rotwein P. S., Parks J. S., Laron Z., Wood W. I., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8083-8087.
77. Moody D. E., Pomp D., Barendse W., Womack J. E., (1995), *Anim. Genet.*, 26, 341-343.
78. Jenkins Z. A., Henry H. M., Sise J. A., Montgomery G. W., (2000), *Anim. Genet.*, 31, 280.
79. Zou L., Burmeister L. A., Sperling M. A., (1997), *Endocrinology*, 138, 1771-1774.
80. Agarwal S. K., Cogburn L. A., Burnside J., (1994), *J. Endocrinol.*, 142, 427-434.
81. Menon R. K., Stephan D. A., Singh M., Morris S. M., Zou L., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 8851-8859.
82. Zhou Y., He L., Kopchick J. J., (1994), *Receptor*, 4, 223-227.
83. Goodyer C. G., Zogopoulos G., Schwartzbauer G., Zheng H., Hendy G. N., Menon R. K., (2001), *Endocrinology*, 142, 1923-1934.
84. Sobrier M. L., Duquesnoy P., Duriez B., Amselem S., Goossens M., (1993), *FEBS Lett.*, 319, 16-20.
85. Seidel B., Glasow A., Schütt M., Kiess W., Wu Z., Strasburger C. J., Kratzsch J., (2003), *Eur. J. Endocrinol.*, 148, 317-324.
86. Moffat J. G., Dao H., Talamantes F., (2000), *Mol. Cell. Endocrinol.*, 167, 147-153.
87. Moffat J., Edens A., Talamantes F., (1999), *J. Mol. Endocrinol.*, 23, 33-44.
88. Domene H. M., Cassorla F., Werner H., Roberts C. T., Leroith D., (1995), *DNA Cell Biol.*, 14, 195-204.
89. Jiang H., Lucy M. C., (2001), *Gene*, 265(1-2), 45-53.
90. Jiang H., Lucy M. C., (2001b), *Mol. Endocrinol.*, 15, 1023-1034.
91. Lucy M. C., Johnson G. S., Shibuya H., Boyd C. K., Herring W. O., (1998), *J. Anim. Sci.*, 76, 2209-2210.
92. Lucy M. C., Jiang H., Kobayashi Y., (2001), *J. Dairy Sci.*, 84 (E. Suppl.), E113-E119.

93. O'Mahoney J. V., Brandon M. R., Adams T. E., (1994), *Mol. Cell. Endocrinol.*, 101, 129-139.
94. Schwartzbauer G., Menon R. K., (1998), *Mol. Genet. Metab.*, 63, 243-253.
95. Jiang H., Lucy M. C., (2000), *J. Anim. Sci.*, 78 (Suppl.), 17 (Abstr).
96. Yu J. H., Schwartzbauer G., Kazlman A., Menon R. K., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 34327-34336.
97. Adams T. E., (1999), *Biochem. J.*, 344, 867-872.
98. Jiang H., Okamura C. S., Boyd C. K., Lucy M. C., (2000), *J. Mol. Endocrinol.*, 24, 203-214.
99. Laron Z., (1993), *Endocrinologist*, 3, 21-28.
100. Strobl J. S., Thomas M. J., (1994), *Pharmacol. Rev.*, 46, 1-34.
101. Laron Z., (2002), *Rev. Endocrinol. Metab. Disord.*, 3, 347-355.
102. Guillaume J., (1976), *World's Poult. Sci. J.*, 32, 285-303.
103. Merat P., (1990), in: *Poultry Breeding and Genetics*, Ed. R. D. Crawford, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 429-467.
104. Decuyper E., Huybrechts L. M., Kuhn E. R. G., Tixier-Boichard M., Merat P., (1991), *Critic. Rev. Poult. Biol.*, 2, 191-221.
105. Rosenfeld R. G., Rosenbloom A. L., Gueverra-Aguirre J., (1994), *Endoc. Rev.*, 15, 369-390.
106. Pinar M. H., Monvoisin J. L., (1994), *Proc. 5th World Congr. Gen. Appl. Anim. Liv. Prod.*, 20, 38-41.
107. Burnside J., Liou S. S., Zhong C., Cogburn L. A., (1992), *General Comp. Endocrinol.*, 88, 20-28.
108. Cogburn L. A., Mao J. N. C., Burnside J., (1997), in: *Perspectives in Avian Endocrinology*, Eds. S. Harvey, R. J. Etches, Bristol: Journal of Endocrinology Ltd., 101-107.
109. Parks J. S., Brown M. R., Faase M. E., (1997), *J. Pediatrics*, 131, S45-S50.
110. Anselem S., Sobrier M. L., Dastot F., Duquesnoy P., Duriez B., Goossens M., (1998), *Bailleres Clin. Endocrinol. Metab.*, 10, 353-369.
111. Berg M. A., Argente J., Chernausak S., Gracia R., Guevara-Aguirre J., Hopp M., (1993), *Amer. J. Hum. Genet.*, 52, 998-1005.
112. Goddard A. D., Covello R., Luoh S-M., Clackson T., Attie K., Gesundheit N., (1995), *N. Engl. J. Med.*, 333, 1093-1098.
113. Chujo S., Kaji H., Takahashi Y., Okimura Y., Abe H., Chihara K., (1996), *Eur. J. Endocrinol.*, 134, 560-562.
114. Hadjiyannakis S., Zheng H., Hendy G. N., Goodyer C. G., (2001), *Mol. Cell. Probes*, 15, 239-242.
115. Iida K., Takahashi Y., Kaji H., Onodera N., Takahashi M.O., Okimura Y., Abe H., Chihara K., (1999), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 4214-4219.
116. Amselem S., Duquesnoy P., Duriez B., Dastot F., Sobrier M. L., Valleix S., Goossens M., (1993), *Hum. Mol. Genet.*, 2, 355-359.
117. Sobrier M.-L., Dastot F., Duquesnoy P., Kandemir N., Yordam N., Goossens M., Amselem S., (1997), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82, 435-437.
118. Gastier J., Berg M., Vesterhus P., Reiter E., Francke U., (2000), *Hum. Mut.*, 16, 323-333.
119. Counts D. R., Cutler G. B., (1995), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80, 1978-1981.
120. Hopp M., Rosenbloom A., Griffiths J., Kgwete S., Vaccarello M., (1996), *S. Afr. Med. J.*, 86, 268-270.
121. Woods K., Fraser N., Postel-Vinay M., Savage M., Clark A., (1996), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 1686-1690.
122. Berg M., Guevara-Aguirre J., Rosenbloom A., Rosenfeld R., Francke U., (1992), *Hum. Mut.* 1, 24-32.
123. Ayling R.M., Ross R., Towner P., (1997), *Nat. Genet.*, 16, 13-14.
124. Silbergeld A., Dastot F., Klinger B., Kanety H., Eshet R., Amselem S., Laron Z., (1997), *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 10, 265-274.
125. Iida K., Takahashi Y., Kaji H., Nose O., Okimura Y., Abe H., Chihara K., (1998), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 531-537.
126. Amselem S., Sobrier M., Duquesnoy P., Rappaport R., Postel-Vinay M., Gourmelen M., Dallapiccola B., Goossens M., (1991), *J. Clin. Invest.*, 87, 1098-1102.
127. Otsuka T., Iwatani N., Kodama M., Sakakida M., Shichiri M., Jinno Y., Niikawa N., Miike T., (1997), *Jpn. J. Hum. Genet.*, 42, 323-329.

128. Duquesnoy P., Sobrier M., Duriez B., Dastot F., Buchanan C., Savage M., Preece M., Craescu C., Blouquit Y., Goossens M., (1994), *EMBO J.*, 13, 1386-1395.
129. Rosenbloom A., Guevara-Aguirre J., Rosenfeld R., Fielder P., (1994), *Acta Pediatr. Suppl.*, 399, 125-127.
130. Sanchez J. E., Perera E., Baumbach L., Cleveland W. W., (1998), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 4079-4083.
131. Walker J. L., Crock P. A., Behncken S. N., Rowlinson S. W., Nicholson L. M., Boulton T. J. C., Waters M. J., (1998), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 2554-2561.
132. Wojcik J., Berg M. A., Esposito N., Geffner M. E., Sakati N., Reiter E. O., Dower S., Francke U., Postel-Vinay M. C., Finidori J., (1998), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 4481-4489.
133. Kou K., Lajara R., Rotwein P., (1993), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76, 54-59.
134. Kaji H., Nose O., Tajiri H., Takahashi Y., Iida K., Takahashi T., Okimura Y., Abe H., Chihara K., (1997), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82, 3705-3709.
135. Quinteiro C., Castro-Feijoo L., Loidi L., Barreiro J., de la Fuente M., Dominguez F., Pombo M., (2002), *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 15, 1041-1045.
136. Hull K. L., Marsh J. A., Harvey S., (1999), *J. Endocrinol.*, 161, 495-501.
137. Duriez B., Sobrier M. L., Duquesnoy P., Tixier-Boichard M., Decuypere E., Coquerelle G., Zeman M., Goossens M., Amselem S., (1993), *Mol. Endocrinol.*, 7, 806-814.
138. Feng X. P., Kuhnlein U., Aggrey S. E., Gavora J. S., Zadworny D., (1997), *Poultry Sci.*, 76, 1770-1775.
139. Lau J. S., Leung F. C., (2002), 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, August 19-23, Abstract 22-27.
140. Hale C. S., Herring W. O., Shibuya H., Lucy M. C., Lubahn D. B., Keisler D. H., Johnson G. S., (2000), *J. Anim. Sci.*, 79, 450-476.
141. Jurka J., (2000), *Trends Genet.*, 16, 418-420.
142. Ostertag E. M., Kazazian H. H. J., (2001), *Annu. Rev. Genet.*, 35, 501-538.
143. Aggrey S. E., Yao J., Sabour M. P., Lin C. Y., Zadworny D., Hayes J. F., Kunlein U., (1999), *Amer. Genet. Assoc.*, 90, 148-151.
144. Torkamanzahi A., Abbasi A. R., Hasani A. R., (2000), 51th Annual Meeting of EAAP, Haga, The Netherlands, postre G1.16, 9.
145. Ge W., Davis M. E., Hines H. C., Irvin K. M., (1999), *Anim. Genet.*, 30, 66-80.
146. Maj A., Zwierzchowski L., (2002), *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 7 Supplement, 305, 8th Polish Conference on Cell Biology, Wrocław, September 23-25.
147. Lagziel A., Lipkin E., Soller M., (1996), *Genetics*, 142, 945-951.
148. Ge W., Davis M. E., Hines H. C., Irvin K. M., (2000), *J. Anim. Sci.*, 78, 2229-2230.
149. Moisiso S., Elo K., Kantanen J., Vilkki J., (1998), *Anim. Genet.*, 29, 55-57.
150. Falaki M., Gengler N., Sneyers M., Prandi A., Massart S., Formigoni A., Burny A., Portetelle D., Renaville R., (1996), *J. Dairy Sci.*, 79, 1446-1453.
151. Blott S., Kim J., Moisiso S., Schmidt-Kuntzel A., Cornet A., Berzi P., Cambisano N., Ford C., Grisard B., Johnson D., Wong J., Vilkki J., Georges M., Farnir F., Coppieters W., (2003), *Genetics*, 163, 253-266.