

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Larisa ZEMLJIČ

**POLIMORFIZMI V GENIH *CLOCK* IN *BMAL-1* KOT  
DEJAVNIKI TVEGANJA ZA PONAVLJAJOČE  
SPONTANE SPLAVE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Larisa ZEMLJIČ

**POLIMORFIZMI V GENIH *CLOCK* IN *BMAL-1* KOT DEJAVNIKI  
TVEGANJA ZA PONAVLJAJOČE SPONTANE SPLAVE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**POLYMORPHISMS IN THE *CLOCK* AND *BMAL-1* GENES AS RISK  
FACTORS FOR RECURRENT SPONTANEOUS ABORTIONS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Kliničnem Inštitutu za medicinsko genetiko na Ginekološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Boruta Peterlina.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov

Mentor: prof. dr. Borut PETERLIN  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Klinični inštitut za medicinsko genetiko

Recenzentka: doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov

Datum zagovora: 6.9.2011

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Larisa Zemljič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	577.2:618.39(043.2)=163.6
KG	Ponavljajoči spontani splavi, polimorfizem posameznih nukleotidov, asociacijska študija, rizičen genotip
AV	ZEMPLJIČ, Larisa
SA	PETERLIN, Borut (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za biologijo
LI	2011
IN	POLIMORFIZMI V GENIH <i>CLOCK</i> IN <i>BMAL-1</i> KOT DEJAVNIKI TVEGANJA ZA PONAVLJAJOČE SPONTANE SPLAVE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 47 str., 12 pregl., 9 sl., 1 pril., 78 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

Kljub temu, da poznamo že številne vzroke za pojav ponavljajočih spontanih splavov (RSA), pri 50-odstotkih še vedno ne znamo določiti vzroka. Nekateri rezultati študij na živalskih modelih kažejo na potencialni velik pomen cirkadianih ritmov pri reproduktivnem zdravju. Proučili smo 8 različnih polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP) v genih *clock* in *bmal-1*. Genotipizirali smo 81 parov (moški, ženska) z RSA in 75 zdravih parov (moški, ženska). V genu *clock* imajo RSA-pari pri polimorfizmu rs6850524 značilno več nosilcev vsaj enega alela G ( $p=0.003$ ,  $OR=0.39$ ), iz česar sklepamo, da genotipa GG in GC delujeta kot rizična za RSA. Pri polimorfizmu rs6811520 pa imajo RSA-pari značilno več nosilcev vsaj enega alela C ( $p=0.004$ ,  $OR=2.90$ ), iz česar sklepamo, da genotipa CC in CT delujeta kot rizična. V genu *bmal-1* imajo RSA-pari pri polimorfizmu rs3789327 signifikantno višjo frekvenco genotipov CC ( $p=0.048$ ,  $OR=1.84$ ) in alela C ( $p=0.018$ ,  $OR=1.46$ ), iz česar sklepamo, da alel C deluje rizično v recesivni obliki. Pri polimorfizmu rs4757144 pa imajo RSA-pari signifikantno višjo frekvenco genotipov AA in AG ( $p=0.039$ ,  $OR=1.67$ ) in alela A ( $p=0.041$ ,  $OR=1.40$ ), iz česar sklepamo, da alel A deluje rizično v dominantni obliki.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	577.2:618.39(043.2)=163.6
CX	Recurrent spontaneous abortion, single nucleotide polymorphism, association study, risk genotype
AU	ZEMLJIČ, Larisa
AA	PETERLIN, Borut (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
Y	2011
T	POLYMORPHISMS IN THE <i>CLOCK</i> AND <i>BMAL-1</i> GENES AS RISK FACTORS FOR RECURRENT SPONTANEOUS ABORTIONS
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	X, 47 p., 12 tab., 9 fig., 1 ann., 78 ref.
LA	sl
AL	sl/en

Although there are several identifiable nongenetic and genetic causes, the etiology remains unknown in almost 50-percent of couples. Studies in animal models demonstrated the importance of circadian rhythms in reproductive health. Eight different SNPs in *clock* and *bmal-1* were examined. 81 RSA couples (male, female) and 75 control couples (male, female) were genotyped. The G allelic status (GG and GC genotypes) of *clock* rs6850524 was over-represented in RSA-couples ( $p=0.003$ ,  $OR=0.39$ ). From the results we suggest GG and GC genotypes in rs6850524 contribute to the risk of RSA. The C allelic status (CC and CT) of *clock* rs6811520 was over-represented in RSA-couples ( $p=0.004$ ,  $OR=2.90$ ). CC and CT in rs6811520 act as a risk genotypes for the development of the RSA. The CC genotype ( $p=0.048$ ,  $OR=1.835$ ) and C allele ( $p=0.018$ ,  $OR=1.46$ ) of *bmal-1* rs3789327 were over-represented in RSA-couples. From the results we suggest C allele in rs3789327 acts as a risk allele for the development of the RSA. The AA, AG genotypes ( $p=0.039$ ,  $OR=1.67$ ) and A allele ( $p=0.041$ ,  $OR=1.40$ ) of *bmal-1* rs4757144 were over-represented in RSA-couples. From the results we suggest A allele in rs4757144 contributes to the risk of RSA.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG .....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	X
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV .....	3
2.1 PONAVLJAJOČI SPONTANI SPLAVI .....	3
2.2 CIRKADIANI RITMI .....	5
2.2.1 Vloga in opis.....	5
2.2.2 Zgradba.....	5
2.2.3 Genetske komponente cirkadiane ure.....	6
2.2.4 Bioritmična gena <i>clock</i> in <i>bmal-1</i> .....	10
2.2.5 Motnje ritmov .....	11
2.3 CIRKADIANI RITMI IN REPRODUKCIJA.....	12
2.3.1 Nastop pubertete .....	12
2.3.2 Sezonska reprodukcija.....	12
2.3.3 Val luteinizirajočega hormona in sproščanje hormonov .....	13
2.3.4 Jajčniki.....	13
2.3.5 Oocita in zgodnji embrio .....	14
2.3.6 Priprava maternice na vgnezditev embria .....	14
2.3.7 Cirkadiana ura med embrionalnim razvojem .....	14
2.4 PORUŠENI CIRKADIANI RITMI IN VPLIV NA REPRODUKCIJO.....	15
2.5 VPLIV POLIMORFIZMOV V GENIH <i>CLOCK</i> .....	16
2.6 SNP IN ASOCIACIJSKE ŠTUDIJE.....	16
3 PREISKOVANCI IN METODE .....	18
3.1 PREISKOVANCI.....	18
3.2 METODE .....	19
3.2.1 Izolacija DNA.....	19
3.2.1.1 Izolacija s kompletom »FlexiGene DNA kit«.....	19
3.2.1.2 Izolacija z aparaturom QuickGene-610L.....	21
3.3 PRIPRAVA RAZTOPIN VZORČNIH DNA .....	22
3.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO .....	22
3.4.1 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času .....	24
3.4.1.2 Detekcija produktov verižne reakcije s polimerazo v realnem času .....	24
3.4.1.3 Hibridizirajoče sonde TaqMan® .....	25
3.4.1.4 Uporaba sond TaqMan® za alelnu diskriminacijo – genotipizacijo .....	26
3.5 GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMOV V GENIH <i>CLOCK</i> IN <i>BMAL-1</i> .....	26
3.6 STATISTIČNE METODE .....	29
4 REZULTATI .....	30
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	34
6 POVZETEK .....	37

7	VIRI.....	41
	PRILOGE .....	49

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Preučevani polimorfizmi v genih <i>clock</i> in <i>bmal-1</i> .....	2
Pregl. 2: Značilnosti RSA-parov .....	18
Pregl. 3: Sestava reakcijske zmesi za rtPCR .....	26
Pregl. 4: Sestava mešanice začetnih oligonukleotidov .....	27
Pregl. 5: Razmere za izvedbo reakcije rtPCR (ciklizacija) .....	27
Pregl. 6: Razmere reciklizacije reakcije rtPCR .....	27
Pregl. 7: Razmere rtPCR za posamezen SNP .....	28
Pregl. 8: Značilnosti sond TaqMan® .....	28
Pregl. 9: Specifične sonde TaqMan® .....	28
Pregl. 10: Statistični izračuni genotipskih in alelnih frekvenc (skupno).....	30
Pregl. 11: Statistični izračuni genotipskih in alelnih frekvenc (ženske).....	31
Pregl. 12: Statistični izračuni genotipskih in alelnih frekvenc (moški).....	32



## KAZALO SLIK

Slika 1: Vzroki za RSA (modif. iz vira: Ford, Schust 2009: 2).....	4
Slika 2: Povratna zanka cirkadiane ure (vir: Boden, Kennaway 2006: 3).....	8
Slika 3: Glavni ritmovnik in periferni oscilatorji (modif. iz vira: Duez, Staels 2009: 3)....	10
Slika 4: Položaj genov <i>clock</i> in <i>bmal-1</i> v človeškem genomu (modif. iz vira: Meiosis, Mendel and ..., 2011).....	11
Slika 6 : Postopek izolacije DNA s kompletom FlexiGene DNA Kit (modif. po viru: QIAGEN FlexiGene DNA Handbook: 8) .....	20
Slika 7: Aparat QuickGene-610L (vir: Avtomatski sistemi za ..., 2011 ) .....	21
Slika 8: Potek PCR (modif. po viru: CGDP - DNA Amplification, 2005) .....	23
Slika 9: Potek reakcije PCR v realnem času in detekcija produktov PCR s sondami TaqMan® (modif. po viru: AB TaqMan® Gene ..., 2011).....	25

## **KAZALO PRILOG**

Priloga A: Preglednica vseh genotipov, uporabljenih pri statističnih izračunih.....	49
---	----

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BMAL-1/*bmal-1* = »brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like«  
protein/gen

CK1 $\epsilon$  = kazein kinaza 1  $\epsilon$

Geni *clock* = geni osrednjega molekularnega mehanizma (*clock*, *bmal-1*, *per*, *cry*)

CLOCK/*clock* = »circadian locomotor output cycles kaput« protein/gen

CRY/*cry* = kriptokrom protein/gen

DEC/*dec* = »differentially expressed in chondrocytes« protein/gen

KO = »knock-out«, brez posameznega gena

LD = »linkage disequilibrium«, vezavno neravnovesje

LH = luteinizirajoči hormon

NFQ = »nonfluorescent quencher«, dušilec pri reakciji PCR v realnem času

PAS-bHLH = PAS proteinska domena z osnovno zgradbo vijačnica-zavoj-vijačnica

PCR = »polymerase chain reaction«, verižna reakcija s polimerazo

PER/*per* = »period« protein/gen

PPAR $\alpha$  = »peroxisome proliferator-activated  $\alpha$ « receptor

RHT = retinohipotalamičen trakt

RSA = »recurrent spontaneous abortion«, ponavljajoči spontani splavi

SCN = »suprachiasmatic nucleus«, suprakiazmalno jedro

SNP = »single-nucleotide polymorphism«, polimorfizem posameznih nukleotidov

## 1 UVOD

Ponavljajoče spontane prekinitve nosečnosti (RSA, ang. *recurrent spontaneous abortion*) so kompleksen pojav, ki v povprečju doleti 1-2-odstotka parov, ki želijo donositi otroka. Kljub temu, da je etiologija kar dobro proučena, je v 50-odstotkih primerov RSA vzrok še vedno nepoznan (Wang in sod. 2010).

Nekateri rezultati študij na živalskih modelih kažejo na velik pomen cirkadianih ritmov pri reproduktivnem zdravju. Izločanje luteinizirajočega hormona (LH) in folikle stimulirajočega hormona iz češerike je pod nadzorom ritmičnega izražanja genov v suprakiazmalnem jedru (SCN). Poškodbe SCN povzročijo porušenje cikla zorenja folikla (Mosko in Moore 1979). Cirkadiani geni se ritmično izražajo tudi v jajčnikih in jajcevodu živalskih modelov (Karman in Tischkau 2006; Kennaway in sod. 2003). Ob implantaciji zarodka nekateri faktorji, povezani z implantacijo, medsebojno reagirajo s cirkadianimi transkripcijskimi dejavniki (Hogenesch in sod. 1998). Mutacija *clock*<sup>A19</sup> povzroči porušitev estrogenskega cikla in ovira vzdrževanje nosečnosti (Miller in sod. 2004). Samčki in samičke miši brez gena *bmal-1* so kazali povečano neplodnost (Bunger in sod. 2000; Alvarez in sod. 2008).

Rezultati omenjenih študij so nas privedli do sklepa, da so cirkadiani ritmi potencialno pomembni tudi pri reprodukciji človeka. Zato smo zasnovali asociacijsko študijo v kateri smo proučili pomen genetske variabilnosti genov *clock* in *bmal-1*, ki sta povezana s cirkadianimi ritmi, pri patologiji RSA.

Postavili smo hipotezo, da genetska variabilnost v genih *clock* in *bmal-1* poveča tveganje za pojav ponavljajočih spontanah splavov (RSA).

V diplomskem delu smo proučevali 4 različne polimorfizme v genu *clock* in 4 različne polimorfizme v genu *bmal-1*. V preglednici 1 so navedeni proučevani polimorfizmi.

Preglednica 1: Preučevani polimorfizmi v genih *clock* in *bmal-1*

gen	SNP	polimorfizem		regija v genu
<i>bmal-1</i>	rs3789327	C	T	intronska
<i>bmal-1</i>	rs4757144	A	G	intronska
<i>bmal-1</i>	rs1481892	C	G	intronska
<i>bmal-1</i>	rs12363415	A	G	intronska
<i>clock</i>	rs6850524	C	G	intronska
<i>clock</i>	rs11932595	A	G	intronska
<i>clock</i>	rs6811520	C	T	intronska
<i>clock</i>	rs13124436	A	G	intronska

Za izbiro posameznega polimorfizma smo se odločili na podlagi njegove informativnosti in funkcionalnosti. Z izbranimi polimorfizmi smo želeli zaobjeti čim večji del gena, zato smo izbrali tiste z visoko stopnjo heterozigotnosti. Pri izbiri smo bili tudi pozorni, da polimorfizmi niso v vezavnem neravnovesju (LD, ang. »linkage disequilibrium«).

Naš cilj je bil, da z asociacijsko raziskavo pogledamo frekvence izbranih genotipov v alelih *clock* in *bmal-1* in le-te primerjamo med slovenskimi pari z RSA in pari brez prekinitve nosečnosti.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PONAVLJAJOČI SPONTANI SPLAVI

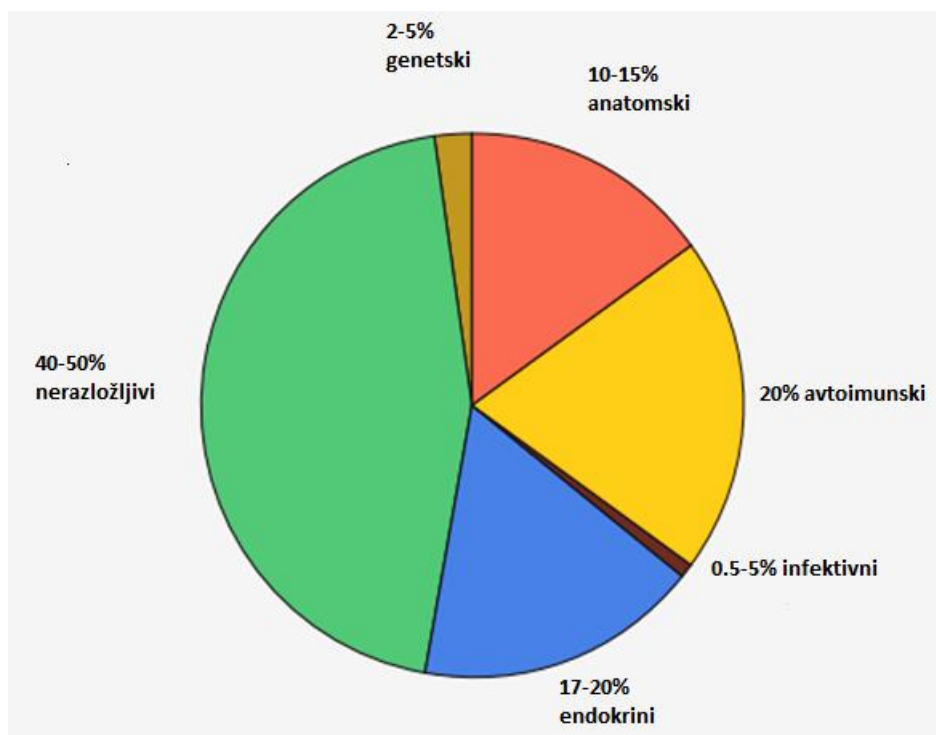
Ponavljajoči spontani splavi (RSA) so definirani kot 3 zaporedne spontane prekinitev nosečnosti pred dopolnjenim 20. tednom nosečnosti. Glede na pogostost sporadičnih (posameznih) spontanih splavov, je moč predvidevati, da RSA doleti 1-2-odstotka parov. Tveganje za RSA narašča s številom prejšnjih spontanih splavov. Tako je verjetnost za normalno nosečnost pri ženskah s predhodnimi tremi spontanimi splavi 30-odstotna pri ženskah s predhodnimi štirimi spontanimi splavi 25-odstotna in pri ženskah s petimi spontanimi splavi 5-odstotna (Ford in sod. 2009).

Obstajata 2 glavna vzroka za RSA. Do pojava lahko pride zaradi težav povezanih s plodom, kot so kromosomske nepravilnosti, ki preprečujejo implantacijo in rast, ali pa zaradi okolja v katerem poteka nosečnost.

Težave s plodom so lahko kromosomske nepravilnosti, ki so vzrok v 50-odstotkih spontanih splavov prvega trimesečja, 5-odstotkih splavov v pozni nosečnosti in 0,5-odstotka živih rojstev.

K težavam v okolju sodijo avtoimunska obolenja, endokrine motnje, anatomske nepravilnosti, nepravilnosti v delovanju encimov različnih metabolnih poti, endometrioza, hormonalno neravnovesje in neuravnovešena prehrana matere. Vzroki za RSA so torej lahko anatomske, hormonalne, metabolne, prehranske, psihološke, infektivne, genetske in imunološke/imunogenetske (Meka, Reddy 2006).

Kljub temu pa je še vedno 50-odstotkov RSA idiopatskih, pri katerih ne poznamo vzroka nastanka (Wang in sod. 2010).



Slika 1: Vzroki za RSA (modificirano iz vira: Ford, Schust 2009: 2)

## 2.2 CIRKADIANI RITMI

### 2.2.1 Vloga in opis

Ena glavnih značilnosti sveta v katerem živimo je cikel dneva in noči. V skladu z njim, kažejo vsa živa bitja dnevne spremembe v obnašanju in/ali fiziologiji. Dnevni ritmi niso zgolj odgovor na 24-urne spremembe v okolju zaradi vrtenja Zemlje okoli svoje osi, ampak izhajajo iz sistema znotraj organizma, ki ohranja orientacijo v času. Ta »biološka ura« omogoča, da se organizem na spremembe, ki so posledica menjavanja dneva in noči, pravočasno pripravi, hkrati pa omogoča notranjo časovno organizacijo soodvisnih procesov (Vitaterna in sod. 2001).

Za dnevne ritme, ki se zgodijo v času 24-ih ur uporabljamo izraz cirkadiani ritmi. Izpeljan je latinske fraze »circa diem« in pomeni »približno en dan«. Izraz vključuje dnevna nihanja v izražanju genov, sproščanju hormonov (Moore in sod. 1972), uravnavanju telesne temperature (Aschoff 1965), imunskega sistema (Oishi in sod. 2006) in reproduktivne funkcije (Miler in sod. 2004). Prisoten je pri vseh živih organizmih, vključno z bakterijami, glivami, rastlinami in živalmi (Vitaterna in sod. 2001).

### 2.2.2 Zgradba

Pri sesalcih imajo pomembno vlogo pri kontroli in koordinaciji cirkadianih ritmov možgani. Cirkadiana ura sesalcev je sestavljena iz glavne ure in perifernih oscilatorjev.

Osnovna cirkadiana ura, imenujemo jo tudi »glavna ura« je v suprakiazmalnem jedru (SCN, ang. »suprachiasmatic nucleus«), ki leži tik nad optično kiazmo v sprednjem delu hipotalamusa. SCN tvori bilateralno simetrična skupina celic, ki tvorijo živčne povezave z mrežnico. Deluje kot osrednji ritmovnik, ki proizvaja in časovno usklajuje notranji ritem organizma. Povezan je s perifernimi oscilatorji v drugih delih možganov, endokrinih organih in perifernih tkivih, kar mu omogoča sinhronizacijo fizioloških sistemov z okoljem (Moore in sod. 1972; Sukumaran in sod. 2010).



Najmočnejši okoljski dražljaj, ki deluje na glavni ritmovnik je svetloba. Direktna informacija o svetlobi se do SCN prenese preko živčnih povezav z mrežnico iz melanopsinskega ganglija preko retinohipotalamičnega trakta (RHT) (Morin in sod. 2006).

### 2.2.3 Genetske komponente cirkadiane ure

Molekularni mehanizem glavnega ritmovnika vsebuje transkripcijsko, post-transkripcijsko in translacijsko samo-regulatorno povratno zanko s periodičnostjo približno 24 –ih ur.

Povratno zanko uravnava delovanje različnih skupin transkripcijskih dejavnikov, vključno s proteinoma CLOCK («circadian locomotor output cycles kaput») in BMAL-1 («brain and muscle arnt like 1»), ki tvorita pozitivni del povratne zanke ter proteinoma PERIOD (PER 1,2,3) in CRYPTOCHROME (CRY 1,2), ki tvorita negativni del povratne zanke (Sukumaran in sod. 2010).

CLOCK je protein z domeno PAS, ki ima osnovno zgradbo vijačnica-zavoj-vijačnica (PAS-bHLH) in lahko tvori heterodimere z BMAL-1, ki ima prav tako domeno PAS-bHLH (Sukumaran in sod. 2010). Dimer se prenese v jedro, kjer medsebojno deluje s specifičnimi ojačitvenimi regijami (E-zaporedja). E-zaporedja imajo nukleotidno zaporedje CACGTG in se nahajajo v bližini promotorjev genov *per* in *cry*. Vezava heterodimera CLOCK-BMAL-1 na E-zaporedja genov *per* in *cry* aktivira njihovo prepisovanje (Gekakis in sod. 1998; Kume in sod. 1999).

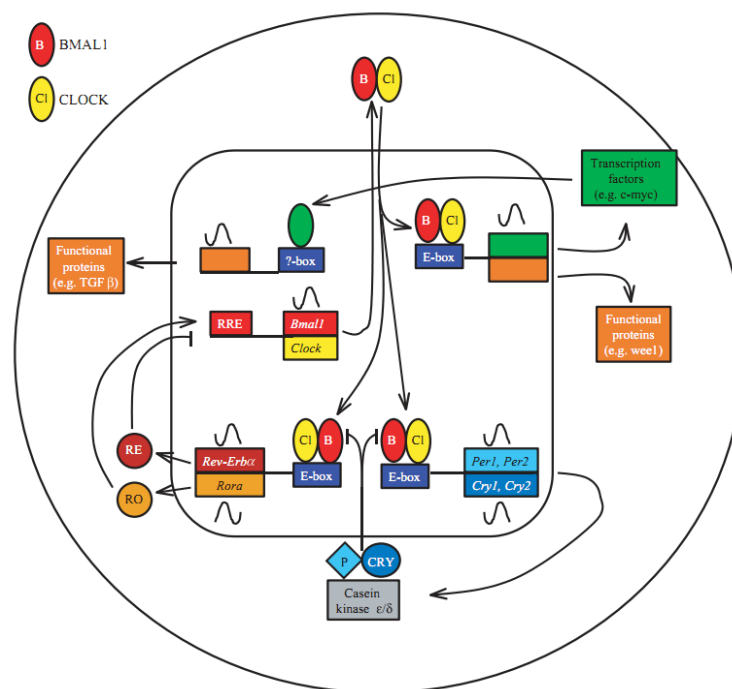
Periodni proteini PER1 in PER2 tvorijo s CRY1 in CRY2 komplekse, ki se po fosforilaciji s kazein kinazo 1 epsilon (CK1ε) prenesejo v jedro. Vežejo se na zaporedje CACGTG, specifično za heterodimer CLOCK-BMAL-1. S tem sterično ovirajo dostop CLOCK-BMAL-1 in inhibirajo transkripcijo svojih genov (Gekakis in sod. 1998; Kume in sod. 1999).

Kriptokromski proteini CRY1 in CRY2 dodatno ovirajo delovanje kompleksa CLOCK-BMAL-1, tako da otežijo njegovo fosforilacijo, ki je potrebna za uspešen transport v jedro in tvorijo z dimerom kompleks, ter spremenijo njegovo funkcijo iz ojačevalne v inhibitorno (Dardente in sod. 2007).

REV-ERB $\alpha$  je jedrni receptor sirota, ki vpliva na izražanje genov z vezavo na regije DNA, ki vsebujejo element RORA (z retinoičnim kislinskim receptorjem povezan element sirota receptorja A) z zaporedjem A[A/T]NT[A/G]GGTCA. Zaporedje se nahaja pred promotorji genov, med drugim tudi gena *bmal-1*, zato z vezavo na to zaporedje REV-ERB $\alpha$  onemogoči transkripcijo in deluje kot regulator negativne povratne zanke (Preinten in sod. 2002).

Kompleks CLOCK-BMAL-1 sproži prepisovanje proteinov DEC (»differentially expressed in chondrocytes« protein). Ti proteini se vežejo v nefunkcionalen dimer z BMAL-1 ali neposredno na E-zaporedja in preprečijo transkripcijo (Hamaguchi in sod. 2004).

Vsi zgoraj naštetih mehanizmi (blokiranje vezavnih mest, preprečevanje vstopa v jedro, inhibicija transkripcije *bmal-1* in tvorba nefunkcionalnih dimerov) povzročijo izgubo funkcije CLOCK-BMAL-1. Zaradi tega je znižana transkripcija genov negativne povratne zanke. Preostali produkti zanke se fosforilirajo ter razgradijo. Ni več zavrte ekspresije genov *bmal-1* in *clock*, kar omogoči spodbujevalnim faktorjem (npr. retinoični kislini), da se vežejo na promotorske regije in ponovno stimulirajo izražanje. Ta oscilacija izražanja genov se pojavlja približno v ritmu 24 ur in je odvisna od cikla svetlobe in teme (Shirai in sod. 2006). Koncentracija CLOCK-BMAL-1 je najvišja med svetlobno periodo, koncentracija PER-CRY pa med periodo teme, ne glede na to ali je žival dnevna ali nočna (Sukumaran in sod. 2010).



Slika 2: Povratna zanka cirkadiane ure (vir: Boden, Kennaway 2006: 3)

Celice SCN imajo širok spekter živčnih prenašalcev, hormonov, citokinov in receptorjev za mnoge ligande. Informacija iz SCN se prenaša preko hormonov ali preko multisinaptičnih živčnih poti.

Glavna uravnava ritmičnosti poteka preko živčnih poti, od katerih je najboljše proučena pot, ki uravnava hipofizo in njeno izločanje melatonina. Receptorji za melatonin so prevladujoče izraženi v SCN, kjer melatonin omogoča stabilno povratno zanko do ritmovnika (Kennaway 2005). Melatonin ima pomembno vlogo pri regulaciji spalno-budnega cikla. Svetloba zavira njegovo sintezo, zato ga je največ med periodo teme in najmanj med periodo svetlobe. V perifernih tkivih vpliva na izražanje genov *rev-erb* in modulira cirkadiano ritmičnost (Sukumaran in sod. 2010).

SCN tvori različne proteine, od katerih se direktno v cerebrospinalno tekočino izločijo  $TGF\alpha$  »transforming growth factor  $\alpha$ «, prokinetin 2 in kardiotropinu podoben citokin, ki sodelujejo pri regulaciji telesne temperature in gibalne aktivnosti.

Med SCN in drugimi deli možganov, SCN in perifernimi endokrinimi organi (češeriko, nadledvičnima žlezama in ščitnico) ter SCN in avtonomnim živčnim sistemom obstajajo obsežne živčne povezave. Nevroni avtonomnega živčnega sistema oživčujejo skoraj vse periferne organe (jetra, mišice, ledvici, maščobno tkivo, srce, trebušno slinavko in jajčnike) (Boden, Kennaway 2006; Sukumaran in sod. 2010).

Poskusi s poškodbami in transplantacijami SCN so pokazali, da nekatera periferna tkiva prejmejo informacije le preko živčnih povezav (postanejo aritmična če signal odstranimo), nekatera periferna tkiva pa lahko po odstranitvi živčnih povezav uporabljajo druge signale (Guo in sod. 2006).

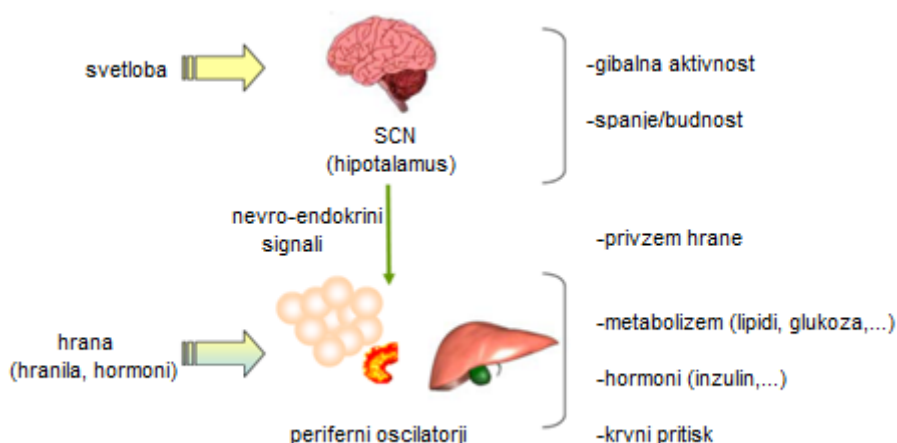
Preko teh mehanizmov SCN sporoči informacijo o času dneva možganom, perifernim tkivom in endokrinim žlezam ter tako omogoči sinhronizacijo teh tkiv z zunanjo fotoperiodo (Hastings in sod. 2003).

Cirkadiani geni se ne izražajo samo v glavnem ritmovniku, ampak jih izražajo tudi posamezne celice v mnogih tkivih (npr. jetra, nadledvični žlezi, ledvici, srce, trebušna slinavka, mišice) (Hastings in sod. 2003).

Prav tako se v SCN in perifernih tkivih velik del genoma izraža ritmično. Študije z mikromrežami so pokazale, da se v celicah srca in jeter ritmično izraža več kot 300 genov. Nekateri od teh genov imajo v promotorjih specifična E-zaporedja (ti se odzivajo neposredno na dimer CLOCK-BMAL-1), druge pa ritmično inducirajo tkivno specifični transkripcijski dejavniki (npr. produkti genov *rev-erba*, *dbp*, *c-myc*) (Munoz in sod. 2002).

Svetloba je najmočnejši dražljaj, ki uravnava endogeni ritem. Vendar lahko tudi informacija iz perifernih tkiv modulira izražanje genov *clock* v glavnem ritmovniku. S poskusi so pokazali, da na izražanje genov v SCN vpliva faza estrogenega cikla (Wollnik in Turek 1988), inzulin in gonadotropini (kar nakazuje na potencialno vlogo količine hranil v telesu) (Yamada in sod. 2003), PPAR $\alpha$  (»peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ «) (Canaple in sod. 2006) in količina grelina, hormona ki ga izločajo celice v želodcu in trebušni slinavki. Koncentracija grelina je pred obroki povečana in po obrokih zmanjšana,

kar ponovno nakazuje vlogo količine hranil pri usklajevanju cirkadiane ure) (Yi in sod. 2006).



Slika 3: Glavni ritmovnik in periferni oscilatorji (modificirano iz vira: Duez, Staels 2009: 3)

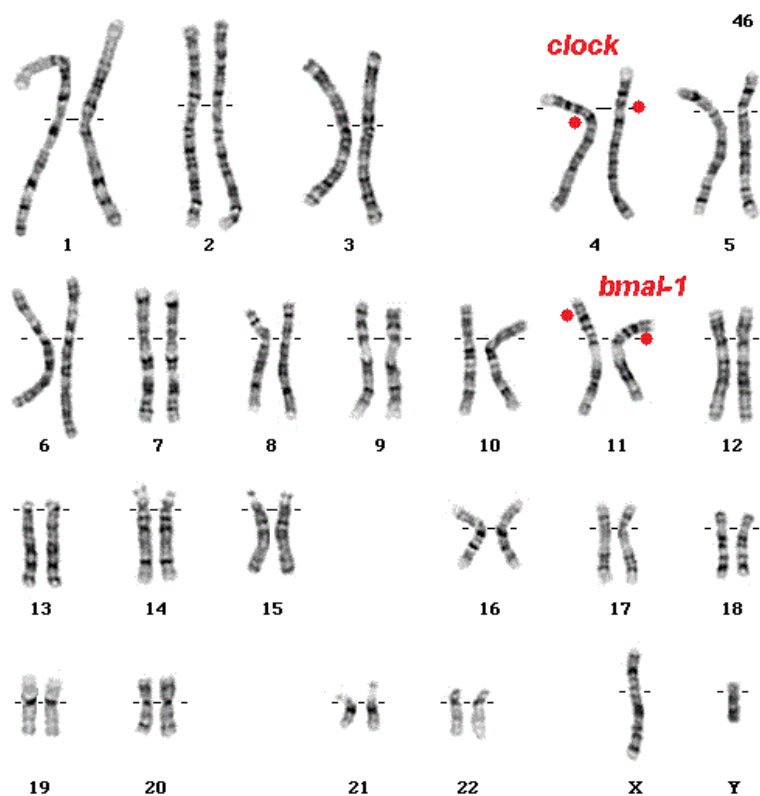
#### 2.2.4 Bioritmična gena *clock* in *bmal-1*

Gen *clock* je na človeškem kromosomu 4 (4q12). Ima zapis za protein CLOCK, ki pripada družini transkripcijskih faktorjev z osnovno strukturo vijačnica-zavoj-vijačnica (bHLH). Polimorfizmi v tem genu so bili povezani z motnjami spanja, metaboličnim sindromom in debelostjo. Protein tvori s proteinom BMAL-1 funkcionalen heterodimer, ki z vezavo na E-zaporedje pred promotorni cirkadianih genov aktivira njihovo transkripcijo. Protein je histonska acetiltransferaza, ki sodeluje pri cirkadiani uravnavi organizacije kromatina (GeneCards, 2011).

Gen *bmal-1* (*arntl*) je na človeškem kromosomu 11 (11p15.2). Ima zapis za protein BMAL-1, ki pripada družini transkripcijskih faktorjev z osnovno strukturo vijačnica-zavoj-vijačnica (bHLH).

Polimorfizmi v tem genu so bili povezani z diabetesom tipa 2 in hipertenzijo, nedavno objavljena študija jih je povezala tudi z reprodukcijo. Protein tvori s proteinom CLOCK

funkcionalen heterodimer, ki z vezavo na E-zaporedje pred promotorji cirkadianih genov aktivira njihovo transkripcijo. (vir: GeneCards, 2011)



Slika 4: Položaj genov *clock* in *bmal-1* v človeškem genomu (modificirano iz vira: Meiosis, Mendel and ..., 2011)

### 2.2.5 Motnje ritmov

Ohranjenost cirkadianega molekularnega sistema med različnimi živalskimi in rastlinskimi modeli kaže, da so cirkadiani ritmi pomembni pri uravnavanju rasti in preživetju.

Pomembnost cirkadianega sistema so dokazali številni poskusi, pri katerih so živalim odstranili ali mutirali posamezen gen molekularne ure.

Miške brez gena *bmal-1* niso zmožne uskladiti aktivnosti s periodo teme (Bunger in sod. 2000), potrebujejo več spanja čez dan (Laposky in sod. 2005), kažejo progresivne ne-  
vnetne artropatije (Bunger in sod. 2005), razvijejo sarkopenijo, očesno mrežo, imajo manj

podkožnega maščevja, pojavijo se krčenje organov, spremembe v številu imunskih celic in povečana količina reaktivnih kisikovih spojin (Kondratov in sod. 2006).

Ponovna ekspresija *bmal-1* v možganih in mišicah povrne vedenjsko ritmičnost, telesno težo in stopnjo aktivnosti (McDearmon in sod. 2006).

Miške s *clock*<sup>A19</sup> imajo tranzverzijo A/T, ki pri prepisovanju povzroči preskok 19. eksona in izgubo 51 aminokislin v C-terminalni regiji proteina CLOCK. Protein je kljub temu zmožen tvorbe dimera z BMAL-1 in vezave na E-zaporedje, vendar ne aktivira transkripcije tarčnih genov. Prav tako je izražanje genov *clock* in genov katere le-ti regulirajo v prifernih tkivih oslajeno ali povsem utišano (Gekakis in sod. 1998; Oishi in sod. 2000; Oishi in sod. 2003). Miške s to mutacijo imajo predispozicijo za debelost (Turek in sod. 2005) in slabo delovanje metabolizma (Kennaway in sod. 2007).

## 2.3 CIRKADIANI RITMI IN REPRODUKCIJA

### 2.3.1 Nastop pubertete

Nastop pubertete so raziskovalci že povezali s cirkadianimi ritmi pri ovcah in podganah. Spreminjanje fotoperiode je zakasnilo nastop pubertete (Foster in sod. 1988; Reiter 1980). Čeprav so pri ljudeh tudi že ugotovili sezonski nastop pubertete, so se drugi faktorji (teža ob rojstvu, prehrana, podnebje, stres in življenjski pogoji) izkazali kot boljši napovedovalci nastopa pubertete (Bronson 1995; Adair 2001).

### 2.3.2 Sezonska reprodukcija

Sezonsko reprodukcijo v povezavi s fotoperiodo so odkrili pri ovcah in hrčkih. Pri samčkah in samičkah teh vrst pride do telesnih hormonskih sprememb, skladno s spremembo fotoperiode v okolju (Lincoln 1998; Lincoln 2002; Reiter 1980). Pri podganah pa so odkrili sezonsko variacijo v plodnosti (Clark in Price 1981).

Pri ljudeh je nekaj dokazov o sezonski reprodukciji, vendar kaže, da so glavni faktorji, ki vplivajo na reprodukcijo, okoljski in socialni pritiski (Bronson 1995).

### 2.3.3 Val luteinizirajočega hormona in sproščanje hormonov

Med razvojem jajčnega folikla se prekine inhibicija sproščanja gonadotropin sproščujočega hormona (GnRH). Zaradi sproščanja GnRH se prične iz češerike sproščati luteinizirajoči hormon (LH), čemur sledi ovulacije zrele oocite (Mosko in Moore 1979).

Poškodbe SCN in posledično nizke koncentracije estrogena so pri podganah povzročile izgubo ovulacije (Mosko in Moore 1979).

SCN posreduje informacijo do nevronov GnRH v hipotalamusu. Nevroni GnRH glodalcev *in vitro* ritmično izražajo celoten komplement genov *clock* (Chappell in sod. 2003), kar kaže, da je SCN pomemben pri regulaciji vala LH. Regija pa vsebuje tudi estrogenske receptorje, kar kaže na možen vpliv steroidnih hormonov na čas ovulacije (van der Beek in sod. 1993; de la Iglesia in sod. 1995).

Pri ljudeh zaradi pomanjkanja jemanja krvi v različnih intervalih ciklusa še niso uspeli narediti analize hormonov (Wilcox in sod. 1995).

### 2.3.4 Jajčniki

Nekaj študij je potrdilo, da se v jajčnikih ritmično izražajo cirkadiani geni. Pri podganah se izražajo geni in proteini *clock* le v razvijajočem foliku, rumenem telescu in žlezem tkivu, v drugih regijah pa ne (Karman in Tischkau 2006). V podganjem jajčniku se ritmično izraža tudi gen *dec1*. Njegovo izražanje stimulira gonadotropni hormon, protein DEC1 pa deluje kot represor in zavira izražanje od gonadotropina odvisnih genov z E-zaporedjem (Yamada in sod. 2004). Iz tega je mogoče sklepati, da med ovulacijo poteka natančno ritmično izločanje hormonov in posledično proženje procesov.



### **2.3.5 Oocita in zgodnji embrio**

Razvijajoči se embrio v mišjem jajcevodu preživi do 4 dni, preden pripotuje do maternice in se ugnezdi. Vpliv materinega izražanja genov *clock* na embrio je bil dokazan še do dveh celic embria, stopnja izražanja pa se je nato znižala (Hamatani in sod. 2004).

Obstaja verjetnost, da je embrio med potovanjem po jajcevodu izpostavljen materinemu ritmičnemu izražanju genov v jajcevodu. V eni izmed študij so odkrili, da podgana v jajcevodu ritmično izraža gene *clock* in od njih odvisne gene, med njimi tudi gen za plazminogen inhibitor-1, ki je povezan z zaščito razvijajočega se embria na poti po jajcevodu (Kennaway in sod. 2003).

### **2.3.6 Priprava maternice na vgnezditev embria**

Ob ugnezditvi pride do sprememb v produkciji večih faktorjev, povečane angiogeneze, manjšega izražanja genov za anti-adhezivne proteine in večjega izražanja genov za adhezivne proteine. Za nekatere od teh proteinov je znano, da medsebojno reagirajo s cirkadianimi transkripcijskimi faktorji (Hogenesch in sod. 1998).

V študiji, v kateri so miške izpostavili necirkadianim fotoperiodam dolgim 22 do 26 ur, so imele le-te slabo preživelost mladičev (Endo in sod. 1989).

### **2.3.7 Cirkadiana ura med embrionalnim razvojem**

Že nekaj let je znano, da mater med nosečnostjo otroku sporoča čas dneva in sezono leta ter da plod uporabi to informacijo za nastavitev faze svojega cirkadianega ritma. Plod dobi informacijo preko časa hranjenja matere in z materinim melatoninom. Otrok je sposoben sinteze melatonina šele po rojstvu. Materin melatonin deluje na SCN ploda, ostali materini humoralni in metabolni signali, ki prehajajo placento, pa delujejo na plodove periferne oscilatorje (Seron-Ferre in sod. 2007).

Poskusi so pokazali, da oocita izraža vse gene *clock*, po oploditvi pa se izražanje le-teh zmanjša do faze blastociste, ko se izražanje spet obnovi. Kaj se dogaja med to fazo in vse do ugnezditev še ni dobro proučeno (Seron-Ferre in sod. 2007).

## 2.4 PORUŠENI CIRKADIANI RITMI IN VPLIV NA REPRODUKCIJO

Miler in njegova raziskovalna skupina (Miller in sod. 2004) so proučevali reprodukcijo mišk s *clock*<sup>A19</sup> mutacijo. Ugotovili so, da mutacija zmoti estrogenski cikel in vpliva na vzdrževanje nosečnosti.

Za mutirane miške so bili značilni:

- podaljšani in neredni estrogenski cikli,
- pomanjkanje koordiniranega LH vala,
- povečana absorpcija ploda,
- večji delež neuspešnih nosečnosti,
- nekoordinirano izločanje hormonov v hipotalamusu in
- kadar so bile v stalni temi, so imele več neuspešnih nosečnosti.

Bunger s sodelavci (Bunger in sod. 2000) ter Alvarez s sodelavci (Alvarez in sod. 2008) so proučevali miške brez gena *bmal-1* (*bmal-1* KO miške).

Za *bmal-1* KO miške je bila značilna:

- porušena vedenjska ritmičnost,
- izguba ritmičnega izražanja genov v SCN in perifernih tkivih,
- neplodnost (samčkov in samičk),
- izguba hormonskega ravnovesja, kar je vodilo do manjših testisov in semenskih mešičkov, nizkega števila spermijev (70-odstotkov manjše kot pri kontrolah) in
- pri samčkih manj testosterona in folikle-stimulirajočega hormona.

Bunger in Alvarez s sodelavci sta po dodatnih poskusih so zaključila, da BMAL-1 v Leydigovih celicah testisov pospeši sintezo testosterona.

## 2.5 VPLIV POLIMORFIZMOV V GENIH *CLOCK*

Raziskovalci so pri ljudeh odkrili mnoge polimorfizme v genih *clock*. Nekateri med njimi so že bili povezani z vedenjskimi spremembami (spalno-nočnih ritmov), nedavne raziskave pa so odkrile tudi povezave med omenjenimi polimorfizmi in reproduktivnim zdravjem.

Do sedaj opravljene raziskave so pokazale, da so polimorfizmi v genu *clock* povezani z diurnalno nagnjenostjo (jutranji oz. večerni tip človeka) (Katzenberg in sod. 1998; Mishima in sod. 2005), sindromom zapoznele faze spanja (Iwase in sod. 2002), metabolnim sindromom in debelostjo (Scott in sod. 2008).

Polimorfizmi v genu *bmal-1* pa so povezani z bipolarno motnjo (Nievergelt in sod. 2006), diabetesom tipa 2 in hipertenzijo (Woon in sod. 2007). Kovanen je s sodelavci nedavno objavil študijo, v kateri so povezali polimorfizme v genu *bmal-1* z reprodukcijo in plodnostjo v različnih letnih časih. Enega izmed proučevanih polimorfizmov so povezali tudi s povečanim številom spontanih splavov (Kovanen in sod. 2010).

## 2.6 SNP IN ASOCIACIJSKE ŠTUDIJE

Ljudje se razlikujemo le v 1-odstotku zaporedja DNA. 90-odstotkov te genetske variabilnosti predstavljajo polimorfizmi posameznih nukleotidov (SNP, ang. »single nucleotide polymorphism«).

SNP je zamenjava enega nukleotida v zaporedju DNA na določenem mestu v genomu. Da variacijo označimo kot SNP, mora biti prisotna vsaj v 1-odstotku populacije (pojavi se v vsaj enem genomu od stotih). V povprečju se SNP pojavijo na vsakih 100 do 300 baznih parov. Lahko so prisotni v kodirajoči ali nekodirajoči regiji gena. Veljajo za evolucijsko zelo stabilne, iz generacije v generacijo se ne spreminjajo veliko, zato jih je v populacijskih študijah enostavno slediti.

Ker se razlikujemo le v 1-odstotku zaporedja DNA obstaja velika verjetnost, da ta genetska variabilnost v DNA vpliva na dovzetnost posameznika za bolezni, na odgovor posameznika na različna zdravila in na odziv posameznika na različne okoljske dejavnike.

Ker je nastanek kompleksnih bolezni običajno poligenski, SNP-ji v posameznih genih niso absolutni indikatorji dovzetnosti za razvoj posamezne kompleksne bolezni.

HapMap je projekt, ki združuje informacije o genetski variabilnosti med posamezniki. V zadnji fazi analize so ocenili, da je v človeški populaciji najmanj 10 milijonov SNP. Številka še ni dokončna, saj se z večanjem števila vzorcev za analizo, večja tudi število novo odkritih SNP (SNP Fact Sheet, 2008).

Za proučevanje vpliva izbranega polimorfizma na pojav bolezni uporabljamo asociacijske študije. V študiji primerjamo frekvence genotipov bolnikov s frekvencami genotipov zdravih ljudi. DNA bolnikov in ljudi zdrave kontrolne skupine genotipiziramo za polimorfizme, ki so blizu gena, za katerega vemo ali predvidevamo, da je vpleten pri razvoju bolezni. Odkrivanje vedno novih polimorfizmov kaže na to, da je izmed vseh težko izbrati ravno značilnega. Pri asociacijski študiji moramo biti pozorni pri izbiri kandidatnih genov in polimorfizmov, zagotoviti moramo dovolj veliko število bolnikov in zdravih ljudi za kontrolo (da zagotovimo statistično moč). Pozorni moramo biti na možen pojav stratifikacije populacije (pri tej populaciji proučevani gen izvira iz enega sorodnika, ki se je naselil na tem področju v preteklosti) (Daly in Day, 2001), sicer obstaja možnost napačno pozitivnih (ali negativnih) rezultatov.

### 3 PREISKOVANCI IN METODE

#### 3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo je bilo vključenih 81 parov, ki so imeli tri ali več spontanih splavov. Vključitveni kriteriji za izbor bolnikov so bili normalen kariotip, odsotnost motenj endokrinega sistema ali presnove (tudi sladkorne bolezni), odsotnost avtoimunskih in drugih sistemskih bolezni, ter odsotnost predhodne venske ali arterijske tromboze in anatomskih nepravilnosti maternice. V raziskavo smo vključili tudi 75 zdravih parov, ki so se starostno ujemali z bolniki. Zdravi pari so imeli najmanj dva živorojena otroka in v preteklosti niso imeli spontanega splava ali drugih zapletov pri nosečnosti. Vsi bolniki in kontrolni pari so bili iz Slovenije. Preiskovancem so v epruvete z antikoagulantom iz komolčne vene odvzeli 3 ml krvi.

Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije. Preiskovanci so svoje sodelovanje v raziskavi potrdili pisno.

Preglednica 2: Značilnosti RSA-parov

	RSA-ženske	RSA-moški
<b>Povprečna starost [leta]</b> (mediana vrednost)	23-46 (33)	23-54 (34)
<b>Število spontanih splavov</b>		
3	74 (91.4%)	
4	4 (4.9%)	
5	2 (2.5%)	
10	1 (1.2%)	
<b>Čas spontanega splava</b>		
1. trimester	284 (92%)	
2. trimester	25 (8%)	

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Izolacija DNA

Iz odvzete krvi smo izolirali DNA s kompletom FlexiGene DNA Kit (QIAGEN, Nemčija) in z aparaturo QuickGene 610-L (FUJIFILM, Japan).

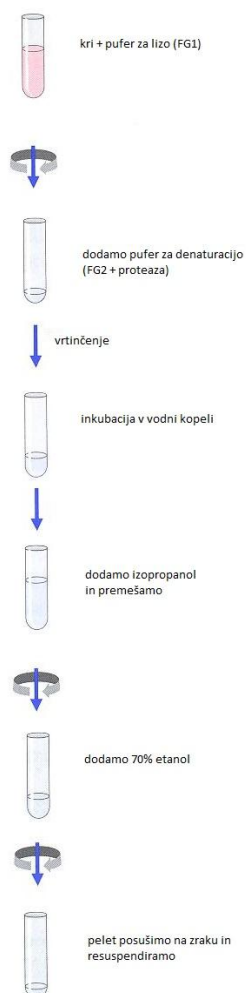
#### 3.2.1.1 Izolacija s kompletom »FlexiGene DNA kit«

DNA smo s kompletom FlexiGene DNA Kit izolirali iz 3 ml krvi po sledečem protokolu:

1. zmrznjeno kri smo najprej hitro odtalili v vodni kopeli (37°C);
2. za vsake 3 ml krvi smo zmešali 5 ml pufra FG2 in 50 µl QIAGEN proteaze;
3. v 50 ml centrifugirko smo odpipetirali 25 ml pufra FG1, dodali 10 ml krvi in 5x premešali z obračanjem;
4. mešanico smo centrifugirali 13 minut pri 3200 obratih/min in 25°C;
5. supernatant smo zavrgli. Centrifugirko smo, obrnjeno navzdol, postavili na vpojni papir in pustili 2 minuti, da se je pelet osušil;
6. dodali smo 5 ml mešanice pufra FG2 in QIAGEN proteaze, ki smo ju pripravili na začetku. Pripravljeno mešanico smo takoj premešali na vibracijskemu mešalniku, dokler se pelet ni popolnoma resuspendiral (približno 5 sekund);
7. vsebino centrifugirke smo premešali z obračanjem 3x in za 10 minut postavili v vodno kopel (65°C);
8. dodali smo 5 ml 100% izopropanola in mešali z obračanjem, dokler oborjena DNA ni postala vidna;
9. nato smo centrifugirali 13 minut pri 3200 obratih in 25°C;
10. supernatant smo zavrgli in centrifugirko, obrnjeno navzdol, postavili na vpojni papir in pustili 2 minuti, da se je pelet osušil;
11. dodali smo 5 ml 70% etanola in mešali 5 sekund, dokler oborjena DNA ni postala vidna;
12. nato smo centrifugirali 13 minut pri 3200 obratih in 25°C;

13. supernatant smo zavrgli in centrifugirko, obrnjeno navzdol, postavili na vpojni papir in pustili 2 minuti, da se je pelet osušil;
14. pelet DNA smo posušili na zraku, dokler ni izhlapel ves etanol (približno 5 minut);
15. dodali smo 0,8 ml pufra FG3, premešali 5 sekund in 1 uro inkubirali v vodni kopeli (65°C), da se je DNA raztopila.

Postopek izolacije DNA je prikazan na sliki 6.



Slika 6 : Postopek izolacije DNA s kompletom FlexiGene DNA Kit (modificirano po viru: QIAGEN FlexiGene DNA Handbook: 8)

Vzorci izolirane DNA smo shranili pri -30°C (QIAGEN FlexiGene DNA Handbook).

### 3.2.1.2 Izolacija z aparaturom QuickGene-610L

Aparatura QuickGene-610L (Fuji Photo Film Co., Japonska) omogoča istočasno izolacijo šestih vzorcev krvi v 12 minutah. Za izolacijo DNA se uporabljata patentirana porozna membrana in filtracija pod pritiskom.



Slika 7: Aparat QuickGene-610L (vir: Avtomatski sistemi za ..., 2011 )

DNA smo izolirali po naslednjem protokolu:

1. v prazno 15 ml centrifugirko smo dodali 300  $\mu$ l raztopine EDB, ki vsebuje proteazo;
2. nato smo dodali 2 ml krvi in takoj zatem 2,5 ml LDB (pufer za lizo celic). Mešanico smo 10x premešali z obračanjem, nato pa z vibracijskim mešalnikom 15 sekund pri najvišji hitrosti mešanja;
3. vzorec smo inkubirali 5 minut v vodni kopeli (56°C) in nato dodali 2,5 ml 100% etanola. Mešanico smo 10x premešali z obračanjem, nato mešali še 15 sekund z vibracijskim mešalnikom, pri najvišji hitrosti mešanja;
4. preostanek izolacije smo opravili z aparatom. Lizat smo prenesli v zbirne posodice aparata QuickGene-610L. Aparat je sam avtomatsko do vzorcev dovajal potrebno količino pufru za izpiranje WDB in elucijskega pufru CDB. Na koncu izolacije se je DNA zbrala v 1,5 ml epicah, odpadni material pa v odpadnih posodicah. S pomočjo aparata smo izolirali 30-80  $\mu$ g genomske DNA posameznega vzorca (Fujifilm Life Science handbook, Ver.1.2, Japonska).



### 3.3 PRIPRAVA RAZTOPIN VZORČNIH DNA

Izoliranim vzorcem DNA smo pred začetkom verižne reakcije s polimerazo (PCR) izmerili koncentracijo in preverili čistost. Za izvedbo reakcije je pomembno, da je imajo vzorci DNA enako koncentracijo. Za merjenje koncentracije smo uporabili spektrofotometer GeneQuant™ 1300 (GE Healthcare, Anglija).

Čistost izolata smo ocenili z meritvijo razmerja absorbc pri 260 in 280 nm. Vodne raztopine DNA smo redčili v razmerju 1:50 (2  $\mu$ l DNA + 98  $\mu$ l visokoprečiščene vode za redčenje), izmerili absorbance vzorcev pri 260 in 280 nm in določili razmerje absorbc  $A_{260/280}$ . Priporočljiva vrednost  $A_{260/280}$  je med 1,8 in 2,0. Vrednosti nižje od 1,8 nakazujejo prisotnost večje količine proteinov, vrednosti višje od 2,0 pa prisotnost RNA.

Pripravljene raztopine smo na osnovi izmerjenih koncentracij redčili do končne koncentracije 3 ng/ $\mu$ l.

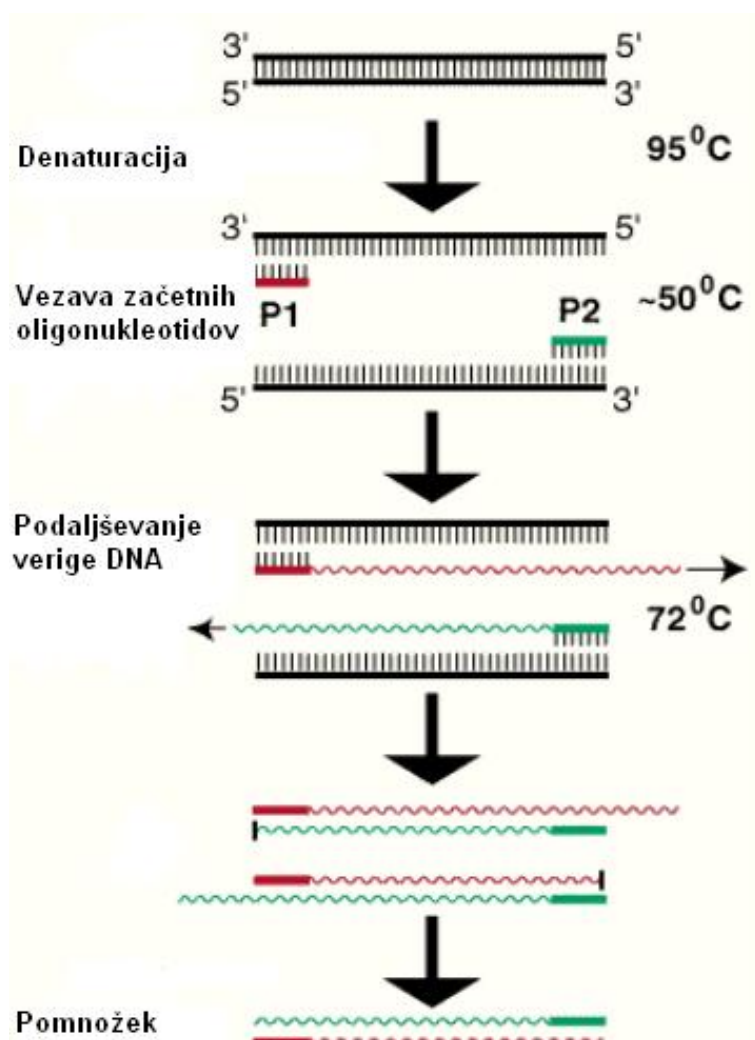
### 3.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda za sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko iz majhne količine DNA sintetiziramo veliko število izvodov v zelo kratkem času.

Za izvedbo PCR potrebujemo reakcijsko zmes, ki mora vsebovati:

- vzorec DNA (matrica),
- začetna oligonukleotida (z njima omejimo odsek, ki ga želimo pomnožiti),
- deoksinukleozid-trifosfate (dNTP) (so gradniki za nove verige DNA),
- magnezijeve ione,
- reakcijski puffer,
- termostabilno DNA-polimerazo.

Reakcija poteka ciklično, vsak cikel je sestavljen iz več stopenj (slika 8). V stopnji denaturacije s segrevanjem na 94 - 95 °C razklenemo verigi DNA ter tako iz dvoverižne DNA dobimo dve enoverižni DNA. Sledi faza prileganja začetnih oligonukleotidov na enoverižni verigi DNA, ki poteka pri 40 - 60 °C. Zatem temperaturo dvignemo na 72 °C, ki je optimalna za delovanje termostabilne DNA-polimeraze. Encim se veže na začetni oligonukleotid in v smeri 5' → 3' izgradi komplementarno verigo DNA. DNA, ki nastane v prvem ciklu, služi kot dodatna matrica za izgradnjo novih verig v naslednjem ciklu. Običajno število ciklov je od 20 do 40 (Arko 2004).



Slika 8: Potek PCR (modificirano po viru: CGDP - DNA Amplification, 2005)

### 3.4.1 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

PCR v realnem času (rtPCR) predstavlja nadgradnjo konvencionalnega PCR. Omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med reakcijo. Pomnoževanje in detekcija potekata istočasno. Metoda temelji na merjenju fluorescence in omogoča lažjo kvantifikacijo nukleinskih kislin (Arko, 2004).

#### 3.4.1.2 Detekcija produktov verižne reakcije s polimerazo v realnem času

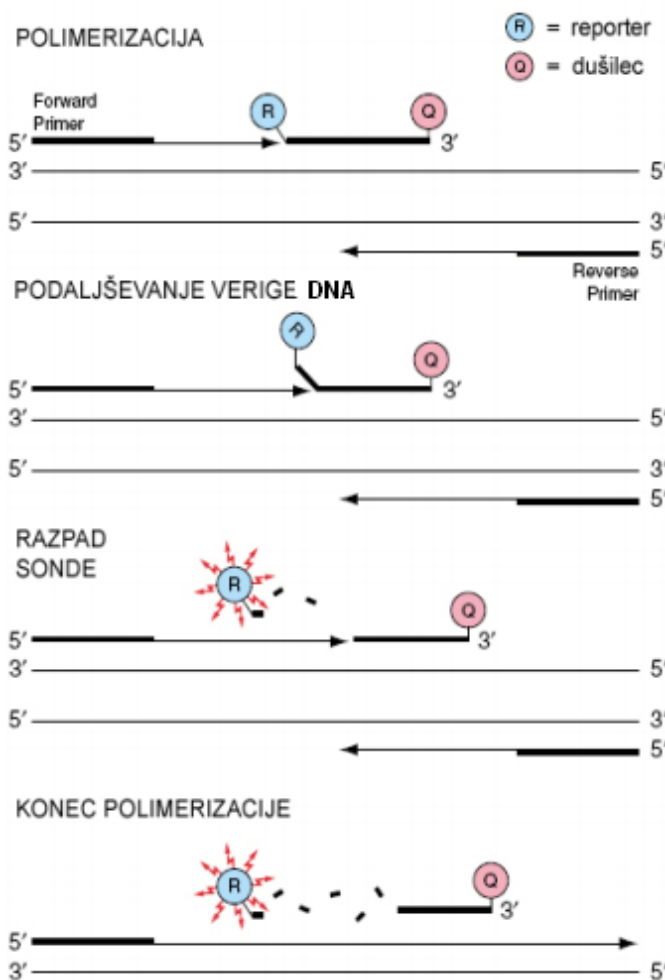
Načinov za detekcijo produktov s PCR v realnem času je več, lahko pa jih, glede na to ali lahko z njimi zaznamo samo specifični produkt ali tudi morebitno prisotne nespecifične produkte, razdelimo v dve skupini.

Med nespecifične načine uvrščamo detekcijo s fluorescentnimi barvili, ki se nespecifično vgradijo v dvoverižno DNA. Primer je etidijev bromid, ki pa ga je nadomestil SYBR® Green I. Slednji ima v prosti obliki nezaznavno fluorescenco, če pa se vgradi v dvoverižno DNA, po eksitaciji močno fluorescira. V stopnji prileganja začetnih oligonukleotidov (enoverižna DNA) barvilo ne fluorescira, v stopnji podaljševanja pa se vgradi v dvoverižno DNA in fluorescira. Intenziteta fluorescence je sorazmerna s količino nastale dvoverižne DNA.

Specifične načine detekcije omogočajo s fluorofori označeni oligonukleotidi (sonde), ki se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. V ta namen uporabljamo dva fluorofora, katerih emisijski in eksitacijski spekter se prekrivata. Ko sta fluorofora dovolj blizu, povzroči vzburljenje donorskega barvila sevanje svetlobe, ki vzburi akceptorsko barvilo, to pa posledično seva svetlobo druge valovne dolžine. Kot sprejemnike uporabljamo molekule, ki absorbirajo svetlobo donorske molekule, same pa ne fluorescirajo. Najpogosteje se uporabljajo hidrolizirajoče sonde, hibridizacijske sonde in molekularna svetila (Arko, 2004).

### 3.4.1.3 Hibridizirajoče sonde TaqMan®

Te sonde imajo na enem koncu vezano reportersko barvilo, ki fluorescira, in na drugem dušilec, ki to svetlobo prestreza. Specifično prepoznajo tarčno zaporedje na DNA in se vežejo nanj. Pri njih izkoriščamo 5' - eksonukleazno aktivnost DNA-polimeraze, ki med potekom reakcije PCR sondo (vezano na specifično tarčno zaporedje) razgradi. Razgrajena sonda fluorescira, ker pride do povečanja razdalje med reporterskim barvilom in dušilcem. Jakost fluorescence reporterskega barvila je sorazmerna količini nastalega produkta PCR (Slika 9) (Arko, 2004).



Slika 9: Potek reakcije PCR v realnem času in detekcija produktov PCR s sondami TaqMan® (modificirano po viru: AB TaqMan® Gene ..., 2011)

#### 3.4.1.4 Uporaba sond TaqMan® za alelnu diskriminacijo – genotipizacijo

Za genotipizacijo uporabljamo en par sond za vsak polimorfizem. Pri vsakem paru ima ena sonda na 5' koncu vezano fluorescentno reportersko barvilo FAM, druga sonda fluorescentno reportersko barvilo VIC, na 3' koncu pa imata obe vezani dušilec. Sondi se razlikujeta v enem baznem paru, tako da ustreza ena izmed sond mutiranemu zaporedju (alel 1), druga pa nemutiranemu zaporedju (alel 2). Ko sta sonde intaktni, neposredna bližina dušilca prepreči fluorescenco reporterja in zato fluorescence ne zaznamo. Ob vezavi sonde na ustrezno zaporedje in porastu fluorescence reporterskega barvila lahko ugotovimo, ali je polimorfizem prisoten ali ne (TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol). V naši raziskavi smo za genotipizacijo uporabili System KASPar, proizvajalca KBiosciences. Sistem sestavljata mešanica začetnih oligonukleotidov (ang. »Assay Mix«), specifičnih za polimorfizem ki ga analiziramo in reakcijska mešanica (ang. »Reaction Mix«), ki vključuje vse ostale komponente, potrebne za potek PCR-reakcije ter fluorescenčni poročevalski sistem.

### 3.5 GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMOV V GENIH *CLOCK* IN *BMAL-1*

Za vse vzorce smo v delovni komori pripravili skupno reakcijsko zmes, ki ni vsebovala vzorčne DNA. Posebno smo bili previdni s sondami, saj so občutljive na svetlobo in toploto, zato smo jih pred samo uporabo hranili na temnem v zamrzovalniku in jih odmrznili neposredno pred uporabo. Reakcijski zmesi pri obeh polimorfizmih sta se razlikovali le v uporabljenih sondah. Sestava reakcijske zmesi za en vzorec je podana v preglednici 3, sestava mešanice začetnih oligonukleotidov pa v preglednici 4.

Preglednica 3: Sestava reakcijske zmesi za rtPCR

<b>Reagent</b>	<b>volumen za en vzorec (µl)</b>
2x reakcijska mešanica	4.00
mešanica začetnih oligonukleotidov	0.11
prečiščena H <sub>2</sub> O	0.89
DNA	3
skupaj	8

Preglednica 4: Sestava mešanice začetnih oligonukleotidov

<b>Reagent</b>	<b>koncentracija v mešanici (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>volumen v mešanici (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
alelno specifičen začetni oligonukleotid 1 (100 $\mu\text{M}$ )	12	12
alelno specifičen začetni oligonukleotid 2 (100 $\mu\text{M}$ )	12	12
povratni začetni oligonukleotid (100 $\mu\text{M}$ )	30	30
H <sub>2</sub> O / Tris-HCl (10mM, pH 8.3)	-	46
skupaj		100

Predhodno pripravljene vzorčne raztopine DNA (koncentracija približno 3 ng/ $\mu\text{l}$ ) smo odpipetrirali v mikrotitrne plošče s 96-imi vdolbinicami, nato pa dodali pripravljeno reakcijsko zmes. Ploščo z reakcijsko zmesjo in vzorčno DNA, smo prekrili s samolepilno folijo ter jo centrifugirali 4 minute pri 2100 obratih/min. Nato smo jo vstavili v ciklični termostat ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Preglednice 5 do 7).

Preglednica 5: Razmere za izvedbo reakcije rtPCR (ciklizacija)

<b>stopnja PCR</b>	<b>temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>čas</b>	
začetna denaturacija	94	15 min	
denaturacija	94	10 s	37 ponovitev
vezava začetnih oligonukleotidov	57/61	20 s	
podaljševanje verige	72	40 s	

Preglednica 6: Razmere reciklizacije reakcije rtPCR

<b>stopnja PCR</b>	<b>temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>čas</b>	
reciklizacija	94	10 s	
	60	60 s	ponovitev 2x

Preglednica 7: Razmere rtPCR za posamezen SNP

SNP	količina začetnih oligonukleotidov/en vzorec DNA [ $\mu$ l]	količina $MgCl_2$ [mM]	temperatura vezave začetnih oligonukleotidov [ $^{\circ}C$ ]
rs3789327	0,11	2.2	57
rs4757144	0,11	2.2	57
rs1481892	0,11	1.8	61
rs12363415	0,11	2.2	57
rs6850524	0,11	1.8	61
rs11932595	0,11	2.2	57
rs6811520	0,11	1.8	57
rs13124436	0,11	2.2	57

Preglednica 8: Značilnosti sond TaqMan®

	reportersko barvilo (na 5' koncu)	dušilec (na 3' koncu)
sonda 1	VIC	NFQ
sonda 2	FAM	NFQ

Preglednica 9: Specifične sonde TaqMan®

gen	SNP	specifična sonda za posamezen nukleotid	
		FAM	VIC
<i>bmal-1</i>	rs3789327	T	C
<i>bmal-1</i>	rs4757144	A	G
<i>bmal-1</i>	rs1481892	C	G
<i>bmal-1</i>	rs12363415	A	G
<i>clock</i>	rs6850524	C	G
<i>clock</i>	rs11932595	A	G
<i>clock</i>	rs6811520	C	T
<i>clock</i>	rs13124436	A	G

Legenda preglednice 9: Divji tip nukleotida je obarvan zeleno

### 3.6 STATISTIČNE METODE

Za razmerje genotipov v veliki populaciji, kjer se osebki naključno razmnožujejo, ni selekcije vzorcev, dodatnih mutacij in migracij, velja Hardy-Weinberg-ovo načelo. To načelo pravi, da se pogostost posameznih genotipov med generacijami ohranja. Če je relativna frekvenca genotipov v 1. in 2. generaciji enaka, potem je populacija v Hardy-Weinbergovem ravnotežju (Mueller, Young 1998). Za oceno deviacije od Hardy-Weinbergovega ravnovesja smo uporabili  $\chi^2$  test. Za populacijo s p-vrednostjo večjo od 0,5 smo smatrali, da je v Hardy-Weinbergovem ravnovesju.

Upravljanje s podatki in statističe analize smo opravili s programskim paketom SPSS 19.0. Vse statistične analize smo opravili ločeno za 3 skupine RSA-ženske in ženske iz kontrolne skupine, RSA-moški in moški iz kontrolne skupine ter RSA-pari in kontrolni pari.

Frekvence genotipov ter alelov bolnikov in kontrol smo primerjali z uporabo Pearson  $\chi^2$  (hi-kvadrat) testa t.j. Fisherjev test natančnosti. Za vsak SNP smo izračunali razlike med frekvencami alelov in genotipov RSA-bolnikov ter kontrol v treh genetskih modelih (dominantnem, recesivnem in kodominantnem) ter njihovo značilnost in razmerja obetov s 95% intervalom zaupanja (OR ang. »odds ratio«, CI ang. »confidence interval«). Kot statistično značilno smo smatrali p-vrednost manjšo od 0,05.



## 4 REZULTATI

Pogostost posameznih genotipov pacientov in kontrol je bila pri vseh osmih polimorfizmih v skladu s Hardy-Weinberg-ovim načelom.

Pri analizi RSA parov se je kot statistično značilna izkazala povezava štirih polimorfizmov, od osmih preiskovanih.

Pri polimorfizmu rs3789327 v genu *bmal-1* smo s statističnim izračunom z recesivnim genetskim modelom za alel C ugotovili signifikantno višjo frekvenco genotipov CC pri bolnikih ( $p=0.048$ , OR= 1.84), iz česar sklepamo, da alel C deluje rizično v recesivni obliki. Povezavo smo potrdili tudi pri primerjavi alelnih frekvenc ( $p=0.018$ , OR=1.46).

Pri polimorfizmu rs4757144 v genu *bmal-1* smo s statističnim izračunom z dominantnim genetskim modelom za alel A ugotovili signifikantno višjo frekvenco genotipov AA in AG pri bolnikih ( $p=0.039$ , OR=1.67), iz česar sklepamo, da alel A deluje rizično v dominantni obliki. Povezavo smo potrdili tudi pri primerjavi alelnih frekvenc ( $p=0.041$ , OR=1.40).

Pri polimorfizmu rs6850524 v genu *clock* smo ugotovili, da je v skupini bolnikov značilno več nosilcev vsaj enega alela G ( $p=0.003$ , OR=0.39) kot pri kontrolnih vzorcih, iz česar sklepamo, da genotipa GG in GC delujeta kot rizična.

Pri polimorfizmu rs6811520 v genu *clock* smo ugotovili, da je v skupini bolnikov značilno več nosilcev vsaj enega alela C ( $p=0.004$ , OR=2.90) kot pri kontrolnih vzorcih, iz česar sklepamo, da genotipa CC in CT delujeta kot rizična.

Preglednica 10: Statistični izračuni genotipskih in alelnih frekvenc (skupno)

skupno	aleli	genotipi % (število)			recesivni model		dominanten model		aleli		p-vrednost	OR	HW p-vrednost		
		1	2	11	12	22	p-vrednost	OR	p-vrednost	OR				1	2
<i>bmal-1</i>	rs3789327	C	T	23,7 % (41)	50,3 % (87)	26,0 % (45)	0.048	1.835 (1.04-3.25)	0.071	1.567 (0.98-2.52)	0,49	0,51	0.018	1.464 (1.07-2.00)	0,93
<i>bmal-1</i>	rs4757144	A	G	32,37 % (56)	43,35 % (75)	24,28 % (42)	0.273	1.34 (0.83-2.17)	0.039	1.67 (1.03-2.70)	0,54	0,46	0.041	1.396 (1.03-1.90)	0,09
<i>bmal-1</i>	rs1481892	C	G	12,14 % (21)	41,04 % (71)	46,82 % (81)	0.27	1.612 (0.77-3.40)	0.824	0.944 (0.61-1.46)	0,33	0,67	0.736	1.067 (0.77-1.49)	0,38
<i>bmal-1</i>	rs12363415	A	G	73,99 % (128)	25,43 % (44)	0,58 % (1)	0.9	1.051 (0.64-1.72)	0.601	2.293 (0.21-2.55)	0,87	0,13	0.819	1.074 (0.69-1.68)	0,17
<i>clock</i>	rs6850524	C	G	9,83 % (17)	51,45 % (89)	38,73 % (67)	0.0034	0.393 (0.21-0.74)	1	1.004 (0.64-1.57)	0,36	0,64	0.125	0.779 (0.57-1.07)	0,11

gen	SNP	aleli		genotipi % (število)			recesivni model		dominanten model		aleli		P-vrednost	OR	HW p-vrednost
		1	2	11	12	22	P-vrednost	OR	P-vrednost	OR	1	2			
<i>clock</i>	rs11932595	A	G	27,17 % (47)	54,91 % (95)	17,92 % (31)	0,094	0,658 (0,41-1,05)	0,405	1,27 (0,74-2,20)	0,55	0,45	0,527	0,899 (0,66-1,23)	0,16
<i>clock</i>	rs6811520	C	T	45,09 % (78)	48,55 % (84)	6,36 % (11)	0,738	0,912 (0,59-1,41)	<b>0,00443</b>	2,899 (1,38-6,11)	0,69	0,31	0,314	1,195 (0,86-1,66)	0,06
<i>clock</i>	rs13124436	A	G	11,56 % (20)	45,09 % (78)	43,35 % (75)	1	0,973 (0,49-1,92)	0,076	1,491 (0,96-2,31)	0,34	0,66	0,206	1,25 (0,90-1,74)	0,97

Legenda preglednice 10: SNP = polimorfizem posameznih nukleotidov, OR = razmerja obetov, HW p-vrednost = p-vrednost za oceno odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja, genotip 11 = homozigot za alel 1, genotip 12 = heterozigot (ima alela 1 in 2), genotip 22 = homozigot za alel 2

Pri analizi vzorcev žensk se je kot statistično značilna izkazala povezava dveh polimorfizmov, obeh v genu *bmal-1*. Pri polimorfizmu rs3789327 imajo ženske RSA bolnice statistično značilno višjo frekvenco genotipa CC ( $p=0.035$ ,  $OR=2.64$ ) v primerjavi z ženskimi kontrolami, iz česar sklepamo, da genotip CC deluje rizično. Pri polimorfizmu rs4757144 smo s statističnim izračunom z dominantnim genetskim modelom za alel A ugotovili, da je v skupini bolnic značilno več nosilk vsaj enega alela A ( $p=0.005$ ,  $OR=2.61$ ) kot pri kontrolnih vzorcih, iz česar sklepamo, da alel A deluje kot rizičen. Povezavo smo potrdili tudi pri primerjavi alelnih frekvenc ( $p=0.032$ ,  $OR= 1.64$ ).

Preglednica 11: Statistični izračuni genotipskih in alelnih frekvenc (ženske)

gen	SNP	aleli		genotipi % (število)			recesivni model		dominanten model		aleli		P-vrednost	OR	HW p-vrednost
		1	2	11	12	22	P-vrednost	OR	P-vrednost	OR	1	2			
<i>bmal-1</i>	rs3789327	C	T	23,46 % (19)	51,85 % (42)	24,69 % (20)	<b>0,035</b>	2,643 (1,08-6,47)	0,225	1,555(0,78-3,11)	0,49	0,51	0,0542	1,571 (1,00-2,46)	0,74
<i>bmal-1</i>	rs4757144	A	G	32,10 % (26)	40,74 % (33)	27,16 % (22)	0,864	1,11 (0,57-2,18)	<b>0,00525</b>	2,613 (1,35-5,07)	0,52	0,48	<b>0,0324</b>	1,638 (1,05-2,56)	0,09
<i>bmal-1</i>	rs1481892	C	G	14,81 % (12)	40,74 % (33)	44,44 % (36)	0,477	1,5 (0,58-3,89)	0,633	1,218 (0,65-2,28)	0,35	0,65	0,403	1,236 (0,77-1,98)	0,34
<i>bmal-1</i>	rs12363415	A	G	67,90 % (55)	32,10 % (26)	0 % (0)	0,378	0,693 (0,35-1,39)	0,236	1,027 (0,99-1,07)	0,84	0,16	0,636	0,826 (0,44-1,54)	0,09
<i>clock</i>	rs6850524	C	G	12,35 % (10)	50,62 % (41)	37,04 % (30)	0,277	0,582 (0,24-1,39)	0,259	1,493 (0,79-2,82)	0,38	0,62	0,817	1,057 (0,67-1,67)	0,48
<i>clock</i>	rs11932595	A	G	29,63 % (24)	55,56 % (45)	14,81 % (12)	0,611	0,826 (0,42-1,62)	0,16	1,884 (0,84-4,20)	0,57	0,43	0,657	1,123 (0,72-1,75)	0,22

gen	ženske SNP	aleli		genotipi % (število)			recesivni model		dominanten model		aleli		P-vrednost	OR	HW p-vrednost
		1	2	11	12	22	P-vrednost	OR	P-vrednost	OR	1	2			
<i>clock</i>	rs6811520	C	T	45,68 % (37)	44,44 % (36)	9,88 % (8)	0.208	0.665 (0.36-1.25)	0.8	1.208 (0.44-3.31)	0.68	0.32	0.462	0.819 (0.51-1.33)	0,86
<i>clock</i>	rs13124436	A	G	12,35 % (10)	41,98 % (34)	45,68 % (37)	0.804	1.215 (0.45-3.26)	0.426	1.354 (0.72-2.53)	0.33	0.67	0.395	1.25 (0.78-2.02)	0,62

Legenda preglednice 11: SNP = polimorfizem posameznih nukleotidov, OR = razmerja obojev, HW p-vrednost = p-vrednost za oceno odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja, genotip 11 = homozigot za alel 1, genotip 12 = heterozigot (ima alela 1 in 2), genotip 22 = homozigot za alel 2

Pri analizi vzorcev moških se je kot statistično značilna izkazala povezava dveh polimorfizmov, obeh v genu *clock*. Pri polimorfizmu rs6850524 smo s statističnim izračunom z dominantnim genetskim modelom za alel G ugotovili, da je v skupini bolnikov značilno več nosilcev vsaj enega alela G ( $p=0.004$ ,  $OR=0.26$ ) kot pri kontrolnih vzorcih, iz česar sklepamo, da alel G deluje kot rizičen. Povezavo smo potrdili tudi pri primerjavi alelnih frekvenc ( $p=0.018$ ,  $OR=0.58$ ). Pri polimorfizmu rs6811520 smo s statističnim izračunom z dominantnim genetskim modelom za alel C ugotovili, da je v skupini bolnikov značilno več nosilcev vsaj enega alela C ( $p=0.0003$ ,  $OR=8.05$ ) kot pri kontrolnih vzorcih, iz česar sklepamo, da alel C deluje kot rizičen. Povezavo smo potrdili tudi pri primerjavi alelnih frekvenc ( $p=0.028$ ,  $OR=1.70$ ).

Preglednica 12: Statistični izračuni genotipskih in alelnih frekvenc (moški)

gen	moški SNP	aleli		genotipi % (število)			recesivni model		dominanten model		aleli		P-vrednost	OR	HW p-vrednost
		1	2	11	12	22	P-vrednost	OR	P-vrednost	OR	1	2			
<i>bmal-1</i>	rs3789327	C	T	23,91 % (22)	48,91 % (45)	27,17 % (25)	0.454	1.369 (0.65-2.91)	0.183	1.597 (0.83-3.08)	0.48	0.52	0.185	1.367 (0.88-2.11)	0,84
<i>bmal-1</i>	rs4757144	A	G	32,61 % (30)	45,65 % (42)	21,74 % (20)	0.17	1.651 (0.82-3.31)	0.85	0.900 (0.42-1.91)	0.55	0.45	0.508	1.179 (0.77-1.82)	0,47
<i>bmal-1</i>	rs1481892	C	G	9,78 % (9)	41,30 % (38)	48,91 % (45)	0.388	1.925 (0.57-3.52)	0.352	0.736 (0.39-1.36)	0.3	0.7	0.812	0.93 (0.58-1.48)	0,81
<i>bmal-1</i>	rs12363415	A	G	79,35 % (73)	19,57 % (18)	1,09 % (1)	0.21	1.595 (0.79-3.24)	1	0.989 (0.97-1.01)	0.89	0.11	0.323	1.409 (0.74-2.70)	0,93
<i>clock</i>	rs6850524	C	G	7,61 % (7)	52,17 % (48)	40,22 % (37)	0.00419	0.261 (0.10-0.66)	0.256	0.657 (0.35-1.25)	0.34	0.66	0.0182	0.581 (0.37-0.91)	0,11
<i>clock</i>	rs11932595	A	G	25,00 % (23)	54,35 % (50)	20,65 % (19)	0.066	0.529 (0.27-1.03)	0.846	0.882 (0.41-1.90)	0.52	0.48	0.184	0.727 (0.47-1.13)	0,39

gen	moški SNP	aleli		genotipi % (število)			recesivni model		dominanten model		aleli		p-vrednost	OR	HW p-vrednost
		1	2	11	12	22	P-vrednost	OR	P-vrednost	OR	1	2			
<i>clock</i>	rs6811520	C	T	44,57 % (41)	52,17 % (48)	3,26 % (3)	0.529	1.275 (0.69-2.37)	<b>0.000345</b>	8.045 (2.25-28.83)	0.71	0.29	<b>0.028</b>	1.696 (1.08-2.67)	0,13
<i>clock</i>	rs13124436	A	G	10,87 % (10)	47,83 % (44)	41,30 % (38)	0.64	0.793 (0.31-2.02)	0.16	1.624 (0.88-3.00)	0.35	0.65	0.412	1.244 (0.78-1.98)	0,60

Legenda preglednice 12: SNP = polimorfizem posameznih nukleotidov, OR = razmerja obetov, HW p-vrednost = p-vrednost za oceno odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja, genotip 11 = homozigot za alel 1, genotip 12 = heterozigot (ima alela 1 in 2), genotip 22 = homozigot za alel 2

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V študiji smo proučevali povezavo med variabilnostjo osmih SNP bioritmičnih genov *clock* in *bmal-1* in pojavom RSA. Do sedaj sta izbrana kandidatna gena že bila povezana z vlogo v reproduktivnem zdravju. Z vlogo v patologiji ponavljajočih spontanih prekinitev nosečnosti pa, razen gena *bmal-1* (Kovanen in sod. 2010), še niso bili povezani. Rezultati naše študije bi zato lahko prispevali k boljšemu razumevanju patogeneze RSA.

Izhodiščni predpostavki, zakaj bi lahko bili bioritmični geni vključeni v patogenezo RSA, sta bili dve. Prisotnost polimorfizmov v genomu ploda lahko vpliva na njegov razvoj in/ali ugnezditvev in bi lahko povzročila spontani splav. Ker nismo imeli splavkov, na katerih bi lahko opravili analizo prisotnosti izbranih polimorfizmov, je indirektna indikacija genotipa ploda genotip staršev, zato smo analizirali genotipe obeh partnerjev.

Ker mati z izražanjem cirkadianih genov v rodilih (jajčniki, jajcevodi in maternica) embriju sporoča čas dneva, bi lahko materino spremenjeno izražanje genov, zaradi prisotnosti specifičnega polimorfizma, vplivalo na spremenjeno izražanje bioritmičnih genov v embriju. To bi lahko motilo njegov razvoj in/ali ugnezditvev in bi povzročilo spontani splav.

Genotipizirali smo 81 parov z RSA in 75 kontrolnih parov. Povezava se je izkazala statistično značilna pri štirih polimorfizmih genov *clock* in *bmal-1*, kar kaže na možno vpletenost teh genov pri patologiji RSA v preiskovani populaciji.

V genu *clock* imajo pari z RSA pri polimorfizmu rs6850524 značilno več nosilcev vsaj enega alela G ( $p=0.003$ ,  $OR=0.39$ ), iz česar sklepamo, da genotipa GG in GC delujeta kot rizična. Pri polimorfizmu rs6811520 pa imajo RSA pari značilno več nosilcev vsaj enega alela C ( $p=0.004$ ,  $OR=2.90$ ), iz česar sklepamo, da genotipa CC in CT delujeta kot rizična.

V genu *bmal-1* imajo pari z RSA pri polimorfizmu rs3789327 signifikantno višjo frekvenco genotipov CC ( $p=0.048$ ,  $OR=1.84$ ) in alela C ( $p=0.018$ ,  $OR=1.46$ ), iz česar sklepamo, da alel C deluje rizično v recesivni obliki. Pri polimorfizmu rs4757144 pa imajo RSA signifikantno višjo frekvenco genotipov AA in AG ( $p=0.039$ ,  $OR=1.67$ ) in

alela A ( $p=0.041$ ,  $OR=1.40$ ), iz česar sklepamo, da alel A deluje rizično v dominantni obliki.

Naše raziskave se ujemajo z že objavljeno študijo, v kateri je Kovanen s sodelavci (Kovanen in sod. 2010) polimorfizem rs4757144 v genu *bmal-1* povezal s povečano nagnjenostjo k večjemu številu spontanih splavov. S tem je že drugič objavljena povezava med polimorfizmi v genu *bmal-1* in spontanimi splavi.

Zanimivi so tudi statistični podatki analize frekvenc za posamezni spol. Pri ženskah se je izkazalo, da genotip CC v polimorfizmu rs3789327 in alel A v polimorfizmu rs4757144 delujeta kot rizična faktorja za razvoj RSA. Oba statistično značilna polimorfizma sta v genu *bmal-1*.

Bunger in Alvarez sta s sodelavci že proučevala vpliv gena *bmal-1* pri KO miškah. Za *bmal-1* KO miške je bila značilna neplodnost samčkov in samičk in izguba hormonskega ravnovesja, kar je pri samčkih vodilo do manjših testisov in semenskih mešičkov ter nizkega števila spermijev (70-odstotkov manjše kot pri kontrolah) (Bunger in sod. 2000; Alvarez in sod. 2008).

Pri moških se je izkazalo, da alela G v polimorfizmu rs6850524 in C v polimorfizmu rs6811520 delujeta kot rizična alela za razvoj RSA. Oba polimorfizma sta v genu *clock*.

Miller je s sodelavci preučeval reprodukcijo *clock*<sup>Al9</sup> mutiranih mišk. Ugotovili so, da mutirane miške niso imele koordiniranega izločanja hormonov v hipotalamusu, kar je zmotilo reproduktivno funkcijo (Miller in sod. 2004). Raziskava je bila narejena samo na samičkih, vendar lahko sklepamo, da je porušeno hormonsko ravnovesje tudi pri samčkih, kar bi lahko vplivalo na pojav reproduktivnih motenj pri samčkih.

Naše ugotovitve bi bilo sicer potrebno potrditi še na večjem številu vzorcev (bolnikov in kontrol), da bi bili rezultati bolj zanesljivi. V kolikor bi imeli na razpolago splavke, bi lahko opravili analizo tudi na splavkih. Do sedaj povezanost proučevanih polimorfizmov z ekspresijo genov še ni bila raziskovana, zato bi bilo morda dobro raziskavo nadgraditi z raziskavo ekspresije.

Pridobljeni rezultati kažejo, da je variabilnost v genih *clock* in *bmal-1* povezana s pojavom ponavljajočih spontanih splavov pri ljudeh, vendar je učinek premajhen, da bi jih lahko uporabljali kot diagnostični test za oceno tveganja za RSA.

## 6 POVZETEK

Ponavljajoče spontane prekinitve nosečnosti (RSA) so kompleksen pojav, ki v povprečju doleti 1-2-odstotka parov, ki želijo donositi otroka. Kljub temu, da je s pojavom RSA že povezanih mnogo vzrokov, pri 50-odstotkih RSA še vedno ne znamo ugotoviti vzroka nastanka. Nekateri rezultati študij na živalskih modelih kažejo na velik pomen cirkadianih ritmov pri reproduktivnem zdravju. Izguba cirkadianih ritmov, zaradi nepravilnega izražanja cirkadianih genov, povzroči mnoge reproduktivne nepravilnosti, ki bi morda lahko prispevale tudi k povečanemu tveganju za razvoj RSA.

Naša raziskovalna skupina se je zato odločila proučiti pomen genetske variabilnosti bioritmičnih genov *clock* in *bmal-1* pri patologiji RSA. Proučili smo 8 različnih polimorfizmov posameznih nukleotidov v obeh genih in dobljene genotipske ter alelne frekvence primerjali s frekvencami kontrolnih vzorcev.

Genotipizirali smo 81 RSA-parov in 75 zdravih parov. Genotipizacijo smo pri vseh preiskovancih izvedli z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času s pomočjo sond TaqMan®.

Rezultati raziskave so pokazali, da je asociacija statistično značilna pri štirih od osmih preiskovanih polimorfizmov, kar kaže na možno vpletenost genov *clock* in *bmal-1* pri patologiji RSA.

V genu *clock* imajo RSA-pari pri polimorfizmu rs6850524 značilno več nosilcev vsaj enega alela G ( $p=0.003$ ,  $OR=0.39$ ), iz česar sklepamo, da genotipa GG in GC delujeta kot rizična. Pri polimorfizmu rs6811520 pa imajo RSA-pari značilno več nosilcev vsaj enega alela C ( $p=0.004$ ,  $OR=2.90$ ), iz česar sklepamo, da genotipa CC in CT delujeta kot rizična.

V genu *bmal-1* imajo RSA-pari pri polimorfizmu rs3789327 signifikantno višjo frekvenco genotipov CC ( $p=0.048$ ,  $OR=1.84$ ) in alela C ( $p=0.018$ ,  $OR=1.46$ ), iz česar sklepamo, da alel C deluje rizično v recesivni obliki. Pri polimorfizmu rs4757144 pa imajo RSA-pari signifikantno višjo frekvenco genotipov AA in AG ( $p=0.039$ ,  $OR=1.67$ ) in alela A ( $p=0.041$ ,  $OR=1.40$ ), iz česar sklepamo, da alel A deluje rizično v dominantni obliki.



Pridobljeni rezultati kažejo, da je variabilnost v genih *clock* in *bmal-1* povezana s pojavom ponavljajočih spontanih splavov pri ljudeh, vendar je učinek premajhen, da bi jih lahko uporabljali kot diagnostični test za oceno tveganja za RSA.

## SUMMARY

RSA is a complex phenomenon, affecting 1-2-percent of couples, who want to give birth to a baby. Despite the fact that RSA has been connected to many aetiological causes, we still cannot identify the actual causes of about 50-percent of RSA. Some results from animal model studies demonstrate the importance of circadian rhythms in reproductive health. Loss of circadian rhythms due to abnormal expression of circadian genes may cause several reproductive abnormalities, which might also contribute to increased appearance of RSA.

We have therefore decided to examine the importance of genetic variability in two biorhythmical genes (*clock* and *bmal-1*) in the pathology of RSA. We examined eight different single nucleotide polymorphisms in the two genes and compared the resulting genotypic and allele frequencies with frequencies of control samples. We genotyped 173 patients (81 female patients, 92 male patients) and 152 healthy controls (77 women, 75 men). Genotyping was performed by polymerase chain reaction in real time using the TaqMan® probes.

The results showed that four out of eight investigated polymorphisms are statistically significant and suggest possible involvement in the pathology of RSA.

The G allelic status (GG and GC genotypes) of *clock* rs6850524 was over-represented in RSA-couples ( $p=0.003$ ,  $OR=0.39$ ). From the results we suggest that GG and GC genotypes in rs6850524 contribute to the risk of RSA. The C allelic status (CC and CT) of *clock* rs6811520 was over-represented in RSA-couples ( $p=0.004$ ,  $OR=2.90$ ). From the results we suggest that CC and CT genotypes in rs6811520 act as risk genotypes for the development of the RSA.

In *bmal-1* gene rs3789327 polymorphism RSA couples had higher CC genotype ( $p=0.048$ ,  $OR=1.835$ ) and C allele ( $p=0.018$ ,  $OR=1.46$ ) frequencies. From the results we suggest C allele rs3789327 acts as a risk allele for the development of the RSA. The AA, AG genotypes ( $p=0.039$ ,  $OR=1.67$ ) and A allele ( $p=0.041$ ,  $OR=1.40$ ) of *bmal-1* rs4757144 were over-represented in RSA-couples. From the results we suggest A allele in rs4757144 contributes to the risk of RSA.

From the obtained results we concluded that the variability in the *clock* and *bmal-1* genes contributes to the risk of developing recurrent miscarriages in humans, but the effect is too small to be used as a diagnostic criterion for the occurrence of RSA.

## 7 VIRI

- Adair L.S. 2001. Size at birth predicts age at menarche. *Pediatrics*, 107, 4: E59.
- Alvarez J.D., Hansen A., Ord T., Bebas P., Chappell P.E., Giebultowicz J.M., Williams C., Moss S., Sehgal A. 2008. The circadian clock protein BMAL-1 is necessary for fertility and proper testosterone production in mice. *Journal of biological rhythms*, 23, 1: 26-36.
- Arko B. 2004. Tehnologija PCR v realnem času in možnost uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farmacevtski Vestnik*, 55: 215-220.
- Aschoff J. 1965. Circadian rhythms in man. *Science*, 148: 1427-32.
- Boden M.J., Kennaway D.J. 2006. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction*, 132, 3: 379-92.
- Bronson F.H. 1995. Seasonal variation in human reproduction: environmental factors. *The Quarterly review of biology*, 70, 2: 141-64.
- Bunger M.K., Walisser J.A., Sullivan R., Manley P.A., Moran S.M., Kalscheur V.L., Colman R.J., Bradfield C.A. 2005. Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the *Mop3/Bmal-1* locus. *Genesis*, 41, 3: 122-32.
- Bunger M.K., Wilsbacher L.D., Moran S.M., Clendenin C., Radcliffe L.A., Hogenesch J.B., Simon M.C., Takahashi J.S., Bradfield C.A. 2000. *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103, 7: 1009-17.
- Canaple L., Rambaud J., Dkhissi-Benyahya O., Rayet B., Tan N.S., Michalik L., Delaunay F., Wahli W., Laudet V. 2006. Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Molecular Endocrinology*, 20, 8: 1715-27.
- Chappell P.E., White R.S., Mellon P.L. 2003. Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *The Journal of neuroscience*, 23, 35: 11202-13.
- Clark B.R., Price E.O. 1981. Sexual maturation and fecundity of wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of reproduction and fertility*, 63, 1: 215-20.
- Daly A.K., Day C.P. 2001. Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. *British Journal of clinical pharmacology*, 52, 5: 489-99.
- Dardente H., Fortier E.E., Martineau V., Cermakian N. 2007. Cryptochromes impair phosphorylation of transcriptional activators in the clock: a general mechanism for circadian repression. *The Biochemical journal*, 402, 3: 525-36.

De la Iglesia H.O., Blaustein J.D., Bittman E.L. 1995. The suprachiasmatic area in the female hamster projects to neurons containing estrogen receptors and GnRH. *Neuroreport*, 6, 13: 1715-22.

Duez H., Staels B. 2009. Rev-erb-alpha: an integrator of circadian rhythms and metabolism. *Journal of applied physiology*, 107, 6: 1972-80.

Endo A., Watanabe T. 1989. Effects of non-24-hour days on reproductive efficacy and embryonic development in mice. *Gamete research*, 22, 4: 435-41.

Ford H.B., Schust D.J. 2009. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in obstetrics and gynecology*, 2, 2: 76-83.

Foster D.L., Ebling F.J., Claypool L.E. 1988. Timing of puberty by photoperiod. *Reproduction, nutrition, development*, 28, 2B: 349-64.

Gekakis N., Staknis D., Nguyen H.B., Davis F.C., Wilsbacher L.D., King D.P., Takahashi J.S., Weitz C.J. 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 280, 5369: 1564-9.

Guo H., Brewer J.M., Lehman M.N., Bittman E.L. 2006. Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *The Journal of neuroscience*, 26, 24: 6406-12.

Hamaguchi H., Fujimoto K., Kawamoto T., Noshiro M., Maemura K., Takeda N., Nagai R., Furukawa M., Honma S., Honma K., Kurihara H., Kato Y. 2004. Expression of the gene for Dec2, a basic helix-loop-helix transcription factor, is regulated by a molecular clock system. *The Biochemical journal*, 382, Pt 1: 43-50.

Hamatani T., Carter M.G., Sharov A.A., Ko M.S. 2004. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental cell*, 6, 1: 117-31.

Hastings M.H., Reddy A.B., Maywood E.S. 2003. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nature reviews Neuroscience*, 4, 8: 649-61.

Hogenesch J.B., Gu Y.Z., Jain S., Bradfield C.A. 1998. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 10: 5474-9.

Iwase T., Kajimura N., Uchiyama M., Ebisawa T., Yoshimura K., Kamei Y., Shibui K., Kim K., Kudo Y., Katoh M., Watanabe T., Nakajima T., Ozeki Y., Sugishita M., Hori T., Ikeda M., Toyoshima R., Inoue Y., Yamada N., Mishima K., Nomura M., Ozaki N., Okawa M., Takahashi K., Yamauchi T. 2002. Mutation screening of the human *Clock* gene in circadian rhythm sleep disorders. *Psychiatry research*, 109, 2: 121-8.

Karman B.N., Tischkau S.A. 2006. Circadian *clock* gene expression in the ovary: Effects of luteinizing hormone. *Biology of reproduction*, 74, 4: 624-32.

Katzenberg D., Young T., Finn L., Lin L., King D.P., Takahashi J.S., Mignot E. 1998. A *clock* polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep*, 21, 6: 569-76.

Kennaway D.J. 2005. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Human Reproduction Update*, 11, 1: 91-101.

Kennaway D.J., Owens J.A., Voultsios A., Boden M.J., Varcoe T.J. 2007. Metabolic homeostasis in mice with disrupted *Clock* gene expression in peripheral tissues. *American journal of physiology*, 293, 4: R1528-37.

Kennaway D.J., Varcoe T.J., Mau V.J. 2003. Rhythmic expression of *clock* and *clock*-controlled genes in the rat oviduct. *Molecular human reproduction*, 9, 9: 503-7.

Kondratov R.V., Kondratova A.A., Gorbacheva V.Y., Vykhovanets O.V., Antoch M.P. 2006. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL-1, the core component of the circadian clock. *Genes & Development*, 20, 14: 1868-73.

Kovanen L., Saarikoski S.T., Aromaa A., Lönnqvist J., Partonen T. 2010. *ARNTL* (*BMAL1*) and *NPAS2* gene variants contribute to fertility and seasonality. *PLoS one*, 5, 4: e10007.

Kume K., Zylka M.J., Sriram S., Shearman L.P., Weaver D.R., Jin X., Maywood E.S., Hastings M.H., Reppert S.M. 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98, 2: 193-205.

Laposky A., Easton A., Dugovic C., Walisser J., Bradfield C., Turek F. 2005. Deletion of the mammalian circadian clock gene *BMAL-1/Mop3* alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation. *Sleep*, 28, 4: 395-409.

Lincoln G.A. 1998. Reproductive seasonality and maturation throughout the complete life-cycle in the mouflon ram (*Ovis musimon*). *Animal reproduction science*, 53, 1-4: 87-105.

Lincoln G.A. 2002. Neuroendocrine regulation of seasonal gonadotrophin and prolactin rhythms: lessons from the Soay ram model. *Reproduction*, 59: 131-47.

McDearmon E.L., Patel K.N., Ko C.H., Walisser J.A., Schook A.C., Chong J.L., Wilsbacher L.D., Song E.J., Hong H.K., Bradfield C.A., Takahashi J.S. 2006. Dissecting the functions of the mammalian clock protein BMAL-1 by tissue-specific rescue in mice. *Science*, 314, 5803: 1304-8.

Meka A., Reddy B.M. 2006. Recurrent spontaneous abortions: an overview of genetic and non-genetic backgrounds. *International journal of human genetics*, 6, 2: 109-117.

Miller B.H., Olson S.L., Levine J.E., Turek F.W., Horton T.H., Takahashi J.S. 2006. Vasopressin regulation of the proestrous luteinizing hormone surge in wild-type and *Clock* mutant mice. *Biology of reproduction*, 75, 5: 778-84.

Miller B.H., Olson S.L., Turek F.W., Levine J.E., Horton T.H., Takahashi J.S. 2004. Circadian *clock* mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Current biology*, 14, 15: 1367-73.

Mishima K., Tozawa T., Satoh K., Saitoh H., Mishima Y. 2005. The 3111T/C polymorphism of *hClock* is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample. *American journal of medical genetics*, 133B, 1: 101-4.

Mladenoff D.J., Haight R.G. 1995. A regional landscape analysis. *Conservation Biology*, 20, 9: 279-294.

Moore R.Y., Eichler V.B. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain research*, 42, 1: 201-6.

Morin L.P., Shivers K.Y., Blanchard J.H., Muscat L. 2006. Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 137, 4: 1285-97.

Mosko S.S., Moore R.Y. 1979. Neonatal suprachiasmatic nucleus lesions: effects on the development of circadian rhythms in the rat. *Brain research*, 164:17-38.

Mueller R.F., Young I.D. 1998. *Emery's Elements of Medical Genetics*. 10th edition. Churchill Livingstone: 113-20.

Munoz E, Brewer M, Baler R. 2002. Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box. *The Journal of biological chemistry*, 277, 39: 36009-17.

Nievergelt C.M., Kripke D.F., Barrett T.B., Burg E., Remick R.A., Sadovnick A.D., McElroy S.L., Keck P.E. Jr, Schork N.J., Kelsoe J.R. 2006. Suggestive evidence for association of the circadian genes *PERIOD3* and *ARNTL* with bipolar disorder. *American journal of medical genetics*, 141B, 3: 234-41.

Ogawa H., Ansai Y. 1995. Diurnal rhythms of rat liver serine dehydratase, D-site binding protein, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA levels are altered by destruction of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *Archives of biochemistry and biophysics*, 321, 1: 115-22.

Oishi K, Fukui H, Ishida N. 2000. Rhythmic expression of *BMAL-1* mRNA is altered in *Clock* mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochemical and biophysical research communications*, 268, 1: 164-71.

Oishi K., Miyazaki K., Kadota K., Kikuno R., Nagase T., Atsumi G., Ohkura N., Azama T., Mesaki M., Yukimasa S., Kobayashi H., Iitaka C., Umehara T., Horikoshi M., Kudo T., Shimizu Y., Yano M., Monden M., Machida K., Matsuda J., Horie S., Todo T., Ishida N.

2003. Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *Journal of biological chemistry*, 278, 42: 41519-27.

Oishi K., Ohkura N., Kadota K., Kasamatsu M., Shibusawa K., Matsuda J., Machida K., Horie S., Ishida N. 2006. *Clock* mutation affects circadian regulation of circulating blood cells. *Journal of circadian rhythms*, 4:13.

Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110, 2: 251-60.

Reiter R.J. 1980. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine reviews*, 1, 2: 109-31.

Scott C.J., Jansen H.T., Kao C.C., Kuehl D.E., Jackson G.L. 1995. Disruption of reproductive rhythms and patterns of melatonin and prolactin secretion following bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei in the ewe. *Journal of neuroendocrinology*, 7, 6: 429-43.

Seron-Ferre M., Valenzuela G.J., Torres-Farfan C. 2007. Circadian clocks during embryonic and fetal development. *Birth defect research*, 81, 3: 204-14.

Shirai H., Oishi K., Ishida N. 2006. Bidirectional CLOCK/BMAL1-dependent circadian gene regulation by retinoic acid in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, 351, 2: 387-91.

Stephan F.K., Zucker I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69, 6: 1583-6.

Sukumaran S., Almon R.R., DuBois D.C., Jusko W.J. 2010. Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Advanced drug delivery reviews*, 62, 9-10: 904-17.

Turek F.W., Joshu C., Kohsaka A., Lin E., Ivanova G., McDearmon E., Laposky A., Losee-Olson S., Easton A., Jensen D.R., Eckel R.H., Takahashi J.S., Bass J. 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian *Clock* mutant mice. *Science*, 308, 5724: 1043-5.

Van der Beek E.M., Wiegant V.M., van der Donk H.A., van den Hurk R., Buijs R.M. 1993. Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *Journal of neuroendocrinology*, 5, 2: 137-44.

Vitaterna M.H., Takahashi J.S., Turek F.W. 2001. Overview of circadian rhythms. *The journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 25, 2: 85-93.



Wang L., Wang Z.C., Xie C., Liu X.F., Yang M.S.. 2010. Genome-wide screening for risk loci of idiopathic recurrent miscarriage in a Han Chinese population: a pilot study. *Reproductive sciences*, 17, 6: 578-84.

Wilcox A.J., Weinberg C.R., Baird D.D. 1995. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. *The New England journal of medicine*, 333, 23: 1517-21.

Wollnik F., Turek F.W. 1988. Estrous correlated modulations of circadian and ultradian wheel-running activity rhythms in LEW/Ztm rats. *Physiology & behaviour*, 43, 3: 389-96.

Woon P.Y., Kaisaki P.J., Bragança J., Bihoreau M.T., Levy J.C., Farrall M., Gauguier D. 2007. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 36: 14412-7.

Yamada K., Kawata H., Mizutani T., Arima T., Yazawa T., Matsuura K., Shou Z., Sekiguchi T., Yoshino M., Kajitani T., Miyamoto K. 2004. Gene expression of basic helix-loop-helix transcription factor, SHARP-2, is regulated by gonadotropins in the rat ovary and MA-10 cells. *Biology of reproduction*, 70, 1: 76-82.

Yamada K., Kawata H., Shou Z., Mizutani T., Noguchi T., Miyamoto K. 2003. Insulin induces the expression of the *SHARP-2/Stral3/DEC1* gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*, 278, 33: 30719-24.

Yi C.X., van der Vliet J., Dai J., Yin G., Ru L., Buijs R.M. 2006. Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*, 147, 1: 283-94.

AB TaqMan® Gene Expression Services, 2011, Asuragen,  
[http://www.asuragen.com/Services/services/gene\\_expression/ab\\_taqman.aspx](http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx), 15.5.2011.

Avtomatski sistemi za ekstrakcijo nukleinskih kislin, 2011, Biovitrum,  
<http://www.biovitrum.ru/catalogue/category/269/>, 15.5.2011.

CGDP - DNA Amplification, 2005, CGDP,  
<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>, 15.5.2011.

Fujifilm Life Science handbook, Ver.1.2, Fujifilm, 2009, Japonska.

GeneCards, 2011, Weizmann Institute of Science,  
<http://www.genecards.org>, 15.5.2011.

Meiosis, Mendel and Hardy-Weinberg: lecture notes, 2011, Jonathan Wolfe,  
<http://www.ucl.ac.uk/~ucbhjow/medicine/mendel.html>, 15.5.2011.

QIAGEN FlexiGene DNA Handbook, QIAGEN, 2009, Nemčija.

SNP Fact Sheet, 2008, U.S. Department of Energy Genome Program's Biological and Environmental Research Information System (BERIS),  
[http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/faq/snps.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml), 15.5.2011.

TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol. Applied Biosystems, 2006 Part Number 4332856 Rev. C 05/2006.

## ZAHVALA

Za strokovno vodenje, nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Borutu Peterlinu. Posebna zahvala velja tudi vsem zaposlenim na Kliničnem inštitut za medicinsko genetiko, ki so mi pomagali in me spodbujali pri opravljanju praktičnega dela diplomske naloge.

In sploh hvala vsem: staršem, Sari, Nejcu, domačim, Alenki, Petri in prijateljem, ki so mi stali ob strani, me spodbujali in bodrili v času študija.

# PRILOGE

## Priloga A

Preglednica vseh genotipov, uporabljenih pri statističnih izračunih

vzorec	diagnoza	rs 3789327	rs 6850524	rs 4757144	rs 1481892	rs 11932595	rs 6811520	rs 12363415	rs 13124436
171.05	RSA Ž	CT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	AG
171.15	RSA Ž	CT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	GG
171.31	RSA Ž	CC	GG	AG	CG	GG	CC	AA	AG
171.33	RSA Ž	CT	GG	AG	CG	GG	CC	AA	AG
171.37	RSA Ž	CC	GG	AG	CG	AG	CC	AA	AA
171.39	RSA Ž	CT	CG	AA	GG	AA	CT	AA	AG
171.41	RSA Ž	CC	CG	AG	CG	AG	CC	AA	AG
171.43	RSA Ž	CC	GG	AG	CG	AG	CC	AA	AG
171.49	RSA Ž	CT	CC	AG	GG	AG	CT	AG	GG
171.50	RSA Ž	CT	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AA
171.54	RSA Ž	TT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	GG
171.56	RSA Ž	CT	CG	AG	GG	AA	CT	AA	AG
171.60	RSA Ž	CT	GG	AA	CG	AG	CC	AA	AG
172.44	RSA Ž	CC	CG	GG	CC	AA	CT	AA	AG
172.50	RSA Ž	CT	CG	GG	CC	AG	CC	AG	GG
172.51	RSA Ž	CT	CC	GG	CG	AA	TT	AA	GG
172.52	RSA Ž	CT	GG	AA	CG	AG	CC	AA	AG
172.53	RSA Ž	CT	CG	AA	GG	AA	CT	AA	AG
172.59	RSA Ž	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AG	AG
172.61	RSA Ž	CC	CC	AA	GG	AA	TT	AA	GG
193.03	RSA Ž	CT	CG	GG	CG	AG	CT	AG	GG
193.19	RSA Ž	CT	GG	GG	CC	GG	CC	AA	GG
193.21	RSA Ž	CC	GG	AG	CG	AG	CC	AA	GG
193.29	RSA Ž	CT	GG	AG	CG	GG	CC	AA	AG
193.31	RSA Ž	CT	CC	AA	GG	AA	TT	AA	GG
193.39	RSA Ž	CT	CG	AA	GG	GG	CC	AG	AG
193.42	RSA Ž	CT	CG	AA	GG	AA	CT	AG	AG
196.39	RSA Ž	CT	CG	AG	CG	AA	CT	AG	GG
196.40	RSA Ž	TT	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AA
200.20	RSA Ž	TT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	GG
200.21	RSA Ž	CC	CC	AA	GG	AA	TT	AA	GG
200.24	RSA Ž	TT	GG	GG	GG	AA	CC	AA	AA
200.28	RSA Ž	CT	CG	GG	CG	AG	CT	AA	GG
200.32	RSA Ž	CC	CG	GG	CG	GG	CC	AG	GG
200.33	RSA Ž	TT	GG	AG	GG	AG	CC	AA	AG
200.35	RSA Ž	TT	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AG
200.44	RSA Ž	CT	GG	AG	GG	AA	CC	AG	AA
200.46	RSA Ž	CT	CG	GG	CG	AG	CT	AA	GG
200.48	RSA Ž	TT	CG	AG	GG	AA	CT	AA	AG
200.52	RSA Ž	TT	CG	AA	GG	AG	CT	AG	GG
200.57	RSA Ž	TT	CG	AA	GG	AG	CT	AG	GG
200.58	RSA Ž	CC	CG	AG	GG	AG	CT	AG	GG
200.60	RSA Ž	CC	CC	GG	GG	AG	TT	AA	GG
200.62	RSA Ž	CC	CG	AG	CG	AA	CT	AG	AG
214.01	RSA Ž	CT	CG	GG	GG	AA	CT	AA	AG
214.03	RSA Ž	CT	CG	AG	GG	AG	CT	AA	GG
214.05	RSA Ž	CC	GG	GG	CC	AA	CC	AG	AA
214.09	RSA Ž	TT	GG	AA	GG	GG	CC	AG	GG

vzorec	diagnoza	rs 3789327	rs 6850524	rs 4757144	rs 1481892	rs 11932595	rs 6811520	rs 12363415	rs 13124436
214.25	RSA Ž	CT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	GG
214.33	RSA Ž	CT	CC	AA	CG	AA	TT	AG	GG
214.35	RSA Ž	CT	GG	AG	CC	AG	CC	AA	AA
214.37	RSA Ž	CT	CG	AG	GG	AG	CT	AG	GG
214.41	RSA Ž	TT	CG	AA	GG	AA	CT	AA	GG
214.43	RSA Ž	CC	GG	GG	CC	AG	CC	AA	AA
214.45	RSA Ž	CT	GG	AA	GG	AA	CC	AA	AA
214.47	RSA Ž	CT	GG	AG	GG	GG	CC	AA	AG
214.49	RSA Ž	TT	GG	GG	CG	AG	CC	AA	GG
214.51	RSA Ž	CC	CC	AG	CG	AG	CT	AG	GG
214.54	RSA Ž	CC	CC	GG	CC	AA	TT	AG	GG
214.56	RSA Ž	CT	CG	AG	GG	AA	CT	AG	AG
214.63	RSA Ž	CC	GG	GG	CC	AG	CC	AG	AG
230.03	RSA Ž	TT	CG	AA	GG	AA	CT	AA	AG
230.05	RSA Ž	TT	GG	AG	CC	AG	CC	AA	AG
230.11	RSA Ž	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	GG
230.29	RSA Ž	CT	CG	AA	CG	GG	CC	AA	AG
230.33	RSA Ž	CC	GG	GG	CC	AG	CC	AG	AG
230.55	RSA Ž	TT	GG	GG	CC	AG	CC	AA	GG
270.09	RSA Ž	CT	CG	AG	GG	AA	CT	AA	AG
270.12	RSA Ž	TT	CG	AA	GG	AG	CT	AG	GG
270.14	RSA Ž	TT	CG	GG	CG	AG	CT	AG	AG
270.17	RSA Ž	CT	CG	GG	CG	AG	CT	AG	GG
270.19	RSA Ž	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	AG
270.24	RSA Ž	CT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	AG
270.25	RSA Ž	TT	GG	AG	CG	GG	CC	AA	AG
270.26	RSA Ž	CT	CC	AA	GG	AA	TT	AA	GG
270.27	RSA Ž	TT	GG	GG	CC	AG	CC	AA	AG
270.29	RSA Ž	CT	CG	GG	CG	AG	CT	AG	GG
270.30	RSA Ž	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	GG
270.33	RSA Ž	CC	GG	AG	CG	AG	CC	AA	AA
270.34	RSA Ž	CT	CG	AG	CG	GG	CC	AA	GG
270.37	RSA Ž	TT	CG	AG	CG	AG	CC	AA	AG
171.02	RSA M	CT	GG	AG	GG	AG	CC	AA	AA
171.08	RSA M	TT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	AG
171.28	RSA M	TT	CG	AG	GG	AG	CT	AA	AG
171.32	RSA M	CT	CG	AG	GG	AA	CT	AG	AG
171.34	RSA M	CT	CG	AG	GG	AA	CT	AA	AG
171.36	RSA M	CC	CG	AA	GG	GG	CC	AA	AG
171.38	RSA M	TT	CG	AA	CG	AG	CT	AG	GG
171.42	RSA M	TT	GG	GG	CG	AG	CC	AA	AA
171.44	RSA M	CC	GG	AA	GG	AG	CC	AA	GG
171.48	RSA M	CC	GG	AA	GG	AA	CC	AA	AA
171.55	RSA M	CT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	AG
171.57	RSA M	CT	CG	AG	GG	AA	CT	AA	GG
171.61	RSA M	CC	GG	AG	GG	GG	CC	AG	AG
172.45	RSA M	CT	GG	AG	CG	AG	CC	AA	AA
172.54	RSA M	CT	GG	AG	GG	AA	CC	AA	AG
172.56	RSA M	CC	CG	GG	CG	AA	CT	GG	AG
172.58	RSA M	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AG	AG
172.60	RSA M	TT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	GG
172.62	RSA M	TT	CG	AA	GG	AA	CT	AA	AG
172.63	RSA M	CT	GG	GG	CG	AG	CT	AG	GG
193.04	RSA M	CC	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AG

vzorec	diagnoza	rs 3789327	rs 6850524	rs 4757144	rs 1481892	rs 11932595	rs 6811520	rs 12363415	rs 13124436
193.10	RSA M	CT	CG	GG	CG	AG	CT	AG	GG
193.14	RSA M	CT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	GG
193.18	RSA M	CC	CG	AG	GG	AG	CC	AA	AG
193.22	RSA M	CT	CG	AG	CG	GG	CC	AA	GG
193.24	RSA M	CT	GG	AG	CG	AG	CC	AA	AA
193.26	RSA M	CC	GG	AG	CG	AG	CC	AA	GG
193.28	RSA M	CC	CC	AG	GG	AG	CT	AA	GG
193.30	RSA M	CC	GG	AG	CG	GG	CC	AG	GG
193.32	RSA M	CT	CG	GG	CC	AG	CT	AG	GG
193.36	RSA M	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	AG
193.40	RSA M	CT	CG	AG	GG	AG	CT	AA	GG
193.56	RSA M	TT	GG	AG	CG	GG	CC	AG	AA
193.58	RSA M	CT	GG	AG	CC	GG	CC	AA	GG
193.62	RSA M	CC	CG	AG	CG	AG	CT	AG	GG
193.64	RSA M	CT	GG	AG	GG	GG	CC	AA	AG
196.38	RSA M	CT	CG	GG	CC	AA	CT	AG	AG
196.41	RSA M	TT	GG	GG	CG	AG	CC	AA	AA
196.49	RSA M	CC	CC	AG	GG	AA	CT	AG	GG
200.22	RSA M	CC	CG	AA	GG	GG	CC	AA	AG
200.27	RSA M	CC	GG	AG	CG	AG	CT	AA	GG
200.34	RSA M	TT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	GG
200.36	RSA M	CC	CG	AG	CG	AG	CT	AA	GG
200.43	RSA M	TT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	AG
200.45	RSA M	CT	CG	GG	CG	GG	CC	AA	GG
200.49	RSA M	TT	CG	AG	GG	AA	CT	AA	AG
200.51	RSA M	TT	CG	AA	GG	AA	CT	AA	AG
200.54	RSA M	CT	CG	GG	CG	AA	CT	AA	GG
200.59	RSA M	CT	CG	AG	CC	AG	CT	AA	AG
200.61	RSA M	TT	CG	GG	CG	AG	CT	AA	GG
200.63	RSA M	CT	CG	AA	GG	AA	CT	AA	AG
214.04	RSA M	TT	GG	AG	CG	GG	CC	AA	GG
214.06	RSA M	CT	CG	GG	CC	AG	CT	AG	GG
214.08	RSA M	CT	GG	AG	CG	GG	CT	AG	GG
214.11	RSA M	CT	CC	AG	CC	AA	TT	AA	GG
214.12	RSA M	TT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	AG
214.14	RSA M	CT	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AG
214.18	RSA M	TT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	AG
214.24	RSA M	CT	CG	GG	CG	AA	CT	AA	AG
214.26	RSA M	CT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	GG
214.34	RSA M	TT	GG	AA	CG	AG	CC	AA	AG
214.36	RSA M	CT	CG	AG	CG	AA	CT	AA	GG
214.38	RSA M	CT	CG	GG	GG	AA	CT	AA	AG
214.42	RSA M	TT	GG	GG	CC	AA	CC	AA	AA
214.44	RSA M	CT	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AG
214.46	RSA M	CT	CG	GG	CG	AG	CT	AG	GG
214.50	RSA M	CT	GG	GG	CC	AG	CC	AA	AG
214.52	RSA M	CT	CC	AA	GG	AA	TT	AA	GG
214.53	RSA M	CC	CG	AA	GG	AG	CT	AA	GG
214.57	RSA M	CC	CG	AG	CG	AA	CT	AA	AG
214.64	RSA M	CC	GG	AG	CG	GG	CC	AG	GG
196.22	RSA M	TT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	GG
230.04	RSA M	TT	CG	AA	GG	AA	CT	AA	AG
230.06	RSA M	TT	GG	AA	GG	AA	CC	AA	AA
230.10	RSA M	CT	CG	AG	GG	AG	CT	AA	GG

vzorec	diagnoza	rs 3789327	rs 6850524	rs 4757144	rs 1481892	rs 11932595	rs 6811520	rs 12363415	rs 13124436
230.12	RSA M	CT	CG	GG	GG	AG	CC	AA	GG
230.28	RSA M	CC	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AG
230.31	RSA M	TT	GG	AG	CG	GG	CC	AA	AA
230.41	RSA M	CC	CG	AA	GG	AG	CT	AG	AG
270.01	RSA M	CT	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AG
270.18	RSA M	CT	CG	GG	CC	GG	CC	AA	AG
270.20	RSA M	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	AG
270.21	RSA M	TT	GG	AG	GG	AG	CC	AA	AG
270.22	RSA M	TT	GG	AG	CG	AG	CC	AA	AG
270.23	RSA M	CC	GG	GG	CG	AG	CC	AA	AG
270.28	RSA M	CT	CC	GG	CG	AA	TT	AG	GG
270.31	RSA M	CT	CC	AG	CG	AG	CT	AA	GG
270.32	RSA M	CC	CG	AG	CG	AG	CT	AA	AG
270.35	RSA M	CT	CC	AG	CG	AG	CT	AA	GG
270.38	RSA M	TT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	AG
270.39	RSA M	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	AG
270.40	RSA M	CT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	AG
171.63	kontrola Ž	TT	CG	GG	CC	AG	CT	AA	AG
171.64	kontrola Ž	CT	CG	AG	GG	AA	CT	AA	AG
172.01	kontrola Ž	CT	GG	GG	CG	GG	CC	AA	GG
172.02	kontrola Ž	CT	CG	GG	CG	AG	CT	AG	AG
172.03	kontrola Ž	TT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	GG
172.04	kontrola Ž	CT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	GG
172.06	kontrola Ž	TT	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AG
172.07	kontrola Ž	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	AG
172.08	kontrola Ž	TT	GG	GG	CC	GG	CC	AA	AG
172.09	kontrola Ž	CT	GG	AA	GG	AA	CC	AG	AA
172.13	kontrola Ž	TT	CC	AA	GG	AA	TT	AG	GG
172.14	kontrola Ž	CT	GG	GG	CC	AG	CC	AA	AA
172.15	kontrola Ž	CT	CC	AG	CG	AA	TT	AG	GG
172.16	kontrola Ž	CT	GG	AG	GG	GG	CC	AA	GG
172.18	kontrola Ž	TT	CC	GG	GG	AA	TT	AA	GG
172.20	kontrola Ž	CT	GG	AG	CG	GG	CC	AA	AG
172.21	kontrola Ž	TT	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AA
172.22	kontrola Ž	CT	GG	AA	CG	AA	CC	AG	AG
172.25	kontrola Ž	TT	GG	AG	GG	AG	CC	AA	AA
172.26	kontrola Ž	TT	CG	GG	CC	AG	CT	AA	GG
172.28	kontrola Ž	TT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	AG
172.30	kontrola Ž	TT	CC	GG	CG	AG	CT	AA	GG
172.31	kontrola Ž	CC	GG	GG	GG	AG	CC	AA	GG
172.38	kontrola Ž	CT	CC	GG	CG	AG	CT	AA	GG
172.46	kontrola Ž	CC	GG	AG	CG	AG	CC	AG	GG
172.47	kontrola Ž	TT	CG	AG	CG	GG	CC	AA	AG
172.48	kontrola Ž	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AG	AG
193.38	kontrola Ž	CT	GG	AG	GG	GG	CC	AA	GG
193.41	kontrola Ž	CT	CC	GG	CC	AG	CT	AA	GG
144.14	kontrola Ž	CT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	GG
147.04	kontrola Ž	CT	CG	GG	CG	AA	CT	AA	AG
147.02	kontrola Ž	CT	CG	GG	CG	AG	CT	AA	GG
149.15	kontrola Ž	CT	GG	AG	GG	AG	CC	AA	AG
149.25	kontrola Ž	CT	CC	AG	CG	AA	TT	AG	GG
113.29	kontrola Ž	TT	CG	AG	GG	AG	CT	AG	GG
123.36	kontrola Ž	CC	CC	AA	GG	AA	TT	AA	GG
153.11	kontrola Ž	CT	CG	AG	GG	AA	CT	AA	AG

vzorec	diagnoza	rs 3789327	rs 6850524	rs 4757144	rs 1481892	rs 11932595	rs 6811520	rs 12363415	rs 13124436
157.40	kontrola Ž	CT	GG	GG	CC	AA	CC	AG	GG
RSA kont 48	kontrola Ž	CT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	GG
RSA kont 49	kontrola Ž	TT	CG	GG	GG	AA	CT	AA	AG
RSA kont 50	kontrola Ž	CT	GG	AA	GG	AA	CC	GG	AA
RSA kont 52	kontrola Ž	TT	GG	GG	CG	AA	CC	AA	AG
RSA kont 53	kontrola Ž	TT	CC	GG	CG	AA	TT	AG	GG
RSA kont 54	kontrola Ž	CT	GG	GG	CG	AG	CC	AA	AG
RSA kont 57	kontrola Ž	CC	GG	GG	GG	GG	CC	AA	GG
RSA kont 58	kontrola Ž	TT	GG	GG	CG	AG	CC	AA	AA
RSA kont 59	kontrola Ž	CT	CG	GG	CG	AG	CT	AG	GG
RSA kont 64	kontrola Ž	CT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	GG
HD 47.02	kontrola Ž	CT	GG	GG	GG	GG	CC	AA	AG
HD 18.05	kontrola Ž	TT	CG	AA	GG	AA	CT	AA	GG
HD 18.11	kontrola Ž	CT	CG	GG	GG	AG	CT	AA	GG
HD 18.12	kontrola Ž	CC	GG	AA	GG	GG	CC	GG	AG
HD 18.13	kontrola Ž	CT	GG	AA	GG	AG	CC	AG	AA
HD 18.16	kontrola Ž	CT	GG	GG	CG	AG	CC	AA	AG
HD 18.21	kontrola Ž	CT	CC	GG	CG	AA	TT	AG	GG
HD 18.25	kontrola Ž	TT	CC	AA	GG	GG	TT	AA	GG
HD 18.32	kontrola Ž	CT	CG	GG	GG	AA	CT	AA	GG
HD 47.01	kontrola Ž	CT	GG	AG	CG	AA	CC	AA	GG
HD 47.10	kontrola Ž	TT	CG	AA	CG	AG	CT	AA	GG
HD 47.21	kontrola Ž	TT	GG	GG	CG	AG	CC	AA	AA
HD 47.42	kontrola Ž	TT	CC	GG	CG	AA	CC	AA	GG
HD 47.64	kontrola Ž	CT	GG	AA	CG	GG	CC	AA	GG
HD 118.01	kontrola Ž	CT	GG	GG	CG	GG	CC	AA	GG
HD 118.31	kontrola Ž	CT	CC	GG	GG	AG	CT	AA	GG
HD 118.35	kontrola Ž	CT	CG	GG	CG	GG	CC	AG	AG
HD 118.48	kontrola Ž	CT	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AG
HD 153.21	kontrola Ž	CC	CC	AA	GG	AA	CC	AA	GG
HD 153.30	kontrola Ž	TT	CG	AA	GG	AG	CC	AA	AG
HD 153.32	kontrola Ž	CC	CG	GG	CG	AA	CT	AA	AG
MD 144.21	kontrola Ž	CT	CG	GG	GG	AA	CT	AA	AG
MD 144.44	kontrola Ž	CC	CG	AA	GG	AA	CC	AA	AG
MD 144.46	kontrola Ž	TT	CC	GG	GG	AA	TT	AA	GG
SMA 113.40	kontrola Ž	CT	GG	GG	CG	AG	CC	AA	GG
SMA 113.46	kontrola Ž	CT	GG	GG	CC	GG	CC	AG	GG
FRA X 165.02	kontrola Ž	TT	CG	GG	CC	AA	CT	AG	AG
FRA X 79.53	kontrola Ž	CT	CG	GG	GG	GG	CC	AA	GG
134.28	kontrola Ž	TT	GG	AA	GG	AG	CC	AA	AG
2.056	kontrola M	CT	CG	AG	CG	AA	CT	AA	AG
4.039	kontrola M	CT	GG	GG	GG	AG	CC	AG	AA
9.027	kontrola M	CC	CC	AG	CG	AG	TT	AA	GG
15.030	kontrola M	CT	CG	AG	CG	GG	CC	AA	GG
17.035	kontrola M	CT	GG	AA	GG	AA	CC	AG	AA
4.049	kontrola M	CT	CC	AG	GG	AA	TT	AA	GG
12.024	kontrola M	CT	CG	AG	GG	AG	CT	AG	GG
17.039	kontrola M	CT	CG	GG	CG	AA	CT	AG	AG
21.005	kontrola M	TT	CC	AG	GG	AA	TT	AA	GG
31.032	kontrola M	CC	CG	AG	CG	AA	CT	AG	GG
4.015	kontrola M	TT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	GG
4.060	kontrola M	CT	GG	GG	GG	AA	CC	AA	AA
12.053	kontrola M	TT	CC	AG	CG	AA	TT	AA	GG
15.047	kontrola M	TT	GG	AG	GG	GG	CC	AA	AA



vzorec	diagnoza	rs 3789327	rs 6850524	rs 4757144	rs 1481892	rs 11932595	rs 6811520	rs 12363415	rs 13124436
19.003	kontrola M	TT	GG	AA	GG	AG	CC	AA	GG
21.025	kontrola M	TT	CG	AA	GG	AA	CT	AA	AG
29.045	kontrola M	CT	GG	AG	CG	GG	CC	AG	AG
31.039	kontrola M	CT	CC	AG	GG	AA	TT	AA	GG
4.022	kontrola M	CC	CC	AG	GG	AA	TT	AG	GG
13.032	kontrola M	TT	GG	AG	CG	AG	CC	AA	AA
17.002	kontrola M	CC	GG	AG	CG	GG	CC	AA	GG
19.005	kontrola M	TT	CG	AA	GG	AG	CT	AG	GG
30.002	kontrola M	TT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	GG
4.022	kontrola M	CC	CC	AG	GG	AA	TT	AG	GG
13.032	kontrola M	TT	GG	AG	CG	AG	CC	AA	AA
17.002	kontrola M	CC	GG	AG	CG	GG	CC	AA	GG
19.005	kontrola M	TT	CG	AA	GG	AG	CT	AG	GG
30.002	kontrola M	TT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	GG
4.026	kontrola M	CC	CG	GG	CG	AA	CT	AG	AG
5.063	kontrola M	CT	GG	AG	CG	AG	CC	AG	AG
14.017	kontrola M	CT	CC	AA	GG	AA	TT	AA	GG
17.004	kontrola M	TT	GG	AG	GG	GG	CC	AA	GG
19.006	kontrola M	TT	CG	AG	CG	AA	CT	AA	AG
21.032	kontrola M	CT	CG	AG	CC	AA	CT	AA	AG
30.021	kontrola M	CT	CG	AA	CG	AG	CT	AA	GG
32.018	kontrola M	TT	CC	AG	CG	AG	CT	AA	GG
4.028	kontrola M	TT	CG	GG	CG	AG	CT	AA	AG
6.001	kontrola M	TT	GG	AG	GG	AG	CC	AA	GG
14.050	kontrola M	CT	CC	GG	CG	AA	TT	AA	GG
17.019	kontrola M	CT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	GG
19.011	kontrola M	TT	GG	AG	CG	AG	CC	AA	GG
21.035	kontrola M	TT	GG	AG	CC	AG	CC	AA	AA
30.031	kontrola M	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	AG
4.034	kontrola M	CC	CC	GG	CG	AA	TT	AG	GG
6.016	kontrola M	TT	CG	AG	CG	AA	CT	AA	AG
14.052	kontrola M	CT	CG	AG	GG	AA	CT	AG	AG
17.030	kontrola M	CT	CC	AG	CG	AA	TT	AG	GG
19.022	kontrola M	TT	CC	GG	CC	AA	TT	AA	GG
21.046	kontrola M	CC	CG	AG	CG	AA	CT	AG	AG
31.005	kontrola M	CC	GG	GG	CG	GG	CC	AG	AA
4.037	kontrola M	CT	CG	GG	GG	AG	CT	AA	AG
6.044	kontrola M	CT	GG	AG	GG	GG	CC	AA	AG
14.058	kontrola M	CT	CG	AA	GG	AG	CC	AA	AG
17.032	kontrola M	CT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	GG
19.043	kontrola M	CC	GG	AG	GG	AG	CC	AG	AG
31.014	kontrola M	TT	CG	GG	CG	AA	CT	AA	AG
48.055	kontrola M	TT	CG	GG	CC	AG	CT	AA	GG
57.038	kontrola M	TT	GG	GG	CG	GG	CC	AA	AG
82.044	kontrola M	CT	CC	GG	CG	AA	TT	AA	GG
82.071	kontrola M	CT	CG	AA	CG	GG	CC	AA	AG
82.102	kontrola M	CT	CG	AG	CG	AG	CC	AG	AG
82.124	kontrola M	CT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	AG
32.027	kontrola M	CT	CG	GG	CG	AA	CC	AA	GG
52.002	kontrola M	TT	CC	AA	GG	AG	CT	AA	GG
57.045	kontrola M	CT	CG	AG	CG	AG	CT	AA	GG
82.010	kontrola M	CC	CG	AG	CG	AG	CT	AA	AG
82.027	kontrola M	TT	CC	AG	CG	AA	TT	AA	GG
82.045	kontrola M	CC	CC	AA	GG	AA	TT	AA	GG

<b>vzorec</b>	<b>diagnoza</b>	<b>rs 3789327</b>	<b>rs 6850524</b>	<b>rs 4757144</b>	<b>rs 1481892</b>	<b>rs 11932595</b>	<b>rs 6811520</b>	<b>rs 12363415</b>	<b>rs 13124436</b>
82.082	kontrola M	CT	GG	AA	GG	GG	CC	AA	AA
82.108	kontrola M	TT	CG	AG	CG	AG	CC	AG	AG
82.126	kontrola M	CC	GG	AG	CG	GG	CC	AA	AA
82.146	kontrola M	CT	CG	AA	GG	AG	CT	AA	GG
82.163	kontrola M	TT	CC	AG	CG	AA	TT	AA	GG
44.004	kontrola M	CT	GG	AG	GG	GG	CC	AG	GG
52.013	kontrola M	CT	CG	AA	GG	AG	CT	AG	AG