

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Jasmina BELTRAM

**IDENTIFIKACIJA VZROČNEGA GENA ZA
VITKOST ZNOTRAJ LOKUSA *Fob3b2* PRI MIŠIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Jasmina BELTRAM

**IDENTIFIKACIJA VZROČNEGA GENA ZA VITKOST ZNOTRAJ
LOKUSA *Fob3b2* PRI MIŠIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**IDENTIFICATION OF A CASUAL GENE FOR LEANNESS WITHIN
THE *Fob3b2* LOCUS IN MICE**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 15.5.2013 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Simon Horvat.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Tanja Kunej

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Vita Dolžan

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora: 14.6.2016

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Jasmina BELTRAM

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 601.4:575.1/.2:616-008.847.9:575.112(043.3)
KG	debelost/ kvantitativni lokus/ <i>Tst</i> /maščobno tkivo/genetske variante/bioinformatika
AV	BELTRAM, Jasmina, uni. dipl. inž. zoot.
SA	HORVAT, Simon (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje biotehnologija
LI	2016
IN	IDENTIFIKACIJA VZROČNEGA GENA ZA VITKOST ZNOTRAJ LOKUSA <i>Fob3b2</i> PRI MIŠIH
TD	Doktorska disertacija
OP	X, 84 str., 11 pregl., 26 sl., 125 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Kljub današnjemu "debelostnemu" okolju relativno velik delež človeške populacije ostaja vitek, kar nakazuje na genetsko rezistenco proti razvoju debelosti. V študiji smo želeli pri poligenem mišjem modelu identificirati vzročni gen znotraj kvantitativnega lokusa za vitkost <i>Fob3b2</i> . Z natančnejšo opredelitvijo genetskega intervala <i>Fob3b2</i> z uporabo F ₂ kongene populacije, intervalno specifično analizo haplotipov in komparativnim kartiranjem, smo uspeli segment, ki izvira iz vitke (Lean) linije, opredeliti na ~3,9 Mbp dolgo regijo na kromosomu 15. Med F ₂ homozigoti debele (FF) in vitke (LL) linije za segment <i>Fob3b2</i> so se pokazale statistično pomembne razlike v telesni masi in različnih maščobnih depojih. Homozigoti LL so imeli izboljšano glukozno toleranco in bili bolj občutljivi na inzulin. Izmed ~20 kandidatnih genov za vitkost znotraj lokusa <i>Fob3b2</i> , je samo tiosulfat sulfur-transferaza (<i>Tst</i> , rhodanese) bila povišano izražena v maščobnem tkivu. Analiza alelne diskriminacije je pokazala signifikantno višje izražanje <i>Tst</i> v maščobnem tkivu F ₂ heterozigotov za segment <i>Fob3b2</i> alela iz linije L in nakazuje na <i>cis</i> -učinek identificiranega polimorfizma. Izdelan atlas regulatornih transkripcijskih elementov <i>Tst</i> gena je omogočil izbor kandidatnih genetskih variant znotraj sekvenirane regije gena (rs251994838, rs31534689). Združeni podatki bodo služili za nadaljnje študije vloge gena <i>Tst</i> v bioloških procesih, kot sta debelost in diabetes. Rezultati naših analiz, skupaj z rezultati genetskih analiz opravljenih na ljudeh, nakazujejo, da smo uspeli odkriti nov, adipozno specifičen gen za vitkost.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 601.4:575.1/.2:616-008.847.9:575.112(043.3)
CX obesity/quantitative trait locus/Tst/adipose tissue/genetic variants/bioinformatics
AU BELTRAM, Jasmina
AA HORVAT Simon (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral
Programme in Biosciences, Field: Biotechnology
PY 2016
TI IDENTIFICATION OF A CASUAL GENE FOR LEANNESS WITHIN THE
Fob3b2 LOCUS IN MICE
DT Doctoral dissertation
NO X, 84 p., 11 tab., 26 fig., 125 ref.
LA sl
AL sl/en
AB A relatively large proportion of the human population still remains lean, despite today's »obesogenic« environment, suggesting genetic resistance to obesity development. Our study aimed at identifying a causal gene within the *Fob3b2* QTL that confers anti-obesity effects in a polygenic mouse model. The genetic interval of *Fob3b2* QTL was fine mapped by using F₂ crosses of congenic lines, interval-specific haplotyping, comparative mapping and confined the small Lean-line segment (~3,9 Mbp) on mouse Chr 15. Differences in body mass and various fatness traits were significant between the FF (homozygotes for Fat alleles) and LL (homozygotes for Lean alleles) F₂ genotypes. In addition, LL homozygotes in F₂ exhibited improved insulin sensitivity and glucose tolerance. Gene expression and functional analyses revealed the nuclear-encoded mitochondrial thiosulfate sulfur-transferase (*Tst*, rhodanese) as the only upregulated adipose-specific gene mapping to the *Fob3b2* interval among of the ~20 positional lean gene candidates. F₂ heterozygotes in the *Fob3b2* segments were used to test allelic imbalance, which showed significantly higher expression of the Lean-line *Tst* allele in the adipose tissue, suggesting a *cis*-effect of identified genetic variant. The developed atlas of transcription regulatory elements of *Tst* gene, integrated with identified polymorphisms within *Tst* region, revealed two candidate genetic variants (rs251994838, rs31534689) for further studies of *Tst* role in biological processes. Our combined results of genetic, transgenic, functional analyses and results from collaborative human genetics strongly indicate *Tst* as a novel gain-of function adipose-derived lean gene.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 DEBELOST	4
2.2 MEHANIZMI NALAGANJA MAŠČEVJA IN NASTANEK DEBELOSTI	6
2.3 MAŠČOBNO TKIVO	7
2.4 GENETIKA DEBELOSTI	9
2.4.1 Monogena (enogenska) oblika debelosti	10
2.4.2 Poligena (večgena) oblika debelosti	11
2.5 MODELI ZA PREUČEVANJE DEBELOSTI	12
2.5.1 Monogeni mišji modeli	12
2.5.2 Poligeni mišji modeli	13
2.5.2.1 Inbridirana mišja linija	13
2.5.2.1.1 Dolgoročno selekcionirane linije (angl. Long-term derived lines)	15
2.5.2.2 Poligeni mišji model za debelost in vitkost	16
2.6 KVANTITATIVNI LOKUS	16
2.6.1 Grobo kartiranje	17
2.6.2 Fino kartiranje	18
2.6.3 Identifikacija kandidatnih genov	18
2.6.4 Primeri kartiranja QTL-ov in identifikacija kandidatnih genov z vplivom na debelost	19
2.6.5 Kvantitativni lokus <i>Fob3b2</i>	21
3 MATERIALI IN METODE	24
3.1 NATANČNEJŠE KARTIRANJE KVANTITATIVNEGA LOKUSA <i>Fob3b2</i>	24
3.1.1 Sub-kongena linija M2	24
3.1.2 Genotipizacija živali	26

3.1.3	Označevalci SNP sivih con subkongenega segmenta (polimorfna mesta)	28
3.1.4	Analiza fenotipov	29
3.1.4.1	Zbiranje maščobnih depojev	29
3.1.4.2	Analiza fenotipskih podatkov	30
3.1.4.3	Oralni glukozni tolerančni test (oGTT)	31
3.1.4.4	Izražanje adiponektina v maščevju sub-kongene mišje linije M2-F ₂	31
3.1.5	Izbor kandidatnega gena znotraj non-IBD regije <i>Fob3b2</i>	33
3.1.5.1	Izražanje kandidatnih genov znotraj non-IBD regije segmenta <i>Fob3b2</i>	33
3.1.5.2	Toplotni graf (angl. heat-map) za izbor kandidatnega gena znotraj <i>Fob3b2</i>	34
3.2	VPLIV KANDIDATNEGA GENA <i>Tst</i> NA VITKOST PRI SUB-KONGENI MIŠJI LINIJI M2	35
3.2.1	Sekveniranje eksonov gena <i>Tst</i>	35
3.2.2	Alelno specifično izražanje	36
3.2.3	Analiza korelacij med ekspresijo kandidatnega gena <i>Tst</i> in ostalimi geni ali fenotipi	37
3.2.4	Polimorfizmi kandidatnega gena <i>Tst</i> pri linijah F in L	37
3.2.5	Atlas regulacije transkripcije kandidatnega gena	39
4	REZULTATI	48
4.1	NATANČNEJŠE KARTIRANJE QTL-A <i>Fob3b2</i> Z ANALIZO F ₂ -POPULACIJE SUBKONGENE MIŠJE LINIJE M2	48
4.1.1	Fenotipska analiza F₂-populacije sub-kongene linije M2	49
4.1.2	Identifikacija kandidatnega gena znotraj QTL-a <i>Fob3b2</i>	53
4.2	REZULTATI ANALIZE VPLIVA KANDIDATNEGA GENA <i>Tst</i>	55
4.3	DOLOČANJE VZROČNOSTI KANDIDATNIH GENOV ZA UČINEK <i>Fob3b2</i> QTL	57
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	61
5.1	RAZPRAVA	61
5.1.1	Natančnejše kartiranje QTL <i>Fob3b2</i>	61
5.1.2	Določanje vzročnosti kandidatnih genov za učinek QTL <i>Fob3b2</i>	63
5.2	SKLEPI	71
6	POVZETEK (SUMMARY)	72
6.1	POVZETEK	72
6.2	SUMMARY	73
7	VIRI	75
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava krme z visokim deležem maščob Clinton-Cybulsky Rodent Diets s 1, 25 % holesterola D12108C	24
Preglednica 2: Reagenti in priprava lizatov iz odščipnjenih tkiv mišijh ušes	26
Preglednica 3: Mikrosatelitski genetski označevalci, uporabljeni pri genotipizaciji sub-kongene M2 linije ter reagenti in pogoji PCR reakcije za vsak par oligonukleotidnih označevalcev	27
Preglednica 4: SNP označevalci, uporabljeni za natančnejše kartiranje mej donorskoga segmenta pri sub-kongeni M2 liniji ter reagenti in pogoji PCR reakcije za vsak par oligonukleotidnih označevalcev	29
Preglednica 5: Simbol tarčnih in normalizacijskih genov ter TaqMan sond uporabljenih za določanje nivoja izražanja adiponektina v maščevju sub-kongene M2-F ₂ linije	32
Preglednica 6: TaqMan sonde uporabljene za preverjanje izražanja kandidatnih genov znotraj segmenta <i>Fob3b2</i>	34
Preglednica 7: Mikrosatelitski genetski označevalci, uporabljeni za sekveniranje eksonov gena <i>Tst</i> ter reagenti in pogoji PCR reakcije za vsak par oligonukleotidnih označevalcev	36
Preglednica 8: Reagenti in protokol PCR reakcije v realnem času	37
Preglednica 9: Imena in sekvene oligonukleotidov uporabljenih pri sekveniranju <i>Tst</i> segmenta	39
Preglednica 10: Povprečja (\pm standardni odklon) za telesno težo F ₂ -populacije miši krmljenih s standardno in visokokalorično krmo pri različnih starosti	51
Preglednica 11: Povprečja (\pm standardni odklon) za maso maščobnih depojev in adipoznega indeksa F ₂ -populacije miši krmljenih s standardno in visokokalorično krmo	52

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Zdravstveni problemi povezani z debelostjo	5
Slika 2: Razširjenost debelosti po svetu ($ITM \geq 30 \text{ kg/m}^2$) do leta 2014	6
Slika 3: Endokrine in nevronske interakcije pri regulaciji energijske homeostaze in apetita	7
Slika 4: Maščobni depoji pri miši in človeku	8
Slika 5: Tipi inbridiranih mišji linij	14
Slika 6: Primer razvoja dolgoročno selekcionirnih linij za telesno maso	16
Slika 7: Izražanje gena <i>Tst</i> pri miši in človeku v različnih tkivih (BioGPS, 2015)	23
Slika 8: Genetska struktura debele (F), vitke (L), kongene M in sub-kongene M2 linije za QTL <i>Fob3b2</i> na 15. kromosomu	26
Slika 9: Polimorfizmi, identificirani s sekveniranjem 15. kromosoma F, L in kongene M linije na The Jackson Laboratory (ZDA)	28
Slika 10: Maščobni depoji, odvzeti za fenotipsko analizo učinka QTL-a <i>Fob3b2</i> na vitkost pri sub-kongeni mišji liniji M2	30
Slika 11: Prikaz merjenja nivoja glukoze v krvni kapljici, pridobljeni iz repne vene miši	31
Slika 12: Postavitev oligonukleotidov uporabljenih pri sekveniranju <i>Tst</i> segmenta	38
Slika 13: Iskanje polimorfizmov znotraj ohranjenih mest med 39 nadredi višjih sesalcev v podatkovni bazi Ensembl	40
Slika 14: Iskanje konzerviranih elementov, status metilacije DNA, DNaseI hipersenzitivnih mest, histonskih modifikacij, vezav polimeraz in vezavnih mest transkripcijskih faktorjev v podatkovni bazi Ensembl	41
Slika 15: Iskanje <i>Tst</i> promotorja in TATA-box mesta v bazi EPD (A). Iskanje vezavnih mest za transkripcijske faktorje v »upstream« regiji <i>Tst</i> gena z orodjem Alibaba 2.1 (B) in MotifMap (C)	43
Slika 16: Iskanje CpG otokov v regiji <i>Tst</i> gena z različnimi orodji: UCSC (A), MethPrimer (B), CpG Island Searcher (C) in EMBOSS Cpgplot (D)	45
Slika 17: Iskanje tarčnih mest za miRNA v regiji <i>Tst</i> gena z različnimi orodji: miRWalk (A), miRDB (B), MicroCosm(C) in miRecords (D)	47
Slika 18: Genetska sestava regije kvantitativnega lokusa <i>Fob3b2</i> na 15. kromosomu ter genotipizirani polimorfizmi sub-kongene linije M2	49

Slika 19:	Telesna teža F ₂ -populacije sub-kongene mišje linije M2, krmljene s visokokalorično in standardno krmo	50
Slika 20:	Test oralne glukozne tolerance in izražanje gena adiponektin v gonadalnem maščevju pri HFD skupini F ₂ sub-kongene linije M2	53
Slika 21:	Relativna sprememba izražanja non-IBD kandidatnih genov v gondalanem mačobnem depaju F ₂ -populacije sub-kongene mišje linije M2	54
Slika 22:	Prikaz rezultatov analiz za določanje glavnih kandidatnih genov za vitkost znotraj kvantitativnega lokusa <i>Fob3b2</i>	55
Slika 23:	Alelna specifična ekspresija gena <i>Tst</i> pri F ₂ -M2 heterozigotih za segment <i>Fob3b2</i>	56
Slika 24:	Močna oziroma zelo močna korelacija med kandidatnim genom <i>Tst</i> , geni izraženimi v adipoznem tkivu ter metaboličnimi parametri pri 23-ih mišjih linijah	57
Slika 25:	Identificirani polimorfizmi znotraj <i>Tst</i> regije med vitko in debelo linijo	58
Slika 26:	Atlas regulacijskih elementov transkripcije gena <i>Tst</i>	60

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABD	abdominalna maščoba (abdominalni maščobni depo)
ALT	standardna kontrolna krma za glodavce
F	debela linija
FEM	femoralna maščoba (femoralni maščobni depo)
FF	homozigot debele linije na odseku <i>Fob3b2</i>
<i>Fob3b2</i>	F-line Obesity QTL 3b2
GON	gonadalna maščoba (gonadalni maščobni depo)
GTT	glukozni tolerančni test (angl. <i>glucose tolerance test</i>)
GWAS	asociacijska analiza na ravni celostnega genoma (angl. <i>genome wide association study</i>)
HFD	krma z visoko vsebnostjo maščob (angl. <i>high fat diet</i>)
ITM	indeks telesne mase (kg/m^2)
L	vitka linija
LL	homozigot vitke linije na odseku <i>Fob3b2</i>
MEZ	mezenterialna maščoba (mezenterični maščobni depo)
miRNA	mikro RNA (angl. <i>microRNA</i>)
mRNA	informacijska RNA (angl. <i>messenger RNA</i>)
non-IBD	neenak po izvoru (angl. <i>not identical by descent</i>)
QTL	kvantitativni lokus (angl. <i>quantitative trait locus</i>)
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
<i>Tst</i>	tiosulfat sulfurtransferaza (angl. <i>Thiosulfate sulfurtransferase</i>)
TSS	mesto začetka transkripcije (angl. <i>transcription start site</i>)
UTR	neprevedna regija (angl. <i>untranslated region</i>)

1 UVOD

Debelost je v zadnjih 50-ih letih postala velik zdravstveni problem, najprej v razvitejših zahodnih družbah kasneje tudi v državah v razvoju. Velik porast debelosti in z njo povezanimi kroničnimi obolenji (diabetes, bolezni srca in ožilja,...) pripisujejo povečani razpoložljivosti in porabi visoko kalorične, z maščobami bogate hrane in zmanjšani fizični aktivnosti (debelostno okolje). Pri človeku je evolucijski razvoj izbiral genetske variente, ki so omogočale energetsko varčnost in učinkovitost pri nalaganju maščob v telesu, ki so potem predstavljale energijske zaloge v obdobjih pomanjanja hrane. Tak pogled je kot hipotezo o varčnih genih (angl. *Thrifty gene hypothesis*) razložil James Neel leta 1962 in navkljub nekaterim novejšim alternativnim hipotezam še danes ponuja pomemben evolucijski model za razlogo lastnosti nalaganja maščevja in pojava debelosti v moderni dobi (Wells, 2009).

Genske variante varčnih genov, ki so človeku v dolgem evolucijskem procesu predstavljale selektivno prednost za preživetje in uspešno reprodukcijo, se v kratkem nedavnem obdobju sprememb v debelostnem okolju niso mogle kvalitativno ali kvantitativno spremeniti (frekvence). Varčni geni/aleli so v debelostnem okolju v močni pozitivni interakciji in pripomorejo k zelo učinkovitemu skladiščenju odvečne energije v maščobno tkivo in hitro privedejo do neravnotežja vnesene ter porabljene energije in s tem debelosti.

Kljub udobnejšemu življenjskemu slogu, veliki razpoložljivosti visoko kalorične hrane in tehnoškim napredkom, ki v veliki meri prispevajo k širjenju epidemije debelosti, ostaja del populacije vitek oziroma rezistenten na razvoj debelosti. Do danes še ni povsem pojasnjeno ali je populacija, ki ostaja vitka v sicer debelostnem okolju, večinoma posledica drugačnega fenotipa ali večinoma posledica okoljskih dejavnikov. Vitkost je lahko rezultat pomanjanja vnosa energije glede na njeno porabo. V razmerah modernega debelostnega okolja, kjer je vnos energije navadno v presežku, pa je vitkost oziroma zmanjšana kapaciteta za nalaganje maščevja, lahko rezultat različnih genetskih oziroma fizioloških mehanizmov, ki so še slabo raziskani. Obstajajo redki sindromi ali bolezni, ki vodijo v stanja ekstremno nizkih zalog maščevja kot so lipodistrofija, kaheksija, nekatera pomanjanja rastnih hormonov (Savage, 2009; Jacquemont in sod., 2011). Pri teh primerih gre pogosto za dedne napake ali bolezni, ki povzročajo odsotnost ali zmanjšanje števila oziroma funkcije adipocitov za skladiščenje maščob in jih lahko imenujemo primeri nezdrave vitkosti. Na drugi strani je lahko vitkost rezultat relativnega presežka porabe nad vnosom energije, kar v literaturi pogosto imenujejo zdrava vitkost oziroma odpornost na razvoj debelosti. Odgovorni geni za vitkost ter njihovi mehanizmi delovanja so slabo raziskani, fiziološke študije pa kažejo, da gre za regulacije na različnih ravneh kot so povečana poraba energije v perifernih tkivih, periferni mehanizmi, ki zmanjšujejo apetit in spremembe v centralni regulaciji teh procesov v možganih.

Nalaganje maščevja je kompleksna lastnost, ki je pod vplivom številnih genov z manjšimi vplivi, ki se v genomu nahajajo znotraj kvantitativnih lokusov (angl. *Quantitative Trait Locus*; QTL). Za večino lastnosti pa se izkaže, da ima manjše število genov lahko tudi večji delež vpliva na lastnost (t.i. »major QTL«) (Flint in Mott, 2001; Mackay in sod., 2009). Identifikacija le-teh pa je odvisna od heritabilitete lastnosti, heterogenosti populacije ter vpliva okolja. Velik izziv pri identifikaciji posameznih QTL-ov je natančno kartiranje na majhne genomske odseke ter dokazovanje vzročnosti kandidatnih genov v preučevanem odseku. QTL-i, ki so odkriti v poskusih grobega kartiranja ali analizah rodovnikov se namreč nahajajo na relativno dolgih genomskeh intervalih, zato jih je potrebno omejiti na krajše segmente z manjšim številom kandidatnih genov. Prav tako je učinek takih genov težje preučevati. Raziskovalci so tako razvili živalske modele, ki omogočajo študije teh kompleksnih mehanizmov. Uporaba mišijih modelov nudi mnoge eksperimentalne prednosti, kot so načrtna in relativno obsežna križanja, kratek generacijski interval, kontrola dejavnikov okolja (npr. prehrana, temperatura, vlažnost, ...) ter številne druge. Mišji modeli predstavljajo tudi nepogrešljivo orodje pri vrednotenju potencialnih terapevtskih pristopov.

Večina raziskav je bila do sedaj osredotočena na iskanje genetskih variant, ki povečajo dovzetnost za razvoj debelosti. Čeprav je bilo odkritih že veliko genov in mutacij s tovrstnim učinkom, to znanje še ni prineslo učinkovitih terapij za zdravljenje debelosti ali učinkovito selekcijo manj zamaščenih živali. Na drugi strani pa raziskave pri ljudeh ter živalskih modelih kažejo, da ostaja določen del populacije vitek oziroma ohranja normalno telesno maso kljub temu, da so izpostavljeni debelostnemu okolju. Menimo, da je prav odkrivanje genov za vitkost in razumevanje mehanizma njihovega delovanja, kar je osnovni raziskovalni problem tega doktorata, nujno za napredek pri razumevanju razvoja debelosti ter porasta »epidemije« debelosti pri ljudeh. Znanje o genih za vitkost lahko nudi tudi alternativne možnosti za učinkovitejši razvoj terapevtskih pristopov za zdravljenje in uspešnejše zatiranje širjenja te bolezni. Prejšnje študije (Prevoršek in sod., 2010a) ter tedaj še preliminarne genetske in fiziološke študije (Morton in sod., 2016) so nakazovale, da ima QTL *Fob3b2* učinek na vitkost oziroma zmanjševanje nalaganja maščevja. Na osnovi teh rezultatov smo si v pričujoči doktorski nalogi postavili za cilj identificirati kandidatne gene znotraj lokusa *Fob3b2* na 15. kromosomu pri miši, dokazati vzročnost identificiranega gena za vitkost in pojasniti molekularno-genetski mehanizem, ki je odgovoren za ugodne fenotipske učinke.

1.1 NAMEN NALOGE

Glavni namen prvega dela doktorske naloge je bil testirati učinke kvantitativnega lokusa *Fob3b2* in možne interakcije z vrsto krme ter odkriti vzročen kandidatni gen za učinek kvantitativnega lokusa na vitkost. Drugi namen raziskave je bil dokazati, da je povišano

izražanje *Tst* odgovorno za opažene fenotipske učinke in mehanizme povezane z vitkostjo in metabolnimi kazalci.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na namen in cilje dela smo postavili dve nični hipotezi:

- 1) Med homozigoti F_2 za odsek *Fob3b2* ni razlik v različnih fenotipskih parametrih povezanih z debelostjo.
- 2) Med heterozigoti F_2 za *Fob3b2* ni razlik v alelno specifičnem izražanju kandidatnega gena *Tst* v maščobnem tkivu.

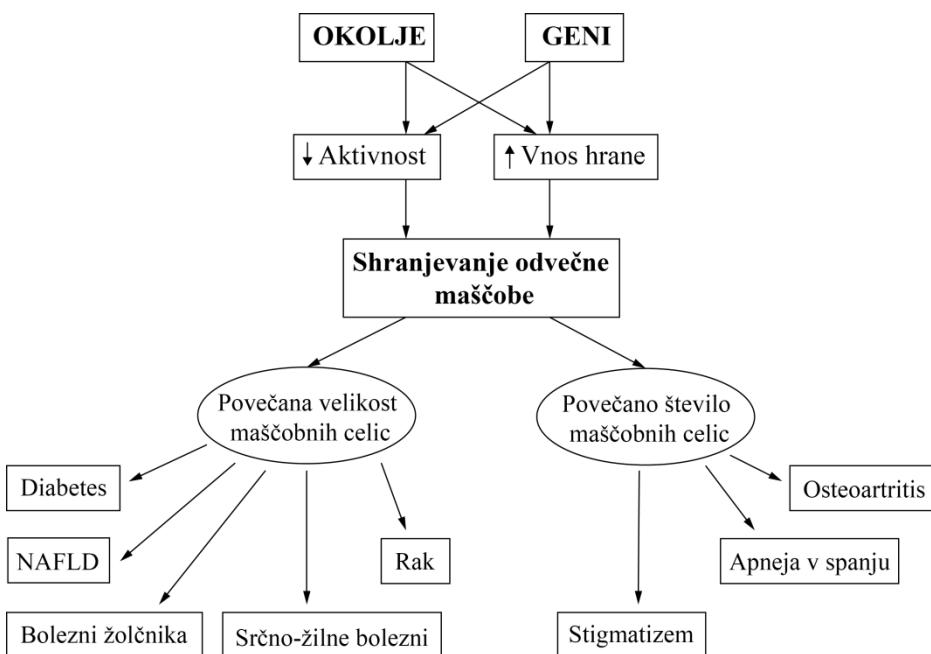
2 PREGLED OBJAV

2.1 DEBELOST

Debelost je definirana kot kronična bolezen, z značilnim čezmernim kopičenjem telesnih maščob. Nastane kot posledica dalj časa trajajoče pozitivne energijske bilance, ko je vnos energije večji od porabe.

Zamaščenost je težko rutinsko meriti, zato se za določanje normalne telesne mase uporablja tako imenovani indeks telesne mase (ITM; angl. *Body Mass Index*), definiran kot telesna masa v kilogramih, deljena s kvadratom telesne višine v metrih. V razred prekomerne telesne mase tako spadajo osebe z ITM med 25 in 30 kg/m², v razred debelosti pa osebe z ITM nad 30 kg/m². ITM predstavlja grobo merilo za določanje stopnje zamaščenosti posameznikov (npr.: ženske v naravi bolj zamaščene kot moški) ter slab kriterij za ocenjevanje tveganja umrljivosti in morbidnosti. Zato je identifikacija alternativnega oz. komplementarnega kazalca, ki bi povezoval telesno zamaščenost s tveganjem razvoja bolezni, še vedno v teku. Nekatere študije tako predlagajo, da obseg trebuha bolje korelira s tveganjem nastanka diabetesa tipa II (Wang in sod., 2005; Caballero, 2007). Čeprav ima visceralna maščoba pomembno vlogo pri nastanku presnovnih motenj povezanih z debelostjo, pa pomanjkanje praktičnih metod določanja trebušne zamaščenosti v rutinskih pregledih, onemogoča uporabo le-te kot orodja za splošen pregled posameznikov.

Odvečna energija se shranjuje v maščobnih celicah, ki se povečajo (hipertofična debelost) in/ali porastejo v številu (hiperplastična debelost). Prav povečanje maščevja in posledično tudi dodatne mase in povečano izločanje prostih maščobnih kislin ter številnih peptidov iz adipocit, vodi v klinične probleme, povezane z debelostjo. Posledica tega je nastanek bolezni (diabetes mellitus, bolezni žolčnika, osteoarthritis, bolezni srca in ožilja, itd.) in nekaterih oblik raka (Slika 1). V povezavi s prekomerno težo prihaja tudi do različnih endokrinih sprememb, ki najbolj prizadenejo ravno reproduktivni sistem (Rich-Edwards in sod., 1994; Pinkney in Kepelman, 2004).



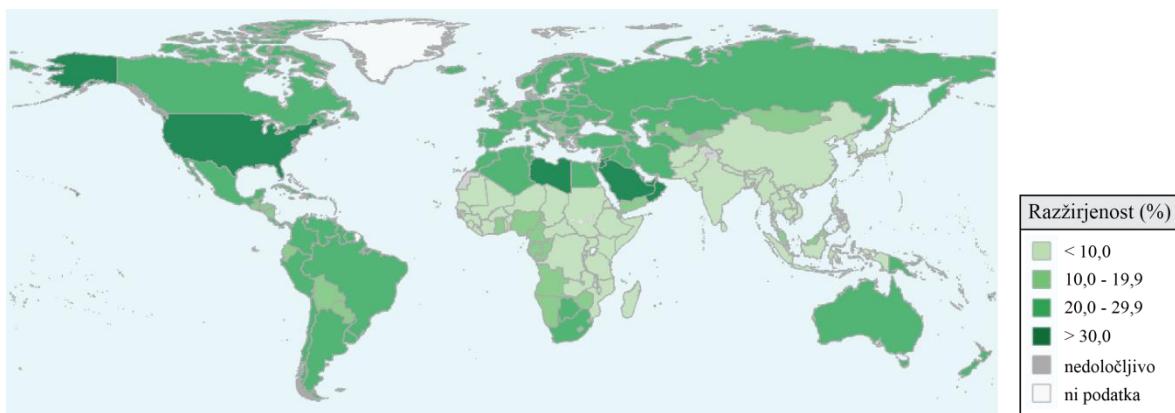
Slika 1: Zdravstveni problemi povezani z debelostjo. NAFLD – nealkoholna bolezen zamaščenih jeter (Bray, 2004)

Figure 1: Health problems associated with obesity. NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease (Bray, 2004)

Naraščajoča razširjenost debelosti ne moremo pripisovati le spremembam v genomu človeka, prehranjevalnim navadam ali zmanjšani fizični aktivnosti. Specifičen okoljski faktor predstavljajo mikroorganizmi v črevesju, ki se razvija z nami od rojstva in z našimi prehranjevalnimi navadami in dokazano prispeva k energijski homeostazi. Slednje so potrdili pri gnotobiotičnih miših (angl. *gnotobiotic mice*). Le-te so bile zaščitene pred nastankom debelosti, pri uvajanju črevesne mikrobiote navadnih miši, pa so drastično povečale telesno težo in razvile inzulinsko rezistenco. Dokazano pa je tudi, da se sestava črevesne mikrobiote razlikuje med debelimi in suhimi ljudmi ter se hitro spreminja glede na dejavnike prehrane. Kako pomembna je sestava in metabolična aktivnost mikroorganizmov v črevesju in v kolikšnem deležu prispeva k nastanku debelosti, pa še ni povsem razjasnjeno (DiBaise in sod., 2012; Everard in Cani, 2013; Moreno-Indias in sod., 2014).

Epidemija debelosti je sedaj prepoznana kot ena izmed najbolj pomembnih zdravstvenih problemov, ki jih srečujemo v današnjem svetu. Zakaj se je razširjenost debelosti več kot podvojila med leti 1980 in 1914 (Slika 2) lahko pripisujemo današnjemu debelostnemu okolju (tj. okolje polno poceni dostopne, visokokalorične hrane z zmanjšano fizično aktivnostjo) in genetski predispoziciji za razvoj le-te. Skozi evolucijo so ljudje in živali razvili »odvečen« mehanizem, ki je služil kot akumulator maščob za obdobja lakote. Da je prednost za preživetje tekom evolucije postala nagnjenost k debelosti, v današnjem okolju, je kot hipotezo o varčnih genih (angl. *Thrifty gene hypothesis*) razložil James Neel leta 1962. Podobno je Speakman (2007) s hipotezo o prenehanju plenjenja (angl. *Predation*

release hypothesis) mnenja, da je razvoj socialnega obnašanja, orožja in ognja signifikanten faktor za opustitev plenilstva, kar je vodilo v spremembe porazdelitve telesnih maščob zaradi naključnih mutacij in genetskega toka (angl. *genetic drift*). Slednje tudi pojasnjuje zakaj nekateri posamezniki še zmeraj ostajajo vitki, kljub vplivu debelostnega okolja (Johnson in Andrews, 2015).

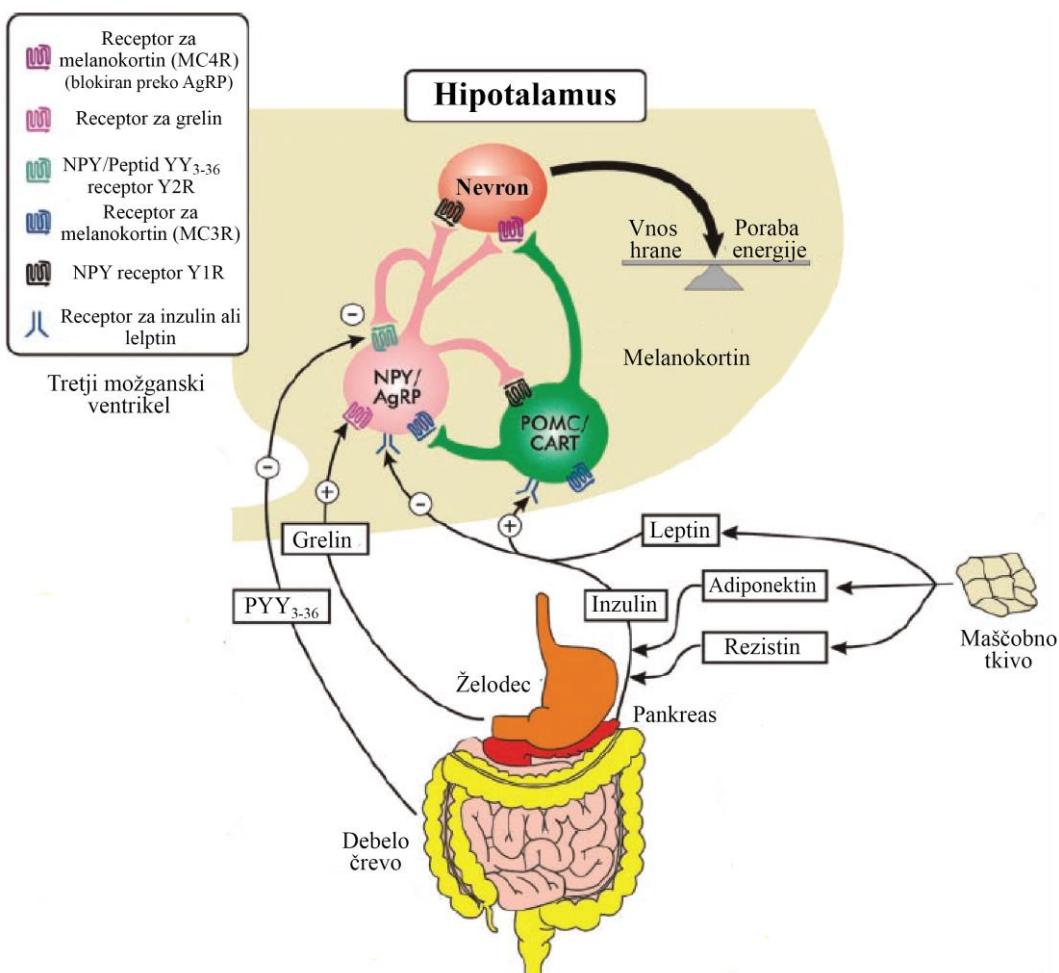


Slika 2: Razširjenost debelosti po svetu ($ITM \geq 30 \text{ kg/m}^2$) do leta 2014 (prirejeno po World Health Organization, 2016)

Figure 2: Prevalence of obesity ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$), year 2014 (adapted from World Health Organization, 2016)

2.2 MEHANIZMI NALAGANJA MAŠČEVJA IN NASTANEK DEBELOSTI

Čeprav je definicija debelosti relativno enostavna, pa so mehanizmi, odgovorni za energijsko bilanco in nalaganje maščevja veliko bolj kompleksnejši. Glede na zakone termodinamike obstaja možnost akumulacije odvečne telesne teže le ob dolgotrajni pozitivni energijski bilanci. Uravnavnje le-te in posledično tudi telesne mase je kompleksen sistem, ki vključuje veliko dejavnikov, kot so nevrološki, endokrini, metabolični, čustveni in kognitivni signali. Ta zapleten sistem tako integrira številne periferne signale glede na vnos in porabo energije (Hill in sod., 2012). Pri tej regulaciji igra pomembno vlogo hipotalamus. V začetnih stopnjah integracije perifernih sitostnih signalov je važno arkvatno jedro hipotalamus. Arkvatno jedro vsebuje dve vrsti nevronov. Prva skupina nevronov z oreksigenim delovanjem (tj. spodbujanje vnosa hrane) izraža peptidna živčna prenašalca neuropeptid Y (NPY; angl. *neuropeptide Y*) in agutiju soroden peptid (AGRP; angl. *agouti-related peptide*). Druga skupina pa izraža anoreksigena peptida (tj. zaviranje vnosa hrane) proopiomelanokortin (POMC; angl. *pro-opiomelanocortin*) in s kokainom in amfetaminom uravnavan transkript (CART; angl. *cocaine and amphetamine regulated transcript*). Obe vrsti nevronov se neposredno odzivata na delovanje perifernih sitostnih peptidov, inzulina in leptina (anoreksigeni učinek) ter grelina in peptida YY₃₋₃₆ (oreksigeni učinek) (Slika 3) (Gale in sod., 2004; Bell in sod., 2005).



Slika 3: Endokrine in nevronske interakcije pri regulaciji energijske homeostaze in apetita (Gale in sod., 2004)

Figure 3: Endocrine and neuronal interaction in the regulation of energy homeostasis and appetite (Gale et al., 2004)

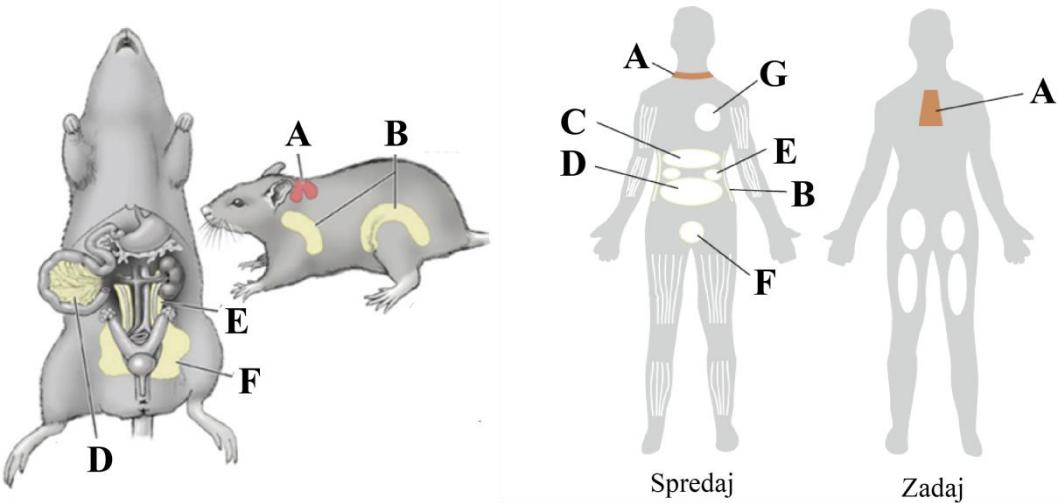
Homeostatski mehanizmi se na presežke zalog ne odzivajo enako, kot na primanjkljaj. Z naraščanjem telesne mase narašča tudi nivo leptina, ki pa pri dolgoročni pozitivni energijski bilanci izgubi svoj proti-debelostni učinek, zaradi razvoja rezistence celic na signale leptina. Takšen mehanizem se je najverjetneje razvil kot posledica evolucije v smeri shranjevanja maščob v primeru nastopa lakote (Bell in sod., 2005). Tudi naraščanje ostalih anoreksigenih peptidov (inzulin) in metabolitov (glukoza, maščobna kislina) ne zavira kopičenja dodatnih telesnih maščob. Tako se pri posameznikih, nagnjenih k debelosti, homeostatski mehanizem, v okolju z visokokalorično hrano, prestavi na novo, višjo vrednost telesne teže in količine maščevja (Woods in D'Alessio, 2008).

2.3 MAŠČOBNO TKIVO

Zamaščenost je delež celotne telesne mase, ki vključuje nevtralne lipide, shranjene v maščobnem tkivu. Primarna funkcija tega tkiva je shranjevanje energije v obliki lipidov za

kasnejše potrebe telesa, ima pomembne imunske, endokrine, regenerativne in mehanične sistemske učinke, deluje pa tudi kot regulator telesne topote (Tchkonia in sod., 2013).

Maščobno tkivo sesalcev sestavlja dve funkcionalno različni vrsti maščob – rjavo in belo maščobno tkivo. Rjavo maščevje igra vlogo pri produkciji topote, s termogenezo, ki ni povezana z mišičnimi kontrakcijami, ampak z oksidativno fosforilacijo prostih maščobnih kislin v mitohondriih. Primarna funkcija belega maščevja je shranjevanje energije ter sproščanje hormonov in citokinov, ki modulirajo sistemski metabolizem in razvoj inzulinske rezistence. Deluje pa lahko tudi kot topotni izolator ter kot zaščita organov pred mehaničnimi poškodbami (Hassan in sod., 2012). Maščobno tkivo predstavlja največji endokrini organ, ki poleg maščobnih kislin izloča še prostanoide, holesterol, retinol ter širok spekter signalnih molekul – adipokinov (npr.: leptin, adiponektin, TNF- α , IL-6,...). Porazdelitev maščevja je odvisna od spola, posameznika, starosti in bolezni. Znano pa je, da so nekateri maščobni depoji bolj povezani z dejavniki tveganja za nastanek bolezni. Glavna maščobna depoja sta subkutani in visceralki depo. Visceralki maščobni depo zaokroža notranje organe in ga lahko delimo na omentalni, mezenterični, retroperitonealni (obkroža ledvice), gonadalni in perikardialni maščobni depo. Gluteofemoralni maščobni depo najdemo v spodnjem delu telesa in spada med subkutano maščevje. Maščobna tkiva pa lahko najdemo tudi znotraj mišic (Slika 4) (Bjørndal in sod., 2011; Tchkonia in sod., 2013).



Slika 4: Maščobni depoji pri miši in človeku (prirejeno po Bjørndal in sod., 2011; Tchkonia in sod., 2013). A – Rjavo maščobno tkivo; B – subkutani maščobni depo; C – omentalni maščobni depo; D – mezenterični maščobni depo; E – retroperitonealni maščobni depo; F – gonadalni maščobni depo; G – perikardialni maščobni depo

Figure 4: Fat depots in mouse and human (adapted from Bjørndal et al., 2011; Tchkonia et al., 2013). A – brown adipose tissue; B – subcutaneous adipose tissue; C – omental fat depo; D – mesenteric fat depo; E – retroperitoneal fat depo; F – gonadal fat depo; G – pericardial fat depo

Spremembe v masi adipoznega tkiva so povezane s spremembami endokrinih in metaboličnih funkcij samega tkiva. Tako je na primer povečan volumen in število adipocit pozitivno korelirano z izločanjem leptina, ki je pomemben regulator vnosa in spravila energije ter regulator občutljivosti na inzulin in metaboličnega razmerja. Negativno pa je povečana masa adipocit korelirana s produkcijo adiponektina, tj. hormona, ki zmanjšuje hepatično glukoneogenezo in povečuje oksidacijo lipidov v mišicah (Weisberg in sod., 2003). Nadaljnje obstaja močna pozitivna korelacija med stopnjo zamaščenosti, vrsto maščobnega depoja in številnimi motnjami povezanimi z debelostjo (npr.: hipertenzija, dislipidemija, glukozna intoleranca). Visceralna maščoba je izmed vseh maščobnih depojev najbolj povezana s patologijo debelosti, in sicer predstavlja faktor tveganja za nastanek bolezni srca in ožilja ter diabetesa tipa 2 (Weisberg in sod., 2003; Bjørndal in sod., 2011). Korelira tudi z nastankom inzulinske rezistence. Ker so tu adipocite bolj lipolitično aktivne kot v subkutanem maščevju, povečajo nivo prostih maščobnih kislin v plazmi. Subkutano maščevje je metabolično manj aktivno kot visceralno, vendar ima pomembno vlogo pri akumulaciji trigliceridov v obdobju vnosa odvečne energije ter oskrbuje organizem s prostimi maščobnimi kislinami v času lakote. Po drugi strani pa ima akumulacija maščob v femoralnem maščobnem depaju lahko zaščitno vlogo proti sladkorni in srčno-žilnim obolenjih (Bjørndal in sod., 2011). Različni maščobni depoji imajo tako specifične vloge pri nivoju lipolize in skladiščenju trigliceridov. Medtem ko visceralna maščoba veča tveganje za nastanek bolezni povezanih z debelostjo, ima subkutana maščoba zaščitno vlogo pred lipotoksičnimi učinki.

2.4 GENETIKA DEBELOSTI

Razvoj debelosti je posledica neravnovesja v energijski bilanci. Slednja pa je skupek lastnosti, ki so pod vplivom številnih faktorjev, kot so obnašanje, prehrana, okolje, socialni status, metabolični parametri in genetika (Mathes in sod., 2011). Kompleksne interakcije med vsemi temi spremenljivkami pa prispevajo k razlikam v razvoju debelosti. Vzrok za nastanek debelosti je veliko, in vključuje različne ne-genetske in genetske faktorje.

Porast debelosti po svetu večinoma pripisujejo spremembam v okolju in evolucijskem ozadju. Še vedno pa obstajajo nekatere specifične lastnosti energijske bilance, ki učinkovito ščitijo eno tretjino človeške populacije pred razvojem debelosti (O'Rahilly in Farooqi, 2008, cit. po Albuquerque in sod., 2015). Obstaja veliko študij, ki so v skladu s hipotezo, da genetski profil posameznika vpliva na individualne razlike v predispoziciji za razvoj debelosti. Genetski prispevek (oz. genetsko komponento določene lastnosti) k razvoju debelosti, so sprva osnovali preko študij na enojajčnih (genetsko enakih) in dvojajčnih (skupno le 50 % genetskega materiala) dvojčkih. Rezultati raziskav so pokazali, da se heritabiliteta (tj. delež fenotipske variance med posamezniki zaradi genetskega prispevka) za debelost giblje med 40 in 70 % (Waalen, 2014) kar potrjuje prve hipoteze o relativno velikem genetskem vplivu na razvoj debelosti. Poleg tega, da na razvoj debelosti

v največji meri vpliva genetika posameznika, pa velja, da lahko učinki okolja tudi vplivajo na genetsko ozadje. Slednji imajo lahko učinke tudi na epigenetske mehanizme, ki prav tako prispevajo k heritabiliteti debelosti. V študiji Wang in sod. (2010) so odkrili povezave med statusom metilacije DNA in v levkocitih periferne krvi in debelostjo. In sicer je gen *UBASH3A* kazal višjo stopnjo metilacije, promotorski del gena *TRIM3* pa nižjo stopnjo pri debelih osebkih. Tudi pri genetski različici *FTO*, ki povzroča debelost, so Gemma in sod. (2009) odkrili večjo metiliranost prvega introna ter obstoj interakcij med genetskimi in epigenetskimi faktorji. Številne mikro RNA so bile povezane z regulacijo razvoja debelosti, natančneje, visoko izražene so bile med diferenciacijo adipocit, npr. miR-21 je visoko izražena v adipoznem tkivu ljudi in je pozitivno korelirana z ITM (Keller, 2011, cit. po Albuquerque in sod., 2015).

Debelost se običajno ne deduje po vzorcu enostavnega Mendelskega dedovanja na enem ali dveh lokusih. K razvoju debelosti navadno prispevajo kombinacije večjega števila genskih variant. Večina primerov debelosti je poligena, kar pomeni, da je debelost rezultat delovanja številnih genov, ki so v interakciji s spreminjačim se okoljem. Vsak tak »debelostni« gen ima relativno majhen prispevek k fenotipu, vendar skupaj igrajo pomembno vlogo pri določanju telesne mase in kako telo vzdržuje energijsko ravnotesje. Čeprav je debelost v večini primerov povezana z delovanjem številnih genov, pa obstajajo primeri kjer je vzrok za debelost enogenski (sindromični ali ne-sindromični).

2.4.1 Monogene (enogenska) oblika debelosti

Monogene oblike debelosti nastopijo zaradi redkih mutacij na enem genu in prizadenejo okoli 5 % populacije. Osebki s to obliko debelosti navadno kažejo ekstremne fenotipe s pojavom debelosti že v otroštvu, spremljajo pa jih tudi vedenjske, razvojne in endokrine motnje (Puiu in sod., 2013). Večina mutacij, odgovornih za ta ekstremen fenotip debelosti pa se pojavlja le pri desetih genih, ki so vključeni v signalni poti leptina/melanokortina in igrajo ključno vlogo pri regulaciji vnosa hrane (Mutch in Clement, 2006; Rankinen in sod., 2006). Mutacije v *LEP*, *LEPR*, *POMC*, *PCSK1*, *MC4R*, *BDNF*, *NTRK2* in *SIM1* so odgovorne za 10 % primerov pojava ekstremne debelosti že v otroštvu. Vsi ti geni kodirajo proteine prisotne v signalnih poteh leptina-melanokortina, ki regulirajo vnos hrane in porabo energije. Ena najbolj znanih oblik enogene debelosti je inducirana zaradi drugačno-smiselne mutacije ali mutacije s spremenjenim bralnim okvirjem gena *LEP*, ki povzroča zmanjšanje oziroma pomanjkanje leptina (tj. hormon ključen pri uravnavanju lakote in občutka sitosti) ter s tem pojav ekstremne debelosti že v zgodnjem življenjskem obdobju. Pri sindromični obliki monogene debelosti so osebki klinično debeli, trpijo lahko tudi za mentalno zaostalostjo, telesnimi hibami in nepravilnim delovanjem organov (Puiu in sod., 2013). Večina genov, povezanih s to obliko debelosti je vezanih na center uravnavanja apetita v centralnem živčnem sistemu. Poznanih je več kot 30 motenj, s fenotipom debelosti, ki kažejo vzorec enostavnega Mendelskega dedovanja. Genetske osnove teh

motenj so zelo heterogene. Pri interpretaciji enogenskih oblik debelosti je potrebno poudariti, da je v teh primerih debelost še vedno pogojena s poligeni, le da so pri teh ljudeh ali živalih prisotne določene mutacije s tako velikimi učinki, da jih lahko zaznamo z analizo segregacije po Mendlovem prvem zakonu dedovanja.

2.4.2 Poligena (večgena) oblika debelosti

Ker so kompleksne lastnosti, kot je debelost, pod vplivom večjega števila genov v interakciji z okoljem, in ker so variacije teh genov specifične med osebki, jih je težje preučevati tudi zato, ker so učinki posameznih genov relativno majhni. Preučevanje poligene oblike debelosti temelji na analizah genetskih variacij (SNP-ji, mikrosateliti), ki ležijo blizu ali znotraj kandidatnih genov. Slednji pa se morajo nahajati vsaj blizu ali znotraj kvantitativnega lokusa za določeno lastnost ter imeti po genetski manipulaciji nek fenotipski učinek na to lastnost. Če variacija kandidatnega gena kaže učinke na fenotip pri raziskavah *in vitro* in *in vivo*, jim sledijo še asociacijske povezave z debelostnim fenotipom s študijami primerov s kontrolami v populacijah debelih ljudi in kontrolnih populacijah ali s študijami večjega števila družin (Mutch in Clement, 2006). Obstaja kar nekaj pristopov za detekcijo in analize kandidatnih genov za debelost: analize povezanosti (angl. *linkage studies*), asociacijske študije kandidatnega gena in asociacijske študije na celotnem genomu (GWAS; angl. *genome wide association studies*). Namen teh analiz je preveriti oz. določiti obstoj povezav med neko genetsko varianto in fenotipsko lastnostjo povezano z debelostjo (Albuquerque in sod., 2015).

S principom testiranja povezanosti številnih variant (SNP-ov) z debelostjo oziroma z njim povezanimi lastnostmi, med debelimi in vitkimi osebki, so z raziskavami celotnega genoma uspeli identificirati več kot 52 lokusov povezanih z debelostjo pri človeku. Prvo povezavo so Frayling in sod. (2007) našli v SNP-u znotraj prvega introna *FTO* gena, ki ima zmeren učinek na ITM. Homozigoti za bolezenski alel so v povprečju tehtali 3 kg več kot homozigoti za normalen alel. Sledile so nadaljnje GWAS študije (npr.: v GWAS katalogu asociacijskih študij na celotnem genomu je potrjenih 39 SNP-ov povezanih z debelostjo; <https://www.ebi.ac.uk/gwas/diagram>), v katerih so potrdili obstoj še dveh polimorfizmov v *MC4R* in *TMEM18* genih, tesno povezanih z ITM. Kljub temu je delež pojasnjene variabilnosti ITM z identificiranimi polimorfizmi precej manjši (1-4 %) v primerjavi s heritabiliteto te lastnosti. Najverjetnejši krivec za tako razliko so še neodkriti lokusi povezni s to lastnostjo, kateri imajo zelo majhen učinek nanjo. Tako se za pojasnjevanje teh razlik vse več uporabljajo analize kompleksnih lastnosti na celotnem genomu (GCTA; angl. *genome-wide complex trait analysis*), analize redkih in strukturnih variant, kot tudi epigenetske raziskave.

2.5 MODELI ZA PREUČEVANJE DEBELOSTI

V nasprotju z diskretnimi lastnostmi (npr.: barva oči, prisotnost/odsotnost bolezni), kvantitativne lastnosti (npr.: krvni tlak, nivo lipoproteina z visoko gostoto, teža,...) v populaciji variirajo kontinuirano in so pod vplivom številnih genov, kot tudi interakcij gen- gen in gen-okolje. Večina človeških bolezni, vključujoč debelost, je kompleksnih, zato predstavlja identifikacija genov, odgovornih za te lastnosti, izziv (Peters in sod., 2007). Uporaba modelnih organizmov je ena izmed metod za genetske analize debelosti pri človeku, saj za razliko od človeške populacije, lahko uravnavamo vpliv okolja in genetskega ozadja (Barsh in sod., 2000). Med vsemi modeli, ki se uporablajo za preučevanje faktorjev povezanih z debelostjo, so najbolj razširjeni mišji modeli. Poleg gentske podobnosti s človekom (~99 % vseh genov je enakih) ima miš, kot model za preučevanje debelosti, tudi druge prednosti (Pomp, 1997):

- genetska raznolikost,
- kratek generacijski interval, enostavno inbridiranje, nizki stroški vzdrževanja, možnost načrtovanja paritev in vzreja številčne populacije ter kontrola pogojev okolja,
- zelo dobro razvite baze molekularnih markerjev za genotipizacijo z mikrosatelitskimi označevalci,
- dobra homologija z ostalimi sesalcji.

Kljub podobnosti, pa se lahko fiziološka kontrola porabe energije in distribucije maščob razlikuje med človekom in mišjo. Zaradi podobnosti prehrambene in metabolične fiziologije s človekom predstavlja prašič boljši model za proučevanje debelosti pri ljudeh. Pomanjkanje inbridinga in kontrole pogojev okolja, pa onemogoča pogosteje uporabo prašičev kot modelnih organizmov za identifikacijo kvantitativnih lokusov ter za preučevanje funkcij in uravnavanj kandidatnih genov (Pomp, 1997). Živalski modeli za preučevanje debelosti so lahko razdeljeni v različne kategorije, oziroma glede na preučevane komponente debelosti: od modelov z mutacijami ali modifikacijami enega ali nekaj genov, pa do genetsko nedotaknjениh živali (natančneje opisano v naslednjem poglavju).

2.5.1 Monogeni mišji modeli

Kot že omenjeno so spontane mutacije na enim genu, ki povzročajo debelost, zelo redke. Za identifikacijo le-teh pa mora obstajati velika fenotipska razlika med zdravimi in bolnimi (debelimi) osebkami. Odkrivanje takih mutacij s pomočjo spontanih monogenih in transgenih živalskih modelov za debelost, je pripomoglo k boljšemu razumevanju fiziološke vloge številnih genov, odgovornih za regulacijo distribucije telesnih maščob. »Obese« (Mayer in sod., 1951), »diabetic« (Hummel in sod., 1966), »fat«, »tubby« (Coleman in Eicher, 1990), »agouti« (Bultman in sod., 1992) in »mahogany« (Gunn in sod., 1999) so mišje linije, pri katerih so odkrili prve najpomembnejše enogene mutacije, ki povzročajo izgubo

funkcionalnosti kodirajočega proteina (Brockmann in Bevova, 1992). Poleg mišjih modelov za spontane mutacije, so z uporabo transgenih mišjih modelov odkrili dodatne gene, ki povzročajo spremenjeno regulacijo telesne teže preko hiperfagije ali sprememb v vedenjskih in metaboličnih odgovorih. Do leta 2005 je bilo znanih 284 genov, ki v primeru mutacije ali transgene ekspresije kažejo fenotipske spremembe v telesni teži in zamaščenosti (Rankinen in sod., 2006). Primer takšnega modela je mišja linija z izničenim (angl. *knock-out*) *Pomc* genom, za katero je značilno prenajedanje in razvoj ekstremne debelosti. Podoben fenotip se pojavi tudi pri heterozigotnih miših z eno delijočo kopijo *Pomc* gena, kar nakazuje na nujno prisotnost obeh kopij fukncionalnega gena za pravilno vzdrževanje energijske homeostaze (Yaswen in sod., 1999; Lutz in Woods, 2012). Podobno so v študiji Fischer in sod. (2009) dokazali vpliv gena *Fto* na energijsko homeostazo, preko kontrole porabe energije. Miši z izbitim genom *Fto* (angl. *knock-out*) so imele manj adipoznega tkiva oziroma so kazale fenotip za vitkost, zaradi povečane porabe energije in aktivacije simpatičnega sistema. Nasprotno pa so miši s prekomernim izražanjem gena (angl. *over-expression*) razvile debelost, kot posledica povečanega vnosa krme (Church in sod., 2010). Nepravilno uravnavanje energijske homeostaze pa ni edini vzrok za nastanek debelosti oziroma ohranjanje vitkosti. V študiji Phan in Reue (2005) so pokazali, da miši brez lipina, ki v maščobnem tkivu vpliva na sposobnost adipocit za skladiščenje maščob, razvijejo lipodistrofijo (tj. odsotnost maščobnega tkiva) oziroma debelost v primeru prekomernega izražanja.

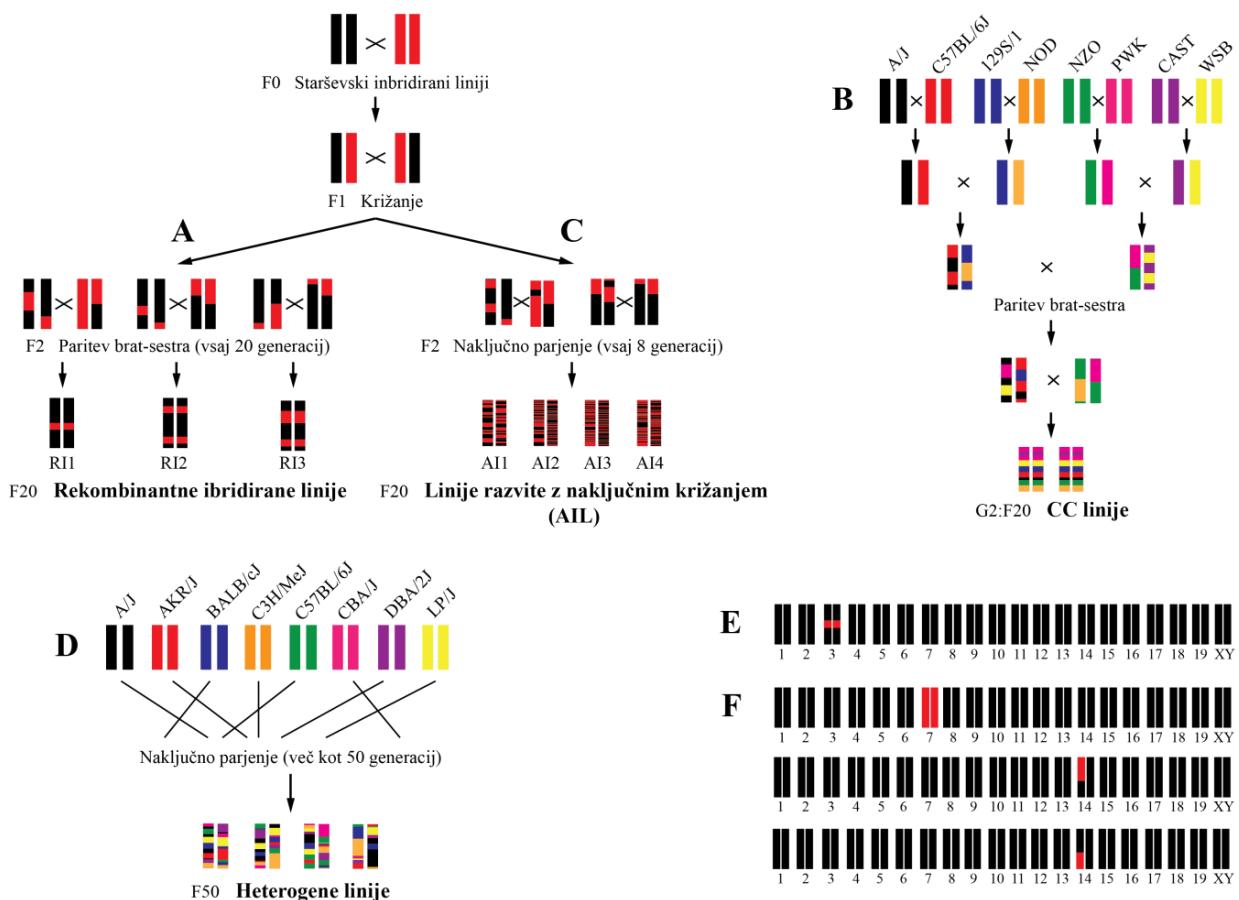
2.5.2 Poligeni mišji modeli

V nasprotju z boleznimi, povzročenimi zaradi okvare enega gena, je večina najpogostejših človeških bolezni poligenih, determiniranih s številnimi kombinacijami genov, ki imajo nanje majhen vendar signifikanten vpliv. Za preučevanje takih kompleksnih lastnosti, kot je debelost, so največkrat uporabljeni poligeni mišji modeli. V nadaljevanju so opisani različni genetski modeli, ki so v uporabi za preučevanje poligene osnove kompleksnih lastnosti, tudi debelosti.

2.5.2.1 Inbridirana mišja linija

Vsa dvajset ali več generacij parjenja brat-sestra je potrebnih, da linija postane inbridirana. Po dvajsetih generacijah so miši genetsko identične (izogene) in homozigotne na vseh lokusih. Obstaja veliko število inbridiranih linij, ki so si genetsko raznolike in fenotipsko specifične. Križanje teh fenotipsko in genetsko različnih inbridiranih linij pa omogoča raziskovalcem odkrivanje kvantitativnih ali kvalitativnih lokusov. Številne inbridirane linije in možnosti križanj le-teh predstavljajo odličen vir tako za preučevanje kompleksnih lastnosti, kot tudi za fiziološka testiranja in razvoj zdravil (Beck in sod., 2000; Peters in sod., 2007). Obstajajo tudi specialne inbridirane liniji kot na primer konsomne linije, ki imajo zamenjan posamezen kromosom na določenem genetskem ozadju. Taki modeli

prispevajo k še večji genetski raznolikosti in dodatnimi možnostmi za raziskovanje (Slika 5):



Slika 5: Tipi inbridiranih mišji linij (prirejeno po Peters in sod., 2007; Flint in Eskin, 2012)

Figure 5: Derivatives of mouse inbred strains (adapted from Peters et al., 2007; Flint and Eskin, 2012)

A) Rekombinantne ibridirane linije (RIL) (Slika 5A)

Rekombinantne inbridirane linije so razvite s križanjem dveh inbridiranih, fenotipsko različnih starševskih linij ter nadaljnjam parjenjem njihovih potomcev med seboj vsaj dvajset generacij. Genom nove inbridirane linije tako predstavlja mozaik starševskega genoma (Broman, 2005). Ena izmed variacij RIL je tako imenovani »Collaborative cross« (Slika 5B). S križanjem osmih različnih inbridiranih linij so razvili približno 1000 rekombinantnih inbridiranih linij z različnimi kombinacijami alelov. Slednje omogoča kartiranje kvantitativnih lokusov z visoko natančnostjo, učinkovito disekcijo epistatskih interakcij in analizo interakcij med geni in okoljem (Pomp, 2005).

B) »Advanced intercross« linije (Slika 5C)

Linije razvite z zaporednimi naključnimi križanji (angl. *Advanced intercross lines*) razvijemo z naključnim in sekvenčnim križanjem populacije, ki prvotno izvira iz križanja

dveh inbridiranih linij. S slednjim dosežemo večjo frekvenco rekombinacij in natančnejše kartiranje kvantitativnih lokusov (Darvasi in Soller, 1995; Pomp, 2005)

C) Heterogene linije (Slika 5D)

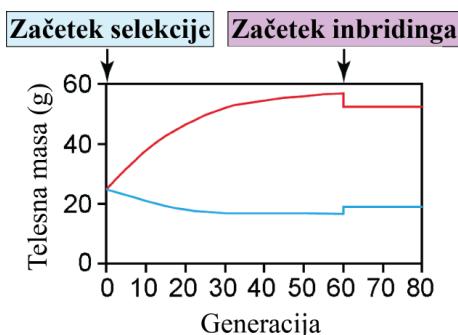
Heterogene linije miši izvirajo iz križanja med osmimi inbridiranimi linijami. Heterogenost ohranajo z naključnim parjenjem (Peters in sod., 2007). V nasprotju z inbridiranimi mišmi, so heterogene miši unikatne in ne nudijo prednosti fenotipa, genotipa in ponovljivosti. Zaradi visoke stopnje rekombinacij in genetske variabilnosti pa predstavljajo odličen material za študije na celotnem genomu (Flint in Eskin, 2012).

D) Kongene linije (Slika 5E)

Kongeno linijo razvijemo s prenosom določenega segmenta genoma iz ene linije na genetsko ozadje druge linije preko več generacij povratnega križanja in selekcije na želen genetski interval. Z njimi lahko preučujemo vpliv točno določenega segmenta (oz. gena) na genetsko ozadje prejemne linije (Pomp, 2005). S takšnimi linijami lahko potrujemo obstoj kvantitativnih lokusov oziroma lahko kvantitativne lokuse razdelimo na krajše interвали (natančneje opredelimo). Drugo različico osnovnih kongenih linij pa predstavljajo linije s kromosomsko substitucijo (konsomične linije; Slika 5F). Pri slednjih se celoten kromosom donorske linije prenese v prejemno linijo. Te linije omogočajo hitre asociacije fenotipa z določenim kromosomom. Nadalje lahko iz teh linij razvijemo sete sub-kongenih linij, ki razdelijo tarčni kromosom na krajše segmente in s tem omogočimo natančnejše pozicioniranje kavzalnega lokusa (Pomp, 2005; Peters in sod., 2007)

2.5.2.1.1 Dolgoročno selekcionirane linije (angl. Long-term derived lines) (Slika 6)

V večini študij se raziskovalci poslužujejo inbridiranih mišjih linij ter iz njih izpeljanih linij. Poleg slednjih pa obstaja še posebna skupina mišjih modelov, razvita z dolgoročno selekcijo glede na različne želene lastnosti oziroma fenotipe (npr.: fenotipi povezani z energijsko bilanco, telesno težo, debelostjo,...) (Pomp, 2005). Kontinuirano selekcioniranje različnih populacij neinbridiranih miši je ustvarilo linije z ekstremnimi fenotipi, pri katerih so se fiksirale variante genov, ki prispevajo k selekcijskim kriterijem. Pri tem principu križamo dve mišji liniji, ki se razlikujeta v fenotipu in molekularnih markerjih. Populacijo F_1 nato parimo v sorodstvu ali povratno križamo z eno od starševskih linij, nastalo F_2 populacijo pa se fenotipizira, genotipizira ter poveže genetske markerje s fenotipom (Brockmann in Bevova, 2002). Tako so na primer nastale linije za vsebnost telesnih maščob (NZO, KK), telesno težo v obdobju mladosti (DU6) ali odraslosti (LG/J, SM/J, P6high, P6low), stopnjo rasti (M16) in izgubo telesne toplotne (MH, ML). Seleksijske linije predstavljajo učinkovit model za testiranje teorij kvantitativne genetike ter za ocenjevanje genetskih parametrov, kot so heritabiliteta in korelacija (Pomp, 2005).



Slika 6: Primer razvoja dolgoročno selekcioniranih linij za telesno maso (prirejeno po Brockmann in Bevova, 2002)

Figure 6: Long-term derived selection lines for body weight (adapted from Brockmann and Bevova, 2002)

2.5.2.2 Poligeni mišji model za debelost in vitkost

Za identifikacijo genetskih in fizioloških osnov debelosti imajo dvosmerno selekcionirane inbridirane linije velik pomen. Za slednje je nujno, da so si za opazovano lastnost zelo različne. V tej doktorski nalogi smo uporabili tovrsten model. S trosmernim križanjem dveh inbridiranih (CBA in JU) in eno neinbridirano (CFLP) linijo, so po več kot 60. generacijah v laboratoriju v Edinburghu razvili inbridirani selekcijski liniji F (»Fat«) in L (»Lean«), ki se razlikujeta v vsebnosti maševja za več kot 4-krat (Sharp in sod., 1984; Bünger in Hill, 1999) ter z ocenjeno heritabiliteto za zamaščenost 0,5. Poligeni liniji predstavljata edinstvena živalska modela primerna za identifikacijo genov zdrave vitkosti oziroma debelosti. Linija F namreč ne razvije debelosti na račun povečanega vnosa krme (oz. hiperfagije), temveč z zmanjšano aktivnostjo in termoregulacijo (Bünger in sod., 2003). Značilno razvije metabolični sindrom ter v povezavi s tem tudi hiperglikemijo, inzulinsko rezistenco, zamaščena jetra in povišan krvni tlak (Morton in sod., 2005). Nasprotno pa je odpornost na razvoj debelosti pri liniji L odgovorna za ugodne metabolne učinke, kot so odpornost na razvoj metabolnega sindroma kljub visokokaloričnem krmljenju, boljšo inzulinsko odzivnost ter glukozno toleranco, povišano periferno termogenezo in izboljšano klinično sliko metabolnih in vnetnih parametrov (Morton, 2005; Bunger, 2003). Raziskava Simončiča in sod. (2008) je pokazala različne strategije obrambe linije L, ko je bila le-ta podvržena visokokalorični krmi. Linija F je povečala aktivnost na tekalnem kolesu, vendar je kljub nespremenjenem vnosu krme pridobivala na telesni masi. Obratno pa so miši linije L zmanjšale vnos krme ter obdržale nivo aktivnosti na tekalnem kolesu in ohranile telesno maso.

2.6 KVANTITATIVNI LOKUS

Fenotipske različice ali variante nastanejo največkrat zaradi vpliva številnih genov (in njihovih genetskih variant) v interakciji z okoljem. Takšne fenotipe imenujemo kvantitativne lastnosti, genomske regije, ki prispevajo k njihovim variacijam pa

kvantitativni lokusi (QTL; angl. *quantitative trait locus*). Kvantitativna lastnost je tako tista lastnost, ki ima merljive fenotipske variacije, kot posledica genetskih in/ali okoljskih vplivov. Analiza QTL-ov omogoča povezovanje kompleksnih fenotipov s specifičnimi regijami kromosomov, z namenom identifikacije genov oz. alelnih variant, z večjim ali manjšim vplivom na opazovane lastnosti. Zaradi potrebe po velikem številu vzorcev in težavnosti opravljanja analiz na človeški populaciji, predstavljajo inbridirane mišje linije boljše orodje za odkrivanje in proučevanje kvantitativnih lastnosti (Srivastava in sod., 2006). Dejstvo, da so mišji in človeški geni razvrščeni »sintencično« in da so QTL-i za neko opazovano lastnost med speciesoma locirani v homologih regijah, omogoča navzkrižno identifikacijo QTL-ov in kandidatnih genov. Ta fenomen so najprej opazili pri preučevanju lastnosti bolezni visokega krvnega tlaka (hipertenzija) ter nadalje pri aterosklerozi, astmi, itd. Tako lahko na primer kavzalni gen, ki se nahaja znotraj določenega QTL-a za neko lastnost ali bolezen, in smo ga identificirali pri miši, najdemo tudi znotraj analognega QTL-a pri človeku (Peters in sod., 2007). V študiji Wang in sod. (2005) so uspeli dokazati, da identificiran gen *Tnfsf4*, znotraj QTL-a *Ath1*, vpliva na rezistenco (tarčna mutacija gena) ali povečano občutljivost (prekomerna ekspresija gena) za razvoj ateroskleroze pri miših ter da je polimorfizem v človeškem homologu *TNFSF4* odgovoren za povečano tveganje za srčni zastoj. Uporaba mišjega modela za diabetes tipa 1 je omogočila asociacijo homologne variacije gena *CTLA-4* pri človeku, s tveganjem za nastanek diabeta tipa 1 in avtoimunih bolezni kot sta Gravesova bolezen in hipoteroidizem (Ueda in sod., 2003).

Takšne študije kartiranja QTL-ov zahtevajo uporabo vsaj dveh linij, ki se med seboj zelo razlikujeta v opazovani lastnosti ter uporabo polimorfnih genetskih markerjev, ki razlikujejo uporabljeni linije med seboj (Miles in Wayne, 2008). Pri tem je pomembno, da se za genotipizacijo živali uporablja markerje, ki ne vplivajo na preučevano lastnost (npr.: molekularni markerji, kot so SNP-i, polimorfne insercije oziroma delekcije, enostavne ponovitve zaporedij DNA (mikrosateliti), polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. *restriction fragment length polymorphism*)). Kartiranje QTL-ov poteka v treh korakih, uspeh le-tega pa je odvisen od heritabilitete opazovane lastnosti, genetske narave (dominanten, recesiven, aditiven) in števila genov, ki vplivajo na to lastnost.

2.6.1 Grobo kartiranje

Starševski liniji, ki se med seboj za opazovano lastnost razlikujeta, križamo med seboj. Heterozigotne potomce F_1 nato ponovno križamo med seboj ali pa parimo z eno od starševskih linij, da razvijemo populacijo F_2 . Slednja vsebuje različne frakcije genoma vsake starševske linije. Vsakega rekombinanta F_2 (oz. rekombinantno linijo) nato fenotipiziramo (npr.: izmerimo telesno težo, maso maščobnih depojev,...) in genotipiziramo z izbranimi polimorfnimi markerji. Z različnimi statističnimi analizami, markerje (oz. intervale med markerji) ovrednotimo za verjetnost asociacije s QTL-i, ki vplivajo na opazovano lastnost. Rezultati so predstavljeni kot graf testa statistične

signifikantnosti v odvisnosti od kromosomske lokacije, ki prikazuje grobo lokacijo QTL-a z relativno velikim intervalom zaupanja (30-50 cM) (Peters in sod., 2007). Ena izmed možnosti zmanjšanja velikosti intervala je uporaba dodatnih polimorfnih markerjev ter povečanje števila živali v populaciji F₂. Slednje navadno zmanjša interval za približno 30 – 50 %, vendar kljub temu tak interval še vedno vsebuje preveliko število genov za nadaljnje analize ugotavljanja kandidatnih genov.

2.6.2 Fino kartiranje

Grobemu kartiranju sledi fino, natančnejše kartiranje za zmanjšanje intervala QTL-a na približno < 1 – 5 cM. Slednje zahteva več rekombinacij, da lahko natančneje opredelimo/ločimo gene, ki vplivajo na kvantitativno lastnost in natančnejšo fenotipizacijo, saj so lahko učinki QTL-ov manjši zaradi zožitve intervala. Najuspešnejše fino kartiranje QTL-ov dosežemo z uporabo križanja linij, ki proizvedejo največ rekombinacijskih dogodkov (npr.: kongene in sub-kongene linije, linije razvite z zaporednimi naključnimi križanji). S seti takih linij, kjer vsaka vsebuje kratek donorski segment na različnih mestih intervala QTL, lahko natančno določimo meje le-tega, kot tudi testiramo posamezen vpliv vsakega kratkega donorskega segmenta (Abiola in sod., 2003).

2.6.3 Identifikacija kandidatnih genov

Končni cilj kartiranja QTL-ov je identifikacija genov z vplivi na preučevane poligene lastnosti in boljše razumevanje njihovih fizioloških in bioloških vlog. Kandidatne gene znotraj intervalov QTL lahko identificiramo in prednostno razvrstimo s klasično reverzno genetiko, to je z različnimi dopolnjujočimi se pristopi (Abiola in sod., 2003; Drinkwater in Gould, 2012):

- Polimorfizmi v kodirajočih ali regulatornih regijah. Z analizo sekvenc med linijami uporabljenimi pri kartiranju QTL-ov lahko ugotovimo razlike (največkrat SNP-je), ki vodijo v spremembe struktur ali regulacije kandidatnih genov. Prav tako lahko z analizo haplotipov SNP še dodatno zmanjšamo intervale QTL-ov in s tem nabor kandidatnih genov.
- Funkcijske analize. Potrebna so testiranja dejanskih vlog in povezav kandidatnih genov s preučevanimi QTL-i (npr.: analiza diferencialnega izražanja kandidatnih genov, bioinformacijska analiza,...).
- *In vitro* funkcijске študije. *In vitro* testi na tkivno-celičnih kulturah morajo biti zasnovani tako, da povzemajo *in vivo* fenotipe, ki so pod vplivom preučevanih QTL-ov. S takšnimi testi lahko na primer analiziramo, kakšne vplive ima zamenjava alelov na izražanje kandidatnega gena in njegovo vlogo pri preučevani kvantitativni lastnosti.
- Transgeni modeli. Modifikacije genov oz. genoma v uporabljenih linijah lahko direktno potrdijo/identificirajo kandidatne gene.

- »Knock-in« in »knock-out« modeli. Modeli z izbitim (angl. *knock-out*) ali vključenim oziroma zamenjanim genom (anlg. *knock-in*) na odseku preučevanega QTL-a bi morala modificirati ali spremeniti kvantitativno lastnost.
- Homolognost med vrstami. Genoma človeka in miši sta si zelo podobna v funkcionalno pomembnih regijah. Tudi na ta način lahko odkrijemo QTL-e in vzročne kandidatne gene glede na homologijo med vrstama.
- Analiza mutacij. Z induciranimi mutacijami (tehnike mutageneze) specifičnih genov znotraj QTL-a, lahko spremljamo spremembe ki nastanejo v kvantitativni lastnosti. S tem lahko ugotavljamo povezave gen-specifičnih mutacij in njihovimi vplivi na izražanje kvantitativnih lastnosti.

2.6.4 Primeri kartiranja QTL-ov in identifikacija kandidatnih genov z vplivom na debelost

S križanjem standardne inbridirane mišje linije C57BL/6J ter divje neinbridirane linije SPRET/Ei so v študiji Diament in sod. (2004) razvili kongeno linijo, ki je na 2. kromosому vsebovala 27 Mb dolg donorski segment linije SPRET/Ei in kartira v QTL *Bsbob*. Homozigotne miši za donorski segment so imele zmanjšano telesno težo in izboljšane fenotipske lastnosti povezane z debelostjo. Nadaljnji razvoj in natančnejše kartiranje sub-kongenih mišjih linij s krajsimi SPRET/Ei donorskimi segmenti je v raziskavi Chiu in sod. (2007) omogočil odkritje regije (~7,4 Mb) z učinkom na zmanjšanje telesne teže in maščevja ter zmanjšanje adipoznega indeksa v primerjavi s homozigoti za alel C57BL/6J. Primerjava izražanja genov med starševskima linijama je pokazala diferencialno izražanje gena *Pcsk2* (angl. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 2*), ki kartira v kratek donorski segment. Encim kodirajoči gen *Pcsk2* je vključen v procesiranje neviroendokrinskih prokurzorjev za produkcijo aktivnih hormonov in neuropeptidov (kot so inzulin in glukagon). Njegovo zmanjšano izražanje v možganskem tkivu homozigotne kongene linije za SPRET/Ei alel, bi tako lahko vplivalo na energijsko bilanco in metabolizem ter posledično tudi na nastanek debelosti.

Primer QTL-a *tabw2* na 6. kromosому z vplivom na povečano telesno težo, so odkrili v študiji Kim in sod. (2005., cit. po Stewart, 2012) pri križanju poligenega mišjega modela za diabetes tipa 2 TallyHo in inbridirane linije C57BL/6J. Razvita homozigotna kongena linija z donorskim segmentom TallHo, ki kartira v *tabw2* QTL, je pri krmljenju s standardno krmo imela malo, vendar signifikantno povečano telesno težo, maso telesne maščobe ter nivo leptina v plazmi, v primerjavi s kontrolo. Razlike so se dodatno povečale, ko so živali krmili s krmo z visokim deležem maščob in saharoze. Pojavila so se tudi bolezenska stanja (hiperleptinemija, hiperinzulinemija, slaba glukozna toleranca ter zmanjšan vnos glukoze v adipozno tkivo), ki spremljajo debelost. Da ima 6. kromosom pri miših močan vpliv na debelost, dokazuje dejstvo, da so na kromosomu identificirali številne QTL-e povezane z debelostjo. Ena takih študij je raziskava Yazbek in sod. (2011),

v kateri so namesto dveh divergentnih inbridiranih linij uporabili mišji model za metabolične bolezni inducirane z dieto izmed linij z zamenjanimi kromosomi. Iz slednjih so nadaljnje razvili kongene, sub-kongene ter sub-sub-kongene linije, kjer so z genotipiziranjem in fenotipiziranjem le-teh uspeli identificirati fenotipsko heterogene, vendar v bližini ležeče si kvantitativne lokuse na 6. kromosomu. Fokusirali so se ne *Obrq2*, ki ima vpliv na z dieto inducirano debelost in glukozno homeostazo. Natančnejše kartiranje slednjega pa je pokazalo štiri krajše sub-QTL-e z vplivom na debelost, inducirane preko diete. *Obrq2a* je izmed vseh štirih imel največji vpliv na telesno težo. Razvili so sub-sub-kongene linije, na katerih so lahko bolj natančneje ocenili genotipsko in fenotipsko kompleksnost preučevanega QTL-a. Znotraj slednjega so odkrili 6 krajših sub-sub-QTL-ov. Ker je *Obrq2a1* vseboval najmanjše število genov so ga v študiji izbrali za identifikacijo kandidatnih genov povezanih s telesno težo in nivojem glukoze. Analiza DNA sekvence in ekspresije genov znotraj omenjenega QTL-a v relevantnih tkivih (jetra, mišice, belo maščevje, trebušna slinavka) je pokazala diferencialno izražanje gena *Slc35b4* v jetrih. Tkvno specifična spremenjena ekspresija tega gena v jetrih bi tako lahko vplivala na inzulinsko rezistenco in glukoneogenezo. Kot že prej omenjeno, se na 6. mišjem kromosomu nahajajo številni različni, prekrivajoči se kvantitativni lokusi povezani z debelostjo, ki so jih odkrili v študijah s križanjem različnih inbridiranih linij. V primeru prekrivanja kvantitativnih lokusov s podobnimi učinki, na poziciji identificiranega kandidatnega gena, lahko sklepamo, da je slednji lahko vključen v razvoj debelosti tudi pri drugih mišjih modelih oziroma linijah.

Eden izmed mišjih modelov, ki razvije poligeno obliko debelosti, inzulinsko rezistenco in dislipoproteinemijo je linija »New Zealand Obese« (NZO). Da bi identificirali segmente na kromosomih, povezanih z omenjenimi kompleksnimi lastnostmi, so v študiji Vogel in sod. (2009) križali NZO miši z vitko in diabetes-rezistentno linijo C57BL/6J. Identificiran kvantitativni lokus *Nob3* na 1. kromosому je povzročil signifikantne razlike v telesni teži kongenih linij (~13 g v 22. tednu starosti). *Nob3* pokriva > 40 cM dolgo regijo na 1. kromosomu, z dvema jasnima vrhovoma, ki ustrezata dvema manjšima QTL-oma. Homozigoti z aleli NZO za segment *Nob3.38* (38 Mbp dolg distalni del QTL-a) so imeli signifikantno višjo telesno težo in več telesne maščobe. Prav tako so nosilci alela NZO imeli značilno večje adipocite, povisano izražanje gena *Lep* ter spremenjeno termogenezo. Nadaljnje fino kartiranje *Nob3.38* z uporabo dodatnih kongenih linij z različno dolgimi segmenti QTL-a (Vogel in sod., 2012), je pokazalo 2,2 Mbp dolg segment znotraj preučevanega lokusa, ki je imel vpliv na telesno težo. Z analizo diferencialnega izražanja genov znotraj te kratke regije, so uspeli identificirati kandidatni gen *Ifi202b*, ki se izraža pri kongenih miših z aleli NZO. Zaradi mikrodelecije prvega eksona in 5' regije pa gena niso zaznali pri C57BL/6J miših. Pri kongenih miših, ki izražajo gen *Ifi202b* so z analizo transkriptoma zaznali indukcijo gena *11β-Hsd1* (angl. *11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1*), ki kodira encim, čigar funkcija je pretvorba kortizola v neaktivni metabolit kortizon v metaboličnih tkivih. Prevelika vsebnost kortizola pa lahko vodi v debelost. Tudi

represija gena *Ifi202b* v adipocitih 3T3-L1 je pokazala znatno inhibicijo ekspresije *11β-Hsd1*, nasprotno pa je prekomerna ekspresija kandidatnega gena signifikantno povišala nivo izražanja *11β-Hsd1*. Tudi človeški ortolog *IFI* je bil povišan v visceralem maščobnem tkivu debelih ljudi. V študiji so tako znotraj *Nob3.38* uspeli potrditi vpliv mikro delecije pri kandidatnem genu, ki povzroči inhibicijo ekspresije *11β-Hsd1* in aktivacijo glukokortikoidov v adipoznem tkivu ter s tem zaščito pred debelostjo pri miši liniji C57BL/6J.

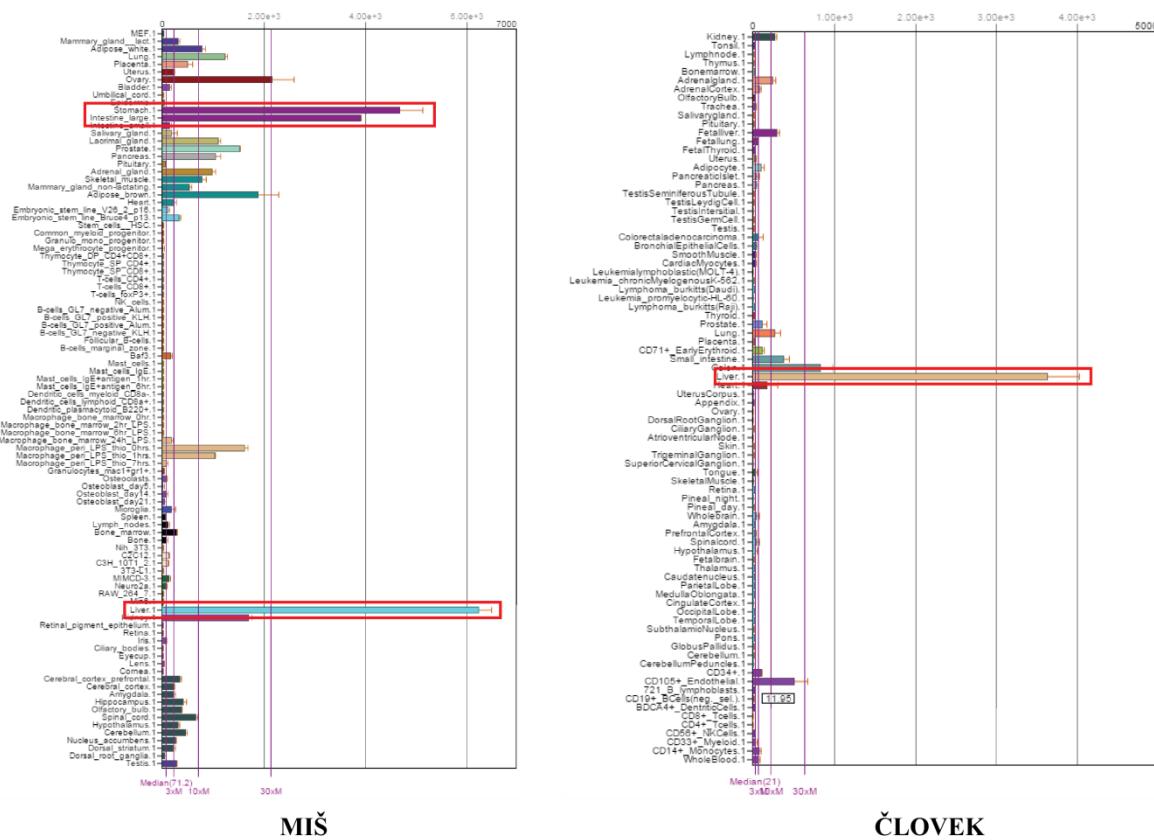
Analiza kvantitativnih lokusov v študiji Ishikawa in Okuno (2014), kjer so za kartiranje QTL-ov križali inbridirano linijo C57BL/6J in divjo linijo *M.m. Castaneus*, je odkrila 3 lokuse; *Pbwg1.12* z vplivom na rast, *Pbwg1.3* z vplivom na telesno dolžino ter *Pbwg1.5* z vplivom na debelost. Alel, ki izvira iz divjega tipa miši vpliva na povečano rast in daljše telo ter na zmanjšano maso maščevja. Presek rezultatov bioinformacijske analize in analize sekvenciranja eksonov genov znotraj identificiranih kvantitativnih lokusov je omogočil prioritizacijo kandidatnih genov. Glavna kandidata znotraj *Pbwg1.5* sta tako bila *Ly75* in *Hgb6*. Prvi kandidatni gen kodira membranski protein, ki deluje kot endocitični receptor na dendritičnih celicah in epitelnih celicah prizeljca, kjer usmerja ujete antigene in zunajceličnega prostora v specializiran del za procesiranje antigenov. Podenota integrin $\beta 6$ kodira gen *Hgb6*. Ta podenota heterodimerizira z podenoto αv , s katero se vežeta in aktivirata latentni transformirajoči rastni faktor β . Spremembe v genih *Ly75* in *Hgb6* (Guo in sod., 2000; Huang in sod., 1996) vplivajo na nastanek vnetnih bolezni. Znano je, da tudi visokokalorična prehrana (Caspar-Baugvir in sod., 2005; Radonjic in sod., 2009) lahko sproži inzulinski odgovor preko vnetja v številnih organih in tkivih, kot so jetra in maščevje. Zatorej Ishikawa in Okuno (2014) menita, da *Ly75* in *Hgb6* predstavljata močna kandidatna gena znotraj kvantitativnega lokusa *Pbwg1.5*, ki deluje zaščitno proti nastanku debelosti, ko so miši podvržene standardni ali visokokalorični krmi.

2.6.5 Kvantitativni lokus *Fob3b2*

Preučevani kvantitativni lokus *Fob3b2* je bil najprej detektiran znotraj grobo kartiranega lokusa *Fob3* na heterogeni populaciji F2, pridobljeni s križanjem divergentno selekcionirane vitke (L) in debele (F) linije (Horvat in sod. 2000). Analizo QTL-ov z vplivom na debelost so opravili z metodo intervalnega kartiranja, z uporabo 71 polimorfnih markerjev, razporejenih enakomerno čez celoten genom. Odkrili so štiri signifikantne QTL-e *Fob1*, *Fob2*, *Fob3* in *Fob4* (angl. *F-line obesity QTL*) na 2., 12., 15. In X. kromosому z aditivnim učinkom na odstotek telesnih maščob. Izmed vseh je *Fob3* imela najvišjo LOD vrednost (LOD = 11,3) ter največji učinek na zamaščenost, z 14,4 % pojasnjeno fenotipsko varianco pri F₂ populaciji. Odstotek maščob se je pri živalih F₂, homozigotih za alel F v *Fob3* segmentu, povečal za kar 4,62 % v primerjavi s homozigoti za vitko linijo za odsek *Fob3*. Poleg *Fob3* kartirajo v isto regijo tudi drugi kvantitativni lokusi, odkriti s križanjem različnih mišjih linij: *Pfat* (križanje M16 in Cast/Ei; Pomp, 1997)

in *Dob3* (križanje AKR/J in SWR/J; West in sod., 1994). Z namenom nadaljnjega preučevanja lokusa *Fob3* so Stylianou in sod. (2004) razvili 3 dodatne kongene linije, ki so na genetskem ozadju linije F vsebovale različno dolge donorske segmente linije L za regijo *Fob3* na 15. kromosому. Dodatno število polimorfnih markerjev je poleg razvitih kongenih linij omogočilo identifikacijo dveh krajših QTL segmentov. *Fob3a* (27 cM) in *Fob3b* (68cM) imata oba aditivni učinek na lastnosti, značilne za debelost. Učinek lokusa *Fob3a* postane signifikanten šele pri 42. dnevu starosti, medtem ko so razlike med genotipi za lokus *Fob3b* značilne že pri odstavitevi mladičev (tj. pri 21. dnevu starosti).

V študiji Prevoršek in sod. (2010) so s finim kartiranjem lokusa *Fob3b*, in sicer s fenotipizacijo in genotipizacijo osmih kongenih linij, ugotovili obstoj vsaj dveh ločenih QTL-ov (*Fob3b1* in *Fob3b2*). Krajsa lokusa kažeta aditivni efekt. Tako alel, ki izvira iz vitke linije za segment *Fob3b1* in *Fob3b2*, zmanjšuje oziroma izboljšuje lastnosti povezane z debelostjo. S finim kartiranjem so tako uspeli daljši *Fob3b* lokus (22,39 Mbp) razdeliti na dva krajsa, *Fob3b1* (4, 98 Mbp), z večjim (vpliv QTL-a na adipozni indeks je 1,22 %), in *Fob3b2* z manjšim (vpliv QTL-a na adipozni indeks je 0,77 %) učinkom na zamaščenost pri miših. Tako so se na primer v kongeni liniji M, ki se od osnovne/starševske F linije razlikuje le v segmentu *Fob3b2*, razlike med genotipi kazale le pri populaciji F_2 , ki pa se pri primerjavi med homozigoti linije M z osnovno linijo niso izkazale za signifikantne (Prevoršek in sod., 2010a). To nakazuje na majhne, vendar značilne vplive manjšega segmenta *Fob3b2*. QTL je bil izbran kot predmet obravnave v pričujoči študiji zato, ker so preliminarne genetske in fiziološke študije nakazovale, da ima lokus *Fob3b2*, ki se deduje od vitke linije, učinek na vitkost oziroma zmanjšano nalaganje maščevja (Morton in sod., 2016). Za identifikacijo kandidatnega gena z vplivom na vitkost, specifičnega za adipozno tkivo, so opravili analizo na podatkih transkriptoma debele in vitke linije. Samo en gen, tiosulfat sulfurtransferaza (*Tst*; angl. *thiosulfate sulfurtransferase*), lociran na 15. kromosomu, znotraj *Fob3b2* regije, je ustrezal vsem postavljenim kriterijem: nivo mRNA je moral biti najmanj 2-krat višji pri vseh maščobnih depojih vitke linije proti debeli liniji, vendar nespremenjen v ostalih metaboličnih tkivih ter kandidatni gen se je moral nahajati znotraj 95 % intervala zaupanja preučevanega kvantitativnega lokusa (Morton in sod., 2016). *Tst* gen kodira encim, lokaliziran v mitohondrijskem matriksu, kjer katalizira konverzijo tiosulfata in cianida v tiocianat in sulfit. Protein v interakciji s 5S ribosomalno RNA olajšuje njen uvoz v mitohondrije. Pri miših je visoko izražen v jetrih, želodcu in debelem črevesju, medtem ko je pri človeku močno izražen le v jetrih (Slika 7).



Slika 7: Izražanje gena *Tst* pri miši in človeku v različnih tkivih (BioGPS, 2015)

Figure 7: Expression of *Tst* gene in defferent tissues of mouse and human (BioGPS, 2015)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 NATANČNEJŠE KARTIRANJE KVANTITATIVNEGA LOKUSA *Fob3b2*

3.1.1 Sub-kongena linija M2

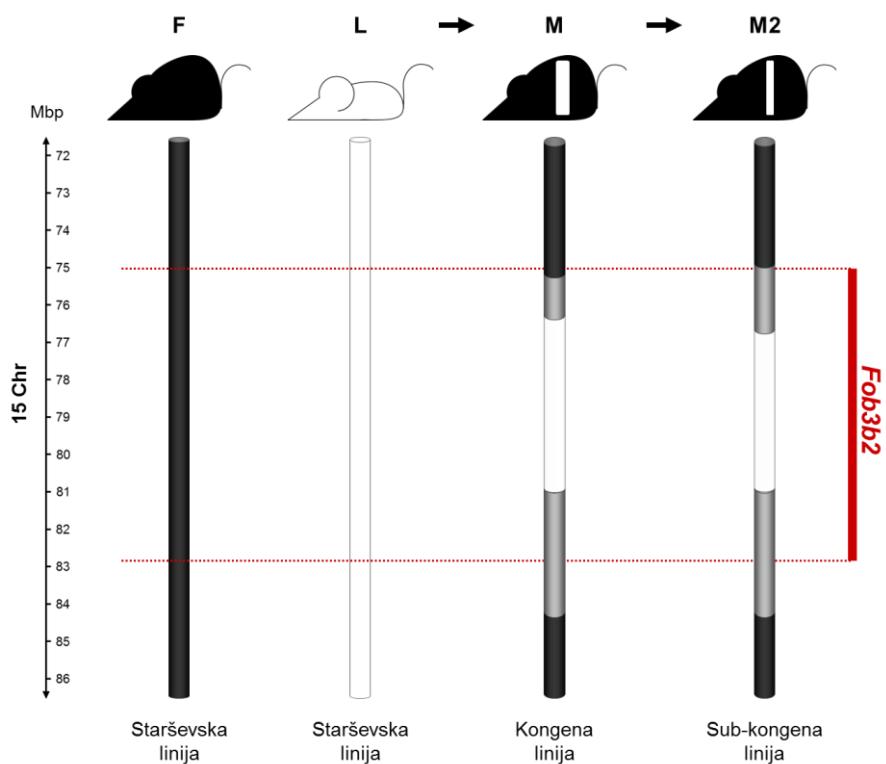
V poskusu natančnejšega kartiranja kvantitativnega lokusa *Fob3b2* so bile vse miši vzrejene v vzrejnem centru za poskusne živali Oddelka za zootehniko na Biotehniški fakulteti. Živali so bile ob odstavitevi, pri starosti treh tednov, ločene po spolu in nameščene po štiri v individualno prezračevane kletke (Techniplast Inc., Italija) do starosti 16 tednov, s predpisanim načinom vzdrževanja (12h teme – 12h svetlobe, $21 \pm 2^\circ\text{C}$, 40 – 70 % vlažnost). Ločene so bile na dve skupini, prva je bila krmljena s standardno vzdrževalno krmo za glodavce (1324, Altromin, Nemčija) in je služila kot kontrolna skupina, druga pa s krmo z visoko vsebnostjo maščob (angl. *high fat diet*; HFD) (D12108C, Research Diets, ZDA), s katero smo povečali relativno majhen fenotipski učinek kvantitativnega lokusa *Fob3b2* na nalaganje maščevja (Preglednica 1). Vsi postopki so bili opravljeni v skladu z evropskimi pravili dela z laboratorijskimi živalmi. Poskus je odobrila Uprava republike Slovenija za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin na Ministrstvu za kmetijstvo in okolje, odločba št. U34401-11/2013/2.

Preglednica 1: Sestava krme z visokim deležem maščob s 1,25 % holesterola D12108C

Table 1: High Fat Diet with 1,25 % Cholesterol D12108C

Sestava	kcal%
Proteini	20
Ogljikovi hidrati	40
Maščoba	39,9
Skupaj	100
Sestavine	kcal
Kazein, mlečen	800
L-Cistin	12
Koruzni škrob	848
Maltodekstrin 10	284
Saharoza	452
Celuloza, BW200	0
Sojino olje	225
Kokosovo maslo	1395
Mineralna meščanica S10021	0
Dikalcijski karbonat	0
Kalcijev karbonat	0
Kalijev citrat	0
Vitaminska meščanica V10001	40
Holin Bitartrat	0
Holesterol	0
Modro barvilo, FD&C #1	0
Rumeno barvilo, FD&C #5	0
Skupaj	4056

Z dvosmerno selekcijo na višjo in nižjo vsebnost maščobe v telesu, so na Univerzi v Edinburgu razvili debelo (angl. *Fat*; F) in vitko (angl. *Lean*; L) linijo miši, ki predstavlja model za preučevanje genetike najpogosteje oblike večgenske debelosti in vitkosti, ki se pojavlja pri ljudeh in živalih. Analiza kartiranja QTL pri križanju med F in L linijo je pokazala štiri signifikantne kromosomske regije z geni, ki vplivajo na delež maščob, *Fob1*, *Fob2*, *Fob3*, in *Fob4* na 2., 12., 15. in X kromosomu (Horvat in sod., 2000). Znotraj QTL-a *Fob3* (z velikim vplivom na vsebnost maščob in z močno statistično podporo) so v nadaljnjih raziskavah (Stylianou in sod., 2004) z grobim genetskim kartiranjem odkrili še dve regiji, *Fob3a* in *Fob3b*. Prevoršek in sod. (2010a) so opravili genetsko študijo intervala *Fob3b* z analizo fenotipov kongenih linij ter dokazali, da QTL sestavlja dva manjša, *Fob3b1* (4,98 Mbp) in *Fob3b2* (7,68 Mbp) z večjim ter manjšim učinkom na nalaganje maščevja. Tako so se na primer v preučevani kongeni liniji M (od osnovne F linije se razlikuje samo v segmentu *Fob3b2*) razlike med genotipi pokazale le pri populaciji F₂, ki pa se pri primerjavi med homozigoti linije M z osnovno linijo, niso izkazale za signifikantne. To nakazuje na majhne, vendar značilne vplive manjšega segmenta *Fob3b2*. Slednji je bil izbran kot predmet obravnave v pričujoči raziskovalni nalogi zaradi preliminarne genetske in fiziološke študije, ki nakazuje, da ima odsek *Fob3b2*, ki se deduje od vitke linije L učinek na vitkost oziroma zmanjševanje nalaganja maščevja (Morton in sod., 2016). V doktorski nalogi smo s križanjem kongene linije M in osnovne, starševske linije F razvili sub-kongeno linijo M2, ki vsebuje majhen odsek lokusa *Fob3b2* (~ 2 Mbp) (Slika 8). Heterozigotne potomce za tarčni genomske odsek smo parili med seboj in s tem pridobili populacijo F₂, na katerih smo preučevali razlike v fenotipih.



Slika 8: Genetska struktura debele (F), vitke (L), kongene M in sub-kongene M2 linije za QTL *Fob3b2* na 15. kromosomu

Figure 8: The genetic map of the *Fob3b2* QTL region on Chr 15 for Fat (F), Lean (L), congenic M and sub-congenic M2 lines

3.1.2 Genotipizacija živali

Živalim smo določali genotipe z mikrosatelitskimi označevalci na 15. kromosomu, okrog *Fob3b2*. Lizate odščipnjenih tkiv ušes smo razredčili z destilirano vodo v razmerju 1:9 in uporabili kot genetski material za verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*) (prirejeno po Laird in sod., 1991; Preglednica 2).

Preglednica 2: Reagenti in priprava lizatov iz odščipnjenih tkiv mišjih ušes
Table 2: Procedure for preparing lysates from clipped tissues of mouse ears

1. korak (Material in reagenti)	2. korak (Inkubacija)	3. korak (Deaktivacija proteinaze K)	4. korak (centrifugiranje vzorcev)
<ul style="list-style-type: none"> • Ušesno tkivo miši • 60 µl pufer za lizo (1M Tris-HCl pH=8,3, 0,5 M EDTA, 20 % SDS, 5 M NaCl) • 0,3 µl Proteinaza K (10 mg/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> • 55 °C za minimalno 4 h ali čez noč 	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C za 10 min 	<ul style="list-style-type: none"> • 6000 g za 2 min

Za vsak par nukleotidov smo optimizirali pogoje reakcij PCR (Preglednica 3). Pripravljene PCR mešanice redčenih lizatov in reagentov za vsak mikrosatelitski označevalcev posebej, smo inkubirali na PCR ploščicah (Thermoquick PCR-Plate 96-well; Greiner Bio-One) v aparatu za PCR (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems). Produkte reakcij smo ločili na 4 % agaroznem gelu (SeaKem LE agarose, Lonza) v 0,5 pufru TBE, kateremu je bil dodan etidijev bromid (20 µL/l TBE pufra).

Preglednica 3: Mikrosatelitski genetski označevalci, uporabljeni pri genotipizaciji sub-kongene M2 linije ter reagenti in pogoji PCR reakcije za vsak par oligonukleotidnih označevalcev

Table 3: PCR mix and cycling condition optimized for microsatellite marker pairs, used in M2 sub-congenic line genotyping

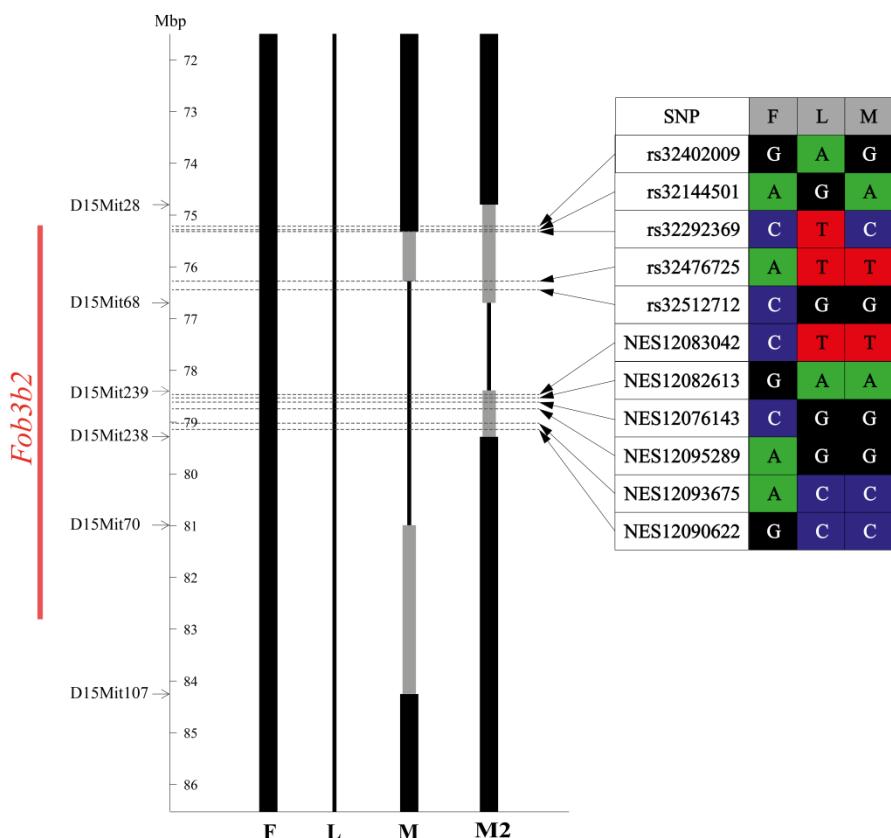
Oligonukleotidni par	Sekvenca ¹ (5'-3')	Bp ^{1,2}	Pogoji
D15Mit28 - smerni - protismerni	ATACACACGCACCCCCATAT CACCCTGACCAATGAGCC	74915354 74915517	1.
D15Mit68 - smerni - protismerni	TTCCATGTGAGTTCCAAGCA GAAC TGCCATT CAGAAAT ATTGG	76910182 76910293	1.
D15Mit239.2 - smerni - protismerni	CACCCCTCCACAACAAACACA AGCTTGCCAGCCCCTAAAT	78576820 78576920	1.
D15Mit238 - smerni - protismerni	AAGCATAAAACCAGACTAAGAGAAC TAGACCTTCCCATAAATATCATCTC	79269828 79269948	2.
Pogoji	PCR mešanica	Program pomnoževanja DNA	
1.	<u>Količina reagenta / vzorec:</u> 1,42 µl diH ₂ O 1 µl pufer (Taq buf +(NH ₄) ₂ SO ₄ – MgCl ₂) 1 µl MgCl ₂ (25 mM) 1 µl dNTP (2 mM) 0,25 µl smerni začetnik (10 µM) 0,25 µl protismerni začetnik (10 µM) 0,08 µl polimeraza ³ 5 µl gDNA (5 ng/µl)	95 °C 95 °C 62 °C 72 °C 94 °C 58 °C 72 °C 72 °C 4 °C	3 min 1 min 1 min 5 ciklov 1 min 15 s 30 s 30 ciklov 30 s 7 min ∞
2.	<u>Količina reagenta / vzorec:</u> 8,4 µl diH ₂ O 4 µl HF buffer 0,4 µl dNTP (10 mM) 2,5 µl Levi primer (10 µM) 2,5 µl Desni primer (10 µM) 0,2 µl polimeraza ⁴ 2 µl gDNA (5ng/µl)	98 °C 98 °C 60 °C 72 °C 72 °C 10 °C	30 s 7 s 30 s 35 ciklov 1 min 10 min ∞

¹ Mouse Genome Informatics, 2015; ² Lokacija mikrosatelitskega genetskega označevalca v Bp; ³ Taq DNA Polymerase, ThermoFischer Scientific; ⁴ Phusion High-Fidelity PCR kit, ThermoFisher Scientific

¹ Mouse Genome Informatics, 2015; 2 Microsatellite marker location in Bp; 3 Taq DNA Polymerase, ThermoFischer Scientific; 4 Phusion High-Fidelity PCR kit, ThermoFisher Scientific

3.1.3 Označevalci SNP sivih con subkongenega segmenta (polimorfna mesta)

Med polimorfizmi, identificiranimi s sekveniranjem 15. kromosoma F, L in M mišje linije na The Jackson Laboratory (ZDA), smo izbrali tiste, ki kartirajo v sive (ne-genotipizirane) cone kvantitatvinega lokusa *Fob3b2* sub-kongene linije M2 ter s katerimi bo mogoče določiti meje zamenjave donorskoga segmenta (Slika 9)(rs32292369, rs32476725 in NES12090622).



Slika 9: Polimorfizmi, identificirani s sekveniranjem 15. kromosoma F, L in kongene M linije na The Jackson Laboratory (ZDA)

Figure 9: SNP symbols and genotypes identified on Chr 15 by sequencing F, L and congenic M line in The Jackson Laoratory (USA)

DNA smo izolirali (NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel) iz jeter miši, po dva vzorca na vsak genotip iz F_2 populacije sub-kongene linije M2. Vzorce produktov PCR za vsak izbran par označevalca SNP (Preglednica 4), smo v primernih koncentracijah in količinah (100 ng/ μ l neociščenega produkta PCR, minimalen končen volumen 30 μ l in 10 pmol/ μ l oligonukleotidi s končnim volumnom 20 μ l na 5 vzorcev) poslali na standardno Sanger sekveniranje (Standard-seq single z aparatom Applied Biosystems 3730XL, Macrogen Inc., Nizozemska). Rezultate smo obdelali s prosto dostopnim programom za poravnavanje sekvenc Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5 (MEGA 5, Tamura in sod., 2011).

Dobljene elektroferograme sekvenc smo pregledali za morebitne artefakte in nepravilnosti pri avtomatskem določanju sekvenc. Nadaljnje smo sekvence poravnali glede na referenčno (C57BL6/J; Ensembl verzija 67). Identificirane alele SNP-jev smo primerjali z že znanimi aleli živali linij F, L in M ter določili meje donorskega segmenata pri M2 homozigotih za vitko linijo.

Preglednica 4: SNP označevalci, uporabljeni za natančnejše kartiranje mej donorskega segmenta pri sub-kongeni M2 liniji ter reagenti in pogoji PCR reakcije za vsak par oligonukleotidnih označevalcev

Table 4: PCR mix and cycling condition optimized for SNP marker pairs, used for fine mapping of the M2 sub-congenic line

Oligonukleotidni par	Sekvenca ¹ (5'-3')	Bp ^{1,2}
rs32292369 - smerni - protismerni	CTGATACAAGTTGGCGCAA AGTGGATGTGCTCAGCTTC	75260126
rs32476725 - smerni - protismerni	GAGGGGAGGGAGTGTTATG CGTCCCTACAGCTCCTCATC	76375640
NES12090622 - smerni - protismerni	AAAGGAAGAGGAAGGCCACCA TGCCACTCTTGCTTCCAT	79166594
PCR mešanica³		Program pomnoževanja DNA
<u>Količina reagenta / vzorec:</u>		95 °C 3 min
1,42 µl H ₂ O		95 °C 1 min
1 µl pufer (Taq buf + (NH ₄) ₂ SO ₄ – MgCl ₂)		62 °C 1 min 5 ciklov
1 µl MgCl ₂ (25 mM)		72 °C 1 min
1 µl dNTP (2 mM)		94 °C 15 s
0,25 µl smerni začetnik (10 µM)		58 °C 30 s 30 ciklov
0,25 µl protismerni začetnik (10 µM)		72 °C 30 s
0,08 µl Phrmentas polimeraza		72 °C 7 min
5 µl gDNA (5ng/µl)		4 °C ∞

¹Ensembl verzija 67; ²Lokacija SNP označevalca v Bp, ³Taq DNA Polymerase, ThermoFischer Scientific

Ensembl version 67; ²SNP marker location in Bp, ³Taq DNA Polymerase, ThermoFischer Scientific

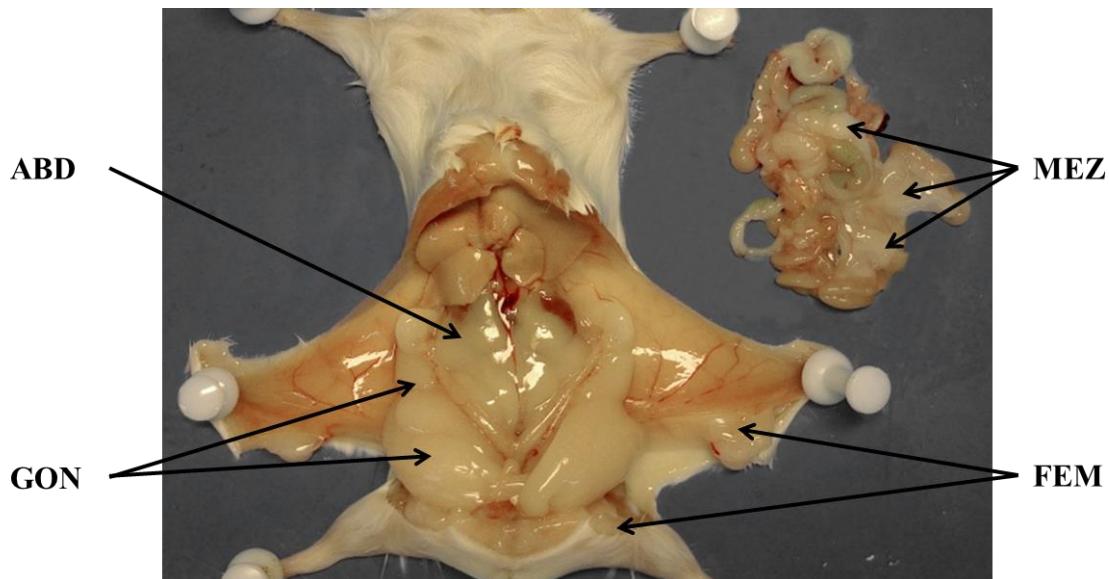
3.1.4 Analiza fenotipov

3.1.4.1 Zbiranje maščobnih depojev

Analizo smo opravili na živalih F₂ sub-kongene mišje linije M2 obeh spolih. Živali so bile razdeljene na dve skupini – kontrolno, krmljena s standardno krmo in HFD, krmljena s krmo z visokim deležem maščob. Živali smo tehtali pri starosti 3., 5., 6., 8., 10., 12., 14., in nazadnje pri 16 tednih, ko smo jih usmrtili s cervikalno dislokacijo. Vzorec krvi smo odvzeli iz vratnih ven ter jo na 6000 obratih centrifugirali za 15 min pri temperaturi 4 °C in s tem pridobili krvno plazmo. Odvzem in tehtanje abdominalnega (ABD), gonadalnega (GON), femoralnega (FEM) in mezenteričnega (MEZ) maščobnega depoja smo opravili po

postopku opisanem v Prevoršek (2010b) (Slika 10). Vsaki živali smo odvzeli tudi košček jeter, femoralne in gonadalne maščobe in jih shranili na -76 °C za nadaljnje analize. Adipozni indeks (angl. *adiposity index*; ADI) smo izračunali iz vsote mas vseh zbranih maščobnih depojev po enačbi 1:

$$ADI = 2*(ABD + EPI + FEM) + MES \quad \dots (1)$$



Slika 10: Maščobni depoji, odvzeti za fenotipsko analizo učinka QTL-a *Fob3b2* na vitkost pri sub-kongenici mišji liniji M2

Figure 10: Fat depots collected for phenotypic analysis of QTL *Fob3b2* effect on leanness in sub-congenic M2 mouse line

3.1.4.2 Analiza fenotipskih podatkov

Zbrani fenotipski podatki so nakazali normalno porazdelitev vsake analizirane spremenljivke, zato smo uporabili statistični model (Enačba 2), z multivariatno normalno porazdelitvijo.

$$\mathbf{y}|\mathbf{b}, \mathbf{s}, \mathbf{R} \sim MVN(\mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{Z}\mathbf{s}, \mathbf{R}) \quad \dots (2)$$

kjer je \mathbf{y} $n \times 5$ matrika fenotipskih vrednosti; \mathbf{b} je vektor lokacijskih parameterov za vpliv, ki se razlikujejo med seti podatkov; \mathbf{s} je vektor lokacijskih parameterov za ns sezoni disekcije, definiran kot interakcija leto-mesec in $\mathbf{R} = \mathbf{I}_{n_y} \otimes \mathbf{R}_0$ je kovariančna matrika ostanka. Pri analizi kongenih F_2 -živali (M2- F_2) je vektor b vseboval vpliv spola (samci in samice), zaporednega gnezda (1, 2 in več kot 3), število mladičev na gnezdo (1-2, 3, 4, 5, 6, in več kot 7) in genotip znotraj linije [homozigoti z dvemi aleli linije F (FF) ali L (LL) za lokus *Fob3b2* ter heterozigoti z eno alelo linije F in L (FL) za lokus *Fob3b2*]. Aditivni

in dominantni učinek alelov smo testirali z statistiko DIC (angl. *deviance information criteria*), pri čemer se je izkazalo, da aditivni model bolje opisuje zbrane podatke. Posteriorno porazdelitvijo smo opisali s povprečjem in standardnim odklonom za vsak genotip za prvo gnezdo s petimi mladiči. Obstoj razlik med homozigoti M2-F₂ smo ovrednotili s posteriorno verjetnostjo, to pomeni, da velika verjetnost (npr. 0,95) nakazuje na signifikantne razlike in prisotnost učinka kvantitativnega lokusa *Fob3b2*.

3.1.4.3 Oralni glukozni tolerančni test (oGTT)

Analizo testa glukozne tolerance smo opravili na populaciji homozigotov sub-kongene linije M2-F₂, povprečne starosti 18 tednov in krmljene s HFD krmo (28 samic in 22 samcev). Za dosega fiziološko osnovnega nivoja glukoze v krvi (160 – 180 mg/dl; povzeto po <http://phenome.jax.org/>), smo živalim odvzeli krmo 5 ur pred začetkom testa. Vsebnost glukoze v krvi smo določali z glukometrom (Contour XT, Bayer), na katerega smo kanili kapljico krvi (~ 1 µl) iz repne vene miši (Slika 11), pridobljene z majhnim vbodom igle. Raztopino glukoze (2 g glukoze / kg telesne mase, 25 % D-glukoza) smo z gavažno sondou vnesli v želodec miši. Kri smo pobirali ob 0 (pred administracijo glukoze), 15, 30, 60 in 120 minutah po aplikaciji glukoze).



Slika 11 : Prikaz merjenja nivoja glukoze v krvni kapljici, pridobljeni iz repne vene miši
Figure 11: Measurement of glucose level in a drop of blood, collected from mouse vein tail

Stopnjo statistično značilne razlike nivoja glukoze v krvi med homozigoti F₂ za *Fob3b2* smo določili z uporabo modela analize variance za ponovljene vzorce (angl. *repeated-measures analysis of variance*; RM-ANOVA) v statističnem paketu SAS/STAT 9.3 (SAS Institute, Cary NC). S tem testom smo ugotavljali statistično značilne razlike med obema skupinama homozigotov (FF in LL) za segment *Fob3b2* glede na čas ter glede na posamezno časovno točko merjenja glukoze v krvi. Meja statistične značilnosti je bila postavljena na p-vrednost ≤ 0.05 .

3.1.4.4 Izražanje adiponektina v maščevju sub-kongene mišje linije M2-F₂

Iz vzorcev gonadalne maščobe treh homozigotov LL in treh homozigot FF sub-kongene linije M2-F₂ smo izolirali mRNA s komercialnim setom reagentov po navodilih proizvajalca (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen). Koncentracije in kvaliteto izolirane

mRNA smo izmerili na spektrofotometru FE NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). V analizmo smo vključili vzorce z RIN ≥ 8 . Da smo preprečili kontaminacijo z DNA, smo vzorce RNA obdelali s deoksiribonuklezo I (angl. *deoxyribonuclease I*; DNase I) po protokolu proizvajalca (Deoxyribonuclease I Amplification Grade; Invitrogen). Nadaljnje smo vzorce z reverzno transkripcijo prepisali v cDNA s kompletom reagentov High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Za izdelavo standardne krivulje, smo vzorce naprej zmešali skupaj (»pool«) in nato uporabili celokupen vzorec ter 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 in 1:64 redčen skupni vzorec. Za določanje nivoja izražanja gena smo uporabili TaqMan sonde (Applied Biosystems) za *Adipoq*, kot tarčni gen, in *Gapdh*, *Tbp* ter *Actb*, kot normalizacijske gene (Preglednica 5). PCR v realnem času (angl. *real-time PCR*) smo izvedli po standardnem protokolu kompleta TaqMan na aparatu Applied Biosystems ViiA 7 Real-time PCR System. Reakcijska mešanica za PCR (končni volumen 10 μl) je vsebovala 2 μl cDNA (1 – 100 ng cDNA/ μl), 2X TaqMan Universal Master Mix II, 20X TaqMan Gene Expression Assay in vodo brez RNaz. Reakcije so potekale na PCR ploščici s 384 vdolbinicami (Applied Biosystems). Začetni inkubaciji pri 50 °C za 2 min je sledila aktivacija polimeraze pri 95 °C za 10 min ter 40 ciklov pri 95 °C po 15 s in 60 °C po 1 min. Vse reakcije, vključujuč negativno kontrolo (angl. *non-template control*; NTC), so bile izvedene v triplikatih.

Standardna krivulja nam je služila kot indikator uspešnosti amplifikacije tarčnega in normalizacijskega gena (standardiziranost/optimizacija protokola) ter za izbiro najboljše dilucije/redčitve (koncentracije) vzorca pri katerem je pomnoževanje najbolj senzitivno oziroma optimalno (standardna deviacija med ponovitvami čim manjša ter C_t vzorca oziroma nivo ekspresije znotraj mej standardne krivulje).

Za vsak vzorec smo izračunali povprečen fluorescenčni prag (angl. *threshold cycle*; C_t) ter vrednosti normalizirali na geometrijsko sredino treh endogenih kontrol (*Actb*, *Gapdh* in *Tbp*), da smo tako določili parameter ΔC_t . Z uporabo metode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ smo kvantificirali relativno spremembo ekspresije tarčnega gena. Diferencialno izražanje gena med homozigoti za genotip LL in FF za segment *Fob3b2* smo preverjali s Studentovo t-test metodo (p-vrednost $\leq 0,05$).

Preglednica 5: Simbol tarčnih in normalizacijskih genov ter TaqMan sond uporabljenih za določanje nivoja izražanja adiponektina v maščevju sub-kongene M2-F₂ linije

Table 5: Target and normalization gene and TaqMan assay symbol used for quantification of adiponectin expression in sub-congenic M2-F₂ line fat

Gen	TaqMan sonda ID
<i>Actb</i> (angl. <i>Beta-actin</i>)	Mm00607939_s1
<i>Gapdh</i> (angl. <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)	Mm99999915_g1
<i>Tbp</i> (angl. <i>TATA-binding protein</i>)	Mm00446971_m1
<i>Adipoq</i> (angl. <i>Adiponeqtin</i>)	Mm00456425_m1

3.1.5 Izbor kandidatnega gena znotraj non-IBD regije *Fob3b2*

Z intervalno specifično analizo haplotipov znotraj intervala *Fob3b2* smo identificirali genomske regije, ki med linijama F in L ter kongenima linijama M in M2, niso enake po izvoru (non-IBD; angl. *not identical by descent*). Te regije najverjetneje vsebujejo vzročne polimorfizme, odgovorne za fenotipske razlike pri kongenih F₂-živalih.

3.1.5.1 Izražanje kandidatnih genov znotraj non-IBD regije segmenta *Fob3b2*

Ekspresijo kandidatnih genov znotraj non-IBD regije med homozigoti FF in LL za odsek *Fob3b2*, smo merili na izoliranih vzorcih RNA (postopek opisan v poglavju 3.1.4.4) iz gonadalne maščobe. Za določanje nivoja izražanja kandidatnih genov smo uporabili TaqMan sonde (Preglednica 6; Applied Biosystems) ter izvedli PCR v realnem času po standardnem protokolu TaqMan PCR kit na aparatu Applied Biosystems ViiA 7 Real-time PCR System. Vsaka 10 µl PCR reakcijska zmes je vsebovala 2 µl cDNA (~50 ng), 2X TaqMan Universal Master Mix II, 20X TaqMan Gene expression sondu, in vodo brez RNaz. Reakcije so potekale na PCR ploščici s 384 vdolbinicami. Začetni inkubaciji pri 50 °C za 2 min je sledil korak aktivacije polimeraze pri 95 °C za 10 min ter 40 ciklov pomnoževanja cDNA pri 95 °C po 15 s in 60 °C po 1 min. Vse reakcije, vključno negativno kontrolo, so bile izvedene v duplikatih. Za vsak vzorec smo izračunali povprečen C_t vsakega kandidatnega gena ter z normalizacijo na tri endogene kontrole (*B-actin*, *Tbp* in *Gapdh*) determinirali ΔC_t. Relativne spremembe nivoja izražanja genov homozigotov LL za lokus *Fob3b2* smo določili z metodo izračuna 2^{-ΔΔC_t}. Z analizo Student t-test smo preverili ali obstajajo statistično značilne razlike v izražanju kandidatnih genov med F₂ homozigoti LL in FF za segment *Fob3b2*.

Preglednica 6: TaqMan sonde uporabljene za preverjanje izražanja kandidatnih genov znotraj segmenta *Fob3b2*

Table 6: TaqMan assays used for identification of candidate gene expression within locus *Fob3b2*

Gen	TaqMan sonda
<i>Actb</i>	Mm00607939_s1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1
<i>Tbp</i>	Mm00446971_m1
<i>Arhgap39</i>	Mm01197504_m1
<i>Zfp251</i>	Mm02342310_m1
<i>Zfp7</i>	Mm00524080_m1
<i>Mb</i>	Mm00442968_m1
<i>Apol6</i>	Mm03990658_m1
<i>Rbm9</i>	Mm00612735_m1
<i>Apol7a</i>	Mm01200950_m1
<i>Apol9a</i>	Mm04206749_gH
<i>Apol7b</i>	Mm01616698_m1
<i>Apol10a</i>	Mm04214065_g1
<i>Apol7c</i>	Mm01628124_s1
<i>Apol10b</i>	Mm04212537_m1
<i>Apol7e</i>	Mm01616699_m1
<i>Myh9</i>	Mm01197036_m1
<i>Pvalb</i>	Mm00443100_m1
<i>Ncf4</i>	Mm00476300_m1
<i>Csf2rb2</i>	Mm00655763_m1
<i>Csf2rb</i>	Mm00655745_m1
<i>Tst</i>	Mm01195231_m1
<i>Mpst</i>	Mm00460389_m1

3.1.5.2 Toplotni graf (angl. *heat-map*) za izbor kandidatnega gena znotraj *Fob3b2*

Z uporabo različnih kriterijev, smo med identificiranimi kandidatnimi geni znotraj non-IBD regije lokusa *Fob3b2* določili najbolj verjetni kavzalni kandidatni gen. Struktorna ohranjenost genomov med sesalskimi vrstami omogoča zmanjševanje intervalov QTL. Z genomskeimi primerjavami, kjer poravnamo QTL-e različnih živalskih vrst glede na genomsko zaporedje, lahko identificiramo regije prekrivanja, skupne določenemu QTL-u. Na ta način lahko tudi sklepamo, da se kandidatni gen znotraj QTL-a pri opazovani živalski vrsti, nahaja tudi v regiji, ki je skupna drugim prekrivajočim se QTL-om drugih vrst. Analizo genomske primerjave za kvantitativni lokus *Fob3b2* smo izvedli pri človeku, govedu, prašiču in kokoši. Tako smo za vsak kandidatni gen znotraj lokusa *Fob3b2* preverili ali se prekriva s kvantitativnim lokusom, povezanim z zamaščenostjo pri drugi živalski vrsti (Kunej in sod., 2012; http://www.integratomics-time.com/fat_deposition). V podatkovni zbirki o ekspresiji genov BioGPS (2015) smo pregledali nivo izražanja vsakega non-IBD kandidatnega gena v metaboličnih tkivih miši pri dveh neodvisnih platformah mikromrež (MOE430 in GNF1M). Izražanje gena je moralo biti vsaj 3-krat nad mediano v vsaj enem relevantnem metaboličnem tkivu (hipofiza, možgani, belo in rjavo maščobno tkivo, jetra, mišice, črevesje, želodec, trebušna slinavka in nadledvična žleza), da smo ga nadalje obravnavali kot potencialni kavzalni gen znotraj lokusa *Fob3b2*. Anotacije

molekularnih funkcij non-IBD kandidatnih genov smo pridobili v bazi Gene Ontology (<http://amigo.geneontology.org/eontology.org>), kjer smo preverjali povezanost genov z biologijo in/ali rastjo adipoznega tkiva. V bazi Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org>), smo za vsak kandidatni gen pregledali njegov vpliv na fenotip povezan s telesno težo, debelostjo, vnosom hrane ali metabolizmom pri knock-out in transgenih mišjih modelih. Za identifikacijo kavzalnega gena znotraj lokusa *Fob3b2* smo uporabili tudi podatke o izražanju non-IBD kandidatnih genih v različnih tkivih F in L linije miši (razlika v izražanju genov med F in L je morala biti ≥ 2 -krat), pridobljenih študiji Morton in sod. (2011). Glede na presek zbranih bioinformacijskih podatkov in podatkov o izražanju non-IBD genov pri kongeni liniji M2-F₂, smo lahko določili najbolj verjetne (prioritetne) kavzalne gene znotraj kvantitativnega lokusa *Fob3b2*.

3.2 VPLIV KANDIDATNEGA GENA *Tst* NA VITKOST PRI SUB-KONGENI MIŠJI LINIJI M2

3.2.1 Sekveniranje eksonov gena *Tst*

Da smo lahko določili nukleotidno zaporedje eksonov gena *Tst* in potencialne kavzalne variacije za vitkost pri sub-kongeni liniji M2, smo iz homozigotov FF, LL in heterozigotov FL sub-kongene linije M2 izolirali genomsko DNA (gDNA) iz jeter s kompletom reagentov GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma). Koncentracijo vzorcev DNA smo izmerili na FE NanoVue Spektrofotometru (GE Healthcare Life Sciences). Vzorce produktov PCR (po postopku v Preglednica 7), smo v primernih koncentracijah in količinah (100 ng/ μ l neočiščenega PCR produkta, minimalen končen volumen 30 μ l in 10 pmol/ μ l oligonukleotidi s končnim volumenom 20 μ l na 5 vzorcev) poslali na standardno Sanger sekveniranje (Standard-seq single z aparatom Applied Biosystems 3730XL, Macrogen Inc., Nizozemska). Rezultate smo obdelali s prosto dostopnim programom za poravnavanje sekvenc Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5 (MEGA 5, Tamura in sod., 2011). Dobljene elektroferograme sekvenc smo pregledali za morebitne artefakte in nepravilnosti pri avtomatskem določanju sekvenc. Nadaljnje sekvence smo poravnali glede na referenčno (C57BL6/J; Ensembl verzija 67) in zabeležili identificirane alele SNP-je. Znotraj regije 3'UTR kandidatnega gena smo s spletnim orodjem miRecords (<http://c1.accurascience.com/miRecords/doc.php>) preverili obstoj vezavnih mest za miRNA na identificiranih SNP-ih. Ker spletno orodje združuje različna prosto-dostopno orodja smo vsako napovedano vezavno mesto in miRNA potrdili še z direktno uporabo teh orodij. Sekvenco regije 3'UTR (Ensembl verzija 67) smo primerjali z sekvencami napovedanih miRNA (NCBI BLAST) ter pregledali in izbrali tiste, ki se vežejo na identificirane SNP-e znotraj preučevane regije.

Preglednica 7: Mikrosatelitski genetski označevalci, uporabljeni za sekveniranje eksonov gena *Tst* ter reagenti in pogoji PCR reakcije za vsak par oligonukleotidnih označevalcev
Table 7: PCR mix and cycling condition optimized for *Tst* exons sequencing

Oligonukleotidni par	Sekvenca ¹ (5'-3')	Bp ^{1,2}
TST.EX2.1 - smerni - protismerni	CCCTCTCAGGCCTGTCTCTT GCATAGAAGCTGCCAGGTC	78405896 78405508
TST.EX2.2 - smerni - protismerni	GGGACTATGTGGCAACCTG TGTTGTGCAATCCTCCCAAG	78405589 78405201
TST.EX1.1 - smerni - protismerni	CACCCTCCACAACAAACACA CTGCACACACTCAGGCCTTC	78400073 78399722
TST.EX1.2 - smerni - protismerni	GCCTACCTTGTCGGCAAACC CTTCTGTGTGGCCTTCATGG	78399845 78399479
PCR mešanica		Program pomnoževanja DNA
<u>Količina reagenta / vzorec:</u>		95 °C 3 min
1,42 µl diH ₂ O		95 °C 1 min
1 µl pufer (Taq buf + (NH ₄) ₂ SO ₄ – MgCl ₂)		62 °C 1 min 5 ciklov
1 µl MgCl ₂ (25 mM)		72 °C 1 min
1 µl dNTP (2 mM)		94 °C 15 s
0,25 µl smerni začetnik (10 µM)		58 °C 30 s 30 ciklov
0,25 µl protismerni začetnik (10 µM)		72 °C 30 s
0,08 µl polimeraza ³		72 °C 7 min
5 µl gDNA (5 ng/µl)		4 °C ∞

¹ Ensembl verzija 64; ² Lokacija mikrosatelitskega genetskega označevalca v Bp; ³ Taq DNA Polymerase, ThermoFischer Scientific

¹ Ensembl version 64; ² Microsatellite marker location in Bp; ³ Taq DNA Polymerase, ThermoFischer Scientific

3.2.2 Alelno specifično izražanje

Metodo alelne diskriminacije (t.i. TaqMan SNP genotipiziranje) smo prilagodili za določanje nivoja izražanja posamezne alele pri heterozigotih M2-F₂ za segment *Fob3b2* za SNP (rs31534689) v 3'UTR gena *Tst*. Načrtovali smo alelno specifične TaqMan začetnike (Applied Biosystems) in sicer: 5'-CCTGCTGTAGGTTCACCTTTAGG-3' (smerni začetnik), 5'-GAGGCACCAAGAGCAATTCTAAA-3' (protismerni začetnik) ter tarčne TaqMan sonde za preučevani SNP (podčrtano) pa CCCTGTCAATCTCCGT (alel specifičen za debelo (F) linijo; barvilo FAM) in ACCCTGTCAATATCCGT (alel specifičen za vitko (L) linijo; barvilo VIC). Izolirano genomsko DNA (po protokolu GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits, Sigma) dveh homozigotov F₂ vitke in debele linije M2 za segment *Fob3b2* smo zmešali v različnih molarnih razmerjih F alel/L alel (FAM alel/VIC alel) 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4 in 1:8, da smo določili umeritveno krivuljo. Reakcije za kvantitativni PCR v realnem času smo pripravili po navodilih

proizvajalca (Custom TaqMan SNP Genotyping Assay, Applied Biosystems). Za vsako razmerje smo izračunali logaritem intenzitete barvil (R_n – fluorescentni signal reporterskega barvila FAM ali VIC, normaliziran na fluorescentni signal pasivnega referenčnega barvila ROX; Enačba 3), ki je služil za izdelavo standardne krivulje. y-os je tako predstavljala logaritem intenzitete barvil pri danem razmerju, x-os pa logaritem razmerja alelov FAM/VIC (Lo in sod., 2003; Sun in sod., 2010). Alelno specifično ekspresijo gena (reakcije pripravljene po Preglednica 8) smo nadaljnje merili na osmih izoliranih RNA vzorcih heterozigotov F_2 za segment *Fob3b2* (glej postopek izolacije RNA v poglavju 3.1.4.4). S primerjavo izmerjene fluorescenčne intenzitete na izdelano standardno krivuljo, smo z determinirano enačbo izračunali alelno razmerje heterozigotov [$\log_2(\text{FAM allele}/\text{VIC allele})$] ter opredelili relativno ekspresijo alela F:L. S tem smo opredelili katera variacija SNP-ja gena *Tst* se bolj izraža. Točnost in delovanje te metode smo potrdili s ponovno izdelavo standardne krivulje in analizo heterozigotnih vzorcev RNA z zamenjanimi barvili v *TaqMan* sondi.

$$\log_2(\Delta Rn_{FAM}/\Delta Rn_{VIC}) = a + b \cdot \log_2(\text{FAM alel}/\text{VIC alel}) \quad \dots (3)$$

Preglednica 8: Reagenti in protokol reakcije PCR v realnem času
Table 8: PCR mix and protocol for Real-time PCR

Komponente reakcije	Volumen (µl)	Protokol PCR amplifikacije v realnem času	
TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)	2,5	95 °C	10 min
20X Assay Mix (TaqMan sonda)	0,25	92 °C 60 °C	15 s 1 min
Redčitev cDNA (1 – 20 ng)	2,25		
			40 ciklov

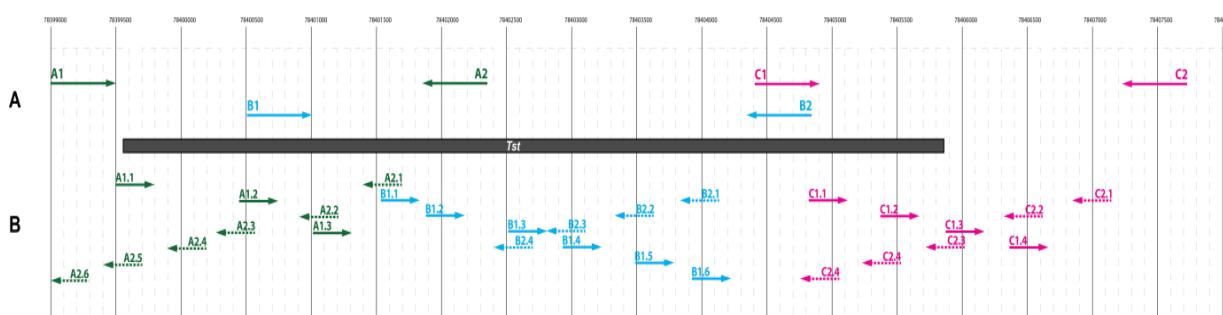
3.2.3 Analiza korelacij med ekspresijo kandidatnega gena *Tst* in ostalimi geni ali fenotipi

Podatke o izraženih genih v adipoznem tkivu posameznih mišjih linij smo pridobili iz baze BioGPS (2015) ter za isti set mišjih linij pridobili tudi fenotipske podatke (glukoza v krvi, holesterol in trigliceridi v plazmi, odstotek maščevja in masa gonadalne maščobe) v bazi Mouse Phenome Database (<http://phenome.jax.org/>; CGDpheno1, 2009). Pearsonov koeficient korelacije smo izračunali s statističnim paketom SAS/STAT, kjer smo preverjali statistično signifikantno korelacijo (p -vrednost $\leq 0,05$) med *Tst* in geni izraženimi v adipoznem tkivu ter med *Tst* in izbranimi fenotipi.

3.2.4 Polimorfizmi kandidatnega gena *Tst* pri linijah F in L

Da smo določili sekvenco celotnega genomskega odseka, ki vsebuje *Tst* in potencialne vzročne variante za vitkost pri sub-kongeni liniji M2, smo iz osnovnih, starševskih linij F

in L izolirali genomsko DNA (gDNA) iz jeter in ledvic z uporabo kompleta reagentov GenEluteTM Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma). Koncentracijo vzorcev DNA smo izmerili na spektrofotometru FE NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). Za lažjo izvedbo reakcije PCR smo preučevani segment, dolg 10 kb, pomnožili v več krajših odsekih (A - zelena, B - modra, C - roza; Slika 12A). Reagente iz Phusion High-Fidelity PCR Kit-a (Thermo SCIENTIFIC) smo uporabili za pomnoževanje posameznih delov. PCR mešanice (končni volumen 20 µl) so vsebovale 5x Phusion GC pufer, 10 mM dNTP-je, 10 µM pare začetnih oligonukleotidov (Preglednica 9), 2 U/µl Phusion polimerazo DNA in 50 ng/µl gDNA. Reakcije so potekale na aparatu PCR pri pogojih: 98°C za 30 sec, 35 ciklov pri 98°C po 7 sec, 68°C po 30 sec in 72°C po 3 minute ter končni cikel pri 72°C za 10 minut. Uspešnost amplifikacije vzorcev smo preverili na 1,5 % agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom ter jih očistili s kompletom reagentov GenEluteTM PCR Clean-Up Kit (Sigma). Vsak pomnožen segment smo nato razdelili na 10 µl sekvenčne reakcije, ki so vsebovale 20 – 80 ng/µl produkta PCR in 5 µM oligonukleotidov za natančnejše sekveniranje znotraj pomnoženih segmentov (Slika 12B). Vzorce smo poslali na standardno Sanger sekveniranje na GATC Biotech (Nizozemska). Dobljene sekvene smo poravnali na referenčno sekvenco (referenčna linija C57BL/6J, Ensembl verzija 78) z uporabo prosto dostopnega programa MEGA 6 (Tamura in sod., 2013) ter preverili morebitne variacije med osnovnima linijama F in L.



Slika 12: Postavitev oligonukleotidov uporabljenih pri sekveniraju segmenta *Tst*
Figure 12: Primers positions used in sequencing the *Tst* locus

Preglednica 9: Imena in sekvene oligonukleotidov uporabljenih pri sekveniranju segmenta *Tst*
Table 9: Oligonucleotide symbols and sequences used for *Tst* segment sequencing

	Oligonukleotid	Sekvenca ¹ (5' – 3')
Slika 12A	A1	TCCTGTGCTCCCTACAGC
	A2	TCAGTGTGGAAACTGCTTG
	B1	TGCCTAGCTTGTGAGTCGT
	B2	GGTCCCCTTGGTATGTGTG
	C1	GTGAGGTGGGCCAAACTT
	C2	AAAAGTGAAGCCCCAAGACGA
Slika 12B	A1.1	TGGTTGAAGGTTGGCAAAGG
	A1.2	TGGCGGACAGAAACTTGTG
	A1.3	TCCATAGTTAGAGGCCAGCC
	A2.1	ACTTTGGTGCTGCTTGAGTC
	A2.2	CTTCTTCTCCCTGGCAC
	A2.3	CATGTCAGTGCACCTCAGC
	A2.4	ACTGTAAGACCCAAGCCTGC
	A2.5	TGAAGGAACTGGCTGGATT
	A2.6	CTTGGCTTGAGACATCCCAC
	B1.1	CTGTGTAACCCTGCCAGTGA
	B1.2	CTGATGTTCATGCCCTGGA
	B1.3	CATTCAAGTCAGGAGGCACG
	B1.4	ACAAGGTACAGGTACCCAG
	B1.5	TGGTGTGCATTGTTGTCCAG
	B1.6	CACTCTCCCTTCCTCCAGTT
	B2.1	CTCTGCCAACCTCCATGTGTG
	B2.2	CCATGTAAGTGACAGGGCT
	B2.3	GGATCACAGAGAAGAGAGGCA
	B2.4	CCTCCTTCGTACATAGCAACC
	C1.1	TTCACAGACACTAGCCAGGG
	C1.2	CTTGAAAACGGCTGGCTCT
	C1.3	CAGGAAAGAGACAGGCCCTGA
	C1.4	CAGTCGAAAAGTAGCTGGG
	C2.1	GAGCTGTGGTGAGGGAGATCT
	C2.2	TGAAGCTCGAGGTGACACTG
	C2.3	CCTAGGGAATGTGCCAACCT
	C2.4	AGAAGCTGCCAGGTATC
	C2.5	AATAGGGCAGCTTGTAGC

¹Ensembl verzija 75

3.2.5 Atlas regulacije transkripcije kandidatnega gena

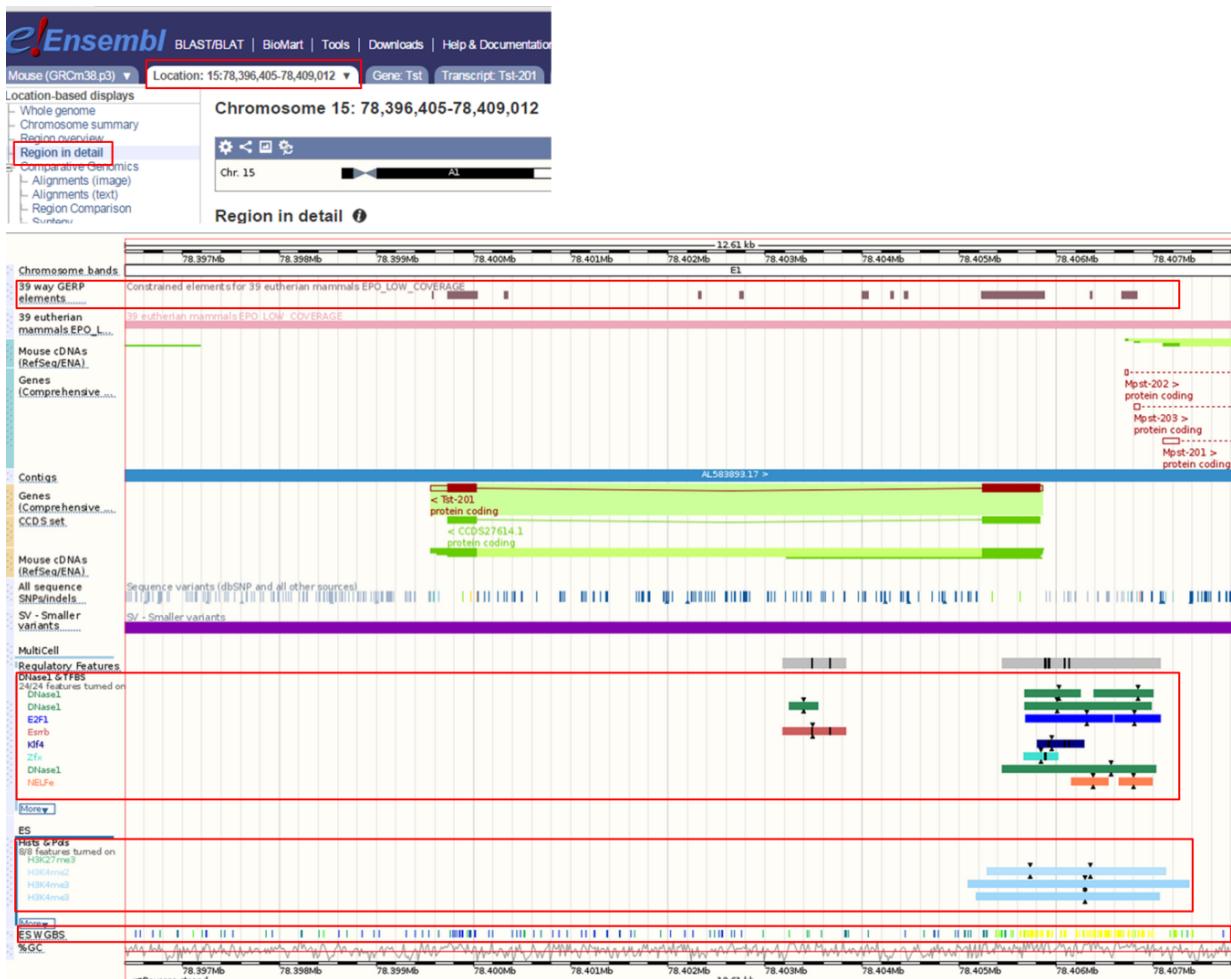
Na segmentu mišjega gena *Tst*, vključujoč regijo 1,5 kb navzdol (angl. *downstream*) in 2 kb navzgor (angl. *upstream*), smo izvedli bioinformacijsko analizo regulacije transkripcije gena. Preučevani segment dolg 9804 bp smo najprej pregledali v podatkovni bazi Ensembl (verzija 79; <http://www.ensembl.org/index.html>), kjer smo povzeli polimorfizme (variacija navzgor od gena, sinonimna variacija, intronska variacija, drugačnopomenska variacija (angl. *missense variation*), 3' UTR variacija in variacija navzdol od gena) glede na ohranjenost nukleotidov med 39 sesalci iz nadreda višjih sesalcev (angl. *eutheria*) (Slika 13).

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for chromosome 15. The search bar at the top indicates the location is 15:78,399,450-78,405,950. The left sidebar has a tree view of genomic resources, with 'Alignments (text)' selected. A red box highlights the search results for '39 eutherian mammals EPO LOW COVERAGE'. The main panel displays the sequence alignment for mouse, rat, kangaroo rat, squirrel, guinea pig, pika, rabbit, vervet-AGM, macaque, olive baboon, human, chimpanzee, orangutan, gibbon, tarsier, mouse lemur, bushbaby, tree shrew, panda, ferret, dog, cat, horse, microbat, megabat, cow, sheep, dolphin, alpaca, pig, hedgehog, shrew, sloth, armadillo, lesser hedgehog tenrec, elephant, and hyrax. Specific positions in the sequence are highlighted in red, corresponding to the aligned regions.

Slika 13: Iskanje polimorfizmov znotraj ohranjenih mest med 39 nadredi višjih sesalcev v podatkovni bazi Ensembl

Figure 13: Searching conserved polymorphisms among 39 eutherian mammals in Ensembl database

V zavihku »Region in detail« smo pridobili evolucijsko ohranjene elemente med 39 nadredi višjih sesalcev (Slika 14), status metilacije DNA smo zbrali za zarodne matične celice, prav tako smo zbrali tudi podatke o aktivnosti in statusu kromatina (DNaseI hipersenzitivna mesta, histonske modifikacije, vezava polimeraze II in III) ter celično specifičnih vrhov vezavnih mest transkripcijskih faktorjev.

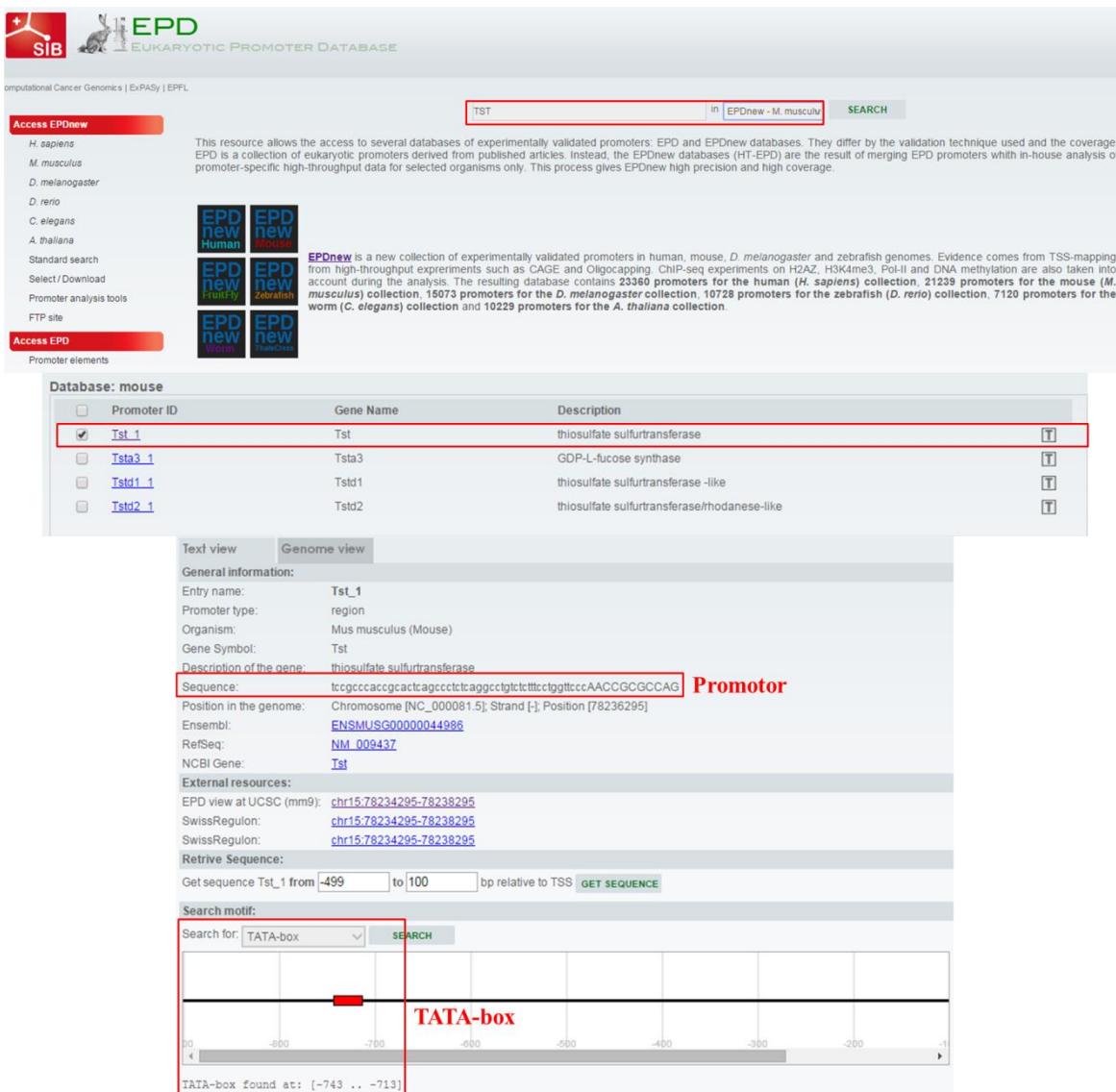


Slika 14: Iskanje ohranjenih elementov, status metilacije DNA, DNaseI hipersenzitivnih mest, histonskih modifikacij, vezav polimeraz in vezavnih mest transkripcijskih faktorjev v podatkovni bazi Ensembl

Figure 14: Searching for conserved elements, DNA methylation status, DNase I hypersensitive sites, histone modifications, polymerase binding sites and transcription binding sites in Ensembl database

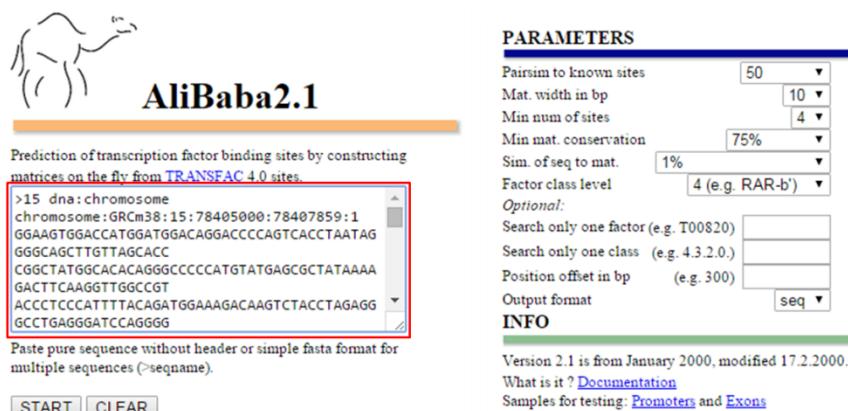
Eksperimentalno validirane promotorje evkariontov in TATA-mesta za gen *Tst* smo pridobili iz baze Eukaryotic Promoter Database (EPDnew Mouse version 002; <http://epd.vital-it.ch/>) (Slika 15A). Napovedi za vezavna mesta transkripcijskih faktorjev smo iskali tudi s programi Alibaba2.1 (<http://www.generegulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) in MotifMap (<http://motifmap.ics.uci.edu/>). V prvo orodje (Slika 15B) smo vnesli ~2 kb dolgo sekvenco regije navzgor od *Tst* gena (15:78405000-78407859) ter za boljšo zanesljivost rezultatov pustili parametre iskanja kot privzete. V programu MotifMap smo v oknu (Slika 15C) »Gene search« izbrali gen *Tst* ter med privzetimi filtri iskanja povečali le razdaljo od začetka mesta transkripcije (angl. *transcription start site*; TSS) na 2000 bp.

A Eukaryotic promoter database



The screenshot shows the EPDnew website interface. At the top, there are links for SIB, EPD, and EPFL. Below that, a search bar contains 'Tst' and 'EPDnew - M. musculus'. A 'SEARCH' button is present. On the left, there's a sidebar with 'Access EPDnew' and a list of organisms: *H. sapiens*, *M. musculus*, *D. melanogaster*, *D. rerio*, *C. elegans*, and *A. thaliana*. It also includes links for 'Standard search', 'Select / Download', 'Promoter analysis tools', and 'FTP site'. Below this is another 'Access EPD' section for 'Promoter elements'. The main content area is titled 'Database: mouse' and shows a table of promoters. The first row, 'Tst_1', is highlighted with a red border. The table columns are 'Promoter ID', 'Gene Name', and 'Description'. The 'Description' column for 'Tst_1' is 'thiosulfate sulfurtransferase'. Below the table are tabs for 'Text view' and 'Genome view'. Under 'General information', details for 'Tst_1' are provided: Entry name, Promoter type (region), Organism (*Mus musculus* (Mouse)), Gene Symbol (Tst), and Description (thiosulfate sulfurtransferase). The sequence is shown as: tccggccacccactcgcccttcaggccgttgtttcggtccAACCAGCGCCAG. A red box highlights the word 'Promotor'. The 'Sequence' section includes links to Chromosome [NC_000081.5], Ensembl [ENSMUSG00000044986], RefSeq [NM_009437], and NCBI Gene [Tst]. External resources include EPD view at UCSC (mm9), SwissRegulon, and SwissRegulon. A 'Retrieve Sequence' section allows getting a sequence from -499 to 100 bp relative to TSS. The 'Search motif' section shows a search for 'TATA-box' with a result found at position -743 to -713. A red box highlights the 'TATA-box' label.

B Alibaba 2.1



The screenshot shows the Alibaba 2.1 interface. At the top, there's a cartoon illustration of a person. The main title is 'AliBaba2.1'. Below it, a sub-header says 'Prediction of transcription factor binding sites by constructing matrices on the fly from TRANSFAC 4.0 sites.' A text input box contains a DNA sequence: >15 dna: chromosome:chromosome:GRCh38:15:78405000:78407859:1 GGAATGGACCATGGATGGACAGGACCCCAGTCACCTAATAG GGGCAGCTTTAGCACC CGGCTATGGCACACAGGGCCCCCATGTATGAGCGTATAAAAG GACTTCAGGTGGCCGT ACCCTCCCATTTACAGATGGAAAGACAAGTCTACCTAGAGG GCCTAGGGGATCCAGGGG. This sequence is highlighted with a red box. To the right, there are 'PARAMETERS' settings: Pairsim to known sites (50), Mat. width in bp (10), Min num of sites (4), Min mat. conservation (75%), Sim. of seq to mat. (1%), Factor class level (4 (e.g. RAR-b')), and optional fields for Search only one factor (T00820) and Search only one class (4.3.2.0). Position offset in bp (e.g. 300) is set to 300, and Output format is set to 'seq'. An 'INFO' section at the bottom provides version information: 'Version 2.1 is from January 2000, modified 17.2.2000.', 'What is it? Documentation', and 'Samples for testing: Promoters and Exons'.

slika 15 se nadaljuje

C MotifMap

[MotifMap: genome-wide maps of regulatory elements.](#)

The screenshot shows the MotifMap Gene Search interface in three stages:

- Step 1:** A top navigation bar with tabs: Home, Motif Search, Gene Search (highlighted in red), and SNPer. Below it, a dropdown menu says "Select species (alignment) and click next" with "Mouse (mm9 multiz30way)" selected.
- Step 2:** Another top navigation bar with the same tabs. Below it, a dropdown menu says "Enter a gene name (official gene symbol or refSeq transcript id) and click next" with "Tst (NM_009437)" selected.
- Step 3:** A third top navigation bar with the same tabs. Below it, a section titled "Mouse (mm9 multiz30way) -> Tst (NM_009437)" contains a "Filters:" section. It includes four filter categories: Conservation Scores, False Discovery Rate, Motif Scores, and Distance From TSS. Under "Distance From TSS", the "Upstream" field is set to 2000 and the "Downstream" field is set to 1000, both highlighted with a red box.

Slika 15: Iskanje *Tst* promotorja in TATA-box mesta v bazi EPD (A). Iskanje vezavnih mest za transkripcijske faktorje v »upstream« regiji *Tst* gena z orodjem Alibaba 2.1 (B) in MotifMap (C)
Figure 15: *Tst* promoter and TATA-box searching in EPD (A). Transcription factor binding sites searching within *Tst* upstream region with Alibaba 2.1 (B) and MotifMap (C) tool

Pregledovalnik UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/index.html>) ter tri dodatna spletna orodja MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>), CpG Island Searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>) in EMBOSS Cpgplot (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/) smo uporabili za iskanje CpG otokov znotraj 2 kb regije navzgor od gena *Tst*. CpG otoki so bili napovedani po kriterijih: vsebnost GC > 50 %, dolžina > 200 bp in razmerje opazovan/pričakovani CpG > 0.6 (Gardiner-Garden in Frommer, 1987) (Slika 16A-D).

A UCSC Genome browser

B MethPrimer

C CpG Island Searcher

slika 16 se nadaljuje

D EMBOSS Cpgplot

The screenshot shows the EMBOSS Cpgplot tool interface. At the top, there are three tabs: Input form, Web services, and Help & Documentation. Below the tabs, a breadcrumb navigation shows Tools > Sequence Statistics > EMBOSS Cpgplot. The main title is "EMBOSS Cpgplot" with the subtitle "Identify and plot CpG islands in nucleotide sequence(s)".

STEP 1 - Enter your input sequence: A text area contains a DNA sequence from chromosome GRCm38:15:78405000:78407859:1, starting with >15 dna:chromosome chromosome:GRCm38:15:78405000:78407859:1. The sequence is highlighted with a red box.

STEP 2 - Set options: A table with four rows: WINDOW SIZE (100), MINIMUM LENGTH (200), MINIMUM OBSERVED (0.6), and MINIMUM PERCENTAGE (50). All four rows are highlighted with a red box.

STEP 3 - Submit your job: A checkbox labeled "Be notified by email" is present, followed by a "Submit" button.

Slika 16: Iskanje CpG otokov v regiji *Tst* gena z različnimi orodji: UCSC (A), MethPrimer (B), CpG Island Searcher (C) in EMBOSS Cpgplot (D)

Figure 16: Searching for CpG islands in *Tst* region with different tools: UCSC (A), MethPrimer (B), CpG Island Searcher (C) in EMBOSS Cpgplot (D)

S spletnimi orodji miRWalk (Slika 17A) (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>), miRDB (Slika 17B) (<http://mirdb.org/miRDB/>), MicroCosm (Slika 17C) (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/#>) in miRecords (Slika 17D) (<http://c1.accurascience.com/miRecords/>) smo preverili obstoj mikro RNA (angl. microRNA; miRNA) s tarčnim mestom znotraj regulatorne regije kandidatnega gena. Napovedane miRNA smo pridobili z vnosom imena gena v orodje. Upoštevali smo le tiste rezultate, katerih sekvene in tarčno mesto napovedanih miRNA so se ujemali s sekvenco kandidatnega gena.

A miRWALK database

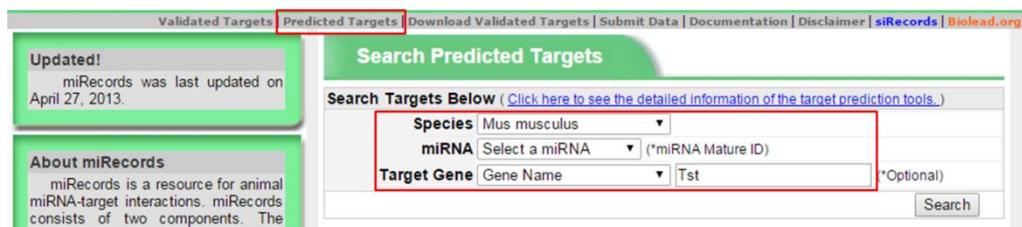
B miRDB

Choose one of the following search options:

C MicroCosm

slika 17 se nadaljuje

D miRecords



The screenshot shows the miRecords website interface. At the top, there are two tabs: "Validated Targets" and "Predicted Targets", with "Predicted Targets" being the active tab. Below the tabs, a green box displays an "Updated!" message: "miRecords was last updated on April 27, 2013". Another green box below it contains the "About miRecords" information: "miRecords is a resource for animal miRNA-target interactions. miRecords consists of two components. The". On the right side, there is a search form titled "Search Predicted Targets" with the sub-instruction "Search Targets Below (Click here to see the detailed information of the target prediction tools.)". The search form includes fields for "Species" (set to "Mus musculus"), "miRNA" (a dropdown menu with "Select a miRNA" and "(*)miRNA Mature ID" placeholder), and "Target Gene" (a dropdown menu with "Gene Name" and "Tst" selected, with "(*)Optional" note). A "Search" button is located at the bottom right of the form.

Slika 17: Iskanje tarčnih mest za miRNA v regiji *Tst* gena z različnimi orodji: miRWALK (A), miRDB (B), MicroCosm(C) in miRecords (D)

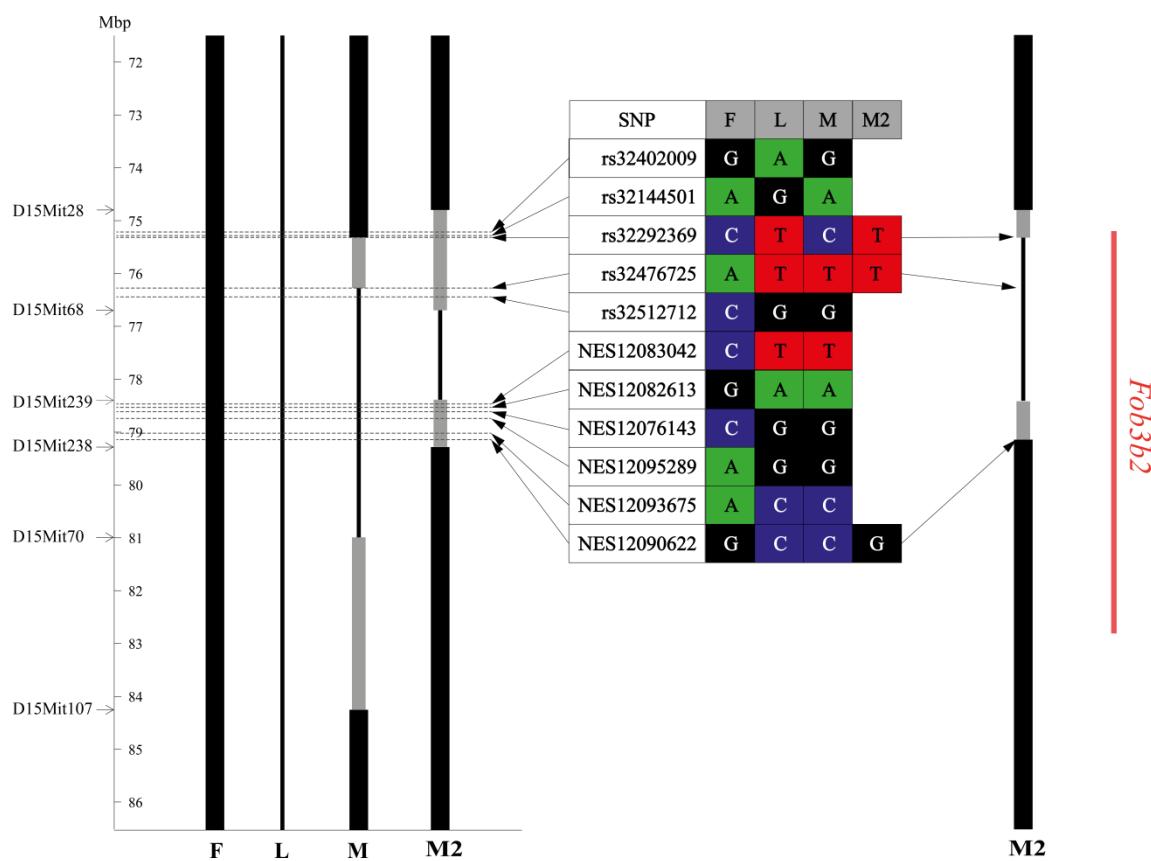
Figure 17: Searching for miRNA target sites in *Tst* region with different tools: miRWALK (A), miRDB (B), MicroCosm(C) in miRecords (D)

Vse rezultate smo nato združili v enotno sliko glede na izbrane kriterije: prisotnost vsaj enega evolucijsko ohranjenega elementa ter vsaj dveh regulatornih elementov, kot so vezavna mesta za transkripcijske faktorje in RNA polimerazo, histonske modifikacije, DNA metilacija, CpG otok, odprt kromatin ali vezavna mesta za miRNA. Na ta način smo poiskali najbolj ohranjena transkripcijsko aktivna mesta za katere menimo, da imajo pomembno regulatororno vlogo pri genu *Tst*.

4 REZULTATI

4.1 NATANČNEJŠE KARTIRANJE QTL-A *Fob3b2* Z ANALIZO F₂-POPULACIJE SUBKONGENE MIŠJE LINIJE M2

Z namenom natančnejšega kartiranja QTL-a *Fob3b2*, ki pri F₂-populaciji kongene linije M povzroči statistično značilno zmanjšanje maščobnih depojev (Prevoršek, 2010b), smo razvili sub-kongeno mišjo linijo M2. Slednja vsebuje donorski segment vitke linije L med mikrosatelitskima označevalcema D15Mit68 in D15Mit239 (~1,7 Mbp) in se v celoti nahaja znotraj kvantitativnega lokusa *Fob3b2* (Slika 18). Mesta brez polimorfnih mikrosatelitskih genetskih označevalcev (na Slika 18 prikazano kot sive cone) smo genotipizirali s tremi SNP označevalci rs32292369, rs32476725 in NES12090622. Na ta način smo lahko natančneje določili meje donorskega segmenta vitke linije L pri sub-kongeni liniji M2. Relativno dolga ne-genotipizirana segmenta smo uspeli skrajšati in jima opredeliti izvor. Donorski segment vitke linije L tako zajema daljšo regijo lokusa *Fob3b2* na 15. kromosomu (~3,9 Mbp), napram predhodni genotipizaciji z mikrosatelitskimi označevalci.



Slika 18: Genetska sestava regije kvantitativnega lokusa *Fob3b2* na 15. kromosomu ter genotipizirani polimorfizmi sub-kongene linije M2. Črni pravokotnik –genomska segment debele linije F; tanka črna črta – genomska segment vitke linije L; sivi pravokotnik – regija z neznanim izvorom. Na desni strani je označen interval *Fob3b2*, na levi pa uporabljeni polimorfni mikrosatelitski genetski označevalci

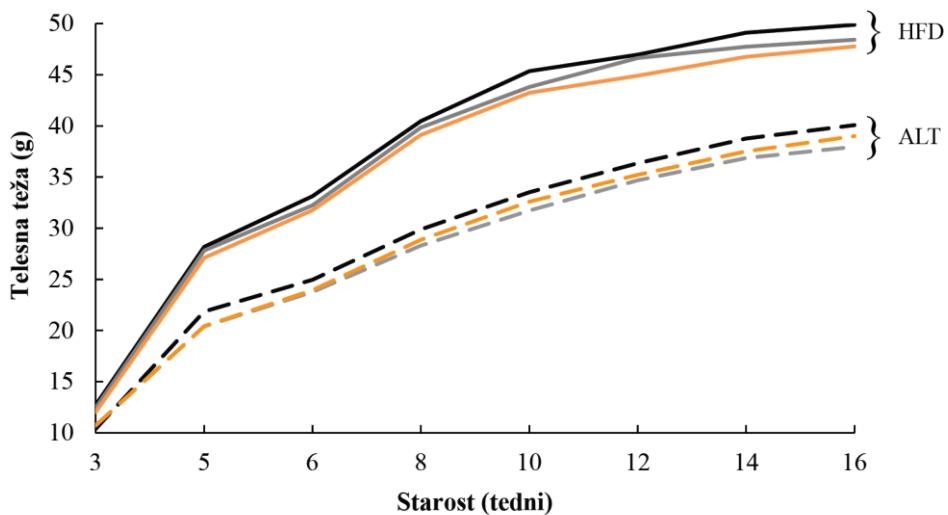
Figure 18: The genetic map of the *Fob3b2* QTL on Chr 15 and genotyped polymorphisms in M2 sub-congenic line. Black rectangle – genomic segment from fat line (F); thin black line – genomic segment from lean line (L); grey rectangle – unknown region. On the right site *Fob3b2* segment position is marked and on the left site polymorphic microsatellite genetic markers are presented

4.1.1 Fenotipska analiza F₂-populacije sub-kongene linije M2

Populacijo F₂ sub-kongene linije M2 smo uporabili za potrditev vpliva kvantitativnega lokusa *Fob3b2*, pri čemer smo med seboj primerjali fenotipe živali z različnimi genotipi (FF, FL in LL). Donorski segment pri sub-kongeni liniji M2 je v primerjavi s kongeno linijo M relativno krajiš (Slika 18). Ker so bile razlike med genotipi pri kongeni liniji M in učinek QTL-a na zmanjšanje maščobnih depojev manjše v primerjavi z drugimi kongenimi linijami, smo eno skupino F₂-populacije miši krmili s krmo z visoko vsebnostjo maščob. S slednjim smo povečali učinek *Fob3b2* in dodatno preverjali prisotnost interakcije gen-dieti.

Miši krmljene s HFD krmo so priraščale telesno maso hitreje kot miši krmljene s standardno krmo. Pri šestih tednih starosti so miši iz HFD skupine v povprečju bile 1,34-

krat težje od miši v kontrolni skupini (Slika 19). V nasprotju z mnenjem/hipotezo, da krma z visokim deležem maščob spodbuja hiperfagijo, so miši krmljene s HFD krmo tekom tednov zmanjšale konzumacijo le-te. Tako se je razlika pri 16. tednih starosti nekoliko zmanjšala, in sicer je bila kontrolna skupina miši povprečno 1,24-krat lažja.



Slika 19: Telesna teža F_2 -populacije sub-kongene mišje linije M2, krmljene s visokokalorično in standardno krmo. HFD – krma z viskim deležem maščob; ALT – standardna, kontrolna krma
Figure 19: Body weight of sub-congenic mouse line M2- F_2 fed with high-fat and standard diet. HFD – high fat diet; ALT – standard control diet

Statistično značilne razlike v telesni masi med homozigoti krmljeni s HFD krmo so se kazale že pri treh tednih starosti in se ohranile vse do 16. tedna starosti, ko smo živali usmrtili (Preglednica 10). Podoben trend se je nakazoval tudi pri živalih krmljenih s standardno krmo, pri čemer razlike v telesni masi med homozigoti niso bile signifikantne. Aditivni model podatkov iz F_2 -populacije sub-kongene linije M2 je pokazal značilne negativne vrednosti aditivnega učinka alela, ki izvira iz vitke linije L. Vpliv alela na telesno težo pri treh tednih je tako bil $-0,33 \pm 0,13$ g in se je stopnjeval do 16. tedna starosti, ko je njegov učinek na zmanjšanje telesne teže bil kar $-1,06 \pm 0,43$ g. Tudi pri skupini F_2 -živali krmljenih s standardno krmo smo opazili podoben trend, vendar z nekoliko manjšim učinkom alela L, ki pa se ni izkazal za signifikantnega. Pri tej skupini živali je bil aditivni učinek alela L na telesno maso pozitiven ($0,15 \pm 0,26$ g), kar pomeni, da so živali z aleлом L bolj pridobivale na telesni teži. Po šestem tednu starosti, pa se je njegov učinek na telesno maso spremenil ($-0,51 \pm 0,70$ g) in ohranil skozi celotno obdobje preučevanja živali. Iz slednjega lahko zaključimo, da je pri obeh skupinah živali iz F_2 -križanja sub-kongene liniji M2, alel, ki izvira iz vitke linije L, značilno zmanjševal telesno težo.

Preglednica 10: Povprečja (\pm standardni odklon) za telesno težo F₂-populacije miši krmljenih s standardno in visokokalorično krmo pri različnih starosti

Table 10: Means (\pm standard deviation) for body weight of F₂ mice fed with standard and high-fat diet chow

Genotip	HFD			
	TT3 (g)	TT6 (g)	TT12 (g)	TT16 (g)
FF (n = 40)	12,70 \pm 0,82	33,13 \pm 0,52	46,97 \pm 0,69	49,89 \pm 0,81
FL (n = 62)	12,45 \pm 0,81	32,23 \pm 0,45	46,64 \pm 0,61	48,44 \pm 0,71
LL (n = 42)	12,03 \pm 0,82	31,77 \pm 0,49	44,90 \pm 0,66	47,77 \pm 0,77
Pr(FF > FL) ¹	0,85	0,96	0,69	0,97
Pr(FF > LL) ¹	0,99	0,99	1,00	0,99
a ²	-0,33 \pm 0,13	-0,68 \pm 0,28	-1,03 \pm 0,37	-1,06 \pm 0,43
d ³	0,09 \pm 0,19	-0,22 \pm 0,41	0,71 \pm 0,55	-0,38 \pm 0,64
Pr(lal > 0) ⁴	0,99	0,99	1,00	0,99
Pr(ldl > 0) ⁴	0,68	0,70	0,90	0,73
ALT				
Genotip	TT3 (g)	TT6 (g)	TT12 (g)	TT16 (g)
FF (n = 10)	10,40 \pm 0,61	24,93 \pm 1,32	36,35 \pm 1,31	40,09 \pm 1,72
FL (n = 18)	10,70 \pm 0,50	23,77 \pm 0,99	34,68 \pm 0,95	37,97 \pm 1,30
LL (n = 14)	10,70 \pm 0,57	23,95 \pm 1,21	35,21 \pm 1,18	39,01 \pm 1,57
Pr(FF > FL) ¹	0,75	0,83	0,90	0,89
Pr(FF > LL) ¹	0,72	0,77	0,80	0,73
a ²	0,15 \pm 0,26	-0,51 \pm 0,70	-0,57 \pm 0,70	-0,54 \pm 0,92
d ³	0,12 \pm 0,34	-0,69 \pm 0,98	-1,10 \pm 0,98	-1,57 \pm 1,32
Pr(lal > 0) ⁴	0,71	0,77	0,80	0,73
Pr(ldl > 0) ⁴	0,67	0,77	0,87	0,88

TT3, TT6, TT12, TT16 – telesna teža pri 3., 6., 12. in 16. tednih starosti; HFD – visokokalorična krma; ALT – standardna, kontrolna krma; Pr(X > Y)¹ – posteriorna verjetnost da je genotip X debelejši/ bolj zamaščen kot kot genotip Y; ² – povprečen učinek zamenjave alel (aditivni učinek); ³ – dominantni vpliv; Pr(|X| > 0)⁴ – posteriorna verjetnost, da je absolutna vrednost X večja od 0. Statistično signifikantne vrednosti (Pr \geq 0,95) so označene s krepko pisavo

TT3, TT6, TT12, TT16 – body weight at 3, 6, 12 and 16 weeks of age; HFD – high fat diet; ALT – standard control diet; Pr(X > Y)¹ - posterior probability that a genotype X is heavier/fatter than genotype Y; ² – averages allele substitution effect - additive effect; ³ - dominance deviation; Pr(|X| > 0)⁴ – posterior probability that absolute value of X is greater than 0. Statistically significant values (Pr \geq 0,95) are marked in bold

Statistično signifikantne razlike med genotipi so se pokazale pri femoralnem maščobnem depaju miši, krmljenih s HFD, kjer je tudi aditivni učinek alela, ki izvira iz vitke linije L imel značilen vpliv na zmanjšanje mase maščobnega depaja (-0,047 \pm 0,020 g) (Preglednica 11). Trend vpliva alela L se je kazal tudi pri drugih maščobnih depojih homozigotov vitke linije (LL) za segment *Fob3b2*. Največji učinek je bilo zaznati pri gonadalnem maščevju (-0,061 \pm 0,039 g), ki pa ni bil statistično značilen. Kvantitativni lokus *Fob3b2*, ki ga zajema sub-kongena linija M2, povzroči tudi statistično značilno manjši adipozni indeks (-0,273 \pm 0,162 g), kot posledica zmanjšanja vseh štirih opazovanih maščobnih depojev. Slednje je potrdila tudi analiza maščobnih depojev kontrolne skupine miši. Opažen je podoben trend, vendar z manjšim vplivom alela vitke linije L, ki pa pri tej skupini ni signifikanten. Zaradi večjega vpliva kvantitativnega lokusa *Fob3b2* pri skupini miši krmljenih s HFD krmo, smo se za vse nadaljnje analize v tej raziskavi osredotočili le na to skupino.

Preglednica 11: Povprečja (\pm standardni odklon) za maso maščobnih depojev in adipoznega indeksa F₂-populacije miši krmljenih s standardno in visokokalorično krmo

Table 11: Means (\pm standard deviation) for fat pads of F₂ mice fed with standard and high-fat diet chow

HFD					
Genotip	ABD (g)	FEM (g)	MEZ (g)	GON (g)	ADI (g)
FF (n = 40)	0,631 \pm 0,022	1,170 \pm 0,037	1,123 \pm 0,057	0,890 \pm 0,066	6,459 \pm 0,282
FL (n = 62)	0,602 \pm 0,019	1,108 \pm 0,033	1,053 \pm 0,047	0,777 \pm 0,055	6,025 \pm 0,240
LL (n = 42)	0,596 \pm 0,021	1,076 \pm 0,036	1,053 \pm 0,053	0,768 \pm 0,062	5,949 \pm 0,266
Pr(FF > FL) ¹	0,90	0,95	0,86	0,94	0,94
Pr(FF > LL) ¹	0,92	0,99	0,83	0,94	0,95
a ²	-0,017 \pm 0,012	-0,047 \pm 0,020	-0,035 \pm 0,036	-0,061 \pm 0,039	-0,273 \pm 0,162
d ³	-0,011 \pm 0,018	-0,015 \pm 0,030	-0,035 \pm 0,054	-0,052 \pm 0,058	-0,197 \pm 0,240
Pr(lal > 0) ⁴	0,92	0,99	0,84	0,94	0,95
Pr(ldl > 0) ⁴	0,74	0,69	0,74	0,82	0,80
ALT					
Genotip	ABD (g)	FEM (g)	MEZ (g)	GON (g)	ADI (g)
FF (n = 10)	0,409 \pm 0,031	0,865 \pm 0,065	0,998 \pm 0,086	0,952 \pm 0,098	5,435 \pm 0,448
FL (n = 18)	0,403 \pm 0,021	0,851 \pm 0,044	1,024 \pm 0,057	1,013 \pm 0,065	5,559 \pm 0,297
LL (n = 14)	0,402 \pm 0,029	0,817 \pm 0,061	1,029 \pm 0,080	0,969 \pm 0,092	5,398 \pm 0,418
Pr(FF > FL) ¹	0,57	0,58	0,62	0,72	0,61
Pr(FF > LL) ¹	0,73	0,73	0,62	0,56	0,53
A2	-0,003 \pm 0,018	-0,024 \pm 0,039	0,016 \pm 0,051	0,009 \pm 0,059	-0,019 \pm 0,269
D3	-0,003 \pm 0,025	0,010 \pm 0,053	0,011 \pm 0,070	0,052 \pm 0,080	0,142 \pm 0,365
Pr(lal > 0) ⁴	0,58	0,74	0,62	0,56	0,53
Pr(ldl > 0) ⁴	0,55	0,58	0,56	0,74	0,65

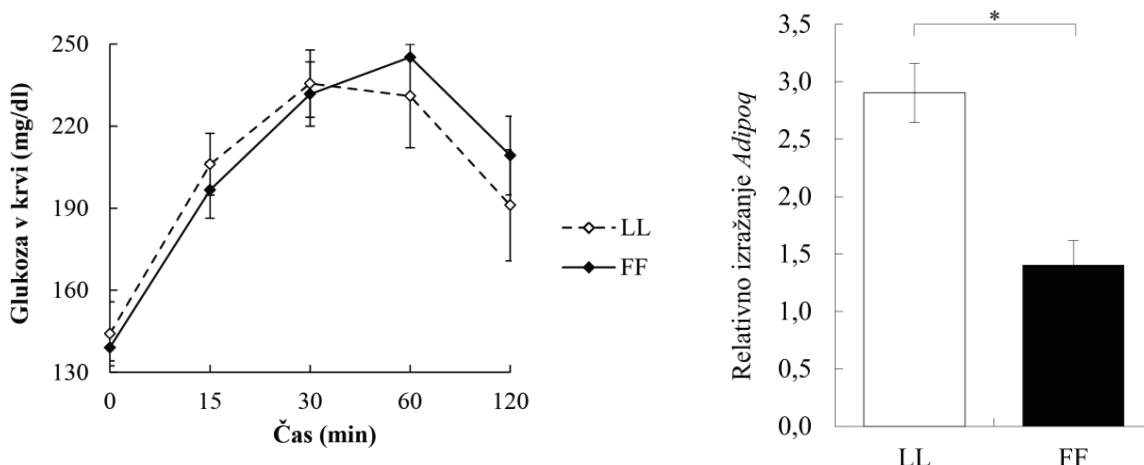
HFD – visokokalorična krma; ALT – standardna, kontrolna krma; ABD – abdominalni maščobni depo; FEM – femoralni maščobni depo; MEZ – mezenterialni maščobni depo; GON – gonadalni maščobni depo; ADI – adipozni indeks; Pr(X > Y)¹ – posteriorna verjetnost da je genotip X debelejši/ bolj zamaščen kot genotip Y; ² – povprečen učinek zamenjave alel (aditivni učinek); ³ - dominantni vpliv; Pr(|X| > 0)⁴ – posteriorna verjetnost, da je absolutna vrednost X večja od 0. . Statistično signifikantne vrednosti (Pr \geq 0,95) so označene s krepko pisavo

HFD – high fat diet; ALT – standard control diet; ABD – abdominal fat depo; FEM – femoral fat depo; MEZ – mesenteric fat depo; GON – gonadal fat depo; ADI – adiposity index; Pr(X > Y)¹ - posterior probability that a genotype X is heavier/fatter than genotype Y; ² – averages allele substitution effect - additive effect; ³ - dominance deviation; Pr(|X| > 0)⁴ – posterior probability that absolute value of X is greater than 0. Statistically significant values (Pr \geq 0,95) are marked in bold

Test glukozne tolerance je standardni postopek, kjer ugotavljamo kako hiter je vnos eksogene glukoze iz krvi v celice. Poslabšana glukozna toleranca kaže na težave pri vzdrževanju glukozne homeostaze (inzulinska rezistenza, diabetes,...). Test glukozne tolerance smo opravili na HFD skupini homozigotov F₂-M2 debele (n = 29) in vitke linije (n=21) za segment *Fob3b2* pri starosti štirih mesecev. Na Slika 20 vidimo, da so homozigoti LL imeli višji začetni nivo glukoze v krvi (čas = 0 min), kot homozigoti FF. Po vnosu glukoze, se je nivo le-te dvignil. Po 30-ih minutah je nivo glukoze v krvi pri homozigotih LL začel padati, medtem ko je nivo glukoze pri homozigotih FF še naraščal in pričel padati šele po eni uri. Sklepamo lahko, da homozigoti LL za segment *Fob3b2* še niso razvili inzulinske rezistenze. Zaradi relativno velikih standardnih odklonov razlike

med genotipi niso bile statistično značilne. Analiza glukozne tolerance po spolu je razkrila statistično značilne razlike med genotipi pri samicah. In sicer so samice, homozigoti LL za segment *Fob3b2*, imele boljšo glukozno toleranco, medtem ko ni bilo opaziti nobenih razlik v nivoju glukoze v krvi samcev.

Inzulinsko rezistenco spremi tudi zmanjšano izražanje adiponektina (*Adipoq*), tj. gena, ki ga izločajo adipocite in ki vpliva na boljšo občutljivost na inzulin ter ima antidiabetični vpliv. Analiza izražanja gena adiponektin (Slika 20) v gonadalnem maščobnem depaju F₂-populacije sub-kongene mišje linije M2 je pokazala statistično značilno povišano izražanje gena pri homozigotih vitke linije L za segment *Fob3b2*. Zmanjšano izražanje gena in v skladu s tem tudi slabša glukozna toleranca, kažeta na razvoj inzulinske rezistence pri homozigotih FF.



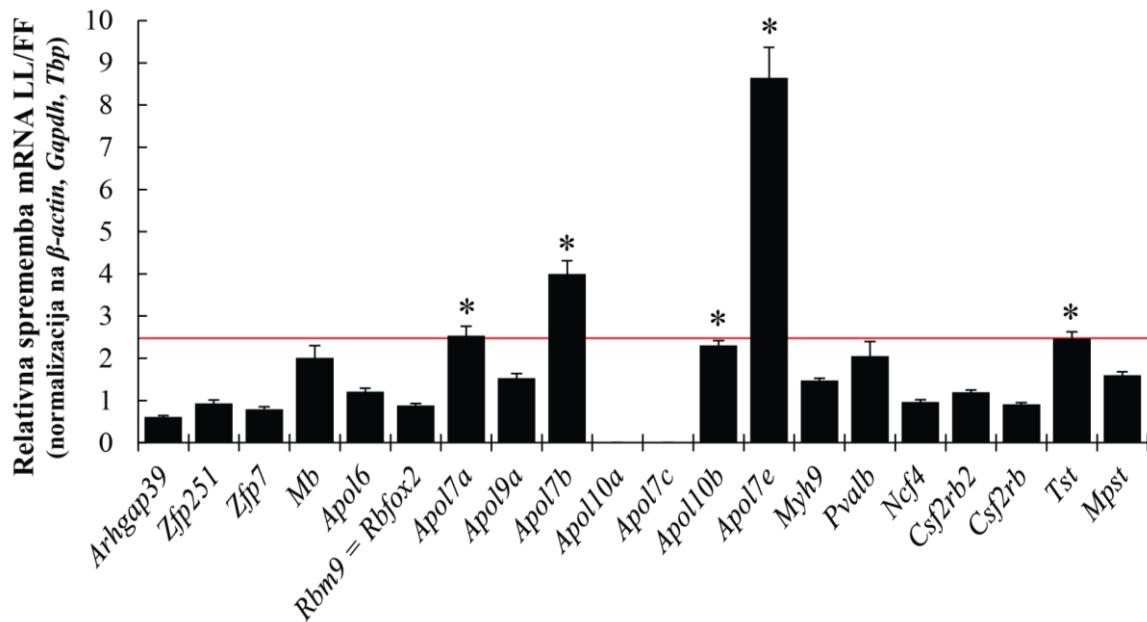
Slika 20: Test oralne glukozne tolerance in izražanje gena adiponektin v gonadalnem maščevju pri HFD skupini F₂ sub-kongene linije M2

Figure 20: Oral glucose tolerance test and relative expression of adiponectin gene in gonadal fat pad in HFD group of F₂ sub-congenic line M2

4.1.2 Identifikacija kandidatnega gena znotraj QTL-a *Fob3b2*

Z intervalno specifično analizo haplotipov med linijama F in L ter kongenima linijama M in M2, znotraj skrajšanega segmenta *Fob3b2* (~3,9 Mbp), smo odkrili non-IBD regije z variacijami, ki prispevajo k razlikam v zamaščenosti med linijami in identificirali 20 pozicijskih kandidatnih genov za vitkost. Značilno povišano izražanje ($\geq 2,5$ -krat; na Slika 21 označeno z rdečo vodoravno črto) v tkivih gonadalne maščobe F₂-M2 homozigotov LL za segment *Fob3b2* so imeli geni *Apol7a* (angl. *Apolipoprotein L 7a*), *Apol7b* (angl. *Apolipoprotein L 7b*), *Apol7e* (angl. *Apolipoprotein L 7e*) in *Tst* (angl. *Thiosulfate sulfurtransferase*). Kljub značilno različni ekspresiji *Apol7e* genov med homozigoti za odsek *Fob3b2*, so bili slednji na mejnem robu ekspresije ($C_t > 33$). Primerjava diferencialnega izražanja zelo nizko izraženih genov je lahko problematična, zato smo te

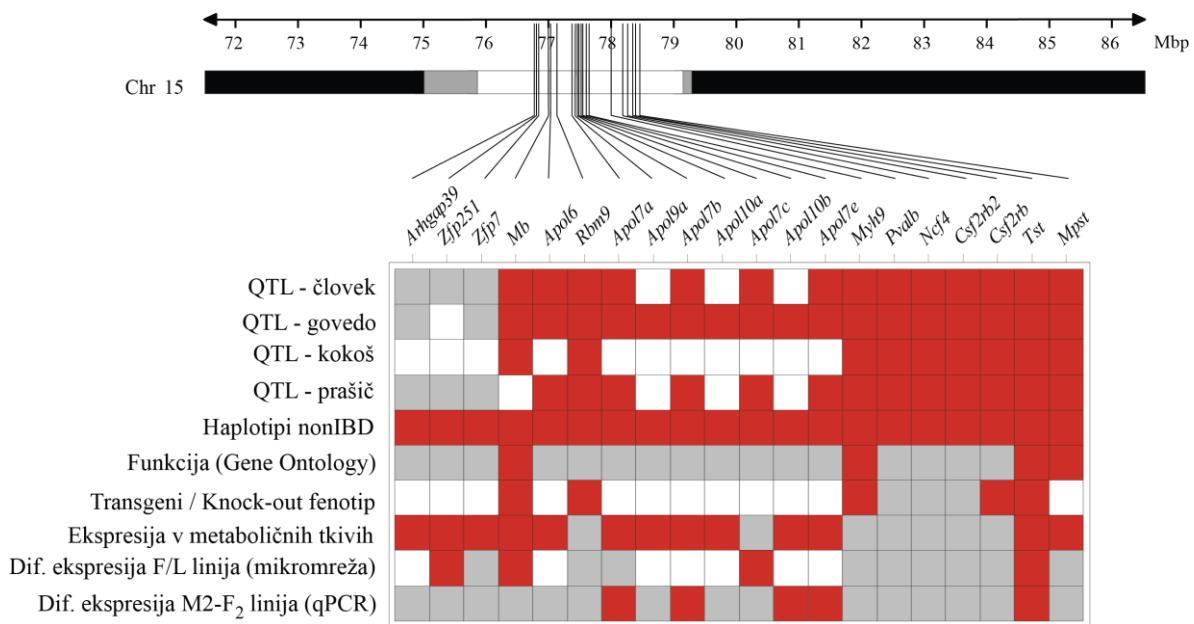
gene izključili iz nadalnjih analiz. Gen *Tst* se je tako izkazal kot edini tkivno specifično različno izražen gen v gonadalnem maščevju sub-kongene M2 linije.



Slika 21: Relativna spremembra izražanja non-IBD kandidatnih genov v gondalanem mačobnem depaju F₂-populacije sub-kongene mišje linije M2

Figure 21: Relative fold change of non-IBD canidate genes in F₂-M2 gonadal fat pad

Kot glavni kandidatni gen za vitkost znotraj QTL-a *Fob3b2* se je *Tst* pokazal tudi pri drugih analizah, katerih rezultati so prikazani na Slika 22. Pozitiven zadetek pri vsaki od analiz smo prikazali z rdečim kvadratkom, negativen s sivim, rezultate brez podatkov pa smo podali z belim kvadratkom. Izmed vseh izbranih non-IBD genov, je le *Tst* imel zadetke pri vseh kriterijih posameznih analiz.

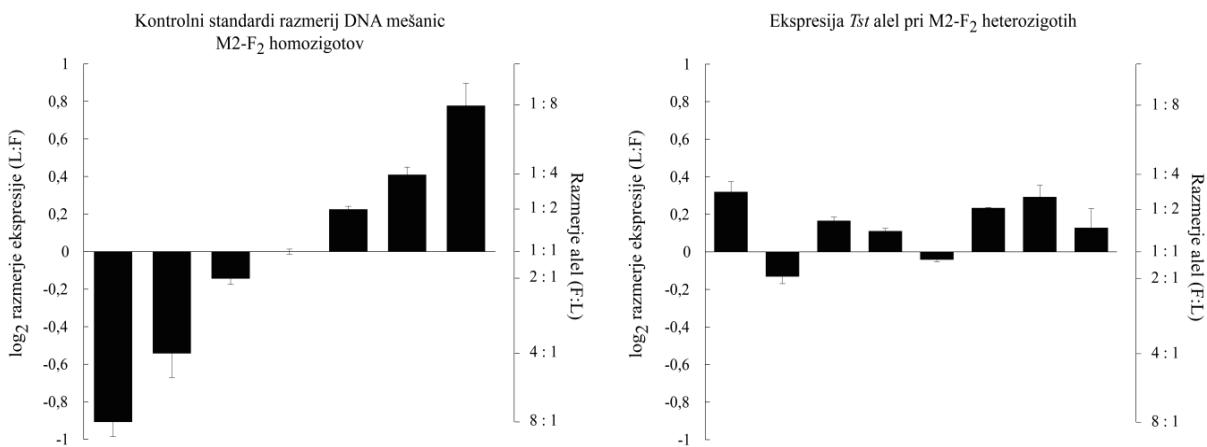


Slika 22: Prikaz rezultatov analiz za določanje glavnih kandidatnih genov za vitkost znotraj kvantitativnega lokusa *Fob3b2*. Rdeči kvadratki – zadetek oz. pozitiven rezultat; sivi kvadratki – ni zadetka oz. negativen rezultat; bel kvadratki – ni podatka

Figure 22: Results of top candidate lean gene positioned within the *Fob3b2* region. Red square – hit/positive result; gray square – no hit/negative result; white square – no data

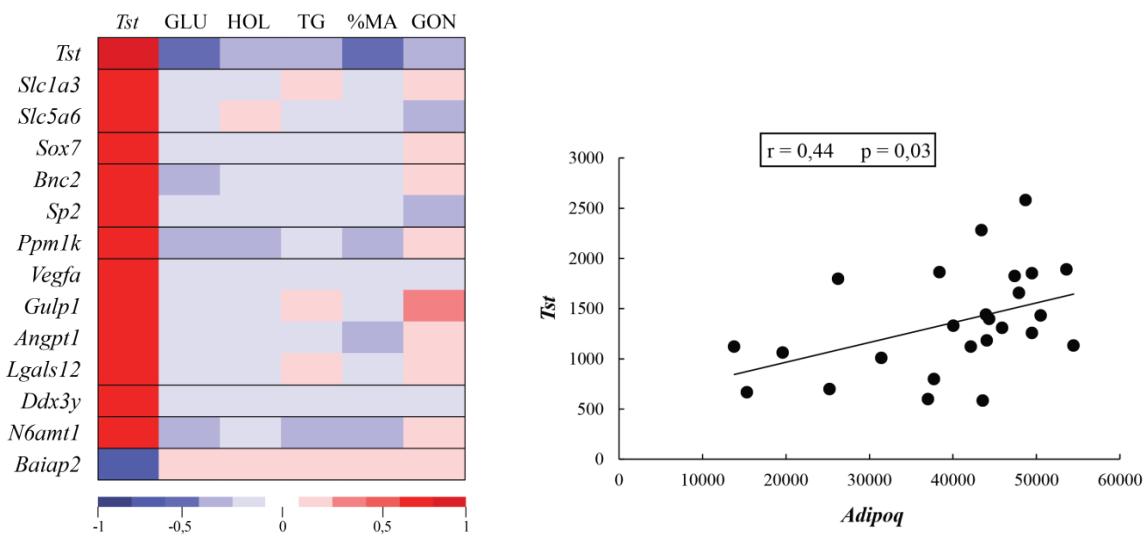
4.2 REZULTATI ANALIZE VPLIVA KANDIDATNEGA GENA *Tst*

S sekveniranjem eksonov gena *Tst* pri F₂-M2 sub-kongeni liniji smo identificirali le en polimorfizem, in sicer v 3'UTR regiji gena (polimorfizem prikazan na Slika 25). Odkriti SNP v prepisanem nekodirajočem delu kandidatnega gena *Tst* (rs31534689) smo izkoristili za analizo alelne diskriminacije ter s tem preverili obstoj razlik v izražanju mRNA v maščobnem tkivu heterozigotov F₂ za segment *Fob3b2*. Z vnosom izmerjene intenzitete fluorescence alelno specifičnega izražanja *Tst* na standardno krivuljo (Slika 23 levo) smo določili relativno izražanje alela iz vitke linije proti alelu iz debele linije (L:F). Ekstrapolirane vrednosti izražanja alelov pri heterozigotih populacije F₂ sub-kongene linije M2, kažejo na višjo ekspresijo alela iz vitke linije L (povprečje F:L = 1:1,64). Rezultati alelno specifičnega izražanja tako nakazujejo kavzalnost variacije z aleлом iz vitke linije L na povišan nivo *Tst* mRNA in posledično vpliv na vitkost.



Slika 23: Alelna specifična ekspresija gena *Tst* pri F₂-M2 heterozigotih za segment *Fob3b2*
Figure 23: Allelic imbalance of *Tst* gene in heterozygotes from F2-M2 sub-congenic cross

Z analizo korelacij smo preučili ali obstajajo podobni fenotipski učinki gena *Tst* tudi pri nekaterih drugih mišjih linijah na različne metabolične parametre ter če obstajajo asociacije z drugimi geni, specifično izraženimi v adipoznem tkivu smo preverili (Slika 24). Kandidatni gen *Tst* je bil statistično signifikantno (p -vrednost $\leq 0,05$) povezan s 4114 geni izraženimi v maščobnem tkivu 23-ih linij miši, od tega s 1140 geni v močni oz. zelo močni korelaciji (r -vrednost $\geq |0,7 - 1|$). Klasifikacija genov s spletnim orodjem PANTHER (<http://pantherdb.org/>) je razvrstila slednje v 42 skupin glede na molekularno funkcijo genov, po sistemu genske ontologije (GO; angl. *Gene Ontology*). Na Slika 24 (levo) so prikazane le pozitivne in negativne močne oz. zelo močne povezave med *Tst* in ostalimi geni. Geni, ki so v signifikantni pozitivni povezavi s *Tst* spadajo v skupino s transportno aktivnostjo (GO: 0005215; *Slc1a3*, *Slc5a6*), skupino, ki se selektivno in nekovalentno veže z DNA ali RNA sekvenco z namenom uravnavanja transkripcije (GO: 0001071; *Sox7*, *Bnc2*, *Sp2*), skupino s katalitično in regulatorno aktivnostjo (GO:0003824, 0030234; *Ppm1k*), skupino z vezavno aktivnostjo (GO:0005488; *Vegfa*, *Gulp1*, *Angpt1*, *Lgals12*), skupino s transkripcijsko regulatorno aktivnostjo (GO:0045182; *Ddx3y*) in skupino s katalitično in vezavno aktivnostjo (GO: 0003824; *N6amt1*). Močno negativno je kandidatni gen koreliran le s *Baiap2*, ki v kombinaciji z zunaj- ali znotraj-celičnim sporočilom promovira spremembo v celični aktivnosti (GO: 0004872). Izražanje gena *Tst* je med metaboličnimi parametri signifikantno negativno korelirano le z vsebnostjo glukoze v krvi (GLU) in z odstotkom maščob (% MA). Vsebnost holesterola (HOL), trigliceridov (TG) in masa gonadalne maščobe se zmanjšuje ob povišanem izražanju gena *Tst*, vendar se povezanost le nakazuje. Da ima povišano izražanje gena *Tst* vpliv na vitkost ter s tem tudi izboljšane metabolične parametre pri sub-kongeni liniji M2, potrjuje tudi signifikantno značilna povezanost med *Tst* in *Adipoq* pri drugih mišjih linijah (Slika 24 desno). Njuna korelacija je pozitivna in zmerna, kar pomeni, da ob povišanem izražanju gena *Tst* opazimo tudi povišano ekspresijo adiponektina, ki posredno vpliva na boljšo občutljivost celic na inzulin.

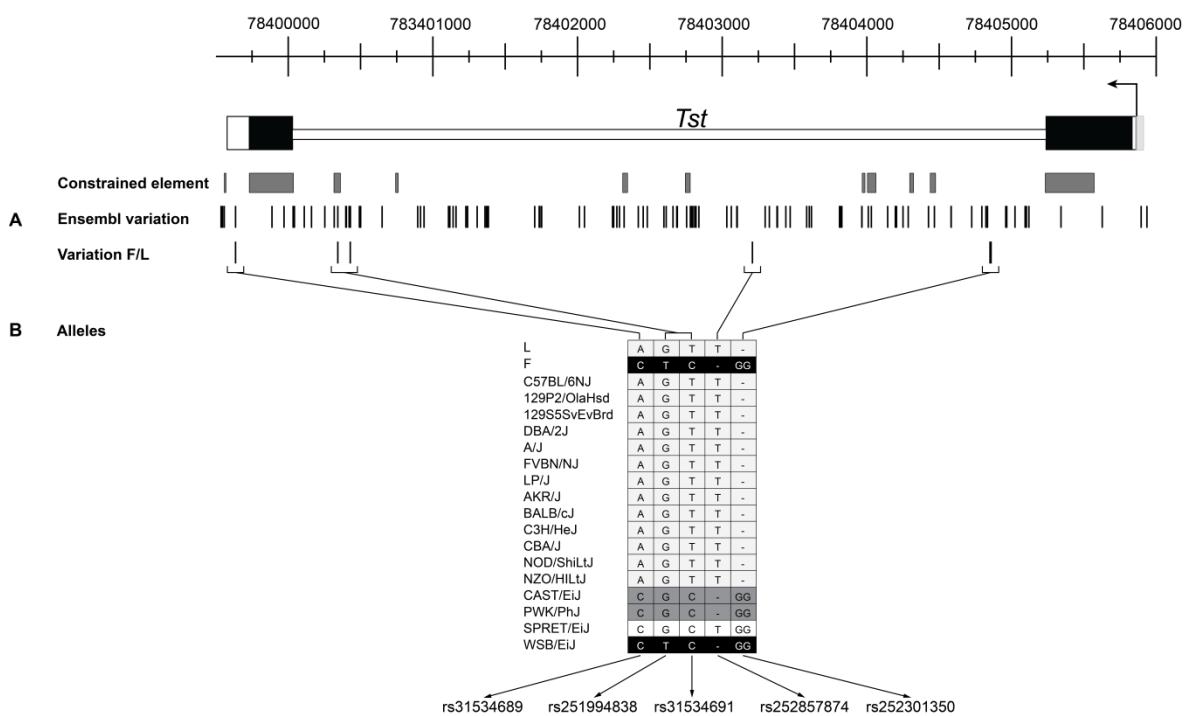


Slika 24: Močna ozioroma zelo močna korelacija med kandidatnim genom *Tst*, geni izraženimi v adipoznem tkivu ter metaboličnimi parametri pri 23-ih mišjih linijah. GLU – gluksa; HOL – holesterol; TG – trigliceridi; %MA – delež maščob; GON – gonadalnamaščobni depo

Figure 24: Correlation heatmap of *Tst*, adipose tissue expressed genes and different metabolic parameters in 23 mouse lines. GLU – glucose; HOL – cholesterol; TG – triglycerides; %MA – fat percent; GON – gonadal fat pad

4.3 DOLOČANJE VZROČNOSTI KANDIDATNIH GENOV ZA UČINEK *Fob3b2* QTL

Namen natančnega sekveniranja lokusa *Tst* debele in vitke linije v naši študiji je bil identificirati še ostale možne genetske variante, ki bi lahko prispevale k učinku preučevanega QTL-a na debelost ozioroma vitkost. Sekveniranje je obsegalo 10962 bp dolg segment (Chr 15: 78399030 - 78409992 bp), ki je pokrival gen *Tst* ter del navzgor (promotorski del) in navzdol od gena. Poravnava sekvene debele in vitke linije je pokazala le pet polimorfizmov (Slika 25). V primerjavi z referenčno sekvenco linije C57BL/6J (Slika 25A), vsebujuča liniji F in L 3 SNP-e, delekcijo nukleotida in insercijo dveh nukleotidov pri liniji F (Slika 25B). Polimorfizem rs31534689, katerega smo odkrili tudi pri sekveniranju eksonov pri sub-kongeni M2 mišji liniji, se nahaja v regiji 3'UTR, medtem ko so vse ostali variante locirane znotraj introna *Tst*. Nobenega polimorfizem nismo odkrili v regiji navzgor od gena. Sekvene debele in vitke linije in sekvene drugih mišjih linij smo primerjali med seboj ter na ta način poskušali določiti izvor lokusa *Tst* naših linij. Linija F ima enak haplotip genetskih variant gena le z linijo WSB/EiJ, podobna je pa tudi drugim divjim linijam, kot so CAST/EiJ, PWK/PhJ in SPRET/EiJ (Slika 25B). Po drugi strani pa ima vitka linija L skupen haplotip z ostalimi 13 klasičnimi inbridiranimi linijami, vključujuč referenčno linijo C57BL/6J.



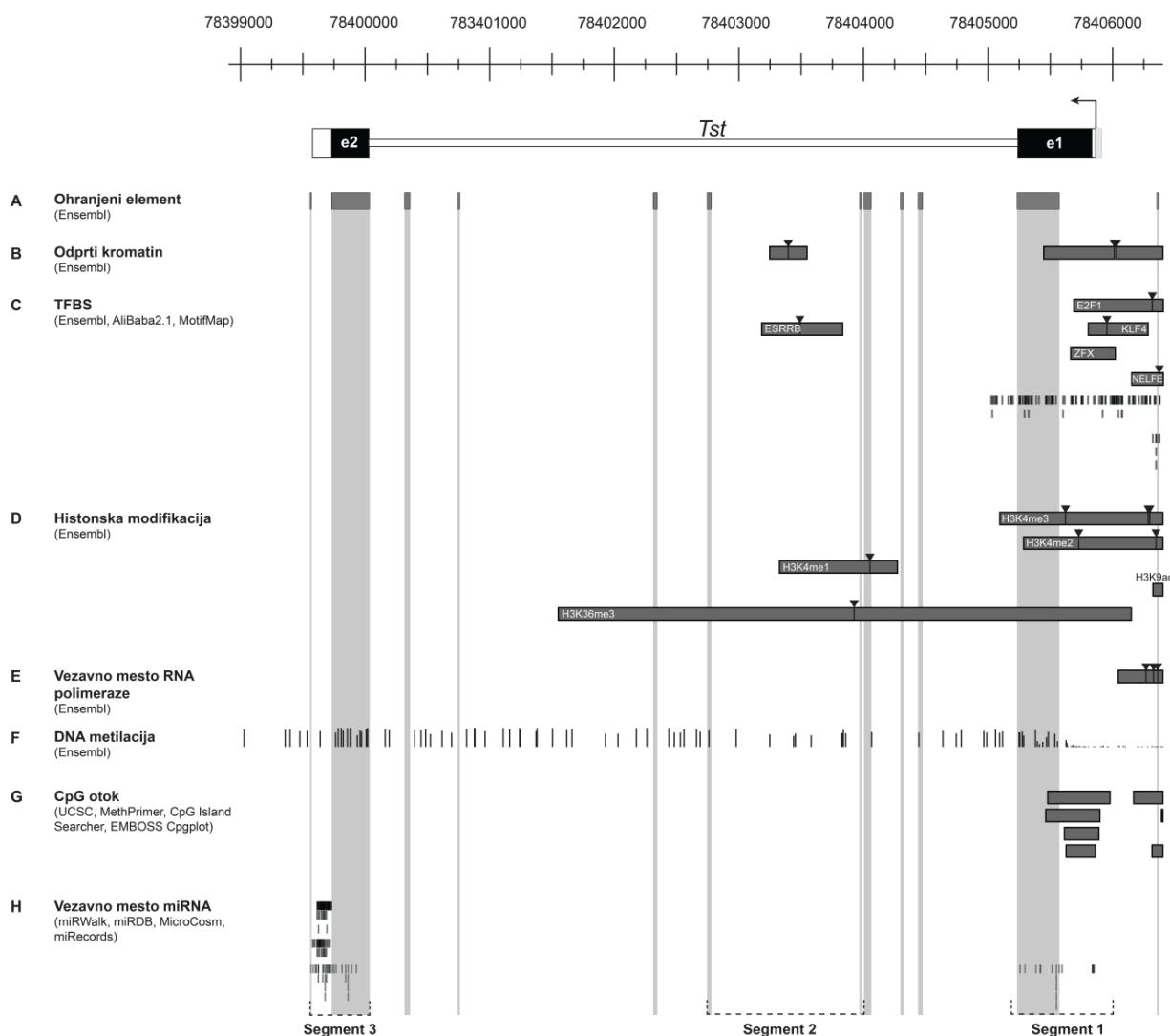
Slika 25: Identificirani polimorfizmi znotraj regije *Tst* med vitko in debelo linijo

Figure 25: Identified variations between Fat and Lean mouse line within the *Tst* region

Glavni cilj izgradnje karte kandidatnih regulatornih elementov gena *Tst* (v nadaljevanju »*Tst* atlas«) je bil sestaviti oziroma povezati različne genomske anotacije za kandidatno regijo lokusa *Tst* ter z različnimi bioinfomacijskimi orodji (Slika 26 A-H) identificirati genomske odseke, ki so potencialno pomembni za regulacijo izražanja gena *Tst*. Iskali smo elemente povezane s spremembami strukture kromatina, kot so histonske modifikacije, regije odprtrega kromatina, mesta metilacije DNA in vezavna mesta za transkripcijske faktorje, polimerazo RNA in miRNA. Dodatno smo pregledali tudi genetske variante pri vseh sekveniranih mišjih linijah. Zgornji del slike prikazuje strukturo gena *Tst* (6304 bp), ki vsebuje dva eksona in en intron. Na sliki je s svetlo sivim kvadratom označen promotor, ki se prekriva z začetnim mestom transkripcije gena (na sliki označeno s puščico). Znotraj ~ 7,4 kb dolgega preučevanega segmenta, smo iskali evolucijsko ohranjene elemente znotraj 39 vrst sesalcev nadreda »višji sesalci« (lat. eutheria). Skupno se nahaja znotraj preučevanega segmenta 12 visoko ohranjenih regij (Slika 26A), izmed katerih samo dva najdaljša elementa pričakovano sovpadata z eksonoma. Nadaljnje smo opazili dve mesti hipersenzitivni na DNazo I oziroma regije odprtrega kromatina (Slika 26B), kjer ena kartira v intron, druga pa prekriva promotorsko mesto gena *Tst*. Regije odprtrega kromatina sovpadajo z vezavnimi mesti transkripcijskih faktorjev (Slika 26C). V podatkovni bazi Ensembl smo našli anotacijo vezavnih mest za 5 različnih transkripcijskih faktorjev (ESRRB, E2F1, ZFX, KLF4 in NELFE), medtem ko sta spletni orodji Alibaba2.1 in MotifMap napovedali dodatnih 55 različnih potencialnih vezavnih mest, izmed katerih so imeli najvišjo frekvenco transkripcijski faktorji SP1, NF1 in C/EBPα. Zabeležili smo 4 različne histonske modifikacije (Slika 26D) in vezavno mesto za polimerazo RNA (Slika

26E), eksperimentalno potrjeno v projektu ENCODE pri dveh celičnih linijah, v regiji odprtga kromatina v promotorskem delu gena. Zbrane anotacije tako kažejo na regulatorno vlogo identificiranih dveh regij odprtga kromatina znotraj *Tst* lokusa. Identificirali smo 181 CpG mest, katerih stopnja metilacije (0 - 100 %) je na Slika 26F prikazana kot višina črtice. Najnižja stopnja metilacije oziroma nemetilirana mesta se prekrivajo z napovedanimi regijami CpG otokov (Slika 26G), kot tudi s promotorsko regijo gena *Tst* in regijo odprtga kromatina. Rezultati analize z orodji za napoved vezavnih mest za miRNA (Slika 26H) nakazujejo na prisotnost regulatorne pomembne regije na 3' neprevedenem mestu drugega eksona gena *Tst*. Orodja so predpostavila 54 različnih miRNA, med katerimi so bile največkrat napovedane mmu-miR-10a, mmu-miR-10b, mmu-miR-761, mmu-miR-214, mmu-miR-670, mmu-miR-877 and mmu-miR-339. Pri analizi so se izpostavila tudi 4 mesta v 3'UTR regiji gena *Tst*, ki so vsebovala največ napovedi za vezavo miRNA. Primerjalna analiza vseh zabeleženih regulatornih elementov kaže na obstoj treh pomembnih regulatornih segmentov, ki locirajo v promotorski, intronski in 3'UTR del lokusa *Tst* (na Slika 26 spodaj Segment 1-3).

Zbrani podatki regulatornih elementov lokusa *Tst* in identifikacija genetskih variant med našima linijama F in L so omogočili določitev glavnih variant, ključnih za učinek lokusa *Tst* na vitkost. Izmed štirih intronskih variant (Slika 25), je le ena (rs251994838) locirana znotraj evolucijsko ohranjenega elementa. Druga kandidatna varianta (rs31534689) pa leži v 3' neprevedeni regiji gena *Tst*. Z bioinformacijsko analizo smo identificirali kar nekaj možnih vezavnih mest okrog kandidatnega SNP-a, a le miRNA mmu-miR-338-5p je imela napovedano popolno vezavo s »seed« mestom na variacijo, ki izvira iz vitke linije L. Polimorfizma rs251994838 in rs31534689 tako predstavlja glavni genetski variaciji, kavzalni za fenotip vitkosti pri homozigotih M2 LL za segment *Fob3b2*.



Slika 26: Atlas regulacijskih elementov transkripcije gena *Tst*
Figure 26: Transcription regulatory atlas for *Tst* gene

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Glavna tema doktorske naloge je bilo pozicijsko kloniranje kvantitativnega lokusa za vitkost znotraj QTL odseka *Fob3b2*. V prvem delu naloge je bilo težišče na pristopu natančnejšega genetskega kartiranja. V drugem delu je bil cilj dokazati vzročnost identificiranih kandidatnih genov z ekspresijskimi študijami in različnimi bioinformacijskimi analizami. Z natančnejšim kartiranjem smo želeli s kvantitativno analizo križanja F₂ subkongenih linij čim bolj zožati genetski odsek, ki je odgovoren za vpliv na vitkost. Z ekspresijskimi in bioinformacijskimi analizami pa smo želeli odkriti kandidatne gene, ki se nahajajo znotraj preučevanega lokusa ter z zbranimi podatki iz različnih baz identificirati vzročni gen.

5.1.1 Natančnejše kartiranje QTL *Fob3b2*

Z metodami grobega kartiranja v raziskavah genoma miši so predhodne študije identificirale štiri QTL z učinkom na maso maščevja *Fob1*, *Fob2*, *Fob3* in *Fob4*. QTL z največjim vplivom je *Fob3*, ki se nahaja na 15. kromosому in pojasnjuje kar 14,4 % fenotipske variance za odstotek maščevja (Horvat in sod., 2000). Regijo so podrobneje kartirali v raziskavi Stylianou in sod. (2004) ter jo razdelili na dva manjša segmenta *Fob3a* in *Fob3b*. Odkrita sta bila na mišji populaciji F₂, katere izhodiščni starševski liniji sta bili poligeni model debele (F) in vitke (L) miši. Slednji se med seboj močno razlikujeta zaradi dolgoročne dvosmerne selekcije za nalaganje maščevja (Bünger in Hill, 1999). Za natančnejše kartiranje lokusa *Fob3b2* smo razvili populacijo F₂ sub-kongene mišje linije M2, ki izhaja iz omenjenih selekcioniranih linij, pri čemer je vitka linija služila kot donorska linija znotraj preučevanega lokusa, linija F pa kot prejemna linija. Subkongena linija M2 ima torej genetsko ozadje prejemne linije F, donorski segment linije L pa predstavlja le odsek med mikrosatelitskima genetskima markerjema D15Mit68 in D15Mit239. Izmed polimorfizmov odkritih v The Jackson Laboratory (ZDA) pri linijah F in L ter kongeni liniji M, smo izbrali tiste, ki so locirani v negenotipiziranih segmentih lokusa *Fob3b2* pri sub-kongeni liniji M2. Na ta način smo lahko natančneje opredelili donorski segment vitke linije, ki pri liniji M2 sega od rs32476725 do NES12090622 (2,8 Mbp) in se nahaja znotraj lokusa *Fob3b2*. Nadaljnje zmanjševanje genetskega intervala QTL pri miših je težko dosegljivo, ker je razmerje med genetsko rekombinacijo (1% rekombinacije oziroma 1cM) in fizično razdaljo (v baznih parih, bp) zelo neugodno: 1 cM genetske razdalje pomeni 1 Mbp fizične razdalje v bp (Shifman in sod., 2006). Zato pri tipičnih velikostih križanj, ki so ekonomsko in praktično izvedljivi pri miših (do 500 F₂ živali) ne moremo pričakovati tako velikega števila rekombinantov v tarčnem odseku, ki bi zmanjšali fino kartiran interval pod 1 cM. Poleg tega se pogosto pojavlja interferenca izmenjave kromatid (angl. *crossing over*) v donorskih segmentih, ki so genetsko heterogene v sicer homogenem genomskem ozadju. V takih heterozigotnih donorskih

segmentih so namreč eksperimentalno pokazali, da je frekvenca rekombinacij še manjša (Valdar in sod., 2006). Zaradi teh fenomenov v našem poskusu nismo nadaljevali z nadaljnji križanji in lahko zaključimo, da smo dosegli visoko stopnjo natančnosti genetskega kartiranja pri subkonegni liniji M2 z doseženo fizično razdaljo 2,8 Mbp oziroma 1,4 cM.

Pri analizi različnih parametrov F₂-populacije sub-kongene linije M2 za *Fob3b2*, kjer je ena skupina bila krmljena s standardno krmo (ALT), druga pa s krmo z visoko vsebnostjo maščob (HFD), smo primerjali fenotipske razlike med tremi genotipi (LL, FL in FF) obeh skupin. Analiza opisnih statistik je pokazala, da so miši krmljene s HFD pridobivale na telesni masi veliko hitreje kot druga skupina. Razlike v telesni masi in masi maščobnih depojev med homozigoti FF in LL za segment *Fob3b2*, pri skupini ALT, so tekom celotnega obdobja preučevanja nakazovale trend (homozigoti FF v poprečju en gram težji), vendar razlike niso bile statistično značilne tudi zaradi relativno velike variabilnosti znotraj genotipov FF in LL. Za majhne razlike in velike variacije znotraj genotipa je najverjetnejša razlaga v dolžini donorskega segmenta vitke linije L, ki je pri liniji M2 krajši. Da ima QTL manjši, vendar signifikanten učinek na zamaščevanje, so ugotovili že v raziskavi Prevoršek (2010b), kjer so učinek slednjega preučevali tudi na kongeni liniji M, iz katere izvira naša sub-kongena linija. Zatorej lahko sklepamo, da ima QTL *Fob3b2* pri liniji M2 krmljeni z ALT krmo manjši učinek, z nakazanimi razlikami med genotipi. V tem primeru bi lahko šlo za fenomen vezane epistaze, zelo reden, vendar že opažen pojav predvsem pri genetskih modelih, ki omogočajo analizo velikega števila rekombinacij in imajo kratek generacijski interval, kot so vinska mušica in nekatere rastline (Haig, 2011). Da se je učinek QTL *Fob3b2* pri liniji M2 krmljeni z ALT krmo zmanjšal v primerjavi z linijo M lahko pripisemo epistatičnemu delovanju QTL *Fob3b2* s tesno vezanim aleлом vitke linije, ki je prisoten v daljšem donorskem segmentu linije M, ne pa tudi v liniji M2. Menimo, da je ta rezultat lahko podlaga za nadaljnje raziskovanje tega redkega fenoma, ki lahko razloži tudi določen delež variabilnosti, ki ni pojasnjena, v literaturi imenovani kot »manjkajoča dednost« (angl. *missing heritability*) (Eichler, 2010).

Čeprav učinek QTL-a *Fob3b2* na vzdrževalni krmi ni bil zelo izrazit, pa smo uspeli potrditi njegov učinek z visoko statistično značilnostjo pri F₂-populaciji linije M2 krmljene s krmo HFD. Rezultati analize fenotipskih podatkov so pokazali, da imajo homozigoti LL krmljeni s HFD krmo, manjšo telesno maso in maso maščobnih depojev, kar lahko pripisemo učinku *Fob3b2*. Negativni koeficienti pri analizi aditivnega modela za vsako preučevano lastnost skupine HFD, kažejo na izrazito zmanjšano zamaščenost pri zamenjavi enega alela F z aleлом L (npr.: *Fob3b2* vpliv na adipozni indeks v povprečju $-0,273 \pm 0,162$ g).

Razvoj debelosti spremljajo tudi druge spremembe v metabolizmu. Da ima QTL *Fob3b2* ugodne učinke na vitkost smo potrdili z analizo glukozne tolerance. Kot že omenjeno poslabšana glukozna toleranca kaže na težave pri vzdrževanju glukozne homeostaze

(inzulinska rezistenca, diabetes,...), kar smo tudi opazili pri homozigotih FF za segment *Fob3b2*. Medtem ko so homozigoti LL uspešno in hitro uspeli znižati nivo glukoze v krvi po administraciji le-te, so homozigoti FF za slednje potrebovali veliko več časa.

Zanimivo je, da je analiza vpliva genotipa na glukozno toleranco miši krmljenih s HFD krmo, ločeno po spolu, pokazala statistično značilno izboljšano glukozno homeostazo pri homozigotnih samicah LL za segment *Fob3b2*, v primerjavi s FF homozigotnimi samicami. Samci so razvili glukozno intoleranco in med njimi ni bilo razlik. Dobljeni rezultati sovpadajo z dognanji študij na človeku, kot tudi na drugih živalskih modelih, kjer so dokazali boljšo občutljivost na inzulin in večjo rezistenco na visokokalorično hrano pri ženskem spolu ter večjo dovzetnost na razvoj inzulinske rezistence pri moških, kljub manjšemu odstotku telesnih maščob. Vzroki za te razlike med spoloma pa še niso dobro pojasnjeni (Macotela in sod., 2009; Varlamov in sod., 2014). Povečano telesno težo in inzulinsko rezistenco sprembla tudi zmanjšano izražanje adiponektina (*Adipoq*), katerega glavni funkciji sta uravnavanje metabolizma glukoze in oksidacije maščobnih kislin. Slednje velja tudi za našo sub-kongeno linijo – homozigoti LL imajo dvakrat višjo izražanje gena adiponektin kot homozigoti FF. Sklepamo lahko, da so slednji razvili inzulinsko rezistenco in debelost, medtem ko je *Fob3b2* na miši genotipa LL deloval rezistentno proti razvoju debelosti. O visokih in pozitivnih korelacijah med nivojem adiponektina v krvni plazmi in ugodnimi učinki na zmanjšanje debelosti ter inzulinske rezistence so poročali tudi v epidemioloških študijah pri ljudeh (Silha in sod., 2003). Naša raziskava k temu ponuja novo znanje in sicer, da je lahko določen delež teh ugodnih učinkov povezan z delovanjem gena *Tst* oziroma izboljšanjem metabolizma mitohondrijev, kjer *Tst* deluje.

Glede na rezultate naše raziskave lahko zaključimo, da smo uspešno natančneje kartirali *Fob3b2* ter da smo uspeli dokazati njegov vpliv na rezistenco za razvoj debelosti pri miših. Rezultati so predstavljeni podlago za drugi del naloge, kjer smo želeli znotraj kartiranega odseka odkriti vzročni gen.

5.1.2 Določanje vzročnosti kandidatnih genov za učinek QTL *Fob3b2*

Znotraj intervala *Fob3b2* smo identificirali genomske regije, ki med linijama F in L niso enake po izvoru. V takih regijah se namreč najverjetneje nahajajo vzročni polimorfizmi (DiPetrillo in sod., 2005). Pri primerjavi haplotipov med linijama F in L, smo izbrali 20 kandidatnih genov, ki so se nahajali znotraj non-IBD regij. Analiza izražanja izbranih kandidatnih genov v gonadalnem maščevju homozigotov debele in vitke linije M2 je pokazala 2,5-kratno povišano ekspresijo le pri genih *Apol7a*, *Apol7b*, *Apol7e* in *Tst*. Po pregledu podatkov o izražanju štirih izbranih genov v drugih tkivih miši v podatkovni bazi BioGPS (2015), smo ugotovili, da se geni *Apol** specifično izražajo le v imunskih celicah

in ne v adipocitih. Vzorčenje smo opravili pri relativno starih zamaščenih živalih (16. tednov), hranjenih s HFD krmo. Znano je, da stanje prekomerne adipoznosti pri miših močno poveča dovzetnost za okužbe in negativno vpliva na imunski sistem in obrambne mehanizme (Fantuzzi, 2005; Fantuzzi, 2013). Glede na veliko možnost prisotnosti infiltriranih imunskih celic v vzorcih maščevja ter relativno poznih ciklih detekcije v vzorcih (nizke količine tarčnega gena) smo skupino izraženih genov apolipoprotein L (*Apol**) izključili iz seznama pomembnih kandidatnih genov in jih nismo upoštevali pri nadaljnjih analizah.

Na osnovi rezultatov bioinformacijske analize povezav kandidatnih genov z zamaščenostjo oziroma adipoznim tkivom glede na različne podatkovne baze in kriterije, združenimi s rezultati ekspresije genov pri liniji F in L (Morton in sod., 2011) in sub-kongeni liniji M2, smo določili gen *Tst* kot najbolj verjetni kavzalni kandidatni gen znotraj lokusa *Fob3b2* (Slika 21 in Slika 22). Tiosulfat sulfurtransferaza je še relativno nepoznan zaščitni encim, ki pospešuje detoksifikacijo cianida v tiocianat. V največji meri je prisoten v jetrih, ledvicah in debelem črevesju, kjer je pomemben pri detoksifikaciji produktov mikrobiote, katera pridobiva energijo z oksidacijo organskih komponent oziroma vodika (H_2) preko pretvorbe sulfatov (SO_4^{2-}) v vodikov sulfid (H_2S). Novejša doganjaja pa kažejo na vlogo encima v poteh mitohondrijske oksidacije sulfida, kjer katalizira prenos sulfan sulfurja (angl. *sulfane sulphur*) iz glutation persulfida (angl. *glutathione persulfide*; GSSH) do sulfita za formacijo tiosulfata (Libiad in sod., 2015).

Ljudje in miši so diploidni organizem, kar pomeni da imamo po dve kopiji vsakega gena. Normalno se ti dve kopiji izražata enako. V nekaterih primerih pa slednje ne drži. Ekspresiji dveh alelov, ki nista v razmerju 1:1 pravimo alelno neravnovesje (AI; angl. *allelic imbalance*). Obstaja veliko razlogov zakaj se ekspresija razlikuje med aleli. Ena izmed takih so *cis*-delujoče mutacije, ki lahko spremeni regulacijo enega alela preko sprememb v promotorskih/ojačevalnih regijah (vezavna mesta za transkripcijske faktorje), ali celo preko mutacij v 3'UTR, ki vplivajo na stabilnost mRNA ali vezavo miRNA. Primerjava stopnje relativne ekspresije dveh alelov SNP gena v istem vzorcu, namesto primerjave izražanja gena med posamezniki, predstavlja alternativni pristop za identifikacijo *cis*-delujočih regulatornih SNP-ov ali haplotipov. Velika prednost tega je primerjava ekspresije dveh alelov SNP znotraj posameznika (oz. posameznega vzorca), kjer vsak alel deluje kot interna referenca za druge faktorje (angl. *confounding factors*), ki lahko vplivajo na celokupno ekspresijo določenega/preučevanega gena. Ti faktorji so lahko spremembe pri pripravi tkiv in mRNA, okoljski vplivi, sekundarne spremembe ekspresije kot posledica *trans*-delujočih substanc (npr.: hormoni) in vplivi sekundarnih polimorfizmov drugih genov, ki posledično spreminjajo raven ekspresije preučevanih/tarčnih genov (Milani in sod., 2007). Alelno neravnovesje je splošen fenomen - več kot 80 % genov pri miši ima *cis*-regulatorno variacijo, ki vpliva na kompleksne lastnosti in so navadno prisotne tudi kot človeški ortologi (Crowley in sod., 2015). Pojav

alelnega neravnoesja smo testirali tudi pri našem kandidatnem genu *Tst*. Analiza ekspresije alelov SNP za identificiran polimorfizem v 3'UTR regiji (rs31534689) je pokazala povišano izražanje L alela pri heterozigotih M2 za segment *Fob3b2*, kar podpira dejstvo, da ima polimorfizem *cis*-učinek in je vzročen za povišano raven *Tst* mRNA in vitkost pri miših.

Povišan nivo ekspresije *Tst*, izboljšani metabolični parametri in zmanjšana telesna teža pri homozigotih LL-M2, oziroma nasprotno nižja ekspresija *Tst*, inzulinska rezistenca, pridobivanje telesne teže in na splošno slabše zdravstveno stanje homozigotov FF-M2, pri krmljenju s HFD krmo, podpira našo predpostavko, da je kandidatni gen specifično povezan z zamaščenostjo in dovzetnostjo za metabolične bolezni. Pojav je prisoten tudi pri drugih mišjih linijah, kjer je ekspresija *Tst* v adipoznem tkivu miši negativno korelirana z maso maščobnih depojev in pozitivno povezana z nivojem adiponektina v plazmi. V močni korelaciji je tudi z 12 geni, katerih biološke funkcije so organizacija celičnih komponent, usmerjanje substanc do specifičnih lokacij, odzivanje na dražljaje, signalizacija, sodelovanje pri razvoju sistemov in procesih metabolizma proteina. Izmed teh izstopa povezava med *Tst* in genom *Lgals12*, ki ima poleg naštetih, tudi funkcijo pri procesih metabolizma lipidov. Gen se preferenčno izraža v adipoznem tkivu, kjer je reguliran preko hormonov in citokinov, ki sodelujejo pri regulaciji občutljivosti na inzulin, kar nakazuje na vključenost gena v energijski homeostazi. Miši z izbitim genom *Lgals12* so imele povišano lipolizo v povezavi s povečano mitohondrijsko respiracijo v adipocitih ter povečano porabo energije. Prav tako so imele manj maščobnega tkiva in izboljšano inzulinsko in glukozno toleranco (Yang in sod., 2011). Zaključimo lahko, da se je povišano izražanje gena *Tst* evolucijsko ohranilo skupaj s fenotipom zdrave vitkosti tudi pri ostalih linijah in je njegov vpliv močno povezan z zamaščenostjo.

Naša raziskava in odkritje QTL *Fob3b2* ter naše analize vzročnosti kandidatnih genov so bile povod za sodelovanje s skupino dr. Mortona (Univerza v Edinburghu), ki je v našo skupno raziskavo prispeval dodatne dokaze in več fizioloških podpornih analiz. Tako so na podlagi rezultatov tega doktorata razvili neodvisne transgene modele za *Tst*: transgeni model s prekomernim izražanjem gena *Tst* specifično samo v belem maščevju ter model z izničenim genom *Tst*, kar je naši študiji nudilo dodatne dokaze o vzročnosti gena *Tst* za učinke QTL *Fob3b* ter komplementarne podatke za boljše razumevanje funkcij gena. Utišanje (angl. *knock-down*) gena *Tst* je povzročilo večjo akumulacijo lipidov med diferenciacijo preadipocit 3T3-L1 in zmanjšanje ekspresije nekaterih genov, ki sodelujejo pri lipolizi. Prav tako so adipocite z utišanim genom bile bolj občutljive na zaviranje lipolize. Po drugi strani pa je transgeni model z izbitim (angl. *knock-out*) kandidatnim genom kazal poslabšanje metaboličnih parametrov. Miši niso bile bistveno bolj zamaščene od kontrole, tudi razlik v porabi energije ni bilo, ampak so histološko gledano kazale hipertrofijo adipocit in povečano akumulacijo lipidov v preadipocitih. Prav tako so

adipocite transgenega modela razvile tudi inzulinsko rezistenco. Odsotnost gena *Tst* povzroča akumulacijo maščob in vpliva na metabolične funkcije adipocit.

Najbolj prepričljiv dokaz o pravilnosti naših rezultatov glede vzročnosti gena *Tst* za opaženi fenotip pa je pokazala fenotipska karakterizacija transgenega modela s prekomerno ekspresijo *Tst*. Ta model je kazal fenotip zdrave vitkosti z zelo podobnimi fenotipskimi in fiziološkimi parametri kot naš model razvit iz vitke linije L. Miši izpostavljeni HFD krmi so imele statistično značilno zmanjšano telesno maso in maso adipoznih depojev v primerjavi s kontrolo, imele so boljšo glukozno toleranco in vzdrževale so visok nivo adiponektina. Fiziološki mehanizmi transgenega modela so tako vključevali boljši lipolitični odgovor, boljšo občutljivost adipoznega tkiva na inzulin in konstantno sproščanje adiponektina. Ker je bil ta model s prekomernim izražanjem *Tst* v belem maščevju razvit na popolnoma drugem genetskem ozadju kot linija L je to dodaten dokaz, da v našem primeru ne gre za mutacijo, ki specifično deluje samo v selekcijskem ozadju linije L ampak gre za splošen učinek, ki je neodvisen od genetskega ozadja. Večji delež rezultatov tega doktorata in študij skupine dr. Mortona smo objavili v skupni publikaciji (Morton in sod., 2016).

Z analizo sekveniranja kandidatnega gena smo določili polimorfna mesta med osnovnima linijama F in L in s tem identificirali genetske variante v genu *Tst*, potencialno odgovorne za povišano izražanje in fenotipske učinke na vitkost. Analiza poravnanih sekvenc med linijama F in L je razkrila le 5 polimorfizmov. Majhno število odkritih variacij nakazuje, da preučevana genomska regija debele in vitke linije miši najverjetnejše izhaja iz dveh po izvoru bližnjih starševskih linij. V regulatorno ohranjenih in pomembnih regijah se nahajata le rs31534689 v 3'UTR regiji in rs251994838, lociran znotraj konzerviranega elementa. Z analizo sekvenc linije F in L nismo ugotovili nobenega polimorfizma specifičnega samo za naši liniji, kar je v skladu z dokazi, da obstaja le ~2 % specifičnih variacij med genomi laboratorijskih mišjih linij (Keane in sod., 2011). S sekveniranjem 10962 bp dolgega segmenta *Tst* smo uspeli odkriti 5 polimorfizmov, ki predstavljajo osnovo za nadaljnje analize primerjalne genomike in ugotavljanje potencialnih funkcijskih variacij.

Ker vzorcev inbridiranih linij JU in CBA ter neinbridirane linije CFLP, ki so bile uporabljene v tri-linijskem prvotnem križanju za razvoj genetsko heterogene osnovne populacije iz katere so začeli selekcionirati liniji F in L, ni mogoče dobiti, nismo mogli z natančnostjo preveriti porekla lokusa *Tst* pri naših dveh linijah. S pomočjo celotne sekvence lokusa *Tst* smo lahko identificirali najverjetnejši izvor debele in vitke linije s primerjavo sekvenc in analizo haplotipov. Debela linija ima popolnoma enak haplotip genetskih variacij kot linija WSB/EiJ, ki predstavlja podvrsto *Mus musculus domesticus*, iz česar zmo zaključili, da lokus *Tst* pri debeli liniji vsebuje DNA *M.m. domesticus*. Linija L, si za razliko od linije F, deli enak haplotip genetskih variant s kar 13 klasičnimi

inbridiranimi linijami, ki predstavljajo mozaik genomov *Mus musculus castaneus*, *Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus* in *Mus musculus spretus* (Yang in sod., 2011). V primerjavi s človekom, kjer s projekti kot je 1000 genomov (»1000 genomes«) - katalog človeških genetskih variacij, pa za genom miši primanjkuje podatkov o variabilnosti mišjih populacij, iz katerih so bile razvite laboratorijske linije (Didion in de Villena, 2013). Prav zaradi tega ni bilo mogoče natančneje določiti izvor lokusa *Tst* linije L. Kljub temu pa naše ugotovitve kažejo na to, da ima lokus *Tst* debele linije divji tip haplotipa in da je alel vitke linije po izvoru enak inbridiranim laboratorijskim linijam.

Vzročnost gena za zmanjšano zamaščenost smo žeeli potrditi tudi z asociacijskimi študijami pri človeku. Tako smo v publikaciji Morton s sod. (2016) povabili k sodelovanju skupine, ki imajo zbrane specifične podatke povezane s parametri debelosti oziroma vitkosti pri človeku. In sicer je bil nivo mRNA *TST*, v vzorcih belega maščevja populacije na Dunaju, višji v vzorcih vitkih osebkov kot pri debelih. Negativna korelacija je bila prisotna tudi pri ekspresiji *TST* in indeksom telesne teže v vzorcih subkutane maščobe v populaciji Islandcev. Isto so potrdili tudi na vzorcih visceralne in subkutane maščobe na vzorcu španske populacije, kjer je bil nivo mRNA *TST* pri debelih osebkih z diabetesom tipa 2. Prav tako je bila ugotovljena povezava med mRNA *TST* in markerji za določanje inzulinske občutljivosti v adipoznem tkivu (*GLUT4*, *IRSI*, *PPARG*) ter z markerji za kapaciteto lipolize in formacijo lipidnih kapljic. Vsa dognanja naše študije in raziskave skupine dr. Mortona v Edinburghu kažejo na evolucijsko ohranjenost kandidatnega gena med človekom in mišjo. Glede na rezultate *in vitro* in *in vivo* študij menimo, da ima kodirajoči encim poleg vloge pri detoksifikaciji, vnosu mito-ribosomalne RNA in formaciji železo-žveplovih gruč tudi novo funkcijo, povezano z zdravo vitkostjo, in sicer preko mehanizmov kjer aktivacija *Tst* poveča sproščanje maščobnih kislin in adiponektina iz adipocit.

Prvi korak pri analizah pozicijskega kloniranja je vrednotenje vpliva genomskeih variant kandidatnih genov za kompleksne lastnosti na funkcije in posledično tudi na fenotip. S študijami genetskega kartiranja kompleksnih lastnosti zožamo kandidatno regijo na en ali par povezanih lokusov, ki pa še vedno vsebujejo številne genetske variante. Da bi zmanjšali število genetskih variant določene kandidatne regije, se lahko poslužimo informacij v literaturi in podatkovnih bazah. S slednjim lahko sestavimo podrobnejši zemljevid elementov genov, kar omogoča učinkovito ovrednotenje polimorfizmov znotraj kandidatnih genov za vsako preučevano lastnost in vrsto. Zmanjšanje števila potencialnih kavzalnih polimorfizmov je pomembno in nujno za vsako nadaljnje načrtovanje raziskav, s katerimi bi potrdili ali podprtli vzročnost kandidatnih genetskih variant. Z izgradnjo atlasa pomembnih regulatornih elementov lokusa *Tst*, za kar smo uporabili različna bioinformacijska orodja in podatkovne baze, smo znotraj lokusa *Tst* odkrili tri pomembna regulatorna področja, ki zajemajo promotski del, intronski del in del 3'UTR regije lokusa *Tst*.

V prvem, promotorskem segmentu je bilo identificiranih 14 SNP-ov, izmed katerih se en nahaja v evolucijsko ohranjeni regiji in en znotraj promotorja gena. SNP-i, ki se nahajajo znotraj ohranjenih funkcionalno pomembnih regij, lahko vplivajo na ekspresijsko in fenotipsko variabilnost pri linijah s polimorfnimi aleli. Regulacija odprtosti kromatina v genomu eukariontov je pomemben faktor, saj nadzoruje regulatorno aktivnost (Cockerill, 2011). Te funkcionalne elemente lahko lokaliziramo preko identifikacije regij v genomu, ki so hipersenzitivne na vezavo DNaze I (Boyle in sod., 2008), tj. regij odprtrega kromatina. Prisotnost funkcionalno odprtih mest na kromatinu pa je podprtta z vezavnimi mesti transkripcijskih faktorjev znotraj teh regij. Slednje je podprto tudi v našem regulatornem atlasu za gen *Tst*, kjer regija odprtrega kromatina v prvem regulatornem segmentusovпадa z informacijami in predikcijami o vezavnih mestih transkripcijskih faktorjev. Največ napovedi za vezavna mesta je imel transkripcijski faktor SP1, katerega so že povezali kot senzor glukoze v celici in vključenost v promotorsko aktivnost leptina (Prieto-Hontoria in sod., 2011). Dodatno so bioinformacijska orodja predpostavila največ vezavnih mest tudi za NF1, vezavni protein za aktivacijo transkripcije (Xu in sod., 2005) in CEBP/α, regulator transkripcije v jetrih, vključen v metabolizem energije (Lee in sod., 1997). Napovedana vezavna mesta za transkripcijske faktorje sovpadajo tudi z manj metiliranimi mesti CpG, vezavnim mestom za polimerazo RNA in histonskimi modifikacijami specifičnimi za aktivno transkripcijo. Rezultati analize vezavnih mest za transkripcijske faktorje tako nudijo dobro podlago in iztočnice za nadaljnjo eksperimentalno preučevanje kateri transkripcijski faktorji so funkcionalno pomembni pri tkivno specifični regulaciji gena *Tst*. Regulatorno pomembno funkcijo prvega segmenta preučevanega lokusa *Tst* potrjujejo tudi tri odkrite histonske modifikacije. Modifikacija H3K4me3, ena izmed najbolj preučevanih modifikacij kromatina, je prisotna pri aktivno prepisovanih protein-kodirajočih promotorjih eukariontov. Obstojevezavnih mest za transkripcijske faktorje potrjuje tudi histonska modifikacija H3K4me2, katere prisotnost je znana ravno znotraj vezavnih mest za transkripcijske faktorje (Wang in sod., 2014). Z dognanjisovpadajo tudi naši rezultati, da je modifikacija H3K36me3 bolj pogosta v eksonih kot intronih ter da označuje aktivno prepisovane regije (Hon in sod., 2009). Na podlagi rezultatov za prvi regulatorni segment znotraj lokusa *Tst* smo zaključili, da promotor *Tst*, 5'UTR in prvi ekson vsebujejo največ histonskih modifikacij, tipičnih za promotorje aktivno izraženih protein kodirajočih genov.

Naša bioinformacijska analiza je razkrila tudi prisotnost druge regulatorne regije znotraj introna *Tst* (15:78402750 – 7840000 bp). Slednji lahko vplivajo na transkripcijo z vezavo regulatornih proteinov ali RNA, ki delujejo kot ojačevalci ali represorji. Tako smo znotraj introna identificirali različne regulatorne elemente – evolucijsko ohranjene regije, mesta odprtrega kromatina, dve histonski modifikaciji povezani z ojačevalci in drugimi distalnimi elementi ter vezavno mesto za transkripcijski faktor. Ugotovili smo, da je frekvenca metilacije DNA v tej regiji statistično značilno zmanjšana v primerjavi s prisotnostjo le-te v preostalem delu introna *Tst*. Prekrivanje regulatornih elementov (regija odprtrega

kromatina, histonska modifikacija H3K4me1 in vezavno mesto za transkripcijski faktor ESRRB) v intronu nakazuje na možno prisotnost funkcionalnega znotraj-genskega spodbujevalca za *Tst* ozziroma druge bližnje gene, kar so na primer dokazali v študiji Kowalczyk in sod. (2012). V študiji Zhang in sod. (2014) kjer so dosegli popolno reprogramiranje induciranih izvornih celic, pridobljenih iz adipoznega tkiva prašičev, so opazili signifikatno povečano regulacijo *Esrrb*. Izražanje le-tega v adipocitih podpirajo tudi podatki študij transkriptomov zajetih v podatkovni bazi BioGPS (2015). Naši rezultati tako nakazujejo, da bi transkripcijski faktor ESRRB z vezavo na spodbujevalno mesto v intronu *Tst*, lahko tkivno specifično reguliral količino proteina *TST* v maščevju.

Tretji pomembni regulatorni segment smo pozicionirali v drugi ekson *Tst* gena. Približno polovico končnega dela drugega eksona predstavlja regija 3'UTR, ki kot posttranskripcijski mehanizem pogosto uravnava ekspresijo gena pri evkariontih (Barrett in sod., 2012). Regije pomembne za tako regulacijo se navadno nahajajo okrog poli(A) repa, ki ga v našem primeru najdemo med 15: 78399577 in 78399572 bp. Slednji v kombinaciji z vezavo poli(A) proteinov prispeva k regulaciji translacije, stabilnosti in izvoza mRNA. Druga možnost vpliva neprevedene regije na izražanje gena, so njene strukturne značilnosti. In sicer je daljša 3'UTR regija povezana z nižjo ekspresijo, saj vsebuje več možnih vezavnih mesta za miRNA ali proteine, vključene v zaviranje translacije. Dve regiji, bogati z napovedanimi vezavnimi mesti za miRNA, se nahajata v drugem eksonu in v 3'UTR regiji. Živalske miRNA se tipično vežejo na tarčno mRNA v 3'UTR regiji, s čimer vplivajo na degradacijo ali inhibicijo translacije mRNA. Slednje je mogoče opaziti tudi v primeru gena *Tst*, saj so štiri regije, z najpogosteje napovedanimi vezavnimi mesti za miRNA, locirane prav v 3' neprevedeni regiji gena. Identificirane regije tako lahko imajo funkcionalen vpliv na izražanje gena, kar je še dodatno podprt z ohranjenostjo regije med mišjimi linijami. Štiri regije so pozicionirane vsaj 15 nukleotidov navzdol od stop kodona in so blizu konca 3'UTR regije – dve lastnosti, ki podpirata dejstvo, da regije predstavljajo učinkovito mesto za vezavo miRNA, kot so tudi eksperimentalno ugotovili v študiji Grimson in sod. (2007). Dodatno so regije bogate tudi z AU elementi (angl. *adenylate-uridylate element*), kar so v študiji Bartel (2009) eksperimentalno povezali s povečano dostopnostjo tarčne mRNA za regulatorni kompleks miRNA. Glede na osnovo naše bioinformacijske analize, lokacija identificiranih mest za vezavo miRNA kaže na tkivno specifični funkcionalni potencial za spremenjeno izražanje kandidatnega gena pri naši subkongeni liniji.

Naš glavni cilj izgradnje atlasa regulatornih elementov transkripcije gena *Tst*, je bila identifikacija genetske variacije, odgovorne za fenotipski učinek na vitkost oz. debelost. Združitev informacij iz atlasa in identificiranih genetskih variant pri naših dveh linijah, je omogočila izbor potencialnih polimorfizmov za nadaljnje eksperimentalne študije. Nekodirajoči polimorfizmi enega nukleotida imajo lahko *cis*-regulatorne vplive, če ležijo v pomembnih regulatornih regijah DNA, kjer na primer lahko spreminjajo afiniteto

transkripcijskih faktorjev, postopke izrezovanja intronov oz. spajanja eksonov (angl. *splicing*) ali procese preoblikovanja kromatina. V našem primeru je le ena intronska variacija rs251994838 sovpadala z evolucijsko ohranjenim elementom, kjer bi lahko imela vpliv na regulacijo izražanja gena *Tst* preko spreminjanja dostopnosti DNA (struktura kromatina) ali preko afinitete za vezavo transkripcijskih faktorjev. Druga prioritetna genetska variacija leži znotraj 3'UTR regije (rs31534689), na katero se izmed vseh napovedanih miRNA, potencialno veže le mmu-miR-338-5p, ki se popolno ujema s tarčno sekvenco mRNA *Tst*, za alel iz vitke linije, z alejom iz debele linije pa ne. SNP je lociran v tako imenovani »seed« regiji miRNA, kjer popolna komplementarnost sekvenc igra pomembno vlogo pri prepoznavanju tarč miRNA (Zorc in sod., 2012). Na podlagi tega ima SNP velik funkcionalni potencial, ki bi ob vezavi z identificirano miRNA lahko vplival stabilnost ali translacijsko *Tst* mRNA. Glede na zbrane podatke, smo zaključili, da rs251994838 in rs31534689 predstavljata glavni kandidatni variaciji za nadaljnje eksperimentalno-funkcijske validacije njihovega tkivno specifičnega učinka na fenotip. Povečana izraženost gena *Tst* je bila značilna pri vitki liniji, specifično v belem maščevju, zato so funkcijske raziskave kandidatnih SNP-ov na celičnih linijah adipocit ali adipoznem tkivu, prvi korak pri validaciji učinkov le-teh. Tudi novi pristopi, ki bazirajo na tehnologiji CRISPR, s katero lahko zamenjamo alele, predstavljajo obetajoča orodja za vrednotenje vzročnosti polimorfizmov *in vivo*. Naš razvit atlas pomembnih regulatornih elementov gena *Tst* in polimorfizmov pri liniji L bo služil kot osnova za nadaljnje preučevanje regulacije izražanja na nivoju mRNA in proteinskem nivoju tega pomembnega gena. Za razumevanje drugih funkcij tega gena, kot je le do sedaj opisana funkcija detoksifikacije cianida, je nujno preučevanje regulatorne mreže v katere je *Tst* vključen in identificiranje regulatornih elementov, ki usmerjajo tkivno ali celično specifično izražanje. Naši rezultati so nakazali, da je za učinke na vitkost, izboljšanje homeostaze glukoze in povečanje lipolize dovolj že 2-kratno povečanje izražanja specifično v belem maščevju. Prihodnji raziskovalni izzivi bodo torej usmerjeni na preučevanje regulatornih elementov identificiranih v tej študiji, ki so odgovorni za to diferencialno regulacijo. Odkritje takih mest in regulatornih proteinov ali molekul RNA, ki usmerjajo to povisano izražanje lahko pomeni tudi osnovno za razvijanje aplikacij v humani medicini za zdravljenje debelosti ali v živinoreji za zmanjševanje zamaščevanja domačih živali. Atlas regulacijskih elementov transkripcije kandidatnega gena ter obratni postopek odkrivanja genov za vitkost in mehanizmov njihovega delovanja, predstavljata nov izviren pristop, zato naloga predstavlja pomemben prispevek k znanosti.

5.2 SKLEPI

- V sklopu doktorske naloge smo razvili sub-kongeno mišjo linijo za interval *Fob3b2* in potrdili učinek kvantitativnega lokusa na zmanjšano zamaščevanje.
- Znotraj preučevanega lokusa *Fob3b2* smo z uporabo različnih bioinformacijskih orodij in primerjavo izražanja non-IBD kandidatnih genov med vitko in debelo linijo ter med homozigoti vitke in debele sub-kongene linije M2 identificirali gen *Tst*, kot glavni kandidatni gen za preučevani segment.
- Rezultati analize alelnega neravnovesja so pokazali, da je povišano izražanje alela L pri heterozigotih M2 za segment *Fob3b2*, posledica *cis*-učinka identificiranega polimorfizma v 3'UTR regiji gena, ki je vzročen za povišano raven mRNA *Tst* in vitkosti pri miših.
- Povišano izražanje kandidatnega gena in posledično tudi manjša zamaščenost ter izboljšani metabolični parametri so splošen pojav, prisoten tudi pri drugih mišji linijah, kar smo dokazali z analizo korelacij.
- S sekveniranjem lokusov *Tst* debele in vitke linije smo uspeli identificirati 5 polimorfizmov ter določili izvor preučevanega segmenta za obe liniji.
- Uporaba različnih bioinformacijskih orodij in podatkovnih zbirk nam je omogočila izgradnjo regulatornega atlasa transkripcije kandidatnega gena, ki bo služil kot osnova za nadaljnja preučevanja in validacije mehanizmov regulacije transkripcije gena.
- Združitev podatkov iz atlasa z identificiranimi polimorfizmi znotraj *Tst* lokusa nam je omogočila izbor prednostnih kandidatnih genetskih variant za nadaljnje eksperimentalno-funkcijske validacije v prihodnosti.

Rezultati naše študije predstavljajo pomemben korak k identifikaciji genetskih variant, ki vplivajo na vitkost pri miših. Pridobljeno znanje in razumevanje uravnavanja kopičenja telesnih maščob bo v bodoče lahko uporabljeno v medicini za boj proti debelosti in razvoj učinkovitih terapevtskih pristopov za zdravljenje le-te. Poleg tega pa bodo naša dognanja lahko služila tudi kot smernice za revo manj zamaščenih domačih živali.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Debelost predstavlja eno izmed pomembnejših kroničnih bolezni, ki postaja vedno večji zdravstveni problem. Kljub prisotnosti debelostnega okolja, pa ostaja del populacije še vedno vitek, kar nakazuje na obstoj genetskih mehanizmov rezistentnih za razvoj debelosti. Tako debelost, kot tudi vitkost sta kompleksni lastnosti, na kateri vpliva veliko število genov in okolje. Zato predstavljajo poligeni živalski modeli primerno orodje za preučevanje takšnih lastnosti. Genetske analize kongenih inbridiranih linij tako pripomorejo k identifikaciji novih kandidatnih genov, ki povzročajo razlike pri razvoju debelosti oziroma vitkosti. V študiji smo uporabili naš poligeni model vitke (L) in debele (F) mišje linije, ki sta bili razviti na osnovi dvosmerne selekcije za odstotek telesnih maščob. Po več kot 60. generacijah se je odstotek telesnih maščob pri liniji F povišal na 22 %, medtem ko se je pri liniji L zmanjšal na 4 %. S križanjem teh dveh linij so v raziskavi Horvat in sod. (2000) odkrili štiri QTL-e z vplivom na zamaščevanje. Izmed teh je imel največji vpliv *Fob3* na 15. kromosomu. Znotraj slednjega so nato z nadaljnjiimi študijami (Stylianou in sod., 2004; Prevoršek in sod., 2010a) ugotovili obstoj treh krajših ločenih kvanitativnih lokusov – *Fob3a*, *Fob3b1* in *Fob3b2*.

Namen naše študije je bil natančneje kartirati in preučiti vpliv kvantitativnega lokusa *Fob3b2*, z, v ta namen razvito, sub-kongeno mišjo linijo M2, ki se od prejemne starševske linije F razlikuje le v kratkem kongenem segmentu za preučevani predel, ki izvira iz vitke linije. Sub-kongeni segment smo s sekveniranjem območij brez polimorfnih mikrosatelitskih genetskih markerjev (odsek dolg ~ 2Mbp) uspeli natančneje kartirati na ~3,9 Mbp. S sekvencami že prej odkritih polimorfizmov med linijami F, L in kongeno M, smo lahko določili meje donorskoga in prejemnega segmenta za lokus *Fob3b2*. Fenotipska analiza podatkov sub-kongene M2 linije je ovrgla našo hipotezo, da med homozigoti za preučevani segment ni razlik, saj se je izkazalo, da so homozigotne miši vitke linije za *Fob3b2* segment bile manj zamaščene in so imele izboljšane metabolične parametre napram homozigotom debele linije. Z intervalno specifično analizo haplotipov med linijama F in L znotraj skrajšanega segmenta *Fob3b2* (~3,9 Mbp), smo odkrili 20 non-IBD kandidatnih genov za vitkost, izmed katerih je le gen *Tst* imel povišano izražanje v gonadalni maščobi homozigotov LL sub-kongene linije M2. Slednje je potrdila tudi bioinformacijska analiza, pri kateri smo uporabili različna orodja za preverjanje ustreznosti pozicijskih kandidatnih genov povezanih z vplivom na debelost znotraj preučevanega segmenta.

V drugem delu doktorske naloge smo želeli preučiti vzročnost kandidatnega gena z analizo alelnega neravnovesja. Rezultati so pokazali povišano izražanje alela, ki izvira iz vitke linije, s čimer smo ovrgli ničelno hipotezo, da se aleli F in L enakomerno izražata. Z analizo smo potrdili *cis*-delovanje edine identificirane variacije znotraj nekodirajoče

sekvene eksonov *Tst*, vzročne za povišano raven mRNA *Tst* in vitkost pri miših. Da je izražanje kandidatnega gena v adipoznem tkivu povezano z manjšo zamaščenostjo in izboljšanimi metaboličnimi parametri, smo potrdili z analizo korelacij med 23 linijami miši. Združeno z rezultati sodeljujoče skupine dr. Mortona v Edinburghu, kjer so preučevali vplive kandidatnega gena v mišjih modelih s prekomernih izražanjem gena (miši manj zamaščene) in modelih z izbitim genom (poslabšani metabolični parametri), smo potrdili gen *Tst* kot glavni kandidatni gen za vitkost pri miših znotraj kvantitativnega lokusa *Fob3b2*. Slednje dodatno potrjujejo tudi rezultati raziskav na človeku, ki so imeli podobne učinke kot miši - vitki osebki so imeli povišano izražanje *Tst* v maščobnem tkivu. Glede na naše rezultate menimo, da ima *Tst* vlogo tudi pri mehanizmih za rezistenco na razvoj debelosti, in sicer preko aktivacije povečanega sproščanja maščobnih kislin in adiponektina iz adipocit.

S sekveniranjem lokusa *Tst* smo želeli identificirati polimorfizme, vzročne za ohranjanje vitkosti pri sub-kongeni liniji M2. Pet odkritih genetskih variacij smo združili skupaj s podatki iz sestavljenega regulatornega atlasa za transkripcijo *Tst*. Identificirani polimorfizmi znotraj introna *Tst*, lahko vplivajo na njegovo izražanje preko spreminjanja dostopnosti DNA ali preko afinitete za vezavo transkripcjiskih faktorjev. Variacije v kodirajočih regijah, v našem primeru v 3'UTR regiji, pa z vezavnim mestom za miRNA vplivajo na stabilnost mRNA – v primeru popolnega ujemanja vodi do degradacije ozziroma do supresije translacije mRNA v primeru nepopolnega ujemanja tarčne mRNA in miRNA. Glede na zbrane podatke, smo zaključili, da dve odkriti genetski varianti, ena v 3'UTR regiji in druga znotraj evolucijsko ohranjene regije introna, predstavljata glavni kandidatni variaciji za nadaljnje eksperimentalno-funkcijske validacije njihovega učinka na regulacijo transkripcije gena *Tst*, kot tudi na fenotip. Pridobljene informacije bodo tako služile za izboljšanje starih in razvoj novih terapij proti debelosti, kot tudi k boljšemu razumevanju delovanja mehanizmov povezanih z rezistenco na razvoj debelosti.

6.2 SUMMARY

It is well known that today's obesogenic environment, coupling with genetic factors, may lead to obesity. But there is still a large proportion of human population, which remain lean despite those factors, suggesting genetic resistance to obesity. Polygenic mouse models present a powerful tool for understanding common complex diseases, including obesity. By divergent selection on fat proportion for over 60. generations, were generated a poligenic fat (F) mouse model, with 23% of fat , and lean (L) mouse model with 4 % of fat (Horvat et al., 2000). They present a unique model to study the genetics of the most common poligenic form of obesity and leanness, which are found in humans and animals. By crossing the two lines, four QTLs with an effect on fatness were identified, of which *Fob3* on Chr 15 was the most significant. Later studies mapped the QTL into three separate QTLs – *Fob3a*, *Fob3b1* and *Fob3b2* (Stylianou et al., 2004).

To identify a causal gene for the QTL *Fob3b2*, a new sub-sub congenic line M2 was developed, with introgression of around 2 Mbp lean line segment into the genetic background of fat line. F₂ cross between the congenic line M2 was then used to examine the phenotype effects of the QTL, which was also the purpose of our study. By sequencing the polymorphisms in the ungenotyped sub-congenic segment we were able to fine map it to ~3,9 Mpb and more accurate define borders of the segment. Based on our results, the null hypothesis that there is no difference between the homozygotes for *Fob3b2* segment was rejected, since LL homozygotes showed decreased body fat mass and improved metabolic parameters. Next step we took was the identification of candidate genes within the studied interval. Twenty non-IBD candidate genes were discovered with interval specific haplotype analysis of *Fob3b2* locus, between F and L line. Only one gene, *Tst*, had significant higher expression in gonadal fat tissue of LL-M2 homozygotes. Additionally, the bioinformatic analysis of non-IBD candidate genes associated with fatness found the *Tst* gene as the most likely candidate gene in the *Fob3b2* segment.

In the second part of our study we examined the causality of the candidate gene by allelic imbalance analysis. Higher levels of L line allele are due to *cis*-acting polymorphism identified in the non-coding region of *Tst* (3'UTR), with an effect on higher *Tst* expression and leanness in mice. *Tst* expression in adipose tissue is also positively correlated with metabolic parameters in our sub-congenic line, but also with other mouse strains. Combined with results of the collaborating team in Edinburgh, where *Tst* overexpression and *Tst* knock-out was studied, we confirmed the *Tst* as the candidate gene with an effect on leanness. The findings are also supported with the results of studies on humans, with lean subjects having higher *Tst* expression. Based on results we suggest a new gain of function leanness mechanism, which by *Tst* activation increase the release of fatty acid and adiponectin from adipocyte.

The identified five polymorphisms between F and L line, by sequence analysis, were narrowed down to two candidate genetic variants with combining data of the developed atlas of *Tst* transcription regulatory elements. In this study we developed a map of regulatory elements for the *Tst* locus in mice potentially involved in regulating enzyme expression or activity, by chromatin remodelling, altering the affinity of transcription factors or degrading or suppressing translation of *Tst* mRNA with miRNA binding. The combination of identified candidate polymorphisms and developed map, provides a basis for planning further experimental validations and functional analyses of this important and evolutionary conserved gene and also for more focused and hypothesis-driven experimental work. Informations gathered in our study will serve for better understanding of genetic mechanisms for resistance to obesity development and will help to improve knowledge for obesity treatment.

7 VIRI

- Abiola O., Angel J.M., Avner P., Bachmanov A.A., Belknap J.K., Bennett B., Blankenhorn E.P., Blizard D.A., Bolivar V., Brockmann G.A., Buck K.J., Bureau J.F., Casley W.L., Chesler E.J., Cheverud J.M., Churchill G.A., Cook M., Crabbe J.C., Crusio W.E., Darvasi A., de Haan G., Derman P., Doerge R.W., Elliot R.W., Farber C.R., Flaherty L., Flint J., Gershenson H., Gibson J.P., Gu J., Gu W., Himmelbauer H., Hitzemann R., Hsu H.C., Hunter K., Iraqi F.F., Jansen R.C., Johnson T.E., Jones B.C., Kempermann G., Lammert F., Lu L., Manly K.F., Matthews D.B., Medrano J.F., Mehrabian M., Mittelmann G., Mock B.A., Mogil J.S., Montagutelli X., Morahan G., Mountz J.D., Nagase H., Nowakowski R.S., O'Hara B.F., Osadchuk A.V., Paigen B., Palmer A.A., Peirce J.L., Pomp D., Rosemann M., Rosen G.D., Schalkwyk L.C., Seltzer Z., Settle S., Shimomura K., Shou S., Sikela J.M., Siracusa L.D., Spearow J.L., Teuscher C., Threadgill D.W., Toth L.A., Toye A.A., Vadasz C., Van Zant G., Wakeland E., Williams R.W., Zhang H.G., Zou F.; Complex Trait Consortium. 2003. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nature Reviews Genetics*, 4, 11: 911-916
- Albuquerque D., Stice E., Rodríguez-López R., Manco L., Nóbrega C. 2015. Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. *Molecular Genetics and Genomics*, 290, 4: 1191-1221
- Barrett L.W., Fletcher S., Wilton S.D. 2012. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 21: 3613–3634
- Barsh G.S., Farooqi I.S., O'Rahilly S. 2000. Genetics of body-weight regulation. *Nature*, 404, 6778: 644-651
- Bartel D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136: 215–233
- Beck J.A., Lloyd S., Hafezparast M., Lennon-Pierce M., Eppig J.T., Festing M.F., Fisher E.M. 2000. Genealogies of mouse inbred strains. *Nature Genetics*, 24, 1: 23-25
- Bell C.G., Walley A.J., Froguel P. 2005. The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics*, 6, 3: 221-234
- BioGPS: A free extensible and customizable gene annotation portal, a complete resource for learning about gene and protein function. 2016. The Scripps Research Institute. www.biogps.org (23.12.2015)
- Bjørndal B., Burri L., Staalesen V., Skorve J., Berge R.K. 2011. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *Journal of Obesity*, 2011: 490650, doi: 10.1155/2011/490650: 15 str.
- Boyle A.P., Davis S., Shulha H.P., Meltzer P., Margulies E.H., Weng Z., Furey T.S., Crawford G.E. 2008. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell*, 132: 311-322
- Bray G.A. 2004. Medical consequences of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89, 6: 2583-2589

- Brockmann G.A., Bevova M.R. 2002. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *Trends in Genetics*, 18, 7: 367-376
- Broman K.W. 2005. The genomes of recombinant inbred lines. *Genetics*, 169, 2: 1133-1146
- Bultman S.J., Michaud E.J., Woychik R.P. 1992. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*, 71, 7: 1195-1204
- Bünger L., Forsting J., McDonald K.L., Horvat S., Duncan J., Hochscheid S., Baile C.A., Hill W.G., Speakman J.R. 2003. Long-term divergent selection on body fatness in mice indicates a regulation system that is independent of leptin production and reception. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 17:85–87
- Bünger L., Hill W.G. 1999. Inbred lines of mice derived from long-term divergent selection on fat content and body weight. *Mammalian Genome*, 10: 645–648
- Caballero B. 2007. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiologic Reviews*, 29: 1-5
- Caspar-Bauguil S., Cousin B., Galinier A., Segafredo C., Nibbelink M., André M., Casteilla L., Pénicaud L. 2005. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Letters*, 579, 17: 3487-3492
- Center for Genome Dynamics (CGD). Multisystem survey of mouse physiology in 72 inbred strains of mice (ANOVA,adjusted methodology). MPD:31850. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. <http://phenome.jax.org> (27.10.2015)
- Chiu S., Kim K., Haus K.A., Espinal G.M., Millon L.V., Warden C.H. 2007. Identification of positional candidate genes for body weight and adiposity in subcongenic mice. *Physiological Genomics*, 31, 1: 75-85
- Church C., Moir L., McMurray F., Girard C., Banks G.T., Teboul L., Wells S., Brüning J.C., Nolan P.M., Ashcroft F.M., Cox R.D. 2010. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nature Genetics*, 42, 12: 1086-1092
- Cockerill P.N. 2011. Structure and function of active chromatin and DNase I hypersensitive sites. *Federation of European Biochemical Societies*, 278, 13: 2182-2210
- Coleman D.L., Eicher E.M. 1990. Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *Journal of Heredity*, 81, 6: 424-427
- Crowley J.J., Zhabotynsky V., Sun W., Huang S., Pakatci I.K., Kim Y., Wang J.R., Morgan A.P., Calaway J.D., Aylor D.L., Yun Z., Bell T.A., Buus R.J., Calaway M.E., Didion J.P., Gooch T.J., Hansen S.D., Robinson N.N., Shaw G.D., Spence J.S., Quackenbush C.R., Barrick C.J., Nonneman R.J., Kim K., Xenakis J., Xie Y., Valdar W., Lenarcic A.B., Wang W., Welsh C.E., Fu C.P., Zhang Z., Holt J., Guo Z., Threadgill D.W., Tarantino L.M., Miller D.R., Zou F., McMillan L., Sullivan P.F., Pardo-Manuel de Villena F. 2015. Analyses of allele-specific gene expression in highly divergent mouse crosses identifies pervasive allelic imbalance. *Nature Genetics*, 47, 4: 353-360

- Darvasi A., Soller M. 1995. Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping. *Genetics*, 141, 3: 1199-1207
- Diament A.L., Farahani P., Chiu S., Fisler J., Warden C.H. 2004. A novel mouse Chromosome 2 congenic strain with obesity phenotypes. *Mammalian Genome*, 15, 6: 452-459
- DiBaise J.K., Frank D.N., Mathur R. 2012. Impact of the Gut Microbiota on the Development of Obesity: Current Concepts. *The American Journal of Gastroenterology Supplements*, 1: 22-27
- Didion J.P., de Villena F.P. 2013. Deconstructing *Mus gemischus*: advances in understanding ancestry, structure, and variation in the genome of the laboratory mouse. *Mammalian Genome*, 24, 1-2: 1-20
- DiPetrillo K., Wang X., Stylianou I.M., Paigen B. 2005. Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. *Trends in Genetics*, 21, 12: 683-692
- Drinkwater N.R., Gould M.N. 2012. The long path from QTL to gene. *PLoS Genetics*, 8, 9: e1002975, doi: 10.1371/journal.pgen.1002975: 3 str.
- Duke-Cohan J.S., Barsh G.S. 1999. The mouse mahogany locus encodes a transmembrane form of human attractin. *Nature*, 398, 6723: 152-156
- Eichler E.E., Flint J., Gibson G., Kong A., Leal S.M., Moore J.H., Nadeau J.H. 2010. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nature Review Genetics*, 11, 6: 446-450
- Everard A., Cani P.D. 2013. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best practice and Research clinical Gastroenterology*, 27: 73-83
- Fantuzzi G. 2005. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115, 5: 911-919
- Fischer J., Koch L., Emmerling C., Vierkotten J., Peters T., Brüning J.C., Rüther U. 2009. Inactivation of the *Fto* gene protects from obesity. *Nature*, 458, 7240: 894-898
- Flint J., Mott R. 2001. Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nature Reviews Genetics*, 2, 6: 437-445
- Flint J., Eskin E. 2012. Genome-wide association studies in mice. *Nature Reviews Genetics*, 13, 11: 807-817
- Frayling T.M., Timpson N.J., Weedon M.N., Zeggini E., Freathy R.M., Lindgren C.M., Perry J.R., Elliott K.S., Lango H., Rayner N.W., Shields B., Harries L.W., Barrett J.C., Ellard S., Groves C.J., Knight B., Patch A.M., Ness A.R., Ebrahim S., Lawlor D.A., Ring S.M., Ben-Shlomo Y., Jarvelin M.R., Sovio U., Bennett A.J., Melzer D., Ferrucci L., Loos R.J., Barroso I., Wareham N.J., Karpe F., Owen K.R., Cardon L.R., Walker M., Hitman G.A., Palmer C.N., Doney A.S., Morris A.D., Smith G.D., Hattersley A.T., McCarthy M.I. 2007. A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 316, 5826: 889-894
- Gale S.M., Castracane V.D., Mantzoros C.S. 2004. Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *Journal of Nutrition*, 134, 2: 295-298

- Gardiner-Garden M., Frommer M. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*, 196, 2: 261-282
- Gemma C., Sookoian S., Alvariñas J., García S.I., Quintana L., Kanevsky D., González C.D., Pirola C.J. 2009. Maternal pregestational BMI is associated with methylation of the PPARGC1A promoter in newborns. *Obesity (Silver Spring)*, 17, 5: 1032-1039
- Glint J., Eskin E. 2012. Genome-wide association studies in mice. *Nature Reviews Genetics*, 13, 11: 801-817
- Grimson A., Farh K.K., Johnston W.K., Garrett-Engele P., Lim L.P., Bartel D.P. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*, 27, 1: 91-105
- Gunn T.M., Miller K.A., He L., Hyman R.W., Davis R.W., Azarani A., Schlossman S.F., Duke-Cohan J.S., Barsh G.S. 1999. The mouse mahogany locus encodes a transmembrane form of human attractin. *Nature*, 398, 6726: 152-156
- Guo M., Gong S., Maric S., Misulovin Z., Pack M., Mahnke K., Nussenzweig M.C., Steinman R.M. 2000. *Human Immunology*, 61, 8: 729-738
- Haig D. 2011. Does heritability hide in epistasis between linked SNPs? *European Journal of Human Genetics*, 19, 2: 123, doi: 10.1038/ejhg.2010.161: 1 str.
- Hassan M., Latif N., Yacoub M. 2012. Adipose tissue: friend or foe? *Nature Reviews Cardiology*, 9, 12: 689-702
- Hill J.O., Wyatt H.R., Peters J.C. 2012. Energy balance and obesity. *Circulation*, 126, 1: 126-132
- Hon G.C., Hawkins R.D., Ren B. 2009. Predictive chromatin signatures in the mammalian genome. *Human Molecular Genetics*, 18, R2: R195–201
- Horvat S., Bünger L., Falconer V.M., Mackay P., Law A., Bulfield G., Keightley P.D. 2000. Mapping of obesity QTLs in a cross between mouse lines divergently selected on fat content. *Mammalian Genome*, 11, 1: 2-7
- Huang X.Z., Wu J.F., Cass D., Erle D.J., Corry D., Young S.G., Farese R.V. Jr., Sheppard D. 1996. Inactivation of the integrin beta 6 subunit gene reveals a role of epithelial integrins in regulating inflammation in the lung and skin. *Journal of Cell Biology*, 133, 4: 921-928
- Hummel K.P., Dickie M.M., Coleman D.L. 1966. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, 153, 3740: 1127-1128
- Ishikawa A., Okuno S. 2014. Fine mapping and candidate gene search of quantitative trait loci for growth and obesity using mouse intersubspecific subcongenic intercrosses and exome sequencing. *PLoS One*, 9, 11: e113233, doi: 10.1371/journal.pone.0113233: 13 str.
- Jacquemont S., konzorcij, Froguel P. 2011. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature*, 478, 7367: 97-102
- Johnson R.J., Andrews P. 2015. The fat gene. *Scientific American*, 313, 4: 64-69

- Keane T.M., Goodstadt L., Danecek P., White M.A., Wong K., Yalcin B., Heger A., Agam A., Slater G., Goodson M., Furlotte N.A., Eskin E., Nellåker C., Whitley H., Cleak J., Janowitz D., Hernandez-Pliego P., Edwards A., Belgard T.G., Oliver P.L., McIntyre R.E., Bhomra A., Nicod J., Gan X., Yuan W., van der Weyden L., Steward C.A., Bala S., Stalker J., Mott R., Durbin R., Jackson I.J., Czechanski A., Guerra-Assunção J.A., Donahue L.R., Reinholdt L.G., Payseur B.A., Ponting C.P., Birney E., Flint J., Adams D.J. 2011. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature*, 477, 7364: 289-294
- Kim J.H., Stewart T.P., Zhang W., Kim H.Y., Nishina P.M., Naggett J.K. 2005. Type 2 diabetes mouse model TallyHo carries an obesity gene on chromosome 6 that exaggerates dietary obesity. *Physiological Genomics*, 22, 2: 171-181
- Kowalczyk M.S., Hughes J.R., Garrick D., Lynch M.D., Sharpe J.A., Sloane-Stanley J.A., McGowan S.J., De Gobbi M., Hosseini M., Vernimmen D., Brown J.M., Gray N.E., Collavin L., Gibbons R.J., Flint J., Taylor S., Buckle V.J., Milne T.A., Wood W.G., Higgs D.R. 2012. Intronogenic enhancers act as alternative promoters. *Molecular Cell*, 45, 4: 447–458
- Kunej T., Jevsinek Skok D., Zorc M., Ogrinc A., Michal J.J., Kovac M., Jiang Z. 2012. Obesity Gene Atlas in Mammals. *Journal of Genomics*, 1: 45-55
- Laird P.W., Zijderveld A., Linders K., Rudnicki M.A., Jaenisch R., Berns A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*, 19, 15: 4293-4293
- Lee Y.H., Sauer B., Johnson P.F., Gonzalez F.J. 1997. Disruption of the c/ebp alpha gene in adult mouse liver. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 10: 6014–6022
- Libiad M., Sriraman A., Banerjee R. 2015. Polymorphic Variants of Human Rhodanese Exhibit Differences in Thermal Stability and Sulfur Transfer Kinetics. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 39: 23579-23588
- Lo H.S., Wang Z., Hu Y., Yang H.H., Gere S., Buetow K.H., Lee M.P. 2003. Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Research*, 13, 8: 1855-1862
- Lutz T.A., Woods S.C. 2012. Overview of animal models of obesity. *Current Protocols in Pharmacology*, poglavje 5, enota 5.61
- Mackay T.F., Stone E.A., Ayroles J.F. 2009. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nature Reviews Genetics*, 10, 8: 565-577
- Macotela Y., Boucher J., Tran T.T., Kahn C.R. 2009. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes*, 58, 4: 803-812
- Mathes W.F., Aylor D.L., Miller D.R., Churchill G.A., Chesler E.J., de Villena F.P., Threadgill D.W., Pomp D. 2011. Architecture of energy balance traits in emerging lines of the collaborative cross. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 300, 6: e1124-e1134, doi: 10.1152/ajpendo.00707.2010: 11 str.
- Mayer J., Bates M.W., Dickie M.M. 1951. Hereditary diabetes in genetically obese mice. *Science*, 113, 2948: 746-747

- Milani L., Gupta M., Andersen M., Dhar S., Fryknäs M., Isaksson A., Larsson R., Syvänen A.C. 2007. Allelic imbalance in gene expression as a guide to cis-acting regulatory single nucleotide polymorphisms in cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 35, 5: e34, doi: 10.1093/nar/gkl1152: 10 str.
- Miles C.M., Wayne M. 2008. Quantitative Trait Locus (QTL) Analysis. *Nature Education*, 1, 1: 208
<http://www.nature.com/scitable/topicpage/quantitative-trait-locus-qtl-analysis-53904>
(2.6.2016)
- Moreno-Indias I., Cardona F., Tinahones F.J., Queipo-Ortuño M.I. 2014. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in Microbiology*, 5: 190, doi: 10.3389/fmicb.2014.00190: 10str.
- Morton N.M., Densmore V., Wamil M., Ramage L., Nichol K., Bünger L., Seckl J.R., Kenyon C.J. 2005. A polygenic model of the metabolic syndrome with reduced circulating and intra-adipose glucocorticoid action. *Diabetes*, 54, 12: 3371-3378
- Morton N.M., Nelson Y.B., Michailidou Z., Di Rollo E.M., Ramage L., Hadoke P.W., Seckl J.R., Bunger L., Horvat S., Kenyon C.J., Dunbar D.R. 2011. A stratified transcriptomics analysis of polygenic fat and lean mouse adipose tissues identifies novel candidate obesity genes. *PLoS One*, 6, 9: e23944, doi: 10.1371/journal.pone.0023944: 16 str.
- Morton N.M., Beltram J., Carter R., Gorjanc G., Munger S.C., Svenson K.L., Rodriguez-Cuenca S., Moreno-Navarrete J.M., Gibbins M., McFadden C., Gastaldello A., Stott H., Naredo G., Zeyda M., Wang Z., Howie A.F., Saari A., Sipila P., Stulnig T., Gudnasson V., Kenyon C.J., Seckl J.R., Walker B.R., Webster S.P., Dunbar D.R., Vidal-Puig A., Churchill G.A., Fernandez-Real J.M., Emilsson V., Horvat S. 2016. Genetic selection for extreme low adiposity identifies a healthy leanness gene. *Nature Medicine* (sprejeto v objavo)
- Mutch D.M., Clément K. 2006. Unraveling the genetics of human obesity. *PLoS Genetics*, 2, 12: e188, 10.1371/journal.pgen.0020188: 1 str.
- Neel J.V. 1962. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *The American Journal of Human Genetics*, 14: 353-362
- Pérusse L., Bouchard C. 2006. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*, 14, 4: 529-644
- Peters L.L., Robledo R.F., Bult C.J., Churchill G.A., Paigen B.J., Svenson K.L. 2007. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nature Reviews Genetics*, 8, 1: 58-69
- Phan J., Reue K. 2005. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metabolism*, 1, 1: 73-83
- Pinkney J.H., Kepelman P.G. 2004. Endocrine determinants of obesity. V: *Handbook of obesity: etiology and pathophysiology*. 2nd edition. Bray G.A., Bouchard C. (ur.) New York, Marcel Dekker: 655-669
- Pomp D. 1997. Genetic dissection of obesity in polygenic animal models. *Behavior Genetics*, 27, 4: 285-306

- Pomp D. 2005. Natural polygenic Models. V: Obesity: Genomics and Postgenomics. Clement K. in Sørensen T.I.A (ur) New York, Informa Healthcare USA: 125-141
- Pomp D., Mohlke K.L. 2008. Obesity genes: so close and yet so far... *Journal of Biology*, 7, 9:36, doi: 10.1186/jbiol93: 4str.
- Prevoršek Z., Gorjanc G., Paigen B., Horvat S. 2010a. Congenic and bioinformatics analyses resolved a major-effect Fob3b QTL on mouse Chr 15 into two closely linked loci. *Mammalian Genome*, 21: 172-185
- Prevoršek Z. 2010b. Identifikacija kvantitativnih lokusov za nalaganje maščevja pri miših z genetskim kartiranjem kongenih linij in bioinformacijsko analizo haplotipov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 157 str.
- Prieto-Hontoria P.L., Pérez-Matute P., Fernández-Galilea M., Martínez J.A., Moreno-Aliaga M.J. 2011. Lipoic acid inhibits leptin secretion and Sp1 activity in adipocytes. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 7: 1059-1069
- Puiu M., Emandi A.C., Arghirescu S. 2013. Genetics and Obesity. V: Genetic Disorders. Puiu M. (ur.) Romunija, InTech: 271-292
- Radonjic M., de Haan J.R., van Erk M.J., van Dijk K.W., van den Berg S.A., de Groot P.J., Müller M., van Ommen B. 2009. Genome-wide mRNA expression analysis of hepatic adaptation to high-fat diets reveals switch from an inflammatory to steatotic transcriptional program. *PLoS One*, 4, 8: e6646, doi: 10.1371/journal.pone.0006646: 18 str.
- Rankinen T., Zuberi A., Chagnon Y.C., Weisnagel S.J., Argyropoulos G., Walts B., Pérusse L., Bouchard C. 2006. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*, 14, 4: 529-644
- Rich-Edwards J.W., Goldman M.B., Willett W.C., Hunter D.J., Stampfer M.J., Colditz G.A., Manson J.E. 1994. Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 171, 1: 171-177
- Savage D.B. 2009. Mouse models of inherited lipodystrophy. *Disease Models and Mechanisms*, 2, 11–12: 554-562
- Sharp G.L., Hill W.G., Robertson A. 1984. Effects of selection on growth, body composition and food intake in mice I. Responses in selected traits. *Genetics Research*, 43: 75–92
- Shifman S., Bell J.T., Copley R.R., Taylor M.S., Williams R.W., Mott R., Flint J. 2006. A high-resolution single nucleotide polymorphism genetic map of the mouse genome. *PLoS Biology*, 4, 12: e395, doi: 10.1371/journal.pbio.0040395: 11 str.
- Silha J.V., Krsek M., Skrha J.V., Sucharda P., Nyomba B.L., Murphy L.J. 2003. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *European Journal of Endocrinology*, 149, 4: 331-335
- Simoncic M., Horvat S., Stevenson P.L., Bünger L., Holmes M.C., Kenyon C.J., Speakman J.R., Morton N.M. 2008. Divergent physical activity and novel alternative responses to high fat feeding in polygenic fat and lean mice. *Behaviour Genetics*, 38 3: 292 -300

- Speakman J.R. 2007. A nonadaptive scenario explaining the genetic predisposition to obesity: the "predation release" hypothesis. *Cell Metabolism*, 6, 1: 5-12
- Srivastava A.K., Mohan S., Masinde G.L., Yu H., Baylink D.J. 2006. Identification of quantitative trait loci that regulate obesity and serum lipid levels in MRL/MpJ x SJL/J inbred mice. *Journal of Lipid Research*, 47, 1: 123-133
- Stewart T.P., Mao X., Aqqad M.N., Uffort D., Dillon K.D., Saxton A.M., Kim J.H. 2012. Subcongenic analysis of tabw2 obesity QTL on mouse chromosome 6. *BMC Genetics*, 13: 81, doi: 101186/147-2156-13-18: 10 str.
- Stylianou I.M., Christians J.K., Keightley P.D., Bünger L., Clinton M., Bulfield G., Horvat S. 2004. Genetic complexity of an obesity QTL (*Fob3*) revealed by detailed genetic mapping. *Mammalian Genome*, 15: 472-481
- Sun C., Southard C., Witonsky D.B., Olopade O.I., Di Rienzo A. 2010. Allelic imbalance (AI) identifies novel tissue-specific cis-regulatory variation for human UGT2B15. *Human Mutation*, 31, 1: 99-107
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739
- Tchkonia T., Thomou T., Zhu Y., Karagiannides I., Pothoulakis C., Jensen M.D., Kirkland J.L. 2013. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metabolism*, 17, 5: 644-656
- Ueda H., Howson J.M., Esposito L., Heward J., Snook H., Chamberlain G., Rainbow D.B., Hunter K.M., Smith A.N., Di Genova G., Herr M.H., Dahlman I., Payne F., Smyth D., Lowe C., Twells R.C., Howlett S., Healy B., Nutland S., Rance H.E., Everett V., Smink L.J., Lam A.C., Cordell H.J., Walker N.M., Bordin C., Hulme J., Motzo C., Cucca F., Hess J.F., Metzker M.L., Rogers J., Gregory S., Allahabadia A., Nithiyantanthan R., Tuomilehto-Wolf E., Tuomilehto J., Bingley P., Gillespie KM., Undlien D.E., Rønningen K.S., Guja C., Ionescu-Tîrgoviște C., Savage D.A., Maxwell A.P., Carson D.J., Patterson C.C., Franklyn J.A., Clayton D.G., Peterson L.B., Wicker L.S., Todd J.A., Gough S.C. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423, 6939: 506-511
- Valdar W., Solberg L.C., Gauguier D., Burnett S., Klenerman P., Cookson W.O., Taylor M.S., Rawlins J.N., Mott R., Flint J. 2006. Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nature Genetics*, 38, 8: 879-887
- Varlamov O., Bethea C.L., Roberts C.T. Jr. 2015. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 5: 241, doi: 10.3389/fendo.2014.00241: 7 str.
- Vogel H., Nestler M., Rüschendorf F., Block M.D., Tischer S., Kluge R., Schürmann A., Joost H.G., Scherneck S. 2009. Characterization of Nob3, a major quantitative trait locus for obesity and hyperglycemia on mouse chromosome 1. *Physiological Genomics*, 38, 2: 226-232

- Vogel H., Scherneck S., Kanzleiter T., Benz V., Kluge R., Stadion M., Kryvych S., Blüher M., Klöting N., Joost H.G., Schürmann A. 2012. Loss of function of Ifi202b by a microdeletion on chromosome 1 of C57BL/6J mice suppresses 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and development of obesity. *Human Molecular Genetics*, 21, 17: 3845-3857
- Waalen J. 2014. The genetics of human obesity. *Translational Research*, 164, 4: 293-301
- Welter D., MacArthur J., Morales J., Burdett T., Hall P., Junkins H., Klemm A., Flieck P., Manolio T., Hindorff L., and Parkinson H. 2014. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. *Nucleic Acids Research*, 42: D1001-D1006 <https://www.ebi.ac.uk/gwas/diagram> (15.2.2015)
- Wang X., Ria M., Kelmenson P.M., Eriksson P., Higgins D.C., Samnegård A., Petros C., Rollins J., Bennet A.M., Wiman B., de Faire U., Wennberg C., Olsson P.G., Ishii N., Sugamura K., Hamsten A., Forsman-Semb K., Lagercrantz J., Paigen B. 2005. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility. *Nature Genetics*, 34, 4: 365-372
- Wang X., Zhu H., Snieder H., Su S., Munn D., Harshfield G., Maria B.L., Dong Y., Treiber F., Gutin B., Shi H. 2010. Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes. *BMC Medicine*, 8: 87, doi: 10.1186/1741-7015-8-87: 8 str.
- Wang Y., Li X., Hu H. 2014. H3K4me2 reliably defines transcription factor binding regions in different cells. *Genomics*, 103, 2-3: 222-228
- Wang Y., Rimm E.B., Stampfer M.J., Willett W.C., Hu F.B. 2005. Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 3: 555-563
- Weisberg S.P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R.L., Ferrante A.W. Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 112, 12: 1796-808
- Wells J.C.K. 2009. Thrift: a guide to thrifty genese, thrifty phenotypes and thrifty norms. *International Journal of Obesity*, 33: 1331-1338
- West D.B., Goudey-Lefevre J., York B., Truett G.E. 1994. Dietary obesity linked to genetic loci on chromosomes 9 and 15 in a polygenic mouse model. *Journal of Clinical Investigation*, 94, 4: 1410-1416
- Woods S.C., D'Alessio D.A. 2008. Central control of body weight and appetite. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93, 11 (S1): S37-50
- Xu H., Uno J.K., Inouye M., Collins J.F., Ghishan F.K. 2005. NF1 transcriptional factor(s) is required for basal promoter activation of the human intestinal NaPi-IIb cotransporter gene. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288, 2: G175-181
- Yang H., Wang J.R., Didion J.P., Buus R.J., Bell T.A., Welsh C.E., Bonhomme F., Yu A.H., Nachman M.W., Pialek J., Tucker P., Boursot P., McMillan L., Churchill G.A., de Villena F.P. 2011. Subspecific origin and haplotype diversity in the laboratory mouse. *Nature Genetics*, 43, 7: 648-655

- Yang R.Y., Yu L., Graham J.L., Hsu D.K., Lloyd K.C., Havel P.J., Liu F.T. 2011. Ablation of a galectin preferentially expressed in adipocytes increases lipolysis, reduces adiposity, and improves insulin sensitivity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 46: 18696-18701
- Yaswen L., Diehl N., Brennan M.B., Hochgeschwender U. 1999. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature Medicine*, 5, 9: 1066-1070
- Yazbek S.N., Buchner D.A., Geisinger J.M., Burrage L.C., Spiezio S.H., Zentner G.E., Hsieh C.W., Scacheri P.C., Croniger C.M., Nadeau J.H. 2011. Deep congenic analysis identifies many strong, context-dependent QTLs, one of which, *Slc35b4*, regulates obesity and glucose homeostasis. *Genome Research*, 21, 7: 1065-1073
- Zhang Y., Wei C., Zhang P., Li X., Liu T., Pu Y., Li Y., Cao Z., Cao H., Liu Y., Zhang X., Zhang Y. 2014. Efficient reprogramming of naïve-like induced pluripotent stem cells from porcine adipose-derived stem cells with a feeder-independent and serum-free system. *PLoS One*, 9, 1: e85089, doi: 10.1371/journal.pone.0085089: 13 str.
- Zhou P., Xu W., Peng X., Luo Z., Xing Q., Chen X., Hou C., Liang W., Zhou J., Wu X., Songyang Z., Jiang S. 2013. Large-scale screens of miRNA-mRNA interactions unveiled that the 3'UTR of a gene is targeted by multiple miRNAs. *PLoS One*, 8, 7: e68204, doi: 10.1371/journal.pone.0068204: 12 str.
- Zorc M., Skok D.J., Godnic I., Calin G.A., Horvat S., Jiang Z., Dovc P., Kunej T. 2012. Catalog of microRNA seed polymorphisms in vertebrates. *PLoS One*, 7, 1: e30737, doi: 10.1371/journal.pone.0030737: 8 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Simonu Horvatu za vso strokovno pomoč, nasvete, spodbude, zaupanje in razumevanje ter potrežljivo vodenje skozi vsa leta.

Vsem na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo se zahvaljujem za pomoč, kolegialnost, nasvete pri delu in prijateljstvo. Hvala vsem!

Vsem, ki ste na kakršen koli način prispevali k nastajanju moje naloge se iskreno zahvaljujem! Besede so premalo, da bi izrazila vso hvaležnost!

Nazadnje naj se zahvalim še domačim in Tomažu za neskončno podporo, spodbude in razumevanje!