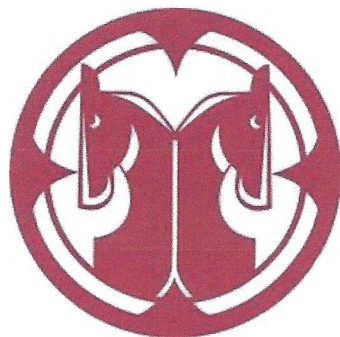


UNIwersytet WarMińsko – MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT



mgr inż. Anna Katarzyna Mańkowska

**ANALIZA POLIMORFIZMU DNA ORAZ EKSPRESJI
WYBRANYCH GENÓW ZWIĄZANYCH
ZE ZRÓŻNICOWANĄ PRZYDATNOŚCIĄ PLEMNIKÓW
KNURA DO KRIOKONSERWACJI**

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt
pod kierunkiem
prof. dr hab. Leylanda Fräsera
oraz drugiego promotora
prof. dr hab. Przemysława Sobiecha

Olsztyn 2022

STRESZCZENIE

Analiza polimorfizmu DNA oraz ekspresji wybranych genów związanych ze zróżnicowaną przydatnością plemników knura do kriokonserwacji

Przedłożona rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o wyniki uzyskane i zaprezentowane w cyklu trzech publikacji naukowych. W pierwszej z prac wykorzystano dane RNA-Seq uzyskane podczas porównania profili transkryptomycznych plemników knura o zróżnicowanej przydatności do kriokonserwacji nasienia. Wykorzystując analizę „variant calling”, zidentyfikowano ponad 1000 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów tzw. SNP i wykazano, że większość z nich znajdowała się w rejonach 3'-niepodlegających translacji (3'-UTR) sekwencjonowanych transkryptów plemnikowych. Do genotypowania populacji knurów wykorzystano technologię KASP. Czterdzieści z wykrytych SNP zostało wykorzystanych w badaniach populacyjno-asocjacyjnych knura rasy wielkiej białej polskiej, podczas których analizowano zależności pomiędzy genotypami poszczególnych loci a wybranymi parametrami charakteryzującymi jakość nasienia po rozmrożeniu. Analiza potwierdziła istotne związki pomiędzy polimorfizmem SNP w genach: *APPL1*, *PLBD1*, *FBXO16*, *EML5*, *RAB3C*, *OXSRI*, *PRICKLE1* i *MAP3K20* a cechami jakościowymi nasienia po zamrożeniu-rozmrożeniu. Zidentyfikowane SNP mogą być potencjalnymi markerami genetycznymi jakości i przydatności nasienia knura po kriokonserwacji.

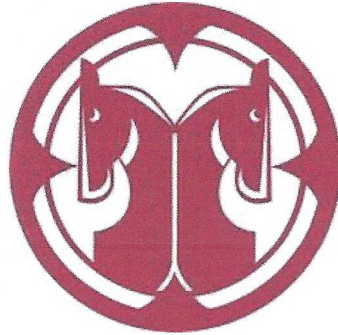
W drugiej pracy analizowano związek pomiędzy polimorfizmami DNA w sekwencjach 5'-flankujących genów *STK35* i *IFT27* (funkcjonalnie związanych odpowiednio z odpowiedzią na bodźce stresowe oraz z ruchliwością plemników) a zróżnicowaną ekspresją białek *STK35* i *IFT27* w nasieniu knurów klasyfikowanych do grup o dobrej i złej przydatności do kriokonserwacji (grupy GSF i PSF). Za pomocą sekwencjonowania Sangera zidentyfikowano obecność tranzykcji C > T (rs327863835) w promotorze genu *STK35* oraz dwóch substytucji A > T i T > C (rs337563873; rs331520020) w promotorze genu *IFT27*.

Zaobserwowano statystycznie istotne różnice we frekwencjach poszczególnych alleli analizowanych promotorów pomiędzy grupami knura GSF i PSF. Analizy bioinformatyczne wykazały, że mutacje *STK35* rs327863835 i *IFT27* rs331520020 mogą skutkować powstaniem dodatkowych miejsc wiązania dla czynników transkrypcyjnych takich jak: NFATC2, ELK1 i GR- β , co może różnicować poziom ekspresji *STK35* i *IFT27* w nasieniu knura o zróżnicowanej przydatności do technologii kriokonserwacji. Ponadto wykazano różnice w ekspresji białek *STK35* i *IFT27* pomiędzy nasieniem świeżym i mrożonym oraz że ekspresja białka *IFT27* była najwyższa w plemnikach po rozmrożeniu z grupy GSF. Uzyskane wyniki sugerują, że warianty alleliczne w *STK35* i *IFT27* mogą być uznane za potencjalne markery genetyczne przydatności nasienia knura do kriokonserwacji.

W trzeciej pracy badano, czy ekspresja genów związanych ze stresem (*TXNRD1*, *HSPA4L* i *ATP1B1*) wpływa na kriotolerancję plemników knura. Na poziomie mRNA stwierdzono wyższą ekspresję genów *TXNRD1* i *HSPA4L* w nasieniu po rozmrożeniu z grupy PSF w porównaniu z nasieniem świeżym. Podobnie, ekspresja białka *HSPA4L* była wyraźnie wyższa w nasieniu po rozmrożeniu z grupy PSF, podczas gdy świeże nasienie wykazywało istotnie wyższą ekspresję białka *TXNRD1* w grupie GSF. Istotnie wyższy poziom ekspresji mRNA *ATP1B1* w świeżym nasieniu o dobrej zamrażalności może być wykorzystany jako obiecujący marker kriotolerancji nasienia. Ponadto, różnice w ekspresji białek *TXNRD1* i *HSPA4L* oraz profile elektroforetyczne białek nasienia po rozmrożeniu pomiędzy grupami GSF i PSF dostarczają nowych danych pozwalających ocenić ich znaczenie w procesach powstawania kriouszkodzeń plemników.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania markerów genetycznych w ocenie przydatności nasienia knura do kriokonserwacji i uzyskania postępu w tej dziedzinie na drodze selekcji osobników o korzystnych genotypach.

UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN
FACULTY OF ANIMAL BIOENGINEERING



Anna Katarzyna Mańkowska, M.Sc.

**ANALYSIS OF DNA POLYMORPHISMS AND EXPRESSION
OF SELECTED GENES ASSOCIATED WITH DIFFERENT
FREEZABILITY OF BOAR SPERMATOZOA**

Doctoral thesis conducted

at the Department of Animal Biochemistry and Biotechnology

Supervisors: Prof. dr hab. Leyland Fraser

Prof. dr hab. Przemysław Sobiech

Olsztyn 2022

ABSTRACT

Analysis of DNA polymorphisms and expression of selected genes associated with different freezability of boar spermatozoa

This thesis was performed in three studies. In the first study, variant calling of transcriptome sequencing data (RNA-Seq), which allowed the comparison of sperm transcriptome profiles from boars differing in freezability, was performed to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs). Variant calling identified more than 1000 SNPs, in which most of them were detected at the 3'-untranslated regions (3'-UTRs). Forty SNPs were used for SNP genotyping by the KASP assay. Analysis showed associations of SNPs with some of the selected parameters of sperm functions following freezing-thawing. Analysis confirmed significant associations of *APPL1*, *PLBD1*, *FBXO16*, *EML5*, *RAB3C*, *OXSRI*, *PRICKLE1* and *MAP3K20* gene polymorphisms with the quality characteristics of frozen-thawed (FT) spermatozoa. It can be suggested that polymorphisms in the candidate genes are potential markers for post-thaw quality of boar semen.

In the second study, the 5'-flanking region sequences of *STK35*, a stress-related gene, and *IFT27*, a motility-related gene, were PCR amplified and analyzed by Sanger sequencing method to identify polymorphisms in spermatozoa of boars considered as having good and poor semen freezability (GSF and PSF, respectively). Bioinformatics was used to study the interactions of the identified SNPs with transcription factors (TFs) on the gene promoter activity. One SNP, rs327863835 (C > T) was detected in the *STK35* promoter, while two SNPs (rs337563873; A > T; rs331520020, T > C) were detected in the *IFT27* promoter. Significant allele frequency differences of *STK35* and *IFT27* promoter polymorphisms were observed between the freezability groups. It was predicted that *STK35* rs327863835 and *IFT27* rs331520020 resulted in the generation of additional binding sites for TFs, such as NFATC2, ELK1 and GR- β , which might regulate the transcriptional activity of the genes in either freezability group. Furthermore, protein expression of *STK35* and *IFT27* varied between

the fresh and PT semen, however, IFT27 protein expression was more marked in FT spermatozoa of the GSF group. It could be suggested that the allelic variants in *STK35* and *IFT27* can serve as potential markers for predicting the freezability of boar semen.

In the third study, it was investigated whether the expression of stress-related genes (*TXNRD1*, *HSPA4L* or *ATP1B1*) was associated with sperm cryotolerance. Higher relative mRNA expression levels of *TXNRD1* and *HSPA4L* were more marked in FT semen of the PSF group compared with the fresh semen. Likewise, HSPA4L protein expression was markedly higher in FT semen of the PSF group, while the fresh semen exhibited significantly higher expression of TXNRD1 protein in the GSF group. The significantly higher level of *ATP1B1* mRNA expression in the fresh semen of good freezability ejaculates could be used as a promising marker for semen freezability. Furthermore, variations in TXNRD1 and HSPA4L protein expression, and the electrophoretic protein profiles of FT semen between the freezability groups provide more insights into the role of sperm proteins in cryo-damage.

These studies indicate that the application of genetic markers for sperm freezability would contribute to the improvement in the cryopreservation of boar semen through the selection of individuals with high freezability ejaculates.