

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Jasmina BELTRAM

**IDENTIFIKACIJA NOVIH REKOMBINANTNIH KONGENIH LINIJ
ZA KVANTITATIVNI LOKUS *Fob3a* PRI MIŠIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION OF NEW RECOMBINANT CONGENIC LINES
FOR QUANTITATIVE TRAIT LOCUS *Fob3a* IN MICE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Z diplomskim delom končujem univerzitetni študij kmetijstvo – zootehnika. Delo je bilo opravljeno v genetskem laboratoriju na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Simona Horvata.

Recenzentka: doc. dr. Tanja Kunej

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Ivan ŠTUHEC Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član:	prof. dr. Simon HORVAT Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Članica:	doc. dr. Tanja KUNEJ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelka za zootehniko

Datum zagovora:

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

Jasmina Beltram

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 575(043.2)=163.6
KG	molekularna genetika/kvantitativni lokusi/QTL/ <i>Fob3a</i> /rekombinantne kongene linije/miši/zamaščevanje
KK	AGRIS /
AV	BELTRAM, Jasmina
SA	HORVAT, Simon (mentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2011
IN	IDENTIFIKACIJA NOVIH REKOMBINANTNIH KONGENIH LINIJ ZA KVANTITATIVNI LOKUS <i>Fob3a</i> PRI MIŠIH
TD	Diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP	X, 62 str., 14 pregl., 14 sl., 3 pril., 42 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Sodobni način življenja ter pomanjkanje telesne aktivnosti lahko vodita v debelost in posledično tudi privedeta do različnih zdravstvenih težav. Po drugi strani pa zavedanje pomena zdrave prehrane spodbuja rejce k vzreji domačih živali s čim manjšo zamaščenostjo. Nalaganje maščevja je kompleksna lastnost, na katero vpliva veliko število genov in okolje. Zato so za preučevanje takšnih vplivov primernejši poligeni živalski modeli, ki smo jih uporabili tudi v našem poskusu. Slednji so bili razviti iz dveh mišjih linij, divergentno selekcioniranih na delež telesnih maščob (debela linija F ter vitka linija L). Cilj diplomske naloge je bil identificirati nove rekombinantne kongene mišje linije z donorskim odsekom vitke linije, znotraj katerega se nahaja kvantitativni lokus <i>Fob3a</i> za nalaganje maščevja. Uspelo nam je odkriti 17 rekombinantov, ki bodo služili za nadaljnje parjenje in pridobivanje novih homozigotnih rekombinantnih kongenih linij s krajšimi donor odseki vitke linije. Rezultati iz naše raziskave na kvantitativnem lokusu <i>Fob3a</i> so pokazali statistično signifikantni vpliv na zamaščevanje pri F₂-križanju kongene linije 15FHV. Razlike med genotipi FF in LL na preučevanem odseku so kazale na aditivni učinek zamenjave alelov na lastnosti zamaščenosti. Ali se te razlike kažejo tudi v ješčnosti, smo preverili z analizo konzumacije krme. Le-ta je pokazala, da konzumacija krme pada glede na število alelov L ter da se nakazuje aditivni vpliv, ki pa deluje v obratni smeri od pričakovane – da miši genotipa LL na odseku <i>Fob3a</i> pojedjo več kot miši genotipa FF. Rekombinantne kongene linije, ki smo jih razvili v okviru te diplomske naloge, bodo odličen genetski vir za natančnejše preučevanje vpliva fiziološkega učinka <i>Fob3a</i> na zamaščevanje in bodo omogočile nadaljnje študije za odkritje vzročne mutacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 575(043.2)=163.6
CX molecular genetics/quantitative trait loci/QTL/*Fob3a*/recombinant congenic lines/mice/fatness
CC AGRIS /
AU BELTRAM, Jasmina
AA HORVAT, Simon (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2011
TI IDENTIFICATION OF NEW RECOMBINANT CONGENIC LINES FOR QUANTITATIVE TRAIT LOCUS *Fob3a* IN MICE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 62 p., 14 tab., 14 fig., 3 ann., 42 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The current life style, unbalanced diet and lack of exercise can lead to obesity and consequently to a variety of health problems. On the other hand, increased awareness regarding importance of healthy diet encourages animal breeders to breed domestic animals with minimal level of fatness. Polygenic animal models are very appropriate to study such traits, because fat deposition is a complex character influenced by a large number of genes and environment. Animal models used in our experiment were developed from two mouse lines, divergently selected on body fat percentage (Fat (F) and Lean (L) lines). The aim of this graduation thesis was to identify new recombinant congenic lines, which carry donor segments of different lengths of an obesity locus *Fob3a* originating from the Lean line. We identified 17 recombinant animals, which can now be further crossed and mated to generate new homozygous congenic lines with shorter overlapping donor segments of *Fob3a*. Analysis of phenotypic data in the population segregating for *Fob3a* showed that there were statistically significant differences between the FF and LL genotypes in various fatness traits. This provides strong evidence of a presence of the obesity quantitative locus which showed an additive genetic effect. With the analysis of food consumption, we wanted to verify whether differences between genotypes in daily food intake also exist. Results showed decreasing of food consumption with regard to the number of alleles L. They also indicated additive effect, which operates in the opposite direction than expected – mice with genotype LL consume more food than mice with genotype FF in the *Fob3a* segment. Hence, the recombinant congenic lines will play an important role as a genetic resource for more physiological studies of the *Fob3a* effect and will enable eventual positional cloning and identification of the casual mutation.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 MAŠČOBE IN FIZIOLOGIJA NALAGANJA MAŠČEVJA	4
2.2 DEBELOST	6
2.3 ODKRIVANJE KVANTITATIVNIH LOKUSOV ZA ZAMAŠČEVANJE	7
2.4 ŽIVALSKI MODELI	14
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 OPIS MIŠJIH LINIJ F ₂ V NAŠI RAZISKAVI	19
3.1.1 Linija FLI	19
3.1.2 Linija 15FHV	20
3.2 POSTOPKI V LABORATORIJU	20
3.2.1 Zbiranje fenotipskih podatkov	20
3.2.1.1 Abdominalna maščoba (ABD)	21
3.2.1.2 Gonadalna maščoba (GON)	21
3.2.1.3 Femoralna maščoba (FEM)	22
3.2.1.4 Mezenterialna maščoba (MEZ)	22
3.2.1.5 Rjava maščoba (RJA)	22
3.2.2 Genotipizacija	22
3.2.2.1 Priprava DNA lizatov	22

3.2.2.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. <i>Polymerase chain reaction</i>)	23
3.2.2.3	Mikrosatelitski genetski označevalci (angl. <i>genetic markers</i>)	25
3.2.2.4	Agarozna gelska elektroforeza	26
3.3	ISKANJE NOVIH REKOMBINANTOV V KONGENI LINIJI 15FHV	28
3.3.1	Prvi pregled z markerji	28
3.3.2	Preverjanje rekombinantnih kromosomov z dodatnimi mikrosateliti	29
3.4	ANALIZA KONZUMACIJE KRME PRI MIŠIH IZ KRIŽANJA F ₂	32
3.5	Statistična obdelava	32
4	REZULTATI	37
4.1	PORAZDELITEV GENOTIPOV V F ₂ -KRIŽANJU KONGENE LINIJE 15FHV	37
4.2	ANALIZA PODATKOV V F ₂ -KRIŽANJU KONGENE LINIJE 15FHV	38
4.3	REZULTATI ISKANJA NOVIH REKOMBINANTOV V F ₂ -KRIŽANJU KONGENE LINIJE 15FHV	43
4.4	REZULTATI KONZUMACIJE KRME V F ₂ -KRIŽANJU KONGENE LINIJE 15FHV	45
4.4.1	Osnovna statistika	45
4.4.2	Razlike med genotipi in spoloma	48
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	51
5.1	RAZPRAVA	51
5.2	SKLEPI	55
6	POVZETEK	56
7	VIRI	58
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Priprava pufra za lizo	23
Preglednica 2: Končna koncentracija reagentov v verižni reakciji s polimerazo	24
Preglednica 3: Potek programa za verižno reakcijo s polimerazo	25
Preglednica 4: Opis uporabljenih mikrosatelitskih genetskih označevalcev	26
Preglednica 5: Priprava 2 litrov 0,5x TBE pufra	27
Preglednica 6: Genetski označevalci za natančnejše kartiranje na kromosomu 15	29
Preglednica 7: Vrednosti χ^2 in p za razmerja frekvenc genotipov pri miših linije 15FHV	37
Preglednica 8: Opisna statistika za maso pri F ₂ samicah linije 15FHV glede na genotip	38
Preglednica 9: Opisna statistika za maso pri F ₂ samcih linije 15FHV glede na genotip	39
Preglednica 10: Rezultati analize (povprečja s standardnimi odkloni ter verjetnostmi) fenotipskih podatkov za odstotek telesnih maščob pri F ₂ kongeni liniji 15FHV glede na genotip	41
Preglednica 11: Opisna statistika za porabo in konzumacijo krme pri F ₂ samicah križanja kongenih miši linije 15FHV merjene v parih glede na genotip	46
Preglednica 12: Osnovna statistika za porabo in konzumacijo krme pri F ₂ samicah križanja kongenih miši linije 15FHV merjene posamično glede na genotip	47
Preglednica 13: Osnovna statistika za porabo in konzumacijo krme pri F ₂ samcih križanja kongenih miši linije 15FHV merjene posamično glede na genotip	48
Preglednica 14: Rezultati analize (povprečja s standardnimi odkloni ter verjetnostmi) fenotipskih podatkov za konzumacijo krme pri F ₂ -križanju kongene liniji 15FHV glede na genotip	49

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Fiziološko uravnavanje energijske bilance (prirejeno po Loos in Bouchard., 2003: 407)	5
Slika 2: Primer pridobivanja linij za identifikacijo in kartiranje QTL (prirejeno po Griffiths in sod., 2008: 150)	10
Slika 3: Lokalno ujemanje človeškega genoma z deli, ki ustrezajo mišjemu genomu. Vsaka barva predstavlja različne kromosome pri miših, kot je navedeno v legendi (prirejeno po Griffiths in sod., 2008: 707)	15
Slika 4: Fenotipske in genotipske spremembe tekom dvosmerne selekcije in inbridingom (prirejeno po Brockmann in Bevova, 2002: 371)	18
Slika 5: Genetski označevalci, ki smo jih uporabljali pri prvem pregledu genotipov	28
Slika 6: Vzorci na agaroznem gelu, genotipizirani z genetskim označevalcem <i>D15Mit87</i> . S slike je razvidno, katere živali so heterozigotne (FL) ali homozigotne (FF in LL) na preučevanem odseku kromosoma. Zadnja dva vzorca pa predstavljata kontroli FF in LL.	29
Slika 7: Mikrotitrna ploščica za PCR, z naloženimi kontrolami za testiranje polimorfnosti novih genetskih označevalcev. S slike je razvidno, v katerem zaporedju si sledijo kontrole: FF (homozigot debele linije), FL (heterozigot debele in vitke linije), LL (homozigot vitke linije), / - nismo dodali nobene kontrole, H ₂ O – bi-deionizirana voda.	31
Slika 8: Primer nepolimorfnega (<i>D15Dcr1</i>) in polimorfnega (<i>D15Mit26</i>) genetskega označevalca, ki smo ga nadalje uporabljali za natančnejše kartiranje rekombinantnih kromosomov. Na sliki polimorfnega markerja <i>D15Mit26</i> se dobro vidi, kako se alel F in L jasno ločita.	31
Slika 9: Povprečje telesnih mas ter standardne napake v F ₂ -križanju kongene linije 15FHV glede na starost	40
Slika 10: Povprečje maščobnih depojev pri F ₂ -križanju kongene linije 15FHV	40
Slika 11: Povprečne vrednosti maščobnih depojev s standardno napako (g) pri F ₂ -križanju kongene linije 15FHV	42
Slika 12: Mikrosatelitski genetski označevalci, uporabljeni pri iskanju novih rekombinantov v F ₂ -križanju kongene linije 15FHV	43
Slika 13: Genetska sestava odseka <i>Fob3a</i> novih rekombinantov, ki izvirajo iz kongene linije 15FHV	44
Slika 14: Povprečna konzumacija krme glede na genotip pri miših linije 15FHV, ko so bile v kletkah posamično	49

KAZALO PRILOG

Priloga A: Podatki F_2 -populacije kongenih miši linije 15FHV

Priloga B: Podatki o konzumaciji krme, merjene v mišjih parih F_2 -populacije kongenih miši linije 15FHV

Priloga C: Podatki o konzumaciji krme, merjene v F_2 -populacije kongenih miši linije 15FHV

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

FF – homozigot debele linije na odseku *Fob3a*

LL – homozigot vitke linije na odseku *Fob3a*

FL – heterozigot debele in vitke linije na odseku *Fob3a*

Fob3a – kvantitativni lokus na 15. kromosomu, ki vpliva na zamaščenost

15FHV – kongena linija V, ki ima odsek *Fob3a* na 15. kromosomu iz vitke linije

QTL – kvantitativni lokus (angl. *Quantitative trait locus*)

F₁ – generacija prvih potomcev križanja med linijo F in L

F₂ – potomci iz križanja generacije F₁

F – debela linija (angl. *F* – *fat*)

L – vitka linija (angl. *L* – *lean*)

DNA – deoksiribonukleinska kislina (angl. *Deoxyribonucleic acid*)

RKL – rekombinantna kongena linija

ABD – abdominalna maščoba (abdominalni maščobni depo)

GON – gonadalna maščoba (gonadalni maščobni depo)

MEZ – mezenterialna maščoba (mezenterialni maščobni depo)

FEM – femoralna maščoba (femoralni maščobni depo)

RJA – rjava maščoba

PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. *Polymerase chain reaction*)

ITM – indeks telesne mase (kg/m²)

1 UVOD

V zadnjem desetletju je debelost postala ena izmed perečih kronično povezanih bolezni. Definirana je kot stanje prekomernega kopičenja telesnih maščob oziroma naravne zaloge energije prek običajne ravni. Zaradi debelosti in prekomerne telesne mase je ogroženo zdravje, povečana pa je tudi predispozicija za različne bolezni, kot so diabetes, bolezni srca in ožilja, povečan krvni tlak, neplodnost, zapleti ob rojstvu, artritis, astma ter slabo zdravstveno stanje nasploh. Pri ljudeh za oceno debelosti največkrat uporabljamo indeks telesne mase (ITM), ki ga izračunamo tako, da maso osebe, merjeno v kilogramih, delimo s kvadratom njegove višine, merjene v metrih. V razred prekomerne telesne mase spadajo tiste osebe, katerih indeks telesne mase je med 25 in 30 kg/m², v razred debelosti pa tiste z ITM nad 30 kg/m². Potrebno pa je tudi poudariti, da se definicija za debelost, glede na telesno zamaščenost, razlikuje med moškimi in ženskami, saj so ženske že naravno nekoliko debelejše od moških.

Debelost se naglo širi po vsem svetu in je prisotna že v skoraj vsaki državi in vsaki starostni skupini, kar dokazujejo razni statistični podatki: razširjenost debelosti se je od leta 1980 več kot podvojila, v letu 2008 je imelo 1,5 milijarde ljudi prekomerno telesno težo, od tega je bilo 200 milijonov moških in skoraj 300 milijonov žensk debelih (WHO). Debelost postaja, poleg razvitih držav in držav v razvoju, očitna tudi v nekaterih najrevnejših državah sveta. Običajno se je problem debelosti v državi najprej pojavil pri premožnejšem delu prebivalstva, vendar v zadnjem desetletju ugotavljajo, da je debelost značilnejša med skupinami z nižjo izobrazbo, nižjim dohodkom in nižjim socialnim razredom.

Vse večji vnos kalorij v telo ter občutno zmanjševanje fizične aktivnosti ljudi zaradi tehnološkega napredka ter enostavnejšega in cenejšega dostopa do hrane so glavni krivci, ki so povzročili nastalo epidemijo debelosti. V času pomanjkanja, ko je bila hrana na voljo le občasno in je bilo tveganje za lakoto zmeraj prisotno, za pridobivanje hrane in preživetje nasploh pa so bili potrebni veliki fizični napor, je človek skozi evolucijo razvil posebne mehanizme, ki učinkovito kopičijo in porabljajo maščobne zaloge v telesu. Tako so geni, ki sodelujejo v teh mehanizmih in povečujejo dovzetnost za debelost, ljudem omogočali

prednost za preživetje v času pomanjkanja hrane. Posledično vsebuje tudi moderna človeška vrsta visoko pogostnost genotipov, ki so sposobni učinkovito vzdrževati biološke funkcije in skladiščiti odvečno energijo v maščobnem tkivu. To neskladje med našim starodavnim načinom življenja in trenutnimi življenjskimi pogoji lahko vodi do neravnovesja med vnosom in porabo energije ter sčasoma tudi v debelost. Enaki vzorci teh mehanizmov veljajo tudi za živali.

Zaradi vse večjega zavedanja pomembnosti zdrave prehrane, energetske uravnotežene prehrane in posledično usmerjenosti porabnika k okusnejšim in bolj zdravim izdelkom, postaja vzreja živali z manj telesnimi maščobami vedno večji izziv pri raziskavah odkrivanja genov, ki sodelujejo pri nalaganju maščevja. Tako selekcija domačih živali, predvsem pri mesnih pasmah, stremi k odbiri na bolj učinkovito izkoriščanje krme in nalaganje le-te v mišice oziroma proteine. Taka vzreja je tudi cenejša in zaželenja, saj ima lahko preveliko nalaganje maščob resne ekonomske posledice v živalski industriji – večje povpraševanje po manj zamaščenem mesu zaradi zavedanja o nezdravi prehrani, izguba vrednosti izdelkov in višji dodatni stroški dela zaradi odstranjevanja maščob pri obdelavi mesa, višji proizvodni stroški zaradi neuporabne odvečne maščobe ter negativni neželeni učinki pri vzrejnih živalih (neplodnost, problemi s sklepi zaradi prekomerne mase itd.).

Zaradi vse večjega pojava debelosti pri ljudeh in interesa kmetov za uspešno selekcijo na manj zamaščene živali so nujno potrebna nova znanja o genih, ki vplivajo na rast in razvoj posameznih maščobnih depojev, s čimer se zadnje čase ukvarja tudi vse več znanstvenikov. Prav tako je razumevanje dejavnikov in genov, ki vplivajo na nagnjenost posameznikov k odvečnemu nalaganju maščob, nujno za nadaljnje preprečevanje širjenja in zdravljenja debelosti. Študije na dvojčkih, večgeneracijskih rodovnikih ter splošne populacijske študije na prebivalstvu, združene študije, kot tudi živalski modeli, so pokazali, da ima debelost visok delež genetske komponente, oziroma je posledica tudi kompleksnih interakcij med številnimi geni in okoljem. K temu so prispevale tudi redke mutacije pri ljudeh in živalskih modelih, s pomočjo katerih so znanstveniki dobili vpogled v poti, ki so vključene v uravnavanje telesne mase. Raziskave kandidatnih genov kažejo na to, da bi tisti, ki so vključeni v regulatorne poti porabe energije in vnosa hrane, lahko igrali pomembno vlogo pri nagnjenosti k debelosti. Identifikacija kvantitativnih lokusov za

nalaganje maščevja z manjšimi vplivi na izražen fenotip bi pripomogla k hitrejši uporabi tega znanja za zdravljenje debelosti pri ljudeh in selekciji živali na manjšo zamaščenost. Za doseganje tega potenciala pa je najprej potrebno identificirati posamezne kvantitativne lokuse. Eden od takih genetskih pristopov temelji na genetskem kartiranju s tako imenovanimi kongenimi linijami, ki jih dobimo tako, da z načrtnim križanjem dveh linij živali, ki se izrazito razlikujeta v opazovani lastnosti, prenesemo določen segment genoma iz ene linije na genetsko ozadje druge linije. Te raziskave pa zahtevajo uporabo živalskih modelov, ki imajo kratek generacijski interval ter relativno nizke stroške vzdrževanja. Največkrat uporabljene živali v takih raziskavah so miš, saj, ne le da si delimo kar 99 % genov, je mišji genom tudi zelo homologen genomu domačih živali, kar predstavlja odlično izhodišče za preučevanje kompleksnih bolezni ter prenos znanja.

Glavni namen diplomske naloge je bila identifikacija novih rekombinantnih kongenih linij za kvantitativni lokus *Fob3a* na 15. kromosomu mišje linije, divergento selekcionirane na odstotek telesnih maščob. Pri kongenih linijah z zelo majhnim donorskim segmentom predstavlja identifikacija novih rekombinantov zaradi manjše pogostnosti rekombinacij velik izziv. Identificiranje le-teh pa je pomembno za razvoj novih subkongenih linij z ožjim donorskim segmentom, s čimer se poveča možnost odkritja novih vzročnih genov, ki vplivajo na nalaganje maščevja.

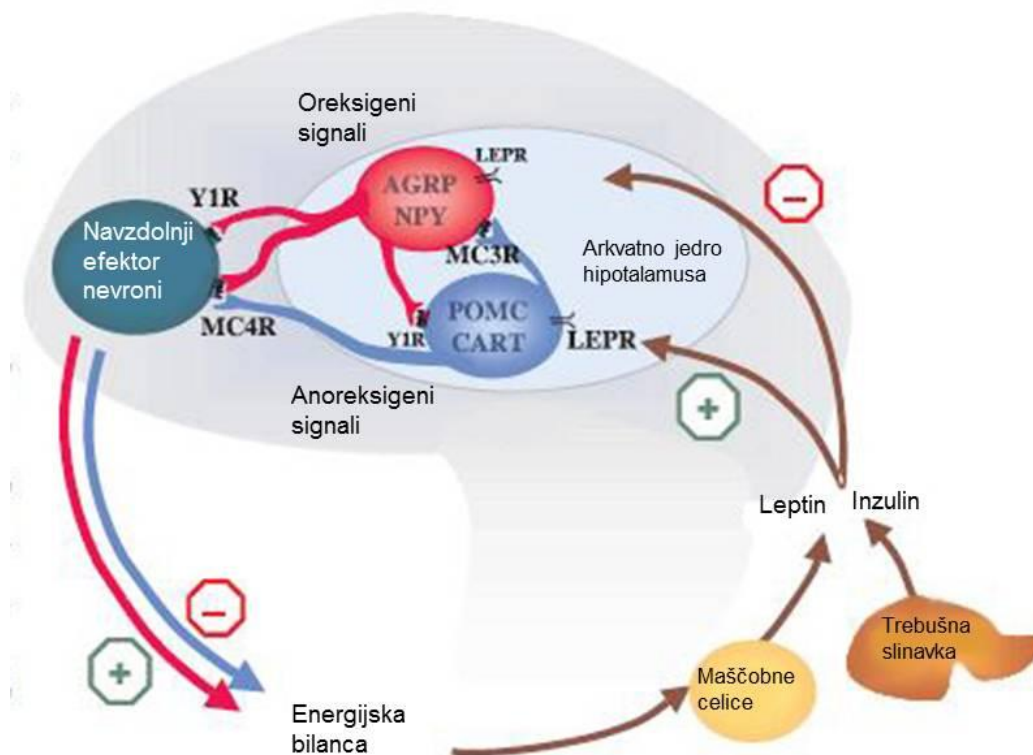
2 PREGLED OBJAV

2.1 MAŠČOBE IN FIZIOLOGIJA NALAGANJA MAŠČEVJA

Maščoba je trdna ali tekoča v vodi netopna organska snov, sestavljena iz glicerola in maščobnih kislin (Maščoba, 2000). Maščoba je vse bolj nezaželen sestava človeške hrane, saj je povezana z debelostjo ter boleznimi srca in ožilja. Kljub temu pa ima številne pomembne fiziološke vloge v telesu: predstavlja vir energije, je sestavni del celičnih membran, nekateri derivati maščobnih kislin so ligandi za jedrske hormonske receptorje pri transkripciji genov, je vir v vodi netopnih vitaminov (A, D, E in K) ter esencialnih omega-3 in omega-6 maščobnih kislin, obenem pa tudi izboljšuje okus in vonj hrane (Sanders in Emery, 2003).

Nastanek debelosti je posledica motenj ravnovesja med vnosom hrane in porabo energije. Vse je nadzorovano preko kompleksnih fizioloških sistemov, katere sestavljajo povezave številnih perifernih signalov ter hipotalamus kot centralni regulator teh sistemov. Slednji dobiva informacije glede energijske bilance preko živčnih in hormonskih signalov, ki potujejo do številnih tkivnih jeder v notranjosti hipotalamusa in do lateralnega hipotalamusnega dela. V tem sistemu ima arkvatno jedro največjo vlogo. Sestavljeno je iz dveh tipov živčnih celic – prve proizvajajo aguti-podoben protein (AGRP, angl. *agouti-related protein*) in neuropeptide Y (NPY, angl. *neuropeptide Y*), druge pa proopiomelanokortin (POMC, angl. *pro-opiomelanocortin*) ter kokain- in amfetamin-podobne prepise (CART, angl. *cocaine- and amphetamine-related transcript*). Aktivacija nevronov AGRP in NPY (Slika 1) ima oreksigeni učinek, ki spodbuja zauživanje hrane in zavira porabo energije, aktivacija živčnih celic POMC in NPY pa ima obratni, anoreksigeni učinek. Omenjene celice v arkvatnem jedru igrajo v telesu pomembno vlogo pri regulaciji energijske bilance, saj prenašajo informacije o vnosu hrane, razpoložljivih zalogah energije v maščobnih tkivih in telesnih aktivnostih. Hipotalamus lahko tako preko avtonomnega živčevja in endokrinega sistema vpliva na fiziološke dejavnike in vedenjske spremembe. Uravnava izločanje hormonov, neuropeptidov in nevrottransmiterjev, ki vplivajo na energijsko bilanco organizma. Anoreksigeni hormon, ki je ključen pri uravnavanju tega ravnovesja, je leptin in je odgovoren za regulacijo nalaganja maščevja na

dolgi rok. Za kratkotrajno regulacijo pa so odgovorni nevrottransmiterji, na delovanje katerih vpliva leptin, ki se izloča iz celic belega maščobnega tkiva (Bell in sod., 2005).



Slika 1: Fiziološko uravnavanje energijske bilance (prirejeno po Loos in Bouchard, 2003: 407)

Nevrotransmiterje lahko delimo na pospeševalce ali zaviralce apetita. Primer je oreksigeni peptid grelin (angl. *ghrelin*), ki ga primarno izločata želodec in dvanajstnik. Njegova koncentracija naraste pred zaužitjem hrane in pade po njem. Primer drugega nevrottransmiterja je peptid YY_{3-36} (PYY_{3-36}), ki pa ga izloča končni prebavni trakt ob zauživanju hrane. Njegova koncentracija ostane velika še približno eno uro po njem. PYY_{3-36} se veže na presinaptični receptor $Y2$ v živčnih celicah NPY, ki naj bi domnevno imele inhibitorne učinek, zaradi katerega bi se lahko zmanjšal vnos hrane (Bell in sod., 2005).

Opisan regulatorni mehanizem deluje v smeri zaščite organizma pred izgubo telesnih maščob, ne pa tudi v smeri pridobivanja telesnih maščob, zato bodo nadaljnje analize teh fizioloških poti priskrbele dodatne informacije o kandidatnih genih, ki lahko vplivajo na genetsko osnovo nalaganja maščevja. Prav tako so genetske raziskave s pomočjo živalskih

modelov in preučevanjem genetike raznih oblik debelosti obratno pripomogle k boljšemu razumevanju fiziologije regulacije telesne mase (Bell in sod., 2005).

2.2 DEBELOST

Današnji najopaznejši zdravstveni problem ljudi je debelost, ki se je v največji meri pojavil zaradi vse slabšega življenjskega sloga: napačne prehranjevalne navade in pomanjkanje telesne aktivnosti (Lanbein in Skalnik, 2007). Posamezniki z indeksom telesne mase večjim od 25 kg/m^2 imajo prekomerno telesno maso, tisti z višjim od 30 kg/m^2 pa so opredeljeni kot predebeli. Debelost je kompleksna, multifaktorska bolezen, kjer so kopičenje maščob in mesta njenega nalaganja determinirana z geni posameznika in okoljem, v katerem se ta nahaja. Povečana količina maščob je tako rezultat kronične pozitivne energijske bilance, kjer dotok presnovne energije presega porabo le-te. Zato je pomembno upoštevati obe strani energetske porabe – vnos kalorij in njihovo porabo (Bünger in Hill, 2005).

Tehnološki napredek ter cenejši in lažji dostop do hrane povzročajo vse večji vnos kalorij v telo. Omejujoči dejavniki, ki nas spremljajo v današnjem življenju, pa vedno bolj stremijo k razvoju v smeri debelosti spodbujajočega okolja. Slednjega že lahko najdemo v industrializiranih državah (Loos in Bouchard, 2003), kjer stopnja fizične aktivnosti strmo upada. Astrup (2005) navaja, da je bilo leta 2001 14 % moških in 17 % žensk na Danskem predebelih, v Veliki Britaniji naj bi bilo predebelih 21 % moških in 24 % žensk, od tega pa kar 47 % moških in 33 % žensk s prekomerno telesno maso. Razmere v ZDA so še slabše. Razširjenost debelosti naj bi se iz 23 % v letih od 1988 do 1994 povečala na 31 % v letu 2000. Tudi Evropa gre po korakih ZDA, saj ocenjujejo, da bo v naslednjih desetih letih pričakovati enako stopnjo debelosti, kot jo imajo trenutno v ZDA.

Po mnenju Loosa in Boucharda (2003) so navedeni podatki najverjetneje posledica evolucije človeškega genoma skozi čas, ko je bila hrana na voljo le občasno in je bilo za pridobivanje le-te potrebno vložiti veliko navora. Tako ima človek v svojem genomu gene, ki so mu v času lakote omogočali preživetje, v današnjem sodobnem prebivalstvu pa pri posameznikih, ki so nagnjeni k skladiščenju odvečne energije in maščobnega tkiva, lahko vodijo do neravnovesij v energijski bilanci in postopoma tudi do debelosti. Povečevanje

stopnje razširjenosti debelosti ima pomemben vpliv na zviševanje pojavnosti drugih bolezni, ki lahko zaradi debelosti nastanejo: splošno povečanje umrljivosti in slabo zdravstveno stanje, bolezni srca in ožilja (povečan krvni pritisk in dislipidemija), diabetes tipa II, metabolični sindrom, kap, motena reprodukcijska sposobnost žensk, respiratorni problemi, mišično-skeletne motnje, rak, gastrointestinalne bolezni, psihološki problemi ter posledice zaradi debelosti v otroštvu oziroma mladosti (Inoue in Zimmet, 2000).

Pojavlja se tudi problem zamaščenosti živali, do česar je prišlo zaradi selekcije in vse večjih človekovih potreb. Boljše zavedanje porabnika glede zdrave prehrane pa vodi rejce in selekcijske službe k zmanjševanju tega problema, pri čemer ima ekonomski vidik velik vpliv. Začeli so izvajati selekcijo na tanjšo hrbtno slanino pri prašičih (Rattink in sod., 2000), na manjšo maso abdominalnega in podkožnega maščevja pri perutnini (Ikeobi in sod., 2002), pri govedu in drobnici pa na količino in sestavo mleka ter na rast in lastnosti klavnega trupa (Khatkar in sod., 2004; Walling in sod., 2004).

2.3 ODKRIVANJE KVANTITATIVNIH LOKUSOV ZA ZAMAŠČEVANJE

Za kvantitativne lastnosti je značilna normalna porazdelitev fenotipskih vrednosti znotraj populacije. Na razvoj takih lastnosti vpliva večje število genov, interakcije med njimi, interakcije genov z okoljem ter seveda samo okolje (Peters in sod., 2007).

Večina genetskih sprememb za vsebnost telesnih maščob je poligena in določena z kombinacijami genov, ki vplivajo na metabolizem, presnovo lipidov in ogljikovih hidratov, apetit ter obnašanje. Različne oblike genov, večina z majhnimi do zmernimi učinki, tako vplivajo na genetsko osnovo za debelost (Pomp, 1997). Prispevek genetskih dejavnikov k debelosti lahko povzamemo kot (Clement, 2005):

- monogena oblika debelosti – ta oblika debelosti je redka, zelo hude in se običajno začne že v otroštvu;
- poligena oblika debelosti – v tem primeru pa ima vsak posamezen, za debelost vplivajoči gen, majhen vpliv na debelost, vendar ima kumulativni prispevek teh genov skupaj pomemben vpliv, ko so prisotne interakcije z okoljskimi dejavniki, katere kažejo nagnjenost k izražanju fenotipa (Clement, 2005).

Opisane značilnosti genov tako omogočajo iskanje in odkrivanje kvantitativnih lokusov za telesno maso in nalaganje maščevja, saj je ocenjena relativno visoka genetska korelacija med telesno maso in nalaganjem maščevja, kot navajajo Leamy in sod. (2005).

Najdenih je bilo že 75 QTL-ov za debelost in 85 QTL-ov za telesno maso med križanjem več različnih linij miši, navajata Brockmann in Bevova (2002). Nekaj od teh je bilo identificiranih tudi zaradi kmetijskih interesov za vzrejo živali (prašiči, govedo, drobnica) z velikimi prirasti in čim manjšo vsebnostjo maščob pri najmanjšem možnem vnosu krme (Comuzzie in Allison, 1998). Lociranje QTL-ov je zato pomembna osnova za iskanje genov, ki vplivajo na že ugotovljene kromosomske učinke (Aksu in sod., 2007). Kvantitativni lokus je tisti, ki ima merljive fenotipske spremembe zaradi genetskih in/ali okoljskih vplivov. Na splošno so QTL-i več faktorski in so pod vplivom polimorfnih genov, zato lahko eden ali več kvantitativnih lokusov vpliva na preučevani fenotip. Pri tem je pomembno poudariti tudi vplive okolja, ki pa so neodvisni od genotipa ali interakcij gen-okolje. Na splošno velja, da več lokusov kot je vključenih v determiniranje kvantitativnih lastnosti, tem težje je locirati in identificirati vse vzročne kvantitativne lokuse. Verjetnost uspeha v lociranju QTL-a pa je odvisna od heritabilitete lastnosti, njenega načina dedovanja (dominanten, recesiven in aditiven) in števila genov, ki nanjo vplivajo (Abiola in sod., 2003).

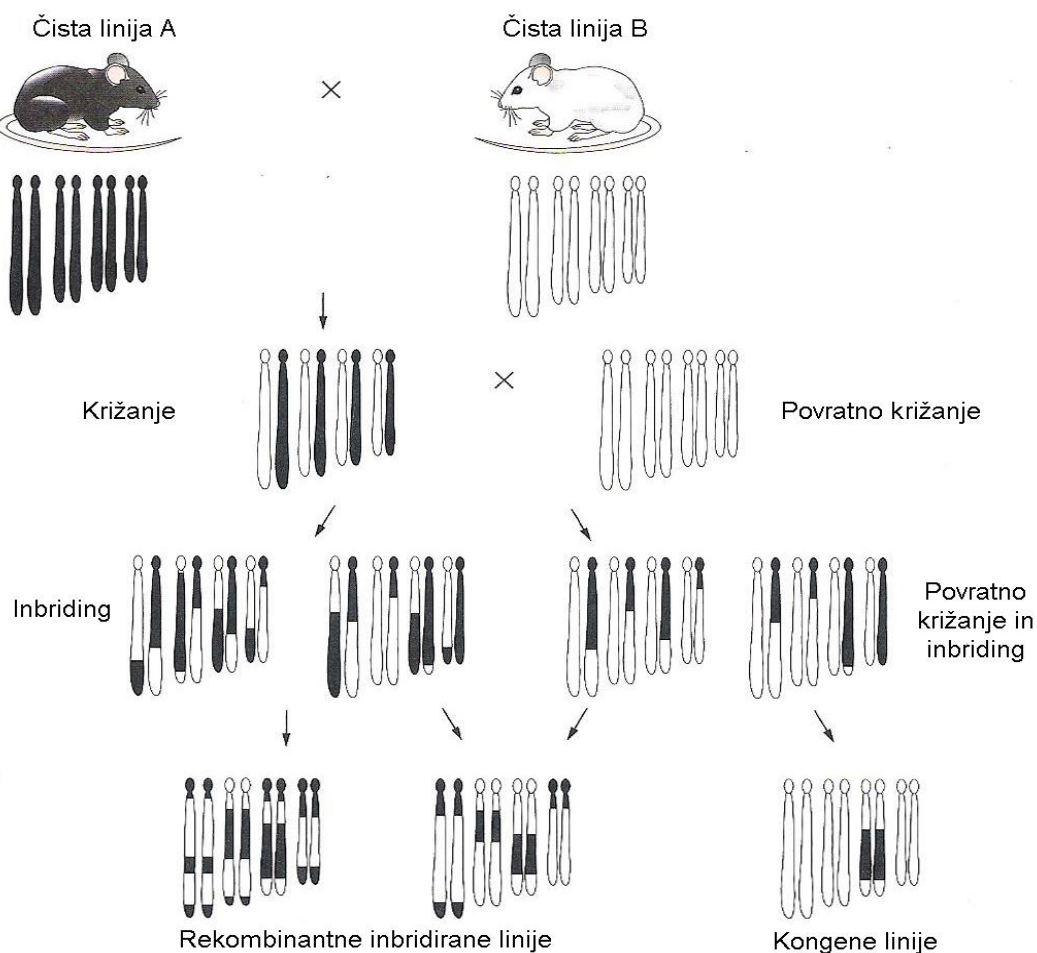
V študijah prevladujejo trije tipi strategij za identificiranje specifičnih genov, ki vplivajo na debelost (Loos in Bouchard, 2003):

- prvi pristop je identifikacija kandidatnega gena, ki temelji na razumevanju patološke fiziologije debelosti. Kandidatni geni so izbrani na osnovi opaženih vlog ali funkcij v biokemičnih poteh, povezanih z regulacijo energijske bilance ali biologije nalaganja maščevja;
- podrobna raziskava celotnega genoma z namenom identificiranja kromosomskih delov tako imenovanih kvantitativnih lokusov in postopoma tudi genov znotraj let;
- primerjava vitkega in debelega posameznika ter drugih informacij na podlagi vzorca izražanja gena na ravni RNA, ki se tkivno-specifično izraža.

Preden pričnemo z raziskavami identificiranja kromosomskih regij, ki skrivajo kvantitativne lokuse v poligenih živalskih modelih, je potrebno po mnenju Pompa (1997) upoštevati tri bistvene komponente – potrebno je imeti številno populacijo, veliko število molekularnih označevalcev za pokritje celotnih regij na kromosomih ter primerne statistične metode.

Postopek kartiranja kvantitativnega lokusa (Slika 2):

1. najprej poteka križanje dveh linij, ki se med seboj izrazito razlikujeta v opazovani kvantitativni lastnosti ter genetskih označevalcih oziroma alelih;
2. potomce generacije F_1 lahko nato parimo med seboj, da dobimo potomce F_2 ali pa jih povratno križamo (angl. *backcross*) z eno od starševskih linij z namenom pridobiti čim večji odstotek genetskega ozadja sprejemne linije. Če se QTL nahaja blizu genetskega označevalca, se bodo le-ti podedovali skupaj ter bo genetski označevalec v F_2 ali povratnem križanju imel različna fenotipska povprečja za kvantitativno lastnost;
3. potomcem F_2 ali potomcem iz povratnega križanja nato z molekularnim genetskim označevalcem analiziramo celoten genom ter opravljamo in zbiramo meritve za fenotipsko lastnost. Z genotipiziranjem ugotavljamo, katera od starševskih linij je prispevala alel na določenem lokusu;
4. kolikšna je razlika med povprečjem fenotipa in genetskim označevalcem, je odvisno od moči učinka QTL-a ter kako tesna je povezava med kvantitativnim lokusom in genetskim označevalcem (Griffiths in sod., 2008). To lahko prikažemo s pomočjo vrednosti LOD (angl. *logarithm of odds ratio*), s katero testiramo hipotezo prisotnosti QTL-a. Na podlagi te vrednosti sklepamo, kje v genomu se nahaja določen kvantitativni lokus (Lander in Kruglyak, 1995, cit. po Abiola in sod., 2003).



Slika 2: Primer pridobivanja linij za identifikacijo in kartiranje QTL (prirejeno po Griffiths in sod., 2008: 150)

Odkritih je bilo 77 genov, katerih raven izražanja je različna med debelimi in vitkimi mišjimi linijami. Ti geni kodirajo proteine, ki imajo vlogo pri ogljikovih hidratih in maščobah, prevajanju signalov, celični proliferaciji, celični komunikaciji, organizaciji citoskeleta in imunskem odgovoru. Geni, ki sodelujejo pri različnih bioloških procesih in molekulskih funkcijah v analiziranih maščobnih tkivih, nakazujejo, da nalaganje maščob v dozorelih maščobnih celicah igra pomembno vlogo v regulaciji telesne teže (Aksu in sod., 2007).

Leptin, inzulin in IGF-1 (angl. *insuline-like growth factor I*) so dobro poznani po svojih stimulativnih rastnih učinkih na metabolizem. Leptin je periferni signal, ki uravnava ješčnost in porabo hrane v sodelovanju s centralnim živčnim sistemom. Po navedbah Maffei in sod. (1995, cit. po Brockmann in sod., 2000) je ta esencialen pri izogibanju

debelosti, vendar se tako kot pri na leptin odpornih debelih ljudeh pojavljajo povečane koncentracije le-tega tudi pri mišjem DU6 modelu, za katerega je značilno, da živali ekstremno hitro rastejo. Do danes glede regulacije telesne mase in debelosti še niso našli povezave z ostalimi kandidatnimi geni, kot so *Cpe* (angl. *carboxypeptidase E*), *Lep* (leptin), *Tub* (angl. *tubby candidate gene*), *A^y* (angl. *agouti signaling peptide*), *Ucp* (angl. *uncoupling protein*) in *Sim1* (angl. *single-minded homolog 1*), odgovorne za ekstremne koncentracije leptina, inzulina in IGF-I (angl. *insulin-like growth factor I*) pri mišji liniji DU6. Zato Brockmann in sod. (2000) sklepajo, da sta rast in debelost regulirana preko dodatnih genov. Ti morda medsebojno vplivajo na gene, ki so v povezavi z debelostjo in telesno maso. Svitz in sod. (1997, cit. po Brockmann in sod. 2000) so glede na rezultate raziskav ugotovili, da bi lahko zaradi znatne korelacije med leptinom in maso mišic imel ta direktni učinek na maščobo in mišično tkivo. Odkritje leptina kot faktorja občutka sitosti pri debelih mišjih linijah je imelo stimulativen učinek za nadaljnje raziskave genetike debelosti ter za dodatna odkrivanja in razčlenjevanja poti leptina, odgovornega za vnos hrane in homeostazo energije (Brockmann in Bevova, 2002).

Boeuf in sod. (2000, cit. po Aksu in sod., 2007) ter Nadler in sod. (2000, cit. po Aksu in sod., 2007) so poleg leptin kodirajočega gena (*Lep*) identificirali še *Cox8* (angl. *cytochrome oxidase c subunit VIII*), *Gapds* (angl. *glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase*), *Fbp1* (angl. *fructose biphosphatase 1*), *Ubce7ip3* (angl. *ubiquitin conjugating enzyme 7 interacting protein 3*), *Csf1r* (angl. *colony-stimulating factor 1*), *Gsto1* (angl. *glutathione S-transferase omega 1*) in *Apoe* (angl. *apolipoprotein E*), ki se prav tako izražajo v gonadalnih maščobnih blazinicah odraslih živali debelih mišjih linij z različno stopnjo hiperglikemije (visoke ravni glukoze v krvi).

Veliko raziskav z različnimi živalskimi modeli in pristopi je usmerjenih k iskanju kvantitativnih lokusov za odstotek telesne maščobe:

- tako imenovan *Mob* (angl. *multigenic obesity*), niz petih QTL-ov, je bil identificiran pri križanju med standardno inbridirano linijo C57BL/6J in divjo linijo *Mus spretus* (Warden in sod., 1993, 1995, cit. po Pomp, 1997). Medtem ko sama linija ter potomci F₁ ne kažejo znakov debelosti, pa je opažena dramatična sprememba v odstotku telesnih maščob pri povratnem križanju s C57. Ta pojav debelosti pri

križancih je najverjetneje rezultat interakcije genov, pri čemer pa mora biti prisotna specifična kombinacija alelov pri dveh ali več lokusih, da se bo lahko izrazil fenotip za debelost;

- *Dob* (angl. *dietary obese*), niz petih QTL-ov, ki so odzivni na sestavo krme. Debelost je v tem primeru pri inbridiranih linijah AKR/J in SWR/J (ki se dvakratno razlikujejo v odstotku telesnih maščob) povzročena s krmo z visoko vsebnostjo maščob (West in sod., 1995, cit. po Pomp, 1997).

V nasprotju s tema modeloma, ki temeljita na epistatičnih ali okoljskih učinkih povzročitve debelosti, uporabljata naslednja dva modela razliko v odstotku telesnih maščob, ki se naravno pojavlja med inbridiranimi linijami oziroma je rezultat direktne umetne selekcije:

- tako sta Taylor in Phillips (1996, cit. po Pomp, 1997) odkrila *Obq* (angl. *obesity QTL*), niz QTL-ov, dobljen pri križanju relativno debele linije EL/Suz z vitko linijo 129/Sv. Liniji kažeta več kot trikratno razliko v debelosti in še večja razlika je opažena med samicami;
- šest QTL-ov, katere označuje *Pfat* (angl. *polygenic fatness*), je bilo identificiranih z uporabo mišje linije M16i, ki je bila podvržena dolgoročni selekciji za hitro pridobivanje teže, kateri je sledilo parjenje v sorodstvu (brat-sestra) za fiksacijo lokusov. Linija M16 je tako razvila 60 % večjo telesno maso od mase neselekcionirane kontrole. Kot rezultat pozitivne genetske korelacije med telesno maso in odstotkom telesne maščobe je razvila zmerno poligeno debelost in hiperfagijo (prekomeren apetit) (Hanrahan in sod., 1973, cit. po Pomp, 1997; Eisen, 1986, cit. po Pomp, 1997; Eisen in Leatherwood, 1978, cit. po Pomp, 1997).

V raziskavi poligenega modela za metabolični sindrom so z uporabo na maso maščob divergentno selekcionirane debele (F) in vitke (L) linije, prišli do sledečih ugotovitev (Morton in sod., 2005):

- debele miši kažejo znake metaboličnega sindroma za odpornost na inzulin z zamaščenimi jetri in hipertenzijo,
- debele miši so zmanjšale kroženje glukokortikoidov po telesu, ki zvišujejo koncentracijo glukoze v krvi,
- debele miši so zelo občutljive na glukokortikoide,

- debele miši so zmanjšale maščobno-glukokortikoidno aktivnost in glukokortikoidno aktivnost v jetrih,
- debele miši imajo večjo telesno maso kot vitke.

Analiza kartiranja kvantitativnega lokusa pri križanju med F in L linijo je pokazala štiri signifikantne kromosomske regije z geni, ki vplivajo na delež maščob, *Fob1* (angl. *F-line obesity QTL 1*), *Fob2*, *Fob3* in *Fob4* na 2., 12., 15. in X kromosomu. *Fob1* je pojasnil 4,9 %, *Fob2* 19,5 %, *Fob3* 14,4 % in *Fob4* 7,3 % F_2 fenotipske variance za odstotek maščobe. Medtem ko imajo *Fob1*, *Fob3* in *Fob4* aditiven učinek, ima *Fob2* dominanten genetski vpliv. Pri vseh štirih odkritih QTL-ih pa so učinki pozitivni, kar pove, da aleli iz linije F zvišujejo odstotek maščobe. Zaradi velikega vpliva na vsebnost maščobe (delež maščob pri homozigotnih živalih debele linije se je zvišal za 4,62 %) in močne statistične podpore (vrednost LOD 11,3) je *Fob3* zanimiv za nadaljnje raziskave (Horvat in sod., 2000). Tako so Stylianou in sod. (2004) v grobem genetskem kartiranju kvantitativnega lokusa *Fob3* odkrili dve regiji znotraj omenjenega QTL-a, *Fob3a* in *Fob3b*. Slednja imata neodvisne, vendar v isti smeri (na delež maščobe) delujoče učinke. Kvantitativna lokusa imata pomemben aditiven in dominanten vpliv na telesno maso, vendar na debelost (delež maščobe in relativna masa gonadalne maščobe) vplivata aditivno. Ocenjen aditiven učinek na delež maščobe pri *Fob3a* je skoraj dvakrat tolikšen (1,62 %), kolikšen je vpliv na delež maščob pri *Fob3b* (0,71 %), ne glede na to pa sta oba pomembna (Stylianou in sod., 2005).

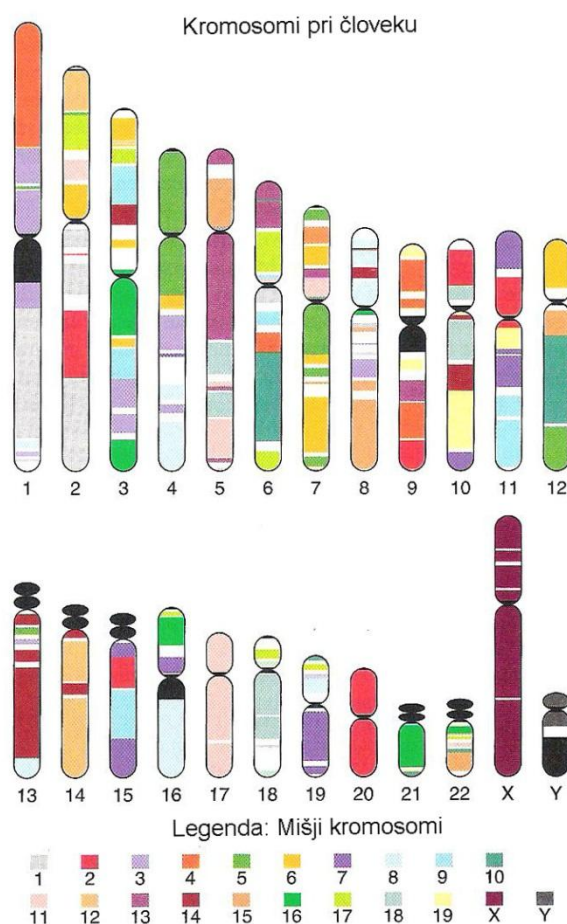
Potencialni kandidatni geni, ki so znotraj LOD intervala kvantitativnega lokusa *Fob3* na kromosomu 15, so: *Trhrf* (angl. *thyrotropin releasing hormone receptor*), *Cog* (angl. *congenital goiter*), *Tgn* (angl. *thyroglobulin*), *Smstr3* (angl. *somatostatin receptor 3*), *Tef* (angl. *thyrotroph embryonic factor*), *Ins3* (angl. *insulin III*) in *Ppara* (angl. *peroxisome proliferator activated receptor alpha*) (Horvat in sod., 2000). Natančnejše kartiranje obeh lokusov (Prevoršek, 2010) je pokazalo, da se znotraj *Fob3b* nahajajo za nastanek debelosti pomembni kandidatni geni *Dgat1* (katalizira končni korak v sintezi trigliceridov), *Gpihbp1* (kodira protein, ki je vpleten v transport lipidov in holesterola po krvi), *Rhpn1* (nosi zapis za protein, ki sodeluje v procesu nastanka maščobnih celic) ter *Ly6a* (povzroča nenormalno zgradbo maščobnih celice pri transgenih miših). Za QTL *Fob3a*, na katerem temelji tudi naše pričujoče raziskovalno delo, pa je bila razvita kongena linija (Prevoršek, 2010), na

kateri so opravili fenotipsko karakterizacijo ter statistično analizo homozigotnih živali. Rezultati te raziskave kažejo na to, da se QTL nahaja na intervalu od 40,14 Mbp do 60,62 Mbp pri kongeni liniji V. Znotraj te regije pa naj bi se nahajali sledeči, za nastanek debelosti, kandidatni geni: *Trhr* (vpliva na debelost preko ščitničnih metaboličnih poteh), *Enpp2* (igra vlogo pri uravnavanju razvoja maščobnega tkiva ter vseh z debelostjo povezanih patoloških stanj v telesu), *Trip1* (vpliva na koncentracije trigliceridov v krvi in na pojav hipertrigliceridemije) in *Sqle* (vpleten v lipogenezo in biosintezo holesterola).

2.4 ŽIVALSKI MODELI

Telesna velikost, masa različnih organov, debelost, gostota mineralov v kosteh, produkcija toplote, vnos hrane in številne druge kompleksne lastnosti pri sesalcih imajo poligeni način dedovanja. Zaradi tega znanstveniki tudi domnevajo, da so te kompleksne lastnosti pod vplivom interakcij med številnimi geni. Slednje je bilo v zadnjih letih prikazano s konstantno naraščajočim številom ugotovljenih kvantitativnih lokusov, ki vplivajo na te lastnosti. Večina teh raziskav je potekala na mišjih modelih zaradi uporabnosti inbridiranih ali selekcioniranih linij, ki so izbrane oziroma vzrejene na odstopanja od povprečij opazovanih lastnosti. Te so nato križane za proizvodnjo F_2 generacije z genotipsko variabilnostjo pri na lastnost vplivajočih lokusih (Leamy in sod., 2005).

Med modeli organizmov je laboratorijska miš tista, ki je največ uporabljena, saj je njen genom zelo podoben človeškemu. Čeprav je mišji genom nekoliko manjši, pa vsebuje približno enako število genov kot človeški. Miši in ljudje so se v evolucijskem razvoju razdvojili od skupnega prednika pred približno 75 milijoni let, kar je zadostovalo za pojav mutacij, ki so povzročile razlike med genomoma. Skupne sekvence mišjega in človeškega genoma tako verjetno kažejo na skupne funkcije (Slika 3). Prvi korak pri primerjavi genoma je identifikacija tako imenovanih homolognih genov, ki so si po zgradbi, delovanju in izvoru čim bolj podobni (imajo podobne DNA sekvence). Nadaljnji pregled mišjih genov je odkril, da ima vsaj 99 % vseh mišjih genov nekaj homologov v človeškem genomu in obratno (Griffiths in sod., 2008).



Slika 3: Lokalno ujemanje človeškega genoma z deli, ki ustrezajo mišjemu genomu. Vsaka barva predstavlja različne kromosome pri miših, kot je navedeno v legendi (prirejeno po Griffiths in sod., 2008: 707)

Miš je bila že od nekdaj primerna vrsta živali pri tolmačenju genetskih osnov človeške fiziologije in patofiziologije. Po osnovanju prve inbridirane mišje linije (DBA) v zgodnjem 20. stoletju so bile raziskave raka in transplantacijske biologije z uporabo teh linij najbolj uspešne, saj je bil za to potreben enoličen rod, ki pa so ga lahko pridobili iz mišjih linij. Sledile so analize napak na posameznih genih, ki so nastale v inbridiranih linijah zaradi spontanij mutacij. Slednje so postale najpomembnejše v nadaljnjih genetskih raziskavah na miših. S tem se je do danes razvila ena pomembnejših genetskih raziskav na miših – analiza kompleksnih oziroma kvantitativnih lokusov. Na stotine genetsko in fenotipsko različnih inbridiranih linij predstavlja izhodišče, na katerem bodo lahko preučevali razmerje med genotipom in fenotipom ter identificirali kvantitativne lokuse za katerokoli merljivo lastnost (Peters in sod., 2007).

Inbridirane mišje linije so pridobljene iz enkratnega parjenja staršev ter sledečega ponavljajočega parjenja v sorodu (brat-sestra). Po 20-ih generacijah inbridinga so miši genetsko identične in homozigotne na vseh lokusih. Razvitih je ogromno za različne lastnosti inbridiranih miši, kar omogoča (Peters in sod., 2007): izbiro primerne linije za odkrivanje kvantitativnih lokusov, izhodišče za nadaljnji razvoj modelov, fiziološka testiranja in/ali razvoj zdravil ter razvoj na mutacije občutljive linije in identifikacijo le-teh.

Dokazano je bilo, da so miši pomembni modeli za razumevanje debelosti pri ljudeh in vzrejnih živalih. Miši z mutacijami na enem genu in genetsko modificirane miši so bile uporabljene pri študijah genov in poti, ki regulirajo telesno maso. Večina učinkov kvantitativnih lokusov je aditivna, zato lahko s prehrano, starostjo in spolom spreminjamo genetske učinke. Kongene linije (angl. *congenic strains*), rekombinantne inbridirane linije (angl. *recombinant inbred strains*), napredno križane linije (angl. *advanced intercross lines*) in linije s kromosomskimi substitucijami (angl. *chromosome substitution strains*) so potrebne za končno kartiranje QTL-a, identificiranje genov, ki ležijo znotraj teh lokusov ter za preučevanje interakcij med njimi. Omembe vredne so linije, ki se razlikujejo v vsebnosti telesnih maščob (NZO, KK, F in L linije), telesni masi v mladosti (DU6 linija) ali odraslosti (LG/J, SM/J, P6high in P6low linije), stopnji rasti (linija M16) in izgubi telesne toplote (MH in ML liniji) (Brockmann in Bevova, 2002). Zaradi velikosti, sorazmernosti med vnosom hrane in telesno težo je miš še posebej primerna za raziskave genetskih osnov in medsebojnih povezav med zaužito krmo in hitrostjo metabolizma (Bünger in Hill, 2005). Dejstvo, da lahko spremenimo samo en gen in s tem pridobimo debele miši, prepričljivo kaže na to, da geni prispevajo k debelosti. Učinek preučevanega gena, zlasti če ta prispeva h kompleksnosti lastnosti, je odvisen od genetskega ozadja (učinki drugih genov), glede na katerega se lahko ali pa ne kaže želeni fenotip. Zaradi tega so poligeni živalski modeli edinstven vir za preučevanje kompleksnosti regulacije telesne mase (Brockmann in Bevova, 2002).

Miši imajo kot živalski model številne prednosti (Bünger in Hill, 2005): kratek generacijski interval, so visoko reproduktivne, imajo majhne stroške vzdrževanja, možno je uravnavanje in standardiziranje okolja, v katerem jih vzrejamo, mogoče je načrtovati

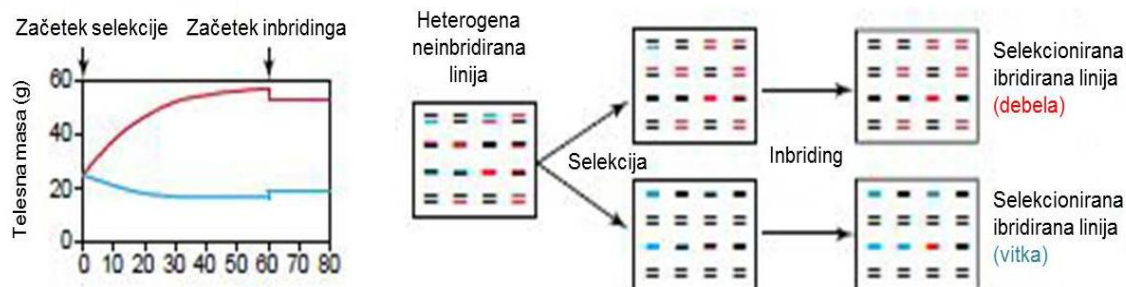
paritve in vzdrževati velike populacije. Široko poznavanje njihove genetike je pripeljalo miši do tega, da so postale glavni model v raziskavah glede dedovanja telesne kompozicije in energetike. Vseeno pa lahko biologija in fiziološka regulacija razporejanja energije in maščob signifikantno variirata med mišmi in ljudmi (Pomp, 1997). Zaradi tega bi lahko prašič bolje ustrezal kot model za preučevanje genetike debelosti pri človeku, saj le-ta poseduje več podobnosti v prehranski in metabolični fiziologiji (Haupt in sod., 1979, cit. po Pomp, 1997; Miller in Ullrey, 1987, cit. po Pomp, 1997; Rapacz in Hasler, 1989, cit. po Pomp, 1997). Vendar pomanjkanje inbridginga in dobro nadzorovanih okoljskih pogojev omejuje uporabo prašiča kot modela za odkrivanje QTL-ov, ki vplivajo na debelost.

Glede na genetsko variabilnost osnovne populacije selekcijskega poizkusa, specifičnega selekcijskega kriterija in selekcijskega postopka (npr.: velikost populacije in intenzivnost selekcije) se na rast selekcionirane mišje linije razlikujejo v fenotipu kot tudi v specifično določenih genih in genetskih spremembah, ki prispevajo k selekcijskemu odgovoru (Brockmann in sod., 2004). Zato lahko z vsakim križanjem med različnimi linijami miši odkrivamo različne nize kvantitativnih lokusov. Kongena mišja linija je eden od genetskih virov, ustrezen za fino kartiranje kvantitativnih lokusov kot tudi za fiziološke raziskave vplivov QTL-ov na debelost (Prevoršek in sod., 2010). Kongene linije so uporabne zaradi vpliva genetskega ozadja druge linije na spremembe v fenotipu (Peters in sod., 2007). Ena izmed pomembnih prednosti je tudi ta, da omogočajo ugotavljanje ocene fenotipov pri genetsko identičnih posameznikih. V takem primeru je lažje dosežena statistična značilnost in so tako kvantitativni lokusi s šibkejšimi vplivi na lastnost identificirani in potrjeni z uporabo manjšega oziroma bolj vodljivega števila živali (Abiola in sod., 2003).

Genetsko kartiranje z uporabo kongenih linij je ena od strategij za identificiranje kvantitativnih lokusov ter nadaljnjo izolacijo genov znotraj teh regij. Razvijemo jih s prenosom določenega segmenta genoma iz ene linije (tako imenovane donor linije) na genetsko ozadje druge linije (prejemne linije) preko več generacij povratnega križanja in selekcij na želen genetski interval. Subkongene linije so razvite z dodatnim povratnim križanjem z namenom identificiranja rekombinantnih posameznikov, ki imajo manjši odsek donorske regije. Rekombinantne kongene živali so nato parjene z eno od starševskih linij zato, da fiksiramo zmanjšan donorski odsek (Flint in sod., 2005). Najpomembnejša

značilnost tega sistema – rekombinantne kongene linije je ta, da so v njihovem genomu geni, ki vplivajo na kvantitativno lastnost, razdeljeni po posameznih rekombinantnih kongenih linijah. Na ta način se lahko ustvari odseke, ki vsebujejo samo en gen ter je s tem omogočeno kartiranje in preučevanje le-tega neodvisno od drugih genov. Za to pa je potrebno križanje F_2 ali povratno križanje rekombinantne kongene linije, da dobimo genetsko identične posameznike, na katerih se nadalje opravljajo raziskave QTL-ov (Stassen in sod., 1996). Pridobivanje takšnih genski intervalov, ki jih pokrivajo posamezne rekombinantne kongene linije (RKL), pa ima včasih omejitve zaradi težavnosti pridobivanja potrebnih rekombinantnih živali, vzdrževanja velikega števila populacije takih živali ter zaradi težavnosti pri iskanju polimorfni markerjev, katerih število mora biti primerno veliko, da lahko identificiramo rekombinante (Rogner in Avner, 2003).

S selekcijo na veliko in majhno vsebnost maščobe v telesu so razvili debelo (F) in vitko (L) linijo miši, ki predstavljata model za poligeno debelost, podobno kot se kaže pri ljudeh. Preko 60 generacij dolga divergentna selekcija heterogenih, neinbridiranih populacij je pripeljala do razvoja linij, ki se razlikujeta v telesni masi in debelosti za faktor več kot 4-krat. Selekcija (Slika 4) je tako vodila do zvišanja deleža maščob pri debelih miših na 23 % in zmanjšala delež maščob na 4 % pri vitkih miših (Brockmann in Bevova, 2002). S križanjem teh linij so odkrili štiri kvantitativne lokuse: *Fob1*, *Fob2*, *Fob3* in *Fob4*. Za analizo kvantitativnega lokusa *Fob3* na 15. kromosomu je bila uporabljena kongena linija F^{Chr15L} z donorskim segmentom vitke linije (Stylianou in sod., 2004).



Slika 4: Fenotipske in genotipske spremembe tekom dvosmerne selekcije in inbridingom (prirejeno po Brockmann in Bevova, 2002: 371)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPIS MIŠJIH LINIJ F_2 V NAŠI RAZISKAVI

Poglavitni namen naše raziskave je bil razvoj kongenih linij, s katerimi lahko nato identificiramo genetske lokuse, ki vplivajo na določeno kvantitativno lastnost, v našem primeru nalaganje maščevja. Križanje moramo opraviti na dveh mišjih linijah, ki sta si različni v opazovani lastnosti in v molekularnih označevalcih. Za produkcijo takih živali so tako že predhodno v skupini profesorja Horvata (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko) najprej med seboj križali starševski liniji F (debela linija) in kongeno linijo 15FHV ter s tem dobili populacijo F_1 . Sledilo je parjenje živali med seboj znotraj populacije F_1 -živali (ang. *intercross*), pri čemer so dobili populacijo F_2 .

3.1.1 Linija FLI

Linija FLI (F - fat) je osnovna selekcijska linija debelih (F) linij miši. Je rezultat več kot dvajsetletne dvosmerne selekcije, ki so jo opravljali v laboratoriju v Edinburgu na Škotskem. S križanjem dveh inbridiranih linij JU in CBA ter genetsko heterogene linije CFLP so razvili populacijo miši, iz katere izvira tudi linija F in je pred selekcioniranjem imela povprečni delež maščevja 10 % telesne mase. Selekcija pri teh miših je potekala v treh selekcioniranih linijah: linija A (apetit) je bila selekcionirana glede na konzumacijo krme, linija F (debelost) je bila selekcionirana glede na delež telesnih maščob, linijo P (protein) pa so selekcionirali na telesno maso pri desetih tednih starosti. Za vsako linijo so tudi upoštevali tri selekcijske kriterije v treh ponovitvah (končno število linij je bilo 27), in sicer: selekcija na osnovi povečanja opazovane lastnosti, selekcija na osnovi zmanjšanja opazovane lastnosti in kontrolna linija, ki ni bila selekcionirana (Sharp in sod., 1984)

Selekcija za linijo F je potekala 53 generacij, od teh pa je bil v prvih dvajsetih generacijah selekcijski kriterij delež gonadalne maščobe pri deset tednov starih samcih. S križanjem treh ponovitvenih linij pri vitki in debeli liniji v 20. generaciji so tako nastali osnovni liniji F (debela) in L (vitka). Po 20. generaciji pa je selekcijski kriterij postal delež celotnega maščevja v telesu pri samcih, ki so ga določili z metodo sušenja zamrznjenih evtanaziranih samcev pri 14 tednih starosti. Tako je po 53. generaciji imela linija F 23 %, linija L pa le 4 % maščobnega tkiva (Bünger in Hill, 1999; Horvat in sod. 2000).

Leta 2003 so bile z Univerze v Edinburgu pripeljane na Univerzo v Ljubljani linije F in L ter nekatere kongene linije. Iz mišje kolonije na Veterinarski fakulteti, kjer so miši najprej bile, so jih leta 2004 preselili v mišjo kolonijo Oddelka za zootehniko na Biotehniški fakulteti.

3.1.2 Linija 15FHV

Kongene linje so linije, pri katerih manjši segment genoma ene linije z načrtnim križanjem prenesemo na genetsko ozadje druge linije. Take živali pridobijo tako, da izbrane F_2 -potomce (rekombinante) večkratno povratno križajo s starševsko linijo F (prejemna linija) (angl. *backcross*; BC). Po končanih križanjih sledi še parjenje izbranih potomcev med seboj (heterozigoti za tarčni genomski odsek), da dobijo homozigotne potomce za opazovani donorski segment genoma. Take živali so nato osnova za razvoj homozigotne kongene linije (Rogner in Avner, 2003).

Tri kongene linije, ki so jih pridobili po petkratnem povratnem križanju F_2 -potomcev, in linija F so služile za nadaljnji razvoj novih kongenih linij za natančnejše kartiranje lokusov. Ena izmed teh linij, F^{chr15L} A, je služila za razvoj kongene linije W, ta pa za dve novi liniji Z in V (Prevoršek, 2010). Slednjo smo uporabili v naši študiji. Pri tej liniji je donorski segment, ki izvira od vitke linije L, precej kratek. Nahaja se med genetskima označevalcema *D15Mit5* do *D15Mit115* in je dolg 12,874937–12,874979 Mbp (6,18 cM). Rekombinante živali na tem odseku smo nato parili s homozigoti iz linije FLI.

3.2 POSTOPKI V LABORATORIJU

3.2.1 Zbiranje fenotipskih podatkov

Pri F_2 -kongenih živalih smo za našo analizo zbirali fenotipske podatke za oba spola. Do dneva usmrčitve so miši imele na voljo vodo in hrano, slednjo pa smo jim tri ure pred sekcijo odvzeli. Živali smo pri starosti 14 tednov stekali in žrtvovali s cervikalno dislokacijo. Vzorec krvi smo odvzeli iz vratnih ven in ga shranili v posebne reagenčne posodice, katerih stene vsebujejo heparin, ki preprečuje strjevanje krvi. S centrifugiranjem heparinskih eppendorfovih epruvet z varnostnim zapiralom (v nadaljnjem tekstu epice), na

8000 obratih za 10 minut pri temperaturi 4 °C so se krvne celice usedle na dno epic, na zgornjem delu pa nam je ostala krvna plazma, katero smo odpipetirali v novo epico ter jo shranili na -20 °C. Po tem smo pričeli z anatomskim seciranjem, kjer smo miš z bucikami pritrdili na secirno desko in jo na ventralni strani trupa razkužili s 70 % etanolom ter se s tem tudi izognili kontaminaciji vzorcev z dlakami. Sledil je rez s topimi secirnimi škarpami čez celoten trebuh živali v obliki črke Y. Na sredini trebuha (višina popka) smo s pinceto privzdignili trebušno steno oziroma mišičnino in zarežali v smeri proti glavi in analni odprtini. Naredili smo še dva reza vzdolž rebrnega loka in pritrdili trebušno steno na secirno desko. S tem je bila žival pripravljena na nadaljnjo anatomsko seciranje ter odvzem in tehtanje maščobnih depojev: abdominalno (ABD), gonadalno (epididimalno, EPI in ovarialno, OVA), femoralno (FEM), mezenterialno (MEZ) in rjavo maščobo. Natančnejši opis poteka posameznega odvzema maščobnega depoja je opisan spodaj.

Maščobni depo z leve strani telesa homozigotnih miši (FF ali LL) iz križanja F₂ smo razdelili na dva dela ter vstavili v epici, ki smo ju začasno shranili v tekočem dušiku, medtem ko smo opravljali sekcijo. Kasneje smo jih shranili na -70 °C za nadaljnjo uporabo. Dodatne koščke maščobnih depojev, ki smo jih odvzeli s škarpami in pinceto, smo vstavili v fiksativ (4 % Paraformaldehid DEPC-PBS), in jih poslali na nadaljnje histološke preiskave. Poleg tega smo pri -76 °C shranili tudi jetra miši, ki služijo za analizo metabolnih procesov in mišico, iz katere lahko kasneje izoliramo mRNA (ang. messenger RNA).

3.2.1.1 Abdominalna maščoba (ABD)

je maščoba, ki se nahaja okrog ledvice. Zaradi tega smo najprej izrezali ledvico s pripadajočo maščobo in jo šele nato na secirni deski ločili od ledvice in nadledvične žleze.

3.2.1.2 Gonadalna maščoba (GON)

je maščoba, ki se nahaja v bližini spolnih žlez. Pri samcih se gonadalna maščoba imenuje epididimalna, ker se nahaja v bližini obmodka (*epididymis*). Pri samicah se imenuje ovarialna oziroma parametrialna maščoba, saj se nahaja ob maternici in jajčnikih. Pri seciranju levi maščobni depo privzdignemo s pinceto in ga z natančnimi rezi ločimo od obmodka, testisa in semenovoda, če seciramo miš moškega spola, oziroma od roga

maternice in jajčnika v primeru samice. Paziti moramo, da pri odvzemu te maščobe ne poškodujemo moških spolnih žlez in semenovoda, saj bi s tem lahko povzročili razlitje sperme po maščobi. Vzorec v takem primeru ne bi bil več uporaben za analizo izražanja genov.

3.2.1.3 Femoralna maščoba (FEM)

je subkutana maščoba, ki se nahaja vzdolž stegenske muskulature. Maščobo smo pričeli rezati na hrbtnem (dorzalnem) delu stegna. Sledilo je izkoženje zadnje noge in nadaljnje izrezovanje maščobe do konca notranjega (ingvinalnega) dela stegna živali.

3.2.1.4 Mezenterialna maščoba (MEZ)

je pritrjena ob črevo in nakopičena v črevesnem oporku. Maščobni depo smo pridobili tako, da smo najprej izrezali celotno črevo (od dvanajsternika do analne odprtine). Nato smo s pomočjo ene pincete fiksirali prvi konec črevesa, s pomočjo druge pincete pa smo z nežnimi potegi ločili maščobo od črevesja.

3.2.1.5 Rjava maščoba (RJA)

se v večji količini nahaja v obliki dveh blazinic na hrbtni strani prsnega koša med lopaticami. Najprej smo truplo miši obrnili s hrbtnim delom navzgor. S topimi škarjami smo naredili zarezo v kožo med lopaticami ter izrezali del z rjavo maščobo. Na secirni deski smo nato od nje ločili belo maščobo, ki jo je obdajala.

3.2.2 Genotipizacija

3.2.2.1 Priprava DNA lizatov

Da smo lahko pričeli z analizo, smo morali najprej pridobiti vzorce za genotipizacijo. Ko so tri tedne stare miši odstavili, so jih za lažje identificiranje označili s ščipanjem ušes s pomočjo posebnega ščipalca. Odščipnjen delec ušesa so s pinceto dali v 0,5 ml reagenčno posodico, označeno s številko vzorca, ter jih shranili v zamrzovalnik na -20 °C.

Kasneje smo v laboratoriju to odščipnjeno ušesno tkivo lizirali po nekoliko spremenjenem postopku Lairda in sod. (1991):

1. Encim proteinazo K (koncentracija 10 mg/ml) smo dodali v pufer za lizo, in sicer 20 µl proteinaze/1 ml pufru.
2. 60 µl pufru s proteinazo K smo dodali v vsak vzorec ušesnega tkiva.
3. V vodni kopeli pri 55 °C smo vzorce inkubirali 4–5 ur in jih vsakih 30 minut nežno pretresli.
4. Posodice z vzorci smo nato centrifugirali 2 minuti pri 14 000 g.
5. Sledila je 10-minutna inkubacija pri 95 °C, s čimer smo deaktivirali proteinazo K.
6. Z 10-minutnim centrifugiranjem vzorcev pri 14 000 g so nerazgrajeni ostanki na dnu reagenčne posodice tvorili usedlino.
7. Lizate smo nato z bi-deionizirano vodo razredčili v razmerju 1:25 in sicer 6 µl lizata v 144 µl vode.
8. Razredčene vzorce smo hranili v hladilniku pri 4 °C. Nerazredčene lizate smo vrnili nazaj v zamrzovalnik na -20 °C.

Pufer za lizo (angl. *lysis buffer*), uporabljen pri pripravi lizatov, smo zamešali s sestavinami, navedenimi v Preglednica 1:

Preglednica 1: Priprava pufru za lizo

1 M Tris* pH 8,5	10 ml
0,5 M EDTA** pH 8,4	1 ml
5 M NaCl	4 ml
20 % SDS***	1 ml
Destilirana voda	Do skupnega volumna 100 ml

* Tris – trihidriksimetil-aminometan; ** EDTA - etilendiamintetraocetna kislina; *** SDS - natrijev dodecil sulfat

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

Za genotipizacijo živali smo morali najprej pridobiti pomnožene odseke DNA. Uporabili smo tehniko verižne reakcije s polimerazo, ki omogoča pomnoževanje želenega specifičnega zaporedja DNA *in vitro*.

- Cikel standardne PCR reakcije je potekal v treh stopnjah:
 - denaturacija DNA – za kratek čas segrejemo na 92 °C ali več. S tem dosežemo, da se komplementarni verigi ločita;

- prileganje začetnih oligonukleotidov na matrico – temperaturo moramo znižati na 37 °–55 °C oziroma pod temperaturo tališča vezave obeh začetnih nukleotidov;
 - podaljševanje verige DNA – sinteza komplementarne verige pri optimalni temperaturi delovanja encima DNA polimeraze (68 °C–72 °C).
- Za vsako PCR reakcijo pripravimo mešanico reagentov:
 - pufer in MgCl₂ - zagotavljata optimalne pogoje za delovanje encima,
 - deoksiribonukleozid-trifosfat (dATP, dCTP, dGTP in dTTP) - gradniki fragmentov DNA, ki se sintetizirajo,
 - par začetnih oligonukleotidov (angl. *primer*) - komplementarna enemu odseku genoma, ki ga želimo pomnožiti ter
 - encim *Taq* DNA-polimeraza - sintetizira del verige DNA med obema oligonukleotidoma.

Reakcija PCR je potekala v končnem volumnu 10 µl z naslednjo končno koncentracijo reagentov (Preglednica 2):

Preglednica 2: Končna koncentracija reagentov v verižni reakciji s polimerazo

Reagentov	Količina reagenta / vzorec (µl)
Bi-deionizirana voda (Sigma)	1,42
1 x <i>Taq</i> pufer (Fermentas)	1,00
200 µM dNTP (mešanica dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1,00
2,5 mM MgCl ₂ (Fermentas)	1,00
0,25 uM 5' začetni oligonukletid (Jana Bioscience)	0,25
0,25 uM 3' začetni oligonukletid (Jana Bioscience)	0,25
0,4 U Ampli <i>Taq</i> polimeraza (Fermentas)	0,08
PCR mešanica skupaj:	5,00 µl
DNA (1:25 lizat)	5,00 µl

- Priprava mešanice za verižno reakcijo s polimerazo

Na sobni temperaturi smo odtajali vse potrebne reagente razen encima DNA polimeraze. Označili smo si prazno reagenčno posodico, jo položili na hladilno ploščo, ohlajeno na -20 °C ter vanjo odpipetirali vse sestavine PCR mešanice. Iz zamrzovalnika smo nazadnje, tik pred uporabo, vzeli še DNA polimerazo, odpipetirali potrebno količino in jo takoj vrnili na

-20 °C. Označeno mikrotitrsko ploščico smo položili na novo hladilno ploščo in v dve prazni vdolbinici nanесли mešanico PCR-ja. Z večkanalno pipeto smo nato odpipetirali mešanico v ostale vdolbinice na ploščici. Iz hladilnika smo vzeli še vzorce (razredčene lizate 1:25). Te smo z večkanalno pipeto nanесли na ploščico, pri tem pa za vsak vzorec uporabili svoj pipetni nastavek. Preden smo mikrotitrsko ploščico pokrili s prozorno folijo, smo v vsako vdolbinico odpipetirali še po eno kapljico mineralnega olja. Pripravljene vzorce smo na hladilni plošči odnesli do PCR aparata, to je mikroprocesorsko vodenega termostata PTC-100 (MJ Research).

Program, ki smo ga uporabili, je podrobneje opisan v Preglednica 3.

Preglednica 3: Potek programa za verižno reakcijo s polimerazo

DB-TAQ	
1. korak:	95 °C, 3 minute
2. korak	95 °C, 1 minuta
3. korak	62 °C, 1 minuta
4. korak	72 °C, 1 minuta
5. korak	5-krat nazaj na 2. korak
6. korak	94 °C, 15 sekund
7. korak	58 °C, 30 sekund
8. korak	72 °C, 30 sekund
9. korak	30-krat nazaj na 6. korak
10. korak	4 °C

Po končani reakciji smo mikrotitrsko ploščico s produkti PCR shranili v hladilnik pri 4 °C, preden smo produkte PCR-ja preverili na agaroznem gelu.

3.2.2.3 Mikrosatelitski genetski označevalci (angl. *genetic markers*)

To so ponavljajoča se zaporedja DNA, ki po navadi temeljijo na manj kot 100 ponovitvah (Schloetterer, 2004) od enega do šest baznih parov dolgih osnovnih enot in so naključno ter razmeroma pogosto razporejeni po genomih prokariontov in evkariontov. Mikrosatelitski molekularski označevalci so zelo polimorfni, prisotni pa so v kodirajočih in nekodirajočih regijah genoma. Preglednica 4 prikazuje, katere polimorfne mikrosatelitske genetske označevalce na kromosomu 15 smo v naši raziskavi uporabljali.

Preglednica 4: Opis uporabljenih mikrosatelitskih genetskih označevalcev

Ime markerja	Sekvenca ¹ L ^{**} R ^{***}	Lokacija na kromosomu 15 (Mbp) ¹
<i>D15Mit87</i>	CTCAAATCCTCAACTTTTATTTAAAAA CACACGCAGGCAAAACAC	43,00 Mbp*
<i>D15Mit5</i>	CTTCCTAATTCCTGTCAAGCAAAT GTTTCATTGGTCAATGGAAACTTA	43,28 Mbp
<i>D15Mit113</i>	TATATGGAAAATAAAGGGGAAAACA CAGGGTGGATCTGGTGATCT	50,23 Mbp
<i>D15Mit115</i>	CATACCCACTGGTGCATCAC AGTGAATTCCATAATTTTAAAGGACG	56,16 Mbp

* Mbp – 10⁶ baznih parov; ** L – levi primer; *** R – desni primer

(¹ Mouse genome informatics, 2010)

3.2.2.4 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je metoda za ločevanje molekul DNA ali RNA glede na njihovo velikost. To dosežemo s premikanjem negativno nabitih molekul nukleinskih kislin skozi agarozni gel v električnem polju. Krajše molekule se premikajo hitreje in posledično pripotujejo dlje od daljših. Da bi bili rezultati vidni, pa moramo fragmente obarvati s fluorescentnim barvilom, specifičnim za DNA (npr. etidijev bromid ali krajše EtBr, ki fluorescira pod ultravijolično svetlobo, ko se vgradi v DNA). Molekule DNA, obarvane z EtBr, niso vidne pod naravno svetlobo. Zato moramo vzorcu, preden ga naložimo na gel, dodati nanašalni pufer.

Ker ločujemo različno dolge fragmente DNA, uporabljamo tudi različne tipe gelov – manjše fragmente DNA (od 5 do 500 baznih parov) ločujemo na poliakrilamidnem tipu, večje fragmente (od 100 do 50.000 baznih parov) pa na agaroznem tipu gela.

Hitrost potovanja DNA skozi gel je odvisna od:

- dolžine DNA molekule – manjše molekule pripotujejo dlje, ker se lažje prebijajo skozi pore v gelu,
- oblike DNA molekule – najhitreje potuje dodatno zvita oblika plazmida, nekoliko počasneje linearna ter najpočasneje krožna oblika plazmida,
- gostote gela – ob povečani koncentraciji agaroze se hitrost potovanja DNA molekul zmanjša,

- napetosti – višja kot je, hitreje potuje DNA, vendar se s tem ločevanje fragmentov slabša, zmanjšuje se resolucija,
- barvila – EtBr nekoliko zmanjšuje gibljivost molekul DNA, s tem ko se vgrajuje vanje,
- sestave in ionske jakosti elektroforetskega pufru – skozi gel ne teče tok in se molekule ne premikajo, če v pufru ni ionov.

V raziskavi smo uporabljali elektroforetski aparat (Flowgen) z razdaljo med elektrodami 44 cm, kjer smo uporabljali gele dimenzij 25x32 cm. Pri agarozni gelski elektroforezi smo uporabljali 0,5-kraten tris boratni pufer (TBE, 0,5 M Tris, 0,5 M borova kislina, 10 mM EDTA), ki je vseboval etidijev bromid (20 µl / 1 l TBE pufru). Pripravili smo ga iz naslednjih sestavin, navedenih v Preglednica 5.

Preglednica 5: Priprava 2 litrov 0,5x TBE pufru

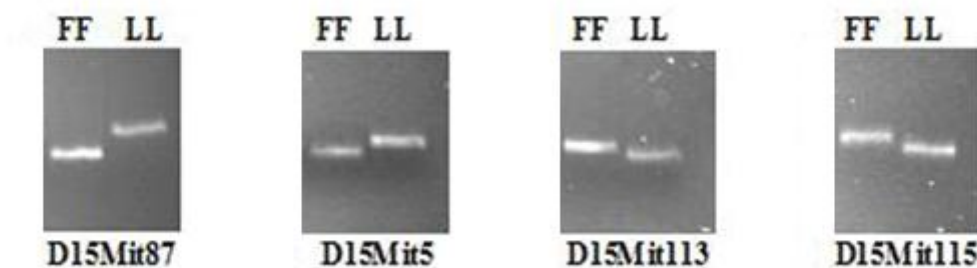
Deionizirana voda	1900 ml
10x TBE pufer	100 ml
Etidijev bromid	40 µl

Produkte reakcije PCR smo ločili na 4 % agaroznem gelu, ki smo ga pripravili v mirovalovni pečici s segrevanjem 24 g agaroze v 600 ml 0,5x TBE do vrelišča. Nato smo mešanico za kratek čas ohlajali na mešalcu in jo šele potem vlili v elektroforetski kalup. Previdno smo vstavili še glavničke in počakali, da se je gel strdil in smo jih nato lahko nežno odstranili. Pripravljen gel smo položili v elektroforetsko kadičko, kjer smo po potrebi dolili pufer, ki mora prekrivati gel. Z večkanalno pipeto smo po 12 µl vsakega vzorca, ki smo mu predhodno dodali nanašalni pufer bromofenolmodro, nanесли na gel ter nazadnje priklopili elektroforetski aparat na električni tok z napetostjo 170 V. Odvisno od posameznega mikrosatelitskega lokusa smo gele vozili različno dolgo. Ko je bila elektroforeza končana, smo gel vstavili v komoro, ga osvetlili z UV svetlobo ter fotografirali s pomočjo programa transiluminator Gel Doc 1000. Rezultate smo shranili kot *.tif datoteke.

3.3 ISKANJE NOVIH REKOMBINANTOV V KONGENI LINIJI 15FHV

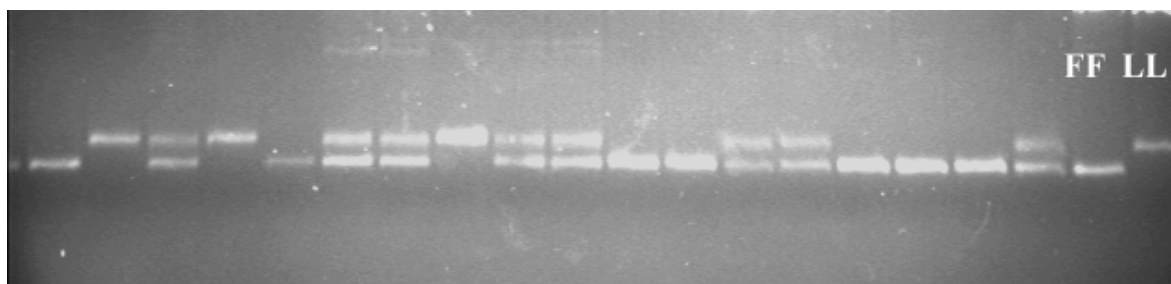
3.3.1 Prvi pregled z markerji

Vzorci in genotipizacijo smo opravili po postopkih, opisanih v poglavju 3.2. Poslikane agarozne gele z vzorci smo shranili v datoteko na računalniku ter jo kasneje pregledali v programu *Windows Photo Gallery*. Zaporedje vzorcev na gelu je bilo enako zaporedju, ki smo ga že pred samo genotipizacijo zapisali v laboratorijski dnevnik. S pomočjo le-tega smo nato lahko s slik razbrali posamezne genotipe ter jih vpisali v Excelovo datoteko. Genotipe smo lahko določili tako, da smo na konec vsakega glavnička dodali še kontroli, prva je bila vedno FF (homozigot debele linije), druga pa LL (homozigot za vitko linijo). Kontrole so bile pripravljene prav tako kot vzorci, to je v razmerju 1:25, le da smo vzorce DNA odvzeli od čistih homozigotnih debelih in vitkih linij. Na Slika 5 so prikazane kontrole genetskih označevalcev, ki smo jih uporabljali za prvo določevanje genotipov, saj določajo razlike na preučevanem odseku ter se F in L alela jasno ločita na agaroznem gelu.



Slika 5: Genetski označevalci, ki smo jih uporabljali pri prvem pregledu genotipov
FF – debela linija (FLI linija); LL – vitka linija (FHI linija)

Slika 6 prikazuje primer, kako smo določevali genotipe na agaroznem gelu z markerjem *D15Mit87*, na katerega so nanesti vzorci DNA populacije, ki segregira za *Fob3a* odsek, pridobljeni iz odščipnjenih delcev ušes miši, zadnja dva vzorca pa sta kontroli FF in LL. Razvidno je, da je prvi vzorec miši genotipa FF, drugi LL, tretji FL, sledijo še LL, FF, FL, FL, LL, FL itd.



Slika 6: Vzorci na agaroznem gelu, genotipizirani z genetskim označevalcem *D15Mit87*. S slike je razvidno, katere živali so heterozigotne (FL) ali homozigotne (FF in LL) na preučevanem odseku kromosoma. Zadnja dva vzorca pa predstavljata kontroli FF in LL.

3.3.2 Preverjanje rekombinantnih kromosomov z dodatnimi mikrosateliti

Za natančnejše kartiranje genotipa rekombinantnih živali, to je miši, katerih DNA oziroma *Fob3a* odsek na kromosomu 15 vsebuje različne kombinacije alelov enega od svojih staršev, smo morali optimizirati oziroma določiti polimorfnost novim markerjem. Odločili smo se, da bomo poiskali nove genetske označevalce okrog že znanega polimorfnega markerja *D15Mit115*. Kar pomeni, da smo morali na spletni strani Mouse Genome Informatics (MGI) poiskati genetske označevalce, ki se nahajajo med 52 Mbp in 58 Mbp. V Preglednica 6 so prikazani vsi genetski markerji, katere bi lahko uporabili pri natančnejšemu kartiranju rekombinantnih kromosomov.

Preglednica 6: Genetski označevalci za natančnejše kartiranje na kromosomu 15

Ime markerja	Sekvenca ¹ L R	Lokacija na kromosomu 15 (Mbp)
<i>D15Mit232</i>	TATTAAGTCAGGAGATGTAAGACATGC CTGAAAGCAGTTGATACCTCTCC	52,94
<i>D15Mit25</i>	CTAACAAAGTGGACAGGCATAGC ATGACAAATTAACCAACCAGGG	53,09
<i>D15Wsu126e</i>	AGAGAGAGACAGGAAGACAG GAGTTTCTCCCAAGTTCTTA	53,14
<i>D15Mit269</i>	CACTTCCATATATGCACATGGG GTTTGTTGATTGGTTGGTTGG	54,08
<i>D15Mit230</i>	CCAGGAACTAGAGATAAAGTTCTTTC GAAATCTCATTGTTTAAATGGTGTG	54,70
<i>D15Mit231</i>	TCATTTGGGGGACGTAAAAA AATTCAAGCCCCAGACCC	54,78
<i>D15Mit183</i>	ACTCCCACAATAAGTACAATTATGTT TCTCACAAACTGCCCTCTCA	55,01

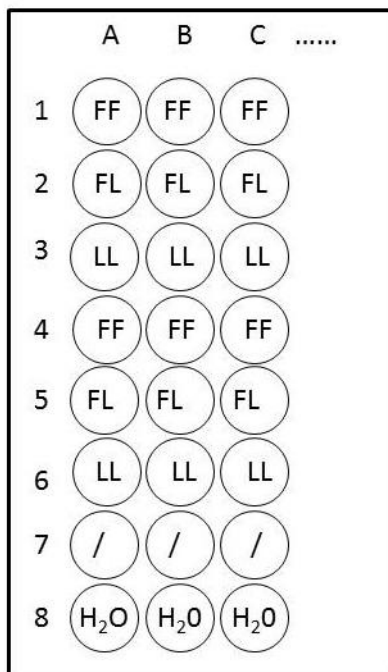
se nadaljuje

nadaljevanje

Ime markerja	Sekvenca ¹ L R	Lokacija na kromosomu 15 (Mbp)
<i>D15Mit26</i>	ACAGACTGCTACAAACTTGGAGC AAATGGCTAAACCCAGCTT	55,10
<i>D15Mit26.1</i>	TCACTTTGCCCTTTACCTCTGTA GCTCCAAGTTTGTAGCAGTCTGT	55,10
<i>D15Mit155</i>	TTCTAATTCTCTAAGATTATTGGGGC CTAAAGTGGTTCTCAGACATTAGCC	55,12
<i>D15Mit132</i>	CCATAAATCGTGTGGGCTTT ACTCATACACATGTACCTGCACG	55,63
<i>D15Mit184</i>	TGTATTCACAAGCATATACTAACACCA TGGTAAGTTTGAAGTCAACCTGG	56,07
<i>D15Mit115</i>	CATACCCACTGGTGCATCAC AGTGAATTCCATAATTTTAAAGGACG	56,16
<i>D15Mit278</i>	CAGTTTCTCAGTCGTTCCAGC AAGTTTTCCAGCCATTATTTTCC	57,00
<i>D15Dcr1</i>	TGAGAGGTTAGTTAAAAAGTATAACTAATTGTTGT TGTATTTGCATATTTAGGTTTTGTGTGT	57,52
<i>D15Mit121</i>	ACGTCATCACACACCGAAGT CCCCAGCCTCAGACATAGAT	57,99

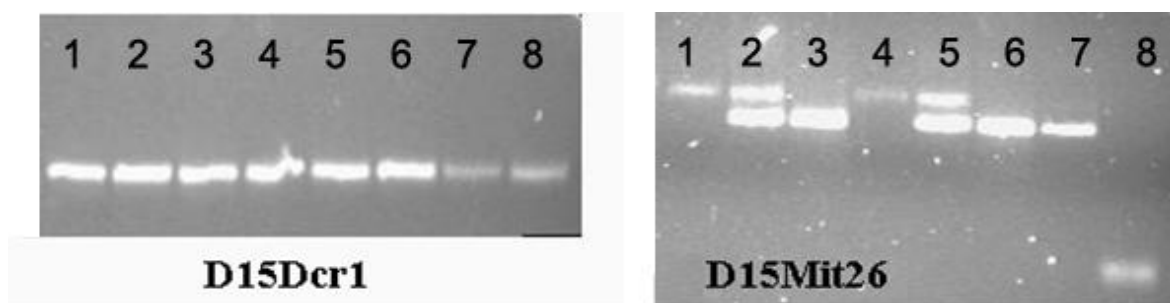
(¹ Mouse Genome Informatics, 2010)

Nove genetske označevalce smo optimizirali tako, da smo jih uporabili na enak način kot že znane in prej uporabljene markerje. Spremenili smo le to, da smo namesto vzorcev lizatov najprej uporabili že znane genotipe, to je FF, LL, vzorec FL pa je mešanica FF in LL kontrole v razmerju 1:1. Na mikrotitrsko ploščico smo za vsak testiran marker naložili kontrole v zaporedju, kot ga prikazuje Slika 7. Natanko takega smo nato tudi uporabili pri nalaganju produktov PCR-ja na agarozni gel za elektroforezo.



Slika 7: Mikrotitrna ploščica za PCR z naloženimi kontrolami za testiranje polimorfnosti novih genetskih označevalcev. S slike je razvidno, v katerem zaporedju si sledijo kontrole: FF (homozigot debele linije), FL (heterozigot debele in vitke linije), LL (homozigot vitke linije), / - nismo dodali nobene kontrole, H₂O – bi-deionizirana voda.

Sledila je še analiza slik gelov, poslikanih v transiluminatorju. Na podlagi teh smo se nato odločili, kateri genetski označevalec je bil polimorfen, alela F in L se jasno ločita na agaroznem gelu in kateri ne, kar je tudi razvidno iz Slika 8.



Slika 8: Primer nopolimorfnega (*D15Dcr1*) in polimorfnega (*D15Mit26*) genetskega označevalca, ki smo ga nadalje uporabljali za natančnejše kartiranje rekombinantnih kromosomov. Na sliki polimorfnega markerja *D15Mit26* se dobro vidi, kako se alel F in L jasno ločita.

3.4 ANALIZA KONZUMACIJE KRME PRI MIŠIH IZ KRIŽANJA F₂

Namen tega poskusa je bil preveriti, ali miši genotipa LL (homozigot za vitko linijo) pojedjo manj krme v primerjavi z mišmi genotipov FF in FL (FF – homozigot debele linije, FL – heterozigot debele in vitke linije), če so te v kletkah posamično ali pa v paru.

V poskus smo vključili kongene miši iz križanja F₂ kongene linije FHV. Merjenje konzumacije krme je bilo razdeljeno v dve obdobji po 14 dni, vmes je bil teden dni brez meritev. V prvem obdobju so bile miši v kletkah v parih istega spola in genotipa (FF, FL in LL). V vmesnem tednu, ko meritev nismo opravljali, smo miši ločili in razselili vsako v svojo kletko. V tem tednu so imele miši tako tudi čas, da so se privadile na ločeno bivanje. Sledilo je še štirinajstdnevno merjenje porabe krme, kjer so bile miši v kletkah posamično.

Miši so bile naseljene v plastične kletke, katerim je bila dodana stelja (LIGNOCEL – Hygienic Animal Bedding, PURE-O'CEL – High purity paper laboratory bedding ali REHOFIX MK 2000) in bombažne krpice (NES3600 – NESTLETS). Krmljene so bile po volji s peletirano krmo (ALTROMIN 1324), *ad libitum* pa je bila tudi voda z dodano HCl, ki preprečuje razvoj in okužbo z bakterijami.

Porabo krme smo merili tako, da smo na prvi dan merjenja odtehtali potrebno količino krme, približno 225 g, ter jo nato stresli v krmilnik na kletki. Vsak tretji dan (četrtek, ponedeljek, četrtek ...) smo tehtali in beležili količino krme, ki je ostala v krmilniku. Opisani postopek smo opravljali enako v obeh obdobjih.

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA

Del statistične obdelave smo opravili v Microsoftovem programu *Excel*, v katerem smo uporabili sledeče funkcije:

- povprečje, definirano s formulo:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots (1),$$

kjer je:

$\bar{x}$ – povprečna vrednost,

n – število živali in

x_i – vrednost i -tega vzorca.

- s^2 , varianca – je mera statistične razpršenosti določene spremenljivke in prikazuje povprečni kvadratni odklon od pričakovane vrednosti, ki ga izračunamo po formuli:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \dots (2),$$

kjer je:

s^2 – vrednost variance,

n – število živali v vzorcu,

x_i – vrednost i -tega vzorca in

$\bar{x}$ – povprečna vrednost vzorca.

- s , standardni odklon – meri povprečno odstopanje od povprečne vrednosti in ga izračunamo s formulo:

$$s = \sqrt{s^2} \quad \dots (3),$$

kjer je:

s – vrednost standardnega odklona in

s^2 – varianca vzorca.

- standardna napaka srednje vrednosti, izračunana po formuli:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad \dots (4)$$

kjer je:

$s_{\bar{x}}$ – standardna napaka srednje vrednosti,

s – standardni odklon in

n – število živali v vzorcu.

Naštete enačbe oziroma funkcije smo uporabili za izračun osnovne statistike analize fenotipskih podatkov iz križanja F_2 . Prvi pregled statistične značilnosti prej omenjene analize pa smo opravili s spodaj zapisanimi funkcijami:

- Test χ^2 uporabljamo takrat, ko želimo ugotoviti, ali se neka diskretna porazdelitev, ki smo jo namerili pri nekem poskusu, ujema s teoretično napovedjo za ta poskus. Vrednosti pa so izračunane s formulo:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \quad \dots (5),$$

kjer je:

χ^2 – vrednost porazdelitve hi-kvadrat,

O_i – opažena frekvenca v i -tem razredu,

E_i – pričakovana frekvenca v i -tem razredu, če drži ničelna hipoteza in

n – število opazovanih razredov.

Za natančnejšo analizo fenotipskih podatkov (masa maščobnih depojev, masa živali pri treh, šestih, desetih in štirinajstih tednih starosti) glede na spol in genotip pa smo testirali s spodaj zapisanima modeloma v programu R (R 2.12.2, The R project for Statistical Computing). Prvi model vključuje genotip kot sistematski kvalitativni vpliv (kakšen je učinek posameznega gena), drugi pa kot neodvisno spremenljivko (kakšen je povprečni učinek zamenjave alelov).

$$y_{ijkl} = \mu + G_i + S_j + O_k + e_{ijkl} \quad \dots (6),$$

kjer je:

y_{ijkl} – odvisna spremenljivka: masa pri treh, šestih, desetih in štirinajstih tednih starosti (g), masa abdominalne, gonadalne, femoralne, mezenterialne in rjave maščobe (g),

μ – srednja vrednost,

G_i – sistematski vpliv genotipa ($i = FF, FL, LL$),

S_j – sistematski vpliv spola ($j = \text{samec, samica}$),

O_k – sistematski vpliv obdobja ($k = \text{september, oktober, november, december}$),

e_{ijkl} – napaka.

$$y_{ijkl} = \mu + bx_i + S_j + O_k + e_{ijkl} \quad \dots (7),$$

kjer je:

y_{ijkl} – odvisna spremenljivka: masa pri treh, šestih, desetih in štirinajstih tednih starosti (g),
masa abdominalne, gonadalne, femoralne, mezenterialne in rjave maščobe (g),

μ – srednja vrednost,

b – linearni regresijski koeficient,

x_i – neodvisna spremenljivka: genotip ($i = 0, 1, 2$),

S_j – sistematski vpliv spola ($j = \text{samec, samica}$),

O_k – sistematski vpliv obdobja ($k = \text{september, oktober, november, december}$),

e_{ijkl} – napaka.

Za obdelavo podatkov iz analize krme smo uporabili spodaj zapisana modela. V tretjem modelu je genotip upoštevan kot sistematski kvalitativni vpliv, v četrtem pa kot neodvisna spremenljivka. Za analizo v parih in posamično sta bila modela enaka, le da je bila naključna spremenljivka pri drugi analizi posamezna žival ($l = 1, 2, \dots 54$).

$$y_{ijklm} = \mu + G_i + S_j + O_k + z_{ijl} + e_{ijklm} \quad \dots (8),$$

kjer je:

y_{ijklm} – konzumacija krme (g/dan),

μ – srednja vrednost,

G_i – sistematski vpliv genotipa ($i = \text{FF, FL, LL}$),

S_j – sistematski vpliv spola ($j = \text{samec, samica}$),

O_k – sistematski vpliv obdobja ($k = 1, 2, 3$),

z_{ijl} – naključna spremenljivka: kletka ($l = 1, 2 \dots 22$),

e_{ijklm} – napaka.

$$y_{ijklm} = \mu + bx_i + S_j + O_k + z_{ijl} + e_{ijklm} \quad \dots (9),$$

kjer je:

y_{ijklm} – konzumacija krme (g/dan),

μ – srednja vrednost,

b – linearni regresijski koeficient,

x_i – neodvisna spremenljivka: genotip ($i = 0, 1, 2$),

S_j – sistematski vpliv spola (j = samec, samica),

O_k – sistematski vpliv obdobja (k = 1, 2, 3),

z_{ijl} – naključna spremenljivka: kletka (l = 1, 2, ..., 22),

e_{ijklm} – napaka.

4 REZULTATI

4.1 PORAZDELITEV GENOTIPOV V F₂-KRIŽANJU KONGENE LINIJE 15FHV

Z χ^2 testom smo preverili ali se je opazovana frekvenčna porazdelitev genotipov v F₂-križanju kongene linije 15FHV razlikovala od pričakovane. Naše rezultate smo testirali proti ničelni hipotezi (H_0), ki opredeljuje, da so frekvence genotipov med homozigoti FF, heterozigoti FL in homozigoti LL v razmerju FF:FL:LL = 1:2:1. S tem bi potrdili, da 1. Mendlov zakon dedovanja drži tudi v našem testiranem primeru populacije. Poleg tega pa smo glede na vrednosti χ^2 , ki so prikazane v Preglednica 7, pridobili še potrditev, da smo vzorce pravilno genotipizirali ter da ni prišlo do kakšnih drugih napak (npr.: zamenjave vzorcev). Pogosto namreč odstopanje od razmerja genotipov 1:2:1 pomeni nezanesljiv marker ali napake pri genotipiziranju.

Ničelno hipotezo bi lahko ovrgli le v primeru, če bi bila p-vrednost manjša od 0,05. Ker pa so naše dobljene p-vrednosti (Preglednica 7) povsod visoke, ničelna hipoteza v našem primeru drži. To pomeni, da so frekvence genotipov v F₂-populaciji kongenih miši v takšnem razmerju, kot smo ga pričakovali, gledano skupno v populaciji F₂ ali znotraj spolov.

Preglednica 7: Vrednosti χ^2 in p za razmerja frekvenc genotipov pri miših linije 15FHV

	Genotip	fg*	n _o	pfg**	n _p	χ^2 vrednost	p-vrednost
SKUPAJ	FF	0,305	36	0,25	29,5	4,898	0,086
	FL	0,398	47	0,50	50		
	LL	0,297	35	0,25	29,5		
SAMCI	FF	0,345	94	0,25	13,75	2,782	0,249
	FL	0,418	23	0,50	27,5		
	LL	0,236	13	0,25	13,75		
SAMICE	FF	0,270	17	0,25	15,75	4,365	0,113
	FL	0,381	24	0,50	31,5		
	LL	0,349	22	0,25	15,75		

* frekvenca genotipa; n_o - opaženo število; n_p – pričakovano število; ** pričakovana frekvenca genotipa

4.2 ANALIZA PODATKOV V F₂-KRIŽANJU KONGENE LINIJE 15FHV

V poskusu je bilo zajetih 80 živali, od tega 29 živali genotipa FF, 24 živali genotipa FL in 27 homozigotnih živali vitke linije. 15 samic genotipa FF, 11 samic genotipa FL in 18 samic genotipa LL smo žrtvovali za fenotipsko analizo križanja F₂. Povprečna masa pri štirinajstih tednih starosti je pri samicah med genotipi zajemala razpon vrednosti med $28,14 \pm 4,86$ g in $29,32 \pm 3,45$ g. Znotraj samic je bila najmanjša zabeležena masa pri 14. tednih starosti 19,14 g, največja pa 48,4 g. Največjo povprečno maso maščobnih depojev so dosegale homozigotne samice genotipa FF v odseku *Fob3a*, najmanjšo pa homozigotne samice genotipa LL v odseku *Fob3a*, kar je vidno v Preglednica 8. Enako povprečno maso maščobnega depoja pa so imeli vsi trije genotipi pri rjavi maščobi, ki je znašala 0,07 g. Pri živalih genotipa FL pri starosti 14 tednov je bila za telesno maso izračunana najvišja standardna napaka srednje vrednosti, in sicer 1,47 g ter varianca z vrednostjo 23,66 g². Podatki za maso pri tej starosti so tako bili široko razpršeni okrog povprečne vrednosti.

Preglednica 8: Opisna statistika za maso pri F₂ samicah linije 15FHV glede na genotip

	Starost (tedni)				Maščobni depo (g)				
	3	6	10	14	GON	ABD	FEM	MEZ	RJA
Genotip FF									
n*	15	15	15	15	15	14	15	15	15
$\bar{x}$ **	12,63	22,67	28,35	29,32	0,63	0,30	0,51	0,46	0,07
s ₂ ***	9,59	8,19	20,75	11,87	0,03	0,05	0,04	0,03	0,00
s****	3,10	2,86	4,56	3,45	0,18	0,21	0,21	0,18	0,03
s $\bar{x}$ *****	0,80	0,74	1,18	0,89	0,05	0,06	0,05	0,05	0,01
Genotip FL									
n	11	11	11	11	11	11	11	11	11
$\bar{x}$	11,01	20,94	26,10	28,14	0,60	0,29	0,54	0,45	0,07
s ₂	11,27	15,23	17,68	23,66	0,05	0,03	0,04	0,04	0,00
s	3,36	3,90	4,20	4,86	0,23	0,18	0,20	0,20	0,02
s $\bar{x}$	1,01	1,18	1,27	1,47	0,07	0,05	0,06	0,06	0,01
Genotip LL									
n	18	18	18	18	18	18	18	16	18
$\bar{x}$	11,92	21,94	26,63	28,16	0,54	0,30	0,46	0,42	0,07
s ₂	8,14	15,13	15,48	18,76	0,05	0,03	0,04	0,03	0,00
s	2,85	3,89	3,93	4,33	0,22	0,19	0,19	0,19	0,02
s $\bar{x}$	0,67	0,92	0,93	1,02	0,05	0,04	0,04	0,05	0,01

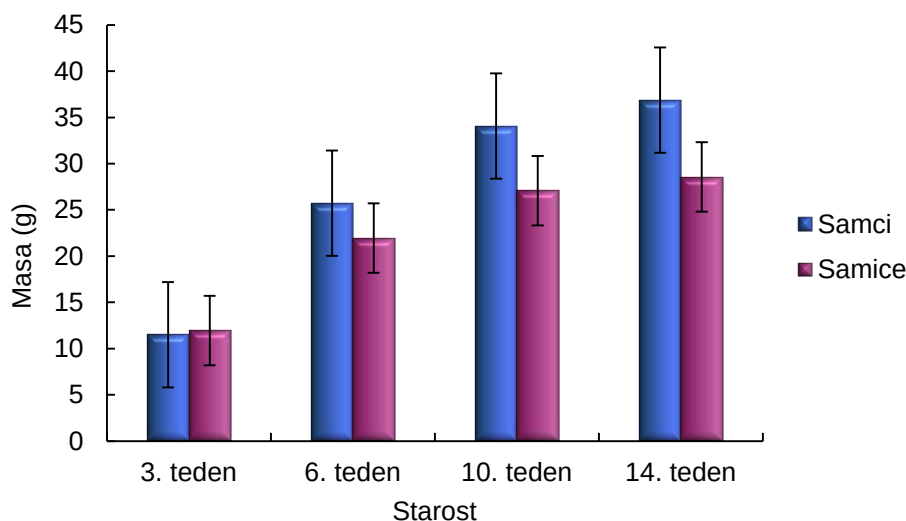
* število živali; ** povprečje (g); *** varianca (g²); **** standardni odklon (g), ***** standardna napaka srednje vrednosti (g)

V Preglednica 9 so podani rezultati za fenotipsko analizo pri samcih, ki je zajemala 36 živali, od tega 14 živali genotipa FF, 13 živali genotipa FL in 9 živali genotipa LL. Maksimalna dosežena povprečna masa pri štirinajstih tednih starosti je bila pri heterozigotnih samcih $38,82 \pm 5,37$ g. Razpon mas pri starosti štirinajstih tednov je bil pri samcih genotipa FF od 27,94 do 48,4 g, pri samcih genotipa FL je zajemal vrednosti med 29,6 in 47,11 g ter pri homozigotnih samcih vitke linije od minimuma 25,48 g pa do maksimuma 43,1 g. Izmed maščobnih depojev sta največje vrednosti zavzemali gonadalna in mezenterialna maščoba, med genotipi pa so bile največje povprečne vrednosti mase maščobnih depojev zabeležene pri živalih genotipa FL. Podatki so od srednje vrednosti mase pri starosti štirinajst tednov najbolj odstopali pri homozigotnih samcih genotipa FF, saj je bila tam izračunana najvišja varianca ($39,34 \text{ g}^2$).

Preglednica 9: Opisna statistika za maso pri F_2 samcih linije 15FHV glede na genotip

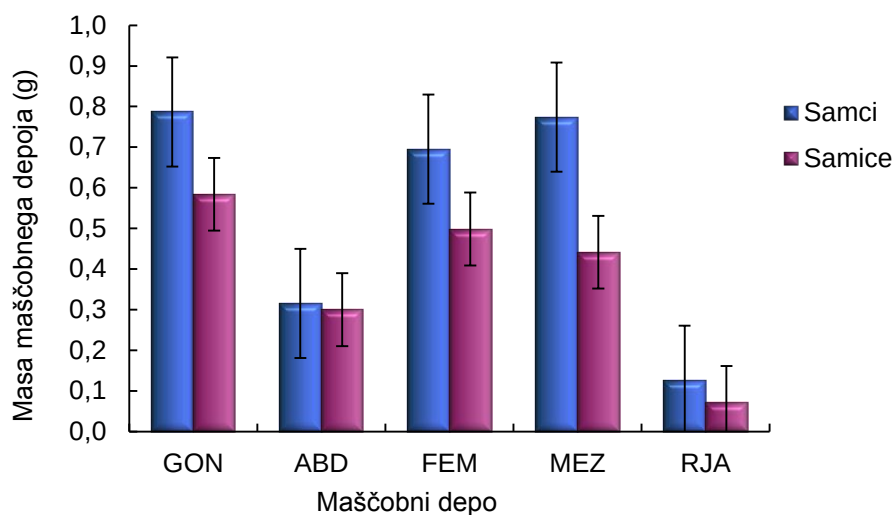
Starost (tedni)					Maščobni depo (g)				
	3	6	10	14	GON	ABD	FEM	MEZ	RJA
Genotip FF									
n*	14	14	14	14	13	14	14	14	14
$\bar{x}$ **	11,23	25,95	33,91	36,79	0,76	0,30	0,69	0,79	0,13
s^2 ***	17,15	24,03	31,54	39,34	0,07	0,01	0,04	0,08	0,00
s****	4,14	4,90	5,62	6,27	0,27	0,10	0,19	0,29	0,05
$s_{\bar{x}}$ *****	1,11	1,31	1,50	1,68	0,08	0,03	0,05	0,08	0,01
Genotip FL									
n	13	13	13	13	13	13	13	13	13
$\bar{x}$	11,84	26,77	35,85	38,82	0,87	0,37	0,76	0,87	0,13
s^2	12,95	16,11	25,17	28,81	0,06	0,01	0,04	0,07	0,00
s	3,60	4,01	5,02	5,37	0,24	0,12	0,19	0,26	0,04
$s_{\bar{x}}$	1,00	1,11	1,39	1,49	0,07	0,03	0,05	0,07	0,01
Genotip LL									
n	9	9	9	9	9	9	9	8	9
$\bar{x}$	11,44	23,81	31,79	34,16	0,70	0,26	0,62	0,59	0,11
s^2	13,53	20,11	17,03	28,93	0,05	0,01	0,03	0,05	0,00
s	3,68	4,48	4,13	5,38	0,23	0,10	0,18	0,22	0,04
$s_{\bar{x}}$	1,23	1,49	1,38	1,79	0,08	0,03	0,06	0,08	0,01

* število živali; ** povprečje (g); *** varianca (g^2); **** standardni odklon (g), ***** standardna napaka srednje vrednosti (g)



Slika 9: Povprečje telesnih mas ter standardne napake v F_2 -križanju kongene linije 15FHV glede na starost

Samci dosegajo večjo telesno maso kot samice, kar je razvidno tudi iz Slika 9. Glede na starost narašča tudi povprečna masa živali, vidno pa je tudi progresivno povečevanje razlike med maso samcev in samic. Pri 14. tednih starosti, je bilo med spoloma opaziti največje odstopanje v povprečni masi, najbolj izenačena pa sta si bila spola pri starosti treh tednov, kjer so samice bile celo za nekaj gramov težje od samcev.



Slika 10: Povprečje maščobnih depojev pri F_2 -križanju kongene linije 15FHV

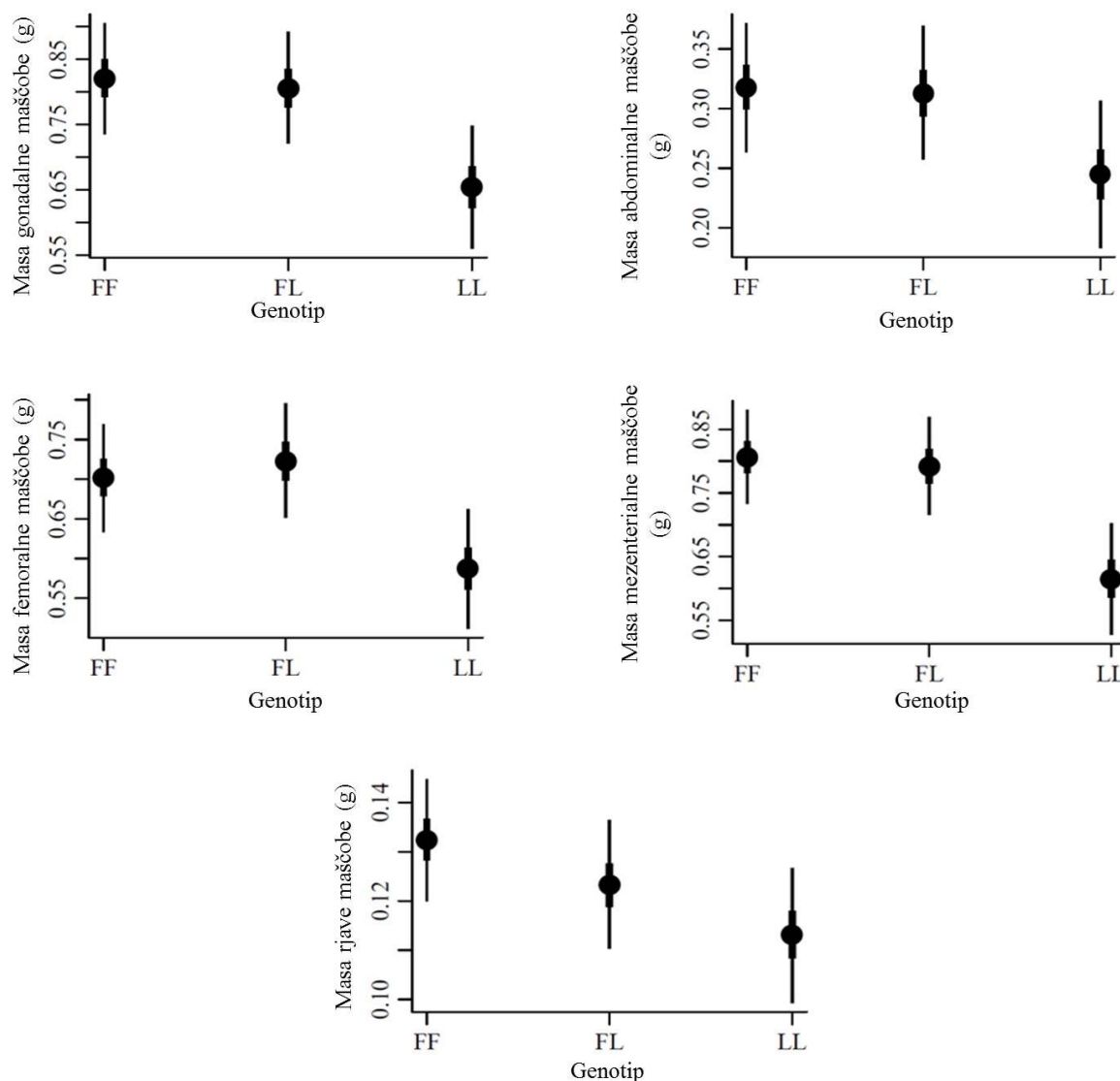
Samci tudi pri maščobnih depojih dosegajo večjo maso kot samice. Najopaznejša razlika med spoloma, ki jo lahko vidimo tudi na Slika 10, je v masi mezenterialne maščobe, maščobe naložene okrog črevesja. Le-ta je pri samcih skoraj za enkrat večja od mase pri samicah. Razlike so opazne tudi pri gonadalni, femoralni in rjavi maščobi. Spola pa sta si najbolj izenačena v masi abdominalne maščobe, to je maščobe, ki se nahaja okrog ledvic.

V programu R smo testirali statistična modela (enačba 6 in 7) za fenotipske podatke F_2 -križanja kongene linije 15FHV. S prvim statističnim modelom smo pridobili rezultate o tem, kakšna so povprečja genotipov oziroma kolikšen je vpliv alelov, z drugim pa kakšen je povprečni učinek zamenjave alela (Preglednica 10). V Preglednica 10 lahko vidimo, da so živali genotipa FF na odseku *Fob3a* imele skoraj povsod največje povprečne vrednosti, razen pri femoralni maščobi, živali genotipa LL na odseku *Fob3a* pa najmanjše. Regresijski koeficient je pri vseh lastnostih (gonadalni, abdominalni, femoralni in mezenterialni maščobni depo ter rjava maščoba) negativen, kar pove, da zamenjava enega alela F poveča maso maščobnega depoja. Glede na rezultate pa lahko vidimo, da je alel F hkrati tudi dominanten nad alelom L. Rezultati kažejo signifikantne razlike ($Pr > 0,95$) med genotipoma FF in LL na odseku *Fob3a*, nakazuje pa se tudi statistično značilna razlika pri rjavi maščobi med genotipoma FF in FL na odseku *Fob3a*.

Preglednica 10: Rezultati analize (povprečja s standardnimi odkloni ter verjetnostmi) fenotipskih podatkov za odstotek telesnih maščob pri F_2 kongeni liniji 15FHV glede na genotip

Genotip	Lastnost				
	GON (g)	ABD (g)	FEM (g)	MEZ (g)	RJA (g)
FF	0,82 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,81 ± 0,04	0,13 ± 0,01
FL	0,80 ± 0,04	0,31 ± 0,03	0,72 ± 0,04	0,80 ± 0,04	0,12 ± 0,01
LL	0,65 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,59 ± 0,04	0,61 ± 0,04	0,11 ± 0,01
b	-0,04 ± 0,02	-0,08 ± 0,03	-0,06 ± 0,02	-0,09 ± 0,02	-0,01 ± 0,004
Pr(FF > FL)*	0,61	0,56	0,32	0,62	0,88
Pr(FF > LL)**	1,00	0,98	0,99	1,00	0,99

* Pr(FF > FL) – da je homozigot FF kongene linije 15FHV iz križanja F_2 je bolj zamaščen od heterozigota FL iz iste populacije; ** Pr (FF > LL) - da je homozigot FF kongene linije 15FHV iz križanja F_2 bolj zamaščen od homozigota LL iz iste linije



Slika 11: Povprečne vrednosti maščobnih depojev s standardno napako (g) pri F₂-križanju kongene linije 15FHV

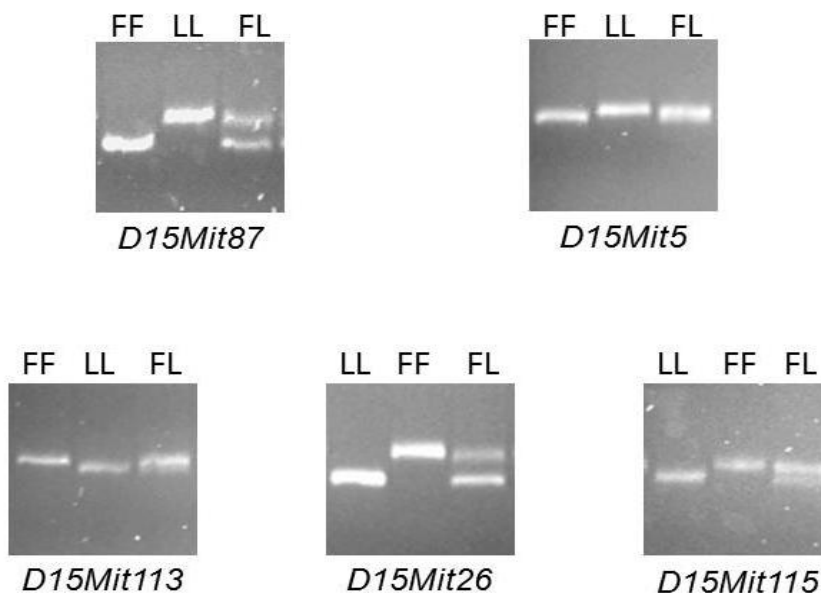
Živali genotipa FF na odseku *Fob3a* dosegajo večjo telesno maso in imajo nasploh večje mase posameznih maščobnih depojev kot miši genotipa LL, kar lahko vidimo na Slika 11. Najvišji masi sta bili zabeleženi pri gonadalnem (0,82 g) in mezenterialnem (0,81 g) maščobnem depoju, ki sta obsegali vrednosti od 0,55 do nekje 0,90 g. Nekoliko manjše povprečne vrednosti so imele miši pri femoralni maščobi z vrednostmi, ki so se gibale od 0,50 do 0,80 g. Pri abdominalni (0,20 do 0,35 g) in rjavi maščobi (0,10 do 0,14 g) pa smo izmerili najmanjše vrednosti. Na Slika 11 se lepo vidi aditivni genetski učinek – za vsak zamenjan F alel z alelom L se zmanjša masa maščobnega depoja. Slednje je najlepše

razvidno pri masi rjave maščobe. Za vsak zamenjan alel F se masa maščobnega depoja zmanjša za 0,01 g. Pri gonadalni, mezenterialni, femoralni in abdominalni maščobi je poleg negativnega trenda vidna tudi dominantnost alela F nad alelom L, saj so pri vseh štirih primerih vrednosti FL živali enake ali celo nekoliko večje od povprečij genotipa FF.

4.3 REZULTATI ISKANJA NOVIH REKOMBINANTOV V F₂-KRIŽANJU KONGENE LINIJE 15FHV

Vzorcem smo s pomočjo agarozne gelske elektroforeze določili genotipe glede na kontrole, ki so bile dodane na gel na koncu vsake vrstice. Kontrole smo na gel nanašali vedno v enakem zaporedju: FF (FLI linija), LL (FHI linija) in FL (heterozigot). Slednja je bila pripravljena iz čiste DNA debele in vitke linije v razmerju 1:1. Kontrole genetskih označevalcev, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, so prikazane na Slika 12.

Od vseh novo testiranih genetskih označevalcev je bil polimorfen samo *D15Mit26*. Le-tega smo nato poleg standardnih genetskih označevalcih (*D15Mit87*, *D15Mit5*, *D15Mit113* in *D15Mit115*) potrebovali pri natančnejšem identificiranju genotipa rekombinantov v F₂-križanju kongene linije 15FHV.

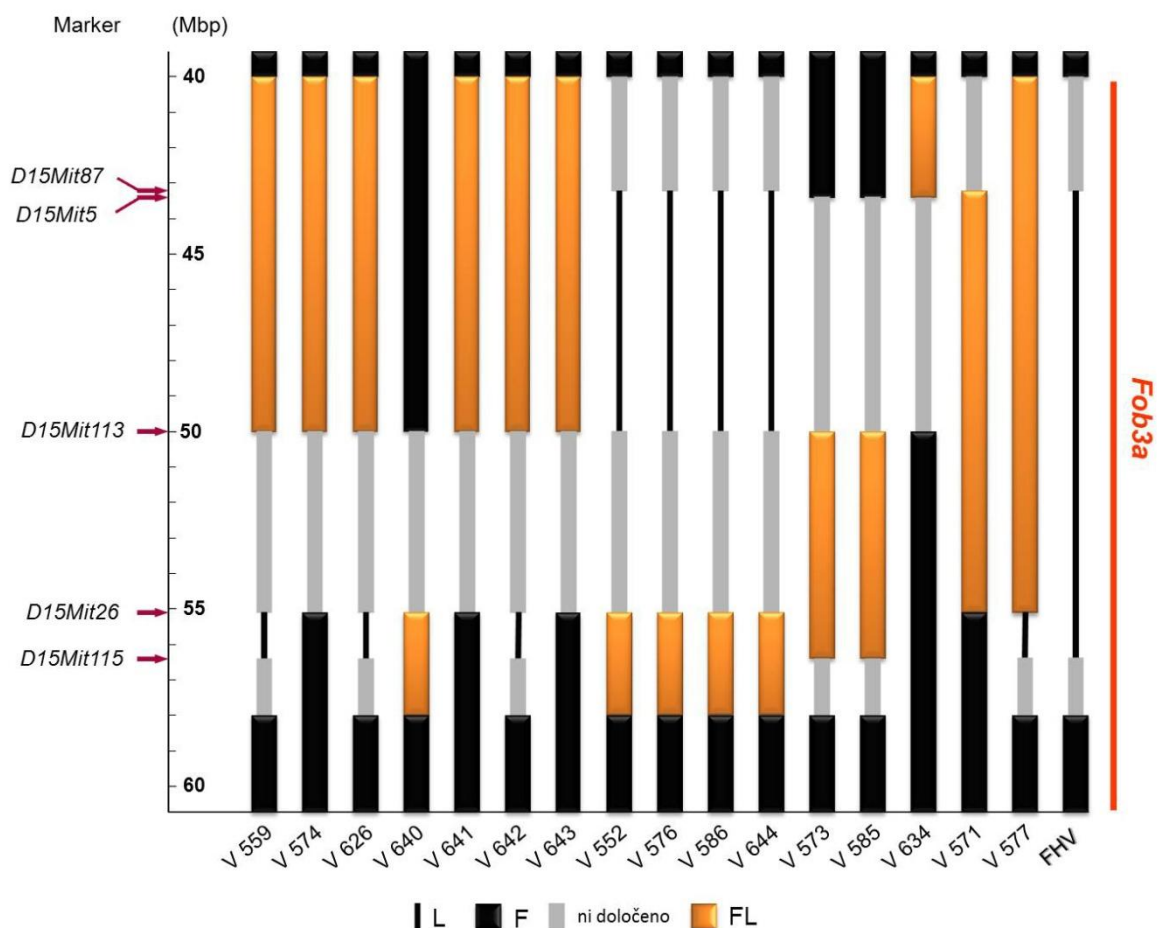


Slika 12: Mikrosatelitski genetski označevalci, uporabljeni pri iskanju novih rekombinantov v F₂-križanju kongene linije 15FHV

FF = debela linija (linija FLI), LL = vitka linija (linija FHI), FL = heterozigot.

Uspeli smo odkriti 16 novih rekombinantov, sedem samic in devet samcev. Kromosomska sestava osnovne linije FHV in genetska sestava odseka *Fob3a* pri omenjenih rekombinantih je prikazana na Slika 13.

Genetsko ozadje prejemne linije F je prikazano s črnim stolpcem, medtem ko tanka črna črta predstavlja donorski segment linije L. Dele na kromosomu, kjer genetski označevalci niso bili polimorfni, smo označili s svetlo sivim stolpcem, saj nismo mogli določiti, ali genomski odsek pripada liniji F ali liniji L.



Slika 13: Genetska sestava odseka *Fob3a* novih rekombinantov, ki izvirajo iz kongene linije 15FHV

4.4 REZULTATI KONZUMACIJE KRME V F₂-KRIŽANJU KONGENE LINIJE 15FHV

4.4.1 Osnovna statistika

V poskusu pri merjenju konzumacije krme, ko so bile miši v kletkah po parih, je bilo vključenih 44 živali. Ker smo meritve opravljali po mišjih parih so podatki v paru ponovljeni, zato so v preglednicah rezultati podani samo za eno žival v kletki. Ker smo imeli po en par samcev na genotip, opisne statistike pri teh nismo mogli opraviti prav zaradi prej navedenega razloga, saj sta živali v paru imeli enaki meritvi.

Analiza konzumacije krme je zajemala 5 samic genotipa FF, 7 samic genotipa FL, genotip LL pa so imele 4 samice (Preglednica 11). Povprečna konzumacija krme na dan se je gibala od $3,94 \pm 0,32$ g/dan (samice genotipa FL) do $4,31 \pm 0,48$ g/dan (samice genotipa FF). Minimalna poraba krme v obdobju testa je bila 47,93 g, maksimalna pa 69,80 g. Podatki za konzumacijo krme so od srednje vrednosti najbolj odstopali pri homozigotnih samicah genotipa FF na odseku *Fob3a* z izračunano varianco $0,23 \text{ g}^2/\text{dan}^2$.

Preglednica 11: Opisna statistika za porabo in konzumacijo krme pri F₂ samicah križanja kongenih miši linije 15FHV merjene v parih glede na genotip

Genotip	Poraba krme (g)	Konzumacija krme (g/dan)
FF		
n	5	5
$\bar{x}$	60,36	4,31
s^2	44,96	0,23
s	6,70	0,48
$s_{\bar{x}}$	3,00	0,21
FL		
n	7	7
$\bar{x}$	55,18	3,94
s^2	19,71	0,10
s	4,44	0,32
$s_{\bar{x}}$	1,68	0,12
LL		
n	4	4
$\bar{x}$	58,84	4,20
s^2	23,02	0,12
s	4,80	0,34
$s_{\bar{x}}$	2,40	0,17

* število živali; ** povprečje (g, g/dan); *** varianca (g², g²/dan²), **** standardni odklon (g, g/dan), ***** standardna napaka srednje vrednosti (g/dan)

Pri merjenju konzumacije krme z mišmi v kletkah posamično je bilo vključenih 54 živali, od tega 32 samic in 22 samcev. Povprečna vrednost pri samicah je znašala $5,42 \pm 0,91$ g/dan, pri samcih pa je bila ta vrednost višja, in sicer $6,03 \pm 1,08$ g/dan. Prav tako so bili podatki pri samcih (varianca = $1,16 \text{ g}^2/\text{dan}^2$) bolj razpršeni okrog srednje vrednosti kot pri samicah (varianca = $0,83 \text{ g}^2/\text{dan}^2$).

8 samic genotipa LL, 14 samic genotipa FL in 10 samic genotipa FF je bilo vključenih v analizo konzumacije krme, kar prikazuje tudi Preglednica 12. Največja povprečna poraba krme je bila pri miših genotipa FF, $79,23 \pm 13,12$ g, najmanjša konzumacija krme pa pri homozigotnih samicah vitke linije, in sicer $5,21 \pm 0,95$ g/dan. Podatki so od povprečja konzumacije krme najbolj odstopali pri samicah genotipa LL z varianco $0,90 \text{ g}^2/\text{dan}^2$. Ta je najverjetneje tako velika zaradi raztrosa krme, ki je nastal med prvim in drugim merjenjem, ko je bil krmilnik v kletki do vrha napolnjen s krmo. Prav tako je bila pri teh živalih izračunana najvišja standardna napaka srednje vrednosti za konzumacijo krme, ki je znašala 0,33 g/dan.

Preglednica 12: Osnovna statistika za porabo in konzumacijo krme pri F₂ samicah križanja kongenih miši linije 15FHV merjene posamično glede na genotip

Genotip	Poraba krme (g)	Konzumacija krme (g/dan)
FF		
n	10	10
$\bar{x}$	79,23	5,66
s^2	172,04	0,88
s	13,12	0,94
$s_{\bar{x}}$	4,15	0,30
FL		
n	14	14
$\bar{x}$	75,04	5,36
s^2	161,79	0,83
s	12,72	0,91
$s_{\bar{x}}$	3,40	0,24
LL		
n	8	8
$\bar{x}$	72,97	5,21
s^2	175,52	0,90
s	13,25	0,95
$s_{\bar{x}}$	4,68	0,33

* število živali; ** povprečje (g, g/dan); *** varianca (g², g²/dan²), **** standardni odklon (g, g/dan), ***** standardna napaka srednje vrednosti (g/dan)

V analizi konzumacije krme je bilo zajetih 8 živali genotipa FF in FL ter 6 živali genotipa LL. V obdobju štirinajstih dni so največ krme porabili samci genotipa FF in samci genotipa FL, katerih pripadajoče povprečne vrednosti so zapisane v Preglednica 13. Glede na te vrednosti sta si bili tudi dnevni konzumaciji krme pri samcih genotipa FF in FL dokaj podobni. Najmanj krme, $5,45 \pm 1,05$ g/dan, so tako konzumirali homozigotni samci genotipa LL. Zabeleženi podatki so pri teh samcih pokazali največje odstopanje od povprečne vrednosti za konzumacijo krme, ki je nastalo zaradi raztrosa krme med prvima dvema meritvama.

Preglednica 13: Osnovna statistika za porabo in konzumacijo krme pri F₂ samcih križanja kongenih miši linije 15FHV merjene posamično glede na genotip

Genotip	Poraba krme (g)	Konzumacija krme (g/dan)
FF		
n	8	8
$\bar{x}$	87,66	6,26
s^2	305,40	1,56
s	17,48	1,25
$s_{\bar{x}}$	6,18	0,44
FL		
n	8	8
$\bar{x}$	87,46	6,25
s^2	143,03	0,73
s	11,96	0,85
$s_{\bar{x}}$	4,23	0,30
LL		
n	6	6
$\bar{x}$	76,30	5,45
s^2	216,85	1,11
s	14,73	1,05
$s_{\bar{x}}$	6,01	0,43

* število živali; ** povprečje (g, g/dan); *** varianca (g², g²/dan²), **** standardni odklon (g, g/dan), ***** standardna napaka srednje vrednosti (g/dan)

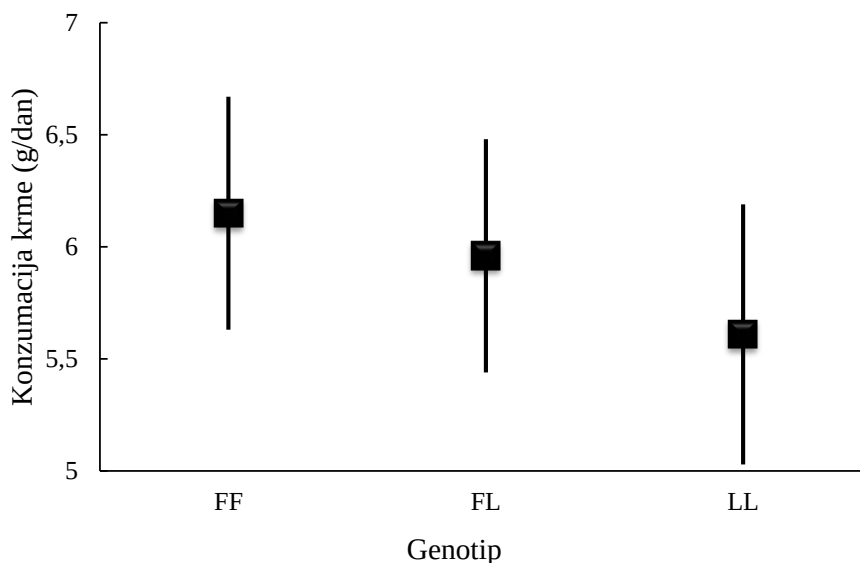
4.4.2 Razlike med genotipi in spoloma

Iz Preglednica 14 lahko vidimo, da je povprečje parov pri živalih genotipa FF (5,11 g) večje od genotipa FL (4,77 g) in genotipa LL (4,98 g). Tudi regresijski koeficient je negativen (-0,08), kar pove, da konzumacija krme pada glede na število alelov L. Na podlagi teh rezultatov bi lahko sklepali, da se nakazuje aditivni vpliv. Ker pa je standardni odklon regresijskega koeficienta večji kot sama ocena, gre pri genotipu FL bolj za naključno odstopanje. To domnevo je še dodatno potrdila statistično neznačilna verjetnost (0,74), da je aditivni učinek negativen. V drugem delu poskusa pa je padanje konzumacije krme glede na število alelov L bolj vidno. Prav tako je tudi verjetnost, da je aditivni vpliv negativen, statistično značilna (0,95). Tudi v tem primeru aditivni genetski učinek ni velik, oziroma nima velikega vpliva. Kaže se pa večje odstopanje med genotipoma FF in LL ($P > 0,95$), kar nakazuje na statistično značilno razliko med obema homozigotoma.

Preglednica 14: Rezultati analize (povprečja s standardnimi odkloni ter verjetnostmi) fenotipskih podatkov za konzumacijo krme pri F₂-križanju kongene liniji 15FHV glede na genotip

Genotip	Lastnost	
	Konzumacija krme – par (g/dan)	Konzumacija krme – posameznik (g/dan)
FF	5,11 ± 0,22	6,15 ± 0,26
FL	4,77 ± 0,16	5,96 ± 0,26
LL	4,98 ± 0,22	5,61 ± 0,29
b	-0,08 ± 0,11	-0,27 ± 0,17
Pr(FF > FL)*	0,96	0,73
Pr(FF > LL)**	0,73	0,95
Pr (b < 0)***	0,74	0,95

* Pr(FF > FL) – verjetnost, da je homozigot FF kongene linije 15FHV iz križanja F₂ konzumira več krme od heterozigota FL iz iste linije; ** Pr (FF > LL) – verjetnost, da je homozigot FF kongene linije 15FHV iz križanja F₂ konzumira več krme od homozigota LL iz iste linije; *** Pr(b < 0) – verjetnost, da je povprečni učinek zamenjave alelov negativen



Slika 14: Povprečna konzumacija krme glede na genotip pri miših linije 15FHV, ko so bile v kletkah posamično

Na Slika 14 so prikazani rezultati analize konzumacije krme s statističnima modeloma. Vrednosti se nahajajo nekje med 5 do 6,7 g/dan, pri čemer ima genotip FF zajema največje vrednosti, genotip LL pa najmanjše. Na sliki lahko vidimo trend padanja konzumacije krme z zamenjavo enega alela F za alel L. Slednje nakazuje aditivni genetski učinek, ki je statistično značilen v primeru merjenja porabe krme, ko so miši v kletkah posamično. Odstopanje je opaznejše le med genotipoma FF (6,15 ± 0,26 g) in LL (5,61 ± 0,29) na

odseku *Fob3a* ter kaže na to, da aditivni vpliv ni tako velik. Le-ta se v prvem delu poskusa sploh ni izkazal za statistično značilnega, saj je bila napaka večja od ocene regresijskega koeficienta (Preglednica 14).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen našega diplomskega dela je bil odkriti nove rekombinantne živali za kvantitativni lokus *Fob3a* na 15. kromosomu, ki vpliva na zamaščevanje pri miših. *Fob1*, *Fob2*, *Fob3* in *Fob4* so štirje QTL-i za debelost, ki so bili identificirani z metodami grobega kartiranja v raziskavah mišjega genoma. *Fob3*, ki se nahaja na 15. kromosomu, je pojasnil 14,4 % fenotipske variance za odstotek maščevja. Stylianou in sod. (2004) so to regijo podrobneje kartirali ter jo razdelili na dva manjša segmenta, *Fob3a* in *Fob3b*. Oba sta bila odkrita na mišji populaciji F_2 , katere izhodiščni starševski liniji sta bili liniji F in L. Poligena modela debelih in vitkih miši za to lastnost se medsebojno močno razlikujeta zaradi dolgoročne divergentne selekcije za nalaganje maščevja (Horvat in sod., 2000). Tudi populacija F_2 kongene mišje linije 15FHV, na kateri je potekala naša raziskava, izhaja iz omenjenih selekcioniranih linij, pri čemer je vitka linija služila kot donor linija na področju okrog lokusa na 15. kromosomu *Fob3*, linija F pa kot prejemna linija. Kongena linija, pri kateri so dokazali, da se nahaja QTL *Fob3a* (Prevoršek, 2010), ima genetsko ozadje prejemne linije F, le odsek od markerja *D15Mit85* (40,14 Mbp) do *D15Mit46* (60,65 Mbp) predstavlja donorski segment linije L. Takšno sestavo so pridobili z medsebojnim križanjem (brat-sestra) heterozigotov debele in vitke linije na tem odseku. Tako so pridobili F_2 generacijo, ki je bila na preučevanem lokusu genetsko bolj izenačena ter hkrati tudi ciljna skupina za nadaljnje raziskave (Prevoršek, 2005) in ugotavljanje vpliva donorskega segmenta L na odseku *Fob3a* za nalaganje maščevja pri kongeni mišji liniji 15FHV.

Fenotipske podatke kongenih živali na preučevanem odseku primerjamo s fenotipskimi podatki starševskih linij. Če obstajajo statistično značilne razlike v opazovani lastnosti med obema linijama, pomeni, da se na tem odseku nahaja en ali več kvantitativnih lokusov (Estrada-Smith in sod., 2004). Če teh razlik ni, lahko sklepamo, da pri tej kongeni liniji na donorskem segmentu ni kvantitativnega lokusa za preučevano lastnost. Obstajata dve slabe strani te metode. Prva je, da lahko v kongeni liniji izgubimo učinek posameznega QTL-a v primeru, če na lastnost deluje več kvantitativnih lokusov, ki se nahajajo na različnih mestih v genomu (Hill, 1998). Druga slabost je v tem, da je pridobivanje kongenih linij na

klasičen način dolgotrajen postopek za katerega potrebujemo tri do štiri leta (Prevoršek, 2005).

Da so postale multigene bolezni dostopne za genetsko in molekularno analizo, so razvili novo genetsko orodje, rekombinantne kongene linije (RKL) pri miših. Te so nastale z inbridinom miši druge generacije povratnega križanja med dvema inbridiranimi linijama. Serija rekombinantnih kongenih linij vsebuje v povprečju 20 linij, od katerih vsaka miš nosi različne nize genov: približno 12,5 % genov iz donor linije in 87,5 % iz prejemne linije. Ker je vsak donorski set genov v posamezni RKL-i različen, se nepovezani geni donor linije, ki so vpleteni pri regulaciji kvantitativne lastnosti, porazdelijo med različne linije, kjer jih nato lahko enega za drugim analiziramo. Tak sistem rekombinantnih kongenih linij spremeni multigeno lastnost, kjer vsak gen, ki prispeva k izražanju lastnosti, lahko preučujemo ločeno. Zaradi tega je vsaka posamezna RKL uporabna pri raziskavah mehanizmov specifičnega gena, ki vpliva na fenotipsko izražanje. RKL-e so uporabne pri humani genetiki zaradi kartiranja genov, ki vplivajo na preučevano lastnost in so homologni regijam na mišjih kromosomih. Če obstajajo razlike med prejemno linijo in rekombinantno kongeno linijo v tej lastnosti, lahko rekombinante na tej regiji relativno hitro testiramo za relevanten gen (Groot in sod., 1992).

Pri naši raziskavi smo genotipiziranje opravili z mikrosatelitskimi genetskimi označevalci. Z njimi smo preverjali, kakšnega genotipa so živali v populaciji F_2 kongene linije (homozigoti FF in LL ali heterozigoti FL) ter na podlagi slik, dobljenih z agarozno gelsko elektroforezo, ugotavljali prisotnost rekombinantov v populaciji. Pri tem pa smo uporabljali le tiste genetske označevalce, katerih aleli sta se na agaroznem gelu dovolj jasno ločili med seboj. Poleg štirih osnovnih genetskih označevalcev smo uporabili še enega, katerega smo izmed vseh ostalih na polimorfizem testiranih označevalcev uspeli ločiti z gelsko elektroforezo. V celotni populaciji smo tako uspeli identificirati 17 rekombinantnih živali (Slika 18). Glede na njihovo kromosomsko sestavo so imeli nekateri osebki krajši ali daljši donorski odsek linije L kot drugi ter bili s tem zanimivi za nadaljnje raziskave. Tako smo z ozirom na to, kje se je donorski segment nahajal znotraj intervala *Fob3a*, živali parili med seboj (rekombinant x rekombinant) ali pa z eno od starševskih linij (v našem primeru linijo F). Z namenom fiksacije zmanjšanih odsekov donor linije

bomo opravljali tudi nadaljnja križanja na rekombinantih, kjer bodo na potomcih sledile raziskave o prisotnosti kandidatnih genov na področju QTL-a *Fob3a*, ki vpliva na zamaščenost. S to namero bomo opravili še fino kartiranje, kjer bodo zbrani fenotipski podatki rekombinantnih kongenih linij, primerjani s fenotipom prejemne debele linije, poleg tega pa bomo uporabili tudi večje število genetskih označevalcev za natančnejše kartiranje genetskega lokusa.

Tekom diplomske naloge smo pridobljene genotipe testirali z χ^2 -testom, s katerim smo preverili njihove frekvence. Želeli smo preveriti ali je frekvenčna porazdelitev genotipov v F_2 -križanju kongene linije 15FHV enaka razmerju, ki je v skladu s 1. Mendlovim zakonom, FF:FL:LL = 1:2:1 (Tabela 7). Rezultati testa niso bili v nobenem primeru statistično značilni in smo tako dokazali, da v naši testirani populaciji drži 1. Mendlov zakon dedovanja. Prav tako smo dobili potrditve, da ni prišlo do napak med genotipiziranjem ali med postopki jemanja vzorcev. Med zbiranjem fenotipskih podatkov je bilo iz populacije F_2 -križanja kongene linije 15FHV izločenih 38 živali zaradi bolezni (npr.: povečane ledvice). Med temi je bilo največ heterozigotnih živali na odseku *Fob3a*. Izločene živali tako niso bile zajete v analizo fenotipskih podatkov in se zato število živali z opravljenimi meritvami nekoliko razlikuje od vseh genotipiziranih živali v populaciji.

Sledila je analiza fenotipskih podatkov živali, pri čemer smo pri treh, šestih, desetih in štirinajstih tednih starosti merili telesno maso miši. Pri štirinajstih tednih pa smo nato živali žrtvovali in s postopki seciranja odstranili pet večjih maščobnih depojev (gonadalni, femoralni, mezenterialni, abdominalni maščobni depo in rjavo maščobo) ter si zabeležili njihove mase. Hiter pregled meritev z opisno statistiko je pokazal, da so tekom razvoja imeli samci večjo telesno maso in mase maščobnih depojev kot samice. Ker pa smo želeli preveriti, če obstajajo statistično značilne razlike med genotipi glede na posamezen maščobni depo, smo dobljene meritve nato vstavili v statistična modela (enačba 6 in 7) ter ju testirali v programu R. Rezultati analize so podani v Preglednica 10, kjer vidimo, pri katerih maščobnih depojih so statistično značilne razlike med genotipi. Statistično značilne razlike obstajajo med genotipom FF in genotipom LL na odseku *Fob3a* pri rjavi maščobi pa se nakazuje še trend razlike med genotipom FF in FL. Rezultati kažejo tudi na izrazit aditivni genetski način dedovanja, kar smo dokazali z analizo modela, v katerega smo

genotip vključili kot regresijo. Negativni regresijski koeficienti, kar je pomenilo, da je naklon premice padajoč v smeri proti genotipu LL, oziroma da zamenjava enega alela F z alelom L zmanjša vsebnost maščob, hkrati pa je alela F tudi dominantna nad alelom L. Dobljeni rezultati dokazujejo, da odsek *Fob3a* na kromosomu 15 vpliva na nalaganje maščevja pri kongeni mišji liniji 15FHV. Omeniti velja še to, da smo v statističnem modelu upoštevali tudi vpliv obdobja, saj se je izkazal za statistično značilnega. V času zbiranja meritev so potekala v koloniji gradbena dela, kar je najverjetneje vplivalo na same miši in posledično tudi na njihovo rast in pridobivanje teže. Tako smo z upoštevanjem vpliva obdobja lahko korigirali te razlike v meritvah.

V našo raziskavo pa smo poleg analize fenotipskih podatkov vključili še analizo konzumacije krme pri kongeni liniji miši 15FHV. Želeli smo dodatno preveriti, če se kaže kakšna razlika med genotipi tudi v dnevni porabi krme. Analiza je pokazala, da obstajajo razlike med spoloma (samci pojedjo več kot samice), med genotipoma FF in FL za konzumacijo krme merjene v parih ter med genotipoma FF in LL za konzumacijo krme, merejne, ko so bile miši v kletkah posamično (Preglednica 14). Čeprav je regresijski koeficient negativen in je tendenca premice padajoča, bi lahko rekli, da se tudi pri tej analizi kaže aditiven učinek zamenjave alela F, vendar zaradi visokih vrednosti standardnih odklonov le-ta ni signifikanten. V obeh primerih gresta trenda v obratno smer od pričakovane – donorski segment linije L vpliva na večjo konzumacijo pri kongenih miših, kar so v prejšnjih poskusih že dokazali z linijami L in F (Simončič in sod., 2008). V omenjeni raziskavi so uporabili izhodne linije, v našem primeru, kjer smo izolirano opazovali vpliv QTL-a na kongeni liniji, ta ni imel vpliva, oziroma ima lahko celo obratni vpliv, če nima možnosti interakcij z drugimi QTL-i, ki se nahajajo v donor liniji L.

Dobljeni rezultati potrjujejo, da se QTL *Fob3a* nahaja in vpliva na zamaščevanje pri F₂-križanju kongene linije 15FHV. Rezultati predstavljajo podlago za razvoj novih rekombinantnih kongenih linij, katere bomo uporabili za natančnejša preučevanja debelosti in posameznih učinkov QTL-ov na 15. kromosomu. Pojasnjene genetske osnove zamaščenosti pri edinstvenih poligenih modelih miši ter homologija med mišjim, človeškim in živalskim genomom bodo pri odkrivanju kandidatnih genov za debelost

pokazale visoko aplikativno vrednost za razvijanje zdravil in diagnostiko pri človeku ter za selekcijo domačih živali, rejenih za človeško prehrano.

5.2 SKLEPI

- Identificirali smo 17 rekombinantnih živali v F_2 -križanju kongene linije 15FHV, s križanjem katerih bomo lahko zmanjšali donorski segment linije L.
- Frekvence genotipov živali, zajetih v poskusu, so v skladu s 1. Mendlovim zakonom dedovanja.
- Alel F statistično značilno povečuje maso maščobnih depojev, kar dokazuje, da QTL *Fob3a* vpliva na zamaščevanje.
- Miši genotipa LL v odseku *Fob3a* niso konzumirale na dan več krme kot živali genotipa FF v odseku *Fob3a*. Med genotipi nismo mogli dokazati razlik. Zaradi velikih vrednosti standardnih odklonov aditivni vpliv ni bil statistično značilen.

6 POVZETEK

Debelost postaja v svetu vedno večji problem, hkrati pa vse večje zavedanje problema zdrave prehrane spodbuja rejce k vzreji domačih živali z manjšo stopnjo zamaščenosti. Zaradi tega se pojavlja vse več raziskav odkrivanja genov, ki vplivajo na pojav debelosti pri ljudeh in na nalaganje maščevja pri živalih.

V raziskavi smo želeli odkriti nove rekombinantne živali s kvantitativnim lokusom *Fob3a* na donorskem odseku linije L, ki bi služile za razvoj novih kongenih linij s krajšimi donorskimi odseki linije L. Identificirati smo uspeli 17 rekombinantnih živali v F_2 -populaciji kongene miške linije, ki izvira iz starševske linije F in L, ki je bila za več kot triinpetdeset generacij selekcionirana na večji oziroma manjši odstotek maščevja. Zaradi velike fenotipske razlike (linija F je imela 22 % telesnih maščob, linija L pa le 4 %) so ju parili med seboj ter po inbridingu in povratnih križanjih dobili zelene kongene linije, ki so se med seboj razlikovale po velikosti donorskega segmenta linije L.

F_2 -populacijo kongenih miši linije 15FHV smo genotipizirali v odseku *Fob3a* tako, da smo najprej DNA živali pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo ter za vsak posamezen mikrosatelitski genetski označevalec ločili aleli F in L s postopkom agarozne gelske elektroforeze. Dobljene genotipe smo nato testirali z χ^2 -testom ter s tem dokazali, da frekvence genotipov ne odstopajo od pričakovanega razmerja, ki ga določa 1. Mendlov zakon – FF:FL:LL = 1:2:1. Da opažena frekvenca genotipov ni bila statistično značilno različna od pričakovane, je za nas pomenilo to, da med postopki genotipiziranja ali jemanja vzorcev nismo naredili napak.

Z analizo fenotipskih podatkov smo želeli potrditi, da kvantitativni lokus *Fob3a* vpliva na nalaganje različnih maščobnih depojev in pridobivanje telesne mase pri različni starosti. Dobljeni rezultati kažejo na statistično značilne razlike med genotipi za posamezen maščobni depo ter signifikanten aditivni vpliv. S tem smo dobili dokaz, da alela F poveča maso maščobnega depoja, kar pomeni, da QTL *Fob3a* na donorskem segmentu linije L res vpliva na nalaganje maščobe. Opravili smo še dodatno analizo konzumacije krme, kjer smo preverjali ali vitke miši pojedjo več krme na dan kot debele. Prišli smo do rezultatov, ki so

bili ravno obratni od pričakovanih. Rezultati kažejo na aditivni vpliv alele F, vendar pa ta ni signifikanten zaradi velikih vrednosti standardnega odklona.

Identificirani rekombinantni osebki ter ugotovitve, da kvantitativni lokus *Fob3a* na 15. kromosomu vpliva na zamaščevanje, predstavljajo odličen vir za nadaljnje natančnejše preučevanje QTL-a ter odkrivanje kandidatnih genov, ki vplivajo na zamaščevanje tako pri ljudeh, kot tudi živalih.

7 VIRI

- Abiola O., Angel I.M., Avner P., Bachmanov A.A., Belknap J.K., Bennett B., Blankenhorn E.P., Blizard D.A., Bolivar V., Brockmann G.A., Buck K. J., Bureau J.F., Casley W.L., Chesler E.J., Cheverud J.M., Churchill G.A., Cook M., Crabbe J.C., Crusio W.E., Darvasi A., de Haan G., Dermant P., Doerge R.W., Elliot R.W., Farber C.R., Flaherty L., Flint J., Gershenfeld H., Gibson J.P., Gu J., Gu W., Himmelbauer H., Hitzemann R., Hsu H.C., Hunter K., Iraqi F.F., Jansen K.C., Johnson T.E., Jones B.C., Kempermann G., Lammert F., Lu L., Manly K.F., Matthews D.B., Medrano J.F., Mehrabian M., Mittleamm G., Mock B.A., Mogil J.S., Montagutelly X., Morahan G., Mountz J.D., Nagase H., Nowakowski R.S., O'Hara B.F., Osadchuk A.V., Paigen B., Palmer A.A., Peirce J.L., Pomp D., Rosemann M., Rosen G.D., Schalkwyk L.C., Seltzer Z., Settle S., Shimomura K., Shou S., Sikea J.M., Siracusa L.D., Spearow J.L., Teuscher C., Threadgill D.W., Toth L.A., Towe A.A., Vadasz C., Van Zant G., Wakeland E., Williams R.W., Zhang H.G., Zou F. 2003. The nature and identification of quantitative loci: a community's view. *Nature Reviews Genetics*, 4, 11: 911–916
- Aksu S., Koczan D., Renne U., Thiesen H.J., Brockmann G.A. 2007. Differentially expressed genes in adipose tissues of high body weight-selected (obese) and unselected (lean) mouse lines. *Journal of Applied Genetics*, 48, 2: 133–143
- Astrup A. 2005. Obesity. V: Human nutrition. 11th edition. Geissler C., Powers H. (eds.). Edinburgh, Elsevier Churchill Livingstone: 379–399
- Bell C.G., Walley A.J., Froguel P. 2005. The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics*, 6: 221–234
- Brockmann G.A., Bevoja M. 2002. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *Trends in Genetics*, 18, 7: 367–376
- Brockmann G.A., Karatayli E., Haley C.S., Renne U., Rottmann O.J., Karle S. 2004. QTLs for pre- and postweaning body weight and body composition in selected mice. *Mammalian Genome*, 15: 593–609
- Brockmann G.A., Kratzsch J., Haley C.S. 2000. Single QTL effects, epistasis and pleiotropy account for two-thirds of the phenotypic F_2 variance of growth and obesity in DU6i x DBA/2 mice. *Genome Research*, 10: 1941–1957
- Bünger L., Hill W.G. 1999. Inbred lines of mice derived from long-term divergent selection on fat content and body weight. *Mammalian Genome*, 10: 645–648

- Bünger L., Hill W.G. 2005. Genetics of body composition and metabolic rate. V: The mouse in animal genetics and breeding research. Eisen E.J. (ed.). London, Imperial College Press: 131–160
- Chiu S., Kim K., Haus K.A., Espinal G.M., Millon L.V., Warden C.H. 2007. Identification of positional candidate genes for body weight and adiposity in subcongenic mice. *Physiological Genomics*, 31: 75–85
- Clement K. 2005. Genetics of human obesity. *Nutrition Society*, 64: 133–142
- Comuzzie A.G., Allison D.B. 1998. The search for human obesity genes. *Science*, 280, 5368: 1374–1377
- Estrada-Smith D., Castellani L.W., Wong H., Wen P.Z., Chui A., Lusi A.J., Davis R.C. 2004. Dissection of multigenic obesity traits in congenic mouse strains. *Mammalian Genome*, 15: 14–22
- Flint J., Valdar W., Shifman S., Mott R. 2005. Strategies from mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nature Reviews Genetics*, 6: 271–286
- Groot P.C., Moen C.J.A., Dietrich W., Stoye J.P., Lander E.S., Demant P. 1992. The recombinant congenic strains for analysis of multigenic traits: genetics composition. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6: 2826–2835
- Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carroll S.B. 2008. An introduction to genetic analysis. 9th edition. New York, W. H. Freeman and company: 838 str.
- Hill W.G. 1998. Selection with recurrent backcrossing to develop congenic lines for quantitative trait loci analysis. *Genetics*, 148: 1341–1352
- Horvat S., Bünger L., Falcone V.M., Mackay P., Law A., Bulfield G., Keightley P.D. 2000. Mapping of obesity QTLs in a cross between mouse lines divergently selected on fat content. *Mammalian Genome*, 11: 2–7
- Ikeobi C.O.N., Wooliams J.A., Morrice D.R., Law A., Windsor D., Burt D.W., Hocking P.M. 2002. Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken. *Animal Genetics*, 33: 428–435

- Inoue S., Zimmet P. 2000. The Asia-Pacific perspective: Redefining obesity and its treatment. Australia, Health communications Australia Pty Limited: 56 str.
- Khatkar M.S., Thomson P.C., Tammen I., Raadsma H.W. 2004. QTL mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genetics, Selection, Evolution*, 36:163–190
- Lanbein K., Skalnik C. 2007. Veliki zdravstveni vodnik: Kaj resnično pomaga. Bolezni in terapije od Br do In. Kranj, Modita: 188 str.
- Leamy L.J., Elo K., Nielsen MK., Van Vleck L.D., Pomp D. 2005. Genetic variance and covariance patterns for body weight and energy balance characters in an advanced intercross population of mice. *Genetics Selection Evolution*, 37: 151–173
- Loos R.J.F., Bouchard C. 2003. Obesity - is it a genetic disorder? *Journal of Internal Medicine*, 154: 401–425
- Maščoba. Slovar slovenskega knjižnega jezika (spletna izdaja). 2000. Inštitut za slovenski jezik Frana Ramovša ZRC SAZU.
http://bos.zrcsazu.si/cgi/a03.exe?name=sskj_testa&expression=ma%C5%A1%C4%8Doba&hs=1 (8. jun. 2011)
- Morton N.M., Densmore V., Wamil M., Ramage L., Nichol K., Bünger L., Seckl J.R., Kenyon C.J. 2005. A polygenic model of the metabolic syndrome with reduced circulating and intra-adipose glucocorticoid action. *Diabetes*, 54: 3371–3378
- Mouse genome informatics (MGI). 2005. The Jackson laboratory
<http://www.informatics.jax.org/> (10. nov. 2010)
- Rattink A.P., De Koning D.J., Faivre M., Harlizius B., Van Arendonk J.A.M., Groenen M.A.M. 2000. Fine mapping and imprinting analysis for fattness trait QTLs in pigs. *Mammalian Genome*, 11, 656–661
- Peters L.L., Robledo R.F., Bult C.J., Churchill G.A., Paigen B.J., Svenson K.L. 2007. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nature Reviews Genetics*, 8: 58–69

- Pomp D. 1997. Genetic dissection of obesity in polygenic animal models. *Behavior Genetics*, 27, 4: 285–306
- Prevoršek Z. 2005. Razvoj kongenih linij za natančnejše kartiranje kvantitativnega lokusa za nalaganje maščevja na kromosomu 15 pri miših. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 78 str.
- Prevoršek Z. 2010. Identifikacija kvantitativnih lokusov za nalaganje maščevja pri miših z genetskim kartiranjem kongenih linij in bioinformacijsko analizo haplotipov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 157 str.
- Prevoršek Z., Gorjanc G., Paigen B., Horvat S. 2010. Congenic and bioinformatics analyses resolved a major-effect *Fob3b* QTL on mouse Chr 15 into two closely linked loci. *Mammalian Genome*, 21: 172–185
- Rogner U.C., Avner P. 2003. Congenic mice: Cutting tools for complex immune disorders. *Nature Reviews Immunology*, 3, 3: 243–252
- Sanders T., Emery P. 2003. *Molecular basis of human nutrition*. London, Taylor & Francis: 165 str.
- Schloetterer C., 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature reviews genetics*, 5: 63-69
- Simončič M., Horvat S., Stevenson P.L., Bünger L., Holmes M.C., Kenyon C.J., Speakman J.R., Morton N.M. 2008. Divergent physical activity and novel alternative responses to high fat feeding in polygenic fat and lean mice. *Behavior Genetics*, 38: 292–300
- Sharp G.L., Hill W.G., Robertson A. 1984. Effects of selection on growth, body composition and food intake in mice I. Responses in selected traits. *Genetics Research*, 43: 75–92
- Stassen A.D.M., Groot P.C., Eppig J.T., Demant P. 1996. Genetic composition of the recombinant congenic strains. *Mammalian Genome*, 7, 1: 55–58

Stylianou I.M., Chrisitians J.K., Keightles P.D., Bünger L., Clinton M., Bulfield G., Horvat S. 2004. Genetic complexity of an obesity QTL (*Fob3*) revealed by detailed genetic mapping. *Mammalian Genome*, 15: 472–481

Stylianou I.M., Clinton M., Keightley P.D., Pritchard C., Tymovska-Lallane Z., Bünger L., Horvat S. 2005. Microarray gene expression analysis of the *Fob3b* obesity QTL identifies positional candidate gene *Sqle* perturbed cholesterol and glycolysis pathways. *Physiological Genomics*, 20: 224–232

Walling G.A., Visscher P.M., Wilson A.D., McTeir B.L., Simm G., Bishop S.C. 2004. Mapping of QTL for growth and carcass traits in commercial sheep populations. *Journal of Animal Science*, 82, 8: 2234–2246

ZAHVALA

Najprej naj se zahvalim mentorju, ki me je že na samem začetku študija navdušil in popeljal v vode genetike. Naraščajoča želja in vse večje zanimanje za genetiko sta me nazadnje le privedla do diplomskega dela na temo s tega področja.

Hvala vam prof. dr. Simon Horvat, da ste mi to omogočili.

Za pomoč pri statistični obdelavi in za nesebične predloge glede priprave rezultatov se zahvaljujem dr. Gregorju Gorjancu.

Zahvala gre tudi recenzentki dr. Tanji Kunej in prof. dr. Ivanu Štuhcu za pregled in koristne nasvete pri popravkih naloge.

Zali Prevoršek in celotni ekipi spodnjega laboratorija se zahvaljujem za uvajanje v laboratorijsko delo. Hvala vam za vse spodbude, pomoč in strokovne nasvete. Zahvala gre tudi tebi Vesna, ki si mi tekom nastajanja in razvijanja diplomskega dela stala ob strani in me s svojim večnim nasmehom bodrila.

Hvala prijateljice za nepozabne dogodke med študijskimi leti.

Mama in *tata*, besede so premalo, da bi se vama lahko za vse zahvalila. Da sem postala to, kar sem, se lahko zahvalim le vama in vajini brezmejni ljubezni. Katjuša, hvala ti za vse sestrške nasvete in pomoč pri prevajanju strokovnih terminoloških izrazov.

Jure, moja zahvala tebi ne pozna meja.

Nazadnje naj se zahvalim tudi tebi *nono*, ki te žal ni več med nami. Vsi nasveti, spodbude, izkušnje in tudi grajanja so se tekom mojega življenja in študija združili v eno – uspeh. Vem, da bi bil neizmerno ponosen name in na vse, kar sem do sedaj dosegla.

Hvala ti!

PRILOGE

Priloga A:

Podatki F₂-populacije kongenih miši linije 15FHV

PODATKI O ŽIVALI				FENOTIPSKI PODATKI									Vel. gn.	Zap. Gn.
Št. vzorca	Datum sekcije	Spol	Genotip	Telesna teža (g)				Maščobni depoji						
				3T	6T	10T	14T	Gon. (g)	Abd. (g)	Fem. (g)	Mes. (g)	Rjava (g)		
V 386	26.8.2010	Z	LL	12,39	22,43	27,57	30,62	0,66	0,30	0,52	0,48	0,10	3	1
V 387	26.8.2010	Z	LL	14,05	24,75	30,5	34,41	0,86	0,48	0,69	0,68	0,12	3	1
V 407	3.9.2010	Z	FF	9,39	21,53	29,18	30,8	0,62	0,36	0,41	0,46	0,06	7	2
V 408	3.9.2010	Z	FL	9,31	20,22	28,13	28,7	0,65	0,36	0,54	0,50	0,05	7	2
V 409	3.9.2010	M	LL	9,36	25,8	35,4	38,38	0,91	0,25	0,67	0,78	0,13	7	2
V 410	3.9.2010	M	FL	9,07	23,1	34,67	37,8	0,79	0,30	0,60	0,66	0,12	7	2
V 411	3.9.2010	M	FL	9,18	24,56	36,09	39,1	0,96	0,43	0,88	1,01	0,17	7	2
V 412	3.9.2010	M	FL	9,46	26,11	39,53	44,01	1,01	0,36	0,80	1,02	0,13	7	2
V 414	6.9.2010	Z	LL	10,85	23,41	29,67	32,2	0,54	0,41	0,52	0,49	0,08	5	2
V 418	6.9.2010	M	FF	11,84	30,32	44,2	48,4	/	0,53	1,16	1,37	0,25	5	2
V 419	8.9.2010	Z	LL	12,35	23,54	25,69	25,9	0,37	0,18	0,33	0,30	0,06	6	2
V 420	8.9.2010	Z	LL	14,48	22,99	30,09	31,3	0,50	0,33	0,41	0,38	0,06	6	2
V 421	8.9.2010	Z	LL	13,61	24,16	28,23	30,6	0,54	0,45	0,45	0,40	0,08	6	2
V 422	8.9.2010	M	FL	14,41	31,64	40,17	44,62	1,18	0,47	1,03	1,14	0,19	6	2
V 423	8.9.2010	M	FL	14,64	31,33	41,86	47,11	1,33	0,62	1,04	1,35	0,21	6	2
V 425	9.9.2010	Z	LL	14,55	24,07	30,42	32,6	0,88	0,67	0,68	0,75	0,08	4	1
V 426	9.9.2010	Z	LL	14,6	23,91	29,18	29,5	0,65	0,41	0,56	0,39	0,06	4	1
V 427	9.9.2010	M	LL	16,06	27,63	37,8	43,1	1,06	0,37	0,90	/	0,17	4	1
V 431	14.9.2010	Z	LL	16,03	27,81	29,81	32,6	0,83	0,48	0,57	0,65	0,09	2	1

se nadaljuje

nadaljevanje

PODATKI O ŽIVALI				FENOTIPSKI PODATKI									Vel. gn.	Zap. Gn.
Št. vzorca	Datum sekcije	Spol	Genotip	Telesna teža (g)				Maščobni depoji						
				3T	6T	10T	14T	Gon. (g)	Abd. (g)	Fem. (g)	Mes. (g)	Rjava (g)		
V 432	14.9.2010	M	FF	19,6	37,07	44,72	47,6	1,25	0,45	0,97	1,26	0,22	2	1
V 434	30.9.2010	Z	FL	15,56	24,56	31,23	35,48	0,95	0,57	0,77	0,86	0,11	8	2
V 435	30.9.2010	Z	LL	14,4	24,24	28,43	29,4	0,51	0,38	0,41	0,42	0,10	8	2
V 436	30.9.2010	Z	FF	15,82	26,26	33,6	35	1,09	0,90	1,00	0,95	0,10	8	2
V 438	30.9.2010	M	FF	17,56	29,14	36,82	45,03	1,11	0,37	0,81	1,14	0,17	8	2
V 439	30.9.2010	M	FL	17,83	33,77	43,83	44,5	0,98	0,49	0,97	1,21	0,12	8	2
V 441	4.10.2010	Z	FF	17,78	27,81	33,46	36,2	0,90	/	0,77	0,67	0,15	3	3
V 442	4.10.2010	Z	FL	16,8	27,39	32,89	35,9	0,94	0,51	0,71	0,64	0,08	3	3
V 443	4.10.2010	M	LL	16,41	25,95	32,93	33,9	0,60	0,21	0,44	0,44	0,13	3	3
V 445	14.10.2010	Z	LL	5,45	19,65	24,6	25	0,35	0,17	0,28	/	0,07	9	2
V 446	14.10.2010	Z	FL	6,18	16,66	23,53	25	0,56	0,26	0,78	0,49	0,09	9	2
V 447	14.10.2010	M	FL	5,73	23,84	31,72	35	0,64	0,33	0,66	0,75	0,10	9	2
V 448	14.10.2010	M	FF	5,63	23,25	31,48	33,8	0,52	0,21	0,57	0,52	0,12	9	2
V 449	14.10.2010	M	FF	5,37	21,75	30,41	34,4	0,48	0,34	0,68	0,64	0,12	9	2
V 451	14.10.2010	M	LL	5,16	16,81	26,78	28,9	0,46	0,23	0,52	0,48	0,09	9	2
V 452	14.10.2010	M	FF	6,15	22,12	30,34	31,5	0,35	0,20	0,51	0,49	0,10	9	2
V 453	19.10.2010	Z	LL	10,96	23,91	27,57	24,3	0,20	0,12	0,28	/	0,05	2	3
V 454	19.10.2010	Z	FF	10,91	24,94	29,59	31,4	0,66	0,43	0,62	0,57	0,07	2	3
V 456	19.10.2010	Z	LL	12,01	24,66	28,79	30,7	0,75	0,54	0,75	0,57	0,08	7	3
V 458	19.10.2010	Z	FL	10,6	22,16	26,43	29,9	0,80	0,32	0,63	0,50	0,08	7	3
V 459	19.10.2010	M	FL	13,65	29,54	35,78	38	0,83	0,42	0,83	0,79	0,13	7	3
V 460	19.10.2010	M	LL	12,22	28,87	36,8	39	0,91	0,43	0,87	0,95	0,12	7	3
V 461	19.10.2010	M	FF	11,86	28,84	35,23	36,6	0,79	0,35	0,62	0,79	0,12	7	3

se nadaljuje

nadaljevanje

PODATKI O ŽIVALI				FENOTIPSKI PODATKI									Vel. gn.	Zap. Gn.
Št. vzorca	Datum sekcije	Spol	Genotip	Telesna teža (g)				Maščobni depoji						
				3T	6T	10T	14T	Gon. (g)	Abd. (g)	Fem. (g)	Mes. (g)	Rjava (g)		
V 462	25.10.2010	Z	FF	12,54	23,74	39,31	30,9	0,81	0,38	0,69	0,54	0,05	5	/
V 463	25.10.2010	Z	FF	13,4	23,31	29,67	30,1	0,66	0,34	0,70	0,47	0,07	5	/
V 464	25.10.2010	M	FF	11,42	25,75	34,95	38,01	0,90	0,31	0,70	0,72	0,11	5	/
V 465	25.10.2010	M	FL	12,93	27,18	40,07	42,22	0,95	0,34	0,83	0,86	0,10	5	/
V 475	9.11.2010	Z	FL	14,77	23,67	29,05	32,44	0,73	0,50	0,74	0,57	0,09	3	/
V 476	9.11.2010	Z	FF	18,82	26	30,1	30,91	0,59	0,38	0,48	0,59	0,10	3	/
V 478	16.11.2010	Z	FF	13,81	21,92	27,26	30,4	0,56	0,31	0,49	0,41	0,09	4	/
V 480	16.11.2010	Z	FF	11,09	19,77	23,91	25,74	0,45	0,30	0,49	0,42	0,09	4	/
V 481	16.11.2010	M	FF	14,08	28,54	37,52	38,07	0,86	0,32	0,77	0,86	0,14	4	/
V 483	23.11.2010	Z	LL	8,8	16,53	24,32	26,43	0,74	0,17	0,83	0,41	0,08	4	15
V 485	23.11.2010	M	FF	8,83	18,03	25,47	27,94	0,49	0,17	0,54	0,48	0,08	4	15
V 486	24.11.2010	Z	LL	8,81	15,32	17,11	19,14	0,28	0,05	0,40	0,14	0,05	3	15
V 488	24.11.2010	M	FL	9,2	23,19	29,75	32,7	0,52	0,20	0,57	0,56	0,09	3	15
V 489	30.11.2010	M	LL	10,95	23,27	29,12	31,69	0,67	0,24	0,62	0,62	0,09	2	/
V 490	30.11.2010	M	LL	12,72	27,25	31,16	33,86	0,74	0,30	0,59	0,61	0,17	2	/
V 491	30.11.2010	Z	FL	9,89	15,97	22,3	25,04	0,45	0,15	0,37	0,26	0,06	4	14
V 492	30.11.2010	Z	FL	9,76	19,06	20,87	22,36	0,34	0,05	0,26	0,22	0,04	4	14
V 493	30.11.2010	Z	FF	11,35	22,81	25,14	26,58	0,59	0,07	0,26	0,29	0,06	4	14
V 495	2.12.2010	Z	LL	11,35	19,25	24,38	25,29	0,50	0,08	0,31	0,29	0,05	2	16
V 496	2.12.2010	M	FF	13,27	27,03	29,08	30,76	0,66	0,21	0,52	0,58	0,10	2	16
V 497	2.12.2010	Z	FF	13,93	20,9	24,88	27,3	0,47	0,22	0,33	0,30	0,05	4	10
V 498	2.12.2010	Z	LL	12,74	21,98	24,97	26,91	0,33	0,22	0,23	0,18	0,06	4	10

se nadaljuje

nadaljevanje

PODATKI O ŽIVALI				FENOTIPSKI PODATKI									Vel. gn.	Zap. Gn.
Št. vzorca	Datum sekcije	Spol	Genotip	Telesna teža (g)				Maščobni depoji						
				3T	6T	10T	14T	Gon. (g)	Abd. (g)	Fem. (g)	Mes. (g)	Rjava (g)		
V 501	6.12.2010	Z	FF	12,46	18,85	25,01	26,7	0,47	0,28	0,30	0,44	0,07	4	11
V 503	6.12.2010	M	FL	17,38	27,14	32,88	33,49	0,81	0,29	0,58	0,67	0,11	4	11
V 504	6.12.2010	M	LL	12,5	21,71	27,89	25,48	0,33	0,10	0,37	0,23	0,05	4	11
V 505	7.12.2010	Z	FL	10,23	22,53	25,46	25,9	0,43	0,20	0,39	0,32	0,06	5	3
V 506	7.12.2010	M	FL	10,17	19,59	27,08	29,6	0,48	0,19	0,47	0,47	0,08	5	3
V 507	7.12.2010	M	FF	10,73	26,29	34,25	36,4	1,05	0,33	0,74	0,88	0,13	5	3
V 508	7.12.2010	M	FF	11,06	19,58	28,05	31,5	0,65	0,21	0,45	0,59	0,11	5	3
V 509	7.12.2010	M	FL	10,29	27,01	32,56	36,5	0,82	0,32	0,59	0,85	0,13	5	3
V 510	7.12.2010	Z	FL	10,84	23,09	27,52	27,2	0,48	0,24	0,49	0,35	0,06	4	4
V 511	8.12.2010	Z	FF	10,14	23,02	25,07	25,29	0,48	0,07	0,29	0,24	0,05	4	4
V 512	8.12.2010	Z	FF	10,71	21,93	27,34	28,17	0,61	0,10	0,40	0,33	0,05	4	4
V 513	9.12.2010	M	FF	9,75	25,53	32,18	35	0,81	0,25	0,63	0,75	0,09	4	4
V 515	8.12.2010	Z	FF	7,32	17,3	21,75	24,37	0,50	0,10	0,38	0,29	0,06	7	12
V 516	8.12.2010	Z	LL	7,17	12,28	17,97	19,89	0,18	0,03	0,15	0,13	0,03	7	12
V 517	8.12.2010	Z	FL	7,2	15,07	19,73	21,67	0,32	0,06	0,29	0,23	0,06	7	12
V 519	9.12.2010	M	LL	7,59	16,98	28,21	33,15	0,64	0,22	0,55	0,59	0,09	7	12

Priloga B:

Podatki o konzumaciji krme, merjene v mišjih parih F₂-populacije kongenih miši linije 15FHV

Kletka	Žival	Datum odstavitve	Spol	Genotip	ABSOLUTNO		KORIGIRANO NA TELESNO MASO	
					Krma v 14. dneh (g)	$\bar{x}$ krma / dan (g/dan)	Telesna masa pri 6. tednih starosti (g)	Korigirana $\bar{x}$ krma / g teže
1	1	10.11.2010	Z	FL	59,88	4,28	12,39	0,345
	2	12.11.2010	Z	FL			12,08	0,354
2	3	25.10.2010	Z	FL	58,70	4,19	21,82	0,192
	4	3.11.2010	Z	FL			23,78	0,176
3	5	12.11.2010	Z	FL	54,75	3,91	16,45	0,238
	6	13.11.2010	Z	FL			11,60	0,337
4	7	29.11.2010	Z	FL	54,54	3,90	18,65	0,209
	8	29.11.2010	Z	FL			15,73	0,248
5	9	30.9.2010	Z	FL	51,34	3,67	18,82	0,195
	10	30.9.2010	Z	FL			19,86	0,185
6	11	10.11.2010	Z	FL	59,17	4,23	13,58	0,311
	12	19.11.2010	Z	FL			14,26	0,296
7	13	29.11.2010	Z	FL	47,93	3,42	12,68	0,270
	14	29.11.2010	Z	FL			14,18	0,241
8	15	25.11.2010	Z	LL	52,93	3,78	14,30	0,264
	16	25.11.2010	Z	LL			14,36	0,263
9	17	29.11.2010	Z	LL	58,69	4,19	13,01	0,322
	18	15.11.2010	Z	LL			12,56	0,334
10	19	5.11.2010	Z	LL	59,09	4,22	14,99	0,282
	20	30.9.2010	Z	LL			19,77	0,213

se nadaljuje

nadaljevanje

Kletka	Žival	Datum odstavitve	Spol	Genotip	ABSOLUTNO		KORIGIRANO NA TELESNO MASO	
					Krma v 14. dneh (g)	$\bar{x}$ krma / dan (g/dan)	Telesna masa pri 6. tednih starosti (g)	Korigirana $\bar{x}$ krma / g teže
11	21	7.10.2010	Z	LL	64,67	4,62	20,09	0,230
	22	29.11.2010	Z	LL			10,58	0,437
12	23	4.10.2010	Z	FF	57,53	4,11	19,93	0,206
	24	4.10.2010	Z	FF			16,05	0,256
13	25	11.10.2011	Z	FF	53,71	3,84	22,44	0,171
	26	30.9.2010	Z	FF			18,43	0,208
14	27	10.11.2010	Z	FF	64,77	4,63	11,41	0,405
	28	15.11.2010	Z	FF			12,42	0,372
15	29	5.11.2010	Z	FF	69,80	4,99	16,18	0,308
	30	30.9.2010	Z	FF			19,59	0,255
16	31	7.10.2010	Z	FF	56,00	4,00	17,49	0,229
	32	19.11.2010	Z	FF			14,27	0,280
17	33	11.10.2010	M	FL	68,97	4,93	16,18	0,304
	34	11.10.2010	M	FL			19,59	0,251
18	35	10.11.2010	M	FL	69,13	4,94	16,59	0,298
	36	10.11.2010	M	FL			17,89	0,276
19	37	25.10.2010	M	FL	65,67	4,69	15,66	0,300
	38	25.10.2010	M	FL			24,36	0,193
20	39	3.11.2010	M	FL	71,46	5,10	20,12	0,254
	40	3.11.2010	M	FL			22,25	0,229
21	41	4.10.2010	M	LL	69,67	4,98	25,60	0,194
	42	4.10.2010	M	LL			28,43	0,175
22	43	6.10.2010	M	FF	72,45	5,17	22,37	0,231
	44	6.10.2010	M	FF			20,27	0,255

Priloga C:

Podatki o konzumaciji krme, merjene v F₂-populacije kongenih miši linije 15FHV

Kletka	Žival	Datum odstavitve	Spol	Genotip	ABSOLUTNO		KORIGIRANO NA TELESNO MASO	
					Krma v 14. dneh (g)	$\bar{x}$ krma / dan (g/dan)	Telesna masa pri 6. tednih starosti (g)	Korigirana $\bar{x}$ krma / g teže
1a	1	10.11.2010	Z	FL	69,89	4,99	12,39	0,403
1b	2	12.11.2010	Z	FL	73,81	5,27	12,08	0,436
2a	3	25.10.2010	Z	FL	84,29	6,02	21,82	0,276
2b	4	3.11.2010	Z	FL	80,19	5,73	23,78	0,241
3a	5	12.11.2010	Z	FL	78,57	5,61	16,45	0,341
3b	6	13.11.2010	Z	FL	71,10	5,08	11,60	0,438
4a	7	29.11.2010	Z	FL	72,58	5,18	18,65	0,278
4b	8	29.11.2010	Z	FL	54,61	3,90	15,73	0,248
5a	9	30.9.2010	Z	FL	58,37	4,17	18,82	0,222
5b	10	30.9.2010	Z	FL	82,23	5,87	19,86	0,296
6a	11	10.11.2010	Z	FL	80,53	5,75	13,58	0,424
6b	12	19.11.2010	Z	FL	66,30	4,74	14,26	0,332
7a	13	29.11.2010	Z	FL	70,56	5,04	12,68	0,397
7b	14	29.11.2010	Z	FL	107,53	7,68	14,18	0,542
8a	15	25.11.2010	Z	LL	64,00	4,57	14,30	0,320
8b	16	25.11.2010	Z	LL	69,92	4,99	14,36	0,348
9a	17	29.11.2010	Z	LL	67,57	4,83	13,01	0,371
9b	18	15.11.2010	Z	LL	103,03	7,36	12,56	0,586
10a	19	5.11.2010	Z	LL	77,73	5,55	14,99	0,370
10b	20	30.9.2010	Z	LL	73,86	5,28	19,77	0,267
11a	21	7.10.2010	Z	LL	66,56	4,75	20,09	0,237
11b	22	29.11.2010	Z	LL	61,07	4,36	10,58	0,412

se nadaljuje

nadaljevanje

Kletka	Žival	Datum odstavitve	Spol	Genotip	ABSOLUTNO		KORIGIRANO NA TELESNO MASO	
					Krma v 14. dneh (g)	$\bar{x}$ krma / dan (g/dan)	Telesna masa pri 6. tednih starosti (g)	Korigirana $\bar{x}$ krma / g teže
12a	23	4.10.2010	Z	FF	83,46	5,96	19,93	0,299
12b	24	4.10.2010	Z	FF	76,71	5,48	16,05	0,341
13a	25	11.10.2011	Z	FF	64,13	4,58	22,44	0,204
13b	26	30.9.2010	Z	FF	65,44	4,67	18,43	0,254
14a	27	10.11.2010	Z	FF	91,80	6,56	11,41	0,575
14b	28	15.11.2010	Z	FF	96,93	6,92	12,42	0,557
15a	29	5.11.2010	Z	FF	74,19	5,30	16,18	0,328
15b	30	30.9.2010	Z	FF	79,42	5,67	19,59	0,290
16a	31	7.10.2010	Z	FF	62,69	4,48	17,49	0,256
16b	32	19.11.2010	Z	FF	97,55	6,97	14,27	0,488
17a	33	11.10.2010	M	FL	88,11	6,29	16,18	0,389
17b	34	11.10.2010	M	FL	87,29	6,24	19,59	0,318
18a	35	10.11.2010	M	FL	110,16	7,87	16,59	0,474
18b	36	10.11.2010	M	FL	95,67	6,83	17,89	0,382
19a	37	25.10.2010	M	FL	75,11	5,37	15,66	0,343
19b	38	25.10.2010	M	FL	71,57	5,11	24,36	0,210
20a	39	3.11.2010	M	FL	83,87	5,99	20,12	0,298
20b	40	3.11.2010	M	FL	87,87	6,28	22,25	0,282
21a	41	4.10.2010	M	LL	66,79	4,77	25,60	0,186
21b	42	4.10.2010	M	LL	85,73	6,12	28,43	0,215
22a	43	6.10.2010	M	FF	68,06	4,86	22,37	0,217
22b	44	6.10.2010	M	FF	101,03	7,22	20,27	0,356
23	45	7.10.2010	M	FF	90,53	6,47	27,74	0,233
24	46	4.10.2010	M	FF	65,10	4,65	24,82	0,187

se nadaljuje

nadaljevanje

Kletka	Žival	Datum odstavitve	Spol	Genotip	ABSOLUTNO		KORIGIRANO NA TELESNO MASO	
					Krma v 14. dneh (g)	$\bar{x}$ krma / dan (g/dan)	Telesna masa pri 6. tednih starosti (g)	Korigirana $\bar{x}$ krma / g teže
25	47	30.9.2010	M	FF	87,25	6,23	24,49	0,254
26	48	26.11.2010	M	FF	92,62	6,62	17,44	0,379
27	49	25.10.2010	M	FF	78,28	5,59	11,21	0,499
28	50	5.11.2010	M	LL	72,38	5,17	20,73	0,249
29	51	3.11.2010	M	LL	68,87	4,92	23,96	0,205
30	52	11.10.2010	M	LL	101,62	7,26	14,00	0,518
31	53	19.11.2010	M	LL	62,40	4,46	18,89	0,236
32	54	12.11.2010	M	FF	118,40	8,46	12,74	0,664

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Jasmina BELTRAM

**IDENTIFIKACIJA NOVIH REKOMBINANTNIH
KONGENIH LINIJ ZA KVANTITATIVNI LOKUS
Fob3a PRI MIŠIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011