

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matjaž STANONIK

**ANALIZA KANDIDATNIH GENOV ZA NALAGANJE MAŠČEVJA
NA MIŠJEM KROMOSOMU 15**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CANDIDATE GENE ANALYSIS AFFECTING FAT ACCRETION ON
MOUSE CHROMOSOME 15**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 16.6.2010 za mentorja dela imenovala prof. dr. Simona Horvata.

Recenzentka: doc. dr. Tanja KUNEJ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

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 diplomska naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Matjaž Stanonik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 575(043.2)=163.6
KG molekularna genetika/debelost/miši/nalaganje maščevja/kandidatni geni/DNA polimorfizmi/izražanje genov
KK AGRIS /
AV STANONIK, Matjaž
SA HORVAT, Simon (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij Biotehnologije
LI 2010
IN ANALIZA KANDIDATNIH GENOV ZA NALAGANJE MAŠČEVJA NA MIŠJEM KROMOSOMU 15
TD Diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP X, 88 str., 28 pregl., 11 sl., 142 vir.
IJ sl
JI sl/en
AB Razumevanje procesov nalaganja maščevja ostaja pri preučevanju debelosti še vedno velik izziv. Kljub temu, da je znanih kar nekaj genov z velikim vplivom, ki pogojujejo razvoj monogene ali sindromske debelosti, pa identifikacija genov z manjšim vplivom, ki določajo razvoj poligene debelosti, ostaja večinoma nerazrešena. V zadnjem obdobju je bil z razvojem inbridiranih mišjih linij z visokim (*fat*, F) in nizkim (*lean*, L) odstotkom maščobnega tkiva narejen velik napredek v analizi genetike razvoja poligene debelosti. Z nadaljnji raziskavami na omenjenih linijah je bilo določenih nekaj kvantitativnih lokusov (QTL), z relativno velikim učinkom na nalaganje maščevja, poleg tega so bili predlagani najverjetnejši pozicijski kandidatni geni. Namen diplomskega dela je bil z uporabo 2 različnih pristopov finega kartiranja nadalje analizirati pozicijske kandidatne gene QTL-a *Fob3b*. V prvem delu diplomske naloge smo proučili nukleotidno zaporedje kandidatnih genov z namenom identifikacije morebitnih polimorfizmov med linijama miši F in L. Zasnovali smo ustrezne začetne oligonukleotide, s katerimi smo pomnožili 6 genov, oziroma 50 eksonov ter identificirali 3 polimorfizme. V drugem delu diplomske naloge smo z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) analizirali diferencialno izraženost nekaterih kandidatnih genov, predhodno določenih z uporabo mikromrež. Analize smo izvedli na F2 križancih kongene linije G z linijo F (FF, LL) za tkiva jeter, možganov in maščob. Glede na obstoječe podatke smo v vseh tkivih potrdili raven absolutne stopnje izraženosti posameznih genov. Čeprav statistično značilne diferencialne izraženosti nismo dosegli, pa je bila razvidna tendenca izraženosti, ki potrjuje predhodne rezultate analiz z mikromrežami. Tako z mikromrežami, kot tudi z qPCR je bilo pokazano, da je gen *Ttc38* bolj izražen pri miših LL. Ugotovitve diplomskega dela predstavljajo dobro osnovo za nadaljnje analize kavzalnosti kandidatnih genov, ki vplivajo na nalaganje maščevja na QTL-u *Fob3b*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 575(043.2)=163.6
CX molecular genetics/obesity/mice/fat accretion/candidate genes/DNA polymorphism/gene expression
CC AGRIS /
AU STANONIK, Matjaž
AA HORVAT, Simon (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2010
TI CANDIDATE GENE ANALYSIS AFFECTING FAT ACCRETION ON MOUSE CHROMOSOME 15
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 88 p., 28 tab., 11 fig., 142 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Understanding the processes of fat accretion remains a major challenge in obesity research. Although quite a few genes with large effects causing monogenic or syndromic form of obesity have recently been identified, most genes with small effects that determine obesity in a cumulative polygenic manner have remained obscure. Inbred mouse lines used here were selected for 60 generations on high (*fat*, F) and low (*lean*, L) body fat percentage and represent a unique model to uncover quantitative trait loci (QTL) in polygenic form of obesity/leanness. Previous studies in these lines identified several QTL across the genome affecting fat accretion, and positional candidate genes. The aim of the present under-graduate (diploma) thesis was to use two different approaches of fine mapping to further analyze positional candidate genes within the *Fob3b* QTL region on mouse chromosome 15. In the first part, candidate genes were examined for potential polymorphisms between the F and L lines. Appropriate primers were designed, 6 genes or 50 exons were amplified and 3 single nucleotide polymorphisms were identified. In the second part of this diploma thesis some candidate genes previously identified in a microarray experiment were evaluated for differential expression using real-time polymerase chain reaction (qPCR). Homozygous animals of opposite genotype from the F2 cross between congenic mouse lines G and F were assayed for expression in adipose tissue, liver and brain. A relative abundance of each candidate gene transcript level was confirmed for tested genes in all three aforementioned tissues. Although this analysis did not confirm statistically significant differential expression for any of the tested genes, the trends obtained by qPCR were similar to results obtained by the microarrays. Main result was that *Ttc38* was shown to be highly expressed in F2 mice of LL genotype in both qPCR and microarray experiments. Our findings represent a solid basis to further evaluate the role of candidate genes affecting fat accretion with the final goal of proving causality for QTL effects.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 DEBELOST PRI LJUDEH.....	4
2.1.1 Osnove debelosti.....	4
2.1.2 Različne oblike debelosti	5
2.2 KARTIRANJE KVANTITATIVNIH LOKUSOV	6
2.2.1 Osnove kvantitativnih lokusov in njihovega kartiranja.....	6
2.2.2 Postopek kartiranja kvantitativnega lokusa	7
2.2.3 Fino kartiranje kvantitativnega lokusa	8
2.2.4 Razvoj kongene linije.....	8
2.2.5 Primeri uspešnih uporabe kongenih linij	10
2.3 UPORABA POLIMORFIZMA POSAMEZNEGA NUKLEOTIDA KOT METODE FINEGA KARTIRANJA	11
2.3.1 Primeri uspešne uporabe SNP genetskih označevalcev pri študijah genetskih osnov nalaganja maščevja.....	13
2.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU KOT METODA FINEGA KARTIRANJA	14
2.4.1 Izbera referenčnih genov	16
2.4.2 Izvedba RT-qPCR v enem koraku oziroma dveh korakih	17
2.4.3 Absolutna kvantifikacija - relativna kvantifikacija.....	18
2.4.4 Fluorescentno barvilo SYBR Green.....	18
2.4.5 Metoda relativnega izražanja z izrisom umeritvene krivulje in metoda ΔCt, korigirana glede na učinkovitost pomnoževanja.....	19
2.4.6 Primeri uspešne uporabe RT-qPCR v študijah genetskih osnov nalaganja maščevja	20
2.5 POZICIJSKI KANDIDATNI GENI NAŠE ŠTUDIJE.....	22
2.5.1 Iskanje polimorfizmov v pozicijskih kandidatnih genih QTL-a <i>Fob3b1</i>...22	22
2.5.1.1 <i>Dgat1</i>.....	22
2.5.1.2 <i>Gpihbp1</i>.....	24
2.5.1.3 <i>Rhpn1</i>	25

2.5.1.4	<i>Cyp11b1</i> in <i>Cyp11b2</i>	25
2.5.1.5	<i>Gpr20</i>	27
2.5.1.6	<i>Tsta3</i>	28
2.5.2	Analiza izražanja izbranih kandidatnih genov QTL-a <i>Fob3b2</i>.....	29
2.5.2.1	<i>Tst</i>	29
2.5.2.2	<i>Lgals2</i>	30
2.5.2.3	<i>Ttc38</i>	30
2.5.2.4	<i>Apol10b</i>	31
3	MATERIALI IN METODE	32
3.1	LABORATORIJSKI PRIBOR	32
3.2	LABORATORIJSKE MIŠI	32
3.3	ISKANJE POLIMORFIZMOV V POZICIJSKIH KANDIDATNIH GENIH QTL-a <i>Fob3b1</i>	34
3.3.1	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za verižno reakcijo s polimerazo.	34
3.3.2	Izolacija DNA iz vranice miši.....	37
3.3.3	Verižna reakcija s polimerazo	38
3.3.4	Agarozna gelska elektroforeza.....	40
3.3.5	Verižna reakcija s polimerazo za potrebe sekvenciranja.....	42
3.3.6	Poravnava nukleotidnih zaporedij	43
3.4	ANALIZA IZRAŽANJA IZBRANIH KANDIDATNIH GENOV QTL-a <i>Fob3b2</i>	44
3.4.1	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za RT-qPCR.....	44
3.4.2	Izolacija RNA	45
3.4.3	RT-qPCR za namen nadaljnje validacije začetnih oligonukleotidov.....	47
3.4.4	Validacija začetnih oligonukleotidov	48
3.4.5	Obratna transkripcija za namen RT-qPCR	50
3.4.6	RT-qPCR – metoda ΔCt , korigirana glede na učinkovitost pomnoževanja.....	51
4	REZULTATI	52
4.1	ISKANJE POLIMORFIZMOV V POZICIJSKIH KANDIDATNIH GENIH QTL-a <i>Fob3b1</i>	52
4.1.1	Pregled agaroznih genov in določitev Tm začetnih oligonukleotidov	52
4.1.2	Identifikacija polimorfizmov med linijama miši F in L	54
4.2	ANALIZA IZRAŽANJA IZBRANIH KANDIDATNIH GENOV QTL-a <i>Fob3b2</i>	57
4.2.1	Karakterizacija RNA	57
4.2.2	Validacija začetnih oligonukleotidov	58
4.2.3	RT-qPCR	58
4.2.3.1	Izraženost genov v tkivu jeter	58
4.2.3.2	Izraženost genov v tkivu možganov	60
4.2.3.3	Izraženost genov v maščobnem tkivu	61
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	63
5.1	RAZPRAVA	63
5.1.1	Iskanje polimorfizmov v pozicijskih kandidatnih genih QTL-a <i>Fob3b1</i>...	64
5.1.2	Analiza izražanja izbranih kandidatnih genov QTL-a <i>Fob3b2</i>.....	66
5.1.3	Razprava splošno	71

5.2	SKLEPI	73
6	POVZETEK	75
7	VIRI	77
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.	
Preglednica 1:	Kandidatni geni kvantitativnega lokusa <i>Fob3b1</i> z visoko in srednjo prioriteto	35
Preglednica 2:	Začetni oligonukleotidi za reakcijo PCR	36
Preglednica 3:	Končne koncentracije reagentov in pripadajoči volumni za reakcijo PCR	38
Preglednica 4:	Program, uporabljen za reakcijo PCR	39
Preglednica 5:	Priprava pufra 0,5xTBE	41
Preglednica 6:	Priprava pufra 10xTBE	41
Preglednica 7:	Reakcija PCR za namen sekvenciranja	42
Preglednica 8:	Geni, ki smo jih analizirali z RT-qPCR	44
Preglednica 9:	Začetni oligonukleotidi za RT-qPCR	44
Preglednica 10:	Priprava vode z odsotnostjo RNaz	45
Preglednica 11:	Razmerja med maso tkiva in volumnom reagenta TRIzol	47
Preglednica 12:	Vzorci, uporabljeni za reakcijo RT-qPCR	47
Preglednica 13:	Priprava pozitivne in negativne kontrole reakcije RT-qPCR	48
Preglednica 14:	Priprava 2,5 µM mešanice začetnih oligonukleotidov za RT-qPCR	49
Preglednica 15:	Priprava reakcijskih mešanic za RT-qPCR	49
Preglednica 16:	Program validacije začetnih oligonukleotidov za RT-qPCR	50
Preglednica 17:	Osnovna zmes posameznega gena za RT-qPCR	51
Preglednica 18:	Temperature prileganj začetnih oligonukleotidov	52
Preglednica 19:	Karakteristike izolirane RNA	57
Preglednica 20:	Validacija začetnih oligonukleotidov za RT-qPCR	58
Preglednica 21:	Vrednosti Cp za tkivo jeter	59
Preglednica 22:	Relativna izraženost genov v tkivu jeter	59
Preglednica 23:	Vrednosti Cp za tkivo možganov	60
Preglednica 24:	Relativna izraženost genov v tkivu možganov	61
Preglednica 25:	Vrednosti Cp za maščobno tkivo	62
Preglednica 26:	Relativna izraženost genov v tkivu maščob	62
Preglednica 27:	Rezultati preliminarne študije Cirnski (2010a)	67
Preglednica 28:	Končni rezultati Cirnski (2010b)	67

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1:	50
Slika 2:	54
Slika 3:	54
Slika 4:	55
Slika 5:	55
Slika 6:	56
Slika 7:	56
Slika 8:	56
Slika 9:	60
Slika 10:	61
Slika 11:	62

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava Pomen

AIL	napredna križana linija (angl. <i>advanced intercross line</i>)
AK	aminokislina
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
cDNA	komplementarna DNA
Cp	točka prečkanja (angl. <i>crossing point</i>)
cM	centi Morgan, 1 cM je enota razdalje na genomu, kjer je verjetnost rekombinacije 1 odstotek
CS	kongena linija (angl. <i>congenic strain</i>)
Ct	pražni cikel (angl. <i>threshold cycle</i>)
EST	oznaka izraženega zaporedja (angl. <i>expressed sequence tag</i>)
F	inhodiščna inbridirana linija miši <i>fat</i> (F)
FF	generacija F2 kongene linije G, z dvema genomskima kopijama linije F
FISH	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
<i>Fob3</i>	<i>F-line obesity QTL3</i> , ime kvantitativnega lokusa
GRBP	vezavni protein odzivnega elementa za glukozo (angl. <i>glucose response element binding protein</i>)
ISCS	intervalno specifična kongena linija (angl. <i>interval-specific congenic strain</i>)
ITM	indeks telesne mase (angl. <i>body mass index-BMI</i>)
KO	izničenje gena (angl. <i>knock-out</i>)
L	izhodiščna inbridirana linija miši <i>lean</i> (L)
LL	generacija F2 kongene linije G, z dvema genomskima kopijama linije L
LOD	logaritem razmerja obetov (angl. <i>log 10 of the odds</i>)
MAS	protokol selekcije s pomočjo genetskih označevalcev (angl. <i>marker assisted selection</i>)
NADPH	nikotinamid dinukleotid fosfat
ORF	odprt bralni okvir (angl. <i>open reading frame</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
qPCR	PCR v realnem času (angl. <i>real time PCR</i>)
QTL	kvantitativni lokus (angl. <i>quantitative trait locus</i>)
RIL	rekombinantna inbridirana linija (angl. <i>recombinant inbreed line</i>)
RIN	parameter, ki oceni integriteto RNA (angl. <i>RNA integrity number</i>)
RPM	obrati na minuto (angl. <i>revolutions per minute</i>)
RT-qPCR	PCR v realnem času s predhodno obratno transkripcijo (angl. <i>real time reverse transcription PCR</i>)
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida
Tm	temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov
TF	transkripcijski dejavnik (angl. <i>transcription factor</i>)
UTR	neprevedljiva regija (angl. <i>untranslated region</i>)
VNTR	spremenljivo število tandemskih ponovitev (angl. <i>variable number tandem repeats</i>)
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (angl. <i>World Health Organisation</i>)

1 UVOD

V preteklosti so bili ljudje pogosto prisiljeni stradati, zato se je tekom evolucije organizem temu ustreznno prilagodil. Usmeril se je v učinkovito hranjenje maščobnih zalog, ki jih je v obdobjih lakote in stradanja uporabil za vir energije. Ni šlo za dogodek, temveč za dolgotrajen proces, v katerem so preživeli predvsem tisti, ki so bili na dane razmere bolje prilagojeni. Takrat je bila to prednost, danes pa nagnjenost k nalaganju maščevja predstavlja problem. Trg se je globaliziral, ponudba hitro pripravljene, visoko-kalorične hrane je cenovno ugodna in dostopna na vsakem koraku. Naše delo postaja vedno bolj statično, in tudi sicer smo vedno manj fizično aktivni. Genetski zapis, ki se je tekom evolucije dolgo časa prilagajal, se na današnje razmere, ki so glede na dolgo zgodovinsko obdobje nastopile nenadoma, ne more prilagoditi v tako kratkem času.

Prekomerna teža ter debelost človeka je trenutno velik zdravstveni problem, ki se vzporedno z globalizacijo trga širi v države v razvoju in dosega tudi najrevnejše države sveta. Prizadene tako posameznika in delovanje njegovega telesa, kot tudi obremeneni zdravstveni sistem prizadetih držav. Leta 2005 naj bi po podatkih WHO za debelostjo trpelo najmanj 400 milijonov odraslih ljudi po vsem svetu, do leta 2015 pa predvidevajo, da naj bi številka narasla na 700 milijonov. Temu primerno je vedno več znanstvenih raziskav, ki proučujejo dejavnike, ki prispevajo k nalaganju maščevja.

Na razvoj debelosti ima velik vpliv naše poligeno genetsko ozadje. Le nekaj oblik debelosti je, kjer je vzrok bolezni en sam okvarjen gen, kar imenujemo monogena debelost. Monogene bolezni smo znali določiti že pred časom, danes pa je večji izziv proučiti bolezni, ki so določene z večjim številom genov, tako imenovane poligene lastnosti, kamor v večini primerov spada tudi debelost. Proučevanje debelosti je izredno kompleksno, saj gre največkrat za to, da nekatere oblike genov pomenijo večjo dovetnost za debelost, toda niso nujno potrebni za njen razvoj, oziroma njenega nastanka ni mogoče pojasniti samo s stanjem teh genov.

Dejavnike okolja je potrebno pri tovrstnih raziskavah čim bolj omejiti, kar pa je pri raziskavah, ki vključujejo ljudi težko. Zaradi kompleksnosti tovrstne lastnosti največkrat

proučujemo na laboratorijskih miših, kjer je lažje nadzorovati vpliv okolja. Poleg tega imajo miši v primerjavi s človekom visoko stopnjo ohranjenosti genoma, predvsem ko primerjamo krajše odseke in vrstni red genov. Tako je zelo verjetno, da bo hipotetični genomskega odsek, identificiran kot odgovoren za neko kvantitativno lastnost pri miših, odgovarjal homolognemu genomskemu odseku pri človeku.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

S prejšnjimi poskusi grobega kartiranja selekcijskih miši F (angl. *fat*) in L (angl. *lean*) so raziskovalci odkrili, da ima področje na kromosому 15, imenovan kvantitativni lokus (QTL) *Fob3b*, relativno velik učinek na nalaganje maščevja (Horvat in sod., 2000). Z nadaljnji poskusi so ugotovili, da je ta QTL sestavljen iz dveh manjših QTL-ov *Fob3b1* in *Fob3b2* (Prevoršek in sod., 2010). Ta dva lokusa sta se izkazala za dobra kandidata za iskanje novih kavzalnih genov za debelost.

Namen diplomskega dela je bil nadalje razjasniti genetsko pogojenost nalaganja maščevja na QTL-u *Fob3b* mišjega kromosoma 15. Naš cilj je bil:

- Z metodo sekvenciranja in poravnava nukleotidnih zaporedij selekcijskih miši F in L poiskati in analizirati polimorfizme v nukleotidnem zaporedju pozicijskih kandidatnih genov, določenih s strani Prevoršek in sod. (2010), ki kartirajo na področje QTL-a *Fob3b1*. Identifikacija polimorfizmov v kodogenih in regulatornih regijah genov namreč lahko omeji izbor pozicijskih kandidatnih genov.
- Z verižno reakcijo s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo (RT-qPCR) potrditi in analizirati diferencialno izraženost kandidatnih genov za kvantitativni lokus *Fob3b2*, določenih na mikromrežah (Cirnski, 2010a). Identifikacija diferencialno izraženih genov med F2 križanci kongene linije G (FF in LL) lahko dodatno omeji izbor pozicijskih kandidatnih genov.

V diplomskem delu smo zastavili sledeči hipotezi:

- Znotraj pozicijskih kandidatnih genov obstajajo razlike v nukleotidnem zaporedju med mišjima linijama F in L, ki določajo stopnjo nalaganja maščevja.

- Med mišmi FF in LL obstajajo diferencialno izraženi geni, ki jih lahko določimo z metodo RT-qPCR.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DEBELOST PRI LJUDEH

2.1.1 Osnove debelosti

Debelost v razvitem svetu postaja vse bolj resen zdravstveni problem (Kopelman, 2000), ki se širi v države v razvoju (Obesity ..., 2006) in dosega tudi najrevnejše države sveta (Prentice, 2006). Prekomerna debelost je definirana z indeksom telesne mase – ITM (angl. *body mass index* – BMI). Gre za razmerje telesne mase in kvadrata telesne višine - če ta presega 30 kg/m^2 govorimo o debelosti, če je med 25 – 30 govorimo o prekomerni telesni masi, 20 – 25 je normalna vrednost, ITM pod 18 kaže na podhranjenost (Kopelman, 2000). Leta 2005 naj bi po podatkih WHO za debelostjo trpelo najmanj 400 milijonov odraslih ljudi po vsem svetu, do leta 2015 pa predvidevajo, da bo številka narasla na 700 milijonov (Obesity ..., 2006). Kopelman (2000) ter Bell in sod. (2005) tako debelost definirata kot epidemijo, ki grozi celiemu svetu. Eden izmed dejavnikov za porast debelosti je vedno manjša fizična aktivnost ljudi (House of Commons ..., 2004), ki je posledica današnjega načina življenja. Drugi dejavnik pa je vedno dostopnejša, cenovno ugodna visoko-kalorična hrana, ki je posledica globalizacije trga (Kopelman, 2000; Mutch in Clément, 2006; Bell in sod., 2005). Pomembno vlogo okolja so s preučevanjem ljudi, ki so se preselili v ZDA in pridobili na teži, dokazali v številnih študijah (Sundquist in Winkleby, 2000; Gordon in sod., 2003; Kaplan in sod., 2004; Hubert in sod., 2005; Goel in sod., 2004). Velik delež pri razvoju debelosti pa prispeva tudi genetsko ozadje (Kopelman, 2000). Neel je leta 1962 utemeljil teorijo varčnih genov, po kateri naj bi imeli osebki z oblikami genov, ki v današnjem času določajo debelost, v zgodovini v populacijah, ki so bile pogosto prisiljene stradati, selekcijsko prednost. Danes pa te oblike genov vodijo do večje nagnjenosti k razvoju debelosti. To se kaže pri Pima Indijancih in Pacifiških otočanah, ki so visoko dovetzni za debelost (Friedman, 2003), velike razlike pa so tudi med etičnimi skupinami v ZDA (Cossrow in Falkner, 2004), kar kaže na pomembno vlogo genetskega ozadja. Zastopanost v drugih razvitih državah je blizu tej v ZDA, in ljudje v

državah v razvoju se s privzemanjem zahodnjaškega načina življenja temu vse bolj približujejo (Bell in sod., 2005). Po podatkih Knai in sod. (2007) naj bi bilo od dva do osem odstotkov vseh zdravstvenih stroškov v zahodno evropskih državah namenjenih prav zdravljenju debelosti in ostalim posledičnim boleznim. Posledice niso le ekonomski, temveč se kažejo v značilnih boleznih, povezanih z resnimi zdravstvenimi stanji in prezgodnjimi smrtmi (Bell in sod., 2005). Debelost je namreč glavni dejavnik tveganja za sladkorno bolezen tipa II, hipertenzijo, koronarne arterijske bolezni, osteoartritis in nekatere oblike rakastih obolenj ter za motnje dihanja, reproduktivne in druge bolezni (Kopelman 2000; Prentice, 2006). Glede na globalen porast debelosti Mokdad in sod. (2004) predvidevajo, da lahko debelost v bližnji prihodnosti izpodrine problem kajenja v ZDA, ki je trenutno glavni dejavnik tveganja za številne bolezni.

2.1.2 Različne oblike debelosti

Glede na genetsko ozadje in fenotip ločimo tri oblike debelosti. Monogena debelost je oblika, kjer debelost povzroči mutacija enega samega gena z velikim učinkom (angl. *major gene*). Znanih je 11 genov, katerih okvara vodi v razvoj debelosti, večina pa ima pomembno vlogo v leptin/melanokortin signalni poti (Rankinen in sod., 2006). Campfield in sod. (1995) so izvedli raziskavo, v kateri so mišim inaktivirali gen *Lep*, ki proizvaja hormon leptin, kar je povzročilo razvoj debelih miši. Nato so mišim leptin injicirali, kar je vodilo do značilnega zmanjšanja telesne teže, telesnih maščob, zaužitja hrane in množine serumskega inzulina. Raziskave pa so bile narejene tudi pri človeku. Farooqi in sod. (2002) so s terapijo injiciranja leptina otroku, ki je imel gen *Lep* okvarjen, občutno zmanjšali telesno maso.

Druga je tako imenovana sindromska oblika debelosti. Znanih je med 20 in 30 nepravilnosti, kjer gre za klinično debelost, bolniki pa med drugim lahko trpijo za mentalno zaostalostjo, telesnimi hibami in nepravilnim delovanjem organov (Bell in sod., 2005). Najbolj pogost primer je sindrom Prader-Willi (PWS), ki prizadene enega na 25000 ljudi (Goldstone, 2004), za katerega je značilna debelost, nizka rast, mentalna zaostalost in hipogonadizem (zmanjšano izločanje spolnih hormonov) (Kopelman, 2000).

Z izjemo redkih oblik debelosti, kjer je vzrok bolezni en sam, okvarjen gen, gre največkrat za to, da nekatere oblike genov pomenijo večjo doveznost za debelost, vsak gen pa pripomore majhen delež k celoti. Ti geni povečajo tveganje za nastanek debelosti, toda niso nujno potrebni za njen razvoj, oziroma njenega nastanka ni mogoče pojasniti samo z alelnimi variantami teh genov (Kopelman, 2000). Te trditve so dokazali v študijah dvojčkov, kjer so pare izpostavili različnemu okolju, razlike med pridobljeno maso pa so pokazale veliko večjo podobnost znotraj parov dvojčkov, kot med njimi. Študije so podprle velik genetski vpliv na razvoj debelosti, saj je bil izračunani dednostni delež od 40 do 75 odstoten (Terán-García in sod., 2004; Nelson in sod., 2002; Stunkard in sod., 1986). Tej, najbolj pogosti oblici pravimo poligenska debelost.

2.2 KARTIRANJE KVANTITATIVNIH LOKUSOV

2.2.1 Osnove kvantitativnih lokusov in njihovega kartiranja

Čeprav je bil v zadnjih letih narejen velik napredek v genetiki in identifikaciji monogenih lastnosti ter pripadajočih genov, pa večina lastnosti pri človeku, drugih živalskih vrstah ter rastlinah, ki so poligene narave, ostaja neidentificiranih (Kearsey, 1998). Poligene lastnosti so večinoma kvantitativne narave, zato je Gandlermann (1975) genomske odseke, kjer ležijo geni, ki te lastnosti določajo, poimenoval kvantitativni lokusi (angl. *quantitative trait loci* - QTL). V praksi je QTL regija DNA, ki kaže statistično značilno povezanost med neko kvantitativno lastnostjo in stanjem genetskih označevalcev na tem odseku (Grisel, 2000). Gre za to, da se genetski označevalci in QTL v mejozi ne porazdelita neodvisno, zato lahko stanje genetskega označevalca povežemo z razlikami v fenotipu proučevane lastnosti. Bliže QTL-a kot se genetski označevalci nahaja na kromosому, v večji meri alel genetskega označevalca odraža stanje QTL-a in natančnejše lahko določimo lokacijo QTL-a (Kearsey, 1998).

Kartiranje QTL-ov je vse prej kot enostavno, saj nam fenotip pove zelo malo o samem genotipu (Kearsey, 1998). Poleg tega, da veliko genov določa neko lastnost, pri čemer vsak

gen prispeva le majhen delež h končnemu fenotipu, je težava tudi v tem, da so te lastnosti v veliki odvisnosti od okolja. QTL-e, ki so med drugim odgovorni za številna bolezenska stanja pri človeku, zato največkrat proučujemo na laboratorijskih miših, kjer lažje kontroliramo vpliv okolja in razlike med linijami miši pripisemo različnemu genetskemu ozadju (Grisel, 2000). Prednosti so tudi visoka stopnja reprodukcije, kratek generacijski interval ter nizki stroški vzdrževanja živali (Cox in Brown, 2003). Dodatna prednost uporabe miši je tudi veliko število določenih genetskih označevalcev in komercialna dostopnost večine mišjih linij (Grisel, 2000; The Jackson Laboratory, 2010). Nenazadnje lahko razvijemo nove linije, ki jih odbiramo povsem po svojih kriterijih. Poleg tega imajo miši v primerjavi s človekom visoko stopnjo ohranjenosti genoma, predvsem ko primerjamo krajše odseke in vrstni red genov (Grisel, 2000). Tako je zelo verjetno, da genomski odsek, ki je odgovoren za neko kvantitativno lastnost pri miših, odgovarja homolognemu genomskemu odseku pri človeku (Copeland in sod., 1993).

2.2.2 Postopek kartiranja kvantitativnega lokusa

Kartiranje QTL-ov navadno pričnemo s križanjem dveh inbridiranih starševskih linij, ki se v proučevani kvantitativni lastnosti razlikujeta. V vsaki starševski inbridirani liniji so vse živali genetsko identične (homozigoti), kar pomeni, da imajo po dve identični kopiji vsakega gena. Potomci starševskih linij (F1 generacija) imajo na vsakem mestu genoma eno kopijo gena od ene, drugo kopijo pa od druge inbridirane starševske linije. Živali F1 generacije so vse genetsko identične in so heterozigotne na vseh mestih genoma, kjer imata starševski liniji različna alela gena. Pomembno je, da so heterozignotne na mestu, kjer leži QTL (Grisel, 2000).

Sledi križanje generacije F1. Dobimo veliko število živali s širokim spektrom najrazličnejših vrednosti proučevane lastnosti, kar je posledica rekombinacij odsekov DNA v procesu mejoze. V tej fazji navadno vzamemo živali, ki se v proučevani lastnosti najbolj razlikujejo. Pomanjkljivost strategije, kjer zajamemo le ekstremna fenotipa je ta, da ne zaznamo QTL-ov z manjšim vplivov, vendar pa s tem močno pocenimo raziskavo, saj zmanjšamo število eksperimentalnih živali (Grisel, 2000).

Nato statistično ovrednotimo korelacije med fenotipom in genetskimi označevalci. V uporabi je več statističnih metod, s katerimi določimo najbolj verjetno pozicijo QTL-a, statistično značilnost in zanesljivost rezultatov (Kearsey, 1998). Bolj ko stanje genetskega označevalca statistično značilno sovpada s fenotipom, bolj natančno pozicijo kandidatnih genov dobimo. Najpogosteje se uporablja intervalno kartiranje, kjer se preuči interval med dvema zaporednima genetskima označevalcema, verjetnost nahajanja QTL-a med genetskima označevalcema pa se določi z verjetnostjo logaritemskih obetov (angl. *log of odds ratio* - LOD) (Lander in sod., 1989).

2.2.3 Fino kartiranje kvantitativnega lokusa

Kartiranje QTL-a je dolg in drag postopek ter zajema več stopenj od same detekcije QTL-a, določitve približne lege QTL-a, ki je opisan v poglavju 2.2.2 ter finega kartiranja (FK) QTL-a, s katerim nadalje ožimo območje in zmanjšujemo število kandidatnih genov (DiPetrillo in sod., 2005). Mott in sod. (2000) navajajo, da lahko z metodami finega kartiranja velikost intervala zmanjšamo na manj kot 0,5 cM (centi Morgan, 1 cM je enota razdalje na genomu, kjer je verjetnost rekombinacije 1 odstotek). Pri finem kartiraju uporabljamo različne pristope: primerjalno kartiranje znotraj vrste in med vrstami, analiza haplotipov (Prevoršek in sod., 2010), poravnava DNA zaporedja v tarčnem intervalu, analize izražanja genov (DiPetrillo in sod., 2005) ter sklop številnih drugih metod, kot so analiza naprednih križanih linij (angl. *advanced intercross lines* – AIL), rekombinantnih sorodnih linij – RIL (angl. *recombinant inbreed lines* – RIL), intervalno specifičnih kongenih linij (angl. *interval specific congenic strains* – ISCS), rekombinantnih kongenih linij (angl. *recombinant congenic strains* – RCS) ter kongenih linij (angl. *congenic strains* – CS) (Stylianou, 2004).

2.2.4 Razvoj kongene linije

Princip kongenih linij je v študiji histokompatibilnosti prvi opisal Snell (1948). Kongene linije predstavljajo pomemben genetski vir QTL analiz, s pomočjo katerih so odkrili

številne QTL-e, ki so odgovorni za debelost, diabetes tipa I, multiplo sklerozo ter rakasta obolenja (Rogner in Avner, 2007).

Postopek razvoja kongene linije (Wakeland in sod., 1997):

- Križamo starševski liniji, ki se razlikujeta v proučevani lastnosti.
- Identificiramo miši, heterozigotne za donorski genomske odsek.
- Izvedemo večkratna zaporedna povratna križanja F1 generacije s prejemniško linijo.
- Zadnjo generacijo kongenih miši parimo med sabo (angl. *intercross F1*), da dobimo homozigotno kongeno linijo.
- Identificiramo kongene miši, homozigotne za donorski genomske odsek.

Pri razvoju kongenih linij z zaporednimi povratnimi križanji vnesemo v genetsko ozadje ene starševske linije (prejemniška linija) le majhen genomske odsek (kjer naj bi se nahajal QTL) druge starševske linije (donorska linija). Z vsakim povratnim križanjem teoretično zmanjšamo zastopanost donorskega genoma za 50 odstotkov (The Jackson Laboratory, 2001). Po standardnem protokolu izvedemo 10 do 12 povratnih križanj in na koncu parimo še zadnjo generacijo kongenih linij med sabo, da dobimo homozigotno kongeno linijo (Wakeland in sod., 1997). Cilj je ustvariti več kongenih linij z različno dolgimi, prekrivajočimi se donorskimi odseki (Prevoršek in sod., 2010) ter primerjati njihove fenotipe. Več kongenih linij kot imamo in manjši kot bodo prekrivajoči se donorski odseki, bolj natančno bomo lahko kartirali QTL (Farber in sod., 2007).

Razvoj kongenih linij po standardnem protokolu traja od 2,5 do tri leta, kar je v preteklosti omejilo njihovo uporabo, a so bile do danes narejene številne spremembe in izboljšave te metode (The Jackson Laboratory, 2001). Ena takih je protokol selekcije s pomočjo genetskih označevalcev (angl. *marker assisted selection – MAS*). Metoda temelji na uporabi genetskih označevalcev, razporejenih po celotnem genomu, ki omogočajo, da razločimo med prejemniškim in donorskim genomom. Tako poleg odbiranja na prisotnost donorskega odseka odbiramo tudi na odsotnost preostalega, neželenega donorskega genoma. V začetni generaciji izvedemo celoten pregled genoma, odberemo osebke, ki

imajo največji odstotek prejemniškega genoma in so heterozigoti za donorski odsek. V naslednjih generacijah pa pregledujemo le še tiste dele genoma, ki vsebujejo donorski odsek. Z uporabo opisane metode, naj bi v le 12-16 mesecih (pet generacij) pridobili kongene linije, ki vsebujejo manj kot 0,5 odstotka nezaželenega donorskega genoma (Wakeland in sod., 1997).

2.2.5 Primeri uspešnih uporabe kongenih linij

Stylianou in sod. (2004) so z uporabo kongenih linij miši preučili QTL *Fob3* (*F-line obesity QTL3*), ki je povezan z razvojem debelosti ter je eden izmed štirih QTL-ov, določenih s strani Horvat in sod. (2000). Izvedli so šest povratnih križanj, pri čemer so v petem preverili prisotnost ostalih treh QTL-ov. Ugotovili so, da QTL *Fob3* na mišjem kromosomu 15 sestoji iz dveh manjših QTL-ov, *Fob3a* in *Fob3b*, ki imata relativno velik učinek na nalaganje maščevja.

Prevoršek in sod. (2010) so z uporabo osmih kongenih linij miši z različnimi prekrivajočimi se genomskeimi odseki nadalje preučili QTL *Fob3b* ter ugotovili, da sestoji iz dveh genetsko vezanih QTL-ov, ki so ju poimenovali *Fob3b1* in *Fob3b2*. QTL *Fob3b* je bil tako zožen iz 22,39 Mbp na 4,98 Mbp za *Fob3b1* in na 7,68 Mbp za *Fob3b2*.

Farber in Medrano (2006) sta s pomočjo kongenih linij miši in finega kartiranja razkrila razlike v izražanju QTL-ov na kromosomih dve in 11, ki vplivata na rast, trdnost kosti in lastnosti povezane z debelostjo. In sicer sta ugotovila, da raven izražanja omenjenih QTL-ov določa spol.

Dokmanovic-Chouinard in sod. (2008) so v študiji, kjer so križali linijo miši F2, odporo na diabetes, z linijo F2, ki je bila na diabetes občutljiva, identificirali QTL na kromosому 1, povezan z razvojem diabetesa. Nato so z uporabo prekrivajočih kongenih linij ter sub-kongenih linij še nadalje zožili QTL na 5 Mbp.

Kongene linije so za uspešno zoženje QTL-a, povezanega s telesno maso in debelostjo na kromosomu dve uspešno uporabili Diament in sod. (2004). Interval, zožen na 27 Mbp so nadalje z razvojem sub-kongenih linij, ki so jih razvili iz kongenih linij iz omenjene študije, Chiu in sod. (2007) zožili na 7 Mbp. Poleg omenjenih pa so bile z uporabo kongenih linij izvedene še številne druge uspešne študije (Lembertas in sod., 1997; Diament in Warden, 2004; Estrada-Smith in sod., 2004; Jerez-Timaure in sod., 2004).

2.3 UPORABA POLIMORFIZMA POSAMEZNEGA NUKLEOTIDA KOT METODE FINEGA KARTIRANJA

S projektom človeški genom in znanim zaporedjem DNA človeka je postala uporaba genetskih označevalcev pri proučevanju genomov vse bolj pomembna. Termin genetski označevalci zajema različne vrste polimorfizmov v zaporedju DNA, na podlagi katerih je mogoče posamezne osebke med seboj razlikovati (Brookes, 1999). Na ravni DNA obstajajo tri glavne variacije (Vignal in sod., 2002):

- polimorfizmi posameznega nukleotida (angl. *single nucleotide polymorphism* - SNP)
- insercije ali delecije, ki obsegajo od enega do nekaj 100 baznih parov
- spremenljivo število tandemskih ponovitev (angl. *variable number tandem repeat* – VNTR)

Kot je razvidno iz samega imena, je SNP sprememba enega nukleotida v zaporedju DNA, navadno z alternativo dveh možnih nukleotidov na določeni poziciji. Da lahko posamezen lokus genomske DNA označimo za SNP, mora biti najmanj pogost alel v populaciji zastopan s frekvenco enega odstotka ali več. Čeprav je v principu lahko na vsakem mestu zaporedja DNA prisoten katerikoli nukleotid, so SNP-ji v praksi bialelni, kar pomeni, da obstajata na določenem mestu samo dve različici zaporedja (Vignal in sod., 2002). Pri človeku so namreč tri in tetra alelni SNP-ji zelo redki (Brookes, 1999). Eden od razlogov za to je nizka frekvenca substitucij posameznega nukleotida, ki naj bi bila od 1×10^{-9} do 5×10^{-9} na nukleotid na leto, na nevtralnem mestu genoma pri sesalcih (Martínez-Arias in

sod., 2001). Tako je verjetnost dveh neodvisnih zamenjav nukleotidov na isti poziciji genoma izredno nizka. Naslednji razlog je nagnjenost mutacij v eno smer, ki vodi v prevladovanje dveh SNP-jev. Mutacija lahko vodi do tranzicije, kjer pride do zamenjave purina s purinom (A-G) ali pirimidina s pirimidinom (C-T) ter do transverzije, kjer se zamenja purin s pirimidinom ali obratno. Če bi bile mutacije naključne, bi bilo torej dvakrat več transverzij, kot tranzicij, vendar pa podatki kažejo na zamenjave v prid tranzicijam (Vignal in sod., 2002).

Do nukleotidne spremembe lahko pride tako v kodirajočih kot nekodirajočih regijah. Sprememba v kodirajoči regiji je lahko nesinonimna ali sinonimna. Nesinonimna se odraža v zamenjavi aminokisline (AK), kar lahko vpliva na funkcijo in strukturo produkta, medtem ko sinonimna lahko vpliva na zvijanje in stabilnost mRNA transkripta (prepisa), kar se lahko odraža v količini produkta. Nekodirajoči SNP-ji se nahajajo v intronih, v neprevedljivih regijah genov (angl. *untranslated region* – UTR) ali v promotorskih regijah genov. SNP-ji v intronih genov so lahko vzrok za alternativno spajanje eksonov, medtem ko SNP-ji v 3' in 5' neprevedljivih regijah ter promotorskih regijah lahko vplivajo na procesiranje mRNA (dodajanje kape na 5' konec gena, poliadenilacija, spajanje eksonov), sekundarno strukturo mRNA in stabilnost mRNA, kar lahko vpliva na translacijo (prevajanje) ter tako na koncentracijo produkta gena, kot tudi na AK zgradbo produkta gena (Jacobsson, 2006; Chatterjee in Pal, 2009).

SNP-ji so najbolj pogost tip variacij v zaporedju DNA človeškega genoma (Cooper in sod., 1985), saj naj bi se v genomu človeka na vsakih 100 do 300 nukleotidov nahajal en SNP. Predstavljajo okoli 90 odstotkov vseh polimorfizmov v genomu človeka (Human Genome Project Information, 2005) ter so izredno pomembni tudi pri živalskih študijah preučevanja kompleksnih genetskih lastnosti, kot je na primer debelost (Kwon in Gu, 1999). Polimorfizmi v zaporedju DNA lahko vplivajo na raven izraženosti ali pa na samo funkcijo produkta gena. Tako je identifikacija polimorfizmov v zaporedju DNA lahko ključna za odkrivanje kandidatnih genov (Abiola in sod., 2003).

Znani so številni pristopi za odkrivanje SNP-jev, ki pa najpogosteje temeljijo na primerjavi lokus specifičnih zaporedij DNA. Kadar preučujemo že izbrano tarčno regijo, je najlažje,

da izvedemo neposredno sekvenciranje produktov PCR želenih genov iz različnih vzorcev. Ta pristop torej uporabimo v primeru, ko že imamo določene kandidatne gene. Pri večjem obsegu je to predrago in preveč zamudno, zato se uporablajo še številni drugi pristopi. Eni izmed njih so: primerjava zaporedij, pridobljenih iz kloniranih fragmentov, uporaba alel specifičnih začetnih oligonukleotidov ter pa metoda hitrega postopka prikazovanja (angl. *reduced representation shotgun* - RRS) (Altshuler in sod., 2000).

2.3.1 Primeri uspešne uporabe SNP genetskih označevalcev pri študijah genetskih osnov nalaganja maščevja

Zhang in sod. (1994) so pri miših in človeku klonirali in preučili zaporedje DNA gena *Ob* (*Obese*). Gen *Ob* kodira 4,5 kb parov dolgo mRNA, oziroma 167 AK dolg produkt z izredno ohranjenim zaporedjem. V kongeni mišji liniji C57BL/6J *ob/ob* so v kodonu 105 identificirali nesinonimno mutacijo iz CGA v TGA, ki se je odražala v 20-krat večji koncentraciji mRNA gena *Ob*. Druga linija miši SM/Ckc+dac *ob2J/ob2J* te spremembe v zaporedju DNA ni imela, vendar pri tej liniji tudi ni bilo zaznati mRNA gena *Ob*. Ti podatki so nakazali, da bi lahko gen *Ob* deloval kot del signalne poti v maščobnem tkivu, ki uravnava nalaganje maščevja. Danes je znano, da je gen *Ob*, imenovan tudi *Lep* (*Leptin*), gen z velikim učinkom, ki določa razvoj debelosti tudi pri človeku. Omenjeni gen vpliva na težnjo po zaužitju hrane ter stimulira porabo energije, zato napake v tem genu vodijo v monogeno debelost (pregledni članek, Kelesidis in sod., 2010).

Znano je, da mutacije v genu *Lpin1* (*lipin 1*) glodavcev, analogu človeškega gena *LPIN1*, v miših povzročijo lipodistrofijo (velika izguba maščobnega tkiva) (Péterfy in sod., 2001). *LPIN1* je zato ustrezен kandidatni gen za pojav lipodistrofije pri človeku. Cao in Hegele (2002) sta za identifikacijo možnih mutacij, ki povzročijo bolezen pri človeku, uporabila pare začetnih oligonukleotidov, s katerimi sta pomnožila gen *LPIN1*. zaporedja DNA sta preučila na bolnikih z lipodistrofijo, ki niso imeli prisotne mutacije na nobenem izmed prej znanih vzročnih genov ter na zdravih, kontrolnih osebah. Mutacij, ki bi bile statistično značilne samo za bolnike v genu *LPIN1* sicer nista našla, sta pa identificirala pet novih SNP-jev. Ugotovite kažejo, da mutacije v genu *LPIN1* pri bolnikih z lipodistrofijo

navadno niso prisotne, če niso bolniki poleg tega še nosilci mutacij v znanih genih, ki povzročajo lipodistrofijo. Pridobljeni začetni oligonukleotidi ter identificirani SNP-ji predstavljajo dobro osnovo za nadaljnje analize povezave gena *LPIN1* z različnimi fenotipi.

Wang in sod. (2006) so pri kokoših preučili vpliv gena, imenovanega *Abdominalni vezavni protein maščobnih kislin* (angl. *abdominal fatty acid-binding protein – A-Fabp*). Zanimalo jih je, če v zaporedju gena *A-Fabp* kokošjih linij NEAURP in CAURP obstajajo razlike v zaporedju DNA, ki vplivajo na rast in na lastnosti povezane s telesno sestavo pri kokoših. Zasnovali so ustrezne začetne oligonukleotide, s katerimi so pomnožili zaporedje gena *A-Fabp* in pridobili njegovo zaporedje DNA. Identificirali so SNP v zaporedju DNA eksona 1, kjer je prišlo do zamenjave nukleotida C z nukleotidom T. Rezultati so pokazali, da je polimorfizem povezan tako z maso, kot tudi s procentom abdominalnih maščob. *A-Fabp* je torej dober kandidatni gen, ki vpliva na nalaganje maščevja pri kokoših.

2.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU KOT METODA FINEGA KARTIRANJA

S spoznanji, da imajo spremembe ravni transkripcije mRNA pomembno vlogo v različnih razvojnih procesih, terapijah in nastanku tumorjev ter so pomembne za diagnozo in kvantifikacijo virusnih okužb (Mackay in sod., 2002), je bila v medicini prisotna vedno večja želja po proučevanju ravni izraženosti genov. Zato so raziskovalci začeli razvijati metode, s katerimi bi bilo možno kar se da natančno določiti koncentracijo mRNA v celicah. Ena pomembnejših metod, ki je danes na voljo, je tudi verižna reakcija s polimerazo v realnem času (ang. *real time polymerase chain reaction – qPCR*) (Roth, 2002). Ker pri tej metodi vedno najprej izvedemo obratno transkripcijo (angl. *reverse transcription - RT*), bomo uporabljali termin RT-qPCR, razen, kjer bomo žeeli izrecno ločiti med RT ter qPCR.

Metodo RT-qPCR so prvič opisali Higuchi in sod. (1993). Število citatov na to temo je od takrat začelo strmo naraščati (VanGuilder in sod., 2008), do danes pa je postala ena najbolj

uporabljenih metod za kvantifikacijo izražanosti genov (Wong in Medrano, 2005). Podlagu temu je bil razvoj nespecifičnih fluorescentnih barvil in naprav s katerimi lahko v vsakem ciklu reakcije PCR izmerimo raven fluorescence, poleg tega pa omogočajo analizo na mikrotitrskih ploščah s 384 vdolbinicami, s čimer lahko na enkrat izmerimo raven izražanja več 100 genov (Udvardi in sod., 2008).

Metoda RT-qPCR je hitra, visoko ponovljiva in občutljiva metoda, kar pomeni, da potrebujemo minimalno množino mRNA, njena izvedba pa ni kompleksna. Za razliko od tradicionalne PCR, tu po končani reakciji ni potrebno nadaljnje laboratorijsko delo (Wong in Medrano, 2005). Pri tej metodi, za razliko od nekaterih drugih, ne uporabljamo radioaktivnih kemikalij (Radonić in sod., 2004). Metoda je v primerjavi z northern prenosom 1000-krat bolj občutljiva metoda (Malinen in sod., 2003), s katero lahko zaznamo celo eno samo kopijo transkripta (Palmer in sod., 2003).

Osnovno reakcijo glede na kinetiko reakcije delimo v 4 glavne faze (Tichopad in sod., 2003):

- linearna faza
- zgodnja eksponentna faza
- logaritemsko-linearna faza (znana tudi kot eksponentna)
- plato faza

V linearni fazi, ki navadno zajema prvih 10 do 15 ciklov pomnoževanja, se določi osnovna intenziteta fluorescence, saj le-ta še ni statistično značilno višja od fluorescence ozadja. V zgodnji eksponentni fazi pa intenziteta fluorescence doseže raven, kjer preseže intenziteto fluorescence ozadja. Cikel v katerem se to zgodi, se imenuje pražni cikel (angl. *threshold cycle* – Ct) (Bookout in sod., 2006). Termin Ct se uporablja na napravah proizvajalca Applied Biosystems, medtem ko se na napravah proizvajalca Roche uporablja termin točka prečkanja (angl. *crossing point* – Cp), ki je izračunan nekoliko drugače, vendar pa za nadaljnje izračune velja enako kot za Ct (Tevfik, 2006). Ct je odvisen od začetnega števila kopij mRNA, zato posledično velja, da večja kot je kvantiteta začetne cDNA, hitreje pride do značilnega povišanja fluorescentnega signala, kar se odraža v nižjem Ct-ju (Heid in sod., 1996). Med eksponentno fazo je doseženo optimalno pomnoževanje cDNA, kjer se

količina produkta v idealnih pogojih v vsakem ciklu podvoji. Ko je dosežena plato faza, začne primanjkovati reakcijskih komponent, učinkovitost pomnoževanja strmo pada, intenziteta fluorescence pa ne raste več (Bustin, 2000).

RT-qPCR ima široko teoretično ozadje, zato se bomo v nadaljevanju dotaknili le nekaterih, najpomembnejših dejstev, ki omogočajo osnovno razumevanje metode.

2.4.1 Izbira referenčnih genov

Osrednji problem RT-qPCR je natančna določitev začetne ravni mRNA, oziroma cDNA, ki se nahaja v reakciji, glede na intenziteto fluorescence. Eden možnih pristopov je pomnožitev mRNA še enega ali več hišnih genov, ki jih uporabimo kot referenco, zato jih imenujemo referenčni geni. Referenčni gen je gen, ki naj bi bil enako izražen v vseh tkivih, oziroma v istem tkivu različnih osebkov, ne glede na eksperimentalne postopke, kar omogoča primerjavo ravni transkripcije preučevanega gena (angl. *gene of interest* - GOI) iz različnih tkiv oziroma znotraj enega tkiva. Glede na to, da je referenčni gen v postopku izpostavljen enakim pogojem kot GOI, njegova kvantifikacija omogoča normalizacijo razlik v količini mRNA, oziroma cDNA v posameznih vzorcih, do katerih pride zaradi (Radonić in sod., 2005):

- razlik v količini začetnega vzorca (razlike v masi, številu celic)
- kvalitete začetnega materiala
- razlik v izolaciji mRNA in sintezi cDNA

Referenčni geni, ki jih raziskovalci v študijah največkrat uporabljam so: *gliceraldehid-3-fosfat (Gapdh)*, *beta aktin (Actb)* ter gena za 18S in 28S rRNA (*Rn18s*, *Rn28s*) (Radonić in sod., 2005). V številnih študijah, v katerih so preučevali primernost različnih referenčnih genov (Blanquicett in sod., 2002; Tricarico in sod., 2002; Selvey in sod., 2001), se je izkazalo, da ne obstaja nek univerzalen referenčni gen, ki bi bil v vseh primerih enako izražen, zato ga je potrebno za vsak poskus določiti posebej. Vadesompele in sod. (2002) so dokazali, da z uporabo več referenčnih genov močno zmanjšamo napako normalizacije,

glede na uporabo samo enega referenčnega gena. Kljub tem izsledkom in dejstvu, da izražanje referenčnih genov variira glede na različna tkiva (Radonić in sod., 2005), pa so Suzuki in sod. (2000), ki so pregledali številne objavljene študije, ugotovili, da so v več kot 90 odstotkih primerov raziskovalci uporabili le en referenčni gen.

Priporočila glede referenčnih genov so v analizi izražanja cirkadianih ritmov pri miših podali Košir in sod. (2010). V raziskavo so vključili tri različne linije miši ter v jetrih in nadledvični žlezi preučili 10 referenčnih genov (*Actb*, *Eif2a*, *Gapdh*, *Hmbs*, *Hprt1*, *Ppib*, *Rn18s*, *Rplp0*, *Tbcc* ter *Utp6c*). Ugotovili so, da genetsko ozadje ter cirkadiani čas vplivata na raven izražanja referenčnih genov. Izkazalo se je, da uporaba referenčnega gena *Actb* v analizah izražanja genov med različnimi linijami miši vodi do napačne interpretacije rezultatov, saj njegova izraženost med linijami najbolj niha, sledita pa mu gena *Hmbs* ter *Gapdh*. Uspelo jim je identificirati alternativne gene, ki so stabilno izraženi ter primerni za analize izražanja genov med različnimi linijami miši. Poleg tega so tudi oni dokazali, da uporaba le enega referenčnega gena lahko vodi do napačnih zaključkov. Ugotovili so, da je pri izbiri referenčnih genov nujno potrebno upoštevati razlike med linijami miši zato predlagajo uporabo več referenčnih genov ter določitev le-teh za vsako tkivo posebej.

2.4.2 Izvedba RT-qPCR v enim koraku oziroma dveh korakih

Termin »raven izražanja genov« se nanaša na količino mRNA (VanGuilder in sod., 2008), kar pomeni, da je naš izhodiščni material mRNA, ki ga z reakcijo RT najprej prevedemo v cDNA, temu pa sledi qPCR (Udvardi in sod., 2008). Celoten postopek imenujemo RT-qPCT. Tako v bistvu posredno preko cDNA izmerimo raven izražanja gena. RT-qPCR lahko izvedemo tako, da je celotna reakcija RT iz mRNA v cDNA in reakcija qPCR izvedena v enem samem koraku, ali pa v dveh korakih, kjer ločeno izvedemo reakcijo RT ter nato še qPCR. Z reakcijo v enem koraku naj bi zmanjšali eksperimentalno napako, ker celotna reakcija poteče v eni sami mikrotitrski plošči. Glede na starejše objave naj bi bila reakcija v dveh korakih bolj občutljiva (Leutenegger in sod., 1999), vendar pa je danes v tem kriteriju reakcija v enem koraku postala povsem enakovredna (Wacker in Godard, 2005). Je pa prednost reakcije v dveh korakih ta, da loči RT od qPCR, kar omogoča več

različnih reakcij, redčitev in druge aktivnosti iz enega samega vzorca cDNA (Wong in Medrano, 2005).

2.4.3 Absolutna kvantifikacija - relativna kvantifikacija

Raven izraženosti genov lahko podamo absolutno ali relativno. Pri določanju absolutnega izražanja uporabimo serijo redčitev standardnega vzorca RNA ali cDNA, ki mora imeti definirano koncentracijo določenega gena, oziroma sestoji iz enega samega gena. Na podlagi znane koncentracije gena nam program izriše umeritveno krivuljo. Le-ta prikaže linearno povezavo med Ct-jem in koncentracijo standardnega vzorca - gena, kar na podlagi Ct-ja GOI omogoča izračun absolutnega števila molekul GOI (Heid in sod., 1996). Če izvedemo kvantifikacijo absolutnega izražanja v enem koraku, moramo uporabiti standarde RNA, saj so standardi DNA zaradi odsotnosti kontrole uspešnosti obratne transkripcije neprimerni (Giulietti in sod., 2001).

Druga možnost je kvantifikacija relativnega izražanja, ki jo znanstveniki v raziskavah uporabijo pogosteje. Pri tej analizi gledamo, kako se pri različnih osebkih izraža določen gen v izbranem tkivu in raven izražanja relativno primerjamo med sabo, rezultat pa izrazimo kot razmerje izražanja GOI znotraj različnih osebkov (Pfaffl in sod., 2003).

2.4.4 Fluorescentno barvilo SYBR Green

Pri RT-qPCR so večinoma v uporabi sledeče fluorescentne tehnologije (VanGuilder in sod., 2008):

- sonde, ki fluorescira ob hidrolizi (TaqMan) ali hibridizaciji (LightCycler)
- fluorescentne lasnice
- interkalacijska barvila (SYBR Green)

SYBR Green je interkalacijsko barvilo, ki fluorescira ob vezavi na dvojno verižno DNA. Po podvojitvi cDNA se tekom pomnoževanja na cDNA vežejo številne molekule SYBR Green in oddajajo fluorescenten signal. Prednost interkalacijskih barvil je, da niso

specifična, kar pomeni, da jih lahko uporabimo za katerokoli nukleotidno zaporedje. Poleg tega je njihova uporaba v primerjavi s sondami zelo enostavna in so glede na ostala barvila najcenejša (VanGuilder in sod., 2008). Vendar pa jih zaradi njihove nespecifičnosti ne moremo uporabiti za hkratno pomnoževanje več sond (angl. *multiplex PCR*). Druga slabost pa je, da se barvilo veže na morebitne dimerne tvorbe začetnih oligonukleotidov, kar da lažni signal o količini produkta (Zipper in sod., 2004). Posledica uporabe barvila SYBR Green je tudi ta, da je moč signala odvisna od dolžine dvojne vijačnice DNA. Ob predpostavljeni enaki učinkovitosti pomnoževanja bo pomnoževanje daljšega produkta proizvedlo močnejši signal, glede na moč signala krajšega produkta. To je v primerjavi s fluorescentnimi sondami slabost, saj pri njih moč signala sovpada s številom molekul cDNA neodvisno od njihove dolžine (VanGuilder in sod., 2008). Toda, če primerjamo izražanje enega gena znotraj različnih tkiv, to nima vloge, ker gre v vseh primerih za enak produkt, z identično dolžino.

2.4.5 Metoda relativnega izražanja z izrisom umeritvene krivulje in metoda ΔCt , korigirana glede na učinkovitost pomnoževanja

Pri metodi relativnega izražanja z izrisom umeritvene krivulje z uporabo redčitvenih vrst vzorca, za vsak GOI in referenčni gen dobimo pripadajočo umeritveno krivuljo. Na podlagi umeritvene krivulje in Ct-jev za posamezen GOI ter referenčne gene z linearno regresijo interpoliramo pripadajoče vrednosti. Vedno je potrebno najprej vrednosti vsakega vzorca primerjati glede na vrednosti referenčnih genov, dobljene vrednosti pa nato lahko primerjamo z vrednostmi istih GOI-jev iz istega tkiva različnih osebkov ali tudi med različnimi tkivi znotraj istih ali med različnimi osebkami. Metoda je primerna za primerjavo izražanja posameznega GOI-ja v različnih bioloških vzorcih, ne pa tudi za primerjavo med različnimi GOI-ji, saj je moč primerjati le podatke, pridobljene na podlagi iste umeritvene krivulje, ki pa veljajo le za posamezen GOI (Bookout in sod., 2006).

Eden izmed danes številnih obstoječih matematičnih modelov za izračun relativnega izražanja genov pa je tudi metoda ΔCt , korigirana glede na učinkovitost pomnoževanja. Le-ta temelji na zgoraj opisani metodi relativnega izražanja z izrisom umeritvene krivulje. Metoda ΔCt , korigirana glede na učinkovitost pomnoževanja, je primerna tako za

primerjavo izražanja posameznega GOI-ja med vzorci, kot tudi za primerjavo izražanja med posameznimi GOI-ji. Vendar pa je za sledečo primerjavo pomembno, da ne uporabljam barvila SYBR Green, katerega fluorescensa je odvisna od dolžine produkta, ali pa moramo poskrbeti, da so produkti različnih setov začetnih oligonukleotidov enakih dolžin. Pri tej metodi prav tako za vsak GOI in referenčen gen na podlagi serijskih redčitev dobimo umeritveno krivuljo, ki pa nam pri tej metodi služi samo za izračun učinkovitosti PCR reakcije »E« po sledeči formuli:

$$E = 10^{(-1/naklon\ premice)} - 1 \quad \dots(1)$$

Raven izražanja pa izračunamo po sledeči formuli: **Error! Bookmark not defined.**

$$raven\ izražanja = E^{-Ct} \quad \dots(2)$$

Vsek Ct GOI-ja iz posameznega tkiva se naprej primerja glede na Ct referenčnega gena iz istega tkiva, nato pa lahko primerjamo posamezne vrednosti Ct-jev med sabo (Bookout in sod., 2006).

2.4.6 Primeri uspešne uporabe RT-qPCR v študijah genetskih osnov nalaganja maščevja

Reizes in sod. (2001) so na miših z izničenim genom (angl. *knock-out*, KO) *Sdc3* (*Syndecan-3*) dokazali, da je omenjeni gen vključen v uravnavanje energijskega ravnotežja v telesu. Ha in sod. (2006) so želeli nadalje preučiti vlogo gena *Sdc3* v razvoju debelosti in ugotoviti, ali so znani SNP-ji v tem genu povezani z debelostjo pri ljudeh korejskega porekla. Izvedli so poskus, kjer so imeli tri vrste mišjih linij: kontrolne miši, miši *ob/ob* ter miši, pri katerih so s hrano z veliko vsebnostjo maščob inducirali debelost. Za vse tri mišje linije so z uporabo RT-qPCR izvedli analize izražanja gena *Sdc3* v tkivu možganov. Ugotovili so, da je izražanje gena *Sdc3* *ob/ob* mišje linije 1,6-krat večje, kot pri kontrolnih miših. Prav tako so ugotovili, da je izražanje gena *Sdc3* v možganih mišje linije, ki so jo hranili z visoko vsebnostjo maščob, 1,5-krat večje, kot pri kontrolnih miših.

Lee in sod. (2005) so izvedli analize izražanja gena *Rstn* (*Rezistin*) pri miših. Rezistin je namreč hormon, ki ga izločajo maščobne celice ter naj bi bil udeležen v razvoju diabetesa tipa II pri debelih ljudeh. Njihov cilj je bil določiti možno povezavo med ravnjo izražanja gena *Rstn* in pojavom inzulinemije in glikemije pri miših. Raven izražanja gena *Rstn* so kvantificirali z metodo RT-qPCR, pri čemer so se osredotočili na belo maščobno tkivo. V raziskavi so uporabili vitke miši C57BL/6J ter številne mišje modele debelosti, vključujuč z dieto inducirane debele miši C57BL/6J, miši hranjene z visoko vsebnostjo maščob TNF- $\alpha^{-/-}$ in miši UCP1-DTA. Ugotovili so, da je raven mRNA *Rstn* enak pri z dieto induciranih debelih miših C57BL/6J in vitkih miših C57BL/6J, kot tudi pri miših divjega tipa ter pri miših TNF- $\alpha^{-/-}$. Mišje linije pa so se razlikovale v koncentraciji proteina RSTN v serumu. V primerjavi s kontrolnimi, vitkimi mišmi, so višje koncentracije zaznali pri z dieto induciranih debelih miših C57BL/6J, TNF- $\alpha^{-/-}$ ter pri miših UCP1-DTA. Njihov sklep je bil, da uravnavanje transkripcije *Rstn* v belem adipoznem tkivu ne sovпадa s koncentracijami cirkulirajočega RSTN v serumu in da ima le-ta malo verjetno vlogo v pojavu neodzivnosti na inzulin in glicemiji pri miših.

Nadler in sod. (2000) so z uporabo mikromrež predhodno dokazali, da je izražanje genov v maščobnem tkivu debelih (*ob/ob*) miši, vključenih v adipogenezo, znižano. Raziskavo so nadaljevali Lan in sod. (2003), ki so z uporabo mikromrež primerjali izražanje genov pri mišji liniji BTBR-*ob/ob*, občutljivi na diabetes ter pri mišji liniji B6-*ob/ob*, ki je na diabetes neobčutljiva. Za potrditev rezultatov mikromrež in razširitev analize pa so nadalje uporabili še metodo RT-qPCR. Analize so izvedli za maščobno tkivo, jetra, skeletne mišice in trebušno slinavko. Ugotovili so, da je izražanje genov v maščobnem tkivu mišjih linij z diabetesom, vključenih v vnetne reakcije, povečano. Rezultati so pokazali tudi, da je izražanje genov vključenih v lipogenezo (pretvorbo glukoze v trigliceride) v maščobnem tkivu mišje linije, podvržene diabetesu, nižje ter se z razvojem diabetesa še znižuje. Ugotovili so tudi, da je v jetrih miši B6-*ob/ob* izraženost genov, vključenih v lipogenezo, povečana. Raziskovalci so zaključili s hipotezo, da povečana izraženost genov, vključenih v lipogenezo, varuje miši B6-*ob/ob* pred diabetesom tipa II.

Stylianou in sod. (2005) so preučili izraženost genov QTL-a *Fob3b*. Izraženost genov so primerjali med linijo miši F ter kongeno linijo, ki je v QTL-u *Fob3b* vsebovala genetsko

ozadje linije L. V prvem delu študije so uporabili metodo mikromrež, s katero so dokazali diferencialno izraženost dokaj velikega nabora genov, med katerimi je bil najbolj pomemben gen *Sqle* (*skvalen epoksidaza*). Za potrditev rezultatov so v drugem delu študije uporabili metodo RT-qPCR, s katero so potrdili in natančno določili raven diferencialne izraženosti gena *Sqle*.

2.5 POZICIJSKI KANDIDATNI GENI NAŠE ŠTUDIJE

2.5.1 Iskanje polimorfizmov v pozicijskih kandidatnih genih QTL-a *Fob3b1*

Pozicijske kandidatne gene QTL-a *Fob3b1*, v katerih smo analizirali prisotnost polimorfizmov med linijama miš F in L, smo izbrali na podlagi raziskave Prevoršek in sod. (2010). Le-ti so bili v omenjeni raziskavi določeni na podlagi sledečih kriterijev:

- nahajanje na QTL-u *Fob3b1*
- tkivo, kjer je gen izražen (predvsem so pomembna jetra, možgani ter maščobno tkivo)
- vloga gena v nalaganju maščevja
- informacije o miših z izničenim genom (povezava z debelostjo)
- prisotnost že znanih polimorfizmov znotraj gena

V poglavjih od 2.5.1.1 do 2.5.1.6 so predstavljeni izbrani pozicijski kandidatni geni QTL-a *Fob3b1*.

2.5.1.1 *Dgat1*

Diacilglicerol O-aciltransferaza 1 (DGAT1) katalizira končni korak v sintezi triaciglycerola, v katerem za substrat uporabi diacilglicerol ter acil CoA (GeneCards, 2010).

Cases in sod. (1998) so preučili klon EST z nepojasnjeno vlogo ter identificirali 47 kDa velik protein, ki je kazal DGAT aktivnost. V celicah insektov, ki so jim vnesli zapis za gen *Dgat*, so v primerjavi s kontrolnimi celicami zaznali več kot desetkrat povečano maso trigliceridov, pri čemer je bila aktivnost DGAT povečana za petkrat. Vlogo DGAT v

sintezi trigliceridov so potrdili na celičnih kulturah adipocitov, kjer je tekom diferenciacije celic v adipocyte prišlo do osemkrat povečane izraženosti gena *DGAT*, ki je sovpadala s povečano aktivnostjo produkta omenjenega gena. Nadalje so v vseh preučenih tkivih sesalcev potrdili izraženost gena *DGAT*, kar je bilo pričakovano glede na osrednjo vlogo *DGAT* v metabolizmu trigliceridov, pri čemer je bilo največjo raven izraženosti zaznati v jetrih, tankem črevesju in maščobnem tkivu. S fluorescentno hibridizacijo *in situ* (FISH) so *DGAT* kartirali na človeški kromosom 8q. Z uporabo interspecifičnega križanja (angl. *interspecific cross*) so kartirali tudi mišji homolog gena *Dgat* na kromosom 15.

Smith in sod. (2000) so mišim izničili gen *Dgat1*. *Dgat1* KO miši so imele telesno maso primerljivo mišim divjega tipa, normalno raven plazemskih trigliceridov ter normalno sestavo maščobnega tkiva. V skeletnih mišicah pa so imele od 30 do 40 odstotkov manj trigliceridov. V splošnem je bila zastopanost maščobnega tkiva manjša, kar nakazuje, da ima DGAT1 pomembno vlogo pri oblikovanju trigliceridnih zalog. Tezo so potrdili tudi s hranjenjem miši s krmo z visoko vrednostjo maščob. Pokazale so se očitne razlike, saj so *Dgat1* KO miši imele v primerjavi z divjim tipom miši 40 odstotkov manjšo vsebnost trigliceridov. Zaključili so, da je sicer možno, da obstaja neka druga signalna pot sinteze trigliceridov, ki pa ni ekvivalentna DGAT1 poti. *Dgat1* KO miši so bile med drugim tudi veliko bolj aktivne od miši divjega tipa, kar bi lahko tudi bil eden možnih vzrokov manjše zastopanosti maščobnega tkiva v *Dgat1* KO miših.

Chen in sod. (2002) so izvedli študijo na transgenih miših, pri katerih je bila izraženost gena *Dgat1* v belem maščobnem tkivu dvakrat večja od normalne. Miši so imele večje maščobne celice in večjo celokupno maso maščob. Bile so tudi bolj občutljive na tip hrane, saj je bila po 15 dneh hranjenja z visoko vsebnostjo maščob njihova teža, glede na divji tip miši, približno 20 odstotkov večja. Povečana zamaščenost ni bila povezana z izpostavitvijo miši velikim odmerkom glukoze, kar so podprtli s testi odpornosti na glukozo in inzulin. Posledično je bila zamaščenost omejena na maščobno tkivo, v jetrih in skeletnih mišicah pa med transgenimi in divjim tipom miši ni bilo razlik. S tem so podprtli lipotoksično hipotezo, ki pravi, da nalaganje trigliceridov v inzulin-občutljivih tkivih sicer povzroči rezistenco na inzulin, kar pa ne velja za maščobno tkivo.

Roorda in sod. (2005) so izvedli študijo na podganah, kjer so z elektroporacijo DNA *in vivo* inducirali prekomerno izraženost gena *Dgat1* v skeletnih mišicah ter preučili njegov vpliv na tvorbo trigliceridnih zalog v mišicah. Prekomerna izraženost gena *Dgat1* je glede na kontrolne osebke povzročila izrazito povečanje intramiocelularnih lipidov (IMCL). V poskusu, kjer so tako *Dgat1* pozitivne, kot kontrolne osebke hrани s hrano z visoko vsebnostjo maščob, je pri obeh skupinah prišlo do povečane tvorbe zalog IMCL, pri čemer je bilo pri *Dgat1* pozitivnih osebkih povečanje skoraj petkratno. Raziskava je pokazala, da *Dgat1* vpliva na tvorbo maščobnih zalog tudi v skeletnih mišicah.

2.5.1.2 *Gpihbp1*

Sidrni protein glikozilfosfatidilinozitol, ki veže lipoproteine visoke gostote (GPIHBP1) je protein, ki se nahaja v endoteliju kapilar, kjer ima ključno vlogo v procesiranju hilomikronov (GeneCards, 2010).

Ioka in sod. (2003) so s kloni cDNA iz jeter glodavcev in analizami izraženosti v celicah ovarijev kitajskega hrčka (angl. *chinese hamster ovary* – CHO) odkrili do tedaj še neidentificiran protein, ki veže lipoproteine visoke gostote (angl. *high density lipoprotein* - HDL). Strukturne analize 228 AK velikega proteina so pokazale, da gre za glikozilfosfatidilinozitol sidrni protein (angl. *glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored protein*), iz česar je sledilo tudi poimenovanje gena. GPIHBP1 na površini celic z veliko afiniteto veže HDL in tako uravnava privzem lipidov iz HDL. Največjo izraženost so zaznali v srčnem tkivu, veliko nižjo raven izraženosti pa še v jetrih in pljučih. V možganih, ledvicah, skeletnih mišicah, vranici in testisih *Gpihbp1* ni bil izražen. Zaključili so, da GPIHBP1 najverjetneje uravnava začetni privzem HDL v celice za nadaljnji transport holesterola.

Beigneux in sod. (2007) so proučili vlogo *Gpihbp1* v metabolizmu plazemskih lipidov. Znano je, da hidroliza trigliceridov v hilomikronih poteče preko lipoprotein lipaz (LPL) (Korn, 1955). Vendar pa do raziskave Beigneux in sod. (2007) še ni bila poznana nobena molekula, ki bi sodelovala pri tem procesu ter ga pospešila. Dokazali so, da sta tako *Gpihbp1* kot *Lpl* najbolj izražena v srčnem in maščobnem tkivu, na ravni celičnih kultur pa

so pokazali, da je GPIHBP1 na površini celic sposoben vezave tako hilomikronov kot molekul LPL. Izvedli so nadaljnjo študijo, v kateri so mišim odstranili gen *Gpihbp1*, kar se je odrazilo v povečani akumulaciji hilomikronov v krvni plazmi - hilomikronemiji. Trend je bil jasno izražen tudi, ko so *Gpihbp1* KO miši hranili z nizko-kalorično hrano, saj je koncentracija trigliceridov v krvni plazmi segala tudi do 5000 mg/dl. Končni sklep je bil, da ima GPIHBP1 pomembno vlogo v procesiranju lipoproteinov, ki so bogati s trigliceridi (torej hilomikronov), reguliranem s strani LPL.

2.5.1.3 *Rhpn1*

Rofilin (angl. *Rhophilin* – *RHPN1*) je vezavni protein brez encimske aktivnosti (GeneCards, 2010).

Hasegawa in sod. (1999) so v raziskavi na podganah odkrili nov dejavnik, ki se veže na odzivni element za glukozo (angl. *glucose response element*) piruvat kinaznega gena ter na odzivni element za inzulin (angl. *inzulin response element*) gena sintaze maščobnih kislin. Poimenovali so ga vezavni protein odzivnega elementa za glukozo (angl. *glucose response element binding protein* – GRBP), ki je sinonim za RHPN1. Izvedli so poskus, v katerem so podganam dajali hrano z visoko vsebnostjo ogljikovih hidratov, kar se je odrazilo v povečani izraženosti *Rhpn1* v jetrih. Nasprotno pa je v jetrih ob uživanju hrane z visoko vsebnostjo maščob, visoko vsebnostjo proteinov in stradanju, prišlo do znižane izraženosti gena *Rhpn1*, s čimer so dodatno podprtli pripisano funkcijo RHPN1.

2.5.1.4 *Cyp11b1* in *Cyp11b2*

11 β -hidroksilaza (CYP11B1) in aldosteron sintaza (CYP11B2) katalizirata končni korak v produkciji glukokortikoidov in mineralokortikoidov (GeneCards, 2010).

Kodirata ju gena *Cyp11b1* in *Cyp11b2*, tesno povezana gena, ki so ju okarakterizirali Mornet in sod. (1989) in se nahajata na človeškem kromosому 8. Njuna homolognost je kar 95-odstotna, oba produkta pa sta sestavljena iz 503 AK. Pri glodavcih aldosteron sintaza katalizira reakcijo, v kateri iz deoksikortikosterona nastane mineralokortikoid

aldosteron, 11 β -hidroksilaza pa deoksikortikosteron pretvori v glukokortikoid, kortikosteron. Pri človeku pa je poglaviti glukokortikoid kortizol (Mullis in sod., 2009). Nefunkcionalnost omenjenih encimov se kaže v kongenitalni adrenalni hiperplaziji (CAH) (White in sod., 1984).

Mullins in sod. (2009) so v raziskavi uporabili *Cyp11b1* KO miši, pri čemer so gen *Cyp11b2* pustili intakten z namenom, da bodo miši lahko še vedno proizvajale mineralokortikoide in bodo tako zmožne preživeti. Raven kortikosterona je pri homozigotnih *Cyp11b1* KO miših, v primerjavi z divjim tipom miši, padel tudi za 18-krat. Nasprotno, toda pričakovano, pa je raven substrata deoksikortikosterona ekstremno narastel. Izničenje gena *Cyp11b1* se je pri miših odrazilo v različnih patoloških stanjih: porušen profil izražanja steroidnih hormonov, toleranca na glukozo, reproduktivne težave, vpliv na krvni pritisk ter neučinkovito uravnavanje elektrolitov. Zaznali so tudi manjšo zastopanost maščobnega tkiva, kar je v skladu z idejo, da glukokortikoidi stimulirajo procese nalaganja maščevja. Na drugi strani pa je prišlo do povečane mase možganov, kar so si raziskovalci razložili z dejstvom, da glukokortikoidi v razvoju možganov signalizirajo konec proliferacije možganskih celic. Pri samcih je bilo opaziti tudi večjo maso ledvic. V *Cyp11b1* KO miših se je povečala izraženost gena *Cyp11b2*, s tem pa raven mineralokortikoidov, ki je bil višji za več kot 30-krat. Posledica je bila hipokalemija in supresija sistema renin angiotenzin. Miši pa so imele tudi povišan krvni pritisk. Na podlagi rezultatov so zaključili, da *Cyp11b1* KO miši predstavljajo dober model proučevanja kongenitalne adrenalne hiperplazije.

V študiji populacij Kitajcev in Japoncev so Ronade in sod. (2001, cit. po Russo in sod., 2007) ugotovili, da je homozigotno stanje -344 C gena *Cyp11b2* povezano s povišano količino glukoze v plazmi ter z intoleranco na glukozo. Nadalje sta Davies in Kenyon (2003, cit. po Russo in sod., 2007) v svoji raziskavi pokazala, da bi lahko imel *Cyp11b2* pomembno vlogo v pojavu visokega pritiska in kardiovaskularnih bolezni. Polimorfizem -344 C>T v genu *Cyp11b2* je bil v veliki meri sovpadal s pojavom arterijske hipertenzije.

Russo in sod. (2007) so v raziskavi, v katero so vključili 1604 ljudi evropskega porekla, preučili zvezo med polimorfizem -344 C>T gena *Cyp11b2* in metaboličnim sindromom, ki

se kaže v številnih posledicah, kot so debelost, hiperglikemija, dislipidemija ter povišan krvni pritisk (Alberti in sod., 2005, cit. po Russo in sod., 2007). Pri moških so rezultati pokazali signifikantno povezavo med aleлом C in metaboličnim sindromom, vendar pa pri ženskah te povezave ni bilo. Pri moških z metaboličnim sindromom, so ugotovili statistično značilno povezavo med aleлом C in povišano ravnjo glukoze v plazmi, opazno višjo zastopanost debelosti ter nižjo ravnjo HDL holesterola.

2.5.1.5 *Gpr20*

Receptor, vezan na G-protein (angl. *G-protein-coupled receptor* – GPR20) je receptor sirota s signalnim delovanjem, ki aktivira ciklični adenozin monofosfat (cAMP) (GeneCards, 2010).

O'Dowd in sod. (1997) so z reakcijo PCR, kjer so uporabili začetne oligonukleotide, osnovane na podlagi zaporedij genov *GPR7* in *GPR8*, identificirali štiri človeške gene *G-protein-coupled receptor* (*GPR*), med njimi tudi *GPR20*. S fluorescentno *in situ* hibridizacijo (FISH) so ga kartirali na kromosom 8q, regijo 24,3-24,2. Northern prenosi so pokazali, da do prepisa gena *GPR20* prihaja v jetrih in možganih. Ligandov, na katere bi se *GPR20* vezal, v študiji niso našli, zato so ga poimenovali receptor sirota *GPR20*.

Brennan in sod. (2003) v svojem patentu razkrivajo, da *Gpr20* KO miši kažejo značilno hiperaktivno vedenje, ki so ga dokazali s testom razdalje, ki so jo omenjene miši prepotovale glede na divji tip miši. S tem so jasno nakazali, da ima *GPR20* nevrfiziološko vlogo. V povezavi s hiperaktivnostjo so pri *Gpr20* KO miših v nekaterih regijah možganov zaznali tudi povišano raven cAMP. Rezultati kažejo, da bi lahko *Gpr20* predstavljal pomembno tarčo za zdravljenje bolezni, povezanih z motnjami v aktivnosti, kot je na primer hiperaktivnost.

Hase in sod. (2008) so preučili receptor GPR20, ki aktivira G-proteine, vendar pa ligand, ki veže GPR20 in njegova funkcija ostajata neznana. Filogenetske analize so pokazale, da je GPR20 soroden receptorjem za nukleotide in lipide, kar kaže na to, da bi lahko GPR20 kot ligande prepoznaval omenjene molekule. Analize izraženosti iz 16 različnih tkiv človeka

so potrdile, da je *GPR20* izražen v vseh tkivih, povišano izraženost pa je bilo zaznati v tankem črevesju. Vzorec izražanja gena *GPR20* so preučili tudi pri miših, ki so potrdile povišano izraženost gena v tankem črevesju. Dokazali so, da lahko GPR20 aktivira G-proteine tudi brez prisotnosti ekstracelularnega liganda. Na ravni celičnih kultur so utišali *GPR20*, zaznati pa je bilo mitogene učinke: povišanje celične proliferacije in povišanje produkcije cAMP. Rezultati nakazujejo, da GPR20 preko nadzorovanja količine celičnega cAMP uravnava raven celične proliferacije.

2.5.1.6 *Tsta3*

Tkivno specifični transplantacijski antigen P53B (*TSTA3*) je vezavni protein za nikotin amid dinukleotid fosfat (NADP(H)), ki katalizira reakcijo, katere končni produkt je gvanozin difosfat (GDP) L-fukoza (GeneCards, 2010).

NADP(H)-vezavni protein, produkt gena *TSTA3*, je bil z afinitetno kromatografijo identificiran leta 1977 (Morelli in De Flora, cit. po Tonetti in sod., 1996). Skupaj z glukozo 6-fosfat dehidrogenazo (G6PD) so ga izolirali iz človeških eritrocitov, prvotno pa so ga poimenovali protein FX. Biokemijsko so ga okarakterizirali, vendar pa je njegova funkcija ostala neznana.

Lenzerini in sod. (1981) so preučili zvezo med nefunkcionalnostjo proteina G6PD Mediteranskega tipa in potrdili pozitivno korelacijo med hemizigoti, heterozigoti in homozigoti *G6PD* Mediteranskega tipa ter koncentracijo proteina FX.

Chang in sod. (1988) so v tkivih sesalcev preučili sintezo L-fukoze. Iz ščitnice prašiča so izolirali encim, ki je kataliziral reakcijo iz GDP-4-keto-6-deoksi-manoze v GDP-L-fukoza. Encim je izkazoval tako epimerazno, kot tudi reduktazno aktivnost, zato so ga poimenovali GDP-4-keto-6-deoksi-manoza-3,5-epimeraza-4-reduktaza.

Funkcija človeškega proteina FX je bila razkrita v študiji, kjer so Tonetti in sod. (1996) na podlagi homologij s proteini iz drugih živalskih vrst ugotovili, da gre za encim, ki katalizira reakcijo med GDP-4-keto-6-deoksi-D-manozo in GDP-L-fukoza. Funkcijo so

preučili s poskusom na celičnih linijah, kjer so potrdili visoko aktivnost pretvorbe GDP-D-manoze v GDP-L-fukozo. Producija GDP-L-fukoze se je z uporabo anti-FX protiteles popolnoma ustavila, s čimer so še dodatno potrdili funkcijo.

2.5.2 Analiza izražanja izbranih kandidatnih genov QTL-a *Fob3b2*

Gene, ki smo jih analizirali z RT-qPCR smo izbrali na podlagi analiz, izvedenih s strani Cirnski (2010a), v katerih so z metodo mikromrež preučili izraženost genov med linijama miši FF in LL. Za izhodišče smo vzeli njihove preliminarne rezultate, ki so med linijama miši FF in LL pokazali najbolj statistično značilno diferencialno izraženost sledečih genov kvantitativnega lokusa *Fob3b2*, opisanih v poglavjih od 2.5.2.1 do 2.5.2.4.

2.5.2.1 *Tst*

Sörbo (1953, cit. po Burton in Akagi, 1971) je s pokusi v kulturi (*in vitro*) prvi raziskal encimsko aktivnost tiosulfat sulfotransferaze (TST). Ugotovil je, da je encim udeležen v detoksifikacijo cianida, in sicer ga pretvori v veliko manj toksičen tiocianat. Gre za mitohondrijski protein, ki je izražen v številnih tkivih, najmočnejšo izraženost pa je zaznati v jetrih (Billaut-Laden in sod., 2006).

Dooley in sod. (1995) so nadalje preučili mišji gen *Tst*. cDNA so pridobili iz komercialne mišje knjižnice cDNA jeter ter jo z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi pomnožili in klonirali v bakteriji *Escherichia coli*. Določili so nukleotidno zaporedje gena *Tst* ter definirali odprt bralni okvir (angl. *open reading frame* – ORF). V bakteriji se je cDNA aktivno prepisovala, potrdili pa so tudi cianid tiosulfat sulfotransferazno aktivnost produkta.

Lee in sod. (1999) so pri miših preučili profil izražanja genov tekom procesov staranja. V skeletnih mišicah so analizirali izražanje genov pri kontrolnih miših ter pri miših, ki so bile podvržene zmanjšanemu vnosu kalorij (angl. *caloric restriction*), kar naj bi pri glodavcih vplivalo na procese staranja. Zaznali so diferencialno izraženost številnih genov, med

drugim tudi gena *Tst*, za katerega se je izkazalo, da je pri miših, ki so podvržene zmanjšanemu vnosu kalorij, dvakrat manj izražen, kot pri kontrolnih miših.

2.5.2.2 *Lgals2*

Galektin-2 (LGALS2) je topni lektin, ki specifično veže beta-galaktozidazo (GeneCards, 2010).

Ozaki in sod. (2004) so na populaciji Japoncev ugotovili povezavo med polimorfizmom gena *Lgals2* in tveganjem za srčno kapjo. Njihov prvotni namen je bil najti molekule, ki delujejo v povezavi s citokinom limfotoksin- α (LTA), katerega vlogo v razvoju srčne kapi so v prejšnji študiji določili Ozaki in sod. (2002). Identificirali so galektin-2, produkt gena *Lgals2*, na katerem so nadalje preučili prisotnost morebitnih polimorfizmov. Uporabili so 32 vzorcev DNA srčnih bolnikov in identificirali 17 SNP-jev. Nato so v študijo zajeli 600 srčnih bolnikov ter 600 kontrolnih oseb in ugotovili, da je pri srčnih bolnikih značilno zastopan SNP 3279 C>T. Rezultate so proučili še na veliko večjem vzorcu, kjer so potrdili povezavo med SNP-jem 3279 C>T in tveganjem za srčno kapjo. Z uporabo plazmidov so potrdili vpliv identificiranega SNP-ja na ravni izraženosti *Lgals2*. In sicer je prišlo pri genotipu 3279 T do skoraj 50 odstotkov nižje izraženosti gena. Proučili so, ali raven intracelularnega galektina-2 vpliva na sekrecijo LTA. Inducirali so tako represijo, kot tudi prekomerno izraženost gena *Lgals2* ter pokazali statistično značilno povezavo med ravnijo izraženosti gena *Lgals2* in stopnjo sekrecije LTA.

2.5.2.3 *Ttc38*

Gen *Tetratrikopeptid 38* (*Ttc38*) kodira protein oz. več proteinov, ki vsebujejo domeno, podobno tetratrikopeptidni. Ta domena namiguje, da ima produkt gena vezavno aktivnost (Mouse Genome Informatics, 2010).

Tetratrikopeptid ponavljača se domena (TTC) je domena, ki je bila prvič identificirana v jedrnem proteinu SSN6 s strani Schultz in sod. (1990), ime pa izhaja iz dejstva, da domena sestoji iz 34 AK (Sikorski in sod., 1990). Do leta 2003 je število znanih proteinov, ki

vsebujejo domeno TTC znatno naraslo, proteini, ki vsebujejo domene TTC pa imajo številne funkcije. Vključeni so v uravnavanje ravni transkripcije, celičnega cikla, aktivnosti šaperonov ter v translokacijo proteinov (D'andrea in Regan, 2003). Cirnski (2010a, 2010b) navaja, da je gen močno izražen v jetrih, možganih ter maščobnem tkivu.

2.5.2.4 *Apol10b*

Apolipoprotein-L 10b (APOL10B) je protein, ki vsebuje domeno, znano pod imenom Apolipoprotein-L (MGI, 2010). Najbližji človeški homologi mišjega gena *Apol10b* so *APOL4*, *APOL3-203*, *APOL2* in *APOL1-201* (Tree Families Database, 2005), zato se bomo osredotočili na opis omenjenih homologov.

Duchateau in sod. (1997) so preučevali lipoproteine visoke gostote (HDL) ter v trebušni slinavki identificirali nov lipoprotein, ki so ga poimenovali apolipoprotein-L (APOL). Protein so biokemijsko okarakterizirali, pridobili zporedje cDNA ter določili ORF. Ugotovili so, da se APOL v plazmi ne nahaja prosto, temveč je vezan na apolipoprotein A-I-vsebujoči lipoprotein (LP(A-I)), ki je podenota HDL-a, prav tako pa so neposredno potrdili prisotnost APOL v HDL, medtem ko v LDL in IDL, APOL niso zaznali.

Page in sod. (2000) so klonirali novo gensko družino šestih *apolipoprotein-L* genov (*APOL-I* do *APOL-VI*). Eden izmed šestih kloniranih genov se je izkazal za *APOL*, prvotno identificiran s strani Duchateau in sod. (1997), zato so ga poimenovali *APOL-I*. Družino genov *APOL* so kartirali na 619 kb veliko genomske regijo človeškega kromosoma 22. S semikvantitativno PCR so dokazali izraženost genov v vseh 24 preučenih tkivih, opazno višjo raven pa so z izjemo *APOL-V* zaznali v placenti. Visoko raven izraženosti je bilo zaznati tudi v pljučih in vranici. Na podlagi njihove zastopanosti v vseh preučenih tkivih raziskovalci sklepajo, da bi proteini APOL lahko imeli zelo pomembno vlogo v izmenjavi lipidov in transportu le-teh po telesu.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 LABORATORIJSKI PRIBOR

Avtomatske pipete	Gilson, Francija
Večkanalna pipeta	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga 5417C	Eppendorf, Nemčija
Kadičke za elektroforezo	Pharmacia, Švedska
Reagenčne posodice	Eppendorf, Nemčija
Pipetni nastavki brez filtra	Brand, Nemčija
Pipetni nastavki s filtrom	Greiner bio-one, Nemčija
Elektroforeza	Pharmacia, Švedska
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, ZDA
Mikrovalovna pečica	Orion, Madžarska
Tehtnica	Sartorius, Nemčija
RNeasy Mini kit	QIAGEN, Nizozemska
Biopulverizer	BioSpec Products, ZDA
Sealin folija 480	Roche Applied Science, Nemčija
Homogenizator	IKA®-Werke, Nemčija
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Nanodrop Products, ZDA
BioAnalyzer	Agilent Technologies, ZDA
Light Cycler 480 II	Roche Applied Science, Nemčija

3.2 LABORATORIJSKE MIŠI

Linije miši Fat (F) in Lean (L), ki smo jih uporabili v diplomski nalogi so rezultat dolgoletne selekcije in izvirajo iz Inštituta Roslin, Univerze v Edinburgu. Izhodiščno linijo so pridobili s križanjem dveh inbridiranih linij JU in CBA, potomce pa so nato križali še s heterogeno mišjo linijo CFLP (Sharp in sod., 1984). Dobili so osnovno populacijo s povprečnim deležem maščob deset odstotkov telesne mase. Prvih 20 generacij so vsako linijo vzgajali v treh replikah, miši pa so odbirali glede na odstotek gonadalnih maščob v

oziru na celotno maso telesa. V 20. generaciji so združili vse tri replike linije F, odbrane na višji odstotek telesnih maščob ter vse tri replike linije F, odbrane na nižji odstotek telesnih maščob. Tako so dobili osnovni dve liniji F in L. Selekcijo so vodili do 53. generacije, po kateri je imela linija F 22-odstotno zamaščenost, medtem ko je imela linija L le štiri odstotke maščobnega tkiva (Bünger in Hill., 1999; Horvat in sod., 2000).

V 53. generaciji so liniji F in L križali med sabo ter pridobili generacijo F1, ki so jo ponovno križali in vzpostavili populacijo miši F2. V tej populaciji so za 436 samcev in samic v starosti 42, 70 in 98 dni pridobili podatke o telesni masi, 14 tednov starim mišim pa so določili odstotek telesnih maščob. V raziskavi so z analizo korelacije odstotka telesnih maščob in stanja genetskih označevalcev določili štiri QTL-e, locirane na kromosomih 2, 12, 15 in X, ki so kazali značilno povezavo z zastopanostjo maščevja pri miših (Horvat in sod., 2000).

Iz te študije so uporabili miš, rekombinantno za QTL *Fob3b* ter razvili kongeni liniji Fchrl15LB in Fchrl15LD. Z linijo F so izvedli pet povratnih križanj in tako dobili omenjeni kongeni liniji z genetskim ozadjem linije F. V petem povratnem križanju so še pregledali odsotnost alelov iz linije L na treh drugih QTL-ih, povezanih z debelostjo, ki se nahajajo na kromosomih 2, 12 in X (Stylianou in sod.; 2004, Horvat in sod., 2000).

Kongeni liniji Fchrl15LB in Fchrl15LD so križali s prejemniško linijo F še nadaljnjih 5-7 generacij, kjer so v 10-12 generaciji z uporabo genetskih označevalcev odstranili še ostale regije QTL-ov. Tekom povratnih križanj so zaznali več rekombinantnih miši za QTL *Fob3b* ter tako razvili nove kongene linije M, D12, E, P, G in K, z različno zastopanostjo maščobnega tkiva. Z uporabo kongenih linij in ostalih bioinformacijskih metod kartiranja QTL-ov so določili kandidatne gene za nalaganje maščevja (Prevoršek in sod., 2010), ki smo jih v diplomske nalogi uporabili za sekvenčne analize (Preglednica 1). Analizo polimorfizmov kandidatnih genov smo izvedli na linijah miši F in L.

Kongeno linijo G so Prevoršek in sod. (2010) nadalje križali z linijo F. Tako so pridobili generacijo F1, kjer so bili vsi potomci heterozigoti (FL). Se pravi, da so imeli na enem kromosomu 15 odsek *Fob3* iz linije L, na drugem kromosomu 15 pa odsek *Fob3* iz linije F.

Nato so te osebke križali med sabo in pridobili F2 generacijo, ki so jo sestavljali vsi trije genotipi (FF, FL in LL). Cirnski (2010a, 2010b) so v diplomskem delu uporabili F2 križance kongene linije G, FF in LL, ter z mikromrežami GeneChip® Gene 1.0 ST Array System-Mouse (Affymetrix), ki pokriva cel genom miši izvedli analize izraženosti genov. Za poskus so uporabili tkiva 13 samic iz generacije F2. Analiza je bila narejena na možganih, gonadalni maščobi in jetrih. Liniji FF in LL sta bili tudi predmet naše raziskave. Na podlagi preliminarnih rezultatov diferencialne izražanosti genov v maščobnem tkivu smo izbrali štiri gene (*Tst*, *Lgals2*, *Ttc38* in *Apoll10b*), ki so bili med linijama FF in LL najbolj statistično značilno diferencialno izraženi. Naša naloga je bila potrditev in kvantifikacija direferencialne izraženosti omenjenih genov v tkivih jeter, možganov ter maščobnem tkivu.

3.3 ISKANJE POLIMORFIZMOV V POZICIJSKIH KANDIDATNIH GENIH QTL-a

Fo3b1

3.3.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za verižno reakcijo s polimerazo

V podatkovni zbirki Ensembl (Ensembl genome browser, 2009) smo na podlagi predhodnih raziskav (Prevoršek in sod., 2010) poiskali nukleotidna zaporedja kandidatnih genov *Fob3b1* (Preglednica 1). V spodnjem meniju levo smo izbrali »Mouse genome«. V iskalni okvir smo vnesli ime, oziroma uradni simbol gena. Izbrali smo rezultat »Ensembl protein coding Gene«. Nato smo v levem meniju »Gene-based displays« izbrali način prikaza »Sequence«.

Sledilo je preverjanje, če izbrana kandidatna zaporedja vsebujejo ponavljalajoče se (repetitivne) elemente. V teh predelih genov se začetni oligonukleotidi ne smejo nahajati, ker lahko to povzroči nespecifično pomnoževanje DNA ali znižanje količine tarčnega produkta. Uporabili smo program RepeatMasker (RepeatMasker, 2009). V stolcu »Services« smo izbrali možnost »RepeatMasking«. Vnesli smo nukleotidno zaporedje gena ter spremenili osnovno nastavitev »DNA source« na »Rodent«. S pritiskom na »Submit Sequence« smo zamaskirali nukleotidno zaporedje gena. Rezultat je lahko prikazan na

različne načine. Izbrali smo možnost prikaza »Masked File«. Nukleotidno zaporedje gena je izpisano na način, da so nukleotidi, kjer se nahajajo repetitivni elementi vsi označeni s črko N. Zamaskirano nukleotidno zaporedje gena smo nadalje uporabili za načrtovanje začetnih oligonukleotidov. Uporabili smo program Primer3 (Primer3 Input (verzija 0.4.0.), 2009). Za vir DNA smo izbrali možnost »RODENT_AND_SIMPLE«. Program ponuja veliko dodatnih nastavitev, mi pa smo uporabili le nekatere. In sicer smo regulirali dolžino začetnih oligonukleotidov (»Primer Size«), število prikazanih zadetkov (»Number To Return«) ter izbrali dolžino nukleotidnega zaporedja, ki ga želimo pomnožiti z dobljenima začetnima oligonukleotidoma (»Product Size Ranges«). Začetni oligonukleotidi (Preglednica 2) so bili dolgi od 20 bp do 24 bp. Noben produkt ni presegal dolžine 700 bp. Vsak izmed začetnih oligonukleotidov je bil zasnovan tako, da se je prilegal vsaj 70 bp pred samim genom, in sicer zato, ker zaporedje na začetku še ni povsem zanesljivo pomnoženo. Pri genu *Dgat1* nas je zanimal le ekson 1, saj so bili ostali eksoni tega gena preučeni že prej (Prevoršek, 2009).

Dobljene začetne oligonukleotide smo nato analizirali z algoritmom BLASTN (Ensembl genome browser, 2009) s katerim smo preverili, če izbrani odsek DNA prilega tudi na drugih mestih po genomu miši. V programu smo izbrali vrsto *Mus musculus* (»Select Species«), nastavili »Search Tool« na možnost »BLAST« ter izbrali senzitivnost iskanja (»Search Sensitivity«) na »Exact Matches«. Pri izbiri naših oligonukleotidov smo poskušali izbrati take, ki se niso nalegali na druga nespecifična mesta v genomu, oziroma so bili odseki in odstotek homologije z drugimi ne-tarčnimi mesti čim nižji.

Preglednica 1: Kandidatni geni kvantitativnega lokusa *Fob3b1* z visoko in srednjo prioriteto

Prioriteta	NCBI36 ID gena	Ensembl56 ID gena	Začetek gena [bp] NCBI36	Konec gena [bp] NCBI36
Visoka prioriteta	<i>Dgat1</i>	ENSMUSG00000022555	76329270	76339073
	<i>Gpihb1</i>	ENSMUSG00000022579	75423897	75425467
	<i>Rhpn1</i>	ENSMUSG00000022580	75531626	75541501
	<i>Ly6a</i>	ENSMUSG00000075602	74825308	74879243
Srednja prioriteta	<i>Cyp11b1</i>	ENSMUSG00000075604	74662150	74668874
	<i>Cyp11b2</i>	ENSMUSG00000022589	74678294	74683480
	<i>Gpr20</i>	ENSMUSG00000045281	73521862	73534760
	<i>Tsta3</i>	ENSMUSG00000022570	75751939	75757008

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi za reakcijo PCR

Ime gena	Pomnoženo območje	Dolžina produkta [bp]	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida (5' – 3')	
			Levi začetni oligonukleotid	Desni začetni oligonukleotid
<i>Dgat1</i>	ekson 1	648	CCTCGGACTACAAATGGACTCT	CTCTACCCAGACTCCCTGGTC
<i>Gpihbp1</i>	ekson 1	546	GCTCAGAACAGCTCAGGTGAC	CGCTAAGTCCTGACCCTAACAT
	ekson 2	582	GGACAAGGAATAGACCTGAGGA	ATGGGGTTCAAGATAAGGTGAGA
	ekson 3	494	CCTGGGTCTCACCTTATCTGAA	AATATTGCACAGTGTGGACTGG
	ekson 4	699	CTTCTGCATCACGCTCGTCT	ATGGGTTGAGGAGAGAGGAAG
	ekson 1	480	CCTTTCTCTCACTCTGGTTGGT	CGTGACTGCTCCAGTGTACTC
<i>Rhpn1</i>	ekson 2	503	GTTGGGATGAGTCAGCCTAC	GGCCTAGTCTGTCTGTGAGGTT
	ekson 3, 4	655	TACTCCAGCGAGGGAACTAAC	TTACGTGGGACCAGAACAGTAG
	ekson 5	373	CAGGTCTTCAACCCTCTCCTT	AGTCAGCTTGTAGTCCCAGGTC
	ekson 6, 7	666	TGCTCTTGAAGGAGCAGTG	ACCAGGACGACCTTCAGAAC
	ekson 8	456	TCTGTGGCAGGAAGTAGTGTG	CTTTAGCGAATGACACAGAGCA
	ekson 9, 10	648	TCAGCTTGGAGTCTAGGGAGAG	ACAGATCAGCAAGGAAGAAAG
	ekson 11	604	GTGGCTCATTCACCTCTTAAT	GGCTGATATCCTCACAGTCTCC
	ekson 12, 13	653	GTAGGGACAGCTAGGCTTGAG	CGTTCACGGACACGATGTAGT
	ekson 14	513	GTGCACATGACTCGAGGAGAG	GACAGTAGCCACGCTATGGAG
	ekson 15	650	CTTCAAATGCCCTAACATGC	GCATCCGCAGAGTAGATGAGG
<i>Cyp11b1</i>	ekson 1	474	CCGAATACATTTCTAGGGCAAG	ATACCTGGAGATGCCTACTGGA
	ekson 2	550	CTGCTCACTGCTGAGAGGATAG	GAAAGGCATGTTCAAGAGCAAGT
	ekson 3	484	GACTTAGTACCTCTGCCAAC	TATCACTGAACCAAGGCAGTCA
	ekson 4	539	CCTGAAGAAGAAAATGCTGGAA	ACAACCCCTGAAGTCACTGTGGA
	ekson 5	491	TTCAAAGAGCTGTGGCAGCTTA	CTTGGCTCAGACATTTACAAG
	ekson 6	571	TTGGCTAGGAATACCATGTCAG	TCAGATATGAAAGGCTTCTCCTG
	ekson 7, 8	688	TATCCCTATGGCTGGTGCTAT	ACTGTGCAGGTTCCATCCTATT
	ekson 9	664	TGGGTAGAAATTGTTAGTGC	ATTGTTTACCAAGGGTGTGA
	ekson 9	669	AGCTTCCTGTTCTGATGACACA	AGAACTGAAAAGCATTGCACAG
	ekson 9	560	AGGATGGAACCTGCACAGTAGT	GAAAGTCAGAAGATGGGCTCAC
<i>Cyp11b2</i>	ekson 1	659	CCCAATCTCCTATGTGGACACT	TCTCTGACCATGTGGAGAAC
	ekson 2	558	GCTGAGAGGATAGAGTGTGTGG	TAGAAAAGCGTATTGCAAGCAG
	ekson 3	622	GTAGGCTGCTTGGAAAGAAAGA	CAAGCTCTGGGTAAGAACAGG
	ekson 4	641	AAGAGAAGGTGCTTCAAAATGC	CACTTCCTATTGTGCATTCCA
	ekson 5	570	CAGGAGACACTGGGTCACT	ATGAGCACTGATCTCTGCATGT
	ekson 6	609	GATCATGAAGGTGCTGAGACAG	ACAGGATAGAGCCTGGAGATGA
	ekson 7, 8	657	TCCATGTTCTCCGTTCTTATCC	CGAGGACCAGCTATAGAGACCT
	ekson 9	591	ATGCTGATGAGCAGTATTGGA	GAAAACATGGGGAGGACTACAC

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime gena	Pomnoženo območje	Dolžina produkta [bp]	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida (5' – 3')	
			Levi začetni oligonukleotid	Desni začetni oligonukleotid
<i>Gpr20</i>	ekson 1	580	ACCCAGCAGATCTTCTTCTCA	TCTCCCCCTCCAAACTCTTTACA
	ekson 2	660	AGGAAGCTGAACCAAACAAAAC	ACTTCACACCCAGCACAGACAG
	ekson 2	683	CTACCTGGCCATTGTGCAAC	CTCCTAGAGCCTTGACCTTGAA
	ekson 2	687	TTCTTACCGAGCTGGAGAAGAAAT	GATAACCCAAGTCCAACCTCTGA
	ekson 2	640	CAACCAGAAGAGTTCACACAG	GGAGCCTAGCACTAGAGAACAGC
<i>Tsta3</i>	ekson 1	478	ACAGGACTCGGTTCCCAGAT	CTGAGCTGATAGCCTACGGTCT
	ekson 2	461	ACAGAGTTGGGTGTCTGTCA	TAAGAGCACAGCCAGCAACTAC
	ekson 3	469	GACAGCTGCTAAAGCTCTGAAC	AAGCAAGCTCAGTCCCAGATAC
	ekson 4	457	AGAGGATGGTGGCTTCTATGAG	ATCATCCTCTTGGCGTATGAGT
	ekson 5	301	TTCCCTGACAAGACCACCTATC	GAATGACATAAATGAGGCAGCA
	ekson 6, 7	686	TGCTGCCTCATTTATGTCAATT	AAGGTTCAAGGATGGTTCTTA
	ekson 8,9	586	CCAAGTCCCCAAGAGTACAAC	ATGGGAAAACGGAATTACTCCT
	ekson 10	470	AGGCAGTGTGGAGGAGTAATT	ATGGTCCCAGTACAGAGGCTAA
	ekson 11	688	CTTGGTCACCAGACCCTTACA	TTCACATCAGACACAGGCTACC

3.3.2 Izolacija DNA iz vranice miši

Za potrebe izolacije smo odrezali petino posamične vranice, preostanek pa smo shranili pri -76°C. Delo je v naslednjih korakih potekalo na ledu. Tkivo smo homogenizirali v 1200 µl pufra LST (20 mM TRIS, pH 7,4 s koncentrirano HCl, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂). Razdelili smo ga na dva dela: po 600 ml v dve 2 ml-reagenčni posodici. Dodali smo 2000 µl TNLB (5% saharoza, 4-odstotni Nonidet P-40 v LST) ter nežno stresali pol minute. Nato smo 5 minut centrifugirali pri 4°C, na 3000 rpm. Supernatant smo odpipetirali ter še enkrat centrifugirali. Ponovno smo odpipetirali supernatant ter peletu dodali 800 µl ACE (50 mM natrijev acetat, 10 mM Na₂EDTA, pH 5,9). Nato smo pelet 20-krat resuspendirali s pipeto. Dodali smo 80 µl 10-odstotnega SDS (10-odstotni natrijevdodecilsulfat v dH₂O) in nežno prestresli. Od tukaj naprej je izolacija potekala na sobni temperaturi v digestoriju. Dodali smo 800 µl fenola. Nato smo enkrat hitro pretresli, nato 1 minuto nežno in počasi. Sledilo je centrifugiranje 5 minut na 13000 rpm. Reagenčne posodice smo nežno prenesli v stojalo, da se faze niso premešale. Vodno fazo (ki se nahaja zgoraj) smo počasi odpipetirali z 1-ml odrezanimi pipetnimi nastavki v novo reagenčno posodico. Dodali smo 400 µl fenola ter 400 µl kloroform. Nato smo reagenčne posodice hitro pretresli, nato pa še 1 minuto nežno in počasi. Sledilo je centrifugiranje na 14000 rpm. Zgornjo vodno fazo smo z

rumenimi odrezanimi pipetnimi nastavki odpipetirali v falkonko. Odmerili smo, koliko imamo vodne faze ter dodali dvakratno količino 96-odstotnega etanola, ki smo ga do tega trenutka hranili na ledu. Mešanico smo nežno premešali, da se je videla DNA, ki smo jo navili na paličko, odcedili ter sprali v 75-odstotnem etanolu. Navito DNA smo prenesli v novo reagenčno posodico ter počakali 10 minut, da se je DNA posušila. Dodali smo 300 µl pufra 1 x TE (10 mM TRIS, pH 7,5 s koncentrirano HCl, 1 mM Na₂EDTA). DNA smo pustili 30 minut, da se je hidrirala in jo nato stresli s paličke v reagenčno posodico. Nato smo DNA za 10 minut izpostavili na 55°C ter jo shranili v hladilnik na -4°C.

3.3.3 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo je metoda za pomnožitev želenega dela DNA vijačnice *in vitro*. En cikel reakcije je sestavljen iz sledečih korakov:

- denaturacija dvostranske vijačnice na 94°C – 96°C
- Prileganje začetnih oligonukleotidov na temperaturi 50°C – 65°C
- Sinteza komplementarne verige na 72°C

Preglednica 3: Končne koncentracije reagentov in pripadajoči volumni za reakcijo PCR

Reagent	Končna koncentracija	1 reakcija Volumen [µl]	5 reakcij Volumen [µl]
deionizirana voda		1,42	7,10*
10 x pufer	1 x	1,00	5,00
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	1,00	5,00
2mM dNTP	200 µM	1,00	5,00
10 pm/µl levi začetni oligonukleotid	0,25 µM	0,25	1,25
10 pm/µl desni začetni oligonukleotid	0,25 µM	0,25	1,25
5 U/µl Polimeraza DNA AmpliTaq	0,4 U	0,08	0,40
SKUPAJ		5,00	25
DNA (5ng/µl)		5,00	25

*V nekaterih primerih smo zaradi boljšega prileganja začetnih oligonukleotidov dodali 1,25 µl formamida, volumen vode pa je bil ustrezno zmanjšan za to volumsko enoto na 5,85 µl.

Za vsak produkt PCR smo naredili štiri ponovitve, in sicer dve za mišjo linijo F in dve za mišjo linijo L. Delo je ves čas potekalo na ledu. Uporabljali smo kadičke z ledom, kjer smo hranili reagente ter hladilno ploščo, na kateri smo imeli mikrotitrsko ploščo. Vse reagente

in vzorce DNA, razen polimeraze DNA AmpliTaq (Fermentas), ki smo jo ves čas hranili v hladilniku na -20°C, smo pred začetkom odtajali na sobni temperaturi ter jih nadalje hranili v kadički z ledom. Reagente smo pred uporabo premešali na vibracijskem mešalniku (vortex) ter kratko centrifugirali. Uporabljali smo pipetne nastavke s filtri, s čimer smo preprečili možno kontaminacijo.

V reagenčni posodici smo pripravili mešanico PCR za pet sekvenčnih reakcij, pri čemer smo nazadnje dodali polimerazo DNA AmpliTaq. Iz hladilnika smo jo vzeli tik pred uporabo ter jo nemudoma vrnili v hladilnik na -20°C. Reagenčne posodice z mešanicami PCR smo nato premešali na vibracijskem mešalniku ter kratko centrifugirali. Najprej smo v posamezne vdolbinice mikrotitrske plošče odpipetirali ustrezne volumske enote mešanice PCR za posamezno sekvenčno reakcijo (iz vsake reagenčne posodice štirikrat po 5 µl), nato smo nanesli še ustrezne vzorce DNA (5 µl). Za vsak vzorec DNA smo nujno uporabili svoj pipetni nastavek, da ne bi slučajno prišlo do kontaminacije. V vsako vdolbinico smo z 1 ml-pipeto odpipetirali še kapljico mineralnega olja, s čimer smo preprečili morebitno izhlapevanje mešanice PCR tekom reakcije. Mikrotitrsko ploščo smo oblepili s prozorno folijo in jo na hladilni plošči odnesli na aparat za reakcijo PCR. Le-ta je potekla v aparaturi za PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Uporabili smo sledeč program reakcije (Preglednica 4), pri katerem smo vedno uporabili možnost »heated lid disabled« ter nastavili ustrezen volumen reakcije.

Preglednica 4: Program, uporabljen za reakcijo PCR

Ime programa	Zala 65
1. korak:	95°C, 3 minute
2. korak	95°C, 1 minuta
3. korak	*65°C, 1 minuta
4. korak	72°C, 1 minuta
5. korak	5-krat nazaj na 2. korak
6. korak	94°C, 15 sekund
7. korak	58°C, 30 sekund
8. korak	72°C, 30 sekund
9. korak	30-krat nazaj na 6. korak
10. korak	4°C

* kjer nismo dobili ustreznega produkta, smo reakcijo PCR ponovili pri temperaturah 62°C, 60°C in 55°C, dokler reakcija PCR ni bila uspešna.

3.3.4 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je metoda, ki se uporablja za ločevanje DNA, RNA ali proteinov, glede na njihovo molekulsko maso. Za razliko od poliakrilamidne gelske elektroforeze, kjer lahko ločujemo molekule velike od 5 do 500 baznih parov, lahko z agarozno gelsko elektroforezo ločujemo molekule, velike od 100 do 50 000 baznih parov. DNA je negativno nabita molekula, zato pod vplivom električnega toka potuje v smeri pozitivno nabite elektrode. Hitrost potovanja in s tem prepotovana pot po določenem času je premo-sorazmerna velikosti molekule DNA. In sicer manjše molekule v električnem polju potujejo hitreje in tako posledično prepotujejo daljšo razdaljo. V našem primeru je metoda služila kot pozitivna kontrola uspešnosti reakcije PCR, torej za identifikacijo želenega produkta DNA.

Dejavniki, ki vplivajo na hitrost potovanja DNA so:

- Dolžina molekule DNA: manjše molekule potujejo hitreje, ker se lažje prebijajo skozi gel in ustvarjajo manjše trenje.
- Oblika molekule DNA: v agaroznem gelu najhitreje potuje superzvita zvita oblika DNA, počasneje linearna in najpočasneje sproščena oblika (pri plazmidih).
- Gostota agaroznega gela: z višanjem koncentracije agaroznega gela se hitrost potovanja molekul zmanjšuje. Za DNA manjše molekule uporabimo bolj koncentriran agarozni gel, kot za večje.
- Električno polje: večji kot je električni tok, hitrejše je potovanje molekul in večji kot je upor, počasnejše je potovanje molekul. Preveliko električno polje lahko povzroči veliko električno prevodnost, pri čemer se sprosti preveč toplotne, ki lahko gel stopi.
- Ionska jakost elektroforetskega pufra: višja kot je ionska jakost pufra, več toka lahko prevaja, kar se kaže v hitrejši ločbi molekul. Preveč ionov lahko tako kot preveliko električno polje povzroči, da se sprošča veliko toplotne, ki lahko gel stopi.
- Barvilo etidijev bromid: vgradi se v DNA in zmanjša mobilnost DNA molekul.

Pri delu smo ves čas uporabljali rokavice (Kimberly Clark), ki so vijolične barve, da se ločijo od ostalih, saj so namenjene uporabi izključno v prostoru za elektroforezo. Uporabljali smo elektroforetski aparat (Pharmacia) z razdaljo med elektrodama 44 cm. Za

pripravo gela smo uporabljali agarozo SeaKem LE (Cambrex) ter pufer 0,5xTBE, ki smo ga pripravili iz reagentov, predstavljenih v Preglednici 5.

Preglednica 5: Priprava pufra 0,5xTBE

Reagent	Volumen
10xTBE	100 ml
Etidijev bromid	40 µl
Deionizirana voda	1,9 l

Pufer 10xTBE smo predhodno pripravili z uporabo litrske čaše, kamor smo natočili približno 500 ml deionizirane vode. Na tehtnici (Sartorius) smo zatehtali potrebne reagente (Preglednica 6) in jih prenesli v čašo. Uporabili smo se magnetno mešalo, da so se vsi reagenti popolnoma raztopili. Z deionizirano vodo smo nato dopolnili volumen do enega litra.

Preglednica 6: Priprava pufra 10xTBE

Reagent	Količina
0,5 M TRIS pufer	60,5 g
0,5 borova kislina	30,85 g
10 mM EDTA	3,72 g
deionizirana voda	do skupnega volumna 1 liter

Za vsak postopek elektroforeze smo uporabili 600 ml 4-odstotnega agaroznega gela. Pripravili smo ga tako, da smo v litrsko čašo nalili 600 ml pufra 0,5xTBE in dodali 24 g agaroze. Čašo smo pokrili s prozorno folijo, da je bilo izhlapevanje manjše. Folijo smo naluknjali, da se zaradi povečanega pritiska ne bi strgala. Gel smo segrevali do vreliča dvakrat po 10 minut, vmes in po tem pa smo uporabili magnetno mešalo, da je bil gel povsem homogen. Pripravili smo elektroforetski kalup, tako da smo ga oblepili z lepilnim trakom. Vanj smo vlili gel ter pričvrstili glavnice. S pinceto smo odstranili morebitne mehurčke v gelu, nato pa počakali najmanj pol ure, da se je gel strdil. Pazljivo smo odstranili glavnice, gel pa prenesli v elektroforetsko kadičko ter ga prelili s pufrom 0,5xTBE, da je bil gel pod gladino.

Pred nanašanjem vzorcev smo v vsako vdolbinico mikrotitrsko plošče, kjer so bili naši vzorci, z multikanalno pipeto nanesli 7 µl nanašalnega pufra ksilencianol (XC) (angl.

loading buffer). Z večkanalno pipeto smo nato v žepke prenesli celoten volumen naših vzorcev. Elektroforeza je potekala 120 minut pri napetosti 160 volтов. Gele smo fotografirali v transiluminatorju Gel Doc 1000 s programom Molecular Analyst ter rezultate shranili v obliki *.tif datotek.

3.3.5 Verižna reakcija s polimerazo za potrebe sekvenciranja

Ko smo za posamezne gene na gelih dobili pozitivne rezultate, smo ponovno izvedli reakcije PCR, kakor je opisano v protokolu v poglavju 2.3.3, le da so bili uporabljeni volumni reagentov sledeči:

Preglednica 7: Reakcija PCR za namen sekvenciranja

Reagent	Volumen 1x [μl]	Volumen 5x [μl]
Deionizirana voda	8,88	35,50*
10x pufer	6,25	25,00
25 mM MgCl ₂	6,25	25,00
2 mM dNTP	6,25	25,00
100 mM levi z. o.	1,56	6,25
100 mM desni z.o.	1,56	6,25
5 U/μl Polimeraza DNA AmpliTaq	0,50	2,00
SKUPAJ	31,25	125
DNA (5ng/μl)	31,25	

*V nekaterih primerih smo zaradi boljšega prileganja začetnih oligonukleotidov dodali 6,25 μl formamida, volumen vode pa je bil ustrezno zmanjšan za to volumsko enoto na 29,25 μl. z.o.: začetni oligonukleotid

Mešanico PCR in ustrezne vzorce DNA smo odpipetirali v označene nize mikrotitrskih ploščic, pri čemer nismo dodali mineralnega olja. Po končani reakciji PCR, ki je potekla na ustrezni temperaturi prileganja (Preglednica 18) smo del volumna uporabili, da smo izvedli agarozno gelsko elektroforezo ter na gelih preverili, ali smo res dobili enotne produkte. Elektroforeza je potekala tako, kot je opisano v zgornjem protokolu (Poglavlje 2.3.4). Pripravili smo 25 μl neočiščenega produkta PCR ter ga skupaj z začetnimi oligonukleotidi poslali podjetju Macrogen, Inc, ki je določilo nukleotidna zaporedja naših produktov.

3.3.6 Poravnava nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja smo dobili elektronsko v obliki datotek *.abi. Za urejanje in poravnavo sekvenc smo uporabili program MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, 2010). Naenkrat smo urejali in poravnali po štiri nukleotidna zaporedja iz istega genomskega odseka mišjih linij F in L (dve zaporedji iz linije F in dve iz linije L). V meniju »Alignment« smo izbrali možnost »View/Edit Sequencer Files« ter odprli želene datoteke. Z uporabo funkcije »Mask Downstream/Upstream of the Cursor« v meniju »Edit« smo odrezali začetne in končne dele zaporedij, ki so bili nedefinirani oz. zelo slabi. Da je zaporedje slabo je razvidno iz kromatograma, ki nima izraženih posameznih vrhov (Slika 4). Nato smo pregledali vrhove posameznega kromatograma zaporedja. Z znanjem o branju kromatogramov smo spremenili nukleotidno zaporedje, če in kjer je bilo to potrebno. Nato smo v »Trace Editorju« z možnostjo »Add to Alignment Explorer« v meniju »Data« dodali zaporedja v »Alignment Explorer«. Iz podatkovne zbirke Ensembl (Ensembl genome browser, 2010) smo pridobili zaporedja genov, kot je opisano v poglavju 3.3.1 ter z možnostjo »Insert Blank Sequence« v meniju »Edit« dodali še ustrezni ekson gena. Z ukazom Ctrl+A smo izbrali vsa zaporedja ter jih poravnali z možnostjo »Align by ClustalW« v meniju »Alignment«. V primeru, kjer smo našli polimorfizme posameznega nukleotida, smo preverili, če spremenjeno nukleotidno zaporedje povzroči tudi spremembo AK proteina. S tehniko iskanja odprtrega bralnega okvira smo prilagodili začetek nukleotidnega zaporedja tako, da smo v zavihku »Translated Protein Sequences« dobili AK zaporedje, ustrezno zaporedju iz podatkovne zbirke Ensembl. Pregledali smo še, ali se sprememba nahaja v domeni proteina. V podatkovni zbirki Ensembl smo poiskali gen, tako kot je opisano zgoraj. V preglednici smo izbrali »ID« proteina in v levem razdelku kliknili »Domains&features« ter preverili, če gre za spremembo v domeni proteina.

3.4 ANALIZA IZRAŽANJA IZBRANIH KANDIDATNIH GENOV QTL-a *Fob3b2*

3.4.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za RT-qPCR

Na podlagi preliminarnih rezultatov izražanja genov diplomskega dela Cirnski (2010a), kjer so z mikromrežami preučili izražanje genov v maščobnem tkivu F2 križancev FF in LL kongenih mišjih linij G, smo izbrali štiri najbolj statistično značilno diferencialno izražene gene v maščobnem tkivu mišjega kromosoma 15 (Preglednica 8). Začetne oligonukleotide za RT-qPCR smo zasnovali na spletni strani Roche Applied Science (Roche Applied Science, 2010). Na osnovni strani smo izbrali kategorijo »PCR, Quantitative Assays«. Odpre se nova stran, kjer smo v meniju levo izbrali možnost »Assay Design Center«, vrsto pa nastavili na *Mus musculus* (Mouse). Vnesli smo GenBank ID gena in izbrali prva dva najboljša rezultata. Za vsak slučaj smo preverili še mesto prileganja vsakega posameznega začetnega oligonukleotida. V preglednici 9 so predstavljeni izbrani začetni oligonukleotidi.

Preglednica 8: Geni, ki smo jih analizirali z RT-qPCR

NCBI ID gena	GenBank ID gena	Začetek gena NCBI36 [bp]	Konec gena NCBI36 [bp]	p-vrednost	Izraženost [LL/FF]
<i>Tst</i>	NM 009437	78229695	78236295	0,001	2,19
<i>Lgals2</i>	NM 025622	78681292	78685959	0,001	1,96
<i>Ttc38</i>	NM 00103337	85662736	85689252	0,002	1,44
<i>Apol10b</i>	NM 177820	77414588	77473733	0,004	1,80

Preglednica 9: Začetni oligonukleotidi za RT-qPCR

Ime gena	Različica	Dolžina produkta [bp]	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	
			Levi začetni oligonukleotid	Desni začetni oligonukleotid
<i>Tst</i>	1	82	CCAGCTGGTGGACTCTCG	GTGGCCCGAGTCTAGTCCT
	2	139	CGGAGCCGGATATAGTAGGA	TCCACCTTCTTGTCCCTGGAA
<i>Lgals2</i>	1	76	AGCAACTGGGAGAGCTGTG	GGTTTCATGTTCAGGTCTTGAG
	2	129	TCCAGGGTCAGAGGTCAAGA	CCCATGCTCAAGTAGTGCAG
<i>Ttc38</i>	1	83	GTGGAGATGTTGCCAAGG	AACATGTCTGTCGGGTGGTC
	2	110	TGCCTACTTCTACCTGGGCTA	AATAGATGCCTTCACGTAGCTG
<i>Apol10b</i>	1	77	AGCCTGGAAGGCATTGA	TCTCCTTCAGAGCATCACGA
	2	78	CGTGGCTGCAGGAAGATT	GCACCAAGCTAGCCATTAG

3.4.2 Izolacija RNA

Za namen analiz izraženosti genov smo izolirali RNA iz 24 vzorcev tkiv (Preglednica 12), ki smo jo pridobili iz samic miši FF in LL. Samice smo izbrali zato, ker so predhodni rezultati pokazali, da je variabilnost fenotipskih lastnosti, povezanih z debelostjo, pogosto manjša kot pri samcih.

Za izolacijo RNA smo uporabili komplet reagentov RNeasy Tissue Mini (Qiagen). Pred začetkom izolacije smo si pripravili vse potrebne reagente. Vodo z odsotnostjo RNaz (angl. *RNase free H₂O*) smo pripravili, kot je navedeno v Preglednici 10, dali čez noč na 37°C in še dvakrat avtoklavirali.

Preglednica 10: Priprava vode z odsotnostjo RNaz

Reagent	Volumen
MiliQ H ₂ O	1 l
DEPC	1 ml

Homogenizator (Ika® Werke) smo pred uporabo sprali z vodo DEPC-miliQ, nato z 0,2 M NaOH in spet z vodo DEPC-miliQ. Med posameznimi homogeniziranjami smo ga vedno sprali z vodo DEPC-miliQ. Končno spiranje pa je potekalo tako kot začetno, s tem, da smo na koncu sprali še s 76-odstotnim etanolom. Potrebovali smo tudi 70-odstotni etanol, ki smo ga pripravili iz 96-odstotnega tako, da smo ga razrečili z ustreznim volumskim razmerjem vode z odsotnostjo RNaz. Pufer RPE smo skladno s protokolom razredčili s 96-odstotnim etanolom v razmerju 1:4. Da nam ni bilo potrebno uporabiti celotne mase izoliranih tkiv, smo le-ta predhodno zmleli z Bio-pulverizerjem (BIOSPEC PRODUCTS, INC). Preko noči smo ga shladili na -76°C. Vzorce ter označene prazne 2 ml-reagenčne posodice smo imeli ves čas na suhem ledu. Biopulverizer smo prenesli v tekoči dušik in pustili toliko časa, dokler se gladina tekočega dušika ni umirila, kar je pomenilo, da je Biopulverizer ohlajen na ustrezno temperaturo. Nato smo ga vzeli iz tekočega dušika, vzdignili bat Biopulverizerja, dali notri tkivo, bat namestili nazaj ter s kladivom zdrobili tkivo in zdrobljeno tkivo prenesli v novo označeno 2 ml-reagenčno posodico. Biopulverizer smo po vsakem drobljenju očistili s papirnatimi brisačkami. Za končno čiščenje pa smo uporabili tudi 76 odstotni etanol. Nato smo v predhodno ohlajene falkonke

na -76°C zatehtali ustezno maso zdrobljenega tkiva ter odpipetirali pripadajočo količino TRizol reagenta (Preglednica 11). Tkivo smo nato nemudoma homogenizirali s homogenizatorjem ter homogenat za 15 minut pustili na sobni temeperaturi. V reagenčno posodico smo prenesli 1 ml homogenata ter v digestoriju dodali 200 µl kloroform. Previdno smo zaprli reagenčno posodico in jo 15 sekund močno stresali. Reagenčno posodico smo za tri minute pustili na sobni temperaturi. Nato smo 15 minut centrifugirali na 12000 x g pri 4°C. Reagenčno posodico smo vzeli ven, temperaturo centrifuge pa smo nastavili na sobno. Po centrifugiranju so bile vidne tri faze. Zgornjo, vodno fazo, ki je vsebovala RNA, smo prenesli v novo reagenčno posodico. Dodali smo 600 µl 70 odstotnega etanola ter premešali na vibracijskem mešalniku. Hitro smo prešli na naslednji korak, kjer smo prenesli 700 µl vzorca v RNeasy spin kolono, ki leži v zbiralni tubi. Nežno smo zaprli pokrovček in centrifugirali 15 sekund na 8 000 x g na sobni temperaturi. Kar se je nabralo v zbiralni tubici, smo zavrgli, isto izbiralno tubico pa smo uporabili še v naslednjih treh korakih. Ponovili smo prejšnji korak, kjer smo v kolono odpipetirali preostanek vzorca. Kar se je nabralo v zbiralni tubici smo ponovno zavrgli. V RNeasy spin kolono smo dodali 700 µl pufra RW1. Nežno smo zaprli pokrovček ter na sobni temperaturi centrifugirali 15 s pri 8 000 x g. Kar se je nabralo v zbiralni tubici smo zavrgli, pri čemer smo zelo pazili, da kolona ni prišla v fizični kontakt z vsebino v zbiralni tubici. Dodali smo 500 µl pufra RPE. Nežno smo zaprli pokrovček kolone in centrifugirali 15 sekund pri 8 000 x g. Ponovno smo dodali 500 µl pufra RPE, s tem da smo centrifugirali 2 minuti pri 8 000 x g. RNeasy spin kolono smo prenesli v novo 2 ml zbiralno tubico, staro pa smo skupaj z njeno vsebino zavrgli. Nežno smo zaprli pokrovček ter centrifugirali 1 minuto na 14 000 x g. RNeasy spin kolono smo prenesli v novo 1,5 ml tubico. Pri izolaciji RNA iz jeter in možganov smo dodali 50 µl vode z odsotnostjo RNaz, pri gonadalni maščobi pa 25 µl. Nato smo centrifugirali 1 minuto na 8 000 x g. Izolirano RNA smo shranili na temperaturi -76°C.

Uspešnost izolacije RNA smo analizirali z NanoDrop ND-1000 spektrofotometrom (Nanodrop Products), kjer smo izmerili koncentracijo RNA in razmerji valovnih dolžin 260/280 ter 260/230. Poleg tega smo ocenili tudi kvaliteto RNA - vrednost RIN (angl. *RNA integrity number*) (Agilent Technologies) (Preglednica 19). Z razmerjem absorbanc 260/280 smo analizirali prisotnost proteinov, fenola ter drugih možnih kontaminantov.

Čistost izolirane RNA pa smo določili še z merjenjem razmerja absorbanc 260/230. Z algoritmom RIN smo ocenili nerazgrajenost RNA.

Preglednica 11: Razmerja med maso tkiva in volumnom reagenta TRIzol

Tkivo	m tkiva [mg]	V Trizola [ml]	Razmerje [m/V]
jetra	20	2	10:1
gonadalna maščoba	40	2	20:1
možgani	100	2	50:1

Preglednica 12: Vzorci, uporabljeni za reakcijo RT-qPCR

Vzorec						
Jetra	Možgani	Gonadalna maščoba	Linija	Spol	Žival	Genotip
1740	1742		G	Samice	15FHG12-F2 3A (31c)	FF
1704	1706		G	Samice	15FHG12-F2 2C (4c)	FF
1644	1646	1647	G	Samice	15FHG12-F2 1A (10c)	FF
1905	1907		G	Samice	15FHG12-F2 12D (1c)	FF
		1920	G	Samice	15FHG12-F2 12C (13c)	FF
		1247	G	Samice	15FHG10-F2 6A (10c)	FF
1813	1815	1816	G	Samice	15FHG12-F2 7C (30c)	LL
1929	1931		G	Samice	15FHG12-F2 13A (1c)	LL
1941	1943		G	Samice	15FHG12-F2 14D (1c)	LL
1579/N	1580	1581	G	Samice	15FHG10-F2 20C (30c)	LL
		1280	G	Samice	15FHG10-F2 8B (30c)	LL

3.4.3 RT-qPCR za namen nadaljnje validacije začetnih oligonukleotidov

Pred začetkom smo z RNaze Away (Invitrogen) poškropili delovno površino in ves uporabljen laboratorijski pribor. Reagente (Invitrogen) smo odtajali, jih premešali na vibracijskem mešalniku in centrifugirali ter jih tekom postopka hranili v kadičkah z ledom. Začetne oligonukleotide smo validirali iz petih vzorcev jeter (1929, 1813, 1740, 1644, 1905), v katerih smo pridobili najvišje koncentracije RNA (Preglednica 19). Iz vsakega vzorca smo odpipetirali 10 µg RNA ter z DEPC H₂O dopolnili volumen do 10 µl. V naslednjem koraku smo odstranili DNaze. V vdolbinico mikrotitrsko ploščice smo odpipetirali:

- 5 µl vzorca RNA (iz vsakega vzorca RNA po 1µl)
- 5 µl DNaze
- 5 µl pufer DNaze
- 35 µl DEPC H₂O

Vzorec smo na sobni temperaturi inkubirali 15 minut. Nato smo dodali 5 µl 25 mM EDTA. Sledila je 10-minutna inaktivacija DNaz na 65°C. Vzorec smo nato razdelili na dva dela in odpipetirali ustrezne volumne (Preglednica 13):

Preglednica 13: Priprava pozitivne in negativne kontrole reakcije RT-qPCR

Reagent	RT-negativna [µl]	RT-pozitivna [µl]
RNA tretirana z DNazo	10	40
5xSS pufer	20	20
DTT	5	5
»RNase out«	2,5	2,5
dNTP-ji	5	5
Naključni začetni oligonukleotidi	5	5
DEPC H ₂ O	52,5	21,5
Superscript RT	/	1
Skupaj	100 µl	100 µl

Vzorca smo nato inkubirali po sledečem programu:

- 10 min pri 25°C
- 60 min pri 50°C
- 15 min pri 70°C

Po inkubaciji smo v reagenčnih posodicah pripravili petkratne redčitvene vrste RT-pozitivnih (0x, 5x, 25x, 125x, 625x, 3125x), s končnim volumenom 80 µl. Posebej smo bili pozorni, da smo v vsakem koraku izvedli mešanje na vibracijskem mešalniku in na hitro centrifugirali. Vzorce smo do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku na 4°C.

3.4.4 Validacija začetnih oligonukleotidov

Založne raztopine 100 µM-začetnih oligonukleotidov smo pred začetkom odtajali, premešali na vibracijskem mešalniku ter na hitro centrifugirali. Za potrebe validacije smo na sobni temperaturi pripravili devet mešanic začetnih oligonukleotidov, za vsak gen dva različna para začetnih oligonukleotidov ter za gen *ciklofilin*, ki je prestavljal pozitivno kontrolo (Preglednica 14). Do nadaljnje uporabe pa smo mešanice shranili na ledu.

Preglednica 14: Priprava 2,5 µM mešanice začetnih oligonukleotidov za RT-qPCR

Reagent	V [µl]
levi začetni oligonukleotid	12,5
desni začetni oligonukleotid	12,5
H ₂ O	475

Pripravili smo si devet mešanic PCR (Preglednica 15). SybrGreen (Roche) smo do uporabe hranili na ledu, zavitega v alu-folijo, saj pod vplivom svetlobe začne razpadati. Pred pričetkom priprave mešanice PCR smo ugasnili luči, nato pa smo vsako pripravljeno mešanico PCR sproti položili v posodo z ledom ter jo pokrili z alu-folijo, da ni bila izpostavljena svetlobi.

Preglednica 15: Priprava reakcijskih mešanic za RT-qPCR

Reagent	1 posodica [µl]	3 posodice + 1 dodatna [µl]	9-krat [µl]
H ₂ O	1,15	4,6	41,4
SybrGreen	2,5	10	90
Mešanica začetnih oligonukleotidov	0,6	2,4	21,6

Pripravili smo si devet nizov mikrotitrskih ploščic, v katerih je imela vsaka vrstica sledeče zaporedje nanosov DNA vzorcev:



Slika 1: Zaporedje nanosa vzorcev na mikrotitrsko ploščo

*Pri čemer –RT, predstavlja negativno kontrolo RT; NTC (angl. *no template control*) kamor smo nanesli H₂O. Posodice od 3 od 8 pa so ustrezne RT pozitivne redčitve DNA.

V vsako vrstico smo z večkanalno pipeto (Kemomed) odpipetirali 3 µl ustreznega vzorca DNA oz. kontrole. V vsak niz mikrotitrskih ploščic smo dodali 17 µl predhodno pripravljene mešanice PCR (v vsako vrstico ustrezno mešanico PCR). Nize mikrotitrskih ploščic smo premešali na vibracijskem mešalniku in na hitro centrifugirali.

Vzorce iz nizov mikrotitrskih ploščic smo z večkanalno pipeto prenesli na mikrotitrsko ploščo s 384 vdolbinicami. V vsako vdolbinico smo prenesli 5 µl vzorca, pri čemer smo za vsak vzorec naredili tri ponovitve. Mikrotitrsko ploščo smo prekrili s folijo Sealin 480 (Roche) in jo kar se da učinkovito zatesnili na ploščo. Mikrotitrsko ploščo smo premešali na vibracijskem mešalniku ter na hitro centrifugirali. Sledila je RT-qPCR v aparaturi Light Cycler 480 II (Roche) po sledečem programu (Preglednica 16):

Preglednica 16: Program validacije začetnih oligonukleotidov za RT-qPCR

Faza	Temperatura [°C]	Čas	Št. ciklov
Pred-inkubacija	95	5 min	1
pomnoževanje	95	10 s	41
	60	10 s	
	72	10 s	
	95	5 s	
Talitvena krivulja	65	60 s	1
	97	kontinuirano	
Ohlajanje	40	30 s	1

Po končani reakciji smo pregledali grafe ter učinkovitosti (E) posameznega para začetnih oligonukleotidov. Glede na učinkovitost reakcije smo izbrali pare začetnih oligonukleotidov (Preglednica 20).

3.4.5 Obratna transkripcija za namen RT-qPCR

Za namen RT-qPCR smo s kompletom reagentov SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen) izvedli obratno transkripcijo vzorcev RNA. Pri delu smo uporabljali pipetne nastavke s filtri. Pred pričetkom smo si označili razpored vzorcev na nizih mikrotitrskih ploščic. Delovno površino ter laboratorijsko orodje smo pred uporabo razpršili z RNaze Away. Vzorce RNA in vse reagente smo hranili na ledu ter jih pred uporabo premešali na vibracijskem mešalniku in na kratko centrifugirali. Pri maščobah smo odvzeli volumen, ki je ustrezal masi 2,5 µg mRNA, pri jetrih in možganih pa volumen, ki je bil ekvivalenten 2 µg mRNA. S H₂O smo volumen dopolnili do 11 µl. Od tu naprej smo delali po navodilih proizvajalca (SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis). Pridobljeno cDNA smo do nadaljnje uporabe shranili pri -20°C.

3.4.6 RT-qPCR – metoda ΔCt , korigirana glede na učinkovitost pomnoževanja

Glede na rezultate validacije začetnih oligonukleotidov (Preglednica 20) smo iz vsakega para začetnih oligonukleotidov, ki se prilegata na isti gen, izbrali najustreznejšega (Preglednica 20 – označeni z odbeljenim tiskom). Poleg tega smo uporabili še dva referenčna gena, *Gapdh* in *Actb*. Pred delom smo si pripravili razporeditev vzorcev na mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami ter s 384 vdolbinicami. Pred vsako uporabo smo vse reagente in vzorce cDNA odtajali, premešali na vibracijskem mešalniku in na kratko centrifugirali. Vse vzorce cDNA smo najprej štirikrat razredčili. V nove nize mikrotitrskih ploščic smo prenesli 10 µl vzorca cDNA in 30 µl H₂O. Nize mikrotitrskih ploščic smo ponovno premešali na vibracijskem mešalniku in na kratko centrifugirali. Istočasno smo analizirali največ tri gene, kar je bilo glede na število vzorcev maksimalno možno. Za vsak gen smo pripravili osnovno zmes (angl. *master mix*) (Preglednica 17).

Preglednica 17: Osnovna zmes posameznega gena za RT-qPCR

Reagent	1x (3 ponovitve) [µl]	40x [µl]
H ₂ O	4,6	184
Sybr Green	10	400
2,5 mM mešanica začetnih oligonukleotidov	2,4	96

Od tega koraka dalje smo delali po identičnem postopu, opisanem v poglavju 3.4.4 - Validacija začetnih oligonukleotidov. RT-qPCR smo izvedli za vsak gen v vsakem tkivu – tudi za referenčne gene, tako da smo pridobili vrednosti Cp v vseh vzorcih, tako za preučevane kot referenčna gena. Pridobljene surove rezultate (uspešnost reakcije ter vrednosti Cp) smo analizirali po metodi Vandesompele in sod. (2002).

4 REZULTATI

4.1 ISKANJE POLIMORFIZMOV V POZICIJSKIH KANDIDATNIH GENIH QTL-a

Fob3b1

4.1.1 Pregled agaroznih genov in določitev Tm začetnih oligonukleotidov

Po vsaki reakciji PCR pri določeni temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov smo izvedli agarozno elektroforezo in gele fotografirali ter pregledali v transiluminatorju Gel Doc 1000 (BioRad Laboratories). Slike gelov smo shranili v obliki *.tif datotek. Če je bilo na gelu razvidno, da je signal samo eden (Slika 2), je to za nas pomenilo, da je produkt specifičen in je temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov ustrezno določena (v primeru na Sliki 2 je to 60°C z dodatkom formamida). V nasprotnem primeru, kot je razvidno na Sliki 3, pa smo reakcijo PCR ponovili pri drugi temperaturi prileganja z ali brez dodatka formamida. V Preglednici 18 so navedene temperature prileganj začetnih oligonukleotidov. Za analizo genov *Dgat1* 1 in *Gpr20* 1 nam ustrezne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov ni uspelo določiti. Poleg tega nam za gen *Ly6a* ni uspelo zasnovati začetnih oligonukleotidov, saj omenjeni gen spada v veliko družino genov, med katerimi imajo nekateri praktično identično nukleotidno zaporedje, zato ni bilo moč najti ohranjenih zaporedij, kamor bi se začetni oligonukleotidi specifično vezali.

Preglednica 18: Temperature prileganj začetnih oligonukleotidov

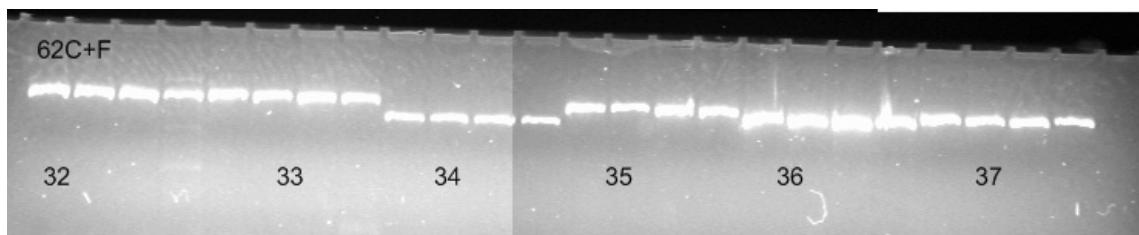
PCR produkt	Temperatura prileganja					
	50°C+F	55°C+F	60°C+F	62°C+F	65°C+F	65°C
<i>Cyp11b1</i> ekson 1					OK	
<i>Cyp11b1</i> ekson 2					OK	
<i>Cyp11b1</i> ekson 3					OK	
<i>Cyp11b1</i> ekson 4			X	OK	X	
<i>Cyp11b1</i> ekson 5						OK
<i>Cyp11b1</i> ekson 6	OK	X	X	X		
<i>Cyp11b1</i> ekson 7,8	OK	X	X	X		
<i>Cyp11b1</i> ekson 9						OK
<i>Cyp11b1</i> ekson 9						OK
<i>Cyp11b1</i> ekson 9						OK

se nadaljuje

nadaljevanje

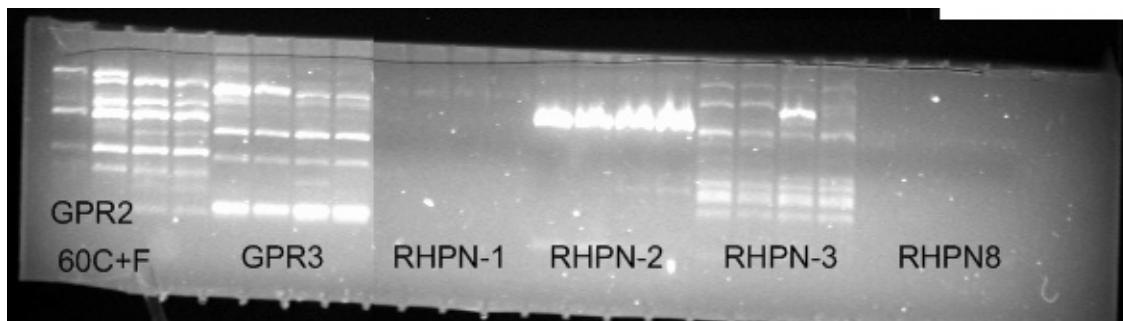
PCR produkt	Temperatura prileganja					
	50°C+F	55°C+F	60°C+F	62°C+F	65°C+F	65°C
<i>Cyp11b2</i> ekson 1						OK
<i>Cyp11b2</i> ekson 2					OK	X
<i>Cyp11b2</i> ekson 3						OK
<i>Cyp11b2</i> ekson 4						OK
<i>Cyp11b2</i> ekson 5					OK	
<i>Cyp11b2</i> ekson 6			OK	OK	X	
<i>Cyp11b2</i> ekson 7,8					OK	
<i>Cyp11b2</i> ekson 9					OK	
<hr/>						
<i>Dgat1</i> ekson 1	X	X	X	X	X	
<hr/>						
<i>Gpihbp1</i> ekson 1					OK	
<i>Gpihbp1</i> ekson 2					OK	
<i>Gpihbp1</i> ekson 3					OK	
<i>Gpihbp1</i> ekson 4					OK	
<hr/>						
<i>Gpr20</i> ekson 1	X	X	X	X	X	
<i>Gpr20</i> ekson 2			X	OK	X	
<i>Gpr20</i> ekson 3			X	OK	X	
<i>Gpr20</i> ekson 4						OK
<i>Gpr20</i> ekson 5						OK
<hr/>						
<i>Rhpn1</i> ekson 1		OK	X	X	X	
<i>Rhpn1</i> ekson 2			OK	OK	X	
<i>Rhpn1</i> ekson 3,4			X	OK	X	
<i>Rhpn1</i> ekson 5						OK
<i>Rhpn1</i> ekson 6,7						OK
<i>Rhpn1</i> ekson 8						OK
<i>Rhpn1</i> ekson 9,10						OK
<i>Rhpn1</i> ekson 11			X	OK	X	
<i>Rhpn1</i> ekson 12,13			X	OK	X	
<i>Rhpn1</i> ekson 14			X	OK	X	
<i>Rhpn1</i> ekson 15					OK	
<hr/>						
<i>Tsta3</i> ekson 1					OK	
<i>Tsta3</i> ekson 2					OK	
<i>Tsta3</i> ekson 3					OK	
<i>Tsta3</i> ekson 4					OK	
<i>Tsta3</i> ekson 5			X	OK	X	
<i>Tsta3</i> ekson 6,7					OK	
<i>Tsta3</i> ekson 8,9					OK	
<i>Tsta3</i> ekson 10					OK	
<i>Tsta3</i> ekson 11					OK	

*F-označuje dodatek formamida; OK-ustrezna temperatura prileganja; X-neustrezna temperatura prileganja,
prazno polje: ustreznost temperature prileganja ni bila analizirana



Slika 2: Primer gela, ki potrjuje ustreznost uporabljenih temperature prileganja začetnih oligonukleotidov pri reakciji PCR

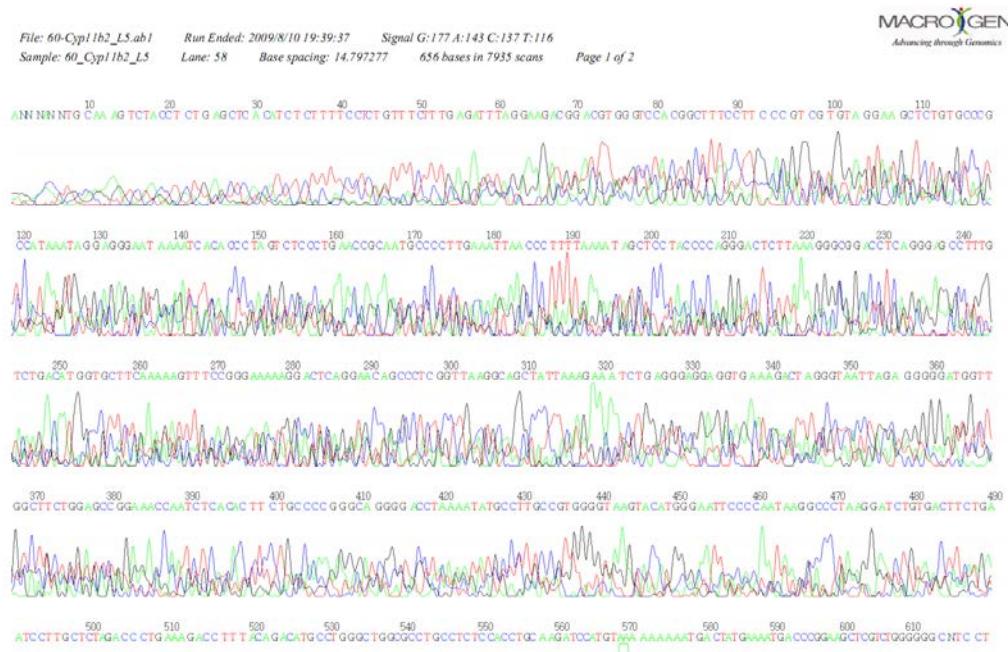
Legenda: 32: *Gpr20_2*; 33: *Gpr20_3*; 34: *Rhpn1_1*; 35: *Rhpn1_2*; 36: *Rhpn1_8* ; 37: *Rhpn1_9*



Slika 3: Primer gela, kjer je bilo reakcije PCR potrebno izvesti pri drugi temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov

4.1.2 Identifikacija polimorfizmov med linijama miši F in L

Pridobljena nukleotidna zaporedja smo poravnali s programom Mega 4. Za vsak odsek gena smo imeli po štiri nukleotidna zaporedja: dva iz mišje linije F in dva iz mišje linije L. Razen nukleotidnih zaporedji *Cyp11b2_5* in *Tsta3_5* (primer gena *Cyp11b2_5*, Slika 4) so bila vsa nukleotidna zaporedja kvalitetno določena, kar je bilo razvidno iz posameznih kromatogramov (primer gena *Gapdh_1*, Slika 5).



Slika 4: Primer nekvalitetnega zaporedja eksona 5, gena *Cyp11b2* ene izmed miši iz linije L, pridobljenega po reakciji PCR pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 65°C z dodatkom formamida



Slika 5: Primer kvalitetnega zaporedja eksona 1, gena *Gpihbp1* ene izmed miši iz linije L, pridobljenega po reakciji PCR pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 65°C z dodatkom formamida

Poravnali smo nukleotidna zaporedja šestih genov, oziroma skupno 50 eksonov ter nekatere dele intronov. Razlike med mišjima linijama F in L smo identificirali na treh mestih DNA:

- V eksonu 2 gena *Cyp11b1* na mestu 74,671,265 (Ensembl genome browser, 2010) se nahaja polimorfizem T>C. Linija miši L ima na tem mestu nukleotid T, medtem ko imajo miši iz linije F na omenjenem mestu nukleotid C. Spremembra je sinonimna, kar pomeni, da se ne odraža v zamenjavi AK zaporedja.
 - V eksonu 9 gena *Cyp11b1* na mestu 74,665,477 (Ensembl genome browser, 2010) se nahaja polimorfizem A>G. Linija miši L ima na tem mestu nukleotid A, medtem ko imajo miši iz linije F na omenjenem mestu nukleotid G. Polimorfizem se nahaja v 3' neprevedljivi regiji gena (angl. *3' untranslated region – 3' UTR*).
 - V intronu 7 gena *Cyp11b2* na mestu 74,681,602 (Ensembl genome browser, 2010) se nahaja polimorfizem T>C. Linija miši L ima na tem mestu nukleotid T, medtem ko imajo miši iz linije F, na omenjenem mestu nukleotid C.

Slika 6: Nukleotidno zaporedje gena *Cyp11b1*, ekson 2

Slika 7: Nukleotidno zaporedje gena *Cyp11b1*, ekson 9

Slika 8: Nukleotidno zaporedje gena *Cyp11b2*, intron 7

Opomba: puščica označuje mesto, kjer se nahaja polimorfizem. Zaporedja na slikah si sledijo v vrstnem redu: L, L, F, F ter zaporedje iz podatkovne zbirke Ensembl (Ensembl genome browser, 2009).

4.2 ANALIZA IZRAŽANJA IZBRANIH KANDIDATNIH GENOV QTL-a *Fob3b2*

4.2.1 Karakterizacija RNA

V Preglednici 19 so predstavljene karakteristike izolirane RNA. Vrednosti RIN, ki so višje od 9, zagotavljajo ustrezno kakovost RNA. RNA, ki ni kontaminirana, mora imeti razmerje absorbanc 260/280 približno dve. Razmerje 260/230 je navadno nekoliko višje (2-2,2), z njim pa ocenimo odsotnost kontaminentov, kot so EDTA, fenol, reagent TRIzol ter morebitni ogljikovi hidrati. Tako razmerje 260/280 kot tudi razmerje 260/230 ter RIN vrednosti so bili v ustreznih okvirovih, zato je bilo izolirano RNA možno uporabiti za nadaljnje analize izražanja genov.

Preglednica 19: Karakteristike izolirane RNA

Tkivo [št. Vzorca]	Genotip	Koncentracija [ng/µl]	Absorbanca [nm]		RIN
			260/280	260/230	
Jetra (1704)	FF	318,42	1,99	1,80	9,1
Jetra(1740)	FF	1518,54	2,08	2,24	9,3
Jetra (1644)	FF	2269,63	2,07	2,20	9,3
Jetra (1905)	FF	2135,83	2,07	2,22	9,2
Jetra (1929)	LL	3693,47	1,92	2,02	9
Jetra (1813)	LL	3731,24	1,9	1,96	9,3
Jetra (1941)	LL	1978,45	2,07	2,21	9,1
Jetra (1579)	LL	2366,51	2,07	2,23	9,2
Možgani (1742)	FF	1054,04	2,11	2,25	9,4
Možgani (1706)	FF	1238,69	2,1	2,28	9,4
Možgani (1646)	FF	1075,03	2,11	2,18	9,4
Možgani (1907)	FF	1061,33	2,09	2,29	9,2
Možgani (1815)	LL	1325,98	2,11	2,30	9,2
Možgani (1931)	LL	1236,00	2,1	2,31	9,2
Možgani (1943)	LL	1027,98	2,09	2,25	9,3
Možgani (1580)	LL	1189,90	2,11	2,31	9,2
Maščobe (1920)	FF	437,11	2,09	2,20	*
Maščobe (1247)	FF	428,11	2,07	1,90	*
Maščobe (1914)	FF	375,81	2,12	2,06	*
Maščobe (1647)	FF	704,54	2,05	2,13	*
Maščobe (1816)	LL	354,61	2,10	2,28	*
Maščobe (1280)	LL	723,61	2,10	2,18	*
Maščobe (1581)	LL	700,18	2,10	2,17	*

*Zadostno koncentracijo vzorcev maščobnega tkiva smo pridobili šele s tretjo izolacijo. V tej seriji RIN-a nismo več izmerili.

4.2.2 Validacija začetnih oligonukleotidov

Preden smo izvedli analize izražanja genov, smo preverili tudi primernost začetnih oligonukleotidov. Za vsak gen smo analizirali po dva začetna oligonukleotida ter iz para izbrali tistega z boljšimi karakteristikami. Rezultati validacije začetnih oligonukleotidov so predstavljeni v Preglednici 20. Izbrali smo začetne oligonukleotide, ki so izpisani z odeadbenjem tiskom: *Ttc38 2*, *Lgals2 1*, *Apo110b 2* in *Tst 1*.

Preglednica 20: Validacija začetnih oligonukleotidov za RT-qPCR

Gen	Slabe razredčitve	Učinkovitost pomnoževanja – E	Naklon
<i>Ciklofilin</i>		1,847	-3,752
<i>Ttc38 1</i>	3125x	1,823	-3,834
<i>Ttc38 2</i>	3125x	1,892	-3,611
<i>Lgals2 1</i>	3125x, 625x, 125x	1,972	-3,392
<i>Lgals2 2</i>	3125x, 625x, 125x	2,121	-3,063
<i>Apo110b 1</i>	vse	/	/
<i>Apo110b 2</i>	3125x, 625x, 125x	2,138	-3,03
<i>Tst 1</i>	nobena	1,928	-3,507
<i>Tst 2</i>	3125x	2,108	-3,087

4.2.3 RT-qPCR

Z reakcijo RT-qPCR smo uspešno določili Cp-je za posamezne gene v posameznem tkivu (Preglednice 21, 24, 27). Nadaljnje izračune smo izvedli po medodi Vandesompele in sod. (2002), za kar smo uporabili programa Excel (Microsoft) ter GraphPad (GraphPad Software, 2009).

4.2.3.1 Izraženost genov v tkivu jeter

V Preglednici 21 so predstavljene vrednosti Cp za posamezne vzorce tkiva jeter. Za vsak posamezni gen smo izračunali povprečni Cp, kjer smo združili vrednosti obeh mišjih linij. Dobljeni povprečni Cp je dober pokazatelj stopnje izraženosti posameznega tkiva, kjer nižja vrednost pomeni višjo izraženost (Preglednica 21). V Preglednici 22 je prikazana

relativna izraženost posameznega gena v tkivu jeter med linijama miši FF in LL. Rezultati so izraženi glede na linijo FF, ki ima posledično vrednosti 1. Na Sliki 9 so rezultati predstavljeni še grafično, kjer je izraženost posameznega gena med linijama miši lepo razvidna.

Preglednica 21: Vrednosti Cp za tkivo jeter

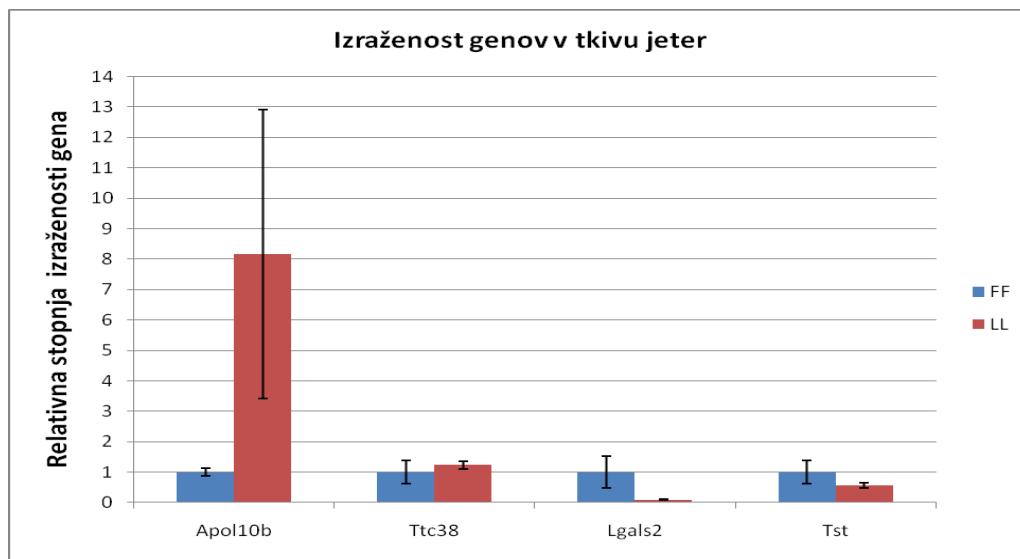
Linija	Identiteta živali	Vzorec	Ime gena					
			<i>Gapdh</i>	<i>Actb</i>	<i>Apol10b</i>	<i>Ttc38</i>	<i>Lgals2</i>	<i>Tst</i>
Cp	Cp	Cp	Cp	Cp	Cp	Cp	Cp	Cp
LL	15FHG12-F2 13A (1c)	1929	19,333	27,177	32,517	22,690	36,340	20,247
LL	15FHG12-F2 7C (30c)	1813	20,053	27,283	27,545	23,450	36,290	20,780
LL	15FHG12-F2 14D (1c)	1941	19,950	26,910	26,437	23,030	35,917	20,410
LL	15FHG10-F2 20C (30c)	1579	20,223	27,537	31,187	22,920	35,920	20,083
<hr/>								
FF	15FHG12-F2 2C (4c)	1704	19,135	26,330	30,210	22,747	32,663	19,010
FF	15FHG12-F2 3A (31c)	1740	19,530	26,537	29,997	23,947	35,997	20,363
FF	15FHG12-F2 1A (10c)	1644	19,117	26,620	30,130	23,420	32,130	19,153
FF	15FHG12-F2 12D (1c)	1905	20,170	29,210	32,590	23,353	32,400	19,477
<hr/>								
Povprečje linija LL+FF			19,7	27,2	30,1	23,2	34,7	19,9

Preglednica 22: Relativna izraženost genov v tkivu jeter

Genotip	Izraženost gena [FF] [#]	Gen			
		<i>Apol10b</i>	<i>Ttc38</i>	<i>Lgals2</i>	<i>Tst</i>
FF	1	1	1	1	1
LL	8,163	1,230	0,096	0,556	
<hr/>					
FF	SEM*	0,136	0,377	0,525	0,376
LL		4,735	0,133	0,014	0,086
<hr/>					
	p-vrednost	0,182	0,585	0,136	0,294

*SEM – standardna napaka povprečja (angl. *standard error mean*)

Izraženost gena je prikazana glede na izraženost FF, ki ima zato vrednost 1



Slika 9: Relativna izraženost kandidatnih genov v tkivu jeter

4.2.3.2 Izraženost genov v tkivu možganov

V Preglednici 23 so predstavljene vrednosti Cp za posamezne vzorce tkiva možganov. Za vsak posamezni gen smo izračunali povprečni Cp, kjer smo združili vrednosti obeh mišjih linij. Dobljeni povprečni Cp je dober pokazatelj stopnje izraženosti posameznega tkiva, kjer nižja vrednost pomeni višjo izraženost (Preglednica 23). V Preglednici 24 je prikazana relativna izraženost posameznega gena med linijama miši FF in LL. Rezultati so izraženi glede na linijo FF, ki ima posledično vrednosti 1. Na Sliki 10 so rezultati predstavljeni še grafično, kjer je izraženost posameznega gena med linijama miši lepo razvidna.

Preglednica 23: Vrednosti Cp za tkivo možganov

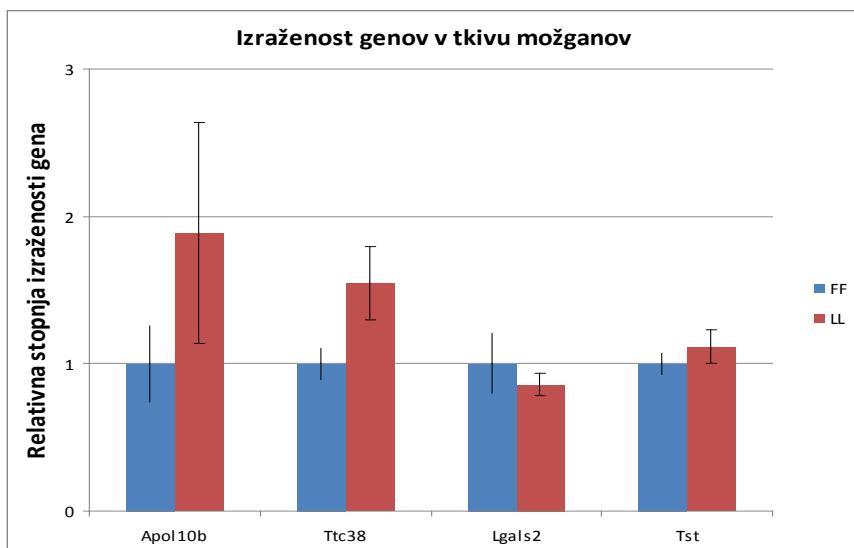
		Ime gena						
		<i>Gapdh</i>	<i>Actb</i>	<i>Apol10b</i>	<i>Ttc38</i>	<i>Lgals2</i>	<i>Tst</i>	
Identiteta živali		Vzorec	Cp	Cp	Cp	Cp	Cp	
LL	15FHG12-F2 7C (30c)	1815	17,740	24,643	29,527	24,960	40,000	22,090
LL	15FHG12-F2 13A (1c)	1931	17,655	24,740	31,750	25,547	40,000	22,670
LL	15FHG12-F2 14D (1c)	1943	17,673	24,693	31,273	25,307	40,000	22,690
LL	15FHG10-F2 20C (30c)	1580	17,383	23,817	30,580	25,643	40,000	21,937
FF	15FHG12-F2 2C (4c)	1706	17,627	25,067	31,637	26,167	40,000	22,543
FF	15FHG12-F2 1A (10c)	1646	17,607	24,513	31,600	26,120	39,125	22,520
FF	15FHG12-F2 12D (1c)	1907	17,500	24,027	32,473	26,130	40,000	22,440
FF	15FHG12-F2 3A (31c)	1742	17,357	24,137	30,423	25,347	40,000	22,257
Povprečje linija LL+FF			17,6	24,5	31,2	25,7	39,9	22,4

Preglednica 24: Relativna izraženost genov v tkivu možganov

Genotip	Izraženost gena $[/FF]^{\#}$	Gen			
		<i>Apol10b</i>	<i>Ttc38</i>	<i>Lgals2</i>	<i>Tst</i>
FF		1	1	1	1
LL		1,891	1,549	0,862	1,117
FF	SEM*	0,256	0,103	0,202	0,069
LL		0,749	0,250	0,077	0,110
	p-vrednost	0,303	0,089	0,549	0,405

*SEM – standardna napaka povprečja (angl. standard error mean)

Izraženost gena je prikazana glede na izraženost FF, ki ima zato vrednost 1



Slika 10: Relativna izraženost kandidatnih genov v tkivu možganov

4.2.3.3 Izraženost genov v maščobnem tkivu

V Preglednici 25 so predstavljene vrednosti Cp za posamezne vzorce maščobnega tkiva. Za vsak posamezni gen smo izračunali povprečni Cp, kjer smo združili vrednosti obeh mišjih linij. Dobleni povprečni Cp je dober pokazatelj stopnje izraženosti posameznega tkiva, kjer nižja vrednost pomeni višjo izraženost (Preglednica 25). V Preglednici 26 je prikazana relativna izraženost posameznega gena med linijama miši FF in LL. Rezultati so izraženi glede na linijo FF, ki ima posledično vrednosti 1. Na Sliki 11 so rezultati predstavljeni še grafično, kjer je izraženost posameznega gena med linijama miši lepo razvidna.

Preglednica 25: Vrednosti Cp za maščobno tkivo

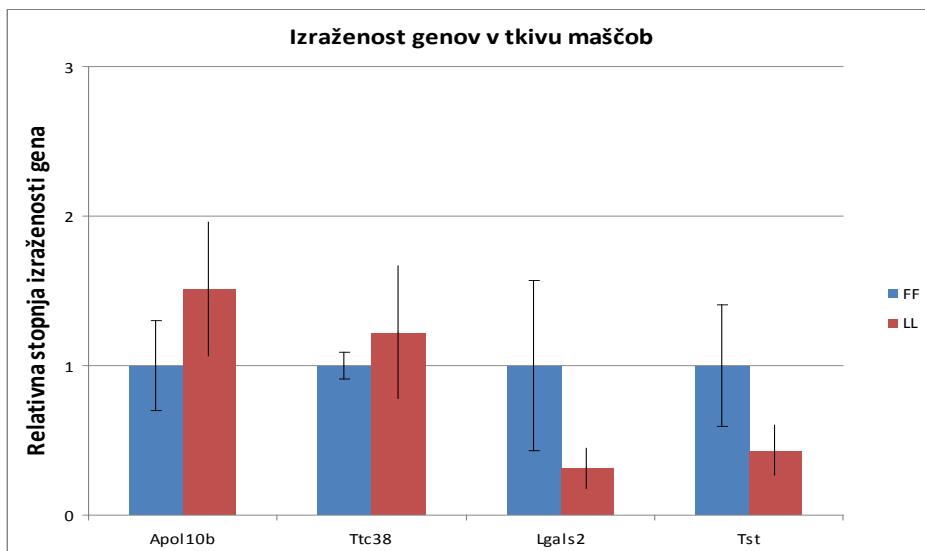
			Ime gena					
			<i>Gapdh</i>	<i>Actb</i>	<i>Apol10b</i>	<i>Ttc38</i>	<i>Lgals2</i>	<i>Tst</i>
	Identiteta živali	Vzorec	Cp	Cp	Cp	Cp	Cp	Cp
LL	15FHG12-F2 7C (30c)	1816	19,940	27,830	26,393	25,293	35,675	24,440
LL	15FHG10-F2 8B (30c)	1280	18,103	25,883	25,720	25,240	32,117	23,527
LL	15FHG10-F2 20C (30c)	1581	18,213	24,820	25,643	24,497	34,020	25,340
FF	15FHG12-F2 1A (10c)	1647	18,677	27,417	26,167	25,587	31,223	22,200
FF	15FHG12-F2 12C (13c)	1920	18,863	28,595	28,180	26,213	34,770	24,835
FF	15FHG10-F2 6A (10c)	1247	18,213	24,820	25,643	24,497	34,020	24,870
Povprečje linija LL+FF			18,7	26,6	26,6	25,4	33,6	24,0

Preglednica 26: Relativna izraženost genov v tkivu maščob

Genotip		Ime gena			
		<i>Apol10b</i>	<i>Ttc38</i>	<i>Lgals2</i>	<i>Tst</i>
FF	Izraženost gena $[\text{FF}]^{\#}$	1	1	1	1
LL		1,514	1,223	0,313	0,434
FF	SEM*	0,302	0,091	0,566	0,410
LL		0,448	0,447	0,134	0,166
	p-vrednost	0,457	0,694	0,365	0,330

*SEM – standardna napaka povprečja (angl. *standard error mean*)

Izraženost gena je prikazana glede na izraženost FF, ki ima zato vrednost 1



Slika 11: Relativna izraženost kandidatnih genov v tkivu maščob

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo z uporabo dveh pristopov finega kartiranja QTL-ov omejili izbor pozicijskih kandidatnih genov. Uporabili smo metodo sekvenciranja, kjer smo analizirali nukleotidna zaporedja kodogenih regij pozicijskih kandidatnih genov in metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času, s katero smo preučili in kvantificirali diferencialno izraženost izbranih kandidatnih genov.

Leta 1984 so na Inštitutu Roslin v Edinburgu začeli s projektom selekcije miši na visok (F) in nizek (L) odstotek telesnih maščob (Sharp in sod., 1984). Kasneje so s križanjem omenjenih linij definirali štiri kvantitativne lokuse *Fob1*, *Fob2*, *Fob3* ter *Fob4*, ki imajo relativno velik učinek na nalaganje maščevja (Horvat in sod., 2000). S kvantitativnim lokusom *Fob3* so pojasnili 14,4 odstotkov fenotipske variance v nalaganju maščevja, zato je bil zanimiv za nadaljnje analize. Stylianou in sod. (2004) so ugotovili, da je QTL *Fob3* sestavljen iz najmanj dveh QTL-ov z relativno velikim učinkom, ki so ju poimenovali *Fob3a* in *Fob3b*. Prevoršek in sod. (2010) so z uporabo kongenih linij ter drugih bioinformacijskih pristopov finega kartiranja QTL-ov ugotovili, da QTL *Fob3b* sestoji iz najmanj dveh genetsko vezanih QTL-ov in ju poimenovali *Fob3b1* in *Fob3b2*, ki so ju zožili na 4,98 Mbp, oziroma 7,68 Mbp. S *Fob3b1* so razložili 1,22 odstotka fenotipske variance v nalaganju maščevja, *Fob3b2* pa je pojasnil 0,77 odstotka fenotipske variance. Poleg tega so na QTL-u *Fob3b1* določili gene z visoko in srednjo prioriteto, ki predstavljajo dobre pozicijske kandidate za nalaganje maščevja in so bili izhodišče naših analiz. Medtem je bila s strani Cirnski (2010a) na mikromrežah izvedena analiza izražanja genov QTL-a *Fob3b* mišjih linij FF in LL. Njihova preliminarna analiza je bila prav tako izhodišče naših analiz.

5.1.1 Iskanje polimorfizmov v pozicijskih kandidatnih genih QTL-a *Fob3b1*

V prvem delu diplomske naloge smo izhajali iz predhodne raziskave Prevoršek in sod. (2010), v kateri so določili osem pozicijskih kandidatnih genov kvantitativnega lokusa *Fob3b1* z visoko in srednjo prioriteto. Izvedli smo sekvenčne analize kodogenih regij šestih genov, saj za gen *Ly6a* zaradi izjemne homolognosti z ostalimi geni iz te družine nismo uspeli zasnovati ustreznih nukleotidov. Poleg tega nam ni uspelo pomnožiti eksona 1 gena *Dgat1* ter eksona 1 gena *Gpr20*, saj reakcija PCR pri nobeni od temperatur prileganj ni uspešno potekla. Pri ostalih šestih genih smo z dvema izjemama (gena *Cyp11b2_5* in *Tsta3_5*) pridobili pričakovane rezultate. Dokazali smo, da znotraj pozicijskih kandidatnih genov za nalaganje maščevja na kvantitativnem lokusu *Fob3b1* med linijama F in L obstajajo polimorfna mesta. Preučili smo šest kandidatnih genov oziroma skupaj 50 eksonov ter nekatere predele intronov in na treh mestih identificirali razlike v zaporedju DNA med linijama miši F in L:

- gen *Cyp11b1*, ekson 2
- gen *Cyp11b1*, ekson 9
- gen *Cyp11b2*, intron 7

Polimorfizem v drugem eksonu gena *Cyp11b1* je sinonimen, saj gre za zamenjavo ATT>ATC. Oba kodona kodirata AK izolevcin, zato se polimorfizem ne odraža v spremembri AK zgradbe proteina. Polimorfizem torej ne vpliva na AK sestavo proteina, vendar pa lahko tovrstni polimorfizmi določajo zvijanje in stabilnost mRNA transkripta (Jacobsson, 2006), s tem pa vplivajo na raven translacije ter posledično na zastopanost produkta gena (Chatterjee in Pal, 2009). Poleg tega so v prvem ali drugem eksonu genov lahko prisotni tudi regulatorni elementi, ki pomembno določajo raven transkripcije. Morebitni polimorfizmi, ki se nahajajo v teh regijah lahko močno vplivajo na raven transkripcije, kar je bilo dokazano v različnih raziskavah (Neznanov in sod., 1997; Lin in Tam, 2001; Pierce in sod., 2006).

Potrebno bi bilo analizirati ali nukleotid C, prisoten pri miših iz linije F, stimulira višjo raven transkripcije oziroma translacije, kar bi se odražalo v večjih koncentracijah produkta

gena *Cyp11b1* pri miših iz linije F, s tem pa v višji zastopanosti glukokortikoidov, za katere je znano, da stimulirajo nalaganje maščevja (Mullins in sod., 2009). Še en korak dalje bi bile analize koncentracij samega proteina.

Drugi polimorfizem A>G se nahaja v devetem eksonu gena *Cyp11b1*. Linija miši L ima na tem mestu nukleotid A, medtem ko imajo miši iz linije F, na omenjenem mestu nukleotid G. Polimorfizem se nahaja v 3' UTR, kar pomeni, da na dolžino in AK sestavo proteina ta polimorfizem ne vpliva, ker se stop kodon nahaja že pred tem polimorfizmom. Tudi regije UTR so lahko ključne, saj pomembno vplivajo na raven translacijskih procesov. Gre za to, da morebitni polimorfizmi, ki se nahajajo v teh regijah lahko vplivajo na sekundarno strukturo mRNA, dostopnost mRNA za ribosom, lokacijo mRNA, transport mRNA ter na potek samega procesa translacije. 3' UTR regije so tudi tarče za mikro RNA in SNP lahko povzroči izgubo ali pridobitev vezavnega mesta za mikro RNA (Clop in sod., 2006). V številnih raziskavah so bili v regijah UTR identificirani polimorfizmi, ki določajo bolezenske fenotipe (pregledni članek, Chatterjee in Pal, 2009).

Pri tretjem polimorfizmu gre za zamenjavo T>C, ki se nahaja v sedmem intronu gena *Cyp11b2*. Linija miši L ima na tem mestu nukleotid T, medtem ko imajo miši iz linije F, na omenjenem mestu nukleotid C. V intronih se nahajajo signali za spajanje in alternativno izrezovanje eksonov (Jacobsson, 2006), zato bi bilo potrebno preučiti ali identificirani polimorfizem vpliva na procese alternativnega spajanja eksonov. To bi lahko v veliki meri vplivalo na zgradbo proteina in s tem na njegovo aktivnost.

Inbridirane mišje linije predstavljajo odlično izhodišče za iskanje polimorfizmov, saj so morebitna polimorfna mesta med dvema inbridiranimi linijama izredno informativna (Tsang in sod., 2005). Zaradi dejstva, da so vse miši med sabo genetsko identične tako zadošča že primerjava minimalnega števila miši, kot je bilo to izvedeno v naši študiji. Primerjali smo po dve miši iz vsake linije, obsežna analiza nukleotidnih zaporedij pa je razkrila tri polimorfizme med mišjima linijama F in L. Tako je bil z analizo polimorfizmov pozicijskih kandidatnih genov QTL-a *Fob3b1* storjen korak naprej k končni identifikaciji kavzalnih genov, ki določajo nalaganje maščevja.

Pred nadaljnjiimi analizami potrditve vzročnosti identificiranih polimorfizmov bi bilo potrebno nukleotidna zaporedja preučiti še v regulatornih regijah pozicijskih kandidatnih genov, saj je verjetno, da morebitni polimorfizmi, ki se nahajajo tam, vplivajo na izraženost genov (Jacobsson, 2006). Polimorfizmi v regulatornih regijah lahko namreč pomembno določajo izražanje gena, zato bi bilo nadaljnje analize vpliva identificiranih polimorfizmov smiselno izvesti po analizah regulatornih regij. Med regulatorne regije spadajo bližnji cis elementi – 3' in 5' neprevedljive regije genov, kamor se med drugim veže RNA polimeraza II ter transkripcijski dejavniki, ki določajo raven transkripcije (Chatterjee in Pal, 2009) ter pa tako imenovani trans elementi, ki so lahko oddaljeni tudi do 50 kbp od gena in vežejo proteine, ki bodisi ojačajo, bodisi utišajo izražanje gena (Noyes in sod., 2010). Tovrstne polimorfizme je izredno težavno preučevati, še težje pa jih je pripisati ustreznemu genu. Noyes in sod. (2010) so nedavno izvedli analize polimorfizmov pri dveh kongenih linijah miši ter ugotovili, da naj bi ravno trans elementi v večini primerov odločilno določali raven izražanja genov, kar je eden možnih razlogov, zakaj je povezava polimorfizmov z vzročnim genom tako zapletena.

5.1.2 Analiza izražanja izbranih kandidatnih genov QTL-a *Fob3b2*

Izhodišče drugega dela diplomske naloge so bili rezultati preliminarnih analiz Cirnski (2010a), ki so pokazali najbolj statistično značilno diferencialno izraženost genov *Tst*, *Lgals2*, *Apol10b* ter *Ttc38*, ki se nahajajo v odseku QTL-a *Fob3b2* (Preglednica 27). In sicer so preliminarni rezultati pokazali, da so vsi širje geni v maščobnem tkivu močneje izraženi v liniji LL. Kasneje so bile analize na mikromrežah ponovljene bolj podrobno in izvedene z dodatnimi vzorci linij ter so občutno zmanjšale število diferencialno izraženih genov. Naše izhodišče pa so bili preliminarni rezultati. Medtem so bili pridobljeni že končni rezultati, ki se zaradi objektivnih tehničnih težav od preliminarnih razlikujejo, saj so med geni, ki smo jih analizirali mi, končni rezultati pokazali diferencialno izraženost le za gen *Ttc38*. Dokazali so, da je gen *Ttc38* v tkivu jeter med linijama FF in LL diferencialno izražen, in sicer je bilo izračunano razmerje LL/FF 1,77 (Preglednica 28), kar je dejansko zelo blizu rezultatom preliminarne študije. Ostali izmed treh genov (*Apol10b*, *Tst*, *Lgals2*) se v nobenem izmed preučenih tkiv (jetra, možgani, maščobno tkivo) v

njihovih analizah niso izkazali za statistično značilno diferencialno izražene. Kljub vsemu smo se pri interpretaciji naših rezultatov poskušali nanašati tako na rezultate, ki so predstavljali izhodišče naših analiz, kot tudi končne rezultate Cirnski (2010b).

Preglednica 27: Rezultati preliminarne študije Cirnski (2010a)

Ime gena	T-statistika	p-vrednost	Izražanje LL/FF	Izraženost genov za posamezne vzorce maščobnega tkiva					
				1325	1331	1396	1265	1391	1401
				LL	LL	LL	FF	FF	FF
Tst	6,73	0,001	2,19	9,459	8,866	8,848	7,824	7,945	8,018
Lgals2	5,42	0,001	1,96	6,448	6,572	5,888	5,180	5,381	5,440
Ttc38	4,82	0,002	1,44	8,120	8,461	8,429	7,862	7,836	7,707
Apol10b	4,03	0,004	1,80	6,847	6,304	5,998	5,753	5,449	5,393

Preglednica 28: Končni rezultati Cirnski (2010b)

Ime gena	T-statistika	p-vrednost	Izražanje LL/FF	Izraženost gena za posamezne vzorce tkiva jeter							
				1563	1869	1564	1574	1851	1857	1389	1399
Ttc38	5,47	0,014	1,77	10,036	9,597	9,784	9,872	9,214	9,274	8,861	8,618

Za naše analize izraženosti kandidatnih genov z RT-qPCR smo v tkivu jeter in možganov za vsak genotip uporabili po tri vzorce, ki so bili izolirani že predhodno za potrebe analiz izražanja genov na mikromrežah s strani Cirnski (2010a), poleg tega pa smo naknadno iz vsakega tkiva izolirali še po štiri vzorce za vsak genotip. Tako smo za posamezno linijo miši imeli sedem vzorcev. Pri maščobnem tkivu pa smo uporabili za vsak genotip miši en že prej izolirani vzorec ter štiri na novo izolirane vzorce – skupno smo torej primerjali pet vzorcev maščobnega tkiva za posamezen genotip miši.

Pri analizi je prišlo do nekonsistentnosti rezultatov, saj so nekateri rezultati že prej izoliranih vzorcev s strani Cirnski (2010a) odstopali za tri Cp-je in več. Izvedli smo ponovne analize RIN-a vzorcev, ki so odstopali, le-te pa so pokazale običajne vrednosti. Pojav smo si razložili kot tako imenovani vpliv serij (angl. *batch effect*), kjer pride do odstopanj zaradi različnih razmer v laboratoriju, različnih serij reagentov ter razlik v delu posamezika (pregledni članek, Leek in sod., 2010). Nedvomno je tehniška napaka zmanjšana, če izhajamo iz ene same sekcije in izolacije RNA že zaradi dejstva, ki so ga dokazali Košir in sod. (2010); in sicer so pokazali, da izraženost genov v miših tekom

dneva variira. Ker je sam projekt analize izraženosti genov izjemno zamuden, drag, poleg tega pa so za to potrebne sekcijske miši, smo se odločili, da za tkivi jeter in možganov izločimo vse predhodno izolirane vzorce, tako odstopajoče, kot tudi tiste, ki niso odstopali ter upoštevamo le rezultate naših, na novo izoliranih vzorcev.

Iz maščobnega tkiva pa smo pridobili izredno majhne koncentracije RNA, ki za uspešno analizo niso bile zadostne. Zaradi tega smo celoten poskus izraženosti genov v maščobnem tkivu ponovili. Izolirali smo RNA iz po štirih vzorcev za vsak genotip ter z nekoliko modificirano izolacijo RNA pridobili nekoliko višje koncentracije RNA, ki pa še vedno niso zadostovale za učinkovito kvantifikacijo izražanja genov, poleg tega pa smo tokrat imeli težave z vibracijskim mešalnikom, saj smo imeli na razpolago mnogo počasnejšega kot sicer, kar se je odražalo v pomanjkljivi homogenosti vzorcev ter izredni variabilnosti znotraj ponovitev. Kljub temu nismo bili povsem prepričani ali je resnični vzrok za variabilnost znotraj vzorcev počasnejši vibracijski mešalnik ali so vzrok še vedno dokaj nizke koncentracije izolirane RNA iz maščobnega tkiva, zato smo ponovno na nekoliko spremenjen način izolirali RNA iz preostalega maščobnega tkiva, tako da smo pridobili RNA iz po treh vzorcev maščobnega tkiva za vsak genotip. In sicer smo za izolacijo RNA namesto enega ml homogenizirane RNA uporabili od štiri do pet ml le-te ter prav tako uporabili le eno kolono, čeprav je bil volumen toliko večji. V povprečju smo pridobili od petkrat do desetkrat večje koncentracije RNA kot s prvo in drugo izolacijo, kar je zadostovalo za učinkovito kvantifikacijo izražanja genov.

V analizi genov *Tst*, *Lgals2*, *Apol10b* in *Ttc38* z RT-qPCR smo kot prvo v vseh tkivih potrdili absolutno stopnjo izraženosti genov, ki je bila določena s strani Cirnski (2010a) (Preglednica 27) ter je tudi v skladu s spletno stranjo <http://biogps.gnf.org> (BioGPS – your Gene Portal System, 2010). Dober približek za izraženost tkiv je izračun povprečne vrednosti vseh točk prečkanja za vse vzorce posameznega tkiva. Ker so bili rezultati obeh linij miši (FF, LL) skladni, smo izračun izvedli za obe liniji miši skupaj. Izraženost tkiv je razvidna iz točk prečkanj, kjer nižja vrednost Cp predstavlja močnejšo izraženost gena. V vseh tkivih (jetra, možgani, maščobno tkivo) je bilo jasno razvidno, da je najbolj izražen gen *Tst*, temu pa sledijo geni *Ttc38*, *Apol10b* ter *Lgals2* (Preglednice 21, 23, 25).

Analize izražanja genov so pokazale nediferencialno izraženost vseh štirih analiziranih genov, v vseh treh tkivih. To je bilo z izjemo gena *Ttc38* za tkivo jeter glede na končne rezultate Cirnski (2010b) tudi sicer pričakovano. Tako smo le z eno izjemo potrdili njihove končne rezultate.

Kljud temu, da statistična značilnost ni bila dosežena smo se osredotočili na analizo tendence diferencialne izraženosti genov ter na primerjavo s preliminarnimi rezultati predhodne analize. Ker smo v analizi primerjali le tri oziroma štiri miši iz vsake linije, je v določenih pogojih, sploh ko gre za biološke vzorce, težko doseči statistično značilnost. Pri analizah na majhnem številu osebkov lahko namreč osebki, ki nekoliko bolj odstopajo zelo vplivajo na standardno napako, kar se posledično odraža v nesignifikantnosti rezultatov. In v nekaterih primerih bi bil zelo verjetno glavni razlog za nesignifikantnost ravno veliko odstopanje nekaterih miši. To je lepo razvidno pri miši 15FHG12-F2 3A (31C), kjer prihaja v jetrih do odstopanj vzorca 1740 za gena *Lgals2* in *Tst* (Preglednica 21). Vzorec 1742 ravno tako izhaja iz omenjene miši, kjer je v tkivu možganov za gen *Ttc38* opaziti vidno odstopanje (Preglednica 23). Zelo zanimivo je opažanje, da vsa tri odstopanja omenjene miši iz linije FF kažejo prav v smer rezultatov linije LL. To mogoče ni tako nepričakovano, saj so miši iz obeh linij genetsko skoraj identične, poleg tega pa je potrebno pri bioloških vzorcih vedno računati na določeno stopnjo variabilnosti. Zanimivo je tudi, da je v vseh treh tkivih moč opaziti izredno variabilnost v izraženosti gena *Apol10b*, ki je najbolj nazorna v jetrih in možganih, medtem ko je v tkivu maščob velika variabilnost prisotna pri vseh genih.

Če pogledamo tendenco diferencialne izraženosti med linijama LL in FF, vidimo, da je pri genu *Ttc38* v vseh tkivih opaziti trend višje izraženosti pri miših LL. Čeprav statistična značilnost ni dosežena pa je to v skladu tako z rezultati preliminarne študije Cirnski (2010a), kot s končnimi rezultati Cirnski (2010b). V prvem delu so namreč pokazali povišano izražanje gena *Ttc38* v maščobnem tkivu miši LL, medtem ko je bilo s končnimi rezultati dokazano povišano izražanje gena *Ttc38* v jetrih miši LL.

Ravno tako je pri genu *Apol10b* v vseh tkivih viden trend višje izraženosti pri miših LL, največjo razliko pa je opaziti v jetrih. Čeprav statistična značilnost ni dosežena, pa je

tendenca v skladu s predhodnimi rezultati, kjer je bila v podobnem rangu ravno tako določena višja izraženost gena *Apol10b* pri miših LL.

Pri genu *Tst* so naši rezultati ravno v nasprotju s preliminarnimi rezultati Cirnski (2010) ter rezultati Stylianou in sod. (2005), kjer so pokazali diferencialno izraženost gena v smeri linije miši LL. Pri nas pa je bila v vseh treh tkivih razvidna tendenca višje izraženosti v smeri linije miši FF. Kljub temu je *Tst* še vedno kandidatni gen, saj se je potrebno zavedati, da tako v naši analizi, kot tudi v analizi Cirnski (2010b), niso bili pridobljeni statistično značilni rezultati.

Gen *Lgals2* je v vseh tkivih zelo šibko izražen, kar se kaže v izredno visokih vrednostih Cp. V jetrih in maščobnem tkivu so le-ti višji od 30, zato imajo rezultati dejansko izredno nizko informativnost, medtem ko je bila izraženost gena v možganih izključno prenizka za pridobitev rezultatov, na katere bi se bilo moč kakorkoli zanašati. V možganih so Cp-ji prišli do maksimalne vrednosti 40, zato so rezultati žal povsem neinformativni. Za preučitev izražanja gena *Lgals2* bi bilo potrebno dodatno predhodno namnožiti mRNA ter šele nato izvesti RT-qPCR. Vprašanje pa je, če bi vzorce linij uspeli primerjati v linearni fazni in s tem zagotoviti objektivnost interpretiranja rezultatov.

Vsekakor ne gre izločiti prav nobenega izmed genov. Kot prvo bi bilo potrebno analize ponoviti, pri čemer bi bilo potrebno uporabiti več vzorcev ter upoštevati cirkadiani ritem živali, kar pomeni, da bi bile živali žrtvovane čim bolj istočasno. Tudi če v ponovljenih analizah diferencialna izraženost ne bi bila dokazana je potrebno vedeti, da enaka stopnja izraženosti mRNA v celicah še ne zagotavlja sinteze enake količine produkta gena med linijama miši (Chatterjee in Pal, 2009). Poleg tega tudi morebitna enaka koncentracija proteina še ne zagotavlja enakega delovanja proteina. Tako je povsem verjetno, da se v katerem izmed genov nahajajo morebitni polimorfizmi, ki vplivajo na AK zgradbo proteina, oziroma delujejo kako drugače in določajo razlike med linijama miši FF in LL. Tako bi se bilo potrebno osredotočiti na nadaljnje analize nukleotidnih zaporedij kandidatnih genov, predvsem tistih, za katere je verjetno, da bi bili glede na svojo funkcijo udeleženi v procesih nalaganja maščevja. Tako bi znal gen *Apol10b* pomembno določati

nalaganje maščevja, poleg tega pa bi lahko vpliv imel tudi *Ttc38*, gen, katerega vloga še ni povsem znana.

5.1.3 Razprava splošno

Potrebno se je zavedati, da so linije miši, ki smo jih analizirali, genetsko praktično identične. Zato trije identificirani polimorfizmi med linijama miši F in L v prvem delu diplomske naloge predstavljajo dobro izhodišče za potrditev kavzalnih genov. Zaradi visoke genetske podobnosti posledično ni bilo pričakovati, da bodo v analizah, izvedenih s strani Cirnski (2010b) našli veliko diferencialno izraženih genov, čeprav so preliminarni rezultati pokazali drugače (Cirnski, 2010a). Med tistimi, ki smo jih z RT-qPCR preučili mi, je bil tako edini diferencialno izražen gen *Ttc38*, katerega tendenco višje izraženosti pri miših LL smo potrdili tudi mi. Vsekakor pa ni nujno, da bo kavzalni gen na kvantitativnem lokusu diferencialno izražen. Kot je že v razpravi omenjeno, lahko polimorfizem v eksonih vpliva na AK sestavo proteina in s tem na njegovo funkcijo. Lahko se nahaja tudi med eskonji in deluje kot signal za alternativno spajanje eksonov, kar lahko ponovno vpliva na AK sestavo produkta. Možno je tudi, da polimorfizem ne povzroči zamenjave AK, temveč vpliva na zvijanje in stabilnost RNA in s tem na raven translacije ter posledično na količino proteina. V obeh primerih ostaja izražanje gena nespremenjeno. Poleg tega se lahko kavzalni polimorfizem nahaja v DNA izven gena, česar v analizi pozicijskih kandidatov nismo podrobnejše analizirali.

V naši študiji smo identificirali polimorfizme v pozicijskih kandidatnih genih, ki predstavljajo osnovo za naslednji korak, v katerem bi bilo potrebno preučiti vpliv identificiranih polimorfizmov na izražanje, tako na ravni RNA, kot tudi na ravni proteinov. Na ravni RNA bi bilo potrebno analizirati:

- količino RNA (uporaba RT-qPCR)
- stabilnost RNA (testi *in vitro*)
- kvaliteto RNA (dolžina in sestava RNA, ki bi jo določili z northern prenosom ali sekvenciranjem mRNA, oziroma cDNA)

Na ravni proteinov bi bilo potrebno analizirati:

- količino proteina (western prenos ali sodobne proteomske analize)
- obstojnost proteina (testi *in vitro*)
- kvaliteto proteina (dolžina, sestava ter zvijanje)
- čas in mesto izražanja (hibridizacija *in situ*, RT-qPCR posameznih tkiv, celičnih tipov)

Kar se tiče analiz izražanja genov bi bilo potrebno analize ponoviti za gena *Ttc38*, *Tst* ter pa tudi *Apol10b*, ki je funkcionalno dober kandidatni gen za nalaganje maščevja. Pri tem bi bilo potrebno uporabiti večje število vzorcev, s čimer bi dobili bolj popolno sliko izraženosti genov. Poleg tega pa bi bilo potrebno zaradi dokazanega vpliva cirkadijalnih ritmov živali žrtvovati čim bolj istočasno. Naslednji korak pa bi bil analiza nukleotidnih zaporedij omenjenih kandidatnih genov v kodogenih in regulatornih regijah le-teh.

Kakorkoli, analize kvantitativnih lokusov so izredno zahtevne raziskave. Nedvomno je najtežji korak pri iskanju vzročnih genov potrditev dejanske funkcionalnosti polimorfizma na preučevano lastnost. Prav tako je pri morebitni identifikaciji diferencialno izraženih genov potrebno dokazati vpliv ter v končni fazi poskušati razjasniti fiziološke mehanizme. Tako je trenutno za številne kvantitativne lastnosti identificiranih veliko QTL-ov, določeni so kandidatni geni, vendar pa zadnji korak ostaja najtežji ter v veliko primerih neizveden, oziroma neuspešen. V analizah kvantitativnega lokusa *Fob3* je bilo narejenih že nekaj študij (Stylianou in sod., 2005, Simončič in sod., 2008, Prevoršek in sod., 2010), saj je bilo z različnimi pristopi začetno področje kvantitativnega lokusa *Fob3* tekom študij razdeljeno na manjše kvantitativne lokuse, pri čemer je kvantitativni lokus *Fob3b1* trenutno zožen na manj kot 5 Mbp, z nekaj močnimi kandidatnimi geni, ki smo jih odkrili v tej študiji.

Kljub temu bi bilo potrebno nadalje dokazati, da identificirani polimorfizmi vplivajo na nalaganje maščevja ter določiti način, na katerega vplivajo. Eden izmed možnih pristopov bi bil ustvariti nove subkongene linije s še manjšimi prejemniškimi odseki, ki bi izključili, oziroma potrdili vzročnost polimorfizma. Pomanjkljivost tega pristopa je najbrž ta, da poleg želenega gena »zamenjamo« tudi druge predelek genoma in gene, ki bi lahko bili

potencialni kandidati. Poleg tega ima obstoječa kongena linije že sedaj le nekaj manj kot 5 Mbp donorskega genoma, zato bi bil razvoj subkongenih linij verjetno izredno težaven.

Najbolj optimalen test za dokazovanje vzročnosti kandidatnega gena za učinek QTL-a naj bi bil kvantitativni komplementacijski test (angl. *quantitative complementation test*) (Flint in Mott 2001). Ta pristop temelji na nizu križanj med posameznim aleлом kandidatnega gena kvantitativnega lokusa, ustvarjanju KO miši ter primerjanju z divjim tipom in križanjem KO miši z divjim tipom za vsak kandidatni gen. Obstoj QTL-a potrdimo v primeru, če obstaja razlika med učinki različnih alelov gena v kombinaciji s KO mišmi vzročnega kandidatnega gena. Kljub temu, da je ta test v nekaterih primerih bil uspešen, pa zanj potrebujemo ustrezne modele KO miši, poleg tega pa zahteva težavna križanja, zato je omenjeni test velikokrat neizvedljiv, kot je bilo to v primeru Prevoršek in sod. (2010). Po njihovem mnenju je pristop v razvoju novih sub-kongenih linij z vedno manjšimi odseki donorskega genoma v povezavi z različnimi bioinformacijskimi orodji, analizami izražanja, iskanjem polimorfizmov v kandidatnih genih in izvedbo funkcionalnih analiz še vedno najbolj obetaven pristop za dokončno določitev kavzalnega gena in pripadajoče genetske variacije.

Pri potrditvi kavzalnosti nam lahko pomagajo tudi študije pri drugih živalskih vrstah, kot tudi pri človeku. Če študije celotnega genoma (angl. *genome wide association studies – GWAS*) odkrijejo haplotipe povezane z debelostjo v istih genih, je to dodaten dodaten dokaz kavzalnosti.

5.2 SKLEPI

- Zasnovali smo začetne oligonukleotide, ki so omogočili uspešno verižno reakcijo s polimerazo ter pridobitev nukleotidnih zaporedij pozicijskih kandidatnih genov QTL-a *Fob3b1*.
- Preučili smo nukleotidna zaporedja šestih genov oziroma 50 eksonov pozicijskih kandidatnih genov ter nekaterih predelov intronov QTL-a *Fob3b1*.

- Potrdili smo hipotezo številka 1: Znotraj pozicijskih kandidatnih genov QTL-a *Fob3b1* so prisotni polimorfizmi, saj smo med linijama miši F in L definirali tri SNP-je.
- Identificirani SNP-ji ne vplivajo neposredno na AK gradbo produkta, možno pa je, da delujejo na druge načine in določajo raven transkripcije, translacije ali pa celo prek alternativnega spajanja eksonov posredno vplivajo na AK zgradbo produkta. Potrebno bi bilo izvesti nadaljnje funkcijске študije na ravni RNA ter proteinov s katerimi bi razjasnili vlogo SNP-jev in identificirali morebitno prisotne SNP-je v regulatornih regijah kandidatnih genov izven kodogenih regij.
- Uspešno smo izolirali RNA F2 križancev kongenih mišjih linij G, genotipa FF in LL, ter z RT-qPCR kvantificirali diferencialno izraženost štirih genov QTL-a *Fob3b2*.
- Glede na obstoječe podatke in predhodno študijo Cirnski (2010a) smo potrdili raven izraženosti posameznih genov. In sicer smo dokazali, da je pri miših FF in LL najbolj izražen gen *Tst*, ki mu sledijo *Ttc38*, *Apol10b* ter *Lgals2*, ki je najmanj izražen gen.
- Hipoteza številka 2 ni bila povsem potrjena, saj nismo dosegli statistično značilnih rezultatov. Razlog je verjetno v sami izbiri genov ter majhnem številu vzorcev. Kljub temu so bili razvidni trendi diferencialne izraženosti genov.
- Glede na predhodno študijo smo potrdili tendenco diferencialne izraženosti gena *Ttc38*, za katerega se je v vseh treh analiziranih tkivih izkazalo, da je bolj izražen pri miših LL. Prav tako smo glede na preliminarne rezultate pokazali tendenco višje izraženosti gena *Apol10b* v vseh treh tkivih, kjer je gen višje izražen pri miših LL.
- Enaka raven mRNA še ne določa enake koncentracije proteina, zato omenjeni geni še vedno ostajajo možni kandidatni geni, ki določajo nalaganje maščevja.

6 POVZETEK

Debelost v razvitih državah postaja vedno bolj zastopana, prav tako pa že dosega ostale predele sveta. Predstavlja glavni dejavnik tveganja za sladkorno bolezen tipa II, hipertenzijo, koronarne arterijske bolezni, osteoartritis in nekatere oblike rakastih obolenj. Z izjemo redkih oblik debelosti, kjer je vzrok bolezni en sam, okvarjen gen, gre največkrat za tako imenovano poligeno debelost, kjer več genov povzroča večjo dovzetnost za debelost, vsak gen pa pripomore majhen delež k celoti. Debelost je kvantitativna lastnost, le-te pa so kodirane na genomskeih odsekih, imenovanih QTL-i. Proučevanje kvantitativnih lastnosti je izredno težavno, saj gre največkrat tako za vpliv genov, kot tudi okolja ter vpliv njunih interakcij. Posledično se tovrstne raziskave najpogosteje izvajajo na miših, oziroma drugih glodavcih, kjer je lažje omejiti vpliv okolja.

Z namenom analize nalaganja maščevja so leta 1984 na Inštitutu Roslin v Edinburgu začeli s selekcijo miši na visok in nizek odstotek telesnih maščob. Ti liniji, imenovani F in L sta omogočili nadaljnje analize, kjer so preučevali genetiko razvoja debelosti. Osnova za diplomsko delo sta bili dve izmed tovrstnih predhodnih raziskav, v katerih so določili možne pozicijske kandidatne gene.

Namen diplomskega dela je bil nadalje razjasniti genetsko pogojenost nalaganja maščevja na QTL-u *Fob3b*, mišega kromosoma 15. Naš cilj je bil:

- Z metodo sekvenciranja in poravnav nukleotidnih zaporedji selekcijskih miši F in L poiskati in analizirati polimorfizme v nukleotidnem zaporedju najbolj verjetnih tarčnih genov, ki kartirajo na področje QTL-a *Fob3b1*.
- Z verižno reakcijo s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo analizirati izraženost štirih genov QTL-a *Fob3b2*, kateri so se v preliminarni študiji Cirnski (2010a) izkazali kot najbolj diferencialno izraženi.

V diplomskem delu smo za analizo pozicijskih kandidatnih genov za nalaganje maščevja na mišjem kromosomu 15 uporabili dva pristopa finega kartiranja: primerjava nukleotidnih zaporedij kandidatnih genov ter analize izražanja kandidatnih genov.

V prvem delu smo izvedli verižno reakcijo s polimerazo ter pridobili nukleotidna zaporedja kandidatnih genov. Pregledali smo nukleotidna zaporedja šestih genov, oziroma skupaj 50 eksonov in nekatere dele intronov ter med linijama miši F in L identificirali tri polimorfizme znotraj pozicijskih kandidatnih genov *Cyp11b1* ter *Cyp11b2*. Le-te se nahajajo v drugem ter devetem eksonu gena *Cyp11b1* ter v sedmem intronu gena *Cyp11b2*. S tem smo potrdili del prve hipoteze, ki pravi, da se med linijama miši F in L v pozicijskih kandidatnih genih nahajajo polimorfizmi. Vlogo polimorfizmov pa bi bilo potrebo potrditi v prihodnjih raziskavah.

V drugem delu diplomske naloge smo z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času potrdili tendenco izraženosti gena *Ttc38*, za katerega se je v vseh treh tkivih (jetra, možgani, maščobno tkivo) izkazalo, da je izraženost gena višja pri miših LL.

Prav tako smo potrdili obstoječe podatke o izraženosti samih genov. In sicer smo dokazali, da je najbolj izražen gen *Tst*, ki mu sledijo *Ttc38*, *Apoll10b* ter *Lgals2*, ki je najmanj izražen gen.

V prihodnjih raziskavah bi bilo potrebno za pozicijske kandidatne gene iz prvega dela diplomske naloge izvesti nadaljnje analize nukleotidnih zaporedij še v njihovih regulatornih regijah izven kodogenih regij, nato pa bi bilo za celostno potrditev hipoteze iz prvega dela diplomske naloge potrebno preučiti vpliv identificiranih polimorfizmov na izražanje, tako na ravni RNA, kot tudi na ravni proteinov. Glede drugega dela diplomske naloge pa bi bilo potrebno analize, predvsem za gene *Ttc38*, *Tst* ter *Apoll10b*, z uporabo večjega števila vzorcev ponoviti ter upoštevati vpliv cirkadianih ritmov živali. Nadaljnji korak bi bila analiza nukleotidnih zaporedij kandidatnih genov znotraj ter izven kodogenih regij. Z uporabo dveh različnih pristopov finega kartiranja smo omejili izbor kandidatnih genov ter ovrgli oziroma potrdili načine, preko katerih bi lahko geni določali fenotip mišjih linij. Verjamemo, da rezultati diplomskega dela predstavljajo dobro osnovo za nadaljnje študije.

7 VIRI

Abiola O., Angel J.M., Avner P., Bachmanov A.A., Belknap J.K., Bennett B., Blankenhorn E.P., Blizzard D.A., Bolivar V., Brockmann G.A., Buck K.J., Bureau J.F., Casley W.L., Chesler E.J., Cheverud J.M., Churchill G.A., Cook M., Crabbe J.C., Crusio W.E., Darvasi A., de Haan G., Derman P., Doerge R.W., Elliot R.W., Farber C.R., Flaherty L., Flint J., Gershenson H., Gibson J.P., Gu J., Gu W., Himmelbauer H., Hitzemann R., Hsu H.C., Hunter K., Iraqi F.F., Jansen R.C., Johnson T.E., Jones B.C., Kempermann G., Lammert F., Lu L., Manly K.F., Matthews D.B., Medrano J.F., Mehrabian M., Mittelmann G., Mock B.A., Mogil J.S., Montagutelli X., Morahan G., Mountz J.D., Nagase H., Nowakowski R.S., O'Hara B.F., Osadchuk A.V., Paigen B., Palmer A.A., Peirce J.L., Pomp D., Rosemann M., Rosen G.D., Schalkwyk L.C., Seltzer Z., Settle S., Shimomura K., Shou S., Sikela J.M., Siracusa L.D., Spearow J.L., Teuscher C., Threadgill D.W., Toth L.A., Toye A.A., Vadasz C., Van Zant G., Wakeland E., Williams R.W., Zhang H.G., Zou F. 2003. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nature Reviews Genetics*, 4, 11: 911-916

Altshuler D., Pollara V.J., Cowles C.R., Van Etten W.J., Baldwin J., Linton L., Lander E.S. 2000. An SNP map of the human genome, generated by reduced representation shotgun sequencing. *Nature*, 407, 6803: 513-516

Beigneux A.P., Davies B.S., Gin P., Weinstein M.M., Farber E., Qiao X., Peale F., Bunting S., Walzem R.L., Wong J.S., Blaner W.S., Ding Z.M., Melford K., Wongsiriroj N., Shu X., de Sauvage F., Ryan R.O., Fong L.G., Bensadoun A., Young S.G. 2007. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metabolism*, 5, 4: 279-291

Bell C.G., Walley A.J., Froguel P. 2005. The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics*, 6, 3: 221-234

Billaut-Laden I., Allorge D., Crunelle-Thibaut A., Rat E., Cauffiez C., Chevalier D., Houdret N., Lo-Guidice J.M., Broly F. 2006. Evidence for a functional genetic polymorphism of the human thiosulfate sulfurtransferase (Rhodanese), a cyanide and H₂S detoxification enzyme. *Toxicology*, 225, 1: 1-11

BioGPS-your Gene Portal Sistem (3. nov. 2010). <http://biogps.gnf.org> (3. nov. 2010)

Blanquicett C., Johnson M.R., Heslin M., Diasio R.B. 2002. Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies. *Analytical Biochemistry*, 303, 2: 209-214

Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., Pesola J.M., Kramer M.F. 2006. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Current Protocols in Molecular Biology*, unit: 15.8

- Brennan T.J., Matthews W., Moore M. 2003. Transgenic mice containing GPCR5-1 gene disruptions. U.S. Patent 0018989
- Brookes A.J. 1999. The essence of SNPs. *Gene*, 234, 2: 177-186
- Buenger L., Hill W.G. 1999. Inbred lines of mice derived from long-term divergent selection on fat content and body weight. *Mammalian Genome*, 10: 645-648
- Burton C.P., Akagi J.M. 1971. Observations on the rhodanese activity of *Desulfotomaculum nigrificans*. *Journal of Bacteriology*, 107, 1: 375-376
- Bustin S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 2: 169-193
- Campfield L.A., Smith F.J., Guisez Y., Devos R., Burn P. 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269, 5223: 546-549
- Cao H., Hegele R.A. 2002. Identification of single-nucleotide polymorphisms in the human *LPIN1* gene. *Journal of Human Genetics*, 47, 7: 370-372
- Cases S., Smith S.J., Zheng Y.W., Myers H.M., Lear S.R., Sande E., Novak S., Collins C., Welch C.B., Lusis A.J., Erickson S.K., Farese R.V. Jr. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 95, 22: 13018-13023
- Chang S., Duerr B., Serif G. 1988. An epimerase-reductase in L-fucose synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 4: 1693-1697
- Chen H.C. 2006. Enhancing energy and glucose metabolism by disrupting triglyceride synthesis: Lessons from mice lacking DGAT1. *Nutrition & Metabolism*, 3: 10
- Chen H.C., Stone S.J., Zhou P., Buhman K.K., Farese R.V. Jr. 2002. Dissociation of obesity and impaired glucose disposal in mice overexpressing acyl coenzyme a: diacylglycerol acyltransferase 1 in white adipose tissue. *Diabetes*, 51, 11: 3189-3195
- Chiu S., Kim K., Haus K.A., Espinal G.M., Millon L.V., Warden C.H. 2007. Identification of positional candidate genes for body weight and adiposity in subcongenic mice. *Physiological Genomics*, 31, 1: 75-85
- Cirnski K. 2010a. »Analiza izražanja genov z mikromrežami«.
(osebni vir, januar 2010)
- Cirnski K. 2010b. Analiza izražanja genov z mikromrežami, ponovitev.
(osebni vir, julij 2010)

- Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibé B., Bouix J., Caiment F., Elsen J.M., Eychenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C., Georges M. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genetics*, 38, 7: 813-818
- Cooper D.N., Smith B.A., Cooke H.J., Niemann S., Schmidtke J. 1985. An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Human Genetics*, 69, 3: 201-205
- Copeland N.G., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Eppig J.T., Maltais L.J., Miller J.C., Dietrich W.F., Weaver A., Lincoln S.E., Steen R.G. in sod. 1993. A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects. *Science*, 262, 513: 57-66
- Corva P.M., Medrano J.F. 2001. Quantitative trait loci (QTLs) mapping for growth traits in the mouse: a review. *Genetics Selection Evololutin*, 33, 2: 105-132
- Cossrow N., Falkner B. 2004. Race/ethnic issues in obesity and obesity-related comorbidities. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 6: 2590-2594
- Cox R.D., Brown S.D. 2003. Rodent models of genetic disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13, 3: 278-283
- Chatterjee S., Pal J.K. 2009. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biology of the Cell*, 101, 5: 251-262
- D'andrea L.D., Regan L. 2003. TPR proteins: the versatile helix. *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 12: 655-662
- Diament A.L., Farahani P., Chiu S., Fisler J., Warden C.H. 2004. A novel mouse Chromosome 2 congenic strain with obesity phenotypes. *Mammalian Genome*, 15, 6: 452-459
- DiPetrillo K., Wang X., Stylianou I.M., Paigen B. 2005. Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. *Trends in Genetics*, 21, 12: 683-692
- Dooley T.P., Nair S.K., Garcia R.E. 4., Courtney B.C. 1995. Mouse rhodanese gene (Tst): cDNA cloning, sequencing, and recombinant protein expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216, 3: 1101-1109
- Duchateau P.N., Pullinger C.R., Orellana R.E., Kunitake S.T., Naya-Vigne J., O'Connor P.M., Malloy M.J., Kane J.P. 1997. Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 41: 25576-25582
- Ensembl genome browser. Izdaja 56 (15. sep. 2009).
<http://www.ensembl.org/> (20. sep. 2010)

Ensembl genome browser. Izdaja 60 (8. okt. 2010).
<http://www.ensembl.org/> (17. nov. 2010)

Estrada-Smith D., Castellani L.W., Wong H., Wen P.Z., Chui A., Lusis A.J., Davis R.C. 2004. Dissection of multigenic obesity traits in congenic mouse strains. *Mammalian genome*, 15, 1: 14-22

Farber C.R., Medrano J.F. 2006. Fine mapping reveals sex bias in quantitative trait loci affecting growth, skeletal size and obesity-related traits on mouse chromosomes 2 and 11. *Genetics*, 175, 1: 349-360

Farooqi I.S., Matarese G., Lord G.M., Keogh J.M., Lawrence E., Agwu C., Sanna V., Jebb S.A., Perna F., Fontana S., Lechler R.I., DePaoli A.M., O'Rahilly S. 2002. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 110, 8: 1093-1103

Flint J., Mott R. 2001. Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nature reviews. Genetics*, 2, 6: 437-445

Friedman, J.M. 2003. A war on obesity, not the obese. *Science*, 299, 5608: 856-858

Geldermann H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers II. Expected effects. *Theoretical and Applied Genetics*, 47, 1: 1-4

GeneCards, verzija 3 (16. nov. 2010). <http://www.genecards.org> (17. nov. 2010)

Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25, 4: 386-401

Goel M.S., McCarthy E.P., Phillips R.S., Wee C.C. 2004. Obesity among United States immigrant subgroups by duration of residence. *Journal of the American Medical Association*, 292, 23: 2860-2867

Goldstone A.P. 2004. Prader-Willi syndrome: Advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15, 1: 12-20

Gordon L.P., Harris K.M., Ward D.S., Popkin B.M. 2003. Acculturation and overweight-related behaviors among Hispanic immigrants to the US: the National Longitudinal Study of Adolescent Health. *Social Science & Medicine*, 57, 11: 2023-2034

Grisel J.E. 2000. Quantitative trait locus analysis. *Alcohol Research & Health*, 24, 3: 169-174

GraphPad Software (feb. 2009). <http://www.graphpad.com> (10. nov. 2010)

- Ha E., Kim M.J., Choi B.K., Rho J.J., Oh D.J., Rho T.H., Kim K.H., Lee H.J., Shin D.H., Yim S.V., Baik H.H., Chung J.H., Kim J.W. Positive association of obesity with single nucleotide polymorphisms of syndecan 3 in the Korean population. 2006. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91, 12: 5095-5099
- Hase M., Yokomizo T., Shimizu T., Nakamura M. 2008. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor, GPR20, that constitutively activates Gi proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 19: 12747-12755
- Hasegawa J., Osatomi K., Wu R.F., Uyeda K.J. 1999. A novel factor binding to the glucose response elements of liver pyruvate kinase and fatty acid synthase genes. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 2: 1100-1107
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 10: 986-994
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 9: 1026-1030
- Horvat S., Bünger L., Falconer V.M., Mackay P., Law A., Bulfield G., Keightley P.D. 2000. Mapping of obesity QTLs in a cross between mouse divergently selected on fat content. *Mammalian Genome*, 11, 1: 2-7
- House of Commons Health Committee. 2004. Obesity: Third report session 2003-2004, 1. edition. London, The Stationery Office Limited.
www.publications.parliament.uk/pa/cm200304/cmselect/cmhealth/23/23.pdf (1. nov. 2010)
- Hubert H.B., Snider J., Winkleby M.A. 2005. Health status, health behaviors, and acculturation factors associated with overweight and obesity in Latinos from a community and agricultural labor camp survey. *Preventive Medicine*, 40, 6: 642-651
- Human Genome Project Information. 2005. The Human Genome Project (19. sep. 2008)
www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml (13. jul. 2010)
- Ioka R.X., Kang M.J., Kamiyama S., Kim D.H., Magoori K., Kamataki A., Ito Y., Takei Y.A., Sasaki M., Suzuki T., Sasano H., Takahashi S., Sakai J., Fujino T., Yamamoto T.T. 2003. Expression cloning and characterization of a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein, GPI-HBP1. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 9: 7344-7349
- Jacobsson J. 2006. Identification of polymorphisms in genes involved in obesity. Upsala teknolog-och naturvetarkår.
http://www.utn.uu.se/sts/cms/filarea/0602_Jacobsson.pdf (10. okt. 2010)
- Jerez-Timaure N.C., Kearney F., Simpson B.E., Eisen E.J., Pomp D. 2004. Characterisation of QTL with major effects on fatness and growth on mouse chromosome 2. *Obesity Research*, 12, 9: 1408-1420

- Kaplan, M. S., Huguet, N., Newsom, J. T., McFarland, B.H. 2004. The longer you stay, the bigger you get: length of time and language use in the U.S. are associated with obesity in Puerto Rican women. *American Journal of Physical Anthropology*, 125, 1: 90-96
- Kearsey M.J. 1998. The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany*, 49, 327: 1619-1623
- Kelesidis T., Kelesidis I., Chou S., Mantzoros C.S. 2010. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Annals of Internal Medicine*, 152, 2: 93-100
- Knai C., Suhreke M., Lobstein T. 2007. Obesity in Eastern Europe: An overview of its health and economic implications. *Economics and Human Biology*, 5: 392-408
- Kopelman P.G., 2000. Obesity as a medical problem. *Nature*, 404, 6778: 635-643
- Korn E.D. 1955. Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. I. Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart. *Journal of Biological Chemistry*, 215, 1: 1915-1921
- Kosir R., Acimovic J., Golicnik M., Perse M., Majdic G., Fink M., Rozman D. 2010. Determination of reference genes for circadian studies in different tissues and mouse strains. *BMC Molecular Biology*, 11: 60
- Krauss R.M., Winston M., Fletcher B.J., Grundy S.M. 1998. Obesity: Impact on Cardiovascular Disease. *Circulation*, 98: 1472-1476
- Kwok P.Y., Gu Z. 1999. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Molecular Medicine Today*, 5, 12: 538-543
- Lan H., Rabaglia M.E., Stoehr J.P., Nadler S.T., Schueler K.L., Zou F., Yandell B.S., Attie A.D. 2003. Gene expression profiles of nondiabetic and diabetic obese mice suggest a role of hepatic lipogenic capacity in diabetes susceptibility. *Diabetes*, 52, 3: 688-700
- Lander E.S., Botstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121, 1: 185-199
- Lee J.H., Bullen J.W. Jr., Stoyneva V.L., Mantzoros C.S. 2005. Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *American Journal of Physiological Endocrinology and Metabolism*, 288, 3: 625-632
- Lee C.K., Klopp R.G., Weindruch R., Prolla T.A. 1999. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science*, 285, 5432: 1390-1393

- Leek J.T., Scharpf R.B., Bravo H.C., Simcha D., Langmead B., Johnson W.E., Geman D., Baggerly K., Irizarry R.A. 2010. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nature Reviews Genetics*, 11, 10: 733-739
- Lembertas A.V., Perusse L., Chagnon Y.C., Fisler J.S., Warden C.H., Purcell-Huynh D.A., Dionne F.T., Gagnon J., Nadeau A., Lusis A.J., Bouchard C. 1997. Identification of an obesity QTL on mouse chromosome 2 and evidence of linkage to body fat and insulin on the human homologous region 20q. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 5: 1240-1247
- Lenzerini L., Benatti U., Morelli A., Pontremoli S., De Flora A., Piazza A., Rinaldi A., Filippi G., Siniscalco M. 1981. Genetic variation in the quantitative levels of an NADP (H)-binding protein (FX) in human erythrocytes. *Blood*, 57, 2: 209-217
- Leutenegger C.M., Mislin C.N., Sigrist B., Ehrengruber M.U., Hofmann-Lehmann R., Lutz H. 1999. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71, 3-4: 291-305
- Lin C.J., Tam R.C. 2001. Transcriptional regulation of CD28 expression by CD28GR, a novel promoter element located in exon 1 of the CD28 gene. *Journal of Immunology*, 166, 10: 6134-6143
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 6:1292-1305
- Malinen E., Kassinen A., Rinttilä T., Palva A. 2003. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, 149, 1: 269-277
- Martínez-Arias R., Calafell F., Mateu E., Comas D., Andrés A., Bertranpetti J. 2001. Sequence variability of a human pseudogene. *Genome Research*, 11, 6: 1071-1085
- Mokdad A.H., Marks J.S., Stroup D.F., Gerberding J.L. 2004. Actual Causes of Death in the United States, 2000. *Journal of the American Medical Association*, 291: 1238-1245
- MEGA 4. 1993. Molecular Evolutionary Genetisc Analysis.
<http://www.megasoftware.net/> (20. mar. 2010)
- Mornet E., Dupont J., Vitek A., White P.C. 1989. Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *Journal of Biological Chemistry*, 264, 35: 20961-20967
- Mott R., Talbot C.J., Turri M.G., Collins A.C., Flint J. 2000. A method for fine mapping quantitative trait loci in outbred animal stocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 23: 12649-12654

Mouse genome informatics (MGI). 2005. The Jackson laboratory.
<http://jaxmice.jax.org/literature/communication/communication06.pdf> (29. apr. 2010)

Mouse Genome Informatics (MGI) (28. apr. 2010). <http://www.jax.org> (29. apr. 2010)

Mullins L.J., Peter A., Wrobel N., McNeilly J.R., McNeilly A.S., Al-Dujaili E.A., Brownstein D.G., Mullins J.J., Kenyon C.J. 2009. Cyp11b1 null mouse, a model of congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 6: 3925-3934

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

Nadler S.T., Stoehr J.P., Schueler K.L., Tanimoto G., Yandell B.S., Attie A.D. 2000. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97, 21: 11371-11376

Neel J.V. 1962. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *American Journal of Human Genetics*, 14: 353-362

Nelson T.L., Brandon D.T., Wiggins S.A., Whitfield K.E. 2002. Genetic and environmental influences on body-fat measures among African-American twins. *Obesity Research*, 10, 8: 733-739

Neznanov N., Umezawa A., Oshima R.G. 1997. A regulatory element within a coding exon modulates keratin 18 gene expression in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 44: 27549-27557

Noyes H.A., Agaba M., Anderson S., Archibald A.L., Brass A., Gibson J., Hall L., Hulme H., Oh S.J., Kemp S. 2010. Genotype and expression analysis of two inbred mouse strains and two derived congenic strains suggest that most gene expression is trans regulated and sensitive to genetic background. *BMC Genomics*, 11: 361

Obesity and overweight. 2006. World Health Organization.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html> (17. apr. 2010)

O'Dowd B.F., Nguyen T., Jung B.P., Marchese A., Cheng R., Heng H.H., Kolakowski L.F. Jr, Lynch K.R., George S.R. 1997. Cloning and chromosomal mapping of four putative novel human G-protein-coupled receptor genes. *Gene*, 187, 1: 75-81

Ozaki K., Inoue K., Sato H., Iida A., Ohnishi Y., Sekine A., Sato H., Odashiro K., Nobuyoshi M., Hori M., Nakamura Y., Tanaka T. 2004. Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro. *Nature*, 429, 6987: 72-75

Ozaki K., Ohnishi Y., Iida A., Sekine A., Yamada R., Tsunoda T., Sato H., Sato H., Hori M., Nakamura Y., Tanaka T. 2002. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that

- are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature Genetics*, 32, 4: 650-654
- Page N.M., Butlin D.J., Lomthaisong K., Lowry P.J. 2001. The human apolipoprotein L gene cluster: identification, classification, and sites of distribution. *Genomics*, 74, 1: 71-78
- Palmer S., Wiegand A.P., Maldarelli F., Bazmi H., Mican J.M., Polis M., Dewar R.L., Planta A., Liu S., Metcalf J.A., Mellors J.W., Coffin J.M. 2003. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 10: 4531-4536
- Péterfy M., Phan J., Xu P., Reue K. 2001. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nature Genetics*, 27, 1: 121-124
- Pfaffl M.W., Vandesompele J., Kubista M. 2009. Data Analysis Software. V: Real-Time PCR: Current Technology and Applications. Logan J., Edwards K., Saunders N. (eds). Norfolk, Caister Academic Press: 65-83
- Pierce R.A., Moore C.H., Arikan M.C. 2006. Positive transcriptional regulatory element located within exon 1 of elastin gene. *American Journal of Physiology – Lung Cell Molecular Physiology*, 291, 3: 391-399
- Prentice A.M., 2006. The emerging epidemic of obesity in developing countries. *International Journal of Epidemiology*, 35, 1: 93-99
- Prevoršek Z. 2009. »Zaporedje gena *Dgat1* pri linijah miši F in L«. Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, oddelek za Zootehniko, Biotehniška fakulteta (osebni vir, jun. 2009)
- Prevoršek Z., Gorjanc G., Paigen B., Horvat S. 2010. Congenic and bioinformatics analyses resolved a major-effect Fob3b QTL on mouse Chr 15 into two closely linked loci. *Mammalian Genome*, 21, 3-4: 172-185
- Radonić A., Thulke S., Mackay I.M., Landt O., Siegert W., Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 4: 856-862
- 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 Research*, 14, 4: 529-644

Reizes O., Lincecum J., Wang Z., Goldberger O., Huang L., Kaksonen M., Ahima R., Hinkes M.T., Barsh G.S., Rauvala H., Bernfield M. 2001. Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3. *Cell*, 106, 1: 105-116

Rogner C.U., Avner P. 2007. Use of Congenic Mouse Strains for Candidate Disease Gene Identification in Complex Traits. V: Sourcebook of Models for Biomedical Research. Conn M.P. (ed). New York, Humana Press: 575-581

Roorda B.D., Hesselink M.K., Schaart G., Moonen-Kornips E., Martínez-Martínez P., Losen M., De Baets M.H., Mensink R.P., Schrauwen P. 2005. DGAT1 overexpression in muscle by in vivo DNA electroporation increases intramyocellular lipid content. *Journal of Lipid Research*, 46, 2: 230-236

Roth C.M. 2002. Quantifying gene expression. *Current Issues in Molecular Biology*, 4, 3: 93-100

Russo P., Lauria F., Loguercio M., Barba G., Arnout J., Cappuccio F.P., de Lorgeril M., Donati M.B., Iacoviello L., Krogh V., van Dongen M., Siani A. 2007. -344C/T Variant in the promoter of the aldosterone synthase gene (CYP11B2) is associated with metabolic syndrome in men. *American Journal of Hypertension*, 20, 2: 218-222

Schultz J., Marshall-Carlson L., Carlson M. 1990. The N-terminal TPR region is the functional domain of SSN6, a nuclear phosphoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 9: 4744-4756

Selvey S., Thompson E.W., Matthaei K., Lea R.A., Irving M.G., Griffiths L.R. 2001. Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 15, 5: 307-311

Sharp G.L., Hill W.G., Robertson A. 1984. Effects of selection on growth, body composition and food intake in mice I. Responses in selected traits. *Genetical Research*, 43, 1: 75-92

Sikorski R.S., Boguski M.S., Goebel M., Hieter P. 1990. A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell*, 60, 2: 307-317

Simoncic M., Horvat S., Stevenson P.L., Bünger L., Holmes M.C., Kenyon C.J., Speakman J.R., Morton N.M. 2008. Divergent physical activity and novel alternative responses to high fat feeding in polygenic fat and lean mice. *Behaviour Genetics*. 38, 3: 292-300

Smith S.J., Cases S., Jensen D.R., Chen H.C., Sande E., Tow B., Sanan D.A., Raber J., Eckel R.H., Farese R.V. Jr. 2000. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nature Genetics*, 25, 1: 87-90

- Stunkard A.J., Foch T.T., Hrubec Z. 1986. A twin study of human obesity. *Journal of the American Medical Association*, 256, 1: 51-54
- Stylianou I.M. 2004. Genetic mapping and microarrays to identify factors associated with a mouse obesity QTL region. PhD, Edinburgh, University of Edinburgh: 296 str.
- Stylianou I.M., Christians J.K., Keightley P.D., Bünger L., Clinton M., Bulfield G., Horvat S. 2004. Genetic complexity of an obesity QTL (Fob3) revealed by detailed genetic mapping. *Mammalian Genome*, 15, 6: 472-481
- Stylianou I.M., Clinton M., Keightley P.D., Pritchard C., Tymowska-Lalanne Z., Bünger L., Horvat S. 2005. Microarray gene expression analysis of the Fob3b obesity QTL identifies positional candidate gene Sqle and perturbed cholesterol and glycolysis pathways. *Physiological Genomics*, 20, 3: 224-232
- Sundquist J., Winkleby M. 2000. Country of birth, acculturation status and abdominal obesity in a national sample of Mexican-American women and men. *International Journal of Epidemiology*, 29, 3: 470-477
- Terán-García M., Després J.P., Couillard C., Tremblay A., Bouchard C. 2004. Effects of long-term overfeeding on plasma lipoprotein levels in identical twins. *Atherosclerosis*, 173, 2: 277-283
- The Jackson Laboratory. 2001. Production of Congenic Strains Using Marker-Assisted ("Speed") Technologies. JAX Communications
- Tevfik D.M. 2006. Real-Time PCR. Cornwall, Taylor&Francis Group: 333 str.
- Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., Pfaffl M.W. 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research*, 31, 20: e122
- Tonetti M., Sturla L., Bisso A., Benatti U., De Flora A. 1996. Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 44: 27274-27279
- Tree Families Databases. 2009. Release 7.
<http://www.treefam.org/> (15. apr. 2010)
- Tricarico C., Pinzani P., Bianchi S., Paglierani M., Distante V., Pazzaglia M., Bustin S.A., Orlando C. 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry*, 309, 2: 293-300
- Tsang S., Sun Z., Luke B., Stewart C., Lum N., Gregory M., Wu X., Subleski M., Jenkins N.A., Copeland N.G., Munroe D.J. 2005. A comprehensive SNP-based genetic analysis of inbred mouse strains. *Mammalian Genome*, 16, 7: 476-480

- Udvardi M.K., Czechowski T., Scheible W.R. 2008. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell*, 20, 7: 1736-1737
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 13, 7: research 0034
- VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44, 5: 619-626
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics, Selection, Evolution*, 34, 3: 275-305
- Wacker M.J., Godard M.P. 2005. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *Journal of Biomolecular Technology*, 16, 3: 266-271
- Wakeland E., Morel L., Achey K., Yui M., Longmate J. 1997. Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunology Today*, 18, 10: 472-477
- Wang Q., Li H., Li N., Leng L., Wang Y., Tang Z. 2006. Identification of single nucleotide polymorphism of adipocyte fatty acid-binding protein gene and its association with fatness traits in the chicken. *Poultry Science*, 85, 3: 429-434
- White P.C., New M.I., Dupont B. 1984. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 81, 23: 7505-7509
- Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39, 1: 75-85
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 6505: 425-432
- Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. 2004. *Nucleic Acids Research*, 32, 12:e103

ZAHVALA

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

Recenzentki doc. dr. Tanji Kunej se zahvaljujem za hiter pregled diplomskega dela ter predloge za izboljšanje le-tega.

Prav posebej se zahvaljujem mlademu raziskovalcu Roku Kebru ter dr. Zali Prevoršek, ki sta tekom celotnega diplomskega dela znala nesebično pomagati ter deliti svoje znanje in izkušnje in brez katerih izvedba eksperimentalnega dela ne bi bila mogoča.

Za pomoč se zahvaljujem tudi Heleni Klavžar iz Centra za biočipe in funkcionalno gemomikro.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matjaž STANONIK

**ANALIZA KANDIDATNIH GENOV ZA NALAGANJE
MAŠČEVJA NA MIŠJEM KROMOSOMU 15**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

