



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nina OGRIN

**VPLIV GENA *Crem* NA CIRKADIANO IZRAŽANJE  
IZBRANIH GENOV CENTRALNE URE IN  
METABOLIZMA PRI MIŠIH (*Mus musculus*)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nina OGRIN

**VPLIV GENA *Crem* NA CIRKADIANO IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV  
CENTRALNE URE IN METABOLIZMA PRI MIŠIH (*Mus musculus*)**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

**THE ROLE OF GENE *Crem* IN CIRCADIAN EXPRESSION OF SELECTED  
CLOCK IN METABOLIC GENES IN MICE (*Mus musculus*)**

M.Sc. THESIS  
Master Study Programmes - Biotechnology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje - Biotehnologija. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Centru za funkcijsko genomiko in bio-čipe.

Študijska komisija Študija biotehnologije je za mentorja magistrskega dela imenovala dr. Simona Horvata in za somentorico dr. Damjano Rozman.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Branka Javornik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Simon Horvat  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof.dr. Damjana Rozman  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Član: doc. dr. Nataša Debeljak  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum predstavitve:

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

Nina Ogrin

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	575(043.2)
KG	fiziologija/biološkki ritmi/cirkadiani ritem/genetika/linija z izničenim genom <i>Crem</i> /multipla regresija/laboratorijske miši
AV	OGRIN, Nina, dipl. bioteh. (UN)
SA	HORVAT, Simon (mentor)/ROZMAN, Damjana (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2013
IN	VPLIV GENA <i>Crem</i> NA CIRKADIANO IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV CENTRALNE URE IN METABOLIZMA PRI MIŠIH ( <i>Mus musculus</i> )
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija)
OP	XIII, 81 str., 6 pregl., 52 sl., 5 pril., 67 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Cirkadiani ritem je eden od bioloških ritmov, ki je povezan z menjavo dneva in noči ter je pomembna pridobitev v razvoju živih bitij, saj se organizmi z izraženim cirkadianim spremenjanjem fizioloških procesov laže prilagajajo na periodično spremenjajoče se razmere v okolju.. Za medicino so cirkadiani ritmi pomembni tudi zaradi časa pojavljanja nekaterih bolezni, njihove diagnoze in zdravljenja. V magistrskem delu smo preverjali kakšen vpliv na izbrane gene cirkadiane ure in metabolizma ima transkripcijski faktor CREM, za katerega je bilo ugotovljeno, da ima pomembno vlogo v prenašanju signalov pomembnih za metabolizem. Vendar se je izkazal za manj pomemben člen v regulaciji cirkadianega ritma pri miši v jetrih in nadledvičnih žlezah. Statistično smo dokazali vpliv CREM na gen <i>Per3</i> , rezultati pa nakazujejo tudi na določen vpliv na nekatere druge gene ( <i>Per2</i> , <i>Cyp1</i> , <i>Cyp2</i> , <i>Dbp</i> , <i>Dec1</i> , <i>Bmal</i> , <i>ReverbA</i> , <i>Cyp11b2</i> , <i>Cyp17a1</i> in <i>Cyp39a1</i> ).

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2  
DC 575(043.2)  
CX physiology/biological rhythms/circadian rhythm/genetics/strain with a knockout  
Crem gene/multiple regression/laboratory mice  
AU OGRIN, Nina  
AA HORVAT, Simon (supervisor)/ ROZMAN, Damjana (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study in Biotechnology  
PY 2013  
TY THE ROLE OF GENE *Crem* IN CIRCADIAN EXPRESSION OF SELECTED  
CLOCK AND METABOLIC GENES IN MICE (*Mus musculus*)  
DT M.Sc. Thesis (Master Study Programmes – Field Biotechnology)  
NO XIII, 81 p., 6 tab., 52 fig., 5 ann., 67 ref.  
LA sl  
AI sl/en  
AB Circadian rhythm is one of biological rhythms, which is connected with the change of day and nights, and is an important asset in the development of living organisms, because organisms with expressed circadian variation of physiological processes are better adapted to periodically changing environmental conditions. Circadian rhythms are also important for medicine because of the occurrence period for certain diseases, their diagnosis and treatment. In this thesis, we examined the impact of a transcription factor CREM in circadian expression of selected clock genes and metabolic genes, which has been found to play an important role in the transmission of signals which are important for metabolism. It turned out that CREM plays less important role in the regulation of circadian rhythms in mice liver and adrenal glands. We have detected a statistically important impact of CREM on *Per3*. The results also indicate a specific effect on some of the other genes (*Cyp1*, *Cyp2*, *Dbp*, *Dec1*, *Bmal*, *ReverbA*, *Cyp11b2*, *Cyp17a1* in *Cyp39a1*).

## KAZALO VSEBINE

str.	
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO PREGLEDNIC .....	VIII
KAZALO SLIK .....	IX
KAZALO PRILOG .....	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XIII
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 FIZIOLOGIJA CIRKADIANIH UR .....	3
2.2 SUPRAKIAZMATIČNO JEDRO .....	3
2.3 PERIFERNI CIRKADIANI OSCILATORJI .....	4
2.4 MOLEKULARNO BIOLOŠKO URAVNAVANJE CIRKADIANE URE .....	6
2.5 CIRKADIANI RITEM IN cAMP .....	8
2.6 TRANSKRIPCIJSKI FAKTOR CREM .....	8
2.7 VLOGA GENA CREM V RAZLIČNIH TKIVIH .....	10
<b>2.7.1 Jetra .....</b>	<b>11</b>
<b>2.7.2 Nadledvična žleza .....</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>15</b>
3.1 SHEMA DELA .....	15
3.2 POSKUSNE ŽIVALI .....	16
3.3 CIRKADIANO VZORČENJE .....	16
3.4 ODVZEM TKIV .....	17
3.5 IZOLACIJA RNA .....	17
3.6 DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN KVALITETE IZOLIRANE RNA .....	18
<b>3.6.1 Določanje koncentracije in čistosti RNA .....</b>	<b>18</b>
<b>3.6.2 Preverjanje kvalitete RNA na čipu AGILENT .....</b>	<b>19</b>
3.7 REAKCIJA Z DNAZO IN SINTEZA cDNA .....	19
3.8 KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (qPCR) .....	20

<b>3.8.1 Izbor in validacija začetnih oligonukleotidov.....</b>	<b>22</b>
3.9 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....	23
<b>3.9.1 Relativna kvantifikacija .....</b>	<b>23</b>
<b>3.9.2 Statistično modeliranje cirkadianega ritma .....</b>	<b>24</b>
<b>3.9.3 Statistična obdelava za mase miši in organov .....</b>	<b>25</b>
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>26</b>
4.1 PREVERJANJE VPLIVA GENA CREM NA TELESNO MASO IN MASO ORGANOV .....	26
4.2 KONCENTRACIJA IN ČISTOST RNA.....	28
4.3 IZBRANI GENI V JETRIH IN NADLEDVIČNI ŽLEZI .....	30
4.4 IZRAŽANJE GENOV CIRKADIANE URE V JETRIH IN ADRENALNI ŽLEZI .....	32
<b>4.4.1 <i>Per1</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4.2 <i>Per2</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>4.4.3 <i>Per3</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.4 <i>Dbp</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4.5 <i>Bhlhe40 (Dec1)</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.6 <i>Bhlh41 (Dec2)</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.7 <i>Arnt1 (Bmal)</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4.8 <i>Cry1</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.9 <i>Cry2</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4.10 <i>ReverbA (Nr1d1)</i>.....</b>	<b>50</b>
4.5 IZRAŽANJE GENOV UDELEŽENIH V SINTEZO HOLESTEROLA V JETRIH .....	52
<b>4.5.1 <i>Cyp51</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>4.5.2 <i>Hmgcr</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>4.5.3 <i>Por</i>.....</b>	<b>53</b>
4.6 IZRAŽANJE GENOV UDELEŽENIH V SINTEZO ŽOLČNIH KISLIN V JETRIH .....	54
<b>4.6.1 <i>Cyp7a1</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>4.6.2 <i>Cyp8b1</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>4.6.3 <i>Cyp27a1</i> .....</b>	<b>56</b>
4.7 IZRAŽANJE GENOV JEDRNIH RECEPTORJEV V JETRIH .....	57
<b>4.7.1 <i>Rxr</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>4.7.2 <i>PparA</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>4.7.3 <i>PparG</i> .....</b>	<b>58</b>

<b>4.7.4</b>	<b><i>Pgc1a</i></b> .....	<b>59</b>
<b>4.7.5</b>	<b><i>Car</i></b> .....	<b>59</b>
<b>4.7.6</b>	<b><i>Srebp2</i></b> .....	<b>60</b>
4.8	IZRAŽANJE GENOV UDELEŽENIH V SINTEZO STEROIDNIH HORMONOV V NADLEDVIČNI ŽLEZI.....	61
<b>4.8.1</b>	<b><i>Cyp11a1</i></b> .....	<b>61</b>
<b>4.8.2</b>	<b><i>Cyp11b2</i></b> .....	<b>62</b>
<b>4.8.3</b>	<b><i>Cyp17a1</i></b> .....	<b>63</b>
<b>4.8.4</b>	<b><i>Cyp21a1</i></b> .....	<b>63</b>
<b>4.8.5</b>	<b><i>Cyp39a1</i></b> .....	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b> .....	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b> .....	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>76</b>
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Reakcijska mešanica sestavin za reakcijo z DNazo in sintezo cDNA .....	20
Preglednica 2: Reakcijska mešanica sestavin za qPCR.....	21
Preglednica 3: Število miši in povprečna masa po genotipu.....	27
Preglednica 4: Število vzorcev in povprečna masa po genotipu .....	28
Preglednica 5: Izbrani geni pri katerih smo merili izražanje v jetrih in nadledvični žlezi .....	31
Preglednica 6: Geni razporejeni po skupinah ter statistični rezultati .....	65

## KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Organizacija cirkadiane ure pri sesalcih.....	5
Slika 2: Osnovni mehanizem cirkadiane ure .....	7
Slika 3: Zgradba gena <i>Crem</i> in njegove izoblike .....	10
Slika 4: PPAR $\gamma$ cirkadiano uravnava sintezo holesterola in žolčnih kislin.....	12
Slika 5: Shema eksperimentalnega dela .....	15
Slika 6: Svetlobni pogoji pri cirkadianih študijah .....	16
Slika 7: Kosinusna funkcija uporabljena za prikaz cirkadianega nihanja .....	24
Slika 8: Primerjava mas miši WT in KO.....	27
Slika 9: Primerjava relativnih mas jeter in nadledvičnih žlez med linijama WT in KO .....	28
Slika 10: Elektroferogrami naključno izbranih vzorcev s pripadajočimi vrednostmi RIN .....	29
Slika 11: Izražanje gena <i>Per1</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	33
Slika 12: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen <i>Per1</i> v jetrih:A-mesinor, B-amplituda, C- faza.....	33
Slika 13: Izražanje gena <i>Per2</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	34
Slika 14: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen <i>Per2</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah:A-mesinor, B-amplituda, C- faza .....	35
Slika 15: Izražanje gena <i>Per3</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	36
Slika 16: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen <i>Per3</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah:A-mesinor, B-amplituda, C- faza .....	37
Slika 17: Izražanje gena <i>Dbp</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	38
Slika 18: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen <i>Dbp</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah:A-mesinor, B-amplituda, C- faza .....	39
Slika 19: Izražanje gena <i>Dec1</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	40

Slika 20: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen <i>Dec1</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah:A-mesinor, B-amplituda, C- faza .....	41
Slika 21: Izražanje gena <i>Dec2</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	42
Slika 22: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen <i>Dec2</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah:A-mesinor, B-amplituda, C- faza .....	43
Slika 23: Izražanje gena <i>Bmal</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	44
Slika 24: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen <i>Bmal</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah:A-mesinor, B-amplituda, C- faza .....	45
Slika 25: Izražanje gena <i>Cry1</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	46
Slika 26: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen <i>Cry1</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah:A-mesinor, B-amplituda, C- faza .....	47
Slika 27: Izražanje gena <i>Cry2</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	48
Slika 28: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen <i>Cry2</i> v nadledvičnih žlezah:A-mesinor, B-amplituda, C- faza.....	49
Slika 29: Izražanje gena <i>ReverbA</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	50
Slika 30: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen <i>ReverbA</i> v jetrih in nadledvičnih žlezah:A-mesinor, B-amplituda, C- faza .....	51
Slika 31: Izražanje gena <i>Cyp51v</i> jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess.....	52
Slika 32: Izražanje gena <i>Hmgcr</i> v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	53
Slika 33: Izražanje gena <i>Por</i> v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	53
Slika 34: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gena <i>Por</i> v jetrih: A-mesinor, B-amplituda, C- faza.....	54
Slika 35: Izražanje gena <i>Cyp7a1</i> v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess.....	54
Slika 36: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gena <i>Cyp7a1</i> v jetrih: A-mesinor, B-amplituda, C- faza.....	55
Slika 37: Izražanje gena <i>Cyp8b1</i> v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess.....	55

Slika 38: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gena <i>Cyp8b1</i> v jetrih: A-mesinor, B-amplituda, C-faza.....	56
Slika 39: Izražanje gena <i>Cyp27a1</i> v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess.....	56
Slika 40: Izražanje gena <i>Rxr</i> v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	57
Slika 41: Izražanje gena <i>PparA</i> v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess.....	58
Slika 42: Izražanje gena <i>PparG</i> v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	58
Slika 43: <i>Pgc</i> Izražanje gena <i>Pgc1a</i> v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess.....	59
Slika 45: Izražanje gena <i>Srebp2r</i> v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	60
Slika 44: Izražanje gena <i>Car</i> v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	60
Slika 46: Izražanje gena <i>Cyp11a1</i> v nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	61
Slika 47: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gena <i>Cyp11a1</i> v nadledvičnih žlezah: A-mesinor, B-amplituda, C-faza.....	62
Slika 48: Izražanje gena <i>Cyp11b2</i> v nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	62
Slika 49: Izražanje gena <i>Cyp17a1</i> v nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	63
Slika 50: Izražanje gena <i>Cyp21a1</i> v nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	64
Slika 51: Izražanje gena <i>Cyp39a1</i> v nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess .....	64
Slika 52: Shema medsebojnega vpliva genov cirkadalne ure .....	71

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Vzorci uporabljeni v poskusu

Priloga B: Seznam oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za merjenje izražanja izbranih genov centralne ure in metabolizma (povzeto po Košir, 2011)

Priloga C: Masa miši in organov

Priloga D: Rezultat spektrofotometrične analize, s katero smo določili čistost in koncentracijo RNA iz jeter LD miši

Priloga E: Izražanje izbranih genov v jetrih in nadledvičnih žlezah WT in KO

### OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACTH	adrenokortikotropni hormon , angl. adrenocorticotropic hormone
ANOVA	analiza variance; angl. analysis of variance
AMP	adenin monofosfat, angl. adenine monophosphate
ATF-1	transkripcijski faktor-1, angl. Activating transcriptional factor 1
ATP	adenin trifosfat, angl. adenine triphosphate
AVP	vazopresin, angl. arginine vasopressin
cAMP	ciklični adenozin monofosfat, angl. cyclic adenosine monophosphate
cDNA	komplementarna DNA, angl. complementary DNA
Cq	pražni cikel, angl. quantification cycle
CRE	cAMP odzivni element; angl. cAMP response element
CREM	modulator cAMP odzivnega elementa; angl. cAMP response element modulator
CREB	vezavni protein odzivnega elementa na cAMP
CRH	kortikotropin ali sproščajoči hormon, angl. corticotropin-releasing hormone)
CT	cirkadiani čas
CYP	citokrom P450
CYP51	lanosterol -14a-demetilaza; angl. lanosterol-14a-demethylase
DBP	albumin vezavni protein, angl. albumin D-box binding protein
DEPC	dietilpirokarbonat, angl. diethylphirocarbonat
DNA	deoksiribonukleinska kislina, angl. deoxyribonucleic acid
DNaza	deoksiribonukleaza
DTT	ditiotreitol
GDP	gvanin difosfat, angl. guanine diphosphate
GTP	gvanin trifosfat, angl. guanine triphosphate
HMGCR	3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktaze, angL.: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reduktaze
HPA	hipotalamus- hipofiza- nadledvična žleza, ang.:hypothalamic–pituitary–adrenal axis
ICER	inducibilni cAMP zgodnji represor; angl. inducible cAMP early repressor
KID	kinaze inducabilna domena, angl kinase inducible domain
KO	miši z izničenim genom Crem; angl. Crem-knock-out

LD	light – dark: pogoji 12 ur svetlobe in 12 ur teme
mRNA	informacijska RNA, angl. messenger RNA
PCR	verižna reakcija s polimerazo; angl. polymerase chain reaction
<i>Per</i>	gen <i>Period</i>
PPAR	receptor delitve peroksisoma, angl.: peroxisome proliferator-activated receptor
pRGC	fotoreceptroske celice angl. photosensitive retinal ganglion cells
qPCR	kvantitativni PCR v realnem času, angl. quantitative PCR
PVN	paraventrikularno jedro hipotalamusa, angl. paraventricular nucleus
RIN	vrednost razgrajenosti RNA, angl. RNA integrity number
RORE	receptorski odgovor, angl. retinotic acid-related orphan receptor response
RNA	ribonukleinska kislina, angl. ribonucleic acid
SCN	suprakiazmatično jedro; angl. suprachiasmatic nucleus
tRNA	prenašalna RNA, angl. transfer RNA
WT	divja linija; angl. wild-type

## 1 UVOD

*Circa dies* v latinščini pomeni okoli dneva (lat. *circa* - okoli, *dies* – dan). Nekateri fiziološki, vedenjski in biokemični procesi v telesu potekajo v približno 24 urnih ciklih, zato jih imenujemo cirkadiani cikli oz. ritmi. Mednje spadajo npr. menjava spanja in budnosti, stanja zavesti, nihanje telesne temperature, nivoji raznolikih hormonov, krvnega tlaka, srčne frekvence, pojavljanje lakote itd. Znanih je več kot 100 bioloških procesov, ki se odvijajo v cirkadianem ritmu (Španinger in sod., 2009).

Cirkadiani ritem je osnovna prilagoditev na izmenjavo dneva in noči, zato so ti biološki ritmi pomembna pridobitev v evoluciji, saj se organizmi z njihovo pomočjo lažje prilagajajo na periodično spreminjajoče se razmere v okolju in učinkovitejše porabljajo energijo. Biološke ritme delimo v dve skupini: zunanje in notranje. Zunanji ritmi nastanejo kot neposredna posledica delovanja okolice (npr. svetloba, temperatura), notranji ritmi pa sledijo notranji biološki urki. Notranji biološki ritmi se vzdržujejo tudi v primeru, kadar odstranimo vse dražljaje iz okolice. Biološki ritmi se znotraj celotnega organizma in znotraj posameznih celic ponavljajo s frekvencami od nekaj let do nekaj milisekund. Najbolj znana cirkadiana ritma pri človeku sta ritem spanja in budnosti ter ritem telesne temperature. Vzporedno z navedenima potekajo še številni drugi ritmi. Na ritem budnosti in spanja je vezan npr. ritem hranjenja s periodičnim javljanjem lakote in z njim povezani prebavni ritmi črevesja, kakor tudi ritem lokomotorne dejavnosti, ki je povezan z lego ali držo telesa (Colten in Altevogt, 2006).

V medicini so cirkadiani ritmi pomembni zaradi časovno določenega pojavljanja bolezni ter s tem v zvezi diagnostike zdravljenja. Znano je, da lahko srčno ali možgansko kap, ki se pogosteje pojavljata zjutraj, sprožijo fiziološki procesi s cirkadianim nihanjem, npr. jutranje naraščanje krvnega tlaka in srčne frekvence, žilnega tonusa ali agregabilnosti trombocitov, kar je mogoče uporabiti v diagnostične ali terapevtske namene. Podoben primer je zdravljenje hiperholesterolemije, kjer se težave bolezenskega stanja pojavljajo v različnih fazah dneva, zato naj bi zdravila jemali času primerno (Španinger in sod., 2009).

Osrednja cirkadiana ura in njen molekularni mehanizem je že precej raziskan, manj pa so poznani medsebojni vplivi cirkadianega ritma, presnove in genskega ozadja. Signalne poti v celicah uravnavajo kompleksne procese, hkrati pa celicam omogočajo neposredno

prilagajanje spremembam v okolju. Končni člen signalnih poti so velikokrat transkripcijski faktorji, njihova ne/aktivnost pa je uravnavana preko aktivacije specifičnih signalnih poti. Ena takšnih družin so od cAMP odzivni transkripcijski faktorji, sem pa spadajo CREB (angl. cAMP responsive element binding protein), CREM (angl. cAMP responsive element modulator) in ATF-1 (angl. activating transcriptional factor 1). Za vse, še posebno za *Crem*, je značilen zapleten proces transkripcije s tvorbo številnih izoform, ki so lahko tako aktivatorji kot inhibitorji prepisovanja DNA (Košir, 2011).

V naši raziskavi smo opazovali izražanje v nadledvičnih žlezah in jetrih ter s tem preverjali ali prihaja do sprememb cirkadianosti oziroma poti prenosa v omenjenih organih.

Nadledvični žlezi in jetra so organi, pri katerih so opazili cirkadiano delovanje, ki je v določenih pogledih ločeno od centralne ure (Lowrey in Takahashi, 2004).

### 1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Cilj pričujočega dela je proučiti vpliv svetlobe in transkripcijskega dejavnika CREM na izražanje izbranih genov centralne biološke ure in genov, ki so povezani s sintezo holesterola, žolčnih kislin in steroidnih hormonov v jetrih in/ali adrenalni žlezi. V izbranih tkivih smo s qPCR izmerili izražanje posameznih genov pri živalih divjega tipa (WT) in živalih z izničenim genom *Crem* (KO). Za vizualizacijo smo izrisali grafe z gladilnikom Loess. Amplitude in faze cirkadianega izražanja smo določili s statističnim modelom in jih za posamezni gen primerjali med WT in KO živalmi in kjer je možno tudi med tkivi. S tem smo preverjali osnovni hipotezi:

Proteini družine CREM imajo:

- v adrenalni žlezi pomembno vlogo v s svetlobo posredovanem cirkadianem izražanju genov;
- v jetrih ne vplivajo na s svetlobo posredovano cirkadiano izražanje genov.

## 2 PREGLED OBJAV

Cirkadiani ritmi se v organizmu in znotraj posameznih celic ponavljajo s frekvencami od nekaj let do nekaj milisekund. Nekateri biološki ritmi so odvisni od dogajanja v okolju. Nanje vplivajo spremembe temperature ozračja, menjava dneva in noči ter menjavanje letnih časov. Raziskave zadnjih nekaj let dokazujejo, da so biološki ritmi pomembni za zdravje in dobro počutje ljudi. Od vseh bioloških ritmov je najbolj raziskan cirkadiani ritem s periodo približno 24 ur (Španinger in sod., 2009; Košir, 2011).

### 2.1 FIZIOLOGIJA CIRKADIANIH UR

Pri ljudeh se večina fizioloških funkcij spreminja sinhrono s ciklusom budnosti in spanja, torej s periodo 24 ur. Periodičnost se ohrani tudi pri tistih, ki živijo v izoliranih prostorih ali jamah, to je v okolju brez časovnih označevalcev pa tudi pri slepih. Vendar se frekvenca njihovega cirkadianega ritma nekoliko razlikuje od 24 ur (navadno je bližja 25 uram). V teh pogojih ritma telesne temperature ter budnosti in spanja sledita eden drugemu (stanje notranje sinhronizacije) (Hastings, 1998).

### 2.2 SUPRAKIAZMATIČNO JEDRO

Cirkadiani ritem je lasten telesu in je prirojen, torej genetsko določen. Takt daje notranja ura s spodbujevalcem / ritmovnikom v suprahiazmatičnem jedru (SCN) medmožganov, katerega dejavnost spodbuja osvetljenost mrežnice, zavira pa melatonin iz epifize. Melatonin je hormon, derivat serotonina, ki ga izloča žleza epifiza v odsotnosti svetlobe in neposredno zavira dejavnost suprahiazmatičnega jedra. Melatonin ima močno hipotermično dejavnost, spodbuja imunski sistem, je močan antioksidant in povzroča utrujenost (Hastings, 1998).

Svetlobna informacija pride do nevronov SCN preko živčnih receptorjev v mrežnici ter po aksonih mrežnično-hipotalamičnega trakta. V mrežnici so v ta namen posebne fotoreceptorske celice pRGC ( angl. Photosensitive retinal ganglion cells), ki izražajo fotopigment melanopsin. Vlakna mrežnično-hipotalamičnega trakta se končujejo direktno na nevronih ventrolateralnega dela SCN ali indirektno, preko intergenikulatnega sloja (IGL). Direktna povezava povzroči sprostitev molekul, ki so vključene v prenos signala preko svetlobe (glutamat, PACAP angl. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide),

kar aktivira številne signalne poti (Hirota in Fukada, 2004) ter povzroči preoblikovanje kromatina in inducira prepisovanje cirkadianih genov ter genov zgodnjega odziva. Električni signal se torej pretvori v kemijskega ter s tem spremeni fazo izražanja cirkadianih genov v nizu nevronov suprahiazmatičnega jedra. Nevroni so tesno skupaj, zato se ta informacija hitro razširi po celotnem SCN, od tod pa v druge možganske regije in v periferne organe preko nevronskih povezav, endokrinih signalov, sprememb telesne temperature ter drugih molekularnih mehanizmov, ki jih sprožijo nihanja v vedenju. Pri bioloških procesih, za katere je značilna 24-urna perioda endogenega cirkadianega ritma, so odkrili tudi nastavljivost (angl. entrainment) osrednje biološke ure s časovnim ritmom zunanjega okolja (Johnson in sod., 2003).

### 2.3 PERIFERNI CIRKADIANI OSCILATORJI

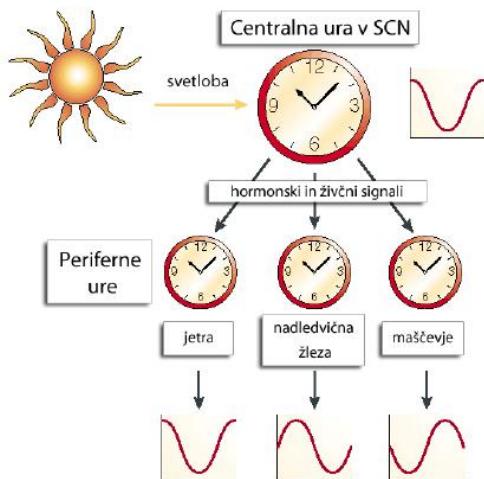
Poleg ritmovnika v suprahiazmatičnem jedru v medmožganih obstajajo pri sesalcih tudi periferni oscilatorji v drugih organih (srce, jetra, ledvica, nadledvični žlezi, črevesje, želodec, mišice ...). Izjema so le moda, kjer ima vsaka posamezna celica znotraj mod avtonomno cirkadiano uro. Ritmovnik v suprahiazmatičnem jedru uravnava periferne oscilatorje preko humoralnih in živčnih poti (Slika 1). Mehanizem delovanja cirkadiane ure je v SCN in perifernih oscilatorjih na molekularni ravni enak. Mreže transkripcijsko-translacijskih povratnih zank so osnova vseh cirkadianih ritmov, in sicer ustvarjajo značilne ekspresijske vzorce glavnih komponent biološke ure. Glavne komponente so geni, katerih proteinski produkti pomagajo pri uravnavanju cirkadianih ritmov v vsaki posamezni celici organizma (Lowrey in Takahashi, 2004).

Z analizo izražanja genov v različnih tkivih so ugotovili, da se izražanje na periferiji razlikuje od glavnega ritmovnika. V različnih tkivih in organih se odvijajo različne funkcije ter posledično s tem cirkadiano uravnavano izražanje različnih genov (Dibner in sod., 2010).

Kljub prisotnosti cirkadiane ure v perifernih tkivih je za njihovo usklajeno delovanje še vedno potrebna prisotnost SCN. Ta periferne ure nadzoruje preko posrednih načinov, kamor spadajo režim hranjenja, režim faze aktivnosti in mirovanja ter nihanje telesne temperature, kot tudi preko neposrednih poti, ki vključujejo hormonske in živčne signale (Košir in sod., 2012).

Poznani so vplivi SCN na periferijo in eden od neposrednih vplivov na obrobne oscilatorje je ritmično izločanje glukokortikoidov. To se lahko spremeni, če organizem izpostavimo svetlobnim pogojem z zamknjeno fazo (Ishida in sod., 2005).

SCN uravnava tudi cirkadiano izražanje hormona melatonina. Največ sinteze le-tega poteka v česariki ter nekaj malega v mrežnici. Raven melatonina je najnižja ob koncu noči oziroma temnega dela dneva. Takrat je raven tako nizka, da ga je težko izmeriti. Melatonin se nikjer ne kopiči, merimo ga v urinu in plazmi, tako da so te koncentracije neposredni pokazatelj ravni sinteze. Razkroj poteka pretežno v jetrih in je precej hiter, saj se deluječi presnovni produkti razgradijo v 20 minutah (Clastrat in sod., 1995). S pomočjo teh produktov se lahko preko SCN in posredno s koncentracijo melatonina v krvi določi dolžino dneva tudi v perifernih organih. Na ta način lahko na biokemijski ravni določijo letni čas in dolžino dneva, kar je pomembno za razmnoževanje pri sezonsko odvisnih vrstah. Medtem je melatonin pri ljudeh pomemben predvsem v ciklu budnosti in spanja. Ugotovljeno je, da je vzrok za slabše spanje pri starostnikih posledica izrazitega padca ravni melatonina (Foulkes in sod., 1997). Poleg tega naj bi imel vlogo tudi pri zaščiti pred rakom, saj zavira nekontrolirano deljenje celic (Hill in Blask, 1988).



Slika 1: Organizacija cirkadiane ure pri sesalcih

Menjava dneva in noči uravnava nihanje glavnega ritmovnika v suprahipazmatičnem jedru (SCN), do koder se signal prenese preko očesne mrežnice in mrežnično-hipotalamičnega trakta. Periferne cirkadiane ure v različnih tkivih se uravnavajo preko hormonskih in živčnih poti (Košir, 2011: 12).

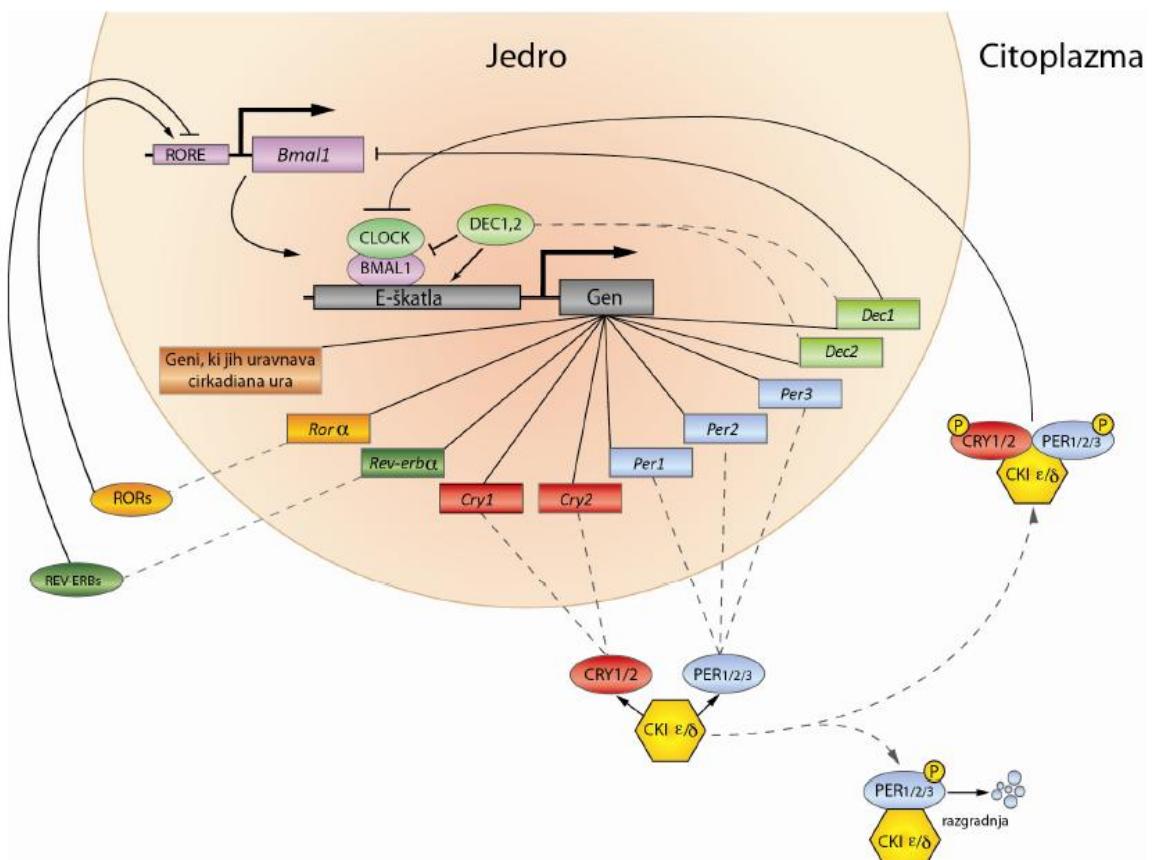
## 2.4 MOLEKULARNO BIOLOŠKO URAVNAVANJE CIRKADIANE URE

Mehanizmi uravnavanja cirkadianega ritma so poznani tudi na molekularni ravni, predvsem uravnavanje izražanja genov ter aktivnosti in količine različnih proteinov. Eden od prvih raziskanih cirkadianih genov je bil gen *Period* (*Per*), ki so ga leta 1984 izolirali iz genoma *Drosophila*-e. Ugotovili so, da prepisovanje gena *Per* uravnava heterodimer BMAL/CLOCK. Oba proteina spadata v skupino cirkadianih transkripcijskih faktorjev, oba z motivom vijačnica-zavoj-vijačnica, ki med sabo interagirata preko PAS-domen. Ta heterodimer poveča prepisovanje gena *Per*, kar vodi do povečane koncentracije proteina PERIOD. Slednji inhibira delovanje heterodimera BMAL/CLOCK in s tem zniža prepisovanje lastnega gena in ostalih BMAL/CLOCK tarčnih genov, ko pa se količina PERIOD proteina v celici zniža do določene mere, se prepisovanje genov uravnnavanih s heterodimerom, ponovno aktivira. Heterodimeri BMAL/CLOCK uravnava jo ritmično izražanje treh genov *Per* in dveh genov *Cry* (Clayton in sod., 2001) (Slika 2). Opisani mehanizem je negativna povratna zanka, v kateri sintetizirani protein zavre prepisovanje lastnega gena. Takšna negativna povratna zanka je osnova vseh cirkadianih ritmov. Celotna zanka poteče v 24 urah, vodijo pa jo posttranslacijske modifikacije kot sta fosforilacija in ubikvitinacija. Ti procesi pripomorejo k njeni točnosti, s tem da vplivajo na stabilnost translokacije proteinov, ki sodelujejo pri ustvarjanju ritmov (Ko in Takahashi, 2006).

Tako genetski kot biokemijski poskusi z vinsko mušico in mišmi so omogočili določitev cirkadianih genov, ki so odgovorni za cirkadiano nihanje. Danes je znana pri sesalcih že cela vrsta cirkadianih genov, ki delujejo kot transkripcijski faktorji: *Clock*, *Bmal*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *ROR- $\alpha$* , *Rev- $\beta$* , *DBP* in *Npas2*. Vsi so visoko evolucijsko ohranjeni (Spaninger in sod., 2009; Košir, 2011).

Heterodimer BMAL/CLOCK inducira tudi drugo znano regulatorno zanko. In sicer kompleks aktivira transkripcijo jedrnih receptorjev *Nr1d1* (na sliki 2 je označen kot *Rev- $\beta$ a*) in *Rora*. Njuna proteina tekmujeta za vezavo na odzivne elemente RORE (angl. Retinoic acid-related orphan receptor response elements) ter tako vplivata na transkripcijo *Bmal1* (Ko in Takahashi, 2006).

Poleg prej omenjenih genov in proteinov pri ustvarjanju ritma sodeluje še več proteinov in mnogih morda niti ne poznamo. Ugotovili so, da je transkripcijski faktor DBP (angl. Albumin D-box binding protein) vključen v regulacijo ure, in sicer z vezavo na promotor gena *Per1* poveča njegovo izražanje. Njegova ekspresija je odvisna od heterodimerov BMAL/CLOCK, PER/CRY in proteina PER1 (Yamaguchi in sod., 2000). Prav tako transkripcijska faktorja BHLHE40 in BHLHE41, znana tudi kot DEC1 in DEC2, sodelujeta pri ustvarjanju ritma. S tekmovanjem za vezavo na E-zaporedja z dimerom BMAL/CLOCK posredno znižujejo izražanje gena *Per1*. Ugotovljeno je bilo, da je njuna ekspresija v suprahiazmatičnem jedru cirkadiana, z vrhom izražanja v svetlem delu dneva (Honma in sod., 2002).



Slika 2: Osnovni mehanizem cirkadiane ure

Podrobnejši opis cirkadiane ure je opisan v tekstu zgoraj (povzeto po: Košir, 2011: 12)

## 2.5 CIRKADIANI RITEM IN cAMP

Signalna pot preko cAMP ima pomembno vlogo pri delovanju molekularnega modela cirkadiane ure preko povratnih zank, kjer sintetizirani proteini zavirajo izražanje ustreznih cirkadianih genov. Vloga cAMP se odraža tako v suprahiazmatičnem jedru kot v perifernih tkivih. S svojo ritmiko ustvarja amplitude, faze in periode cirkadianih oscilacij na ravni transkripcije genov (O'Neill in sod., 2008; Bele, 2011).

Ena najbolj preučenih signalnih kaskad je prav pot preko cAMP. Slednja se sproži ob vezavi liganda na ustrezen receptor in sicer GTP zamenja na G-protein vezan GDP, kar povzroči odcep podenot  $\beta\gamma$  G-proteina. Podenota  $\alpha$  nato med drugim aktivira encim adenilat-ciklazo, ki katalizira pretvorbo ATP v ciklični AMP. Med drugim cAMP vpliva tudi na aktivacijo protein-kinaze A, ki nato fosforilira končne tarče, med drugim tudi transkripcijski faktor CREM. Dokazano je, da fosforiliran faktor CREM vpliva na zapleten proces transkripcije s tvorbo številnih izoform, ki so lahko aktivatorji ali inhibitorji začetka prepisovanja DNA (Košir, 2011).

## 2.6 TRANSKRIPCIJSKI FAKTOR CREM

Končni členi signalnih poti so velikokrat transkripcijski faktorji, katerih aktivnost ali neaktivnost je uravnavana preko aktivacije različnih signalnih poti. Ena takšnih družin so od cAMP odvisni transkripcijski faktorji, kamor sodijo CREM ter CREB in ATF-1. Uvrščamo jih v skupino transkripcijskih faktorjev z domeno levcinske zadrge, ki tvorijo homo- ali hetero-dimere in se vežejo na palindromska ohranjena zaporedja CRE. Obstaja veliko izoblik teh proteinov, kar je posledica alternativnega izrezovanja, zato lahko na izražanje genov vplivajo kot aktivatorji ali represorji (Slika 3). Aktivacija proteina CREM lahko poteka na dva načina. Kot aktivatorji delujejo, ko jih fosforilira ena od kinaz (PKA, CamKIV ali Rsk-2) in tako aktivirani lahko sodelujejo s ko-aktivatorjem, vezavnim proteinom za CREB (CBP) in skupaj z njim povečajo izražanje tarčnega gena. Kadar pa pride do defosforilacije, se na CBP ne morejo vezati, zato delujejo kot represorji. Druga možnost je inducibilni represor ICER, ki je ena od oblik proteina CREM (Servillo, 2002).

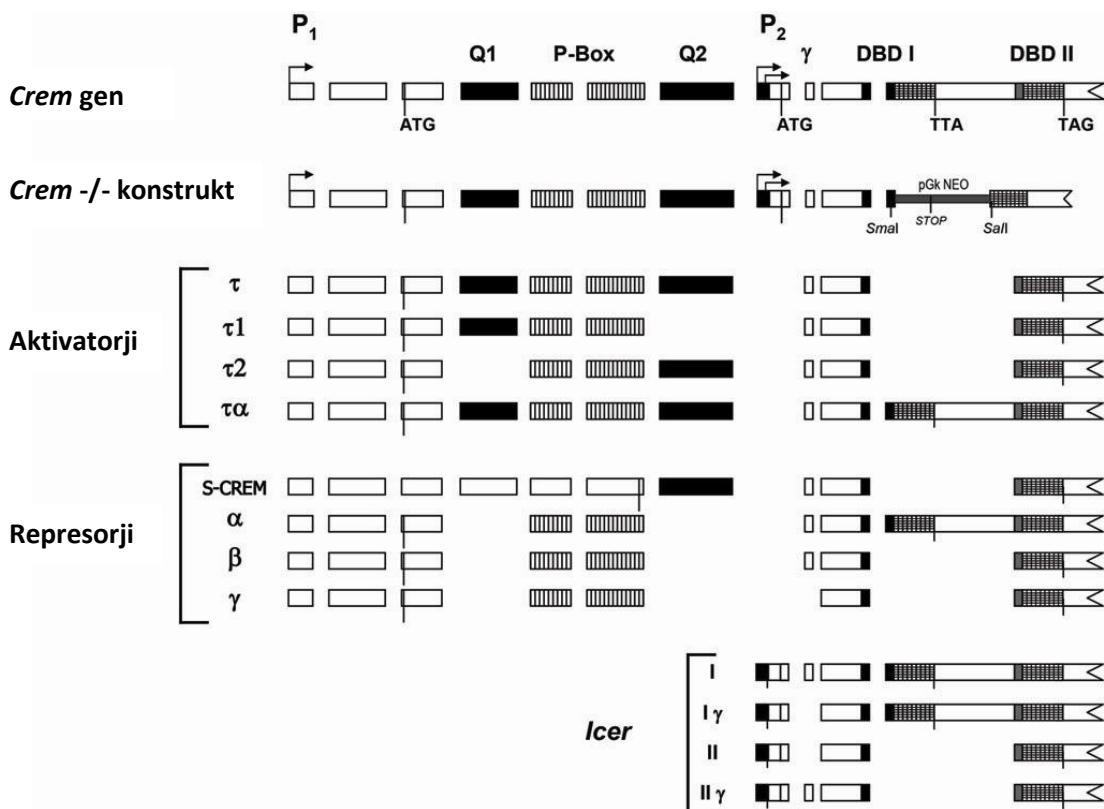
Raziskovalci so dokazali, da obstaja povezava med faktorjem CREM in uravnavanjem cirkadianih ritmov. Foulkes in sodelavci (1996) so ugotovili, da je v češeriki oblika proteina CREM, imenovana ICER, izražena ritmično. Prav tako so dokazali, da sodeluje

pri transkripcijski povratni zanki, ki določa amplitudo izražanja gena za encim serotonin-N-acetil-transferazo. Encim določa hitrost sinteze melatonina v češeriki, saj katalizira omenjeno reakcijo (Foulkes in sod., 1996).

Določitev zgradbe gena *Crem* je pokazala sposobnost tvorbe velikega števila različnih izoform. Gen je zgrajen iz devetih eksonov, vsak od njih določa eno funkcionalno enoto proteina (Slika 3). Enote so: P-enota (KID- angl kinase inducible domain), le-ta vsebuje fosforilacijsko mesto, ki je pri CREM Ser117; področji Q1 in Q2, ki sta bogati z glutaminskimi kislinami in sta pomembni pri interakciji z osnovnim transkripcijskim aparatom ter dve DNA vezavni domeni- DBD I in DBD II, ki z dimerizacijo tvorita levcinsko zanko. Nastajanje izoform je omogočeno z uporabo alternativnega izrezovanja eksonov, alternativnega mesta poliadenilacije ter alternativnega mesta začetka prepisovanja. Izoforme lahko delujejo kot aktivatorji ali represorji prepisovanja DNA. Večina izooblik gena *Crem* se prepisuje iz neinducibilnega, GC- bogatega promotorja P1. Manjša skupina represorjev *Icer* pa se prepisuje iz alternativnega promotorja P2 in kodirajo zgolj eno od obeh DNA vezavnih domen (Foulkes in sod., 1991).

Uporaba različnih poliadenilacijskih mest omogoča nastanek različno dolgih prepisov gena *Crem*, ki imajo v 3' neprepisanem delu prisotne elemente AUUUA. Večje kot je število teh, manjša je stabilnost mRNA (Košir, 2011).

Za preučevanje vloge različnih izooblik gena *Crem* so uporabljene miši z izbitim genom *Crem* (KO). Glavna fenotipska značilnost KO miši je ustavitev spermatogeneze na stopnji okroglih spermatid. Okvare spermatogeneze, povečano število aberantnih struktur in skoraj 50% zmanjšanje števila spermijev se pojavijo že pri heterozigotih *Crem* (+/-) (Košir, 2011).



Slika 3: Zgradba gena *Crem* in njegove izooblike

Shematični prikaz zgradbe gena *Crem*, prikazuje njegove glavne delajoče enote: z glutaminskimi kislinami bogati domeni (Q1 in Q2), P-škatla, dve DNA-vezavni domeni (DBDI in DBDII), mesta začetka (ATG) in zaključka (TTA, TAG) prevajanja ter mesti začetka prepisovanja (P<sub>1</sub> in P<sub>2</sub>). Poleg zgradbe gena so prikazane še zgradbe različnih spodbujevalcev in zaviralcev ter konstrukt za pripravo miši z izbitim genom *Crem* (Prijejeno po: Prosenc Zmrzljak, 2012: 17).

## 2.7 VLOGA GENA CREM V RAZLIČNIH TKIVIH

Z uporabo alternativnega izrezovanja, alternativnega mesta poliadenilacije ter alternativnega mesta začetka prepisovanja je omogočeno nastajanje izooblik, ki lahko delujejo kot spodbujevalci ali zaviralci prepisovanja DNA (Prosenc Zmrzljak, 2012). Odkrite so bile tri večje spremembe, in sicer spremembe vedenjskih vzorcev, zakasnjenja regeneracija jeter in ustavljenja spermatogeneza (Košir, 2011).

Eden od neposrednih vplivov SCN na obrobne oscilatorje je ritmično izločanje glukokortikoidov, ki se lahko spremeni, če organizem izpostavimo svetlobnim pogojem z zamaknjeno fazo. Ena od znanih sprememb je ponastavljanje ure (ang.: re-entrainment) v nadledvični žlezi (Ottenweller in Meier, 1982).

### 2.7.1 Jetra

Raziskave na univerzi v Virginiji so pokazale, da imajo jetra svoj cirkadiani ritem, ki se ravna po rednih obrokih hrane. Poleg tega so ugotovili, da lahko moten dnevni ciklus jeter privede do tveganja za presnovni sindrom, diabetes, povišane vrednosti holesterola in debelosti. Na cirkadiani ritem jeter vpliva tako vedenje kot metabolizem. Kljub temu, da obstaja ogromno dokazov za cirkadiano sposobnost delovanja jeter, proces še vedno ni popolnoma razumljen in se lahko navezuje na vlogo jeter v pripravi telesa na prebavljanje in optimalno porabo energije (Davidson in sod., 2006).

Prisotnost cirkadianega ritma v jetrih so dokazali z uporabo DNA- mikromrež. Analizirali so izražanje RNA preko cirkadianega cikla in prišli do zaključkov, da je v jetrih od 3 % do 20 % genov s cirkadianim vzorcem izražanja (Prosenc Zmrzljak, 2012).

S poskusi na gensko spremenjenih miših so preverjali delovanje enega ključnih genov cirkadiane ure- *Bmal1*, in sicer s prekomernim izražanjem proteina REVERB, ki deluje kot zaviralec prepisovanja *Bmal1*. Tako so ugotovili, da so geni cirkadiane ure ohranili amplitudo nihanja, kljub temu, da je bila jetrna ura zaustavljena. Ta je sicer zelo avtonomna, vendar še vedno pod vplivom sistemskoga uravnavanja (Kornmann in sod., 2007). V tem poskusu so živali izpostavili svetlobnim signalom in prekinili oživčenje jeter, posledično pa ni bilo zaznati običajno prisotnega odziva v prepisovanju gena *Per1*. Slednje pomeni, da se sporočila SCN v jetrih ponastavljajo preko živčnih povezav (Kornmann in sod., 2007).

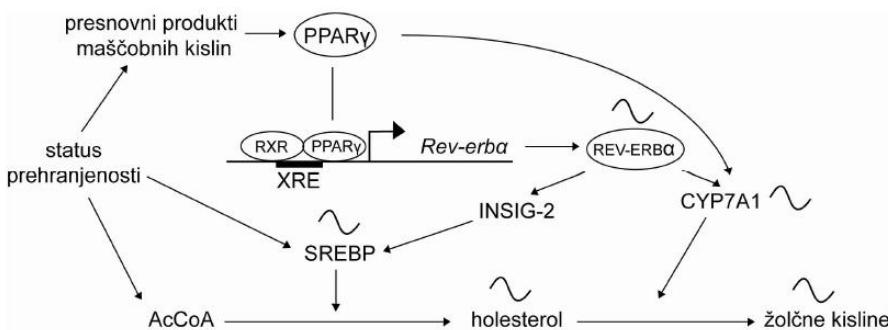
Fazo cirkadiane ure se v jetrih najlažje premakne s spremenjenim časom hranjenja, svetloba je manj pomemben dejavnik. Vendar imajo na delovanje teh prehranskih sporočil močan vpliv hormoni. Ugotovljeno je bilo, da će so glukokortikoidi ali njihovi receptorji v jetrih odsotni, lahko spremenjen čas hranjenja bolj očitno zamakne fazo cirkadiane ure (Le Minh in sod., 2001).

Omejeno hranjenje - dostop do hrane le ob času, ko običajno živali niso aktivne in se ne hranijo - povzroči 12 urni zamik v izražanju cirkadiano uravnavanih genov, ki so povezani s presnovom. Protein, ki se veže na sterolni element uravnavanja-1 (SREBP-1), lahko z uravnavanjem drugih genov povzroči tako velik premik faze in je znan kot protein

takojšnjega zgodnjega odziva z usklajenim vplivom na s presnovo povezanimi geni v jetrih (Brewer in sod., 2005).

V jetrih poteka največji delež biosinteze holesterola. Dnevno nihanje holesterola sledi vnosu hrane in cirkadianemu prepisovanju omejujočega encima izgradnje 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktaze (HMGCR). Kljub temu pa se nihanje v količini receptorja za lipoproteine z nizko gostoto (LDLR) in receptorja SRB1 ohranja ne glede na dieto (Jurevics in sod., 2000).

Ves odvečni holesterol se s pomočjo encima CYP7A1 pretvori v žolčne kisline. *Cyp7a1* se prepisuje cirkadiano, prepisovanje pa je uravnavano z vezavo REV-ERB in vezavnega proteina D mesta albuminskega promotorja (DBP) na promotor tega gena. Posredno na uravnavanje biosinteze holesterola vpliva tudi receptor delitve peroksisoma PPAR, ki heterodimerizira z jedrnim retinoidnim X receptorjem RXR. PPAR in RXR sta na več ravneh povezana z geni osrednje cirkadiane ure ali od nje odvisnih genov. Zanka cirkadianega uravnavanja ravni holesterola je shematsko predstavljena na sliki 4 (povzeto po: Prosenc Zmrzljak, 2012).



Slika 4: PPAR $\gamma$  cirkadiano uravnava sintezo holesterola in žolčnih kislin

PPAR $\gamma$  vpliva na prepisovanje REV-ERB. Le-ta pa posredno ali neposredno vpliva na gene udeležene v biosintezo holesterola in žolčnih kislin. Krivilje nad geni pomenijo, da je za te znano cirkadiano nihanje v koncentraciji (Prosenc Zmrzljak, 2012: 9).

## 2.7.2 Nadledvična žleza

Nadledvični žlezi sta parni endokrini žlezi, ki se nahajata nad ledvicami. Sta glavni organi, ki skrbi za odgovor telesa na stres preko izločanja kortikosteroidov in kateholaminov, vključno s kortizolom in adrenalinom. Posamezna žleza je sestavljena iz dveh delov, iz rumenkaste skorje (cortex) in rdečkaste sredice (medulla), ki se razlikujeta po histološki zgradbi in funkciji. Ishida in sodelovci (2005) so dokazali, da ima svetloba vpliv na izražanje genov v nadledvični žlezi in sicer preko simpatičnega živčevja in ne preko hipotalamo-adrenohipofizne poti. Prav tako intenziteta svetlobe lahko vpliva na amplitudo cirkadianega izražanja genov in v povezavi s tem se spreminja količina izločenega kortikosterona (Ishida in sod., 2005).

Med perifernimi oscilatorji je nadledvična žleza še posebej zanimiva, saj z izločanjem kortikoidov vpliva na sinhronizacijo z ostalimi ritmovniki ter uravnava metabolične ritme v drugih organih, vključno z jetri (Oishi in sod., 2005). V njej se namreč izgrajujejo različni hormoni, ki uravnavajo širok spekter presnovnih reakcij (Sewer in sod., 2008).

Nadledvična žleza proizvaja različne količine glukokortikoidov glede na dnevno-nočni ritem, za kar je odgovoren SCN, ki pošilja signale preko hipofize. Le-ta posreduje svoja sporočila tako preko živcev kot tudi hormonov, zato velja nadledvična žleza za enega najpomembnejših posrednikov uravnavanja cirkadiane ure perifernih organov (Prosenc Zmrzljak, 2012).

Za pravilno delovanje nadledvične žleze je potrebna stresna os: hipotalamus- hipofiza-nadledvična žleza (HPA, ang.:hypothalamic–pituitary–adrenal axis). Nevroni iz SCN predajajo sporočila tudi v paraventrikularno jedro hipotalamusa (PVN – ang.: paraventricular nucleus), le-ta vsebuje nevroendokrine nevrone, ki proizvajajo kortikotropin sproščajoči hormon (CRH, ang.: corticotropin-releasing hormone) in vazopresin (AVP, ang.: arginine vasopressin). CRH deluje na prednji režen hipofize, zato le-ta proizvede adrenokortikotropni hormon (ACTH, ang.: adrenocorticotropic hormone). Slednji preko krvnega obtoka in skozi skorjo nadledvične žleze uravnava izločanje kortizola pri ljudeh. Kortikosteron je hormon, ki se ob tem sprošča pri glodalcih in v povratni zanki deluje na izločanje CRH ter posledično ACTH. ACTH je cirkadiano uravnavan, saj ga pri živalih brez SCN ni bilo mogoče zaznati. V raziskavi so tudi ugotovili, da so za cirkadiano

uravnavanje ACTH in kortikosterona pomembne živčne povezave (Kalsbeek in sod., 2012).

Glukokortikoidi se izločajo pulzno 1 do 2-krat na uro. Podobni so tudi ritmi izločanja ACTH, ki pa imajo nižjo cirkadiano amplitudo. ACTH se namreč veže na receptorje melanokortina tipa 2 v skorji nadledvične žleze ter spodbuja sintezo kortikosteroidov. Na izločanje ACTH pa vpliva CRH. Tudi izgradnja le-tega cirkadiano niha. Z raziskavami so ugotovili, da so se pri živalih z odstranjeno hipofizo izgubili ritmi ACTH, ritmi kortikosteroidov pa so ostali. Ritmi kortikosteroidov so se prekinili, če so živalim poleg hipofize odstranili še živčne povezave z nadledvično žlezo (Ottenweller in Meier, 1982).

Prav tako se kažejo cirkadiani ritmi izražanja v nadledvični žlezi pri regulatorjih transporta holesterola, ki sodelujejo pri izgradnji glukokortikoidov. Merjenje v sredici oziroma v skorji nadledvične žleze je pokazalo različno cirkadiano izražanje genov osrednje ure. V raziskavi, kjer so s pomočjo mikromrež analizirali cDNA celotnih nadledvičnih žlez cirkadiano vzorčenih živali, so ugotovili, da se je večina cirkadianih genov najviše izražala na prehodu med počitkom in aktivnostjo (Bittman in sod., 2003).

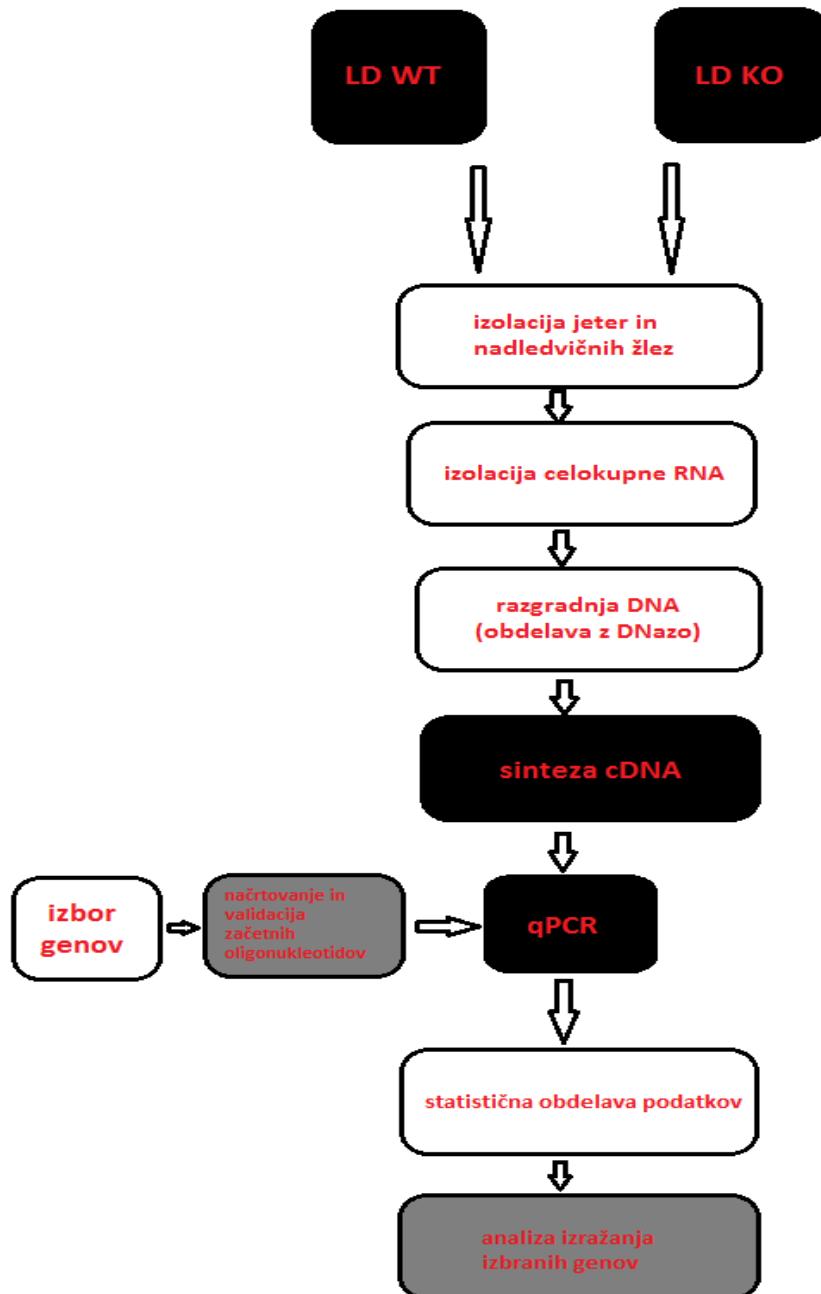
Dejstvo, da se raven glukokortikoidov poveča pred začetkom aktivne faze, kaže, da je SCN pomemben pri uravnavanju ritmov le-teh. Nihanje na ravni glukokortikoidov torej ni le posledica aktivnosti ali svetlobe, ampak je uravnavana sistemsko (Henley in sod., 2009). Izločanje glukokortikoidov je povezano s fazo aktivnosti živali: pri dnevno aktivnih živalih je vrh izločanja zgodaj podnevi, medtem ko je pri nočno aktivnih zgodaj ponoči (Meier, 1976). Glukokortikoidi uravnavajo najrazličnejše fiziološke procese. Njihovi receptorji so prisotni v različnih tkivih. Zato sodijo med najverjetnejše posrednike med osrednjo cirkadalno uro in obrobnimi urami (Reddy in sod., 2007; Chung in sod., 2011).

Pri nadledvični žlezi so bili opaženi tudi značilni ritmi izražanja gena *Npas2*. Ugotovljeno je bilo, da lahko NPAS2 dopoljuje ali pa popolnoma nadomesti vlogo CLOCK v heterodimeru z BMAL1. Tako nihanje so opazili tudi pri drugih organih. Prav tako kažejo geni, ki so povezani s strukturo kromatina - kodirajo informacijo za histone, tudi močno nihanje med dnevom in nočjo, in sicer se najmočneje prepisujejo zgodaj zjutraj (Oster in sod., 2006).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 SHEMA DELA

Na sliki 5 je shema eksperimentalnega dela ter izpisane metode, ki smo jih uporabljali pri delu v naši raziskavi. Shema je podrobno opisana v nadaljnem besedilu.



Slika 5: Shema eksperimentalnega dela

LD WT – linija miši pri svetlobnih pogojih light-dark (LD) z mešanim genetskim ozadjem, t.i. divji tip (WT)  
LD KO- linija miši pri svetlobnih pogojih light-dark (LD) z enakim genetskim ozadjem z izbitim genom *Crem* (KO).

### 3.2 POSKUSNE ŽIVALI

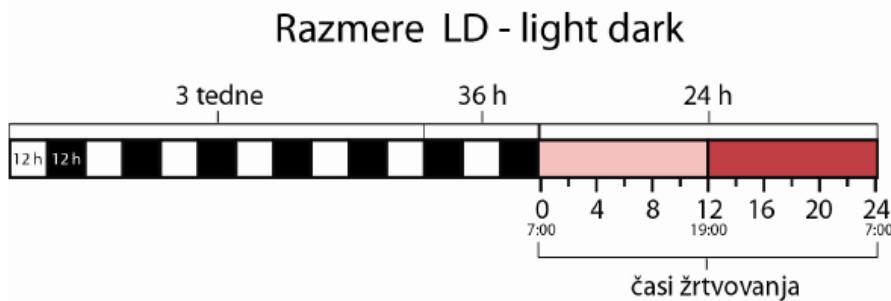
Raziskave so bile opravljene v skladu z dovoljenjem, ki ga je izdala Veterinarska uprava Republike Slovenije (št. dovoljenja 34401-9/2008/4).

Kot poskusne živali je bila uporabljena linija miši z mešanim genetskim ozadjem (129/SvPas in C57BL/6J), t.i. divji tip (v nadaljevanju WT) in miši z enakim genetskim ozadjem (129/SvPas in C57BL/6J) z izbitim genom *Crem* (v nadaljevanju KO). Vse živali so bivale v nadzorovanih razmerah in imele neomejen dostop do hrane ter vode. Miši so živele ob 12-urnem dnevno-nočnem ritmu, luči smo prižgali ob 7.00 in jih ugasnili ob 19.00.

Pri načrtovanju raziskav so delovali v skladu z načelom treh R, določili smo najmanjše število miši, kar je zadostovalo za kasnejšo statistično analizo.

### 3.3 CIRKADIANO VZORČENJE

Miši CREM so bile vzrejene in pripeljane z Veterinarske Fakultete Univerze v Ljubljani. Prve tri tedne je potekala prilagoditev na novo okolje in nove svetlobne pogoje. Miši so bile na normalnem svetlobnem ciklu (12 h svetlobe (7.00 – 19.00) in 12 h teme (19.00 - 7.00)). Poskus se je začel ob 7.00 zjutraj (svetloba – CT0) in se končal naslednji dan ob 7.00 (tema – CT24).



Slika 6: Svetlobni pogoji pri cirkadianih študijah

Adaptacija miši na svetlobne pogoje 12 ur teme in 12 ur svetlobe je potekala vsaj tri tedne. V našem primeru so bile miši tudi med žrtvovanjem pri normalnem svetlobnem režimu. (Košir, 2011: 24).

Bela, svetlo rdeča - svetloba  
Črna, temno rdeča – tema

### 3.4 ODVZEM TKIV

Živali so bivale v razmerah LD (angl. light-dark) do časa usmrtitve (slika 6). Vse miši so bile žrtvovane s postopkom dislokacije vratu in sicer v skupinah na vsake 2 uri v časovnem obdobju 24 ur. Pri obeh linijah so prvo skupino miši žrtvovali ob 7.00, takoj za tem so jim odstranili jetra in nadledvični žlezi in jih stehtali (samo dnevni cikel) ter tkiva zamrznili v tekočem dušiku in shranili na -80°C. Vse faze poskusa do tu so bile predhodno pripravljene (magistrska naloga je del širših raziskav), zamrznjena tkiva smo uporabili v sledečih postopkih.

V poskusu smo uporabili le samce in sicer smo imeli po tri vzorce KO miši in dva vzorca WT. V predhodnih raziskavah je bilo namreč ugotovljeno (Aćimović, 2012), da z uporabljenim statističnim modelom natančneje ocenimo parametre, če se uporabi manjše število vzorcev v več časovnih točkah. Torej smo zato vzorčili po 2 oziroma 3 vzorce na vsaki 2 uri (namesto večje število vzorcev na vsake 4 ure). Druga omejitev pri številu vzorcev v posamezni časovni točki je predstavljalo število miši, saj smo poskušali žrtvovati čim manjše število. Vse nadaljnje postopke smo opravljali na vzorcih, prikazanih v preglednici 6 v prilogah.

### 3.5 IZOLACIJA RNA

Iz tkiv (jetra) smo izolirali celotno RNA s pomočjo kompleta za izolacijo QuickGene RNA tissue kit S II (RT-S). Homogenizacija je potekala v 500µL LRT reagenta. Vse reagente smo pred uporabo segreli na sobno temperaturo, količina tkiva, ki smo ga uporabili (primer jeter), je bilo med 15-30 mg. Sledili smo protokolu proizvajalca.

Reagenti:

- 100 % etanol
- LRT reagent
- SRT reagent
- WRT reagent

Opis postopka:

- Določitev količine vzorca, dodamo 500µL LRT reagenta.
- Homogenizacija 1 min, dokler ni več vidnih delcev.

- Centrifugiramo 3 min pri 17000 g.
- Prenesemo 385 µL supernatanta v 1,5.ml mikrocentrifugirko.
- Dodamo 175 µL SRT reagenta.
- Vortexiramo 30 sekund in kratko centrifugiramo
- Dodamo 100 % etanol.
- Ponovno vortexiramo 1 minuto in naredimo 'spin down'.
- Sledi ekstrakcija z izolatorjem QG-810 po protokolu proizvajalca.

Iz adrenalnih žlez je bila celotna RNA izolirana predhodno, in sicer z uporabo reagenta TRI (Sigma). Tkiva so bila homogenizirana po postopku podrobno opisanem v delu Prosenc Zmrzljak (2012).

### 3.6 DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN KVALITETE IZOLIRANE RNA

#### 3.6.1 Določanje koncentracije in čistosti RNA

Koncentracijo dobljene RNA smo določili spektrofotometrično z napravo NanoDrop. Uporabili smo 2 µL vzorca koncentrirane RNA. Iz dobljenih podatkov smo nato izračunali, kalikšne volumne je potrebno odpipetirati iz posameznega vzorca, da bomo imeli povsod primerno količino RNA, in sicer 1 µg RNA. Učinkovitost uporabljenih metod smo preverjali z ugotavljanjem koncentracije in čistosti izolirane RNA. Primerjali smo razmerja meritev A260/A230 in A260/A280. Molekula RNA izraža specifičen UV absorpcijski spekter z minimumom pri 230 nm in maksimumom pri 260 nm. Iz vrednosti A260 smo izračunali koncentracijo RNA v vzorcih. Informacijo o čistosti izolirane RNA smo dobili z merjenjem absorbance pri 260 nm in 280 nm ter računanjem razmerja dobljenih absorbanc (A260/A280), ki ga uporabljamo kot kvalitativno merilo za čistost RNA. Razmerje A260/A230 se uporablja kot sekundarna meritev čistosti nukleinskih kislin. Vrednosti tega razmerja so lahko še višje kot vrednosti A260/A280. Stopnja čistosti je zadovoljiva, če se razmerja gibljejo v ustreznom območju, razmerje  $A260/A280=2\pm0,3$  in razmerje  $A260/A230=2,0\pm0,3$ .

### 3.6.2 Preverjanje kvalitete RNA na čipu AGILENT

Iz prvega vzorca vsake časovne točke smo odpipetirali 2 µL za preverjanje razgrajenosti RNA. Kvaliteto izolirane RNA oz. stopnjo razgrajenosti, smo preverjali z elektroforezo na čipu, ki jo vodi računalniški sistem Agilent 2100 Bioanalyzer. Analizator za vsak vzorec izriše elektroferogram ter določi faktor kvalitete RNA (RIN), poleg tega pa poda delež rRNA v vzorcih mRNA.

## 3.7 REAKCIJA Z DNAZO IN SINTEZA cDNA

Reagenti:

- 10x DNAzni pufer Roche
- DNAza I 10U/ µL
- DEPC voda
- 5x pufer za sintezo prve verige
- 100mM DTT
- 10mM dNTP
- Oligonukleotid pdN6
- Reverzna transkriptaza SSIII
- RNAza OUT

Postopek:

- 1 µg RNA smo dodali DEPC vodo do končnega volumna 12,5 µL.
- Dodali smo 10 µL DNAze reakcijske zmesi (2 µL 10x DNAznega pufra in 0,5 µL DNAze I ter 7,5 µL DEPC vode) za odstranitev nečistoč.
- Nato smo vorteksirali in na kratko centrifugirali.
- Inkubirali 10 minut pri 30°C ter 10 minut pri 75°C.
- Nato smo vzorce ohladili na ledu in dodali 10 µL reakcijske zmesi za reverzno transkripcijo.

Preglednica 1: Reakcijska mešanica sestavin za reakcijo z DNazo in sintezo cDNA

Sestavine:	Količina:
5x pufer za sintezo prve verige	4 µL
encima SuperScript III	0,5 µL
RNaze OUT	0,5 µL
DTT	1 µL
dNTP	1 µL
DEPC vode	2,5 µL

- Vzorce smo nato ponovno premešali na mešalniku in na kratko centrifugirali.
- Sledila je inkubacija: 5 minut pri 20° C, 60 minut pri 50° C ter 15 minut pri 70° C
- Nato smo vzorce ohladili na 4°C in dodali 200 µL vode brez DNAz do končnega volumna 250 µL.
- Do reakcije qPCR smo vzorce hranili na -20° C.

### 3.8 KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (qPCR)

PCR v realnem času oz. kvantitativni PCR (qPCR) je metoda, ki jo na mnogih področjih molekularne biologije uporabljam za detekcijo in kvantifikacijo nukleinskih kislin (DNA, RNA). Metoda je, za razliko od klasične metode PCR, kvantitativna, kar pomeni, da omogoča natančno določanje koncentracije DNA (relativne ali absolutne) v vzorcu.

Vrednost Cp (angl. crossing point) je rezultat analize z napravo LightCycler, to pa je cikel, v katerem fluorescensa vzorca preseže signal ozadja.

Reagenti:

- Začetni oligonukleotidi

- Voda brez RNaz
- Barvilo SYBR Green I
- cDNA

Postopek:

- Meritve smo opravljali na aparaturi LightCycler 480 (Roche Applied Science).
- qPCR smo izvajali v ploščicah, ki omogočajo sočasno analizo 384 reakcij hkrati, pri vseh vzorcih smo uporabljali reakcijsko mešanico LightCycler 480 SYBR Green I.

Preglednica 1: Reakcijska mešanica sestavin za qPCR

Sestavine:	Količina:
SybrGreen 2x mešanica	2,5 µL
Voda brez RNaz	1,15 µL
Primer mix ( <i>založna raztopina: 475 µL vode, 12,5 µL smiselnih in 12,5 µL protismiselnih oligonukleotidov</i> )	0,6 µL
DNA iz posameznega vzorca	0,75 µL

- V vsako od 384 luknjic smo odpipetirali 5 µL reakcijske mešanice.
- Za vsak vzorec smo pripravili tri tehnične ponovitve za kasnejšo kvalitetnejšo statistično obdelavo podatkov.
- Poleg tega smo pripravili tudi negativno kontrolo (sterilno dH<sub>2</sub>O).
- Ploščico smo prekrili z zaščitno folijo in centrifugirali 2 minuti pri 2000g in vstavili v PCR aparaturo.
- Pogoji qPCR postopka:
  - inkubacija 10 minut pri 95°C,
  - 45 ciklov 10 sekund pri 95°C,

- 20 sekund pri 60°C in
- 20 sekund pri 72°C.
- Program je po vsaki reakciji izrisal talilno krivuljo v temperaturnem območju med 65°C in 95°C, saj naprava namreč meri fluorescenco med povečevanjem temperature ter ob zmanjšanju intenzitete oddane svetlobe določi, kdaj je prišlo do hidrolize dvojerižnih produktov reakcije.
- Vsi začetni oligonukleotidi so zbrani v preglednici 7 v prilogah. Načrtovani in validirani so bili predhodno (Košir, 2011).

### **3.8.1 Izbor in validacija začetnih oligonukleotidov**

Izbira začetnih oligonukleotidov je temeljila na že opravljeni validaciji po naslednjem postopku. V 1,5 ml epruveti so za vsak začetni oligonukleotid, ki so ga validirali, pripravili osnovno raztopino, ki je vsebovala:

- 41,1 µL vode,
- 90 µL 2-kratnega Sybr Green Master Mixa,
- 21,6 µL mešanice začetnih oligonukleotidov.

Po 17 µL osnovne mešanice so dodali k 3 µL cDNA za validacijo, predhodno prenešeno v sveže epruvete. Pripravili so tri tehnične replike vsakega vzorca, pri čemer je bil volumen posamezne replike 5 µL. Na podlagi redčitvene vrste cDNA so izračunali in določili učinkovitost pomnoževanja (E) ter specifičnost začetnih oligonukleotidov. E so izračunali na podlagi naklona premice, ki so jo dobili z linearno regresijo vrednosti Cp pri posameznih redčitvah cDNA. Naklon premice -3,333 je enak 100 % učinkovitosti pomnoževanja oziroma  $E = 2,00$ . Specifičnost začetnih oligonukleotidov so določili s pomočjo talilne krivulje. Za uspešno izveden PCR postopek potrebujemo učinkovite začetne oligonukleotide, torej so izbrani oligonukleotidi specifični za tarčno zaporedje, da ne tvorijo več različnih produktov ali dimerizirajo. V primeru ugotovitve nespecifičnosti oziroma dimere začetnih oligonukleotidov, so le-te zavrgli in izdelali nove (Košir, 2011).

Začetni oligonukleotidi so prikazani v preglednici 7 v prilogah.

### 3.9 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

S programom LightCycler 480 Software 1.5 (Roche Applied Science) smo analizirali vsak posamezni gen in v posamezni qPCR reakciji dobili vrednosti Cp. Izračunanih Cp je 189, kar se ujema s številom vzorcev (63 + negativna kontrola) izolirane RNA pomnoženim z 3, saj smo nanašali tri ponovitve reakcijske mešanice. Te podatke smo izvozili v program Excel in izvedli relativno kvantifikacijo

#### 3.9.1 Relativna kvantifikacija

Za izračun razmerij med nivoji izražanja genov v vzorcih je potrebno upoštevati tudi faktor učinkovitosti pomnoževanja za posamezen gen (Ef) (Pfaffl, 2006).

Izračunali smo povprečno vrednost (Cp') in standardni odklon ter na podlagi razmerja med temo vrednostima, z izračunom koeficiente variacije (CV), izločili izstopajoče Cp. To pomeni, da smo izločili vse tiste vrednosti, kjer je bil koeficient večji od 17 % in so statistično preveč odstopale. Vse Cp smo nato preračunali v relativne vrednosti (A) po spodnji formuli:

$$A_n = E_f^{-Cp_n}$$

Izražanje izbranih genov je potrebno pri relativni kvantifikaciji normalizirati z izbranimi referenčnimi geni. S tem zmanjšamo vpliv razlik v izhodni količini RNA na zanesljivost analiz podatkov. Najprej smo izračunali vrednost A' za referenčna gena *Rn18s* in *Rplp0*, tako izražene vrednosti predstavljajo normalizacijski faktor za posamezen vzorec. Določili smo geometrijsko povprečje A referenčnih genov in geometrijsko povprečje izračunanih povprečji.

Nato smo izračunali relativno izražanje gena (R) za vsak vzorec in vsak gen in sicer glede na učinkovitost pomnoževanja po slednji enačbi, kjer je R razmerje izražanja med preučevanim in referenčnimi geni:

$$R = \frac{A}{NF}$$

Za najlažjo vizualizacijo smo rezultate predstavili grafično in sicer s pomočjo programa R (Statistics Department of the University of Auckland). Vhodni podatki so predstavljeni razmerja med relativnim izražanjem preučevanih in referenčnih genov.

### 3.9.2 Statistično modeliranje cirkadianega ritma

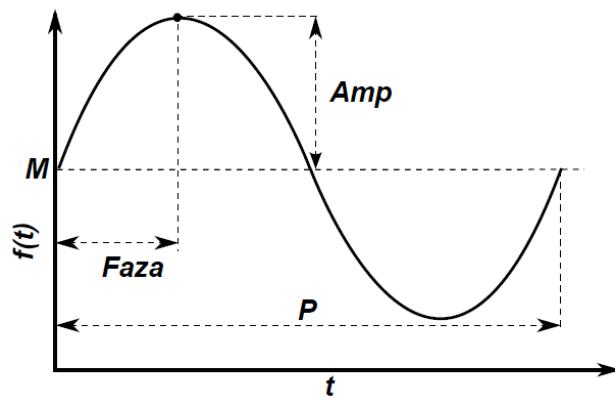
Statistično modeliranje smo izvedli v sodelovanju z ddr. Juretom Aćimovićem. Postopek je podrobno opisan v njegovem delu (2011), v nadaljevanju je metoda na kratko povzeta. Izbrali smo stopnjo značilnosti  $\alpha = 0.05$  za vse statistične obdelave.

Kadar želimo modelirati naravni proces v času, z ritmom s periodom  $P$ , so primerne periodične funkcije. Za te velja  $f(t) = f(t + P)$  pri času  $t$ . Pri cirkadianem ritmu je torej primerno modeliranje s trigonometričnimi funkcijami, ena od teh je kosinusna funkcija, saj se predpostavlja, da cirkadiano izražanje niha podobno kot kosinusna oziroma sinusna funkcija.

$$f(t) = M + Amp * \cos\left(\frac{2\pi(t - Faza)}{P}\right)$$

V enačbi  $t$  predstavlja čas,  $M$  vrednost oscilacije funkcije,  $Amp$  amplitudo,  $P$  perioda in  $Faza$  časovni premik. Omejimo se na interval  $[0;P]$ , saj gre za porces s periodom  $P$ . Za kosinusno funkcijo velja  $-\cos(x) = \cos(x + \pi)$ , iz tega privzamemo da je  $Amp > 0$ . Tako ima funkcija  $f$  na intervalu  $[0;P]$  edini maksimum pri  $t = Faza$  (Aćimović, 2012).

Na sliki 7 je graf funkcije:



Slika 7: Kosinusna funkcija uporabljena za prikaz cirkadianega nihanja

Kosinusna funkcija v kateri:  $M$  predstavlja povprečje,  $Amp$  amplitudo,  $P$  perioda,  $Faza$  časovni premik in  $t$  čas (Aćimović, 2012).

### 3.9.3 Statistična obdelava za mase miši in organov

Meritve mas miši ter mas njihovih jeter in nadledvičnih žlez smo primerjali med mišjimi linijami WT in KO. Preverjali smo ali se mase statistično razlikujejo med vzorcema, torej ali ima izbitje gena *Crem* vpliv na maso miši ter njihovih organov. Uporabili smo t-test, s pomočjo katerega preverjamo razlike med aritmetičnima sredinama dveh neodvisnih vzorcev. Določimo stopnjo značilnosti ( $\alpha$ , v našem primeru 0,05), na podlagi katere določimo kritično območje.

Analitična formula za t-test:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2 - (\mu_1 - \mu_2)}{s} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}; \text{ Predpostavka: } \mu_1 - \mu_2 = 0$$

Formula za oceno populacijske variance:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Na vzorčnih podatkih izračunamo eksperimentalno vrednost statistike, in če le-ta pade v kritično območje ( $p < 0,05$ ), ničelno domnevo zavrnemo in sprejmemo osnovno domnevo ob že prej določeni stopnji značilnosti  $\alpha$ , sicer pa rečemo, da vzorčni podatki kažejo na statistično neznačilne razlike med parametrom in vzorčno oceno.

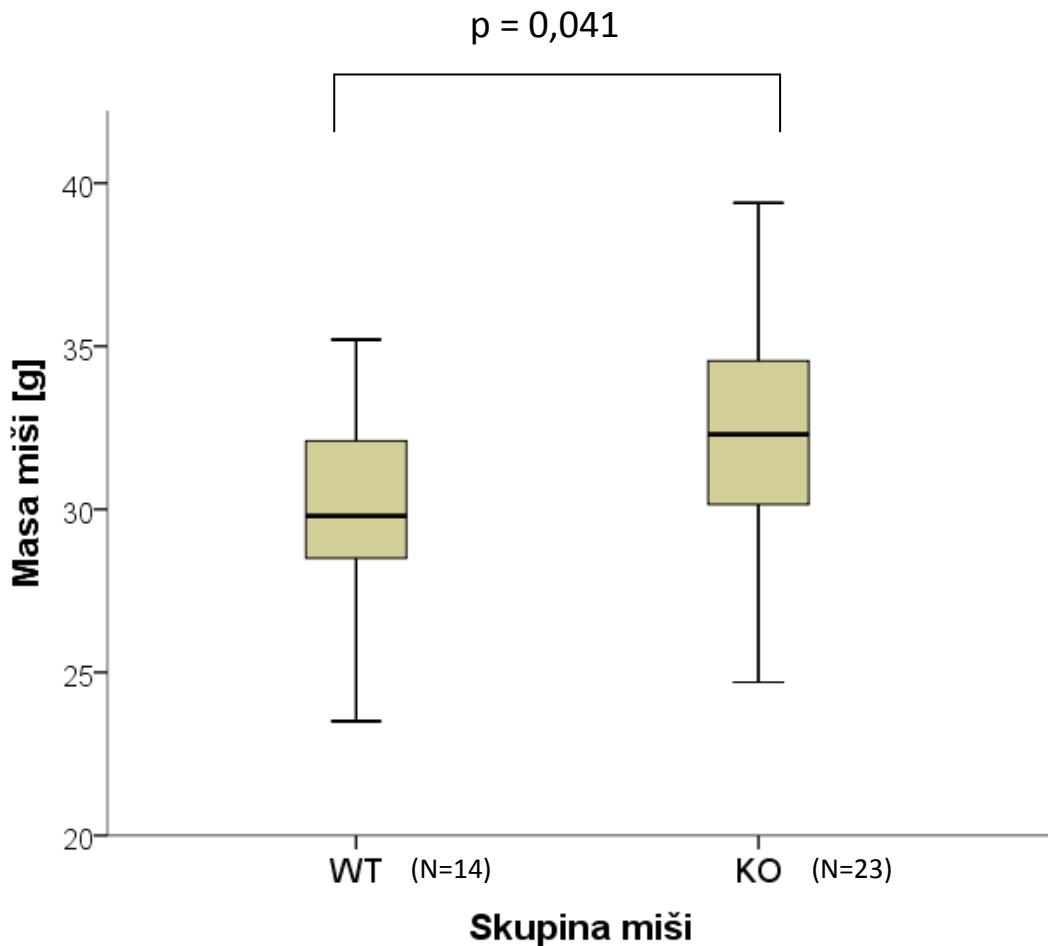
## 4 REZULTATI

V magistrskem delu smo se osredotočili na opazovanje in proučevanje izražanja izbranih genov v jetrih in nadledvični žlezi pri miši. Izbrani geni so bili iz skupine ali centralnih genov cirkadiane ure ali metabolnih genov, za katere smo predvidevali, da se izražajo ritmično v obeh ali vsaj enem od organov.

V poskusu smo uporabili dve skupini miši. Prvo predstavlja linija z mešanim genotipom - divji tip (WT), drugo pa linija z enakim genskim ozadjem (129/SvPas in C57BL/6J), z izbitim genom *Crem* (KO). Vse miši so živele v svetlobnih razmerah 12 ur v temi in 12 ur na svetlobi, kar je približna simulacija spremenjanja dneva in noči na Zemlji. Opazovali smo 24 - urne profile izražanja izbranih genov, pri določeni časovni točki smo vzorčili 3 biološke ponovitve. Vse postopke smo opravljali na vzorcih, prikazanih v preglednici 6 v prilogah.

### 4.1 PREVERJANJE VPLIVA GENA CREM NA TELESNO MASO IN MASO ORGANOV

Z izmerjeno maso miši ter posameznih organov in s statistično obdelavo smo preverili ali ima izbitje gena *Crem* kakršen koli vpliv na maso živali/organov. Primerjali smo maso miši in relativno maso organov glede na celotno maso miši. Vse izmerjene mase so prikazane v preglednici 8 v prilogah.

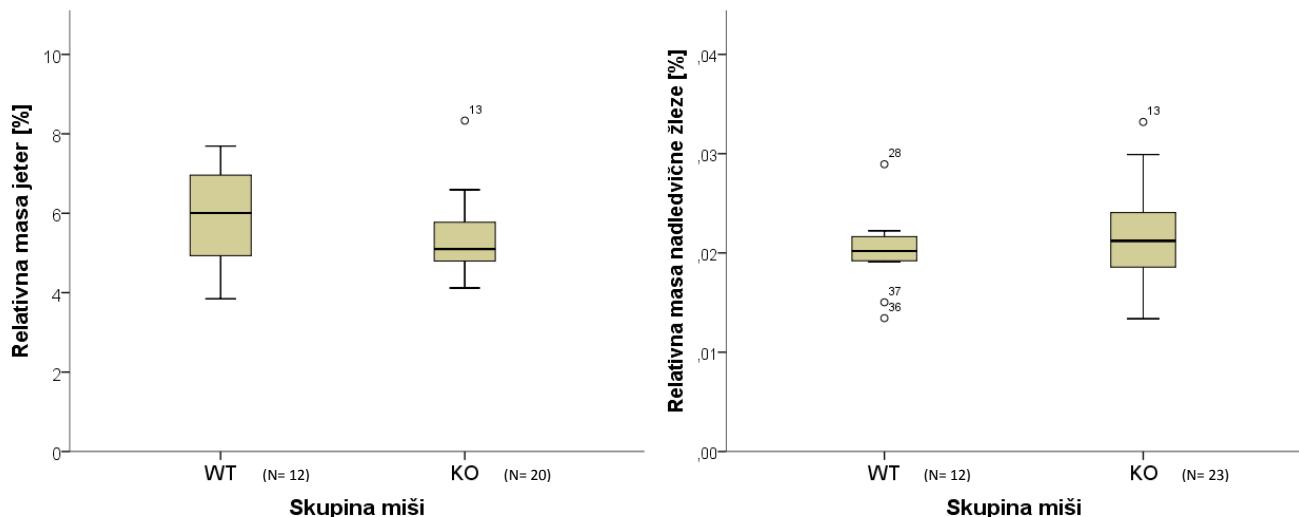


Slika 8: Primerjava mas miši WT in KO

Preglednica 2: Število miši in povprečna masa po genotipu

	Skupina miši	N	Povprečje mas(g)	St. deviacija
<b>Masa miši (g)</b>	WT	14	29,7	3,18
	KO	23	32,2	3,58

Skupini miši WT in KO se statistično značilno razlikujeta ( $t= 2,122$ ;  $p=0,041$ ) in sicer so KO miši v povprečju 13% težje kot WT miši.



Slika 9: Primerjava relativnih mas jeter in nadledvičnih žlez med linijama WT in KO

Preglednica 3: Število vzorcev in povprečna masa po genotipu

A	Skupina miši	N	Povprečje mas (g)	St. deviacija
	WT	12	5,9327	1,24274
	KO	20	5,3406	0,96802

B	Skupina miši	N	Povprečje mas (g)	St. deviacija
	WT	12	0,0101	0,00191
	KO	23	0,0110	0,00250

A: Jatra, B: Nadledvična žleza

V primeru relativnih mas jeter in nadledvičnih žlez med linijama miši WT in KO ni statistično značilnih razlik (jatra:  $p=0,143$ ; nadledvična žleza:  $p= 0,299$ ). Zaključimo lahko, da CREM nima vpliva na maso teh dveh organov.

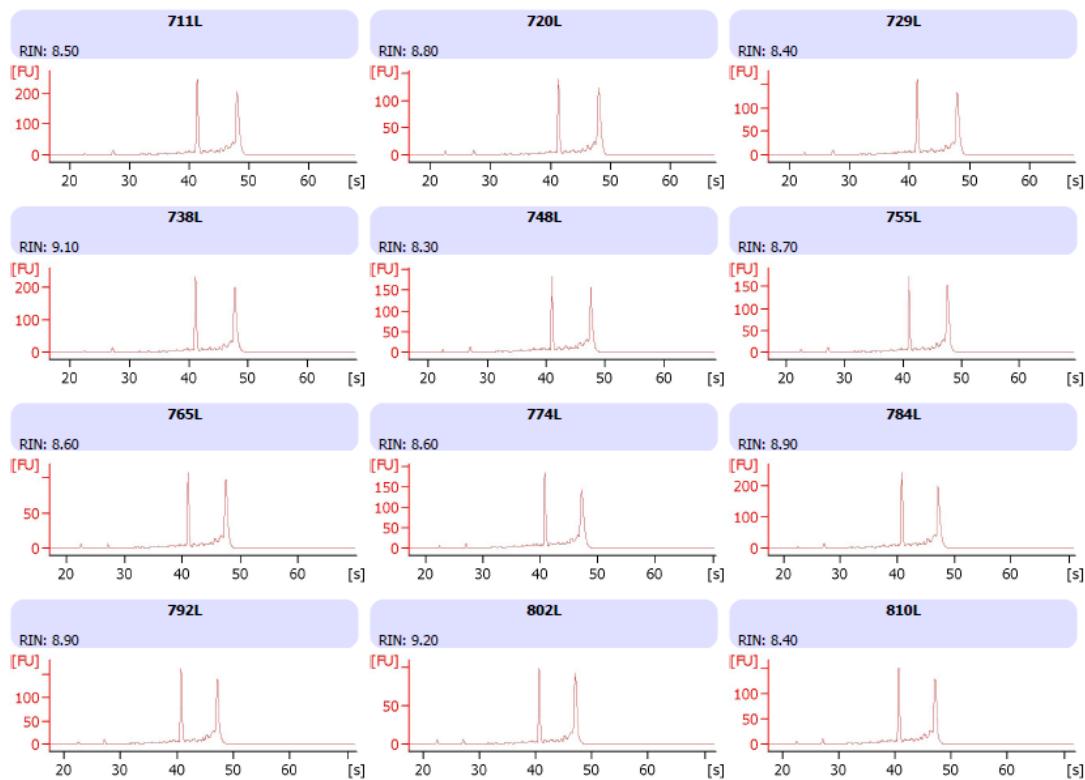
#### 4.2 KONCENTRACIJA IN ČISTOST RNA

Izolacija celotne RNA iz jeter (izolacija iz nadledvičnih žlez je bila že opravljena) je potekala z uporabo Quick gene. Sledilo je preverjanje njene koncentracije s spektrofotometrom NanoDrop. Pomembno pri uporabi qPCR in obdelavi podatkov z relativno kvantifikacijo je zagotoviti čim bolj identične pogoje za vse meritve (Pfaffl,

2006). Navedeno lahko storimo z uravnovešenjem začetnih koncentracij izolirane celotne RNA. Iz spektrofotometričnih rezultatov smo izračunali potrebne redčitve vzorcev, tako da je bila začetna količina RNA pred prepisovanjem v cDNA pri vseh vzorcih po 1 µg, z razmerji meritev absorbanc A260/A230 in A260/A280 smo preverili čistost vzorcev.

Podatki so prikazani v preglednici 10 v prilogah.

Za dodatno preverjanje kvalitete RNA smo s pomočjo naprave Agilent 2100 Bioanalyzer izmerili še vrednosti RIN. Omenjena naprava za vsak vzorec s pomočjo vgrajenega algoritma analizira elektroforezno sliko in hkrati izračuna vrednost RIN, ki je vrednost razgrajenosti RNA. RIN vrednost je v razponu med 1 in 10, kjer 1 pomeni razgrajeno, 10 pa popolnoma intaktno RNA (Schroeder in sod., 2006). Na sliki 10 so prikazani rezultati za 12 naključno izbranih vzorcev, v obliki grafov z ustreznimi vrednostmi RIN. Vrednosti se gibljejo od 8,3 do 9,2, kar pomeni, da je RNA le malo razgrajena.



Slika 10: Elektroferogrami naključno izbranih vzorcev s pripadajočimi vrednostmi RIN

#### 4.3 IZBRANI GENI V JETRIH IN NADLEDVIČNI ŽLEZI

V raziskavi smo preverjali vpliv gena *Crem* na gene cirkadiane ure in gene, ki sodelujejo v metabolizmu holesterola do steroidnih hormonov ali žolčnih kislin ter gene jedrnih receptorjev.

Za potrebe statističnih obdelav smo določili raven izražanja še za referenčne gene, ki so se v predhodnih študijah izkazali za najbolj učinkovite pri raziskovanju cirkadianih ritmov in sicer: *Rn18s* in *Rplp0* (Košir in sod., 2010).

Magistrsko delo je hkrati tudi del širših raziskav, v katerem smo vzorce zajeli iz dveh tkiv, in sicer jeter ter nadledvične žleze. V predhodni raziskavi (Košir, 2011) je bilo ugotovljeno, da v nadledvični žlezi *Crem* vpliva na izražanje skoraj 150 genov, kjer ima velika večina znižano izražanje, kar nakazuje na vlogo aktivatorskih oblik gena *Crem* v tej žlezi. Medtem ko ima *Crem* v jetrih manjši vpliv, ker se je izražanje spremenilo le nekoliko več kot 10 genom (Košir, 2011). Glede na te ugotovitve so bili predhodno izbrani tudi geni, ki smo jih opazovali mi. S pomočjo qPCR v realnem času smo opazovali izražanje izbranih genov.

Preglednica 4: Izbrani geni pri katerih smo merili izražanje v jetrih in nadledvični žlezi

GENI	JETRA	NADLEDVIČNE ŽLEZE
GENI CIRKADIANE URE		
<i>Per1</i>	X	X
<i>Per2</i>	X	X
<i>Per3</i>	X	X
<i>Dbp</i>	X	X
<i>Bhlhe40 (Dec1)</i>	X	X
<i>Bhlhe41 (Dec2)</i>	X	X
<i>Arnt1 (Bmal1)</i>	X	X
<i>Cry1</i>	X	X
<i>Cry2</i>	X	X
<i>RevERBa</i>	X	X
GENI PRISOTNI PRI SINTEZI HOLESTEROLA		
<i>Cyp51</i>	X	
<i>Hmgcr</i>	X	
<i>Por</i>	X	
GENI PRISOTNI PRI SINTEZI ŽOLČNIH KISLIN		
<i>Cyp7a1</i>	X	
<i>Cyp8b1</i>	X	
<i>Cyp27a1</i>	X	
GENI, KI PREPISUJEJO JEDRNE RECEPTORJE		
<i>PparA</i>	X	
<i>PparD</i>	X	
<i>PGC1a</i>	X	
<i>Rxr</i>	X	
<i>Car</i>	X	
<i>Pxr</i>	X	
<i>Srebp2</i>	X	
GENI PRISOTNI PRI SINTEZI STEROIDNIH HORMONOV		
<i>Cyp11a1</i>		X
<i>Cyp11b2</i>		X
<i>Cyp17a1</i>		X
<i>Cyp21a1</i>		X
<i>Cyp39a1</i>		X

#### 4.4 IZRAŽANJE GENOV CIRKADIANE URE V JETRIH IN ADRENALNI ŽLEZI

Podatke smo interpretirali na podlagi grafičnega prikaza z gladilnikom Loess in s pomočjo rezultatov statističnega modeliranja, ki so prav tako grafično prikazani. Pomembno je zavedanje, da na vseh grafih čas med 0 in 12 pomeni dnevno fazo s stališča ure ritmovnika in čas od 12 do 24 nočno fazo oziroma ugasnjeno luč.

Pri genih, kjer je bilo sipanje podatkov preveliko, predvsem metabolnih genih, ki se ne izražajo tako robustno, statistični model ni predvidel cirkadianega izražanja, kar je razlog, da pri teh genih ni grafičnega prikaza statističnih podatkov.

Na grafičnih prikazih z gladilnikom Loess modre črte prikazujejo vrednosti gladilnika Loess, osenčena področja pa pripadajočo 95 % ovojnico zaupanja.

Grafični prikaz rezultatov statističnega modeliranja je razdeljen na tri grafe: graf A- menisor, B- amplituda, C- faza. Ročaji prikazujejo 95 % interval zaupanja.

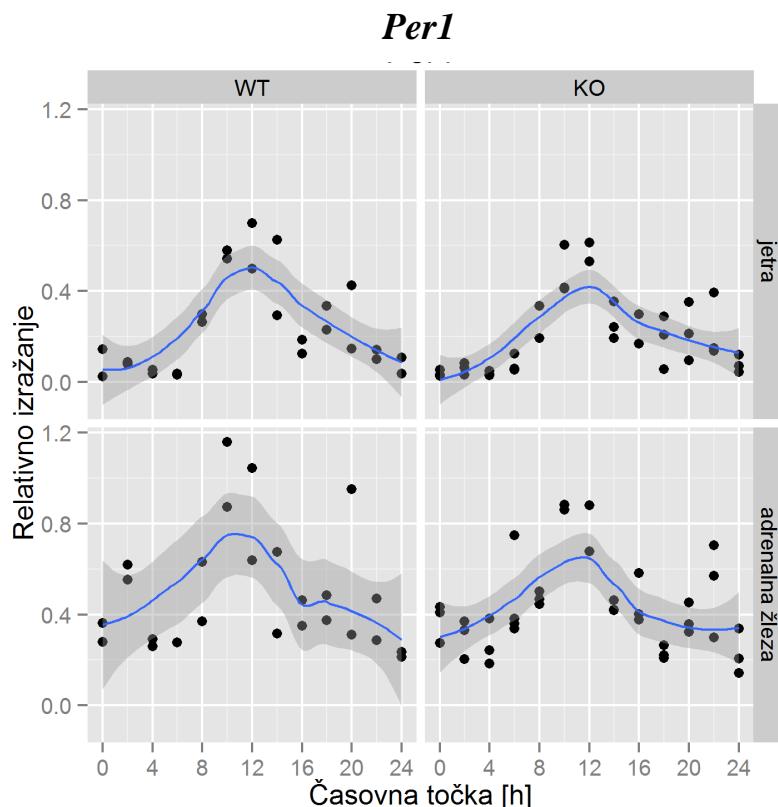
Rezultati qPCR so predstavljeni za vsak izbrani gen posebej. Kjer je ocena parametrov nakazovala na razlike v fazi ali amplitudi, smo to ponovno preverili (Priloga E). Na teh grafih so krivulje linij WT in KO predstavljene na isti sliki. Vizualno smo preverjali prekrivanje ovojnici 95% intervala zaupanja. Če prekrivanja ni, to nakazuje na razliko zaradi odsotnosti CREM.

##### 4.4.1 *Per1*

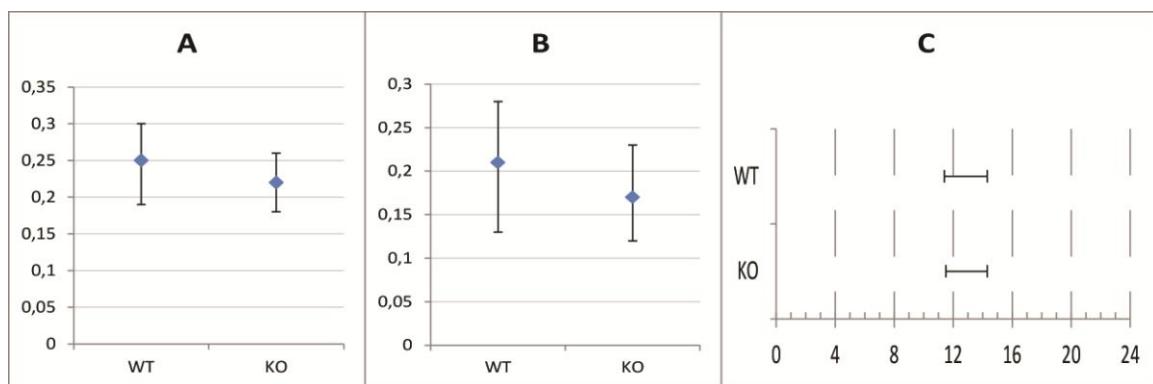
Znano je, da ima *Per1* pomembno vlogo v sistemu cirkadiane ure v SCN, v perifernih tkivih pa vloga še ni natančno pojasnjena. Pri miših z okvarjenimi geni *Per* so ugotovili, da prihaja do sprememb v periodi nihanja izražanja genov (Cermakian in sod., 2001).

Pri WT miših je tako v jetrih kot v nadledvičnih žlezah, glede na grafe z gladilnikom Loess, izražanje gena cirkadiano. Število transkriptov se med svetlobno fazo veča in doseže maksimum pred ugasnitvijo luči (okrog CT 12) in nato med temno fazo pada do minimuma (CT 24). Statistična obdelava ni pokazala signifikantnih razlik, saj se 95 % intervala zaupanja med skupinama WT in KO prekrivata, CREM naj torej ne bi imel vpliva

na izražanje *Per1* (Priloga E). Opazimo lahko manjše spremembe v mesinorju nihanja (Slika 12A), prav tako je nekoliko manjša amplituda nihanja (Slika 12B). Statistični izračuni za meritve iz nadledvičnih žlez so pokazali, da nihanje ni cirkadiano.



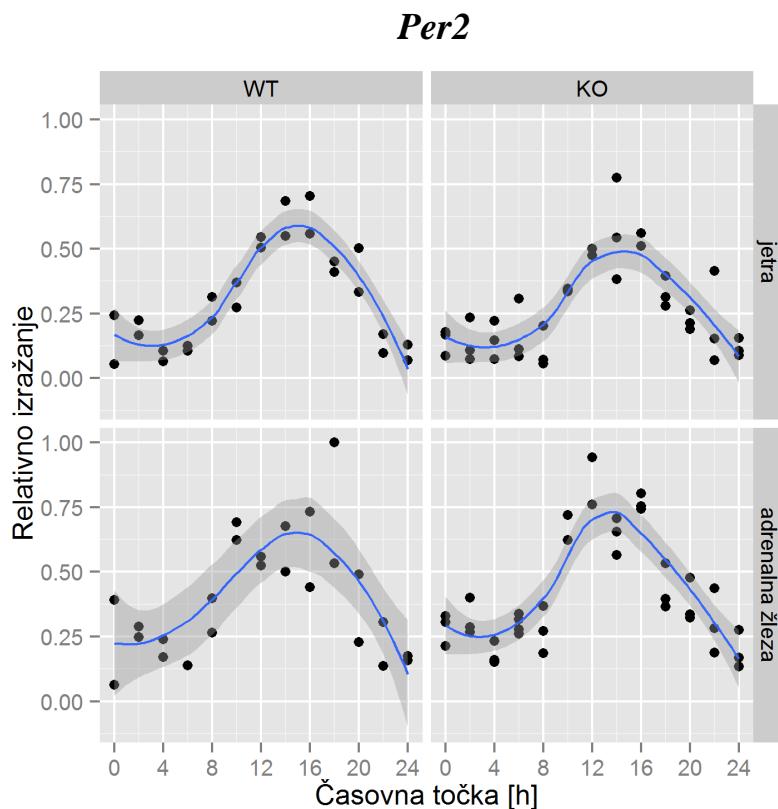
Slika 11: Izražanje gena *Per1* v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess



Slika 12: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen *Per1* v jetrih: A-mesinor, B-amplituda, C-faza

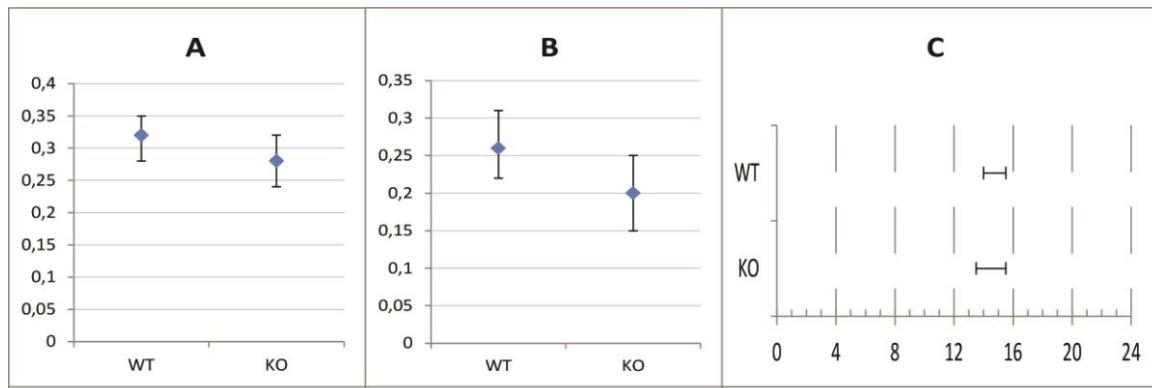
#### 4.4.2 *Per2*

Naše meritve kažejo, da je nihanje gena cirkadiano, največja količina mRNA je pri približno CT14, najmanjša pa pri CT 24 (Slika 13). Iz grafov rezultatov statističnega modeliranja lahko zaključimo, da ni statistično pomembnih razlik (Priloga E), opazi se nekoliko zmanjšana amplituda izražanja v KO liniji v jetrih (Slika 14B).

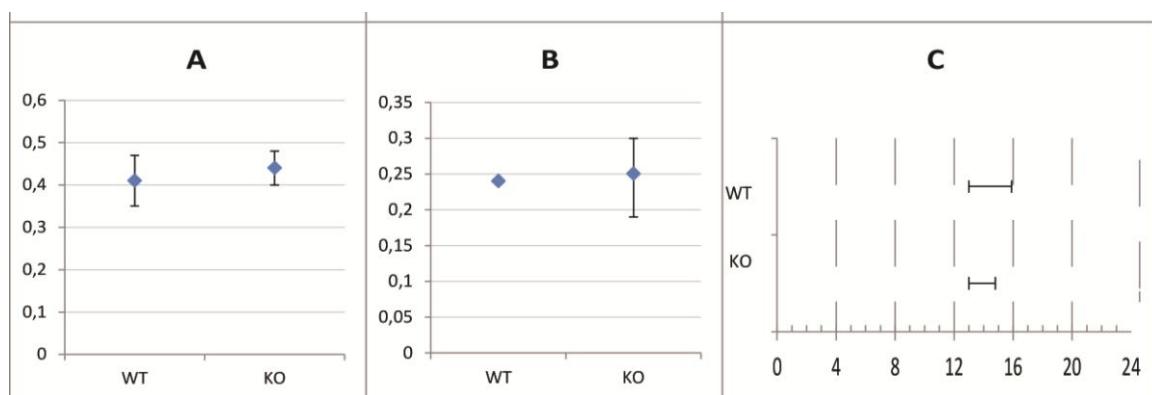


Slika 13: Izražanje gena *Per2* v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

## JETRA



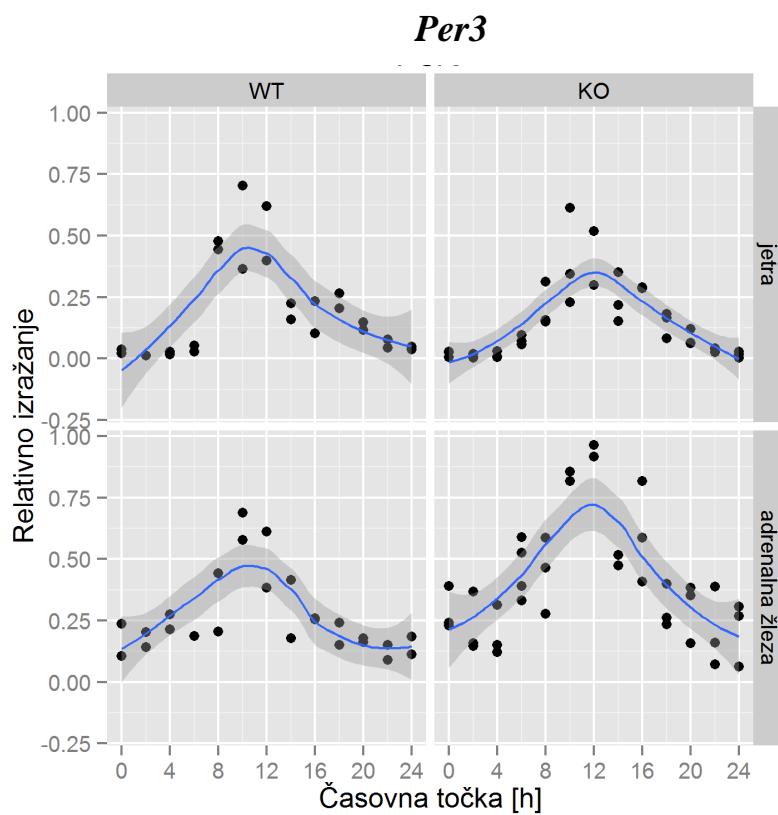
## NADLEDVIČNA ŽLEZA



Slika 14: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen *Per2* v jetrih in nadledvičnih žlezah: A- mesinor, B-amplituda, C- faza

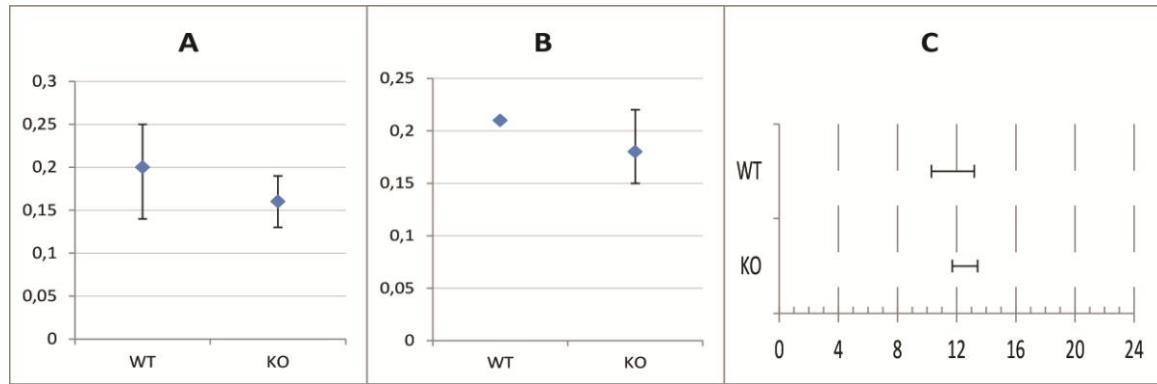
#### 4.4.3 *Per3*

*Per3* se prav tako izraža cirkadiano, kar je razvidno iz predstavljenih grafov. Največje število transkriptov je malo pred koncem svetlobne faze (CT11). Prišlo pa je do razlike v amplitudi izražanja. V jetrih se je nekoliko znižala, medtem ko se je v nadledvičnih žlezah povečala (Slika 15, Slika 16B). Iz rezultatov statistične obdelave pri *Per3* lahko opazimo razlike, največje pri mesinorju v nadledvičnih žlezah (Slika 16A). Tu se intervala zaupanja ne prekrivata, kar pomeni, da je razlika statistično značilna. Mesinor je višji pri KO miših, iz česar bi lahko sklepali, da ima CREM določen vpliv na izražanje *Per3*. Prav tako je opazna razlika v intervalih amplitude, ki sicer ni statistično značilna (Slika 16B), vendar tudi s pomočjo grafov z uporabljenim gladilnikom Loess ocenimo vpliv gena *Crem* na izražanje. Navedeno potrjujejo tudi grafi v prilogi E.

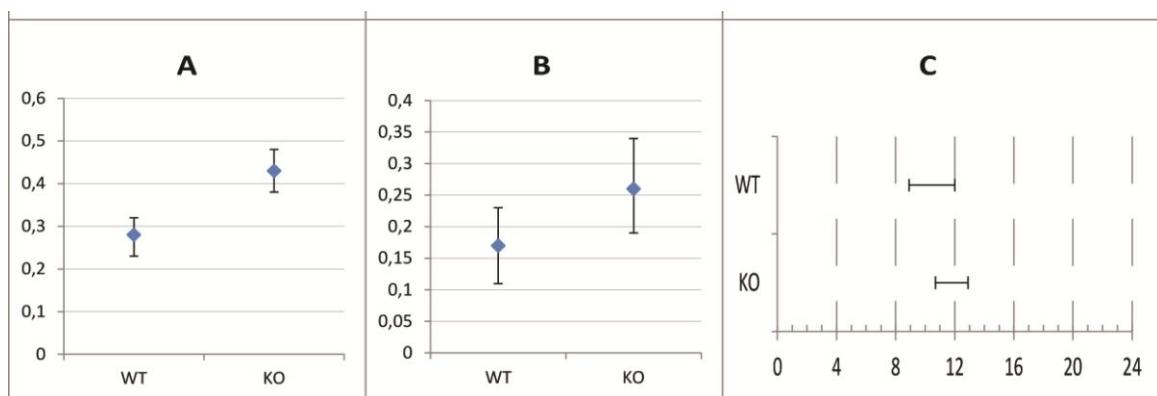


Slika 15: Izražanje gena *Per3* v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

## JETRA



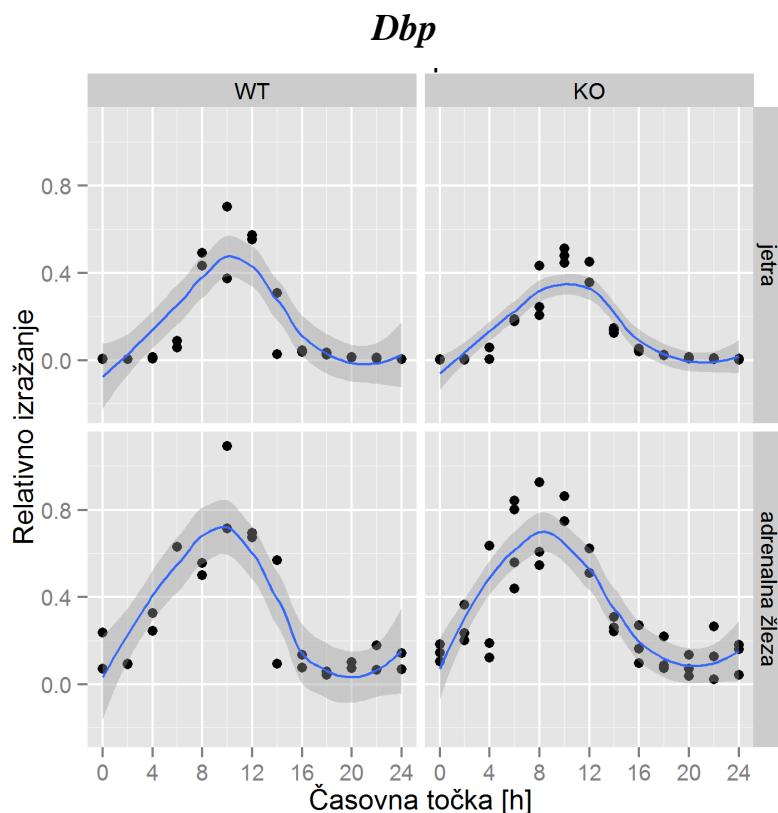
## NADLEDVIČNA ŽLEZA



Slika 16: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen *Per3* v jetrih in nadledvičnih žlezah: A- amplituda, B-amplituda, C- faza

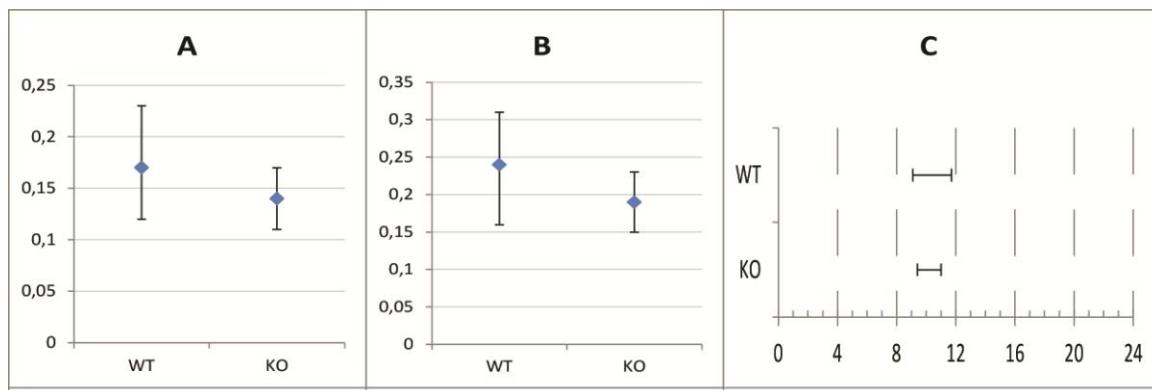
#### 4.4.4 *Dbp*

DBP (angl. albumin D element-binding protein) je transkripcijski faktor. Na izražanje gena *Dbp* vpliva predvsem svetloba, CREM naj ne bi imel vpliva nanj, kar je razvidno tudi iz naših rezultatov. Grafi z uporabljenim gladilnikom Loess kot statistični rezultati ne kažejo relevantnega odstopanja oziroma večjih sprememb v izražanju pri KO miših, pokaže pa se trend zmanjšanja amplitude pri KO liniji v jetrih (Priloga E). Nekoliko zmanjšana amplituda nihanja v KO liniji v jetrih je opazna na sliki 17, prav tako je manjše odstopanje vidno na sliki 18B. Tako v jetrih kot v nadledvičnih žlezah je pri obeh – WT in KO miših najvišje število transkriptov pri CT okrog 10. Gen *Dbp* se glede na naše rezultate izraža cirkadiano.

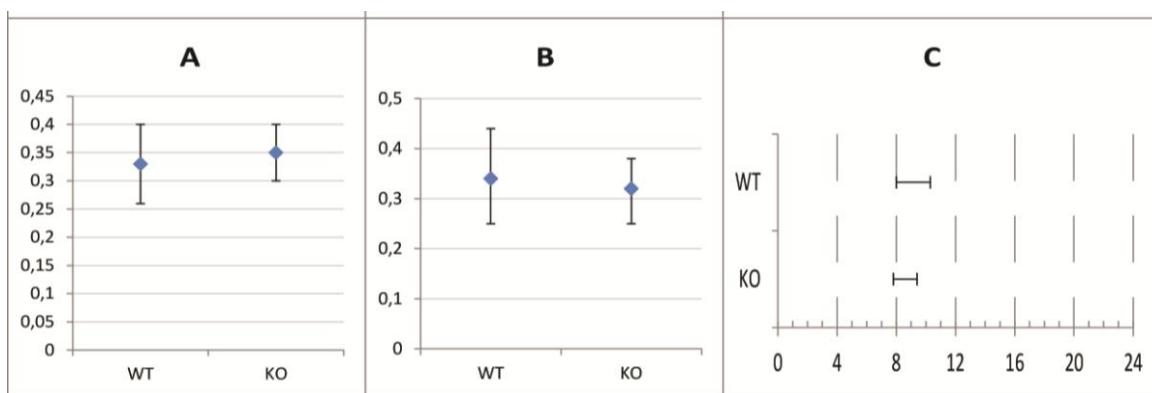


Slika 17: Izražanje gena *Dbp* v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

## JETRA



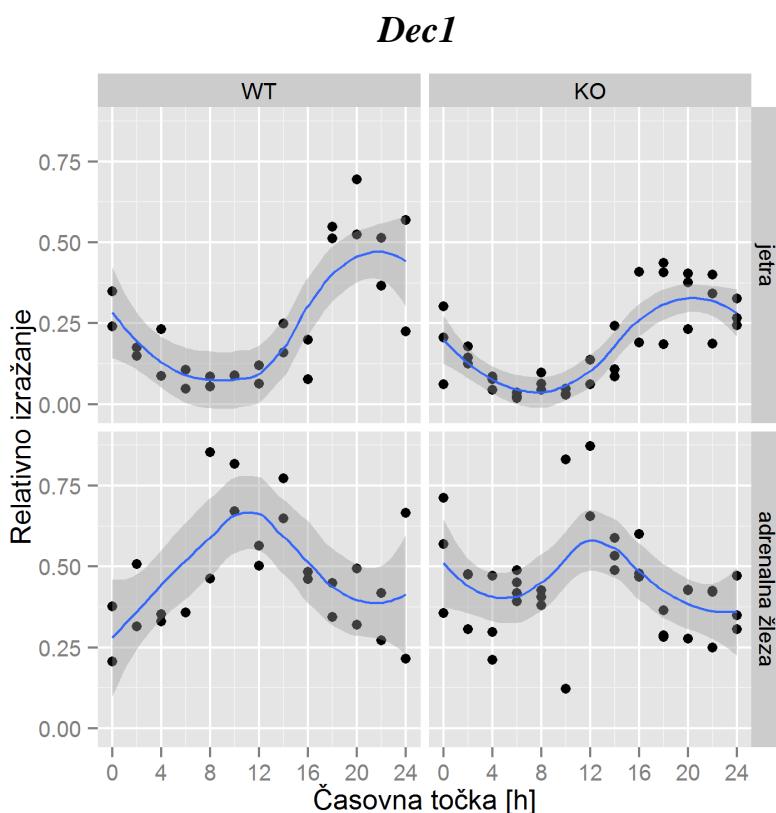
## NADLEDVIČNA ŽLEZA



Slika 18: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen *Dbp* v jetrih in nadledvičnih žlezah: A- mesinor, B-amplituda, C- faza

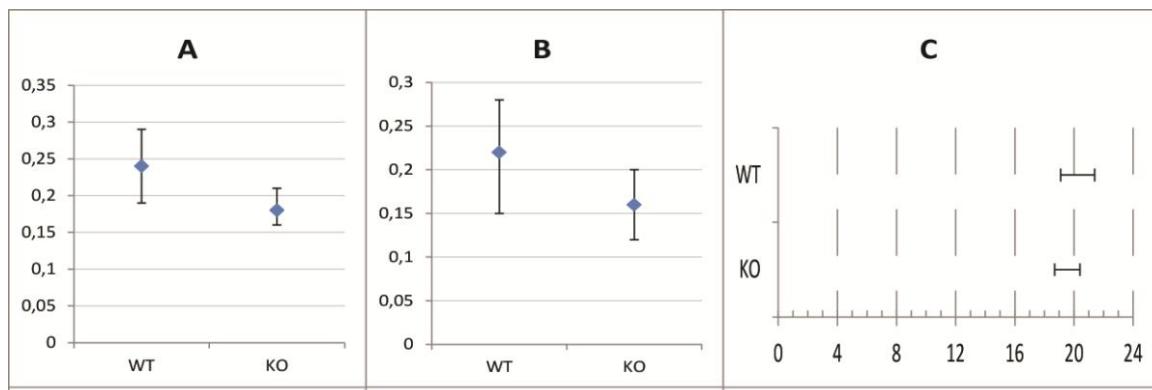
#### 4.4.5 *Bhlhe40 (Dec1)*

Transkripcijski faktor BHLHE40 je bolj poznan pod imenom DEC1. Naši rezultati kažejo na razliko v izražanju gena *Dec1* med jetri in nadledvičnimi žlezami. Med WT in KO mišmi na prvi pogled ni statistično signifikantnih razlik niti v jetrih kot tudi ne v nadledvičnih žlezah. Podrobnejša analiza nakazuje, da prihaja do razlik nihanja izražanja med tkivi (Priloga E). Najviše število transkriptov je v jetrih pri CT 20 in najnižje pri CT okoli 8. V nadledvičnih žlezah pa je faza zamaknjena, najviše število transkriptov opazimo pri CT 12, najnižje pa pri CT okoli 4. Spodnji rezultati kažejo, da se lahko geni v nihanju oz. glede na časovne točke v različnih tkivih različno izražajo. Učinki CREM na cirkadiano izražanje *Dec1* statistično nismo dokazali.

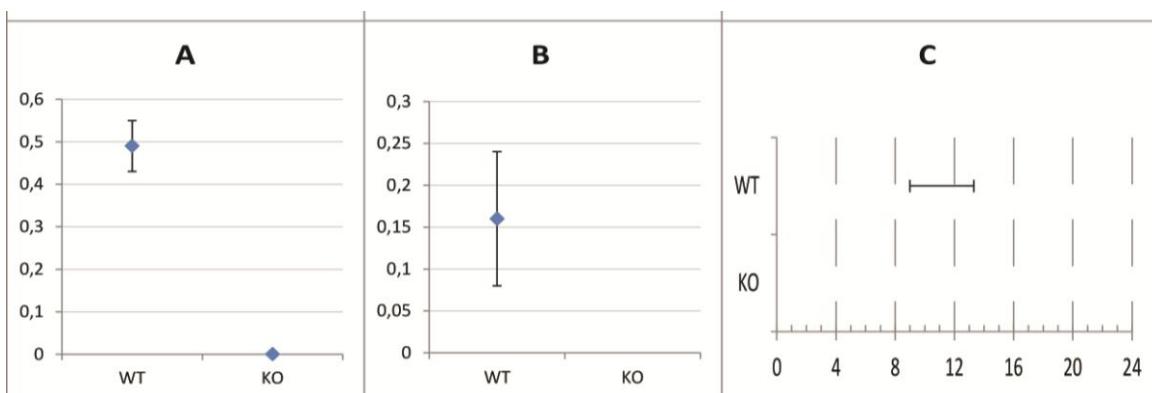


Slika 19: Izražanje gena *Dec1* v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladišnikom Loess

## JETRA



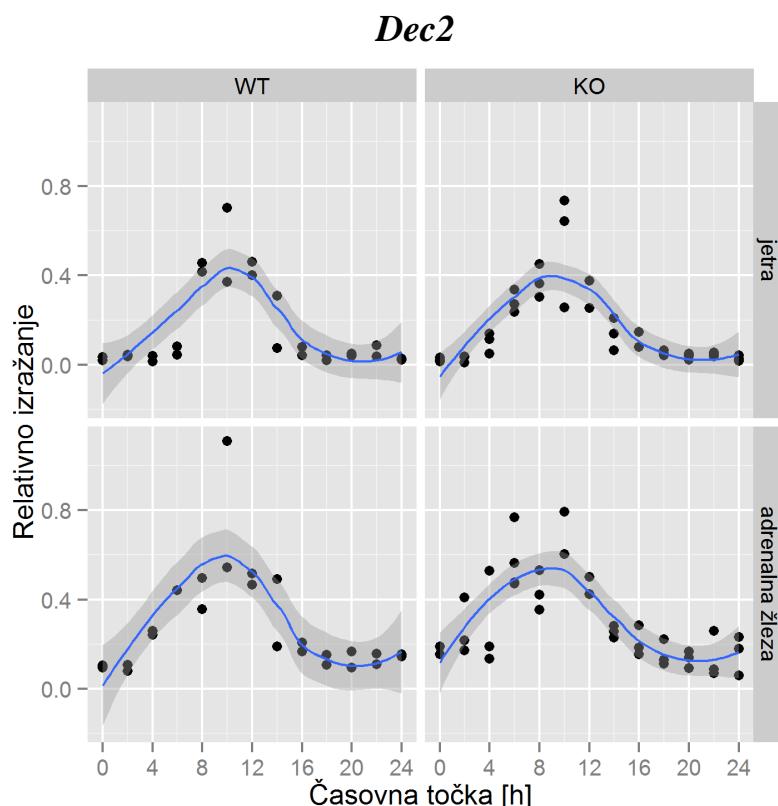
## NADLEDVIČNA ŽLEZA



Slika 20: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen *Dec1* v jetrih in nadledvičnih žlezah: A-mesinor, B-amplituda, C-faza

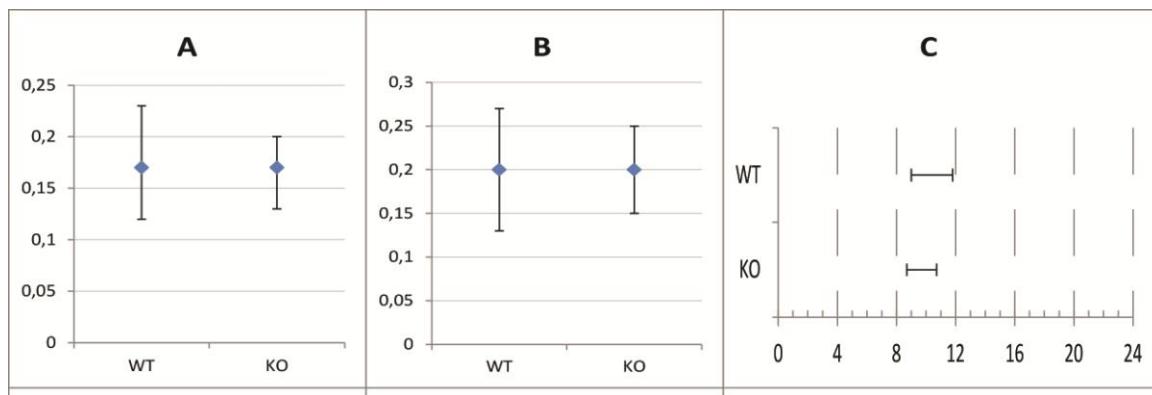
#### 4.4.6 *Bhlh41 (Dec2)*

DEC2 ali BHLH41 spada v isto družino transkripcijskih faktorjev kot *Dec1* in tudi ta sodeluje pri uravnavanju cirkadianih ritmov. Rezultati za ta gen kažejo na cirkadiano izražanje, prav tako lahko sklepamo, da CREM nima vpliva na izražanje tega gena, saj med WT in KO vzorci ni signifikantne razlike. Najvišje število transkriptov je pri vseh vzorcih okrog CT 10, najnižje pa pri CT 22.

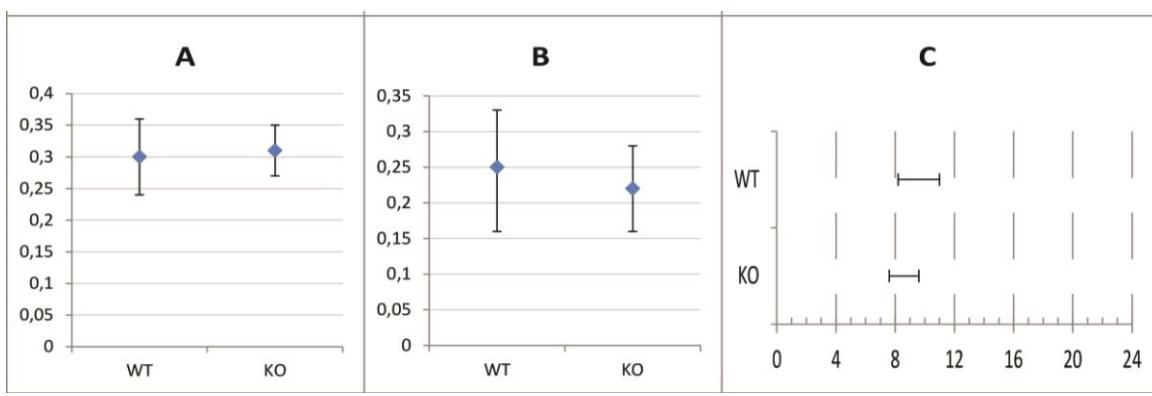


Slika 21: Izražanje gena *Dec2* v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

## JETRA



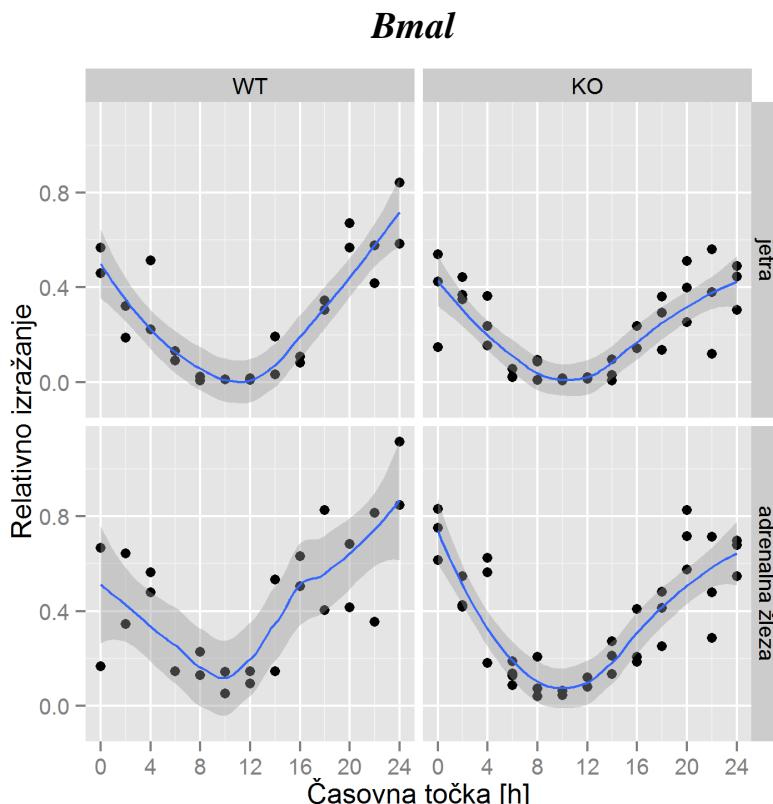
## NADLEDVIČNA ŽLEZA



Slika 22: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen *Dec2* v jetrih in nadledvičnih žlezah: A- mesinor, B-amplituda, C- faza

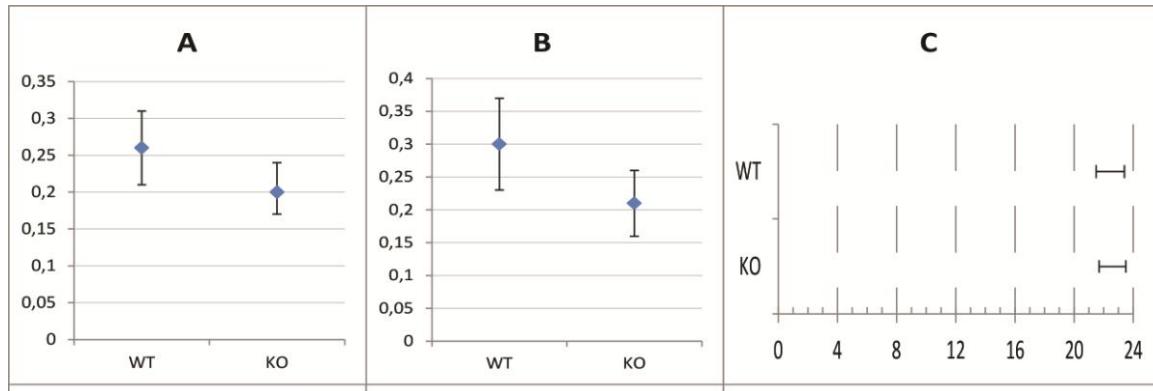
#### 4.4.7 *Arnt1 (Bmal)*

*Bmal* ali *Arnt1* je še en centralni gen cirkadiane ure, vendar je faza nihanja drugačna kot v do sedaj obravnavanih genih. Minimalno število transkriptov je pri CT okrog 12 in maksimalno pri CT 24 (Slika 23), obratno kot pri ostalih centralnih genih. Iz naših rezultatov je razvidno, da se krivulje izražanja gena med tkivi ne razlikujejo, prav tako je izražanje gena *Bmal* med WT in KO linijo nespremenjeno. Tudi statistični rezultati so pokazali podobno, saj se 95 % intervali zaupanja prekrivajo. Podrobnejša primerjava (Priloga E) nakazuje na zmanjšanje amplitude pri KO liniji v jetrih, vednar učinek CREM na cirkadiano izražanje *Bmal* ni statistično značilen.

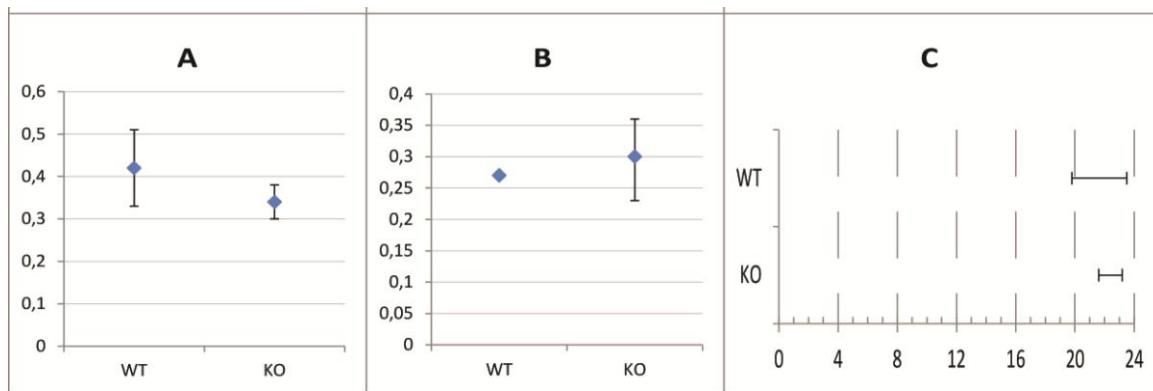


Slika 23: Izražanje gena *Bmal* v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

## JETRA



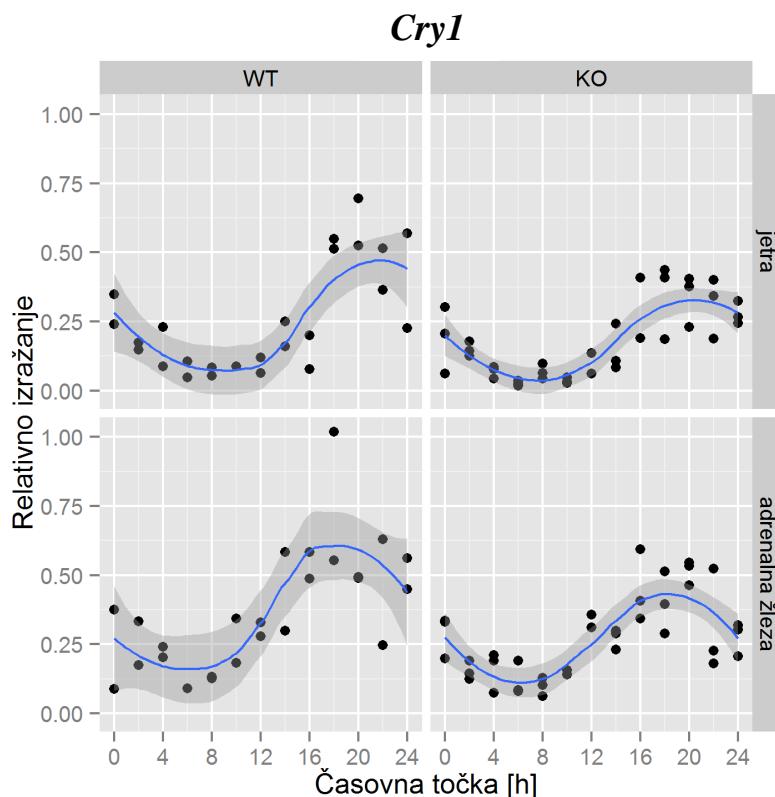
## NADLEDVIČNA ŽLEZA



Slika 24: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen *Bmal* v jetrih in nadledvičnih žlezah: A-mesinor, B-amplituda, C-faza

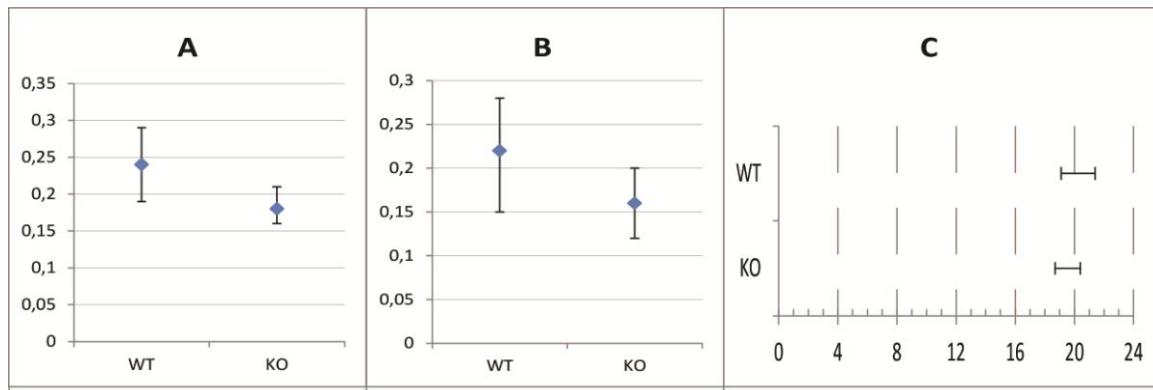
#### 4.4.8 *Cry1*

Gen *Cry1* kodira protein CRY1, ki je od svetlobe neodvisen inhibitor CLOCK-BMAL1 komponente cirkadiane ure (Griffin in sod., 1999). *Cry1* se torej po predhodnih raziskavah izraža cirkadiano, enako kažejo tudi naši rezultati. Najmanjše število transkriptov se tako v jeternih vzorcih kot v tistih iz nadledvičnih žlez kaže pri CT 8 in nato raste do maksimuma pri CT okrog 20. Med WT in KO vzorci na prvi pogled v nobenem od tkiv ni statistično pomembnih razlik. Rezultati v prilogi E nakazujejo na znižanje amplitude pri KO miših v obeh organih, vendar učinka CREM statistično nismo uspeli potrditi. Opazno je zmanjšanje mesinorja (Slika 26A) ter amplitude (Slika 26B) nihanja v KO vzorcih v obeh tkivih.

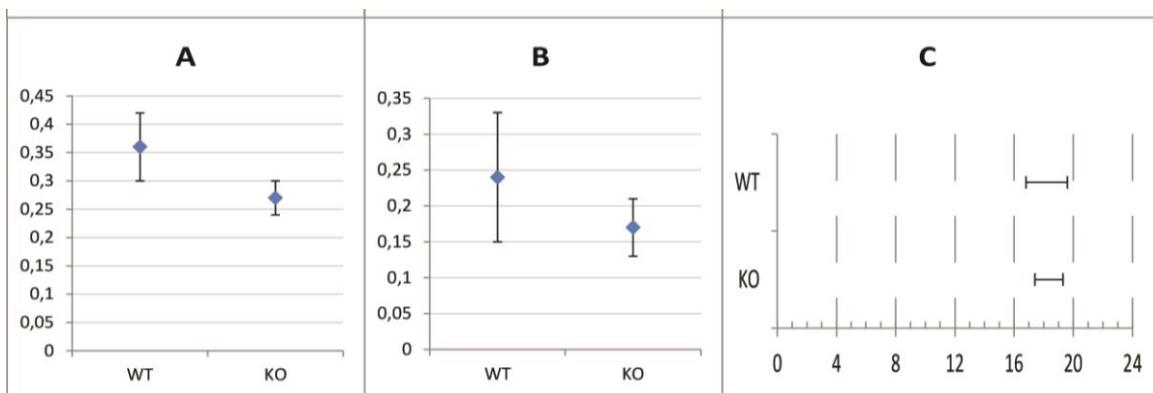


Slika 25: Izražanje gena *Cry1* v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

## JETRA



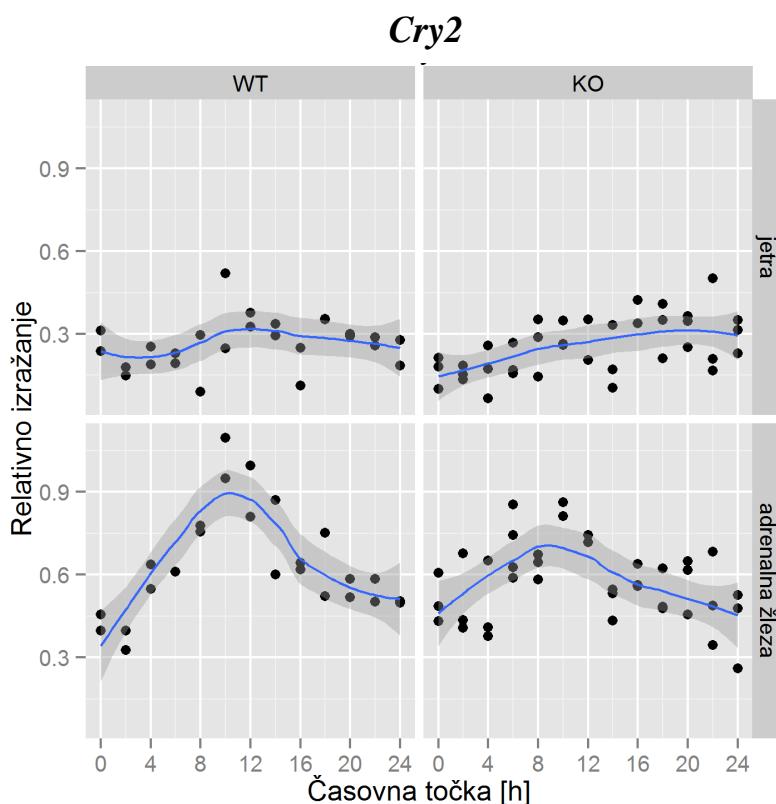
## NADLEDVIČNA ŽLEZA



Slika 26: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen *Cry1* v jetrih in nadledvičnih žlezah: A- mesinor, B-amplituda, C- faza

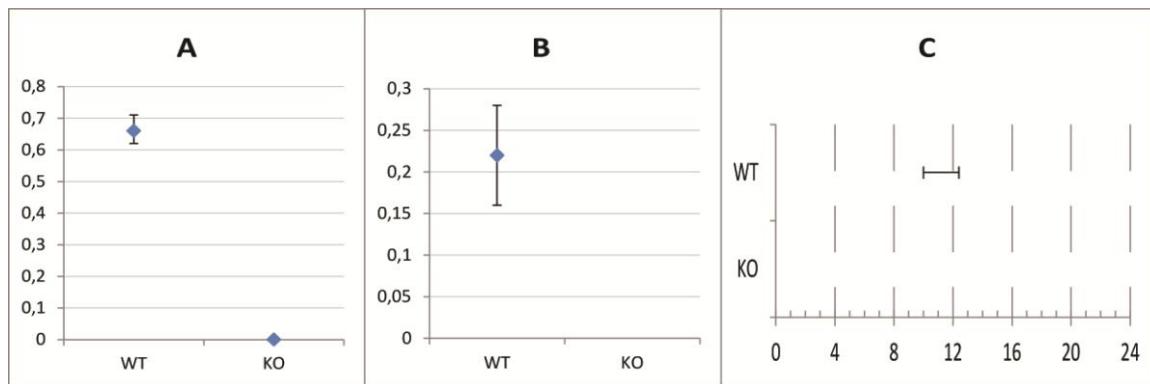
#### 4.4.9 *Cry2*

Dosedanje raziskave kažejo, da se *Cry1* v nadledvični žlezi izraža cirkadiano, ne pa tudi *Cry2* (Bele, 2011), kar so potrdili naši rezultati (Slika 27). V adrenalni žlezi opazimo cirkadiano nihanje *Cry2* z vrhom pri CT12, medtem ko je pri KO miših nihanje dušeno. Iz navedenega lahko sklepamo, da CREM vpliva na cirkadiano izražanje *Cry2* v adrenalni žlezi.



Slika 27: Izražanje gena *Cry2* v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

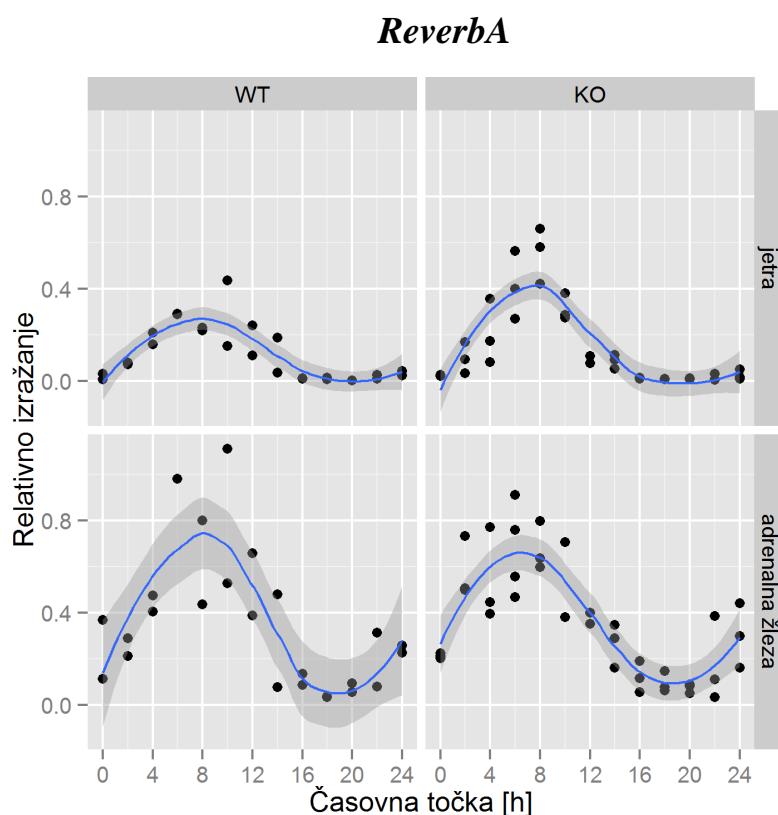
#### NADLEDVIČNA ŽLEZA



Slika 28: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen *Cry2* v nadledvičnih žlezah: A-mesinor, B-amplituda, C-faza

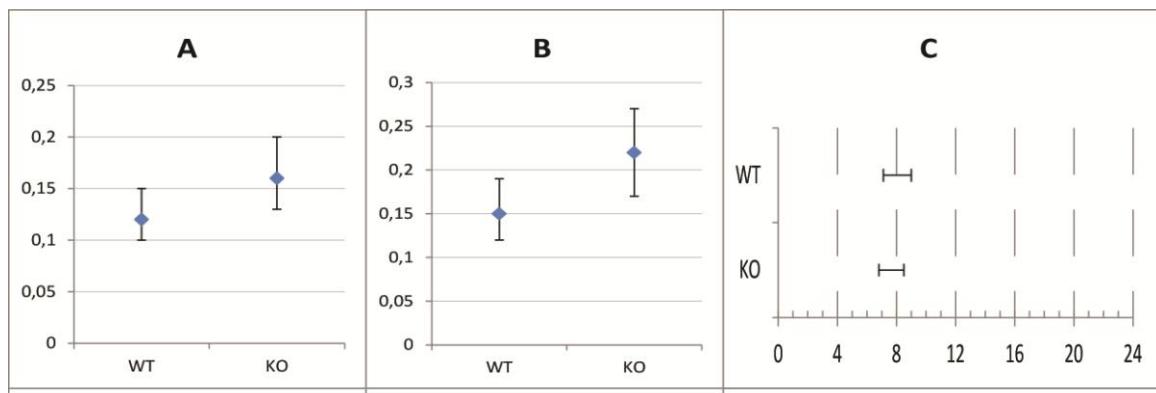
#### 4.4.10 *ReverbA* (*NR1D1*)

Iz obeh tkivnih vzorcev je razvidno, da je največje število transkriptov pri CT okrog 8 in se niža do minimuma pri CT 20. Statistični model kaže, da razlika v nihanju gena med linijama ni statistično pomembna, vendar je na grafu B (Slika 30) opazna povečana amplituda v KO jeter, kar je opaziti tudi na grafih v prilogi E. Statistično nam vpliva CREM na *ReverbA* ni uspelo dokazati.

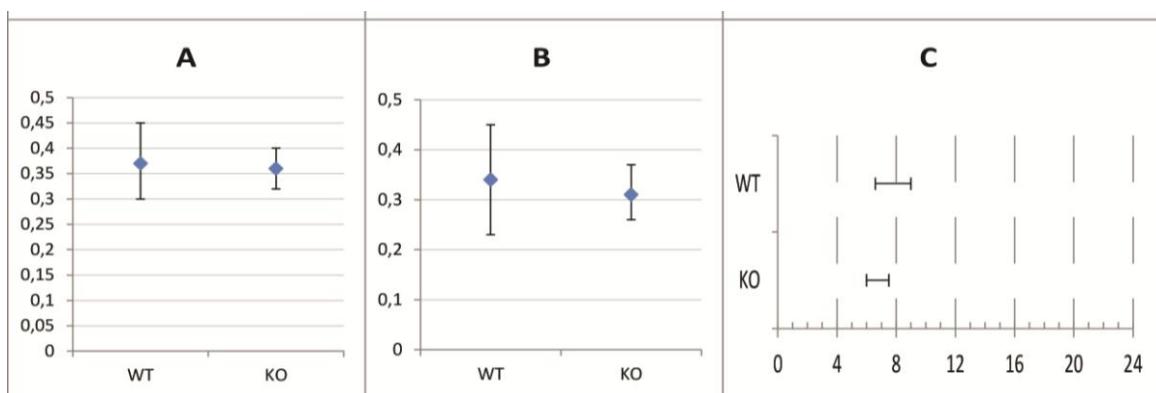


Slika 29: Izražanje gena *ReverbA* v jetrih in nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

## JETRA



## NADLEDVIČNA ŽLEZA

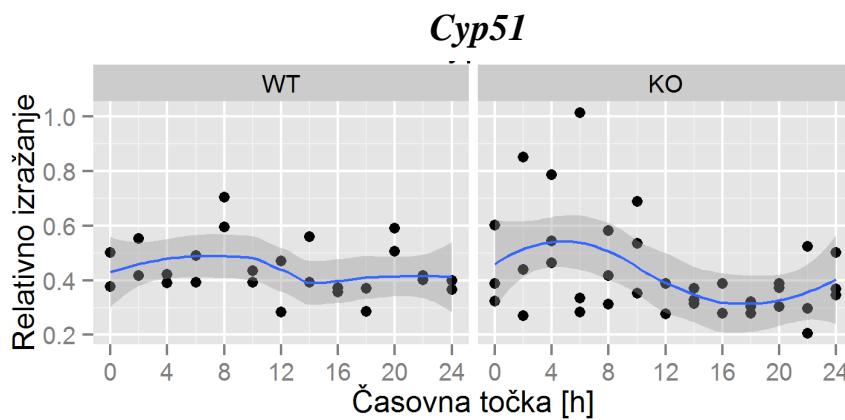


Slika 30: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gen *ReverbA* v jetrih in nadledvičnih žlezah: A- mesinor, B-amplituda, C- faza

## 4.5 IZRAŽANJE GENOV UDELEŽENIH V SINTEZO HOLESTEROLA V JETRIH

### 4.5.1 *Cyp51*

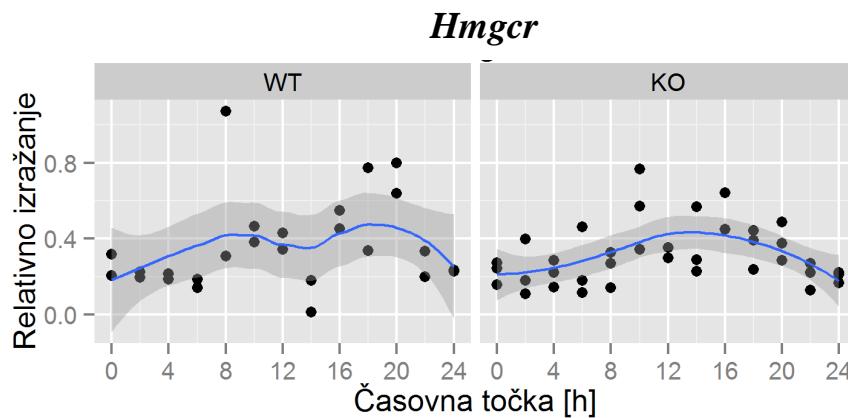
Eden izmed najbolj ohranjenih citokromov P450, ki je vključen v biosintezo endogenega holesterola je *Cyp51*. Uporabljen statistični model kaže, da nihanje gena ni cirkadiano, vendar graf z uporabljenim gladilnikom Loess vendarle implicira določeno cirkadianost. Pri vzorcih iz jeter je največje število transkriptov pri CT 6, najmanjše pa pri CT okrog 18, nato pa spet raste. Signifikantnih razlik med WT in KO ni.



Slika 31: Izražanje gena *Cyp51* v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

### 4.5.2 *Hmgcr*

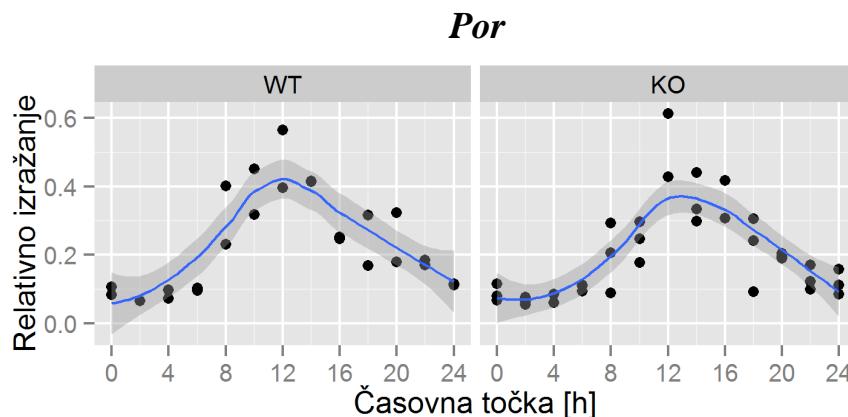
*Hmgcr* gen je udeležen v biosintezi holesterola. Zanj smo prišli do ugotovitev, da se ne izraža cirkadiano. Prav tako ne prihaja do drugačnega izražanja gena pri miših z izbitim genom *Crem*. Sicer se grafa WT in KO nekoliko razlikujeta, vendar je variabilnost znotraj časovnih točk velika.



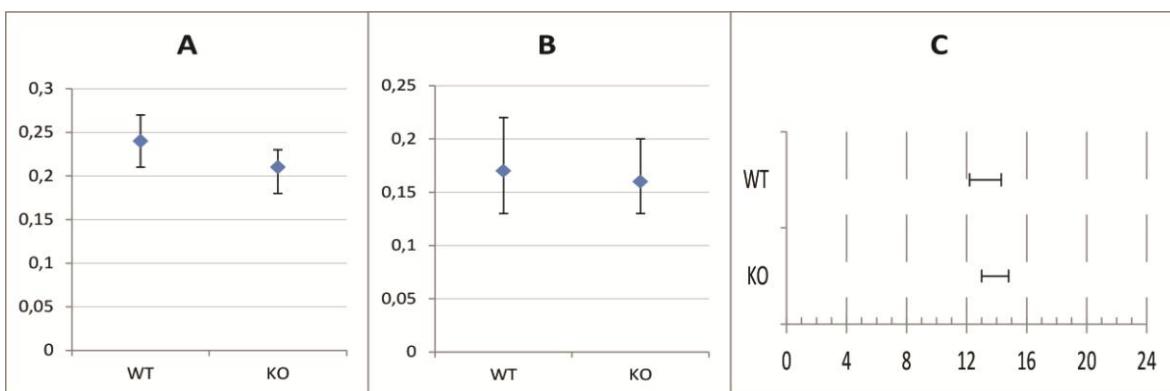
Slika 32: Izražanje gena *Hmgcr* v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

#### 4.5.3 *Por*

Gen *Por* se izraža cirkadiano. Tako grafi z uporabljenim gladilnikom Loess kot tudi statistični rezultati kažejo, da relativno izražanje sledi tipični sinusni krivulji in se skozi čas različno močno izraža. Minimalno število transkriptov je zaznati pri CT 0, nato pa se število veča do CT okrog 12. Transkripcijski faktor CREM pa na gen *Por* nima vpliva, saj med vzorci WT in KO ni statistično pomembnih razlik.



Slika 33: Izražanje gena *Por* v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

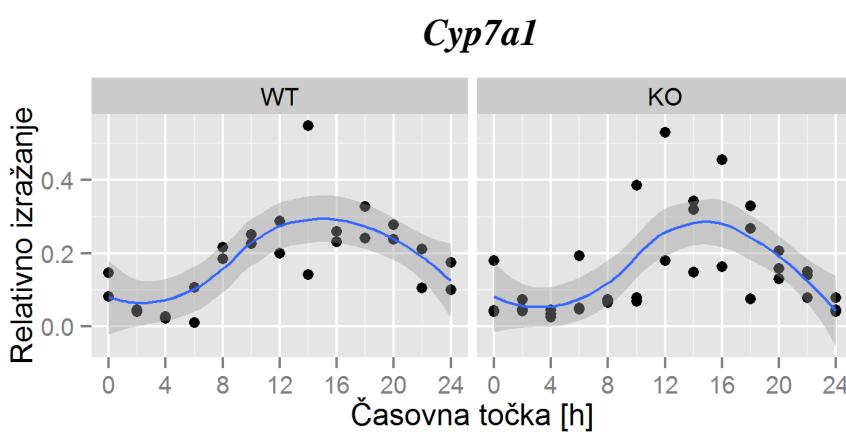


Slika 34: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gena *Por* v jetrih: A-mesinor, B-amplituda, C-faza

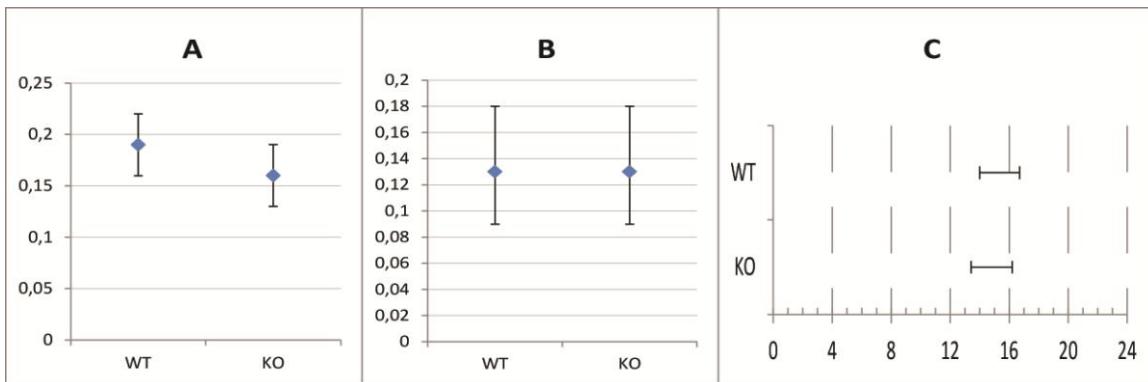
## 4.6 IZRAŽANJE GENOV UDELEŽENIH V SINTEZO ŽOLČNIH KISLIN V JETRIH

### 4.6.1 *Cyp7a1*

Izražanje gena *Cyp7a1* smo preverjali v vzorcih iz jeter in ugotovili, da se gen izraža cirkadiano. Najmanjše število transkriptov se opazi pri CT4 in najvišje pri CT okrog 15. Do razlik v izražanju pa med skupinama miši WT in KO ni prišlo. Uporabljen statistični model kaže, da ni statistično pomembnih razlik v izražanju, zmanjšan je le mesinor izražanja v KO vzorcih (Slika 36A), vendar se 95 % intervali zaupanja prekrivajo, tako da lahko zaključimo, da CREM nima vpliva na izražanje *Cyp7a1*.



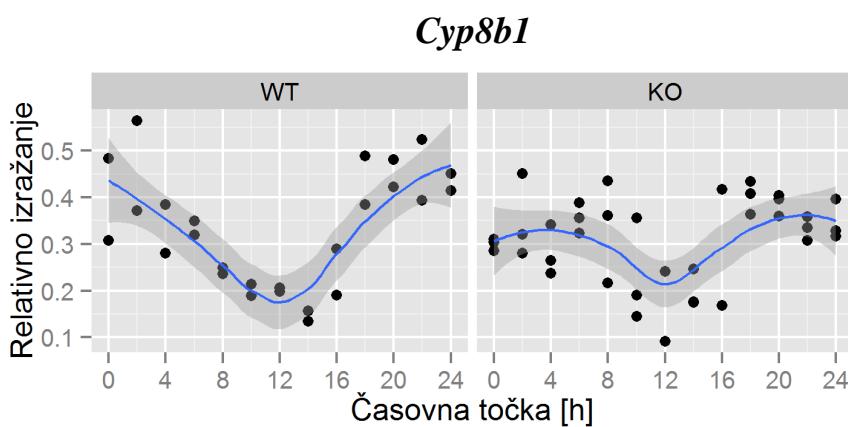
Slika 35: Izražanje gena *Cyp7a1* v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess



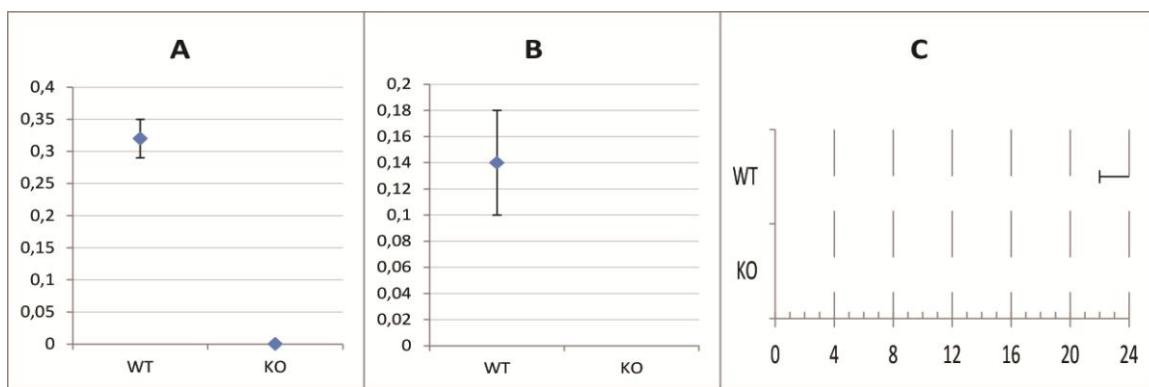
Slika 36: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gena *Cyp7a1* v jetrih: A-mesinor, B-amplituda, C-faza

#### 4.6.2 *Cyp8b1*

Protein CYP8B1 je protein, ki je pomemben v metabolizmu holesterola in drugih lipidov, kodira ga gen *Cyp8b1*. Statistični rezultati kažejo, da je pri vzorcih miši WT izražanje cirkadiano, medtem ko tako nihanje ni zaznano pri miših z izbitim genom *Crem*. Iz grafov z uporabljenim gladilnikom Loess lahko sklepamo, da je amplituda nihanja pri KO miših zmanjšana in glede na to zaključimo, da CREM vpliva na izražanje *Cyp8b1* gena v jetrih.



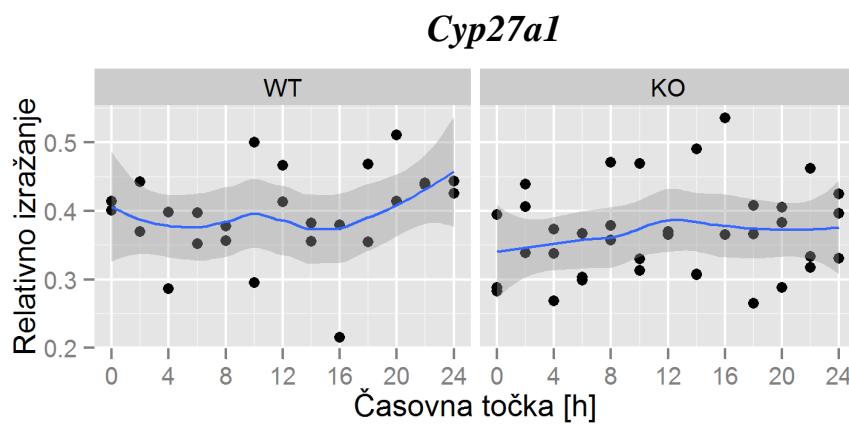
Slika 37: Izražanje gena *Cyp8b1* v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess



Slika 38: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gena *Cyp8b1* v jetrih: A-mesinor, B-amplituda, C- faza

#### 4.6.3 *Cyp27a1*

Tudi *Cyp27a1* sodi v superdružino citokromov P450, vendar so grafi očitno drugačni. Grafi z uporabljenim statističnim modelom Loess kažejo, da *Cyp27a1* nima cirkadianega ritma izražanja. Uporabljen statistični model je prav tako pokazal, da nihanje ni cirkadiano. Variabilnost znotraj časovnih točk je velika, ni opazne razlike med WT in KO vzorci, zato lahko zaključimo, da transkripcijski faktor CREM nima vpliva na izražanje *Cyp27a1*.

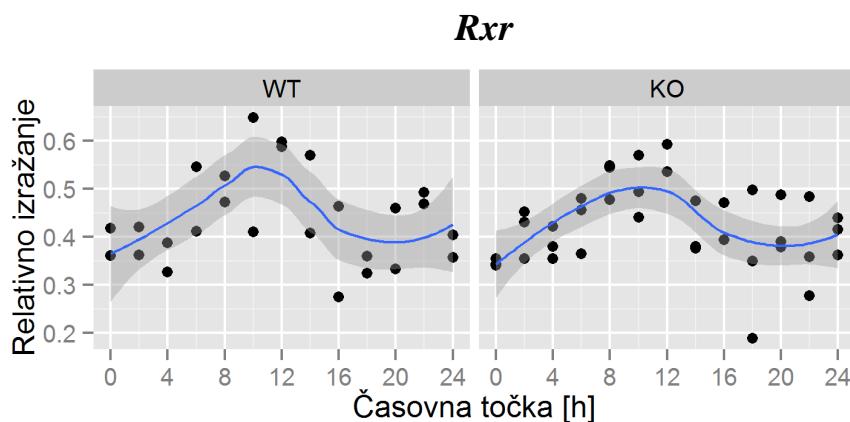


Slika 39: Izražanje gena *Cyp27a1* v jetrih na grafih z uporabljenim gladišnikom Loess

## 4.7 IZRAŽANJE GENOV JEDRNIH RECEPTORJEV V JETRIH

### 4.7.1 *Rxr*

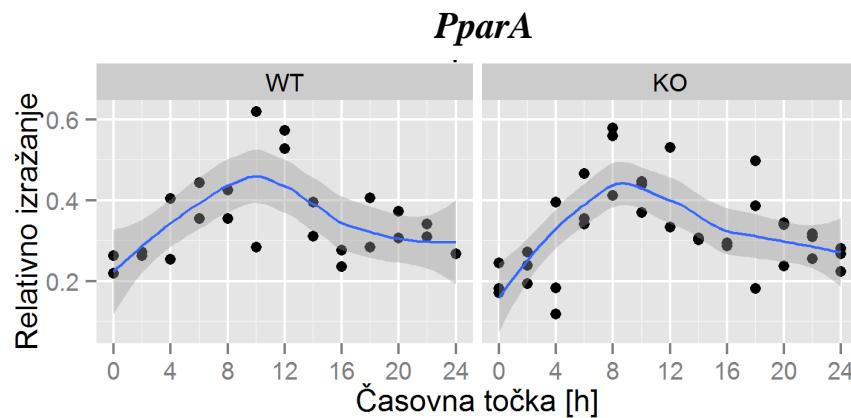
Pri genu *Rxr*, lahko na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess zaznamo maksimalno izražanje pri CT okrog 10 in minimalno pri CT okrog 20, tako da bi lahko sklepali, da gre za cirkadiano izražanje. Izračuni statističnega modela sicer ne kažejo slednjega, vendar je potrebno poudariti, da je variabilnost v izražanju genov znotraj iste časovne točke pri metabolnih genih precej višja kot pri cirkadianih genih in je zaradi tega s statističnimi izračuni težje priti do verodostojnega rezultata. Iz grafov na sliki 40 lahko ocenimo manjšo razliko, in sicer v amplitudi, ki se pri KO miših nekoliko zmanjša, vendar se 95 % intervala zaupanja WT in KO linije prekrivata (Priloga E).



Slika 40: Izražanje gena *Rxr* v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

### 4.7.2 *PparA*

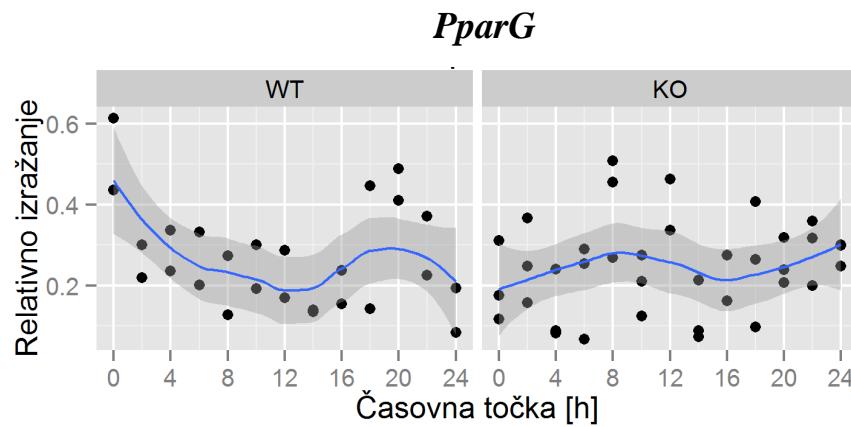
Na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess je najmočnejše izražanje vidno pri CT okrog 8 in nato pada proti CT 20. Statistični rezultati ne kažejo na cirkadiano izražanje. Krivulje izražanja med WT in KO se praktično ne razlikujeta, zato lahko zaključimo, da faktor CREM nima vpliva na izražanje tega gena.



Slika 41: Izražanje gena *PparA* v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

#### 4.7.3 *PparG*

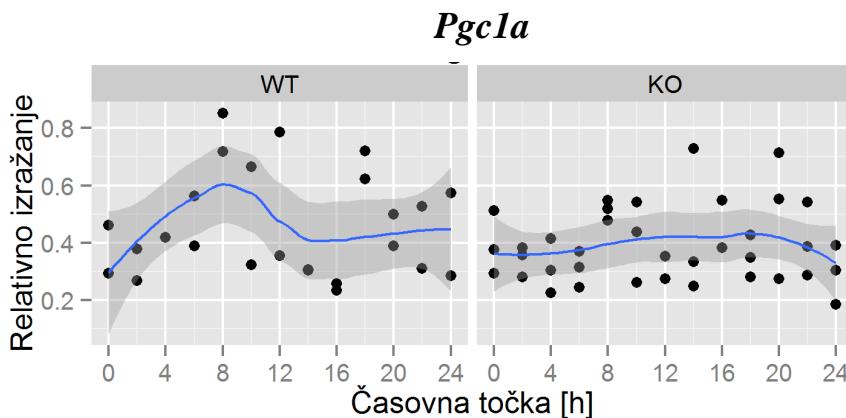
Za razliko od *PparA* pri genu *PparG* iz grafov ne moremo razbrati, da gre za cirkadiani način izražanja, saj ni zaslediti tipične krivulje. Prav tako statistični rezultati kažejo, da ne gre za statistično značilno cirkadiano izražanje. Iz spodnjih grafov (Slika 42) lahko razberemo, da se krivulji med KO in WT nekoliko razlikujeta, vendar ne moremo priti do zaključkov, da bi imel CREM faktor vpliv na izražanje gena *PparG*.



Slika 42: Izražanje gena *PparG* v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

#### 4.7.4 *Pgc1a*

*Pgc1a* ali *PparGC1* gen je prav tako gen uravnavanja metabolizma, in sicer deluje kot transkripcijski koaktivator jedrnih receptorjev. Pri vzorcih miši divjega tipa je iz spodnjega grafa razvidno (Slika 43) cirkadiano izražanje z nekoliko manjšo amplitudo, z največjim številom transkriptov pri CT 8 in najmanjšim okrog CT 16. Medtem ko je iz grafa KO razvidno, da je prišlo do utišanja takšnega izražanja in da je to precej konstantno, vedar ne moremo statistično dokazati, vpliva CREM ( Priloga E).

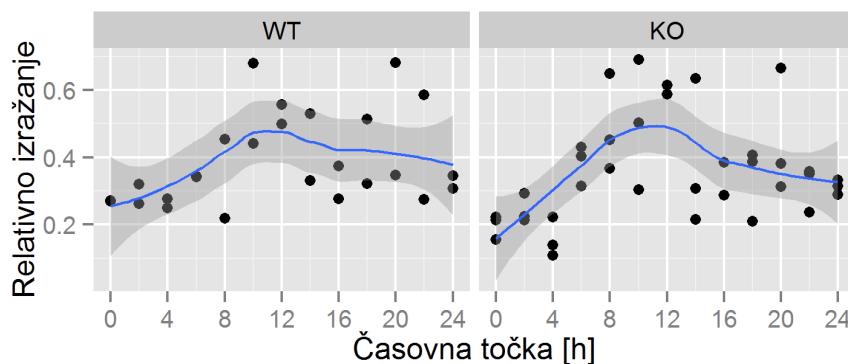


Slika 43: Izražanje gena *Pgc1a* v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

#### 4.7.5 *Car*

Gen *Car* ali *Nrl3* je še enden izmed genov uravnavanja metabolizma. Uporabljen statistični model sicer kaže, da se gen ne izraža cirkadiano, kljub temu pa graf z uporabljenim gladilnikom Loess vseeno nakazuje ritmično izražanje, ki pa je poudarjeno predvsem pri KO miših. Vizualno lahko ocenimo, da je amplituda izražanja Car gena v KO jetrih višja, vendar se 95 % intervala zaupanja med WT in KO linijo prekrivata (Priloga E).

### *Car*

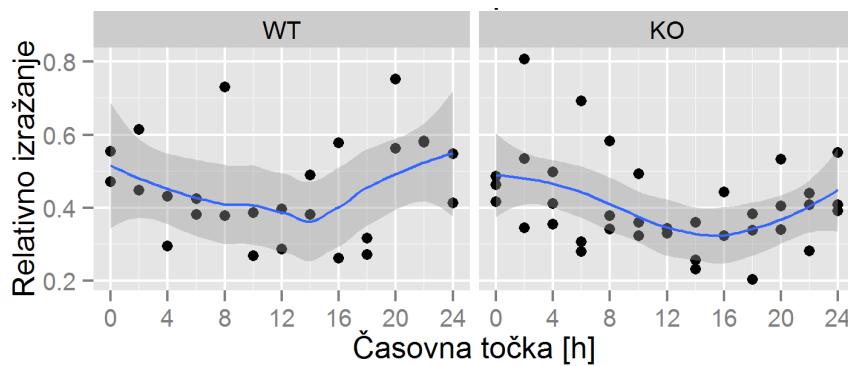


Slika 44: Izražanje gena *Car* v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

### 4.7.6 *Srebp2*

Statistični rezultati ne kažejo cirkadianega izražanja tega gena, vendar se vizualno lahko zazna manjšo amplitudo nihanja izražanja *Srebp2* gena, z najmanjšim številom transkriptov pri CT okrog 14 in največjim pri CT24. Med grafi z uporabljenim gladilnikom Loess je težko zaznati spremembe v izražanju med WT in KO mišimi, zato zaključimo, da CREM nima vpliva na izražanje gena *Srebp2*.

### *Srebp2*

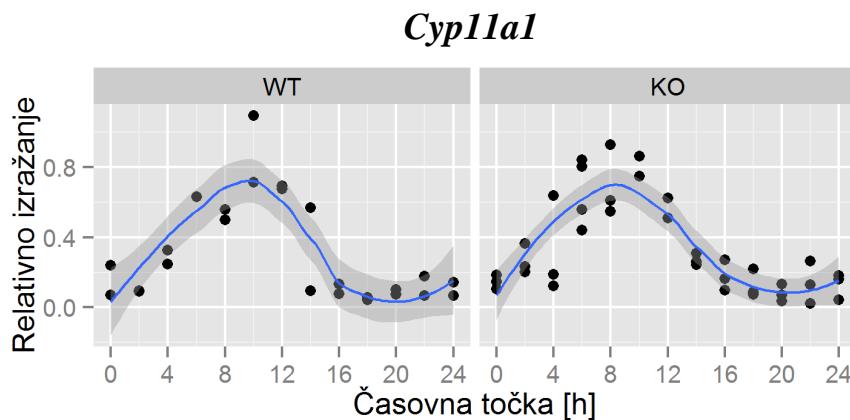


Slika 45: Izražanje gena *Srebp2* v jetrih na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

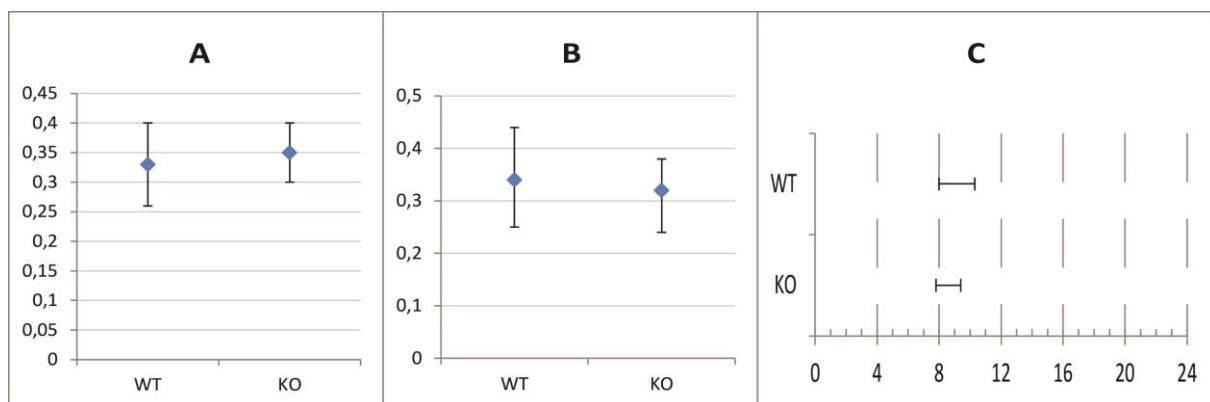
## 4.8 IZRAŽANJE GENOV UDELEŽENIH V SINTEZO STEROIDNIH HORMONOV V NADLEDVIČNI ŽLEZI

### 4.8.1 *Cyp11a1*

*Cyp11a1* kodira protein, ki je pomemben za sintezo steroidov v nadledvični žlezi, sodeluje namreč v prvi stopnji pretvorbe molekule holesterola. Iz naših rezultatov (Slika 46) lahko ugotovimo, da je izražanje v nadledvičnih žlezah cirkadiano, kar potrjujejo tudi statistični rezultati. Največje število transkriptov je pri CT okrog 8 in najnižje pri CT 20. Iz grafov z uporabljenim gladilnikom Loess je tudi razvidno, da se krivulja med KO in WT mišmi opazno ne razlikuje. Do statistično pomembnih razlik v izražanju tega gena pri miših z izbitim genom *Crem* ni prišlo, tako da lahko zaključimo, da CREM transkripcijski faktor nima vpliva na izražanje *Cyp11a1* v nadledvični žlezi.



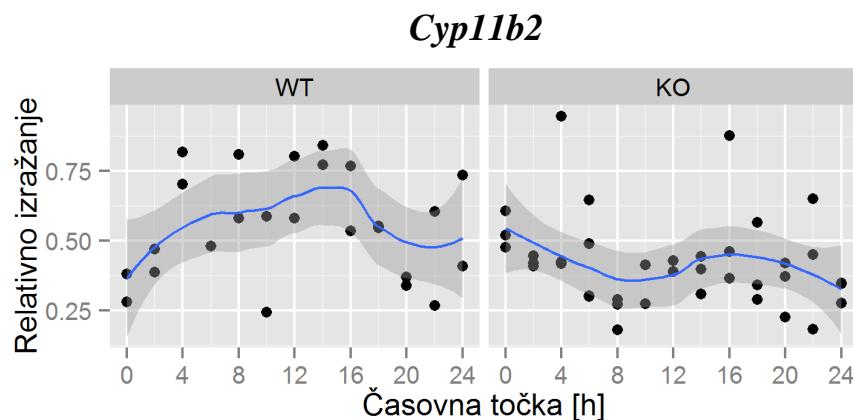
Slika 46: Izražanje gena *Cyp11a1* v nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess



Slika 47: Ocena parametrov modela cirkadianega nihanja za gena *Cyp11a1* v nadledvičnih žlezah: A-mesinor, B-amplituda, C-faza

#### 4.8.2 *Cyp11b2*

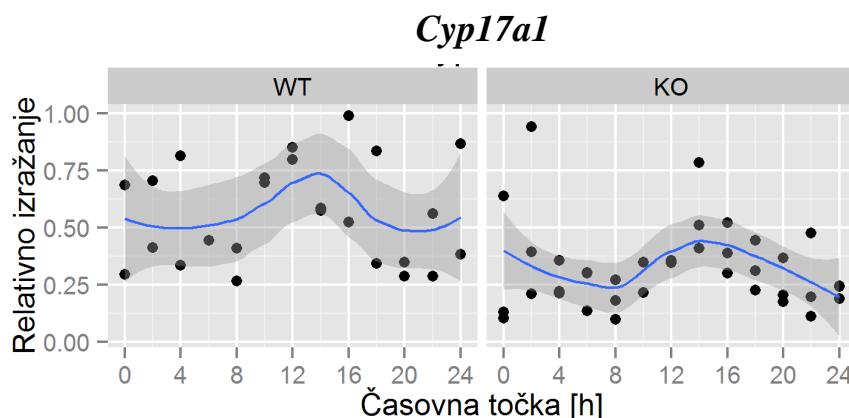
Gen *Cyp11b2* kodira protein CYP11B2, ki je pomemben pri sintezi mineralkortikoidov. Spada v enako družino kot *Cyp11a1*, vendar se presenetljivo, glede na naše rezultate, izraža drugače. Statistični rezultati ne kažejo cirkadianega izražanja, prav tako iz spodnjih grafov (Slika 48) ni mogoče zaznati cirkadianega izražanja. Iz predhodnje raziskave (Bele, 2011) je razvidno, da se ta gen izraža zelo podobno kot *Cyp11a1* in celo, da je možno zaznati določen vpliv faktorja CREM na izražanje (Bele, 2011). Naši rezultati cirkadianega ritma ne potrjujejo, vzroki še niso znani. Podrobnejša analiza nakazuje, da prihaja do razlik med WT in KO vzorci (Priloga E), vedar statistično opaznega vpliva CREM ne moremo dokazati.



Slika 48: Izražanje gena *Cyp11b2* v nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

#### 4.8.3 *Cyp17a1*

Uporabljen statistični model kaže, da nihanje gena *Cyp17a1* ni cirkadiano, vendar graf z uporabljenim gladišnikom Loess vendarle implicira določeno cirkadianost. Na grafih (Slika 49) lahko opazimo spremembo v amplitudi nihanja, saj se ta pri KO vzorcih zmanjša. Iz navedenega bi lahko sklepali, da ima CREM faktor vpliv na izražanje gena *Cyp17a1* v nadledvičnih žlezah, saj se intervala zaupanja med WT in KO linijo ne prekrivata (Priloga E).

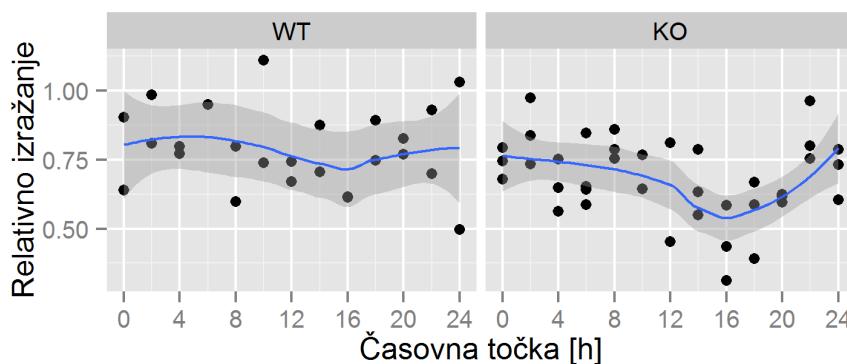


Slika 49: Izražanje gena *Cyp17a1* v nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladišnikom Loess

#### 4.8.4 *Cyp21a1*

V predhodni raziskavi so prišli do zaključkov, da se izražanje gena *Cyp21a1* preko dneva cirkadiano spreminja (Bele, 2011). Do takih ugotovitev iz naših statističnih rezultatov nismo prišli, prav tako spodnji grafi ne prikazujejo tipične krivulje, ki bi nakazovala ritmično nihanje izražanja. Zazna se manjši upad števila transkriptov pri CT16, vendar iz slednjih rezultatov, kjer so meritve precej raztresene, ne moremo dokazati cirkadianega izražanja. Med skupinama miši WT in KO analiza ni pokazala pomembnih razlik, tako da lahko zaključimo, da faktor CREM nima vpliva na izražanje tega gena.

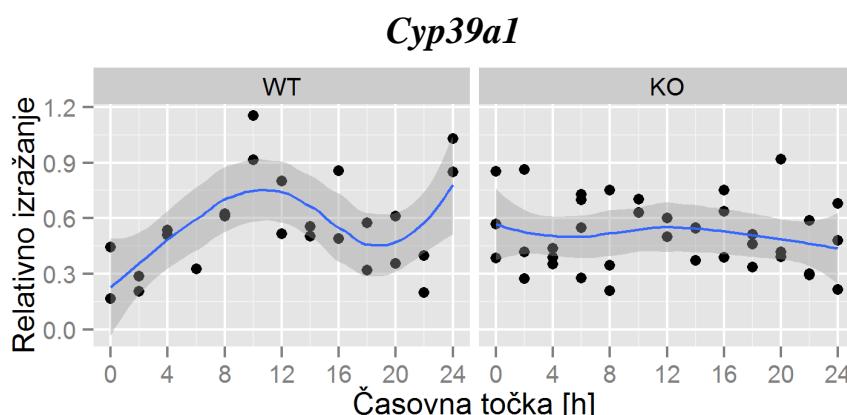
### *Cyp21a1*



Slika 50: Izražanje gena *Cyp21a1* v nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

### 4.8.5 *Cyp39a1*

*Cyp39a1* je prav tako gen iz super družine citokromov P450, sodeluje pa pri alternativni sintezi žolčnih kislin. Ugotovljeno je bilo, da se gen v jetrih izraža konstantno (Russell, 2003), medtem ko se v adrenalni žlezi izraža ritmično (Bele, 2011). Tudi naši spodnji grafi kažejo, da se gen v vzorcih miši divjega tipa izraža cirkadiano z maksimalnim številom transkriptov pri okrog CT 10 in minimalnim številom pri CT približno 20. Medtem pa rezultati statističnega modela ne kažejo cirkadianega izražanja. Na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess lahko vidimo, da je pri KO miših cirkadiano izražanje utišano (Priloga E). Iz navedenega bi lahko sklepali, da CREM vpliva na izražanje gena *Cyp39a1*.



Slika 51: Izražanje gena *Cyp39a1* v nadledvičnih žlezah na grafih z uporabljenim gladilnikom Loess

#### 4.9 PREGLED IZRAŽANJA VSEH GENOV PO ORGANIH

Geni, ki sodelujejo pri metabolizmu holesterola, žolčnih kislin in geni jedrnih receptorjev v jetrih ter geni metabolizma steroidnih hormonov v nadledvičnih žlezah, se glede na cirkadiani ritem ne izražajo tako robustno kot geni centralne ure. Robustnost lahko opredelimo kot zmanjšano občutljivost na motnje, torej na gene centralne ure spremembe v okolju ne vplivajo toliko, oziroma se njihova cirkadianost v veliki meri ohranja, medtem ko se pri metabolnih genih izražanje spreminja. Tako pri večini genov nismo dobili uporabnih grafičnih prikazov statističnih rezultatov, saj rezultati niso pokazali cirkadianega nihanja. Eden od možnih razlogov je, da na izražanje ne vpliva le dnevno-nočni ritem, temveč tudi vnos hrane. Miši so imele konstanten dostop do hrane in vode, kar se lahko odraža v večji variabilnosti vzorcev znotraj časovnih točk in nerobustnem izražanju genov.

Preglednica 5: Geni razporejeni po skupinah ter statistični rezultati

LINIJA	JETRA			NADLEDVIČNE ŽLEZE		
	MESINOR	AMPLITUDA	FAZA	MESINOR	AMPLITUDA	FAZA
<b>GENI CIRKADIANE URE</b>						
Per1	WT KO	0,25 ± 0,05 0,22 ± 0,04	0,29 ± 0,07 0,25 ± 0,05	11,4 ± 1,4 10,9 ± 1,4	— —	— —
Per2 <sup>~</sup>	WT KO	0,32 ± 0,04 0,28 ± 0,04	0,26 ± 0,05 0,22 ± 0,05	14,8 ± 0,7 14,2 ± 1,0	0,41 ± 0,06 0,44 ± 0,04	15 ± 1,5 13,4 ± 0,9
Per3 <sup>~</sup>	WT KO	0,20 ± 0,05 0,16 ± 0,03	— 0,20 ± 0,04	10,3 ± 1,5 11,6 ± 0,9	0,27 ± 0,04* 0,43 ± 0,05*	0,19 ± 0,06 0,29 ± 0,08
Dbp <sup>~</sup>	WT KO	0,16 ± 0,06 0,13 ± 0,03	0,31 ± 0,07 0,23 ± 0,04	10,3 ± 1,3 10,1 ± 0,8	0,32 ± 0,07 0,35 ± 0,05	0,38 ± 0,09 0,34 ± 0,06
Bhlhe40 <sup>~</sup> (Dec1)	WT KO	0,24 ± 0,05 0,18 ± 0,03	0,24 ± 0,06 0,16 ± 0,04	20,3 ± 1,1 19,6 ± 0,8	0,48 ± 0,06 —	0,17 ± 0,08 —
Bhlhe41 (Dec2)	WT KO	0,16 ± 0,06 0,17 ± 0,03	0,27 ± 0,07 0,23 ± 0,05	10,3 ± 1,4 9,4 ± 1,0	0,30 ± 0,06 0,31 ± 0,04	0,27 ± 0,08 0,22 ± 0,06
Arnt1 <sup>~</sup> (Bmal1)	WT KO	0,26 ± 0,05 0,20 ± 0,04	0,30 ± 0,07 0,21 ± 0,05	22,3 ± 0,9 23 ± 0,9	0,42 ± 0,09 0,34 ± 0,04	23,8 ± 1,8 22,9 ± 0,8
Cry1 <sup>~</sup>	WT KO	0,24 ± 0,05 0,18 ± 0,03	0,24 ± 0,06 0,16 ± 0,04	20,3 ± 1,1 19,6 ± 0,8	0,37 ± 0,06 0,27 ± 0,03	0,24 ± 0,04 0,17 ± 0,06
Cry2 <sup>~</sup>	WT KO	— —	— —	— —	0,65 ± 0,05 —	0,26 ± 0,06 —
RevERBa <sup>~</sup>	WT KO	0,12 ± 0,03 0,16 ± 0,04	0,14 ± 0,04 0,24 ± 0,05	8,1 ± 0,9 7,6 ± 0,8	0,37 ± 0,08 0,36 ± 0,04	0,37 ± 0,07 0,30 ± 0,04
						8,6 ± 1,2 6,4 ± 0,8

#### GENI PRISOTNI PRI SINTEZI HOLESTEROLA V JETRIH

Cyp51	WT	—		
	KO	—		
Hmgr	WT	—		
	KO	—		
Por	WT	0,24± 0,03	0,21± 0,05	11,6± 1,1
	KO	0,21± 0,02	0,17± 0,04	13,1± 0,9

#### GENI PRISOTNI PRI SINTEZI ŽOLČNIH KISLIN V JETRIH

Cyp7a1	WT	0,19± 0,03	0,13± 0,05	13,5± 1,4
	KO	0,16± 0,03	0,13± 0,05	14,3± 1,4
Cyp8b1	WT	0,33± 0,03	0,16± 0,04	21,4± 1,1
	KO		—	
Cyp27a1	WT	—		
	KO	—		

#### GENI, KI PREPISUJEJO JEDRNE RECEPTORJE V JETRIH

PparA	WT	—		
	KO	—		
PparD	WT	—		
	KO	—		
PGC1a	WT	—		
	KO	—		
Rxr	WT	—		
	KO	—		
Car	WT	—		
	KO	—		
Srebp2	WT	—		
	KO	—		

#### GENI PRISOTNI PRI SINTEZI STEROIDNIH HORMONOV V NADLEDVIČNIH ŽLEZAH

Cyp11a1	WT	0,32± 0,07	0,38± 0,09	9,8± 1,1
	KO	0,35± 0,05	0,34± 0,06	8,8± 0,8
Cyp11b2 <sup>~</sup>	WT	—		
	KO	—		
Cyp17a1 <sup>~</sup>	WT	—		
	KO	—		
Cyp21a1	WT	—		
	KO	—		
Cyp39a1 <sup>~</sup>	WT	—		
	KO	—		

± vrednosti s podanim 95% intervalom zaupanja

— glede na uporabljen statistični model nihanje ni cirkadiano

\* statistične razlike med WT in KO vzorci

~ ni prekrivanja med 95% intervali zaupanja med WT in KO linijo, kar nakazuje na vpliv CREM

## 5 RAZPRAVA

Velika evolucijska pridobitev so biološki ritmi, saj se organizmi z njihovo pomočjo lažje prilagajajo na periodično spremenljajoče se razmere v okolju. Biološke ritme delimo v dve skupini: zunanje in notranje. Zunanji ritmi nastanejo kot neposredna posledica delovanja okolice (npr. svetloba, temperatura), notranji ritmi pa sledijo notranji biološki uri. Notranji biološki ritmi se vzdržujejo tudi v primeru odstranitve vseh dražljajev iz okolice. Biološki ritmi se znotraj celotnega organizma in znotraj posameznih celic ponavljajo s frekvencami od nekaj let do nekaj milisekund. Vzopredno z omenjenima potekajo še številni drugi ritmi. Na ritem budnosti in spanja je vezan npr. ritem hranjenja s periodičnim javljanjem lakote pa tudi ritem lokomotorne dejavnosti, ki je povezan z lego ali držo telesa. Sem prištevamo tudi nihanje telesne temperature, nivo raznih hormonov, krvnega tlaka, srčne frekvence, itd.

Takt daje notranja ura s spodbujevalcem/ritmovnikom v suprahiazmatiskem jedru možganov (SCN). Kandidati za prenašanje signalov so poleg ostalih mehanizmov tudi endokrine žleze, saj lahko z ritmičnim izločanjem hormonov v krvni obtok signale hitro prenesejo po celotnem organizmu, oziroma do tarčnih tkiv in celic, ki imajo na membranah izražene ustrezne receptorje. Med take spada nadledvična žleza, ki kortikoide v krvni obtok izloča cirkadiano in s tem vpliva na ritme odgovorne za stres, homeostazo porabe, reprodukcijo itd. (Kennaway, 2005). Pri sesalcih pa obstajajo tudi drugi periferni oscilatorji v drugih organih (srce, jetra, ledvica, črevesje, želodec, mišice). Poleg nadledvične žleze so nas zanimala tudi jetra, ki imajo prav tako svoj cirkadiani ritem, ta pa se v glavnem ravna po rednih obrokih hrane. Vendar na cirkadiani ritem jeter vpliva tako vedenje kot metabolizem.

Namen magistrske naloge je bil določiti vpliv svetlobe in transkripcijskega faktorja CREM na izražanje izbranih genov v dveh tkivih: jetrih in nadledvičnih žlezah. V poskusu LD CREM smo uporabili dve skupini miši, WT in KO. Obe skupini miši sta živelji v svetlobnih razmerah - 12 ur v temi in 12 ur na svetlobi, kar je približna simulacija spremnjanja dneva in noči na Zemlji. Podatki o izražanju genov v teh dveh skupinah miši so nam dali informacije o pomenu transkripcijskega faktorja CREM.

Podatke o teži se ob evtanaziji sistematično zbira, zato je prva stvar, ki smo jo lahko preverili, ali se učinki izbitja CREM izražajo makroskopsko oziroma globalno (na masi

organov oz. cele miši). Prišli smo do zanimivih ugotovitev. Pokazala se je statistično značilna razlika v masah miši WT in KO in sicer so miši z izbitim genom *Crem* nekoliko težje. Lui in sodelavci (2007) so ugotovili, da imajo miši z izbitim genom *Crem* nekoliko večjo maso bazalnih kosti v primerjavi z WT linijo, kar bi se lahko odražalo v razliki med povprečnimi masami teh dveh linij miši (Liu in sod., 2007). Medtem pa se mase organov (jetra in nadledvične žleze) med obema skupinama statistično ne razlikujejo, vendar je bilo sisanje podatkov precej veliko. V dosedanjih raziskavah je bilo ugotovljeno, da imajo KO miši nekoliko zmanjšano maso jeter, saj CREM sodeluje pri regeneraciji jeter (Servillo in sod., 1998). Sicer nismo dobili statistično značilnih rezultatov, vendar lahko kljub temu zaključimo, da trend dobljenih grafov nakazuje na zmanjšanje mase jeter.

S pomočjo qPCR smo izvedli meritve izražanja izbranih genov. Metoda je precej učinkovita, saj je v primerjavi z delom z biočipi občutno cenejša, zahteva pa tudi krajši čas in manjšo količino izolirane RNA. Poleg tega, da za izvedbo ne potrebujemo tolikšne količine RNA, je tudi kvantifikacija natančnejša, saj ima široko dinamično območje meritve. Vzorci iz jeter sicer niso predstavliali težav, medtem pa so nadledvične žleze miši zelo majhne, posledično je tudi količina RNA, ki je bila izolirana, majhna. Navedeno je bil razlog, da smo izolirali RNA iz celotnih žlez, čeprav je žleza zgrajena iz več različnih plasti. V posameznih plasteh potekajo različne biokemijske in biosinteze reakcije in tudi encimi se od plasti do plasti nekoliko razlikujejo. Omenjeno je lahko razlog, da so naši rezultati drugačni kot bi bili, če bi izražanje genov določali v vsaki plasti posebej.

Po izolaciji celotne RNA iz jeter (tkiva iz nadledvičnih žlez so bila predhodno pripravljena) smo njeno koncentracijo in čistost preverili na spektrofotometru NanoDrop. V preglednici 9 v prilogah so prikazani rezultati, iz katerih je razvidno, da smo pri vseh vzorcih dobili zadostne koncentracije RNA, tako da so bile pri vseh časovnih točkah vzorce dve ali tri biološke ponovitve. Poleg tega so bili vsi vzorci dovolj čisti in dobro ločeni od proteinskih nečistoč. Pri vseh naključno izbranih vzorcih so vrednosti RIN višje od 8,0, zato lahko trdimo, da smo pred začetkom reakcij PCR zagotovili ustrezne pogoje za pridobitev kvalitetnih in zanesljivih rezultatov.

Z uporabo metode relativne kvantifikacije smo rezultate - vrednosti Cp, dobljene z metodo qPCR na napravi LightCycler, pretvorili v količine, s pomočjo katerih smo lahko primerjali izražanje genov med različnimi vzorci. Rezultate smo predstavili grafično za lažjo

vizualizacijo. Gene smo razdelili v več skupin, glede na to pri katerih procesih v telesu in metabolizmu sodelujejo.

Poglavitna naloga raziskave je bila preveriti vpliv transkripcijskega faktorja CREM. Vendar se je izkazal za manj pomemben člen v regulaciji cirkadianega ritma pri miši. Rezultate smo prikazovali na dva različna načina. Eden je statistični model (opisan v poglavju Metode), drugi način pa je grafični z uporabljenim gladilnikom Loess. Pri številnih genih smo preko statističnega modela prišli do zaključkov, da cirkadianega nihanja ni, hkrati pa je bilo iz grafov z uporabljenim gladilnikom Loess lahko razbrati cirkadiano krivuljo. Grafi podatkov sicer ne dajo nobenih številk, lahko pa postavimo vizualno oceno, vendar so vse ocene subjektivne. Kjer tudi statistični model pokaže cirkadiano nihanje, tam lahko z večjo verjetnostjo trdimo, da je izražanje cirkadiano, čemur v prid govorita tako statistika kot graf. Predhodne raziskave so pokazale, da je statistično bolj verodostojno, če imamo v poskusu več časovnih točk z manj vzorci (Aćimović, 2012).

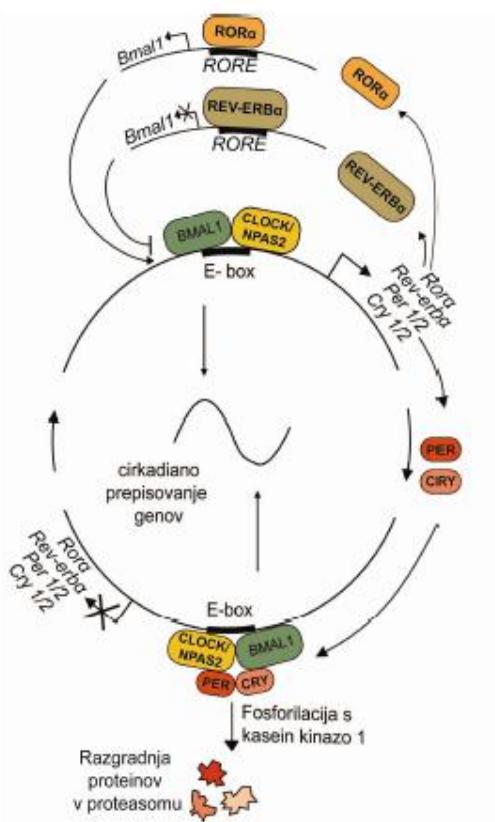
Prve smo pregledovali gene centralne ure tako v jetrih kot v nadledvični žlezi. Ugotovili smo, da CREM nima poglavitev vloge v regulaciji genov centralne ure, z izjemo le posameznih genov. Zaznati je vpliv CREM pri genih iz družine *Period*. Za *Per1*, *Per2* in *Per3* je značilno, da se izražajo cirkadiano in da ima nanje močan vpliv svetloba. Do identičnih ugotovitev smo prišli tudi sami. Pri *Per3* je faza pri miših z izbitim genom *Crem* v obeh organih nekoliko zamaknjena, poleg tega pa je prišlo do statistično značilne razlike v intervalih mesinorja med KO in WT vzorci. Manjša razlika je tudi med intervali amplitude, iz česar lahko sklepamo, da ima faktor CREM na omenjeni gen precejšen vpliv. Medtem se manjše spremembe v amplitudi pri KO liniji kažejo tudi pri *Per2* iz družine *Period*. Navedeno se sklada z dejstvom, da so geni *Period* v SCN uravnnavani preko cAMP in transkripcijskega faktorja CREB (Košir, 2011). Z nadaljnimi raziskavami bi bilo smotrno preveriti *in vivo* vpliv CREM na cirkadiano in epigenško regulacijo *Period* genov, predvsem *Per3*. Zanimivo bi bilo pregledati razliko v koncentraciji proteinov PERIOD med WT in KO mišmi, saj je regulacija lahko transkripcijska, post-transkripcijska ali epigenška.

Za vse gene, ki zapisujejo proteine oziroma transkripcijske faktorje, ki so udeleženi pri ustvarjanju ritmov v organizmu, smo pričakovali, da so izražani cirkadiano, kar so pokazali

tudi naši rezultati. Poleg genov družine *Period* smo preverili še *Dbp*, *Bhlhe40* (*Dec1*), *Bhlh41* (*Dec2*), *Arnt1* (*Bmal1*), *Cry1*, *Cry2* ter *ReverbA* (*NR1D1*) in pri vseh se kaže cirkadiano izražanje. Zanimivi so grafi z uporabljenim gladilnikom Loess za gen *Dec1*, kjer prihaja do zamika faze med organoma. Rezultati nakazujejo, da se lahko geni glede na cirkadiani ritem v različnih tkivih različno izražajo.

*Bmal* se izraža s faznim zamikom glede na ostale opazovane gene centralne ure. Rezultati so razumljivi, saj *Bmal* sodeluje v transkripcijsko-translacijski zanki s *Period*, kar pomeni, da njuno izražanje ne more biti sočasno. Faza izražanja je bila prav tako zamaknjena pri genih *Cry1* in *Cry2*. Oba spadata v družino evolucijsko visoko ohranjenih proteinov kriptokromov, ki generirajo transkripcijsko-translacijsko negativno povratno zanko, skupaj s *Period*, *CLOCK* in *BMAL1* (Slika 52). Prav zato se tudi ti geni ne morejo izražati sočasno. Na vse tri: *Bmal*, *Cry1* in *Cry2* transkripcijski faktor CREM nima vpliva, saj ni statistično pomembnih razlik med linijama, opazimo le nekoliko zmanjšano amplitudo pri KO liniji, ki pa se še vedno giblje v območju 95 % intervala zaupanja.

Statistično sicer ne moremo dokazati vpliva CREM na večino genov centralne ure, vendar pa pri določenih (*Per2*, *Bmal*, *Dbp*, *Cry1*, *Cry2*, *Dec1* in *ReverbA*) grafi nakazujejo vpliv CREM, saj se 95 % intervali zaupanja na določenih mestih ne prekrivajo (Priloga E). Naši rezultati se skladajo z dosedanjimi raziskavami, da se geni centralne ure izražajo cirkadiano. Izjema je *Cry2*, ki se v jetrih ne izraža cirkadiano, kot so odkrili že Myamoto in sodelavci leta 1998. V nadledvični žlezi je iz grafov z uporabljenim gladilnikom Loess lahko razvidno nihanje, ki je pri KO miših utišano.



Slika 52: Shema medsebojnega vpliva genov cirkadiane ure

Prikazane so povratne, prepisovalne, prevajalne in poprevajalne zanke, ki so opisane v besedilu (Povzeto po Prosenc Zmrzljak, 2012: 6)

Poleg genov centralne ure smo opazovali izražanje genov sinteze holesterola v jetrih:

*Cyp51*, *Hmgcr* in *Por*. Signifikantnih razlik med WT in KO ni, tudi statistični model ne kaže, da bi CREM vplival na izražanje genov vključenih v sintezo holesterola, kot so ugotovili tudi v predhodnih raziskavah (Bele, 2011; Košir, 2011).

Naši rezultati za *Cyp7a1* in *Cyp8b1* kažejo amplitudo cirkadianega nihanja, tako kot so ugotovili predhodniki (Košir, 2011), nihanje pa ni cirkadiano pri genu *Cyp27a1*. Grafi z uporabljenim gladilnikom Loess (Slika 37) kažejo zmanjšanje amplitude izražanja *Cyp8b1* v KO miših in implicirajo na vpliv faktorja *Crem*, vendar se 95 % interval zaupanja med WT in KO linijama prekriva (Priloga E).

Za zanimivo se je v predhodnih raziskavah izkazalo cirkadiano izražanje genov jedrnih receptorjev v jetrih: *Rxr*, *PparA*, *PparG*, *Pgc1a*, *Srebp2* (Košir, 2011). Ti geni veljajo za kandidatne gene integracije signalov metabolizma in cirkadianih ritmov (Yang in sod., 2006).

Geni jedrnih receptorjev se ne izražajo tako robustno kot geni centralne ure, zato rezultati uporabljenega statističnega modela niso pokazali cirkadianega ritma. Kljub temu smo iz grafov z uporabljenim gladilnikom Loess razbrali cirkadiano nihanje pri *Rxr*, *PparA*, *Pgc1a*, *Car* in *Srebp2*. Poleg tega lahko z vizualno oceno zaključimo, da bi CREM lahko imel določen vpliv na izražanje genov jedrnih receptorjev, saj se pri KO miših izražanje spremeni, vendar se intervali zaupanja med WT in KO linijami prekrivajo. Zanimiva je primerjava s predhodnimi raziskavami (Košir, 2011), v katerih je bilo ugotovljeno, da ima večina izbranih genov cirkadiano izražanje, ki je pri WT liniji bolj izrazito. Prišli smo do podobnih ugotovitev, saj je v večini primerov, kjer je zaznati vpliv faktorja CREM, v vzorcih miši KO zaznati utišanje izražanja genov. Amplituda izražanja *Rxr*, *PparG* in *Pgc1a* se v KO liniji zmanjša, le pri genu *Car* se poveča. Pri vseh genih je variabilnost znotraj časovnih točk velika. Eden od možnih razlogov za tako veliko variabilnost je sposobnost jeter, da lahko izražanje genov sinhronizirajo s časom hranjenja (Damiola in sod., 2000). Miši so namreč imele prost dostop do hrane in vode med celotnim eksperimentom, zaradi tega bi lahko prišlo do določenih individualnih razlik v prehranjevanju, kar pa lahko pripelje do variabilnosti v izražanju metabolnih genov. Za natančnejšo oceno bi bilo boljše, da bi poskus trajal 48ur, tako bi imeli več časovnih točk, iz katerih bi lahko prišli do natančnejših ugotovitev. Prav tako bi bili rezultati bolj optimalni, če bi živalim hrano in vodo dovajali v intervalih oziroma glede na njihov dnevno-nočni ritem ter da bi v samem poskusu sodelovalo več živali.

Pregledali smo tudi izražanje genov prisotnih v sintezi steroidnih hormonov nadledvični žlezi. Dosedanji rezultati (Bele, 2011) kažejo, da se večina teh genov izraža ritmično ter da je zaznati vpliv faktorja CREM. Mi smo prišli do nekoliko drugačnih ugotovitev. *Cyp11b2* se ne izraža ritmično, poleg tega naši statistični rezultati ne kažejo vpliva CREM na te gene. Naši grafi z uporabljenim gladilnikom Loess kažejo na vpliv CREM pri *Cyp11b2*, *Cyp17a1* in *Cyp39a1*, in sicer je amplituda v KO miših zmanjšana. V raziskavi Koširja so ugotovili, da produkti gena *Crem* vplivajo na izražanje *Cyp17a1* v mišjih adrenalnih

žlezah, saj je bila cirkadianost v vzorcih KO povečana (Košir, 2011). Pri nekaterih genih, prisotnih v sintezi steroidnih hormonov v nadledvični žlezi, smo torej prišli do drugačnih ugotovitev kot v predhodnih raziskavah, vendar vzroki še niso jasni.

Cirkadiani ritmi so sicer precej robustni sistemi, katerih delovanje težko porušimo. V našem primeru je lahko pri miših z izbitim genom *Crem* prišlo do komplementacije transkripcijskih faktorjev v družini CREB/CREM/ATF-1. To je mogoča rešitev, saj so že ugotovili, da lahko pride do komplementacije transkripcijskih faktorjev, ko so primerjali tumorske celice, ki ne izražajo proteina CREB, v katerih so izmerili povišane koncentracije proteina CREM v primerjavi z zdravimi celicami (Groussin in sod., 2000).

## 6 SKLEPI

V sklopu magistrske naloge smo s pomočjo qPCR ter pregleda literature preverjali ali ima transkripcijski faktor CREM vpliv na izražanje izbranih genov periferije in centralne ure. Iz poskusov je razvidno, da nima večjega vpliva na 24-urni profil izražanja večine genov osrednje biološke ure in metabolizma, z izjemo redkih genov. Največja razlika v izražanju med linijama se je pokazala pri genu centralne ure *Per3*.

V naši raziskavi smo opazovali in ocenjevali izražanje genov v dveh različnih tkivih - jetrih in nadledvični žlezi. Najbolj robustno se izražajo geni centralne ure, medtem ko se geni vključeni v metabolizem ne izražajo s tako odzivnostjo. Le-to je po vsej verjetnosti posledica različnega režima prehranjevanja. V jetrih na prepisovanje genov, poleg izmenjave dneva in noči, vpliva še vnos hrane in intervali hranjenja.

Rezultate smo prikazovali na dva različna načina. Eden je statistični model, ki je opisan v poglavju Metode, drugi način pa je grafični z uporabljenim gladilnikom Loess, kjer sicer grafi podatkov ne dajejo nobenih številk, lahko pa postavimo (subjektivno) vizualno oceno. Najnatančnejše rezultate dobimo tam, kjer tako statistični kot grafični model potrjujeta ali negirata cirkadianost. Izkazalo se je, da ima CREM faktor največji vpliv na gen *Per3*, kjer so rezultati statistično značilni. Med metabolnimi geni smo lahko le vizualno preverjali prekrivanje intervalov zaupanja in pri nekaterih se nakazuje določen vpliv CREM (*Per2*, *Bmal*, *Dbp*, *Cry1*, *Cry2*, *Dec1* in *ReverbA*). Izražanje je v večini primerov utišano ali spremenjeno na kakšen drug način (fazni zamik, večja amplituda). Vendar pa po drugi strani nimamo statističnih rezultatov za večino skupin genov.

Izkazalo se je, da bi bilo predvsem pri perifernih genih, kjer je biološka variabilnost precej velika, kljub temu smiselno imeti večje število vzorcev v posamezni časovni točki, vendar smo v poskusih žeeli žrtvovati čim manj miši (princip 3 R). Rezultati bi bili natančnejši, če bi namesto 24-urnega časovnega okvirja vzeli 48-urnega, vendar zaradi časovne omejenosti tega nismo mogli storiti. V takem primeru bi imeli več časovnih točk tako za statistično kot grafično obdelavo, krivulje bi bile bolj razvidne in pregledne.

Z našimi meritvami smo preverjali ali ima transkripcijski faktor CREM vpliv na cirkadiano izražanje genov. Bilo bi smiselno pregledati tudi vpliv na ravni proteinov. Omenjeno bi lahko preverili s prenosom western. Znano je namreč, da se tudi 10 – 20 % funkcionalnih

proteinov izraža cirkadiano. Tako je teoretično možno, da je protein izražen ritmično, kar na nivoju izražanja gena niti ne bi zaznali. Organizem je reguliran na ogromno nivojih, tako da je za potrebe aplikativne znanosti (kronofarmakologije, medicine itd.) potrebno stvari preveriti ne le na nivoju genov (genomike), temveč tudi drugih nivojih - omike.

## 7 VIRI

- Aćimović J. 2012. Statistično vrednotenje cirkadianega ritma holesterola in njegovih intermediatov v jetrih in krvni plazmi miši divjega seva in seva z izničenim genom *Crem*. Doktorsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta: 85 str.
- Balsalobre A. 2002. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell in Tissue Research*, 309: 193–199
- Bele T. 2011. Vpliv svetlobe in transkripcijskega faktorja *Crem* na izražanje genov v mišji nadledvični žlezi. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 62 str.
- Bittman E.L., Doherty L., Huang L., Paroskie A. 2003. Period gene expression in mouse endocrine tissues. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative physiology*, 285: 561–569
- Brewer M., Lange D., Baler R., Anzulovich A. 2005. SREBP-1 as a transcriptional integrator of circadian in nutritional cues in the liver. *Journal of Biological Rhythms*, 20 : 195–205
- Cermakian N., Monaco L., Pino M.P., Dierich A., Sassone-Corsi P. 2001. Altered behavioral rhythms in clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene. *The EMBO journal*, 20: 3967–3974
- Chung S., Son G.H., Kim K. 2011. Adrenal peripheral oscillator in generating the circadian glucocorticoid rhythm. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1220: 71–81
- Claustre B., Geoffrion M., Brun J., Chazot G. 1995. Melatonin in humans: a biochemical marker of the circadian clock in an endogenous synchronizer. *Neurophysiologie clinique = Clinical neurophysiology*, 25: 351–359
- Clayton J.D., Kyriacou C.P., Reppert S.M. 2001. Keeping time with the human genome. *Nature*, 409: 829–831
- Colten H.R.H.R., Altevogt B.M.B.M. 2006. Sleep Disorders in Sleep Deprivation: An Unmet Public Health Problem The National Academies Collection: Reports funded by Washington (DC), National Institutes of Health, National Academies Press (US)

- Damiola F., Le Minh N., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F., Schibler U. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development*, 14: 2950–2961
- Davidson A.J., Straume M., Block G.D., Menaker M. 2006. Daily timed meals dissociate circadian rhythms in hepatoma in healthy host liver. *International journal of cancer. Journal International du Cancer*, 118: 1623–1627
- Dibner C., Schibler U., Albrecht U. 2010. The Mammalian Circadian Timing System: Organization in Coordination of Central in Peripheral Clocks. *Annual Review of Physiology*, 72: 517–549
- Foulkes N.S., Borjigin J., Snyder S.H., Sassone-Corsi P. 1996. Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 14140–14145
- Foulkes N.S., Borjigin J., Snyder S.H., Sassone-Corsi P. 1997. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends in Neurosciences*, 20: 487–492
- Foulkes N.S., Borrelli E., Sassone-Corsi P. 1991. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell*, 64: 739–749
- Green C.B., Takahashi J.S., Bass J. 2008. The meter of metabolism. *Cell*, 134: 728–742
- Griffin E.A., Staknis D., Weitz C.J. 1999. Light-independent role of CRY1 in CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*, 286: 768–771
- Groussin L., Massias J.F., Bertagna X., Bertherat J. 2000. Loss of expression of the ubiquitous transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) in compensatory overexpression of the activator CREM $\tau$  in the human adrenocortical cancer cell line H295R. *The Journal of Clinical Endocrinology in Metabolism*, 85: 345–354
- Hastings M. 1998. The brain, circadian rhythms, in clock genes. *BMJ (Clinical research ed.)*, 317: 1704–1707

- Henley D.E., Russell G.M., Douthwaite J.A., Wood S.A., Buchanan F., Gibson R., Woltersdorf W.W., Catterall J.R., Lightman S.L. 2009. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in obstructive sleep apnea: the effect of continuous positive airway pressure therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology in metabolism*, 94: 4234–4242
- Hill S.M., Blask D.E. 1988. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation in morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer research*, 48: 6121–6126
- Hirota, T., Fukada, Y., 2004. Resetting mechanism of central in peripheral circadian clocks in mammals. *Zoological science*, 21: 359–368
- Honma S., Kawamoto T., Takagi Y., Fujimoto K., Sato F., Noshiro M., Kato Y., Honma K. 2002. Dec1 in Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature*, 419: 841–844
- Ishida A., Mutoh T., Ueyama T., Bino H., Masubuchi S., Nakahara D., Tsujimoto G., Okamura H., 2005. Light activates the adrenal glin: timing of gene expression in glucocorticoid release. *Cell Metabolism*, 2: 297–307
- Johnson C.H., Elliott J.A., Foster R. 2003. Entrainment of circadian programs. *Chronobiology international*, 20: 741–774
- Jurevics H., Hostettler J., Barrett C., Morell P., Toews A.D. 2000. Diurnal in dietary-induced changes in cholesterol synthesis correlate with levels of mRNA for HMG-CoA reductase. *Journal of Lipid research*, 41: 1048–1054
- Kalsbeek A., van der Spek R., Lei J., Endert E., Buijs R.M., Fliers E. 2012. Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Molecular in Cellular endocrinology*, 349: 20–29
- Kennaway D.J. 2005. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Human Reproduction Update*, 11: 91–101
- Ko C.H., Takahashi J.S. 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15: R271–277
- Kornmann B., Schaad O., Bujard H., Takahashi J.S., Schibler U. 2007. System-driven in oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biology*, 5: 34

- Košir R. 2011. Vpliv svetlobe, genetskega ozadja miši in transkripcijskega faktorja *Crem* na cirkadiano izražanje centralnih genov biološke ure in metabolizma. Doktorsko delo. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 149 str.
- Košir R., Zmrzljak U.P., Bele T., Acimovic J., Perse M., Majdic G., Prehn C., Adamski J., Rozman D. 2012. Circadian expression of steroidogenic cytochromes P450 in the mouse adrenal glin--involvement of cAMP-responsive element modulator in epigenetic regulation of Cyp17a1. *The FEBS Journal*, 279: 1584–1593
- Liu F., Lee S.-K., Adams D.J., Gronowicz G.A., Kream B.E. 2007. CREM deficiency in mice alters the response of bone to intermittent parathyroid hormone treatment. *Bone*, 40: 1135–1143
- Lopez-Molina L., Conquet F., Dubois-Dauphin M., Schibler U. 1997. The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus in influences circadian behavior. *The EMBO Journal*, 16: 6762–6771
- Lowrey P.L., Takahashi J.S. 2004. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual Review of Genomics in Human Genetics* 5: 407–441
- Meier A.H. 1976. Daily variation in concentration of plasma corticosteroid in hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 98: 1475–1479
- Le Minh N., Damiola F., Tronche F., Schütz G., Schibler U. 2001. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *The EMBO Journal*, 20: 7128–7136
- O'Neill J.S., Maywood E.S., Chesham J.E., Takahashi J.S., Hastings M.H. 2008. cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science*, 320: 949–953
- Oishi K., Amagai N., Shirai H., Kadota K., Ohkura N., Ishida N. 2005. Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal glin-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes in Genomes*, 12: 191–202
- Oster H., Damerow S., Hut R.A., Eichele G. 2006. Transcriptional profiling in the adrenal glin reveals circadian regulation of hormone biosynthesis genes in nucleosome assembly genes. *Journal of Biological Rhythms*, 21: 350–361

- Ottenweller J.E., Meier A.H. 1982. Adrenal innervation may be an extrapituitary mechanism able to regulate adrenocortical rhythmicity in rats. *Endocrinology*, 111: 1334–1338
- Pfaffl M.W. 2006. Relative quantification. V: Real-time PCR. Taftik Dorak M. (ed.). Taylor & Francis Group: 63–82
- Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110: 251–260
- Prosenc Zmrzljak U. 2012. Novi vidiki uravnavanja holesterogenega Cyp51 in cirkadianih represorjev Per1 in Per2. Doktorsko delo. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 131 str.
- Quinn C.M., Jessup W., Wong J., Kritharides L., Brown A.J. 2005. Expression in regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR in PPARgamma ligins. *The Biochemical journal*, 385: 823–830
- Reddy A.B., Maywood E.S., Karp N.A., King V.M., Inoue Y., Gonzalez F.J., Lilley K.S., Kyriacou C.P., Hastings M.H. 2007. Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45: 1478–1488
- Rozman D., Fink M., Fimia G.M., Sassone-Corsi P., Waterman M.R., 1999. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate(cAMP)/cAMP-responsive element modulator (CREM)-dependent regulation of cholesterologenic lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51) in spermatids. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13: 1951–1962
- Russell D.W. 2003. The enzymes, regulation, in genetics of bile acid synthesis. *Annual review of biochemistry*, 72: 137–174
- Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*, 7: 3
- Servillo G. 2002. Coupling cAMP Signaling to Transcription in the Liver: Pivotal Role of CREB in CREM. *Experimental Cell Research*, 275: 143–154
- Servillo G., Della Fazia M.A., Sassone-Corsi P. 1998. Transcription factor CREM coordinates the timing of hepatocyte proliferation in the regenerating liver. *Genes & development*, 12: 3639–3643

- Sewer M.B., Li D., Dammer E.B., Jagarlapudi S., Lucki N. 2008. Multiple Signaling Pathways Coordinate CYP17 Gene Expression in the Human Adrenal Cortex. *Acta chimica Slovenica*, 55: 53–57
- Španinger K., Košir R., Fink M., Debeljak N., Rozman D. 2009. Cirkadiani ritem pri ljudeh. *Zdrav Vestnik*, 78: 651–657
- Yamaguchi S., Mitsui S., Yan L., Yagita K., Miyake S., Okamura H. 2000. Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Molecular in cellular biology*, 20: 4773–4781
- Yang X., Downes M., Yu R.T., Bookout A.L., He W., Straume M., Mangelsdorf D.J., Evans R.M. 2006. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*, 126: 801–810

## ZAHVALA

Na prvem mestu bi se rada zahvalila svojemu delovnemu mentorju Gregorju Lorbku za vse nasvete, ideje, namige in pogovore tekom nastajanja tega magistrskega dela, brez njegove pomoči moja magistrska naloga ne bi bila to kar je.

Zahvala gre tudi mojemu mentorju dr. Simunu Horvatu ter somentorici dr. Damjani Rozman za vse nasvete in pripombe ter pomoč pri delu.

Zahvala gre tudi vsem ostalim delavcem Centra za funkcionalno genomiko in biočipe za vso pomoč pri izvajanju poskusov in obdelavi podatkov.

Zahvalila bi se univ. dipl. bibl in slovenistki Tatjani Reščič Rihar za lekturo moje magistrske naloge.

Nenazadnje pa gre največja mera zahvale mojim staršem in ostali družini za vso podporo in vzpodbudne besede.

## PRILOGE

### Priloga A

Vzorci uporabljeni v poskusu

ČAS (CT)	Linija	Zap.št.
0	KO	701
0	KO	702
0	KO	703
0	WT	704
0	WT	705
2	KO	711
2	KO	712
2	KO	713
2	KO	714
2	WT	715
2	WT	716
4	KO	720
4	KO	721
4	KO	722
4	WT	723
4	WT	724
6	KO	729
6	KO	730
6	KO	731
6	KO	732
6	WT	733
6	WT	734
8	KO	738
8	KO	739
8	KO	740
8	WT	741
8	WT	742
10	KO	748
10	KO	749
10	KO	750
10	WT	751
10	WT	752
12	KO	755
12	KO	756

ČAS (CT)	Linija	Zap.št.
12	KO	757
12	WT	758
12	WT	759
14	KO	765
14	KO	766
14	KO	767
14	WT	769
14	WT	770
16	KO	774
16	KO	775
16	KO	776
16	WT	777
16	WT	778
18	KO	784
18	KO	785
18	KO	786
18	WT	787
18	WT	788
20	KO	792
20	KO	793
20	KO	794
20	WT	795
20	WT	796
22	KO	802
22	KO	803
22	KO	804
22	WT	805
22	WT	806
24	KO	810
24	KO	911
24	KO	812
24	KO	813
24	WT	814
24	WT	815

## Priloga B

Seznam oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za merjenje izražanja izbranih genov centralne ure in metabolizma (povzeto po Košir, 2011)

Gen	NCBI št.		Sekvenca	Dolžina v [bp]	Učinkovitost pomnoževanja
<b>Referenčni geni:</b>					
<i>Rplp0</i>	NM_007475.4	fw	CACTGGTCTAGGACCCGAGAAG	22	1,98
		rv	GGTGCCTCTGGAGATTTCG	20	
<i>Rn18s</i>	NR_003278.1	fw	CGCCGCTAGAGGTGAAATT	20	1,79
		rv	TTGGCAAATGCTTCGCTC	19	
<b>Cirkadiani geni</b>					
<i>Arntl</i>	NM_007489	fw	GCA GTGCC ACTGACT ACCAAGA	22	1,94
		rv	TCCTGGACATTGCATTGCAT	20	
<i>Dbp</i>	NM_016974.2	fw	AATGACCTTGAAACCTGATCCCGCT	25	1,93
		rv	GCTCCAGTACTTCTCATCCTTCTGT	25	
<i>Per1</i>	NM_011065.3	fw	TCCTCCTCCTACACTGCCTCT	21	1,90
		rv	TTGCTGACGACGGATCTT	19	
<i>Per2</i>	NM_011066.3	fw	CAACACAGACGACAGCATCA	20	1,94
		rv	TCCTGGTCCTCCTTCAACAC	20	
<i>Per3</i>	NM_011067.1	fw	CTGCTCCAACTCAGCTTCTTT	22	2,00
		rv	TTAGACAGCAAGGCTCTGGTCT	23	
<i>Cry1</i>	NM_007771	fw	CCCAGGCTTTCAAGGAATGGAACA	25	1,98
		rv	TCTCATCATGGTCATCAGACAGAGG	25	
<i>Cry2</i>	NM_009963	fw	AGGGCTGCCAAGTGCATCAT	20	2,00
		rv	AGGAAGGGACAGATGCCAATAG	22	
<i>Bhlhe40</i>	NM_011498.4	fw	TCTCCTACCCGAACATCTCAA	21	1,95
		rv	AATGCTTTCACGTGCTTCAA	20	
<i>Bhlhe41</i>	NM_024469.1	fw	ATTGCTTACAGAATGGGGAGCG	23	1,89
		rv	AAAGCGCGCGAGGTATTGCAAGAC	24	

<i>Nr1d1</i>	NM_145434.3	fw	ACGACCCCTGGACTCCAATAA	20	2,00
		rv	CCATTGGAGCTGTCACTGTAGA	22	
<b>Metabolni geni</b>					
<i>Hmgcr</i>	NM_008255.2	fw	CTTGTGGAATGCCTGTGATTG	22	1,90
		rv	AGCCGAAGCAGCACATGAT	19	
<i>Por</i>	NM_008898.1	fw	GGGAACTTGGAAGAGGAGTTCA	22	2,00
		rv	CCCGAAGAACTCGCACACA	19	
<i>Ppara</i>	NM_011144.6	fw	CCTCTTCCCAAAGCTCCTTCA	21	2,00
		rv	CGTCGGACTCGGTCTTCTTG	20	
<i>Pparg</i>	NM_001127330.1	fw	GGTTGACACAGAGATGCCATTCT	23	1,93
		rv	AATGCGAGTGGTCTTCCATCA	21	
<i>Ppargc1a</i>	NM_008904.2	fw	CATTTGATGCACTGACAGATGGA	23	1,94
		rv	CCGTCAGGCATGGAGGAA	18	
<i>Nr1i2</i>	NM_010936.3	fw	CCTGAAGGCCTACATTGAGTG	21	1,70
		rv	TGATCTTCAGGAACAGGAACC	21	
<i>Nr1i3</i>	NM_009803.4	fw	CAGGGTTCCAGTACGAGTTTG	22	2,00
		rv	AGGCTCCTGGAGATGCAGTC	20	
<i>Cyp7a1</i>	NM_007824.2	fw	TCTCAAGCAAACACCATTCC	21	1,94
		rv	GGCTGCTTCATTGCTTCA	19	
<i>Cyp7b1</i>	NM_007825.4	fw	AATTGGACAGCTTGGCTGC	20	1,95
		rv	TTCTCGGATGATGCTGGAGT	20	
<i>Cyp8b1</i>	NM_010012.2	fw	GGAAGTGAGCCAGTTGCAG	19	1,70
		rv	TTTCCAGGTTTGCTCCAC	20	
<i>Cyp27a1</i>	NM_024264.4	fw	CCTCACCTATGGGATCTTCATC	22	1,87
		rv	TTTAAGGCATCCGTGTAGAGC	21	
<i>Cyp51</i>	NM_020010.2	fw	ACGCTGCCTGGCTATTGC	18	1,86
		rv	TTGATCTCTCGATGGGCTCTATC	23	
<i>Cyp11a1</i>	NM_019779.3	fw	AAGTATGGCCCCATTACAGG	21	1,99
		rv	TGGGGTCCACGATGTAAACT	20	

<i>Cyp11b2</i>	NM_009991.3	fw	GCACCAGGTGGAGAGTATGC	20	1,78
		rv	GCCATTCTGGCCCATTAG	19	
<i>Cyp17a1</i>	NM_007809.3	fw	CATCCCACACAAGGCTAACAA	20	1,97
		rv	CAGTGCCCAGAGATTGATGA	20	
<i>Cyp21a1</i>	NM_009995.2	fw	AGGAATTCTCCTTCCTCACTTGT	23	1,99
		rv	TCTGTACCAACGTGCTGTCC	20	
<i>Cyp39a1</i>	NM_018887.3	fw	ACCTATGATGAGGGCTTGAGTA	23	1,84
		rv	CCATTTGGATTTGACCA	21	

### Priloga C

#### Masa miši in organov

ČAS (CT)	Linija	Zap.št.	Masa miši (g)	Masa jeter (g)	Masa nadl. žlez (g)
0	KO	701	34,1	1,938	0,0051
0	KO	702	33,1	1,771	0,0039
0	KO	703	32,1	1,912	0,0046
2	KO	711	29,2	1,484	0,0027
2	KO	712	35,2	1,686	0,0037
2	KO	713	27,3	1,395	0,0028
2	KO	714	31,4	1,877	0,0038
4	KO	720	31,1	1,799	0,0033
4	KO	721	24,7	1,614	0,0033
4	KO	722	27,7	1,893	0,0033
6	KO	729	32,4	1,685	0,0027
6	KO	730	31,3	1,579	0,0033
6	KO	731	37,4	2,058	0,0041
6	KO	732	31,8	1,786	0,0036
8	KO	738	33,4	1,366	0,0031
8	KO	739	34	1,56	0,0030
8	KO	740	32,3	1,444	0,0030
10	KO	748	29,3	1,394	0,0037
10	KO	749	23,5	1,54	0,0025
10	KO	750	29,1	1,555	0,0045
12	KO	755	28,5		0,0031
12	KO	756	35,2		0,0029
12	KO	757	33,3		0,0040
0	WT	704	29	1,609	0,0035
0	WT	705	35	1,801	0,0031
2	WT	715	32,3	1,818	
2	WT	716	33,3	1,915	0,0028
4	WT	723	26,9	1,807	0,0034
4	WT	724	36,5	1,957	
6	WT	733	39,4	2,137	0,0033
6	WT	734	35,4	1,726	0,0030
8	WT	741	32,1	1,825	0,0028
8	WT	742	24,7	1,353	0,0037
10	WT	751	29,7	1,451	0,0036
10	WT	752	30,8	1,461	0,0031
12	WT	758	29,9		0,0018
12	WT	759	26,8		0,0023

### Priloga D

Rezultat spektrofotometrične analize, s katero smo določili čistost in koncentracijo RNA iz jeter LD miši

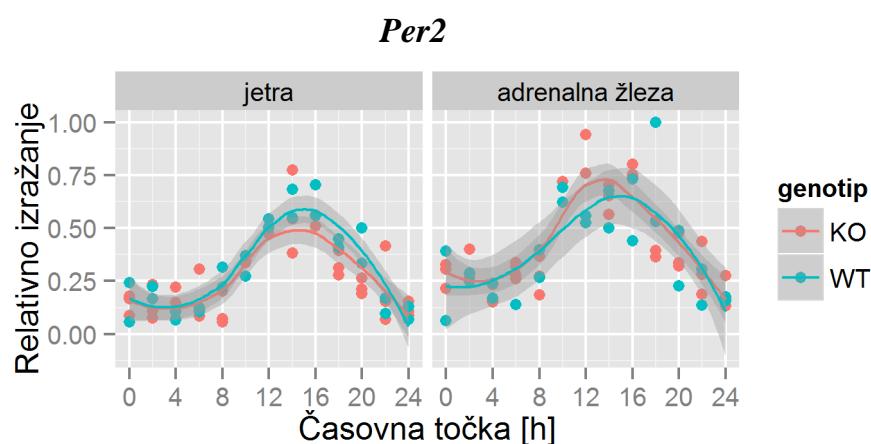
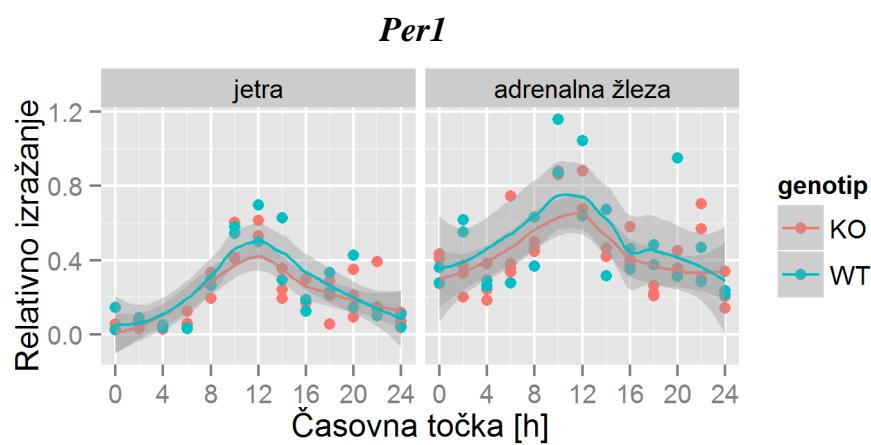
ČAS (CT)	Linija	Zap.št.	Koncentracija (ng/µL)	Čistost (A 260/280)	Čistost (A 260/230)
0	KO	701	1203.36	2.1	2.1
0	KO	702	1348.26	2.1	2.1
0	KO	703	1168.57	2.09	2.07
0	WT	704	1634.12	2.09	2.13
0	WT	705	565.49	2.09	2.11
2	KO	711	543.55	2.09	2.11
2	KO	712	377.09	2.09	2.05
2	KO	713	833.73	2.07	2.18
2	KO	714	932.48	2.07	2.19
2	WT	715	575.44	2.05	2.11
2	WT	716	778.85	2.06	2.17
4	KO	720	456.01	2.09	2.06
4	KO	721	862.02	2.1	2.19
4	KO	722	825.88	2.1	2.18
4	WT	723	472.17	2.07	2.05
4	WT	724	527.53	2.17	2.13
6	KO	729	472.88	2.09	2.06
6	KO	730	632.35	2.15	2.11
6	KO	731	569.68	2.16	2.13
6	KO	732	668.95	2.15	2.15
6	WT	733	474.75	2.09	2.04
6	WT	734	304.35	2.11	2.04
8	KO	738	898.28	2.13	2.17
8	KO	739	843.3	2.11	2.16
8	KO	740	662.06	2.11	2.13
8	WT	741	379.06	2.1	2.03
8	WT	742	639.17	2.1	2.13
10	KO	748	634.37	2.03	2.11
10	KO	749	513.95	2.14	2.11
10	KO	750	349.35	2.08	2.34
10	WT	751	568.35	2.04	2.09
10	WT	752	396.58	2.07	2.02
12	KO	755	470.55	2.08	2.05
12	KO	756	731.93	2.11	2.11
12	KO	757	1227.45	2.1	2.16
12	WT	758	705.64	2.07	2.1
12	WT	759	511.67	2.05	2.1

14	KO	765	324.91	2.1	2.02
14	KO	766	330.47	2.1	2.03
14	KO	767	603.85	2.05	2.07
14	KO	768	924.71	2.09	2.2
14	WT	769	631.34	2.04	2.1
14	WT	770	744.01	2.03	2.11
16	KO	774	660.09	2.01	2.11
16	KO	775	890.56	2.05	2.16
16	KO	776	502.8	2.1	2.1
16	WT	777	1468.83	2.09	2.19
16	WT	778	341.14	2.1	1.96
18	KO	784	811.77	2.15	2.15
18	KO	785	1447.74	2.09	2.22
18	KO	786	1004.96	2.07	2.19
18	WT	787	381.49	2.09	2
18	WT	788	598.76	2.1	2.1
20	KO	792	459.72	2.08	2
20	KO	793	515.38	2.06	2.07
20	KO	794	782.83	2.09	2.14
20	WT	795	1047.88	2.1	2.19
20	WT	796	695.62	2.07	2.11
22	KO	802	340.3	2.1	2.03
22	KO	803	706.37	2.11	2.09
22	KO	804	664.34	2.07	2.07
22	WT	805	1004.69	2.08	2.18
22	WT	806	770.3	2.07	2.13
24	KO	810	587.4	2.09	2.05
24	KO	911	1026.83	2.08	2.13
24	KO	812	963.42	2.07	2.14
24	KO	813	1057.8	2.07	2.14
24	WT	814	863.94	2.08	2.13
24	WT	815	746.29	2.09	2.11

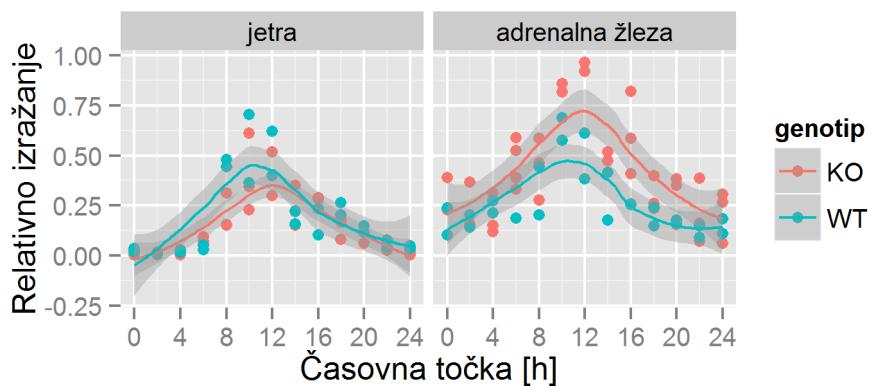
## Priloga E

### Izražanje izbranih genov v jetrih in nadledvičnih žlezah WT in KO

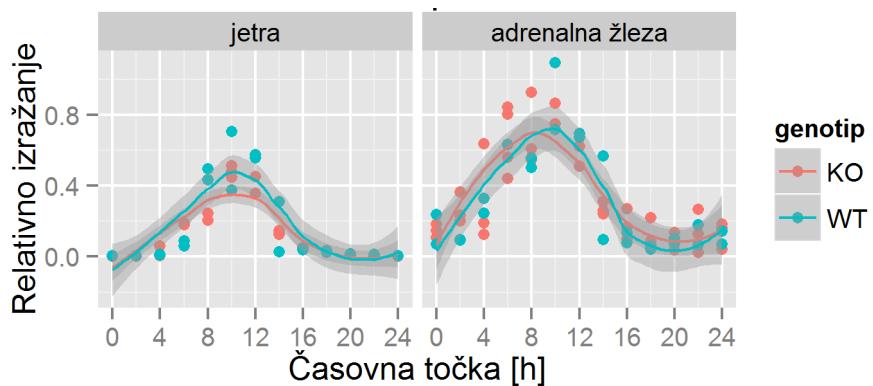
Izris grafa s programom R/ggplot2. Vsaka točka na grafu predstavlja meritev iz vzorca ene živali. Modra in rdeča črta prikazujejo vrednosti gladilnika Loess, osenčena področja pa predstavljajo pripadajoče 95% ovojnici zaupanja.



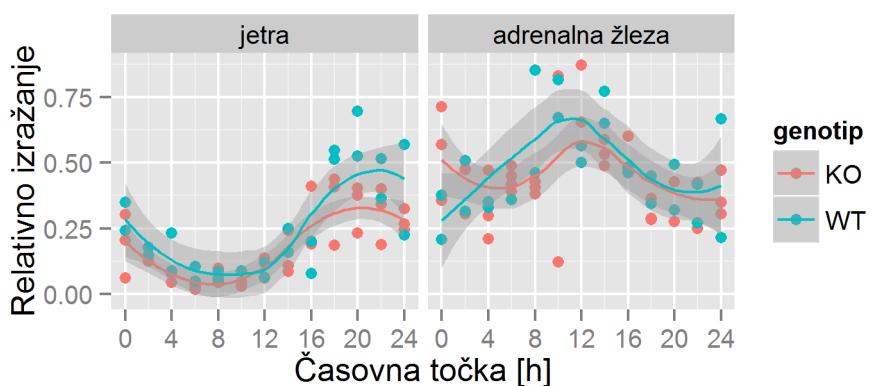
***Per3***



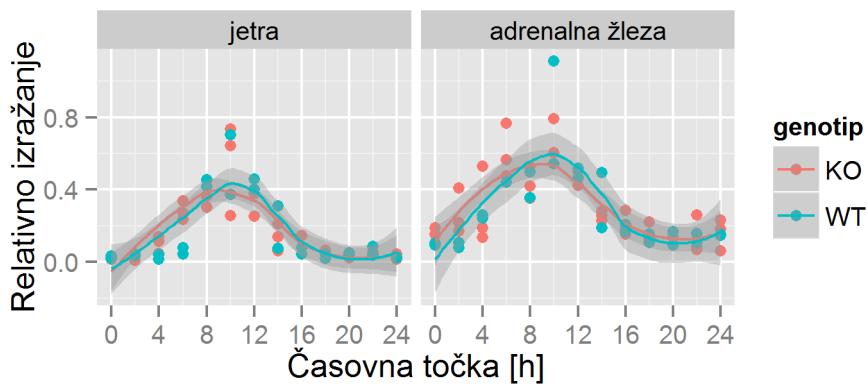
***Dbp***



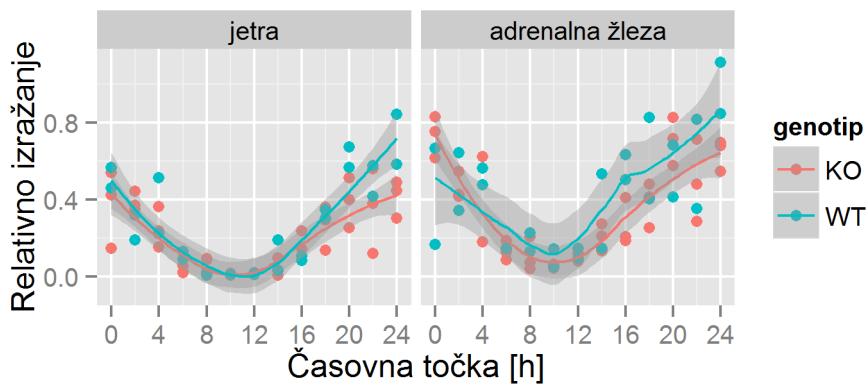
***Dec1***



***Dec2***



***Bmal***



***Cry1***

