

EKSPRESJA *LIF* mRNA W ZALEŻNOŚCI OD POLIMORFIZMÓW *LIF1* I *LIF3* U LOSZEK

Aurelia Mucha¹, Katarzyna Ropka-Molik², Katarzyna Piórkowska²

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, 32-083 Balice k. Krakowa

¹Dział Genetyki i Hodowli Zwierząt, ²Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt

*Badaniami objęto 80 loszek ras wbp, pbz i linii 990 ubijanych w SKURTCh w Pawłowicach i Chorzelowie. Po uboju przy masie ciała 100 kg pobierane były próbki tkanek: jajnika, jajowodu, rogu i trzonu macicy oraz krew do izolacji DNA. Fazy cyklu rujowego określono na podstawie oceny makroskopowej ilości i wielkości pęcherzyków jajnikowych, ciałek żółtych i białawych. Zwierzęta podzielono na 2 grupy w zależności od fazy cyklu rujowego: loszki w fazie folikularnej i lutealnej. Polimorfizmy *LIF1* i *LIF3* genotypowano metodami PCR-SSCP i PCR-RFLP, przy użyciu enzymu restrykcyjnego DraIII. W pobranych tkankach oznaczono poziom ekspresji RNA. Dla badanych polimorfizmów stwierdzono wszystkie trzy genotypy. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy genotypami *LIF1* i *LIF3* w profilu ekspresji genu *LIF* w poszczególnych tkankach zarówno w fazie folikularnej, jak i lutealnej. Zauważono jednak, że dla polimorfizmu *LIF3* w rogu i trzonie macicy wyższą ekspresją charakteryzowały się lochy o genotypach AB i BB, co może sugerować wpływ allelu B na wyższy poziom transkrypty. W przypadku mutacji *LIF1* takich zależności nie stwierdzono.*

*Słowa kluczowe: świnie, tkanki układu rozrodczego, fazy cyklu rujowego, polimorfizmy *LIF1* i *LIF3*, ekspresja*

Czynnik hamujący białaczkę (leukemia inhibitory factor – LIF) jest cytokiną, która w organizmie spełnia wiele funkcji. Wpływa na różnicowanie i proliferację wielu typów komórek, wpływa na metabolizm wapnia i kości, bierze udział w patogenezie procesów zapalnych, wytwarzaniu białek fazy ostrej, powstawaniu stanu wyniszczenia organizmu przy współwystępującym rozroście nowotworowym lub przewlekłym zakażeniu (Abe i in., 1986; Austin i in., 1992; Mayer i in., 1993; Metcalf i Gearing, 1989; Mori i in., 1991; Reid i in., 1990).

Właściwy przebieg ciąży warunkowany jest między innymi przez prawidłowy rozwój zarodka, jak również przez odpowiednie przygotowanie macicy do jego im-

plantacji. Poznanie czynników wpływających na rozwój zarodka oraz receptywność endometrium jest rzeczą niezmiernie ważną w biologii rozrodo zarówno ludzi, jak i zwierząt. W badaniach dotyczących płodności wykazano, że LIF jest niezbędnym czynnikiem biorącym udział w procesach rozwoju i implantacji zarodka oraz we wczesnych okresach ciąży (Vogiagis i in., 1997; Robb i in., 2002; Salleh i Giribabu, 2014). Prace na temat profilu ekspresji i poziomu białka LIF i ich związku z płodnością prowadzone były głównie u ludzi oraz u myszy (modele zwierzęce) (Stewart i in., 1992; Robb i in., 2002). Niewiele jest natomiast badań dotyczących wpływu mutacji w genie *LIF* na płodność czy poziom transkryptu tego genu u zwierząt gospodarskich. Analiza ekspresji czynnika hamującego białaczkę w tkankach układu rozrodczego świń może wyjaśnić rolę tego białka w rozwoju i implantacji zarodka u tych zwierząt.

Celem pracy była analiza ekspresji *LIF* mRNA w zależności od genotypu *LIF1* i *LIF3* u świń.

Material i metody

Badania przeprowadzono na loszkach pochodzących ze Stacji Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTCh) w Chorzelowie i Pawłowicach. Ogółem badaniami objęto 80 sztuk samic ras wbp, pbz i linii 990. Doświadczenie zostało przeprowadzone zgodnie z metodyką oceny obowiązującą w stacjach kontroli. Materiał biologiczny pobierany był systematycznie w miarę przyjmowania nowych sztuk zwierząt do Stacji Kontroli. Po uboju przy masie ciała 100 kg pobierane były próbki tkanek: jajnika, jajowodu, rogu i trzonu macicy oraz krew do izolacji DNA. W celu określenia fazy cyklu rujowego jajniki poddawane były szczegółowej ocenie morfologicznej polegającej na makroskopowej ocenie liczby i wielkości pęcherzyków jajnikowych, ciałek żółtych i białawych. W zależności od fazy cyklu rujowego zwierzęta podzielone zostały na 2 grupy: loszki w fazie folikularnej i lutealnej.

DNA izolowane było z krwi pełnej pobranej do próbek z EDTA przy użyciu Genomic Wizard Purification Kit (Promega, Madison, USA) zgodnie z załączonym protokołem. Analiza polimorfizmów *LIF1* (transwersja C/G w pozycji 4950) i *LIF3* (tranzycja C/T w pozycji 6988) prowadzona była metodami PCR-RLFP i PCR-SSCP według metodyki Lina i in. (2009) oraz Spöttera i in. (2005), przy użyciu enzymu restrykcyjnego *DraIII* (New England, BioLabs, Canada).

Próbki tkanek jajnika, jajowodu, rogu i trzonu macicy pobrane były w czasie nie dłuższym niż 20 minut po uboju do próbek zawierających roztwór RNAlater (Ambion, Life Technologies, USA) i przechowywane w temp. -20°C . Do oznaczenia poziomu ekspresji RNA wyizolowano wg metodyki Chomczyńskiego (1993) z wykorzystaniem odczynnika TRI Reagent (jajnik, jajowód) oraz przy użyciu PARIS Kit – Protein and RNA Isolation Iystem (róg i trzon macicy) (Ambion, Life Technologies, USA). Ilościową i jakościową ocenę wyizolowanego kwasu rybonukleinowego przeprowadzano na spektrofotometrze NanoDrop (Thermo Scientific, USA) i na 2% żelu agarozowym. 1 μg RNA został przepisany na cDNA w 37°C z wykorzystaniem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Techno-

logies, USA) wg dołączonego protokołu. Primery i sondy zostały zaprojektowane i zsyntetyzowane przez Applied Biosystems (tab. 1). Poziom ekspresji oszacowano w odniesieniu do genów endogennych *OAZ1* i *RPL27* (Ropka-Molik i in., 2012). Reakcje (w całkowitej objętości 25 μ l) przeprowadzono w trzech powtórzeniach oraz w multipleksie z dwoma endogennymi genami. Wydajność reakcji dla kontroli endogennych i badanego genu wyznaczono metodą krzywej standardowej. Względną ilość transkryptu badanego genu obliczono z wykorzystaniem metody $\Delta\Delta$ CT i zgodnie ze wzorem: $1/E^{(Ct)}$ (gdzie E – wydajność reakcji obliczona jako $E=10^{[-1/\text{slope}]}$; slope – współczynnik kierunkowy krzywej standardowej; Ct – cykl graniczny (ang. threshold cycle)). Czynniki normalizujący obliczono na podstawie średniej geometrycznej znormalizowanej ilości dwóch endogennych genów zgodnie z metodyką według Pfaffla (2001).

Analizę statystyczną, mającą na celu zbadanie wpływu polimorfizmów *LIF1* i *LIF3* na poziom ekspresji w poszczególnych tkankach przeprowadzono przy użyciu procedury ANOVA (SAS Institute, USA).

Wyniki

Frekwencję genotypów i alleli polimorfizmów *LIF1* i *LIF3* u wszystkich zwierząt objętych badaniami przedstawiono w tabeli 2. Dla wszystkich badanych mutacji stwierdzono występowanie wszystkich trzy genotypów. Analizując ich frekwencję stwierdzono, że loszki o genotypach *AB* obu mutacji charakteryzowały się najwyższą frekwencją (odpowiednio 0,53 i 0,57), a genotypy *AA* i *BB* zbliżoną frekwencją (od 0,21 do 0,24). Również podobną frekwencją dla obu polimorfizmów charakteryzowały się allele *A* i *B* (dla *LIF1* odpowiednio 0,49 i 0,51, dla *LIF3* – 0,51 i 0,49).

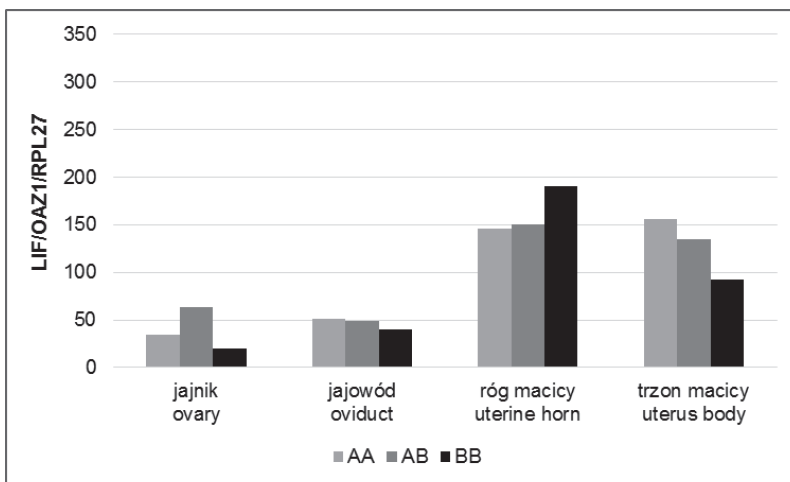
Wykresy od 1 do 4 przedstawiają porównanie poziomów ekspresji genu *LIF* w zależności od genotypów polimorfizmów *LIF1* i *LIF3* u loszek w fazie folikularnej i lutealnej w poszczególnych tkankach. Porównując poziom ekspresji genu *LIF* w poszczególnych tkankach stwierdzono, że najwyższą ekspresją w jajniku charakteryzowały się loszki o genotypie *AB*, w jajowodzie i trzonie macicy o genotypie *AA*, a w rogu macicy o genotypie *BB* (wykres 1). Najniższą ekspresję natomiast wykazano w jajniku, jajowodzie i trzonie macicy u loszek o genotypie *BB*. Nieco odmienne wyniki uzyskano w fazie lutealnej (wykres 2). Najwyższą ilość mRNA w jajnikach stwierdzono u loszek o genotypie *BB*, w jajowodzie o genotypie *AB*, a w rogu i trzonie macicy o genotypie *BB*, natomiast najniższą w jajowodzie i trzonie macicy u zwierząt o genotypie *BB*. W przypadku polimorfizmu *LIF3* u loszek w fazie folikularnej najwyższą ekspresję w jajniku stwierdzono u loszek o genotypie *AA*, w jajowodzie u loszek o genotypie *BB*, w rogu macicy loszek o genotypie *AB* oraz w trzonie macicy u loszek o genotypie *BB* (wykres 3). Natomiast w fazie lutealnej w jajniku i rogu macicy najwyższy poziom mRNA wykazano u loszek o genotypie *BB*, a w jajowodzie i trzonie macicy u loszek o genotypie *AB* (wykres 4). Nie wykazano jednak statystycznie istotnych różnic pomiędzy genotypami w ekspresji analizowanych genów w poszczególnych tkankach.

Tabela 1. Sekwencje starterów i sond wykorzystywanych do analizy ekspresji genu *LIF*
 Table 1. The sequences of primers and probes used for the analysis of *LIF* gene expression

Gen Gene	Nazwa Name	GenBank Accession No.	Sekwencja starterów Sequences of primers	Sekwencja sond Sequences of probes	Barwnik Dye	Długość PCR (pz) Length of PCR (bp)	Wydajność reakcji PCR Yield of PCR
OAZ1	ornithine decarboxy- lase antyzym 1	EU545195	F TGCAGCGGATCCTCAACA R TGGGTTTATCCCCCTCCTTCT	CCACTGCTTCGCCAGA	VIC	57	2.03
RPL27	60S ribosomal prote- in L27	NM_001097479	F CCGTACTCCGGACGCCAAA R GGTCTGAGTGCCATCATCA	CGGTCATCGTAAAGAA	NED	58	2.03
LIF	leukemia inhibitory factor	AY585336.1	Tagman gene expression assay ID: Ss0391458_m1 (Applied Biosystems)		FAM	104	1.97

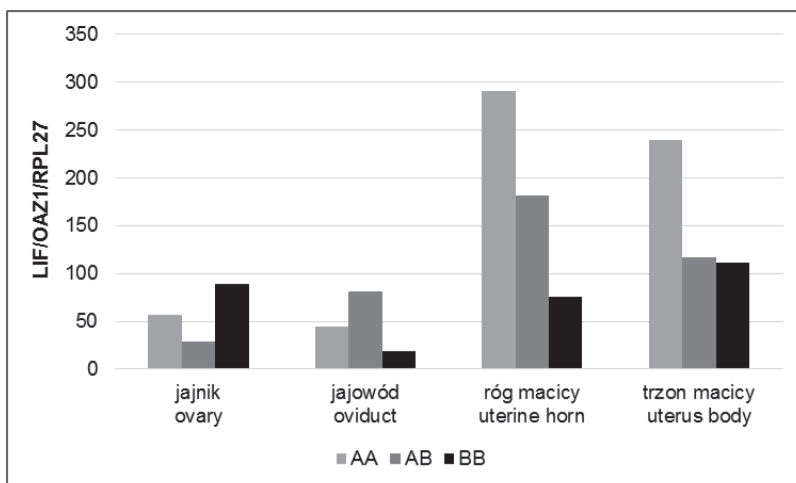
Tabela 2. Frekwencja genotypów i alleli polimorfizmów *LIF1* i *LIF3*
 Table 2. Genotype and allele frequencies of *LIF1* and *LIF3* polymorphisms

Gen Gene	Genotyp Genotype			Allel Allele		P P-Value
	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	
<i>LIF1</i>	0,23	0,53	0,24	0,49	0,51	0,4784
<i>LIF3</i>	0,22	0,57	0,21	0,51	0,49	0,2846



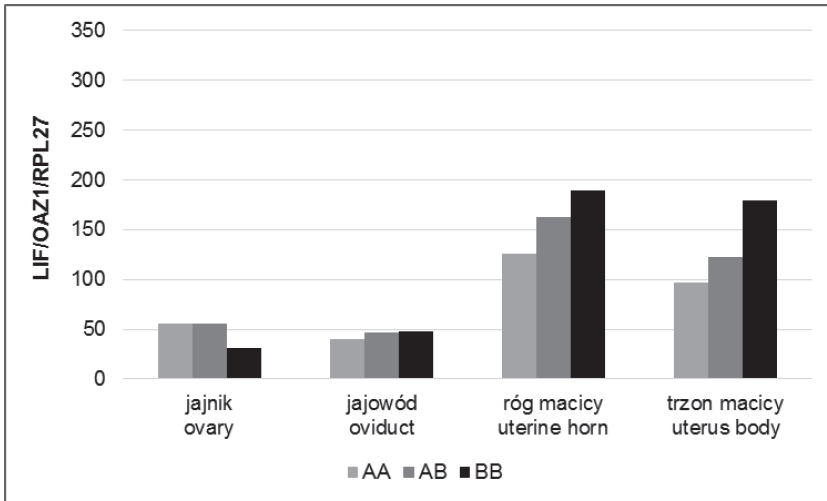
Wykres 1. Poziom ekspresji genu *LIF* w zależności od genotypu polimorfizmu *LIF1* w fazie folikularnej w tkance jajnika, jajowodzie, rogu i trzonie macicy

Figure 1. The level of *LIF* gene expression depending on *LIF1* genotype polymorphism in the follicular phase in the tissue of the ovary, oviduct, uterine horn and uterus body



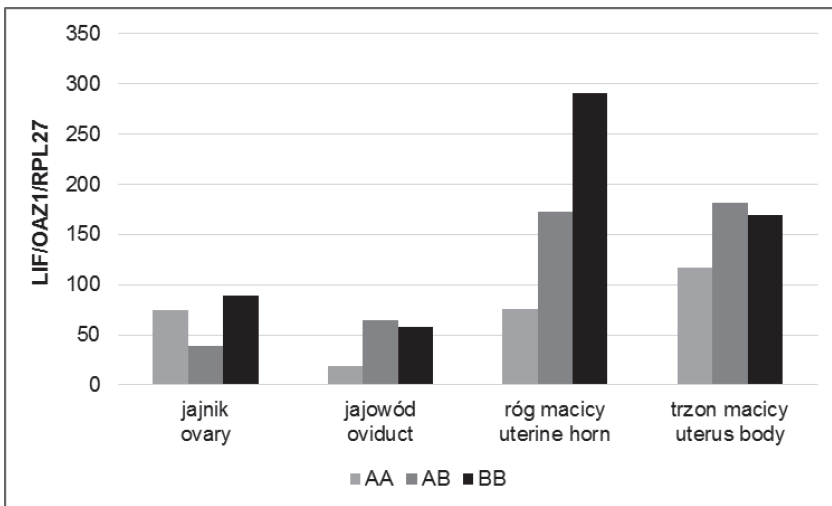
Wykres 2. Poziom ekspresji genu *LIF* w zależności od genotypu polimorfizmu *LIF1* w fazie lutealnej w tkance jajnika, jajowodzie, rogu i trzonie macicy

Figure 2. The level of *LIF* gene expression depending on *LIF1* genotype polymorphism in the luteal phase in the tissue of the ovary, oviduct, uterine horn and uterus body



Wykres 3. Poziom ekspresji genu *LIF* w zależności od genotypu polimorfizmu *LIF3* w fazie folikularnej w tkance jajnika, jajowodu, rogu i trzonie macicy

Figure 3. The level of *LIF* gene expression depending on *LIF3* genotype polymorphism in the follicular phase in the tissue of the ovary, oviduct, uterine horn and uterus body



Wykres 4. Poziom ekspresji genu *LIF* w zależności od genotypu polimorfizmu *LIF3* w fazie lutealnej w tkance jajnika, jajowodu, rogu i trzonie macicy

Figure 4. The level of *LIF* gene expression depending on *LIF3* genotype polymorphism in the luteal phase in the tissue of the ovary, oviduct, uterine horn and uterus body

Omówienie wyników

W niniejszych badaniach stwierdzono najwyższą frekwencję dla genotypów *AB* obydwóch genów oraz zbliżoną frekwencję genotypów *AA* i *BB*. Nieco odmienną

frekwencję genotypów polimorfizmów *LIF1* i *LIF3* również u ras wbp i pbz wykazali Mucha i in. (2013) w badaniach nad wpływem polimorfizmu tych genów na cechy rozplodowe. Dla mutacji *LIF1* stwierdzono, że frekwencja genotypu *AB* (0,45) była niewiele wyższa od frekwencji genotypu *AA* (0,42), a dla *LIF3* frekwencja genotypu *AB* (0,45) niewiele wyższa niż frekwencja genotypu *BB* (0,42). Lin i in. (2009) dla rasy Large White dla polimorfizmu *LIF1* oszacowali frekwencję genotypów od 0,25 (*AA*) do 0,38 (*BB*), a dla *LIF3* od 0,06 (*AA*) do 0,53 (*BB*), natomiast Spötter i in. (2005) dla syntetycznej linii niemieckiej Duroc i Large White dla *LIF3* od 0,07 (*AA*) do 0,53 (*BB*).

Spötter i in. (2005) wytypowali u świń gen *LIF*, jako gen kandydujący w odniesieniu do cech użytkowości rozplodowej, a zwłaszcza wielkości miotu. W prowadzonych badaniach nad wpływem polimorfizmów *LIF1* i *LIF3* nie uzyskano jednak jednoznacznych wyników (Spötter i in., 2005; Lin i in., 2009; Mucha i in., 2013; Napierała i in., 2014). Nieliczne badania dotyczą jednak poziomu *LIF* mRNA w tkankach świń w różnych fazach cyklu rujowego.

Anegon i in. (1994) wykazali u świń szczytową aktywność białka *LIF* w płynach prześwietu macicy w 12. dniu ciąży oraz w 7. i 13. dniu cyklu rujowego, jednak *LIF* mRNA był wykryty w endometrium tylko w 11. dniu. Wcześniejsze badania prowadzone przez nasz zespół dotyczyły porównania poziomu transkryptu genu *LIF* pomiędzy fazami cyklu rujowego w poszczególnych tkankach układu rozrodczego (Ropka-Molik i in., 2012). W tkankach jajnika, jajowodu, rogu i trzonu macicy poziom transkryptu genu *LIF* był wyższy w fazie lutealnej cyklu rujowego w porównaniu do fazy folikularnej czy niedojrzałych płciowo loszek (przed pierwszą rują), co potwierdza rolę genu *LIF* w okresie okołoimplantacyjnym zarodka. Stwierdzono również wyższą ekspresję tego genu w rogu i trzonie macicy w porównaniu do jajników i jajowodów w obydwu analizowanych fazach oraz u loszek niedojrzałych płciowo. Potwierdzają to wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Średni poziom transkryptu w rogu i trzonie macicy (bez podziału na genotypy) był wyższy niż w jajnikach i jajowodach zarówno w fazie folikularnej, jak i lutealnej.

Kholkute i in. (2000) w badaniach na marmozetach wykazali obecność białka *LIF* w nabłonku gruczołowym endometrium podczas wczesnej fazy lutealnej, najwyższy poziom ekspresji w połowie fazy lutealnej i ponownie niższy w późnej fazie lutealnej. Nie stwierdzono białka *LIF* podczas wczesnych i późnych fazach pęcherzykowych. Vogiagis i in. (1997) w badaniach na owcach wykazali natomiast, że ekspresja *LIF* pozostawała względnie stabilna w całym cyklu rujowym, zmniejszała się we wczesnym okresie ciąży (12–14 dzień) i była najwyższa w 16–20 dniu ciąży.

Prace dotyczące profilu ekspresji i poziomu białka *LIF* i ich związku z płodnością prowadzone były głównie u ludzi i myszy. Charnock-Jones i in. (1994) wykazali najwyższą ilość *LIF* mRNA w późnej fazie wydzielniczej cyklu w porównaniu do fazy wczesnej i środkowej oraz że jest ona sześć razy większa niż wykrywana w fazie proliferacji, gdy poziom *LIF* był niski lub niewykrywalny. Ekspresja *LIF* w endometrium zależy od etapu cyklu miesięczkowego, ale również od typu komórek. Badania Chena i in. (1995) potwierdziły, że na każdym etapie cyklu menstruacyjnego komórki nabłonkowe wydzielają znacznie więcej *LIF* niż komórki zrębu, ale stwierdzono również, że komórki nabłonka gruczołowego w połowie fazy lutealnej wydzielają

znacznie więcej LIF niż w innych fazach cyklu. U myszy Yang i in. (1995) wykazali na wysokim poziomie białka LIF w macicy blisko czasu owulacji i w 4 dniu ciąży.

W badaniach dotyczących płodności zaobserwowano istotnie wyższe stężenie LIF w macicy u kobiet płodnych niż niepłodnych (Laird i in., 1997). W przypadku kobiet niepłodnych stwierdzono mutacje w genie *LIF* (Giess i in., 1999; Kralickova i in., 2006). U myszy pozbawionych genu *LIF* po zapłodnieniu obserwowano powstawanie blastocysty, ale nie dochodziło do implantacji zarodka (Stewart i in., 1992; Robb i in., 2002).

W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy genotypami polimorfizmów *LIF1* oraz *LIF3* w profilu ekspresji genu *LIF* w poszczególnych tkankach zarówno w fazie folikularnej, jak i lutealnej. Zaobserwowano natomiast, że lochy o genotypach *AB* i *BB* charakteryzowały się wyższą ekspresją dla polimorfizmu *LIF3* w rogu i trzonie macicy, co może sugerować wpływ allelu *B* na wyższy poziom transkryptu. W przypadku polimorfizmu *LIF1* takich zależności nie stwierdzono. Uzyskane w pracy wyniki przyczynią się być może do pełniejszego poznania czynników mających wpływ na receptywność macicy i rozwój zarodków u sów, a co za tym idzie na zwiększenie płodności rzeczywistej loch.

Piśmiennictwo

- Abe E., Tanaka H., Ischimi Y., Miyaura C., Hayashi T., Nagasawa H., Tomida M., Yamaguchi Y., Hozumi M., Suda T. (1986). Differentiation-inducing factor purified from conditioned medium of mitogen-treated spleen cell cultures stimulates bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5958–5962.
- Anegon I., Cuturi M.C., Godard A., Moreau M., Terqui M., Martinat-Botté F., Soullilou J.P. (1994). Presence of leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 in porcine uterine secretions prior to conceptus attachment. *Cytokine*, 6 (5): 493–499.
- Austin L., Bower J., Kurek J., Vakakis N. (1992). Effects of leukemia inhibitory factor and other cytokines on murine and human myoblast proliferation. *J. Neurol. Sci.*, 112: 185–191.
- Charnock-Jones D.S., Sharkey A.M., Fenwick P., Smith S.K. (1994). Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J. Reprod. Fertil.*, 101 (2): 421–426.
- Chen D.B., Hilsenrath R., Yang Z.M., Le S.P., Kim S.R., Chuong C.J., Poindexter A.N. 3rd, Harper M.J. (1995). Leukaemia inhibitory factor in human endometrium during the menstrual cycle: cellular origin and action on production of glandular epithelial cell prostaglandin *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 10 (4): 911–918.
- Chomczyński P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15: 532–537
- Giess R., Tanasescu I., Steck T., Sendtner M. (1999). Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol. Hum. Reprod.*, 5 (6): 581–586.
- Kholkute S.D., Katkam R.R., Nandedkar T.D., Puri C.P. (2000). Leukaemia inhibitory factor in the endometrium of the common marmoset *Callithrix jacchus*: localization, expression and hormonal regulation. *Mol. Hum. Reprod.*, 6 (4): 337–343.
- Kralickova M., Sima R., Vanecek T., Sima P., Rokyta Z., Ulcova-Gallova Z., Sucha R., Uher P., Hes O. (2006). Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 127: 231–235.
- Laird S.M., Tuckerman E.M., Dalton C.F., Dunphy B.C., Li T.C., Zhang X. (1997). The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod.*, 12 (3): 569–574.

- Lin H.C., Liu G.F., Wang A.G., Kong L.J., Wang X.F., Fu J.L. (2009). Effect of polymorphism in the leukemia inhibitory factor gene on litter size in large white pigs. *Mol. Biol. Rep.*, 36: 1833–1838 (doi:10.1007/s11033-008-9387-0).
- Mayer P., Geissler K., Ward M., Metcalf D. (1993). Recombinant human leukemia inhibitory factor induces acute phase proteins and raises the blood platelet counts in nonhuman primates. *Blood*, 81 (12): 3226–3233.
- Metcalf D., Gearing D. (1989). Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of leukemia inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 5948–5952.
- Mori M., Yamaguchi K., Honda S., Nagasaki K., Veda M., Abe O., Abe K. (1991). Cancer cachexia syndrome developed in nude mice bearing melanoma cells producing leukemia-inhibitory factor. *Cancer Res.*, 51: 6656–6659.
- Mucha A., Ropka-Molik K., Piórkowska K., Tyra M., Oczkowiec M. (2013). Effect of *EGF*, *AREG* and *LIF* genes polymorphisms on reproductive traits in pigs. *Anim. Reprod. Sci.*, 137 (1–2): 88–92.
- Napierała D., Kawęka M., Jacyno E., Matysiak B., Wierzchowska A. (2014). Effect of polymorphism in the LIF gene on reproductive performance of hybrid Polish Large White and Polish Landrace sows. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 44 (1): 49–53.
- Pfaffl M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29 (9): e45 (doi:10.1093/nar/29.9.e45).
- Reid I., Lowe C., Cornish J., Skinner S.J., Hilton D.J., Willson T.A., Gearing D.P., Martin T.J. (1990). Leukemia inhibitory factor: a novel bone-active cytokine. *Endocrinology*, 126: 1416–1420.
- Robb L., Dimitriadis E., Li R., Salamonsen L.A. (2002). Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: cytokines with key roles in implantation. *J. Reprod. Immunol.*, 57, 129–141.
- Ropka-Molik K., Oczkowiec M., Mucha A., Piórkowska K., Piestrzyńska-Kajtoch A. (2012). Variability of mRNA abundance of leukemia inhibitory factor gene (LIF) in porcine ovary, oviduct and uterus tissues. *Mol. Biol. Rep.*, 39 (8): 7965–7972 (doi: 10.1007/s11033-012-1642-8).
- Salleh N., Giribabu N. (2014). Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *The Scientific World Journal*, Hindawi Publishing Corporation, Volume 2014, Article ID 201514, 10 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/201514>
- Spötter A., Drögemüller C., Hamann H., Distl O. (2005). Evidence of a new leukemia inhibitory factor-associated genetic marker for litter size in a synthetic pig line. *J. Anim. Sci.*, 83: 2264–2270.
- Stewart C.L., Kaspar P., Brunet L.J., Bhatt H., Gadi I., Kontgen F., Abbondanzo S.J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359: 76–79.
- Vogiagis D., Fry R.C., Sandeman R.M., Salamonsen L.A. (1997). Leukaemia inhibitory factor in endometrium during the oestrous cycle, early pregnancy and in ovariectomized steroid-treated ewes. *J. Reprod. Fertil.*, 109 (2): 279–288.
- Yang Z.M., Le S.P., Chen D.B., Cota J., Siero V., Yasukawa K., Harper M.J. (1995). Leukemia inhibitory factor, LIF receptor, and gp130 in the mouse uterus during early pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.*, 42 (4): 407–414.

Zatwierdzono do druku 11 I 2016

AURELIA MUCHA, KATARZYNA ROPKA-MOLIK, KATARZYNA PIÓRKOWSKA

Expression of *LIF* mRNA depending on *LIF1* and *LIF3* polymorphisms in gilts

SUMMARY

The study involved 80 Polish Large White, Polish Landrace and line 990 gilts slaughtered at the Pig Performance Testing Stations in Pawłowice and Chorzów. After slaughter at 100 kg body weight,

samples of tissues (ovary, oviduct, uterine horn, uterine body) and blood for DNA isolation were collected. Phases of the estrous cycle were determined based on macroscopic examination of the number and size of ovarian follicles, corpora lutea and corpora albicans. Gilts were divided into 2 groups according to the follicular or luteal phase of the estrous cycle. *LIF1* and *LIF3* polymorphisms were genotyped by PCR-SSCP and PCR-RFLP, using DraIII restriction enzyme. The sampled tissues were analysed for the level of RNA expression. All three genotypes were found for the studied polymorphisms. No statistically significant differences were found between the *LIF1* and *LIF3* genotypes in LIF expression profile in different tissues, in both the follicular and luteal phase. However, higher expression for *LIF3* polymorphism in the uterine horn and uterine body was characteristic of the sows of AB and BB genotypes, which may suggest the effect of the B allele on the higher transcript level. No such relationships were observed for the *LIF1* mutation.

Key words: pigs, tissues of the reproductive system, phases of the estrous cycle, *LIF1* and *LIF3* polymorphisms, expression