

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Daša JEVŠINEK SKOK

**RAZISKAVE GENETSKIH VZROKOV ZA NALAGANJE
MAŠČOBE Z UPORABO INTEGRATIVNIH GENOMSKIH
STRATEGIJ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**RESEARCH OF GENETIC CAUSES FOR FAT DEPOSITION
USING INTEGRATIVE GENOMICS STRATEGIES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Z diplomskim delom končujem univerzitetni študija kmetijstvo – zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Tanjo Kunej, za somentorja pa prof. dr. Simona Horvata.

Recenzent: prof. dr. Peter DOVČ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan ŠTUHEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Tanja KUNEJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Član: prof. dr. Peter DOVČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek 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.

Daša Jevšinek Skok

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 575:636.2(043.2)=163.6
KG	bioinformatika/govedo/maščobno tkivo/debelost/molekularna genetika/mikro RNA/kandidatni geni
KK	AGRIS L10/5214
AV	JEVŠINEK SKOK, Daša
SA	KUNEJ, Tanja (mentorica)/HORVAT, Simon (somentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2010
IN	RAZISKAVE GENETSKIH VZROKOV ZA NALAGANJE MAŠČOBE Z UPORABO INTEGRATIVNIH GENOMSKIH STRATEGIJ
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 84 str., 19 pregl., 40 sl., 3 pril., 57 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Vse pogostejši pojav prekomerne debelosti je v zadnjem času pospešil prizadevanja znanstvenikov za odkrivanje genov in mehanizmov povezanih s to boleznijo. Predhodne raziskave so potrdile povezanost debelosti s številnimi geni, najnovejša odkritja pa so razvoj debelosti povezala tudi z mikro RNA (miRNA). Prekomerno nalaganje maščobe je nezaželeno tudi pri prireji mesa in mleka iz ekonomskih razlogov, ter zaradi vse večjega povpraševanja potrošnikov po manj mastnih proizvodih. Odkritje čim večjega števila genov, povezanih z nalaganjem maščobe, vključno z geni za miRNA ter vseh vrst mehanizmov, povezanih z njihovim uravnavanjem, je ključ do zdravljenja in nadzora tovrstnih motenj tako pri ljudeh kot tudi pri živalih. V obsežnem bioinformacijskem delu naloge smo izdelali podatkovno zbirko z 828 lokusi, povezanimi z nalaganjem maščobe: 669 genov, ki kodirajo proteine in 159 miRNA. Za šest že obstoječih kandidatnih genov (<i>TFAM</i> , <i>GH</i> , <i>IGF1</i> , <i>IGR1R</i> , <i>TG</i> in <i>FABP4</i>) smo ugotovili, da so vsi polimorfni tudi v slovenski populaciji lisastega goveda, razen gena <i>DGAT1</i> , ki je bil za analizirani SNP monomorfen. Razvili smo nove molekularne označevalce povezane z nalaganjem maščobe, in sicer na osnovi: 1) miRNA in 2) bioloških poti. Genetsko variabilnost miRNA smo preverili na treh ravneh: 1a) znotraj miRNA genov, 1b) mehanizma za procesiranje miRNA in 1c) tarč za miRNA. Našli smo dve miRNA znotraj gostiteljskih genov, povezanih z nalaganjem maščob: <i>MEST</i> (mir-335) in <i>IGF2</i> (mir-483). V območjih miRNA, odgovornih za vezavo na mRNA (angl. <i>seed region</i>) smo našli 18 SNP-jev (miR-SNP) pri miših in človeku. SNP rs30372501 znotraj Mir717, ki se nahaja v območju miRNA, odgovornem za vezavo na mRNA (angl. <i>seed SNP</i>) vpliva na nalaganje maščobe pri miših. Tриje proteini udeleženi pri procesiranju miRNA (RNASEN, FMR1 in ZFP36) so predhodno že bili povezani z nalaganjem maščobe. Našli smo sedem polimorfnih miRNA tarč (<i>ASPA</i> , <i>GLUL</i> , <i>GNG3</i> , <i>GPR37</i> , <i>PKLR</i> , <i>RELA</i> in <i>SQLE</i>) pri govedu. Za lokuse povezane z nalaganjem maščobe, smo identificirali biološke poti in genske mreže, ki predstavljajo novo generacijo biooznačevalcev za nalaganje maščobe. Rezultati naloge bodo prispevali k razvijanju molekularnih označevalcev za uporabo v seleksijskih programih goveda za učinkovitejšo odbiro živali, ki imajo željen genotip za lastnosti zamaščevanja in temelji na genskih označevalcih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 575:636.2(043.2)=163.6
CX	bioinformatics/cattle/adipose tissue/obesity/molecular genetics/microRNA/candidate genes
CC	AGRIS L10/5214
AU	JEVŠINEK SKOK, Daša
AA	KUNEJ, Tanja (supervisor)/HORVAT, Simon (co-supervisor)
PP	SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Animal Science
PY	2010
TI	RESEARCH OF GENETIC CAUSES FOR FAT DEPOSITION USING INTEGRATIVE GENOME STRATEGIES
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XIV, 84 p., 19 tab., 40 fig., 3 ann., 57 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The frequent incidence of obesity through generations increased the efforts of scientists to discover the genes and mechanisms associated with this disease. Previous studies have confirmed the association of obesity with a number of genes. Recent discoveries also linked the development of obesity with microRNA (miRNA). For economic reasons and due to growing consumer demand for lower fat products, excessive fat deposition is also undesirable in meat and milk production. The discovery of genes associated with fat deposition, including the miRNA genes, and all kinds of their regulatory mechanisms is the key to better treatment and control of such disorders both in humans and in animals. In an extensive bioinformatics part of this thesis a database of 828 loci associated with obesity was created consisting of 669 protein coding genes and 159 miRNAs. The Slovenian population of Simmental cattle was tested for the already existing molecular markers residing in some candidate genes (<i>TFAM</i> , <i>GH</i> , <i>IGF1</i> , <i>IGR1R</i> , <i>TG</i> and <i>FABP4</i>). All candidate genes were polymorphic with the exception of <i>DGAT1</i> gene, which was monomorphic for the analyzed SNP. New markers were developed on the basis of: 1) miRNA and 2) biological pathways. Genetic variability of miRNA was studied at three levels: 1a) miRNA genes, 1b) polymorphic silencing machinery and 1c) miRNA targets. Two miRNAs located within the obesity associated host genes were found: <i>MEST</i> (mir-335) and <i>IGF2</i> (mir-483). Within miRNA seed regions 18 SNPs (miR-SNPs) were found. One SNP was found located within the Mir717 in the obesity associated <i>Gpc3</i> gene. This SNP is located within the miRNA region responsible for mRNA binding (seed SNP) (rs 30372501) and affects fat deposition in mice. Three proteins involved in miRNA processing (RNASEN, FMR1 IN ZFP) were previously associated with obesity. Seven polymorphic miRNA targets were found (<i>ASPA</i> , <i>GLUL</i> , <i>GNG3</i> , <i>GPR37</i> , <i>PKLR</i> , <i>RELA</i> in <i>SQLE</i>) in cattle. For the loci related to fat deposition we identified biological pathways and gene networks, representing a new generation of biomarkers for fat deposition. Results of this project will contribute to the development of molecular markers in cattle selection programs allowing more effective, marker assisted selection for animals with desired genotype for fatness.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	XII
Okrajšave in simboli	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MAŠČOBNO TKIVO	3
2.2 DEBELOST	4
2.2.1 Geni za debelost	5
2.2.1.1 Monogena debelost	6
2.2.1.2 Sindromna debelost	7
2.2.1.3 Poligena debelost	7
2.3 RNA	8
2.3.1 Družina RNA	8
2.3.2 MiRNA	9
2.3.3 Struktura miRNA in njena biogeneza	9
2.3.4 Gostiteljski geni za miRNA	11
2.3.5 Z miRNA povezani polimorfizmi	11
2.3.6 miRNA povezane z debelostjo	13
2.3.7 miRNA povezane s proizvodnimi lastnostmi	14
2.4 INTEGRACIJA PODATKOV IN SISTEMSKA BIOLOGIJA	16
2.4.1 Genske mreže	16
2.4.2 Analiza bioloških poti	16
3 MATERIAL IN METODE	18

3.1	PODATKOVNE ZBIRKE IN BIOINFORMACIJSKA ORODJA	18
3.1.1	Podatkovne zbirke	18
3.1.2	Bioinformacijska orodja	20
3.1.2.1	ToppGene Suite	20
3.1.2.2	Ingenuity Systems Pathway Analysis (IPA)	21
3.1.2.3	Ondex	22
3.2	MOLEKULARNO GENETSKE METODE	23
3.2.1	Vzorci	23
3.2.1.1	Vzorci goveda	23
3.2.1.2	Vzorci miši	24
3.2.2	Laboratorijska oprema	25
3.2.3	Kemikalije in raztopine	25
3.2.4	Kompleti reagentov	25
3.2.5	Encimi	26
3.2.6	Označevalci velikosti	26
3.2.7	Začetni oligonukleotidi	26
3.2.8	Izolacija DNA	26
3.2.8.1	Izolacija DNA iz mišičnega tkiva s kompletom reagentov	26
3.2.8.2	Izolacija DNA iz semena bikov	28
3.2.9	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	29
3.2.10	Elektroforeza na agaroznem gelu	29
3.2.11	Restrikcijska analiza (PCR-RFLP)	30
3.2.11.1	Izdelava molekularno genetskih diagnostičnih testov	30
3.2.12	Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja	31
3.3	SHEMA INTEGRATIVNEGA GENOMSKEGA PRISTOPA	33
4	REZULTATI	34
4.1	IZDELAVA PODATKOVNE ZBIRKE GENOV POVEZANIH Z NALAGANJEM MAŠČOBE	34
4.2	GENOTIPIZACIJA ŽE OBSTOJEČIH MARKERJEV ZA NALAGANJE MAŠČOBE	36
4.3	RAZVOJ NOVIH MOLEKULARNIH OZNAČEVALCEV	40
4.3.1	Molekularni označevalci na osnovi miRNA	41
4.3.1.1	Geni za miRNA	41
4.3.1.1.1	Gostiteljski geni za miRNA	41

4.3.1.1.2	Genetska variabilnost miRNA v območjih, odgovornih za vezavo na mRNA	43
4.3.1.2	Genetska variabilnost mehanizma za procesiranje miRNA	47
4.3.1.3	Genetska variabilnost tarč za miRNA	50
4.3.1.3.1	Iskanje polimorfnih tarč za miRNA s podatkovno zbirkjo Patrocles	50
4.3.1.3.2	Iskanje polimorfnih tarč za miRNA s primerjavo podatkovnih zbirk Ensembl in MicroCosm	51
4.3.2	Identifikacija kandidatnih bioloških poti in genskih mrež	54
4.3.2.1	KEGG, Biocarta	54
4.3.2.2	Ingenuity Pathway Analysis (IPA)	56
4.3.2.3	Ondex	62
4.3.2.4	ToppGene povezan z nalaganjem maščobe	64
5	RAZPRAVA	66
5.1	IZDELAVA PODATKOVNE ZBIRKE GENOV POVEZANIH Z NALAGANJEM MAŠČOBE	66
5.2	GENOTIPIZACIJA ŽE OBSTOJEČIH OZNAČEVALCEV ZA NALAGANJE MAŠČOBE	66
5.3	RAZVOJ NOVIH MOLEKULARNIH OZNAČEVALCEV ZA NALAGANJE MAŠČOBE	67
5.3.1	Razvoj novih molekularnih označevalcev na osnovi treh kategorij miRNA (geni za miRNA, mehanizem za procesiranje miRNA in tarče za miRNA)	67
5.3.2	Identifikacija kandidatnih bioloških poti in genskih mrež povezanih z nalaganjem maščobe	72
6	SKLEPI	74
7	POVZETEK	76
8	VIRI	78
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Kategorije genetske variabilnosti, ki vplivajo na z miRNA posredovano uravnavanje genov (prirejeno po Georges in sod., 2007)	13
Preglednica 2: Izhodiščna zmes za PCR (angl. <i>PCR-master-mix</i>)	29
Preglednica 3: Izhodiščna zmes za RFLP (angl. <i>RFLP-master mix</i>)	30
Preglednica 4: Izhodiščna zmes za čiščenje produkta PCR	32
Preglednica 5: Izhodiščna zmes za sekvenčno reakcijo	32
Preglednica 6: Rezultati genotipizacije kandidatnih genov pri dvanajstih bikih lisaste pasme goveda	36
Preglednica 7: Rezultati genotipizacije treh SNP-jev v promotorju gena <i>TFAM</i> pri vzorcih bikov	38
Preglednica 8: Rezultati restriktivske analize gena <i>TG</i> z restriktivskim encimom <i>PsuI</i> za 31 vzorcev bikov – očetov in 169 vzorcev potomcev	39
Preglednica 9: Gostiteljski geni za miRNA pri govedu	42
Preglednica 10: Trinajst miRNA s SNP-jem v območju odgovornem za vezavo na mRNA pri človeku	43
Preglednica 11: Pet miRNA s SNP-jem v območju odgovornem za vezavo na mRNA pri miših	44
Preglednica 12: SNP-ji znotraj gena <i>RNASEN</i> za človeka, kokoš, govedo, psa in miš	48
Preglednica 13: Polimorfne tarče za miRNA v genih kandidatih za nalaganje maščobe <i>ASPA</i> , <i>GLUL</i> , <i>GPR37</i> in <i>PKLR</i> pridobljene iz podatkovne zbirke Patrocles	51
Preglednica 14: Enainosemdeset genov za nalaganje maščobe z 200 SNP-ji v območju 3'UTR in pripadajočimi miRNA tarčami	52
Preglednica 15: SNP-ji znotraj vezavnega mesta miRNA pri govedu	54
Preglednica 16: Seznam bioloških poti povezanih s 669 kandidatnimi geni za nalaganje maščobe pri človeku	55
Preglednica 17: Genske mreže za gene povezane z nalaganjem maščobe identificirane z orodjem IPA	57
Preglednica 18: Najbolj pomembne biološke poti povezane z geni za nalaganje maščobe pridobljene z analizo IPA	62
Preglednica 19: Rezultati iskanja bioloških poti za gene povezane z nalaganjem maščobe z orodjem ToppGene	64

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Družina RNA (prirejeno po Buckingham, 2003)	9
Slika 2: Shema mehanizma delovanja in biogeneze miRNA pri sesalcih (prirejeno po Wienholds in Plasterk, 2005)	10
Slika 3: Predvideni vzroki in posledice miRSNP-jev (prirejeno po Mishra in sod., 2008)	12
Slika 4: Začetna stran podatkovne zbirke Patrocles	19
Slika 5: Shematski prikaz delovanja podatkovne zbirke ToppGene Suite (prirejeno po Chen in sod., 2009)	21
Slika 6: Začetna stran Ingenuity Systems Pathways Analysis	22
Slika 7: Začetna stran spletnih strani Ondex	23
Slika 8: Model selekcije govedi lisaste pasme (prirejeno po Čepon in sod., 2004)	24
Slika 9: Protokol za izolacijo DNA s kompletom reagentov Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)	27
Slika 10: Protokol za izolacijo DNA iz semena bikov s fenolno ekstrakcijo. DTT - ditiotreitol	28
Slika 11: Program za PCR	29
Slika 12: Nukleotidno zaporedje gena <i>RNASEN</i> z začetnima oligonukleotidoma in SNP-jem	30
Slika 13: Restriktijski encim <i>EarI</i> za identifikacijo nukleotidne nesinonimne zamenjave G>C v genu <i>RNASEN</i>	31
Slika 14: Shematski prikaz reakcije PCR-RFLP za analizo gena <i>RNASEN</i> z restriktijskim encimom <i>EarI</i> s prikazanimi dolžinami restriktijskih odsekov. 100 bp: označevalec velikosti.	31
Slika 15: Program za sekvenčno reakcijo	32
Slika 16: Shema integrativnega genomskega pristopa dela	33
Slika 17: Shema zbiranja genov kandidatov za nalaganje maščobe iz podatkovnih zbirk Rat genome database (RGD), Mouse genome informatics (MGI), zbirke genov za debelost pri človeku (OGM) in PubMed (govedo). Z modro je označeno prekrivanje genov med podatkovnimi zbirkami.	34

Slika 18: Območje promotorja gena <i>TFAM</i> pri govedu s tremi SNP-ji -1220A>C, -1212T>C in -995T>C. Z zeleno barvo je označen ekson 1, z modro začetna oligonukleotida in z rumeno SNP-ji (Jiang in sod., 2005).	37
Slika 19: Prikaz treh polimorfizmov v promotorju gena <i>TFAM</i> . N: nukleotidna zamenjava adenin ali citozin ali timin.	37
Slika 20: Prikaz polimorfizma 1696C>T gena <i>TG</i> . N: nukleotidna zamenjava citozina v gvanin	39
Slika 21: Prikaz šestih polimorfizmov v genih, predhodno povezanih z nalaganjem maščobe. A: nukleotidna zamenjava C>T v genu <i>GH1</i> , B: nukleotidna zamenjava T>C v genu <i>GH1</i> , C: nukleotidna zamenjava C>T v genu <i>IGF-I</i> , D: nukleotidna zamenjava A>G v genu <i>IGF-IR</i> , E: nukleotidna zamenjava C>G v genu <i>FABP4</i> in F: nukleotidna zamenjava C>G v genu <i>FABP4</i> . Y: nukleotidna zamenjava citozina v gvanin, R: nukleotidna zamenjava adenina v gvanin, S: nukleotidna zamenjava citozina v gvanin	40
Slika 22: Prekrivanje <i>bta-mir-335</i> in gostiteljskega gena <i>MEST</i> pri govedu	42
Slika 23: Prekrivanje <i>bta-mir-483</i> in gostiteljskega gena <i>IGF2</i> pri govedu	42
Slika 24: Rezultati iskanja miRNA znotraj gena <i>GPC3</i> s CoGemiR	44
Slika 25: Medvrstna primerjava nukleotidnega zaporedja <i>Mir717</i> pri 26-ih vrstah sesalcev	45
Slika 26: Genska organizacija in genetska variabilnost Mir717. A: lokacija Mir717 v mišjem genu <i>Gpc3</i> , B: nukleotidno zaporedje ter lasnična zanka Mir717, C: rezultat genotipizacije z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja <i>Mir717</i>	46
Slika 27: Iskanje genetske variabilnosti mehanizmov za procesiranje miRNA s podatkovno zbirko Patrocles	47
Slika 28: Proteini udeleženi pri procesiranju miRNA povezani z nalaganjem maščob	48
Slika 29: Genetska variabilnost gena <i>RNASEN</i> pri govedu	49
Slika 30: Preverjanje produkta PCR gena <i>RNASEN</i> pri vzorcih očetov- bikov v progenem testu	49
Slika 31: Restriktivna analiza za SNP (rs41946228) v eksonu 3 gena <i>RNASEN</i> z zamenjavo C>G na vzorcih potomcev bikov z restriktivskim encimom <i>EarI</i>	50
Slika 32: Signalna pot PPAR (z zvezdico so označeni kandidatni geni za nalaganje maščobe v naši podatkovni zbirki)	56

- Slika 33: Analiza genov povezanih z nalaganjem maščobe z orodjem IPA za sklop »celično smrt, obolenja vezivnega tkiva, metabolne bolezni«. Z modro barvo so označene interakcije med povezovalnikom ADCYAP1 in sosednjimi molekulami. 58
- Slika 34: Analiza genov povezanih z nalaganjem maščobe z orodjem IPA za sklop »Metabolizem lipidov, transport molekul, biokemija majhnih molekul«. Z modro barvo so označene interakcije med povezovalnikom PPARG in sosednjimi molekulami. 59
- Slika 35: Analiza genov povezanih z nalaganjem maščobe z orodjem IPA za celični razvoj in organizacijo, metabolizem lipidov, transport molekul. Z modro barvo so označene interakcije med povezovalnikom E2F in ostalimi molekulami. 60
- Slika 36: Analiza genov povezanih z nalaganjem maščobe z orodjem IPA. Z modro barvo so označene interakcije med povezovalnikom *TGFB1* in ostalimi molekulami. 61
- Slika 37: Metabolna pot PPAR (s sivo obarvane molekule predstavljajo kandidatne gene za nalaganje maščobe iz naše podatkovne zbirke) 62
- Slika 38: Rezultat iskanja podatkov z orodjem Ondex za nalaganje maščobe, debelost, hrbitno slanino in zamaščenost na genomu prašiča (kromosom 17) 63
- Slika 39: Restriktijske endonukleaze za analizo SNP-jev v Mir717. Za analizo nukleotidne zamenjave rs30373504 T>C je možno uporabiti restriktijska encima *BsmAI* in *CviKI-1*, za genotipizacijo rs30372501 C>A pa encim *Hpy18I* 69
- Slika 40: Medvrstna primerjava odseka nukleotidnega zaporedja gena *RNASEN*, v katerem se nahaja nukleotidna zamenjava C>G (človek, miš, podgana, govedo in konj) 70

KAZALO PRILOG

- Priloga A: miRNA iz literature do sedaj povezana z nalaganjem maščobe
- Priloga B: Seznam 669 genov, povezanih z nalaganjem maščobe izbranih iz podatkovnih zbirk OGM, MGI, RGD in podatkov iz literature
- Priloga C: Število SNP-jev v tarčnih mestih za miRNA v 512-ih genih kandidatih za nalaganjem maščobe pri govedu

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

3'UTR	3' neprevedljivo območje (angl. <i>3' untranslated region</i>)
A	adenin
ASOs	protismerni oligonukleotidi (angl. <i>antisense oligonucleotides</i>)
BBS syndrome	sindrom Bardet-Biedl
bta	<i>Bos taurus</i>
C	citozin
CPE	citoplazemski poliadenilacijski elementi (angl. <i>cytoplasm polyadenylation element</i>)
CNV	različice v številu kopij (angl.: <i>copy number variants</i>)
dme	<i>Drosophila melanogaster</i>
G	gvanin
hsa	<i>Homo sapiens</i>
MGI	podatkovna zbirka »Mouse genome informatics«
Mir717	mikro RNA 717 pri miši (sinonimi mir 717, mir-717, Mirn717, mmu-mir-717)
miRNA	mikro RNA
miRNP	ribonukleoproteinski kompleks, ki vsebuje miRNA (angl. <i>miRNA containing ribonucleoprotein complex</i>)
mmu	<i>Mus musculus</i>
N	gvanin ali adenin ali timin ali citozin
ncRNA	nekodirajoča RNA (angl. <i>non-coding RNA</i>)
OGM	genska mapa za debelost (angl. <i>obesity gene map</i>)
piRNA	piwi-interacting RNA
polyCAs	ponovitve dinukleotidov CA
PPAR	receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov (angl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PWS syndrom	sindrom Prader-Willi
QTL	lokusi za kvantitativne lastnosti (angl. <i>quantitative trait loci</i>)
R	adenin ali gvanin
rasiRNA	report-associated siRNA

RFLP	polimorfizem dolžin restriktivskih fragmentov (angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RGD	podatkovna zbirka »Rat genome database«
RISC	z RNA inducirani kompleks za utišanje genov (angl. <i>RNA – induced silencing complex</i>)
RNAi	RNA-interferenca
rRNA	ribosomalna RNA
S	citozin ali gvanin
scnRNA	small-scan RNA
SERPINE	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (prej znan kot PAI-I)
siRNA	mala interferenčna RNA, small interfering RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. <i>single nucleotide polymorphisms</i>)
snRNA	small nuclear RNA
T	timin
tasiRNA	trans-acting siRNA
tRNA	prenašalna RNA (angl. <i>transfer RNA</i>)
Y	citozin ali timin

1 UVOD

Debelost je problem razvitega sveta in v zadnjem času tudi dežel v razvoju. Za debelostjo zbolevajo ljudje vseh generacij, pojavlja pa se tudi pri domačih živalih, kjer pogosteje govorimo o zamaščenosti oziroma nalaganju maščobnega tkiva. Debelost prištevamo med dedne bolezni, ki se prenašajo s prednikov na potomce, kar povečuje delež obolelih v naslednjih generacijah.

Edina podatkovna zbirka s kandidatnimi geni za debelost je genska mapa za debelost pri človeku (angl. *Human obesity gene map*) (Rankinen in sod., 2006). Čeprav so bili številni geni povezani z debelostjo tudi kasneje, ta zbirka ni bila posodobljena. Trenutno ni primernega vira, kjer bi bil možen pregled genov povezanih z debelostjo. Novejša odkritja so razvoj debelosti povezala tudi z mikroRNA (miRNA). miRNA so nekodirajoče enoverižne molekule RNA, dolge 21 do 23 nukleotidov. Njihova vloga je uravnavanje izražanja genov, dokazali pa so tudi njihovo vpletjenost v razvoj nekaterih rakavih in nevroloških obolenj.

Odkritje čim večjega števila genov povezanih z debelostjo, vključno z geni za miRNA ter vseh vrst mehanizmov, povezanih z njihovim uravnavanjem je ključ do zdravljenja ter nadzora nad tovrstnimi motnjami tako pri ljudeh, kot tudi pri živalih.

Bioinformatika je področje, ki nam omogoča obsežne raziskave bioloških procesov z računalniškimi orodji, s čimer se stroški in porabljen čas za raziskave bistveno zmanjšajo. Z metodami *in silico* lahko med seboj združimo ter obdelamo več podatkovnih zbirk in ostalih rezultatov raziskav s področja, ki ga proučujemo. Je pa nujno raziskave *in silico* eksperimentalno potrditi.

Namen naše naloge je bil razviti molekularne označevalce, ki so povezani z lastnostmi zamaščevanja v populaciji slovenskega lisastega goveda.

V ta namen smo:

- 1) razvili podatkovno zbirko 828 lokusov povezanih z nalaganjem maščobe: 669 genov, ki kodirajo proteine in 159 miRNA,

2) na populaciji slovenskega lisastega goveda analizirali izbrane molekularne označevalce, ki so bili predhodno v literaturi že povezani z nalaganjem maščobe,

3) razvili nove molekularno-genetske označevalce, povezane z nalaganjem maščobe z obdelavo informacij iz literature, podatkovnih zbirk in uporabe bioinformacijskih metod. Pri razvijanju novih označevalcev smo se osredotočili predvsem na genetsko variabilnost miRNA, in sicer na treh ravneh: 1) znotraj genov za miRNA, 2) tarč za miRNA in 3) mehanizmov udeleženih pri uravnavanju miRNA pri človeku in šestih živalskih vrstah: miši, podgani, govedu, konju, psu in kokoši. Identificirali smo tudi biološke poti, povezane z nalaganjem maščobe.

Izvedli smo obsežno in sistematsko bioinformacijsko raziskavo, v kateri smo zbrali in analizirali vse znane genetske vzroke za nalaganje maščobe pri miših, prašičih, govedu in človeku. Za nekatere izbrane nove označevalce smo eksperimentalno preverili njihovo povezavo z nalaganjem maščobe.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil analizirati izbrane, že razvite molekularne označevalce za lastnosti nalaganja maščob ter razviti nove označevalce, ki jih bo možno testirati v prihodnosti. Označevalci predstavljajo nove tarče za diagnostične ali terapevtske intervencije v biomedicini in živinoreji.

1.2 HIPOTEZA

Genetska variabilnost miRNA in njihovih tarč ter poznavanje njihove regulacije nam omogoča razvijati nove potencialne genetske označevalce za nalaganje maščobe.

Z integracijo vseh do sedaj poznanih genetskih vzrokov za nalaganje maščobe je možno identificirati pomembne genske mreže in biološke poti, ki bi jih bilo možno razviti v biomarkerje (angl. *pathway and network-based biomarkers*).

S sekvenciranjem DNA očetov - bikov slovenskega lisastega goveda v progenem testu bo mogoče identificirati nove polimorfizme in razviti genetske označevalce.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MAŠČOBNO TKIVO

Najpomembnejša funkcija maščobnega tkiva je skladiščenje maščob, za zagotavljanje energetskih potreb. Sestavljajo ga funkcionalno specifična tkiva, ki so udeležena pri vseh energetskih procesih. Pomembnost maščobnega tkiva se pokaže pri patološki izgubi le-tega pri sindromih lipodistrofije oziroma lipoatrofije. Ti sindromi so povezani s hudimi presnovnimi zapleti, vključno s sladkorno boleznjijo tipa II, kar pomeni, da je maščobno tkivo pomembno za normalno fiziološko funkcijo in presnovo in ne le kot zaloga energije. Tako je jasno, da tako premalo kot preveč maščob lahko predstavlja resno grožnjo zdravju. Debelost je močno povezana z razvojem sladkorne bolezni tipa II, povišanim krvnim tlakom ter srčno žilnimi boleznimi (Klaus in Keijer, 2004).

Z uporabo genomskeh in proteomskeh pristopov so odkrili navzkrižno povezavo številnih novih adipocitov povezanih z drugimi tkivi. Maščobno tkivo lahko proizvaja ali sprošča veliko število bioaktivnih molekul imenovanih adipokini ali adipocitokini, ki delujejo avtokrino, parakrino, intrakrino in endokrino. Adipociti predstavljajo le 30% do 60% celic maščobnega tkiva, ostale celice pa so preadipociti in številne druge vrste celic (fibroblasti, histiocite, mast celice, limfociti in žilne celice) (Klaus in Keijer, 2004).

Po histološki funkciji ločimo dva tipa maščobnega tkiva; belo (WAT; angl. *white adipose tissue*) in rjavo (BAT; angl. *brown adipose tissue*). Bele adipocite najdemo v belem maščobnem tkivu in vsebujejo unilokularne lipidne kapljice, ki imajo večjo sposobnost skladiščenja maščob kot rjave multilokularne lipidne kapljice (Trujillo in sod., 2006).

WAT lahko razdelimo na subkutano in interno maščobno tkivo. Subkutano maščobno tkivo je definirano kot sloj maščobnega tkiva med dermisom in aponevrozami ter fasciami mišic. Interno maščobno tkivo pa razdelimo na visceralne komponente, kamor sodi maščobno tkivo treh telesnih votlin (intatorakalno, intraabdominalno in intrapelvisno maščobno tkivo) in nevisceralne komponente. Med nevisceralne komponente uvrščamo intramuskularno in perimuskularno maščobno tkivo (maščobno tkivo znotraj mišičnih fascij), h kateremu sodi intermuscularno in paraosealno maščobno tkivo (maščobno tkivo med mišico in kostjo) (Shen in sod., 2003).

BAT je visokospecifično maščobno tkivo, značilno za sesalce. Rjavi adipociti, sodelujejo pri vzdrževanju telesne temperature, spodbujanju prezimovanja in porabi presežka energije iz hrane. Čeprav BAT z WAT deli veliko metabolnih značilnosti, je njuna vloga v energetskih procesih ravno obratna. Ti dve vrsti maščobnega tkiva si nasprotujeta pri razdeljevanju energije z usmerjanjem energije lipidov v kopiranje maščobe (WAT) ali oksidacijo oz. porabljanje le-te (BAT) (Klaus in Keijer, 2004).

BAT in WAT predstavljata funkcionalno različne vrste maščobnega tkiva, pri čemer je dejavnost BAT bistveno višja. Termogeneza BAT je zelo pomembna za presnovo dojenčkov, ki se z odraščanjem zmanjšuje in je pri odraslih osebkih zanemarljiva (Klaus in Keijer, 2004).

Znanstveniki želijo spodbuditi izvorne celice WAT v razvoj rjavih adipocitov, kar bi energetsko ravnovesje premaknilo bolj v negativno smer in s tem preprečilo debelost. Porazdelitev maščobnega tkiva je različna glede na spol, starost in vrsto. WAT depoji locirani na različnih območjih telesa imajo različne presnovne lastnosti in funkcije (Klaus in Keijer, 2004).

2.2 DEBELOST

Prekomerno telesno maso in debelost ocenjujemo z indeksom telesne mase (ITM). ITM je definiran kot masa v kilogramih, deljena s kvadratom višine v metrih (kg/m^2). Vrednost ITM nad $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ je opredeljena kot prekomerna telesna masa, nad $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ pa kot debelost (Obesity and overweight, 2003).

Debelost predstavlja povišano tveganje za številne bolezni, nesposobnost opravljanja vseh življensko pomembnih funkcij in celo smrt. Lahko povzroči številne resne zdravstvene težave pri opravljanju pomembnih življenskih funkcij vključno s povišanim krvnim tlakom. Pri sladkorni bolezni tipa II se lahko v klinični sliki pojavijo bolezni srca in ožilja, srčni infarkt, hiperlipidemija, neplodnost, večja pojavnost raka na črevesju, prostatit in prsih. V Združenih državah Amerike je letno z debelostjo povezanih kar 300.000 smrtnih primerov, kar je vsekakor zaskrbljujoč podatek (The Gale Encyclopedia ..., 2002).

Maščobno tkivo služi kot zaloga energije. Nedavno je bilo označeno kot endokrini organ, ki izloča številne biološko aktivne snovi, vključno z adiponektinom, leptinom in SERPINE1 (angl. *Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1*) prej poznan kot PAI-I (angl. *Plasminogen Activator Inhibitor type 1*). Fenotipske spremembe maščobnega tkiva imajo lahko pomembno vlogo pri nastanku debelosti in posledično sindroma odpornosti na inzulin. Pojasnitev mehanizma adipogeneze (nastanka maščobnih celic), bi lahko prispevala k razumevanju patogeneze debelosti in sindroma odpornosti na inzulin (Kajimoto in sod., 2006).

2.2.1 Geni za debelost

Boljše razumevanje različnih tipov debelosti omogoča razvoj potencialnih terapij, hkrati pa odkriva nove in pogosto nepričakovane poti za razumevanje disfunkcionalnega stanja debelosti. Tehnološki napredek zadnjih 20 let je proizvedel orodja, potrebna za raziskovanje biokemije debelosti in pokazal, da so interakcije med genom in okoljem (G+E) ključne za regulacijo funkcije maščevja. Medicinska in prehranska priporočila osnovana na genetsko nedefiniranih in/ali okoljsko heterogenih populacijskih študijah so imela minimalen uspeh pri zdravljenju navadnih bolezni (Mutch in Clément, 2006).

Debelost, ki izvira iz enega samega, naravno prisotnega okvarjenega gena (t.i. monogena debelost) je resnejša v primerjavi s pogostejo obliko debelosti, pri kateri k fenotipu debelost prispevajo manjši prispevki številnih genov (t.i. poligena debelost) (Mutch in Clément, 2006; Bell in sod., 2005).

Čeprav so nekateri geni kandidati za monogeno debelost pri miših dobro definirani, je prenos tega znanja na človeka sprožil več vprašanj kot odgovorov. Molekularni pristop je odkril nove gene kandidate za različne tipe debelosti pri človeku in predlagal, da so številni klinični primeri definirani kot monogena debelost genetsko bolj kompleksni kot so si mislili. Jasno je tudi pokazal, da so interakcije med geni in okoljem temeljne za razumevanje mehanizma vključenega v povečanje maščobne mase (Mutch in Clément, 2006).

2.2.1.1 Monogena debelost

Do danes so skoraj 200 primerov človeške monogene debelosti povezali z mutacijo enega od enajstih genov (*CRHR1*, *CRHR2*, *GPR24*, *LEP*, *LEPR*, *MC3R*, *MC4R*, *NTRK2*, *POMC*, *PCSK1* in *SIM1*). Ti primeri so okarakterizirani z ekstremnimi fenotipi, ki se pokažejo že v otroštvu in so pogosto povezani z dodatnimi vedenjskimi, razvojnimi ali endokrinimi motnjami (Mutch in Clément, 2006; Rankinen in sod., 2006).

Začetno znanje o monogeni debelosti izvira iz obsežnih analiz pri miših, ki so imele naravno prisotno mutacijo, ki je vodila v ekstremno zamaščenost. Te analize so privedle do detekcije lokusov in identifikacije genov kandidatov. Z uporabo tega pristopa so večino mutacij v genih, odgovornih za monogeno debelost miši klonirali (Mutch in Clément, 2006).

Ciljana genetska karakterizacija naravno pojavljajočih se debelostnih modelov, kot so *ob/ob*, *db/db*, *fat* in *tubby* miši je vodila v odkritje recessivnih mutacij genov, ki kodirajo leptin (*Lep* ali *ob*), leptin receptor (*Lepr* ali *Obr*), karboksipeptidazo E (*Cpe* ali *fat*) in *tubby* (*Tub*) (Mutch in Clément, 2006).

Naravno pojavljajoče se mutacije in ciljane motnje genov mišjih modelov (*Lep*, *Lepr*, *Pomc*, *Mc4r* in *Mc3r*) imajo ključno vlogo v isti molekularni poti, v genih in so povezani z leptin/melanokortin potjo. Zato so ti geni postali logični kandidati za klinične študije nepojasnjene debelosti (Mutch in Clément, 2006).

Gen *SIM1* (*single-minded homolog 1*) je bil identificiran pri deklici z zgodnjim pojavom debelosti in *de novo* kromosomska translokacija. Mutacija v genu *NTRK2* (angl. *neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2*) je bila identificirana pri osemletnemu dečku s kompleksnim razvojnim sindromom in močno debelostjo (Mutch in Clément, 2006).

Z *MC4R* povezana debelost ostaja najpogostejša oblika monogene debelosti in predstavlja 2% - 3% vzrokov debelosti otrok in odraslih. Mutacije so našli tudi pri običajni populaciji, ampak v manjši stopnji. Nedavna odkritja so pokazala redke funkcionalne mutacije v območjih POMC (angl. *Proopiomelanocortin*), ki kodirajo α -MSH (angl. α -melanocyte-

stimulating hormones) in povzročajo debelost otrok brez drugih opaženih anomalij (Mutch in Clément, 2006).

2.2.1.2 Sindromna debelost

Obstaja 20 do 30 motenj, pri katerih so pacienti klinično debeli, poleg tega pa še umsko prizadeti, imajo telesne okvare in razvojne anomalije specifičnih organov. Taki primeri so označeni kot sindromna debelost. Ti sindromi so odraz genetskih okvar ali kromosomskih mutacij, ki so bodisi avtosomalne ali pa povezane s kromosomom X. Analize genetskih komponent teh stanj kažejo, da več genov znotraj biološke poti lahko producira identične fenotipe. Najbolj znana obolenja so sindrom Prader-Willi (PWS), sindrom Bardet-Biedl (BBS) in sindrom Alström (Mutch in Clément, 2006).

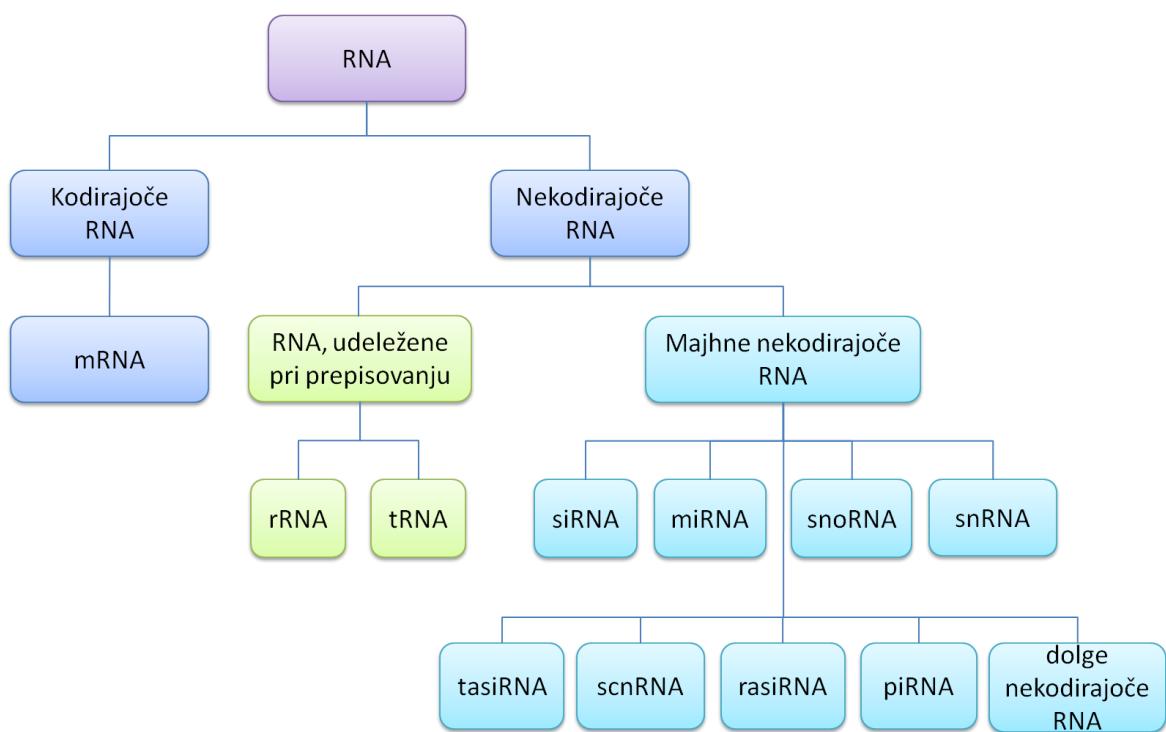
2.2.1.3 Poligena debelost

Do poligene ali navadne debelosti pride, ko je genom posameznika dovzet en za okolje, ki spodbuja konzumacijo hrane bolj kot porabo energije. Študije poligene debelosti temeljijo na asociacijskih analizah fenotipskih lastnosti ter genotipov določenih s SNP-ji ali ponovitev nukleotidov ((CA)_n ali mikrosatelitih) lociranih znotraj ali v bližini kandidatnega gena. Ti geni so vključeni v številne biološke funkcije kot so: regulacija vnosa hrane, poraba energije, metabolizem glukoze in lipidov ter razvoj maščobnega tkiva. Kljub vse obsežnejšemu katalogu kandidatnih genov je še vedno izliv kako razvozlati molekularni mehanizem debelosti. Ne samo, da je število genov povezanih z debelostjo veliko, tudi variante nekaterih od teh genov kažejo pomembnost polimorfizma pri »interpretaciji« dražljajev iz okolja. Za razliko od genetsko identičnih miši, ki jim lahko kontroliramo okolje, sta raznolikost genetike in okolje človeka problematični za ponovljivost rezultatov (Mutch in Clément, 2006).

2.3 RNA

2.3.1 Družina RNA

Družino molekul RNA delimo na kodirajoče, ki predstavljajo manjši del in nekodirajoče, ki predstavljajo veliko večino (nad 90 %) celotne RNA prisotne v celici. Med kodirajoče RNA uvrščamo mRNA (informacijska RNA; angl. *messenger RNA*), pod nekodirajoče pa RNA, udeležene pri prepisovanju (angl. *transcriptional RNA*) in majhne RNA (angl. *small RNA*). Ti dve podskupini nato razdelimo še na več manjših podskupin. Pod RNA, udeleženo pri prepisovanju, uvrščamo rRNA (ribosomska RNA) in tRNA (prenašalno RNA), med majhne pa siRNA (angl. *small interfering RNA*), miRNA (mikro RNA), snoRNA (angl. *small nucleolar RNA*), snRNA (angl. *small nuclear RNA*), tasiRNA (angl. *trans-acting siRNA*), scnRNA (angl. *small-scan RNA*), rasiRNA (angl. *report-associated siRNA*), piRNA (angl. *piwi-interacting RNA*) in dolge nekodirajoče RNA (angl. *long non-coding RNA*; long ncRNA) (Buckingham, 2003; Chu in Rana, 2007; Lau, 2008). Pomembna skupina dolgih nekodirajočih RNA so visoko ohranjeni geni med različnimi živalskimi vrstami (angl. *Ultraconserved genes*; *UCG*), ki se nahajajo znotraj visoko ohranjenih območij (angl. *Ultraconserved regions*; *UCR*, *ultraconserved elements*; *UCE*, *highly conserved elements*; *HCE*) (Ferdin in sod., 2010). Razdelitev družine RNA je prikazana na sliki 1.



Slika 1: Družina RNA (prirejeno po Buckingham, 2003)

2.3.2 MiRNA

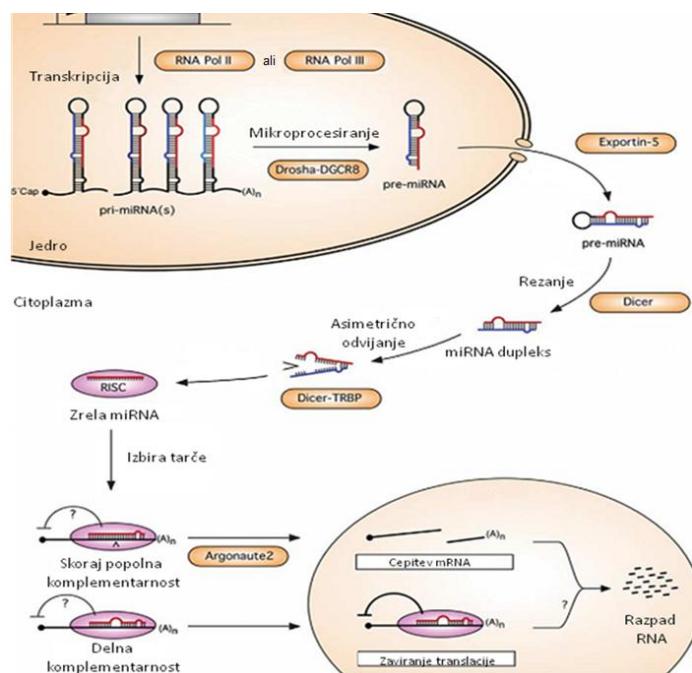
MiRNA so kratke nekodirajoče molekule RNA dolžine 21 nukleotidov, katerih baze se po transkripciji povežejo z mRNA. Večina bioloških funkcij miRNA je še neraziskana, je pa znano, da je več kot 30% miRNA povezanih z regulacijo genov znotraj človeškega genoma. Geni za miRNA so približno 50-krat kraši od genov, ki kodirajo proteine. Več kot polovica znanih miRNA se nahaja znotraj intronov gostiteljskih genov, ki se izražajo z njimi. Nekatere miRNA so izražene samo v točno določenih tipih celic. Največ študij izražanja tkivno specifičnih miRNA je bilo izvedenih na vretenčarjih (Wienholds in Plasterk, 2005).

2.3.3 Struktura miRNA in njena biogeneza

MiRNA prepiše RNA polimeraza II (pol II) ali polimeraza III (pol III), kot prekurzor molekule s 5' m⁷ G strukturo kapice in 3' repom poli-A. Ti daljši prepisi genov primarne miRNA (pri-miRNA) se zrežejo s pomočjo kompleksa DROSHA – DGCR8 (pri nekaterih vrstah znan tudi pod imenom Pasha), ki naredi zankasto strukturo – prekurzorsko miRNA (pre-miRNA) dolgo približno 70 nukleotidov. DROSHA spada med endonukleaze RNaze

III, DGCR8 pa je vezavni protein, ki služi kot merilo za mesto reza oddaljenega 11 nukleotidov od zanke. S tem se zaključi prva faza procesiranja miRNA, ki poteka v jedru. Exportin-5 z Ran GTP vezavnim proteinom tvori jadrno transportni kompleks, ki prenese pre-miRNA skozi jadrne pore v citoplazmo (Chu in Rana, 2007; Jeffrey, 2008).

Po prehodu pre-miRNA iz jedra v citoplazmo encim dicer razreže pre-miRNA na približno 22 nukleotidov dolge dvostranske RNA molekule. Dicer je RNaza III, ki je bil prvotno odkrit v svoji vlogi utišanja genov, kjer procesira dolge dvostranske RNA v siRNA in usmerja RNA-interferenco (RNAi). Dicer se veže z vezavnim proteinom TRBP (angl. *TAR RNA binding protein*), kar najverjetneje prenosti iniciatorski in efektorski korak delovanja miRNA. MiRNA veriga s 5' terminalnim koncem je bodoča zrela miRNA (slika 2). Zrela miRNA je vstavljen v ribonukleoproteinski kompleks - miRNP, ki je podoben kompleksu RISC (angl. *RNA-induced silencing complex*), ki je efektor RNAi (Wienholds in Plasterk, 2005; Taccioli in sod., 2009; Kim, 2005).



Slika 2: Shema mehanizma delovanja in biogeneze miRNA pri sesalcih (prirejeno po Wienholds in Plasterk, 2005)

2.3.4 Gostiteljski geni za miRNA

Dokazano je bilo, da se intronske miRNA izražajo skupaj z mRNA gostiteljskih genov (angl. *host genes*), kar kaže na uporabo skupnega prepisovalnega mehanizma (Baskerville in Bartel, 2005). Okvara uravnavanja izražanja miRNA pri rakavih obolenjih ljudi vodi v izgubo izražanja določenih miRNA. Izražanje hsa-miR-342, ki leži v intronu gena *ELV* je znižano pri kolorektalnem raku pri človeku in je tako koordinirano z izražanjem gostiteljskega gena *ELV*. Številne miRNA so kodirane v intronih genov za določene proteine in so kot take dovzetne za transkripcijsko represijo z metilacijo CpG otoka lociranega v 5'UTR gostiteljskega gena. V nekaterih primerih je lahko uravnavanje izražanja miRNA dosežena z epigeneskimi spremembami regulatornih elementov gostiteljskega gena, ki se lahko nahajajo daleč stran od miRNA lokusa (Grady in sod., 2008).

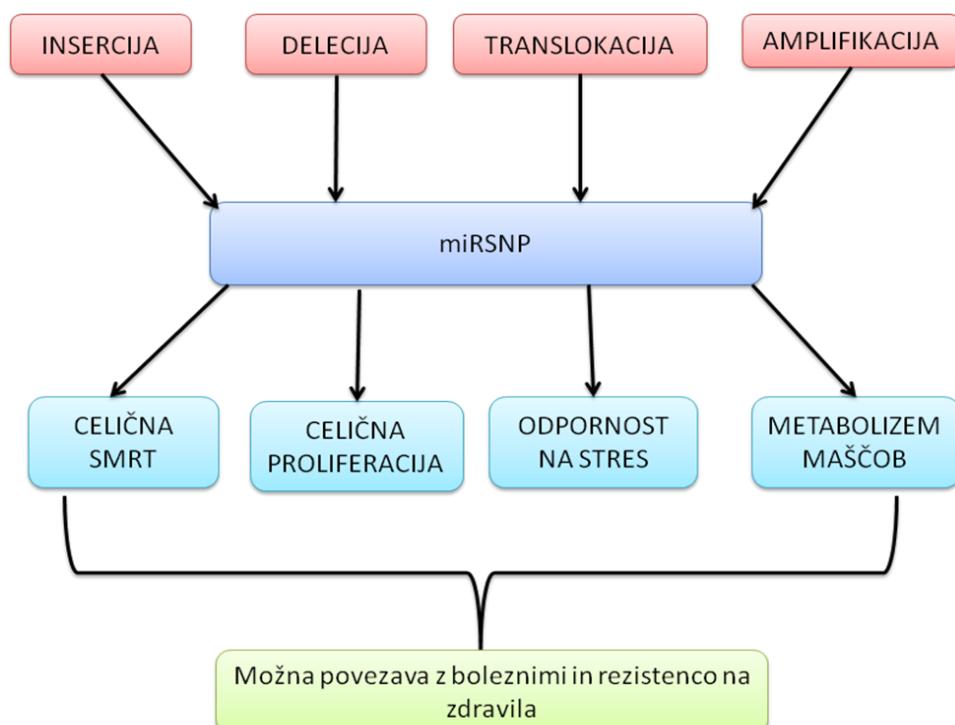
Do podobnih rezultatov so prišli tudi Toyota in sod. (2008), ki so odkrili, da naj bi bila miR-34b/c in *BTG4* nova zaviralca tumorjev pri kolorektalnem raku. CpG otoki dvosmerno uravnavajo miR-34b/c in *BTG4* ter so pogoste tarče epigenetskega utišanja pri kolorektalnem raku.

2.3.5 Z miRNA povezani polimorfizmi

MiRNA so znane kot inhibitorji prepisa proteinov z vezavo na tarčne prepise v 3'UTR. Polimorfizme v območjih 3'UTR številnih genov so preko vpliva na izražanje genov povezali s številnimi boleznimi. Ti polimorfizmi delujejo z regulatornimi elementi, ki se vežejo na 3'UTR tega gena. Ta nov razred funkcionalnih polimorfizmov so poimenovali miRSNP. Definiran je kot polimorfizem znotraj ali v bližini vezavnih mest funkcionalnih genov za miRNA, pri tem pa lahko z delovanjem na funkcijo miRNA vpliva na izražanje genov (Mishra in sod., 2008). Pred kratkim so dopolnili terminologijo in sedaj velja da se izrazi »Mir-SNP« sklicujejo na spremembo, ki se pojavlja v zaporedju gena za miRNA, »Mir-TS-SNP« pa se sklicuje na SNP-je, ki se pojavljajo v tarčnem mestu (angl. *target site; TS*) ali vezavnem mestu za miRNA (Sun in sod., 2009).

MiRSNP vplivajo na biološke funkcije mnogih miRNA in s tem na uravnavanje genov vključenih v številne poti, kot so: celična smrt, celična proliferacija, odpornost na stres in metabolizem maščob. Predpostavlja, da so miRSNP-ji povezani s številnimi boleznimi (slika 3) (Mishra in sod., 2008).

Številne gene, ki so tarče zdravil lahko reguliramo z miRNA. MiRSNP-ji lahko potencialno vodijo v pridobitev ali izgubo funkcije miRNA, kar je odvisno od tega ali delujejo na vezavno mesto za miRNA, ga generirajo ali degenerirajo (Mishra in sod., 2008).



Slika 3: Predvideni vzroki in posledice miRSNP-jev (prirejeno po Mishra in sod., 2008)

Genske variabilnosti v miRNA tarčah, miRNA genih in genih, ki kodirajo proteine za procesiranje miRNA prispevajo k razlikam v fenotipu. Georges in sod. (2007), te genske variabilnosti povezujejo z dovzetnostjo za bolezni in proizvodnimi lastnostmi (preglednica 1).

Preglednica 1: Kategorije genetske variabilnosti, ki vplivajo na z miRNA posredovano uravnavanje genov
(prirejeno po Georges in sod., 2007)

miRNA tarče	miRNA geni	Genetska variabilnost proteinov za procesiranje miRNA
Polimorfizmi, ki spremenijo prepoznavna mesta za miRNA tarče Spreminjanje obstoječih tarčnih mest <i>Stabilizacija ali destabilizacija interakcij z miRNA</i> Ustvarjanje novih; nepravilnih tarčnih mest	Polimorfizmi, ki spremenijo nukleotidno zaporedje miRNA Stabilizacija ali destabilizacija interakcij s tarčo Polimorfizmi, ki spremenijo koncentracijo miRNA Različice v številu kopij (CNVs angl.: <i>copy number variants</i>), ki vključujejo pri-miRNA Polimorfizmi, ki spreminja raven prepisovanja pri-miRNA <i>Delujoci v cia ali trans</i> Polimorfizmi, ki spreminja učinkovitost procesiranja pri- ali pre-miRNA	Polimorfizmi, ki spremenijo aminokislinsko zaporedje ali komponent za procesiranje miRNA Polimorfizmi, ki spremenijo koncentracijo komponent za procesiranje miRNA Različice v številu kopij, ki zajemajo komponente za procesiranje miRNA
Polimorfizmi, ki spremenijo 3'UTR tarče (npr. polimorfne poliadenilacije)		

2.3.6 miRNA povezane z debelostjo

MiRNA imajo pomembno vlogo pri razvojnih in diferenciacijskih procesih vretenčarjev, saj uravnavajo izražanje genov preko delnega parjenja baz s tarčnimi mRNA, kar vodi v razpad mRNA ali v zaviranje translacije. Študije s področja miRNA, povezane z nalaganjem maščob, so v vzponu in v prilogi A smo zbrali pregled študij o miRNA povezanih z diferenciacijo pre-adipocitov, številom adipocitov, zamaščenostjo omentuma (peritonealna duplikatura ob želodcu), adipogenezo, debelostjo, diabetesom, hrbtnim lojem, podkožnim maščevjem, skeletnimi mišicami in belim maščobnim tkivom.

Izražanje 21-ih miRNA je v popolnoma diferenciranih adipocitih modulirano deveti dan in ne v zgodnjih fazah diferenciacije, kar kaže na to, da lahko miRNA modulirajo funkcijo adipocitov po diferenciaciji, ne pa da jo sprožijo. Delecija miR-14 pri *Drosophili* (dme-miR-14) je povzročila povišanje nivojev triacilgliceridov in diacilgliceridov, povečanje števila kopij miR-14 pa ima obraten učinek. Iz tega lahko sklepamo, da bi bile miRNA lahko vključene v uravnavanje metabolizma maščobe, vendar pa gena, ki bi ustrezal dme-miR-14 v genomu sesalcev še niso našli (Kajimoto in sod., 2006).

Z namenom, da bi odkrili miRNA, pomembne med diferenciacijo adipocitov, so protismerne oligonukleotide (ASO; angl. *antisense oligonukleotides*), ki ciljajo 86 človeških miRNA transficirali v kultivirane človeške pre-adipocite in ocenili njihovo sposobnost modulacije adipocitov. Z inhibicijo miRNA v pre-adipocitih z uporabo oligonukleotidov ASO v kombinaciji z analizo izražanja miRNA v diferencirajočih se adipocitih je bila odkrita ena miRNA; miR-143, ki ima funkcijo spodbujanja diferenciacije adipocitov (Esau in sod., 2004; Xie in sod., 2009).

Analize so pokazale, da je med diferenciacijo adipocitov rahlo povečano izražanje dveh razredov miRNA, miR-143 in družine miR-17/92. Inhibicija izražanja miR-143 z ASO povzroči inhibicijo adipogeneze *in vitro*, čezmerno izražanje pa nekoliko poveča tvorbo adipocitov *in vitro* (Lin in sod., 2009).

Identifikacija miR-143, kot pomembnega regulatorja diferenciacije adipocitov kaže na to, da so miRNA potencialne tarče zdravil za debelost in metabolne bolezni (Esau in sod., 2004). Poleg omenjene regulacije adipocitov, so miR-143 povezali še: s povečanim številom pre-adipocitov (Kajimoto in sod., 2006), znižanim številom maščobnih celic (Ortega in sod., 2010), debelostjo (Takanabe in sod., 2008) ter povečano tvorbo maščobnih celic (Lin in sod., 2009).

Vretenčarski miR-375 in miR-376, ki se izražata v β -celicah trebušne slinavke sta vključeni v kontrolo izločanja inzulina. Ohranjena miR-1 ima močan vpliv na mišično diferenciacijo in mišično funkcijo pri nevretenčarjih in sesalcih (Lin in sod., 2009).

Izražanje miR-27 (miR-27a in miR-27b) je bilo povečano v maščobnem tkivu genetsko debelih *ob/ob* miši. Odkrili so, da sta na uravnavanje izražanja miR-27 vplivala tudi okoljski stres in pomanjkanje kisika. Podatki kažejo, da je miR-27 pomemben negativni regulator adipogeneze in da ima pomembno vlogo v regulaciji funkcije maščevja v povezavi z debelostjo (Lin in sod., 2009).

2.3.7 miRNA povezane s proizvodnimi lastnostmi

Genetske analize razvojnih okvar pri *Caenorhabditis elegans* in *Drosophila melanogaster* so identificirale prve miRNA in poudarile njihovo vlogo v razvoju. Kasnejša identifikacija

večine razvojnih genov med miRNA tarčami pri rastlinah je potrdila njihovo ključno vlogo pri razvoju in diferenciaciji. Študije razporeditve tarčnih mest med živalskimi geni pa kažejo, da imajo živalske miRNA dodatne funkcije (Georges in sod., 2007).

Utišanje genov z miRNA se je izkazalo kot ključni regulator celične diferenciacije in homeostaze, ki pri metazojih zaseda precejšen del zaporedja. Tudi ta del zaporedja je podvržen svojemu deležu mutacij, od katerih so nekatere selekcijsko nevtralne, druge ugodne, bolj pogosto pa nekoliko škodljive. SNP-ji, ki se pojavljajo v tem delu zaporedja vsekakor prispevajo k fenotipskim razlikam, vključno z doveznostjo za bolezni in priejo. Zanimiv primer, kako motnje izražanja miRNA prispevajo k fenotipski variabilnosti, je kalipigni fenotip (angl. *callipyge phenotype*) (hipertrofija mišic) pri ovcah pasme teksel (angl. *Texel*), na kromosomu 18. (Georges in sod., 2007; Freking in sod., 2002).

Kvantitativni lokus (QTL; angl. *quantitative trait loci*), odgovoren za četrtino hipertrofije mišic se nahaja na kromosому 2, natančneje na delu kromosoma, kjer se nahaja gen *MSTN* (*GDF8*), ki kodira miostatin. Natančna genetska analiza je pokazala zamenjavo G>A v slabo ohranjenem delu 3' neprevedljivih območijih (3'UTR) gena *MSTN*, ki je pokazal popolno povezavo s QTL genotipom. Ta točkovna mutacija ustvari tarčno mesto za miR-1 (priloga A), ki se močno izraža v skeletnih mišicah v območju, odgovornem za vezavo na mRNA. Zamenjava G>A je povezana s trikratnim zmanjšanjem nivoja cirkulirajočega miostatina in 1,5-kratnim zmanjšanjem ravni transkripta *GDF1*. Ta mišična hipertrofija je rezultat ektopičnega izražanja proteina *DLK1* v skeletnih mišicah, ki ga povzroča mutacija (CLPG) v utiševalcu, ki regulira gensko skupino *DKL1-GTL2*. Posamezniki, ki podedujejo mutacijo CLPG od bikov, imajo povečano stopnjo prepisa paternalno izraženih genov *DLK2* in *PEG11*. Osebki, ki mutacijo podedujejo po materi, imajo povisane stopnje maternalno izraženih mRNA podobnih nekodirajočih RNA genov (*GTL2*, *MEG8* in *MIRG*). Obstajajo trdni dokazi, da je odsotnost proteina *DLK1* in s tem fenotipa pri homozigotnih mutantih posledica translacijske inhibicije *DLK1* transkriptov z miRNA, ki jih gostijo maternalno izraženi nekodirajoči RNA geni (Clop in sod., 2006).

2.4 INTEGRACIJA PODATKOV IN SISTEMSKA BIOLOGIJA

2.4.1 Genske mreže

Življenje je odvisno od sposobnosti posamezne celice, da se učinkovito odzove na dražljaje v okolju. Celično odločanje in odzive narekujejo zapletene molekulske mreže. Informacije v primarnih podatkovnih zbirkah in v literaturi so zelo obsežne in njihova količina hitro narašča, zato jih je vedno težje vključiti v raziskave. Primernejše je zbiranje sklepov eksperimentov iz literature in podatkovnih zbirk v zbirke znanj, ki so sestavljene iz potrjenih bioloških metabolnih poti (Viswanathan in sod., 2008).

Sistemska biologija (angl. *systems biology*) se osredotoča na pridobivanje kvantitativnih opisov celotnih bioloških sistemov, vključno s celičnimi funkcijami. Na ta način je mogoče izvajati računalniško vodeno razvijanje novih zdravil, naprednih terapij za zdravljenje kompleksnih bolezni, in *in silico* razvoj kemikalij, sestavin živil in farmacevtskih izdelkov. Vključuje tako kombinacijo novih eksperimentalnih tehnik iz različnih disciplin, kot tudi funkcionalno genomiko, bioinformatiko in matematično modeliranje, zaradi česar so podatki dostopnejši (Mustacchi in sod., 2006). Njen cilj je identificirati določene genetske in molekularne značilnosti za boljšo diagnostiko bolezni (Vodovotz in sod., 2008).

V prihodnosti bodo verjetno zelo pomembne štiri nove aplikacije biologije sistemov: (a) biomarkerji izbrani na podlagi bioloških (signalnih, metabolnih) poti (angl. *pathway-based biomarkers*), (b) globalne karte genetskih interakcij (angl. *global genetic interaction maps*), (c) sistemski pristopi za identifikacijo bolezenskih genov, in (d) analiza izvornih celic s sistemskim pristopom. Biomarkerji bioloških poti so funkcionalno povezane skupine genov ali proteinov (Chuang in sod., 2010).

2.4.2 Analiza bioloških poti

Analize bioloških poti se nanašajo na računalniške pristope, ki se uporabljajo za preiskovanje obnašanja omrežja kot sistema. Na splošno jih lahko razvrstimo v dve vrsti: strukturne analize omrežja in dinamične analize. Strukturalna analiza poti opredeljuje globalne kvalitativne, medtem ko dinamična analiza (matematično modeliranje z višjo resolucijo) pojasnjuje podrobne kvantitativne lastnosti sistema. Dinamična analiza zahteva

več informacij o reakcijskih parametrih in več začetnih pogojev, kot strukturni pristop (Viswanathan in sod., 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PODATKOVNE ZBIRKE IN BIOINFORMACIJSKA ORODJA

3.1.1 Podatkovne zbirke

Literaturo, povezano z nalaganjem maščobe, smo pridobili iz National Center for Biotechnology Information - PubMed (NCBI-PubMed) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) s pomočjo iskalnih izrazov: »obesity« (debelost), »adipose tissue« (maščobno tkivo), »marbling« (marmoriranost mišic), »fat deposition« (nalaganje maščobe), »adipogenesis« (adipogeneza).

Gene, povezane z debelostjo pri človeku, smo zbrali iz zbirke genov za debelost pri človeku Human obesity gene map (OGM) (<http://obesitygene.pbrc.edu>) ter podatkovne zbirke Rat genome database (RGD) (<http://rgd.mcw.edu/>). V podatkovni zbirki RGD smo poiskali tudi gene povezane z debelostjo pri miših in podgani ter jih primerjali z geni za nalaganje maščobe in vsebnost mišične mase pri miših iz podatkovne zbirke Mouse genome informatics (MGI) (<http://www.informatics.jax.org>). Za preverjanje dogovorjene nomenklature genov smo uporabili spletno stran HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org>). Za vrsto specifično poimenovanje miRNA smo uporabili podatkovno zbirko MGI za miš ter miRBase 15.0 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) za vse ostale vrste. Nukleotidna zaporedja genov različnih vrst smo našli v podatkovni zbirki National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) in Ensembl release 58 (<http://www.ensembl.org/index.html>). Podatke o miRNA smo pridobili iz podatkovne zbirke miRBase 15.0 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>), genetsko variabilnost miRNA pa iz podatkovne zbirke Patrocles (<http://www.patrocles.org/>) in Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Podatkovna zbirka Patrocles nam je omogočila tudi iskanje polimorfnih tarč za miRNA (slika 4). Trenutna verzija te zbirke vsebuje podatke za človeka, kokoš, šimpanza, govedo, psa, podgano in miš.

Unit
Animal
Genomics

- [Background](#)
- [Polymorphic targets](#)
- [Polymorphic miRNAs](#)
- [Polymorphic silencing machinery](#)
- [Patrocles finder](#)
- [Validated pSNPs](#)
- [Patrocles Home](#)

Patrocles

The database of polymorphic miRNA-target interactions



Why the name "PATROCLES"?

To a large extent, Patrocles was killed by Hector because he went to battle wearing the armour of his friend Achilles. Likewise, the mutant Texel MSTN mRNA has mistakenly become the target of miRNAs because of its disguise using a target octamer motif borrowed from genuine target genes.

Please send comments and suggestions to:

S.Hiard@ulg.ac.be

Slika 4: Začetna stran podatkovne zbirke Patrocles

3.1.2 Bioinformacijska orodja

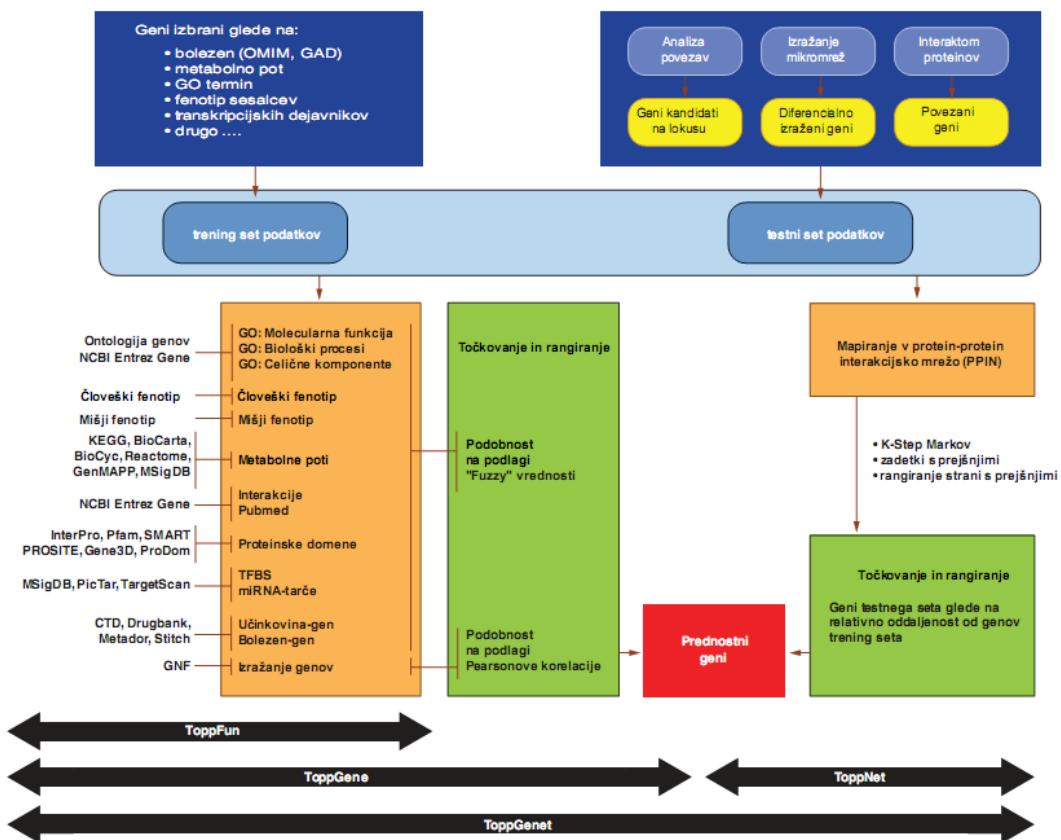
Primerjavo nukleotidnega zaporedja med vrstami smo izvedli s programom MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin>).

Tarče za miRNA smo določali s pomočjo orodij:

- TargetScanHuman 5.0 (<http://www.targetscan.org/>),
- miRBase 13.0 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>),
- MicroCosm (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>),
- DIANA-microT v3.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>),
- Comparative Genomics Analysis of MicroRNA (CoGemiR) (<http://cogemir.tigem.it/>),
- MirGen (<http://diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>),
- miRDB (http://mirdb.org/miRD_B/) in
- PITA (<http://genie.weizmann.ac.il/index.html>).

3.1.2.1 ToppGene Suite

Identifikacijsko številko NCBI smo genom določili avtomatsko z uporabo orodja ToppGene Suite (<http://toppgene.cchmc.org/>). ToppGene Suite je prosto dostopna podatkovna zbirka sestavljena iz štirih sklopov: ToppFun, ToppGene, ToppNet in ToppGeNet. Shematski prikaz organizacije in delovanja podatkovne zbirke ToppGene Suite je prikazan na sliki 5 (Chen in sod., 2009).

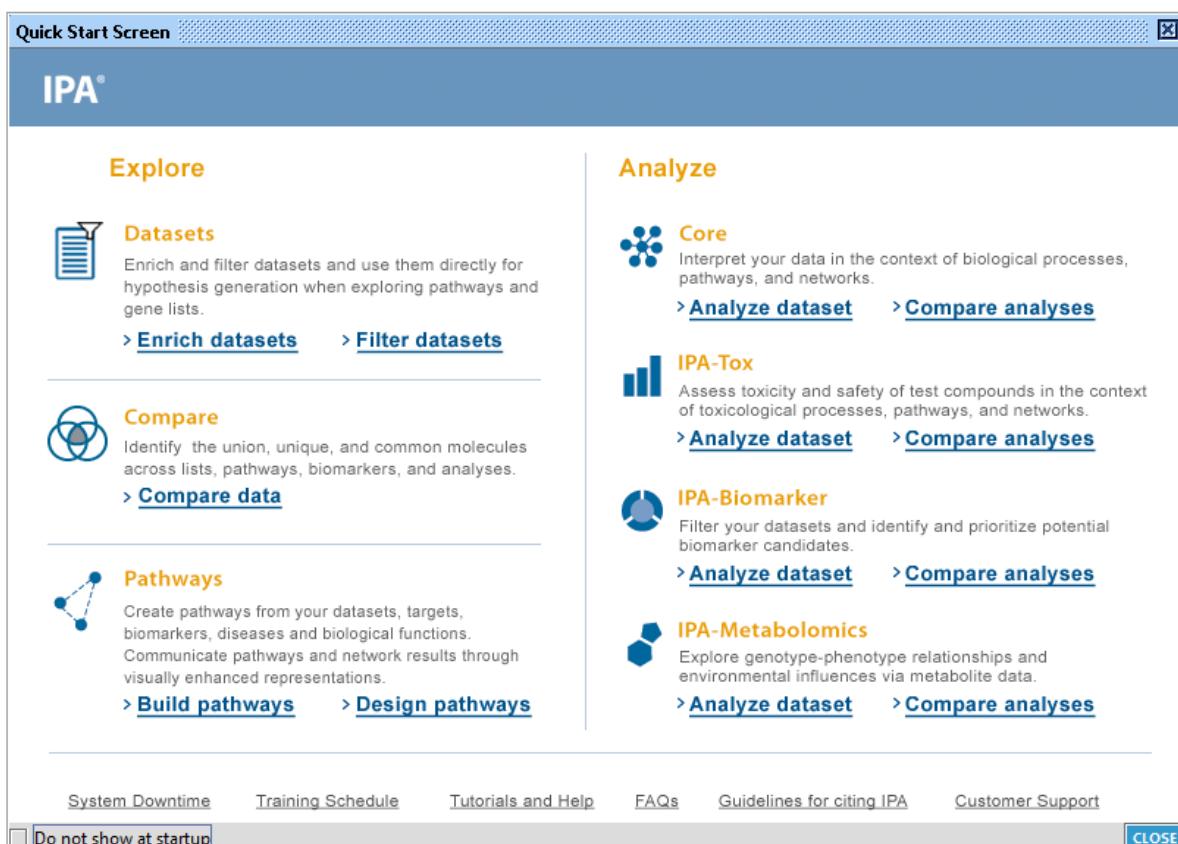


Slika 5: Shematski prikaz delovanja podatkovne zbirke ToppGene Suite (prirejeno po Chen in sod., 2009)

3.1.2.2 Ingenuity Systems Pathway Analysis (IPA)

Za risanje genskih mrež smo uporabili program Ingenuity Systems Pathway Analysis (IPA) (<http://www.ingenuity.com/index.html>). IPA je programsko orodje, ki omogoča analiziranje in razumevanje kompleksnih bioloških in kemijskih sistemov.

Na sliki 6 je prikazana začetna stran programa IPA, ki nam omogoča pregleden in hiter začetek željene analize.

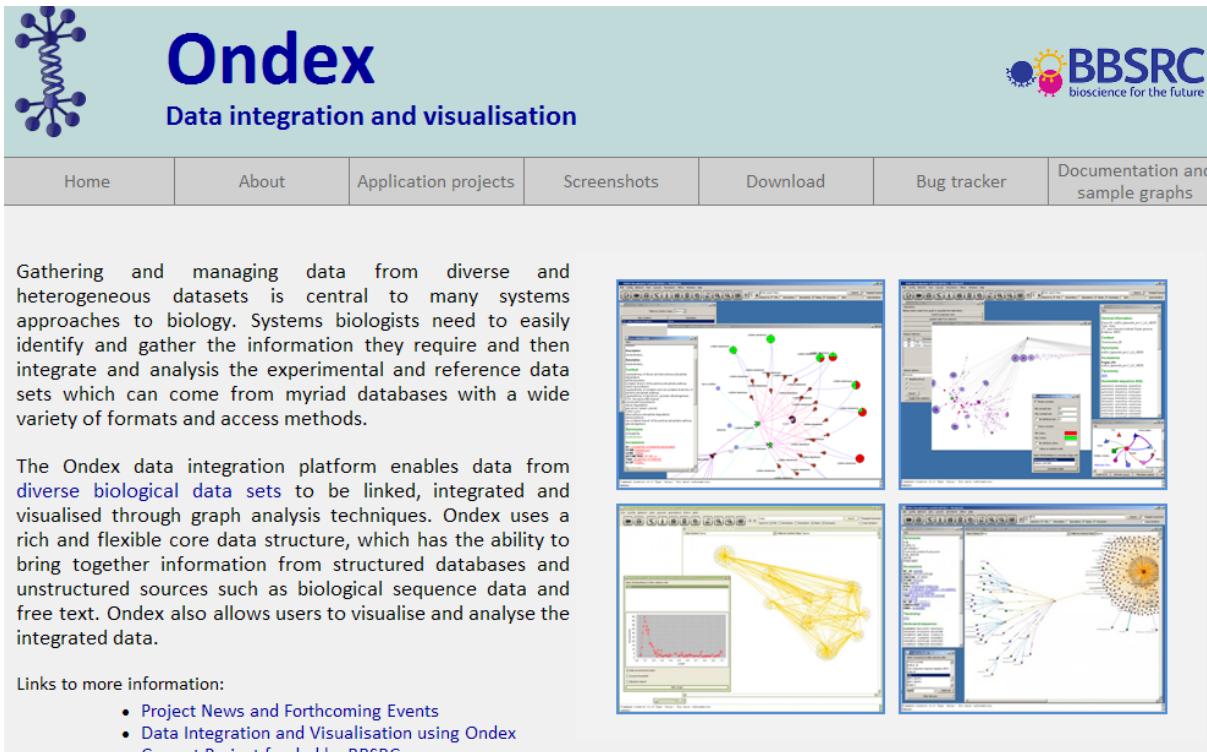


Slika 6: Začetna stran Ingenuity Systems Pathways Analysis

3.1.2.3 Ondex

Ondex je bioinformacijsko orodje za integracijo in vizualizacijo genomskega podatkov. Orodje je bilo prvotno razvito za analizo genomskega podatkov pri rastlinah (<http://www.onDEX.org>) (Köhler in sod., 2006). Podatke uvozimo iz različnih virov (npr. Gene Ontology, KEGG, Drastic, Enzyme Nomenclature, Pathway Tools Pathway Genomes (PGDBs), Medical Subject Headings Vocabulary (MeSH) ...), nato pa jih s tehnikami grafične analize združimo. Na sliki 7 je prikazana začetna stran spletnih strani Ondex.

Ondex podatke prikazuje kot niz povezanih grafov, kjer vozlišča (angl. *nodes*) predstavljajo gene oz. proteine in biološki odnos med dvema vozliščema s tako imenovanimi robovi (angl. *edges*). Z uporabo številnih filtrov lahko grafe poljubno oblikujemo glede na naše zahteve in zanimanja.



The screenshot shows the Ondex website homepage. At the top left is the Ondex logo, which is a stylized blue molecular or network structure. Next to it is the word "Ondex" in a large, bold, blue sans-serif font. Below that, in a smaller blue font, is the tagline "Data integration and visualisation". To the right of the logo is the BBSRC logo, which consists of a stylized sun-like icon with blue and yellow rays and the text "BBSRC bioscience for the future". Below the main title is a horizontal navigation menu with links: Home, About, Application projects, Screenshots, Download, Bug tracker, and Documentation and sample graphs. To the left of the menu is a text block that reads: "Gathering and managing data from diverse and heterogeneous datasets is central to many systems approaches to biology. Systems biologists need to easily identify and gather the information they require and then integrate and analyse the experimental and reference data sets which can come from myriad databases with a wide variety of formats and access methods." To the right of the text block are four screenshots of the Ondex software interface, each showing a different type of biological network graph with nodes and edges.

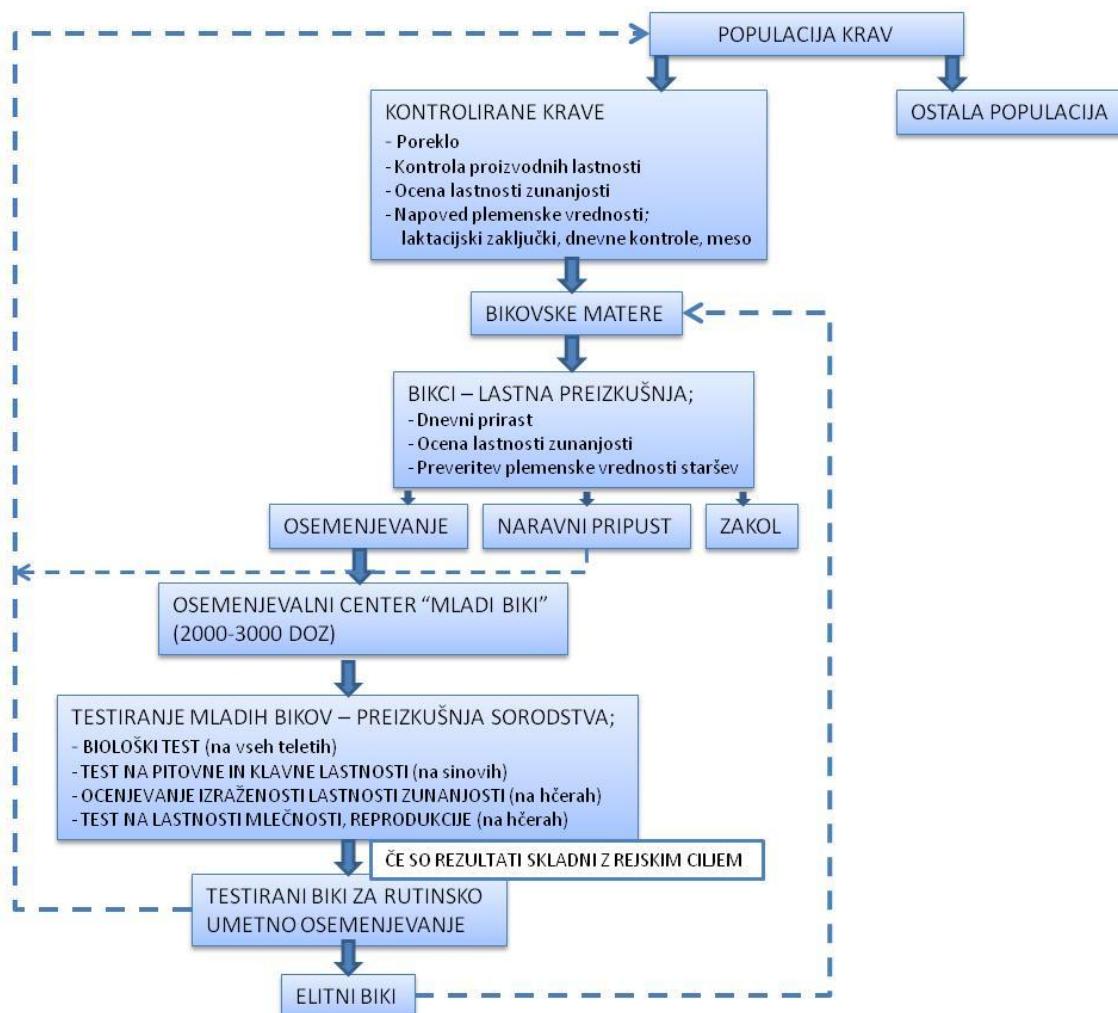
Slika 7: Začetna stran spletne strani Ondex

3.2 MOLEKULARNO GENETSKE METODE

3.2.1 Vzorci

3.2.1.1 Vzorci goveda

Vzorce goveda lisaste pasme smo pridobili v okviru ARRS projekta mapiranja genoma (J4—9252 MAS za pitovne in klavne lastnosti pri kombiniranih pasmah goveda, vodja prof. dr. Milena Kovač) iz nacionalnega progenega testa. Na razpolago smo imeli večje število fenotipiziranih družin polbratov (178) ter njihovih očetov (31) (slika 8).



Slika 8: Model selekcije govedi lisaste pasme (prijezeno po Čepon in sod., 2004)

3.2.1.2 Vzorci miši

Za analizo smo uporabili DNA miši linij: 129/Sv, C57BL/6J in DBA/2J, ki so se razlikovale po lastnostih, povezanih z nalaganjem maščobe. Za liniji C57BL/6J in DBA/2J je značilno povišano nalaganje maščobnega tkiva (angl. *high fat strains*), medtem ko vitka linija 129/Sv (angl. *the lean line*) kaže nižje vrednosti za vse lastnosti povezane z debelostjo (maščoba v krvi, skupne telesne maščobe, masa posameznih maščobnih depojev, itd.). Analizo smo izvedli na dveh oziroma treh osebkih miši na imbridirano linijo (Kunej in sod., 2010b).

3.2.2 Laboratorijska oprema

Pri delu smo uporabljali sledečo laboratorijsko opremo:

Avtomatske pipete (5 do 1000 µl)	Gilson, Francija
Kapilarna elektroforeza ABI3130xl	Applied Biosystems, ZDA
Elektroforeza	Pharmacia, Švedska
UV-transiluminator	Syngene, ZDA
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, ZDA
Vibracijski mešalnik (angl. <i>vortex</i>)	Assistent, Nemčija
Namizna centrifuga	Stratagene, ZDA
Centrifuga 5417C	Eppendorf, Nemčija
Vakuumski koncentrator	Eppendorf, Nemčija

3.2.3 Kemikalije in raztopine

Uporabili smo naslednje kemikalije in raztopine:

Agaroza	Lonza, ZDA
Etilendiaminotetraocetna kislina (EDTA)	Merck, ZDA
Etidijev bromid	Fluka, Švica
SYBR Safe	Invitrogen, ZDA
96-odstotni etanol	Pharmachem, Slo
Fenol	Sigma, ZDA
Formamid	Applied Biosystems, ZDA
Izoamil-alkohol	Merck, ZDA
Kloroform	Merck, ZDA
Mineralno olje	Sigma, ZDA
Standard ROX	Applied Biosystems, ZDA
TE pufer (Tris-EDTA)	Merck, ZDA
SDS; natrijev dodecil sulfat; (angl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)	Merck, ZDA
PBS; fosfatni pufer (angl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)	Merck, ZDA

3.2.4 Kompleti reagentov

Za izolacijo DNA iz tkiva mišic in iz agaroznih gelov smo uporabili dva kompleta reagentov:

- Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) (izolacija DNA iz tkiva) in
- JETquick; Gel Extraction spin Kit /50 (Genomed) (izolacija odsekov DNA iz gela).

3.2.5 Encimi

Pri delu smo uporabili naslednje encime:

<i>Earl</i> (<i>Eam1104I</i>)	Fermentas, Litva
<i>Psul</i>	Fermentas, Litva
rekombinantna polimeraza DNA <i>Taq</i>	Fermentas, Litva
Proteinaza K	Life Technologies, ZDA

3.2.6 Označevalci velikosti

Za določanje velikosti odsekov z elektroforezo smo uporabili dve lestvici označevalcev velikosti:

100 bp	Fermentas, Litva
1 kb	Fermentas, Litva

3.2.7 Začetni oligonukleotidi

Za verižne reakcije s polimerazo smo uporabili sledeče začetne oligonukleotide:

Oznaka	Nukleotidno zaporedje	Ta
Bta-Rnasen-F	5'-GGT TTT TCA TAC AAA CGA ATA TGG-3'	59°C
Bta-Rnasen-R	5'-TCC TTT TCC TTG ATT GAG GTA TAA T-3'	59°C
G5U2-F ¹	5'-GGGATGACTACGAGTATGACTG-3'	59°C
G5U2-R ¹	5'-GTGAAAATCTTGTGGAGGGCTGTA-3'	59°C
Mmu-mir-717-F	5'-CCA AAT CAC CAC CTT TGT CC-3'	59°C
Mmu-mir-717-R	5'-AGG AAG CTT GGA GGC AGA TT-3'	59°C
Pro1TFAM-F ²	5'-GTT GTT GCA GAA ATC AGC TAA AAT G-3'	61°C
Pro1TFAM-R ²	5'-CAT CCA CTG AGA CTA TCG CTG ACC T-3'	61°C

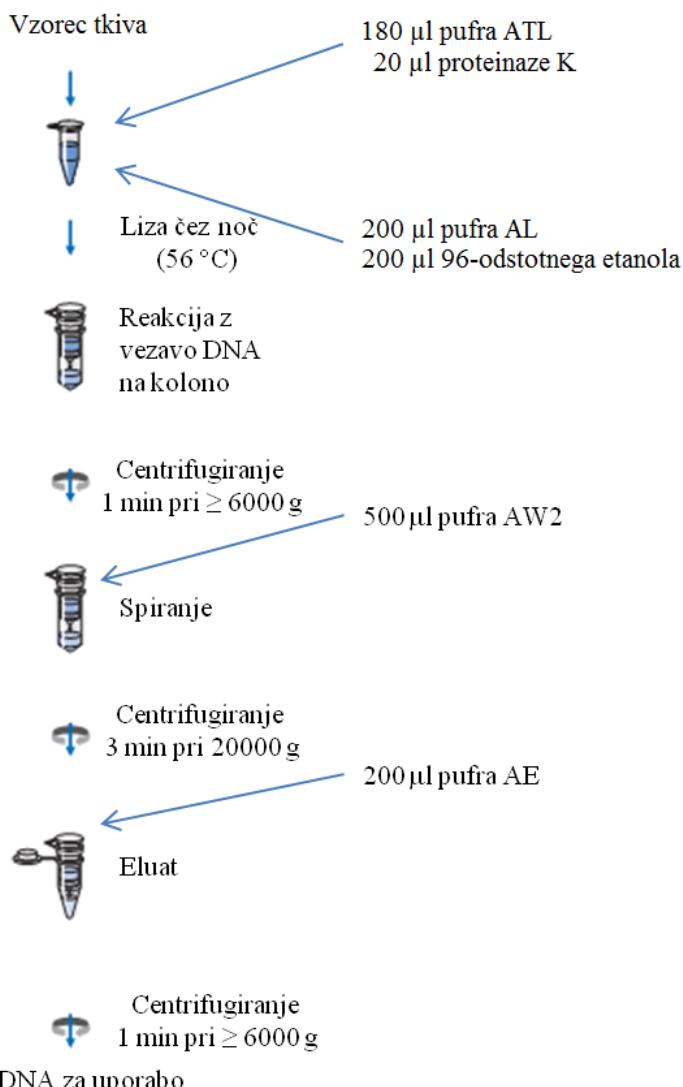
Ta – temperatura prileganja začetnih nukleotidov (angl. *annealing temperature*), 1:
Barendse in sod., 1999, 2: Jiang in sod., 2005

Delovno raztopino začetnih oligonukleotidov (10 pm/µl) smo pripravili iz založne raztopine (angl. *stock*) 250 pm/µl.

3.2.8 Izolacija DNA

3.2.8.1 Izolacija DNA iz mišičnega tkiva s kompletom reagentov

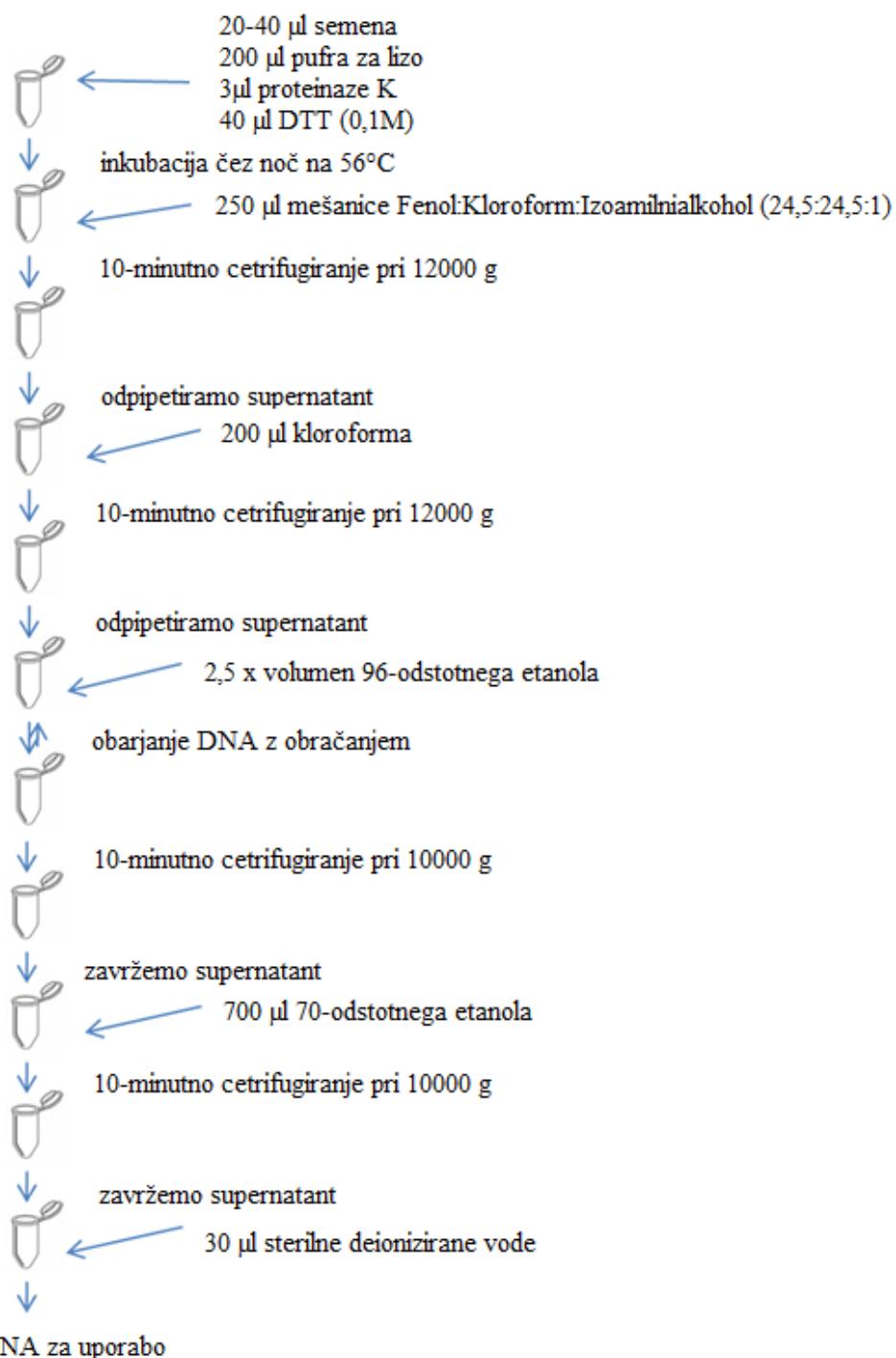
Izolacijo DNA iz mišičnega tkiva smo izvedli s kompletom reagentov QIAGEN-Dneasy Blood & Tissue Kit, kot je prikazano na sliki 9.



Slika 9: Protokol za izolacijo DNA s kompletom reagentov Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

3.2.8.2 Izolacija DNA iz semena bikov

DNA iz semena bikov smo izolirali s fenolno ekstrakcijo (slika 10), pri čemer smo spreminali začetni volumen semena.



Slika 10: Protokol za izolacijo DNA iz semena bikov s fenolno ekstrakcijo. DTT - ditiotreitol

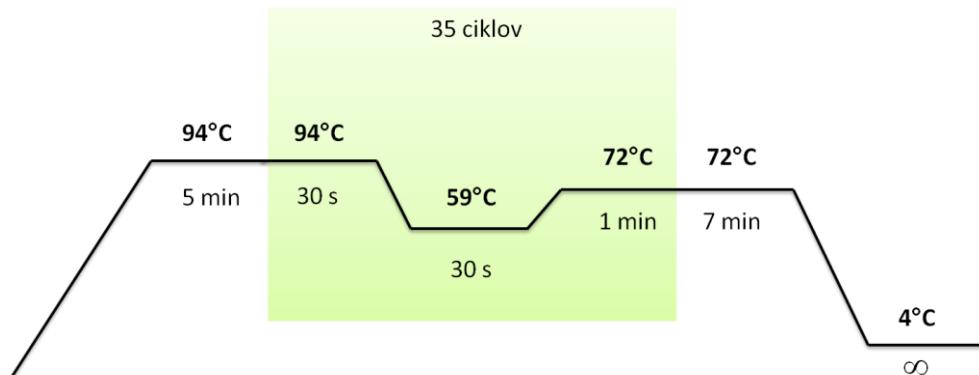
3.2.9 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Kemikalije, navedene v preglednici 2, smo pripravili v 1,5 - mililitrske mikrocentrifugirki, nato pa izhodiščno zmes razdelili v posamezne 0,2 - mililitrske mikrocentrifugirke, katerim smo na koncu dodali delovno razredčino raztopine izolirane DNA (50 ng/ μ l). Vse kemikalije, ki smo jih uporabili za PCR so bile od proizvajalca Fermentas.

Za PCR smo uporabili temperaturni program, ki je prikazan na sliki 11.

Preglednica 2: Izhodiščna zmes za PCR (angl. *PCR-master-mix*)

Volumen	Reagent
6,25 μ l	H ₂ O
1 μ l	10 × pufer za PCR
0,6 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
0,6 μ l	mešanica dNTP (dATP, dCTP, dGTP in dTTP)
0,25 μ l	začetni oligonukleotid F (angl. <i>forward, left</i>) (10 pmol/ μ l)
0,25 μ l	začetni oligonukleotid R (angl. <i>reverse, right</i>) (10 pmol/ μ l)
0,05 μ l	DNA polimeraze <i>Taq</i> (5 U/ μ l)
1 μ l	vzorčna DNA (50 ng/ μ l)
$\Sigma=10 \mu$ l	



Slika 11: Program za PCR

3.2.10 Elektroforeza na agaroznem gelu

Vse produkte izolacije DNA, PCR in restriktivne analize smo preverili na agaroznem gelu. Koncentracija gela je bila odvisna od dolžine pričakovanih odsekov ozziroma njegove uporabe.

Uspešnost izolacije DNA smo preverili na 0,8-odstotnem, produkte PCR in RFLP pa na 1-1,5-odstotnem agaroznem gelu v pufru TE, pri jakosti električnega toka 75-120 V (Pharmacia, Švedska).

3.2.11 Restrikcijska analiza (PCR-RFLP)

Izhodiščno zmes za RFLP (angl. *RFLP-master mix*) (preglednica 3) smo razdelili v posamezne mikrocentrifugirke, ki so vsebovale preverjen produkt PCR.

Preglednica 3: Izhodiščna zmes za RFLP (angl. *RFLP-master mix*)

Volumen	Reagent
2,8 µl	H ₂ O
1 µl	pufer za restrikcijski encim
0,2 µl	restrikcijski encim (10 U/µl)
6 µl	produkt PCR
$\Sigma=10 \mu\text{l}$	

3.2.11.1 Izdelava molekularno genetskih diagnostičnih testov

Za izdelavo molekularno genetskih diagnostičnih testov smo uporabili:

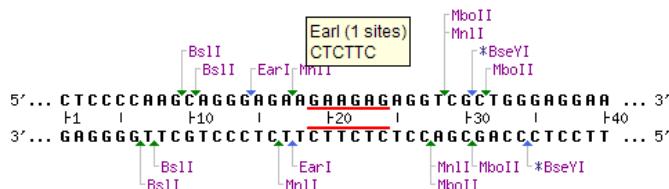
- za iskanje genetskega zaporedja: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)
- za iskanje ustreznih začetnih oligonukleotidov: Primer3:
(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)
- za iskanje restrikcijskih encimov: NEBcutter
(<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) in Webcutter 2.0
(<http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/>)

Z bioinformacijskim orodjem Primer3 smo našli začetne oligonukleotide za analizo nesinonimne zamenjave gvanina v citozin (G>C) v genu *RNASEN* (slika 12).

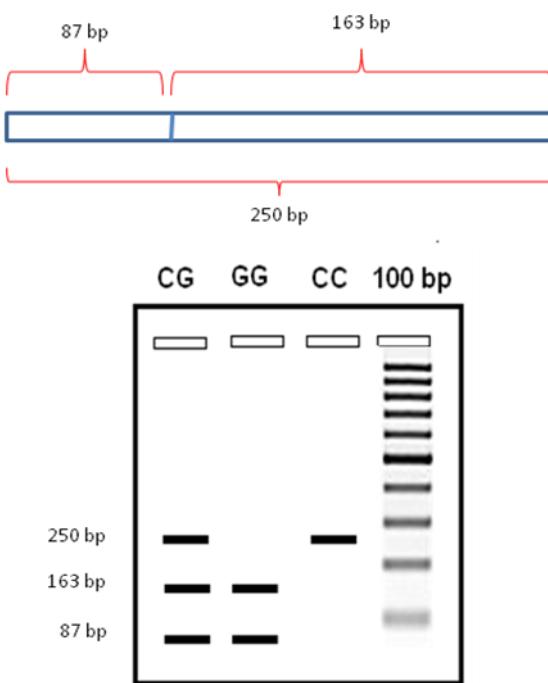
```
GGTTTTCATACAAACGAATATGGTGTTGGCATGACGTTTCTTTAGGTGACAAATGA
ACTAACAGTAAAATAGAAAAGTTTACAAGGAAAGAACATTAAATAGCCTCCCTCTGC
CCCCTTTGAAGTCGCTCCCCAAGCAGGGAGAAGAA [G>C] AGAGGTCGCTGGAGGAAGAA
AAAGACAGATGGAGTGACATCCGGCTCTGGCAAAGAGAAGAATTACCTCAATCAAGGA
AAAGGA
```

Slika 12: Nukleotidno zaporedje gena *RNASEN* z začetnima oligonukleotidoma in SNP-jem

Z bioinformacijskim orodjem NEBcutter smo našli restriktijski encim (*EarI*) s prepoznavnim mestom znotraj območja s SNP-jem, ki smo ga uporabili za restriktijsko analizo (slika 13). Po cepljenju produkta PCR z restriktijskim encimom smo pridobili odseke z dolžinami 163 bp in 87 bp (homozigot GG) (slika 14).



Slika 13: Restriktijski encim *EarI* za identifikacijo nukleotidne nesintonimne zamenjave G>C v genu
RNASEN



Slika 14: Shematski prikaz reakcije PCR-RFLP za analizo gena *RNASEN* z restriktijskim encimom *EarI* s prikazanimi dolžinami restriktijskih odsekov. 100 bp: označevalec velikosti.

3.2.12 Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja

Uspešnost reakcije PCR smo preverili na 1,5-odstotnem agaroznem gelu (6,4 µl). Produkte PCR smo očistili z uporabo Exonuclease I (*ExoI*) (Fermentas) in Shrimp alkaline phosphatase (SAP) (Fermentas) (preglednica 4).

Preglednica 4: Izhodiščna zmes za čiščenje produkta PCR

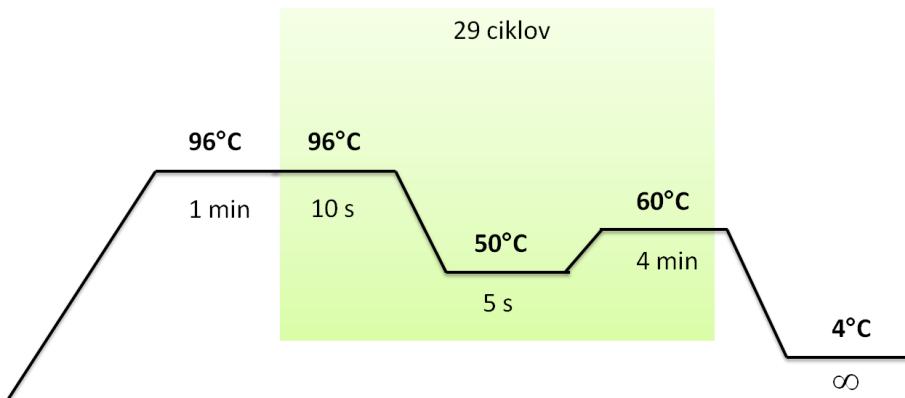
Volumen	Reagent
0,3 µl	<i>ExoI</i>
0,6 µl	SAP
0,6 µl	H ₂ O
3,5 µl	produkta PCR
$\Sigma=5 \mu\text{l}$	

Mešanico smo inkubirali 45 min pri 37°C in s to reakcijo razgradili začetne oligonukleotide, nato pa inkubirali še pri 80°C in tako inaktivirali encim.

Po čiščenju produkta PCR smo izhodiščno zmes (preglednica 5) vstavili v termo blok in uporabili program s pogoji za sekvenčno reakcijo prikazan na sliki 15.

Preglednica 5: Izhodiščna zmes za sekvenčno reakcijo

Volumen	Reagent
3,7 µl	H ₂ O
0,5 µl	začetni oligonukleotid (5' ali 3')
0,8 µl	BigDye 3.1
5 µl	PCR produkt + <i>ExoSAP</i>



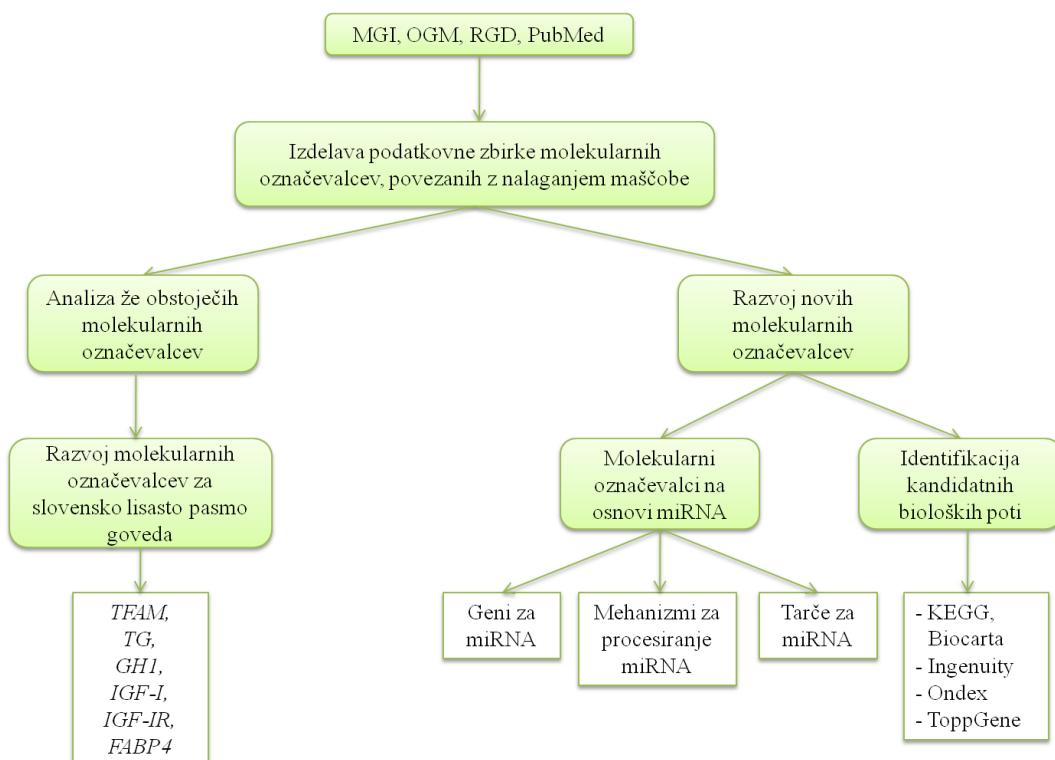
Slika 15: Program za sekvenčno reakcijo

Čiščenje produkta PCR po sekvenčni reakciji

Produktu PCR smo dodali 20 µl sterilne destilirane vode mili q (MQ). Zmes smo prestavili v označene 1,5-mililitrske mikrocentrifugirke. Vzorcu smo dodali 7,5 µl 125 mM EDTA in 90 µl 96-odstotnega etanola. Po 15-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi, smo vzorce centrifugirali pri najvišji hitrosti 20 min. Odlili smo supernatant in mikrocentrifugirke posušili v vakuumski centrifuggi. Posušenemu vzorcu smo dodali 10 µl formamida, vzorce prenesli na ploščo in jih denaturirali pri 92°C (2 min). S tako pripravljenimi vzorci smo izvedli kapilarno elektroforezo na ABI3130xl.

3.3 SHEMA INTEGRATIVNEGA GENOMSKEGA PRISTOPA

Na sliki 16 je prikazana celotna shema integrativnega pristopa dela. Najprej smo izdelali podatkovno zbirko vseh genov povezanih z nalaganjem maščobe. Na osnovi te zbirke smo obstoječe označevalce razvili za slovensko populacijo lisastega goveda, hkrati pa smo razvijali tudi nove molekularne označevalce na podlagi nekodirajočih RNA in bioloških poti.



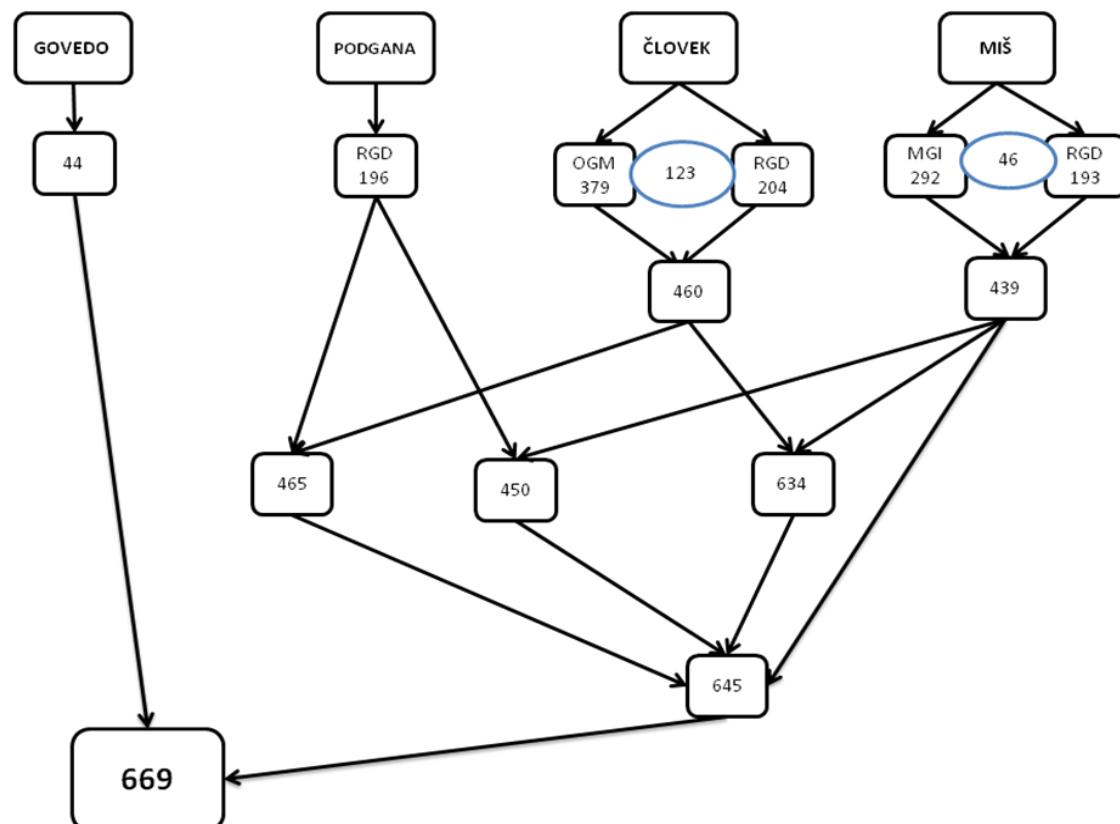
Slika 16: Shema integrativnega genomskega pristopa dela

4 REZULTATI

Kot osnova za delo nam je služila podatkovna zbirka, ki smo jo izdelali na podlagi vseh poznanih genov in miRNA povezanih z nalaganjem maščobe. Iz podatkovne zbirke smo nato izbrali sedem kandidatnih genov, za katere smo testirali njihovo polimorfnost pri slovenski populaciji lisastega goveda. Nove molekularne označevalce smo razvijali na podlagi nekodirajočih RNA in bioloških poti. Nekatere nove označevalce smo nato testirali na slovenski populaciji lisastega goveda.

4.1 IZDELAVA PODATKOVNE ZBIRKE GENOV POVEZANIH Z NALAGANJEM MAŠČOBE

V nalogi smo želeli zbrati vse gene, ki so bili v dosedanjih raziskavah povezani z nalaganjem maščobe.



Slika 17: Shema zbiranja genov kandidatov za nalaganje maščobe iz podatkovnih zbirk Rat genome database (RGD), Mouse genome informatics (MGI), zbirke genov za debelost pri človeku (OGM) in PubMed (govedo). Z modro je označeno prekrivanje genov med podatkovnimi zbirkami.

Primerjali smo kandidatne gene med štirimi vrstami sesalcev: človek, miš, podgana in govedo. Listo genov kandidatov za nalaganje maščobe smo izdelali s pomočjo treh podatkovnih zbirk Obesity gene map (OGM), Rat genome database (RGD) in Mouse genome informatics (MGI) ter literature povezane z debelostjo, nalaganjem maščobe in marmoriranostjo mesa (priloga B). Slika 17 prikazuje potek iskanja genov kandidatov za nalaganje maščobe.

V podatkovni zbirki MGI smo našli 292 genov povezanih z nalaganjem maščobe. V tem sklopu genov je v iskalni izraz nenormalna vsebnost belega maščobnega tkiva (angl. *abnormal WAT amount*) združenih več podskupin (odsotnost dermalnega maščevja (angl. *absent dermal adipose tissue*), odsotnost podkožnega maščevja (angl. *absent subcutaneous adipose tissue*), zmanjšana vsebnost abdominalnega maščevja (angl. *decreased abdominal adipose tissue amount*), zmanjšana vsebnost podkožnega maščevja (angl. *decreased subcutaneous adipose tissue amount*), zmanjšana vsebnost WAT (angl. *decreased white adipose tissue amount*) in povečana vsebnost WAT (angl. *increased white adipose tissue amount*).

Med obsežno zbirko genov povezanih z debelostjo pri miši, podgani in človeku v podatkovni zbirki RGD smo izbrali le potrjene gene. Tako smo dobili 196 genov povezanih z debelostjo pri podgani, 204 pri človeku in 193 pri miši.

Tristo devetinsedemdeset genov iz zbirke genov za debelost pri človeku smo primerjali z 204 geni iz podatkovne zbirke RGD pri tem se je 123 genov med podatkovnima zbirkama prekrivalo. Tako smo dobili 460 genov povezanih z debelostjo pri človeku. Podobno smo 193 genov iz podatkovne zbirke RGD primerjali z 292 geni iz podatkovne zbirke MGI, kjer je bilo 46 genov enakih, ter dobili 439 genov povezanih z nalaganjem maščobe pri miših. Teh 439 mišjih genov povezanih z maščobo, smo nato primerjali s 460 človeškimi geni povezanimi z debelostjo in 196 podganjimi geni iz podatkovne zbirke RGD. Presek med podganjimi in mišjimi geni je vseboval 450, med podganjimi in človeškimi 465, med mišjimi in človeškimi pa 634 genov povezanih z debelostjo. Na koncu smo naredili še primerjavo med podganjimi in človeškimi geni (465), podganjimi in mišjimi (450) ter med mišjimi in človeškimi (634) ter tako dobili 645 genov kandidatov. Seznam 645-ih genov smo nato primerjali še s 54 geni kandidati povezanimi z marmoriranostjo mesa, debelostjo

in nalaganjem maščobe pri govedu. Tako smo dobili 669 genov, ki so bili povezni z debelostjo pri človeku, miši, podgani ter govedu. Izdelana podatkovna zbirka nam je služila kot osnova za izbor označevalcev za genotipizacijo kot tudi za razvoj novih molekularnih označevalcev. Poleg genov, ki kodirajo proteine smo zbrali tudi 159 nekodirajočih RNA; miRNA, predhodno povezanih z nalaganjem maščobe.

4.2 GENOTIPIZACIJA ŽE OBSTOJEČIH MARKERJEV ZA NALAGANJE MAŠČOBE

Iz izdelane podatkovne zbirke smo izbrali sedem genov (*TFAM*, *DGAT1*, *GH*, *IGF1*, *IGR1R*, *TG* in *FABP4*), povezanih z nalaganjem maščobe, ki so bili predhodno že genotipizirani pri govedu in opisani v literaturi: *TFAM* (Jiang in sod., 2005), *DGAT1* (Winter in sod., 2002), *GH1* (Wu in sod., 2005), *IGF-I* (Ge in sod., 2001), *IGF-IR* (Curi in sod., 2005), *TG* (Barendse, 1999) in *FABP4* (Michal in sod., 2006). Želeli smo ugotoviti stopnjo polimorfnosti teh označevalcev v slovenski populaciji lisastega goveda. Za vsak SNP smo genotipizirali najmanj 12 vzorcev bikov iz slovenske populacije lisastega goveda (preglednica 6); (za gen *TFAM* 26 vzorcev bikov (slika 19) in za gen *TG* 200 vzorcev (31 vzorcev bikov in 169 potomcev) (slika 20).

Preglednica 6: Rezultati genotipizacije kandidatnih genov pri dvanajstih bikih lisaste pasme goveda

Ime bika	<i>TFAM</i>			<i>GH1</i>		<i>IGF-I</i>	<i>IGF-IR</i>	<i>TG</i>	<i>FABP4</i>
Horuk	AA	TT	TT	-	-	-	-	CC	CC CC
Huvar	AC	TC	TC	-	-	-	-	CC	CC CC
Hajduk	AC	TC		CC	TT	-	-	CC	CG CG
Horpal	AA	TT	TT	CC	TT	CC	-	TC	CC CC
Mangart	AA	TT	TT	-	-	-	-	CC	CC CC
Frik	AC	TC	TC	CC	CC	TC	-	TT	CC CC
Genom	AC	CC	CC	CC	TT	CC	GG	CC	CG GG
Manbi	AC	TC	TC	CC	TT	TC	AG	TC	CC CC
Rosalon	CC	CC	CC	CC	TT	TT	AG	CC	CC CG
Theodosien	AC	TC	TC	CC	TT	TC	AG	TC	CC CC
Zamorko	AA	TT	TT	CC	TT	TC	GG	CC	CC CC
Zlatko	-	-	-	TC	TT	TC	AG	CC	CC CC

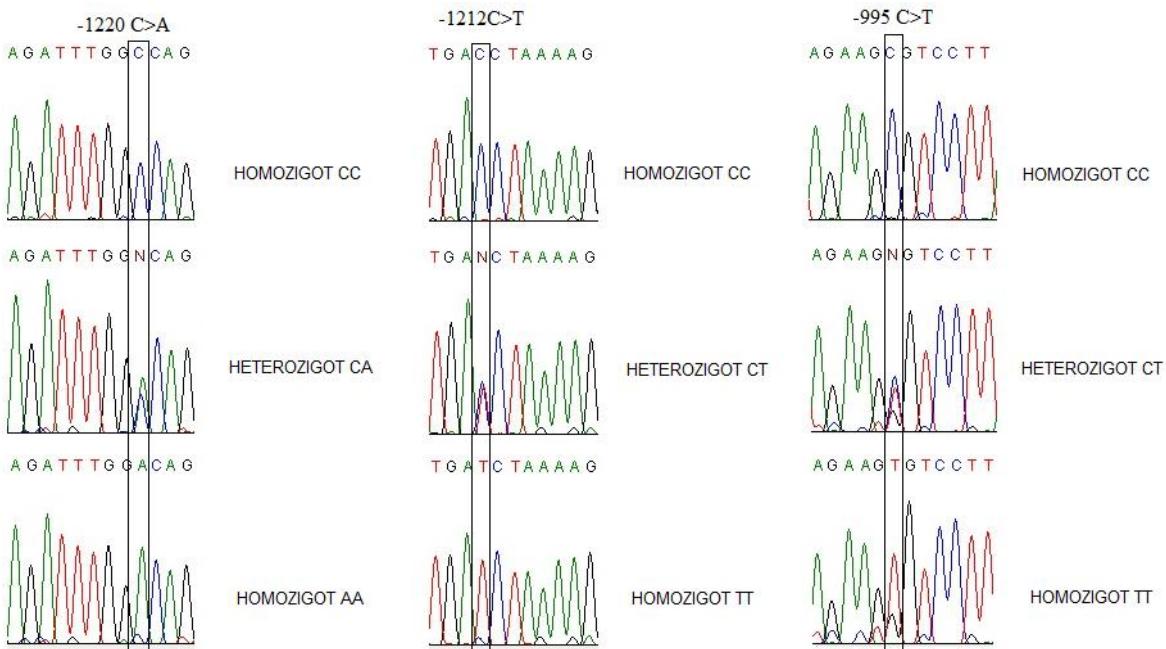
(-) ni podatka.

```

TAGATCAGATTATAAGAACCTTATAGCAAGGCTTATCAAATGACACTTTAAAACAACAAAGACTTTAAATATT
CAAAAAAATTTTATATCTATCAAACGTCGAAAGAATAAAAACACTCTAGAAAATGTAAAGAAAAAGTGTGTTG
CAGAAATCAGCTAAAATGTAATTATAAGGAATTCTATCCCATACTTTAGCTGACATTGAGTGAACTGTCA
TTCTTGCCTCTGCCACTAGACTCATGGCGGTGAAAAGAAGGCTGTGTTTTATCTAAGTTGTGGCCTTG
TACATAATGTGACTCAGAAAATAATCAAACAAACAAATCCAACCTGTTCTCCATGACAGAGTGAGAGATT
TGGACAGATGATCTAAAAGGCTCTTCAATACTGAGAATTTTAAAAGGAAGTGGTGTAGTTGCTTACCACT
TAGAATGGGCTTGGTGCCTGACTCACGGCCAGTGAAGAAGCTCTCAGCTCAATGACACTAGTAAGAATT
TCTTACAAACCTATCCAACAGAAAAAGCTGTTTCAAGGACTCTGAGAATTTGAAATGAAACCTGAGAGCTA
GAAGCGTCTTAGATAGCTTAGATAAGGTTATCTAATCTTTTCTGCCCCATGTCCACATGGAAAATGGCGG
TACTGCACATCGATCAAATCTCAAGGCATAATTGTACAGGTTCTCAGAGCTTGGTGGGAAATGATCTCGTC
CAACATCCTCGTCTGCAGTGGGGAAATTAAATCTACAGCAGGGAAAGTGAACATTTCAGATCAAGACGTAAATG
CAAATGATGGAGCTAGAACTCTAGTCTCCGGACAGATAACTAGTCAGTCTCCTCCCACAAAGTAAGCAGGGTTG
GATGTCAGCTGCGATTAGGTCAAGCGTAGTCAGTGGATGGCTATGGTCTGGATCTGTGTTGCTTAA
TGTGGTCCCATAACCACTGGCATCAGAGCTGTTAACCTTGAGGAACCTGTTAAATAGCTGAGACATGGGACC
CACACAAACACGGAATCAGGCTCTGCCAGGCGGAATCTGCATTAAAGGTTAGAAACACGTGATCCATCC
CACCTCTTACGGTAATTGGACTACCGCCTCCGACTGTAAGTGGGACTCTGCTGGGCGCATATGCCAG
CAACCTGACCTCAGAGCACGGTGGCGGACGGCTTACCGCGTTCTAGCGTAAACTGCTGTTACGTACTAGCC
CTTCCAGTCGTCAAAACAGCCAGGGCCCCATCGTGTGAGGACACCGCCGTGCTCCAATCAGCCTCTGGCC
GGGCGGCTGAGCAGGCTGCCGGGGGGTGGGGGGTGGGGTGGGACAGAGGGGCTCAGCTCGCCCCCTCGAG
GCCAGGTCCCTCCGCAGGCTAGCGGGTTGCAGTTCCCTCTCCGCCTCCGAGCGCCTTTTCTCGTAGTCCC
GCCCAACAGGAAGGCCAGTACAGCGCCTCGCGCTTCTACCTTGCCCCGCTCTAGCTAATCGGAAGTTAGCCGA
TTTCCCATAGTGCCTCCGGAGTGGCAGGCTGAGTGAATACCGTAGGCTCTCTGGGGGTTAAAGTCGGCTTT
GTTGGGTTCTCTTGTGCCAGGGCGTGTAGGGAAATTGGGGCTGGTCACTGCTTGTCTGCGGATGCAATGGC
GCTTCTCCGGGGCGTATGGGGCGTGTGAATGCGCTGGGAAAGTCAGGAGCGGATCTCTGCGGGCTGGCAG
TCGACTGCCCTCTCCCTTAAAGCTGCTTGCGTGCACCTTGAGGAGCGGAAGGGTTCAAGGACGCTTGGGG
TTAGAATGTAGACGCTGTTCTCCGTTCTGACCCCCCTGAAATGGTCAAGGACTGACTTAGCCCTGTGATTCCGA

```

Slika 18: Območje promotorja gena *TFAM* pri govedu s tremi SNP-ji -1220A>C, -1212T>C in -995T>C. Z zeleno barvo je označen ekson 1, z modro začetna oligonukleotida in z rumeno SNP-ji (Jiang in sod., 2005).



Slika 19: Prikaz treh polimorfizmov v promotorju gena *TFAM*. N: nukleotidna zamenjava adenin ali citozin ali timin.

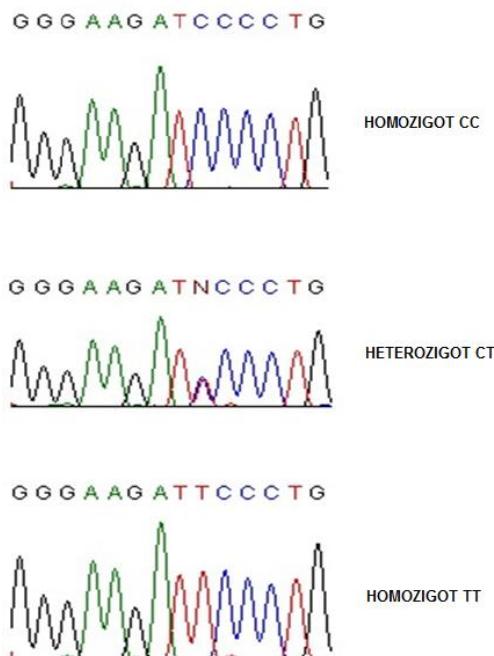
Za gen *TFAM* smo z določanjem nukleotidnega zaporedja analizirali območje dolgo 801 bp, v katerem so trije SNP-ji (slika 18). Poleg predhodno analiziranih 12 vzorcev bikov

smo nukleotidno zaporedje določili še ostalim 19 očetom. Rezultati genotipizacije so prikazani v preglednici 7.

Preglednica 7: Rezultati genotipizacije treh SNP-jev v promotorju gena *TFAM* pri vzorcih bikov

SNP	Genotipi	Število živali	Frekvenca (%)	Stopnja heterozigotnosti (%)
-1220A>C TGG A CAG	AA	12	46,15	50,00
	AC	13	50,00	
	CC	1	3,85	
		Σ=26	Σ=100	
-1212T>C TG A TCTAA	TT	5	19,23	57,69
	TC	15	57,69	
	CC	6	23,08	
		Σ=26	Σ=100	
-950T>C AAG C GTCC	TT	4	16,00	52,00
	TC	13	52,00	
	CC	8	32,00	
		Σ=25	Σ=100	

Z restrikcijsko analizo smo preverili genetsko variabilnost gena *TG*, ki je bil predhodno že povezan z nalaganjem maščobe (Barendse, 1999). Analizirali smo SNP 1696C>T. V preglednici 8 so predstavljeni rezultati analize zaporedja PCR-RFLP genetskih označevalcev z restrikcijskim encimom *PsuI*. Analizirali smo 31 vzorcev očetov in 169 vzorcev njihovih potomcev. Glede na izračunano stopnjo heterozigotnosti sklepamo, da so identificirani genetski označevalci srednje informativni in tako uporabni za nadaljnje asociacijske študije s fenotipskimi podatki.

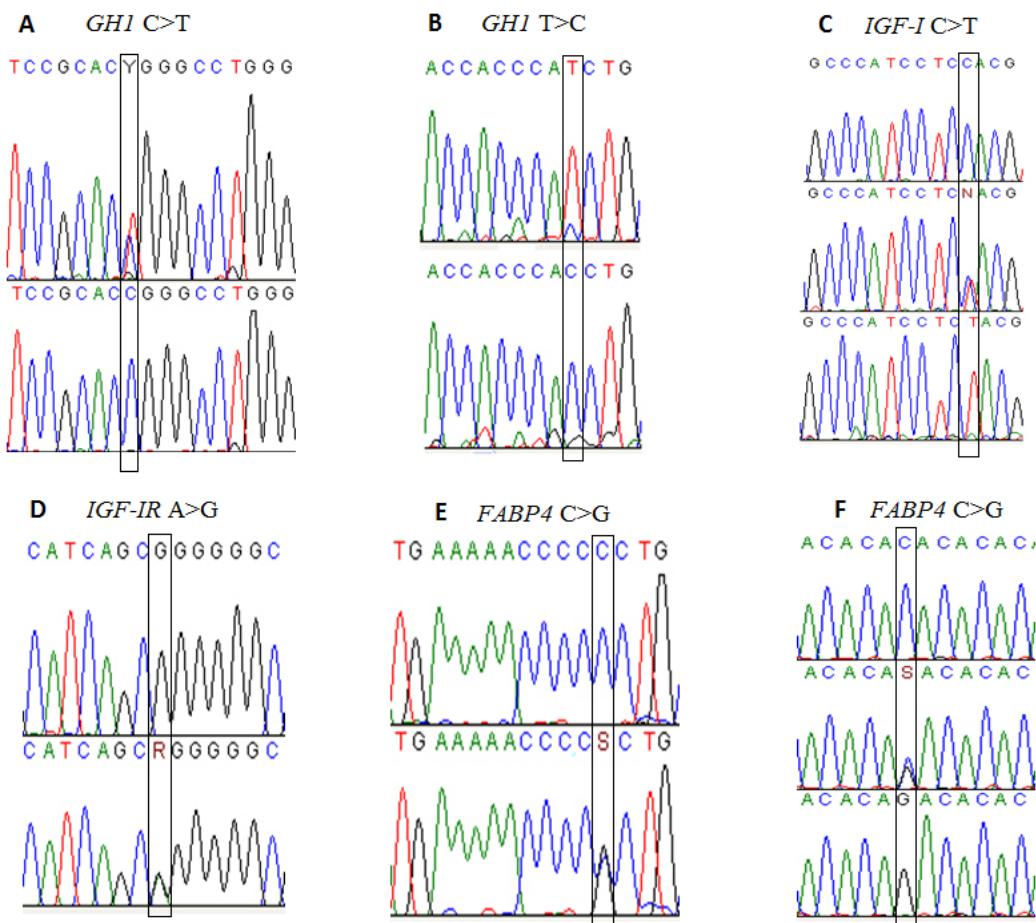


Slika 20: Prikaz polimorfizma 1696C>T gena *TG*. N: nukleotidna zamenjava citozina v gvanin

Preglednica 8: Rezultati restriktivne analize gena *TG* z restriktivnim encimom *PsuI* za 31 vzorcev bikov – očetov in 169 vzorcev potomcev

Analizirana skupina	Genotip	Število živali	Frekvenca (%)	Stopnja heterozigotnosti (%)
Očetje	CC	21	67,74	29,03
	TC	9	29,03	
	TT	1	3,23	
	$\Sigma=31$	$\Sigma=100$		
Potomci	CC	128	75,74	22,48
	TC	38	22,48	
	TT	3	1,78	
	$\Sigma=169$	$\Sigma=100$		
Skupaj	CC	149	74,50	23,50
	TC	47	23,50	
	TT	4	2,00	
	$\Sigma=200$	$\Sigma=100$		

Polimorfizmi znotraj genov *GH*, *IGF1*, *IGR1R* in *FABP4* so prikazani na sliki 21. Ugotovili smo, da je šest genov (*TFAM*, *GH*, *IGF1*, *IGR1R*, *TG* in *FABP4*) polimorfnih, *DGAT1* pa je v analizirani populaciji monomorfen.



Slika 21: Prikaz šestih polimorfizmov v genih, predhodno povezanih z nalaganjem maščobe. A: nukleotidna zamenjava C>T v genu *GH1*, B: nukleotidna zamenjava T>C v genu *GH1*, C: nukleotidna zamenjava C>T v genu *IGF-I*, D: nukleotidna zamenjava A>G v genu *IGF-IR*, E: nukleotidna zamenjava C>G v genu *FABP4* in F: nukleotidna zamenjava C>G v genu *FABP4*. Y: nukleotidna zamenjava citozina v gvanin, R: nukleotidna zamenjava adenina v gvanin, S: nukleotidna zamenjava citozina v gvanin

4.3 RAZVOJ NOVIH MOLEKULARNIH OZNAČEVALCEV

Poleg že obstoječih molekularnih označevalcev za nalaganje maščobe pri govedu smo razvili tudi nove označevalce v genih, ki so povezani z nalaganjem maščobe. Pri razvijanju označevalcev smo se osredotočili na 1) nekodirajoče RNA (miRNA) in 2) biooznačevalce na osnovi bioloških poti. Nekatere genetske označevalce smo preverjali na slovenski populaciji lisastega goveda in v sodelovanju z Washington State University (prof. dr. Jiang Zhihua) na populaciji križancev Wagyu X Limousin.

4.3.1 Molekularni označevalci na osnovi miRNA

Genetska variabilnost povezana z miRNA je prisotna na treh ravneh, in sicer v genih za miRNA, mehanizmu za procesiranje miRNA in tarčah za miRNA.

4.3.1.1 Geni za miRNA

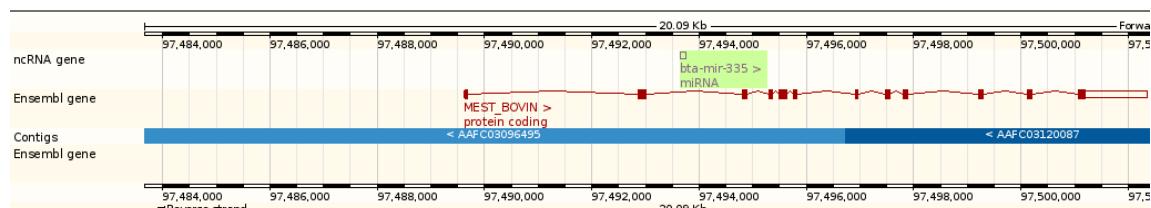
Ker je bilo dokazano, da se intronske miRNA izražajo skupaj z mRNA gostiteljskih genov smo želeli ugotoviti, če se pri govedu miRNA nahajajo znotraj genov, povezanih z nalaganjem maščobe. Prav tako nas je zanimalo, če so v območjih miRNA, ki je odgovorna za vezavo na mRNA prisotni SNP-ji.

4.3.1.1.1 Gostiteljski geni za miRNA

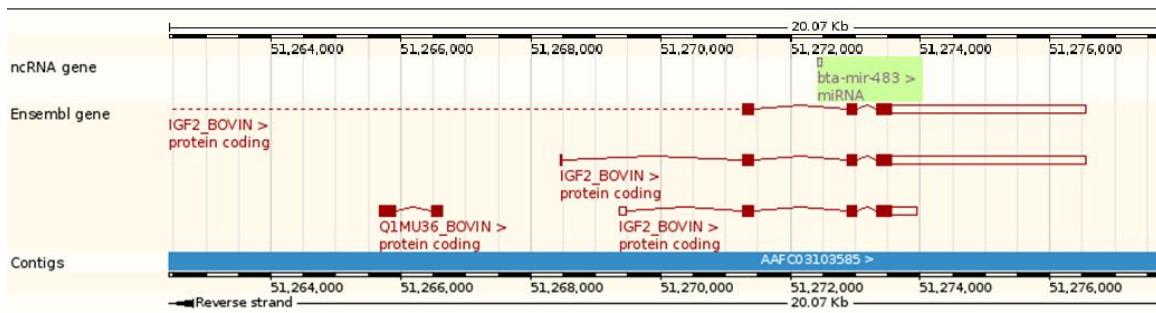
S primerjavo genomskeh lokacij genov za miRNA (miRBase) in genov, ki kodirajo proteine smo ugotovili, da se pri govedu 56 do sedaj znanih miRNA nahaja znotraj genov; govorimo o gostiteljskih genih za miRNA (preglednica 9). Ugotovili smo, da so izmed teh 56-tih gostiteljskih genov za miRNA z nalaganjem maščobe povezani trije geni: *IGF2*, *MEST* in *NEIL1*. Ker so za nadaljnje raziskave zanimivi le geni, v katerih je miRNA v smiselnem (angl. *sense*) smeri, smo se osredotočili le na dva gena, in sicer *MEST*, ki je gostiteljski gen za *bta-mir-335* (slika 22) in *IGF2*, znotraj katerega leži *bta-mir-483* (slika 23).

Preglednica 9: Gostiteljski geni za miRNA pri govedu

<i>A5PK67</i>	<i>HXB4</i>	<i>Q3MI06</i>
<i>A6QPP3</i>	<i>IF4A2</i>	<i>Q3SZ64</i>
<i>A6QQJ6</i>	<i>IGF2</i>	<i>Q58D99</i>
<i>A7E390</i>	<i>GBRA3</i>	<i>Q2NL14-2</i>
<i>A7E3C5</i>	<i>LOC521172</i>	<i>Q6VE48-2</i>
<i>A7YWF5</i>	<i>MCM7</i>	<i>Q7M2W1</i>
<i>A9CR99</i>	<i>MCP</i>	<i>Q7YRB1</i>
<i>ACADV</i>	<i>MEST</i>	<i>Q8MIK3</i>
<i>ACSF2</i>	<i>MYH7</i>	<i>R3HDM1</i>
<i>ANR54</i>	<i>NEIL1</i>	<i>RAC2</i>
<i>ARRB1</i>	<i>NFYC</i>	<i>RCL1</i>
<i>ASTN1</i>	<i>PANK3</i>	<i>RNF180</i>
<i>ATP2B2</i>	<i>PDE2A</i>	<i>RRN3</i>
<i>CCD55</i>	<i>PGCP</i>	<i>SKA2</i>
<i>CJ033</i>	<i>PTPRN</i>	<i>TBB2B</i>
<i>CL041</i>	<i>Q0P5K0</i>	<i>TBB3</i>
<i>COPZ1</i>	<i>Q0VBX2</i>	<i>TBB4</i>
<i>DYN1</i>	<i>Q148M4</i>	<i>USMG5</i>
<i>HNRPK</i>	<i>Q2T9S1</i>	



Slika 22: Prekrivanje *bta-mir-335* in gostiteljskega gena *MEST* pri govedu



Slika 18: Prekrivanje *bta-mir-483* in gostiteljskega gena *IGF2* pri govedu

Zanimalo nas je, če sta ti dve miRNA polimorfni, zato smo v podatkovni zbirki Ensembl preverili njuno genetsko variabilnost. Znotraj miRNA variabilnosti nismo odkrili; saj v genu *MEST* SNP-jev nismo našli, v genu *IGF2* pa se nahaja en intronski SNP, vendar ne

znotraj miRNA. Primerjava teh rezultatov z našo podatkovno zbirkovo miRNA povezanih z nalaganjem maščobe je pokazala, da je miR-335 predhodno že bila povezana z nalaganjem maščobe (Nakanishi in sod., 2009).

4.3.1.1.2 Genetska variabilnost miRNA v območjih, odgovornih za vezavo na mRNA

S pomočjo informacij v podatkovni zbirki Patrocles in objavljene literature (Mencia in sod., 2009; Lewis in sod., 2010) smo našli 18 SNP-jev, v območjih miRNA, ki so odgovorne za vezavo na mRNA (angl. *seed SNP*): 13 pri človeku (preglednica 10) in pet pri miših (preglednica 11). Pri človeku se omenjene polimorfne miRNA ne nahajajo znotraj genov za nalaganje maščobe. Pri miših pa sta dve miRNA medgenski, dve pa se nahajata znotraj intronov gostiteljskih genov. Ugotovili smo, da se pri miših Mir717 nahaja znotraj kandidatnega gena za nivo rasti (angl. *growth rates*) Glypican 3 (*Gpc3*) (preglednica 11) (Jevšinek Skok in sod., 2009; Kunej in sod., 2010b).

Preglednica 10: Trinajst miRNA s SNP-jem v območju odgovornem za vezavo na mRNA pri človeku

Oznaka miRNA	Oznaka SNP	Nukleotidna zamenjava
hsa-mir-938	rs12416605	G>A
hsa-mir-1304	ENSSNP10480642	T>C
hsa-mir-379	ENSSNP5999008	A>G
hsa-mir-1268	rs28599926	G>A
hsa-mir-1276	rs34381260	->A
hsa-mir-627	rs2620381	T>G
hsa-mir-662	rs9745376	G>A
hsa-mir-125a	rs12975333	G>T
hsa-mir-124-3	rs34059726	G>T
hsa-mir-499	rs3746444	A>G
hsa-mir-941-3	rs35544770	G>A
hsa-mir-513a-1	rs35027589	->G
hsa-mir-96	+13G>A +14C>A	G>A ¹ C>A ¹

1: Mencia in sod., 2009

Preglednica 11: Pet miRNA s SNP-jem v območju odgovornem za vezavo na mRNA pri miših

Oznaka miRNA	Oznaka SNP	Nukleotidna zamenjava	Lokacija
Mir654	rs36943496	A>G	Medgenski
Mir698	rs27569360	G>A	Prekrivanje z genom: <i>Inpp5b</i> (inozitol polifosfat-5-fosfataza B) (3'UTR, ekson 5),
Mir717	rs30372501	T>C (A>G)	Prekrivanje z genom: <i>Gpc3</i> , (glypican 3) (intron 3)
Mir743a	rs29048185	T>C (A>G)	Medgenski
Mir96	-	A>T ¹	-

1: Lewis in sod., 2010

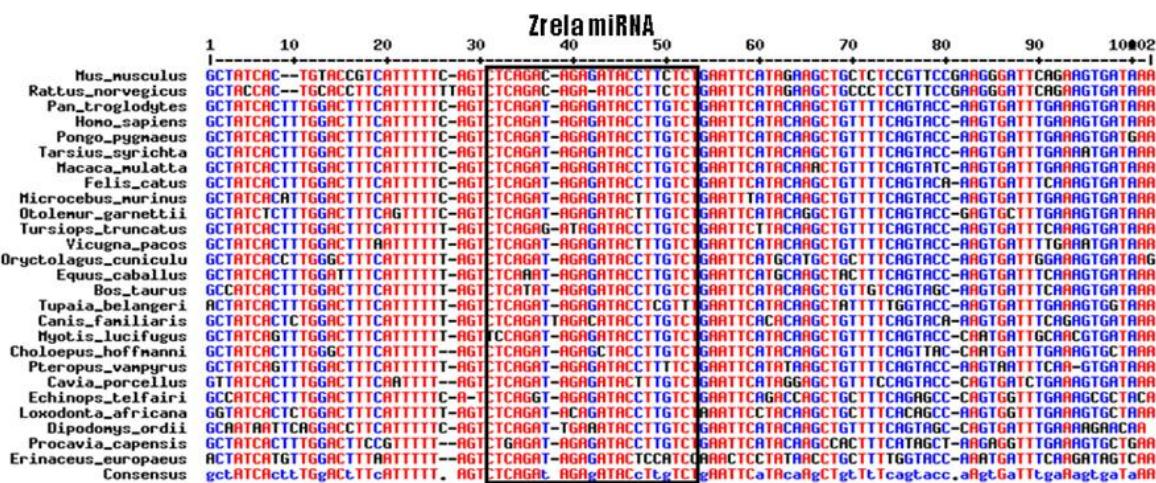
Z bioinformacijskim orodjem CoGemIR in pregledom literature smo ugotovili, da je Mir717 do sedaj potrjen (angl. *annotated*) le pri miših in človeku. Za ostale vrste, lahko na osnovi medvrstne primerjave nukleotidnih zaporedij, anotacijo le predpostavimo (slika 24).

The screenshot shows the CoGemIR search interface. The search parameters are set to: MicroRNA (mir-717), Species (All), Status (All), Localization (All), Overlapping gene (GPC3), and Annotation (Family, Conservation, miRBase, Genomic Coordinates, Species, Overlapping gene, Localization, #Intron/Exon, Status). The results table displays four entries:

MICRORNA	CONSERVATION	FAMILY	MIRBASE	GENOMIC COORDS	ORGANISM	OVERLAPPING GENE	LOCALIZATION	# INTRON/EXON	STATUS
ptr-mir-717	mir-717	mir-717	-	X: 133206516 - 133206614	Chimpanzee	sense GPC3	intron	4	E PREDICTION
hsa-mir-717	mir-717	mir-717	-	X: 132708441 - 132708539	Human	sense GPC3	intron	4	E PREDICTION
mml-mir-717	mir-717	mir-717	-	X: 131984770 - 131984872	Macaque	sense GPC3	intron	2, 4	E PREDICTION
mmu-mir-717	mir-717	mir-717	MI0004704	X: 49775584 - 49775692	Mouse	sense Gpc3	intron	4	ANNOTATED

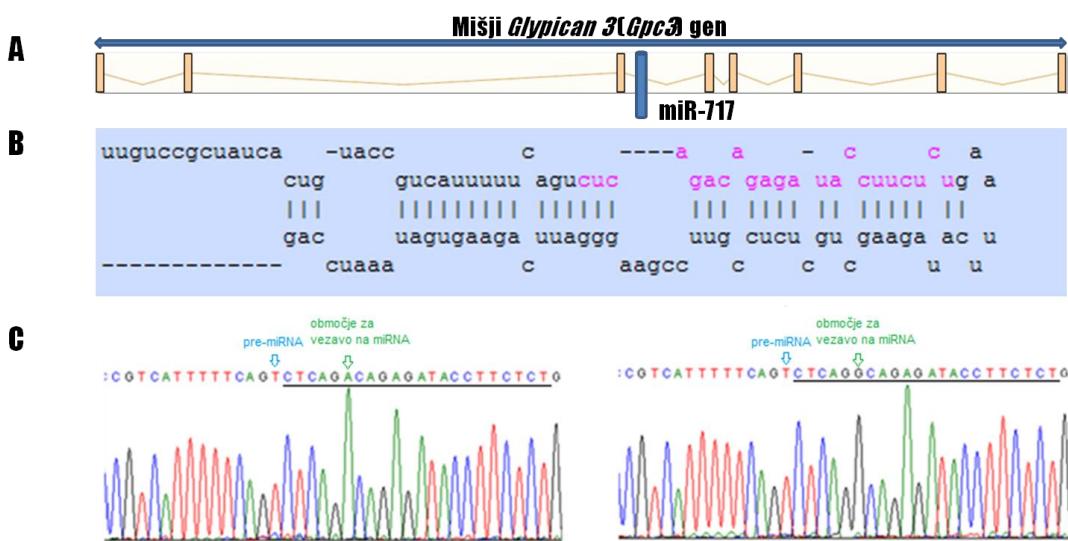
Slika 24: Rezultati iskanja miRNA znotraj gena *GPC3* s CoGemIR

Medvrstna primerjava nukleotidnega zaporedja potrjene Mir717 je pokazala visoko ohranjenost pri 26 vrstah sesalcev (slika 25).



Slika 25: Medvrstna primerjava nukleotidenga zaporedja *Mir717* pri 26-ih vrstah sesalcev

Zanimalo nas je, če je genetska variabilnost *Mir717*, ki se pri miših nahaja v intronu 3 gostiteljskega gena *Gpc3* povezana z nalaganjem maščob pri tej vrsti. Pri linijah miši, ki se razlikujejo v fenotipskih lastnostih povezanih z debelostjo smo analizirali odsek nukleotidnega zaporedja dolgega 475 bp, ki vsebuje zaporedje *Mir717*. Na sliki 26 je prikazana lokacija *Mir717* v mišjem genu *Gpc3* (slika 26A), nukleotidno zaporedje *Mir717*, pridobljeno iz podatkovne zbirke miRBase (slika 26B) in rezultati genotipizacije z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja *Mir717* (slika 26C). SNP v pre-miRNA (rs30373504) (T>C) je bil v naši populaciji miši monomorfen, potrdili pa smo variabilnost v območju miRNA, odgovornem za vezavo na mRNA (rs30372501) (A>G). Ugotovili smo, da je ta zamenjava potencialno lahko povezana z nalaganjem maščobe. Alel A je bil prisoten pri linijah miši C57BL/6J in DBA/2J, za kateri je značilno povišano nalaganje maščobnega tkiva (angl. *high fat strains*) in pri 25 od 26 primerjanih živalskih vrstah. Medtem ko je bil alel G prisoten le pri liniji 129/Sv (angl. *the lean line*), ki kaže nižje vrednosti za vse lastnosti povezane z debelostjo (maščoba v krvi, skupne telesne maščobe, masa posameznih maščobnih depojev, itd.) (Kunej in sod., 2010b).

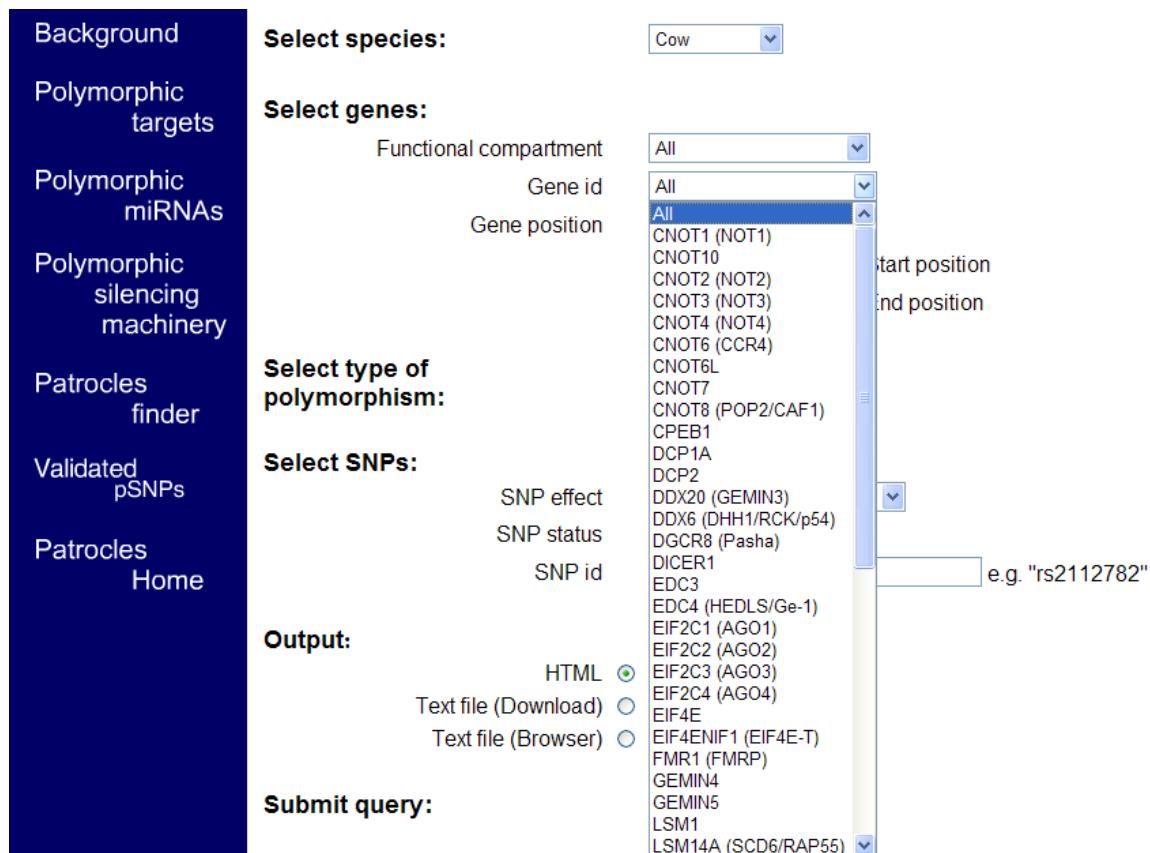


Slika 26: Genska organizacija in genetska variabilnost Mir717. A: lokacija Mir717 v mišjem genu *Gpc3*, B: nukleotidno zaporedje ter lasnična zanka Mir717, C: rezultat genotipizacije z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja *Mir717*

Želeli smo ugotoviti, če so tarče za Mir717 povezane z nalaganjem maščobe. Iskanje potencialnih tarč za Mir717 smo izvedli z uporabo orodij: DIANA-microT v3.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>), TargetScanHuman 5.0 (<http://www.targetscan.org/>), miRBase 13.0 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>), MirGen (<http://diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>), miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) in PITA (<http://genie.weizmann.ac.il/index.html>). Zbrali smo 2610 genov, ki so potencialne tarče Mir717. Analiza je pokazala, da je med njimi le osem potencialnih tarčnih genov, ki smo jih našli z vsemi petimi orodji hkrati (*2010002N04Rik*, *Camta1*, *Coq4*, *Dwdd*, *Dixdc1*, *Spry1*, *Spy in Tyro3*). Primerjava tarčnih genov Mir717 in naše podatkovne zbirke kandidatnih genov za nalaganje maščobe je pokazala, da je bilo 91 tarčnih genov predhodno že povezanih z nalaganjem maščobe.

4.3.1.2 Genetska variabilnost mehanizma za procesiranje miRNA

V podatkovni zbirki Patrocles se nahajajo tudi podatki o genetski variabilnosti proteinov za procesiranje miRNA (angl. »*polymorphic silencing machinery*«) (slika 27).



The screenshot shows the Patrocles web interface with a sidebar on the left containing links: Background, Polymorphic targets, Polymorphic miRNAs, Polymorphic silencing machinery, Patrocles finder, Validated pSNPs, and Patrocles Home. The main area has the following sections:

- Select species:** Cow
- Select genes:**
 - Functional compartment: All
 - Gene id: All
 - Gene position: All (highlighted in blue)
 - Start position: CNOT1 (NOT1)
 - End position: CNOT10
- Select type of polymorphism:**
- Select SNPs:**
 - SNP effect: All
 - SNP status: All
 - SNP id: All (highlighted in blue)
 - e.g. "rs2112782"
- Output:**
 - HTML (radio button selected)
 - Text file (Download) (radio button)
 - Text file (Browser) (radio button)
- Submit query:**

Slika 27: Iskanje genetske variabilnosti mehanizmov za procesiranje miRNA s podatkovno zbirko Patrocles

Podatkovna zbirka vsebuje 13 polimorfnih genov, ki kodirajo proteine udeležene pri procesiranju miRNA pri govedu, 49 pri človeku in 35 pri miših. Te gene smo primerjali z našo podatkovno zbirko genov kandidatov za nalaganje maščobe (priloga B). Pri človeku se prekrivajo trije geni: *RNASEN* (Ribonuclease III), *FMR1* (angl. *Fragile X mental retardation 1*) in *ZFP36* (angl. *Zinc finger protein 36*) (slika 28).



Slika 28: Proteini udeleženi pri procesiranju miRNA povezani z nalaganjem maščob

Pri miših in govedu je izmed genov, ki kodirajo proteine udeležene pri procesiranju miRNA z nalaganjem maščobe povezan le gen *RNASEN*. Gen *RNASEN* je bolj znan kot *Drosha*, ki je ključen za procesiranje miRNA. Gen je zanimiv za analizo tudi pri govedu, saj smo iz podatkovne zbirke MGI pridobili podatek, da izničenje (angl. *knock out*) tega gena povzroči prekomerno nalaganje maščobe in zmanjšano vsebnost mišičnine pri miših.

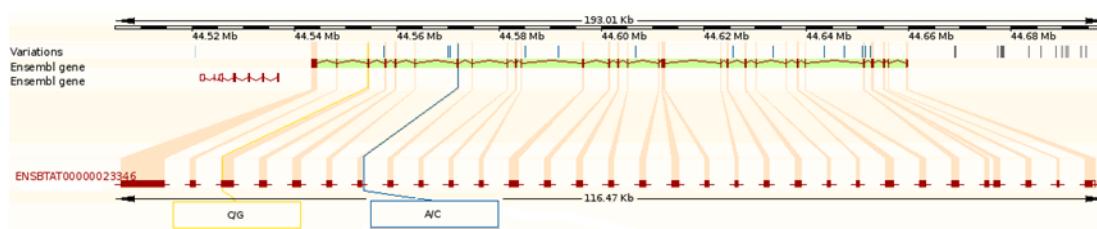
S podatkovno zbirko Patrocles smo poiskali vse SNP-je genov za procesiranje miRNA v celotnem genomu vsake vrste posebej. Ugotovili smo, da se SNP-ji znotraj človeškega genoma pojavljajo v štirih genih in sicer v genu *DICER1* šest SNP-jev, *RNASEN* pet SNP-jev, v genu za exportin 5 (*XPO-5*) devet SNP-jev in v genu *DGCR8* (Pasha) šest SNP-jev.

Osredotočili smo se na gen *RNASEN*, za katerega smo primerjali število SNP-jev med vrstami (preglednica 12). Pri človeku so znani štirje, kokoši dva, govedu eden, psu trije in pri miših devet SNP-jev znotraj tega gena.

Preglednica 12: SNP-ji znotraj gena *RNASEN* za človeka, kokoš, govedo, psa in miš

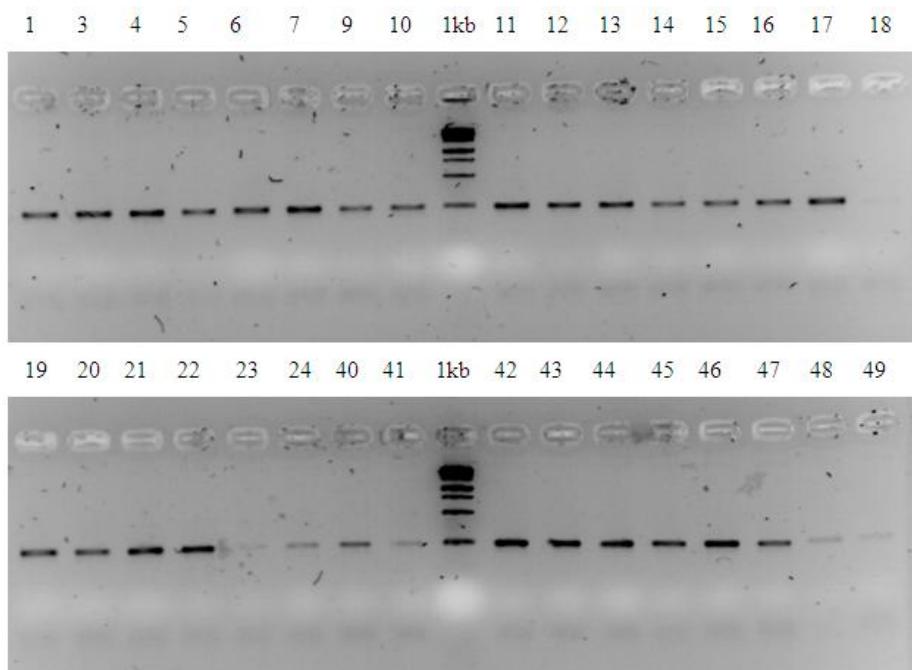
Clovek	Kokoš	Govedo	Pes	Miš
rs12517177	rs14202816	rs41946228	rs24101032	rs31936126
rs1559205	rs15115314		rs8779253	rs32495802
rs17485810			rs9061622	rs36241077
rs35342496				rs36376267
rs35745393				rs36962728
				rs37373727
				rs37774551
				rs38952848
				rs39112329

V podatkovni zbirki Ensembl smo našli dva SNP-ja v genu *RNASEN* pri govedu; enega v eksonu 3 in drugega v intronu 7 (slika 29).

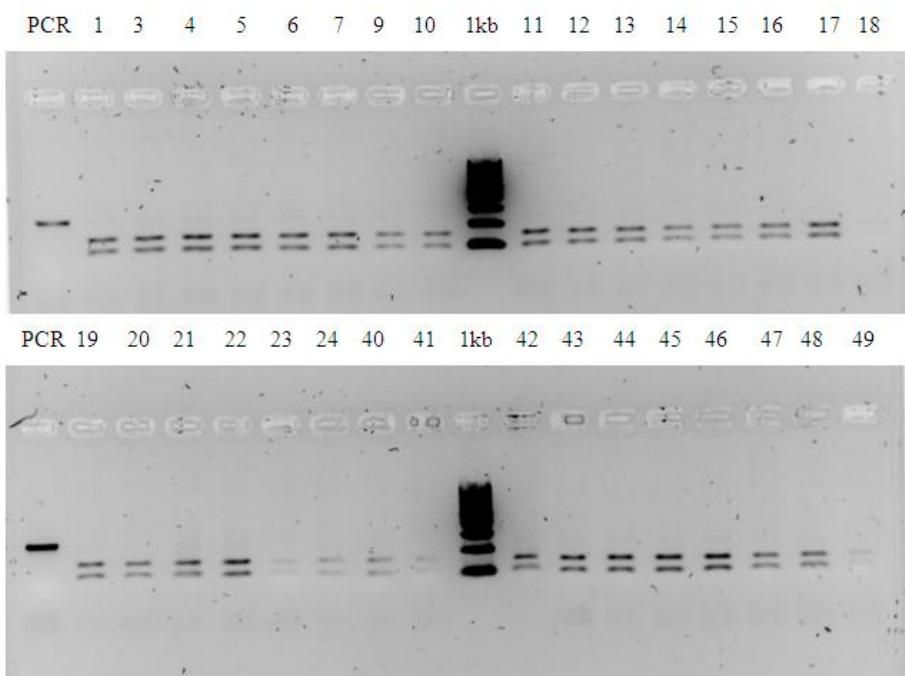


Slika 29: Genetska variabilnost gena *RNASEN* pri govedu

Za analizo smo izbrali SNP (rs41946228) v eksonu 3 gena *RNASEN* z zamenjavo C>G. Ta povzroči nesinonimo zamenjavo aminokisline lizin v asparagin. Iz podatkovne zbirke Ensembl smo pridobili nukleotidno zaporedje eksona 3 gena *RNASEN*, ter na njem našli omenjeni SNP. Izdelali smo diagnostični test, s katerim smo z metodo PCR-RFLP genotipizirali nesinonimno zamenjavo. Na slovenski populaciji lisaste pasme goveda, smo preverjali polimorfnost tega gena, vendar polimorfizma nismo potrdili; vseh 32 vzorcev potomcev je bilo homozigotnih GG (slika 30, slika 31).



Slika 30: Preverjanje produkta PCR gena *RNASEN* pri vzorcih očetov- bikov v progenem testu



Slika 31: Restriktijska analiza za SNP (rs41946228) v eksonu 3 gena *RNASEN* z zamenjavo C>G na vzorcih potomcev bikov z restriktijskim encimom *EarI*

4.3.1.3 Genetska variabilnost tarč za miRNA

SNP-je v tarčah za miRNA (miR-TS-SNP) smo iskali na dva načina:

1. v podatkovni zbirk Patrocles smo pregledali vse do sedaj poznane SNP-je v tarčah za miRNA pri govedu in ugotavliali, če so tarčni geni predhodno že bili povezani z nalaganjem maščobe (če spadajo v skupino 669 genov iz naše podatkovne zbirke), in
2. na daljši način - ročno, s pomočjo povezave informacij o lokaciji SNP-jev na mestih za vezavo na mRNA, ki smo jih ugotavliali s programom MicroCosm.

4.3.1.3.1 Iskanje polimorfnih tarč za miRNA s podatkovno zbirko Patrocles

V podatkovni zbirki Patrocles smo poiskali vse polimorfne tarčne gene za miRNA pri govedu in jih primerjali z bazo 669 genov kandidatov za debelost (priloga B). Našli smo štiri gene povezane z debelostjo, ki vsebujejo SNP na mestu vezave miRNA: *ASPA*, *GLUL*, *GPR37* in *PKLR* (preglednica 13).

Preglednica 13: Polimorfne tarče za miRNA v genih kandidatih za nalaganje maščobe *ASPA*, *GLUL*, *GPR37* in *PKLR* pridobljene iz podatkovne zbirke Patrocles

Oznaka SNP-ja	Kromosom	Nukleotidna zamenjava	Ime gena	Tarčno mesto za miRNA	miRNA	
rs41597277	19	C>T	<i>ASPA</i> (aspartoacylase)	AGTGCCTT GTGCCTTG TGCCTTGA	-	
rs42572268	16	C>T	<i>GLUL</i> (glutamate-ammonia ligase)	GTCTTCCA	bta-miR-7	
rs42447468	4	G>A	<i>GPR37</i> (G protein-coupled receptor 37)	ACTGTATA	-	
rs41255486	3	A>G	<i>PKLR</i> (pyruvate kinase)	ATACCTCA TACCTCAG	TACCTCGG	-

(-) ni podatka

4.3.1.3.2 Iskanje polimorfnih tarč za miRNA s primerjavo podatkovnih zbirk Ensembl in MicroCosm

Za iskanje polimorfnih miRNA tarč smo primerjali podatke iz zbirke Ensembl release 58 (informacije o genetski variabilnosti) in MicroCosm (podatki o potencialnih miRNA tarčah). Večina dosedanjih raziskav in bioinformacijskih orodij se pri analizi vezave miRNA osredotoča na območja 3'UTR, zato nas je zanimalo število SNP-jev v njih. Za 669 genov za nalaganje maščobe, smo preverili genetsko variabilnost v območjih 3'UTR. V podatkovni zbirki MicroCosm smo poiskali miRNA tarčne gene za govedo (priloga C). Ugotovili smo, da je pri govedu 81 genov povezanih z nalaganjem maščobe vsebovalo skupaj 200 SNP-jev v območjih 3'UTR (preglednica 14).

Preglednica 14: Enainosemdeset genov za nalaganje maščobe z 200 SNP-ji v območju 3'UTR in pripadajočimi miRNA tarčami

Ime gena	Število SNP-jev v 3'UTR	miRNA (miR-)
<i>ACP1</i>	1	380-5p
<i>ADA</i>	1	let-7d, 24, 140, 29c, let-7i, let-7g, let-7a, let-7f, 27a, 27b, 29b
<i>ADIPOR1</i>	1	151*, 122, 191
<i>ADM</i>	1	34a, 25, 20a, 92, 26a, 26b, 93, 25, 20b, 365, 18b, let7a*, 18a, 532,
<i>AK1</i>	1	423, 142, 24
<i>ALPL</i>	1	10a, 10b
<i>APOC3</i>	1	let-7a, let7d, let-7c, 138, 145, 151*
<i>ARHGAPI1</i>	1	214, let-7e, let-7d, let7c, 210
<i>ASPA</i>	1	181b, 181c, let-7i, 545, 181a, 21, 122, 142, 380-5p, 124a, 10a
<i>BUB3</i>	1	215, 192, 374, 132
<i>CAV3</i>	1	101, 139, 19a, 199a-3p, 218
<i>CD36</i>	1	101, 126
<i>CDKN1B</i>	1	193a, 191
<i>CTSC</i>	1	23a, 17-3p, let-7a*, 23b, 487b
<i>CXCL14</i>	1	200a, 200c
<i>EFEMP1</i>	1	139, 140, 29b, 7, 193a*, 29c, 186, 106, 17-5p, 365, 20a, 29a
<i>GHRHR</i>	1	320, 66
<i>GLO1</i>	1	-
<i>GNAS</i>	1	497, 15b, 15a, 218
<i>GPR37</i>	1	29b, let-7a, 29c, 29a, 18a, 18b, 193a, 142, 450
<i>GYS1</i>	1	-
<i>IFRD1</i>	1	374, 193a, 150
<i>IGFBP6</i>	1	545, 660, 29a, 132, 150
<i>IL6</i>	1	181c, 22-5p, let-7g, 455, 181a, let-7f, let-7a, 532, 365, 23b, 23a, 221, 132
<i>INPPL1</i>	1	101, 193a*, 193a, 205, 24, 331, 342, 29b, 29c, 99a, 99b
<i>KCNJ11</i>	1	-
<i>LEF1</i>	1	545, 199a-5p, 192
<i>LRPAP1</i>	1	200c, 200b, 125b, 210, 425-3p, 125a, 148b, 148a
<i>MEN1</i>	1	484
<i>PCSK1</i>	1	26a, 26b, 145, 7, 122, 106, 20b, 140, 660, 17-5p, 126
<i>PEG3</i>	1	26b
<i>PKLR</i>	1	122
<i>PLA2G1B</i>	1	-
<i>PLIN</i>	1	425-5p
<i>PPPIR3C</i>	1	365, 34b, 34a, 103, 200a, 10b, 99b, 99a
<i>PRKCB</i>	1	380-3p, 26b, 200b, 191

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime gena	Število SNP-jev v 3'UTR	miRNA (miR-)
<i>PTPNS1</i>	1	27a, 27b, 31, 128a, 499, 29b, 29a
<i>RBP4</i>	1	-
<i>SLC12A2</i>	1	26a, 26b, 101, 369-3p, 200a, 210, 126
<i>SLC17A6</i>	1	-
<i>SLC27A1</i>	1	151*
<i>SLC2A4</i>	1	199a-5p, 199b, 20a, 20b, 93, 106
<i>SLC30A7</i>	1	101, 320, 425-3p, 487b
<i>SLC6A14</i>	1	23a, 23b, 374, 199a-3p
<i>SOAT2</i>	1	423, 181c, 205, 455*, 181b, 181a, 101, 222, 29b, 210, 127, 132
<i>SQLE</i>	1	186, 139, 27a, 27b, 128a, 200b, let-7a*, 200c, 199a-5p , 151, 199b , 205, 22-5p
<i>SREBF1</i>	1	19a, 21, 192, 215
<i>THBD</i>	1	-
<i>THRA</i>	1	140, 200c, 374, 27a, 27b, 532
<i>TOMM2</i>	1	23a
<i>WRN</i>	1	139, 545*, 142*, 26b, 221, 222, 26a, 18b, 29b, 450, 369-5p
<i>ZFAND5</i>	1	10a, 10b, 151, 145, 30c
<i>ADAMTS1</i>	2	151*, 455, 139, 127
<i>BCAT2</i>	2	122, 92, 192
<i>ESD</i>	2	200a
<i>GCK</i>	2	-
<i>GNG3</i>	2	27a, 27b, 210
<i>RAB6B</i>	2	142, 20a, 18b, 15b, 195, 221, 18a, 17-5p, 106, 99b
<i>RGS5</i>	2	7, 499
<i>SCP2</i>	2	660, 7, 210, 199a-3p
<i>SFRP1</i>	2	-
<i>TLR4</i>	2	151
<i>TWIST2</i>	2	140, 331, 380-5p, 18b, 18a
<i>UQCRC1</i>	2	-
<i>ADCYAP1</i>	3	150, 145, 361
<i>DOK1</i>	3	125a, 125b, 204, 142*, 331, let-7a*, 532, 127
<i>SCD5</i>	3	205
<i>IL1RN</i>	4	-
<i>NEIL1</i>	4	145, 218, 425-3p, 127
<i>PDYN</i>	4	34a, 193a
<i>DPT</i>	5	205
<i>HEXB</i>	5	-
<i>RELA</i>	5	660

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime gena	Število SNP-jev v 3'UTR	miRNA (miR-)
<i>SLC2A2</i>	5	199a-5p, 199b, 200a, 101
<i>IL1B</i>	7	31, 331, 221, 320, 484
<i>RAD23B</i>	7	150, 20b, 93,
<i>LEP</i>	8	23b, 138
<i>GPD2</i>	9	-
<i>LPL</i>	14	-
<i>PRKAG3</i>	18	-
<i>GLUL</i>	20	-

Z rdečo bravo so označene miRNA, katerih vezavno mesto se prekriva s SNP-jem v 3'UTR tarčnega gena.

(-) ni znanih vezavnih mest za miRNA

Ugotovili smo, da se pri treh genih SNP-ji znotraj 3'UTR nahajajo na potencialnih mestih vezave za miRNA: *SQLE* (squalene epoxidase), *GNG3* (guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3) in *RELA* (v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)).

Podatke o območju miRNA, odgovornem za vezavo na mRNA smo preverili v podatkovni zbirki TargetScan in jih primerjali z nukleotidnimi zaporedji tarčnih genov. Preglednica 15 prikazuje ime SNP-ja ter miRNA, ki ima vezavno mesto v teh treh genih kandidatih za nalaganje maščobe.

Preglednica 15: SNP-ji znotraj vezavnega mesta miRNA pri govedu

Ime gena	miRNA	SNP
<i>SQLE</i>	bta-miR-199	rs41255579
<i>GNG3</i>	bta-miR-210	rs42189265
<i>RELA</i>	bta-miR-660	rs43109568

4.3.2 Identifikacija kandidatnih bioloških poti in genskih mrež

Želeli smo identificirati biološke poti, v katere so vključeni geni iz naše podatkovne zbirke genov, povezanih z nalaganjem maščobe, ter na ta način razviti nove biooznačevalce.

4.3.2.1 KEGG, Biocarta

Analizo smo izvedli v sodelovanju s skupino z univerze King Abdullah University of Science and Technology (KAUST) iz Savdske Arabije. Naš seznam genov za nalaganje

maščobe smo primerjali s podatkovno zbirko proteinskih interakcij (Chuang in sod., 2007). Na ta način smo identificirali 30 bioloških poti, ki so bile statistično pomembno povezane z našim seznamom genov (Kunej in sod., 2010a).

V preglednici 16 so prikazane biološke poti (KEGG, Biokarta), povezane s kandidatnimi geni za nalaganje maščobe pri človeku.

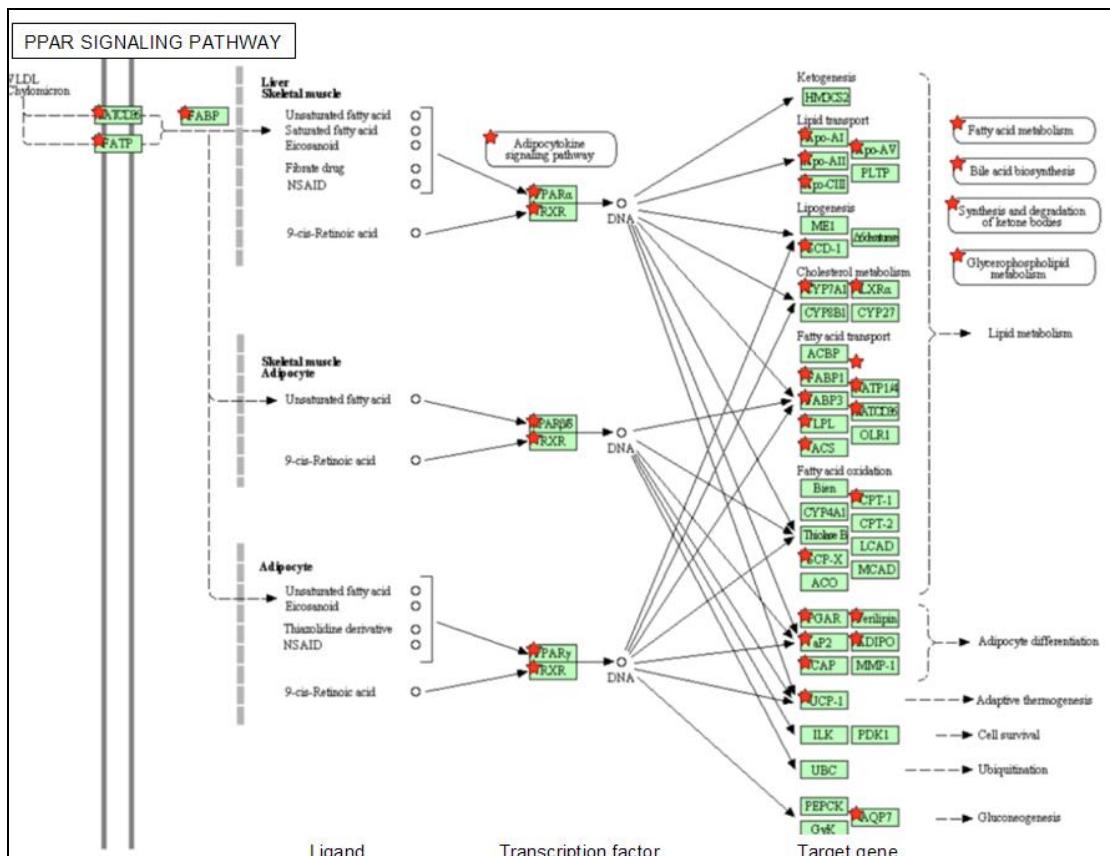
Preglednica 16: Seznam bioloških poti povezanih s 669 kandidatnimi geni za nalaganje maščobe pri človeku

Podatkovna zbirka	Biološka pot	Število genov	P-vrednost
KEGG_PATHWAY	Adipocytokine signaling pathway	36	1,36E-23
KEGG_PATHWAY	Neuroactive ligand-receptor interaction	68	5,06E-23
KEGG_PATHWAY	PPAR signaling pathway	32	1,55E-18
KEGG_PATHWAY	Insulin signaling pathway	38	1,32E-13
KEGG_PATHWAY	Type II diabetes mellitus	21	8,51E-12
KEGG_PATHWAY	Prostate cancer	22	5,15E-07
KEGG_PATHWAY	Acute myeloid leukemia	17	1,31E-06
KEGG_PATHWAY	Aldosterone-regulated sodium reabsorption	14	2,35E-06
KEGG_PATHWAY	Pathways in cancer	46	6,67E-06
KEGG_PATHWAY	Chronic myeloid leukemia	18	1,14E-05
KEGG_PATHWAY	Pancreatic cancer	17	2,70E-05
BIOCARTA	Visceral Fat Deposits and the Metabolic Syndrome	8	2,01E-06
KEGG_PATHWAY	mTOR signaling pathway	14	4,16E-05
KEGG_PATHWAY	Melanoma	16	8,98E-05
KEGG_PATHWAY	ErbB signaling pathway	17	2,94E-04
KEGG_PATHWAY	Non-small cell lung cancer	13	2,76E-04
BIOCARTA	Mechanism of Gene Regulation by Peroxisome Proliferators via PPAR α (alpha)	16	3,52E-05
KEGG_PATHWAY	Jak-STAT signaling pathway	24	4,36E-04
KEGG_PATHWAY	Bladder cancer	11	4,95E-04
KEGG_PATHWAY	Maturity onset diabetes of the young	8	0,00126
KEGG_PATHWAY	Glioma	13	0,001207
KEGG_PATHWAY	Colorectal cancer	15	0,001893
KEGG_PATHWAY	Small cell lung cancer	15	0,001893
KEGG_PATHWAY	Neurotrophin signaling pathway	19	0,002323
KEGG_PATHWAY	Endometrial cancer	11	0,002833
KEGG_PATHWAY	Thyroid cancer	8	0,003204
KEGG_PATHWAY	Glycerolipid metabolism	10	0,003455
KEGG_PATHWAY	Calcium signaling pathway	23	0,005415
KEGG_PATHWAY	Apoptosis	14	0,007122

Prve štiri signalne poti (*Adipocytokine signaling pathway*, *Neuroactive ligand-receptor interaction*, *PPAR signaling pathway*, *Insulin signaling pathway*) razumemo kot močne

povezave z geni kandidati za nalaganje maščobe, saj so neposredno povezane z njenim nastankom.

V signalni poti PPAR (receptorji, aktivirani s proliferatorjem peroksisomov) so z zvezdicami označeni kandidatni geni za nalaganje maščobe, ki so v naši podatkovni zbirki (slika 32).



Slika 32: Signalna pot PPAR (z zvezdico so označeni kandidatni geni za nalaganje maščobe v naši podatkovni zbirki)

4.3.2.2 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Rezultati analize Ingenuity so prikazani v petih poglavjih:

- mreže (angl. *top networks*),
- biološke funkcije (angl. *top bio functions*),
- biološke poti (angl. *top pathways*),
- seznam toksinov (angl. *top tox lists*),
- funkcija toksinov (angl. *top tox function*).

Za vsako poglavje smo prikazali pet statistično najbolj značilnih zadetkov.

Predstavljeni so rezultati za mreže in biološke poti. Za analizo smo v IPA uvozili 828 lokusov (669 genov in 159 miRNA) predhodno povezanih z nalaganjem maščobe.

Genske mreže

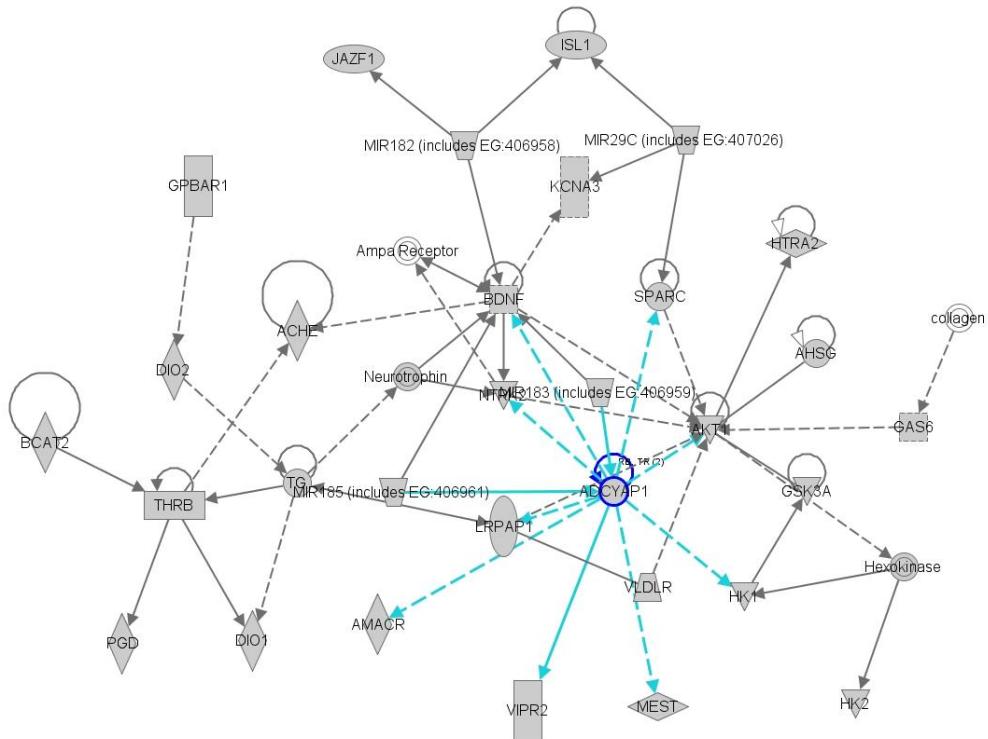
V preglednici 17 je prikazanih pet statistično najznačilnejših genskih mrež, pridobljenih z analizo z IPA. Na sliki 33 je narisana mreža za prvi sklop (Celična smrt, obolenja vezivnega tkiva, metabolne bolezni), povezovalnik (angl. *hub*), ki ima v tej mreži največ interakcij je *adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary)* (*ADCYAPI*). V mreži za sklop »Metabolizem lipidov, transport molekul, biokemija majhnih molekul« v katero je bilo vključeno 31 molekul ima največ interakcij povezovalnik *peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG)* (slika 34). Na sliki 35 je za sklop »celični razvoj in organizacijo, metabolizem lipidov, transport molekul« narisana mreža s povezovalnikom *E2F transcription factor (E2F)* in ostalimi molekulami.

Vseh pet sklopov z molekulami povezanimi z nalaganjem maščobe smo združili v eno mrežo (slika 36). V tej mreži ima največ povezav *transforming growth factor, beta 1 (TGFB1)*.

Preglednica 17: Genske mreže za gene povezane z nalaganjem maščobe identificirane z orodjem IPA

Najpomembnejše mreže (angl. <i>top networks</i>)	Število molekul
Celična smrt, obolenja vezivnega tkiva, metabolne bolezni (angl. <i>cell death, connective tissue disorders, metabolic disease</i>)	40
Obnašanje, razvoj in funkcija prebavnega sistema, razvoj in funkcija vezivnega tkiva (angl. <i>behavior, digestive system development and function, connective tissue development and function</i>)	32
Metabolizem lipidov, transport molekul, biokemija majhnih molekul (angl. <i>lipid metabolism, molecular transport, small molecule biochemistry</i>)	31
Celični razvoj in organizacija, metabolizem lipidov, transport molekul (angl. <i>cellular assembly and organization, lipid metabolism, molecular transport</i>)	29
Metabolizem ogljikovih hidratov, metabolne bolezni, transport molekul (angl. <i>carbohydrate metabolism, nutritional disease, molecular transport</i>)	29

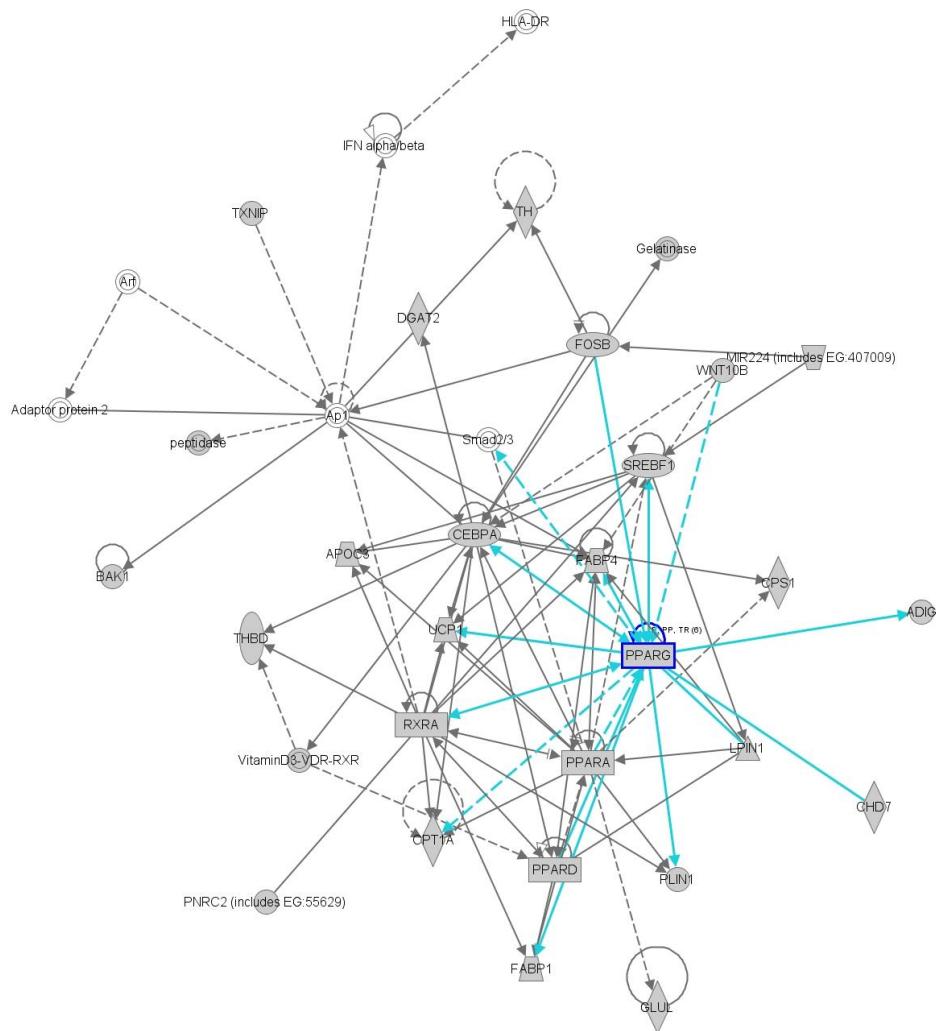
Network 1 : New My List 1d+c+z+t+mirna - 2010-09-03 11:10 AM



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

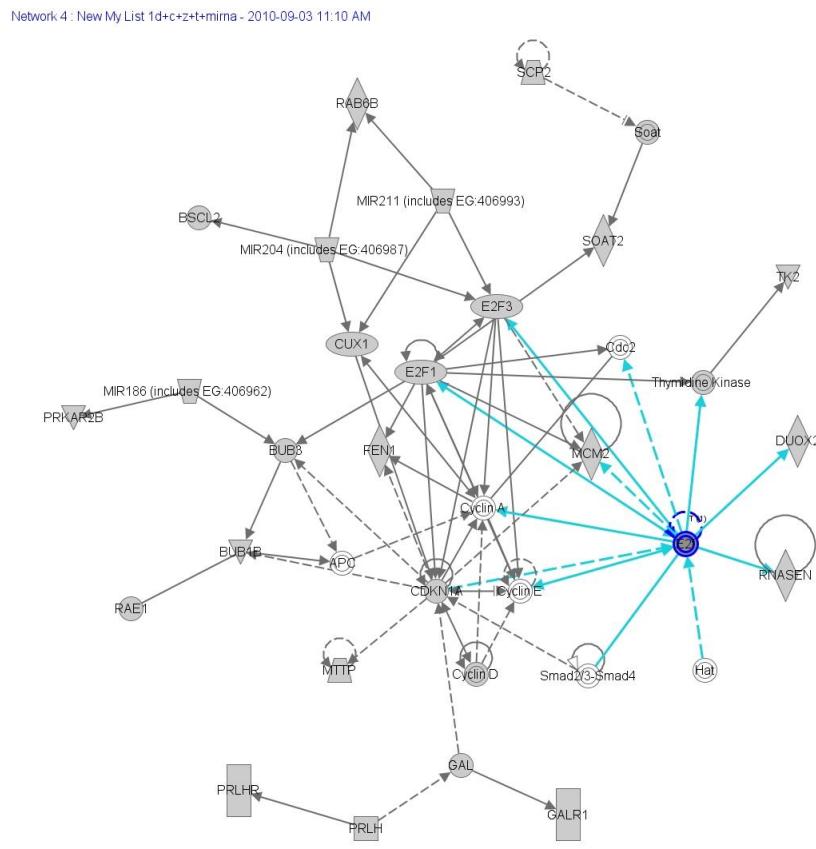
Slika 33: Analiza genov povezanih z nalaganjem maščobe z orodjem IPA za sklop »celično smrt, obolenja vezivnega tkiva, metabolne bolezni«. Z modro barvo so označene interakcije med povezovalnikom ADCYAP1 in sosednjimi molekulami.

Network 3 : New My List 1d+c+z+t+mima - 2010-09-03 11:10 AM

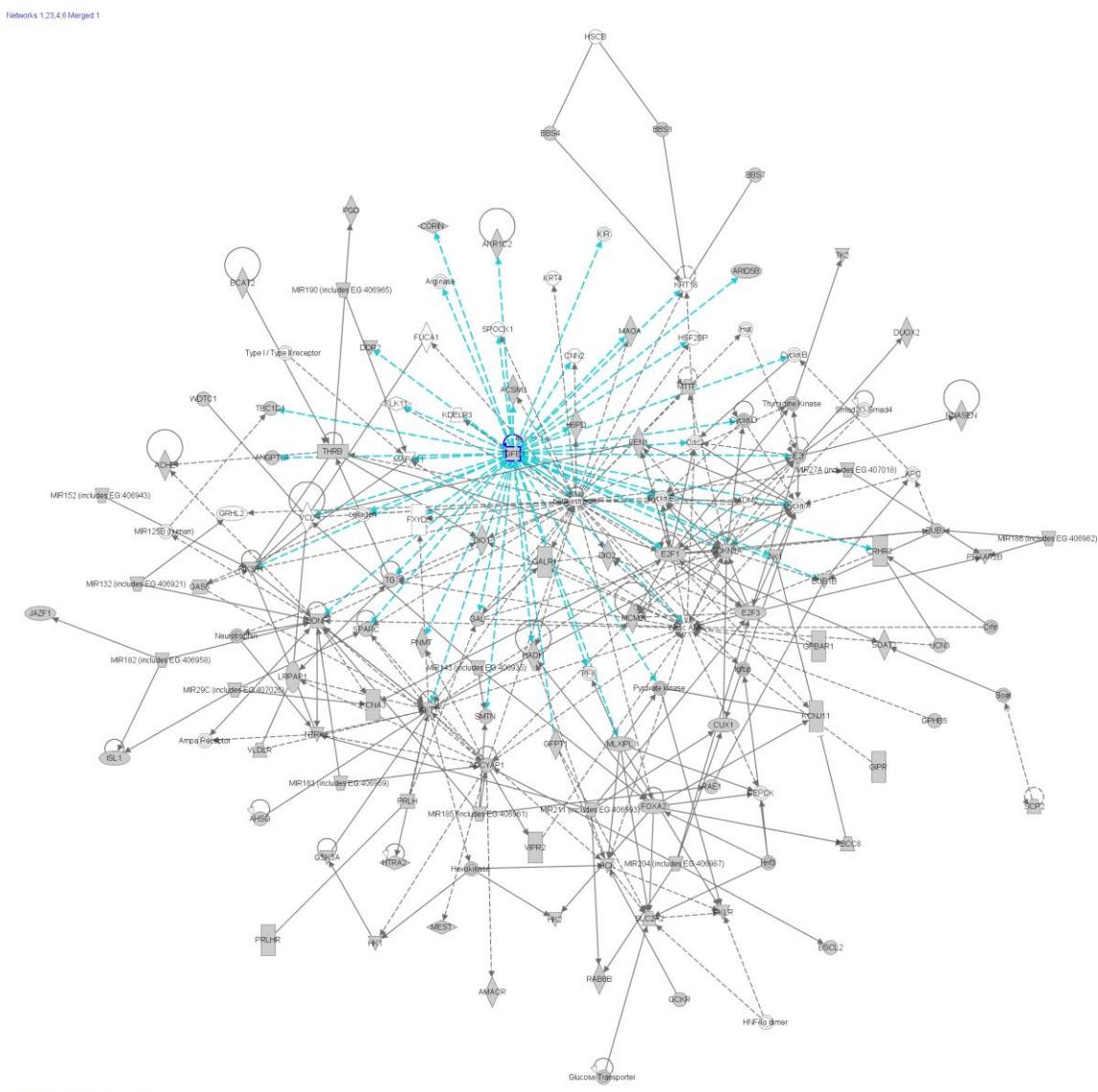


© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Slika 34: Analiza genov povezanih z nalaganjem maščobe z orodjem IPA za sklop »Metabolizem lipidov, transport molekul, biokemija majhnih molekul«. Z modro barvo so označene interakcije med povezovalnikom PPARG in sosednjimi molekulami.



Slika 35: Analiza genov povezanih z nalaganjem maščobe z orodjem IPA za celični razvoj in organizacijo, metabolizem lipidov, transport molekul. Z modro barvo so označene interakcije med povezovalnikom E2F in ostalimi molekulami.



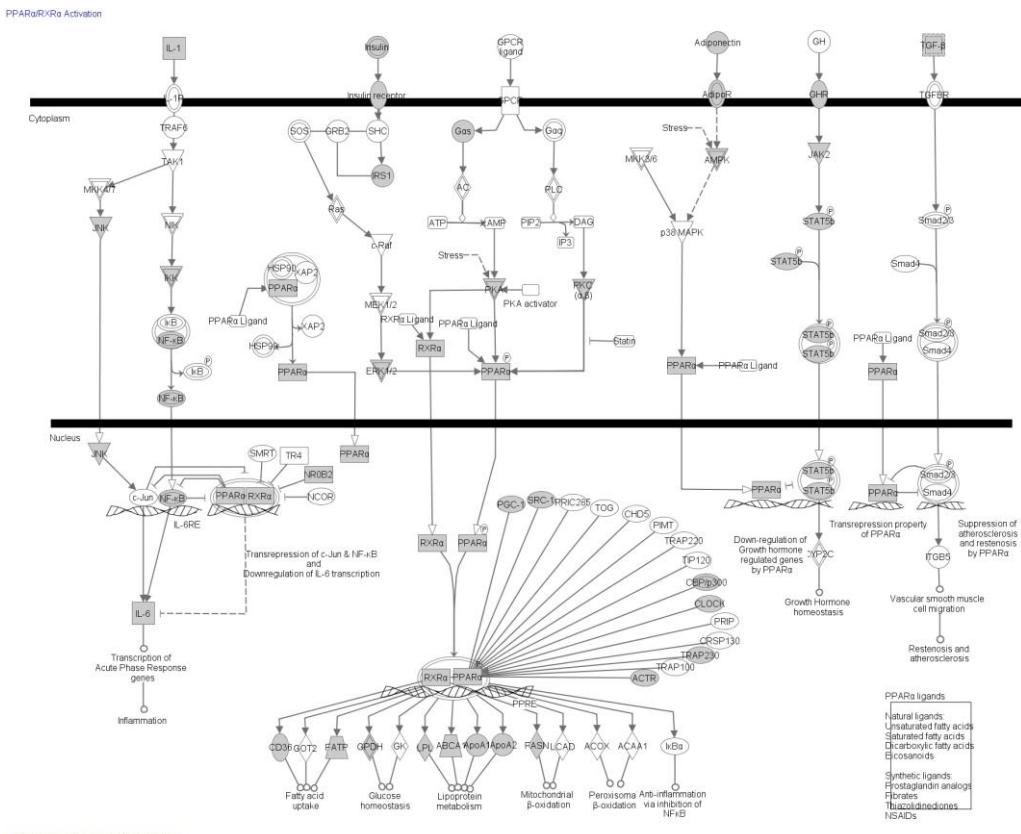
Slika 36: Analiza genov povezanih z nalaganjem maščobe z orodjem IPA. Z modro barvo so označene interakcije med povezovalnikom *TGFB1* in ostalimi molekulami.

Biološke poti

Pri analizi bioloških poti s programom IPA so statistično najbolj značilne: 1) *LXR/RXR activation*, 2) *FXR/RXR activation*, 3) *type II diabetes mellitus signaling*, 4) *Acute phase response signaling*, 5) *PPAR /RXR activation* (preglednica 18). Biološka pot »*PPAR /RXR activation*« je prikazana na sliki 37 in vključuje 57 lokusov povezanih z nalaganjem maščobe.

Preglednica 18: Najbolj pomembne biološke poti povezane z geni za nalaganje maščobe pridobljene z analizo IPA

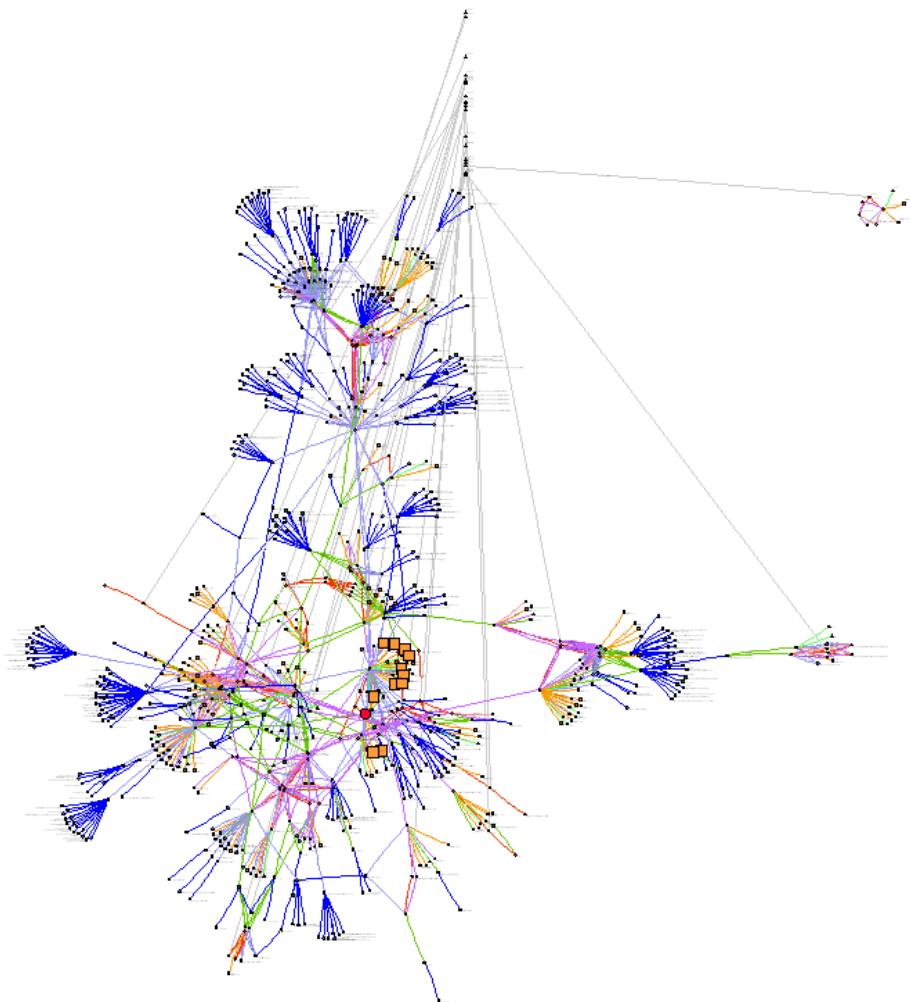
Biološka pot	p-vrednost
LXR/RXR activation	5,56E-27
FXR/RXR activation	2,26E-24
Type II diabetes mellitus signaling	6,52E-22
Acute phase response signaling	4,9E-18
PPAR /RXR activation	1,48E-16



Slika 37: Metabolna pot PPAR (sivo obarvane molekule predstavljajo kandidatne gene za nalaganje maščobe iz naše podatkovne zbirke)

4.3.2.3 Ondex

Na prašičjem kromosomu 17 smo s programom Ondex zbrali podatke povezane z nalaganjem maščobe, debelostjo, hrbitno slanino in zamaščenostjo (angl. *obesity, fat deposition, backfat, fatness*) iz različnih virov (slika 38). Iskali smo z nalaganjem maščobe povezane gene kandidate znotraj QTL za debelino hrbitne slanine (angl. *backfat; BTF*) na kromosому 17. Z orodjem smo znotraj omenjenega QTL našli gen *Mkks*, ki je bil z nalaganjem maščobe povezan pri miših (*McKusick-Kaufman/Bardet-Biedl syndromes putative chaperonin*).



Slika 38: Rezultat iskanja podatkov z orodjem Ondex za nalaganje maščobe, debelost, hrbtno slanino in zamaščenost na genomu prašiča (kromosom 17)

4.3.2.4 ToppGene povezan z nalaganjem maščobe

V preglednici 19 je prikazanih 81 statistično značilnih bioloških poti, povezanih z nalaganjem maščobe, dobljenih s ToppGene analizo 669 genov, od katerih jih je bil velik del povezan z nalaganjem maščobe.

Preglednica 19: Rezultati iskanja bioloških poti za gene povezane z nalaganjem maščobe z orodjem ToppGene

Biološka pot	Vir	P-vrednost	St. Lokusov
Adipocytokine signaling pathway	KEGG pathway	<0.000001	36
Neuroactive ligand-receptor interaction	KEGG pathway	<0.000001	68
PPAR signaling pathway	KEGG pathway	<0.000001	32
Lipoprotein metabolic	Pathway Ontology	<0.000001	13
Statin_pathway_pharmgkb	Msigdb	<0.000001	14
RXR and RAR heterodimerization with other nuclear receptor	NCI-Nature Curated	<0.000001	15
Gpcrdb_class_a_rhodopsin_like	Msigdb	<0.000001	43
PPARA pathway	Msigdb	<0.000001	23
Insulin signaling pathway	KEGG pathway	<0.000001	36
Leptin system	Pathway Ontology	<0.000001	11
Nuclear_receptors	Msigdb	<0.000001	19
Type II diabetes mellitus	KEGG pathway	<0.000001	19
Lipid metabolism	Reactome	<0.000001	21
FOXA2 and FOXA3 transcription factor networks	NCI-Nature Curated	<0.000001	18
Melanocortin system	Pathway Ontology	<0.000001	9
Signaling events mediated by PTP1B	NCI-Nature Curated	<0.000001	19
Insulin signaling	Pathway Ontology	<0.000001	14
Obesity disease	Pathway Ontology	<0.000001	8
Visceral fat deposits and the metabolic syndrome	CGAP biocarta	<0.000001	8
Vobesity pathway	Msigdb	<0.000001	8
Mechanism of gene regulation by peroxisome proliferators via PPARA(alpha)	CGAP biocarta	<0.000001	18
Prostate cancer	KEGG pathway	0.000006	24
GH pathway	Msigdb	0.000008	13
Monoamine_GPCRS	Msigdb	0.000009	14
Altered lipoprotein metabolic	Pathway Ontology	0.00001	7
Insulin/IGF-protein kinase B signaling cascade	Pantherdb	0.000038	14
Acute myeloid leukemia	KEGG pathway	0.000056	18
Pathways in cancer	KEGG pathway	0.000088	50
Peptide_GPCRS	Msigdb	0.000122	20
Sig_insulin_receptor_pathway_in_cardiac_myocytes	Msigdb	0.00021	16
Signaling events mediated by stem cell factor receptor (c-kit)	Nci-nature curated	0.000284	16
Mtor signaling pathway	Kegg pathway	0.000284	16
Breast_cancer_estrogen_signaling	Msigdb	0.00031	23
Biogenic_amine_synthesis	Msigdb	0.000346	9
Pancreatic cancer	Kegg pathway	0.000392	19
Insulin signalling	Smpdb	0.000502	13

se nadaljuje

nadaljevanje

Biološka pot	Vir	P-vrednost	St. Lokusov
Heterotrimeric g-protein signaling-gi alpha and gs alpha mediated	Pantherdb	0.000518	28
Chronic myeloid leukemia	Kegg pathway	0.00062	19
IL2-mediated signaling events	Nci-nature curated	0.000673	16
IL2RB pathway	Msigdb	0.000727	13
Insulin pathway	Nci-nature curated	0.00077	14
Sig_IL4receptor_in_b_lymphocytes	Msigdb	0.001	11
Growth hormone signaling	Cgap biocarta	0.001	11
Cardiac EGF pathway	Msigdb	0.001298	9
Insulin receptor mediated signaling	Reactome	0.001459	13
IL6-mediated signaling events	Nci-nature curated	0.001947	14
Diabetes type 2	Pathway ontology	0.002252	5
Altered melanocortin system	Pathway ontology	0.002252	5
Altered energy homeostasis	Pathway ontology	0.002252	5
IL-2 receptor beta chain in t cell activation	Cgap biocarta	0.002734	12
IGF1 pathway	Nci-nature curated	0.003469	11
Ace_inhibitor_pathway_pharmgkb	Msigdb	0.003789	6
IGF1 mtorpathway	Msigdb	0.003962	9
Skeletal muscle hypertrophy is regulated via akt/motor	Cgap biocarta	0.004009	10
PI3 kinase	Pantherdb	0.004528	14
IL23-mediated signaling events	Nci-nature curated	0.00535	12
Melanoma	Kegg pathway	0.005902	17
Influence of ras and rho proteins on G1 to S transition	Cgap biocarta	0.00612	10
IFN-gamma pathway	Nci-nature curated	0.006791	13
Energy metabolism	Reactome	0.008964	13
Gleevec pathway	Msigdb	0.010366	9
Obesity / metabolic syndrome	Smpdb	0.010709	6
Glucocorticoid receptor regulatory network	Nci-nature curated	0.01153	18
Keratinocyte pathway	Msigdb	0.011728	13
Non-small cell lung cancer	Kegg pathway	0.015837	14
Raccycd pathway	Msigdb	0.016008	9
Vegfr1 specific signals	Nci-nature curated	0.019139	10
Longevity pathway	Msigdb	0.023121	7
Corticosteroids and cardioprotection	Cgap biocarta	0.023121	7
Small cell lung cancer	Kegg pathway	0.023261	18
Bladder cancer	Kegg pathway	0.023296	12
Integrins in angiogenesis	Nci-nature curated	0.025026	13
Reverse cholesterol transport	Pathway ontology	0.025228	6
GCR pathway	Msigdb	0.026699	8
Glycerolipid metabolic	Pathway ontology	0.026974	10
Insulin/igf-mitogen activated protein kinase kinase/map kinase cascade	Pantherdb	0.026974	10
ERBB signaling pathway	Kegg pathway	0.027508	18
Basic mechanism of action of PPARA, PPARB(D) and PPARG and effects on gene expression	Cgap biocarta	0.033204	4
Sa_mmptokine_connection	Msigdb	0.04081	7
Inhibition of cellular proliferation by gleevec	Cgap biocarta	0.041857	8
NFAT and hypertrophy of the heart (transcription in the broken heart)	Cgap biocarta	0.046255	11

5 RAZPRAVA

5.1 IZDELAVA PODATKOVNE ZBIRKE GENOV POVEZANIH Z NALAGANJEM MAŠČOBE

Genska mapa za debelost pri človeku (Rankinen in sod., 2006) je zelo pripomogla k raziskavam debelosti. Obsegala je 12 dopolnitev, iz finančnih pa razlogov so zbirkovo letu 2006 prenehali dopolnjevati. Ažurno dopolnjevana podatkovna zborka je osnova za sistemski pristop k raziskavam poligenskih bolezni, zato smo se lotili nadaljevanja tega projekta. V podatkovno zbirkovo smo dodali informacije tudi o miRNA, ki so bile z nalaganjem maščobe povezane v zadnjem času.

Iz treh podatkovnih zbirk OGM, RGD in MGI ter literature smo zbrali 669 genov kandidatov za nalaganje maščobe, povezanih z debelostjo ali marmoriranostjo mišic. Zbirkovo smo dopolnili tudi z nekodirajočimi RNA; 159 miRNA, povezanih z nalaganjem maščobe. Tako smo skupno zbrali 828 lokusov povezanih z nalaganjem maščobe.

V prihodnje bi bilo potrebno zbirkovo genov kandidatov za nalaganje maščobe dopolniti tudi z ostalimi lokusi (QTL, kromosomske mutacije ...) ter jo vizualizirati v obliki interaktivne genetske mape, iz katere bodo razvidni prekrivajoči se lokusi. Takšna zborka nam bo služila kot osnova za nadaljnje raziskave na področju nalaganja maščobe.

5.2 GENOTIPIZACIJA ŽE OBSTOJEČIH OZNAČEVALCEV ZA NALAGANJE MAŠČOBE

Iz izdelane podatkovne zbirke genov kandidatov smo izbrali sedem genov povezanih z nalaganjem maščobe (*TFAM*, *DGAT1*, *GH*, *IGF1*, *IGR1R*, *TG* in *FABP4*) in jih genotipizirali pri 12 vzorcih bikov iz slovenske populacije lisastega goveda. V naši populaciji je bilo šest molekularnih označevalcev iz genov, ki so povezani z nalaganjem maščobe (*TFAM*, *GH*, *IGF1*, *IGR1R*, *TG* in *FABP4*) polimorfnih, označevalec iz gena *DGAT1* pa je bil monomorfen. Rezultate, ki so se pri genotipizaciji izkazali za polimorfne, bi bilo smiselno preveriti na potomcih-polbratih iz progenega test in narediti asociacijsko analizo s fenotipskimi lastnostmi, povezanimi z nalaganjem maščevja (npr. delež loja, količine posameznih maščobnih depojev, stopnja marmoriranosti). Za gen *DGAT1*, ki je bil

v naši populaciji monomorfen, pa bi bilo smiselno njegovo polimorfost preveriti na drugi populaciji goveda ter analizirati preostale SNP-je tega gena. Statistično značilne SNP-je iz take analize bi veljalo potem preveriti tudi na večji populaciji proizvodnih živali na podatkih pridobljenih iz klavne linije. Prav tako bi bilo potrebno na slovenski populaciji goveda analizirati še preostale označevalce, ki so bili razviti za govedo. Do sedaj je za govedo razvitih 44 molekularnih označevalcev povezanih z nalaganjem maščobe.

5.3 RAZVOJ NOVIH MOLEKULARNIH OZNAČEVALCEV ZA NALAGANJE MAŠČOBE

S pomočjo zbirke genov kandidatov za nalaganje maščobe smo iskali nove potencialne genetske označevalce. Pri razvijanju označevalcev smo se osredotočili na 1) nekodirajoče RNA (miRNA), in 2) biooznačevalce na osnovi bioloških poti. Nekatere genetske označevalce smo preverjali na slovenski populaciji lisastega goveda in v sodelovanju z Washington State University na populaciji križancev Wagyu X Limousin.

5.3.1 Razvoj novih molekularnih označevalcev na osnovi treh kategorij miRNA (geni za miRNA, mehanizem za procesiranje miRNA in tarče za miRNA)

Ugotovili smo, da so vse tri kategorije variabilnosti, povezane z miRNA: miRNA geni, tarče za miRNA in mehanizem regulacije teh molekul lahko povezane z nalaganjem maščobe.

Geni za miRNA

Študije so pokazale, da se intronske miRNA izražajo skupaj z mRNA gostiteljskih genov, kar kaže na uporabo skupnega prepisovalnega mehanizma (Baskerville and Bartel, 2005). Iz tega razloga smo poiskali vse gostiteljske gene za miRNA pri govedu in ugotovili, da tri miRNA ležijo znotraj genov, ki smo jih zbrali v povezavi z nalaganjem maščob (*IGF2*, *MEST* in *NEIL1*). Za nadaljnje raziskave so zanimivi le geni, v katerih je miRNA v smiselnih smerih, zato smo se osredotočili le na dva gena in sicer *MEST*; gostiteljski gen za mir-335 in *IGF2*; gostiteljski gen za mir-483. V podatkovni zbirki Ensembl smo preverili genetsko variabilnost za gena *MEST* in *IGF2*, vendar variabilnosti znotraj miRNA nismo odkrili; v genu *MEST* SNP-jev nismo našli, v genu *IGF2* pa se nahaja en intronski SNP,

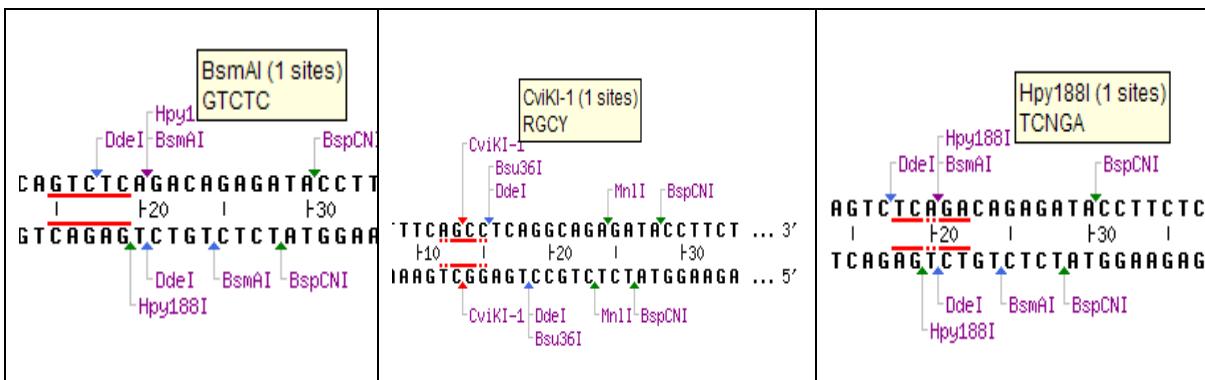
vendar ne znotraj miRNA. Čeprav podatkov o genetski variabilnosti za omenjeni miRNA v podatkovnih zbirkah ni bilo, pa bi bilo smiselno njihovo variabilnost preveriti z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja. Prav tako bi bilo potrebno preveriti izražanje teh miRNA v maščobnem tkivu.

V predhodnih študijah je bila mir-335 že povezana z nalaganjem maščobe, ugotovljena je bilo močno izražanje v tkivu belega in podkožnega maščevja (Klöting in sod., 2009, Nakanishi in sod., 2009). S tem smo potrdili naš pristop, da so miRNA, ki se nahajajo znotraj kandidatnih genov za debelost prav tako povezane s to lastnostjo.

Analizirali smo tudi Mir717, ki pri miših leži znotraj introna 3 gostiteljskega gena *Gpc3*, predhodno povezanega z nalaganjem maščobe. Analiza te miRNA je zanimiva iz dveh razlogov: miRNA se nahaja znotraj gostiteljskega gena za debelost, poleg tega pa vsebuje SNP na mestu odgovornem za vezavo na miRNA (miR-SNP). Analizirali smo odsek nukelotidnega zaporedja gena *Gpc3* v območju z zapisom za Mir717. V podatkovnih zbirkah smo našli dva SNP-ja: enega v pre-miRNA (rs30373504) (T>C) in drugega v območju miRNA odgovornem za vezavo na mRNA (rs30372501) (A>G). Z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja pa smo polimorfnost potrdili le za drugi SNP. Alel A je bil prisoten pri linijah miši C57BL/6J in DBA/2J, za kateri je značilno povisano nalaganje maščobnega tkiva (angl. *high fat strains*) in pri 25 od 26 primerjanih živalskih vrstah. Medtem ko je bil alel G prisoten le pri liniji 129/Sv (angl. *the lean line*), ki kaže nižje vrednosti za vse lastnosti povezane z debelostjo (maščoba v krvi, skupne telesne maščobe, masa posameznih maščobnih depojev, itd.), zato lahko ta SNP povežemo z nalaganjem maščobe (Kunej in sod., 2010b). Smiselno bi bilo preveriti še genetsko variabilnost pri govedu in drugih vrstah sesalcev. MiR-SNP-ji, ki ležijo znotraj območij miRNA, ki prepoznavajo zaporedja na mRNA imajo lahko velik vpliv na fenotip, saj posamezna miRNA lahko uravnava izražanje več genov (Sun in sod., 2009). Pred kratkim so SNP znotraj miR-96, ki se nahaja v območju za vezavo na mRNA povezali z gluhostjo pri miših (Lewis in sod., 2009) in človeku (Mencia in sod., 2009).

V diplomskem delu smo analizirali Mir717 samo pri osmih miših, zato bi bilo potrebno v prihodnosti povišati število preiskovanih vzorcev. Oba SNP-ja znotraj Mir717 pri miših smo genotipizirali s pomočjo avtomatskega sekvenatorja. Ker pa je na mestu obeh

nukleotidnih zamenjav tudi prepoznavno mesto za restriktijske encime, bi bilo možno genotipizacijo izvesti tudi z restriktijskimi encimi. V ta namen smo za oba SNP-ja izdelali diagnostični test PCR-RFLP, ki ga nameravamo v prihodnosti uporabiti za ugotavljanje povezave SNP-jev z nalaganjem maščobe. Za analizo SNP-jev bi bilo možno uporabiti restriktijske encime: *BsmAI* ali *CviKI-1* za rs30373504 (T>C) ter *Hpy18I* za rs30372501 (A>G) (slika 39).



Slika 39: Restriktijske endonukleaze za analizo SNP-jev v Mir717. Za analizo nukleotidne zamenjave rs30373504 T>C je možno uporabiti restriktijska encima *BsmAI* in *CviKI-1*, za genotipizacijo rs30372501 C>A pa encim *Hpy18I*

Dodatno smo potrdili vlogo Mir717 pri vpletjenosti v nalaganje maščobe tudi z analizo njenih potencialnih tarč. Zbrali smo 2610 genov, ki so potencialne tarče Mir717: Primerjava tarčnih genov *Mir717* in naše podatkovne zbirke kandidatnih genov za nalaganje maščobe je pokazala, da je bilo 91 tarčnih genov predhodno že povezanih z nalaganjem maščobe.

Izražanje te miRNA so do sedaj potrdili le pri človeku (Huang in sod., 2010) in miših (Lewis in sod., 2009), vendar je iz nukleotidne primerjave razvidno, da gre za visoko ohranljeno območje med vrstami. Sklepamo, da je Mir717 prisotna tudi pri drugih vrstah. V prihodnosti bi bilo potrebno to predpostavko potrditi tudi eksperimentalno.

Genetska variabilnost mehanizma za procesiranje miRNA

RNASEN sodeluje v proteinskem kompleksu za dozorevanje; procesiranje miRNA. Pri miših je njegovo izničenje povzročilo prekomerno nalaganje maščobe in zmanjšano vsebnost mišičnine, zato je ta gen dober kandidat za nalaganje maščobe tudi pri drugih vrstah. Poleg gena *RNASEN*, smo pri človeku med geni kandidati za debelost našli še gena *FMR1* in *ZFP36*, ki sta prav tako udeležena v omenjenem mehanizmu za procesiranje miRNA. Zanimivo bi bilo ugotoviti genetsko variabilnost tudi za ta dva gena.

V podatkovni zbirki NCBI smo poiskali nukleotidna zaporedja gena *RNASEN* za več vrst (človeka, miš, podgano, govedo in konja). Med seboj smo jih primerjali z bioinformacijskega orodjem MultAlin v območju nesintonimnega SNP-ja (C>G) pri govedu (rs41946228), ki se nahaja na tretjem eksonu gena (slika 40). Ugotovili smo, da je to območje ohranljeno med vrstami. Omenjeni SNP povzroči nesintonimo zamenjavo aminokisline lizin v asparagin.

GOVEDO	AAAAAAAGAGTATAAGAATCTGGAAAGTCGCTCCCAACCGAGGGAGAGAGA GAGGTCCCTGGGAGGAAGAAGAACAGATGGAGTGACATCCC GGCTCTGGCARAGAGAGGATTT
CLOVEK	AAAAAAAGAGTATAAGAATCTGGAAAGTCGCTCCCAACGTAGGGAGAGAGA GAGCTCGTTGGGAGGAAGAAGAACAGCTTGGAGTGACACCCAGAGTTCTGGCARAGAGAGGACTAT
PODGANA	GCCCCCACCCAGGAGAATGTGAACTCATCGTCTCCCAACCGAGGGAGAGAGA GAGAGCAGCTGGGAGGAGGAAGAAGAACAGCTTGGAGTGACRGCAGAGCTCTGGCARAGAGAGGCTAT
KONJ	AAAAAAAGAGTATAAGAATCTGGAAAGTCGCTCCCAACGTAGGGAGAGAGA GAGCTCGTTGGGAGGAAGAAGAACAGATGGAGTGACACCCAGAGCTCTGGCARAGAGAGGACTAT
MIS	GCCCCGCCCGGGAGAATGTGAACTCATCGTCTCCCAACCGAGGGAGAGAGA GAGCTCGTTGGGAGGAAGAAGAACAGCTTGGAGCAGCTGCCAGGGCTCTGGCARAGAGAGGACTAT
Consensus	gccccaccccaaggAGAatgtgaatcaTCGtCTCCAGCAGGGAGAGAGA GAGCTCGTTGGGAGGAAGAAGAACAGATGGAGTGACAGCAGAGCTCTGGCARAGAGAGGAGAGACTAT

Slika 40: Medvrstna primerjava odseka nukleotidnega zaporedja gena *RNASEN*, v katerem se nahaja nukleotidna zamenjava C>G (človek, miš, podgana, govedo in konj)

Na slovenski populaciji lisaste pasme goveda smo preverjali polimorfnost gena *RNASEN*, vendar polimorfizma nismo potrdili; vseh 32 vzorcev potomcev je bilo homozigotnih GG. Ker pa je *RNASEN* dober gen kandidat za nalaganje maščobe, bi bilo smiselno to zamenjavo analizirati tudi pri drugih populacijah in pasmah goveda, identificirati nove SNP-je znotraj gena ter analizirati povezavo z nalaganjem maščobe.

Glede na to, da obstajajo tri vrste genetske variabilnosti, povezane z miRNA, bi morala biti skladna s tem tudi nomenklatura. Poimenovanje genetske variabilnosti miRNA povzroča nejasnosti, saj se v različnih člankih uporablja različno poimenovanje za različne tipe variabilnosti. SNP-ji, ki se nahajajo znotraj miRNA se imenujejo miR-SNP in znotraj tarčnega mesta na mRNA (angl. *target site*) miR-TS-SNP. Analogno s tem bi bilo za SNP-

je, ki se nahajajo znotraj mehanizma za procesiranje miRNA primerno ime miR-SM-SNP (angl. *silencing machinery*).

Genetska variabilnost tarč za miRNA

SNP-je v tarčah za miRNA; miR-TS-SNP-je smo iskali na dva načina: s podatkovno zbirko Patrocles in ročno s primerjavo informacij pridobljenimi s programom MicroCosm in podatkovne zbirke Ensembl.

Patrocles je zelo uporabna podatkovna zbirka za iskanje informacij o genetski variabilnosti na osnovi miRNA pri človeku, za govedo pa je trenutna količina podatkov o polimorfnih miRNA tarčah zelo omejena. S povezovanjem informacij med vsemi polimorfnimi tarčnimi geni znotraj zbirke Patrocels in našo podatkovno zbirko genov smo ugotovili, da štirje geni (*ASPA*, *GLUL*, *GPR37* in *PKLNR*), povezani z nalaganjem maščobe, vsebujejo SNP na mestu vezave za miRNA.

S primerjavo podatkovnih zbirk Ensembl in MicroCosm smo poiskali polimorfne tarče za miRNA znotraj 109-ih genov pri govedu in ugotovili, da trije geni (*SQLE*, *GNG3* in *RELA*) vsebujejo SNP-je v 3'UTR na mestih vezave za miRNA.

Zaradi možnosti napak pri sekvenciranju genov bo potrebno v prihodnosti obstoj SNP-jev, ki so v podatkovnih zbirkah in še niso bili potrjeni, eksperimentalno dokazati na dovolj veliki populaciji.

Rezultati iskanja tarč s pomočjo orodij se hitro spreminjajo in se med posameznimi orodji zelo razlikujejo. To predstavlja problem pri njihovem iskanju, saj ni univerzalnega orodja za zbiranje teh podatkov. Takšno delo je zamudno, saj je potrebno z vsakim orodjem poiskati tarče za vsak gen posebej. V primeru, da se iskanja tarč lotimo na daljši način, z ročno primerjavo nukleotidnih zaporedij, se tudi ti rezultati razlikujejo od pridobljenih z orodji.

V prihodnosti bi bilo potrebno razviti orodje, ki bi avtomatizirano iskalo tarče in hkrati zbiralo podatke iz obstoječih zbirk in orodij, s čimer bi verjetno rešili problem omenjene neskladnosti.

5.3.2 Identifikacija kandidatnih bioloških poti in genskih mrež povezanih z nalaganjem maščobe

Kandidatne gene za nalaganje maščobe smo žeeli vključiti v biološke poti in genske mreže. To smo storili z bioinformacijskimi orodji KEGG, Biocarta, Ingenuity, ToppGene in Ondex.

Izmed množice bioloških poti pridobljenih z bioinformacijskimi orodji KEGG Biocarta, Ingenuity in ToppGene smo izbrali statistično najbolj značilne: iz analize s KEGG in Biocarta (*adipocyte signaling pathway, neuroactive ligand-receptor interaction, PPAR signaling pathway, insulin signaling pathway*), Ingenuity (*LXR/RXR activation, FXR/RXR activation, type II diabetes mellitus signaling, Acute phase response signaling, PPAR /RXR activation*) in ToppGene (*adipocytokine signaling pathway, neuroactive ligand-receptor interaction, PPAR signaling pathway, lipoprotein metabolic*). Prišli smo do zanimivega odkritja, da se pri vseh treh analizah kot statistično zelo značilna pojavlja signalna pot PPAR (angl. *PPAR signaling pathway*). Receptorji, aktivirani s proliferatorjem peroksisomov (angl. *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)*) so jedrni hormonski receptorji, ki jih aktivirajo maščobne kisline in njihovi derivati. Zato je ta biološka pot ena od pomembnejših za nalaganje maščob.

Gen *PPARG* je bil tudi povezovalnik v statistično značilni genski mreži za »metabolizem lipidov, transport molekul in biokemijo majhnih molekul«. Ti rezultati optimistično napovedujejo razvijanje nove generacije molekularnih označevalcev na osnovi bioloških poti in genskih mrež.

Bioinformacijsko orodje Ondex je bilo razvito za raziskave na rastlinah, v diplomskem delu pa je predstavljen prvi primer uporabe tega orodja pri živalih. Z orodjem Ondex smo analizirali QTL za debelino hrbtne slanine (angl. *backfat; BTF*) na kromosому 17 in našli kandidatni gen *Mkks* za nalaganje maščobe znotraj tega QTL. Orodje je zelo uporabno za iskanje informacij fenotipskih lastnosti na podlagi literature in podatkovnih zbirk. Slabost orodja Ondex pa je njegova obremenitev računalniškega procesorja.

Na podlagi rezultatov integracije lokusov v biološke poti smo razvili nove biološke označevalce za nalaganje maščobe, ki jih nameravamo eksperimentalno potrditi.

Raziskovalci predpostavljajo, da biooznačevalci na osnovi bioloških poti bolj natančno opisujejo povezavo med genotipom in fenotipom in zato imajo kot molekularni označevalci velik potencial v primerjavi s skupinami naključno, funkcionalno nepovezanih genov kandidatov (Chuang in sod., 2010).

6 SKLEPI

Z integracijo informacij iz podatkovnih zbirk in literature smo izdelali najobsežnejšo podatkovno zbirko za gene, povezane z nalaganjem maščobe za človeka, govedo, miš in podgano. Do sedaj je bilo z nalaganjem maščobe povezanih 669 genov, ki kodirajo proteine ter 159 nekodirajočih RNA (miRNA).

Šest izbranih, že poznanih kandidatnih genov za nalaganje maščobe (*TFAM*, *GH*, *IGF1*, *IGR1R*, *TG* in *FABP4*) je polimorfni tudi v slovenski populaciji lisastega goveda, zato jih bo v prihodnosti možno analizirati na večjem številu živali. Gen *DGAT1* pa je bil v tej populaciji monomorfen.

Potrdili smo hipotezo, da nam genetska variabilnost miRNA in njihovih tarč ter poznavanje njihove regulacije, omogoča razvoj novih potencialnih genetskih označevalcev za nalaganje maščobe.

Razvili smo nove molekularne označevalce povezane z nalaganjem maščobe, in sicer na osnovi: 1) miRNA in 2) bioloških poti.

1) MiRNA in geni, za katere smo predpostavili vpletjenost v nalaganje maščobe:

1a) Geni za miRNA:

Znotraj genov, povezanih z nalaganjem maščobe se nahajata dve miRNA: bta-mir-335 znotraj gostiteljskega gena *MEST* in bta-mir-483 znotraj gostiteljskega gena *IGF2*. Genetska variabilnost za ti dve miRNA še ni znana, v prihodnosti bi bilo smiselno analizirati tudi izražanje te miRNA v povezavi z nalaganjem maščobe.

Ugotovili smo povezavo med SNP-jem *Mir717*, ki leži znotraj gostiteljskega gena *Gpc3* z lastnostmi za nalaganje maščobe pri miših. Na podlagi relativno redkega prekrivanja štirih genomskega elementov: QTL, gen, miRNA in SNP smo našli SNP, ki se nahaja znotraj območja miRNA, odgovornega za vezavo na mRNA (angl. *seed SNP*).

1b) Mehanizem za procesiranje miRNA:

Med 97 geni, ki kodirajo proteine za procesiranje miRNA, so bili trije predhodno povezani z nalaganjem maščobe: *RNASEN*, *FMR1* in *ZFP36*. Za eksperimentalno potrjevanje je zanimiva nukleotidna zamenjava G>C na tretjem eksonu gena *RNASEN*, ki povzroči nesinonimno zamenjavo lizina v asparagin, vendar je bila v slovenski populaciji lisastega goveda monomorfna.

1c) MiRNA tarče:

Z bioinformacijskimi metodami smo pri govedu našli sedem polimorfnih tarčnih genov za miRNA: *ASPA*, *GLUL*, *GNG3*, *GPR37*, *PKLR*, *RELA* in *SQLE* s SNP-ji v območjih 3'UTR, ki jih bo mogoče sedaj eksperimentalno potrditi.

2) Novi molekularni označevalci na osnovi bioloških poti

Potrdili smo hipotezo, da je z integracijo vseh do sedaj poznanih genetskih vzrokov za nalaganje maščobe možno identificirati pomembne genske mreže in biološke poti, ki bi jih bilo možno razviti v biooznačevalce. Identificirali smo 30 metabolnih poti, ki so bile statistično značilno povezane z našim seznamom genov, statistično najbolj značilne poti so: *adipokine signaling pathway*, *neuroactive ligand - receptor interaction*, *PPAR signaling pathway* in *insulin signaling pathway*. Najbolj obetaven biooznačevalec za nalaganje maščobe na osnovi bioloških poti je signalna pot PPAR, saj smo jo potrdili s tremi različnimi pristopi.

7 POVZETEK

Debelost je dedna bolezen, ki se prenaša s prednikov na potomce, kar povečuje delež obolelih v naslednjih generacijah. Predhodne raziskave so potrdile povezanost debelosti s številnimi geni, najnovejša odkritja pa so razvoj debelosti povezala tudi z miRNA, katerih vloga je uravnavanje izražanja genov, poleg tega pa so vpletene v razvoj nekaterih rakavih in nevroloških obolenj. Prekomerno nalaganje maščobe je nezaželeno tudi pri priteji mesa in mleka iz ekonomskih razlogov ter zaradi vse večjega povpraševanja potrošnikov po manj mastnih proizvodih. Odkritje čim večjega števila genov, povezanih z nalaganjem maščobe, vključno z geni za miRNA ter vseh vrst mehanizmov, povezanih z njihovim uravnavanjem, je ključ do zdravljenja in nadzora tovrstnih motenj tako pri ljudeh kot tudi pri živalih. Namen naloge je bil analizirati izbrane, že razvite molekularne označevalce za lastnosti nalaganja maščobe, ter razviti nove molekularne označevalce, ki jih bo možno testirati v prihodnosti. V obsežnem bioinformacijskem delu naloge smo izdelali podatkovno zbirko z 828 lokusi, povezanimi z nalaganjem maščobe: 669 genov, ki kodirajo proteine in 159 miRNA. Za šest že obstoječih kandidatnih genov (*TFAM*, *GH*, *IGF1*, *IGR1R*, *TG* in *FABP4*) smo ugotovili, da so vsi polimorfni tudi v slovenski populaciji lisastega goveda, razen gena *DGAT1*, ki je bil monomorfen. Na osnovi: 1) miRNA in 2) bioloških poti smo razvili nove molekularne označevalce povezane z nalaganjem maščobe. Genetsko variabilnost miRNA smo preverili na treh ravneh: 1a) znotraj miRNA genov, 1b) mehanizma za procesiranje miRNA in 1c) tarč za miRNA. Našli smo dve miRNA znotraj gostiteljskih genov, povezanih z nalaganjem maščobe: *MEST* (mir-335) in *IGF2* (mir-483). V območjih miRNA, odgovornih za vezavo na mRNA (angl. *seed region*) smo našli 18 SNP-jev (miR-SNP) pri miših in človeku. SNP rs30372501 znotraj Mir717, ki se nahaja v območju miRNA, odgovornem za vezavo na mRNA (angl. *seed SNP*) vpliva na nalaganje maščobe pri miših. Trije proteini za procesiranje miRNA (RNASEN, FMR1 in ZFP36) so predhodno že bili povezani z nalaganjem maščobe. Pri govedu smo našli sedem polimorfnih miRNA tarč (*ASPA*, *GLUL*, *GNG3*, *GPR37*, *PKLR*, *RELA* in *SQLE*). Za lokuse povezane z nalaganjem maščobe, smo identificirali biološke poti in genske mreže, ki omogočajo identifikacijo nove generacije biooznačevalcev za nalaganje maščobe. Rezultati naloge bodo prispevali k razvijanju molekularnih označevalcev za uporabo v seleksijskih programih goveda za učinkovitejšo

odbiro živali, ki imajo željen genotip za lastnosti zamaščevanja in temelji na genskih označevalcih.

8 VIRI

- Baskerville S., Bartel D.P. 2005. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11, 3: 241-247
- Barendse W.J. 1999. Assessing lipid metabolism. Patent. International publication Number: WO 99/23248. World International Property Organization.
- Bell C.G., Walley A.J., Froguel P. 2005. The genetics of human obesity. *Nature Reviews, Genetics*, 6, 3: 221-234
- Buckingham S. 2003. The major world of microRNAs. Understanding the RNAissance. V: The 2nd Horizon Symposium, Maine, USA, May 2003. Nature Publishing Group. <http://www.nature.com/horizon/rna/background/micrornas.html> (2. avg. 2009)
- Chen J., Bardes E.E., Aronow B.J., Jegga A.G. 2009. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Research*, 37: 307-11
- Chu C.Y., Rana T.M. 2007. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *Journal of Cellular Physiology*, 213, 2: 412-419
- Chuang H.Y., Lee E., Liu Y.T., Lee D., Ideker T. 2007. Network-based classification of breast cancer metastasis. *Molecular Systems Biology* 3: article number 140 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2063581/pdf/msb4100180.pdf> (15. sep. 20109)
- Chuang H.Y., Hofree M., Ideker T. 2010. A Decade of System Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26, 1: 721-744
- Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibé B., Bouix J., Caiment F., Elsen J. M., Eychenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C., Georges M. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genetics*, 38, 7: 813-818

Curi R.A., de Oliveira H.N., Silveira A.C., Lopes C.R. 2005. Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. *Livestock Production Science*, 94: 159-167

Čepon M., Janžekovič M., Klopčič M., Potočnik K., Šmid J., Ostrc S. 2004. Rejski program za lisasto pasmo govedi v Sloveniji: dopolnjen v skladu s pripombami MKGP z dne, 5. 1. 2005. Mengeš, Govedorejska zadruga.

Esau C., Kang X., Peralta E., Hanson E., Marcusson E. G., Ravichandran L. V., Sun Y., Koo S., Perera R. J., Jain R., Dean N. M., Freier S. M., Bennett C. F., Lollo B., Griffey R. 2004. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 50: 52361-52365

Ferdin J., Kunej T., Calin G.A. 2010. Non-coding RNAs: identification of cancer-associated microRNAs by gene profiling. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 9, 2: 123-138

Freking B.A., Murphy S.K., Wylie A.A., Rhodes S.J., Keele J.W., Leymaster K.A., Jirtle R.L., Smith T.P. 2002. Identification of the single base change causing the callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only known example of polar overdominance in mammals. *Genome Research*, 12, 10: 1496-1506

Ge W., Davis M.E., Hines H.C., Irvin K.M., Simmen R.C. 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*, 79: 1757-1762

Georges M., Coppieters W., Charlier C. 2007. Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17, 3: 166-176

Grady W.M., Parkin R.K., Mitchell P.S., Lee J.H., Kim Y.H., Tsuchiya K.D., Washington M.K., Paraskeva C., Willson J.K., Kaz A.M., Kroh E.M., Allen A., Fritz B.R., Markowitz S.D., Tewari M. 2008. Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene*, 27, 27: 3880-3888

Huang W., Liu H., Wang T., Zhang T., Kuang J., Luo Y., Chung S.S.M., Yuan L., Yang J.Y. 2010. Tonicity-responsive microRNAs contribute to the maximal induction of osmoregulatory transcription factor OREBP in response to high-NaCl hypertonicity. *Nucleic Acids Research*, doi:10.1093/nar/gkq818
<http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2010/09/17/nar.gkq818.full.pdf>
(28. sep. 2010)

Jeffrey S. 2008. Cancer biomarker profiling with microRNAs. *Nature Biotechnology*, 26, 4: 400-401

Jevšinek Skok D., Horvat S., Dovč P., Kunej T. 2009. Developing genetic markers for fat deposition based on genetic variability of microRNAs. V: Skupni kongres SGD in SBD Otočec 2009, 20-23 sep. 2009. Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo. <http://ibk.mf.uni-lj.si/otocec2009/defaultslslo.html> (5. feb. 2010)

Jiang Z., Kunej T., Michal J.J., Gaskins C.T., Reeves J.J., Busboom J.R., Dovc P., Wright Jr. R.W. 2005. Significant associations of the mitochondrial transcription factor A (TFAM) promoter polymorphisms with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334: 516-523

Jin W., Dodson M.V., Moore S.S., Basarab J.A., Guan L.L. 2010. Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: a potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. *BMC Molecular Biology*, 11, 29: 1-8

Kajimoto K., Naraba H., Iwai N. 2006. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *RNA*, 12, 9: 1626-32

Klaus S., Keijer J. 2004. Gene expression profiling of adipose tissue: Individual, depot-dependent, and sex-dependent variabilities. *Nutrition*, 20, 1: 115-120.

Klöting N., Berthold S., Kovacs P., Schön M.R., Fasshauer M., Ruschke K., Stumvoll M., Blüher M. 2009. MicroRNA Expression in Human Omental and Subcutaneous Adipose Tissue. *PLoS ONE*, 4, 3: e4699

- Kim V.N. 2005. RNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 6, 5: 376-385
- Köhler J., Baumbach J., Taubert J., Specht M., Skusa A., Rüegg A., Rawlings C., Verrier P., Philippi S. 2006. Graph-based analysis and visualization of experimental results with ONDEX. *Bioinformatics*, 22, 11:1383-1390
- Kunej T., Dovč P., Ogorevc J., Čeh E., Zorc M., Godnič I., Jevšinek Skok D., Calin G.A., Ferdin J., Gorup Č., Cannistraci C.V. 2010a. Integrative systems biology analysis and visualization of relevant subnetwork modules and pathways in phenotypic traits and diseases. In: Systems biology : networks. Joint Cold Spring Harbor Laboratory/Wellcome Trust Conference, Hinxton, 10-15 avg. 2010. Aloy P. (ed): 52
- Kunej T., Jevšinek Skok D., Horvat S., Dovč P., Jiang Z. 2010b. The glypican 3-hosted murine Mir717 gene : sequence conservation, seed region polymorphisms and putative targets. *International Journal of Biological Sciences*, 6, 7: 769-772
- Lau N.C. 2008. Analysis of small endogenous RNAs. *Current Protocols in Molecular Biology*, 26, 7: 1-15
- Lewis M.A., Quint E., Glazier A.M., Fuchs H., De Angelis M.H., Langford C., van Dongen S., Abreu-Goodger C., Piipari M., Redshaw N., Dalmay T., Pelayo M.A.M., Enright A.J., Steel K.P. 2009. An ENU-induced mutation of miR-96 associated with progressive hearing loss in mice. *Nature Genetics*, 41, 5: 614–618
- Lin Q., Gao Z., Alarcon R.M., Ye J., Yun Z. 2009. A role of mir-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS Journal*, 276, 8: 2348-2358
- Mack G.S. 2007. MicroRNA gets down to business. *Nature Biotechnology*, 25, 6: 631-8
- Mencía A., Modamio-Høybjør S., Redshaw N., Morín M., Mayo-Merino F., Olavarrieta L., Aguirre L.A., del Castillo I., Steel K.P., Dalmay T., Moreno F., Moreno-Pelayo M.A. 2009. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nature Genetics*, 41: 609-613.

Michal J.J., Zhang Z.W., Gaskins C.T., Jiang Z. 2006. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Animal Genetics*, 37: 400-402

Mishra P.J., Banerjee D., Bertino J.R. 2008. MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell Cycle*, 7, 7: 853-858

Mutch D.M., Clément K. 2006. Unraveling the genetics of human obesity. *PLoS Genetics*, 2, 12: 1956-1963

Mustacchi R., Hohmann S., Nielsen J. 2006. Yeast systems biology to unravel the network of life. *Yeast*, 23: 227-238

Nakanishi N., Nakagawa Y., Tokushige N., Aoki N., Matsuzaka T., Ishii K., Yahagi N., Kobayashi K., Yatoh S., Takahashi A., Suzuki H., Urayama O., Yamada N., Shimano H. 2009. The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385, 4: 492-6

Obesity and overweight. 2003. Word Health Organisation.

<http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/> (7. okt. 2010)

Ortega F.J., Moreno-Navarrete J.M., Pardo G., Sabater M., Hummel M., Ferrer A., Rodriguez-Hermosa J.I., Ruiz B., Ricart W., Peral B., Fernández-Real J.M. 2010. MiRNA Expression Profile of Human Subcutaneous Adipose and during Adipocyte Differentiation. *PLoS ONE* 5, 2: e9022.

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0004699>
(2. okt. 2010)

Rankinen T., Zuberi A., Chagnon Y. C., Weisnagel S. J., Argyropoulos G., Walts B., Pérusse L., Bouchard C. 2006. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity*, 14, 4: 529-644

- Shen W., Wang Z.-M., Punyanita M., Lei J., Sinav A., Kral J.G., Imielinska C., Ross R., Heymsfield S.B. 2003. Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification. *Obesity Research*, 11, 1: 5–16
- Sun G., Yan J., Noltner K., Feng J., Li H., Sarkis D.A., Sommer S.S., Rossi J.J. 2009. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*; 15: 1640-1651
- Takanabe R., Ono K., Abe Y., Takaya T., Horie T., Wada H., Kita T., Satoh N., Shimatsu A., Hasegawa K. 2008. Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376, 4: 728-732
- Taccioli C., Fabbri E., Visone R., Volinia S., Calin G.A., Fong L.Y., Gambari R., Bottoni A., Acunzo M., Hagan J., Iorio M.V., Piovan C., Romano G., Croce C.M. 2009. UCbase & miRfunc: a database of ultraconserved sequences and microRNA function. *Nucleic Acids Research*, 37: 41-48
- The Gale Encyclopedia of Medicine, vol. 4. 2nd ed. Longe J.L., Blanchfield D. S. (eds.). Detroit, MI: Gale Group/Thomson Learning: 2373-2378
- Toyota M., Suzuki H., Sasaki Y., Maruyama K., Imai K., Shinomura Y., Takino T. 2008. Epigenetic Silencing of MicroRNA-34b/c and B-Cell Translocation Gene 4 Is Associated with CpG Island Methylation in Colorectal Cancer. *Cancer Research*, 68, 11: 4123-4132
- Trujillo M.E., Scherer P.E. 2006. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocrine Reviews*, 27: 762-778
- Viswanathan G.A., Seto J., Patil S., Nudelman G., Sealfon S.C. 2008. Getting Started in Biological Pathway Construction and Analysis. *PLoS Computational Biology*, 4, 2: e16. <http://www.ploscompbiol.org/article/info:doi/10.1371/journal.pcbi.0040016>
(15. mar. 2009)
- Vodovotz Y., Csete M., Bartels J., Chang S., An G. 2008. Translational System Biology of Inflammation. *PLoS Computational Biology*, 4, 4: e1000014

Wang Q., Wang Y., Minto A.W., Wang J., Shi Q., Li X., Quigg R.J. 2008. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy. FASEB Journal, 22, 12: 4126-4135

Wienholds E., Plasterk R. H. 2005. MicroRNA function in animal development. FEBS Letters, 579, 26: 5911-5922

Winter A., Krämer W., Werner F.A.O., Kollers S., Kata S., Durstewitz G., Buitkamp J., Womack J.E., Thaller G., Frie R. 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 14: 9300-9305

Wu X.L., MacNeil M.D., De S., Xiao Q.J., Michal J.J., Gaskins C.T., Reeves J.J., Busboom J.R., Raymond W. Wright R.W. Jr., Jiang Z. 2005 . Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection. Genetica, 125, 1: 103-113.

Zhao E., Keller M.P., Rabaglia M.E., Oler A.T., Stapleton D.S., Schueler K.L., Neto E.C., Moon J.Y., Wang P., Wang I.M., Lum P.Y., Ivanovska I., Cleary M., Greenawalt D., Tsang J., Choi Y.J., Kleinhanz R., Shang J., Zhou Y.P., Howard A.D., Zhang B.B., Kendziorski C., Thornberry N.A., Yandell B.S., Schadt E.E., Attie A.D. 2009. Obesity and genetics regulate microRNAs in islets, liver, and adipose of diabetic mice. Mammalian Genome, 20, 8: 476-485

Xie H., Lim B., Lodish H. F. 2009. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. Diabetes, 58, 5: 1050-1057

9 ZAHVALA

Mentorici doc. dr. Tanji Kunej se zahvaljujem za potrpežljivost, strokovnost in spodbudo pri pisanju naloge.

Za komentarje, predloge in pomoč pri izvedbi naloge se zahvaljujem somentorju prof. dr. Simonu Horvatu.

Prof. dr. Petru Dovču se zahvaljujem za hiter in temeljit pregled naloge.

Za vzorce se zahvaljujem prof. dr. Silvestru Žgurju, prof. dr. Mileni Kovač in prof. dr. Simonu Horvatu.

Za pomoč pri iskanju bioloških poti se zahvaljujem dr. Carlu Vittoriu Cannistraci (King Abdullah University of Science and Technology (KAUST)).

Za sodelovanje se zahvaljujem tudi prof. dr. Zhihui Jiangu in njegovi skupini iz Washington State University (WSU).

Za razvoj orodja Ondex za analize pri prašičih se zahvaljujem dr. Catherine Canevet in Keywan Hassani-Pak.

Hvala sodelavcem Katedre za genetiko, animalno bioteknologijo in imunologijo, Oddelka za zootehniko za pomoč pri delu in odlično vzdušje v laboratoriju.

Družini in prijateljem najlepša hvala za spodbudo in podporo v času študija.

PRILOGE

Priloga A: miRNA iz literature do sedaj povezana z nalaganjem mašcobe

miR-	Referenca	Izraženost	
1	Georges in sod., 2007 Zhao in sod., 2009	↑ ↑	skleletne mišice debelost
7	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
7a	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
7b	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
7c	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
7d	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
7e	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
7f	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
7g	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
7i	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
let-7b	Ortega in sod., 2010 Kajimoto in sod., 2006	↑ ↑	število adipocitov 3T3-L1 pre-adipociti
let-7c	Ortega in sod., 2010	↓	število adipocitov
let-7e	Ortega in sod., 2010	↑	število adipocitov
let-7f	Ortega in sod., 2010	↓	število adipocitov
let-7i	Ortega in sod., 2010	↓	število adipocitov
10a	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↑ ↑	število adipocitov število adipocitov
10b	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↑ ↓	število adipocitov število adipocitov
15	Kajimoto in sod., 2006	↑	3T3-L1 pre-adipociti
15a	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
15b	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
16	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
17-3p	Zhao in sod., 2009 Kajimoto in sod., 2006	↑ ↑	debelost število adipocitov
17-92	Jin in sod., 2010	↓	hrbni loj
20	Klöting in sod., 2009	↑	zamaščenost omentuma, podkožno maščevje
21	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
22	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
22*	Ortega in sod., 2010	↓	število adipocitov
23a	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
23a	Ortega in sod., 2010	↓	število adipocitov
23b	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
24	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
25	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
26a	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↑ ↑	3T3-L1 pre-adipociti število adipocitov
26b	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↑ ↓	število adipocitov število adipocitov

se nadaljuje

nadaljevanje

miR-	Referenca	Izraženost
27a	Kajimoto in sod., 2006 Klöting in sod., 2009	↑ ↑
27b	Kajimoto in sod., 2006	↑
285p	Ortega in sod., 2010	↑
298	Zhao in sod., 2009	↑
29a	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↑ ↓
29b	Kajimoto in sod., 2006 Klöting in sod., 2009 Ortega in sod., 2010	↑ ↑ ↓
29c	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↑ ↓
30a	Ortega in sod., 2010	↑
30a-5p	Kajimoto in sod., 2006	↑
30b	Kajimoto in sod., 2006	↑
30c	Kajimoto in sod., 2006 Klöting in sod., 2009	↑ ↑
30d	Kajimoto in sod., 2006	↑
30e	Kajimoto in sod., 2006	↑
31	Zhao in sod., 2009 Kajimoto in sod., 2006, Ortega in sod., 2010	↑ ↑ ↓
33	Kajimoto in sod., 2006	↑
34a	Ortega in sod., 2010 Zhao in sod., 2009	↑ ↑
34b	Kajimoto in sod., 2006 Zhao in sod., 2009	↑ ↑
34b*	Ortega in sod., 2010	↓
34c	Kajimoto in sod., 2006 Kajimoto in sod., 2006 Zhao in sod., 2009	↑ ↑ ↑
93	Jin in sod., 2010	↓
96	Kajimoto in sod., 2006	↑
98	Kajimoto in sod., 2006 Klöting in sod., 2009 Ortega in sod., 2010	↑ ↑ ↓
99a	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↑ ↑
99b	Kajimoto in sod., 2006	↑
100	Ortega in sod., 2010	↑

se nadaljuje

nadaljevanje

miR-	Referenca	Izraženost
101	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↑ ↓
101b	Kajimoto in sod., 2006	↑
103	Kajimoto in sod., 2006	↓
106	Kajimoto in sod., 2006	↑
122	Mack, 2007	Obesity
125a	Kajimoto in sod., 2006	↑
125b	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↑ ↓
126	Klöting in sod., 2009	↑
126*	Kajimoto in sod., 2006	↑
126-5p	Zhao in sod., 2009	↑
130a	Kajimoto in sod., 2006	↑
132	Zhao in sod., 2009	↑
133a	Zhao in sod., 2009	↑
133b	Zhao in sod., 2009	↑
135a	Zhao in sod., 2009	↑
137	Ortega in sod., 2010	↓
140	Klöting in sod., 2009	↑
143	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010 Takanabe in sod., 2008 Esau in sod., 2004 Lin in sod., 2009 Mack, 2007	↑ ↓ ↑ ↑ ↑ ↑
145	Kajimoto in sod., 2006 Klöting in sod., 2009	↑ ↑
146	Kajimoto in sod., 2006	↑
152	Kajimoto in sod., 2006	↑
141	Zhao in sod., 2009	↑
142-3p	Kajimoto in sod., 2006 Kajimoto in sod., 2006	↑ ↑
142-5p	Jin in sod., 2010	↓
148a	Kajimoto in sod., 2006	↑
151	Zhao in sod., 2009	↑
151-3p	Jin in sod., 2010	↓
151-5p	Jin in sod., 2010	↓
152	Zhao in sod., 2009	↑
175p	Klöting in sod., 2009	↑

se nadaljuje

nadaljevanje

miR-	Referenca		Izraženost
181a	Kajimoto in sod., 2006 Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↓ ↑ ↑	3T3-L1 pre-adipociti število adipocitov število adipocitov
182	Kajimoto in sod., 2006 Klöting in sod., 2009	↓ ↑	3T3-L1 pre-adipociti zamaščenost omentuma, podkožno maščevje
183	Kajimoto in sod., 2006	↑	3T3-L1 pre-adipociti
184	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
185	Kajimoto in sod., 2006 Zhao in sod., 2009	↑ ↑	3T3-L1 pre-adipociti debelost
186	Jin in sod., 2010	↓	hrbtne loj
189	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
190	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
191	Jin in sod., 2010	↓	hrbtne loj
192	Zhao in sod., 2009 Kajimoto in sod., 2006	↑ ↑	maščobno tkivo število adipocitov
193	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
193a-3p	Ortega in sod., 2010	↓	število adipocitov
195	Klöting in sod., 2009 Ortega in sod., 2010	↑ ↓	zamaščenost omentuma, podkožno maščevje število adipocitov
196	Jin in sod., 2010	↑	hrbtne loj
196a	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
197	Klöting in sod., 2009	↑	zamaščenost omentuma, podkožno maščevje
199a	Kajimoto in sod., 2006 Klöting in sod., 2009	↑ ↑	število adipocitov zamaščenost omentuma, podkožno maščevje
199a*	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
199a-3p	Jin in sod., 2010	↓	hrbtne loj
199b	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
200a	Kajimoto in sod., 2006 Zhao in sod., 2009	↑ ↑	število adipocitov debelost
200b	Kajimoto in sod., 2006 Zhao in sod., 2009	↑ ↑	število adipocitov debelost
200c	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
201	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
204	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
205	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
206	Georges in sod., 2007	↑	skleletne mišice
210	Ortega in sod., 2010	↑	število adipocitov
211	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
212	Zhao in sod., 2009	↑	debelost

se nadaljuje

nadaljevanje

miR-	Referenca	Izraženost	
214	Jin in sod., 2010 Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↓ ↑ ↑	hrbtni loj število adipocitov število adipocitov
215	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
218	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
221	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010 Zhao in sod., 2009	↑ ↓ ↑	število adipocitov število adipocitov debelost
221*	Ortega in sod., 2010	↓	število adipocitov
222	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
224	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↑ ↓	3T3-L1 pre-adipociti število adipocitov
320	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
328	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
328	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
329	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
330	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
331	Kajimoto in sod., 2006 Klöting in sod., 2009	↑ ↑	število adipocitov zamaščenost omentuma, podkožno maščevje
335	Klöting in sod., 2009 Nakanishi in sod., 2009	↑	zamaščenost omentuma, podkožno maščevje belo maščobno tkivo
351	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
342	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
365	Ortega in sod., 2010	↓	število adipocitov
375	Mack, 2007		diabetes
375	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
376c	Ortega in sod., 2010	↑	število adipocitov
377	Wang in sod., 2008	↑	diabetes
378	Jin in sod., 2010	↑	hrbtni loj
380-5p	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
410	Ortega in sod., 2010	↑	število adipocitov
422	Kajimoto in sod., 2006	↑	3T3-L1 pre-adipociti
422b	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
423	Kajimoto in sod., 2006	↑	število adipocitov
424	Kajimoto in sod., 2006 Ortega in sod., 2010	↑ ↓	število adipocitov število adipocitov
429	Zhao in sod., 2009	↑	debelost
450a	Ortega in sod., 2010	↓	število adipocitov
494	Ortega in sod., 2010	↓	število adipocitov
503	Ortega in sod., 2010	↑	število adipocitov

se nadaljuje

nadaljevanje

miR-	Referenca	Izraženost
923	Ortega in sod., 2010	↑
	Klöting in sod., 2009	↑
1403p	Ortega in sod., 2010	↓
3373p	Ortega in sod., 2010	↓
3423p	Ortega in sod., 2010	↑
3432	Jin in sod., 2010	↑
4553p	Ortega in sod., 2010	↑
5423p	Ortega in sod., 2010	↑
5425p	Ortega in sod., 2010	↑
7683p	Ortega in sod., 2010	↑

↑: povišano, ↓: zmanjšano

Priloga B Seznam 669 genov, povezanih z nalaganjem maščobe izbranih iz podatkovnih zbirk OGM,
MGI, RGD in podatkov iz literature

Gen	Ime gena
<i>A2BP1</i>	RNA binding protein, fox-1 homolog (<i>C. elegans</i>) 1
<i>A4GALT</i>	alpha 1,4-galactosyltransferase
<i>ABCA1</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
<i>ABCA7</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7
<i>ABCC8</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8
<i>ABCG5</i>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5
<i>ABCG8</i>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8
<i>ACACB</i>	acetyl-CoA carboxylase beta
<i>ACADVL</i>	acyl-CoA dehydrogenase, very long chain
<i>ACE</i>	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1
<i>ACHE</i>	acetylcholinesterase
<i>ACOT11</i>	acyl-CoA thioesterase 11
<i>ACP1</i>	acid phosphatase 1, soluble
<i>ACSL1</i>	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
<i>ACTA1</i>	actin, alpha 1, skeletal muscle
<i>ADA</i>	adenosine deaminase
<i>ADAM12</i>	ADAM metallopeptidase domain 12
<i>ADAM17</i>	ADAM metallopeptidase domain 17
<i>ADAMTS1</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1
<i>ADCYAP1</i>	adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary)
<i>ADIG</i>	adipogenin
<i>ADIPOQ</i>	adiponectin, C1Q and collagen domain containing
<i>ADIPOR1</i>	adiponectin receptor 1
<i>ADIPOR2</i>	adiponectin receptor 2
<i>ADM</i>	adrenomedullin
<i>ADORA1</i>	adenosine A1 receptor
<i>ADRA1B</i>	adrenergic, alpha-1B-, receptor
<i>ADRA2A</i>	adrenergic, alpha-2A-, receptor
<i>ADRA2B</i>	adrenergic, alpha-2B-, receptor
<i>ADRB1</i>	adrenergic, beta-1-, receptor
<i>ADRB2</i>	adrenergic, beta-2-, receptor, surface
<i>ADRB3</i>	adrenergic, beta-3-, receptor
<i>AEBP1</i>	AE binding protein 1
<i>AGPAT2</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta)
<i>AGRP</i>	agouti related protein homolog (mouse)
<i>AGT</i>	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
<i>AGTR2</i>	angiotensin II receptor, type 2
<i>AHO2</i>	Albright hereditary osteodystrophy-2
<i>AHSG</i>	alpha-2-HS-glycoprotein
<i>AK1</i>	adenylate kinase 1
<i>AKR1C1</i>	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)
<i>AKR1C2</i>	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)
<i>AKT1</i>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>AKT2</i>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
<i>ALMS1</i>	Alstrom syndrome 1
<i>ALOX12</i>	arachidonate 12-lipoxygenase
<i>ALPI</i>	alkaline phosphatase, intestinal
<i>ALPL</i>	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
<i>AMACR</i>	alpha-methylacyl-CoA racemase
<i>AMH</i>	anti-Mullerian hormone
<i>ANGPTL4</i>	angiopoietin-like 4
<i>ANGPTL6</i>	angiopoietin-like 6
<i>ANKRD26</i>	ankyrin repeat domain 26
<i>ANMA</i>	anisomastia
<i>APLN</i>	apelin
<i>APLNR</i>	apelin receptor
<i>APOA1</i>	apolipoprotein A-I
<i>APOA2</i>	apolipoprotein A-II
<i>APOA4</i>	apolipoprotein A-IV
<i>APOA5</i>	apolipoprotein A-V
<i>APOB</i>	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)
<i>APOBEC1</i>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1
<i>APOC1</i>	apolipoprotein C-I
<i>APOC2</i>	apolipoprotein C-II
<i>APOC3</i>	apolipoprotein C-III
<i>APOD</i>	apolipoprotein D
<i>APOE</i>	apolipoprotein E
<i>AQP7</i>	aquaporin 7
<i>AR</i>	androgen receptor
<i>ARHGAPI</i>	Rho GTPase activating protein 1
<i>ARID5B</i>	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)
<i>ARL6</i>	ADP-ribosylation factor-like 6
<i>ASIP</i>	agouti signaling protein
<i>ASPA</i>	aspartoacylase
<i>ATP12A</i>	ATPase, H+/K+ transporting, nongastric, alpha polypeptide
<i>ATP1A2</i>	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 2 polypeptide
<i>ATP1B1</i>	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide
<i>ATP8B1</i>	ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8B, member 1
<i>ATR</i>	ataxia telangiectasia and Rad3 related
<i>ATRN</i>	actin
<i>AZGP1</i>	alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding
<i>B2M</i>	beta-2-microglobulin
<i>B4GALT1</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1
<i>BAD</i>	BCL2-associated agonist of cell death
<i>BAK1</i>	BCL2-antagonist/killer 1
<i>BATF</i>	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like
<i>BBS1</i>	Bardet-Biedl syndrome 1
<i>BBS2</i>	Bardet-Biedl syndrome 2
<i>BBS4</i>	Bardet-Biedl syndrome 4

se nadaljuje

nadaljevanje

GEN	IME GENA
<i>BBS5</i>	Bardet-Biedl syndrome 5
<i>BBS7</i>	Bardet-Biedl syndrome 7
<i>BBS8</i>	tetratricopeptide repeat domain 8
<i>BCAT2</i>	branched chain amino-acid transaminase 2, mitochondrial
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2
<i>BDKRB1</i>	bradykinin receptor B1
<i>BDKRB2</i>	bradykinin receptor B2
<i>BDNF</i>	brain-derived neurotrophic factor
<i>BF</i>	complement factor B
<i>BRS3</i>	bombesin-like receptor 3
<i>BSCL2</i>	Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (seipin)
<i>BSX</i>	brain-specific homeobox
<i>BUB1B</i>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)
<i>BUB3</i>	budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast)
<i>C3</i>	complement component 3
<i>CACNA1S</i>	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit
<i>CALCA</i>	calcitonin-related polypeptide alpha
<i>CAMKK2</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta
<i>CAPN1</i>	calpain 1, (mu/I) large subunit
<i>CAPN10</i>	calpain 10
<i>CAPN12</i>	calpain 12
<i>CAPN14</i>	calpain 14
<i>CARP2</i>	carbonic anhydrase XI
<i>CART</i>	CART prepropeptide
<i>CAST</i>	calpastatin
<i>CAV1</i>	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
<i>CAV3</i>	caveolin 3
<i>CBFA2T1</i>	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)
<i>CBL</i>	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence
<i>CBY1</i>	chibby homolog 1 (Drosophila)
<i>CCK</i>	cholecystokinin
<i>CCKAR</i>	cholecystokinin A receptor
<i>CCKBR</i>	cholecystokinin B receptor
<i>CCL2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 2
<i>CCND1</i>	cyclin D1
<i>CCND3</i>	cyclin D3
<i>CD36</i>	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
<i>CDC73</i>	cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)
<i>CDH2</i>	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
<i>CDKN1A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
<i>CDKN1B</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
<i>CDO1</i>	cysteine dioxygenase, type I
<i>CEBPA</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
<i>CEPB</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
<i>CEBD</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>CEL</i>	carboxyl ester lipase (bile salt-stimulated lipase)
<i>CETP</i>	cholesteryl ester transfer protein, plasma
<i>CFD</i>	complement factor D (adipsin)
<i>CFH</i>	complement factor H
<i>CHD7</i>	chromodomain helicase DNA binding protein 7
<i>CHM</i>	choroideremia (Rab escort protein 1)
<i>CHRM3</i>	cholinergic receptor, muscarinic 3
<i>CIDEA</i>	cell death-inducing DFFA-like effector a
<i>CIDEB</i>	cell death-inducing DFFA-like effector b
<i>CIDEC</i>	cell death-inducing DFFA-like effector c
<i>CLOCK</i>	clock homolog (mouse)
<i>CLPS</i>	colipase, pancreatic
<i>CNR1</i>	cannabinoid receptor 1 (brain)
<i>CNTF</i>	ciliary neurotrophic factor
<i>CNTFR</i>	ciliary neurotrophic factor receptor
<i>COL8A2</i>	collagen, type VIII, alpha 2
<i>COMT</i>	catechol-O-methyltransferase
<i>CORIN</i>	corin, serine peptidase
<i>COX8B</i>	cytochrome c oxidase, subunit 8B pseudogene
<i>CPE</i>	carboxypeptidase E
<i>CPS1</i>	carbamoyl-phosphate synthase 1, mitochondrial
<i>CPT1A</i>	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)
<i>CREBBP</i>	CREB binding protein
<i>CRH</i>	corticotropin releasing hormone
<i>CRHR1</i>	corticotropin releasing hormone receptor 1
<i>CRHR2</i>	corticotropin releasing hormone receptor 2
<i>CRP</i>	C-reactive protein, pentraxin-related
<i>CRY1</i>	cryptochrome 1 (photolyase-like)
<i>CRY2</i>	cryptochrome 2 (photolyase-like)
<i>CTNNBL1</i>	catenin, beta like 1
<i>CTSC</i>	cathepsin C
<i>CTSK</i>	cathepsin K
<i>CUX1</i>	cut-like homeobox 1
<i>CX3CR1</i>	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
<i>CXCL14</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 14
<i>CYB5R4</i>	cytochrome b5 reductase 4
<i>CYP11B2</i>	cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2
<i>CYP19A1</i>	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1
<i>CYP2D6</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6
<i>CYP2E1</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
<i>CYP2J2</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2
<i>CYP7A1</i>	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
<i>DAB2IP</i>	DAB2 interacting protein
<i>DBH</i>	dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monooxygenase)
<i>DDR2</i>	discoidin domain receptor tyrosine kinase 2
<i>DECRI</i>	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>DGAT1</i>	diacylglycerol O-acyltransferase 1
<i>DGAT2</i>	diacylglycerol O-acyltransferase 2
<i>DHCR24</i>	24-dehydrocholesterol reductase
<i>DIO1</i>	deiodinase, iodothyronine, type I
<i>DIO2</i>	deiodinase, iodothyronine, type II
<i>DLK1</i>	delta-like 1 homolog (Drosophila)
<i>DNAJC3</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3
<i>DOB1</i>	superkiller viralicidic activity 2-like 2 (S. cerevisiae)
<i>DOK1</i>	docking protein 1, 62kDa (downstream of tyrosine kinase 1)
<i>DOK5</i>	docking protein 5
<i>DPP9</i>	dipeptidyl-peptidase 9
<i>DPT</i>	dermatopontin
<i>DRD2</i>	dopamine receptor D2
<i>DRD3</i>	dopamine receptor D3
<i>DRD4</i>	dopamine receptor D4
<i>DSG3</i>	desmoglein 3
<i>DUOX2</i>	dual oxidase 2
<i>DUSP1</i>	dual specificity phosphatase 1
<i>DUSP1</i>	dual specificity phosphatase 12
<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1
<i>E2F3</i>	E2F transcription factor 3
<i>EDG1</i>	sphingosine-1-phosphate receptor 1
<i>EFEMP1</i>	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor
<i>EIF4EBP1</i>	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
<i>EIF6</i>	eukaryotic translation initiation factor 6
<i>ENPP1</i>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
<i>ERCC1</i>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)
<i>EREG</i>	epiregulin
<i>ESD</i>	esterase D
<i>ESR1</i>	estrogen receptor 1
<i>ESR2</i>	estrogen receptor 2 (ER beta)
<i>ESRRA</i>	estrogen-related receptor alpha
<i>EWSR1</i>	Ewing sarcoma breakpoint region 1
<i>FAAH</i>	fatty acid amide hydrolase
<i>FABP1</i>	fatty acid binding protein 1, liver
<i>FABP2</i>	fatty acid binding protein 2, intestinal
<i>FABP3</i>	fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)
<i>FABP4</i>	fatty acid binding protein 4, adipocyte
<i>FABP5</i>	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
<i>FADS1</i>	fatty acid desaturase 1
<i>FADS2</i>	fatty acid desaturase 2
<i>FASN</i>	fatty acid synthase
<i>FDFT1</i>	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
<i>FEN1</i>	flap structure-specific endonuclease 1

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>FGF21</i>	fibroblast growth factor 21
<i>FGF8</i>	fibroblast growth factor 8 (androgen-induced)
<i>FGFR3</i>	fibroblast growth factor receptor 3
<i>FKHL18</i>	forkhead box S1
<i>FMR1</i>	fragile X mental retardation 1
<i>FOSB</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
<i>FOXA2</i>	forkhead box A2
<i>FOXC2</i>	forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)
<i>FSHR</i>	follicle stimulating hormone receptor
<i>FTO</i>	fat mass and obesity associated
<i>FXYD4</i>	FXYD domain containing ion transport regulator 4
<i>GABBR1</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1
<i>GABRA6</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 6
<i>GABRG3</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 3
<i>GAD2</i>	glutamate decarboxylase 2 (pancreatic islets and brain, 65kDa)
<i>GAL</i>	galanin prepropeptide
<i>GALR1</i>	galanin receptor 1
<i>GAMT</i>	guanidinoacetate N-methyltransferase
<i>GAS6</i>	growth arrest-specific 6
<i>GAST</i>	gastrin
<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3
<i>GCGR</i>	glucagon receptor
<i>GCK</i>	glucokinase (hexokinase 4)
<i>GCKR</i>	glucokinase (hexokinase 4) regulator
<i>GDF3</i>	growth differentiation factor 3
<i>GFPT1</i>	glutamine--fructose-6-phosphate transaminase 1
<i>GFRA2</i>	GDNF family receptor alpha 2
<i>GGT1</i>	gamma-glutamyltransferase 1
<i>GH</i>	growth hormone 1
<i>GHR</i>	growth hormone receptor
<i>GHRH</i>	growth hormone releasing hormone
<i>GHRHR</i>	growth hormone releasing hormone receptor
<i>GHRL</i>	ghrelin/obestatin prepropeptide
<i>GHSR</i>	growth hormone secretagogue receptor
<i>GIPR</i>	gastric inhibitory polypeptide receptor
<i>GLO1</i>	glyoxalase I
<i>GLP1R</i>	glucagon-like peptide 1 receptor
<i>GLRA1</i>	glycine receptor, alpha 1
<i>GLUL</i>	glutamate-ammonia ligase
<i>GNAS</i>	GNAS complex locus
<i>GNB3</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3
<i>GNG3</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3
<i>GPAM</i>	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial
<i>GPBAR1</i>	G protein-coupled bile acid receptor 1
<i>GPC1</i>	glypican 1
<i>GPC3</i>	glypican 3

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>GPC4</i>	glypican 4
<i>GPD2</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)
<i>GPHB5</i>	glycoprotein hormone beta 5
<i>GPM6A</i>	glycoprotein M6A
<i>GPR109A</i>	G protein-coupled receptor 109A
<i>GPR12</i>	G protein-coupled receptor 12
<i>GPR35</i>	G protein-coupled receptor 35
<i>GPR37</i>	G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)
<i>GPR39</i>	G protein-coupled receptor 39
<i>GPR40</i>	free fatty acid receptor 1
<i>GPR50</i>	G protein-coupled receptor 50
<i>GPR7</i>	neuropeptides B/W receptor 1
<i>GPSM1</i>	G-protein signaling modulator 1
<i>GPX1</i>	glutathione peroxidase 1
<i>GRM1</i>	glutamate receptor, metabotropic 1
<i>GRM5</i>	glutamate receptor, metabotropic 5
<i>GRM8</i>	glutamate receptor, metabotropic 8
<i>GSK3A</i>	glycogen synthase kinase 3 alpha
<i>GSK3B</i>	glycogen synthase kinase 3 beta
<i>GTRGEO22</i>	chromosome 19 open reading frame 20
<i>GUSB</i>	glucuronidase, beta
<i>GYPA</i>	glycophorin A (MNS blood group)
<i>GYSI</i>	glycogen synthase 1 (muscle)
<i>H6PD</i>	hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)
<i>HADH</i>	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
<i>HCRT</i>	hypocretin (orexin) neuropeptide precursor
<i>HD</i>	huntingtin
<i>HDAC3</i>	histone deacetylase 3
<i>HDC</i>	histidine decarboxylase
<i>HELLS</i>	helicase, lymphoid-specific
<i>HEXB</i>	hexosaminidase B (beta polypeptide)
<i>HFE</i>	hemochromatosis
<i>HGF</i>	hepatocyte growth factor (hepatopoietin A; scatter factor)
<i>HIF1A</i>	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
<i>HK1</i>	hexokinase 1
<i>HK2</i>	hexokinase 2
<i>HMGA2</i>	high mobility group AT-hook 2
<i>HNF1A</i>	HNF1 homeobox A
<i>HP</i>	haptoglobin
<i>HRH1</i>	histamine receptor H1
<i>HRH3</i>	histamine receptor H3
<i>HSD11B1</i>	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1
<i>HSD11B2</i>	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2
<i>HSD3B1</i>	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1
<i>HSPA1B</i>	heat shock 70kDa protein 1B
<i>HTR1B</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>HTR2A</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A
<i>HTR2C</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C
<i>HTR5A</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A
<i>HTRA2</i>	HtrA serine peptidase 2
<i>ICAM1</i>	intercellular adhesion molecule 1
<i>ID2</i>	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
<i>IDE</i>	insulin-degrading enzyme
<i>IDH1</i>	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
<i>IFRD1</i>	interferon-related developmental regulator 1
<i>IGF1</i>	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
<i>IGF1R</i>	insulin-like growth factor 1 receptor
<i>IGF2</i>	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
<i>IGFBP2</i>	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa
<i>IGFBP6</i>	insulin-like growth factor binding protein 6
<i>IGKC</i>	immunoglobulin kappa constant
<i>IKBKG</i>	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma
<i>IL18</i>	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
<i>IL1B</i>	interleukin 1, beta
<i>IL1RN</i>	interleukin 1 receptor antagonist
<i>IL6</i>	interleukin 6 (interferon, beta 2)
<i>IL6R</i>	interleukin 6 receptor
<i>INPPL1</i>	inositol polyphosphate phosphatase-like 1
<i>INS</i>	insulin
<i>INS1</i>	Insulin 1
<i>INSIG2</i>	insulin induced gene 2
<i>INSR</i>	insulin receptor
<i>IPW</i>	imprinted in Prader-Willi syndrome (non-protein coding)
<i>IRS1</i>	insulin receptor substrate 1
<i>IRS2</i>	insulin receptor substrate 2
<i>ISL1</i>	ISL LIM homeobox 1
<i>JAK2</i>	Janus kinase 2
<i>JAZF1</i>	JAZF zinc finger 1
<i>KCNA3</i>	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3
<i>KCNJ11</i>	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11
<i>KCTD15</i>	potassium channel tetramerisation domain containing 15
<i>KEL</i>	Kell blood group, metallo-endopeptidase
<i>KL</i>	klotho
<i>KLF3</i>	Kruppel-like factor 3 (basic)
<i>KLF5</i>	Kruppel-like factor 5 (intestinal)
<i>KLF7</i>	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)
<i>KRT71</i>	keratin 71
<i>LBR</i>	lamin B receptor
<i>LDLR</i>	low density lipoprotein receptor
<i>LEF1</i>	lymphoid enhancer-binding factor 1
<i>LEP</i>	leptin
<i>LEPR</i>	leptin receptor

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>LHB</i>	luteinizing hormone beta polypeptide
<i>LIPA</i>	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase
<i>LIPC</i>	lipase, hepatic
<i>LIPE</i>	lipase, hormone-sensitive
<i>LIPG</i>	lipase, endothelial
<i>LMNA</i>	lamin A/C
<i>LPAR1</i>	lysophosphatidic acid receptor 1
<i>LPIN1</i>	lipin 1
<i>LPL</i>	lipoprotein lipase
<i>LRPAP1</i>	low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1
<i>LTA</i>	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
<i>MAGEL2</i>	MAGE-like 2
<i>MAOA</i>	monoamine oxidase A
<i>MAPK3</i>	mitogen-activated protein kinase 3
<i>MAPK8</i>	mitogen-activated protein kinase 8
<i>MAPK8IP1</i>	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1
<i>MC2R</i>	melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropic hormone)
<i>MC3R</i>	melanocortin 3 receptor
<i>MC4R</i>	melanocortin 4 receptor
<i>MC5R</i>	melanocortin 5 receptor
<i>MCHR1</i>	melanin-concentrating hormone receptor 1
<i>MCM2</i>	minichromosome maintenance complex component 2
<i>MCOLN1</i>	mucolipin 1
<i>MECP2</i>	methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome)
<i>MED12</i>	mediator complex subunit 12
<i>MEHMO</i>	mental retardation, epileptic seizures, hypogonadism and -genitalism, microcephaly and obesity syndrome
<i>MEN1</i>	multiple endocrine neoplasia I
<i>MEST</i>	mesoderm specific transcript homolog (mouse)
<i>METTL8</i>	methyltransferase like 8
<i>MFN2</i>	mitofusin 2
<i>MGAT1</i>	mannosyl (alpha-1,3)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase
<i>MGRN1</i>	mahogunin, ring finger 1
<i>MIF</i>	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
<i>MKKS</i>	McKusick-Kaufman syndrome
<i>MKRN3</i>	makorin ring finger protein 3
<i>MLXIPL</i>	MLX interacting protein-like
<i>MMP11</i>	matrix metallopeptidase 11 (stromelysin 3)
<i>MMP19</i>	matrix metallopeptidase 19
<i>MMP9</i>	matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
<i>MOB1</i>	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1B (yeast)
<i>MRXS11</i>	mental retardation, X-linked, syndromic 11
<i>MRXS7</i>	mental retardation, X-linked, syndromic 7
<i>MSRA</i>	methionine sulfoxide reductase A
<i>MSTN</i>	myostatin
<i>MT1A</i>	metallothionein 1A

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>MTCH2</i>	mitochondrial carrier homolog 2 (C. elegans)
<i>MTFR1</i>	mitochondrial fission regulator 1
<i>MTTP</i>	microsomal triglyceride transfer protein
<i>MYC</i>	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
<i>MYOG</i>	myogenin (myogenic factor 4)
<i>NAMPT</i>	nicotinamide phosphoribosyltransferase
<i>NCOA3</i>	nuclear receptor coactivator 3
<i>NDN</i>	necdin homolog (mouse)
<i>NEB</i>	nebulin
<i>NEGRI1</i>	neuronal growth regulator 1
<i>NEIL1</i>	nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)
<i>NEUROD1</i>	neurogenic differentiation 1
<i>NHLH2</i>	nescient helix loop helix 2
<i>NMB</i>	neuromedin B
<i>NMU</i>	neuromedin U
<i>NOS1</i>	nitric oxide synthase 1 (neuronal)
<i>NOSIAP</i>	nitric oxide synthase 1 (neuronal) adaptor protein
<i>NOS2</i>	nitric oxide synthase 2, inducible
<i>NOS3</i>	nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)
<i>NOX3</i>	NADPH oxidase 3
<i>NPB</i>	neuropeptide B
<i>NPC1</i>	Niemann-Pick disease, type C1
<i>NPPB</i>	natriuretic peptide precursor B
<i>NPR3</i>	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)
<i>NPY</i>	neuropeptide Y
<i>NPY1R</i>	neuropeptide Y receptor Y1
<i>NPY2R</i>	neuropeptide Y receptor Y2
<i>NPY5R</i>	neuropeptide Y receptor Y5
<i>NQO1</i>	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
<i>NR0B2</i>	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2
<i>NR1H2</i>	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2
<i>NR1H3</i>	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3
<i>NR1I3</i>	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3
<i>NR2E1</i>	nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1
<i>NR3C1</i>	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)
<i>NRXN3</i>	neurexin 3
<i>NTRK2</i>	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
<i>NTSR1</i>	neurotensin receptor 1 (high affinity)
<i>OFD1</i>	oral-facial-digital syndrome 1
<i>OPRM1</i>	opioid receptor, mu 1
<i>ORM1</i>	orosomucoid 1
<i>PAH</i>	phenylalanine hydroxylase
<i>PAM</i>	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
<i>PARP1</i>	poly (ADP-ribose) polymerase 1
<i>PAX6</i>	paired box 6
<i>PCSK1</i>	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>PCSK1N</i>	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor
<i>PDE3B</i>	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited
<i>PDP1</i>	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 1
<i>PDYN</i>	prodynorphin
<i>PEG3</i>	paternally expressed 3
<i>PEMT</i>	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
<i>PER2</i>	period homolog 2 (<i>Drosophila</i>)
<i>PGD</i>	phosphogluconate dehydrogenase
<i>PGF</i>	placental growth factor
<i>PGR</i>	progesterone receptor
<i>PHEX</i>	phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked
<i>PHF6</i>	PHD finger protein 6
<i>PIK3CB</i>	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide
<i>PIK3R1</i>	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
<i>PIP4K2B</i>	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, beta
<i>PKLR</i>	pyruvate kinase, liver and RBC
<i>PKNOX1</i>	PBX/knotted 1 homeobox 1
<i>PLA2G1B</i>	phospholipase A2, group IB (pancreas)
<i>PLIN</i>	perilipin 1
<i>PLSCR1</i>	phospholipid scramblase 1
<i>PLSCR3</i>	phospholipid scramblase 3
<i>PMCH</i>	pro-melanin-concentrating hormone
<i>PMM2</i>	phosphomannomutase 2
<i>PNLIP</i>	pancreatic lipase
<i>PNMT</i>	phenylethanolamine N-methyltransferase
<i>PNPLA2</i>	patatin-like phospholipase domain containing 2
<i>PNPLA3</i>	patatin-like phospholipase domain containing 3
<i>PNRC2</i>	proline-rich nuclear receptor coactivator 2
<i>POLG</i>	polymerase (DNA directed), gamma
<i>POMC</i>	proopiomelanocortin
<i>PON1</i>	paraoxonase 1
<i>PON2</i>	paraoxonase 2
<i>POR</i>	P450 (cytochrome) oxidoreductase
<i>POU1F1</i>	POU class 1 homeobox 1
<i>POU3F2</i>	POU class 3 homeobox 2
<i>PPARA</i>	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
<i>PPARD</i>	peroxisome proliferator-activated receptor delta
<i>PPARG</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
<i>PPARGC1A</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
<i>PPARGC1B</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta
<i>PPM1L</i>	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1L
<i>PPP1R3A</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3A
<i>PPP1R3C</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C
<i>PPY</i>	pancreatic polypeptide
<i>PPYR1</i>	pancreatic polypeptide receptor 1
<i>PRKAA2</i>	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>PRKAG3</i>	protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit
<i>PRKAR1A</i>	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)
<i>PRKAR2B</i>	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta
<i>PRKCB</i>	protein kinase C, beta
<i>PRKCD</i>	protein kinase C, delta
<i>PRKCE</i>	protein kinase C, epsilon
<i>PRKCQ</i>	protein kinase C, theta
<i>PRL</i>	prolactin
<i>PRLH</i>	prolactin releasing hormone
<i>PRLHR</i>	prolactin releasing hormone receptor
<i>PROP1</i>	PROP paired-like homeobox 1
<i>PROX1</i>	prospero homeobox 1
<i>PSIP1</i>	PC4 and SFRS1 interacting protein 1
<i>PTPN1</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1
<i>PTPN11</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
<i>PTPNS1</i>	signal-regulatory protein alpha
<i>PTPRF</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
<i>PTTG1</i>	pituitary tumor-transforming 1
<i>PYY</i>	peptide YY
<i>RAB2A</i>	RAB2A, member RAS oncogene family
<i>RAB6B</i>	RAB6B, member RAS oncogene family
<i>RAD23B</i>	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)
<i>RAE1</i>	RAE1 RNA export 1 homolog (S. pombe)
<i>RAI1</i>	retinoic acid induced 1
<i>RARRES2</i>	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2
<i>RASGRF1</i>	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1
<i>RBP4</i>	retinol binding protein 4, plasma
<i>RCAN1</i>	regulator of calcineurin 1
<i>RDH1</i>	retinol dehydrogenase 5 (11-cis/9-cis)
<i>RELA</i>	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
<i>REN</i>	renin
<i>RETN</i>	resistin
<i>RETNLB</i>	resistin like beta
<i>RGS4</i>	regulator of G-protein signaling 4
<i>RGS5</i>	regulator of G-protein signaling 5
<i>RHOA</i>	ras homolog gene family, member A
<i>RNASEN</i>	ribonuclease type III, nuclear
<i>ROR2</i>	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
<i>RORC</i>	RAR-related orphan receptor C
<i>RPS6</i>	ribosomal protein S6
<i>RPS6KA3</i>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3
<i>RPS6KB1</i>	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
<i>RSC1A1</i>	regulatory solute carrier protein, family 1, member 1
<i>RUNX3</i>	runt-related transcription factor 3
<i>RXRA</i>	retinoid X receptor, alpha
<i>RXRG</i>	retinoid X receptor, gamma

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>SAH</i>	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3
<i>SAT1</i>	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1
<i>SCARB1</i>	scavenger receptor class B, member 1
<i>SCD</i>	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
<i>SCD5</i>	stearoyl-CoA desaturase 5
<i>SCP2</i>	sterol carrier protein 2
<i>SDC1</i>	syndecan 1
<i>SDC3</i>	syndecan 3
<i>SDCCAG8</i>	serologically defined colon cancer antigen 8
<i>SEC16B</i>	SEC16 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
<i>SELS</i>	selenoprotein S
<i>SERPINA12</i>	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 12
<i>SERPINE1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
<i>SFRP1</i>	secreted frizzled-related protein 1
<i>SGK</i>	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
<i>SH2B1</i>	SH2B adaptor protein 1
<i>SIM1</i>	single-minded homolog 1 (<i>Drosophila</i>)
<i>SIRT1</i>	sirtuin 1
<i>SIRT6</i>	sirtuin 6
<i>SLC12A2</i>	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2
<i>SLC17A6</i>	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6
<i>SLC27A1</i>	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1
<i>SLC27A2</i>	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2
<i>SLC27A4</i>	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4
<i>SLC2A2</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2
<i>SLC2A4</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4
<i>SLC30A7</i>	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 7
<i>SLC32A1</i>	solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter), member 1
<i>SLC3A1</i>	solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1
<i>SLC6A1</i>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1
<i>SLC6A14</i>	solute carrier family 6 (amino acid transporter), member 14
<i>SLC6A3</i>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3
<i>SLC9A3</i>	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3
<i>SMTN</i>	smoothelin
<i>SNORD116</i>	small nucleolar RNA, C/D box 116 cluster
<i>SNRPN</i>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N
<i>SOAT2</i>	sterol O-acyltransferase 2
<i>SOCS1</i>	suppressor of cytokine signaling 1
<i>SOCS3</i>	suppressor of cytokine signaling 3
<i>SOD2</i>	superoxide dismutase 2, mitochondrial
<i>SORBS1</i>	sorbin and SH3 domain containing 1
<i>SOX6</i>	SRY (sex determining region Y)-box 6
<i>SOX8</i>	SRY (sex determining region Y)-box 8
<i>SPARC</i>	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
<i>SQLE</i>	squalene epoxidase

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>SREBF1</i>	sterol regulatory element binding transcription factor 1
<i>STAT1</i>	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
<i>STAT3</i>	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
<i>STAT5B</i>	signal transducer and activator of transcription 5B
<i>STK11</i>	serine/threonine kinase 11
<i>STK25</i>	serine/threonine kinase 25
<i>TAF8</i>	TAF8 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 43kDa
<i>TBC1D1</i>	TBC1 (tre-2/USP6, BUB2, cdc16) domain family, member 1
<i>TBL2</i>	transducin (beta)-like 2
<i>TBX3</i>	T-box 3
<i>TBXA2R</i>	thromboxane A2 receptor
<i>TCF7L2</i>	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)
<i>TENC1</i>	tensin like C1 domain containing phosphatase (tensin 2)
<i>TERC</i>	telomerase RNA component
<i>TF</i>	transferrin
<i>TFAM</i>	transcription factor A, mitochondrial
<i>TFB1M</i>	transcription factor B1, mitochondrial
<i>TG</i>	thyroglobulin
<i>TGFB1</i>	transforming growth factor, beta 1
<i>TH</i>	tyrosine hydroxylase
<i>THBD</i>	thrombomodulin
<i>THRA</i>	thyroid hormone receptor, alpha (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog, avian)
<i>THRΒ</i>	thyroid hormone receptor, beta (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog 2, avian)
<i>TK2</i>	thymidine kinase 2, mitochondrial
<i>TKT</i>	transketolase
<i>TLR4</i>	toll-like receptor 4
<i>TMEM18</i>	transmembrane protein 18
<i>TNF</i>	tumor necrosis factor
<i>TNFRSF11A</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator
<i>TNFRSF11B</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
<i>TNFRSF1A</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
<i>TNFRSF1B</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
<i>TNFSF14</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
<i>TNKS</i>	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase
<i>TNMD</i>	tenomodulin
<i>TOMIL2</i>	target of myb1-like 2 (chicken)
<i>TRIM32</i>	tripartite motif-containing 32
<i>TRIM55</i>	tripartite motif-containing 55
<i>TRIM63</i>	tripartite motif-containing 63
<i>TRP53</i>	transformation related protein 53
<i>TSPAN8</i>	tetraspanin 8
<i>TTN</i>	titin
<i>TUB</i>	tubby homolog (mouse)
<i>TWIST1</i>	twist homolog 1 (Drosophila)

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Ime gena
<i>TWIST2</i>	twist homolog 2 (Drosophila)
<i>TXNIP</i>	thioredoxin interacting protein
<i>UBB</i>	ubiquitin B
<i>UBL5</i>	ubiquitin-like 5
<i>UBR1</i>	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1
<i>UCN</i>	urocortin
<i>UCN3</i>	urocortin 3 (stresscopin)
<i>UCP1</i>	uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)
<i>UCP2</i>	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)
<i>UCP3</i>	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)
<i>UNC5C</i>	unc-5 homolog C (C. elegans)
<i>UQCRC1</i>	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I
<i>UTS2</i>	urotensin 2
<i>UTS2R</i>	urotensin 2 receptor
<i>VDR</i>	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor
<i>VEGF</i>	vascular endothelial growth factor A
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A
<i>VGF</i>	VGF nerve growth factor inducible
<i>VIPR2</i>	vasoactive intestinal peptide receptor 2
<i>VLDLR</i>	very low density lipoprotein receptor
<i>VPS13B</i>	vacuolar protein sorting 13 homolog B (yeast)
<i>VSX1</i>	visual system homeobox 1
<i>VWF</i>	von Willebrand factor
<i>WDTCI</i>	WD and tetratricopeptide repeats 1
<i>WHRN</i>	deafness, autosomal recessive 31
<i>WNT10B</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 10B
<i>WRN</i>	Werner syndrome, RecQ helicase-like
<i>WT1</i>	Wilms tumor 1
<i>WTS</i>	Wilson-Turner X-linked mental retardation syndrome
<i>XDH</i>	xanthine dehydrogenase
<i>ZEB1</i>	zinc finger E-box binding homeobox 1
<i>ZFAND5</i>	zinc finger, AN1-type domain 5
<i>ZFP36</i>	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)
<i>ZMPSTE24</i>	zinc metallopeptidase (STE24 homolog, <i>S. cerevisiae</i>)

Priloga C: Število SNP-jev v tarčnih mestih za miRNA v 512-ih genih kandidatih za nalaganjem maščobe pri govedu

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA															
<i>ABCA1</i>	1			7	5/1	181b	98	532	7f	99a	99b											
<i>ABCA7</i>				3	3/2	204																
<i>ABCC8</i>				20	10/0																	
<i>ABCG5</i>				4	2/1	7	425-5p	215	192													
<i>ABCG8</i>						214	122	34a	199a-3p	17-3p	455											
<i>ACACB</i>		2		7	1/0	26a	26b	191														
<i>ACADVL</i>	1			2		98	let-7a	let-7b	let-7c	let-7i	let-7d	let-7g	let-7e	214	17-5p	20a	106	132	let-7f			
<i>ACE</i>						21	214	199a-5p	193a													
<i>ACHE</i>				1		34c	34b	34a	26a													
<i>ACOT11</i>				1																		
<i>ACPI</i>			1			380-5p																
<i>ACTA1</i>				1	3/0	142	342	193a	30a-5p	30c	139											
<i>ADA</i>	4		1	1	1/0	let-7a	24	140	let-7i	let-7d	let-7g	let-7f	29c	27a	27b	29b						
<i>ADAM12</i>		1		7	5/1	199b	199b-5p	7	19a	29b	139	29c	101	19b	148a	29a						
<i>ADAMTS1</i>			2		1/0	151*	455	139	127													
<i>ADCYAPI</i>			3	2		150	145	361														

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA														
<i>ADIG</i>						193a	27a	27b	128a												
<i>ADIPOQ</i>						214	21	545													
<i>ADIPOR1</i>		1	1	1/0	155*	122	191														
<i>ADIPOR2</i>					200a	23a	23b	487a	150												
<i>ADM</i>		1			34a	25	20a	92	26a	26b	93	25	20b	365	18b	let-7a*	18a	532			
<i>ADORA1</i>	1	1	1/0	138	150																
<i>ADRA1B</i>																					
<i>ADRA2A</i>																					
<i>ADRA2B</i>					29a	29b	29c	181b	34c	380-5p	34b										
<i>ADRB1</i>					18a	18b	210	30c	380-5p	34b											
<i>ADRB2</i>					497	151	let-7a	27a	let-7c	455	let-7g	22-5p	27b	let-7e	7d	16	195	98	15a	210	369-3p
<i>ADRB3</i>	1			1/1	let-7a	let-7b	let-7c	let-7d	let-7e	let-7f	let-7g	let-7i	139								
<i>AEBP1</i>	1				34a	34b	34c	181b	23a	17-3p	138	23b	181a	210	181c	193a					
<i>AGPAT2</i>					125b	423	455	125a	125b	345	484	660	342								
<i>AGRP</i>				1/0																	
<i>AGT</i>					365																
<i>AGTR2</i>					x																
<i>AHSG</i>					29b	29a	27b	27a	49936 5	29c	99a	99b	369-5p								

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen					Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA											
<i>AK1</i>			1		1/0	423	142	24														
<i>AKR1C1</i>				5	2/0	let-7a																
<i>AKT1</i>						423	let-7g	127	34a	423	127											
<i>AKT2</i>		1				34c	34a	34b	320	199a-3p												
<i>ALPI</i>					1/0	331	20b	210														
<i>ALPL</i>		1	9	4/1	10a	10b																
<i>AMACR</i>				1/1	26b	215	26a	192	let-7d	21	23a	23b										
<i>AMH</i>					423	200a	10a	10b														
<i>ANGPTL4</i>					345	101	27b	27a	204	193a	139	140	425-3p									
<i>ANGPTL6</i>					x																	
<i>ANKRD26</i>			17	16/7	200b	487a	20a	let-7i	106	132	200c	let-7g	487b									
<i>APLN</i>					345	21	214	342	345													
<i>APOA1</i>					x																	
<i>APOA2</i>					x																	
<i>APOA4</i>				2/1	let-7a	let-7b	let-7c	let-7d	let-7e	let-7f	let-7g	let-7i	98	29c								
<i>APOA5</i>				1/1	204	24	29c	380-3p	29a	425-5p												
<i>APOB</i>				1/1	200a																	
<i>APOBEC1</i>					30b	30d	30c	30a-5p	30e-5p													

se nadaljuje

nadaljevanje

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA													
							148a	148b	27a	27b	218	24	92	25	139	380-5p	132			
<i>B4GALT1</i>							148a	148b	27a	27b	218	24	92	25	139	380-5p	132			
<i>BAD</i>							150	127												
<i>BATF</i>							484	145	218	181b	331	363	181a	181c						
<i>BBS2</i>							320	let-7a*	34a	15a	101	let-7i	497	193a	34c	205	16			
<i>BBS4</i>							24	204												
<i>BBS5</i>				3			374	499	532	369-3p	215	380-5p								
<i>BBS8(TTC8)</i>							222	30a-5p	30c	30b	545	106	30d	17-5p	93	20a	221	369-3p	20b	
<i>BCAT2</i>			2				122	92	192											
<i>BDKRB1</i>							26a	205	26b	30c	345	30b	30d							
<i>BDKRB2</i>							200c	320	345	200b	369-3p	26a	425-5p							
<i>BDNF</i>							16	let-7a*	361	15a	195	10a	101	15b	380-3p	106	191	29a		
<i>BF</i>							let-7a	let-7b	let-7c	let-7d	let-7e	let-7f	let-7g	let-7i	214	455	21*	98		
<i>BRS3</i>	1						200a	192	let-7a*	25	124a	215	200b	30b	30d	30e-5p	30a-5p	363	92	
<i>BSCL2</i>																				
<i>BSX</i>							17-3p													
<i>BUB1B</i>				2	1/1		660	361	199a-5p	199b	107	103								

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen		Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA											
<i>BUB3</i>				1		1/0	215	192	374	132									
<i>C3</i>						2/0													
<i>CAMKK2</i>							221	99a	99b										
<i>CAPN1</i>	1			20	9/2	138	122	151*											
<i>CAPN10</i>					4	3/2	24	7	17-3p	10a	193a	10b							
<i>CARP2</i>							192	222	215	92									
<i>CAST</i>					1		151	34c	34b	34a									
<i>CAV1</i>					2	1/0													
<i>CAV3</i>				1			101	139	19a	199a-3p	218								
<i>CBFA2T1</i>					1		450	151*	193a	17-5p	545								
<i>CBY1</i>							193a	365	369-5p										
<i>CCK</i>						1/1	23b	23a	369-3p	92	487a								
<i>CCKAR</i>							15b	let-7e	497	15a	let-7f	218							
<i>CCKBR</i>	1					3/0	484	101	122	150	455	132	365	210					
<i>CCND1</i>																			
<i>CCND3</i>							487a												
<i>CD36</i>				1	1		101	126											
<i>CDH2</i>						4/1	499	19a	369-3p										

se nadaljuje

nadaljevanje

se nadaljuje

nadaljevanje

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA												
<i>DIO2</i>							545*	425-5p	let-7f	181c	487a								
<i>DLK1</i>							x												
<i>DNAJC3</i>							210	191											
<i>DOK1</i>			3	1			125a	125b	204	142*	331	let-7a*	532	127					
<i>DPT</i>	2		5	1			205												
<i>DRD2</i>				1			193a												
<i>DRD3</i>							497	let-7i	98	25	let-7a	let-7b	let-7c	let-7d	205	92			
<i>DSG3</i>							x												
<i>DUOX2</i>				1			342												
<i>DUSP1</i>							101	200c	660	342	200b	199a-5p	30e-5p	199b	30a-5p	425-3p			
<i>E2F1</i>							205	365											
<i>E2F3</i>							200a	25	200b	92	363	345	139	210					
<i>EDG1</i>	1						148a	148b	24	20a	181b	181a	19b	19a					
<i>EDN1</i>							let-7i	let-7b	let-7g	425-5p									
<i>EFEMP1</i>		1	1				139	140	29b	7	193a*	29c	186	106	17-5p	365	20a	29a	
<i>EGFR</i>				5			532	138											
<i>EIF4EBP1</i>							138	218	423	342	150								

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA														
<i>EIF6</i>					1	1/1	26a	374	26b	374	30e-5p	532	25	20a	369-3p	380-5p					
<i>ENPP1</i>					2	1/1	181c	181a	34b	125b	125a										
<i>ERCC1</i>							126*	20a	106	93	17-5p	20b	92								
<i>ESD</i>			2	3			200a														
<i>ESR1</i>				1			128a														
<i>ESR2</i>							151*	345	140	31	17-3p	423	140	425-5p							
<i>EWSR1</i>				2			106	20a	20b	20c	17-5p	193a*	148a	148b	93	128a					
<i>FAAH</i>							20b														
<i>FABP1</i>							186														
<i>FABP2</i>	1	4		10	17/1 7		545*	374	23b	132	30e-5p										
<i>FABP4</i>							x														
<i>FABP5</i>							199a-3p														
<i>FADS1</i>	1			2	1/0		204														
<i>FASN</i>				2	9/3		24	210													
<i>FEN1</i>							20c	26a	425-3p	30e-5p	30b										
<i>FGF8</i>						1/1	199a-5p	199b	let-7a*	192	140	193a	215	132	193a						
<i>FGFR3</i>				1			23a	23b	103	107	34c	423									

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA															
							140	484	660	193a	125b	125a	127									
<i>FKHL18</i>							19b	19a	186	191	532	126										
<i>FMRI</i>							204	10a	204	145	22-5p	10b	107	103	31	34a	210	34b				
<i>FOSB</i>							1/0	124a	let-7e	let-7d	let-7g	222	499	221	199a-3p	142	450	92	132			
<i>FOXA2</i>							31	193a*														
<i>FOXC2</i>							6	2/1	138	148b	30d	363										
<i>FSHR</i>							1		200a	132												
<i>FTO</i>	1						1	let-7c	let-7f													
<i>GABBR1</i>							2		27a	27b	124a	let-7a*	125a	128								
<i>GABRA6</i>							1		210	21	425-5p											
<i>GAD2</i>	1						140	363	25	92												
<i>GAL</i>							20a	17-3p	34b	34c	186	17-5p	93	30e-5p	19b							
<i>GALR1</i>							138															
<i>GAMT</i>							1	2/2	331													
<i>GAS6</i>							1	1/1														
<i>GAST</i>							1															
<i>GATA3</i>							1	1/1	532	142*	10b	127	10a	19b								
<i>GCGR</i>							1		331													
<i>GCK</i>		1	2	7	3/0																	

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA														
<i>GFPT1</i>						1/0															
<i>GFRA2</i>				2	1/0		214	21*	455												
<i>GH</i>	3				1/1		99a	99b													
<i>GHR</i>							10a	10b	365												
<i>GHRH</i>							210	10a													
<i>GHRHR</i>		1	1				320	66													
<i>GHRL</i>																					
<i>GHSR</i>							34b	186	34c	218	150	497	29a	29b	150	101	29c	200a	342		
<i>GIPR</i>							193a*	186	545*	7	361	128a	139	365							
<i>GLO1</i>		1																			
<i>GLP1R</i>			2				let-7i	27a	128a	15a											
<i>GLRA1</i>			9	1/0			204	221	222												
<i>GLUL</i>		2 0	1	17/9																	
<i>GNAS</i>	1		1	3			497	15b	15a	218											
<i>GNB3</i>							320	31	10b	221	222										
<i>GNG3</i>	1		2				27a	27b	210												
<i>GPAM</i>							27a	27b	101	17-5p	106	128a	380-5p	20a	20b	139	450	128a			
<i>GPBAR1</i>							487a	487b													
<i>GPC1</i>					2/2		423														

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA														
<i>GPC3</i>							320	331	140	7	122	151	369-5p								
<i>GPC4</i>							let-7a*	222	320	221	191										
<i>GPD2</i>	1		9	9	1/0																
<i>GPM6A</i>																					
<i>GPR10</i>							151														
<i>GPR12</i>							145	17-5p	93	20a	106	26a	21								
<i>GPR35</i>						1/1	193a	484	139												
<i>GPR37</i>			1		1/0	29b	let-7a	29c	29a	18a	18b	193a	142	450							
<i>GPR50</i>							218	361	126												
<i>GPR7</i>							210	484	425-3p	125b	125a										
<i>GPSM1</i>							138	125a	125b												
<i>GPX1</i>				1		200c	425-5p														
<i>GRM1</i>						x															
<i>GRM8</i>				1		x															
<i>GSK3A</i>				1	1/0	140	24														
<i>GSK3B</i>				3	1/1	x															
<i>GUSB</i>	1			2	4/1	126*	484	128a	139	148a	148b	210	let-7d	199-5p	199-3p	365	369-5p				

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA													
<i>GYPA</i>						x														
<i>GYS1</i>		1	1	1																
<i>H6PD</i>				1	3/3	193a*														
<i>HADH</i>					1		31	15b	15a	210										
<i>HCRT</i>							150	23a	125b	23b	25	125a	363	487b						
<i>HDAC3</i>							193a	125a	205	99a	487b									
<i>HDC</i>				3			365	106	20b	484	140	20a	93	19b	487b	126				
<i>HELLS</i>					4		29a	29b	29c											
<i>HEXB</i>		1	5	9	1/0															
<i>HGF</i>				7	1/0	26b	200a	26a	199a-5p	200c	365	200b	455	25	92					
<i>HIF1A</i>					1		199a-5p	320	18a	199b	18b	126*								
<i>HK2</i>					13		142	20a	200b	107	103	17-5p	200c	16	93	363	101	193a	487b	
<i>HMGA2</i>						x														
<i>HNF1A</i>				2	2/0	192	545*	221	214	215	484	222								
<i>HP</i>				1	5/1	25	204	92												
<i>HRH1</i>		1				320	27b	30b	27a	181a	125a	181a	125a	181b	128a	125b	181c	30c	23b	29c
<i>HSD11B1</i>	2	1				204														
<i>HSD11B2</i>					1/0	205	34a	138	101	148b										
<i>HSD3B1</i>						140	34b	34c	34a											

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA														
<i>HSPA1B</i>						2/0															
<i>HTR1B</i>							x														
<i>HTR2A</i>		1				3/0	193a														
<i>HTRA2</i>				1			125b	22-5p													
<i>ICAM1</i>							532	222	221	142*	210										
<i>ID2</i>					1		30e-5p	29c													
<i>IDE</i>					5	3/0	7	92	25	425-3p											
<i>IDH1</i>							92	25													
<i>IFRD1</i>			1				347	193a	150												
<i>IGF1</i>							19a	19b													
<i>IGF1R</i>			5	1/0			34a	192													
<i>IGF2</i>				1			214	let-7b	98												
<i>IGFBP2</i>							150	214	423												
<i>IGFBP6</i>			1				545	660	29a	132	150										
<i>IKBKG</i>							140														
<i>IL18</i>	1						200a	17-5p													
<i>IL1B</i>		7		2/0			31	331	221	320	484										
<i>IL1RN</i>			4																		
<i>IL6</i>		1	1	1/0	181c	22-5p	let-7g	455	181a	let-7f	let-7a	532	365	23b	23a	221	132				

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA											
<i>IL6R</i>				1			186	let-7i	193a	17-3p								
<i>INPPL1</i>			1	4	1/0		101	193*	193a	205	24	331	342	29b	29c	99a	99b	
<i>INS</i>	1			2			320	214										
<i>IRSI</i>							29b	29c	20a	17-5p	106	20b	140	18b	484	18a	380-5p	29a
<i>ISL1</i>							27a	27b	128a									
<i>JAK2</i>							18b	499	101	18a	181b	181a	132	487a	487b			
<i>KCNJ11</i>		1																
<i>KL</i>							200a	200c	30d	30a-5p	138	23a	19a	23b	200b	19b		
<i>KLF3</i>				1														
<i>KLF5</i>							200a	let-7a*	26a	200c	26b	145	200a	425-5p	10a			
<i>KRT71</i>					1/0	x												
<i>LBR</i>				1			148a	148b	19a									
<i>LDLR</i>				1	1/0													
<i>LEF1</i>		1	1				545	199a-5p	192									
<i>LEP</i>		8	4	8/3			23b	138										
<i>LEPR</i>				5	5/3		487a	380-3p										
<i>LHB</i>						x												

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA											
<i>LIPA</i>					7	3/2	30e-5p	499	124a	30a-5p								
<i>LIPC</i>					7	1/1	128a											
<i>LIPE</i>					2	7/4	x											
<i>LIPG</i>							214	125a	151*	484	125b	199-5p						
<i>LMNA</i>	1					1/0	484	124a										
<i>LPL</i>			1 4	13	2/0													
<i>LRPAP1</i>			1				200c	200b	125b	210	425-3p	125a	148b	148a				
<i>LTA</i>							7	31										
<i>MAGEL2</i>							484	181c	221	29c	191							
<i>MAOA</i>							363	25	92	487a								
<i>MAPK3</i>							484	214	363	151								
<i>MAPK8</i>						1/1	107	103	15b	15a	205	195	199a-5p	499	16	30c		
<i>MAPK8IP1</i>							150	34a	140	151	34b	222						
<i>MC2R</i>							10a	10b										
<i>MC4R</i>							320	23b	532	23a	23b							
<i>MC5R</i>							125b	125a	369-5p									

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA													
							145	30e-5p	30a-5p											
<i>MCHR1</i>																				
<i>MCM2</i>				3	1/0	199b	145	199a-5p	369-3p	30d	30a-5p	484	30c-5p	18a						
<i>MCOLN1</i>				1	1/1	181c	138	193a*	193a	24	10a	29a	127	365						
<i>MECP2</i>						454-3p	199a-5p	19a	450	222	125b	199a-3p	218							
<i>MED12</i>						23a	23b	199b	199a-5p	181b	let-7a*	222	181c	221	191					
<i>MEN1</i>			1			484														
<i>MEST</i>																				
<i>METTL8</i>				1																
<i>MGRN1</i>						205	126	380-5p												
<i>MIF</i>		1				210	425-3p													
<i>MKKS</i>					1/0	425-5p	142*	126*												
<i>MKRN3</i>						x														
<i>MLXIPL</i>				2	1/0	214	320	497	151											
<i>MMP11</i>					1/0	107	34a	145	103											
<i>MMP19</i>																				
<i>MMP9</i>				4	2/1	186	17-3p	24	22-5p	127	34a	151								

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5UTR	3UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA																
							x																
<i>MT1A</i>							x																
<i>MTTP</i>						1/1	30b	27a	30c	30d	27b	10a	30e-5p	30a-5p	10b	200a	let-7c	199a-3p	let-7b	361	191	132	
<i>MYC</i>							let-7c	let-7b	let-7f	98	let-7a	145	let-7e	let-7g	let-7d	380-5p							
<i>MYOG</i>					1	1/1	484																
<i>NAMPT</i>					3		26b	142	24a	30b	545	19a	34c	34b	218	30c	30a-5p						
<i>NCOA3</i>	1		5	5/1	320	20b	20a	106	17-5p	18b	93	18a											
<i>NDN</i>					29c	200c	361	200b	23b	29b	29a	342											
<i>NEB</i>			5	3/2	29c	29a	29b																
<i>NEIL1</i>		4	4	6/3	145	218	425-3p	127															
<i>NEUROD1</i>					3/0	369-3p	142	19b	30b	let-7a	30c	19a	let-7d	let-7c	98	30e-5p	30d	30a-5p					
<i>NHLH2</i>						128a	205	191	487b														
<i>NMB</i>						27a	27b	128a	101	29a	487a	99b											
<i>NMU</i>		1			x																		
<i>NOS1</i>			1	8/4	25	34a	92	487b															
<i>NOS2</i>			2		487a	10a	20b	487b															
<i>NOS3</i>			15	9/2	17-3p	let-7f	132	let-7c	let-7a	150	425-3p	487b											
<i>NPB</i>			1		107	103	let-7e	let-7i	let-7c	let-7a	let-7g												

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA												
							let-7e	let-7d	let-7a	369-3p	200c	200b	let-7c	331	374	218			
<i>NPPB</i>							let-7e	let-7d	let-7a	369-3p	200c	200b	let-7c	331	374	218			
<i>NPR3</i>	1						365	455	20a	20b									
<i>NPY</i>							let-7d	let-7f	let-7e	let-7a	let-7c	let-7g	let-7b						
<i>NPY1R</i>							x												
<i>NPY2R</i>							145	218											
<i>NPY5R</i>	1	1					let-7a*												
<i>NQO1</i>		1				1/0	200b												
<i>NR1H2</i>				2			320	145	18a	18b	7	24							
<i>NR1H3</i>					2/0		425-3p	205	22-5p	let-7g	191								
<i>NR1I3</i>							204	let-7e	450										
<i>NR2E1</i>							let-7i	let-7a	let-7c	let-7b	let-7d	221	98	let-7e	let-7f	let-7g	222		
<i>NR3C1</i>																			
<i>NTRK2</i>							200c	200b	204										
<i>NTSR1</i>						1/0	345	181b											
<i>OPRM1</i>	1	1	5	1/0	423														
<i>PAH</i>							128a	27a	499	27b	380-5p								
<i>PAM</i>							34b	200c	20b	342									
<i>PARP1</i>				1		320	19a	19b	124a	148a	148b	125a	210	99a					

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA														
							455*	7	181c	21*	369-3p	181b	let-7a*	374	365						
<i>PAX6</i>							455*	7	181c	21*	369-3p	181b	let-7a*	374	365						
<i>PCSK1</i>			1		1/0		26a	26b	145	7	122	106	20b	140	660	17-5p	126				
<i>PCSK1N</i>							29c	29a	204	29b	342	345	363								
<i>PDE3B</i>							128a	27b	17-3p	34c	192	27a	34b	106	215	124a	20b				
<i>PDYN</i>	1		4		3/2		34a	193a													
<i>PEG3</i>			1	5	6/0		26b														
<i>PEMT</i>							124a	450													
<i>PGF</i>				5			15a	124a													
<i>PHEX</i>							200c	200b	222	221	21	18a	30a-5p	30e-5p	101	132	487b				
<i>PHF6</i>							142	126*	221	222	25	374	425-5p	363							
<i>PIK3RI</i>				7	2/0		139	221	128a	29b	29c	222	455	363							
<i>PIP4K2B</i>	1						210	345	31	222	101										
<i>PKLR</i>			1				122														
<i>PKNOX1</i>				1			186	19a	125a	19b	125b	23b	499	380-5p	106	93	20b	140	99b	25	210
<i>PLA2G1B</i>				1																	
<i>PLIN</i>				1			425-5p														
<i>PLSCR1</i>				4			26a	26b													

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5UTR	3UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA												
							let-7e	124a	let-7g	let-7a	let-7d	29c	29b	17-3p	532				
<i>PLSCR3</i>						1/0	let-7e	124a	let-7g	let-7a	let-7d	29c	29b	17-3p	532				
<i>PMCH</i>							142	15a	369-3p	107	103	98							
<i>PMM2</i>					1		145												
<i>PNLIP</i>							423	450											
<i>PNMT</i>							342												
<i>PNPLA2</i>						1/1	124a	210	22-5p	138	29b	29c							
<i>PNRC2</i>		1					112	215											
<i>POMC</i>						5/1													
<i>PON1</i>							365	499	455	26b	26a								
<i>PON2</i>							10a	10b	23b	93	199a-3p	23a	106	20a	20b				
<i>POR</i>							331	127	342	181b	380-5p								
<i>POU1F1</i>							455	320											
<i>PPARA</i>							499	320	19a	19b	205	25	425-5p						
<i>PPARD</i>							138	195	423	17-3p	16	425-5p	369-5p						
<i>PPARG</i>	1	1	5				142	18b	18a										
<i>PPARGC1A</i>			4	2/0															
<i>PPMIL</i>		1	1	1/1			320	199b	124a	221	222	455							

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA													
<i>PPP1R3A</i>						2/1	140	21												
<i>PPP1R3C</i>	1	1					365	34b	34a	130	200a	10b	99b	99a						
<i>PPY</i>							128a	345	365	487b										
<i>PPYR1</i>				1			19b	19a	122	150	455	345	21							
<i>PRKAA2</i>							545*	31	148a	148b	27a	22-5p	27b	139	380-5p	200a				
<i>PRKAG3</i>	2	1	1	8	11	2/0														
<i>PRKAR1A</i>				3	1/0		191	210												
<i>PRKAR2B</i>		1		5	2/2		23b	27b	let-7a*	148a	23a									
<i>PRKCB</i>		1	1	7	1/0		380-3p	26b	200b	191										
<i>PRKCD</i>				9	2/0		15b	93	20a	24	497	195	16	15a	345	342	181c	22	26a	380-5p
<i>PRKCE</i>				1			361	138	103	let-7b	15b	let-7c	107	17-3p	148a	34c	34b	151*	let-7f	101
<i>PRKCQ</i>	1	1		6	3/0		26b	7	151	26a	222	221								199a-3p
<i>PRL</i>							660													
<i>PRLH</i>							331	455	193a*	423										
<i>PRLHR</i>							151													
<i>PROPI</i>				1			369-3p	361	7											

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA															
<i>PROX1</i>							145	30b	30c	30d	365											
<i>PSIP1</i>				1			200b	200c	499	34b	15a	15b	199a-3p	487a								
<i>PTPN1</i>							484	27b	205	148b	27a	199b	22-5p	199a-5p	148a	125b	125a	140	24			
<i>PTPN11</i>			2				139	200a	218	98	let-7d	let-7a*	140	380-3p	let-7f	200b	101					
<i>PTPNS1</i>		1	23	18/1 5			27a	27b	31	128a	499	29b	29a									
<i>PTPRF</i>			3	3/0	17-3p		151*	24	27b	107	103	139	27a	199a-3p	128a							
<i>PTTG1</i>							186	369-3p	106	20a	20b	17-5p	93									
<i>RAB6B</i>		2	11	1/1	142		20a	18b	15b	195	221	18a	17-5p	106	99b							
<i>RAD23B</i>		7		1/1	150		20b	93														
<i>RAE1</i>							320	181b	101	34b	181a	181b	34c	139	487b	132	99a					
<i>RAII</i>			1	3/1	122	127	425-3p		345	369-5p												
<i>RBP4</i>		1	2																			
<i>RDH1</i>							34c	34b	532													
<i>RELA</i>		5	1	1/1	660																	
<i>REN</i>			2		363	34b	34c	25	92	127	363											
<i>RETN</i>																						

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA															
<i>RGS5</i>				2			7	499														
<i>RHOA</i>							186	16	15b	487a	200b	145	199a-3p	195	140	222	363	487b				
<i>RNASEN</i>					1	1/1	27a	27b	205	320	31	181c	380-3p									
<i>ROR2</i>					1	2/1	124a	199b	210	34c												
<i>RORC</i>							125b	320														
<i>RPS6</i>							29c	29b	let-7i	27b	363											
<i>RPS6KA3</i>						1/0	126*	15b	195	15a	497	107	103	214	16	218						
<i>RPS6KB1</i>							200b	545	200c	497	342	455	10a									
<i>RSC1A1</i>						1/1	let-7i	let-7g	let-7a	let-7f	let-7c	let-7b	98	24	499	let-7e	let-7d	425-3p	127	380-5p		
<i>RUNX3</i>							125a	145	128a	126												
<i>RXRA</i>							484	17-3p	24	425-3p												
<i>RXRG</i>							let-7a*															
<i>SAT1</i>		1					199b	let-7a*	199-5p	181a	487a	361	191	487b								
<i>SCARB1</i>				1			99a	125a	99b													
<i>SCD5</i>			3	2	1/0	205																
<i>SCP2</i>		1	2	3	2/1	660	7	210	199a-3p													

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA															
							17-3p	22-5p	34a	450												
<i>SDC1</i>																						
<i>SDC3</i>							484	150	24	34a												
<i>SERPINA1</i> 2							10b	132	210	10a												
<i>SERpine1</i>				1			195	15a	15b	16	200a											
<i>SFRP1</i>		2																				
<i>SH2B</i>			1				let-7g	let-7e	let-7a	let-7f	let-7i	let-7c	let-7b	let-7d	320	138	98	10a	320	10b		
<i>SIRT6</i>			2				331	125a	125b	186	331	423	29a	205								
<i>SLC12A2</i>		1	1	1/0			26a	26b	101	369-3p	20a	210	126									
<i>SLC17A6</i>		1	1																			
<i>SLC27A1</i>		1	2	1/1			151*															
<i>SLC27A4</i>			1				193a*															
<i>SLC2A2</i>		5	5				199a-5p	199b	200a	101												
<i>SLC2A4</i>	2	1	2				199a-5p	199b	20a	20b	93	106										
<i>SLC30A7</i>	2		1	1			101	320	425-3p	487b												
<i>SLC3A1</i>				3	2/2		199b	1991	142*	361	126*	142	199a-5p	18b	125a	148b	148a					
<i>SLC6A1</i>				2			let-7c	let-7e	let-7b	200c	98	200b	365	425-3p	132							

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA													
				1	1		23a	23b	374	199a-3p										
<i>SLC6A14</i>				1	1															
<i>SLC6A3</i>					3		205	193a	342											
<i>SLC9A3</i>							342	423												
<i>SMTN</i>					10	5/2	455*	210	205	18a	18b	361								
<i>SNORD11_6</i>							x													
<i>SNRPN</i>							30c													
<i>SOAT2</i>				1			423	181c	205	455*	181b	181a	101	222	29b	210	127	132		
<i>SOCS1</i>							let-7e	let-7d	let-7b	214	let-7c	let-7a	let-7g	30a-5p	30d	30e-5p	19a	30b	30c	
<i>SOCS3</i>							27b	218	331	27a	455									
<i>SOD2</i>		1			1/0		487a	487b												
<i>SORBS1</i>					7	5/4	342	148b	148a											
<i>SOX8</i>							151*	425-3p	425-5p											
<i>SPARC</i>					1		27b	23a	128a	27a	23b	369-3p	380-5p	26a	365	21	99b			
<i>SQLE</i>				1			186	139	27a	27b	128a	200b	let-7a*	200c	199a-5p	151	199b	205	22-5p	
<i>SREBF1</i>	1	1	2	1/1			19a	21	192	215										
<i>STAT3</i>																				
<i>STAT5B</i>	1		6	1/0			23a	23b												

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA													
<i>STK11</i>					1		24	34a	34c	214	484	16	34b	7	151*	199a-3p	345			
<i>STK25</i>					5	1/1	101	497	425-5p	151*	210	150	380-5p	140	132					
<i>TAF8</i>							24	99a	369-5p											
<i>TBX3</i>							93	17-5p	380-5p	20b	200b	106	148a	148b						
<i>TBXA2R</i>							222	7	98	221										
<i>TF</i>					1		148b	148a	484	let-7a*										
<i>TFAM</i>					2		31	199a-3p	221	374	27a									
<i>TG</i>																				
<i>TGFB1</i>					1		18a	210	193a											
<i>TH</i>					3		20b	17-5p	20a	106	34a	93	18b							
<i>THBD</i>			1		1/0		x													
<i>THRA</i>			1	2			140	200c	374	27a	27b	532								
<i>THRΒ</i>					8	3/1														
<i>TK2</i>							7	16	29b	345	195	29c	193a							
<i>TKT</i>						2/1	148b	425-3p	342											
<i>TLR4</i>	1	1	2	4	28/8	151														

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen	Navzdol	Navzgor	5'UTR	3'UTR	Intron	Eks./nesin.	Tarče za miRNA															
<i>TNF</i>						7	31															
<i>TNFRSF1A</i>					1/0	x																
<i>TNFRSF1B</i>						145																
<i>TOM1L2</i>		1	5			23a																
<i>TRIM32</i>						545	140															
<i>TRIM55</i>	2		2	1/0	200a	200b																
<i>TRIM63</i>						205	484															
<i>TUB</i>			4	3/0	484	218																
<i>TWIST2</i>		2			140	331	380-5p	18b	18a													
<i>TXNIP</i>	1			1/0	205	369-5p																
<i>UBL5</i>					x																	
<i>UBR1</i>						145	122															
<i>UCN</i>						99a	125b	125a	99b													
<i>UCP1</i>				1/0	361	21	200c	142	200b													
<i>UCP2</i>					2/0	139	128a	484	27a	27b												
<i>UCP3</i>				1		148b	148a	124a	30e-5p	200b	30d	30a-5p	26a	19a	19b	30b	380-3p	30c	660	16	10b	
<i>UNC5C</i>						125a	125b	128a	27a	27b												

se nadaljuje

nadaljevanje