

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katarina CIRNSKI

**IDENTIFIKACIJA KANDIDATNIH GENOV ZA KVANTITATIVNA
LOKUSA *Fob3b1* in *Fob3b2* DEBELOSTI Z UPORABO KONGENIH
MIŠJIH LINIJ IN EKSPRESIJSKIH MIKROMREŽ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION OF CANDIDATE GENES FOR *Fob3b1* AND
Fob3b2 OBESITY QUANTITATIVE LOCI USING CONGENIC
MOUSE LINES AND EXPRESSION MICROARRAY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Centru za funkcijsko genomiko in biočipe Inštituta za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 16.06.2010 za mentorja imenovala prof. dr. Simona Horvata.

Recenzentka: prof. dr. Damjana ROZMAN

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Damjana ROZMAN

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Član: prof. dr. Simon HORVAT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 08.06.2015

Podpisani/podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega 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.

Katarina Cirnski

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 575(043.2)=163.6
KG	molekularna genetika/pozicijsko kloniranje/mikromreže/transkriptomika/kandidatni geni/debelost/miši
AV	CIRNSKI, Katarina
SA	HORVAT, Simon (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij Biotehnologije
LI	2015
IN	IDENTIFIKACIJA KANDIDATNIH GENOV ZA KVANTITATIVNA LOKUSA <i>Fob3b1</i> in <i>Fob3b2</i> DEBELOSTI Z UPORABO KONGENIH MIŠJIH LINIJ IN EKSPRESIJSKIH MIKROMREŽ
TD	Diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP	XI, 74 str., 27 pregl., 3 sl., 1 pril., 100 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Debelost zahvaljujoč modernemu načinu življenja in lahko dostopni energijsko bogati hrani postaja vedno bolj pereč zdravstveni problem družbe. Poleg monogenih oblik debelosti poznamo še poligene oblike debelosti. Tu več lokusov vsak v manjši meri prispeva k razvoju debelega fenotipa. Z uporabo kongenih linij, genskih kart in analizo QTL-jev, smo močno povečali znanje o gentskem ozadju poligenih oblik debelosti. Tako so ugotovili, da je <i>Fob3</i> , ki se nahaja na kromosomu 15, sestavljen in 2 lokusov, <i>Fob3a</i> in <i>Fob3b</i> . Slednji pa še iz dveh, <i>Fob3b1</i> in <i>Fob3b2</i> . Pokazalo se je, da slednja lokusa pojasnita precej fenotipske variabilnosti. Njuna analiza je dala prve možne vzročne gene. Namen diplomskega dela je bil poiskati diferencialno izražene gene med F2 križanci kongenih linij, ki se genetsko razlikujejo v <i>Fob3b1</i> in <i>Fob3b2</i> odsekih. Z uporabo ekspresijskih mikromrež, ki vsebujejo gene celega genoma, v treh tkivih (jetra, možgani in maščobno tkivo) poiskati diferencialno izražene gene v tarčnem odseku (pozicijski kandidatni geni) ali drugje po genomu (sekundarni ali terciarni kandidatni geni). Izolacija RNA in uporaba ekspresijskih mikromrež, je dala številne diferencialno izražene gene pri primerjavi med linijama v celotnem genomu. Razen v možganih, smo dobili diferencialno izražene gene tudi pri omejitvi na kandidatni odsek kromosoma 15 pri primerjavi med linijama. V jetrih se statistično značilno izražajo geni <i>Celsr1</i> , <i>Creld2</i> , <i>Ttc38</i> in <i>Miox</i> . V možganih se statistično značilno izraža gen <i>Nfkbil2</i> . V maščobnem tkivu se statistično značilno izražata gena <i>Lgals2</i> in <i>Tst</i> . V tkivih nismo dobili nobene statistično značilno izražene metabolne poti. Smo pa v vseh treh tkivih odkrili statistično značilno izražanje številnih bioloških procesov, kot je proces regulacije apoptoze, katabolzem etanola, proces pozicioniranja nukleosomov in z dušikovim oksidom posredovane signalne transdukcije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 575(043.2)=163.6
 CX molecular genetics/positional cloning/microarray/transcriptomics/candidate genes/obesity/mice
 AU CIRNSKI, Katarina
 AA HORVAT, Simon (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
 PY 2015
 TI IDENTIFICATION OF CANDIDATE GENES FOR *Fob3b1* AND *Fob3b2* OBESITY QUANTITATIVE LOCI USING CONGENIC MOUSE LINES AND EXPRESSION MICROARRAY
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XI, 74 p., 27 tab., 3 fig., 1 ann., 100ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Thanks to the modern way of life and accessibility of high-energy food, obesity is becoming a serious health issue of society. There are two types of obesity, monogenic and polygenic obesity, where obese phenotype is a result of several smaller loci each of which contributes only a small percentage to its development. Use of congenic lines, genetic maps and QTL analysis greatly increased our knowledge of the genetic background of the polygenic types of obesity. This approach made it possible to identify *Fob3*, located on chromosome 15 consisting of two smaller linked loci, *Fob3a* and *Fob3b*. Latter is also found to consist of two smaller loci, *Fob3b1* and *Fob3b2*, that accounted for a large percentage of phenotypic variance. The main aim of this thesis was to uncover differentially expressed genes in homozygous animals of opposite genotype from the F2 cross between congenic mouse lines for *Fob3b1* and *Fob3b2* loci by assaying for expression in liver, brain and adipose tissue with whole-genome microarrays therefore obtaining positional candidate genes. We also aimed to uncover differentially expressed genes from other parts of the genome that will serves as secondary and tertiary candidates. RNA isolation and expression microarray experiments resulted in a large number of differentially expressed genes between mouse lines at whole genome level. With restriction of our data analysis to candidate locus, we obtained differentially expressed genes for all tissues. *Celsr1*, *Creld2*, *Ttc38* and *Miox* are differentially expressed genes in liver, *Nfkbil2* in brain, *Lgals2* and *Tst* in adipose tissue. We weren't able to uncover any differentially expressed metabolic pathway. We were able to uncover differentially expressed biological processes in all tissues (apoptose regulation, ethanol catabolism, nucleosome positioning and nitric oxide mediated signal transduction).

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 GENETSKE OSNOVE NALAGANJA MAŠČEVJA.....	4
2.1.1 Monogena in poligena debelost	6
2.2 POLIGENA OBLIKA DEBELOSTI/VITKOSTI-MODEL FHI IN FLI	12
2.3 UPORABA TRANSKRIPTOMIKE KOT ORODJE ZA POZICIJSKO KLONIRANJE QTL	15
2.3.1 Kartiranje QTL-jev in umestitev transkriptomike.....	16
2.3.2 Primeri.....	18
3 MATERIAL IN METODE.....	22
3.1 LABORATORIJSKE MIŠI, KRIŽANJA, VZORČENJE TKIV	22
3.2 IZOLACIJA RNA	26
3.3 PREVERJANJE IZVORA RNA.....	29
3.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction, PCR)	30
3.3.2 Agarozna gelska elektroforeza	33
3.4 MIKROMREŽE – HIBRIDIZACIJA IN SKENIRANJE.....	35
3.5 MIKROMREŽE – OBDELAVA PODATKOV	39
4 REZULTATI	41
4.1 PREDHODNI REZULTATI.....	41
4.2 PRIMERJAVA TRANSKRIPTOMOV MOŽGANOV LL PROTI FF	44
4.2.1 Diferencialno izraženi geni v možganih pri analizi celotne mikromreže	44
4.2.2 Diferencialno izraženi geni v možganih z omejitvijo na 333 genov na kromosomu 15.....	45
4.3 JETRA LL PROTI FF	46
4.3.1 Diferencialno izraženi geni pri analizi celotne mikromreže	46
4.3.2 Diferencialno izraženi geni z omejitvijo na 333 genov na kromosomu 15	46
4.4 MAŠČOBNO TKIVO LL PROTI FF	47
4.4.1 Diferencialno izraženi geni pri analizi celotne mikromreže.....	47
4.4.2 Diferencialno izraženi geni z omejitvijo na 333 genov na kromosomu 15	48
4.5 OBOGATENOST GENSKIH SKUPIN IN METABOLNIH POTI.....	48
4.5.1 Skupine genov iz KEGG metabolnih poti	48
4.5.1.1 Jetra LL proti FF	48
4.5.1.2 Možgani LL proti FF	49

4.5.1.3	Maščobno tkivo LL proti FF	49
4.5.2	Skupine genov iz GO ontologije »Biološki proces«	49
4.5.2.1	Možgani LL proti FF	50
4.5.2.2	Maščobno tkivo LL proti FF	50
4.5.2.3	Jetra LL proti FF	51
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1	RAZPRAVA	52
5.1.1	DI geni tkiv	52
5.1.2	Skupine genov iz KEGG metabolnih poti	55
5.1.3	Skupine genov iz GO ontologije »Biološki proces«	57
5.2	SKLEPI	58
6	POVZETEK.....	60
7	VIRI.....	62
	ZAHVALA	
	PRILOGA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Genotipi vzorcev.....	25
Preglednica 2: Razmerje med TRIzolom in tkivom	26
Preglednica 3: Masa vzorcev	26
Preglednica 4: Merjeni parametri RNA vzorcev in njihove vrednosti	28
Preglednica 5: Sestava PCR mešanice.....	31
Preglednica 6: Genetski in fizični položaj uporabljenih mikrosatelitov za genotipizacijo .	31
Preglednica 7: Zaporedja levega in desnega začetnega oligonukleotida mikrosatelitov, ki smo ju uporabili za genotipizacijo (Vir: Mouse genome browser, 2015)	32
Preglednica 8: Potek programov za PCR reakcijo.....	32
Preglednica 9: Priprava 10- kratnega in 0,5- kratnega TBE.....	34
Preglednica 10: Izhodiščna koncentracija RNA in količina sintetizirane cRNA in ss-cDNA	38
Preglednica 11: Primerjava povprečnih vrednosti mase različnih maščobnih depojev po genotipu	41
Preglednica 12: Primerjava povprečnih vrednosti mase različnih tipov maščobe po spolu	42
Preglednica 13: Primerjava vrednosti t-testa med tkivi in izbranimi populacijami miši.....	42
Preglednica 14: Primerjava vrednosti t-testa med tkivi in genotipi populacij miši.....	43
Preglednica 15: DI geni možgan pri analizi celotne mikromreže brez uporabe FDR.....	45
Preglednica 16: DI geni možgan pri analizi kandidatnega odseka kromosoma 15 z uporabo FDR	45
Preglednica 17: DI geni jeter pri analizi celotne mikromreže z uporabo FDR	46
Preglednica 18: DI geni jeter pri analizi kandidatnega odseka kromosoma 15 z/brez uporabo FDR	47
Preglednica 19: DI geni maščobnega tkiva pri analizi celotne mikromreže z uporabo FDR	47
Preglednica 20: DI geni maščobnega tkiva pri analizi kandidatnega odseka kromosoma 15 z uporabo FDR	48
Preglednica 21: Metabolne poti z DI geni, analiza jeter LL proti FF; odsotnost FDR	49
Preglednica 22: Metabolne poti z DI geni, analiza možgan LL proti FF; odsotnost FDR..	49
Preglednica 23: metabolne poti z DI geni, analiza maščobnega tkiva LL proti FF; odsotnost FDR	49
Preglednica 24: Rezultati GSEA po skupinah genov iz GO ontologije bioloških procesov, z in brez uporabe FDR	50
Preglednica 25: DI biološki procesi pri analizi možgan LL proti FF, brez uporabe FDR ..	50
Preglednica 26: DI biološki procesi pri analizi maščobnega tkiva LL proti FF, brez uporabe FDR	51
Preglednica 27: DI biološki procesi pri analizi jeter LL proti FF	51

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Sestava kromosoma 15 pri kongeni liniji G	24
Slika 2: Prikaz regij in vrhov na elektroferogramu, ki se jih upošteva v algoritmu za izračunu RIN-a (RNA integrity ..., 2004).....	29
Slika 3: Genetski označevalci, ki smo jih uporabili za potrditev genotipov	35

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Genotipi izbranih tkiv in masa maščobnih depojev

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
11 β -HSD-1	11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1 (angl. <i>11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1</i>)
6PGDH	6-fosfoglukonat dehidrogenaza
AgRP	agutiju sorodni peptid (angl. <i>Agouty-related protein</i>)
AIL	napredna križana linija (angl. <i>advanced intercross lines</i>)
ASP	aguti signalna beljakovina (angl. <i>agouti-signaling protein</i>)
BW	masa telesa (angl. <i>body weight</i>)
CART	s kokainom in amfetaminom reguliran transkript (angl. <i>cocaine amphetamine regulated transcript</i>)
CC	skupno križanje (angl. <i>collaborative cross</i>)
CCA	analiza kombiniranega križanja (angl. <i>combined cross analysis</i>)
CFGBC	Center za funkcijsko genomiko in bio-čipe
cM	centimorgan
CPE	karboksipeptidaza E
CSS	sevi s kromosomskimi substitucijami (angl. <i>chromosome substitution strains</i>)
CTC	konzorcij za kompleksne lastnosti (angl. <i>Complex trait Consortium</i>)
CŽS	centralni živčni sistem
DI	diferencialno izražen
EST	oznaka izražene zaporedja (angl. <i>expressed sequence tag</i>)
F linija	debela linija (angl. <i>fat</i>)
FDR	ocena verjetnosti, da določen genski set predstavlja napako prve vrste - lažno pozitiven (angl. <i>False Discovery Rate</i>)
FF	generacija F2 kongene linije G, z dvema genomskima kopijama linije G
<i>Fob3</i>	<i>F-line obesity QTL</i> , ime kvantitativnega lokusa
G6PDH	glukoze-6-fosfat dehidrogenaza
GFP	gonadalno maščobno tkivo (angl. <i>gonadal fat pad</i>)
GH	rastni hormon (angl. <i>growth hormone</i>)
GSEA	analitično orodje za analizo in interpretacijo podatkov mikromrež, ki se osredotoča na skupine genov (angl. <i>Gene Set Enrichment Analysis</i>)
HR	zgodovinski rekombinanti (angl. <i>historical recombinants</i>)
HS	Osnovna heterogena linija (angl. <i>heterogeneous stock</i>)
IDH	izocitrat dehidrogenaza
ISCS	Intervalno specifični kongeni sev (angl. <i>interval-specific congenic strain</i>)
JAK	Janus kinaze
L linija	Vitka/suha linija (angl. <i>lean</i>)
LEPR	leptinski receptor

LL	generacija F2 kongene linije G, z dvema genomskima kopijama linije L
LOD	logaritem razmerja obetov (angl. <i>log 10 of the odds</i>)
MC-4R	melanokortin-4 receptor
MDH	malat dehidrogenaza
NAPDH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (angl. <i>nicotineamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NPY	neuropeptid Y (angl. <i>neuropeptide Y</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PEPCK	fosfoenolpiruvat karboksikinaza (angl. <i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>)
POMC	proopiomelanokortin (angl. <i>pro-opiomelanocortin</i>)
q-PCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
QTL	kvantitativni lokus (angl. <i>quantitative trait locus</i>)
rGFP	relativna masa gonadalne maščobe
RIN	parameter, ki oceni integriteto RNA (angl. <i>RNA integrity number</i>)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. <i>real-time polymerase chain reaction</i>)
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida
STAT	prevodnik signala in aktivator transkripcije (angl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
T _m	temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov (angl. <i>melting temperature</i>)
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (angl. <i>World Health Organisation</i>)
WT	divji tip (angl. <i>wild type</i>)
YYC	Jing-jang križanja (angl. <i>yin-yang crosses</i>)
α-MSH	melanokortin

1 UVOD

Debelost je epidemija razvitega sveta, ki se izredno hitro širi tudi v srednje in slabo razvite države. Dostopnost visoko kalorične hrane in pasiven način življenja, povzročata debelost, ki vodi v razvoj številnih kroničnih obolenj, diabetesa in rakavih obolenj. Kljub okoljskim dejavnikom, ki vplivajo na razvoj debelost, je ta močno podvržena genetskim vplivom. Poznamo monogene in poligene oblike debelosti. Zlasti slednje so problematične, zaradi številnih genov, ki vsak v majhni meri prispevajo k razvoju stanja in jih je izredno težko identificirati. Razvoj genskih kart, kongenih in drugih mišjih linij, dostopnost genskih sekvenc, bioinformatičnih orodij in ostalih genetskih metod, je močno pospešila identifikacijo kvantitativnih lokusov povzanih z debelostjo. Ti so glavne tarče iskanja vzročnih genov, ki vodijo v razvoj debelosti. Ohranjenost genskih regij med vrstami nam omogoča, da debelost preučujemo na mišjih modelih. Uporaba mišjih linij hkrati tudi omogoči omejitev vplivov dejavnikov okolja.

Z divergentno selekcijo na odstotek maščobe, so izselekcionirali debelo in suho linijo, ki predstavlja poligeni model za preučevanje debelosti. Analiza QTL je nakazala na štiri kromosomske regije, ki so imele značilno velik vpliv na odstotek maščobe. Eden od teh je QTL *Fob3b*, ki se nahaja na kromosomu 15. Z nadaljnimi raziskavami so pokazali, da je le-ta sestavljen iz dveh manjših QTL-jev, *Fob3b1* in *Fob3b2*. Zaradi izredno velikega vpliva na nalaganje maščobe, je zelo verjetno da se tu nahaja oz. nahajajo vzročni geni.

Isolacija RNA iz tarčnih tkiv – jetra, maščobno tkivo in možgani in preučevanje razlik v transkriptomu osebkov debele in suhe linije poligenega modela z ekspresijskimi mikromrežami, nam pomaga pri zmanjšanju števila možnih vzročnih genov, ki se nahajajo znotraj *Fob3b1* in *Fob3b2*. Poznavanje vzročnih genov bi bilo v humani medicini pomembno predvsem z vidika razvoja zdravil ali genske terapije za zdravljenje, razvoj diagnostičnih testov in preventivnih strategij.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Debelost je v zadnjem desetletju postala globalni problem in se z razsežnostmi epidemije širi po vsem svetu. Po poročilih Svetovne zdravstvene organizacije WHO (angl. *World Health Organization*, v nadaljevanju WHO) zaradi posledic debelosti vsako leto umre 2,7 milijona ljudi. Leta 2014 je bilo 1,9 milijarde odraslih prekomerno težkih, od tega jih je 600 milijonov debelih (Obesity and overweight, 2015). Loos in Bouchard (2008) navajata, da je debelost je poligena lastnost, ki je pod relativno velikim vplivom genetskih dejavnikov (dednostni delež= 40-70%), pomembne pa so tudi interakcije genov med sabo in interakcije genov z okoljem (prehrana, fizična aktivnost ipd.) (Bünger in Hill , 1999). S prejšnjimi poskusi grobega kartiranja selekcijskih miši F (angl. fat) in L (angl. lean) so odkrili, da ima področje na kromosomu 15 (imenovan kvantitativni lokus *Fob3*), relativno velik učinek na nalaganje maščevja (Horvat in sod., 2000). Z nadaljnimi poskusi so ugotovili, da je ta kvantitativni lokus sestavljen iz 2 kvantitativnih lokusov *Fob3b1* in *Fob3b2*, ki sta se izkazala za dobra kandidata za iskanje novih vzročnih genov za debelost (Prevoršek in sod., 2010).

Naš cilj je bil:

- Poiskati diferencialno izražene gene med F2 križanci kongenih linij, ki se genetsko razlikujejo v *Fob3b1* in *Fob3b2* odsekih – odseka lahko izvirata ali iz linije miši selekcionirane na višji odstotek telesnih maščob ali linije selekcionirane na nižji odstotek maščob.
- Z uporabo ekspresijskih mikromrež , ki vsebujejo gene celega genoma (Affymetrix GeneChip Mouse Gene 1.0 ST) želimo v treh tkivih (jetra, možgani in maščobno tkivo) poiskati diferencialno izražene gene v tarčnem odseku (pozicijski kandidatni geni) ali drugje po genomu (sekundarni ali terciarni kandidatni geni).

V diplomskem delu smo zastavili sledeči hipotezi:

- Med F2 križanci kongenih linij za kvantitativna lokusa *Fob3b1* in *Fob3b2* treh tkiv (jetra, možgani, maščobno tkivo) obstajajo statistično značilno diferencialno izraženi geni.

- Pričakujemo, da bomo odkrili diferencialno izražene gene, ki kartirajo v tarčni odsek, ki vsebuje *Fob3b1* in *Fob3b2* (t.i. pozicijski kandidatni geni) in diferencialno izražene gene drugje po genomu, ki so posledica kavzalnih mutacij v *Fob3b1* in *Fob3b2* (sekundarni ali terciarni kandidatni geni in metabolne poti).

2 PREGLED OBJAV

2.1 GENETSKE OSNOVE NALAGANJA MAŠČEVJA

Svetovna zdravstvena organizacija definira prekomerno težo in debelost kot prekomerno oz. nenormalno nalaganje maščobe, ki predstavlja nevarnost zdravju. Za oceno debelosti populacije se uporablja indeks telesne mase – ITM (angl. *body mass index*, BMI). ITM je razmerje med maso telesa v kilogramih in kvadratom telesne višine v metrih (Mean body mass index, 2013). Ko to razmerje preseže vrednost 30 govorimo o debelosti, vrednosti med 25 – 30 označujejo prekomerno telesno maso, 20 – 25 normalno telesno maso, vrednosti pod 18 pa kažejo na podhranjenost (Kopelman, 2000; Bünger in Hill, 2005).

Prekomerna teža in debelost sta dva glavna dejavnika tveganja za razvoj kroničnih bolezni, med drugim tudi za sladkorno bolezen, kardiovaskularne bolezni (predvsem bolezni srca in kap) ter rakava obolenja (endometrijski, rak dojk in debelega črevesa) in osteoartritis (Kopelman, 2000; Prentice, 2006; Obesity and overweight, 2015; Bünger in Hill, 2005). Otroška debelost lahko vodi v debelost v odrasli dobi, invalidnost in prezgodnjo smrt. Poleg tega se otroci spopadajo s težavami dihanja, povečanim tveganjem za zlome, povišanim krvnim tlakom in inzulinsko odpornostjo (Obesity and overweight, 2015).

Januarja 2015 je WHO objavil, da se je število debelih ljudi, od leta 1980, skoraj podvojilo. Leta 2014 je bilo 1,9 milijarde ljudi, starih 18 let ali več, prekomerno težkih. Od tega jih je bilo 600 milijonov debelih. 13% odraslih v svetovni populaciji je bilo leta 2014 debelih (11% moških in 15% žensk). Leta 2014 je bilo 39% odraslih, starejših od 18 let, prekomerno težkih. Od tega je bilo 38% moških in 40% žensk (Obesity and overweight, 2015). Več kot 40 milijonov otrok, mlajših od 5 let, je bilo prekomerno težkih v letu 2011. 65% svetovne populacije živi v državah kjer prekomerna teža in debelost ubijeta več ljudi kot prenizka teža. Prekomerna teža in debelost sta 5. na lestvici faktorjev, ki povzročijo največ smrti na svetu. Za posledicami prekomerne teže oz. debelosti po svetu umre vsaj 2,8 milijard odraslih. 44% jih oboleva za sladkorno boleznijo, 23% za ishemično boleznijo srca in od 7 – 41% jih oboli za raznimi oblikami raka. Čeprav so debelost nekoč smatrali

za problem visoko razvitih držav, pa je le ta sedaj v porastu tudi v srednje in slabo razvitih državah, še posebej v urbanih območjih (Obesity and overweight, 2015). Debelost je postala epidemija razvitega sveta (Stylianou in sod., 2004a).

Glavni razlog za razvoj prekomerne teže in debelosti je energijsko neravnovesje med zaužitimi in porabljenimi kalorijami. Prišlo je do povečanega uživanja energijsko bogate hrane, to je hrane, ki vsebuje veliko maščob (angl. *high-fat food*) (Stylianou in sod., 2004a) in zmanjšanja fizične aktivnosti, ki je posledica narave dela, transporta in povečane urbanizacije (Obesity and overweight, 2015). Znižan nivo porabe energije in nizek bazalni metabolizem sta bila definirana kot ključna dejavnika tveganja za naknadno pridobivanje teže v populaciji, ki je nagnjena k debelosti. V populaciji Pima Indijancev so odkrili, da so pomembni vsi naslednji dejavniki: stopnja metabolizma, fizična aktivnost, stopnja oksidacije maščobe, inzulinska občutljivost, aktivnost simpatičnega živčnega sistema in koncentracije leptina v plazmi. Kljub vsemu ostaja vloga porabe energije v regulaciji energije kontroverzna. Pokazali so, da je poraba energije ključni faktor v regulaciji energije (Bünger in Hill, 2005). Nizka poraba energije namreč pospešuje pridobivanje teže in niža izgubo energije med dietami pri osebkih, ki so dovzetni za debelost. Prav tako obstajajo dokazi, da lahko fizična aktivnost vpliva na osnovne determinante energijskega ravnotežja. Študije s telovadbo so pokazale, da je celotna poraba energije po vadbi večja kot bi jo pričakovali glede na zaužite kalorije (Bünger in Hill, 2005). Študije fizične aktivnosti so pokazale tudi, da so debeli osebki fizično manj aktivni kot suhi, kar je lahko posledica debelosti in ne nujno vzrok (Ekelund in sod., 2005, cit. po Simončič in sod., 2008). Simončič in sod. (2008) so pokazali, da so suhe miši (miši L linije) bolj aktivne od debelih (miši F linije) in s starostjo postajajo razlike večje. Ko so te miši hranili s krmo bogato z maščobami, pa se je pokazalo, da so miši L linije znatno znižale vnos energije in vzdrževale aktivnost, ki vodi v izgubo teže. Miši F linije pa so obdržale nivo vnesene energije in povečale aktivnost, vendar so kljub temu pridobile na teži.

Debelost je kompleksna lastnost, ki je posledica interakcij genetskih in okoljskih dejavnikov (Bünger in Hill, 2005, cit. po Simončič in sod., 2008). Konzorcija za kompleksne lastnosti - KKL (ang. *Complex trait Consortium*, CTC) (Abiola in sod., 2003)

navaja, da so ravno interakcije gen-gen in gen-okolje tiste, ki predstavljajo največjo oviro pri genetskih analizah, ker statistično predstavljajo dodatne dejavnike, ki jih je v standardnih genetskih testih in velikosti populacij težko iz vrednotiti. Genetski dejavniki sodelujejo pri kontroli vnosa energije, metabolizma in porabe energije, delitvi hranil in obnašanju (Bouchard, 1994, cit. po Horvat in sod., 2000).

2.1.1 Monogena in poligena debelost

Poznamo monogene in poligene oblike debelosti. Pri monogeni obliki debelosti pride do mutacije v enem samem genu, ki ima velik učinek. Poznamo 11 takih mutacij genov, ki so jih identificirali v miših. Najbolj znane mutacije so obese (*Lep^{ob}*), diabetes (*Lepr^{db}*), fat (*Cpe^{fat}*), agouti yellow (*A^y*) in tubby (*tub*) (Bünger in Hill, 2005). Njihovo kloniranje je razkrilo nove gene in metabolne poti, ki so vključene v razvoj debelega fenotipa (Horvat in sod., 2000).

Pri mutanutu *ob/ob* (angl. *obese*, debel) so potrdili mutacijo v genu, ki kodira leptin. Gre za hormon, ki ga izloča belo maščobno tkivo. Veže se na receptorje, ki se nahajajo v hipotalamusu. Njegova vezava na receptorje povzroči sintezo neuropeptidov, ki sodelujejo pri uravnavanju apetita in porabi energije, sodelujejo pa tudi pri regulaciji endokrinih poti. Mutacija v tem genu je povzročila spremembo bralnega okvirja in predčasno pojavljanje stop kodona. To je vodilo v pomanjkanje sinteze leptina in posledično odsotnost hormona v krvi. Testni osebki so imeli neobičajno povišan apetit in močno povečan delež maščobnega tkiva v telesu (54 – 57%) (Montague in sod., 1997, cit. po Simončič, 2008). Tako izrazit fenotip povzroči homozigotno stanje mutacije. Osebki z eno funkcionalno kopijo gena imajo znižano raven sinteze leptina v maščobi in posledično, nižje koncentracije hormona v krvi, kar vodi v večjo zamaščenost (Farooqi in sod, 2001, , cit. po Simončič, 2008). Ko so mišim, ki so imele inaktiviran gen *Lep* in so bile posledično debele, injecirali leptin je to vodilo do značilno zmanjšane telesne teže, telesnih maščob, zaužitja hrane in serumskega inzulina (Campfield in sod., 1995).

Sinteza leptina je povečana, ko se povečajo maščobni depoji in zmanjšana, ko se maščobni depoji zmanjšajo. Leptin se izloča v krvni obtok in se veže na leptinske receptorje v hipotalamusu, kjer vpliva na energijsko homeostazo telesa. Ko je koncentracija leptina povišana, preko POMC/CART (angl. *pro-opiomelanocortin/cocaine amphetamine regulated transcript*) nevronov vpliva na katabolne procese v telesu. V nasprotnem primeru, ko je koncentracija leptina nizka, ta preko NPY/AgRP (angl. *neuropeptide Y/Agouty-related protein*) nevronov sproži anabolne procese, kar vodi v povečano uživanje hrane (Loos in Bouchard, 2003).

Mutante *db* (angl. *diabetes*) imajo podoben metabolni sindrom, s to razliko, da gre tu za točkovno mutacijo v genu za leptinski receptor. Mutacija povzroči nastanek prezgodnjega stop kodona. Posledično nastane proteinski receptor LEPR, ki mu manjkajo intracelularne domene, katerih naloga je aktivacija JAK/STAT signalne poti (Margetic in sod., 2002, cit. po Simončič, 2008). LEPR je prisoten tako pri NYP/AGRP tipu nevronov, kot pri POMC/CART nevronih. NYP/AGRP izločajo neuropeptid Y (NYP) in agutiju podoben peptid (AgRP). Nekateri celice v centralnem živčnem sistemu (CŽS) imajo melanokortin-4 receptorje (MC-4R). Na te receptorje se veže α -stimulirajoči hormon (α -MSH). Z vezavo leptina na LEPR NYP/AGRP pride do zmanjšanega izločanja NYP. Vezava leptina na LEPR POMC/CART povzroči povečano izločanje α -MSH. Posledično pride do izločanja noradrenalina, ki ima pri glodalcih vlogo povečanja termogeneze v rjavi maščobi in zmanjšanja apetita (Loos in Bouchard, 2003; Speakman, 2004).

Pri mutaciji *fat* gre za točkovno mutacijo, ki povzroči zamenjavo timidina s citozinom, posledično se namesto serina vgradi prolin. Dobimo nefunkcionalno karboksipeptidazo E (angl. *carboxypeptidase*, CPE). Slednja sodeluje pri oblikovanju končne, funkcionalne oblike neuropeptidov. Ti nastajajo iz propeptidov, ki jih prohormon konvertaze pretvorijo v krajši peptid, ki mu CPE odcepi C-terminalni ostanek. Mutante *fat* so imele nižje vrednosti α -MSH kot kontrolne miši divjega tipa (angl. *wild type*, WT). Pri tem tipu mutacije ostaja precej stvari še nerazjasnjenih. Kajti moteno procesiranje neuropeptidov se pojavi že pri 6-8 tednov starosti, ko se mutanti in WT še ne razlikujejo v deležu maščevja.

Debelost pri mutantu nastopi pri 10-12 tednih. Boudarine in sod. (2002) predvidevajo, da v tem primeru pojava debelosti sodelujejo še drugi, opioidni receptorji v CZŠ.

Pri avtosomalno recesivni mutaciji *tubby* pride do zamenjave gvanina s timinom. Ta mutacija posledično povzroči nepravilno spajanje eksonov in introna, zato protein ne vsebuje aminokislin s karboksilno skupino, ki jih kodira zadnji ekson. Wang in sod. (2006) predvidevajo, da ima protein vlogo transkripcijskega faktorja v inzulinski signalizaciji. Zanimivo je tudi, da te mutante raje kot glukozo metabolizirajo maščobne kisline.

Pri mutaciji *agouti yellow* pride do insercij ali delecij v promotorju gena A^y . Mutirana aguti-signalna beljakovina (ASP) vpliva na povečanje Ca^{2+} ionov, ki v celicah sprožijo številne signalne poti. V β -celicah trebušne slinavke povečana koncentracija Ca^{2+} vodi v povečano izločanje inzulina, kar privede do hiperinzulinemije. ASP se veže na melanokortinski receptor MCR-4, ki ima vlogo v uravnavanju apetita. Vežava povzroči, da ne pride do prenosa signala leptina preko α -MSH, kar povzroči povečan apetit (Leibel in sod., 1997, cit. po Simončič 2008).

Bünger in Hill (2005) navajata, da se debelost, ki nastopi kot posledica mutacije enega gena, pri zgoraj navedenih mutacijah razlikuje v obsegu in starosti osebka, ko pride do razvoja debelosti in je odvisna od genetskega ozadja. Prav tako navajata, da čeprav so ustrezni monogeni modeli debelosti pri človeku redki, pa so mišji modeli močno pripomogli k razumevanju molekularnih poti in fizioloških sistemov, ki vplivajo na regulacijo energijskega ravnotežja in debelosti.

Zaradi velikega učinka na energijsko ravnotežje in debelost, so ti geni primerni za kandidatne, da se razišče ali je polimorfizem določenega gena prispeval k odgovoru na umetno selekcijo. Študije so pokazale, da ti geni ne prispevajo veliko, če sploh kaj. V poligenem modelu debelosti, ki je nastal z divergentno selekcijo na debelost so ugotavljali vlogo leptinske povratne zanke. Ocenjena je bila z introgresijo s številnimi povratnimi križanji *Lep^{ob}* (povzroči leptinsko produkcijo) in *Lepr^{db}* (povzroči okvaro leptinskega receptorja) mutacij v debelo (angl. *Fat*, F) in suho linijo (angl. *Lean*, L). V obeh linijah,

homozigotnih za *Lep^{ob}* in *Lepr^{db}*, je prišlo do bistvenega povečanja količine maščobe v primerjavi z divjim tipom. Pri debelih samicah se je količina maščobe povečala iz 6,4g na 24,1g pri *Lep^{ob}* in 27,4g pri *Lepr^{db}*. Pri vitkih samicah se je količina maščobe povečala iz 2,4g na 18,7 pri *Lep^{ob}* in 23,4g pri *Lepr^{db}*. Razlike med linijama se po introgresiji niso spremenile, kar kaže na to, da geni, ki so odgovorni za razhajanja med linijama, delujejo neodvisno od leptinskega regulatornega sistema. Vlogo genetskih sprememb za občutljivost na leptin so testirali tudi z eksogenim dodajanjem leptina neinbridirani F liniji in neselekcionirani kontrolni liniji. Zdravljene živali so imele znatno nižjo, 15% živali F linije in 3% živali kontrolne linije, srednjo vrednost maščobnega tkiva kot nezdravljene živali (21% in 7,4%). Kljub temu so bile razlike v odgovoru med linijama nepomembne. Razpon vrednosti maščobnega tkiva se je pri zdravljene F liniji gibal med 3-29%, pri nezdravljeni pa od 15-31%. Pri zdravljene kontroli je bil ta razpon med 0,7-6,4%. Pokazalo se je tudi, da je odgovor živali na leptin odvisen tudi od uporabljenega odmerka. Pri osebkih F in L linije so preučevali tudi vpletenost rastnega hormona (angl. *growth hormone*, GH). S številnimi povratnimi križanji recesivnega *lit* gena v obe liniji, so dosegli pomanjkanje GH. Slednje je povzročilo relativno povečanje maščobnega tkiva v obeh linijah, še posebej pri samcih.

Poleg znanih enogenskih mišjih modelov debelosti, poznamo še 55 izbitih in transgenih glodalskih modelov, ki so pomembni za razumevanje pojava debelosti. Več kot 430 genov, označevalcev in kromosomskih regij je bilo povezanih s človeško debelostjo. To nakazuje, da je debelost tipična kvantitativna lastnost s poligeno osnovo in normalno porazdelitvijo, pri čemer imamo veliko genov z majhnim učinkom in nekaj genov z velikim oz. vidnim učinkom. Flint in Mott (2001) navajata, da smo do tega znanja prišli z razvojem gostih genskih map polimorfni markerjev. Bünger in Hill (1999) navajata nekaj takih genov oz. mutacij genov, ki imajo velik učinek: *hg*, *lit*, *dw*, *dw^J*, *pg*, *cmpt*. Razen mutacije *hg*, ki vpliva na povečanje telesne teže (med 21-42 dnem za 30-50%), ostale mutacije nižajo telesno težo. Nadalje navajata, da telesna teža sestoji iz maščobnega in ne-maščobnega tkiva, pri čemer nekateri geni vplivajo samo na količino maščobnega tkiva, nekateri pa vplivajo na oboje. Torej moramo poznati sestavo telesa, če hočemo odkriti gene, ki povzročajo tako stanje. Horvat in sod. (2000) navajajo, da poznavanje teh genov vodi v

razumevanje procesov, ki vodijo v razvoj debelega fenotipa. Za ljudi je to znanje pomembno z vidika razvoja zdravil ali genske terapije za zdravljenje debelosti, razvoj diagnostičnih testov in preventivnih strategij. V živalih bi nam to omogočilo neposredno manipulacijo vsebnosti maščobe z introgresijo alelov z želenim učinkom. Tabeliranih je bilo 75 kvantitativnih lokusov (angl. *quantitative trait loci*, QTL) za debelost in 85 za telesno težo. Ti QTL-ji kartirajo na vse kromosome, razen na Y. Še posebej veliko se jih nahaja na kromosomih 1, 7 in 11. Večina teh QTL-jev ima majhne, aditivne učinke, ki jih pogostokrat spremenijo dieta, starost in spol. Ko so selekcionirali osebke v liniji, ki so imeli visoko telesno maso pri 35 dneh starosti in osebke, ki so imeli visoko telesno maso pri 70 dneh starosti, so ugotovili, da so oboji osebki po 70 dneh pridobili na telesni masi, vendar so osebki izbrani pri 35 dneh pridobili nekoliko več mase. Zaključki tega poskusa so nakazali, da so razlike v rasti pri mladih osebkih na račun različne količine zaužite hrane, ker živali izbrane pri nižji starosti enostavno zaužijejo več. Pri starejših pride do povečanega kopičenja maščobe in večjih razlik v uživanju krme. Selekcija starejših živali favorizira vitkost. Selekcija mlajših živali pa vodi v povečano uživanje hrane in nalaganje maščobe (Bünger in Hill, 2005).

V medicini ljudi in vzreji domačih živali je pomembna tudi razporeditev maščobnega tkiva po telesu. Mehanizmi, ki kontrolirajo razporejanje maščobnega tkiva še niso popolnoma znani (Asante in sod., 1989). Študije so pokazale, da obstaja povezava med določenimi maščobnimi depoji in bolezenskimi stanji. Nadalje se je izkazalo, da je pomembna tudi topografija znotraj maščobnega depoja (Bünger in Hill, 2005). Asante in sod. (1989) so naredili študijo kjer so merili specifično aktivnost štirih encimov, ki sodelujejo v nastanku nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (angl. *nicotineamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH). Njihova hipoteza je bila, da je NADPH potreben za *de novo* sintezo maščobnih kislin. Posledično aktivnost teh encimov vpliva na hitrost lipogeneze. Primerjali so aktivnost glukoze-6-fosfat dehidrogenaze (G6PDH), 6-fosfoglukonat dehidrogenaze (6PGDH), malat dehidrogenaze (MDH) in izocitrat dehidrogenaze (IDH) v jetrih in gonadalnem maščobnem tkivu (angl. *gonadal fat pad*, GFP) F in L linije pri starosti 5 in 10 tednov. F linija je imela višjo aktivnost jetrnih encimov od L linije, pri 5 tednih od 10-55% in pri 10 tednih 1-19%. Podobne rezultate so dobili za gonadalno maščobno tkivo. MDH v

GFP je bil edini encim, ki je obdržal dvakratno spremembo v izražanju med F in L linijo pro obeh starostih, kar nakazuje da ima najverjetneje pomembno vlogo v metabolizmu lipidov. Z merjenjem količine NADPH so pokazali, da ga F linija hitreje pretvarja, kar kaže na hitrejšo lipogenezo.

Obstaja tudi t.i. idiopatska debelost. V Merriam-Webster je pridevnik idiopatski razložen kot nekaj kar se pojavi spontano oziroma iz neznanega razloga (Idiopathic, 2015). Morton in sod. (2005) v svojem članku trdijo, da obstaja povezava med idiopatskim metaboličnim sindromom in presežkom kortizola v plazmi, poznano tudi pod imenom Cushingov sindrom. To nakazuje na skupni vzrok za presežen nastanek glukokortikoidov. To so dokazali pri glodalcih, ki so jim odstranili ščitnico in jim nato vbrizgali glukokortikoide. Naloga glukokortikoidov je nadzorovanje pretirane tvorbe adipocitov, sodelujejo pri hipertrofiji, proizvodnji lipidov, povečujejo nivo glukoze v jetrih, slabšajo inzulinsko odpornost mišič in zavirajo centralne sisteme porabe energije. Ugotovili so, da je pri človeku, količina plazemskih glukokortikoidov nespremenjena ali celo nižja. To lahko razložimo s povečanim izražanjem encima 11β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1 (angl. *11\beta*-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 11β -HSD-1). Izražanje slednjega je močno povišano pri pokožnem maščevju debelih ljudi. Enak pojav so opazili tudi v visceralni maščobi pri glodalcih z monogenimi okvarami v genu za leptin in leptinski receptor. Transgene miši s prekomerno izraženim 11β -HSD-1 v maščobnem tkivu prav tako razvijejo ta metabolični sindrom, skupaj z zamaščenimi jetri, visokim krvnim tlakom in inzulinsko odpornostjo. To stanje je zelo podobno človeški miotoni distrofiji. Nasprotno pa se miši z neaktivnim 11β -HSD-1 upirajo z dieto povzročeni debelosti in imajo izboljšane jetrne funkcije. V svojem poskusu so ugotovili tudi, da je dodajanje zunanega glukokortikosteroida povzročilo povečanje mase podkožnega in mezenternega maščevja, a ne epididimalnega pri osebkih F in L linije. Prav tako je prišlo do povečane koncentracije inzulina v krvi pri osebkih F linije, a ne pri osebkih L linije. Do sprememb je prišlo tudi na nivoju mRNA, saj je bil nivo mRNA za glukokortikoidni receptor v maščobnem tkivo močno znižan pri F linij. To je posledno povzročilo tudi znižano izražanje angiotensinogena in lipoprotein lipaze in povišano izražanje encima, ki sodeluje pri kopičenju lipidov. V jetrih je bila količina mRNA za 11β -HSD-1, angiotensinogen, LDL

receptor in glukokortikoidni receptor pri F liniji povečana. Medtem pa se količina mRNA encimov fosfoenolpiruvat karboksikinaze (angl. *phosphoenolpyruvate carboxykinase*, PEPCCK), sintazo maščobnih kislin, karnitin palmitoil transferazo-1 in jetrno lipazo med linijama ni razlikovala. Hranjenje s hrano bogato z maščobami ni povečalo že tako visoke ravni plazemskega inzulina in jetrnih trigliceridov pri F liniji. Pri miših L linije je prišlo do t.i. superlean odgovora. Masa maščobe v vseh maščobnih depojih se je zmanjšala. Pokazali so, da je debelost pri F miših povezana s pozitivno hiperglikemijo, inzulinsko rezistenco, zamaščenimi jetri in povišanim krvnim tlakom. Pri F miših je prisoten metabolni sindrom, ki je posledica izražanja osnovnih genov in ni posledica prekomernega apetita. Pri teh miših je prisoten pojav shranjevanja maščobne mase v podkožju in ne v visceralnem predelu. Ta pojav razporejanja maščobnega tkiva je povezan z nižjim tveganjem razvoja metabolne bolezni.

Bünger in Hill (2005) navajata, da selekcijski poskusi na miših dokazujejo, da je možna selekcija na posamezne maščobne depoje in da lahko razporeditev maščobe po telesu spremenimo. Čeprav obstaja visoka pozitivna korelacija med različnimi maščobnimi depoji, obstaja tudi genetska raznolikost v razporeditvi teh depojev in času razporeditve. To nakazuje na prisotnost sistemske in lokalne kontrole lipogeneze in/ali lipolize.

2.2 POLIGENA OBLIKA DEBELOSTI/VITKOSTI-MODEL FHI IN FLI

Za identifikacijo genetskih in fizioloških osnov, ki so povezane z rastjo in debelostjo, se največkrat uporabljajo inbridirane linije. Najprej se razvije za lastnost močno različne selekcijske linije, ko je stopnja divergence dovolj velika se iz njih razvije inbridirane linije (Bünger in Hill, 1999). Z dvosmerno selekcijo na visoko in nizko vsebnost maščobe preko 60 generacij so izselecionirali *debelo* (angl. *fat*, F) in *suho* (angl. *lean*, L) linijo miši, ki predstavlja poligeni model debelosti in je podoben situaciji v človeški populaciji. Razlika v količini maščobnega tkiva med linijama je bila 5-kratna, F linija je imela 22% in L linija 4% maščobnega tkiva (Stylianou in sod., 2004a). Razvoj linije EF oz. F in EL oz. L je opisan v točki 3.1. Laboratorijske miši, križanja, vzorčenja tkiv.

Horvat in sod. (1999) so na F in L liniji naredili osnovni pregled za mikrosatelitne označevalce. Namen je bil identifikacija primerjev, ki so med linijama polimorfni. Izkazalo se je, da kljub divergentni selekciji večina označevalcev za nasprotni alel ni fiksna. To pomeni, da imata liniji skupne alele. Posledično posameznikom iz F₂ generacije ni vedno možno določiti izvor alela kar posledično zmanjša informativnost posameznikovih podatkov. F₁ populacija je nastala z vzajemnim križanjem F in L linije po 53 generacijah. Sledila so križanja F₁ populacije med sabo kar je dalo F₂ populacijo.

Analiza QTL narejena s pomočjo 71 označevalcev je identificirala obstoj štirih kromosomskih regij z značilnim vplivom na odstotek maščobe. Regije so poimenovali *Fob1* (ang. Fat line obesity lokus 1, ki se nahaja na kromosomu 2) in ima LOD vrednost 4,0, *Fob2* (se nahaja na kromosomu 12) in ima LOD vrednost 3,9, *Fob3* (se nahaja na kromosomu 15) in ima LOD vrednost 11,3 in *Fob4* (se nahaja na kromosomu X) in ima LOD vrednost 6,7. Vsi imajo pozitiven učinek kar pomeni, da aleli iz F linije višajo odstotek maščobe. Največji vpliv imata *Fob2* in *Fob3*, prispevata kar 19,55 in 14,4% F₂ fenotipske raznolikosti za odstotek maščobe. *Fob2* ima dominanten učinek ostali trije pa aditivnega.

V *Fob3* regijo na kromosomu 15 mapira nekaj potencialnih kandidatnih genov: *Trhrf* (angl. *Thyrotropin releasing hormon receptor*), *cog* (angl. *Congenital goiter*), *Tgn* (angl. *Thyroglobulin*), *Smstr3* (angl. *Somatostatin receptor 3*), *Tef* (angl. *Thyrotroph embrionic factor*), *Ins3* (angl. *Insulin 3*) and *Ppara* (angl. *Peroxisome proliferator activated receptor alpha*). Domnevna regija *Fob3* je homologna človeški regiji 8q22-q24 in 22q12-q13. V regijo 8q22-q23 kartira z debelostjo povezano bolezensko stanje COH1 (angl. *Cohen syndrome*).

Stylianou in sod. (2004b) so razvili kongeno linijo za QTL regijo *Fob3*. Križali so F in L linijo in F₁ potomce, ki so bili heterozigoti za regijo *Fob3* petkrat povratno križali z F linijo. Nastala je kongena linija imenovana F^{chr15L}. Gre za F linijo z delom L linije na kromosomu 15. Po šestem povratnem križanju je ozadje F linije predstavlja 97% genoma. Sledilo je križanje homozigotnega F^{chr15L} samca s samičkami F linije.

Heterozigotno potomstvo so križali med sabo in dobili zelene rekombinante. Moške rekombinante so povratno križali z F linijo in kongenimi F^{chr15L} samicami, ženske rekombinante pa so križali z samci F linije. Potomce ženskih rekombinant z želenim rekombinantnim genotipom so povratno križali z osebki F linije in osebki kongene F^{chr15L} linije. Fisler in Warden (1997) navajata, da z uporabo kongenih linij poligeni model spremenimo v monogenega, ker majhen donorski genski segment prenesemo v standardizirano inbridirano genetsko ozadje.

Uporaba večjega števila genetskih označevalcev, kongene linije in podatkov kot so masa telesa (angl. *body weight*, v nadaljevanju BW) pri starosti 21, 42, 70, 98 in 115 dni, relativna masa gonadalne maščobe ali rGFPwt (razmerje med maso gonadalne maščobe in maso pri starosti 115 dni) in odstotek maščobe (določen z razmerjem med maso posušenega trupla in maso pri starosti 115 dni) so pokazali, da je QTL regija *Fob3* pomembna že pri starosti 21 dni. Vloga raste do starosti 10 tednov, ko se ustavi oz. stabilizira. Nakazuje se, da se v tej regiji nahajata dva QTL-ja, saj se vrh aktivnosti s starostjo širi. Z večkratno QTL analizo regije so potrdili, da je *Fob3* dejansko sestavljen iz dve QTL-jev. Poimenovali so ju *Fob3a* in *Fob3b*. Nadaljne analize so pokazale, da *Fob3a* postane pomemben za razvoj debelosti kasneje, okoli starosti 70 dni. *Fob3b* pa je pomemben na začetku pri starosti okoli 21 dni. V obdobju med 42 in 70 dnevom starosti prihaja med QTL-jema do epistatskih interakcij. Velikost in vrh intervala zaupanja za *Fob3b* nekoliko niha kar kaže na to, da na rezultate vpliva *Fob3a*. Druga možna razlaga predlaga, da je *Fob3b* sestavljen iz dveh QTL-jev z zapletenimi epistatskimi interakcijami. V bližino *Fob3a* kartira kar 8 QTL-jev povezanih z debelostjo in/ali telesno maso. Analiza *Pfat15* je pokazala, da slednji prekriva oba, tako *Fob3a* kot *Fob3b*. Obstaja možnost, da je pod vplivom istih genov.

Oba QTL-ja so pregledali za potencialne kandidatne gene. Znotraj *Fob3a* so našli dva:

- *Cox6c* (angl. *cytochrome c oxidase-subunit Vic*), ki je zadnji od encimov v dihalni verigi in
- *Trhr*, ki vpliva na debelost preko hormonov ščitnice.

Znotraj *Fob3b* regije so našli 7 kandidatnih genov:

- *Ndufb9* (angl. *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex*), sodeluje v oksidativni fosforilaciji NADH-ja,
- *Sqle* (angl. *Squalene monooxygenase*) sodeluje v biosintezi holesterola,
- *Myc* (angl. *Myelocytomatosis oncogene*) sodeluje v diferenciaciji adipocitov,
- *Oc90* (angl. *otoconin 90 precursor*) sodeluje v katabolizmu lipidov,
- *Tef* (angl. *thyrotroph embryonic factor*) sodeluje v poti hormonov ščitnice,
- *Rhpn1* (angl. *Rho-GTPase-binding protein-1*) se veže na glukozo odzivne elemente in sproži lipogenezo in
- *Dgat1* (angl. *diacylglycerol O-acyltransferase-1*), ki sodeluje v sintezi triacilglicerola.

Primerjava *Fob3b* regije med uporabljenimi kongenimi linijami, analiza razlik med kongenimi in F linijo ter razlik med LL in FF genotipom v F2 medsebojnem križanju kongenih osebkov, je rezultirala v zožanju *Fob3b* regije. S finim kartiranjem in pozicijskim kloniranjem odseka, so ugotovila, da je *Fob3b* sestavljen iz 2 QTL-jev: *Fob3b1* in *Fob3b2* (Prevoršek in sod., 2010).

2.3 UPORABA TRANSKRIPTOMIKE KOT ORODJE ZA POZICIJSKO KLONIRANJE QTL

Transkriptomiko v splošnem definiramo kot globalno genomsko analizo RNA prepisov, ki nastanejo v določenih okoliščinah in/ali v specifičnem celičnem tipu, z uporabo visoko zmogljivih metod, kot so mikromreže. Primerjava transkriptomov omogoča identifikacijo diferencialno izraženih genov v določeni celični populaciji ali kot odgovor na določen tretma (Transcriptomics, 2015).

Pozicijsko kloniranje: Tehnika za izolacijo in kloniranje gena v odsotnosti kakršne koli informacije o njegovem produktu. Opira se na genetsko analizo določene lastnosti v križanjih ali analizi rodovnikov z uporabo gosto posejanih genskih označevalcev, s katerimi poskušamo določiti vezano dedovanje s preučevano lastnostjo. Označevalci

skupaj z obstoječimi genskimi kartami nakažejo na katerem kromosomskem odseku se nahaja vzročni gen (Positional cloning, 2004).

2.3.1 Kartiranje QTL-jev in umestitev transkriptomike

Abiola in sod. (2003) so definirali kvantitativno lastnost kot lastnost z merljivimi fenotipskimi variantami. So multifaktorialne in pod vplivom več polimorfnihih genov in okoljskih pogojev. To pomeni, da na fenotip lahko vpliva en ali več QTL-jev, pri čemer ima vsak različno velik vpliv (Flint in Mott, 2001; Yalcin in sod., 2004). QTL so definirali kot genetsko lokacijo katere aleli vplivajo na spremembe fenotipa (Abiola in sod., 2003). DiPetrillo in sod. (2005) navajajo, da je analiza QTL-jev močna metoda za lokalizacijo genov, ki povzročajo bolezenska stanja, a identifikacija vzročnih genov ostaja problematična. Korstanje in Paigen (2002) trdita, da se je z razvojem statističnih orodij in mikromrež, analiza QTL-jev močno olajšala in pospešila. Abiola in sod. (2003) pravijo, da analiza QTL-jev poteka v treh korakih: (a) grobo kartiranje, (b) fino kartiranje in (c) identifikacija vzročnih genov. Pri grobem kartiranju dobimo segment v velikosti 10-30 centimorganov (v nadaljevanju cM). Uspešnost kartiranja je odvisna od dednosti lastnosti, genske narave lastnosti in števila genov, ki nanjo vplivajo. Resolucija kartiranja je odvisna tudi od števila rekombinacijskih dogodkov v populaciji. V tej fazi je pomembno, da se vzpostavi verodostojnost povezave med potencialnim QTL in fenotipsko lastnostjo. To dosežemo z (a) analizo permutacij, (b) določanjem mejnih LOD vrednosti in z uporabo (c) napake tipa 1. Dobljeno povezavo je potrebno potrditi. Ena možnost so nadaljna neodvisna križanja. Druga možnost vključuje vzpostavitev kongene linije, ki vsebuje preiskovani QTL. Tretja možnost je kratkoročna selektivna vzgoja. Sledi fino kartiranje. Tu preiskovani segment zmanjšamo na velikost 1-5cM. Da dosežemo tako dobro ločljivost potrebujemo še več rekombinacijskih dogodkov, kar posledično pomeni več živali. Potrebno je tudi bolj občutljivo fenotipiziranje. Mott in Flint (2001, 2005) pravita, da si z uporabo subkongenih linij močno olajšamo delo. Skupaj z Yalcin in sod. (2004) navajajo, da je smiselno uporabiti tudi zgodovinske rekombinante (angl. *historical recombinants*, v nadaljevanju HR), outbred linije in analizo haplotipov. Na voljo je tudi *in silico* analiza. Grupe in sod. (2001) so razvili program, ki predvidi povezanost med fenotipom in določenimi kromosomskimi odseki na podlagi podatkov genetskih označevalcev,

genotipov in fenotipov, ki so vpisani v bazah. Mott in sod. (2005), Darvasi A (2005) in Abiola in sod. (2003) navajajo, da so v tem koraku zelo uporabne tudi AIL (angl. *advanced intercross lines*), HS (angl. *heterogeneous stock*), RI (angl. *recombinant inbred*), ISCS (angl. *interval-specific congenic strain*) in outbred linije. Mott in sod. (2005) navaja, da so CSS-ji (angl. *chromosome substitution strains*), CC-ji (angl. *collaborative cross*) in YYC-ji (angl. *yin-yang crosses*) prav tako nepogrešljivi v tem koraku kartiranja. Zaradi strukturnih ohranitev med sesalci, si lahko pomagamo tudi s primerjalno genomiko (DiPetrillo in sod., 2005). S poravnavo ustreznih segmentov iz različnih vrst, dobimo regije prekrivanja in s tem zmanjšamo preiskovani segment. DiPetrillo in sod. (2005) prav tako navajajo, da si s CCA (angl. *combined cross analysis*) lahko še dodatno zožamo preiskovani odsek, brez potrebe po izvedbi dodatnih poskusov. Gre namreč za statistično metodo, ki uporabi že obstoječe podatke iz QTL križanj. Metoda predpostavi da je v vsakem križanju isti gen vzročni znotraj QTL-ja. Povezava večkratnih križanj pomeni več rekombinantnih dogodkov, kar vodi v boljšo resolucijo. Zadnji korak je identifikacija kandidatnih genov. DiPetrillo in sod. (2005) in Flint in sod. (2005) pravijo, da je to glavna, a hkrati najzahtevnejša stopnja. Pri čemer je potrebno vedeti, da moramo poznati odstotek vse fenotipske variabilnosti, ki jo pojasni preiskovani QTL. Večji kot je ta odstotek, lažje je identificirati vzročni gen. V resnici so ti odstotki zelo nizki. Metode, ki se jih poslužujemo so: (a) primerjava zaporedij, kjer iščemo polimorfizme v kodirajočih in regulatornih regijah, (b) študij funkcije gena in vključenost v primerne metabolne poti in/ali izražanje v primernih tkivih ali celičnih tipih, (c) *in vitro* funkcijske študije, (d) transgeneza zigot z velikimi vektroji, (e) uporaba knock-ins, kjer en alel zamenjamo z drugim, (f) test komplementacije, če so na voljo linije z izbitim QTL-jem ali nedelujočo obliko QTL-ja, (g) kemična mutageneza embriogenih celic, (h) pregled homologije med mišjim in človeškim genom, (i) kvantitativna komplementacija in (j) profiliranje genske ekspresije. S pomočjo transkriptomike si močno zmanjšamo število kandidatnih genov, vendar se moramo zavedati, da ima metoda tudi nekaj pomanjkljivosti (Flint in sod., 2005). Prvič, razlike v izražanju so lahko zelo zmerne, kar z mikromrežami niti ne zaznamo. Drugič, razlike v izražanju genov niso vedno znak QTL-ja. Tretjič, razlike v ekspresiji so lahko omejene na določeno razvojno stopnjo in/ali tkiva. Preiskovanje ekspresijskih baz je prav tako zelo učinkovito. DiPetrillo in sod. (2005) navajajo kot zelo uporabne naslednje

baze: (a) ExQuest preiskuje baze izraženih zaporedij s podatki o tkivnem in razvojnem izražanju genov, (b) SymAtlas, vsebuje neposredne meritve genskega izražanja pridobljene z mikromrežami, (c) The Gene Expression Omnibus, (d) ArrayExpress, (e) The Institute for Genome Research. Slednji so primerni za identifikacijo genov, ki so različno izraženi med različnimi linijami. Schadt E (2006) opisuje novo integrativno genomsko strategijo za identifikacijo genov kompleksnih lastnosti. Genske lokuse, ki so povezani z boleznimi, je označil kot motnje v biološkem sistemu, ki povzročijo spremembe v genomskem, transkriptomskem, proteomskem in/ali signalnem omrežju in na ta način povečajo dovzetnost za bolezni. Predvideva, da mutacije v zaporedju gena oz. sprememba v izražanju gena znotraj QTL-ja, vpliva na izražanje gena v drugem QTL-ju, kar povzroči določen fenotip. Uvedel je izraz cis- in trans-delujoči ekspresijski QTL-ji. Gre za integracijo podatkov iz genotipiziranja, molekularnega profiliranja in kliničnih podatkov. Ena od integrativnih metod je uporaba genskih ko-izražajočih omrežij (Ghazalpour in sod., 2006). Na podlagi podatkov izražanja celotnega genoma segregirajočih populacij se sestavi gensko ko-izražajoče omrežje. Določijo se moduli v omrežju, ki imajo pomembno biokemijsko in fiziološko vlogo. Nato se določijo genski odseki, ki regulirajo izražanje modulov. Sledi integracija omrežij z genetskimi podatki z namenom določitve biološke pomembnosti modulnih genov.

2.3.2 Primeri

Flint in Mott (2001) navajata, da je zaznavanje QTL uspešno le pri vrstah, ki jih lahko inbridiramo. Do ločevanja QTL-jev pride, ko dve inbridirani vrsti križamo in njune potomce parimo med sabo. Nadalje navajata, da se je potrebno zavedati, da vsako inbridno križanje predstavlja le del genetske variabilnosti izvirne populacije. Kar pomeni, če je prišlo do segregacije QTL-ja pri križanju sevov A in B, ne pomeni da se bo enako zgodilo pri križanju sevov C in D. Zaznavanje QTL-ja prav tako ne kartira gena, ampak genetski učinek, ki je lahko sestavljen iz večih povezanih genov. Funkcijsko povezani geni vplivajo na isti fenotip. Aleli znotraj QTL-ja tako lahko delujejo skupaj in ojačajo fenotip ali pa se med seboj izničijo. Metode za zaznavanje QTL-jev prav tako ne zaznajo interakcij med lokusi. Predpogoj za dosego odlične resolucije je vzpostavitev ustreznih mišjih linij (Mott

in Flint, 2008). Yalcin in sod. (2004) so po zgledu Flint in Mott (2001) uporabili HS linijo. Pri HS namreč izkoriščamo veliko število rekombinacij med lokusi, ki so se kopičile preko več generacij. S tem so rešili potrebe po večjem številu rekombinant in hkrati zmanjšali število osebkov, ki so jih potrebovali za izvedbo poskusa. Na ta način so prišli do kavzalnega gena *Rgs2*, ki je odgovoren za uravnavanje tesnobe/nelagodja pri miših.

S finim kartiranjem QTL oz. principi pozicijskega kloniranja so Prevoršek in sod. (2010) prišli do 4 možnih vzročnih genov: *Ly6a*, *Dgat1*, *Gpihbp1* in *Rhpn1*. Najprej so razvili različne kongene linije. Tu so si pomagali z z-označevalci olajšanim izločanjem QTL (angl. *marker-assisted elimination of QTLs*). Sledil je pregled kromosoma 15 z mikrosateliti in fenotipiziranje. Nato so izvedli bioinformatične analize. S primerjalno genomiko, kjer so primerjali mišje QTL-je za debelost s prašičjimi, kokošnjimi, govejimi in človeškimi, so dobili regije, ki se prekrivajo. Zaradi ortologije segmentov, so predpostavili, da se v prekrivajočem delu mišjega QTL-ja nahaja vzročni gen. Z intervalno specifično analizo haplotipov zožanega *Fob3b* intervala in bioinformatičnimi analizami so dobili nekaj kandidatnih genov. V BioGPS ekspresijski bazi podatkov so dobili podatke o izražanju genov, ki so bili pridobljeni z neposrednim merjenjem izražanja genov z mikromrežami.

Aitman in sod. (1999) so z uporabo kongenih linij in mikromrež pri podganah uspešno identificirali gen *Cd36*, ki vpliva na inzulinsko rezistenco in kartira v bližino QTL-ja na kromosomu 4. Primerjali so razlike v izražanju genov med kongeno podganjo linijo za kromosom 4 in inbridiranima starševskima linijama. Fluorescenčno označeno cDNA, pripravljeno iz maščobnega tkiva, so hibridizirali na DNA mikromreže, ki so vsebovale pribl. 10 000 podganjih cDNA. Podgane, ki so imele težave s previsokim pritiskom so imele izražanje gena *Cd36* znižano za 90%. Preučevanje razlik ekspresije je Ferraro in sod. (2004) omogočilo identifikacijo gena *Kcnj10*, ki se nahaja v lokusu odgovornem za podvrženost napadom. Paigen in Korstanje (2002) ugotavljata, da bo dostopnost mikromrež močno pospešila in olajšala identifikacijo QTL genov, saj so razlike v izražanju genov med dvema sevoma zelo redke. Stylianou in sod. (2004a) pa navajajo, da so se z analizo razlik izražanja genov znotraj QTL regije in statistično analizo skupine genov znotraj metabolnih poti, izognili večkratnim statističnim analizam oznak izraženegega

zaporedja (angl. *expressed sequence tag*, v nadaljevanju EST). S tem načinom so odkrili, da sta med F linijo in kongenimi *Fob3b* linijami, diferencialno izraženi biosintezna pot holesterola in geni v glikolizni poti. Rezultate so preverili z Northern analizo in verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (angl. *real-time polymerase chain reaction* ali *quantitative polymerase chain reaction*, v nadaljevanju RT-PCR oz. q-PCR). Tako so dobili dva kandidatna gena za nadaljno analizo. *Tst* (angl. *thiosulfate transferase*) mapira zunaj 95% intervala zaupanja za *Fob3b*, medtem ko se *Sqle* nahaja znotraj tega intervala. S tem so dodatno potrdili rezultate, ki so jih 2004 objavili Stylianou in sod. (2004a), ko so *Fob3a* in *Fob3b* pregledali za potencialne kandidatne gene. Ker je *Sqle* vključen v biosintezno pot holesterola, so se odločili, da je smiselno preveriti izražanje ostalih genov v tej poti. 8 od 13 encimov v tej poti je bilo v F liniji prekomerno izraženih.

Karp in sod. (2000) so s študijem genetskega izražanja identificiral komplementarni faktor 5 kot vzrok za podvrženost za astmo. *Alox15* je bil na podlagi transkriptomike predlagan kot vzrok za razlike v kostni masi (Klein in sod., 2004). Christians in sod. (2006) so z uporabo ekspresijskih mikromrež in študije različnega izražanja PAPP2 v različnih tkivih. Našli so 14 nesinonimnih SNP-jev, ki vplivajo na aktivnost prevedenega proteina. Z merjenjem nivoja IGFBP-5, ki je tarča PAPP2 in genotipskimi podatki, so zaključili, da je PAPP2 vzročni gen QTL-ja.

Stylianou in sod. (2008) so s transkriptomsko analizo jeter ter uporabo, SNP-jev, analize haplotipov, masno spektrometrijo ter western analizo in uporabo ekspresijskih baz močno zmanjšali število možnih vzročnih genov znotraj 9 QTL-jev. Iz 943 identificiranih proteinov na 10. Znotraj 3 QTL-jev povezanih z debelostjo in telesno težo so našli 5 možnih vzročnih genov: (a) *Pparg*, (b) *Rassf4*, (c) *Adipor2*, (d) *Pgc* in (e) *Atrnl1*.

Z integrativnim pristopom in uporabo ko-izražajočih omrežij so Ghazalpour in sod. (2006) našli dva ključnih proteinov, ki regulirata adipogenezo in sta povezana z debelostjo: PPAR- γ in BMP2. Stem pristopom so odkrili tudi gene *Cyp2c37*, *Cyp2c40*, *Cyp2d10*, *Cyp4b1* in *Ehhadh*, ki se nahajajo v poti metabolizma maščobnih kislin in so bili povezani z nalaganjem maščevja. Schadt E (2006) je z integrativnim pristopom kartiral *Insig2* gen

kot ključnega v poti holesterola in je povezan tako z nalaganjem maščevja kot z nivojem inzulina. Na enak način so identificirali *Alox5* kot gen za podvrženost k debelosti, spremembi nivoja holesterola in spremembi kostne gostote (Mehrabian in sod., 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 LABORATORIJSKE MIŠI, KRIŽANJA, VZORČENJE TKIV

Linija, ki smo jo uporabili pri poskusu, izhaja iz laboratorija v Edinburghu na Škotskem. Izhodiščno populacijo miši so razvili s trosmernim križanjem med dvema inbridiranima linijama, CBA in JU, in genetsko heterogeno linijo CFLP. Populacijo pridobljenih miši so označili kot generacija 0. Na tej populaciji je selekcija potekala v treh med sabo ločenih poskusih. V poskusu A (apetit) so selekcionirali miši glede na porabo krme, v poskusu F (debelost) glede na delež telesnih maščob in v poskusu P (protein) glede na telesno maso pri 10-ih tednih starosti (Sharp in sod., 1984). Za vsako lastnost so selekcionirali tri linije. Na dveh linijah je potekala divergentna selekcija, tretja linija je bila neselekcionirana in jim je služila za kontrolo. V kontrolni liniji je potekalo parjenje med osebki izhodiščne populacije naključno. Za vsako lastnost so imeli 3 ponovitvene linije. To pomeni, da so selekcionirali 27 linij (3x3 A linije + 3x3 Linije F + 3x3 P linije). Naše miši izvirajo iz linije F, zato se nanjo tudi osredotočamo. Do osme generacije je vsako generacijo sestavljalo 16 paritev. V naslednjih generacijah pa le še osem paritev. Mladiči so bili odstavljeni, ko so dosegli starost 21 dni. Krmljeni so bili *ad libitum* s krmo Rat and Mouse No. 1 Expanded Maintenance Diet (14,8 % SB, 13,1 kJ/kg metabolne E). Imeli so 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Temperatura zraka v koloniji je bila 21°C (Sharp in sod., 1984).

V liniji F so miši odbirali glede na odstotek gonadalne maščobe v telesu. Iz podatka o odstotku gonadalne maščobe so izračunali odstotek skupne maščobe v telesu. Korelacija med tema dvema podatkoma znaša kar 0,9.

Pri osmih tednih starosti so po štiri samce iz gnezda parili. Potomce, ki so imeli v telesu zelo visok oz. nizek odstotek telesne maščobe, so obdržali za naslednjo generacijo paritev. Dva tedna po paritvi so samce usmrtili s cervikalno dislokacijo, jih stehali in secirali. V kontrolni liniji so parili enega samca na gnezdo za vzdrževanje kontrolne linije. Secirali pa so dva samca na gnezdo pri desetih tednih starosti. (Sharp in sod., 1984). Po 11 generacijah divergentne selekcije se je pri miših selekcioniranih na višji odstotek gonadalne maščobe

odstotek povečal za 36 v primerjavi s kontrolno linijo. Pri miših, ki so bile selekcionirane na nižjo odstotek gonadalne maščobe pa se je odstotek znižal za 44 v primerjavi s kontrolno linijo (Sharp in sod., 1984).

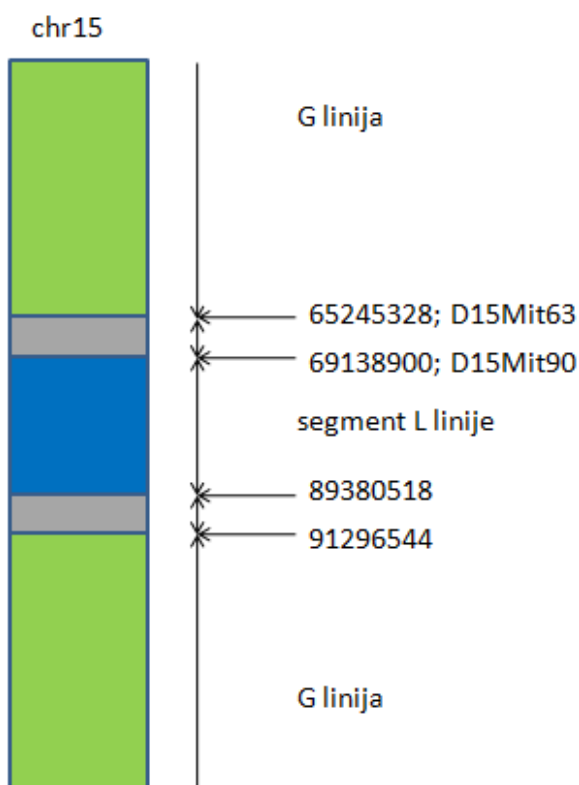
Buenger in Hill (1999) poročata o nadaljnjem poteku dvosmerne selekcije do 53. generacije. V tem času se je selekcijski kriterij za odbiranje živali spremenil. Naslednjih 20 generacij so odbirali glede na povečano ali zmanjšano vsebnost maščobe. Določili so jo s primerjavo mase gonadalne maščobe s celotno telesno maso 10 tednov starih samcev (razmerje teh dveh vrednosti). Tako so dobili debelo (EF oz. F) in suho (EL oz. L) linijo. Po 20-ih generacijah so spremenili selekcijski kriterij in začeli odbirati 14 tednov stare samce glede na odstotek telesnih maščob, ki so ga določili z metodo sušenja zamrznjenih vzorcev (Hastings in Hill, 1989; cit. po Bünger in Hill, 1999). Sledilo je še 33 generacij dvosmerne selekcije z novim selekcijskim kriterijem. V tem času se je delež maščob pri 14 tednov starih samcih v F linij povečal na 22%. Pri liniji L pa se je v tem času znižal na 4%. V kontrolni populaciji je delež maščob po 53-generacijah znašal 10% (Bünger in Hill, 1999).

V 53. generaciji so miši iz F in L linije križali med sabo. F1 osebke so nato uporabili za tvorbo F2 generacije. Z uporabo mikrosatelitskih genetskih označevalcev in LOD (angl. *logarithm of odds ratio*) so določili položaj kvantitativnih lokusov, ki značilno vplivajo na nalaganje maščevja. Izkazalo se je, da so mikrosateliti polimorfni med linijama F in L. Ugotovili so tudi, da se kvantitativni lokusi s statistično značilnim vplivom pri liniji F in L nahajajo na kromosomih 2, 12, 15 in X. Največji vpliv pa imata kvantitativna lokusa na 12. in 15. kromosomu, ki so ju poimenovali *Fob2* in *Fob3* (Horvat in sod., 2000).

F, L in nekatere kongene linije so leta 2003 pripeljali z Univerze v Edinburghu na Univerzo v Ljubljani. Najprej v mišjo kolonijo na Veterinarski fakulteti, aprila 2004 pa v mišjo kolonijo na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete.

Kongena linija 15FHG (oznaka G) nosi genetsko ozadje linije F, na kromosomu 15 ima segment z *Fob3*, ki izhaja iz linije L. Do mesta 65245328 (mikrosatelit *D15Mit63*) je

genetsko ozadje linije F. Sledi t.i. siva cona, kjer ne poznamo porekla. Nahaja se med mestom 69138786 in 69138900 (mikrosatelit *D15Mit90*). Gre za odsek med markerjem, ki izhaja iz F linije in markerjem, ki izhaja iz L linije. Sledi segment iz L linije, ki se nahaja med mestom 69138900 in 89380518. Med mestom 89380518 in 91296544 je zopet siva cona. Od mesta 91296544 naprej se nadaljuje genetsko ozadje F linije. V naš poskus smo vključili segment iz L linije in obe sivi coni. Sivi coni smo vključili zato, ker ne poznamo njenega porekla.



Slika 1: Sestava kromosoma 15 pri kongeni liniji G

Kongeno linijo G so križali z linijo F. Tako so pridobili F1 generacijo kjer so vsi potomci heterozigoti (FL). Se pravi, da so imeli na enem kromosomu 15 segment *Fob3* iz L linije, na drugem kromosomu 15 pa segment *Fob3* od F linije. Nato so te osebkke križali med sabo in pridobili F2 generacijo, ki so jo sestavljali vsi 3 genotipi (FF, FL in LL). Za naš poskus smo uporabili tkiva 13 samic iz F2 generacije. Analiza je bila narejena na možganih, gonadalni maščobi in jetrih. Samice smo izbrali zato, ker so predhodni rezultati pokazali,

da je variabilnost fenotipskih lastnosti povezanih z debelostjo pogosto manjša kot pri samcih.

Tkiva so bila po odvzemu zamrznjena v tekočem dušiku in nato shranjena v zamrzovalni skrinji na -84°C (Prevoršek, 2010). Uporabili smo tkiva 13 samic. Genotipsko smo imeli 3 vzorce gonadalnega maščobnega tkiva genotipa FF in 3 vzorce maščobnega tkiva genotipa LL. Pri jetrih smo imeli po 4 genotipe LL in 4 FF. 4 vzorci iz možgan so imeli genotip FF in 5 LL, kot je prikazano v Preglednici 1. Skupno smo naredili 23 mikromrež.

Preglednica 1: Genotipi vzorcev

Tkivo	Genotip	Številka vzorca
Maščobno tkivo	FF	1265
		1391
		1401
	LL	1325
		1331
		1396
Jetra	FF	1389
		1399
		1851
		1857
	LL	1564
		1574
		1863
		1869
Možgani	FF	1390
		1400
		1853
		1859
	LL	1395
		1565
		1575
		1865
		1871

3.2 IZOLACIJA RNA

Tkiva iz katerih smo izolirali RNA, so bila shranjena v zamrzovalni skrinji na -84° . Tkivo smo prenesli v TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, ZDA), v večji volumen, kot ga priporoča proizvajalec (Preglednica 2).

Preglednica 2: Razmerje med TRIzolom in tkivom

Tkivo	Razmerje TRIzol/tkivo
Jetra	100 μ l/mg
Možgani	20 μ l/mg
Maščobno tkivo	50 μ l/mg

Pri jetrih smo uporabili samo četrtino vzorca prednjega režnja jeter. Možgane smo homogenizirali cele, da smo prišli do povprečnega transkriptoma. Pri gonadni maščobi pa smo uporabili cele vzorce zato, da smo dobili zadostno količino RNA. Masa uporabljenih vzorcev je prikazana v Preglednici 3.

Preglednica 3: Masa vzorcev

Tkivo (št. vzorca)		Masa (mg)
Jetra	1389	101,8
	1399	51,5
	1564	124
	1574	78
	1851	100,8
	1857	78,5
	1863	81,7
	1869	91,5
Možgani	1390	423
	1395	313,5
	1400	362,5
	1565	411,9

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 3. Masa vzorcev.

Tkivo (št. vzorca)		Masa (mg)
Možgani	1575	366,3
	1853	425,8
	1859	398,6
	1865	421,6
	1871	402,0
Maščobno tkivo	1265	174,3
	1325	337,1
	1331	127,1
	1391	219,8
	1396	137,2
	1401	199,2

Tkivo je bilo treba pred homogenizacijo stehtati in hitro prenesti v TRIzol, da vmes ni odmrznilo, sicer bi RNaze razgradile vso RNA. Sledila je homogenizacija s homogenizatorjem Ultra-Turrax T25 (Janke&Kunkel Ika-Labortechnik, Staufen, Nemčija). Homogenizacija je trajala do 60 sekund na 20500 obratih na minuto. Po 1 ml homogenata smo prenesli v 1,5 ml epico in nadaljevali z ustreznim protokolom. Jetra so bila izolirana po protokolu, ki je bil priložen TRIzolnem reagentu, možgani in gonadalna maščoba pa s komercialnim kitom za tkiva bogata z lipidi RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Duesseldorf, Nemčija). Pelet RNA jeter smo raztopili v 100 µl DEPC-H₂O in inkubirali na 65°C 5 min, da se je popolnoma raztopil. Pri možganih smo RNA eluirali v 2×50 µl RNaze-free Water, pri maščobi pa v 1×30 µl, pri čemer smo za drugo elucijo uporabili isti eluat. Pri maščobi smo morali RNA skoncentrirati v manjšem volumnu, zaradi nižje vsebnosti RNA. To je bilo potrebno zato, da smo lahko na Nanodrop 1000 Spectrophotometeru (Thermo Scientific, Wilmington, ZDA) pomerili koncentracijo in razmerji 260/280 in 260/230 (aparatus ima spodnjo mejo detekcije 50 ng/µl RNA) in da smo imeli dovolj RNA za čipe (rabimo 100 ng v prbl. 3 µl). Po eluciji smo od vsakega vzorca prenesli 10 µl v novo 0,5 ml epico za preverjanje kakovosti in količine RNA. Nato smo vse

vzorci zamrznili v zamrzovalni skrinji na -84°C . V termoizolacijski posodi s tekočim dušikom smo vzorce prenesli na Center za funkcijsko genomiko in bio-čipe v Ljubljani (CFGBC, <http://cf gbc.mf.uni-lj.si/>). Tu smo vzorcem na Nanodropu s programom ND-1000 V.3.3.0 pomerili koncentracijo in razmerji 260/280 in 260/230. Nato smo z Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA) in Agilent RNA 6000 Nano Kitom (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA) izmerili RIN-e vzorcev. Izmerjene vrednosti so v Preglednici 4.

Preglednica 4: Merjeni parametri RNA vzorcev in njihove vrednosti

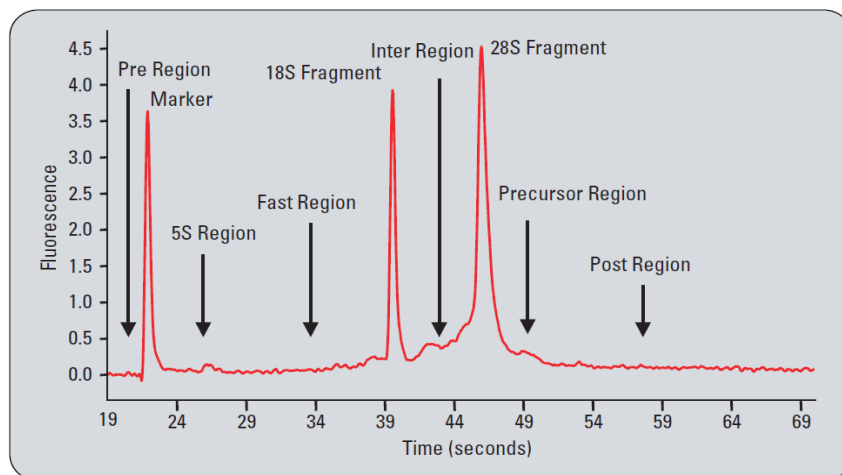
Tkivo (št. vzorca)		Koncentracija (ng/ μl)	260/280	260/230	RIN
Jetra	1389	1116,18	1,91	2,07	8,50
	1399	338,59	1,84	2,08	8,90
	1564	493,80	2,07	2,27	8,70
	1574	578,26	2,03	2,24	6,90
	1851	770,31	2,03	2,28	9
	1857	205,76	2,07	2,48	9,10
	1863	437,09	2,02	2,25	9,10
	1869	504,11	2,03	2,30	9,10
Maščobno tkivo	1265	67,56	2,15	1,72	8,30
	1325	43,27	2,09	1,62	8
	1331	69,77	2,06	1,80	8,20
	1391	57,03	2,00	1,70	8,60
	1396	58,49	2,10	1,83	8,60
	1401	47,32	2,12	1,65	9,50
Možgani	1390	377,42	2,05	2,25	9,30
	1395	386,16	2,04	2,12	9
	1400	383,72	2,01	2,28	9,40
	1565	442,83	2,09	2,26	8,80
	1575	417,92	2,09	2,25	8,90
	1853	541,6	2,02	2,36	9

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 4. Merjeni parametri RNA vzorcev in njihove vrednosti

Tkivo (št. vzorca)		Koncentracija (ng/ μ l)	260/280	260/230	RIN
Možgani	1859	416,32	2,06	2,29	9
	1865	550,05	2,03	2,32	9
	1871	408,91	2,03	2,21	9,20

Razmerje 260/280 nam pove ali je v vzorcu prisotnih še kaj proteinov (pri 280nm absorbira benzenov obroč amino kislin). Medtem ko nam razmerje 260/230 pove, če je v vzorcu prisotnega še kaj fenola. Le-ta absorbira pri 230 nm. Fenol vnesemo z uporabo TRIZola. Njegova prisotnost v izolirani RNA moti nadaljnje poskuse, saj je inhibitor številnih encimov. RIN (angl. *RNA Integrity Number*) nam pove stopnjo razgrajenosti RNA. Vrednosti imajo razpon od 1 do 10. Pri čemer 1 pomeni popolnoma razgrajeno RNA in 10 nerazgrajeno RNA. Za določanje RIN-a so razvili poseben algoritem, ki upošteva intenziteto fluorescence različnih regij in vrhov na elektroferogramu, kot je prikazano na Sliki 2.



Slika 2: Prikaz regij in vrhov na elektroferogramu, ki se jih upošteva v algoritmu za izračunu RIN-a (RNA integrity ..., 2004)

3.3 PREVERJANJE IZVORA RNA

Ker pri jemanju vzorcev ali kasnejših postopkih lahko pride do napak oz. zamenjav je koristno, da se ponovno preveri genotip končnega vzorca RNA.

Genotipizirali smo kar RNA vzorce, ker se je izkazalo, da vsebujejo dovolj razgrajene DNA za izvedbo PCR. Izbrali smo si dva mikrosatelitska genetska označevalca. *D15Mit68*, ki se nahaja znotraj segmenta G in *D15Mit63*, ki se nahaja zunaj segmenta G. Z mikrosatelitom *D15Mit68* določimo genotip segmenta G (FF, FL ali LL). Z uporabo *D15Mit63*, ki je izven segmenta G pa potrdimo, da imajo vsi vzorci enak genotip in sicer FF.

3.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction, PCR)

PCR je metoda, ki nam omogoča hitro pomnoževanje DNA *in vitro*. Poteka v treh korakih:

1. Denaturacija matrične DNA pri temperaturi 92-95°C.
2. Prileganje začetnih oligonukleotidov. Temperaturo znižamo pod temperaturo tališča (T_m) obeh začetnih oligonukleotidov.
3. Sinteza komplementarne verige. Temperaturo prilagodimo glede na to katero DNA polimerazo uporabljamo (za Taq polimerazo je to 72°C).

V reakcijsko mešanico za izvedbo PCR-ja moramo zmešati: DNA, začetne oligonukleotide, pufer, $MgCl_2$, deoksiribonukleozid-trifosfate (dNTP-ji; dATP, dTTP, dCTP, dGTP), vodo in encim. Začetna oligonukleotida (dolga prbl. 15-30 nukleotidov in z GC vsebnostjo 40-60%) sta komplementarna matrični DNA in se nanjo vežeta. To nam omogoči pomnožitev fragmenta med njima z izbrano DNA polimerazo. $MgCl_2$ je pomemben, ker Mg^{2+} tvori kompleks z začetnimi oligonukleotidi, dNTP-ji in matrično DNA. Pufer ustvari optimalno okolje za delovanje encima, ki uporablja dNTP-je kot gradnike za novo nastajajočo verigo DNA.

Reakcijsko mešanico smo pripravili v volumnu 10 μ l, od tega je bilo 5 μ l PCR mešanice in 5 μ l ustreznega DNA vzorca. Sestava reakcijske mešanice je opisana v Preglednici 5. Uporabili smo kit od Fermentasa (Fermentas International Inc., Burlington, Kanada).

Preglednica 5: Sestava PCR mešanice

Končna koncentracija reagentov	V reagenta /vzorec (µl)	V reagenta /25 vzorcev (µl)
Bi-deionizirana voda (Sigma, St. Louis, ZDA)	1,42	35,5
1× Taq pufer (Fermentas, Burlington, Kanada)	1,00	25,0
200µM dNTP (mešanica dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	1,00	25,0
2,5mM MgCl ₂ (Fermentas, Burlington, Kanada)	1,00	25,0
0,25 uM 5' začetni oligonukleotid (Biotech)*	0,25	6,25
0,25 uM 3' začetni oligonukleotid (Biotech)*	0,25	6,25
0,4 U Ampli Taq polimeraza (Fermentas, Burlington, Kanada)	0,08	2
Skupaj	5	125

Za vsak mikrosatelit smo naredili svojo reakcijsko mešanico z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi.

V Preglednici 6 je naveden genetski in fizični položaj mikrosatelitov, ki smo jih uporabili za genotipizacijo.

Preglednica 6: Genetski in fizični položaj uporabljenih mikrosatelitov za genotipizacijo

Ime markerja	Položaj	
	Genetski (cM) ¹	Fizični (bp) ²
<i>D15Mit68</i>	44,1	76910182 - 76910293
<i>D15Mit63</i>	29,2	65245184 - 65245328

(¹ Mouse genome browser, 2015)

(² Ensembl genome browser, 2015)

V Preglednici 7 so navedena zaporedja levih in desnih začetnih oligonukleotidov mikrosatelitov, ki smo jih uporabili za genotipizacijo.

Preglednica 7: Zaporedja levega in desnega začetnega oligonukleotida mikrosatelitov, ki smo ju uporabili za genotipizacijo (Mouse genome browser, 2015)

Ime markerja	Zaporedje	
	Levi začetni oligonukleotid	Desni začetni oligonukleotid
<i>D15Mit68</i>	TTCCATGTGAGTTCCAAGCA	GAACTGCCATTCAGAATATTTGG
<i>D15Mit63</i>	ACCAATGATCGTTGATGCCT	TAATTTCACACTAGCAAAACCAA

Vse reagente in vzorce, z izjemo Taq polimeraze, smo iz zamrzovalnika prenesli na led, da so se odtalili. Preden smo jih uporabili, smo jih centrifugirali. Nato smo za vsak mikrosatelit posebej v epici pripravili reakcijsko mešanico. Reakcijska mešanica je sestavljena iz vseh komponent, ki so navedene v Preglednici 7, brez DNA. Encim Taq polimerazo smo dodali nazadnje. Do uporabe je bil encim shranjen na - 20°C, kamor smo ga vrnil. Na ohlajeno ploščo (-20°C) smo položili mikrotitrsko ploščo in v vdolbinice nanесли PCR mešanico. Pri tem smo uporabili pipetne nastavke s filtrom, da smo se izognili kontaminaciji. Sledil je nanos vzorcev v ustrezno vdolbinico. Za vsak vzorec smo uporabili drug pipetni nastavek. Na koncu smo v vsako vdolbinico nanесли še kapljico mineralnega olja, ki prepreči izhlapevanje reakcijske mešanice. Mikrotitrsko ploščo smo prekrili s prozorno folijo in dali v PCR aparat. Uporabili smo mikroprocesorsko voden termostatski PCT-100 (MJ Research, Waltham, ZDA). Glede na temperature v posameznih fazah reakcije (optimizirano za izbrana mikrosatelita) smo uporabili program opisan v Preglednici 8.

Preglednica 8: Potek programov za PCR reakcijo

Korak	Temperatura (°C)	Čas (min)
1	95	3
2	95	1

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 8. Potek programov za PCR reakcijo.

Korak	Temperatura (°C)	Čas (min)
3	62	1
4	72	1
5	5- krat nazaj na korak 2	/
6	94	0,25
7	58	0,5
8	72	0,5
9	30- krat nazaj na korak 6	/
10	4	/

Po končani reakciji smo na mikrotitrsko ploščo nanesti še nanašalni pufer (angl. *loading buffer*). Nanesli smo po 7 µl na vdolbinico.

Da smo lahko razbrali genotipe vzorcev smo uporabili kontrole. In sicer DNA vzorce F in L linije. Prvo kontrolo predstavlja homozigot FF in drugo homozigot LL. Kot negativno kontrolo smo uporabili MQ-vodo.

3.3.2 Agarozna gelska elektroforeza

Elektroforeza je metoda, ki se je poslužujemo, ko želimo ločiti fragmente DNA, ki so različno dolgi. Obstajata dve različici in sicer agarozna in poliakrilamidna. Poliakrilamidne se poslužujemo kadar ločujemo manjše fragmente DNA (od 5 do 500 baznih parov). Z agarozno pa lahko ločujemo tudi daljše fragmente (od 100 do 50.000 baznih parov).

Pri elektroforezi moramo upoštevati tudi vse faktorje, ki vplivajo na hitrost potovanja DNA molekule skozi gel.

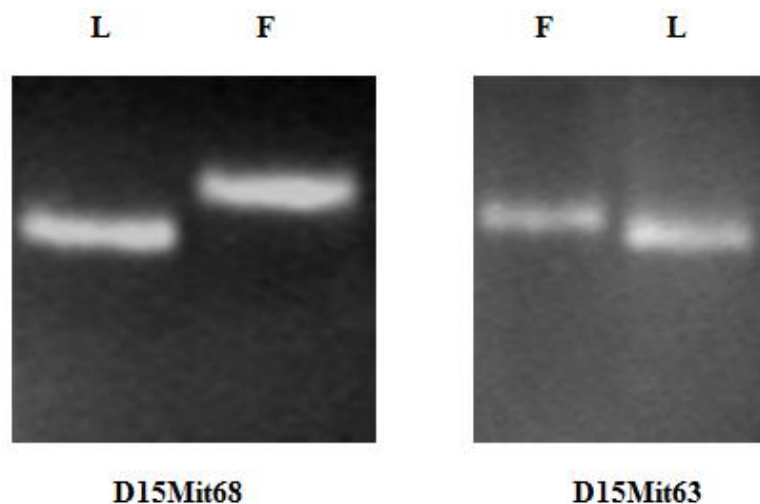
Uporabili smo elektroforetski aparat pri katerem sta elektrodi 44 cm narazen in gele velikosti 25 krat 32 cm. Kot elektroforetski pufer smo uporabili 0,5- kratni TBE, za

njegovo pripravo pa smo potrebovali 10- kratni TBE. Njuna priprava je opisana v Preglednici 9.

Preglednica 9: Priprava 10- kratnega in 0,5- kratnega TBE

10- kratni TBE	
Reagent	Količina
0,5 M TRIS	60,50 g
10 nM EDTA	3,72 g
0,5 M borova kislina	30,85 g
Deionizirana voda	Do 1000 ml
0,5- kratni TBE	
10- kratni TBE	50 ml
Etidijev bromid	20 μ l
Deionizirana voda	950 ml

Sam gel smo pripravili tako, da smo ustrezno količino agaroze raztopili v 0,5- kratnem TBE in nato segrevali do vrelišča. Segreto agarozo smo nato vlili v kalupe z glavnički in počakali, da se strdi. Glavničke smo uporabili zato, da smo oblikovali žepke za nanos vzorcev v gel. Gel smo nato prenesli v elektroforezno kad v kateri je bil pufer. Če gel ni bil v celoti prekrit s pufrom smo ga naknadno dolili. Sledil je nanos vzorcev in kontrol z multikanalno pipeto. Potovanje vzorcev je potekalo 4 ure na 165 V. Na koncu smo gele pregledali in fotografirali v transiluminatorju Gel Doc 1000 in rezultate shranili kot *.tif datoteke.



Slika 3: Genetski označevalci, ki smo jih uporabili za potrditev genotipov
 F= FLI linija (debeli), L= FHI linija (suha)

3.4 MIKROMREŽE – HIBRIDIZACIJA IN SKENIRANJE

Vso delo s čipi je potekalo na CFGBC (Center za funkcijsko genomiko in bio-čipe).

V tem poskusu smo uporabili mikromreže Affymetrix, in sicer GeneChip® Mouse 1.0 ST Array System (Affymetrix, Santa Clara, ZDA), ki pokriva cel genom miši. Vsebuje 28.853 dobro anotiranih genov, 770.317 sond in 25-merne oligonukleotide razporejene preko celotnega prepisa. Sond pri tem tipu mikromreže je približno 27 na gen in so enakomerno razporejene po celotni dolžini gena. To nam daje celotno in bolj natančno sliko genske ekspresije. Sonde so nanošene na stekleno podlago in sintetizirane fotolitografsko. Ta tip mikromrež omogoča analizo diferencialne genske ekspresije in alternativnega izrezovanja.

Ena mikromreža velikosti 1,28cm×1,28cm je sestavljena iz 6.5 milijona lokacij. Na vsaki lokaciji je več milijonov sond enega gena. Poleg tega se en gen ponovi na več lokacijah mikromreže. Gene 1.0 ST Array System sestavljajo sonde s popolnim ujemanjem na katere hibridizirajo smiselne tarče, ki so RNA prepisi smiselne verige. Za določanje ozadja je v uporabi set približno 17.000 generičnih sond (antigenomski set). V bistvu gre tu za

pozitivne in negativne kontrole. Pozitivne kontrole so sonde homologne eksonom konstitutivno izraženih genov, negativne kontrole pa so sonde homologne intronom konstitutivno izraženih genov mišjega genoma. Tehnično pravilno izvedbo protokola se preverja s standardnimi poly-A kontrolami in hibridizacijskimi kontrolami. Poly-A kontrole sestavljajo modificirani geni *B. subtilis* dap, lys, phe in thr, ki so jim dodali poly-A rep in klonirali v pBluescript in služijo predvsem za preverjanje ali je prišlo do sinteze cDNA. Hibridizacijske kontrole pa so geni bioB, bioC in bioD iz *E. coli*, ki so vključeni v sintezno pot biotina in gen cre iz bakteriofaga P1. Poleg teh kontrol so vključene še sonde s 5' konca in sredine prepisa, ki služijo preverjanju integritete začetne RNA in preverjanju učinkovitosti sinteze prve verige cDNA. Intenziteta signalov teh sond je nižja od intenzitete signalov sond s 3' konca prepisa kar je posledica smeri sinteze cDNA med reverzno transkripcijo. Kitu so dodane tudi Oligo B2 kontrole. Gre za sintetični oligonukleotid, ki omogoči poravnavo mreže za analizo slike.

Za ta tip mikromreže smo uporabili protokol, kjer je potrebno imeti 100 ng izhodiščne RNA (po priporočilih proizvajalca). Protokol, ki smo ga uporabili najdemo na uradni strani od Affymetrix in se nahaja pod naslovom User Manual GeneChip Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay. Protokolu smo sledili v celoti, le korak redukcije ribosomalne RNA (rRNA) smo izpustili. Ta korak je namreč namenjen odstranjevanju rRNA v vzorcu kar minimalizira ozadje, poveča občutljivost in specifičnost detekcije. Ta korak se izvrši, ko delamo z GeneChip® Exon 1.0. ST Array (Affymetrix, Santa Clara, ZDA). Posebnost tega protokola je uporaba naključnih primerjev. Gre za heksamerne sekvence, ki jim je dodana T7 promotorska sekvenca. Ta omogoči sintezo dvovijačne cDNA (ds-cDNA), ki se nato uporabi za sintezo in amplifikacijo protismiselne cRNA s T7 polimerazo. V drugem ciklu cDNA sinteze se naključni heksameri uporabijo za prepis protismiselne cRNA v enovijačno cDNA (ss-cDNA) v smiselni orientaciji. Za fragmentacijo ss-cDNA v smiselni orientaciji se uporabi dUTP, ki se vgradijo v DNA v drugem ciklu sinteze cDNA. cDNA z vgrajenimi dUTP se nato izpostavi mešanici dveh encimov: uracil DNA glikozilazi (UDG) in apurinski/apirimidinski endonukleazi 1 (APE1). UDG specifično prepozna vgrajene dUTP in jih izrežeta iz verige, APE1 pa nato cepi fosfodiestersko ogrodje. Dolžina fragmentov se giblje med 20 do 200 nukleotidov.

Večina fragmentov je dolga od 40 do 70 nukleotidov. DNA se označi s terminalno dioksinukleotidil transferazo (TdT) z Affymetrix® proprietary DNA Labeling Reagent, ki je kovalentno vezan na biotin. Gre za biotin alonamid trifosfat.

Eksperimentalni postopek traja 3 dni. Prvi dan si pripravimo ustrezne redčitve izhodiščne RNA . To je potrebno zato, ker lahko dodamo le 3 µl RNA k oligonukleotidnim začetnikom in poly-A kontrolam in v teh 3 µl moramo imeti 100 ng RNA. Nato poteče prvi cikel sinteze ds-cDNA iz RNA. Temu sledi 17 urna in vitro transkripcija (IVT) in sinteza cRNA. Preden se nadaljuje s sintezo cDNA iz cRNA, se preveri na Nanodropu koliko cRNA se je sintetiziralo, kar prikazuje Preglednica 14. V naslednjem koraku smo zopet omejeni z volumnom, zato mora biti zadostna koncentracija. Sledi drugi cikel sinteze ss-cDNA iz cRNA, hidroliza cRNA in čiščenje ss-cDNA. Nato preverimo koliko ss-cDNA se je sintetiziralo, kar je prikazano v Preglednici 14. Sledi fragmentacija ss-cDNA. Nato fragmente označimo in pripravimo hibridizacijsko tekočino. Nato napolnimo čip. Ko čip napolnimo se moramo prepričati, da je prisoten mehurček zraka, ki omogoča optimalno mešanje hibridizacijske tekočine med 17-urno hibridizacijo na 45°C in 60rpm. Potrebno je tudi zalepit septi, da tekočina med hibridizacijo ne steče ven. Naslednji dan moramo vzorce registrirati v programsko opremo AGCC-Affymetrix GeneChip Command Console, ker tako Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, ZDA) kot GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix, Santa Clara, ZDA) zahtevata podatke o vzorcih, med delom pa ni časa za vnos podatkov. Nato si pripravimo Fluidics Station 450, ki je namenjen spiranju čipov, barvanju in pripravi čipov za skeniranje. Najprej je potrebno Fluidics station 450 pripraviti za uporabo. Temu je namenjen protokol Prime_450 Protocol, ki cevke in igle napolni s pufrom, da se znebimo mehurčkov zraka. Nato si pripravimo raztopine Stain Coctail 1, ki je občutljiv na svetlobo, Stain Coctail 2 in Array Holding Buffer in jih naložimo v Fluidics station. Zaženemo protokol FS450_0007 in sledimo navodilom. Preden čip naložimo v Fluidics Station 450 je potrebno iz njega odstraniti hibridizacijsko tekočino in ga napolniti z 100 µl Wash A pufra. Po približno eni uri je spiranje in barvanje čipa končano. Barvanje poteka z raztopino SAPE (streptavidin-fikoeritrin) in raztopino kozjih IgG protiteles, ki so biotinizirana. Preden začnemo s skeniranjem čipa preverimo ali je prisoten mehurček. V tej stopnji ga ne sme biti, ker bi pri skeniranju povzročal lom svetlobe in s tem nepravilno

merjene intenzitete. Ponovno je potrebno zalepit obe septi, da se pufer ne bi razlil po skenerju in ga poškodoval. Nato v AGCC zaženemo skener in zopet sledimo navodilom. Za skeniranje enega čipa potrebujemo 10 minut. Nato preverimo ali so na čipu vidne vse kontrolne točke. Gre za pregled vseh štirih robov čipa, kjer so Oligo B2 kontrole in sredine čipa, kjer na en del nič ne hibridizira. Po skeniranju za vsak vzorec dobimo 3 tipe datotek. Prva je *.DAT v kateri je slika čipa, ki jo dobimo po skeniranju.. Druga je *.CHP z intenzitetami vseh točk na čipu. Tretja je *.CEL, ki vsebuje povprečne intenzitete za gen po korekciji ozadja in normalizaciji Na koncu sledi še preverjanje kvalitete GeneChip® Gene 1.0 ST Array System, ki izhaja iz *.CEL datotek in vključuje različne statistične pristope. Uporabi se Expression Console software (Affymetrix, Santa Clara, ZDA).

Preglednica 10: Izhodiščna koncentracija RNA in količina sintetizirane cRNA in ss-cDNA

Vzorec	RNA (ng/μl)	cRNA (ng/μl)	ss-cDNA (ng/μl)
1389	65,24	1389,1	247,95
1399	45,14	1302,7	240,16
1564	50,37	1840,4	227,25
1574	45,92	1845,7	273,67
1391	49,54	3109,5	292,37
1396	43,27	2809,4	328,68
1401	49,18	2855,8	332,91
1265	57,03	1337,5	255,21
1331	58,49	2794,1	265,03
1325	47,32	1285,5	237,15
1390	45,30	1625,6	246,03
1395	63,18	1346,5	246,10
1400	65,11	3474,5	245,13
1565	57,34	1506,4	217,88
1575	52,45	2264,5	301,83
1851	63,79	3679,1	279,01
1857	56,02	4063,8	314,94

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 10. Izhodiščna koncentracija RNA in količina sintetizirane cRNA in ss-cDNA

Vzorec	RNA (ng/μl)	cRNA (ng/μl)	ss-cDNA (ng/μl)
1863	59,70	3568,5	283,03
1869	60,64	4248	285,34
1853	63,57	5805,1	289,46
1859	55,81	3884	233,59
1865	67,06	4906,2	303,92
1871	64,63	4078,8	272,9

3.5 MIKROMREŽE – OBDELAVA PODATKOV

Preden izvedemo statistično obdelavo podatkov, moramo preveriti kakovost izvedene hibridizacije. S tem preverimo, če je med samim postopkom vse potekalo tako kot mora in ali so podatki primerni za nadaljnjo obdelavo. Pri tej analizi tudi ugotavljamo, če so vsi čipi primerni za nadaljnjo obdelavo ali če je potrebno kakšnega izločiti iz poskusa. Rezultati kakovosti izvedenih hibridizacij mikromrež se nahajajo v Prilogi A.

Vsi ti rezultati kažejo na verodostojnost izvedenega poskusa.

Sledila je statistična analiza podatkov, da smo prišli do liste diferencialno izraženih genov. Statistično obdelavo podatkov je izvedel dr. Peter Juvan s CFGBC, marca 2011.

Do liste diferencialni izraženih genov smo prišli tako, da smo iz intenzitet signalov pri FF in LL izračunali $\log_2(LL) - \log_2(FF)$, kar je enako $\log_2(LL/FF)$. Pozitivne vrednosti tako pomenijo povišano izražanje gena pri LL in negativne vrednosti pomenijo povišano izražanje pri FF. Nespremenjeno stanje je označeno z 0.

Poleg tega smo tudi:

- opravili test diferencialnega izražanja (DI) genov z metodo modificiranega paired-samples t- testa iz paketa R/Bioconductor/Limma,
- razdelili DI gene pri primerjavah LLvsFF na particije med tkivi,

- ponovili DI analizo za gene odseka kromosoma 15,
- opravili GSEA (angl. *Gene Set Enrichment Analysis*) na skupinah genov velikosti od 2 naprej, in sicer:
 - skupine genov iz KEGG metabolnih poti,
 - skupine genov iz GO ontologije bioloških procesov brez selekcije po »evidences«
- razdelili DI genske skupine pri primerjavah LLvsFF na particije med tkivi,
- teste DI genov in genskih skupin ponovili s popravkom p-vrednosti za testiranje večjega števila hipotez (Adjusted P-values for Multiple Comparisons) z metodo FDR (angl. *False Discovery Rate*).

Vse teste smo opravili pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$ (verjetnost napake 1. stopnje). V principu lahko pri testiranju večjega števila hipotez p-vrednosti množimo s številom hipotez, torej v našem primeru s številom obravnavanih genov. Tak popravek je najbolj strikten, reče se mu »Bonferroni correction«. FDR je manj strikten, deluje pa tako, da p-vrednosti uredimo naraščajoče, jih pomnožimo z št. vseh genov/1, št. vseh genov/2, št. vseh genov/3, itd. po vrsti ter odrežemo pri postavljeni meji (npr. 0,05).

Pri analizi smo poleg genotipa vzorca upoštevali tudi vpliv gnezda, ker so bile izbrane samičke iz različnih gnezd. Poskušali smo imeti čim več samičk znotraj istega gnezda, da bi bila okoljska variabilnost čim manjša. To nam ni najbolj uspelo, ker je bilo malo potomcev na gnezdo, poleg tega je zelo težko dobiti vse tri genotipe znotraj enega gnezda in spola. Upoštevali smo tudi datum hibridizacije vzorcev na čip.

4 REZULTATI

4.1 PREDHODNI REZULTATI

V Preglednici 11 so prikazane razlike v povprečnih vrednostih mas različnih maščobnih depojev. Primerjali smo mase po genotipu znotraj enega maščobnega depoja v celotni F2 generaciji, znotraj celotne ženske F2 populacije in znotraj populacije F2 samičk, ki smo jih uporabili za poskus. Opazimo, da imajo pri vseh treh skupinah miške z genotipom FF največje mase depojev in miške z genotipom LL najmanjše. Heterozigoti so po vrednostih nekje vmes med obema homozigotoma, kot smo pričakovali. Izračuni so bili narejeni na vzorcih odvzetih do 05.11.2009.

Preglednica 11: Primerjava povprečnih vrednosti mase različnih maščobnih depojev po genotipu

	Celotna F2 (M in Ž)			F2, samo Ž			F2, izbrane Ž		
Gonadalna maščoba									
genotip	N= 62	Povprečje (mg)	Sd	N= 37	Povprečje (mg)	Sd	N= 13	Povprečje (mg)	Sd
FL	31	534	263	15	399	139	1	450	0
LL	17	396	218	13	339	131	7	293	41
FF	14	608	242	9	453	117	5	422	38
Abdominalna maščoba									
genotip	N= 62	Povprečje (mg)	Sd	N= 37	Povprečje (mg)	Sd	N= 13	Povprečje (mg)	Sd
FL	31	263	142	15	243	109	1	239	0
LL	17	214	109	13	205	79	7	185	55
FF	14	287	88	9	258	74	5	231	40
Femoralna maščoba									
genotip	N= 62	Povprečje (mg)	Sd	N= 37	Povprečje (mg)	Sd	N= 13	Povprečje (mg)	Sd
FL	31	461	184	15	379	128	1	426	0
LL	17	370	181	13	322	107	7	305	60
FF	14	544	181	9	448	105	5	419	58
Mezenterialna maščoba									
genotip	N= 62	Povprečje (mg)	Sd	N= 37	Povprečje (mg)	Sd	N= 13	Povprečje (mg)	Sd
FL	31	473	264	15	320	107	1	368	0
LL	17	350	235	13	273	120	7	237	65
FF	14	518	285	9	337	83	5	339	29

Primerjali smo tudi povprečne vrednosti maščobnih depojev po spolu, kot je prikazano v Preglednici 12. Opazimo, da so mase vseh maščobnih depojev samcev večje kot mase

maščobnih depojev samic. Tudi standardna deviacija je pri samcih višja. Največje razlike se pojavljajo pri gonadalni, femoralni in mezenterialni maščobi. Izračuni so bili narejeni na vzorcih odvzetih do 05.11.2009.

Preglednica 12: Primerjava povprečnih vrednosti mase različnih tipov maščobe po spolu

	Gonadalna maščoba			Abdominalna maščoba		
Spol	N= 62	Povprečje (mg)	Sd	N= 62	Povprečje (mg)	Sd
M	25	693	285	25	287	157
Ž	37	396	137	37	233	90
	Femoralna maščoba			Mezenterialna maščoba		
Spol	N= 62	Povprečje (mg)	Sd	N= 62	Povprečje (mg)	Sd
M	25	572	213	25	660	289
Ž	37	380	123	37	310	107

Primerjali smo tudi maso različnih maščobnih depojev med sabo za različne vzorčne populacije, kot je prikazano v Preglednici 13. S tem testom smo želeli ugotoviti ali obstaja povezava med maso dveh različnih maščobnih depojev. Največja povezanost se je pokazala pri celotni populaciji (F2, vsi) med femoralno in mezenterialno maščobo. Visoke vrednosti smo dobili tudi znotraj moške populacije med gonadalno in mezenterialno maščobo. Znotraj ženske populacije pa med abdominalno in mezenterialno maščobo. Naša testna populacija (F2, Ž, izbrane) pa je pokazala visoko povezanost med gonadalno in femoralno maščobo. Izračuni so bili narejeni na vzorcih odvzetih do 05.11.2009.

Preglednica 13: Primerjava vrednosti t-testa med tkivi in izbranimi populacijami miši

Vrednosti t – testa (dva repa, neenake variance)				
Primerjava med tkivi	F2, Ž	F2, M	F2, vsi	F2, Ž, izbrane
Gonadalna m. – Abdominalna m.	$6,07 \cdot 10^{-8}$	$2,94 \cdot 10^{-7}$	$1,03 \cdot 10^{-10}$	$1,29 \cdot 10^{-5}$
Gonadalna m. – Mezenterialna m.	$3,13 \cdot 10^{-3}$	0,69	0,16	0,03
Gonadalna m. – Femoralna m.	$6,07 \cdot 10^{-8}$	0,10	0,15	0,91

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 13. Primerjava vrednosti t-testa med tkivi in izbranimi populacijami miši

Vrednosti t – testa (dva repa, neenake variance)				
Primerjava med tkivi	F2, Ž	F2, M	F2, vsi	F2, Ž, izbrane
Abdominalna m. – Mezenterialna m.	0,60	$1,74 \cdot 10^{-6}$	$7,76 \cdot 10^{-7}$	$4,56 \cdot 10^{-3}$
Abdominalna m. – Femoralna m.	$1,10 \cdot 10^{-7}$	$2,71 \cdot 10^{-6}$	$1,35 \cdot 10^{-10}$	$1,31 \cdot 10^{-5}$
Femoralna m. – Mezenterialna m.	$9,62 \cdot 10^{-3}$	0,23	0,85	0,03

Prav tako smo primerjali maso različnih maščobnih depojev med sabo po genotipih znotraj vzorčnih skupin, kot je prikazano v Preglednici 14. Izkazalo se je, da dobimo višje vrednosti povezanosti, če primerjamo vzorčne populacije po genotipu. Visoka povezanost je vidna za vse skupine in vse genotipe pri primerjavi gonadalne in femoralne maščobe ter gonadalne in mezenterialne maščobe pri samcih (F2, M). Pri samcih (F2, M) in celotni populaciji (F2, vsi) smo dobili visoko povezanost med femoralno in mezenterialno maščobo. Izračuni so bili narejeni na vzorcih odvzetih do 05.11.2009.

Preglednica 14: Primerjava vrednosti t-testa med tkivi in genotipi populacij miši

Vrednosti t – testa (dva repa, neenake variance)						
Genotip	F2, Ž			F2, Ž, izbrane		
	FF	FL	LL	FF	FL	LL
Gonadalna m. – Abdominalna m.	$9,38 \cdot 10^{-4}$	$2,04 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	/	0,00
Gonadalna m. – Mezenterialna m.	0,03	0,09	0,19	0,01	/	0,08
Gonadalna m. – Femoralna m.	0,94	0,68	0,73	0,93	/	0,68
Abdominalna m. – Mezenterialna m.	0,05	0,06	0,10	0,00	/	0,13
Abdominalna m. – Femoralna m.	$5,01 \cdot 10^{-4}$	$4,10 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	/	0,00

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 14. Primerjava vrednosti t-testa med tkivi in genotipi populacij miši

Vrednosti t – testa (dva repa, neenake variance)						
Genotip	F2, Ž			F2, Ž, izbrane		
	FF	FL	LL	FF	FL	LL
Femoralna m. – Mezenterialna m.	0,02	0,18	0,27	0,04	/	0,06
Genotip	F2, M			F2, vsi		
	FF	FL	LL	FF	FL	LL
Gonadalna m. – Abdominalna m.	$2,16 \cdot 10^{-5}$	$1,51 \cdot 10^{-4}$	0,16	0,00	$7,41 \cdot 10^{-6}$	0,01
Gonadalna m. – Mezenterialna m.	0,69	0,68	0,95	0,38	0,37	0,56
Gonadalna m. – Femoralna m.	0,09	0,18	0,82	0,44	0,21	0,71
Abdominalna m. – Mezenterialna m.	$3,03 \cdot 10^{-3}$	$4,70 \cdot 10^{-4}$	0,15	0,01	$2,95 \cdot 10^{-4}$	0,04
Abdominalna m. – Femoralna m.	$3,47 \cdot 10^{-3}$	$4,63 \cdot 10^{-4}$	0,17	0,00	$1,43 \cdot 10^{-5}$	0,01
Femoralna m. – Mezenterialna m.	0,31	0,37	0,76	0,77	0,83	0,78

4.2 PRIMERJAVA TRANSKRIPTOMOV MOŽGANOV LL PROTI FF

4.2.1 Diferencialno izraženi geni v možganih pri analizi celotne mikromreže

Ko smo analizirali celotno mikromrežo z uporabo FDR, nismo dobili nobenega diferencialno izraženega gena (v nadaljevanju označeno z DI). Če smo FDR popravek zavrgli, smo dobili 428 DI genov. Največjo negativno spremembo v izražanju (pomeni povišano izražanje pri FF) je imel gen *Ly6a*. Največjo pozitivno spremembo izražanja (pomeni povišano izražanje pri LL) pa smo zaznali pri genih *Gc*, *Cyp2e1*, *PI3* in *Alb*. Podatki so prikazani v Preglednici 15 (10 genov z največjo pozitivno in 10 z največjo negativno spremembo).

Preglednica 15: DI geni možgan pri analizi celotne mikromreže brez uporabe FDR

Brez FDR				
Simbol	Ime	Kromsom	p-vrednost	Sprememba izražanja
<i>Ly6a</i>	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	15	0.001	-1,14
<i>Gm15698</i>	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 pseudogene	11	0.027	-0,66
<i>Nfkbil2</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2	15	0	-0,55
<i>Bai1</i>	brain-specific angiogenesis inhibitor 1	15	0.004	-0,54
<i>Vmn1r178</i>	vomeroneasal 1 receptor, D13	7	0.021	-0,53
<i>Kcns2</i>	K ⁺ voltage-gated channel, subfamily S, 2	15	0.007	-0,51
<i>Olf707</i>	olfactory receptor 707	7	0.012	-0,49
<i>Glx3</i>	glutaredoxin 3	7	0.032	-0,49
<i>Olf1252</i>	olfactory receptor 1252	2	0.003	-0,48
<i>Comm5</i>	COMM domain containing 5	15	0.033	-0,48
<i>Car3</i>	carbonic anhydrase 3	3	0.018	0,58
<i>C3</i>	complement component 3	17	0.007	0,59
<i>9530091C08Rik</i>	RIKEN cDNA 9530091C08 gene	9	0.019	0,59
<i>Dnm3os</i>	dynamin 3, opposite strand	1	0.01	0,63
<i>Nr4a1</i>	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	15	0.025	0,68
<i>Adh1</i>	alcohol dehydrogenase 1 (class I)	3	0.008	0,97
<i>Gc</i>	group specific component	5	0.043	1,37
<i>Cyp2e1</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	7	0.001	1,4
<i>PI3</i>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1C	12	0.028	2,2
<i>Alb</i>	albumin	5	0.007	2,66
DI genov: 428				

4.2.2 Diferencialno izraženi geni v možganih z omejitvijo na 333 genov na kromosomu 15

Z omejitvijo na kandidatni odsek kromosoma 15 in z uporabo FDR, smo dobili samo en DI gen, *Nfkbil2*, ki je imel povišano izražanje pri FF. Podatki so prikazani v Preglednici 16.

Preglednica 16: DI geni možgan pri analizi kandidatnega odseka kromosoma 15 z uporabo FDR

Simbol	Ime	Kromsom	p-vrednost	Sprememba izražanja
<i>Nfkbil2</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2	15	0,032	-0,55
DI geni: 1				

4.3 JETRA LL PROTI FF

4.3.1 Diferencialno izraženi geni pri analizi celotne mikromreže

Analiza celotne mikromreže jeter z uporabo FDR, je dala 43 DI genov. Največjo negativno spremembo v izražanju je imel gen *Tubb2a*. Največjo pozitivno pa *Rgs16*. Podatki o 10 genih z največjo pozitivno in 10 z največjo negativno spremembo v izražanju so prikazani v Preglednici 17.

Preglednica 17: DI geni jeter pri analizi celotne mikromreže z uporabo FDR

Simbol	Ime	Kromosom	p-vrednost	Sprememba izražanja
<i>Tubb2a</i>	tubulin, beta 2A	13	0,014	-1,24
<i>4933406L18Rik</i>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3A	12	0,019	-0,84
<i>Pde9a</i>	phosphodiesterase 9A	17	0,001	-0,8
<i>Syt15</i>	synaptotagmin-like 5	X	0,019	-0,74
<i>Cyp4a12a</i>	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12a	4	0,033	-0,72
<i>Insc</i>	inscuteable homolog (Drosophila)	7	0,021	-0,64
<i>Nup93</i>	nucleoporin 93	8	0,014	-0,63
<i>Dhx29</i>	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 29	13	0,017	-0,6
<i>Mal2</i>	mal, T-cell differentiation protein 2	15	0,024	-0,6
<i>Tars</i>	threonyl-tRNA synthetase	15	0,024	-0,53
<i>Cux2</i>	cut-like homeobox 2	5	0,001	1,12
<i>Mt1</i>	metallothionein 1	8	0,005	1,2
<i>Usp2</i>	ubiquitin specific peptidase 2	9	0,024	1,26
<i>AI132487</i>	expressed sequence AI132487	12	0,001	1,28
<i>Osbpl3</i>	oxysterol binding protein-like 3	6	0,001	1,35
<i>Mt2</i>	metallothionein 2	8	0,001	1,44
<i>Cyp17a1</i>	cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	19	0,01	1,46
<i>Acot3</i>	acyl-CoA thioesterase 3	12	0,019	1,62
<i>Slc23a2</i>	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2	2	0,001	1,8
<i>Rgs16</i>	regulator of G-protein signaling 16	1	0	2,95
DI genov: 43				

4.3.2 Diferencialno izraženi geni z omejitvijo na 333 genov na kromosomu 15

Pri omejitvi analize na kandidatni odsek na kromosomu 15 in z uporabo FDR, smo dobili 9 DI genov. Največjo pozitivno spremembo izražanje je imel gen *Ttc38*. Največjo negativno

spremembo izražanja pa je imel gen *Celsr1*. Podatki o 5 genih z največjo pozitivno in 4 z največjo negativno spremembo v izražanju so prikazani v Preglednici 18.

Preglednica 18: DI geni jeter pri analizi kandidatnega odseka kromosoma 15 z/brez uporabo FDR

Simbol	Ime	Kromosom	p-vrednost	Sprememba a izražanja
<i>Celsr1</i>	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (flamingo homolog, Drosophila)	15	0,006	-0,71
<i>Creld2</i>	cysteine-rich with EGF-like domains 2	15	0,026	-0,7
<i>Lrrc24</i>	leucine rich repeat containing 24	15	0,007	-0,68
<i>Gramd4</i>	GRAM domain containing 4	15	0,002	-0,49
<i>1300018J18Rik</i>	RIKEN cDNA 1300018J18 gene	15	0,028	0,38
<i>Sun2</i>	Sad1 and UNC84 domain containing 2	15	0,011	0,47
<i>Pla2g6</i>	phospholipase A2, group VI	15	0	0,62
<i>Miox</i>	myo-inositol oxygenase	15	0	0,72
<i>Ttc38</i>	tetratricopeptide repeat domain 38	15	0,001	0,82
DI genov: 9				

4.4 MAŠČOBNO TKIVO LL PROTI FF

4.4.1 Diferencialno izraženi geni pri analizi celotne mikromreže

Analiza celotne mikromreže in uporaba FDR je dala en sam DI gen. Gre za gen *Sfrp5*, ki ima povišano izražanje pri FF. Podatki so prikazani v Preglednici 19.

Preglednica 19: DI geni maščobnega tkiva pri analizi celotne mikromreže z uporabo FDR

Simbol	Ime	Kromosom	p-vrednost	Sprememba izražanja
<i>Sfrp5</i>	secreted frizzled-related sequence protein 5	19	0.033	-1.18
DI genov: 1				

4.4.2 Diferencialno izraženi geni z omejitvijo na 333 genov na kromosomu 15

Omejitev na kandidatni odsek kromosoma 15 in uporaba FDR je dala 2 DI gena. To sta gena *Lgals2* in *Tst*. Oba imata povišano izražanje pri LL. Podatki o genih z največjo pozitivno in z največjo negativno spremembo v izražanju so prikazani v Preglednici 20.

Preglednica 20: DI geni maščobnega tkiva pri analizi kandidatnega odseka kromosoma 15 z uporabo FDR

Simbol	Ime	Kromosom	p-vrednost	Sprememba izražanja
<i>Lgals2</i>	lectin, galactose-binding, soluble 2	15	0,007	0,86
<i>Tst</i>	thiosulfate sulfurtransferase, mitochondrial	15	0,001	1,1
DI genov: 2				

4.5 OBOGATENOST GENSKIH SKUPIN IN METABOLNIH POTI

4.5.1 Skupine genov iz KEGG metabolnih poti

Z upoštevanjem FDR GSEA pri posameznih tkivih (jetra LL proti FF, možgani LL proti FF in maščobno tkivo LL proti FF), ni dala nobenih diferencialno izraženih genov, ki bi jih lahko umestili v KEGG metabolne poti.

4.5.1.1 Jetra LL proti FF

V prisotnosti FDR, nismo dobili nobenega DI gena znotraj metabolnih poti. Če FDR nismo uporabili, smo dobili DI gene znotraj dveh metabolnih poti. To sta biosintezna pot betalanina in nikotin in nikotinamidna metabolna pot. Prva ima povišano izražanje pri FF, druga pa v LL. Podatki se nahajajo v Preglednici 21.

Preglednica 21: Metabolne poti z DI geni, analiza jeter LL proti FF; odsotnost FDR

Metabolna pot	p-vrednost	Sprememba izražanja
Betalain biosynthesis	0,048	-0,29
Nicotinate and nicotinamide metabolism	0,038	0,3
Št. metabolnih poti z DI geni: 2		

4.5.1.2 Možgani LL proti FF

V prisotnosti FDR, nismo dobili nobenega DI gena znotraj metabolnih poti. Če FDR nismo uporabili, smo dobili DI gene znotraj dveh metabolnih poti. To sta biosintezna pot kondroitin sulfata in biosintezna pot heparan sulfata. Obe imata povišano izražanje v FF. Podatki se nahajajo v Preglednici 22.

Preglednica 22: Metabolne poti z DI geni, analiza možgan LL proti FF; odsotnost FDR

Metabolna pot	p-vrednost	Sprememba izražanja
Chondroitin sulfate biosynthesis	0,015	-0,23
Heparan sulfate biosynthesis	0,041	-0,18
Št. metabolnih poti z DI geni: 2		

4.5.1.3 Maščobno tkivo LL proti FF

V prisotnosti FDR, nismo dobili nobenega DI gena znotraj metabolnih poti. Če FDR nismo uporabili, smo dobili DI gene znotraj dveh metabolnih poti. To sta metabolna pot krčenja gladkih mišičnih vlaken in metabolna pot astme. Obe imata povišano izražanje v LL. Podatki se nahajajo v Preglednici 23.

Preglednica 23: metabolne poti z DI geni, analiza maščobnega tkiva LL proti FF; odsotnost FDR

Metabolna pot	p-vrednost	Sprememba izražanja
Vascular smooth muscle contraction	0,045	0,38
Asthma	0,032	0,7
Št. metabolnih poti z DI geni: 2		

4.5.2 Skupine genov iz GO ontologije »Biolški proces«

GSEA pri skupinah genov iz GO ontologije biološki procesi in upoštevanje FDR, ni dala nobenega DI biološkega procesa pri analizi možgan LL proti FF in maščobnem tkivu LL proti FF. Pri jetrih LL proti FF smo dobili 7 DI bioloških procesov. Če FDR nismo

uporabili, smo dobili 56 DI bioloških procesov pri analizi možgan LL proti FF in 113 pri analizi maščobnega tkiva LL proti FF. Podatki so prikazani v Preglednici 24.

Preglednica 24: Rezultati GSEA po skupinah genov iz GO ontologije bioloških procesov, z in brez uporabe FDR

		FDR	Brez FDR
LL proti FF	Možgani	0	56
	Maščobno tkivo	0	113
	Jetra	7	197

4.5.2.1 Možgani LL proti FF

Kot je bilo že omenjeno, GSEA z uporabo FDR, ni dala nobenega DI biološkega procesa. Če FDR nismo uporabili, smo dobili 56 DI bioloških procesov. Pri FF ima največjo povišano spremembo izražanja regulacija apoptoze, pri LL pa katabolizem etanola. Podatki o treh DI bioloških procesih z največjo spremembo izražanja v LL (pozitivna sprememba izražanja) in treh z največjo spremembo izražanja v FF (negativna sprememba izražanja), so prikazani v Preglednici 25.

Preglednica 25: DI biološki procesi pri analizi možgan LL proti FF, brez uporabe FDR

Biološki proces	p-vrednost	Sprememba izražanja
Regulation of apoptosis	0,032	-0,24
Nucleosome assembly	0,044	-0,24
Brain-specific angiogenesis inhibitor activity	0,03	-0,21
Response to steroid hormone stimulus	0,005	0,28
Alcohol dehydrogenase (NAD) activity	0,019	0,37
Ethanol catabolic process	0,005	0,44

4.5.2.2 Maščobno tkivo LL proti FF

Tudi pri GSEA maščobnega tkiva LL proti FF z uporabo FDR, nismo dobili nobenega DI biološkega procesa. Če FDR nismo uporabili, smo dobili 113 DI bioloških procesov. Pri FF ima največjo povišano spremembo izražanja tvorba A obroča. Pri LL pa vezava antigenov. Podatki o treh DI bioloških procesih z največjo spremembo izražanja v LL (pozitivna sprememba izražanja) in treh z največjo spremembo izražanja v FF (negativna sprememba izražanja), so prikazani v Preglednici 26.

Preglednica 26: DI biološki procesi pri analizi maščobnega tkiva LL proti FF, brez uporabe FDR

Biološki proces	p-vrednost	Sprememba izražanja
A band	0,016	-0,71
Response to activity	0,015	-0,62
Myosin complex	0,011	-0,49
B cell receptor signaling pathway	0,046	0,52
B cell receptor complex	0,026	0,53
Antigen binding	0,014	0,7

4.5.2.3 Jetra LL proti FF

GSEA jeter LL proti FF z uporabo FDR, je dala 7 DI bioloških procesov. Pri FF ima največjo povečano spremembo izražanja tvorba pozicioniranje nukleosomov. To je edini DI biološki proces, ki ima povečano izražanje pri FF. Pri LL pa z dušikovim oksidom posredovana signalna transdukcija. Podatki o DI bioloških procesi z največjo spremembo izražanja v LL (pozitivna sprememba izražanja) in z največjo spremembo izražanja v FF (negativna sprememba izražanja), so prikazani v Preglednici 27.

Preglednica 27: DI biološki procesi pri analizi jeter LL proti FF

Biološki proces	p-vrednost	Sprememba izražanja
Nucleosome positioning	0,033	-0,34
Ligand-dependent nuclear receptor activity	0,011	0,4
Steroid hormone receptor activity	0,011	0,41
Glucocorticoid biosynthetic process	0,029	0,46
Cellular zinc ion homeostasis	0,005	0,56
Detoxification of copper ion	0,005	0,66
Nitric oxide mediated signal transduction	0,002	0,85

Vsi ostali navedeni rezultati (prevelika količina podatkov), so dostopni za ogled pri mentorju diplomske naloge prof. dr. Simonu Horvatu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo z izolacijo RNA iz jeter, maščobnega tkiva in možgan ter z uporabo ekspresijskih mikromrež in statističnih metod za preučevanje transkriptoma, močno znižali število kandidatnih vzročnih genov znotraj dveh QTL-jev, *Fob3b1* in *Fob3b2*.

Naša osnova so bili rezultati Horvat in sod. (2000), ki so s križanjem mišjih linij divergentno selekcioniranih na vsebnost maščobe, mapirali 4 QTL-je z visokim odstotkom vpliva na odstotek maščobe v telesu. Eden od teh je QTL *Fob3*, ki se nahaja 34cM od proksimalnega dela kromosoma 15 in pojasni 14,4% fenotipske variance za odstotek maščobe v F2 populaciji. Stylianou in sod. (2004a) so z nadaljnim preučevanjem kongenih linij in njihovega potomstva, skupaj z mikrosatelitno genotipizacijo, ugotovili, da je *Fob3* sestavljen iz dveh manjših QTL-jev, *Fob3a* in *Fob3b*. Prevoršek in sod. (2010) so nadalje analizirali *Fob3b*. Analizirali so osem prekrivajočih se kongenih linij za *Fob3b* in štiri kongene linije F2 križanja. Bioinformatična analiza je pokazala, da je *Fob3b* sestavljen iz dveh vezanih QTL-jev, *Fob3b1* in *Fob3b2*. *Fob3b1* pojasni 1,22 odstotka fenotipske variance, *Fob3b2* pa 0,77 odstotka. Nato so s pomočjo primerjalne genomike ter intervalno specifične analize haplotipov in uporabe spletnih baz podatkov, zmanjšali število kandidatnih vzročnih genov znotraj *Fob3b1* iz 85 možnih vzročnih genov na 4 visoko prioritete. To so geni *Dgat1*, *Gpihbp1*, *Rhpn1* in *Ly6a*. Tako smo poskušali s preučevanjem transkriptoma izbranih tkiv potrditi njihove rezultate in hkrati poiskati še kandidate vzročne gene za *Fob3b2*.

5.1.1 DI geni tkiv

Pri analizi celotnega transkriptoma možgan, nismo dobili nobenega DI gena. Kar je povsem razumljivo, saj je hipotalamus, ki je najpomembnejši del možgan kar se tiče vpliva na debelost, zelo majhen del možgan, mi pa smo v poskusih uporabili celotne možgane. Če

smo statistično analizo izvedli brez FDR popravka, smo dobili 428 DI genov. Največjo spremembo izražanja je imel *Ly6a* in sicer 1,14krat večjo pri FF kot pri LL. *Nfkbil2* in *Bai1* sta prav tako imela povišano izražanje v možganih FF. *Nfkbil2* je imel 0,55krat večje izražanje in *Bai1* 0,54krat večje izražanje pri FF kot pri LL. *Alb* pa je imel 2,66krat večje izražanje v možganih LL, *Serpina1c* 2,2krat in *Cyp2e1* 1,4krat. Če smo se omejili samo na kandidatni odsek, to je odsek kjer se nahaja *Fob3* in kjer predvidevamo, da se nahajajo vzročni geni, smo dobili 1 sam DI gen. To je *Nfkbil2*, ki ima 0,55krat večje izražanje v FF kot v LL. de Jong in sod. (2011) so pokazali, da je spremenjeno izražanje *Ly6a* v možganih povezano s spremembami v motorični aktivnosti. In sicer, nižje izražanje *Ly6a* vodi v nižjo motorično aktivnost. *Nfkbil2* zapisuje protein, ki je del večjega proteinskega kompleksa katerega naloga je vzdrževanje genomske integritete med podvajanjem DNA in sicer tako, da spodbuja popravljanje oboje vijačnih lomov s homologno rekombinacijo (*Nfkbil2*, 2015). Prevorsek in sod. (2010) so prav tako uvrstili *Bai1* med kandidatne vzročne gene in sicer na podlagi mesta izražanja in njegove funkcije. Primarno se izraža v olfaktornem bulbusu in sodeluje v neuropeptidni signalni poti. Prav tako se smatra, da njegov produkt, protein BAI1 sodeluje v neovaskularizaciji, ki je potrebna za rast tumorjev. Deluje tudi kot površinski receptor za fosfatidilserin, ki se izraža na površini apoptotičnih celic. To nakazuje, da deluje kot iniciator fagocitoze. (Bollinger in sod., 2010). *Ly6a* je vključen v izločanje epinefrina oz. adrenalina in sodeluje pri razvoju nadledvične žleze in ostalih organov. Adrenalin in noradrenalin promovirata razgradnjo trigliceridov in glikogena (Landsberg in sod., 1992), stimulirata vnos hrane, ko injicirana v centralni živčni sistem (Goldman in sod., 1985) in aktivirata termogenezo v rjavem maščobnem tkivu (Nicholls in Locke, 1984; Klaus in sod., 1991). Bornstein in sod. (1997) so pokazali, da leptin deluje tudi periferno na nadledvično žlezo in vpliva na koncentracijo spoščenega kortizola. Pralong in sod. (1998) pa so pokazali, da ima količina leptina direkten vpliv na znižano izločanje kortizola. To pa povzroči potrebo po hranjenju in shranjevanju maščobe in proteinov v telesu. *Alb* je imel močno povečano izražanje v možganih pri LL (2,66krat). Ker kodira protein albumin, ki ima zelo dobro vezavno sposobnost za številne ione, maščobne kisline, hormone, bilirubine in zdravila, lahko predvidevamo, da je nekako povezan s prenosom signalov, ki spodbujajo razvoj vitkega fenotipa. Poleg tega je vključen tudi v proces odgovora celic na stradanje in v urejanje cikla spanja (Albumin, 2015). Gen

PI3 je imel prav tako močno povišano izražanje v možganih pri LL (2,2krat). Watson in sod. (2001) so ugotovili, da njegov proteinski produkt sodeluje kot eden od od dveh aktivacijskih signalov, ki so potrebni, da pride do z inzulinom povzročene translokacije glukoznega prenašalca. Leptin preko tega signala kontrolira homeostazo glukoze z aktivacijo POMC nevronov (Hill in sod., 2008) v hipotalamusu (Koch in sod., 2010). Knockaert in sod. (2011) navajajo, da je *Cyp2e1* oz njegov proteinski produkt, vključen v biotransformacijo ketonskih teles, glicerola in številnih maščobnih kislin. Prav tako sodeluje pri proizvodnji številnih strupenih reaktivnih metabolitov, ki povzročajo močan oksidativni stres, poškodbe mitohondrijev in celično smrt.

Analiza celotnega transkriptoma jeter je dala 43 DI genov. Največjo spremembo izražanja pri FF je imel gen *Tubb2a* in sicer kar 1,24krat večjo kot v jetrih LL. Tubulin je strukturna komponenta citoskeleta in sodeluje pri vezavi nukleotidov in polimerizaciji proteinov. *Rgs16* pa je imel močno povišano izražanje pri LL, kar za 2,95krat večje kot pri FF. Huang in sod. (2006) navajajo, da je *Rgs16* edini iz družine genov, ki je dnevno reguliran v jetrih miši hranjenih *ad libitum*. V času postenja se njegovo prepisovanje močno poveča in ob ponovnem hranjenju zelo hitro ustavi. Izraža se v s kisikom bogatih hepatocitah kjer potekata lipoliza in glukoneogeneza. Paskhov in sod. (2011) pa navajajo, da imajo miši z izbitim *Rgs16* genom povišano izražanje genov vključenih v oksidacijo maščobnih kislin v jetrih. Transgene miši s prekomernim izražanjem *Rgs16* pa so v primerjavi z divjim tipom imele zelo nizek nivo glukoze v krvi. *Rgs16* je močno induciran s strani saharidov zaužitih v prehrani, količina mRNA se poveča tudi do 300krat (Wilkie in sod., 2008). *Slc23a2* kodira protein, ki deluje kot prenašalec natrija in askorbata (vitamin C). Ta sodeluje v številnih procesih kot je hidrosilacija kolagena, biosinteza karnitina in inhibitor oksidacije. Zato vsekakršno odstopanje v izražanju *Slc23a2* od normalnega, vodi v razvoj številnih bolezenskih stanj, kot so osteoporoza, debelost, visok krvni tlak in staranje. Prav tako ima velik vpliv na metabolizem maščob in delovanje endokrinih žlez (Stratakis in sod., 2000). V našem primeru je imel slednji povišano izražanje pri LL in to za kar 1,8krat v primerjavi z FF. Pri omejitvi analize na kandidatni odsek kromosoma 15, smo dobili 9 DI genov. *Celsr1* in *Creld2* z 0,71 in 0,7krat večjim izražanjem v FF ter *Ttc38* in *Miox* z 0,82krat in 0,72krat večjim izražanjem v LL. Ti 4 geni so imeli največje spremembe

izražanja. *Celsr1* oz njegov produkt sodeluje pri medcelični komunikaciji. Navajajo tudi, da je povezan z nastopom ishemične kapi (Yamada in sod., 2009). Kerley-Hamilton in sod. (2012) so pokazali, da je prepisovanje *Creld2* pri hranjenju miši s krmo, ki spodbuja razvoj debelega genotipa, zavrto. Prav tako navajajo, da je vključen pri znotrajceličnem katabolizmu proteinov. *Miox* ima oksidoreduktazno delovanje in deluje na NADP in NADPH pri metabolizmu ogljikovih hidratov. Katalizira pretvorbo mioinozitola v d-glukuronsko kislino (Arner in sod., 2004).

Analiza celotnega transkriptoma maščobnega tkiva je dala 1 sam DI gen. Gre za gen *Sfrp5*, ki je imel pri FF 1,18krat večje izražanje kot pri LL. Gre za proti vnetni adipokin, ki sodeluje v Wnt signalni poti in čigar nepravilno izražanje vodi v razvoj debelosti in diabetes tipa 2. Osebkami z debelim fenotipom in oboleli za tipom 2 diabetesa imajo znižane koncentracije SFRP5 v plazmi (Hu in sod., 2013). Slabo izražanje oz nično izražanje *Sfrp5* pri miškah vodi v močno glukozno intoleranco (Ouchi in sod., 2010). SFRP5 deluje kot inhibitor Wnt signalizacije in negativno regulira adipogenezo (Hu in sod., 2013). Zdravi adipociti so sposobni izločati SFRP5 in se s tem zaščititi pred Wnt5a. Pri z dieto inducirani debelosti, je bilo izražanje *Sfrp5* v adipocitih povišano (Schulte in sod., 2012), po 4 tednih hranjenja z visoko kalorično krmo, se izražanje *Sfrp5* poveča za 45 odstotkov (Koza in sod., 2006). Z omejitvijo analize na kandidatni odsek kromosoma 15, smo dobili 2 DI gena. To sta gena *Tst* in *Lgals2*, ki imata oba večje izražanje pri LL kot pri FF, in sicer za 1,1krat in 0,86krat. Stylianou in sod. (2004a) so pokazali, da ima *Tst* v rjavem maščobnem tkivu F linije nižje izražanje kot pri L liniji, kar sovpada z našimi rezultati. LGALS2 je produkt *Lgals2* gena in spada v družino proteinov, ki vežejo beta-galaktozidazo, se preferenčno izraža v adipocitih in deluje kot negativni regulator lipolize. Odstranitev gena vodi v povečano mitohondrijsko dihanje adipocitov, znižano nalaganje maščobe in omili inzulinsko odpornost (Yang in sod., 2011).

5.1.2 Skupine genov iz KEGG metabolnih poti

Analiza skupine genov iz KEGG metabolnih poti znotraj posameznih tkiv po genotipu, ni dala nobene DI skupine genov. Če FDR nismo uporabili smo v vsakem tkivu dobili 2

skupini DI genov. V jetrih sta to biosintezna pot betalaina in metabolizem nikotinata in nikotinamida. Prva ima povišano izražanje pri FF, druga ima povišano izražanje pri LL. Kanner in sod. (2001) navajajo, da betalain v povišani koncentraciji negativno vpliva na peroksidacijo lipidov celične mebrane, inhibira delovanje lipoksigenaze in vpliva na razpad hema. Betalain ima visoko afiniteto do celične membrane. Nikotinamid, prekursor NAD^+ , spodbuja oksidativni metabolizem skeletnih mišic in rjavega maščevja ter varuje pred debelostjo, ki je posledica uživanja hrane bogate z maščobami (Canto in sod., 2012).

Geni, ki sodelujejo v biosintezi kondroitin sulfata in heparan sulfata, sta DI skupini genov v možganih. Obe skupini sta imeli povišano izražanje pri FF. Han in sod. (2000) navajajo, da kondroitin sulfat vpliva na lipazno aktivnost v trebušni slinavki, zmanjšuje telesno težo, preprečuje zamaščenost jeter in hiperlipidemijo v miših hranjenih s krmo bogato z maščobami. Vplival naj bi na zakasnjeno absorpcijo zaužitih maščob v črevesju z inhibicijo lipazne aktivnosti trebušne slinavke (Han in sod., 2005). Heparan je del zunajceličnega matriksa in se povezuje s proteini. Vpliva na metabolizem ter prenos molekul in sodeluje v medcelični signalizaciji v vseh organskih sistemih (Bishop in sod., 2007).

V maščobnem tkivu sta DI dve skupini genov. Obe imata povišano izražanje pri LL. To so geni, ki so vključeni v metabolne poti astme in krčenje gladkih mišičnih vlaken ožilja. Delvecchio in sod. (2008) so pokazali, da imajo mutacije v transporterjih, ki se nahajajo v celicah gladkih mišic dihalnih velik vpliv na patogenezo boleznih dihal kot je astma. Matricardi in sod. (2007) pa navajajo, da se pojavlja vedno več dokazov o tem, da ima leptin tudi protivnetno vlogo. Prav tako obstajajo številni geni katerih spremenjeno izražanje se pojavlja in pri astmatičnih osebkih in pri debelih. Eden od takih je npr. inzulinu podoben rastni faktor. Okon in sod. (2003) pa so pokazali, da imajo debele miši močno povezano krčenje gladkih mišičnih vlaken ožilja, to dolgoročno vodi v razvoj številnih ožilnih bolezenskih stanj. Povečano krčenje je posledica sprememb v izražanju genov za prostaglandine, ki sodelujejo v vnetnih procesih. Brandier in sod. (2005) pa so pokazali, da maščobno tkivo ob ožilju izloča določene signalne molekule, ki sprožijo

proliferacijo gladkih mišičnih vlaken. Debele miši so imele močno povečano izražanje te signalne molekule in posledično močno odebeljene žilne stene.

5.1.3 Skupine genov iz GO ontologije »Biološki proces«

Primerjava po genotipu znotraj možgan je pokazala, da je biološki proces regulacije apoptoze povišan pri FF. Izražanje proteinov, ki sodelujejo v regulaciji apoptoze in nekroze celic, je pri debelih miših z zamaščenimi jetri močno povečano. Povečana količina teh proteinov posledično vodi v večjo apoptozo in nekrozo hepatocit (Rashid in sod., 1999). Pri LL pa je povišan biološki proces katabolizem etanola. Etanol nastaja v telesu pri fermentaciji zaužite krme. Količina nastalega etanola je odvisna od količine in tipa zaužite hrane. Več kot je etanola, več je citokroma P450 2E1 in posledično je več reaktivnih kisikovih zvrsti, ki povzročajo ogromno škode. Izražanje citokroma je povišano tudi pri miših krmljenih s krmo bogato z maščobami, debelih osebkih in osebkih z diabetesom (Robin in sod., 2005). Pri maščobnem tkivu sta tvorba A pasu in miozinskega kompleksa povišani pri FF in vezava antigenov pri LL. Okvarjena tvorba A pasu vodi v nepravilno razporeditev aktinskih in miozinskih vlaken, kar vodi v moteno delovanje mišic (Shelley in sod., 2009). Sklepamo lahko, da imajo debeli miši težave z gibanjem kar vodi v razvoj debelega fenotipa. Vezava in prepoznavanje antigenov sodeluje v imunskem odgovoru telesa. To posledično vpliva na mediacijo vnetnih procesov katerih komponente vplivajo na količino adiponektina v krvi, ki posledično vpliva na razvoj debelosti, inzulinsko rezistenco, diabetes tipa 2 in razne kardiovaskularna obolenja (Gaal in sod., 2006). Adiponektin nastaja v adipocitih in regulira nivo glukoze in razgradnjo maščobnih kislin. Odkrili so, da je imajo debeli osebki manj adiponektina v krvi kot suhi (Lihn in sod., 2005). Proteini PPAR poti so ključni pri regulaciji debelosti in metabolizma. Njihovo izražanje med drugim vpliva tudi na termogenezo, neprostovoljno fizično aktivnost (nemirnost) in močno poveča porabo energije ter tako varuje pred razvojem debelosti. Ti jedrni receptorji se aktivirajo z vezavo maščobnih kislin in njihovih metabolitov. So tkivno specifični in vsak drugače regulira energijski metabolizem. PPAR- γ je glavni regulator razvoja adipocitov in njihovega normalnega delovanja. Miši z izbitim PPAR- γ genom ne razvijejo adipocitov in posledično maščobnega tkiva. Izbitje gena po razvoju maščobnega

tkiva vodi v močno izgubo adipocitov, hiperlipidemijo in inzulinsko odpornost. Dokler ostaja v telesu vsaj nekaj maščobnega tkiva lahko vzdržuje normalno glukozno homeostazo celotnega telesa (Evans in sod., 2004). V jetrih je pozicioniranje nukleosomov tisti biološki proces, ki ima povišano izražanje pri FF. Z dušikovim oksidom posredovana signalna transdukcija pa je povišana pri LL. Shimabukuro in sod. (1997) navajajo, da obstaja povezava med povečano količino dušikovega oksida in okvarami β -otočkov v trebušni slinavki. Biološki proces sinteze glukokortikosteroidov je prav tako povečan pri LL. Povečano maščobno tkivo sproži sproščanje glukokortikosteroidov in vnetnih citokinov, ki posledično preprečujejo delovanje inzulina. Vpliv glukokortikosteroidov je odvisen od njihovega znotraj celičnega metabolizma, ki ga regulirajo 11β -hidroksisteroid dehidrogenaze. Nekatere oblike proteina sprožijo njegovo delovanje, druge zavrejo. Transgene miši z vgrajenim človeško 11β -hidroksisteroid dehidrogenazo, ki zavre njihovo delovanje, se uspešno branijo pridobivanju teže kljub temu, da so hrajene z visoko kalorično krmo. Prav tako imajo znižano izražanje leptina, povišano izražanje adiponektina in PPAR γ (Kershaw in sod., 2005). Glede na to, da je biološki proces precej širši pojem kot metabolna pot in ker lahko več različnih metabolnih poti sodeluje v biološkem procesu, je bilo za pričakovat, da bo število rezultatov padalo.

5.2 SKLEPI

- Z uporabo ekspresijskih mikromrež, ki vsebujejo gene celega genoma (Affymetrix GeneChip Mouse Gene 1.0 ST) smo v treh tkivih (jetra, možgani in maščobno tkivo) poiskali diferencialno izražene gene v tarčnem odseku (pozicijski kandidatni geni) ali drugje po genomu (sekundarni ali terciarni kandidatni geni).
- Poiskali smo diferencialno izražene gene med F2 križanci kongenih linij, ki se genetsko razlikujejo v *Fob3b1* in *Fob3b2* odsekih – odseka lahko izvirata ali iz linije miši selekcionirane na višji odstotek telesnih maščob ali linije selekcionirane na nižji odstotek maščob.
- Potrdili smo hipotezo številka 1: Med F2 križanci kongenih linij za kvantitativna lokusa *Fob3b1* in *Fob3b2* treh tkiv (jetra, možgani, maščobno tkivo) obstajajo statistično značilno diferencialno izraženi geni.

- Pokazali smo, da se v jetrih statistično značilno izražajo geni *Celsr1*, *Creld2*, *Ttc38* in *Miox*. V možganih se statistično značilno izraža gen *Nfkbil2*. V maščobnem tkivu se statistično značilno izražata gena *Lgals2* in *Tst*.
- Delno smo potrdili hipotezo številka 2: Pričakujemo, da bomo odkrili diferencialno izražene gene, ki kartirajo v tarčni odsek, ki vsebuje *Fob3b1* in *Fob3b2* (t.i. pozicijski kandidatni geni) in diferencialno izražene gene drugje po genomu, ki so posledica kavzalnih mutacij v *Fob3b1* in *Fob3b2* (sekundarni ali terciarni kandidatni geni in metabolne poti).
- V možganih nismo odkrili nobenih sekundarnih kandidatnih genov. Sekundarni kandidatni geni jeter so *Tubb2a*, *Rgs16* in *Slc23a2*. Sekundarni kandidatni gen maščobnega tkiva je *Sfrp5*.
- Znotraj posameznih tkiv nismo odkrili nobene diferencialno izražene metabolne poti.
- Odkrili smo diferencialno izražene biološke procese znotraj tkiva. V možganih smo odkrili biološka procesa regulacije apoptoze in katabolizem etanola. V jetrih smo odkrili biološka procesa pozicioniranja nukleosomov in z dušikovim oksidom posredovane signalne transdukcije. V maščobnem tkivu smo odkrili biološka procesa tvorbe A pasu in vezave antigenov.

6 POVZETEK

Debelost se izredno hitro širi iz razvitih držav v nerazvite in postaja epidemija sodobnega sveta, ki močno bremeni zdravstveno blagajno. Vodi v razvoj številnih drugih bolezenjskih stanj kot so sladkorna bolezen, karidovaskularna obolenja in številna rakava obolenja. Obstajata dve obliki debelost. Redke monogene oblike, ki jih povzroča okvara v enem samem genu, ki ima zelo velik vpliv na fenotip in poligene oblike debelosti. Tu k razvoju debelega fenotipa prispeva več genov in vsak v majhni meri. Njihovo identifikacijo otežujejo gen-gen in gen-okolje interakcije. Uporaba ustreznih mišjih linij v kontroliranih pogojih, ki omogoči zanemarjene vpliva okolja, nam je močno olajšala iskanje kandidatnih genov.

Namen diplomske naloge je bil, s transkriptomiko kot orodjem pozicijskega kloniranje, odkriti:

- Med F2 križanci kongenih linij za kvantitativna lokusa *Fob3b1* in *Fob3b2* treh tkiv (jetra, možgani, maščobno tkivo) obstajajo statistično značilno diferencialno izraženi geni.
- Pričakujemo, da bomo odkrili diferencialno izražene gene, ki kartirajo v tarčni odsek, ki vsebuje *Fob3b1* in *Fob3b2* (t.i. pozicijski kandidatni geni) in diferencialno izražene gene drugje po genomu, ki so posledica kavzalnih mutacij v *Fob3b1* in *Fob3b2* (sekundarni ali terciarni kandidatni geni in metabolne poti).

S statistično analizo podatkov pridobljenih iz ekspresijskih mikromrež, smo dobili statistično značilno diferencialno izražene gene za kvantitativna lokusa *Fob3b1* in *Fob3b2* vseh treh tkiv. Prav tako smo določili sekundarne kandidatne gene in diferencialno izražene metabolne poti. Uspeli smo tudi potrditi rezultate Prevoršek in sod. (2010), ki so bili pridobljeni z drugimi metodami in smo jih uporabili kot osnovo za naše eksperimentalno delo.

V prihodnosti bi bilo smiselno s kvantitativnim PCR preveriti oz. ovrednotiti izražanje v tem delu določenih kandidatnih genov in s pregledom sekvenc teh genov, poiskati možne

polimorfizme, ki bi lahko razložili spremembe v fenotipu. Smiselen bi bil tudi pregled regulatornih regij teh proteinov ter proučiti kako, če sploh se spremembe na DNA nivoju pretvorijo v spremembe na nivoju mRNA in nato v spremembe na nivoju proteinov.

7 VIRI

Aasheim E.T., Hofsø D., Hjelmsaeth J., Birkeland K.I., Bøhmer T. 2008. Vitamin status in morbidly obese patients: a cross-sectional study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 2: 362-369

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., Dermant P., Doerge R.W., Elliot R.W., Farber C.R., Flaherty L., Flint J., Gershenfeld 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., Mittlemann 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., Toyne A.A., Vadasz C., Van Zant G., Wakeland E., Williams R.W., Zhang H.G., Zou F. 2003 The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nature Reviews Genetics*, 4, 11: 911-916

Aitman T.J., Glazier A.M., Wallace C.A., Cooper L.D., Norsworthy P.J., Wahid F.N., Al Majali K.M., Trembling P.M., Mann C.J., Shoulders C.J., Graf D., St Lezin e., Kurtz T.W., Kren V., Pravenca M., Ibrahim A., Abumrad N.A., Stanton L.W., Scott J. 1999. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nature Genetics* 21: 76-83

Albumin. 2003-2013. PhospoSite. Cell Signaling Technology.

<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=6883&showAllSites=true> (24.2.2015)

- Arner R.J., Prabhu K.S., Reddy C.C. 2004. Molecular cloning, expression, and characterization of myo-inositol oxygenase from mouse, rat, and human kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 4: 1386-1392
- Asante E.A., Hill W.G., Bulfield G. 1989. Analysis of lines of mice selected for fat content. Correlated responses in the activities of NADPH-generating enzymes. *Genetical Research*, 54: 155-160
- Barandier C., Montani J.P., Yang Z. 2005. Mature adipocytes and perivascular adipose tissue stimulate vascular smooth muscle cell proliferation: effects of aging and obesity. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 289, 5: H1807-1813
- Barsh G.S., Schwartz M.W. 2002. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Reviews Genetics* 3: 589-600
- Bishop J.R., Schuksz M., Esko J.D. 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 26, 446, 7139:1030-1037
- Bolliger M.F., Martinelli D.C., Südhof T.C. 2010. The cell-adhesion G protein-coupled receptor BAI3 is a high-affinity receptor for C1q-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 6: 2534–2539
- Bornstein S.R., Uhlmann K., Haidan A., Ehrhart-Bornstein M., Scherbaum W.A. 1997. Evidence for a Novel Peripheral Action of Leptin as a Metabolic Signal to the Adrenal Gland: Leptin Inhibits Cortisol Release Directly. *Diabetes*, 46, 7: 1235-1238
- Boudarine M., Yegorov O., Sterling-Dubrovsky A., Devi L.A., Berman Y. 2002. Developmental changes in opioid peptides and their receptors in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice lacking peptide processing enzyme carboxypeptidase E. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 303, 3: 1317-24

- 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
- Bünger L., Hill W.G. 2005. Genetics of body composition and metabolic rate. V: *The mouse in animal genetics and breeding research*. Eisen E.J. (ur.). London, Imperial College Press: 131-160
- Campfield L.A., Smith F.J., Guisez Y., Devos R., Burn P. 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269, 5223: 546-549
- Cantó C., Houtkooper R.H., Pirinen E., Youn D.Y., Oosterveer M.H., Cen Y., Fernandez-Marcos P.J., Yamamoto H., Andreux P.A., Cettour-Rose P., Gademann K., Rinsch C., Schoonjans K., Sauve A.A., Auwerx J. 2012. The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metabolism*, 15, 6: 838-847
- Christians J.K., Hoeflich A., Keightley P.D. 2006. *PAPPA2*, an enzyme that cleaves an insulin-like growth-factor-binding protein, is a candidate gene for quantitative trait locus affecting body size in mice. *Genetics* 173: 1547-1553
- Coleman J.A., Quazi F., Molday R.S. 2013. Mammalian P₄-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831, 3: 555–574
- Darvasi A. 2005. Dissecting complex traits: the geneticists' »Around the world in 80 days«. *Trends in Genetics*, 20, 7: 373-376
- de Jong S., Kas M.J., Kiernan J., de Mooij-van Malsen A.G., Oppelaar H., Janson E., Vukobradovic I., Farber C.R., Stanford W.L., Ophoff R.A. 2011. Hippocampal gene expression analysis highlights *Ly6a/Sca-1* as candidate gene for previously mapped novelty induced behaviors in mice. *Plos One*, 6, 6: e20716

- Delvecchio C.J., Bilan P., Nair P., Capone J.P. 2008. LXR-induced reverse cholesterol transport in human airway smooth muscle is mediated exclusively by ABCA1. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295, 5: 949-957
- DiPetrillo K., Xiaosong W., Stylianou I.M., Paigen B. 2005. Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. *Trends in Genetics*, 21, 12: 683-692
- Evans R.M., Barish G.D., Wang Y. 2004. PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine*, 10: 355-361
- Ferraro T.N., Golden G.T., Smith G.G., Martin J.F., Lohoff F.W., Gieringer T.A., Zamboni D., Schwebel C.L., Press D.M., Kratzer S.O., Zhao H., Berrettini W.H., Buono R.J. 2004. Fine mapping of a seizure susceptibility locus on mouse Chromosome 1: nomination of *Kcnj10* as a causative gene. *Mammalian Genome* 15, 4: 239-251
- Fisler J.S., Warden C.H. 1997. Mapping of mouse obesity genes: a genetic approach to a complex trait. *Journal of Nutrition*, 127: 1909-1916
- Flint J., Mott R. 2001. Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nature Review Genetics*, 2: 437-445
- Flint J., Valdar W., Shifman S., Mott R. 2005. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nature Review Genetics*, 6: 271-286
- Gesta S., Tseng Y.H., Kahn C.R. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 131, 2: 242-256
- Ghazalpour A., Doss S., Zhang B., Wang S., Plaisier C., Castellanos R., Brozell A., Schadt E.E., Drake T.A., Lusis A.J., Horvath S. 2006. Integrating genetic and network analysis to characterize gene related to mouse obesity. *Plos Genetics*, 2, 8: 1-11

- Goldman C. K., Marino L., Leibowitz S. F. 1985. Postsynaptic α_2 -noradrenergic receptors mediate feeding induced by paraventricular nucleus injection of norepinephrine and clonidine. *European Journal of Pharmacology*, 115, 11–19
- Grupe A., Germer S., Usuka J., Aud D., Belknap J.K., Klein R.F., Ahluwalia M.K., Higuchi R., Peltz G. 2001. In silico mapping of complex disease-related traits in mice. *Science*, 292: 1915-1918
- Han L.K., Sumiyoshi M., Takeda T., Chihara H., Nishikiori T., Tsujita T., Kimura Y., Okuda H. 2000. Inhibitory effects of chondroitin sulfate prepared from salmon nasal cartilage on fat storage in mice fed a high-fat diet. *Journal of Obesity*, 24, 9: 1131-1138
- Han L.K., Kimura Y., Okuda H. 2005. Anti-obesity effects of natural products. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30: 79–110
- Hill J.W., Williams K.W., Ye C., Luo J., Balthasar N., Coppari R., Cowley M.A., Cantley L.C., Lowell B.B., Elmquist J.K. 2008. Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118, 5: 1796–1805
- Horvat S., Bünger L., Falconer M.V., 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: 2-7
- Hu E., Liang P., Spiegelman B.M. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 18: 10697-10703
- Hu W., Li L., Yang M., Luo X., Ran W., Liu D., Xiong Z., Liu H., Yang G. 2013. Circulating Sfrp5 is a signature of obesity-related metabolic disorders and is regulated by glucose and liraglutide in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98, 1: 290-298

- Huang D., Khoe M., Ilic D., Bryer-Ash M. 2006. Reduced expression of focal adhesion kinase disrupts insulin action in skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 147,7: 3333-3343
- Huang J., Pashkov V., Kurrasch D.M., Yu K., Gold S.J., Wilkie T.M. 2006. Feeding and fasting controls liver expression of a regulator of G protein signaling (Rgs16) in periportal hepatocytes. *Comparative Hepatology*, 5:8-19
- Idiopathic. 2015. Merriam-Webster
<http://www.merriam-webster.com/dictionary/idiopathic> (15.04.2015)
- Janke J., Engeli S., Boschmann M., Adams F., Böhnke J., Luft F.C., Sharma A.M., Jordan J. 2006. Retinol-Binding Protein 4 in Human Obesity. *Diabetes*, 55, 10: 2805-2810
- Kanner J., Harel S., Granit R. 2001. Betalains--a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 11: 5178-5185
- Karp C.L., Grupe A., Schadt E., Ewart S.L., Keane-Moore M., Cuomo P.J., Köhl J., Wahl L., Kuperman D., Germer S., Aud D., Peltz G., Wills-Karp M. 2000. Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nature Immunology* 1, 3: 221-226
- Kerley-Hamilton J.S., Trask H.W., Ridley C.J., Dufour E., Ringelberg C.S., Nurinova N., Wong D., Moodie K.L., Shipman S.L., Moore J.H., Korc M., Shworak N.W., Tomlinson C.R. 2012. Obesity is mediated by differential aryl hydrocarbon receptor signaling in mice fed a Western diet. *Environmental Health Perspectives*, 120, 9: 1252-1259
- Kershaw E.E, Morton N.M., Dhillon H., Ramage L., Seckl J.R., Flier J.S. 2005. Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-induced obesity. *Diabetes*, 54, 4: 1023-1031

- Klaus S., Casteilla L., Bouillard F., Ricquier D. 1991. The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *International Journal of Biochemistry*, 23: 791–801
- Klein R.F., Allard J., Avnur Z., Nikolcheva T., Rotstein D., Carlos A.S., Shea M., Waters R.V., Belknap J.K., Peltz G., Orwoll E.S. 2004. Regulation of bone mass in mice by the lipoxigenase gene *Alox15*. *Science*, 9, 303, 5655: 229-232
- Knockaert L., Fromenty B., Robin M.A. 2011. Mechanisms of mitochondrial targeting of cytochrome P450 2E1: physiopathological role in liver injury and obesity. *FEBS Journal*, 278, 22: 4252–4260
- Koch C., Augustine R.A., Steger J., Ganjam G.K., Benzler J., Pracht C., Lowe C., Schwartz M.W., Shepherd P.R., Anderson G.M., Grattan D.R., Tups A. 2010. Leptin Rapidly Improves Glucose Homeostasis in Obese Mice by Increasing Hypothalamic Insulin Sensitivity. *The Journal of Neuroscience*, 30, 48: 16180-16187
- Kohsaka A., Laposky A.D., Ramsey K.M., Estrada C., Joshu C., Kobayashi Y., Turek F.W., Bass J. 2007. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metabolism*, 6, 5: 414-421
- Kopelman P.G. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature*, 404, 6778: 635-643
- Korstanje R., Paigen B. 2002. From QTL to gene: the harvest begins. *Nature Genetics*, 31: 235-236
- Koza R.A., Nikonova L., Hogan J., Rim J.S., Mendoza T., Faulk C., Skaf J., Kozak L.P. 2006. Changes in Gene Expression Foreshadow Diet-Induced Obesity in Genetically Identical Mice. *PLoS Genetics*, 2, 5: e81
- Lal K.J., Dakshinamurti K., Thliveris J. 1996. The effect of vitamin B6 on the systolic blood pressure of rats in various animal models of hypertension. *Journal of Hypertension*, 14, 3: 355-63

Landsberg L., Young J. B. 1992. Catecholamines and the adrenal medulla. V Williams Textbook of Endocrinology 8th edn. Wilson, J. D. in Foster, D. W.(eds). W.B. Saunders, Philadelphia: 621–705

Lihn A.S., Pedersen S.B., Richelsen B. 2005. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obesity Reviews*, 6,1: 13-21

Loos R.J., Bouchard C. 2003. Obesity-is it a genetic disorder? *Journal of internal medicine*, 254, 5: 401-25

Loos R.J., Bouchard C. 2008. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obesity Reviews*, 9, 3: 246-250

Matricardi P.M., Grüber C., Wahn U., Lau S. 2007. The asthma-obesity link in childhood: open questions, complex evidence, a few answers only. *Clinical and Experimental Allergy*, 37, 4: 476-484

Mean Body Mass Index (BMI). 2013. Global Health Observatory Data. World Health Organisation.
http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/bmi_text/en/ (10.12.2013)

Mehrabian M., Allayee H., Stockton J., Lum P.Y., Drake T.A., Castellani L.W., Suh M., Armour C., Edwards S., Lamb J., Lusk A.J., Schadt E.E. 2005. Integrating genotypic and expression data in a segregating mouse population to identify 5-lipoxygenase as a susceptibility gene for obesity and bone traits. *Nature Genetics*, 37, 11: 1224-33

Morton N.M., Densmore V., Wamil M., Ramage L., Nichol K., Bünger L., Seckl J.R., Kenyon J.R. 2005. A polygenic model of the metabolic syndrome with reduced circulating and intra-adipose glucocorticoid action. *Diabetes*, 54: 3371-3378

Mott R., Flint J. 2008. Prospects for complex trait analysis in the mouse. *Mammalian Genome*, 19. 306-308

Nfkbil2. 2003-2013. PhosphoSite. Cell Signaling Technology.

<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=15967&showAllSites=true>
(23.2.2015)

Nicholls D. G., Locke R. M. 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiological Reviews*, 64: 1-64

Obesity and overweight. 2015. World Health Organization.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (15.4.2015)

Okada M., Shibuya M., Yamamoto E., Murakami Y. 1999. Effect of diabetes on vitamin B6 requirement in experimental animals. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 1,4: 221-225

Okon E.B., Szado T., Laher I., McManus B., van Breemen C. 2003. Augmented contractile response of vascular smooth muscle in a diabetic mouse model. *Journal of Vascular Research*, 40, 6: 520-530

Oram J.F., Vaughn A.M. 2006. ATP-Binding Cassette Cholesterol Transporters and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 99: 1031-1043

Ouchi N., Higuchi A., Ohashi K., Oshima Y., Gokce N., Shibata R., Akasaki Y., Shimono A., Walsh K. 2010. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science*, 329, 5990: 454-457

Pashkov V., Huang J., Parameswara V.K., Kedzierski W., Kurrasch D.M., Tall G.G., Esser V., Gerard R.D., Uyeda K., Towle H.C., Wilkie T.M. 2011. Regulator of G Protein Signaling (RGS16) Inhibits Hepatic Fatty Acid Oxidation in a Carbohydrate

Response Element-binding Protein (ChREBP)-dependent Manner. The Journal of Biological Chemistry, 286, 15116-15125

Positional Cloning. 2004. A Dictionary of Biology. Encyclopedia.com
<http://www.encyclopedia.com/doc/1O6-positionalcloning.html> (26.01.2015)

Pralong F.P., Roduit R., Waeber G., Castillo E., Mosimann F., Thorens B., Gaillard R.C. 1998. Leptin Inhibits Directly Glucocorticoid Secretion by Normal Human and Rat Adrenal Gland. Endocrinology, 139, 10: 4264-4268

Prentice A.M. 2006. The emerging epidemic of obesity in developing countries. International Journal of Epidemiology, 35, 1: 93-99

Prevoršek Z. 2010. »Shranjevanje vzorcev«. Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko. (osebni vir, julij 2010).

Prevoršek Z., Gorjanc G., Paigen B., Horvat S. 2010. Congenic and bioinformatics analysis resolved a major-effect *Fob3b* QTL on mouse Chr 15 into two closely related loci. Mammalian Genome, 21, 3-4: 172-185

Primeaux D.S., Barnes M.J., Bray G.A. 2007. Olfactory bulbectomy increases food intake and hypothalamic neuropeptide Y in obesity-prone but not obesity-resistant rats. Behavioural Brain Research, 180, 2: 190-196

Rashid A., Wu T.C., Huang C.C., Chen C.H., Lin H.Z., Yang S.Q., Lee F.Y., Diehl A.M. 1999. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. Hepatology, 29, 4: 1131-1138

Richardson B.E., Vander Woude E.A., Sudan R., Thompson J.S., Leopold D.A. 2004. Altered Olfactory Acuity in the Morbidly Obese. Obesity Surgery, 14, 7: 967-969

Rikke B.A., Johnson T.E. 1998. Towards the cloning of genes underlying murine QTLs. *Mammalian Genome*, 9: 963-968

RNA integrity number (RIN) – Standardization of RNA quality control. 2004. Agilent.
<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-1165EN.pdf> (8.8.2010)

Schadt E.E. 2006. Novel integrative genomics strategies to identify genes for complex traits. *Animal Genetics*, 37: 18-23

Schulte D.M., Müller N., Neumann K., Oberhäuser F., Faust M., Güdelhöfer H., Brandt B., Krone W., Laudes M. 2012. Pro-inflammatory wnt5a and anti-inflammatory sFRP5 are differentially regulated by nutritional factors in obese human subjects. *PLoS One*, 7, 2: e32437

Shelley P., Martin-Gronert M.S., Rowleson A., Poston L., Heales S.J., Hargreaves I.P., McConnell J.M., Ozanne S.E., Fernandez-Twinn D.S. 2009. Altered skeletal muscle insulin signaling and mitochondrial complex II-III linked activity in adult offspring of obese mice. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297, 3: R675-681

Shimabukuro M., Ohneda N., Lee Y., Unger R.H. 1997. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 2: 290-295

Simončič M. 2008. Molekularna in fiziološka osnova nalaganja maščevja pri poligenem modelu miši. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, 144 str.

Simončič 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. *Behavioral Genetics* 38: 292-300

- Speakman J.R. 2004. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *The Journal of nutrition*, 134, 8: 2090S-2105S
- Stratakis C.A., Taymans S.E., Daruwala R., Song J., Levine M. 2000. Mapping of the human genes (*SLC23A2* and *SLC23A1*) coding for vitamin C transporters 1 and 2 (SVCT1 and SVCT2) to 5q23 and 20p12, respectively. *Journal of medical Genetics*, 37: 20-23
- Stylianou I.M., Affourtit J. P., Shockley K.R., Wilpan R.J., Abdi F.A., Bhardwaj S., Rollins J., Churchill G.A., Paigen B. 2008. Applying gene expression, proteomics and single-nucleotide polymorphism analysis for complex trait gene identification. *Genetics*, 178: 1795-1805
- Stylianou I.M., Christians J.K., Keightley P.D., Bünger L., Clinton M., Bulfield G., Horvat S. 2004a. Genetic complexity of an obesity QTL (*Fob3*) revealed by detailed genetic mapping. *Mammalian Genome*, 15: 472-481
- Stylianou I.M., Clinton M., Keightley P.D., Pritchard C., Tymowska-Lalanne Z., Bünger L., Horvat S. 2004b. Microarray gene expression analysis of the *Fob3b* obesity QTL identifies positional candidat gene *Sqle* and perturbed cholesterol and glycolysis pathways. *Physiological Genomics*, 20: 224-232
- Van Gaal L.F., Mertens I.L., De Block C.E. 2006. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444, 875-880
- Wang Y.X., Lee C.H., Tjep S., Yu R.T., Ham J., Kang H., Evans R.M. 2003. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, 113, 2: 159-170
- Watson, R.T., Shigematsu, S., Chiang, S.H., Mora, S., Kanzaki, M., Macara, I.G., Saltiel, A.R., Pessin, J.E. 2001. Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is

required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *Journal of Cell Biology*, 154, 4: 829-840

Wilkie T., Pashkov T., Esser V., Uyeda K., Huang J. 2008. RGS/G-protein control of liver carbohydrate and fatty acid metabolism. *The FASEB Journal*, 22: 614-622

Yalcin B., Willis-Owen S.A.G., Fullerton J., Meesaq A., Deacon R.M., Rawlins J.N.P., Copley R.R., Morris A.P., Flint J., Mott R. 2004. Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety in mice. *Nature Genetics*, 36, 11: 1197-1202

Yamada Y., Fuku N., Tanaka M., Aoyagi Y., Sawabe M., Metoki N., Yoshida H., Satoh K., Kato K., Watanabe S., Nozawa Y., Hasegawa A., Kojima T. 2009. Identification of *CELSR1* as a susceptibility gene for ischemic stroke in Japanese individuals by a genome-wide association study. *Atherosclerosis*, 207, 1: 144-149

Yang R.Y., Yu L., Graham J.L., Hsu D.K., Kent 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. *PNAS*, 108, 46: 18696–18701

Ziouzenkova O., Orasanu G., Sharlach M., Akiyama T.E., Berger J.P., Viereck J., Hamilton J.A., Tang G., Dolnikowski G.G., Vogel S., Duyster G., Plutzky J. 2007. Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nature Medicine*, 13, 6: 695-702

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Simonu Horvatu za pomoč in strokovne nasvete pri izvedbi in pisanju diplomskega dela.

Recenzentki prof. dr. Damjani Rozman se zahvaljujem za hiter pregled in predloge za izboljšanje diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi dr. Zali Prevoršek in dr. Roku Koširju za pomoč in nasvete pri opravljanju laboratorijskega dela.

Zahvaljujem se tudi dr. Petru Juvanu za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Za pomoč se zahvaljujem tudi Heleni Klavžar iz Centra za funkcijsko genomiko in biočipe.

Zahvaljujem se tudi staršema za moralno in finančno pomoč.

Hvala vsem, ki ste kakorkoli z nasveti, spodbudo ali zabavnimi trenutki, sodelovali pri nastajanju naloge.

PRILOGA

PRILOGA A: Genotipi izbranih tkiv in masa maščobnih depojev

Linija 15FHG, F2, samice								
ID	Tkivo			Genotip	Masa maščobnih depojev (mg)			
	Možgani	Jetra	Gonadalna maščoba		Gonadalna maščoba	Abdominalna maščoba	Femoralna maščoba	Mezenterialna maščoba
15FHG10-F2 7A (3c)	/	/	DA	FF	423	196	500	320
15FHG10-F2 10B (30c)	/	/	DA	LL	366	158	312	211
15FHG10-F2 10C (10c)	/	/	DA	LL	233	115	198	165
15FHG10-F2 15A (30c)	/	/	DA	FF	471	300	455	330
15FHG10-F2 15B (10c)	DA	DA	DA	LL	302	152	304	207
15FHG10-F2 15C (1c)	DA	DA	DA	FF	392	214	354	331
15FHG10-F2 20A (10c)	DA	DA	/	LL	299	284	380	336
15FHG10-F2 20B (4c)	DA	DA	/	LL	260	219	265	293
15FHG10-F2 20D (3c)	DA	DA	/	FL	450	239	426	368
15FHG10-F2 8A (3c)	DA	DA	/	LL	295	169	320	173
15FHG10-F2 8B (10c)	DA	DA	/	FF	444	216	400	391
15FHG10-F2 8C (11c)	DA	DA	/	FF	387	230	384	325
15FHG10-F2 8D (4c)	DA	DA	/	LL	298	198	357	274

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJA BIOTEHNOLOGIJE

Katarina CIRNSKI

**IDENTIFIKACIJA KANDIDATNIH GENOV ZA
KVANTITATIVNA LOKUSA *Fob3b1* in *Fob3b2*
DEBELOSTI Z UPORABO KONGENIH MIŠJIH
LINIJ IN EKSPRESIJSKIH MIKROMREŽ**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015