

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Andrej RENČELJ

**ASOCIACIJSKA ANALIZA HAPLOTIPOV V GENU *FTO*
Z LASTNOSTMI ZAMAŠČEVANJA PRI GOVEDU (*Bos taurus*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ASSOCIATION ANALYSIS OF THE *FTO* GENE HAPLOTYPES WITH
FAT DEPOSITION TRAITS IN CATTLE (*Bos taurus*)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Kmetijstvo – zootehnika. Delo je bilo opravljeno v Genetskem laboratoriju katedre za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Simona Horvata in za somentorico doc. dr. Tanjo Kunej.

Recenzent: prof. dr. Peter Dovč

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

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

Datum zagovora:

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

Andrej Renčelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 636.2:575(043.2)=163.6
KG govedo/pasme/lisasta pasma/zamaščevanje/maščobe/nalaganje/molekularna genetika/geni/*FTO*/SNP/debelost
KK AGRIS L10/5214
AV RENČELJ, Andrej
SA HORVAT, Simon (mentor)/KUNEJ, Tanja (somentorica)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2009
IN ASOCIACIJSKA ANALIZA HAPLOTIPOV V GENU *FTO* Z LASTNOSTMI ZAMAŠČEVANJA PRI GOVEDU (*Bos taurus*)
TD Diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP X, 58 str., 16 pregl., 26 sl., 3 pril., 64 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Genetske variante pri nedavno odkritem genu *FTO* imajo dokazan vpliv na debelost pri človeku ter nalaganje maščevja pri modelnih organizmih ter prašičih. Namen te diplomske naloge je bil identificirati polimorfizme posameznih nukleotidov (ang. single nucleotide polymorphism, SNP) pri slovenskem lisastem govedu ter analizirati povezanost med posameznim SNP ter lastnostmi zamaščevanja. Poskusna populacija je bila odbrana iz nacionalnega progenega testa bikov lisaste pasme (171 polbratov ter 31 očetov). S podatkovnimi zbirkami ENSEMBL in NCBI smo pridobili informacije o že znanih SNP v govejem genu *FTO*, medtem ko smo s sekvenciranjem odbranega niza očetov poiskali nove polimorfizme v naši poskusni populaciji. Identificirali smo skupno 23 SNP označevalcev v genu *FTO*, od tega smo genotipizirali 12 najbolj informativnih. Statistična analiza je potrdila hipotezo, da gen *FTO* vpliva na lastnosti zamaščevanja - SNP rs41636320 A>T, ki se nahaja v intronu 6, je bil statistično značilno povezan z deležem loja ($P > 0,0127$). V 3' UTR področju gena *FTO* smo našli potencialno vezavno mesto za miRNA, ki je ohranjeno pri šestih živalskih vrstah. Identificiran SNP povezan z lastnostmi zamaščevanja je lahko podlaga za razvoj novih genetskih označevalcev v genu *FTO*, ki bi jih uporabljali v rejskem programu in s tem bolj učinkovito izvajali selekcijo na manj zamaščene živali

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 636.2:575(043.2)=163.6
CX	cattle/breeds/Simmental breed/fat deposition/molecular genetics/genes/ <i>FTO</i> /SNP/obesity
CC	AGRIS L10/5214
AU	RENČELJ, Andrej
AA	HORVAT, Simon (supervisor)/KUNEJ, Tanja (co-supervisor)
PP	SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY	2009
TI	ASSOCIATION ANALYSIS OF THE <i>FTO</i> GENE HAPLOTYPES WITH FAT DEPOSITION TRAITS IN CATTLE (<i>Bos taurus</i>)
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	X, 58 p., 16 tab., 26 fig., 3 ann., 64 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Genetic variants in recently identified <i>FTO</i> gene have shown to have a relatively big effect on human obesity and some fatness-related traits in the model organisms, and in pigs. The objective of this thesis was to identify the single nucleotide polymorphism (SNP) markers in Slovenian Simmental cattle and to perform the association study between the SNPs and fatness-related traits. The studied population was selected from the national progeny test programme of Slovenian Simmental bulls (171 half-sib brothers and 31 sires). By utilising databases (ENSEMBL, NCBI) we obtained information on already identified SNP markers within the bovine <i>FTO</i> gene, whereas by sequencing a DNA panel of sires, we were able to identify the novel SNPs, specific for our experimental population. A total of 23 SNP markers were identified, out of which we genotyped 12 that were most informative. Statistical analysis confirmed our working hypothesis that <i>FTO</i> gene affects fatness in our cattle population - SNP rs41636320 A>T located in intron 6 showed statistically significant association with body fat percentage ($P > 0,0127$). In the 3' UTR region of <i>FTO</i> gene we found a potential miRNA binding site that was conserved in six animal species. The identified SNP associated with fatness traits can form a basis for development of novel genetic markers in the <i>FTO</i> gene that could be used in the breeding programme to increase efficiency of selection for leaner animals.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli.....	X
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZA.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 SNP	3
2.1.1 Nomenklatura SNP.....	4
2.2 MAŠČOBNI DEPOJI BELEGA MAŠČEVJA	5
2.2.1 Podkožna maščoba	5
2.2.2 Intermuskularna maščoba	5
2.2.3 Intramuskularna maščoba (marmoriranost mesa)	6
2.2.4 Trebušna (visceralna) maščoba.....	8
2.3 GEN <i>FTO</i> PRI PRAŠIČIH	8
2.4 GEN <i>FTO</i> PRI MIŠIH	10
2.5 URAVNAVANJE IZRAŽANJA GENOV Z MIKRO RNA (MIRNA)	12
3 MATERIAL IN METODE.....	13
3.1 ŽIVALI.....	13
3.2 LABORATORIJSKA OPREMA	14
3.3 IZOLACIJA DNA	15
3.3.1 Izolacija DNA iz tkiva	15
3.3.2 Izolacija DNA iz sperme.....	16
3.4 MERJENJE KONCENTRACIJE IZOLIRANE DNA.....	17
3.5 IDENTIFIKACIJA GENETSKE VARIABILNOSTI GENA <i>FTO</i> IN GENOTIPIZACIJA	18
3.6 PCR.....	19
3.7 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA	21

3.8 RESTRIKCIJSKA ANALIZA	21
3.9 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA	22
3.9.1 Izolacija fragmentov DNA iz gela z elektroelucijo	22
3.10 METODA GENOTIPIZACIJE S SISTEMOM PCR »FAST REAL-TIME«	22
3.11 POSTOPEK IZBORA IN NAČRTA SOND TAQMAN	23
3.12 BIOINFORMACIJSKE METODE	24
3.13 STATISTIČNE METODE	26
4 REZULTATI.....	27
4.1 ORGANIZACIJA GENA <i>FTO</i>	27
4.2 GENETSKA VARIABILNOST GENA <i>FTO</i> V NAŠI POSKUSNI POPULACIJI IN GENOTIPIZACIJA.....	28
4.3 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE.....	39
4.3.1 Pregled osnovne statistike.....	39
4.4 ANALIZA TARČNIH MEST ZA MIRNA	45
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	48
6 POVZETEK.....	51
7 VIRI	52
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Razmerje med proteini in nukleinskimi kislinami.....	17
Preglednica 2: Razmerje med nukleinskimi kislinami in proteini.....	17
Preglednica 3: PCR oligonukleotidi in dolžina njihovih produktov v bp	18
Preglednica 4: Volumni reagentov za pripravo reakcijske mešanice za PCR.....	20
Preglednica 5: Volumni reagentov za pripravo reakcijske mešanice restrikcijskih reakcij	21
Preglednica 6: Nukleotidna zaporedja, na podlagi katerih so bile izbrane TaqMan	23
Preglednica 7: Prikaz podatkovnih zbirk in bioinformacijskih metod	24
Preglednica 8: Prikaz začetka, konca in dolžine eksonov in intronov.....	27
Preglednica 9: Ime začetnega oligonukleotida, vrsta nukleotidne zamenjave in uporabljeni metoda za genotipizacijo.	29
Preglednica 10: Prikaz frekvenc in deleža SNP pri potomcih ter stopnja heterozigotnosti posameznih označevalcev SNP.	39
Preglednica 11: Prikaz frekvenc SNP pri očetih	40
Preglednica 12: Prikaz P-vrednosti in stopinj prostosti za statistično značilen SNP	41
Preglednica 13: Rešitve za naključne vplive (Solution for random effects)	42
Preglednica 14: Statistika za povprečni delež loja pri potomcih po vplivih, ki so vključeni v model (po SNP).	43
Preglednica 15: Statistika za povprečni delež loja pri potomcih po vplivih, ki so vključeni v model (po sezonah).....	44
Preglednica 16: Statistika za povprečni delež loja pri potomcih po vplivih, ki so vključeni v model (po očetih).....	44

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Primer SNP	3
Slika 2: Anatomski prikaz $FTO^{+/+}$ in $FTO^{-/-}$ 20 tednov starih miši	11
Slika 3: Model selekcije govedi lisaste pasme (prirejeno po Čepon in sod., 2004)	13
Slika 4: Postopek izolacije DNA s kitom QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit.....	15
Slika 5: spektrofotometer Perkin Elmer Lambda BIO+	17
Slika 6: Pogoji za reakcijo PCR.....	19
Slika 7: Delovanje TaqMan sond.....	24
Slika 8: Slika začetne strani programa TargetScan.....	25
Slika 9: Prikaz organizacije gena <i>FTO</i>	27
Slika 10: Prikaz variabilnosti gena <i>FTO</i> pri govedu.....	28
Slika 11: Prikaz polimorfizma int1 T>C v intronu 1.....	30
Slika 12: Prikaz polimorfnega mesta ex2 T>C v eksonu 2.....	31
Slika 13: Prikaz polimorfnega mesta int2 indel *>T v intronu 2.....	31
Slika 14: Prikaz polimorfnega mesta int2 A>G v intronu 2.....	32
Slika 15: Prikaz dveh polimorfnih mest v intronu 6	32
Slika 16: Prikaz treh polimorfnih mest v intronu 7	33
Slika 17: Prikaz dveh polimorfnih mest v intronu 8	33
Slika 18: Prikaz polimorfnega mesta 3'UTR C>T v območju 3'UTR.....	34
Slika 19: Polimorfno mesto 3'UTR indel *>C v 3'UTR	34
Slika 20: Polimorfno mesto 3' UTR G>A v 3'UTR	35
Slika 21: Slika prikazuje primer poravnave sekvenc s programom MEGA4.....	35
Slika 22: Prikaz odčitavanja rezultatov z grafa pri PCR v realnem času.....	36
Slika 23: Prikaz odčitavanja rezultatov z grafa pri PCR v realnem času.....	37
Slika 24: Prikaz odčitavanja rezultatov z grafa pri PCR v realnem času.....	38
Slika 25: Analiza s programom TargetScan: tarčno mesto za miR-141/200a.....	45
Slika 26: Analiza s programom TargetScan	47

KAZALO PRILOG

Priloga A: Koncentracija izolirane DNA

Priloga B: P-vrednosti za vplive iz izbranega modela

Priloga C: Nukleotidno zaporedje gena *FTO* pri govedu

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
ADGTEST	dnevni prirast v testu (<i>ang. Average Daily Gain on Test</i>)
BMI	indeks telesne mase (<i>ang. body mass index</i>)
Bp	bazni par
C	citozin
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>FTO</i>	Fat mass and obesity associated gene
G	gvanin
in situ	na mestu
indel	mutacija insercija/delecija
INSIG2	Insulin induced gene 2
K	G (gvanin) ali T (timin)
M	A (adenin) ali C (citozin)
MAF	frekvenca manj pogostega alela (<i>ang. Minor Allele Frequency</i>)
MAS	na markerje operta selekcija (<i>ang. Marker Assisted Selection</i>)
MyoD	Myogenic differentiation 1
miRNA	mikroRNA
N	A (adenin), T (timin), C (citozin) ali G (gvanin)
NCBI	Nacionalni center za informacije v biotehnologiji (<i>ang. National Center for Biotechnology Information</i>)
NPV	napoved plemenske vrednosti
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>ang. Polymerase Chain Reaction</i>)
PPAR γ	receptor, aktiviran s poliferatorjem peroksisomov (<i>ang. Peroxisome Proliferator - Activated Receptor gamma</i>)
R	A (adenin) ali G (gvanin)
qPCR	kvantitativni PCR (<i>ang. quantitative PCR</i>)
RFLP	Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (<i>ang. Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
Rpgrip11	Rpgrip1-like (<i>ang. retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 – like</i>)
Runx2	runt-related transcription factor 2
SCD1	Stearoyl-CoA desaturaza
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (<i>ang. Single Nucleotide Polymorphism</i>)
T	timin
UTR	neprevedljiva regija (<i>ang. UnTranslated Region</i>)
UV svetloba	ultravijolična svetloba
v.	versus
W	A (adenin) ali T (timin)

1 UVOD

Debelost in z njo povezane bolezni (npr. hiperlipidemija, ateroskleroza) postaja v svetu in tudi v Sloveniji vse večji zdravstveni problem. Prekomerno nalaganje maščevja je vse bolj prisotno tudi pri domačih živalih, ta lastnost je nezaželena tudi pri prireji mesa in mleka iz ekonomskih razlogov ter zaradi večjega povpraševanja potrošnikov po manj mastnih proizvodih. Identifikacija novih genov, povezanih z uravnavanjem nalaganja maščevja nam omogoča, da pri ljudeh razvijemo ustrezne diagnostične in terapevtske pristope za nadzor te bolezni, pri domačih živalih pa možnost odbire plemenskih živali, ki na potomstvo prenašajo dedne zasnove za nižji delež telesnih maščob. Genomske študije polimorfizmov posameznih nukleotidov (ang. Single Nucleotide Polymorphism) pri ljudeh so v letu 2007 (Frayling in sod., 2007; Scureti in sod., 2007) odkrile nov pomemben gen, ki regulira raven maščevja v telesu, tako imenovani gen *FTO* (ang. *fat mass and obesity associated*). Pomembno pri teh študijah je dejstvo, da so pri različnih geografsko ločenih populacijah vedno uspeli dokazati visoko pogostnost pojavljanja alela, ki povišuje % telesnih maščob. Pri domačih živalih so do sedaj objavili povezanost alelov v lokusu *FTO* z lastnostmi zamaščevanja pri prašičih in sicer v štirih publikacijah (Fontanesi in sod., 2009, 2010; Fan in Rothschild, 2009; Flisar in sod., 2009). Vzrok za zaostajanje tovrstnih raziskav pri drugih vrstah domačih živalih leži verjetno v dejstvu, da raziskovalci nimajo ustrezno strukturiranega genetskega materiala in merjenj definiranih lastnosti, povezanih z nalaganjem maščob.

Cilj diplomskega dela je bil preveriti, če obstaja asociacija med polimorfizmi v genu *FTO* in odstotkom telesnih maščob z drugimi povezanimi lastnostmi pri slovenskem simentalskem govedu.

Raziskave o genetskih vzrokih, povezanimi z debelostjo in nalaganjem maščob pri govedu (*Bos taurus*) do sedaj še niso bile opravljene. Zato smo se v okviru projekta MAS (na markerje oprta selekcija, ang. *marker assisted selection*) odločili, da z diplomskim delom zberemo in obdelamo podatke o genetski variabilnosti gena *FTO* in njegovem vplivu na debelost in nalaganje maščob v populaciji slovenskega lisastega goveda.

1.1 HIPOTEZA

Gen *FTO* ima statistično značilen učinek na lastnosti zamaščevanja v populaciji slovenskega lisastega goveda.

2 PREGLED OBJAV

V zadnjih nekaj desetletjih so se pokazale korenite spremembe na področju okolja. Pri tem moramo upoštevati tudi povečan dostop do zelo kalorične hrane, naša fizična aktivnost pa se je zaradi življenjskega sloga korenito zmanjšala (Blakemore in Froguel., 2008). Zaradi takega življenjskega sloga smo vse bolj podvrženi prekomerni telesni teži in debelosti. Niso pa vsi ljudje podvrženi enako. Nekateri so obvarovani pred škodljivim vplivom, drugi pa v sebi nosijo gene, zaradi katerih so še posebej dovetzni za nalaganje maščobe.

V okviru projekta genetske mape za debelost pri človeku »*The Human Obesity Gene Map*« so do sedaj zbrali že več kot 1000 lokusov, povezanih z debelostjo, med njimi 244 genov za katere so ugotovili, da po pristopu izbijanja genov (ang. *knock-out*) vplivajo na nalaganje maščob pri miših, 317 QTL, ki so povezani s fenotipom debelosti pri človeku in 408 QTL pri živalih. Število lokusov, povezanih z debelostjo pa še narašča (Rankinen in sod., 2006). Ugotovili so, da se geni, ki vplivajo na debelost in nalaganje maščob, pri človeku nahajajo na vseh kromosomih, razen na kromosому Y (Rankinen in sod., 2005).

Na debelost in nalaganje maščob vplivata oba, genetski vpliv in način prehranjevanja. V zadnjih letih se je v povezavi z nalaganjem maščob pri človeku in živalih pokazala pomembna vloga gena *FTO*. Ta gen kodira demetylazo nukleinskih kislin, odvisno od 2-oxoglutarata, katere izražanje je regulirano v možganih preko hranjenja.

Gen *FTO* so prvič povezali z nalaganjem maščobe v dveh neodvisnih študijah (Frayling in sod., 2007; Scureti in sod., 2007). Fraylink in sod., (2007) so s pristopom analize celotnega genoma ugotovili povezavo *FTO* z diabetesom tipa 2. Skupina SNP v prvem intronu gena *FTO* je pokazala močno povezavo in statistično značilnost v povezavi z diabetesom tipa 2. Ko so študijo povezali z indeksom telesne mase (BMI), pa so povezavo gena *FTO* z diabetesom tipa 2 popolnoma zavrgli, saj so predlagali, da je nastanek diabetesa tipa 2 indirekten in da nanj vpliva indeks telesne mase.

Prav tako so Scureti in sod., (2007) izvedli analizo celotnega genoma v povezavi z indeksom telesne mase. Poskusna skupina je štela več kot 4000 Sardincev. V njihovih analizah se je pokazala zelo velika asociacija med genoma *FTO* in *PFKP* (ang. *Phosphofructokinase, platelet*) ter indeksom telesne mase.

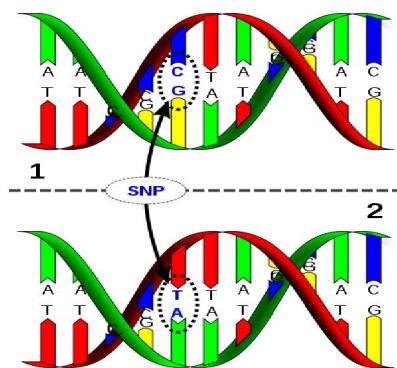
Kasneje pa so povezavo z indeksom telesne mase in debelostjo jasno dokazali tudi pri trinajstih skupinah ljudi, kar je skupno štelo 38.000 analiziranih oseb (Loos in Bouchard, 2008). Prav tako so Dina in sod., (2007) potrdili, da je gen *FTO* povezan z indeksom telesne mase in da prispeva k debelosti otrok in starejših ljudi (Dina in sod., 2007).

Blakemore in Froguel. (2008) so ugotovili majhen vpliv *FTO* na debelost in nalaganje maščob. Pri starejših ljudeh, ki so homozigoti, naj bi zaradi gena *FTO* bili težji dva do tri kilograme. Pri Kavkaških populacijah naj bi bil to specifičen alel. Njegov učinek se začne kazati že v obdobju zgodnje starosti. Višja telesna masa je opažena že pri otrocih starih 2 tedna, prisotnost tega gena pa se kasneje izraža kot višji indeks telesne mase in povečuje apetit lakoto pri otrocih.

2.1 SNP

SNP so mesta na DNA, kjer se en nukleotid (A, T, C ali G) v genomske sekvenci spremeni (Human Genome Project). O SNP govorimo, ko se pojavi sprememba v nukleotidnem zaporedju na primer AAGGCTAA v ATGGCTAA. SNP se mora pojaviti v vsaj 1% populacije, da ga lahko označimo kot polimorfizem. Polimorfizmi (SNP) predstavljajo 90% variacij v celotnem genomu, pojavijo pa se v povprečju vsakih 100 do 300 baznih parov. Dva od treh SNP vsebujejo zamenjavo citozina (C) s timinom (T). Pojavijo se lahko v kodirajočem ali nekodirajočem delu genoma. Večina SNP nima nikakršnega učinka na delovanje celice, znanstveniki pa verjamejo, da mnogi SNP predstavljajo nagnjenje za bolezni ali pa lahko vplivajo na delovanje zdravil.

Ker samo 3-5% DNA kodira proteine, se zato večina SNP nahaja na nekodirajoči DNA. SNP, ki so znotraj kodirajoče DNA, so zelo zanimivi za raziskave, saj obstaja velika verjetnost, da le-ti spremenijo biološko funkcijo proteinov (Kruglyak in Nickerson, 2001). SNP so evolucijsko zelo stabilni, se ne spreminjajo iz generacije v generacijo, zaradi tega jim lažje sledimo v populacijskih študijah. Veliko jih uporabljajo v biomedicinskih raziskavah in v proizvodnji farmacevtskih zdravil ali medicinski diagnostiki.



Slika 1: Primer SNP (Seingle-nucleotide ..., 2009)

Pričakuje se, da bo s pomočjo kart SNP možno identificirati številne gene, povezane z različnimi hudimi boleznimi, kot so na primer rak, diabetes, debelost, vaskularne bolezni in nekatere mentalne bolezni (Kruglyak in Nicherson, 2001). Na primer nekdo, ki je podedoval dva *E4* alela ne bo nikoli zbolel za Alzheimerjevo boleznijo, medtem, ko bo tisti, ki je podedoval dva *E2* alela zbolel za prej omenjeno boleznijo.

S pomočjo genotipizacije SNP lahko ocenjujemo interakcije med geni in nastankom različnih bolezni, kot na primer kardiovaskularnih bolezni, diabetesa tipa 2, multiple skleroze in raka (Kruglyak in Nicherson, 2001). Povezav med SNP gena *FTO* in nalaganjem maščobe ne študiramo samo pri človeku, ampak tudi pri živalih, in sicer nas med drugim zanima pomembna proizvodna lastnost, marmoriranost mesa.

2.1.1 Nomenklatura SNP

Termin polimorfizem se uporablja za označevanje sprememb v nukleotidnem zaporedju, ki ne povzročajo bolezni in jih najdemo pri vsaj 1% (ali več) osebkih v populaciji (Human Genome Variation Society, 2009). Pri poimenovanju polimorfizmov je zaželeno uporabljati enostavne termine kot so: različica sekvence, alteracija in alelna različica. Najpomembnejše pravilo pri poimenovanju je, da moramo vse različice opisati na najbolj osnovnem nivoju (na nivoju DNA). Opis in ime morata vedno biti v relaciji z referenčno sekvenco, pa naj bo to genomska ali kodirajoča DNA. Da bi se izognili zmedi pri imenovanju SNP, se uporablja standardizirane oznake: c. (kodirajoča DNA sekvenca, npr. c.76A>T), g. (genomska sekvenca, npr. g.476A>T), m. (mitohondrijska sekvenca, npr. m.8993C>T), r. (RNA sekvenca, npr. r.76a>u) in p. (proteinska sekvenca, npr. p.Lys76Asn). Številke, ki se nahajajo za črkovno oznako, označujejo mesto kjer se nahaja zamenjava nukleotida.

Nukleotid 0 ne obstaja, nukleotid 1 pa je A iz ATG translacijsko-iniciacijskega kodona. Nukleotid, ki leži 5' od ATG translacijsko-iniciacijskega kodona označimo z -1, nukleotid pred njim z -2 in tako naprej. Nukleotid, ki leži na 3' koncu translacijskega stop kodona se označi z *1, naslednji z *2 in tako naprej.

Začetek introna se označi s številko zadnjega nukleotida predhodnega eksona, sledi znak plus (+) in mesto v intronu (npr. c.77+1G). Konec introna se označi s številko prvega nukleotida naslednjega eksona nato znak minus (-) in mesto v smeri 5' v intronu (npr. c.78-1G). Če pa se nukleotid nahaja nekje vmes v intronu, pa ga označimo s številko na katerem mestu se nahaja (npr. c.77+... ali c.78-...).

Prvi nukleotid na začetku posameznega kromosoma v genomske sekvenci označimo s številko ena (1). Pri označevanju nukleotidov v genomske sekvenci ne uporabljamo znakov plus (+) in minus (-). Če pa ne poznamo zaporedja celotne sekvence gena, lahko uporabimo poimenovanje, ki se uporablja pri poimenovanju kodirajoče sekvence DNA.

Za specifične spremembe na sekvenci pa uporabljamo določene znake. Znak večje-manjše (>) se uporablja pri zamenjavi na nivoju DNA (npr. c.76A>T). Podčrtaj (_) označuje območje delecij, ločuje prvega in zadnjega (npr. c.76_78delACT). Podvojitev nukleotidov označimo z oznako dup (ang. duplication) na primer c.76dupA, insercije označujemo z oznako ins (ang. insertion), npr. c.76_77insG, inverzijo označimo z oznako inv (ang. inversion), npr. c.76_83inv).

Glede na to, da genomska sekvanca pri govedu še ni popolna in obstajajo v njej še vrzeli, se za poimenovanje naših SNP nismo mogli držati zgornjih priporočil.

2.2 MAŠČOBNI DEPOJI BELEGA MAŠČEVJA

2.2.1 Podkožna maščoba

Količina podkožne maščobe variira od živali do živali in med vrstami. Podkožno maščobo običajno merimo na hrbtni z ultrazvokom, ali pa fizično na klavnih polovicah. Žurk in Čepon. (2007) so ugotovili, da so živali lisaste pasme goveda težje v primerjavi z rjavo pasmo goveda in da pasma živali ni imela vpliva na delež podkožne in intermuskularne maščobe. Prav tako pasma ni vplivala tudi na delež podkožne maščobe normalizirane glede na maso klavnega trupa. So pa biki lisaste pasme imeli absolutno več mase podkožne maščobe kot rjavi. Jiang in sod., (2008) navajajo, da gen stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) ni imel vpliva na nalaganje podkožne maščobe. Prav tako te povezave niso uspeli potrditi pri prašičih (Doran in sod., 2006). Opazili so, da polimorfizmi v genu *SCD1* nimajo vpliva na nalaganje podkožne maščobe, vendar pa vplivajo na izražanje proteina *SCD1* v mišicah. Podatki kažejo na to, da je izražanje gena *SCD1* specifično za določeno vrsto tkiva. Povezano s podkožno maščobo pa so našli za mitohondrijski prepisovalni dejavnik A (ang. mitochondrial transcription factor A, *TFAM*) (Jiang in sod., 2008)

2.2.2 Intermuskularna maščoba

Christensen in sod., (1991) so v svoji raziskavi dokazali, da pasma očetov ne vpliva na količino intermuskularne maščobe pri pitancih goveda. Čeprav se delež maščob med pasmami ni razlikoval pa Christensen in sod., (1991) menijo, da bi bilo dobro imeti metodo za razlikovanje med pasmami ali križanci goveda, ki bi s svojo razporeditvijo intermuskularne maščobe zadovoljili željam potrošnika.

Bergen in sod. (2006) so v svoji raziskavi dokazali, da sta intermuskularna maščoba s podkožno maščobo ter intermuskularna maščoba s trebušno maščobo, med seboj bolj korelirani kot pa podkožna maščoba s trebušno maščobo, kar kaže na to, da maščobne depoje regulirajo različni geni.

Čeprav je selekcija usmerjena proti debelini podkožne maščobe pa bo verjetno prišlo do zmanjšanja maščobnih zalog v celotnem telesu. Zaradi tega je pričakovati, da se bo z nadaljnjo selekcijo v govejem mesu zmanjševala količina intermuskularne in trebušne maščobe, ki je najbolj nezaželena.

2.2.3 Intramuskularna maščoba (marmoriranost mesa)

Marmoriranost mesa se nanaša na pojav maščobnega tkiva med snopi mišičnih vlaken pri mišicah (Harper in sod., 2001). Marmoriranost se pojavlja tudi v drugih mišicah in ne samo v *longissimus dorsi*, kar je najbolj zanimivo predvsem za prehransko industrijo (Brackebusch in sod., 1991), saj marmoriranost mesa pripseva k okusnosti in sočnosti mesa.

Enake lastnosti opazimo tudi v mišicah ovac, prašičev (Nurnberg in sod., 1998) in nekaterih linijah eksperimentalnih miši (Kawaguchi in sod., 2002). Kirkland in sod. (2002) navajajo, da intramuskularno maščobo najdemo tudi pri starejših ljudeh, lahko pa se intramuskularna maščoba razvije kot posledica bolezni.

Marmoriranost mesa pri govedu lahko na živi živali zmerimo s pomočjo ultrazvoka, če pa jo merimo oziroma ocenujemo na klavnih polovicah, pa z vizualnimi metodami (Tume, 2004). Maščoba, ki daje mesu lastnost marmoriranosti, razprši ultrazvočne valove in zato vidimo bela, svetla, mesta na temni podlagi na ultrazvočni sliki mišice *longissimus dorsi*.

Maščoba, ki povzroča marmoriranost, nima vzročne povezave s podkožno maščobo (Harper in sod., 2004). Če se ta povezava pokaže, pomeni da je prišlo do vraščanja podkožne maščobe v mišico, česar pa ne štejemo več v marmoriranost mišice.

Marmoriranost mišice povzročajo maščobne celice. Odrasli adipociti v marmorirani mišici so krogličaste oblike s premerom 40-90 µm, le-te pa so lahko manjše kot druge maščobne celice v telesu (Cianzio in sod., 1985; Lee in sod., 2000).

Maščobne celice, ki povzročajo marmoriranost mišice, se običajno pojavljajo v kupih ali »otokih« (Harper in sod., 2004). Ti otoki maščobnih celic postanejo vidni pod mikroskopom, ko vsebujejo 10-15 maščobnih celic. Histološko lahko najdemo otoke maščobnih celic, ki vsebujejo po več sto takih celic.

Vemo, da pri obnovi mišice sodelujejo tudi matične celice. V goveji odrasli mišici lahko najdemo različne vrste celic kot so: miociti (večjedrne celice v mišici katere so zadolžene za kontrakcijo mišice), fibroblasti (tvorijo tkivo, ki povezuje mišična vlakna in tvorijo hrustanec v mesu), endotelne celice (obdajajo krvne žile), makrofagi (igrajo vlogo pri čiščenju celičnih ostankov), mastociti (igrajo vlogo pri vnetjih) in adipociti (shranjujejo maščobo in se delijo v nove adipocyte) (Harper in sod., 2004)

Asakura in sod. (2003) so iz mišje skeletne mišice izolirali satelitne celice in jih gojili *in vitro*. Mislili so, da so se razvile miogenske prekurzorske celice ozziroma mioblasti. Ko so te celice izpostavili seriji stimulov (methyl-isobutylxanthine, dexamethasone, indomethacin in insulin) so le-te celice prevzele krogličasto obliko in začele nalagati lipide v citoplazemske vezikle, kar so karakteristike adipogeneze.

Wada in sod. (2002) pa so izolirali individualne satelitne celice in jih gojili *in vitro*. Dokazali so, da je klon sam zadosten, da se razvije v adipocito, vendar pa mora biti izpostavljen ustreznim pogojem (dodali so γ -linolno kislino). Dokazali so tudi, da pluripotentne mišične matične celice simultano izražajo nekatere proteinske markerje za miogenezo (MyoD), adipogenezo (PPAR γ) in osteogenezo (Runx2).

Histološke preiskave so pokazale, da se maščoba pri prežvekovalcih, tudi intramuskularna maščoba, povečuje skozi rast in staranje organizma, kar ni nič podobno celicam mišic in kosti, ki dosežejo maksimalno zrelost v odraslosti organizma (Hood in Allen, 1973). Adipocite naj bi se tudi združevale med seboj medtem ko se v njih nalaga maščoba (Leibel in sod., 1989)

Hocquette in sod. (2003) domnevajo, da obstaja povezava med deležem intramuskularne maščobe in aerobno-anaerobnim metabolizmom kot je bilo ocenjeno s pomočjo encimskega vzorca ($R^2=0,57$ za citokrom c oksidazo v. mišičnim triacilglicerolom).

Harper in sod. (2004) navajajo, da se akumulacija maščobe v mišici lahko pojavi tudi pri drugih vrstah sesalcev in ne samo pri govedu. Za večino vrst velja, da se to lahko zgodi samo pod ekstremnimi patološkimi pogoji. Maščoba v mišicah pri prašičih pasme Duroc in ovcah lahko doseže vrednost do 10%. Izražanje marmoriranosti pri govedu spodbujamo skozi dolgo dobo krmljenja in visoko energijsko krmo.

2.2.4 Trebušna (visceralna) maščoba

Trebušno (visceralno) maščobo najdemo v trebušni votlini med organi. Kishikawa in sod. (2005) so v svoji raziskavi dokazali, da je v trebušnem maščevju višje izražanje CDC42 proteina in mRNA kot pa v podkožnem maščevju goveda, prašičev in miši. Analiza ostalih genov pa ni pokazala velikega izražanja v trebušnem in podkožnem maščevju pri govedu, prašičih in miših. Navajajo, da je veliko razlogov zakaj trebušno maščevje prispeva k abnormalnemu delovanju metabolizma. V študiji, kjer so primerjali japonsko črno govedo in volov holštajnske pasme, so ugotovili, da je količina trebušne maščobe v obeh poskusnih populacijah podobna (Higashiyama in sod., 2003). Nasprotno pa je primerjava med mlečno pasmo (Holštajn) in mesno pasmo (Šarole) pokazala, da biki pasme Holštajn nalagajo več trebušne (in tudi podkožne ter intramuskularne) maščobe kot biki šarole – verjetno gre tu za genetske razlike, kjer mlečni tip nalaga več maščevja kot energijski vir za potrebe med laktacijo medtem ko mesni tip daje prednost nalaganju proteinov (mišic) (Pfuhl in sod., 2007). Poleg genetskih vplivov je znan tudi vpliv prehrane na količino maščevja. Dodajanje močnih krmil zvišuje količino nalaganja v vseh depojih – zanimiva pa je ugotovitev, da dodatek močnih krmil pri govedu proporcionalno najmanj poviša količino trebušne maščobe (Scollan in sod., 2003)

2.3 GEN *FTO* PRI PRAŠIČIH

Fan in sod. (2009) so ugotovili visoko stopnjo polimorfizmov v nekodirajočem in regulatornem območju gena *FTO*, kar je prispevalo k razvoju številnih funkcij gena *FTO*. V raziskavi navajajo, da trije najbolj perspektivni SNP (rs9939609, rs1421085 in rs17817449) v intronu 1 gena *FTO*, ki so bili povezani z indeksom telesne mase pri ljudeh, niso bili identificirani pri prašiču, ker je razlika zaporedja nekodirajočega območja med vrstama prevelika. Pri človeku pa je dolžina introna 1 gena *FTO* tako velika (~405kb), da ustreznih SNP pri prašiču verjetno še niso našli.

V raziskavi so našli in potrdili 12 variant zaporedij, v katerih sta bili tudi dve varianti insercija/delecija (indel) in deset SNP. SNP c.594C>G v eksonu 3 je povzročil sinonimno mutacijo Ala198Ala. Fan in sod. (2009) še navajajo, da so našli v intronu 1 tri SNP in dve indel (insercija - delecija), v intronu 6 pa tri SNP. Navajajo še, da je bila frekvenca manj pogostega alela (ang. *minor allele frequency*; *MAF*) večja od 0,05 za vsak SNP, trije SNP pa niso bili v Hardy-Weinbergovem ravnotežju ($P<0,001$) iz česar sklepajo, da so ti trije SNP lahko pod pritiskom naravne ali umetne selekcije, lahko celo obojega skupaj.

Večina SNP v njihovi raziskavi ni pokazala statistične značilnosti ($P>0,05$) pri hrbtni maščobi, razen c.594C>G, ki je bil statistično značilen ($P<0,05$) za ledveno maščobo, bil pa naj bi povezan hrbtno maščobo desetega rebra in povprečno hrbtno maščobo. Medtem ko so štirje SNP bili statistično značilni pri deležu celotnih lipidov ali pri marmoriranosti mesa. SNP c.46-139A>T v intronu 1 je bil statistično značilen ($P<0,01$) v povezavi z dnevnim prirastom v testu, (*ang. ADGETEST, average daily gain on test*).

Fan in sod. (2009) so dokazali, da gena *FTO* in *MC4R* nista neposredno povezana s hrbtno maščobo pri prašičih, prispevata pa pri ADGETEST-u, verjetno posredno preko konzumacije. Dokazali so, da je gen *FTO* pri prašičih povezan z intramuskulano maščobo.

Fontanesi in sod. (2009) navajajo, da so v svoji raziskavi pri prašičih pasem belgijski landras, italijanski duroc, italijanski veliki beli prašič, meishan in pietrain našli tri SNP. Dva so našli v intronu 4 (g.170T>G in g.276T>G). Tretji SNP so našli v območju 3'UTR. (g.341G>A).

Pri tej skupini živali so ugotovili, da je gen vplival na napoved plemenskih vrednosti za konverzijo krme, medtem ko med napovedmi plemenskih vrednosti (NPV) za pH ni bilo razlik (*ang. feed:gain ratio in estimated breeding values*) ($P<0,05$) (Fontanesi in sod., 2009). Ostale napovedi plemenskih vrednosti in pH vrednosti niso bile statistično povezane z genom *FTO*.

V drugi skupini so prašiče selektivno odbrali na osnovi genotipa (*ang. genotyping approach*) (Fontanesi in sod., 2009). Odbrali so 100 italijanskih velikih belih prašičev (Italian Large White) z ekstremno visokimi napovedmi plemenskih vrednosti za debelino hrbtne slanine (*ang. backfat thickness*). V tretjo skupino pa so selektivno odbrali 100 italijanskih duroc (Italian Duroc) prašičev z ekstremno visoko napovedjo plemenske vrednosti za intramuskularno maščobo. Pri italijanskih velikih belih prašičih niso našli nobene povezave med testiranimi genetskimi označevalci in debelino hrbtne slanine. Dokazali so tudi, da med temo dvema ekstremnima skupinama ni večjih razlik pri razporeditvi alelov.

Pri pasmi italijanski duroc so ugotovili, da je *FTO* statistično značilno povezan z vrednostmi napovedi plemenske vrednosti za intermuscularno maščobo ($P = 0,0025$) (Fontanesi in sod., 2009). Dokazali so, da je gen *FTO* pri pasmah prašičev iz raziskovalnih populacij bolj povezan z intermuscularno maščobo, ne pa z debelino hrbtne slanine.

Da bi potrdili zgoraj navedene rezultate, so Fontanesi in sod. (2010) genotipizirali te polimorfizme tudi pri prašičih pasme italjanski duroc. V testni populaciji so imeli 313 prašičev iz testa lastne proizvodnosti (performance testa). Poleg tega pa so genotipizirali te polimorfizme tudi pri 148 težkih komercialnih prašičih (commercial heavy pigs). Rezultati raziskave so potrdili vpliv gena *FTO* na debelost in nalaganje maščobe pri prašičih pasme Italjanski Duroc ($P<0,01$), enako tudi pri težkih komercialnih prašičih (ang. *commercial heavy pigs*).

Flisar in sod. (2009) v svoji raziskavi navaja, da pri prašičih pasme krškopoljski prašič niso potrdili povezave med genom *FTO* in vsebnostjo intramuskularne maščobe. Navaja tudi, da niso našli nobene povezave med genom *FTO* in maščobnokislinsko sestavo maščob. Razlika, na katero naj bi vplival gen *FTO*, se je pokazala samo pri debelini hrbtni slanine ki so jo merili v vihru. Navaja tudi, da je eden od možnih vzrokov, da niso potrdili vpliva gena *FTO*, struktura živali po poreklu, saj je bil vzorec majhen, eden izmed ključnih problemov pri pasmi krškopoljski prašič pa je tudi visoka stopnja sorodstva.

2.4 GEN *FTO* PRI MIŠIH

Fto je bil prvotno kloniran pri mutantah miši (*Fused toes deletion*) (Peters in sod., 1999). Je del sosedne ležeče delecije, ki povzroča zlepljene prste pri glodavcih (Van der Hoeven in sod., 1994), ki ima 1,6 Mb delekcijo na kromosomu 8. Smrtnost se v embrionalnem stadiju pokaže pri homozigotih (Gotz in sod., 2005). Opazna je tudi levo-desna asimetrija, živčni defekti in polidaktilia (Heymer in sod., 1997). Zarodki, ki so homozigoti in vsebujejo delekcijo zlepljenih prstov, imajo defekte na anteroposteriorni in dorsoventralni strani možganov, pojavi se zmanjšanje velikosti hipotalamus (Anselme in sod., 2007). Miši, ki so heterozigotne, niso debele, ampak imajo zlepljene prste kot tudi hiperplazijo timusa, verjetno zaradi navideznega poslabšanja programirane celične smrti (Van der Hoeven in sod., 1994).

Stratigopoulos in sod. (2008) so dokazali visoko izražanje gena *Fto* v hipotalamu, ampak je bil relativno nekoliko višje izrazit v skupku nevronov v mediobazalnem hipotalamu (ang. *nucleus arcuatus hypothalami*), med tem ko je bilo izražanje tesno vezanega gena *RpgripII* (ang. *RpgripI-like*, sinonim *Ftm*) vezano samo na skupek nevronov v mediobazalnem hipotalamu (ang. *nucleus arcuatus hypothalami*).

Gen *RpgripII* kodira zaporedje za sintezo proteina, ki lahko lokalizira centrosome bazalnih teles. Okvare v tem genu so lahko vzrok za nastanek Joubertovega sindroma tipa 7 (JBTS7) in Meckelovega sindroma tipa 5 (MKS5) (Stratigopoulos in sod., 2008).

Stratigopoulos in sod. (2008) so dokazali, da je izražanje genov *Fto* in *Rpgrip1l* največje v mezenterični maščobi, jetrih, podkožni maščobi in v hipotalamusu. Izražanje genov *Fto* in *Rpgrip1l* so preučili tudi s hibridizacijo *in situ* in s kvantitativnim PCR (qPCR) iz mišjega zarodka. Pri zarodku starem 13,5 dni se je gen *Fto* izražal v celotnem zarodku, še posebej pa v možganih in hrbtničnih življenjskih fazah. V srednjih možganih je bila izraženost gena *Fto* relativno visoka pri razvijajočem se nukleusu in v mamilarnem področju.

Zmanjševanje izražanja *Fto*, ne pa *Rpgrip1l*, v mezenterični maščobi $+/\pm$ živali je edina jasna kvalitativna razlika v izražanju teh dveh genov (Stratigopoulos in sod., 2008). Padec v izražanju gena *Fto* nakazuje na to, da na raven izražanja *Fto/Rpgrip1l* vplivajo substrati z visoko koncentracijo iz tankega črevesa. Hibridizacija *in situ* napeljuje na to, da sta *Rpgrip1l* in *Fto* koekspresivna v omejeni regiji v skupku nevronov v mediobazalnem hipotalamusu (ang. *nucleus arcuatus hypothalami*).



Slika 2: Anatomski prikaz $FTO^{+/+}$ in $FTO^{-/-}$ 20 tednov starih miši (Fischer in sod., 2009)

Fischer in sod. (2009) navajajo, da odstranitev oz. izguba gena *Fto* pri miših povzroča zaostalost v postnatalni rasti in zmanjšanje podkožne maščobe ter zmanjšanje telesne mase. Suhost se pojavi zaradi povečanja porabe energije, čeprav se spontana fizična aktivnost organizma znatno zmanjša. Dokazali so, da je gen *Fto* funkcionalno vpletен v homeostazo energije preko uravnavanja porabe energije.

2.5 URAVNAVANJE IZRAŽANJA GENOV Z MIKRO RNA (MIRNA)

miRNA so kratke molekule RNA (dolge med 19-25 nukleotidov), za katere so dokazali, da igrajo ključno vlogo v regulaciji genskega izražanja, tako da inhibirajo translacijo ali aktivirajo razgradnjo tarčnih mRNA (Bartel, 2004). miRNA nastanejo s procesiranjem daljših primarnih transkriptov, dolgih od nekaj sto do nekaj tisoč nukleotidov, do struktur lasničnih zank in z nadaljnjiimi koraki zorenja pod vplivom encima Drosha v jedru ter encimskega kompleksa v Dicer v citoplazmi. miRNA regulirajo gensko izražanje na sekvenčno-specifičen način. miRNA se vežejo na regijo 3'UTR mRNA, posledica vezave je prizadeta translacija in stabilnost mRNA molekule. To pa vodi v znižano izražanje na ravni proteinov (Valencia-Sanchez in sod., 2006; Filipowicz in sod., 2008).

Izražanje vsaj tretjine genov pri sesalcih je postranskirpcijsko povezanih s približno 1000 miRNA (Georges in sod., 2007). Polimorfizmi in mutacije v zaporedjih prekurzorskih miRNA in tarčnih mest za miRNA po vsej verjetnosti veliko doprinesejo fenotipski raznolikosti in občutljivosti za bolezni.

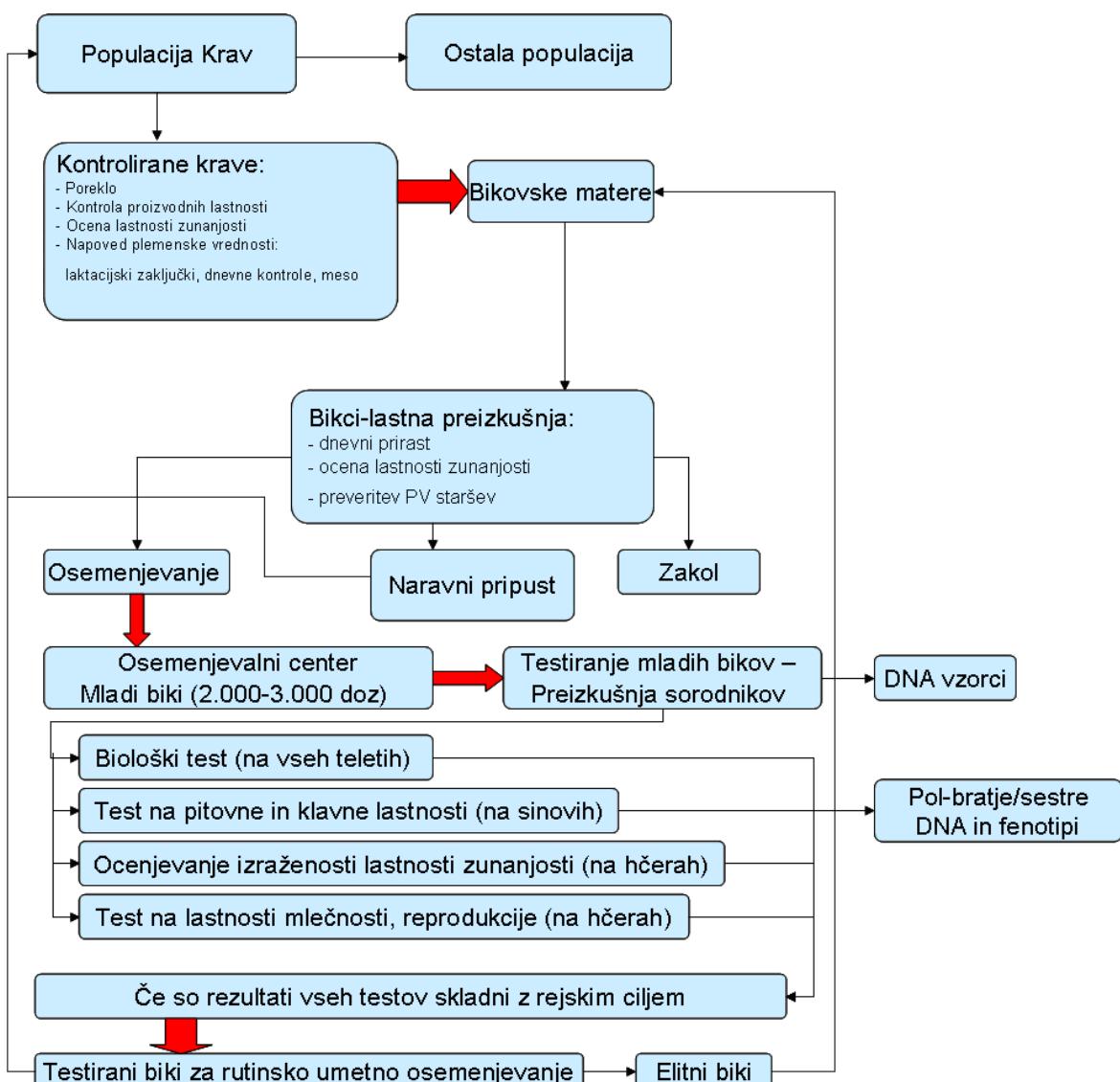
Mutacije, ki medsebojno vplivajo na tarčna mesta za miRNA, imajo komaj opazen vpliv na fenotip, saj nastanejo hiper- ali hipomorfni aleli, kar pa je v nasprotju z izgubo ali pridobitvijo funkcije (sorodne Tourettovemu sindromu, hipertenziji in Texel mišični hipetrofiji). Pomembno prispevanje lastnosti in defektov v nasledstvo, kot ga prikazuje Mendeljevo dedovanje, lahko izključimo, saj ima lahko utišanje gena s pomočjo miRNA večje vplive na določene značilnosti pri osebku.

Malo verjetno je, da polimorfizmi, ki vplivajo na interakcije med miRNA in njihovimi tarčami povzročijo motnje, ampak skromno vplivajo na spremembe izražanja gena in s tem na fenotip (Plasterk 2006). Njihov vpliv je bolj postopen, zaradi tega pa lahko pride do adaptacije organizma ali celo do nastanka nove vrste.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ŽIVALI

Vzorci so bili odvzeti pri živalih iz nacionalnega progenega testa (vrednotenje bikov po lastnostih potomstva), kjer imamo na razpolago večje število fenotipiziranih družin polbratov. Vzorce smo odvzeli 31 plemenjakom in 178 sinovom. Vse živali so bile selekcionirane na podlagi modela opisanega na sliki 3.



Slika 3: Model selekcije govedi lisaste pasme (prirejeno po Čepon in sod., 2004)

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

Avtomatske pipete (10 do 1000 µl)	Gilson, Francija
Centrifuga 5417C	Eppendorf, Nemčija
Kadičke za elektroforezo	Pharmacia, Švedska
Reagenčne posodice	Eppendorf, Nemčija
Pipetni nastavki	Brand, Nemčija
Elektroforeza	Pharmacia, Švedska
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, ZDA
Mikrovalovna pečica	Orion, Madžarska
Tehtnica	Sartorius, Nemčija
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN, Nemčija
Perkin Elmer Lambda BIO+	Terra Universal, ZDA

3.3 IZOLACIJA DNA

3.3.1 Izolacija DNA iz tkiva

Genomsko DNA smo izolirali iz tkiva (mišica) s kompletom reagentov DNeasy Blood & Tissue (QiaGen, Nemčija). Najprej smo tkivo stehtali in zmacerirali ter ga dali v reagenčno posodico (epico). Nato smo dodali 180 µl pufra ATL in 20 µl proteinaze K. Vse skupaj smo pomešali in inkubirali v termomešalcu na 56°C preko noči. Po inkubaciji smo dodali 200 µl pufra AL in 200 µl etanola (96-100%).

Mešanico smo prenesli v kolono DNeasy in centrifugirali eno minuto pri 8000 vrtljajih na minuto. Eluat smo zavrgli. Nato smo dodali vzorcu 500 µl pufra AW1 in ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Tekočino smo zavrgli. Ponovno smo dodali 500 µl pufra AW2 in centrifugirali tri minute pri 14000 vrtljajih na minuto. Eluat smo zavrgli.

V zadnjem koraku pa smo na kolono dodali 200 µl pufra AE. Inkubirali smo 1 minuto pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali približno 1 minuto pri 8000 vrtljajih na minuto. Zadnji korak smo ponovili dvakrat, da smo iz kolone dobili čim več DNA.



Slika 4: Postopek izolacije DNA s kitom QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit

3.3.2 Izolacija DNA iz sperme

DNA smo izolirali tudi iz sperme po spodaj navedenemu protokolu.

Protokol za izolacijo DNA iz sperme

1. Spermo smo dali v epice
2. Dodali smo pufer TE (200µl)
3. Centrifugirali smo 1min -> vodno raztopino smo odlili
4. Znova smo dodali TE pufer (ta korak smo trikrat ponovili)
5. Dodali smo pufer za lizo (za 10 vzorcev 910 µl) + 40 µl DTT + 50 µl proteinaze K
6. vse skupaj smo vstavili v termoblok na 55°C in blago stresali čez noč;
za lažje pobiranje pufra smo dodali še 100µl TE pufra

7. Dodali smo 200 µl fenola
8. Vorteksirali
9. Centrifugirali smo 5min na največ vrtljajih na minuto
10. Odpipetirali smo zgornji del (vodna raztopina)
11. V dodno raztopino smo dodali isto količino kloroforma : izoamil-alkohola (24:1)
12. Vorteksirali
13. Centrifugirali smo na največ vrtljajih na minuto
14. Odpipetirali smo vodno fazo
15. V vodno fazo smo dodali $2,5 \times$ (volumen vodne faze) hladnega 96% alkohola
16. Inkubirali smo eno uro pri -20°C in nato centrifugirali 20 min
17. Alkohol smo odlili in še enkrat centrifugirali
18. Odpipetirali smo še preostali alkohol in epice pustili odprte, da se posušijo
19. V vsako epico smo dodali 42µl NG-filtrirane vode
20. Vzorce smo preko noči shranili v hladilniku

3.4 MERJENJE KONCENTRACIJE IZOLIRANE DNA

Po izolaciji DNA s kompletom reagentov DNeasy smo izmerili njeno koncentracijo. Za izmero koncentracije smo uporabili merilnik spektrofotometer Perklin Elmer Lambda BIO+ (slika 5). Merilnik deluje na podlagi absorbkcije UV svetlobe v vzorcu. Koncentracijo smo izmerili desetim vzorcem izolirane DNA iz mišice in desetim vzorcem DNA, izolirane iz sperme (preglednica 4).



Slika 5: spektrofotometer Perklin Elmer Lambda BIO+

Do takih razlik, kot so prikazane v preglednici 1 in 2, pride zaradi tega, ker imajo nukleinske kisline višji ekstinkcijski koeficient (*ang. extinction coefficient*) pri 260 nm in 280 nm v primerjavi s proteini (Tataurov in sod., 2008). Zaradi tega tudi relativno visoka količina proteinov v vzorcu doprinese male vrednosti absorbance pri 260 nm in 280 nm.

Preglednica 1: Razmerje med proteini in nukleinskimi kislinami

% proteinov	% nukleinskih kislin	razmerje 260:280
100	0	0,57
95	5	1,06
90	10	1,32
70	30	1,73

Preglednica 2: Razmerje med nukleinskimi kislinami in proteini

% nukleinskih kislin	% proteinov	razmerje 260:280
100	0	2,00
95	5	1,99
90	10	1,98
70	30	1,84

Absorpcijo pri 230 nm pa lahko povzročijo fenolatni ioni, tiocianati in druge organske sestavine. Za čist vzorec nukleinskih kislin mora biti vrednost razmerja med 260:230 nm 2.

Vzorci izolirane DNA so velikokrat kontaminirani tudi z drugimi molekulami (npr. proteini, fenol in druge organske sestavine). Ker imajo te molekule svoje karakteristike absorbkcije UV svetlobe, je absorbkcija (pri drugih valovnih dolžinah) primerjana z absorbkcijo pri 260 nm valovne dolžine. S tako metodo lahko določimo čistost našega vzorca DNA. K napaki pri merjenju čistosti vzorca izolirane DNA velikokrat doprinese tudi sam fenol, saj tudi le-ta absorbira UV svetlobo valovne dolžine 260 nm.

V prilogi 1 so navedene izmerjene vrednosti koncentracije DNA, ki smo jih uporabili kot orientacijo ali bodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) in restrikcijske reakcije uspešne. Koncentracijo DNA je možno povečati s tem, da dvakrat eluiramo DNA v koloni. Za ta korak pa smo se odločili na podlagi razmerja A260/280. S tem razmerjem običajno določamo čistost vzorca izolirane DNA z upoštevanjem kontaminiranosti s proteini, saj imajo proteini (predvsem aromatske aminokisline) tendenco da absorbirajo svetlobo 180 nm valovne dolžine.

S primerjavo naših vrednosti v preglednici 1 s preglednico 2 vidimo, da se naše izmerjene vrednosti, oziroma razmerje 260:280 nm giblje med 1 in 2, kar pomeni, da je v naših vzorcih med 50% in 100% nukleinskih kislin, kar zadošča za reakcije PCR, vendar pa smo pri izolaciji DNA vseeno dvakrat eluirali iz kolone in s tem pridobili večjo količino DNA za kasnejše analize.

Vrednosti razmerja 260:280 nm (preglednica 2) variirajo, vendar so po večini okoli vrednosti dva (manjša odstopanja). Zato je PCR lahko normalno potekal, saj vzorci niso bili zelo kontaminirani.

3.5 IDENTIFIKACIJA GENETSKE VARIABILNOSTI GENA *FTO* IN GENOTIPIZACIJA

Za detekcijo mutacij smo uporabili 11 parov začetnih oligonukleotidov. V preglednici 3 so navedena imena in nukleotidno zaporedje 5' (levih (*ang. forward*)) in 3' (desnih (*ang. reverse*)) začetnih oligonukleotidov, dolžina produkta PCR in lokacija pomnoženega tarčnega območja v genu *FTO*.

Preglednica 3: PCR oligonukleotidi in dolžina njihovih produktov v bp

Ime oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje 5' in 3' začetnih oligonukleotidov	produkt PCR (bp)	Pomnoženo/tarčno območje v genu <i>FTO</i>
BOVPROM1-F	TCTCCTTCCGAGGGAGAAT	201	promotor
BOVPROM1-R	AAGATCCCAGACTTGGGTGA		
FTO-Ex2-F	GGTTTGGAGGGAGAATGGAT	804	Del introna 1, ekson 2 in del introna 2
FTO-Ex2-R	TTGCGATTTCGCCAGTTGTA		
FTO-Int2-F	CTTGTGACTTTGGCGAGTT	853	Del introna 2 in del eksona 3
FTO-Int2-R	CCTCTTATGGAGCAACTCAGG		
FTO-Int3-F	ATTTTGGCATGGGAAAATG	861	Del eksona 3 in del introna 3
FTO-Int3-R	GGGGACCTTCAAAACACAGA		
BOVINT6A-F	TGGACAAGGTCTCCTTGC	450	Intron 6
BOVINT6A-R	GACAGTGTTAACGGGGTA		
BOVINT7A-F	GGAGCAGTGGGGATACAGTC	516	Intron 7
BOVINT7A-R	CCTATATTGCCCTCTCTGG		
BOVINT8A-F	ATGCTGAGGCCCACTAGAGA	798	Intron 8
BOVINT8A-R	CCAGAAAGTGGATAACCCAGA		

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Ime oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje 5' in 3' začetnih oligonukleotidov	produkt PCR (bp)	Pomnoženo/tarčno območje v genu <i>FTO</i>
BOVINT8B-F	TTCATGCTTTGCCTTCCTT	727	Intron 8
BOVINT8B-R	ATGTGCTGTTCTGGCTTCT		
FTO-UTR3a-F	TCGAATTGCCCGAACTTTAC	814	Del 3'UTR
FTO-UTR3a-R	GATGAAAACGTTCTGTGTCCAA		
FTO-UTR3b-F	TCAGTTGCATGAGCCACATT	803	Del 3'UTR
FTO-UTR3b-R	TTCATGGCATCATGAGACAAA		
FTO-UTR3c-F	GCTGACCTGCTGTAGGCATT	931	Del 3'UTR
FTO-UTR3c-R	CAGGCACTCTGGGTTCT		

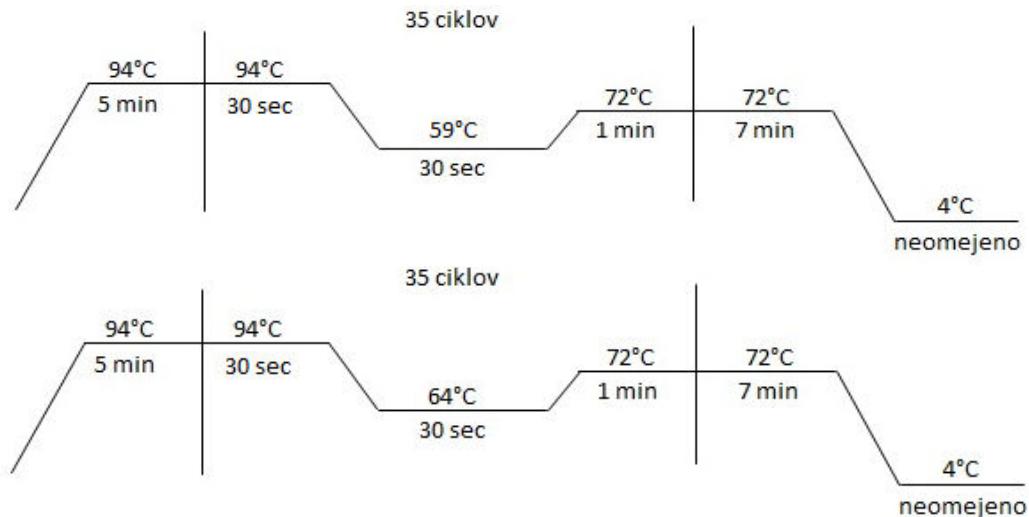
3.6 PCR

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda pomnoževanja določenega odseka DNA. PCR poveča število kopij izbranega tarčnega zaporedja DNA v samo nekaj urah (Guatelli in sod., 1989). Pri reakciji PCR potrebujemo dva začetna oligonukleotida (*ang. primer*), ki sta komplementarna tarčni sekvenci DNA in sta si nekaj sto baznih parov narazen.

Prvi korak pri reakciji PCR je denaturacija molekule DNA, ki jo dosežemo s topoto. V drugem koraku pride do prileganja začetnih oligonukleotidov, (*ang. annealing temperature*) kjer se začnejo oligonukleotidi vezati na denaturirano molekulo DNA. Polimeraza (*ang. Taq DNA polymerase*) nadaljuje podvojevanje DNA molekule po vezavi začetnih oligonukleotidov. Rezultat tega procesa sta dve kopiji želenega zaporedja DNA.

S ponavljanjem zgoraj navedenih korakov, število kopij zaporedja DNA eksponentno narašča.

Pri našem delu smo uporabljali dva programa za PCR, prikazana na sliki 6.



Slika 6: Pogoji za reakcijo PCR

Pri vseh PCR reakcijah smo uporabljali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov 59°C, razen pri PCR reakcijah, kjer smo uporabili začetne oligonukleotide BovInt7A. Za ta oligonukleotid smo določili temperaturo prileganja 64°C.

Sestavine, ki smo jih potrebovali za 10 µl reakcijo PCR prikazuje preglednica 4.

Preglednica 4: Volumni reagentov za pripravo reakcijske mešanice za PCR

Reagent	Volumen v reakcijski mešanici 10 µl
1× PCR pufer (Fermentas, Litva)	1 µl
200 µM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,6 µl
25mM MgCl ₂	0,6 µl
5' začetni oligonukleotid (10pmol/ µl)	0,25 µl
3' začetni oligonukleotid (10pmol/ µl)	0,25 µl
Polimeraza <i>Taq</i> DNA (Fermentas, Litva)	0,05 µl (0,5U)
Vzorec DNA (50ng/ µl)	1 µl
Bidestilirana voda do 10ul	6,25 µl

Reakcijsko mešanico smo pripravili v ločenem prostoru, kjer ni nevarnosti kontaminacije z DNA in produkti PCR predhodnih reakcij. Ker je aktivnost polimeraze temperaturno pogojena, smo vzorcem polimerazo DNA dodali na ledu. Vzorce smo vstavili v mikroprocesorsko voden termostat (MJ Research, ZDA).

3.7 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA

Elektroforeza na agaroznem gelu je metoda za ločevanje DNA po velikosti. Metodo smo uporabili za preverjanje uspešnosti izolacije DNA in uspešnosti metode PCR ter uspešnost analize z restriktijskimi encimi. Opazovanje DNA in produktov PCR omogoči barvilo SYBRSafe (Invitrogen, ZDA), ki luminiscira pri UV svetlobi, in tako lahko s kamero slikamo rezultate. Koncentracija agaroznega gela je odvisna od namena uporabe. Za opazovanje izolirane DNA in produktov PCR smo uporabili 1,5% agarozni gel, za opazovanje produktov restrikcije pa (2%) agarozni gel.

Agarozni gel smo pripravili iz agaroze in pufra TBE. Mešanico smo zavreli v mikrovalovni pečici, pri čemer se je agaroza raztopila. Ko se je agaroza ohladila, smo ji dodali barvilo SYBR Safe in nalili v model z glavnički.

Ko se je agaroza strdila, smo v žepke, ki jih naredijo glavnički, previdno odpipetirali 10 µl vzorca s predhodno dodano kapljico aplikacijskega pufra (Loading dye, Fermentas, Litva). Zaradi tega pufra se vzorec obarva, tako da ga lažje nanesemo na gel.

Elektroforeza je potekala pri sobni temperaturi in napetosti med 90 in 100 V. Po končani elektroforezi smo gel slikali s sistemom za slikanje gelov (U:Genius, Syngene, ZDA).

3.8 RESTRIKCIJSKA ANALIZA

Restriktijska analiza je proces, pri katerem encim reže DNA na določenem mestu (mesto z določenim zaporedjem). Če obstaja SNP na mestu, kjer se nahaja prepoznavno zaporedje restriktijskega encima, lahko glede na nastale dolžine DNA po restriktiji sklepamo na genotip zaporedja DNA. Ta proces imenujemo tudi RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

V našem primeru smo z uporabo programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) ugotovili, da za ugotavljanje zamenjave C>T možno uporabiti encim *SmuI*, za ugotavljanje zamenjave A>G pa encim *Eco130I*. Do zamenjave C>T pride v UTR regiji, do zamenjave A>G pa v promotorju gena *FTO*.

Preglednica 5: Volumni reagentov za pripravo reakcijske mešanice restriktijskih reakcij

Reagent	Volumen v reakcijski mešanici 10 µl
Reakcijski encim (<i>SmuI</i> in <i>Eco130I</i>)	0,2 µl (2 U)
Produkt PCR	6 µl
Pufer Tango (Fermentas, Litva)	1 µl
Bidestilirana voda	2,8 µl

Vzorce smo inkubirali pri 37°C preko noči.

3.9 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

Z verižno reakcijo s polimerazo smo pomnožili želeni odsek. PCR produkt smo prečistili z elektroforezo v 1,5% agaroznem gelu in z elektroelucijo, ter poslali na sekvenciranje v podjetje Macrogen (Seul, Južna Koreja, <http://www.macrogen.com>).

3.9.1 Izolacija fragmentov DNA iz gela z elektroelucijo

Namen izolacije DNA iz gela je odstranitev začetnih oligonukleotidov, soli in polimeraze *Taq*. Iz gela izolirane fragmente lahko uporabimo v reakciji določanja nukleotidnega zaporedja.

Po končani elektroforezi produktov PCR smo s skalpelom izrezali kvader agaroznega gela tik pred izbranim fragmentom DNA. Luknjico smo napolnili s puferjem 0,5×TAE in pri napetosti 200 V podaljšali čas elektroforeze še za 45 s oziroma dokler se izbrani odsek DNA ni eluiral v pufer v luknjici. Raztopino smo odpipetirali iz luknjice, DNA smo oborili z dodatkom nasičene raztopine NaCl in 96-odstotnega ledeno hladnega etanola (8 µl NaCl/50 µl 0,5×TBE, 2,5-kratni volumen etanola). Obarjanje je trajalo 1 uro pri -70°C ali čez noč pri -20°C. Vzorce smo centrifugirali 15 min pri 20.000 g, odpipetirali etanol, oborino DNA posušili na zraku in jo raztopili v 24 µl vode (Sigma Chemical, ZDA).

3.10 METODA GENOTIPIZACIJE S SISTEMOM PCR »FAST REAL-TIME«

TaqMan sonde so hidrolizne sonde, ki jih je razvilo podjetje Applied Biosystems; ABI (Foster City, CA, ZDA), da bi povečali specifičnost PCRa v realnem času (real-time PCR) (<http://www.vetscite.org>, Kutyavin in sod, 2000; Bustin, 2000). Sonde delujejo na principu 5'-3' eksonukleazne aktivnosti polimeraze *Taq* (slika 8).

TaqMan sonde so izbrane tako, da se nahajajo v delu DNA, ki jo pomnožujemo z začetnimi oligonukleotidi po istem principu kot za PCR. Ko polimeraza *Taq* podaljšuje oligonukleotid in sintetizira nastajajočo verigo, 5' proti 3' eksonukleazno delovanje polimeraze odstrani in razgradi Taqman sondu, ki se prilega osnovni verigi. Pri razgradnji se fluorofor in dušilec ločita, ker dušilec ne ovira več signala, lahko zaznamo fluorescenco, ki jo povzroči fluorofor. Nastalo fluorescenco zazna senzor v napravi in odčita jakost signala.

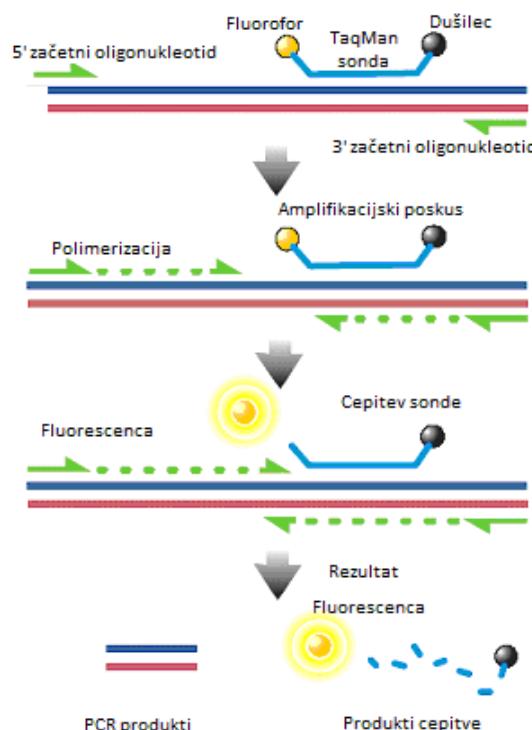
3.11 POSTOPEK IZBORA IN NAČRTA SOND TAQMAN

Pri izboru in načrtovanju sond SNP smo se osredotočili na odseke zaporedij, kjer smo s sekvenciranjem (glej sekcijo 4.9) odkrili genetsko variabilnost med biki (očeti) v populaciji slovenske listaste pasme. Najprej smo kakovost zaporedij preverili s primerjanjem večjega števila sekvenčnih reakcij na isti živali (tehnične ponovitve) oziroma sekvenc primerjavo med očeti. Na ta način smo se dodatno prepričali, da nakazani polimorfizem resnično obstaja. Sekvenco smo tudi analizirali s programom BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), da smo dodatno ocenili kakovost naših sekvenc in če sekvence kartirajo na lokus *FTO* pri govedu. Nato smo posamezne odseke nukleotidnih zaporedij analizirali za prisotnost repetitivne DNA (ponovite kot so LINE, SINE, mikrosateliti, minisateliti ipd.). To smo opravili z analizo sekvenc s programom Repeat Masker (<http://www.repeatmasker.org/>). Odkrita področja repetitivne DNA smo v nukleotidnem zaporedju naših sekvenc zamenjali s črko »N« in s tem te odseke izločili iz analize za načrt sond Taqman. Če je bila lokacija SNP v bližini repetitivne sekvenca (npr. oddaljena nekaj nukleotidov) smo tak potencialen SNP prav tako izločili iz nadaljnje analize za razvoj sonde, tako, da smo tako SNP mesto prav tako označili s črko »N«. Z uporabo programa FileBuilder (<http://www.appliedbiosystems.com/filebuilder>) smo potencialne SNP označili in sekvence pripravili v formatu kot to zahteva proizvajalec sond Applied Biosystems, ki je nato sonde tudi sintetiziral. Da bi omogočili učinkovitejšo analizo (multipleksing) smo vsak SNP označili z različnim fluorescenčnim barvilom.

Preglednica 6: Nukleotidna zaporedja, na podlagi katerih so bile izbrane TaqMan sonde

BovFTOprom (Promotor)	CCCTGGGAGTGGTATTCTCTCCTTCCGAGGGAGAATGGGCCAGCGGGAG CTGGACGCCAAGAGAACTACATGGAGGAGGCCGGTCCAGGGCTAGGAATCT ACGCG [A>G] TTAGTAGTGGCGAAGGCAGCTATAACGGCAGCATGAAGCGGAC CCCGACGGCCGAGGAACGAGAGCGCGAAGCTAAGGTATTCGGGCTCACCA AGTCTGGGATCTTC
BovFTOint4 (Intron 4)	TTCTTATTAAAGATGTCATATTGCGATTCTAAAATGACTTGTCCGCATCTTCTC TTAGGCTAAACAAAACAAAAATAAAAGCAACCAGGTGGAAAGGCCACCTTT CTCTTACTTTAAAAGCCAAGGACTCTAAAGAACCCGTCCGGGATCCCT GCCCTGTGCTGATAACCTGAAATCTGAACCTCATAGCACTT [T>G] GAAAAGGA AACAGTTAGCTCAATTATAATAATATTGGTCTGCAGAGGAAGTGCAGAC CAAACCTGCTGTCAGTCAGTCAGTCCAGGGGTGTCTGATGGGAACGTGC CGGGTGCGCTGTAATAATCCACTGCCTGTGAAATTGAGTGAAGGCCCTGCTGG CAGTGCCTGAGGACACGCTTAAC TGCGGTTGTCACGGTTACTTTAAATTG GAATCTTGCCCTAATCTCAGAGTT
BovFTO3utr (3'UTR)	GGAAGCCGAGGAGCTTTTCACCCATTCAAGAGGTACCTGAGAACTAAACTCT CC [C>T] GCCATCAGAATCTCACCGGTCAAGGTTGGGCTATTCTATAGAG TTTACCTCAGAGAGATCACATCACACAAGGCAGATGGGGTT

SNP so označeni z rdečo barvo.



Slika 7: Delovanje TaqMan sond.

3.12 BIOINFORMACIJSKE METODE

Pri delu smo uporabili tudi podatkovne zbirke in bioinformacijske metode (preglednica 7).

Preglednica 7: Prikaz podatkovnih zbirk in bioinformacijskih metod

Podatkovne zbirke

NCBI	Podatkovna zbirka iz katere smo pridobili nukleotidno zaporedje	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Ensembl Genome Browser, verzija 56, september 2009	Podatkovna zbirka iz katere smo pridobili nukleotidno zaporedja	http://www.ensembl.org
OMIM	Imena in vloga genov	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez
HGNC	Imena genov, sinonimi	http://www.genenames.org/
<hr/>		
<hr/>		
Primer 3	Iskanje zaporedij začetnih oligonukleotidov	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
NEBcutter	Program za iskanje restriktičnih encimov	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
MultAlin	Poravnavo/primerjava nukleotidnih zaporedij	http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html (Corpet in sod., 1988)
MEGA4	Urejanje nukleotidnih zaporedij	http://www.megasoftware.net/
SeqScape verzija 2.5	Urejanje nukleotidnih zaporedij	Applied Biosystems

se nadaljuje

nadaljevanje

Bioinformacijske metode

TargetScan, verzija 5.1, april 2009	Napovedovanje tarčnih mest za miRNA	http://www.targetscan.org/
BLAST	Orodje za poravnavo sekvenc	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Repeat Masker	Pregled DNA sekvence za razpršene ponovitve nizko kompleksnih DNA	http://www.repeatmasker.org/
FileBuilder 3.1	Program za izdelavo datotek, ki se uporablajo za Custom TaqMan Genomic Assaysa	Applied Biosystems

Na sliki 8 je prikazana vhodna stran programa TargetScan, s katerim smo iskali vezavna mesta za miRNA.

Search for predicted microRNA targets in mammals

[Go to TargetScanMouse]
[Go to TargetScanWorm]
[Go to TargetScanFly]

1. Select a species Cow
 AND
2. Enter a human Entrez ID symbol (e.g. "LIN28") FTO
 AND/OR
3. Do one of the following

- Select a broadly conserved* microRNA family Broadly conserved microRNA families
- Select a conserved* microRNA family Conserved microRNA families
- Select a poorly conserved microRNA family Poorly conserved microRNA families
- Enter a microRNA name (e.g. "mmu-miR-1")

Go to [TargetScan Custom](#) if your RNA is not included in the microRNA families listed above.

Slika 8: Slika začetne strani programa TargetScan

3.13 STATISTIČNE METODE

Za našo statistično obdelavo smo uporabili sledeči model:

$$y_{ij} = \mu + T_i + S_j + b(x_{ij} - \bar{x}) + o_k + e_{ijkl} \quad \dots(1)$$

y_{ij} - delež loja

μ - srednja vrednost za lastnost

T_i - sezona, $i = 1, \dots, 6$

S_j - SNP, $j = 1, \dots, 12$

b - regresijski koeficient za maso bika ob zakolu

x_{ij} - masa bika ob zakolu

o_k - naključni vpliv očeta

e_{ijkl} - ostanek

Sezona je določena glede na mesec zakola in leto. Sezona 1 označuje meritve narejene v letu 2006, sezona 2 označuje meritve narejene v letu 2008, medtem ko sezone 3 do 6 označujejo meritve narejene v letu 2007. Sezona tri označuje meritve v januarju in februarju, meritve v juniju in juliju so označene kot sezona 4, meritve v avgustu in septembru smo označili s sezono 5 in sezona 6 predstavlja meritve v oktobru in novembру 2007.

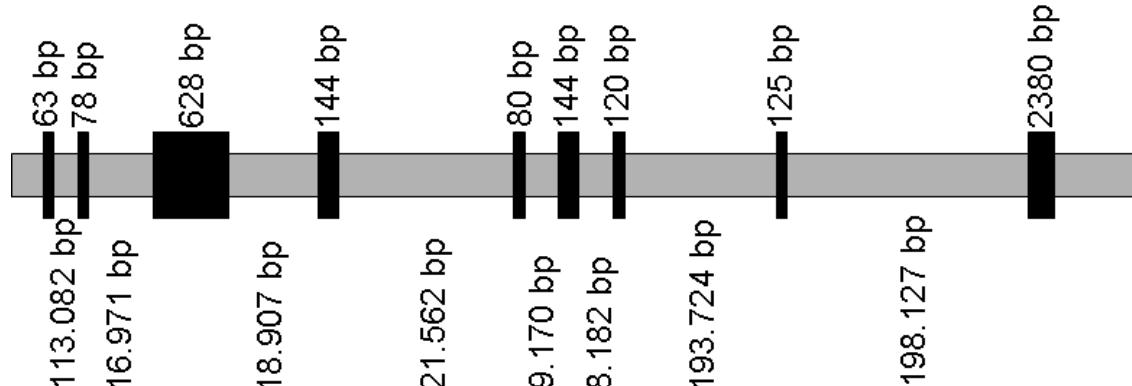
Uporabili smo statistični paket SAS/STAT (SAS User's Guide, 1990). V sklopu programa smo uporabili sledeče programe: MEANS (izračun osnovne statistike), FREQ (izvede n načinov analiz kategoričnih podatkov), UNIVARIATE (izvedba parametričnih in neparametričnih analiz vzorca iz populacije), GLM (za osnovne modele s sistematskimi vplivi) in MIXED (za izbrani model).

4 REZULTATI

V diplomskem delu smo izolirali DNA iz tkiva in sperme populacije slovenskega lisastega goveda in z različnimi metodami genotipizacije (PCR-RFLP, določanje nukleotidnega zaporedja in PCR v realnem času) analizirali genetsko variabilnost gena *FTO* in njegovo povezavo z lastnostmi zamaščevanja.

4.1 ORGANIZACIJA GENA *FTO*

Nukleotidno zaporedje gena *FTO* smo pridobili iz podatkovne zbirke Ensembl (verzija 56, september 2009). Gen *FTO* obsega 583.487 baznih parov (bp) in je sestavljen iz devetih eksonov in osmih intronov (slika 9, priloga 1). Začne se pri 21.321.201 bp in konča pri 21.904.687 bp kromosoma BTA18. Dolžine eksonov in intronov smo shematsko prikazali na sliki 9 in preglednici 8.



Slika 9: Prikaz organizacije gena *FTO* (zgoraj so napisane dolžine eksonov, spodaj pa dolžine intronov)

Preglednica 8: Prikaz začetka, konca in dolžine eksonov in intronov v genu *FTO*

Ekson/Intron	Začetek	Konec	Dolžina v bp
Ekson 1 ENSBTAE00000389951	21.321.201	21.321.263	63
Intron 1-2	21.321.264	21.434.345	113.082
Ekson 2 ENSBTAE00000135015	21.434.346	21.434.423	78
Intron 2-3	21.434.424	21.451.394	16.971
Ekson 3 ENSBTAE00000135018	21.451.395	21.452.022	628
Intron 3-4	21.452.023	21.470.929	18.907
Ekson/Intron	Začetek	Konec	Dolžina v bp
Ekson 4 ENSBTAE00000135019	21.470.930	21.471.073	144
Intron 4-5	21.471.074	21.492.635	21.562
Ekson 5 ENSBTAE00000135020	21.492.636	21.492.715	80
Intron 5-6	21.492.716	21.501.885	9.170

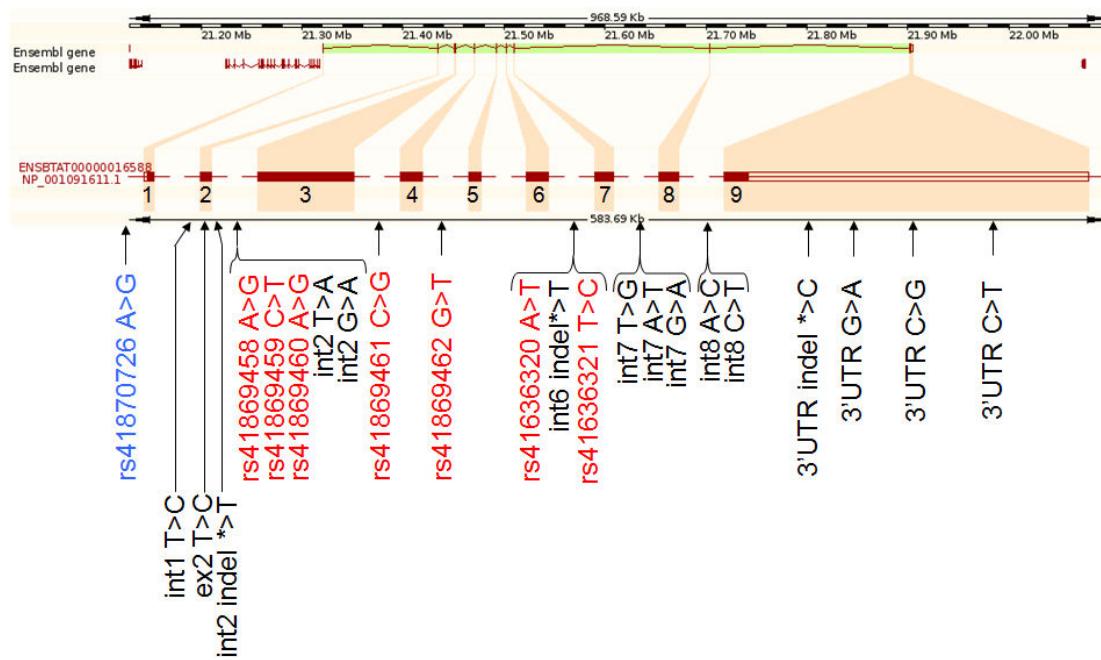
se nadaljuje

nadaljevanje

Eksion/Intron	Začetek	Konec	Dolžina v bp
Ekson 6 ENSBTAE00000135021			
Intron 6-7	21.501.886	21.502.029	144
Ekson 7 ENSBTAE00000135022	21.502.030	21.510.211	8.182
Intron 7-8	21.510.212	21.510.331	120
Ekson 8 ENSBTAE00000135023	21.510.332	21.704.055	193.724
Intron 8-9	21.704.056	21.704.180	125
Ekson 9 ENSBTAE00000259760	21.704.181	21.902.307	198.127
	21.902.308	21.904.687	2380

4.2 GENETSKA VARIABILNOST GENA *FTO* V NAŠI POSKUSNI POPULACIJI IN GENOTIPIZACIJA

V genu *FTO* smo skupno identificirali 23 SNP: en SNP je bil naveden v podatkovni zbirki Ensembl, sedem v podatkovni zbirki NCBI, 15 pa smo jih v okviru diplomske naloge identificirali s sekvenciranjem (slika 10, priloga 1). V populaciji goveda smo od identificiranih 23 SNP genotipizirali 12 SNP: dva z metodo PCR-RFLP, tri z metodo PCR v realnem času in sedem z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja.



Slika 10: Prikaz variabilnosti gena *FTO* pri govedu. S črno barvo so označeni SNP, ki smo jih identificirali s sekvenciranjem, z rdečo barvo so označeni SNP povzeti iz podatkovne zbirke NCBI SNP, z modro barvo pa iz zbirke Ensembl.

V preglednici 9 so navedena imena oligonukleotidov, vrsta SNP v določenem delu gena *FTO* in metoda za genotipizacijo SNP. Za dva SNP smo genotipizacijo izvedli z dvema metodama: analiza SNP v promotorju rs41870726 A>G je bila izvedena z metodo PCR v realnem času in s sekvenciranjem, za SNP v območju 3'UTR C>T pa s PCR v realnem času in PCR-RFLP. Pri produktu PCR, kjer smo uporabili oligonukleotid z imenom BOVINT8A nismo našli polimorfizmov, v primeru začetnih oligonukleotidov BOVINT6A tri SNP v primeru BOVINT7A smo našli dva.

Preglednica 9: Ime začetnega oligonukleotida, vrsta nukleotidne zamenjave in uporabljeni metoda za genotipizacijo.

Ime oligonukleotida /taqman sonde	SNP	Metoda za genotipizacijo	
BovFTOprom, BOVPROM1	rs41870726 (A>G)	PCR v realnem času Sekvenciranje	Promotor
FTO-Ex2	int1 T>C, ex2 T>C	Sekvenciranje * Sekvenciranje *	Intron 1 Ekson 2
FTO-Int2	Int2 indel *>T, int2 G>A	Sekvenciranje * Sekvenciranje / *	Intron 2
FTO-Int3	A>G	Sekvenciranje / *	Intron 3
BovFTOint4	rs41869462 (G>T)	PCR v realnem času / *	Intron 4
BOVINT6A	rs41636320 A>T, int6 indel *>T, rs41636321T>C	Sekvenciranje Sekvenciranje Sekvenciranje / *	Intron 6
BOVINT7A	int7 T>G, int7 A>T, int7 G>A	Sekvenciranje Sekvenciranje Sekvenciranje	Intron 7
BOVINT8A	Odsek ni vseboval polimorfizmov	Sekvenciranje / *	Intron 8
BOVINT8B	Int8 A>C, Int8 C>T	Sekvenciranje Sekvenciranje	Intron 8
FTO-UTR3a	3'UTR indel *>C	Sekvenciranje / *	3'UTR
FTO-UTR3b	3'UTR A>G	Sekvenciranje / *	3'UTR
FTO-UTR3c, BovFTO3utr	3'UTR C>T	PCR-RFLP PCR v realnem času	3'UTR

/ genotipizacija ni bila izvedena; *genotipizacija pri očetih ni bila izvedena

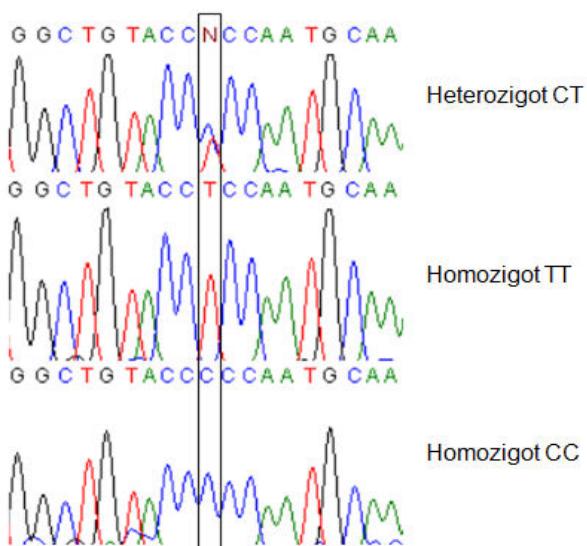
Z metodo PCR-RFLP smo analizirali dva SNP in sicer v območju 3'UTR, za katerega smo uporabili začetne oligonukleotide fto-UTR3c in v drugem intronu, za katerega smo uporabili oligonukleotide fto-Int2.

Za restrikcijo smo uporabili encima *SmuI* (reže v zaporedju $^{5'}\text{C C C G C (N)}_4\text{-3'}$
 $^{3'}\text{G G G C G (N)}_6\text{-5'}$) in *Eco130I* (reže v zaporedju $^{5'}\text{C C W W G G-3'}$
 $^{3'}\text{G G W W C C-5'}$).

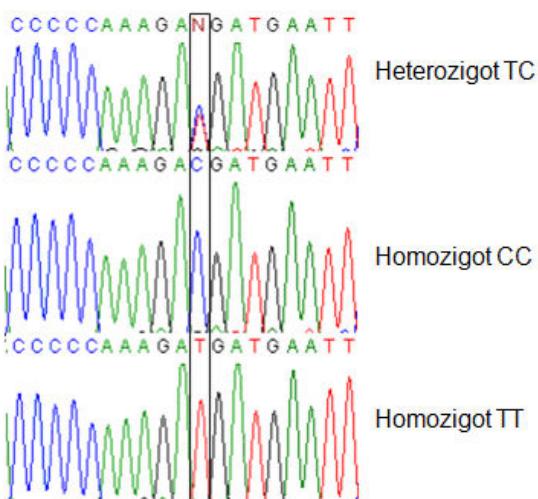
Encim *SmuI* smo uporabili pri produktih PCR, pri katerih smo uporabili začetne oligonukleotide fto-UTR3c. Produkt PCR je bil velik 931 bp. Če je bil vzorec homozigot CC smo dobili na gelu fragmente dolžin 511, 246 in 174 bp, če je bil vzorec homozigot TT so bili vidni fragmenti dolžine 511 in 420 bp, če pa je bil vzorec heterozigot CT pa smo na gelu dobili vidne štiri fragmente velikosti 511, 420, 246 in 174 bp.

PCR produkte začetnih oligonukleotidov fto-Int2 smo rezali z *Eco130I*. Če je bil vzorec homozigot AA smo na gelu videli fragmente dolžin 353 in 500 bp, če je vzorec homozigot GG smo na gelu videli samo en fragment dolžine 853 bp. Pri heterozigotih pa je encim rezal samo v primeru enega alela zaradi tega so bili na elektroforeznem gelu vidni vsi trije fragmenti dolžin 853, 500 in 353 bp.

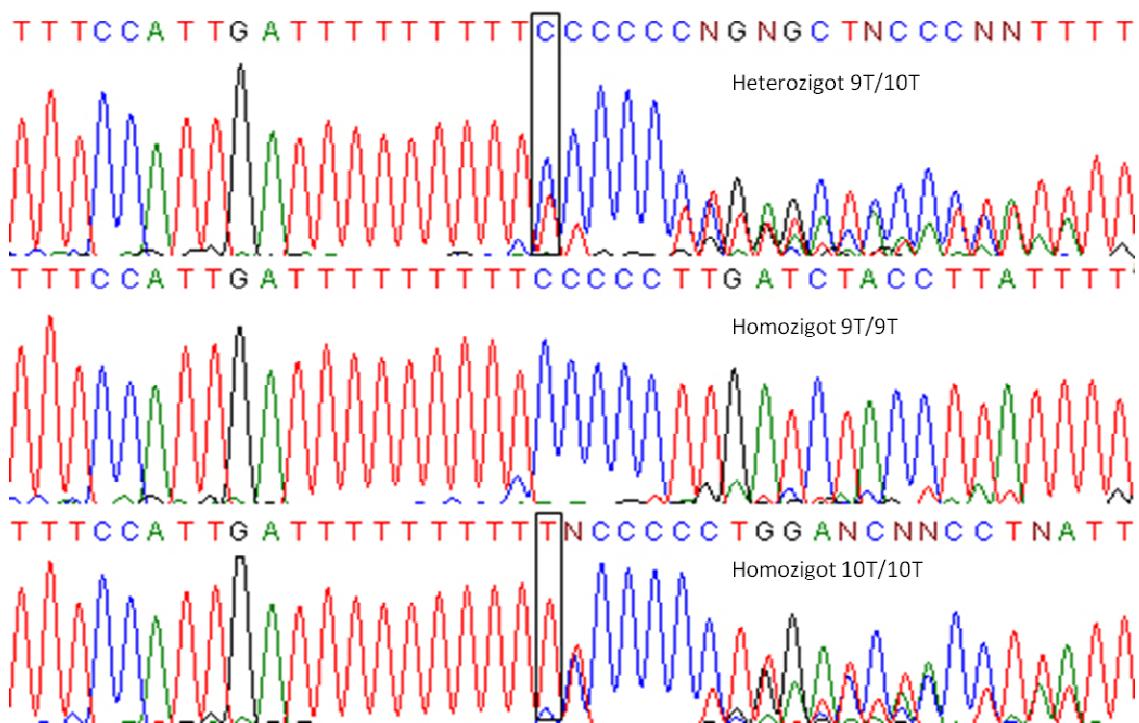
Večino SNP smo genotipizirali tako, da smo produkte PCR analizirali s kapilarno elektroforezo in na elektroferogramu poiskali prisotnost polimorfizmov (slike 11-21).



Slika 11: Prikaz polimorfizma int1 T>C v intronu 1.

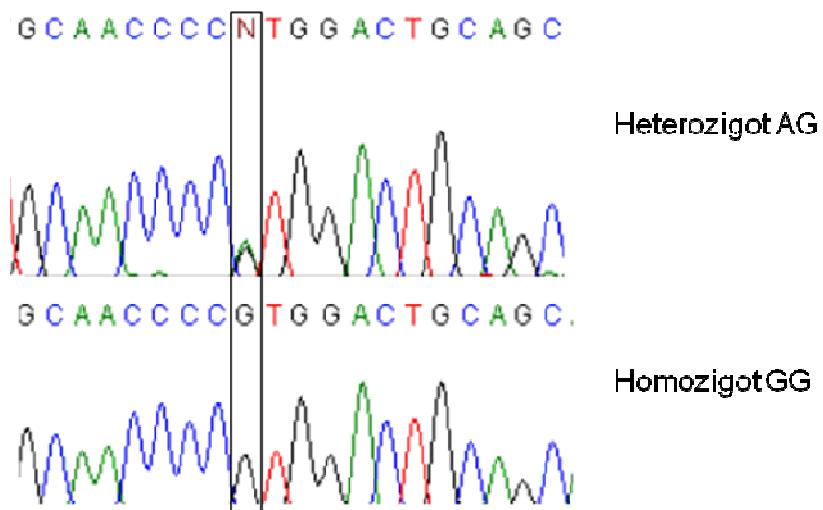


Slika 12: Prikaz polimorfnega mesta ex2 T>C v eksonu 2



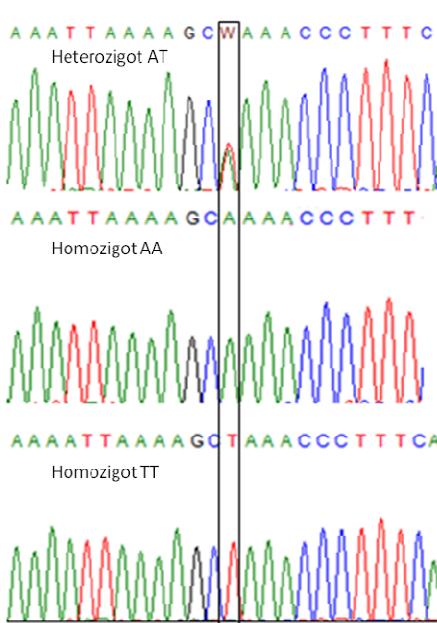
Slika 13: Prikaz polimorfnega mesta int2 indel *>T v intronu 2.

Slika 13 prikazuje polimorfizem indel T v intronu 2. Na zgornjem elektroferogramu je prikazan heterozigot 9T/10T, na srednjem homozigot 9T/9T in na spodnjem elektroferogramu homozigot 10T/10T. Ugotovili smo, da so SNP v intronu 1, eksonu 2 (sliki 11 in 12) ter indel v intronu 2 (slika 13) vezani.

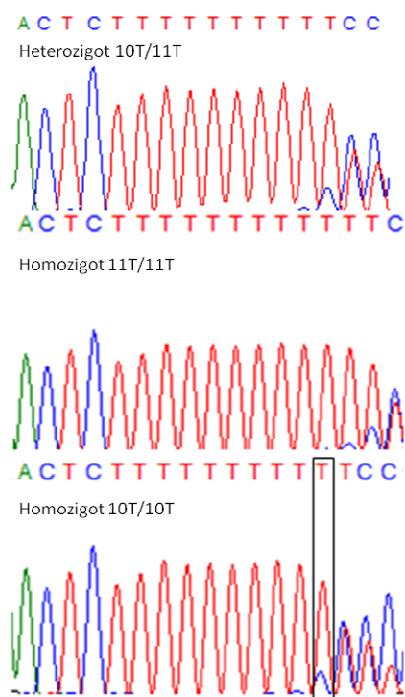


Slika 14: Prikaz polimorfnega mesta int2 A>G v intronu 2.

a.

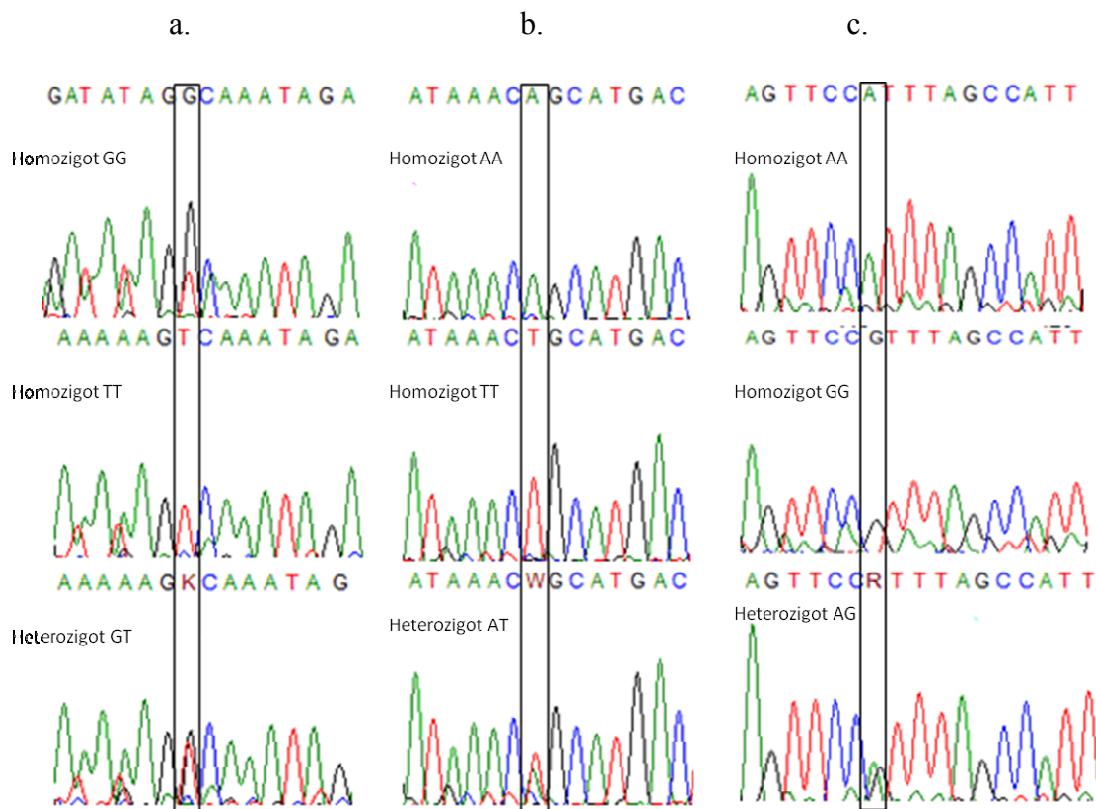


b.

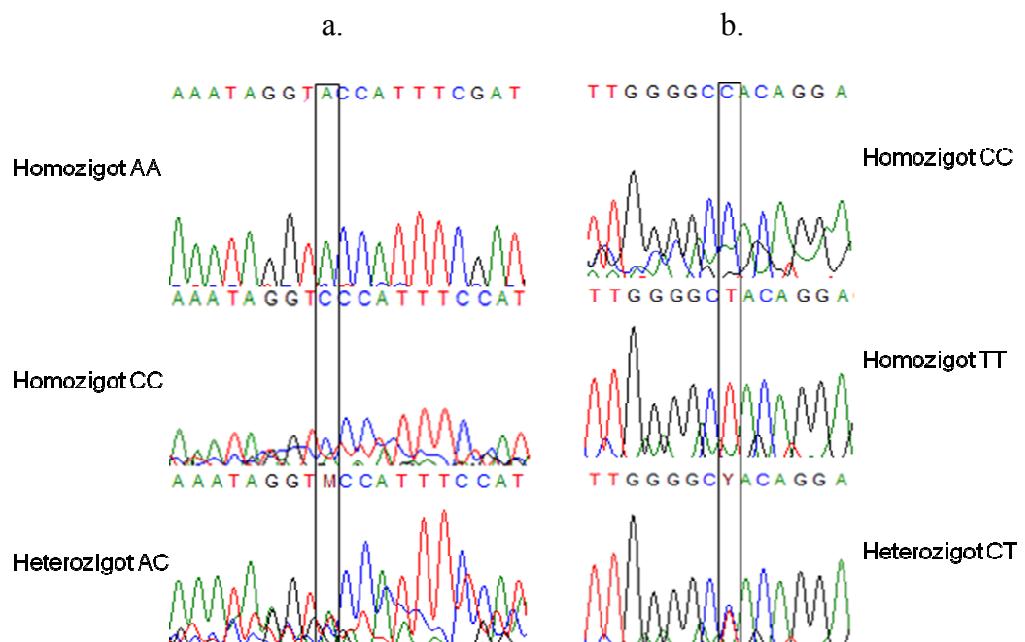


Slika 15: Prikaz dveh polimorfnih mest v intronu 6: a. rs41636320 A>T, b: indel (*>T).

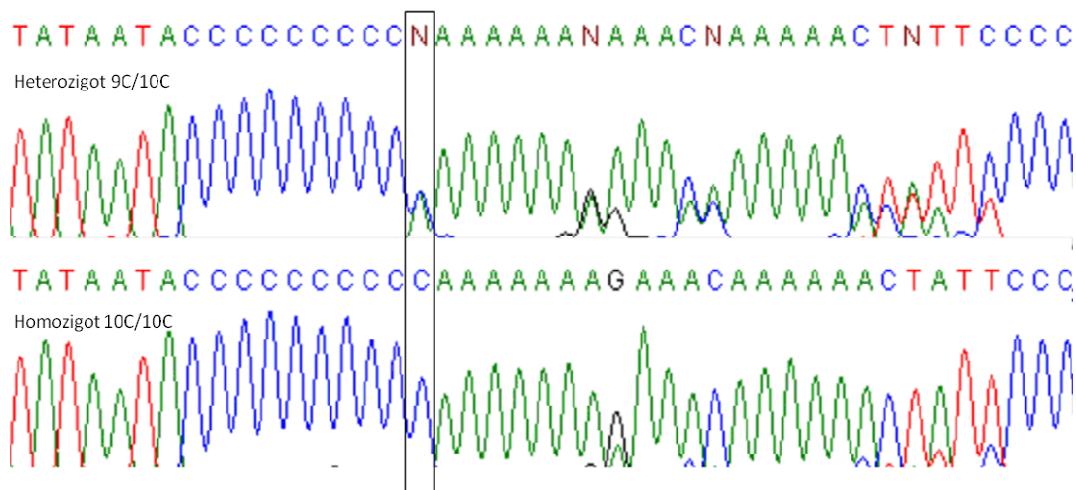
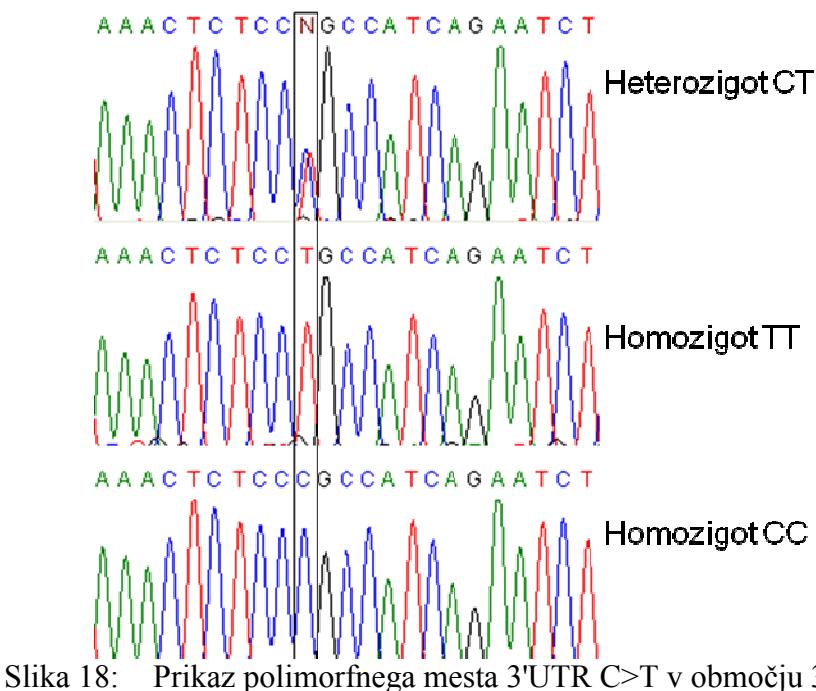
Na sliki 15b je prikazan polimorfizem indel v intronu 6. Na zgornjem elektroferogramu je prikazan heterozigot 10T/11T, v sredini je homozigot 11T/11T in spodaj homozigot 10T/10T.



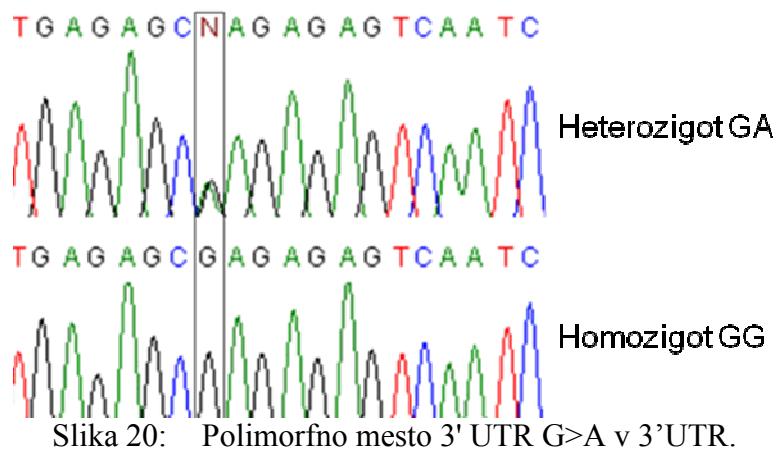
Slika 16: Prikaz treh polimorfnih mest v intronu 7 (a: int7 G>T, b: int7 A>T, c: int7 A>G).



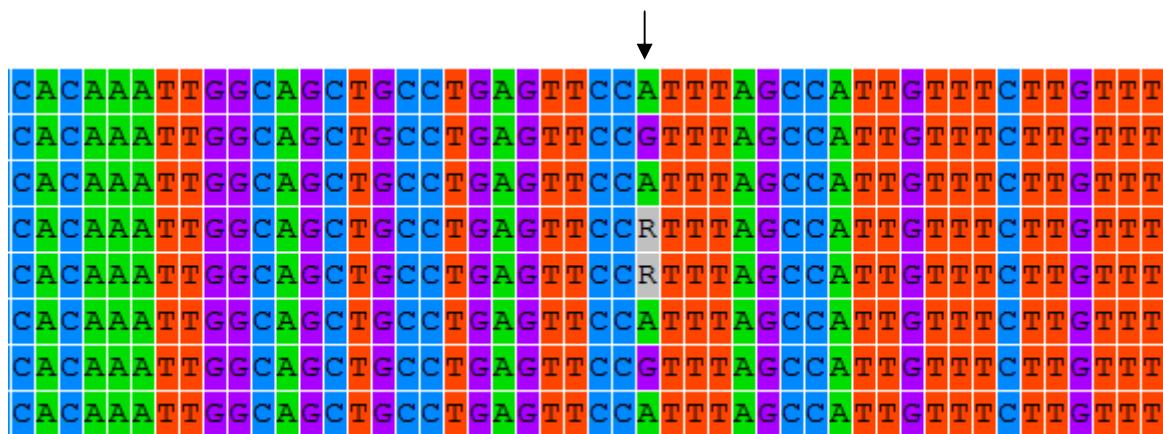
Slika 17: Prikaz dveh polimorfnih mest v intronu 8 (a: int8 A>C in b: int8 C>T).



Na sliki 19 je prikazan polimorfizem indel v 3'UTR. Na zgornjem elektroferogramu je prikazan heterozigot 9C/10C na spodnjem elektroferogramu pa homozigot 10C/10C. Obstaja tudi homozigot 9C/9C (SNP nismo genozipizirali pri potomcih).

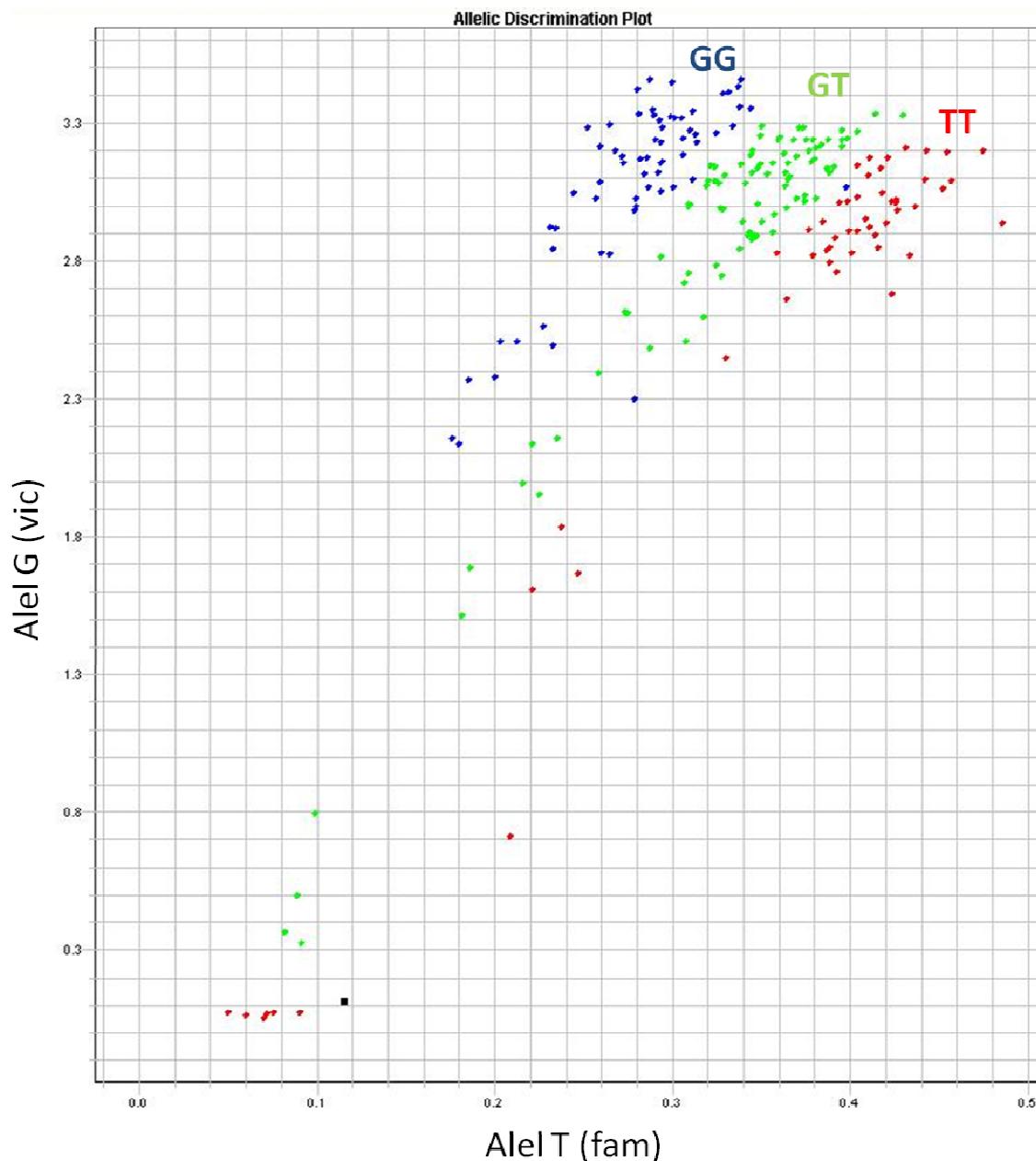


Analizo nukleotidnih zaporedij smo izvedli s pomočjo programa MEGA4, kakor je za primer SNP A>G (intron 7) prikazano na sliki 21.

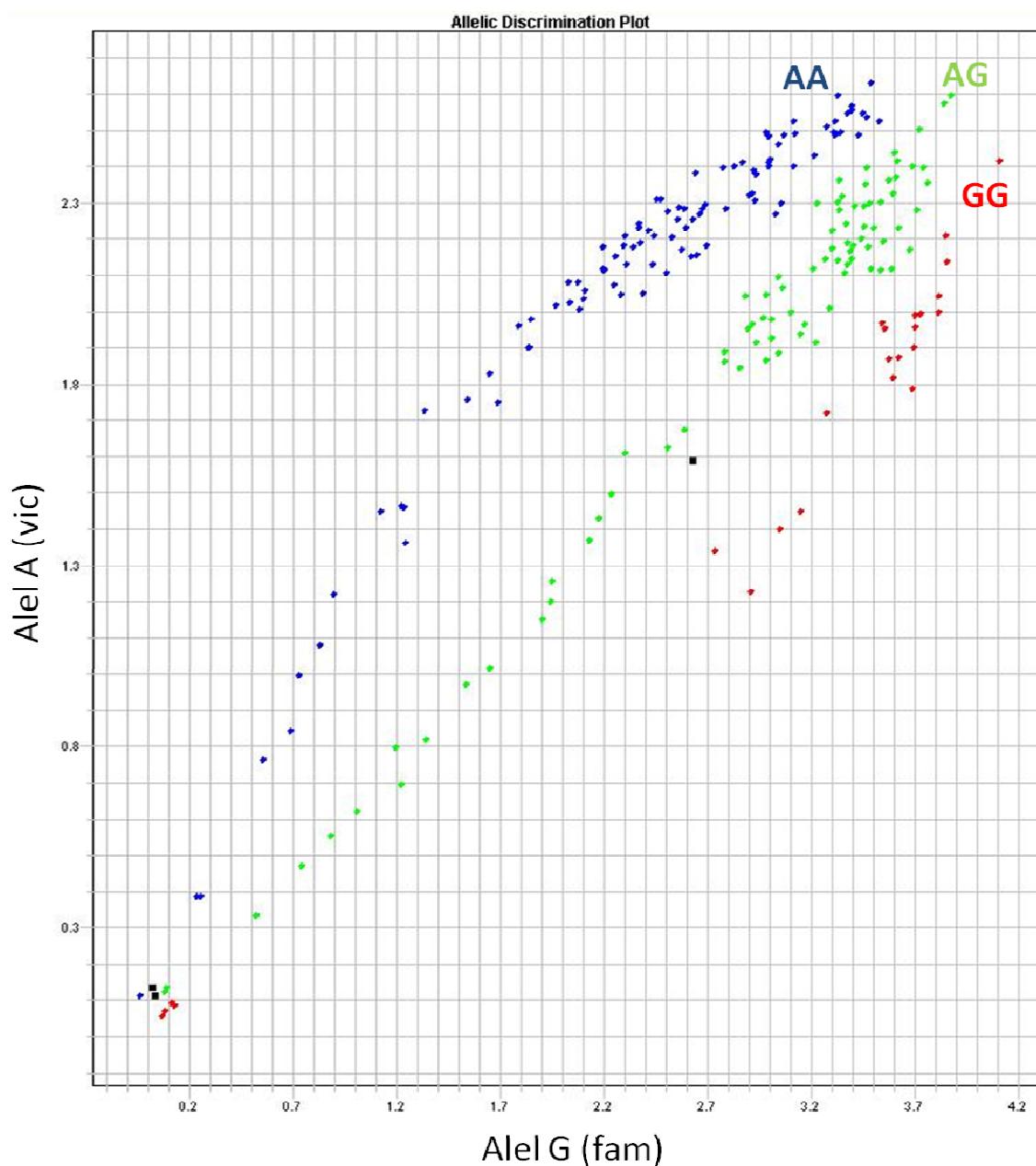


Slika 21: Slika prikazuje primer poravnave sekvenčne podatkovne baze s programom MEGA4. Na sliki so s puščico označeni homozigoti AA in GG, s črko R so označeni heterozigoti AG.

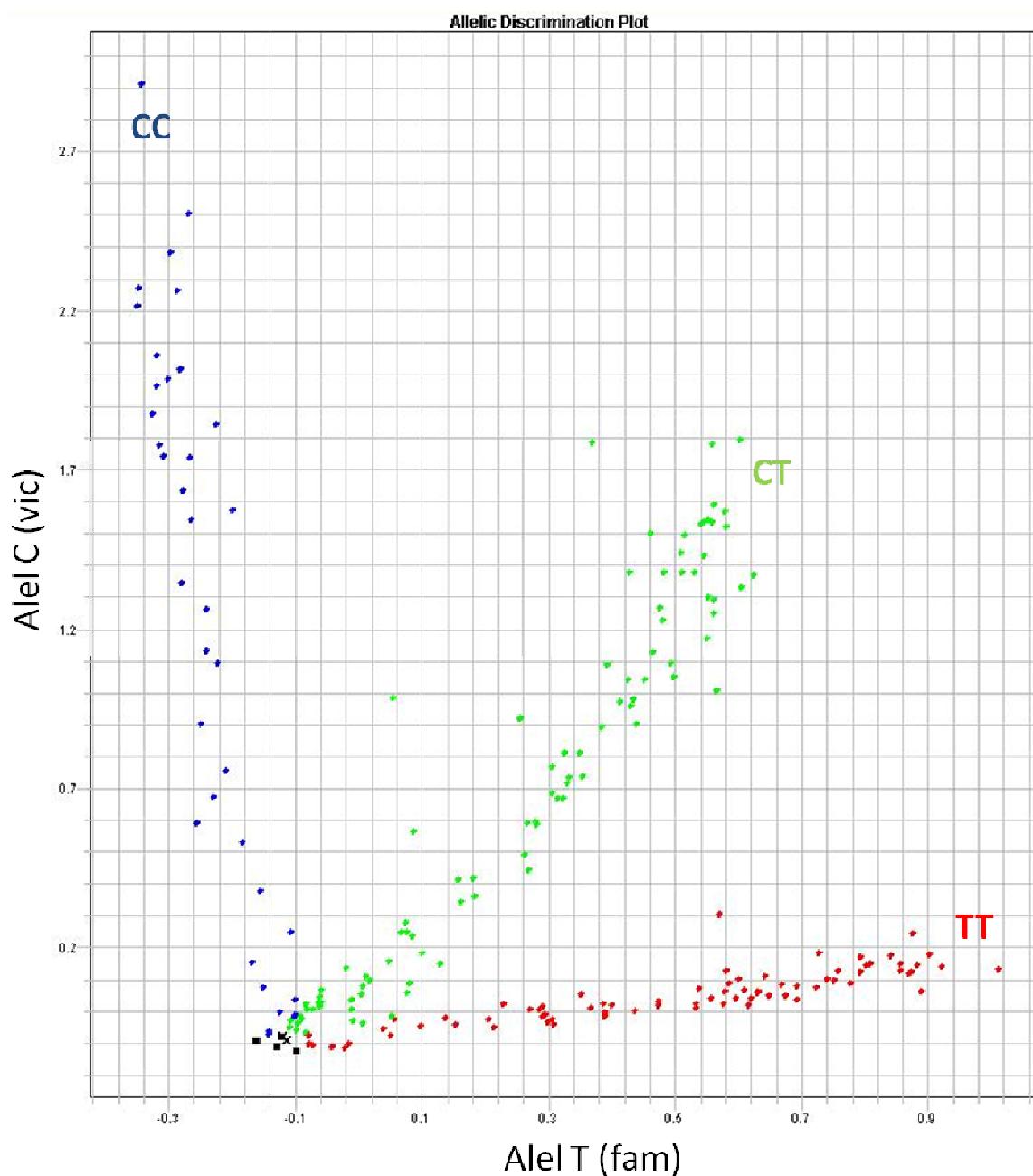
Tri SNP smo analizirali z metodo PCR v realnem času. Po obdelavi podatkov so na grafih z modro in rdečo barvo označeni homozigoti, z zeleno barvo pa heterozigoti (slike 22-24).



Slika 22: Prikaz odčitavanja rezultatov z grafa pri PCR v realnem času s TaqMan sondijo intronu 4 (rs41869462 G>T); os Y predstavlja alel G, ki je določen s sondijo označeno z barvilm VIC; os X predstavlja alel T, ki je določen s sondijo označeno z barvilm FAM. Modro obarvani simboli v grafu predstavljajo homozigote GG, rdeči simboli homozigote TT, vmes so heterozigoti GT, obarvani z zelenimi simboli.



Slika 23: Prikaz odčitavanja rezultatov z grafa pri PCR v realnem času s TaqMan sondijo v promotorju (rs41870726 A>G os Y predstavlja alel A, ki je določen s sondijo označeno z barvilm VIC; os X predstavlja alel G, ki je določen s sondijo označeno z barvilm FAM. Modro obarvani simboli v grafu predstavljajo homozigote AA, rdeči simboli homozigote GG, vmes so heterozigoti AG, obarvani z zelenimi simboli.



Slika 24: Prikaz odčitavanja rezultatov z grafa pri PCR v realnem času s TaqMan sondom v 3'UTR (3'UTR C>T), os Y predstavlja alel C, ki je določen s sondom označeno z barvilom VIC; os X predstavlja alel T, ki je določen s sondom označeno z barvilom FAM. Modro obarvani simboli v grafu predstavljajo homozigote CC, rdeči simboli homozigote TT, vmes so heterozigoti CT, obarvani z zelenimi simboli.

4.3 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE

4.3.1 Pregled osnovne statistike

Preglednica 10 prikazuje izračune nekaterih osnovnih statističnih parametrov in stopnjo heterozigotnosti za posamezne SNP pri potomcih. SNP, ki je kazal največjo stopnjo heterozigotnosti se nahaja v intronu 2 (int2 indel *>T). Vrednost heterozigotnosti le-tega SNP je 52,05. Frekvence tega SNP so sledeče: frekvanca homozigota 9T/9T je 32, frekvanca homozigota 10T/10T je 50, frekvanca heterozigota 9T/10T pa je 89. Najnižjo stopnjo heterozigotnosti je imel SNP int8 A>C v intornu 8 (njegova heterozigotnost je 7,6). Najvišjo frekvenco ima homozigot AA, ki pripada SNP int8 A>C (v intornu 8), najnižjo frekvenco pa ima homozigot TT, to je 6,43, ki pripada SNP rs41636320 A>T v intonu 6. Heterozigot z najvišjo frekvenco (89) pa sta 9T/10T (SNP int2 indel */T v intornu 2) in CT (SNP ex2 T>C v eksonu 2).

Preglednica 10: Prikaz frekvenc in deleža SNP pri potomcih ter stopnja heterozigotnosti posameznih označevalcev SNP.

SNP		Frekvanca	Delež (%)	Stopnja heterozigotnosti (H)
rs41870726 A>G Promotor	AA	17	9,94	38,01
	AG	65	38,01	
	GG	89	52,05	
int1 T>C Intron 1	CC	46	26,90	50,88
	CT	87	50,88	
	TT	38	22,22	
ex2 T>C Exon 2	CC	52	30,41	52,02
	CT	89	52,05	
	TT	30	17,54	
int2 indel *>T Intron 2	9T/9T	32	18,71	52,05
	9T/10T	89	52,05	
	10T/10T	50	29,24	
rs41636320 A>T Intron 6	AA	109	63,74	29,82
	TA	51	29,82	
	TT	11	6,43	
int6 indel *>T Intron 6	10T/10T	65	38,01	19,88
	10T/11T	34	19,88	
	11T/11T	72	42,11	
int7 T>G Intron 7	GG	75	82,42	9,89
	GT	9	9,89	
	TT	7	7,69	
int7 A>T Intron 7	AA	15	16,48	32,97
	AT	30	32,97	
	TT	46	50,55	
int7 G>A Intron 7	AA	62	68,13	23,08
	GA	21	23,08	
	GG	8	8,79	
int8 A>C Intron 8	AA	122	71,35	7,60
	AC	13	7,60	
	CC	36	21,05	
int8 C>T Intron 8	CC	100	58,48	21,64
	CT	37	21,64	
	TT	34	19,88	
3'UTR C>T 3'UTR	CC	77	45,03	38,60
	CT	66	38,60	
	TT	28	16,37	

Preglednica 11 prikazuje izračune osnovne statistike za posamezne SNP pri očetih. V preglednici so SNP poimenovani, navedena je njihova genomska lokacija. Razvidno je, da ima heterozigot indel (SNP indel *>C) v območju 3'UTR najvišjo frekvenco med vsemi SNP, najmanjšo pa heterozigot AC (SNP A>C) v intronu 8. Homozigot z najvišjo frekvenco pa je CC (SNP C>T) v intronu 8, najnižjo pa širje homozigoti: AA (SNP rs41870726 A>G) v promotorju, TT (SNP rs41636320 A>T) v intronu 6, GG (SNP A>G) v intronu 7 in CC (SNP indel *>C) v 3'UTR.

Preglednica 11: Prikaz frekvenc SNP pri očetih

SNP		Frekvenca	Delež (%)	Stopnja heterozigotnosti (H)
rs41870726 A>G	AA	2	6,45	54,84
	AG	17	54,84	
	GG	12	38,71	
rs41636320 A>T	AA	21	67,74	25,81
	TA	8	25,81	
	TT	2	6,45	
int6 indel *>T	10T/10T	8	25,81	48,39
	10T/11T	15	48,39	
	11T/11T	8	25,81	
int7 T>G	GG	18	58,06	29,03
	GT	9	29,03	
	TT	4	12,90	
int7 A>T	AA	3	9,68	38,71
	AT	12	38,71	
	TT	16	51,61	
int7 G>A	AA	19	61,29	32,26
	GA	10	32,26	
	GG	2	6,45	
int8 A>C	AA	7	22,58	9,68
	AC	3	9,68	
	CC	21	67,74	
int8 C>T	CC	23	74,19	12,90
	CT	4	12,90	
	TT	4	12,90	
3'UTR C>T	CC	2	6,45	80,65
	CT	25	80,65	
	TT	4	12,90	

Za SNP int1 T>C (intron 1), ex2 T>C (ekson 2) in int2 indel *>T (intron 2) pri očetih nimamo podatkov.

V preglednici 12 so prikazane P-vrednosti za dva označevalca SNP izračunane z izbranim modelom. Kot je razvidno je imel SNP rs41636320 A>T P-vrednost 0,0127. To pomeni, da ima ta SNP statistično značilen vpliv na delež loja in s tem na lastnost nalaganja maščevja. Poleg tega vpliva so bili statistično značilni še fiksni vplivi (sezona, masa) ter vpliv očeta.

Preglednica 12: Prikaz P-vrednosti in stopinj prostosti za statistično značilen SNP in SNP ki je kazal trend.

Vpliv	P - vrednost	Stopinje prostosti (DF)
Sezona	0,0157	6
SNP (rs41636320 A>T)	0,0127	2
Masa	0,0307	1
Oče	0,0127	128
Sezona	0,0158	6
SNP (int8 A>C)	0,0892	2
Masa	0,0280	1
Oče	0,0140	128

SNP v intronu 8 (int8 A>C) prav tako kaže relativno nizko P-vrednost (0,0892), kar kaže, da ima ta SNP trend vpliva na delež loja.. Kot je razvidno iz preglednice 11 ima ta SNP precej nizko informativnost (stopnja heterozigotnosti le 9,68), kar nakazuje, da senzitivnost statističnega test za ta SNP ni bila optimalna.

Ker je bil SNP rs41636320 A>T statistično značilen smo v preglednico 13 vključili rezultate programa MIXED (SAS User's Guide, 1990).

V prvem stolpcu preglednice 13 so navedeni očetje(N=33). V drugem stolpcu (ocena standardne napake) so vrednosti, ki nam povedo za koliko potomci določenega očeta odstopajo od srednje vrednosti populacije. Negativne vrednosti nakazujejo, da so potomci manj zamaščeni kot povprečje populacije, kjer pa ni predznaka oziroma je vrednost pozitivna, pa so potomci določenega očeta bolj zamaščeni kot je srednja vrednost populacije (Pr>t pomeni statistično značilnost). Pri tistih kjer je Pr>t vrednost nižja od 0,05 je razlika med potomci bika in med populacijo statistično značilna, kjer pa je vrednost višja od 0,05 pa ni statistične razlike med potomci bika in povprečjem populacije. 15 bikov ima potomce bolj zamaščene kot je srednja vrednost populacije ostali pa imajo manj zamaščene potomce. Razlika med potomci bika in med populacijo pa je statistično značilna le pri enem biku in sicer SI52380248, pri ostalih pa ne.

Preglednica 13: Rešitve za naključne vplive (Solution for random effects)

Oče	Ocena standardne napake	Pr>t
CZ13672558	-0,7897	0,3706
DE09362946	-0,5040	0,4509
FR25423118	-0,9941	0,1243
IT03100010	-0,0169	0,9805
SI02527044	0,8153	0,2519
SI02636977	0,8916	0,1452
SI02768186	-0,8912	0,1643
SI12409600	-0,1829	0,8355
SI12492769	0,1304	0,8418
SI12516225	1,0257	0,1193
SI12761463	0,5057	0,4279
SI22423560	0,3779	0,5655
SI22539500	-0,1146	0,8579
SI22554864	-0,0658	0,9230
SI22812661	-0,6796	0,3105
SI32492767	-0,9065	0,1842
SI32526741	-0,1480	0,8210
SI42492773	-1,1799	0,0859
SI42555021	-1,1078	0,0998
SI52380248	1,7017	0,0097
SI52421091	0,1244	0,8688
SI62492788	0,4106	0,5469
SI72400090	0,3993	0,5582
SI72425402	-0,1852	0,8065
SI72458220	-0,1500	0,8200
SI72474712	-0,7138	0,2727
SI82492779	-0,5415	0,4006
SI82624239	0,0366	0,9554
SI82780580	0,4954	0,4827
SI92422421	0,0629	0,9294
SI92492792	1,2207	0,0839
SI92555026	1,0816	0,1015
SI92767959	-0,1080	0,8647

Preglednica 14 prikazuje število opazovanj, srednje vrednosti za delež loja pri potomcih s standardnimi odkloni ter najmanjšo ter največjo zabeleženo vrednostjo (obseg). Opazimo, da je število opazovanj najmanjše pri homozigotu TT SNP int7 G>T, največje pa je pri homozigotu AA SNP int8 A>C. Standardni odklon se pri vseh SNP giblje med 1 in 2,7. Statistično značilni SNP rs41636320 A>T kaže zanimive alelne učinke, saj ima heterozigot manjšo srednjo vrednost od obeh homozigotov.

Preglednica 14: Statistika za povprečni delež loja pri potomcih po vplivih, ki so vključeni v model (po SNP).

		Št. opazovanj	Srednja vrednost	Standardni odklon	Minimum	Maksimum	P- vrednost
rs41870726 A>G	AA	17	12,16	2,18	9,03	16,46	
Promotor	AG	65	12,25	2,11	7,90	18,10	0,9387
	GG	89	12,50	2,25	7,17	21,04	
int1 T>C	CC	46	11,91	1,86	7,90	15,66	
Intron 1	CT	87	12,49	2,32	7,17	19,00	0,2490
	TT	38	12,65	2,19	8,62	21,04	
ex2 C>T	CC	52	12,41	2,19	8,25	21,04	
Exon 2	CT	89	12,49	2,31	7,17	19,00	0,4752
	TT	30	11,95	1,75	7,90	15,51	
int2 indel T>C	9T/9T	32	11,95	1,69	7,90	15,51	
Intron 2	9T/10T	89	12,69	2,31	7,17	19,00	0,4689
	10T/10T	50	12,42	2,23	8,25	21,04	
rs41636320 A>T	AA	109	12,55	2,09	8,41	21,04	
Intron 6	TA	51	11,83	2,24	7,17	16,46	0,0127
	TT	11	12,99	2,56	8,49	18,10	
Int6 indel *>T	10T/10T	65	12,34	2,40	7,90	21,04	
Intron 6	10T/11T	34	11,91	2,06	8,41	16,63	0,2714
	11T/11T	72	12,62	2,02	7,17	18,10	
Int7 T>G	GG	75	12,10	1,40	7,17	19,00	
Intron 7	GT	9	12,24	1,24	10,1	13,34	0,1072
	TT	7	13,66	2,31	9,83	16,63	
Int7 A>T	AA	15	12,46	2,11	9,29	16,63	
Intron 7	AT	30	12,49	2,68	7,17	19,00	0,6804
	TT	46	11,99	2,16	7,90	18,10	
Int7 G>A	AA	62	12,59	2,26	7,17	19,00	
Intron 7	GA	21	11,40	2,51	7,90	16,16	0,2224
	GG	8	11,64	1,78	8,49	13,71	
Int8 A>C	AA	122	12,33	2,21	7,17	21,04	
Intron 8	AC	13	11,77	2,19	8,62	16,42	0,0892
	CC	36	12,72	2,09	8,41	18,10	
Int8 C>T	CC	100	12,57	1,94	7,17	16,63	
Intron 8	CT	37	12,21	2,62	7,90	21,04	0,2756
	TT	34	11,94	2,32	9,03	19,00	
3'UTR C>T	CC	77	12,33	2,04	8,02	18,10	
3'UTR	CT	66	12,18	2,29	7,17	21,04	0,1945
	TT	28	12,92	2,30	8,25	19,00	

Ker je bila sezona statistično značilen fiksni vpliv (glej preglednica 12) smo s programom UNIVARIATE Izračunali osnovne statistične parametre po posameznih sezонаh (preglednica 15). Največje zabeleženo število opazovanj v preglednici 15 je 31 v sezoni tri (meritve v januarju in februarju leta 2007) najmanj pa v sezoni 7. Navedeni so še podatki za srednjo vrednost, standardni odklon, minimum in maksimum. Najvišja srednja vrednost je bila izračunana za sezono 1 (meritve v letu 2006) najmanjša pa v sezoni 4 (meritve opravljene v juniju in juliju leta 2007).

Preglednica 15: Statistika za povprečni delež loja pri potomcih po vplivih, ki so vključeni v model (po sezонаh).

Sezona	Število opazovanj	Srednja vrednost	Standardni odklon	Minimum	Maksimum
1	22	13,22	1,53	9,65	16,42
2	13	11,84	1,79	9,86	15,63
3	31	12,00	2,60	7,17	16,16
4	29	11,79	2,25	8,41	18,10
5	30	12,40	2,37	8,02	19,00
6	30	13,15	2,34	9,42	21,04
7	16	11,84	1,36	9,03	14,10

Preglednica 16 prav tako vsebuje rezultate programa UNIVARIATE in sicer po očetih, kar bil prav tako statistično značilen vpliv (glej preglednica 12). Največje število zabeleženih opazovanj (sinov po očetu) je osem (bik SI0263697). Najmanjše pa ena in to kar pri dveh bikih z ušesnima številkama CZ13672558 in SI12409600. Tema bikoma pa zaradi pre malo podatkov nismo mogli izračunati standardnega odklona, minimuma in maksimuma. V poprečju ima v naši poskusni populaciji vsak oče zbrane fenotipske podatke pri ... sinovih (izračunajte poprečje stolpca 2). Najvišj poprečni delež loja so imel sinovi po očetu SI52380248 (14,72%, merjeno pri 6 sinovih), najnižji pa pri očetu CZ13672558 – pri slednjem pa je potrebno dodati, da je ta podatek le na osnovi enega sina.

Preglednica 16: Statistika za povprečni delež loja pri potomcih po vplivih, ki so vključeni v model (po očetih)

Oče	Število opazovanj	Srednja vrednost	Standardni odklon	Minimum	Maksimum
CZ13672558	1	9,65	/	/	/
DE09362946	5	11,77	1,82	9,63	14,37
FR25423118	6	11,77	1,33	9,29	12,73
IT03100010	5	12,40	1,32	11,00	13,99
SI02636977	4	13,48	0,79	12,88	14,62
SI02636977	8	13,99	2,24	10,39	16,46
SI02768186	6	11,07	1,30	9,46	13,39
SI12409600	1	12,29	/	/	/
SI12492769	6	12,56	0,60	11,71	13,34
SI12516225	6	14,43	1,29	12,45	16,16
SI12761463	6	12,95	1,54	10,84	16,84
SI22423560	6	12,86	2,39	8,80	15,66
SI22539500	6	11,97	2,41	9,51	14,79
SI22554864	5	12,28	0,83	11,34	13,25
SI22812661	6	10,85	1,97	9,03	14,10
SI32492767	5	10,72	1,91	8,41	13,22
SI32526741	6	11,74	2,79	8,25	15,51
SI42492773	5	10,07	1,27	8,49	12,02
SI42555021	5	10,65	1,77	8,02	12,22
SI52380248	6	14,72	3,84	9,33	19,00
SI52421091	3	13,23	0,65	12,75	13,98
SI62492788	6	13,63	0,65	12,75	13,98
SI72400090	5	13,04	2,32	10,44	16,42

se nadaljuje

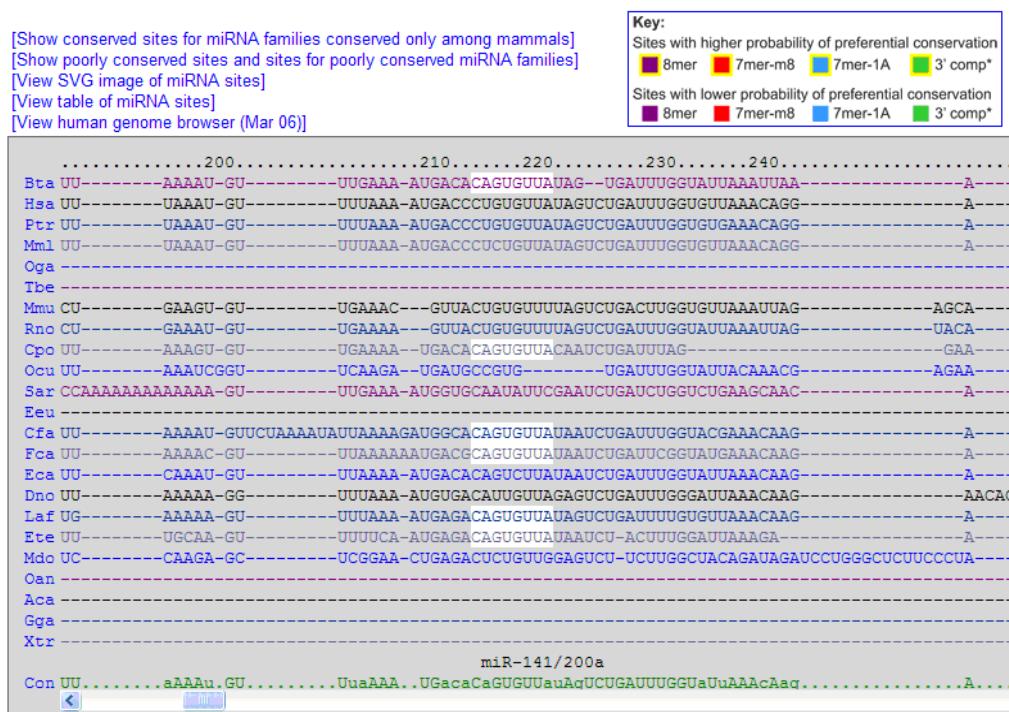
nadaljevanje

Oče	Število opazovanj	Srednja vrednost	Standardni odklon	Minimum	Maksimum
SI72425402	3	11,73	2,14	9,27	13,11
SI72458220	6	12,31	1,84	8,56	13,23
SI72474712	6	11,28	3,18	7,17	15,30
SI82492779	7	11,64	1,19	10,13	13,57
SI82624239	6	11,75	1,20	10,67	13,85
SI82780580	4	13,73	1,37	12,23	15,39
SI92422421	4	13,04	1,89	11,34	15,59
SI92492792	5	13,66	1,26	12,51	15,63
SI92555026	6	13,66	1,70	11,80	16,63
SI92767959	6	12,21	1,24	10,10	16,46

/ - ni podatkov

4.4 ANALIZA TARČNIH MEST ZA MIRNA

Želeli smo ugotoviti, če se v območju 3'UTR gena *FTO* nahajajo potencialna vezavna mesta za vezavo miRNA. V genu *FTO* smo z uporabo programa TargetScan našli potencialno tarčno mesto za dve miRNA; miR-141 in miR-200a, ki prepoznavata na istem mestu 3'UTR. To prepoznavno mesto je ohranjeno pri šestih živalskih vrstah (slika 25), Na sliki 25 je prikazano ohranjeno (prisotno pri več vrstah) in delno ohranjeno mesto za vezavo miRNA. S primerjavo nukleotidnih zaporedij smo ugotovili, da se v območju potencialnega vezavnega mesta za miR-141/200a niso nahajali SNP, ki smo jih mi identificirali v 3'UTR. (slika 27).



Slika 25: Analiza s programom TargetScan: tarčno mesto za miR-141/200a v genu *FTO* pri govedu je ohranjeno pri šestih živalskih vrstah.

Conserved

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site- type contri- bution	3' pairing contri- bution	local AU contri- bution
Position 215-221 of FTO 3' UTR bta-miR-200a	5' ... UGUUUGAAAAUGACACAGUGUA... 3' UUGUAGCAAUGGUCUGUCACAAU	8mer	-0.310	0.005	-0.126

Poorly conserved

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site- type contri- bution	3' pairing contri- bution	local AU contri- bution
Position 856-862 of FTO 3' UTR bta-miR-200a	5' ... CACACAGGAAGAGAGCAGUGUUG... 3' UUGUAGCAAUGGUCUGUCACAAU	7mer- m8	-0.161	0.020	-0.003

Slika 26: Analiza s programom TargetScan: ohranjeno (conserved) in delno ohranjeno (poorly conserved) mesto za vezavo bta-miR-200a na 3'UTR *FTO*.

Na sliki 27 so na nukleotidnem zaporedju gena *FTO* pri govedu označene lokacije SNP in vezavno mesto za miR-141/200a.

CCAGGTGCCAGTCTCGAATTGCCCGAACTTACCCGCTGATCAGAACGCCAGAACATGCCGGCCGTACTGGGAAAAGGGTGAT
 CCTTCGATGCCCTGCCATTGATCTCACAGAGATCGTTCTGAACTCAGAGGCTGCTCTGGAAACCAGGCCCTAGAGG
 CAGAGGCCAGTCCTCAGGTGGAGGGAGGAAGGCATTTCAGTTCTCTCCAACCCCTGCGTGGGCTTAGGCAAGGG
 CGGTATGGGTAGACTTGGCTTGAGATTGAGAAACTGTTGAGATGAGATAGAGAACATGGCCTGGAGATTGTTCCAGTG
 GGAACAATTAGGGAGTGGAACCCATGAAGATTAAAATGTTGAAATGACACAGTGTTA TAGTGATTGGTATTAAATTA
 AAAATACCCAAAAATAATAACCCCCCCCCC>CAAAAAAAGAACAAAAACTATTCCCCTTGAGATTAAATGCA
 AGCTATTCCACTCCTGAGGCCCTGGGGAGTGACCAGGGTAACCTGCCCTTGGCAGAACCTAACCTACTTGCTTTCCC
 AAGCCTTGCAGAGTCCCTACAGGGGATCTCCAGTCATGGAGGAGAACATCAAATTAGAGACGTTAGCCCATTTC
 TCAACACATCCTCAGAGTCTGTGGTCCAATATGGTAGCCACTAGGTAGATGGGCTTCTACCATTTAAATTCCATT
 AATTGTAATTAAAATTCAGTTCTICAGTGATGAGCCACATTTCAAGTGCTTAGTAGGCCAGGTGCGTAGAGACTAC
 TGTGTTGGACACAGAACGTTTCATTTGTAGAAAGCCCTCTAGACGATACTCTGTCAAAAGTTGAGAGCG>AAGA
 GAGTCATCTCCAGTTCTGTAGCTGCTCTCCCCACCTGCAAATAATGAGAACAGAACATGCCCTGGAAAGTAG
 CCTCTTCCCTCTCTAAGGCAGCAAGGTTGTAGGCCCTGACTCTGCACACAGGAAGAGAGCAGTGTGAAGATTAAA
 ATAAAATCTGACATCTGTCTTAGGAAGTCCCCCTGATCTAATGAAAGAGAACAAACTCTATTACATTGCTCTGGATT
 TAACCAACACACTACATATTGTTCTCTTAATTCCCCCATTCACACATAAGGCTAGAATTGAGGCTTGAAGAACCTA
 GTGCCCATCCTGGTGTGCTGGAGCACCAAGAGAACATGAGAACAGGTTAGAACATTGGGCTTGGTTCTGAGTCAG
 ATGCAAATGCCACTGGCTGATCTTGAGTGTGACTGTGCCCTGGTTCTCATCTGATAATGGGATACTACAGGC
 ACACTGATTCCAAGGTGAAGATGAAATGAAATAATCTAGTCCAGATTAGAACATCTGGTACGTAGATAAACACG
 CAGCAAATATTAGAAAATATTATATCAGTAAGGCTGACCTGCTGTAGGCATTTTCCCTCCCTCCTCAATCTGGTGC
 CAGTTGCTCATGATGCCATGACCCACCTCTGCTTCGGGCTGGC>GTTCACCCATGGTGGCCCCAGAAATCAC
 AAGATTAGTCAGCCCTCTCCCCAGCCTGCTGCTTCTCTGTCATCTGCAGTATCGGGAAAGCCGAGGGCTTTCACC
 CATTCAAGGGTACCTGAGAACTAAACTCTCC>TGCCATCAGAACATCTACGGGTTCAAGGTTGGCTCATTCTATAG
 AGTTTACCTCAGAGAGATCACATCACACAAGGCAGATGGGTTTCACCATCTGAGACTCTCAAATCTTAGATGAGTCC
 CTGATGCCCTTAAGCCTCAGTCTCTCATCAGTAAAGATGAAGTGTCTCCCTTACGGTTGGGGAAATGATGAAATGAA
 ATCATGGAGGCAGGGTGTGAGGGCAGCCTGGGACCATATGCCCTGTTTATTTCACCCCCCAGAACATGTTGTCCT
 TGTCTAGTTCATGAGGAGGCCAGTATTAAAAATGAAAGATTCTATATAACATAAAAGTTGTTGCGTCTCTTAAATTC
 AGAGCACCCAGCAGCCTCCATCCTGACATGGCAGAGAGCTAGGTAGCATCTCTAGGTGGGGCTGAACCCCTCCATGGC
 CGCCGTCACTCCCAGTTACCATTTATGTGAATCTGACCATCTTACCCCTCACGTCAAGCACCTGCTGCTGCACCCGTA
 GAGTAGAAATAATAAACGTTGCGTCTACCCCATATGTGTATTACTATCCAGCTATTGTTGAGACTGCTGTA
 CTAATATGCCATGTACATCGTAAACACGCATAAACAAATAATTGAAAGGATGAGATAAGAAACCCAGAGAGTGC
CTG

Slika 27: Nukleotidno zaporedje območja 3'UTR gena *FTO*. Modra, rumena in vijolična barva ponazarjajo zaporedja treh parov začetnih oligonukleotidov (rumena FTO-UTR3a, vijolična FTO-UTR3b in modra FTO-UTR3c), rdeča barva označuje mesto SNP, temno zeleni barvi označuje prepoznavno mesto za bta-miR-141/200a **[CAGTGTTA]**.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Pri človeku je bilo do sedaj narejenih veliko raziskav na področju debelosti, saj le-ta predstavlja velik zdravstveni problem. Pred kratkim je bilo z genomskimi študijami SNP pri ljudeh odkrito, da gen *FTO* pomembno uravnava raven maščevja v telesu. Pri živalskih vrstah so do sedaj naredili raziskave vpliva gena *FTO* pri miših (referenca), štiri raziskave pa govorijo o učinku gena *FTO* pri nekaterih pasmah prašičev (navedi reference). Do sedaj še v nobeni raziskavi niso analizirali vpliva gena *FTO* na nalaganje maščob pri govedu. Ker je za govedo pomembno odkrivanje genetskih označevalcev, ki bi jih lahko uporabili za MAS, smo se odločili, da analiziramo genetsko variabilnost gena *FTO* v slovenski pasmi lisastega goveda. V našem primeru smo imeli vzorce bikov (sperma) in njihovih potomcev (mišice) lisaste pasme.

Ko smo pričeli z raziskavo, gen *FTO* še ni bil anotiran. Meje med introni in eksoni smo določili tako, da smo primerjali celotno sekvenco gena *FTO* pri govedu (NCBI #: NC_007316.2; BTA18, *whole genome shotgun sequence*) z mRNA gena *FTO* pri človeku (NCBI #: NG_012969), saj je bila sekvenca le-tega popolnoma znana. S to primerjavo smo lahko določili meje med eksoni in introni in poiskali območja promotorja, 5'UTR in 3'UTR. Na tem zaporedju smo določili prvi set začetnih oligonukleotidov.

Med potekom diplomskega dela pa je bila objavljena sekvenca gena *FTO* pri govedu. Sekvenco gena *FTO* smo pridobili iz podatkovne zbirke Ensembl (Ensembl #: NP_001091611), v katerem je bil naveden tudi SNP v območju promotorja. V bazi NCBI pa je bilo kmalu za tem objavljenih še dodatnih osem SNP.

Z informacijami v podatkovnih zbirkah smo tako pridobili devet SNP, ostale pa smo določili z molekularno-genetskimi metodami. S sekvenciranjem in s podatki iz zbirk NCBI in Ensembl smo skupno identificirali 23 SNP v genu *FTO*, od tega smo jih z uporabo treh različnih metod (sekvenciranje, PCR-RFLP, TaqMan) genotipizirali 12. Koristno je rezultate genotipizacije preveriti še z eno metodo, saj lahko tako zagotovimo točnost rezultatov. V naši raziskavi smo z dvema metodama preverili dva SNP in sicer: rs41870726A>G in 3'UTR C>T.

V naši raziskavi smo potrdili hipotezo, da gen *FTO* vpliva na delež loja in s tem na lastnosti zamaščevanja, saj je statistična obdelava podatkov pokazala, da je rs41636320 A>T, ki se nahaja v intronu 6, povezan z deležem loja ($P=0,0127$). Ta SNP kaže tudi nekonvencionalne alelne učinke, saj so imeli heterozigoti nižjo srednjo vrednost od obeh homozigotov. To v genetiki razlagamo kot naddominanco (v našem primeru bolje poddominanco), ki je bila pri domačih živalih že dokazana za nekatere mutacije z velikimi učinki (npr. mutacija Inverdale ali Calipyge pri ovcah).

Drugi SNP (C>T) v intronu 8, pa kaže trend statistične značilnosti ($P=0,0892$) in bi bilo potrebno ta SNP preveriti v nadalnjih analizah na večjem vzorcu. Poleg tega je imel ta SNP precej nizko informativnost (stopnja heterozigotnosti le 9,68). V prihodnje bi veljalo v območju okrog tega SNPja poiskati bolj informativen SNP in ponoviti analizo, kar bo gotovo povišalo občutljivost statističnega testa.

Ker je bilo do sedaj dokazano pri ljudeh in prašičih ter v naši raziskavi tudi pri govedu, da ima gen *FTO* vpliv na debelost in nalaganje maščob, bi bilo smiselno podobne raziskave izvesti tudi pri drugih vrstah živali, predvsem pri vrstah, ki jih redimo za meso, saj se potrošniki vse bolj zavedajo kako pomembna je ravno prav mastna hrana in posledično le-to tudi zahtevajo v večjih količinah.

V bazi podatkov NCBI je navedenih devet SNP v genu *FTO* pri kokoši (*Gallus gallus*), kar dokazuje, da je ta gen razvojno in evolucijsko pomemben, saj se je obdržal pri številnih živalskih vrstah. Iz tega razloga bi ga bilo potrebno še bolj proučiti in raziskati njegove vplive tudi pri tej vrsti domačih živali.

V 3'UTR smo našli potencialno vezavno mesto za miRNA, vendar pa se nobeden izmed štirih identificiranih SNP ni nahajal znotraj vezavnega mesta za miRNA. Večina programov za iskanje tarčnih mest za miRNA je še vedno usmerjena v analizo zaporedij pri človeku in miši, z razvojem bioinformacijskih orodij pa bo v prihodnosti možno odkriti več potencialnih vezavnih mest v 3'UTR.

Clop in sod. (2006) so v svoji raziskavi identificirali mutacije na genih, ki so odgovorne za mišično hipertrofijo; dvojno omišičenost pri ovcah pasme teksel. Razlog za dvojno omišičenost goveda je mutacija gena miostatina (MSTN ali GDF8), ki se nahaja BTA2. Ugotovili so, da prihaja do nukleotidne zamenjave G>A v območju 3'UTR. Ta zamenjava se nahaja na tarčnem mestu za dve miRNA: mir-1 in mir-206. Za ti dve miRNA so ugotovili viskok izraženost v mišičnem tkivu. Dokazali so, da zaradi zamenjave (mutacije) pride do utišanja gena preko miRNA, kar povzroča mišično hipertrofijo pri ovcah teksel. Polimorfna miRNA tarčna mesta v 3'UTR tako predstavljo nov vir fenotipske variabilnosti.

V podatkovni zbirkri Patrocles smo preiskali, če se SNP nahajajo v 3UTR območju gena *FTO* pri govedu in drugih vrstah in ugotovili, da polimorfna tarčna mesta za miRNA trenutno še niso znana pri govedu, pri človeku pa sta v genu *FTO* znani že dve polimorfni mesti na mestih vezave miRNA.

V prihodnosti bi bilo potrebno odkriti še nove SNP, ki se nahajajo v genu *FTO* pri govedu in analizirati njihov vpliv na debelost in nalaganje maščob. S povečanjem gostote SNP lahko izvedemo tudi bolj občutljive statistične analize (analize več vezanih haplotipov skupaj). Kar lahko bistveno poveča senzitivnost detekcije statistično značilnega učinka določenega področja gena. Na podlagi znanih SNP bi lahko razvili genetske označevalce, ki bi jih uporabljali pri MAS. S to tehnologijo pa bi hitreje in bolje dosegali dobre rezultate pri selekciji in s tem povečali in izboljšali proizvodnjo v živinoreji. Potrebno bo tudi uradno poimenovati SNP saj so trenutno začasno označeni, ker celotna sekvenca gena *FTO* še ni znana zato tudi nismo mogli uradno poimenovati SNP.

6 POVZETEK

S podatkovnimi zbirkami smo pri govedu pridobili nukleotidno zaporedje gena *FTO* in z informacijami v podatkovnih zbirkah in z molekularno-genetskimi metodami v genu poiskali vse znane SNP. S sekvenciranjem in s podatki iz zbirk NCBI in Ensembl smo skupno identificirali 23 SNP v genu *FTO*, od tega smo jih genotipizirali 12.

Potrdili smo hipotezo, da gen *FTO* vpliva na delež loja in s tem na lastnosti zamaščevanja; SNP rs41636320 A>T, ki se nahaja v intronu 6, je bil statistično pomembno povezan z deležem loja ($P=0,0127$). Drugi SNP (C>T) v intronu 8 pa kaže trend statistične značilnosti ($P=0,0892$) in bi bilo potrebno ta SNP preveriti v nadaljnjih analizah na večjem vzorcu.

V 3'UTR gena *FTO* smo našli potencialno vezavno mesto za miRNA, ki je ohranljeno pri šestih živalskih vrstah. Z razvojem novih bioinformacijskih orodij za iskanje tarčnih mest za miRNA pri govedu bo v prihodnosti možno ugotoviti, če se kateri od SNP nahaja v vezavnem mestih za miRNA.

Na podlagi znanih SNP bi lahko razvili genetske označevalce, ki bi jih uporabljali pri MAS. S to tehnologijo pa bi hitreje in bolje dosegali dobre rezultate pri selekciji in s tem najhitreje prišli do najprimernejših genotipov.

7 VIRI

- Anselme I., Laclef C., Lanaud M., Ruther U., Schneider-Maunoury S. 2007. Defects in brain patterning and head morphogenesis in the mouse mutant Fuesd toes. *Developmental Biology*, 304: 208-220
- Asakura A., Komaki M., Rudnicki M. 2003. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic and adipogenic differentiation. *Differentiation*, 68: 245-253
- Bartel D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*, 116: 281-297
- Bergen R., Miller S.P., Wilton J.W., Mandell I.B. 2006. Genetic correlations between live yearling bull and steer carcass traits adjusted to different slaughter end points. 2. Carcass fat partitioning. *Journal of Animal Science*, 84: 558-566
- Blakemore A.I.F., Froguel P. 2008. Is obesity our genetic legacy? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93: 51-56
- Brackebusch S.A., McKeith F.K., Carr T.R., McLaren D.G. 1991. Relationship between longissimus composition and the composition of other major muscles of the beef carcass. *Journal of Animal Science*, 69: 631-640
- Bustin S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169-193
- Christensen K.L., Johnson D.D., West RL., Hargrove D.D., Marshall T.T., Rogers A.L. 1991. Factors influencing intermuscular fat and other measures of beef chuck composition. *Journal of Animal Science*, 69: 4461-4468
- Cianzio D.S., Topel D.G., Whitehurst G.B., Beitz D.C., Self H.L. 1985. Adipose tissue growth and cellularity: changes in bovine adipocyte size and number. *Journal of Animal science*, 60: 970-976
- Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibe 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: 813-818

Corthésy-Theulaz I., den Dunnen J.T., Ferré P., Geurts J.M.W., Müller M., van Belzen N., van Ommen B. 2005. Nutrigenomics: The impact of biomics technology on nutrition research. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 49: 355-365

Čepon M., Janžekovič M., Klopčič M., Potočnik K., Šmid J., Ostroč S. 2004. Rejski program za lisasto pasmo govedi v Sloveniji: dopolnjen v skladu s pripombami MKGP z dne, 5.1.2005. Mengeš, Govedorejska zadruga: 34

Dina C., Meyer D., Gallina S., Durand E., Körner A., Jacobson P., Carlsson L.M.S., Kiess W., Vatin V., Lecoeur C., Delplanque J., Vaillant E., Pattou F., Ruiz J., Weill J., Levy-Marchal C., Horber F., Potoczna N., Hercberg S., Le Stunff C., Bougnères P., Kovacs P., Marre M., Balkau B., Cauchi S., Chevre JC., Froguel P. 2007. Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature Genetics*, 39, 6: 724-726

Doran O., Moule S.K., Teye G.A., Whittington F.M., Hallett K.G., Wood J.G. 2006. A reduced protein diet induces stearoyl-CoA desaturase protein expression in pig muscle but not in subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formation. *British Journal of Nutrition*, 95: 609-617

Elliot R.M., Johnson I.T. 2007. Nutrigenomics approaches for obesity research. *Obesity Review*, 8 Suppl 1: 77-81

Fan B., Du Z-Q., Rothschild M.F. 2009. The fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene is associated with intramuscular fat content and growth rate in the pig. *Animal Biotechnology*, 20: 58-70

Fischer J., Koch L., Emmerling C., Vierkotten J., Peters T., Brüning J.C., Rüther U. 2009. Inactivation of the *FTO* gene protects from obesity. *Nature*, 458: 894-898

Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics*, 9: 102-14

Flisar T., Žemva M., Levart A., Kunej T., Malovrh Š., Kovač M. 2009. Vpliv gena *FTO* na lastnosti zamaščenosti in maščobnokislinsko sestavo pri pasmi krškopoljski prašič, Spremljanje proizvodnosti prašičev, VI. del. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Enota za prašičerejo, biometrijo in selekcijo: 91-100

Fontanesi L., Scotti E., Buttazzoni L., Dall'olio S., Bagnato A., Lo Fiego D.P., Davoli R., Russo V. 2010. Confirmed association between a single nucleotide polymorphism in the *FTO* gene and obesity-related traits in heavy pigs. *Molecular Biology Reports*, 37, 1: 461-466.

Fontanesi L., Scotti E., Buttazzoni L., Davoli R., Russo V. 2009. The porcine fat mass and obesity associated (*FTO*) gene is associated with fat deposition in Italian Duroc pigs. *Animal Genetics*. 40: 90-93

Frayling T.M., Timpson N.J., Weedon M.N., Zeggini E., Freathy R.M., Lindgren C.M., Perry J.R.B., Elliot K.S., Lango H., Rayner N.W., Shields B., Harries L.W., Barret J.C., Ellard S., Groves C.J., Knight B., Patch A.M., Ness A.R., Ebrahim S., Lawlor D.A., Ring S.M., Ben-Shlomo Y., Jarvelin M.R., Sovio U., Bennett A.J., Melzer D., Ferrucci L., Loos R.J.F., Barroso G.D., Wareham N.J., Karpe F., Owen K.R., Cardon L.R., Walker M., Hitman G.A., Palmer C.N.A., Doney A.S.F., Morris A.D., Smith G.D., The wellcome trust case control consortium, Hattersley A.T, McCarthy M.I. 2007. A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 316: 889-894

Fredriksson R., Hägglund M., Olszewski P.K., Stephansson O., Jacobsson J.A., Olszewska A.M., Levine A.S., Lindblom J., Schiöt H.B. 2008. The obesity gene, *FTO*, is of ancient origin up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology*, 149: 2062-2071

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

Gotz K., Briscoe J., Ruther U. 2005. Homozygous Ft embryos are affected in floor plate maintenance and ventral neural tube patterning. *Developmental Dynamics*, 233: 623-30

Guatelli J.C., Gingera TR., Richman D.D. 1989. Nucleic acid amplification in vitro: detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2: 217-226

Harper GS., Pethick D., Oddy V.H., Tume R.K., Barendse W.J., Hygate L. 2001. Biological determinants of intramuscular fat deposition in beef cattle: current mechanistic knowledge and sources of variation. *Meat and Livestock Australia project FLOT 208 Final report*. Sydney, Meat and Livestock Australia Ltd.

Harper G.S., Pethick D.W. 2004. How might marbling begin? *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44: 653-662

Heymer J., Huehn M., Ruther U.. 1997. The expression pattern of nodal and lefty in the mouse mutant Ft suggests a function in the establishment of handedness. Mechanisms of Development, 66: 5-11

Higashiyama Y., Abe H., Hayashi M., Hodate K. 2003. The comparison of plasma level and mRNA expression of leptin from Japanese Black steers and Holstein steers. Livestock Production Science, 81: 247-255

Hocquette J.F., Jurie C., Ueda Y., Boulesteix P., Bauchart D., Pethick D.W. 2003. The relationship between muscle metabolic pathways and marbling of beef. V: Progress in research on energy and protein metabolism. Souffrant W.B., Metges C.C. (Eds.), Wageningen, Netherlands, založnik Wageningen Pers: 513-516

Hood R.L., Allen C.E. 1973. Cellularity of bovine adipose tissue. Journal of Lipid Research 14: 605-610

Human genome project

http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faw/snps.shtml (10. dec. 2009)

Human genome variation society

<http://www.genomic.unimelb.edu.au/midi/mutnomen/recs.html> (12. dec. 2009)

Jiang Z., Michal J.J., Tobey DJ., Daniels TF., Rule D.C., MacNeil M. 2008. Significant associations of stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) gene with fat deposition and composition in skeletal muscle. International Journal of Biological Science, 4, 6: 345-351

Kawaguchi N., Xu X., Tajima R., Kronqvist P., Sundberg C., Loeschel F., Albrechsten R., Wewer U. 2002. ADAM 12 protease induces adipogenesis in transgenic mice. American Journal of Pathology, 160: 1895-1903

Kirkland J.L., Tchkonia T., Pirtskhalava T., Han J., Karagiannides I. 2002. Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? Experimental Gerontology, 37: 757-767

Kishikawa D., Hong Y.H., Roh S.G., Miyahara H., Nishimura Y., Tomimatsu A., Tsuzuki H., Gotoh C., Kuno M., Choi KC., Lee HG., Cho KK., Hidari H., Sasaki S. 2005. Identification of genes expressed differentially in subcutaneous and visceral fat of cattle, pig and mouse. Physiological Genomics, 21: 343-350

Kruglyak L., Nicherson D.A. 2001. Variation is the spice of life. Nature Genetics, 27: 234-236

Kutyavin I.V., Afonina I.A., Mills A., Gorn VV., Lukhtanov E.A., Belousov E.S., Singer M.J., Walburger D.K., Lokhov S.G., Gall A.A., Dempcy R., Reed M.W., Meyer R.B., Hedgpeth J. 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*, 28: 655–661

Lee H.J., Lee S.C., Kim K.W., Park J.G., Han I.K. 2000. Cellularity of adipose tissue obtained from different sex and growth stages of Hanwoo cattle and sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 13: 155-160

Leibel R.L., Edens N.K., Fried S.K. 1989. Physiological basis for the control of body fat distribution in humans. *Annual Review of Nutrition*, 9:417-443

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

Mutch D.M., Wahli W., Williamson G. 2005. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *The FASEB Journal*, 19: 1602-1616

National Center for Biotechnology Information.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/snps.html> (23. nov. 2009)

New England. BioLabs Inc.

<http://tools.neb.com/NEBCutter2/> (12. mar. 2009)

Nurnberg K., Wgner J., Ender K. 1998. Factor influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. *Livestock Production Science*, 56: 145-156

Peters T., Ausmeier K, Ruther U. 1999. Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mammalian Genome*, 10: 983-986

Pfuhl R., Bellman O., Hukn C., Teuscher E., Ender K., Wegner J. 2007. Beef versus dairy cattle: a comparison of feed conversion, carcass composition, and meat quality. *Archiv für Tierzucht-Archives of Animal Breeding*, 50: 59-70

Plasterk R.H. 2006. Micro R.N.A in animal development. *Cell*, 124: 877-881

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

SAS/STAT User's Guide. 1990. Carry, SAS Institute

Scollan N.D.N, Dhanoa M.S., Kim E.J., Dawson J.M., Butterly P.J. 2003. Effects of diet and stage of development on partitioning of nutrients between fat and lean deposition in steers. Animal Science, 76: 237-249

Scureti A., Sanna S., Chen W-M., Uda M., Albai G., Strait J., Najjar S., Nagaraja R., Orru M., Usala G., Dei M., Ali S., Maschio A., Busonero F., Mulas A., Ehret G.B., Fink A.A., Weder A.B., Cooper R.S., Galan P., Chakravarti A., Schlessinger D., Cao A., Lakatta E., Abecasis GR. 2007. Genome-wide association scan shows genetic variants in the *FTO* gene are associated with obesity-related traits. PloS Genet, 3: e115

Shouldiner A.R. 2008. Obesity and gene-environment-behavior interactions: recommendations for a way forward. Obesity, 16: 79-81

Single-nucleotide polymorphism, Wikipedia, The Free Encyclopedia
http://en.wikipedia.org/wiki/Single-nucleotide_polymorphism (10. avg. 2009)

Stratigopoulos G., Padilla S.L., LeDuc C.A., Watson E., Hattersley A., McCarthy M.I., Zelster L.M, Chung W.K., Leibel R.L. 2008. Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 194: 1185-1196

Tataurov A.V, You Y, Owczarzy R. 2008. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. Biophysical Chemistry, 133, 1-3: 66-70

The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine, Veterinary Sciences Tomorrow
http://www.vetscite.org/issue1/tools/leute_2_0800.htm (27. nov. 2009)

Tume R.K. 2004. The effects of environmental factors on fatty acid composition and the assessment of marbling in beef cattle: a review. Australian Journal of Experimental Agriculture, 44: 663-668

Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J., Parker R. 2006. Control of Translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes & Development, 20: 515-24

Van der Hoeven F., Schimmang T., Volkmann A., Matter M.G., Kyewsky B., Ruther U. 1994. Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (Ft). Development (The Company of Biologists Limited), 120: 2601-2607

Wada M.R., Inagawa-Ogashiwa M., Shimizu S., Yasumoto S., Hashimoto N. 2002.
Generation of different fates from multipotent muscle cells. Development (Cambridge, England), 129: 2987-2995

Žgur S., Čepon M. 2007. Fat tissue distribution between subcutaneous and intermuscular fat tissue in simmental and brown bulls. Poljoprivreda/Agriculture, 13, 1: 120-123

ZAHVALA

Za vodenje pri delu in pridobljeno znanje se zahvaljujem mentorju prof. dr. Simonu Horvatu in somentorici doc. dr. Tanji Kunej.

Za hiter pregled, komentarje in nasvete se zahvaljujem prof. dr. Petru Dovču.

Za vzorce in fenotipske podatke se zahvaljujem doc. dr. Silvestru Žgurju.

Za statistično obdelavo podatkov se zahvaljujem: prof. dr. Mileni Kovač in Martini Planinc.

Nenazadnje se zahvaljujem tudi sodelavcem genetskega laboratorija: dr. Andreju Razpetu, Ivanki Cizelj, Ani Zanjkovič in Daši Jevšinek Skok; družini in prijateljem za spodbudo.

PRILOGE

PRILOGA A

Koncentracija izolirane DNA

Merili smo koncentracijo DNA, izolirano iz mišic potomcev (označeni s številkami) in iz sperme očetov (označeni z imeni). V tabeli so navedene vse vrednosti absorpcije in razmerja med njimi, ki jih potrebujemo za ugotavljanje čistosti DNA.

Koncentracije DNA izolirane iz mišice in sperme

Vzorec	Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	A230	A260	A280	A260/A280	A260/A230
potomci						
138	90,5	0,205	0,181	0,146	1,240	0,883
148	166	0,414	0,332	0,287	1,157	0,802
158	117,0	0,273	0,234	0,204	1,147	0,857
160	100,5	0,181	0,201	0,143	1,406	1,110
166	94	0,188	0,188	0,143	1,315	1,000
170	38,5	0,065	0,077	0,042	1,833	1,785
172	150,5	0,325	0,301	0,269	1,119	0,926
180	36,5	0,059	0,073	0,041	1,780	1,237
190	61,5	0,155	0,123	0,092	1,337	0,794
195	68,5	0,184	0,137	0,098	1,398	0,745
očetje						
Azil	379	0,443	0,758	0,473	1,603	1,711
Hajduk	309,5	0,367	0,619	0,424	1,460	1,687
Hofer	278	0,458	0,556	0,473	1,175	1,214
Hupid	475	0,639	0,950	0,663	1,433	1,487
Manbi	514,5	0,707	1,029	0,785	1,311	1,455
Maner	320,5	0,315	0,641	0,431	1,487	2,035
Rogel	264	0,309	0,528	0,353	1,496	1,709
Zamorko	686	0,881	1,372	0,997	1,376	1,557
Zimbo	1180	2,175	2,361	2,104	1,122	1,086
Zlatko	168,5	0,179	0,337	0,221	1,525	1,883

PRILOGA B

P-vrednosti za vplive iz izbranega modela

Sezona	SNP (1-12)	Masa	Oče
0.0199	0.1945	0.0336	0.0186
0.0457	0.2490	0.0195	0.0182
0.0369	0.4752	0.0145	0.0198
0.0395	0.4689	0.0142	0.0196
0.0379	0.9387	0.0245	0.0194
0.0098	0.1072	0.0173	0.0502
0.0310	0.6804	0.0144	0.0448
0.0379	0.2224	0.0208	0.0624
0.0157	0.0127	0.0307	0.0127
0.0342	0.2714	0.0305	0.0166
0.0158	0.0892	0.0280	0.0140
0.0409	0.2756	0.0107	0.0188

Z rdečo barvo je označen statistično značilen SNP z odbeljeno pisavo pa je označen SNP kateri kaže trend statistične značilnosti.

PRILOGA C

Nukleotidno zaporedje gena *FTO* pri govedu.

Zaradi obsežnosti gena so prikazani deli nukleotidnega zaporedja z eksoni in območja gena, v katerih smo izbrali začetne nukleotide in identificirali SNP. Prva dva (GT) in zadnja dva nukleotida intronov (AG) sta označena z vijolično barvo. SNP so označeni z rdečo barvo. Zelena barva pa označuje eksone (sledijo si v zaporedju od prvega do devetega). Rumena barva označuje začetne oligonukleotide.

Z rdečo barvo je označen SNP rs41870726 iz baze Ensembl.

...TGTCTCGTGCTGGCTGCTTCACGTGAGCAGAACGCCAAGGCCTCTCCAGGAGGTAGAGCAGACCCCAC
GACCCCGGCCGTGCTAGAGGTAGAGGGCTGGCTACCTGCACCCCTACTCCCCGGGTGACTCACCGCCAC
TCTCCCAGCGCTAGCTACCGTTGCTATAGGCCGACGGCTTGAGGCAGCCGGCGAGAGGAGCACGGAA
AAACATGGCAGGCACCGTTGCCTCTGGATTGTAGTTCTTCGGGCCCTGCCAGCCGCTGCTGAGCA
GCAGACTACGCTGCCAGCTGCGGACCTGGAAATTCTCTAGCTTCCAACCCGAGGCACATTCCGGCCTT
ACCGCGGTGCACCCCTGGGAGTGGTAGTTCTCCTTCCGAGGGAGAATGGGCCAGGCAGGGAGCTGGACGCC
AAGAGAACTACATGGAGGAGGGCCAGGGCTAGGAATCTACGCG [A>G] TTAGTAGTGGCGAA~~GGCGC~~
~~TATAACGGCAGC~~**ATG****AAGCGGACCCCGACGGCCAGGAACGAGAGCGCAAGCTAAC**~~GT~~ATTTCGGGCTCACC
CAAGTCTGGGATCTTCTGCACTTGTAGCTGGGTCTGGGAACCGGAAGGGCTGGTTGGATGGCAAGCGGA
CCCACGGCTTAAGCGAAGGGGTTACAAGGCCCTGTCAGCAAGGGAGCCAGAGACTTGGGGCTTGAATAC
GTGCTGCTCGGGATGCAGGCCAGTCCTAGTCCCTAGTGGACCGACTCACATGAGAATTAAGACACCCATTCTGTCC
TGCTTCTGCACTTCATTCTGGTTAAGTTGTAGTTACCCCTGTCAGCTTACCGGACTCTAGACGCT
TGTGATCATATCAGTTGTGCTTCCTCTCGGAATGATTCTGTGGATTGAGATGGGTTAGGTGAGAAAAT
CTGTGCGATCAGATGTATGTATTGAAACAGTTGTCTGTGTTCTGTGCTTCCGCACAGCGGATGTAGAGTT
TAACTACAATACCGTTTCTACTTGGGGGTTACGCTGTAGCAGTTGTCAGGATGACAATAATAATT
GTTATGGAATTCTTTAGTATTATTACGCATCAGACTCTGCGGTTCCATAATATTATATTTCG
TATTCTTATCACAGCAGATCGCAGATAGCTATTACAGATGGAATATCAAGAGTCCTGTTTACAAATGAA
GACTTGAGGCTCAGAAGAATTGAGTGTCTCATTCCCCAAATCAAGTCCTATCAATTGTCTAAAATAT
TGGTAATCTCTCACCTTCCATCTCACCCACCTGGGACCGGGCTACCAATTACCTCCTCAATGGACTGTT
CAGTGATCTCCTATTGGCTATATTCACTCTGCATCCAATCACTCCTGGTCCCTTTGTCCCCCTTCC
ACAAAAGACACTCTCACACTGTAGTGTGAGCTTCAAAATGCAAATGCAATCATGCCCTTCTCT
TACCTCCTGTCAACCAACTGTTAAAAATCTTCATGGGATTCCCTGGTGGTCCAGTGGGCTCCTGAAAT
GACTTGAGTTGATCCCCAGTGGGAAACTAAGATCCTGCAAGCTGGTGGTGGCCAAAAAAAG
AAACTTCATGGCTTCTGATGCTTCTAGGATAAAAAGGAAACTTCACATGACCTACAGTGTGTTCCACAGTG
TAAACTCTACTTGCATCATCCACAGCCTCAATGGATGTGACCCCT...

Z rdečo barvo so označeni SNP, ki smo jih našli s sekvenciranjem, z rumeno barvo so označeni začetni oligonukleotidi (FTO-Ex2). V intronu 2 se nahaja indel SNP. Pojavljata se homozigota 9T/9T in 10T/10T ter heterozigot 9T/10T.

...TTGGAGGGTATTCTTTATTAGAAAAATAAGGCATTGTCAGCCTGGATGGAGGGGGTTGGAGGGAGAAT
GGATACATGTATGTGTGACTGAGCCCTTGCTGTTACCTGAAACTTCACATTGTTAATTGGCTG
TACC [T>C] CCAATGAAAATAAAAAGTAAAAAGAACATTGCTTATATTGAGTCTGTTATAAT
TTAGTCACCTATAATCATTATTTAAACAGAAACTGAGGCTTCTGAAGAGCTGAAGACACGTGGCTCCC
TACCTGACCCCCAAAGA [C>T] GATGAATTCTATCAGCAGGTAAAGGTCTTTAACATTGTCAATTCCATTG
A[TTTTTTTTTCCCCCTGATCTACCTATTGCTATGAAGCAACTGTGGTAGAGAGATTAAATGAGA
GGTTAAGGTCTGATTGGTCACCCATTGATTCACCCCCAGAACATATACTGTCCTGCGCAATGTTCTGCTGT
GAACCTAGTGCTTAGAATAGTGGACTGTCTTCTCCCCAACGTTCCATGTTTCCCTACTCCTCCC
TCTGCTTCTGTTCTGACGGAATCTTCTTGCACGGTCTTCTGCTTACCTGTTGCCAGATGACTAATTCTGAGGA
CTTCACTGAAACATCACCTCCTTGTGAACGTTCTTAACCTACCTCAAATGGAATTGATTGCATT
CGCCTGGTGCCTGTACCATATAACACAAGGGTCTGTGATTGACCCCTCACAGTGATTGAGTT
ATAGGATTCTGTCTCTCCCCTGAATTAGTCAGCACTTTCAAATACACTGGCAAACAAACT
CACTGTGGCAAAAAGGGAAATTATTGACTGACAACTTAGATGTCAAGGATAAGCACATGGCCAATCCAGTT
TCTCGAAAGATGTCATGGATCACTCTTCCCTGTTCTGGCTTCTGGTACT...

Spodnji SNP se nahajajo znotraj introna 2.

Z rdečo barvo je označen SNP iz baze NCBI: rs41869458.

...AGTTAGAACTGGACATGGAACAAACAGACTGGTCAAATAGGAAAGTACGTCAAGGCTGTATATTGTC
ACCCTGCTTCTTAACTTATATGCAAGAGTACATCATGAGAAACTCTGGGCTGGAGGAAGCACAGCTGGAATC
AAGATTCCGGGAGAAATGTCAATAACCTCAGATATGCAGATGACACCACCGTTATGGCAGAAAGTGAAGAAG
AACTAAAGAGCCTTGTGAAAGTGGAGAGTAAAAAGTTGGCTTAA [A>G] CTCATATTGAGA
AAACTAAAGATCATGGCATCCGGTCACATCACTCATGGCAAATAGATGGGGAAACAGTGGAAACGGTGTCA
CTTATTCTGGCTCCACATCACTGCAGATGGTATTGAGTCATGAAATTAAAAGATGCTTA...

Z rdečo barvo je označen SNP iz baze NCBI: rs41869459.

...TCTCTACATTGCAGGTGGATTCTTACTGCTGAGCCACTGGGAAGTCCATGAATTGTTACTTAATTAAA
CAAATGTAATTAGCCTGGCTTCCAAAGTGGCGCTAGTGGGAAAGAACCTGCCTGCCATGCAGGGACTTAA
GAGATACCAGTTGGTCCCTGGGATACGGGAAGATCCA [T>C] TGGAGAAGGGCACGGCAACCCACTCCAGTA
TTCTGCTGGAGAATCCCAGGACAGAGAACCTTGGCAGGCTACAGTCCATAGGGTCGCAAAGAGTCA
GACAGATTGAAGCGACTAACACTCATCGTTCTGGACAGAGTTAACAG...

Z rdečo barvo označen SNP iz NCBI baze: rs 41869460.

...GACTAATGAAGTTATTTAACACAGGGAAATTAAACTCTAAAGACCTGGAAATTACATAACCATATGA
GGATCACATATAAAACCTAACATTAACAAAAACACACTAAAAATATAACAATAATAATGACATGGAAAGTAT
TAAAAAAAGTTTTTCACTGGTAACCTTGTTCTTGCCTGGATC [A>G] CACGAGCTTCTTTCT
TTGGCCTCAAGAGGCCAGGACTTCAGTACTTCCCTCAAGGCATTCTTCCCCAACTTGTACCTGGCA
GATCCTTCTCATCCTCCAGGTCCCTACTCAAATAACCCCTCCCTGAATGTCCATCCTCCATTAGATATCCCC
...

Zelena barva označuje ekson 3, z rumeno so označeni začetni oligonukleotidi(FTO-Int2)...ATTCACTGTGAGAACATCAGGGAGCTGATTGGCTGAAAAGTGAATGAAGTCCTAAACTGCATCAATA
AATCCCTGTGTTCCATGTTAGGGAGGACATTATCTTATAGTGCCTCCTCTGGTGAACACCAGTAGAATTAT
TACATCTTCTAAATTGCAGTGGGATGTCTCATCCATTCACTCAGCCAGTATTACTGAGTACATCCTGGTA
CTCATATTATAGTGGAAAGCAAAACTATCATGGCTTTGTGTCATGGGACTCAGTGTCTGACTCACAAAGAA
AAGTTATTCTCTTCAGTGAAGCATTGAAGCAGAAGCCAGTTTCATTATTGAGAGGCTGTGCAATCTT
GTGGTTAAGAGCTCATGCTCTGGAGCTGACTCTGAAGCCTGCAGGTTAAATTCCAGCTCCTATTATC
AGTC CTTGTGACTTTGGCGAGTTTATTATTATTATTATTAAATTGCTGTGCCATGTGCCAT
GTGGGATCTTAGTCCCTGAGCAGGGATTGAACCCATGACCCCTGCATTGGAAGTGTGGAATCTAACCACTG
GACCACAGAGAAGTCCCCAAGTTTGGAATGTCTCTGCCTCAG [T>A] ATTCTCATCTATGACCTGGAG
ATAATATTAATAATAGTACCTCCACATAAAGTGTAAAGAAGTAAATGAGTTGGTATGTATAAATCATTTGAA
TAGTACACAACACTGGTAAGCCCTAAAAAAACAGGTGTTAACGAGCAATTAATCAGGTTGTTGTTGG
AAGGCCAAGCTGGAAGACAGGTTGAGGGTGGGAGAAATGGTCACAGAGGGAGCTGGAAGACCAAAGACCA
AATCATTATTATCCTTTATTATGTTGTTGCTGTCAGTCGCTCAGTCTGTGACTCTTGCAACCCC [G
>A] TGGACTGCAGCACGCCAGGCTCCCTGCTCTTCACTGTCCTGGAGTTCTCAAACCTCATAAACTTTT
GTTTATAATTGTCGTAAATGGAGCTTGGACCTAAAACCTTTGGAGAGTTGATGACTTAGTTCTATT
TAGGCTAGAGAGATATGTGTTAGAAATACCCCTGACAGTCTTTTATTCTCCTGAGGCTATGAAGAAACA
CACTTTGAAATAATAAAATTATAGCTCTCCATAAACACATATTGCTTGTGTTCTAGTGGCAACT
GAAATATCCTAAACTAATTCTCGAGAACGCTGCCAGCGTCCTGAGTTGCTCCATAAAAGAGG TTCAACAAGCC
TTCTCACGCTGCACAAGCACGGCTGTTATTCCGGATCTGGTGAAGGATCCAGGGCAAAGACTTGCTCACTC
CAGTCTCGCATCCTCATCGTAACCCCGCTGCACCTACAAGTACCTGAACACCAGGCTCTCACGGTACC
CTGGCCCGTGAAAGGCTCTGATGCAAAGTACAATGAGGCCGAAATAGCTGCCGCTGTCAAACGTTCTCAAG
CTCAACAGCTACCTGCAGGTAGAGACCATCCAGGTTGGAAGAGCTTGCTGCCAAGGAGAAAGCCAACATCG
ATGCCGTGCCAGTGTGCATAGGTCCAGATTCCCCAGGGTTGGCATGGGTCCTCTTGACGGGCACGATGA
GATTGACATGAAGAACCGAGCAGCGTACAACGTCACTTGTGAATTCTCATGGATCCCAGAACATGCCATAC
CTGAAAGAGGAACCGTATTGGCATGGGAAAATGCGGTGAGCTGGCATCATGATGAAATCTGGTGACA
GGTCAGGGTGGCAGTGTACAGTTAGCTGTGAAC GTACAGTCTGCTATGAAGAAGCAGCCCCAACATA
ACATGACCAGAGTCGCGCAGGCTCTGGAGATATGATTGGATATGCGTGCCTGTTGTGTGTGTGT
ACGTAGATATGTGTCCTCTAAGGTTGCTGCGCCCATATATCTACAGAAAATGCTTCTTCATCCATTG
TGCTATTGGCTATTGTTATCCTGTGCTCAGAATATTGCTCGTAAGCGCTGCTGTCAATTGCTTCCC
AAGCCCTGGAGAGCCGCATCTGGTTCACACACCCAGCTGCCCTTCTAAAGCTCAGAGTAGATTGTACAG
TTGTTATAATTGACTTGCTGATAAAGGCCGGAAAACAAAATCTGTCACATCCTCAGGGTCCCACAGGT
GTACATTCCAGTCTGCCAACACGTTTATTACAATTGACATTGCTGCTTGAAGGGAGTGAATTGTCAACT
GTGGACTTGTCTTGGCTCCCTCGGTTTGACTACTGTCCTCCTCATCAGAACAGCTGAGGTGGTTTA
TAAGCTGACAGACCTCTATTTCAGGAGTATCTAGCCCGCCCCCTGCCCTCATCAGTTCTGCAGTT
TAGACCTGAGAGGGTTCTGTTGAGCAGCCTGTTCTGCAGTTCTGAAACCTGGTGCCTTGGAGCAAAGATC
ACAGGCTACCTTCTGTTGCTGCACACATTTCCTCTGATTGTCAGGT CTCGTGTTGAAGGTCCC
CAGTGTGTTTCAGAACAGGATTATAAAAAGTAGGTGGACAAATCAAGGACAGAGTGCACCTTCTGACTTC
TTGCCTGATCATTGGCAAGGAATATAAGATGTAAGTGTAGCTT...

Z rdečo barvo je označen SNP iz baze NCBI: rs41869461 v intronu 4.

...ATTGTAACGTGCTCAATAATATTCTTAGATGAACCTTACATGTTTATGTAGGTGTGGGACAGTTAATG
TA [G>C] GTGAATCATAGGGTGTGCCTCTACTCCTTACTGTCCTCTGTTATTCCAGCCATGTAATT
CTCTTCCAGAAAAATCAGTCTTGAGTTCTCCAGAAATATTATAATATGCACTATACACACAT
ATGTGTATGTGTTTTTTAATACAAATTAGCCTATTCTTCT...

Ekson 4

...CTTTCTTGACAGGCCCTGAAGAGGAAAGTGAGGACGACCCTCAGCTTGAAGGCAGAGATCCTGATATTC
GGCACGTTGGTTTAAGATCTCGTGGACATAGAGACACCTGGTTGGCGATACCCCTCACCAAGGAGACTG
CTATTTATGCTTGTTAATGCAAGGATCAAAGCTATACTGATGCTTAGTGTCTAAGTTTAGATTATTGGG
TACATATTTGCATATGTCTTGAAAGTAAACTTGTAAGTTTCATATGATAATGAAGCTTACATGTAA
CTTGATTTTTTTTTCTTTAAG...

Z rdečo barvo označen SNP iz baze NCBI: rs41869462 v intronu 4.

...AGCCAAGGACTCTAAAGAACCCCTGTCCC GGATCCCTGCCCTGTGCTGATACCTGAAATCTGAACCATAG
CACTTT [T>G] GAAAAGGAAACAGTTAGCTCAATTATAATAATATTGGTCTGCAGAGGAAGTGCAGACC
AAACCCCTGCTGTCTCAAGTCAGTCCTCAGGGGTGTGATGGGAACGTGCCGGTGCCTGTAATAATCCA
CTGCCTGTGGAATTGAGTGAAGG...

Ekson 5

TAAATACTATTTAGTGAUTGATAAGTGGCATGTTGGATGCTTTTCCCTTAATTGGTATTTCTGC
ACATGATCTCAATGCCACCCACCAACACTGTGTTTGGCTGGTTACACCTCGGTTAGTCCACCCACCGA
GTGGCAGAC**GTAAGTGTAAATAAAATGTGAC...**

Ekson 6

...GAAGGGGACAGACATCCTAGGAAGGGAGGCTTGGTCAACGTGGGTTCACTTACTGTGTCGGTGGCTGGTTG
TCTCTGC**AC**TGCTCAACAGGGACCTTGGAGTACATCTTACAGCGCTGCCAGGTGCCCTGCAGAATGTCCCGCG
AGGAGGCAGACAACGGTAAATCTCTTGAAATCCTTGGAGTCAGTGGTTGAAACAAGGAGAAGAAATCCA
CAACGAGGTAAGGGCTCTGAGAACTGTGGTGATTCTGTCTACTTGTAGCTAACAAAGTAATCGGCCACGGT
TTGCTCTAAGTGTAAAGAGCCAAGGATGGTCATTGCTTACAAGGCAGTAGCCAGAGCATCGGCATTTCATG
CCAGTGCTGCCAGCCT...

Intron 6

Z rumeno barvo sta označena 5' in 3' začetna oligonukleotida z imenom BOVINT6A. Z rdečo barvo so označeni SNP znotraj introna 6.

...ACACTGTCTGCTTCAAAAGATAGTTGGGCATCTAAAGAGGAAGTGAACATCATTATTTAAAG**TGGACA**
AGGTCTCCTTGCTTCCTGCTTACAGGCTGAATGAACATCATTCTCCACTCTTGAGCTTCATTACT
GAAATCCAGACTCTGTTGACCTTACAGGCTGAATGAACATCATTACAAACGATAATTATTTGTTCTGGG
ATATCATGGTTGCCAAGGCTGTATGTTGTTCTCATAATGGAAGTAACCAGCCCCAAAGATTATAAAAAAAAT
TAAAAGC [A>T] AAACCCTTCAACTCTCCCTAACATAGAGGCTTGATGCTTGACAGGCTGTTCTGTA
ATGTCAACAAATTTCATGTGAAATCTAAAAGAACTCTTTTTTT [*>T] CCCCTGTAATAAAATAATGTT
GTTAACACTGTATTT [T>C] AGAGAAGTTGAACACTACCTGTATTCACTTCAAGCAGTTAAGTT
ACCCCCGTTAACCACTGTCTTTAATACCACAGATAAGGTTAGCAGCTATTGTCTGAATATTGTCTACATTC
CCTTTTCCCTGTTAACAGCTTAACATGAAATCGGTCTACATATCAAACAAACATTAGTTAGTGAA
CTAAAACCTTCATATGACTTGGTCTCAGGTTAGTTAGTGAGTGTACCTTCAACATTGTTAAATCTCA
CAAGTTGCTTTGTTGCATGAAAGTTCAGCATGGATAAACAAACAAAAATTCTTGTGGTAACAGGTGAAG
ACTATTATAACTCGGTGCCTGTATATGGAACATGATTACCTTAGTAAAGCCAACCTAACCAATATTAAGCTG
TGAAAGCTCTACATTCTTACAGCAGAAGTAAAGAGCTTGGGATGAATGAAGTTGTACTTTGATGG
TAAAATTGCTTTCAAGTTGAAGATAAGTGATAGAAAATACATAGGAAACAACCTCTTATTCTTAAAGCT
TAAGTTAGTCTCACCTACATATGTTGAAATTATTCAGTGCAGGAAGTGGAAACTCAACCTGAAATGGTT
TAAGCCAAGGGGCTTCAGGATAACTTGATCAAGAGTCAGCTGATCTGACTAGGACCTGGTTTTAATCTG
TTCATCTGTAGCTGCTCCTACTGCCTGCCTCATTCTCCATTCTGAAAATGGTTGCAGAACCTTT
CCTGAATCTCTGACAGTCTACTCTGATTGATCATATGCCTGTCTCCCCAAGCCCATTCTGTGGCTGGAG
AAAGTGTGGTGGCTGATGGGCTCAGATGGGTTGCATGTTCCACTCCGGTATTAGTAGAGCGCTACCCAGAC
CACGTGGACTGAGACCGGGAAAGGCAGTGGGTTACCGAGATGAATCATGGGATTGGCTAGAGTGAAGGGTGC
TCGGGAGAGAAATATTGAAGTTACCGTAGTAGGTTCTAGGAAGGAAGAGAAATGGTTAGTGGCTTACTG
TGCTTTTACCTATTGCAATTGCCCTGACTGAATTGAAAGTGAAGCTTGATGGCTCTGTAGGTGAATGT
GTCCTCCGTAATTATATTGTTAGTTACATGAACACCTCCTGCCAGCTCCTGGCCATGGTAAATTC
TTTGTATTAGATCCAAAATCTTAAATTGGTGCCTCCTGATACGTGTCTGTGTTGCTTTGCTTTTGT
TGTTGTTTTCACTAAGTCGTCTCACCTTGCAACCCTGGACTACAGCGCCAAGCTTCCCTGTC
CTTCACCGTCTCCAGAGTTGGCTCAGATTGATGCCATTGAGCCTCTAACGATGTCTTGTGCCGCCCT
CTTCTCCTTCAATCTTCTCAGCATGAGGGTCTTCCAGTGACTCAGCTTCACTCAGGTGGCCAAGTA
TTGGAGCTTCAGCTCAGTCTCCAAATGAATATTCAAGGTTGATTCCTGAGGATTGCCTGGTTGATCTT
CTTACAGTACTAATCTTAATAAGATGTTAATGAAAACATATTGTTGATTTGCCTTCCCACCTAC
ACAGCGCAGGCTGTCATGTGCTTAGGATCTCAGGATTGTTGATTGACCGATAGCTCCTCTGTGAG
TGATGAACGGTGACTGAAAACCCCTCCCCAGCCTGACCTGGGTTGTCAGTCAAGCTCTATGTCTACTT
CCTGACTTGTAAAAGGCTCCAGAGACTTGAGTTATGGGAACGGTTAGGCTGAGTTCTCTTT
TCTCACCTATGGCTGTGAAGTTACTGGAGGAGACTGAATGACGAAGTTATTGTCTTGATTGTCCATCAT
GGGACTTTATAACCACGGCTTGTCTTATGATCCCC

Ekson 7

AGGTGAGTTGAATGGCTGAGACAGTTGGTTCAAGGCAGTCATAAAAGTGCAGTACTGGTGGTG
TCAGCCCATGAGTCAGCTGGAGAGATGTGGAGAAAGATGGAGTGGT TGGTAAGTATCCAGGAGTGGATTCT
TGGGATGTTGTGCTCTGTCAGCCTGGCTGCCTCCTGGCCTGGTAAATGCAAGAG...

Intron 7

Z rumeno barvo sta označena 5' in 3' začetna oligonukleotida z imenom BOVINT7A. Z rdečo barvo so označeni SNP znotraj introna 7.

...TGCTCTTGTGTTGCATGCTGTTCTAGTCCTACTTTGTTACAGTTGACGAGCATTATCAAAGTCATTAGGGAGCAGTGGGATAACAGTCGAAACTAAATAGGATCCTGCCCATGAATTCACTTCTTCAACCCCTCCTCTCAGGATCCATGGTAAACTAGGGCTCTGGATAAAACGTAAACGATATGAAAGGCCAAGAAGATACAAACGACTGTTGAAAAAG [T>G] CAAATAGAGAAATAATTTATTTCATCATGTCTTGGAGCCATCTAGATGTGTTATTTCCATGTGAAGCACTTTGGTAAAATAATGTGTACCAACAGGCATGGTGATAAAC [A>T] GCATGACTTCCTGAGGTCCTCTGGCTTCAGTGGTAGGGCGGGTACAGACAAGGAGCAATGCTGTTAGAGTCCCATTGATGCCAAGACCTCTCGAAATGAGACATTGTTACACTATAGGCCACAATTGGCAGCTGCCGTGAGTCC [G>A] TTTAGCCATTGTTCTGTTATCCCACATGGTATTAAAAAAATGGGGGCCAGAGAGGGCAATATAGGAATGGGGGGTGGGAGGTACAAACCCCTGGTATAAGATAAGCTCA A...

Ekson 8

...TCCTTATTCCTATGGGCTTTTCATTATTAATTTCACTTCACTTCTCTTTGGGGATTGTTCTCTAGCAAGGGCTGTGCTTCGCGAAGTTAGAAGAGAGGGGGTCCCCATGAAACAAAGAATGAGATGTTGACATCCATCCTCGCCTCGATCACCACTGCCAGAACCTGAGGAGAGAATGGCATGCCAGGT TTGTTCTGTTACGAAATGGGATTGTTGTCCTGGAAAATGAGGGCTT...

Intron 8

Z rumeno sta označena 5' in 3' začetna oligonukleotida z imenom BOVINT8A.

...TTAGGGTTGTCATGCTGAGGCCACTAGAGAACACTTAATTGTAGATCATTGCCAGTGTGTTACGAGGCTTTTCAGGGCTTTAACAAAGCAGCTTCTGCCACTTACGGGAAACCTGGAAAGTTCTGAGGCAGACAAACCAAGCATATTCTTACATCTGCCTGAAGTAACGGAAATCGTCAGATTCTGTATCTCCCCTCACTTTTCCCTCTAAATAATCAAGCCTCGGTTGTACATAGATCCCTGGGTGCTGGATGTATGTCGAATACGTTCTTCCCTTTCAATTCTGCTTGAAGTTGGGTTTTGGTGGTGGTATGGTGGAGATGGTGAATGAAACACACAGTTACACATCCAGGGCTGTGAAACCTTAATTAGCAGCGTAATAAAACCACATTGTTACATGGAGCCAATTCCCTCGCCTCTTCCCCAAGGACTGAAGGAAGTATCTCTGGTATATGTTAAATACTGATAGATGAGACCTGCAGATAGATGGTGGGTTAAGGCAGAGCACAAAAGAAAGCTCATGTTTCAGCTGTCTACCTTCTAGGTCCAATTGCCCTCAGTGTTCAGAATTACATTAGCCTAATCTAACATGTAGCTTTAATGTTCCAATTCTGGGTGAACTGAGTCCCAGCTTCACATTGCCTGTCTGTTAGCATCTGCATCTATAAGAGGGCATTCAATTAGGGCTGTATGGAGGGAAATCCACCAAAAGACCCGACCCACTTCTGGGTATCCACTTCTGGGTATTCTGGGAAATCCAAGTCCCCAGATTGAAGACAATGAATTGAGAGGTACCCGTAAATCATCAAGATAGATCCAAGGATCAAAACTAAAAACCTAG...

Z rumeno barvo sta označena 5' in 3' začetna oligonukleotida poimenovana BOVINT8B. Z rdečo barvo so označeni SNP znotraj introna 8.

...CACTTGGTGGGTGTAAGAGACTGGAAGTCTTGTTCTGCCATGATGGTGGTGCCATTTCATGCTTT
TGCCTTCCTTGGCTAAGAAAACCTGTTGGTGTGTTTGCCATCGAACTGCTGCCATTGTCATAGGC
TCCAGATTGTCAGGCAGGGCAATTAGTTATTGGTACTGGCTGCTATGATGTATAGTTGCCT
AGCAACGGCCTCTGAATTAAGTCTGGAAAGGGGCATACAGGAAGAGACAGGAAGATGAAATAGGT [A>C] C
CATTCGATGGTAGGTGAGTGGTAATGAAAAAAGAGTAAAGGTATTATAATCATAGAACGGCTGAGTG
GAAACTTGGGGC [C>T] ACAGGGAGAGAGACAGAACTTAGTTCTGCTTAGTTCTCCCTGCTAAATAAAA
TAAGAGTAAGCAGCAGTCGAACCAACCCATTAAAACAAAAGCTCATCTTCTTCGACACTTGTGATTCCA
TGCAGGCAGGACTCAAGGAGCGCTTTATCCAAGCACAGCATGAAAATTGTGGAAGGGAGAGATGGAGAC
CCGAGTCATGCCTGACTCTGAAATCTTGAGGACAAGCTTAATTACCAACTTAGTTCATACCAACGAAC
TGGGGTTAAGTGGGGACAGGATCCAGTTGATTCACTGCTGTAGTACCAACTTGTGATTCTCA
GATACAGATGTTCCATCTCAATTGTGAAGTCAGGAAGTATCTGAAGAAGCCGAGAACAGCACATCCGTT
TCATTAGAGTCGGCTGAGTTAGACACGTGGCAGACTAACCCATCA...

Ekson 9

...TTAAAAACACACCTGCTTCTGCCTCCAAACTCATTTCCTCCTCATCACCACATCACAGTGGAT
TGCCAAGGTTGCCCAAGTTGCCTGAGTATGGGTCTTGAGTCTTCTGGAAATTAACTGCCTATTCT
TACTTTCCAGGTGCCAGTCTCGAATTGCCGAACCTTACCCGCTGATCAGAACCCAGAATGCCGGCGTACT
GGGAAAAGGGTGATCCTCGATGCCCTGCCATTGATCTCACAGAGATCGTTCTGAACACTCAGAGGTCTGCT
TCTGGAAACCAGGCCCTAG...

Območje 3'UTR; Rumena vijolična in modra barva označujejo začetne oligonuleotide (FTO-UTR3a, FTO-UTR3b in FTO-UTR3c), rdeča barva označuje SNP in temno zelena barva označuje prepoznavno mesto za bta-miR-141m in bta-miR-200a. Bolj natančno opiši za klokio Cjev gre v primeru *>C.

...CCAGGTGCCAGTCTCGAATTGCCGAACTTACCCGCTGATCAGAACGCCAGAACGCCGGTACTGGAAA
AGGGTGATCCTTCGATGCCTCTGCCATTGATCTCACAGAGATCGTTCTGAACTCAGAGGTCTGCTCTGGA
AACCAGGCCCTAGAGGCAGAGCGCAGTCCTCAGGTGGAGGAGGAAAGGTATTTCAGTCCTCTCCAAC
CCTGTCGTGGCTTAGGCAAGGGCGGTATGGGTAGACTTGGCCTTGAGATTGTAGAAACTGTTGAGATGATA
GAGAATGCCCTGGAGATTGTTCCAGTTGGAAACAATTAGGGAGTGGAACCCATGAAGATTAAATGTTGA
AAATGACA **CAGTGT** ATAGT GATTGGTATTAAATTAAAAATACCCAAAATATAATACCCCCCCC [*>C]
AAAAAAAGAAACAAAAAACTATTCCCCACTTGGATTAAATGCAAGCTATTCCACTCCTGAGGCCTGGGAG
TGACCAGGGTGAACCTGGCCTTGGCAGAACCTAACCTACTTGTCTTCCAAGCCTTGCAGAGTCCTA
CAGGGATCTCTCCAGTCATGGAGGAGAAGATCAAATTAGAGACGTTAGCCATTTCCTAACACATCCTT
CAGACTCTGTGGCCAATATGGTAGCCACTAGGTAGATGGGCTTCTACCATTAAATTCCATTAAATTG
TAATTAAAATTCAAGTCT **TCAGTTGCATGAGCCACATT** TCAAGTGTCTAGTAGCCAGGTGAGCTAGAGAC
TACTGT **TTGGACACAGAACGTTTCAT** TTTGTAGAAAGCCTCTAGACGATACTCTGTCAAAGTTGA
GAGC [**G>A**] AGAGAGTCATCTCCAGTTCTGTAGCTGCTCTCCCCACCTGCAAATAATGAGAACAGCA
ATGCCTCGTTGGAAAGTAGCCTCTTCCCTCTAAGGCAGCCAAGGTTGTGAGCCCTGTACTCTGCACACA
GGAAGAGAGCAGTGTGAAGATTTAAACTGACATCTGTCTTAGAAGTCCCCGTATCTAATGAAA
GAGACAAAATCTATTACATTGCTTGGATTAAACCAACACACTACATATTGTTTCCCTTAATTCCCC
CATTCACACATAAGGGCTAGAATTGAGGCTTGAAGAACCCACTGCCCCATCCTGGTATGCTGGAGCACCAG
AGAAATGAGAAAGAGGTTAGAACCTGGCTTGGTTTCGAGTGCCTAGATGCAAATGCCACTGGCTGTGA
TCTTGAGTGTGACTGTGCCTCGGTTCCCTCATCTGTATAATTGGGATACTACAGGCACACTGATTCCAAGG
TGAAGATGAAATGAAATAATCTAGTCCAGATTAGAACAAATCTCTGGTAGATAAACACGCAGCAAATA
TTAGTAAAATATTATATCAGTAAGCTGACCTGCTGTAGGCATT **TTCCCCTCCCTCAATCTGGTGCC**
AG **TTTGTCTCATGATGCCATGAA** CCCACCTCTCGCTTCGGCCTGG [**C>G**] TTTCACCCATGGTGGCCCA
GAAATCACAAGATTAGTCAGCCCTCTCCCAGCCTGTCGCTTCTCTGTATCTGCAGTATTGGGAAGCC
GAGGAGCTTTCAACCATTAGAGGTACCCCTGAGAAACTAAACTCTCC [**C>T**] GCCATCAGAACATCTCACCGGT
TCAAGGTTGGCTCATTCTATAGAGTTACCTCAGAGAGATCACATCACAAAGGCAGATGGGTTTCA
ATCTTGAGACTCTCAAATCTTAGATGAGTCCCTGATGCCCTAAGCCTCAGTCTCTCATCAGTAAAAGATG
AAGTGCTCCCTTACGGTTGCGGGAAATGATGAAATCATGGAGGCAGGGTGTGCAGGGCAGCCTCGGG
ACCATATGCCCTCTGTTTATTCACCCCCAGAACATGTTGTTCTGTATAGTCATGAGGAGCCAGTAT
TTAAAAATGGAAGATTCTATATAACATAAAAGTTGTGCGTCTCTTAAATTCAAGAGCACCCAGCAGCCTC
CATCCTGACATGGCAGAGAGCTAGGTAGCATCCTTAGGTGGGCCTGAACCCCTCATGGCCCGTCACTC
CCAGTTACCATTTATTGTGAATCTGACCATCTTACCCCTCACGTACGCACCTGCTGCTGCACCGTAGA
GTAGAAATAATAACGTTGCGTGTACCCCCATATGTGTATTACTATCCAGCTATTGTTGTGGACTG
CTTGTACTAATATGCCATGTACATGTTAAACACGCATAAACAAATAATTGAAAGGATGAGATA **AGAAA**
CCCAGAGAGTGCCTG

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Andrej RENČELJ

**ASOCIACIJSKA ANALIZA HAPLOTIPOV V GENU
FTO Z LASTNOSTMI ZAMAŠČEVANJA PRI
GOVEDU (*Bos taurus*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009