

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Mateja POKLUKAR

**ANALIZA POLIMORFIZMOV GENA *TFAM*
PRI KONJU (*Equus caballus*)**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**ANALYSIS OF *TFAM* GENE POLYMORPHISMS
IN HORSE (*Equus caballus*)**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek visokošolskega strokovnega študija kmetijstvo - zootehnika. Poskus in analize so bili opravljeni v Genetskem laboratoriju Inštituta za živinorejo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je na seji dne 9.6.2006 določila za mentorja prof. dr. Petra Dovča in somentorico doc. dr. Tanjo Kunej.

Recenzent: prof. dr. Simon HORVAT

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

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

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

Datum zagovora:

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

Mateja Poklukar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Vs
DK	UDK 636.1:575(043.2)=163.6
KG	konji/molekularna genetika/geni/ <i>TFAM</i> /polimorfizem
KK	AGRIS L10/5120
AV	POKLUKAR, Mateja
SA	DOVČ, Peter (mentor)/KUNEJ, Tanja (somentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2007
IN	ANALIZA POLIMORFIZMOV GENA <i>TFAM</i> PRI KONJU (<i>Equus caballus</i>)
TD	Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP	IX, 33 str., 2 pregl., 20 sl., 2 pril., 25 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Mitochondrijski transkripcijski faktor A (<i>TFAM</i>) je protein, ki je kodiran v jedru celice in regulira začetek transkripcije in podvajanje mitochondrialne DNA. Gen <i>TFAM</i> je zanimiv pri vrstah, za katere nas zanima razvijanje genetskih markerjev, povezanih s fizičnimi zmogljivostmi živali. Postavili smo hipotezo, da bi lahko genetska variabilnost v genu <i>TFAM</i> imela vpliv na mitochondrialno biogenezo in posledično na energetski metabolizem ter mišično maso skeletnih mišic pri različnih pasmah konj. Nukleotidno zaporedje gena <i>TFAM</i> smo pridobili z <i>in silico</i> primerjalnim kloniranjem iz podatkovne zbirke projekta sekvenciranja konjskega genoma. Program MatInspector smo uporabili za analizo vezave potencialnih transkripcijskih faktorjev. DNA smo izolirali iz krvi po metodi izolacije s fenolom iz krvi sesalcev. Restrikcijsko analizo smo izvedli z metodo PCR-RFLP. Ugotovili smo, da ima gen <i>TFAM</i> pri konju 7 eksonov in 6 intronov. Primerjava promotorja med vrstami je razkrila ohranjena območja. Našli smo 22 SNP-jev, 6 z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja in 16 iz podatkovne zbirke sekvenciranja konjskega genoma. SNP-ji v promotorju lahko vplivajo na izraženost gena in število mitochondrialjev. SNP v intronu II se nahaja na vezavnem mestu za specifični mišični transkripcijski faktor Mt, zato obstaja možnost, da ima vpliv na razvoj mišic in fizične sposobnosti živali. Nadaljnji poskusi na podlagi te študije bodo omogočili razvoj genetskih markerjev z vplivom na fizične sposobnosti konj.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDK 636.1:575(043.2)=163.6
CX horses/molecular genetics/genes/*TFAM*/polymorphism
CC AGRIS L10/5120
AU POKLUKAR, Mateja
AA DOVČ, Peter (supervisor)/KUNEJ, Tanja (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department
PY 2007
TI ANALYSIS OF *TFAM* GENE POLYMORPHISMS IN HORSE (*Equus caballus*)
DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
NO IX, 33 p., 2 tab., 20 fig., 2 ann., 25 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Mitochondrial transcription factor A (*TFAM*), a nucleus-encoded protein, regulates the initiation of transcription and replication of mitochondrial DNA (mtDNA). Characterization of the *TFAM* gene is of interest in the species where physical performance plays an important role. Therefore we hypothesized that the genetic variants in *TFAM* gene could have an impact on mitochondrial biogenesis and consequently energy metabolism and skeletal muscle mass in different horse breeds. The *TFAM* gene sequence was annotated using *in silico* comparative cloning of the sequence retrieved from the Horse Genome Browser Gateway and the gaps were closed with targeted region PCR amplification. Transcriptional regulatory elements were searched for using MatInspector. DNA was isolated from blood using phenol-chloroform extraction. Genotyping was performed using sequencing and PCR-RFLP method. It has been established that the equine *TFAM* gene consists of 7 exons and 6 introns. Multi-species promoter alignment revealed several conserved regulatory elements. We identified 22 SNPs, six of them were found experimentally and 16 SNPs were retrieved from database searches. Promoter SNPs might affect the expression level of the gene and mitochondrial number. Intron II SNP resides in the binding site for the muscle specific transcription factor Mt and may affect muscle development. The revealed genetic variability might be used for marker assisted selection of racing horses.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWI)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
 <hr/>	
1 UVOD	1
1.1 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MITOHONDRIJSKI TRANSKRIPCIJSKI FAKTOR A – GEN <i>TFAM</i>	3
2.2 MIŠICE, MITOHONDRIJI IN ATP	5
2.2.1 Proteini in transkripcijski faktorji, značilni za mišico	6
2.3 OPIS POSTOPKOV DOLOČANJA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENOMA	8
2.3.1 Naključno sekvenciranje celotnega genoma	8
2.3.2 Sekvenciranje urejenih klonov	8
2.4 PROJEKT SEKVENCIRANJA KONJSKEGA GENOMA	9
2.5 RAZISKAVE GENA <i>TFAM</i> PRI KONJU	10
2.6 RAZISKAVE GENA <i>TFAM</i> PRI ČLOVEKU IN GOVEDU	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 LABORATORIJSKA OPREMA	11
3.2 IZOLACIJA, PRIPRAVA IN ANALIZA DNA	11
3.2.1 Izolacija DNA iz krvi	11
3.2.2 Elektroforeza DNA v agaroznem gelu	13
3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo	14

3.2.4	Restrikcijska analiza; polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov	15
3.2.5	Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje)	16
3.2.6	Bioinformatske metode	18
4	REZULTATI	19
4.1	DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENA <i>TFAM</i>	19
4.2	ANALIZA GENETSKE VARIABILNOSTI GENA <i>TFAM</i>	20
4.2.1	Analiza polimorfizmov v območju promotorja in eksona 1	20
4.2.2	Analiza polimorfizma C989T v intronu 2 z metodo RFLP	22
4.2.3	<i>In silico</i> ugotavljanje polimorfizmov v genu <i>TFAM</i>	25
4.3	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE TFAM PRI KONJU	25
4.4	PRIMERJAVA ZAPOREDJA PROMOTORJA GENA <i>TFAM</i> Z ZAPOREDJEM PRI DRUGIH VRSTAH	26
5	ZAKLJUČKI	27
5.1	DOLOČANJE IN PRIMERJAVA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA	27
5.2	ANALIZA GENETSKE VARIABILNOSTI GENA <i>TFAM</i>	27
5.2.1	Analiza polimorfizmov z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja	27
5.2.2	Analiza polimorfizma C989T v intronu II z metodo RFLP	29
5.2.3	<i>In silico</i> ugotavljanje polimorfizmov v genu <i>TFAM</i>	29
5.3	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE TFAM PRI KONJU	30
6	POVZETEK	31
7	VIRI	32
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Pregl. 1: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za reakcijo PCR	15
Pregl. 2: Podatkovne zbirke in bioinformatske metode, ki smo jih uporabljali pri delu	18

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Mehанизem transkripcije mitohondrijske DNA	3
Sl. 2: Medsebojno vplivanje med mitohondrijskimi transkripcijskimi proteini ob začetku transkripcije mitohondrijske DNA	4
Sl. 3: Prikaz mišične celice z mitohondriji	6
Sl. 4: Proces miogeneze	7
Sl. 5: Uravnavanje gena za dezmin s transkripcijskimi faktorji MEF2, Mt in MyoD1	7
Sl. 6: Naslovna stran projekta sekvenciranja konjskega genoma	9
Sl. 7: Organizacija gena <i>TFAM</i> pri človeku. Navedene so dolžine eksonov in intronov 10	10
Sl. 8: Zamenjava C>T v intronu II gena <i>TFAM</i> pri konju in mesto prepoznavanja restriktijskega encima <i>Xba</i> I	15
Sl. 9: Aparatura za kapilarno elektroforezo	17
Sl. 10: Organizacija gena <i>TFAM</i> pri konju	19
Sl. 11: SNP-ji gena <i>TFAM</i> pri konju	20
Sl. 12: Primerjava nukleotidnih zaporedij v promotorju in eksonu 1 gena <i>TFAM</i> pri sedmih konjih, ki pripadajo štirim različnim pasmam	21
Sl. 13: Mesto SNP-ja v eksonu 1	21
Sl. 14: Primerjava nukleotidnih zaporedij promotorjev gena <i>TFAM</i> pri sedmih konjih in nukleotidnega zaporedja iz podatkovne zbirke projekta konjskega genoma	22
Sl. 15: Nukleotidno zaporedje, ki smo ga pomnoževali pri metodi PCR-RFLP za analizo SNP-ja C989T	23
Sl. 16: Shema analize PCR-RFLP za C989T v intronu II gena <i>TFAM</i>	23
Sl. 17: Agarozni gel PCR-RFLP za analizo C989T v intronu II gena <i>TFAM</i>	24
Sl. 18: Prikazano je območje Mt z vezavo alela T ali alela C in vezavno mesto za MEF2	24
Sl. 19: Aminokislinsko zaporedje gena <i>TFAM</i> pri konju	25
Sl. 20: Primerjava nukleotidnega zaporedja promotorja gena <i>TFAM</i> pri šestih vrstah	26

KAZALO PRILOG

Pril. A: Nukleotidno zaporedje gena *TFAM* pri konju

Pril. B: Podatki o SNP-jih

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	Adenin
C	Citozin
G	Gvanin
T	Timin
Ak	aminokislina
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNTP	2'-deoksinukleozid-5'-trifosfat
EST	oznaka izraženega zaporedja (angl. <i>Expressed Sequence Tag</i>)
EtBr	etidijev bromid (2,7-diamino-10-etil-9-fenantridinijev bromid)
HSP	promotor težke verige (angl. <i>Heavy-Strand Promoter</i>)
LSP	promotor lahke verige (angl. <i>Light-Strand Promoter</i>)
M	molarnost, mol/l
µl	mikroliter, 10^{-6} l
MtDNA	mitohondrijska deoksiribonukleinska kislina
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
POLRMT	mitohondrijska RNA polimeraza (angl. <i>Mitochondrial RNA Polymerase</i>)
SNP	posamezni nukleotidni polimorfizem (angl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA	ribonukleinska kislina
TFAM	mitohondrijski transkripcijski faktor A (angl. <i>Mitochondrial Transcription Factor A</i>)
TFB1M	mitohondrijski transkripcijski faktor B1 (angl. <i>Mitochondrial Transcription Factor B1</i>)
TFB2M	mitohondrijski transkripcijski faktor B2 (angl. <i>Mitochondrial Transcription Factor B2</i>)
3'-UTR	3' -neprevedeno območje (angl. <i>3'-UnTranslated Region</i>)
5'-UTR	5' -neprevedeno območje (angl. <i>5'-UnTranslated Region</i>)
ATP	Adenozintrifosfat

1 UVOD

Mitohondrijski transkripcijski faktor A (TFAM) je protein, pomemben za transkripcijo mitohondrijske DNA. Kodiran je v celičnem jedru in deluje na kontrolno območje mitohondrijske DNA (*angl. D-loop*) (Casas in sod., 2000).

Mitohondriji so celični organeli in imajo zunanjou membrano, notranjo membrano in matriks. Notranja membrana mitohondrijev je nagubana, da ima veliko površin za razmestitev encimov dihalne verige in sinteze ATP. V plazmi matriksa je krožna molekula DNA in ribosomi. Tkiva in organi, ki potrebujejo veliko energije, imajo večje število mitohondrijev (Voet D. in Voet I.G., 1995).

Mišičje je velik porabnik energije v telesu. Krčenje mišic omogočajo nitaste beljakovine. Na osnovi funkcionalnih in morfoloških kriterijev lahko pri sesalcih razdelimo mišično tkivo na: gladko mišično tkivo, prečno progasto srčno mišico in prečno progasto skeletno mišično tkivo (Voet D. in Voet I.G., 1995).

Analiza mitohondrijev je smiselna pri živalih, pri katerih nas zanima razvijanje genetskih markerjev z vplivom na njihovo fizično aktivnost. Mitohondrijski geni in njihovi transkripcijski faktorji so tako dobri kandidatni geni za razvoj genetskih markerjev z vplivom na mišično moč in vzdržljivost pri konjih.

Konj ima 64 kromosomov (62 avtosomov in dva spolna kromosoma). Konjski genom je bil sekvenciran iz dveh razlogov. Pričakuje se, da bo pomagal identificirat funkcionalne genomske značilnosti sesalcev in omogočal odkrivanje genetskih vzrokov za bolezni pri konjih. Konji in ljudje si delimo mnogo bolezenskih stanj (npr. alergije, artritis). Mapiranje bolezenskih genov pri konjih bi pripomoglo k ugotavljanju bolezenskih genov pri človeku (Broad Institute, 2007).

Osnovni mehanizem mitohondrijske transkripcije, v katero spada tudi gen *TFAM*, usmerja mitohondrijsko biogenezo in izražanje genov. Mitohondriji so odgovorni za energijski

metabolizem. Želeli smo analizirati genetsko variabilnost gena *TFAM* pri konju in morebitni vpliv na prečno progasto skeletno mišičje in fizične sposobnosti konj.

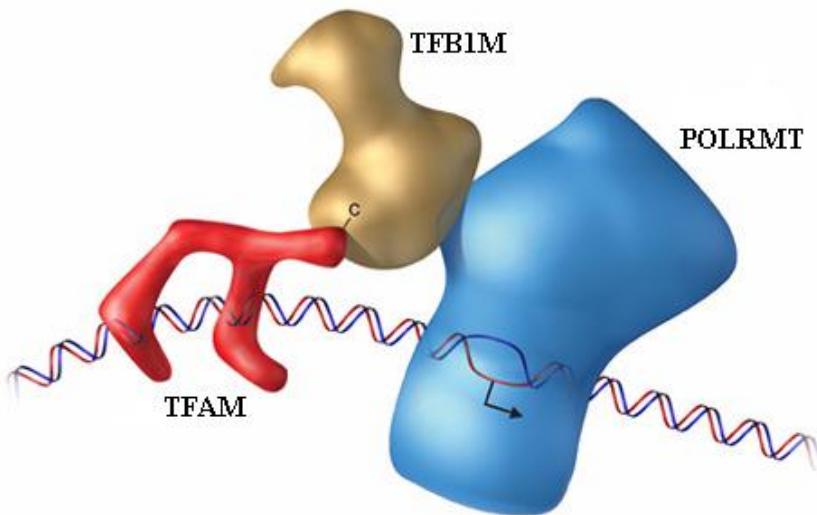
1.1 DELOVNE HIPOTEZE

1. Z informacijami iz podatkovnih zbirk je možno pridobiti vsaj delno zaporedje gena *TFAM* pri konju.
2. V genu za *TFAM* pri konju so prisotni polimorfizmi, ki vplivajo na aminokislinsko zaporedje proteina TFAM.
3. Frekvenca mutacij v genu za *TFAM* je pri različnih pasmah različna.
4. Nekatere mutacije v genu *TFAM* utegnejo imeti vpliv na fizične sposobnosti konja.

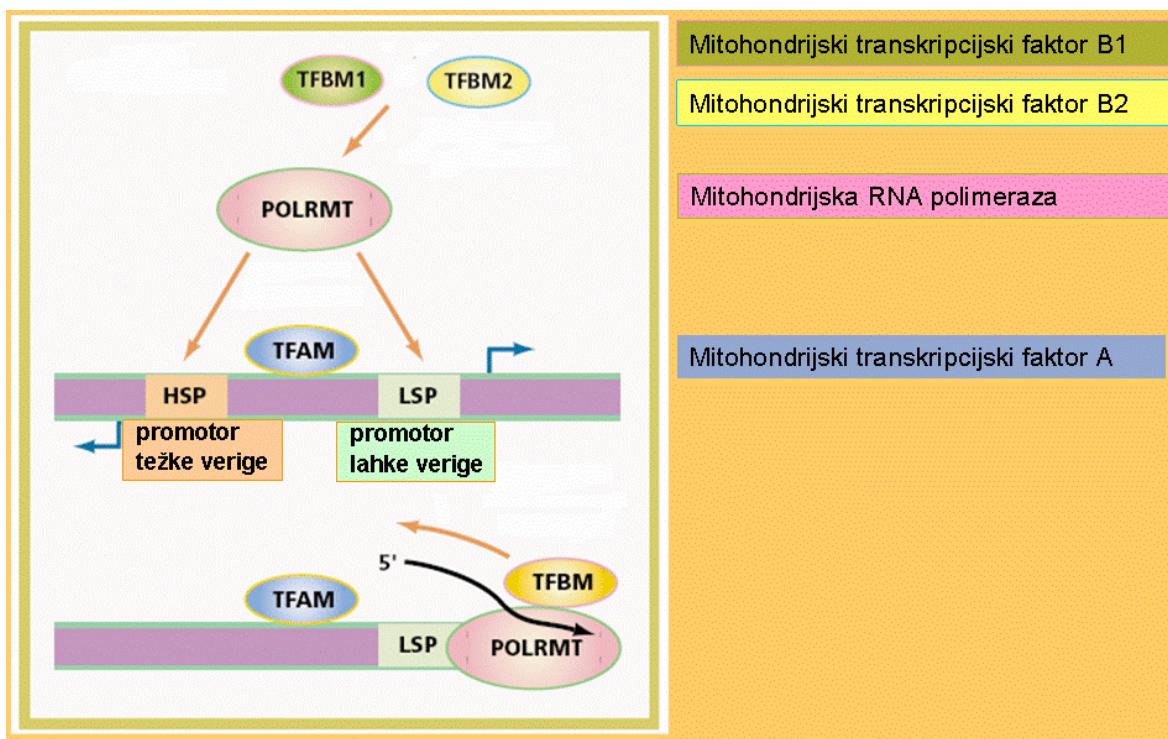
2 PREGLED OBJAV

2.1 MITOHONDRIJSKI TRANSKRIPCIJSKI FAKTOR A – GEN *TFAM*

Gen *TFAM* je mitohondrijski transkripcijski faktor, ki je potreben je za transkripcijo mtDNA. Transkripcija mtDNA poteka s promotorja lahke verige (*angl. light strand promoter*, LSP) in promotorja težke verige (*angl. heavy strand promoter*, HSP) ob prisotnosti mitohondrijskih transkripcijskih faktorjev B1 (TFB1M), B2 (TFB2M) in mitohondrijske RNA polimeraze (POLRMT). Na sliki 1 je prikazan mehanizem transkripcije mitohondrijske DNA. Transkripcija z LSP (Slika 2) tudi ustvarja RNA začetni oligonukleotid, ki je odgovoren za podvajanje mtDNA, torej je gen *TFAM* vključen tudi v regulacijo števila kopij mtDNA (Chang in Clayton, 1984).



Sl. 1: Mehanizem transkripcije mitohondrijske DNA (Falkenberg in sod., 2002)



Sl. 2: Medsebojno vplivanje med mitohondrijskimi transkripcijskimi proteini ob začetku transkripcije mitohondrijske DNA (McCulloch in Shadel, 2003)

S tehnologijo izničenja genov (*angl. knock out technology*) pri miših so v heterozigotnih živalih za *TFAM* odkrili nižje število mitohondrijev na celico, pri homozigotnih živalih pa ekstremno znižanje števila mitohondrijev, kar je povzročilo prekinitev oksidativne fosforilacije in letalnost (Larsson in sod., 1998; Falkenberg in sod., 2002).

Poznavanje gena *TFAM* je zanimivo za tiste živalske vrste, pri katerih igrajo pomembno vlogo fizične sposobnosti. Polimorfizmi v območju promotorja gena *TFAM* pri konjih bi lahko direktno vplivali na njihovo mitohondrijsko aktivnost in fizično sposobnost (Kunej in sod., 2005).

Ugotovljeno je bilo, da je ena molekula mtDNA v povprečju prepletena z 900 molekulami *TFAM* (Alam in sod., 2003) in da *TFAM* regulira število kopij mtDNA. Raziskave na miših s povečanim izražanjem gena *TFAM* in izničenim genom *TFAM* so pokazale povezano med količino proteina *TFAM* v mišijih zarodkih ter številom kopij mtDNA (Ekstrand in sod., 2004). Prav tako je bil na celicah HeLa z metodo RNA interference dokazan direkten vpliv ravni *TFAM* na število mitohondrijev (Kanki in sod., 2004).

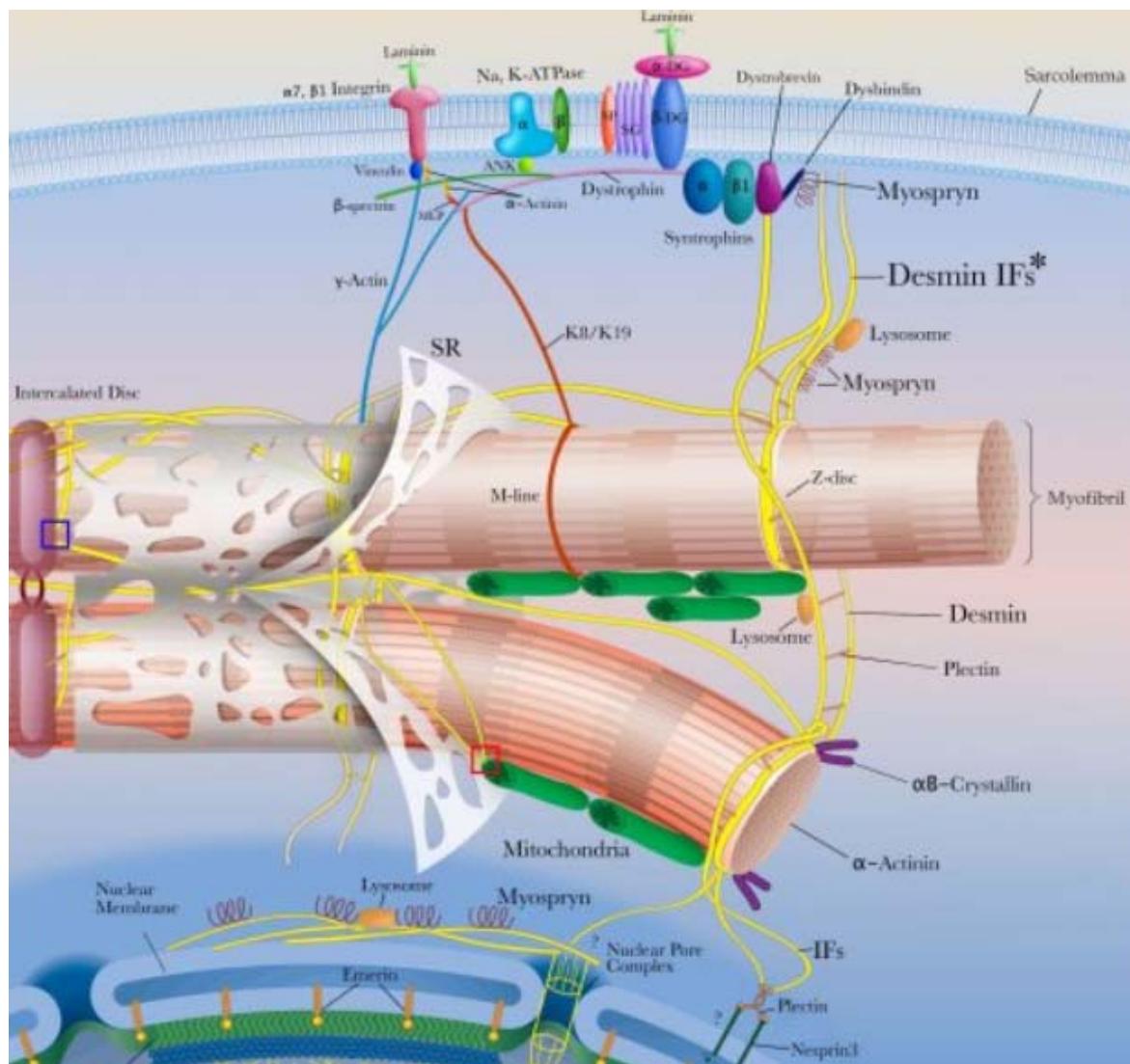
2.2 MIŠICE, MITOHONDRIJI IN ATP

Za krčenje mišica potrebuje energijo, ki se sprošča zlasti pri izgorevanju ogljikovih hidratov (glukoze) in maščobnih kislin. Pri mišičnem delu se sprošča tudi mnogo toplote, ki greje telo in omogoča kemične procese v vseh telesnih celicah. Mišica opravlja delo tako, da se na živčno pobudo skrči in skrajša, pri čemer se tudi zadebeli in postane trša ter bolj napeta kot v mirovanju. Ko živčna pobuda preneha, se mišica sprosti in postane ohlapnejša. Mišice potrebujejo veliko energije zato imajo veliko mitohondrijev. Na sliki 3 je prikazana mišična celica z mitohondriji (Voet D. in Voet I.G., 1995).

Genetska variabilnost v mtDNA ima vpliv na mišice, dokazano je bilo namreč, da spadajo med organe, ki jih mutacije v mtDNA najbolj prizadenejo možgani, skeletna mišica, srce, ledvica in jetra (D'Souza in Weissig, 2004)

Predniki današnjega mitohondrija so bile bakterije, ki so v nekem času vzpostavile znotrajcelično simbiozo z zgodnjimi evkariontskimi celicami. Mitohondriji so zelo pomembni, ker v njih potekajo respiratorni in oksidativno fosforilacijski procesi (mehanizem produkcije ATP) (Stuart in Brown, 2006).

ATP je molekula, ki služi kot univerzalni prenašalec energije v biokemijskih procesih. V mitohondrijih sta procesa transport elektronov in sinteza ATP povezana in odvisna drug od drugega. Oksidativna fosforilacija je kombinacija teh dveh različnih procesov. Proses pretvorbe elektrokemijske energije (izvira iz razlik oksidoreduktičkih potencialov) v kemijsko energijo (shranjena v ATP) razлага mehanizem kemiosmosne sklopitve. Tok elektronov gre preko sklopitvenih mest, pri tem se protoni prečrpavajo skozi notranjo mitohondrijsko membrano. Tako nastaja protonski gradient, saj koncentracija protonov v medmembranskem prostoru glede na matriks narašča. Ko se protoni vračajo v matriks in se gradient ruši, se sproščena energija porablja za nastanek ATP. Sinteza ATP poteka v notranji mitohondrijski membrani (Boyer, 2005).

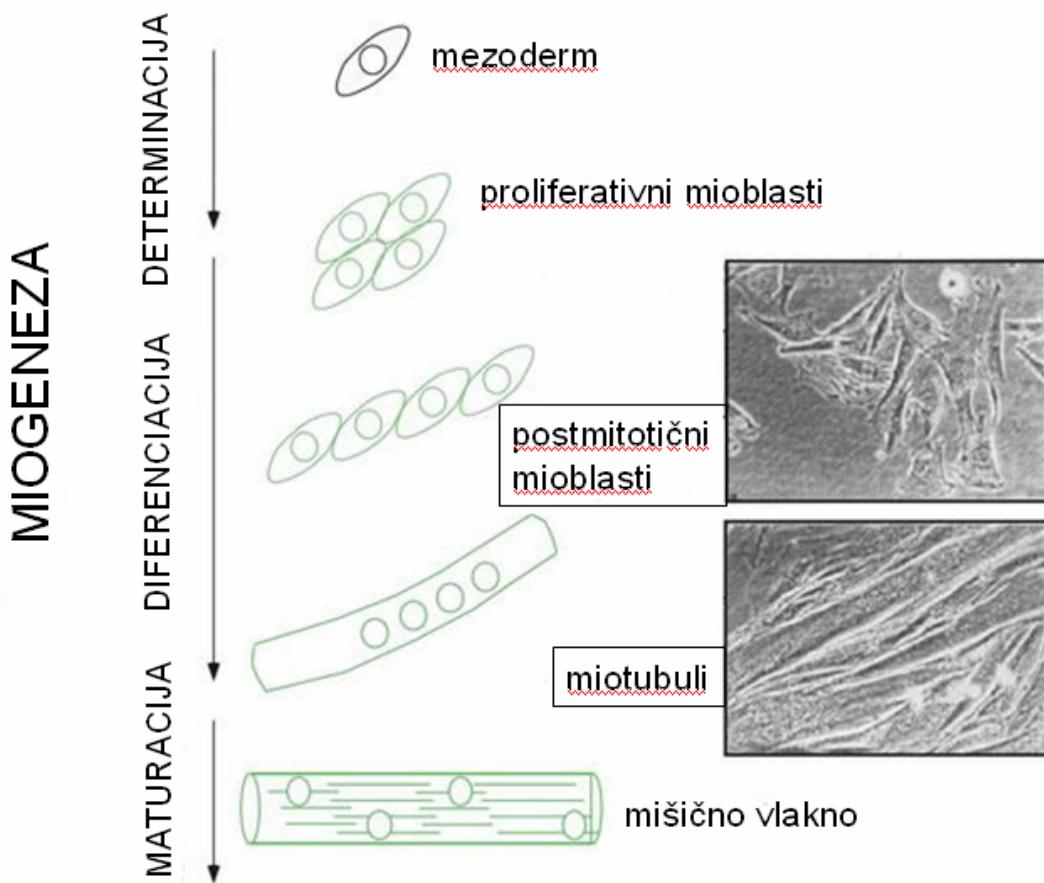


Sl. 3: Prikaz mišične celice z mitohondriji (Cell biology, 2007)

2.2.1 Proteini in transkripcijski faktorji, značilni za mišico

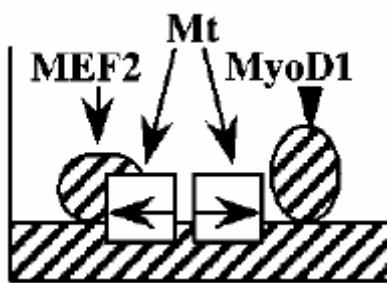
V mišici se nahajajo značilni proteini, kot na primer: miozin, G-aktin, tropomiozin, troponin, α-aktinin, dezmin, vimentin, titin, nebulin, distrofin, C-protein in M-protein (Voet D. in Voet I.G., 1995).

Proces miogeneze (Slika 4) je tvorba mišičnega tkiva v času razvoja zarodka. Mišična vlakna se oblikujejo iz mišičnih matičnih celic mioblastov v večjedrno imenovana miotubuli (angl. *Myotubes*), iz katerih nato nastanejo mišične celice ali vlakna (Yahi in sod., 2006).



Sl. 4: Proces miogeneze (Neuromuscular differentiation, 2007)

V različnih stopnjah procesa miogeneze so v kontrolo izražanja genov vpleteni transkripcijski faktorji, kot na primer MyoD, MEF 2 (angl. *Myocyte enhancing factor 2*), Mt, p38 MAP (angl. *mitogen-activated protein*) kinaza (Gao in sod., 1998; Lluís in sod., 2006). Na sliki 5 je prikazana regulacija izražanja dezmina v skeletnih mišicah.



Sl. 5: Uravnavanje gena za dezmin s transkripcijskimi faktorji MEF2, Mt in MyoD1 (Gao in sod., 1998)

2.3 OPIS POSTOPKOV DOLOČANJA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENOMA

Nukleotidno zaporedje genoma ugotovimo tako, da genom najprej razbijemo na majhne naključne odseke in ugotovimo nukleotidno zaporedje vsakega posameznega odseka, prekrijemo te majhne dele, kjer so nukleotidna zaporedja identična in nadaljujemo prekrivanje vedno večjih delov, dokler ne združimo vseh odsekov DNA. Reakcija za določanje zaporedja zagotovi odsek DNA, ki je običajno dolg 600 baznih parov. Največji izziv pri projektu genoma je sestaviti vsa delna zaporedja v skupno zaporedje. Za pridobitev pravilnega neukleotidnega zaporedja genoma vsebujejo genomski projekti običajno 10-kratno pokritje (10X) za vsak bazni par v genomu. Ugotovljeno nukleotidno zaporedje lahko nato primerjamo s posameznimi organizmi znotraj vrste ter z ostalimi vrstami (Griffiths in sod., 2005). Ko pridobimo sekvenco genoma, sledijo postopki: bioinformatike, primerjalne genomike (primerjava genomov med vrstami) in funkcijsko genomiko (študij interakcij genov).

Poznamo dva pristopa za določevanje nukleotidnega zaporedja genoma: naključno sekvenciranje in sekvenciranje urejenih klonov (Griffiths in sod., 2005).

2.3.1 Naključno sekvenciranje celotnega genoma

Pri postopku naključnega sekvenciranja (*angl. Whole genome shotgun sequencing*) najprej ugotovimo nukleotidno zaporedje velikega števila klonov, nato pa jih uredimo na podlagi informacije o njihovem medsebojnem prekrivanju (Griffiths in sod., 2005).

2.3.2 Sekvenciranje urejenih klonov

Pri pristopku sekvenciranja urejenih klonov (*angl. Ordered clone sequencing*) je ravno obratno, najprej na podlagi informacij fizičnih markerjev (npr. STS (*angl. Sequence Tagged Site*), RFLP) uredimo zaporedje prekrivajočih klonov v fizično mapo, nato za tako urejene klone ugotovimo nukleotidno zaporedje (Griffiths in sod., 2005).

2.4 PROJEKT SEKVENCIRANJA KONJSKEGA GENOMA

Januarja 2007 je bil objavljen prvi osnutek konjskega genoma, ki obsega 6,8X pokritje genoma. Sekvenciranje konjskega genoma je bilo izvedeno s pristopom naključnega sekvenciranja. Za 84% nukleotidnega zaporedja je že bila ugotovljena kromosomska lokacija in zajema 1-31 avtosomov in spolni kromosom X. Na sliki 6 je prikazana naslovna stran projekta sekvenciranja konjskega genoma. Poleg nukleotidnega zaporedja je bil objavljen tudi spisek SNP-jev (posameznih nukleotidnih polimorfizmov), ki bo omogočil mapiranje kvantitativnih in kvalitativnih lokusov pri konjih (Broad Institute, 2007).

The screenshot shows the homepage of the Horse Genome Project. At the top, there's a navigation bar with links to Home, Data, Genomic Sequences & Maps, and Horse Genome. Below the navigation is a large banner with the text "Horse Genome Project" and a photo of a horse's head. To the left is a sidebar with the Broad Institute logo and links to About, Science, Resources, and Information. The "Data" link under Resources is highlighted in blue. The main content area contains text about the domestic horse being a member of the mammalian order Perissodactyla and its sequencing for medical research. It also describes the project's goal of generating a high-quality draft sequence of a female thoroughbred horse and its collaboration with other institutions.

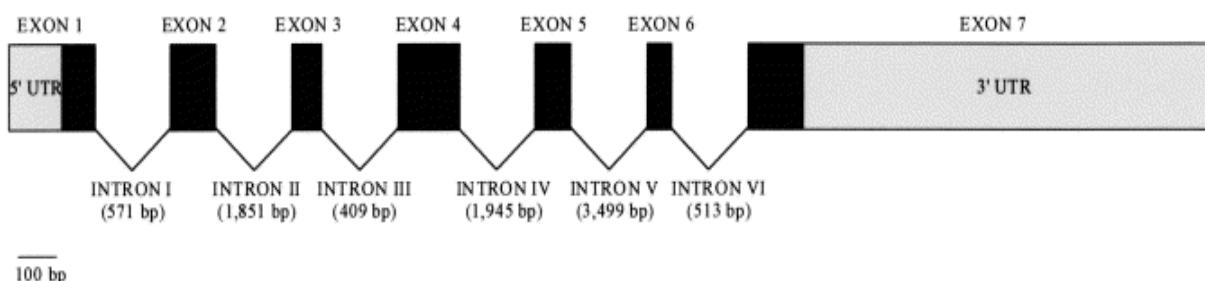
Sl. 6: Naslovna stran projekta sekvenciranja konjskega genoma (Broad Institute, 2007)

2.5 RAZISKAVE GENA *TFAM* PRI KONJU

V predhodnih raziskavah je bilo z metodami primerjalne genomike ugotovljeno delno zaporedje gena *TFAM* pri konju (Kunej in sod., 2005). S primerjavo nukleotidnega zaporedja med vrstami (človek, govedo, prašič, kokoš, miš, podgana in žaba) so ugotovili ohranjena območja gena *TFAM*, ter v teh območjih izbrali začetne oligonukleotide za pomnoževanje DNA z metodo PCR. S tem pristopom so odkrili 348 baznih parov kodirajočega območja (prve štiri eksone), prve tri introne in 467 baznih parov območja 3'-neprevedene regije in promotorja gena *TFAM* pri konju. V intronu II so odkrili SNP C>T, ki je kazal jasne razlike v frekvenci alelov med pasmama lipicanec (0,72) in slovenski galoper (1,00) (Dovč in sod., 2006).

2.6 RAZISKAVE GENA *TFAM* PRI ČLOVEKU IN GOVEDU

Tako kot pri vseh sesalcih, je gen *TFAM* pri človeku in govedu sestavljen iz sedmih eksnov in šestih intronov. Introni I, III in VI so manjši od 600 bp. Preostali trije introni so večji od 1,8 kb (slika 7).



Sl. 7: Organizacija gena *TFAM* pri človeku. Navedene so dolžine eksnov in intronov (Reyes in sod., 2002)

Za gen *TFAM* so pri človeku ugotovili sorodna nukleotidna zaporedja, ki jih imenujemo psevdogeni, ki se nahajajo na kromosomih 7, 11 in X (Reyes in sod., 2002).

Pri govedu so v genu *TFAM* razvili genetske markerje za kvaliteto mesa. Dokazana je bila povezava med polimorfizmi promotorja gena *TFAM* ter marmoriranostjo mišic (*angl. marbling*) in debelina podkožnega maščevja (*angl. subcutaneous fat depth*) (Jiang in sod., 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 LABORATORIJSKA OPREMA

Za delo v laboratoriju smo potrebovali:

- | | |
|--|--------------------|
| ▪ avtomatske pipete (10 do 1000 μ l) | Gilson, Francija |
| ▪ centrifuga 5417C | Eppendorf, Nemčija |
| ▪ kadičke za elektroforezo | Pharmacia, Švedska |
| ▪ reagenčne posodice | Eppendorf, Nemčija |
| ▪ pipetni nastavki | Brand, Nemčija |
| ▪ tehnicka | |
| ▪ digestorij | |
| ▪ UV transiluminator – Gel Doc 1000 | Biorad, Nemčija |
| ▪ mikrovalovna pečica | |
| ▪ mikroprocesorsko voden termostat | MJ Research, ZDA |

3.2 IZOLACIJA, PRIPRAVA IN ANALIZA DNA

3.2.1 Izolacija DNA iz krvi

Genomsko DNA (deoksiribonukleinsko kislino) smo izolirali iz krvi po metodi izolacije s fenolom iz krvi sesalcev. Uporabili smo vzorce štirih pasem konj: tri kasače, enega lipicanca, dva posavca in enega konja slovenske toplokrvne pasme. 400 μ l krvi iz vsakega vzorca smo odpipetirali v reagenčno posodico (Eppendorf), katero smo predhodno označili. Nato smo 200 μ l iz vsake reagenčne posodice prenesli v drugo, ki je bila prav tako označena. Prvo serijo reagenčnih posodic smo shranili na +4°C. V vsako reagenčno posodo smo dodali 800 μ l TE pufra in centrifugirali pri 12000g (30s). Po končanem centrifugiranju smo previdno odlili supernatant. Postopek smo trikrat ponovili. Pelet (usedlino) smo resuspendirali smo z 200 μ l pufra za lizo (angl. *lysis buffer*) in 4 μ l proteinaze K. Inkubirali smo najmanj 2 uri pri 56°C.

Kemikalije za izolacijo DNA:

■ pufer za lizo	200 µl
■ proteinaza K	4 µl
■ PCl (fenol:kloroform:izoamil alkohol=25:24:1)	230 µl
■ Cl (kloroform:izoamil alkohol=24:1)	200 µl
■ 96% etanol	500 µl
■ 70% etanol	500 µl
■ bidestilirana voda	30 µl

Pufer za lizo smo pripravili iz:

■ Tris – HCl (pH 8,3)	20 mM
■ MgCl ₂	1,2 mM
■ KCl	25 mM
■ 0,5% Tween 20	

Vzorcem smo dodali 230 µl PCl (fenol:kloroform:izo-amil alkohol=25:24:1). Raztopino smo premešali na mešalcu (Vortex) in centrifugirali 11 minut pri 14000g. Zgornjo fazo raztopine smo odpipetirali in prestavili v nove 1,5 ml reagenčne posodice in ji dodali enak volumen Cl (kloroform:izo-amil alkohol=24:1). Raztopino smo centrifugirali 10 minut pri 14000g in nato zgornjo fazo raztopine prenesli v nove 1,5 ml reagenčne posodice, v katere smo nato dodali 500 µl 96 % etanola, ohlajenega na temperaturo -20°C. Ob dodatku etanola smo reagenčne posodice obračali do nastanka oborine, nato pa vzorce pustili na temperaturi -20°C vsaj 30 min. Vzorce smo centrifugirali 10 min pri 10000g. Etanol smo previdno odlili in dodali 500 µl 70 % etanola. Vzorce smo centrifugirali 7 minut pri 10000g. Po končanem postopku smo odlili etanol in pustili reagenčne posodice 15 minut odprte, da je alkohol izhlapel. Oborino smo tako posušili do voskaste konsistence in jo nato raztoplili v 30 µl bidestilirane vode. Izolirano DNA smo shranili pri 4°C. Naslednji dan smo koncentracijo in degradacijo DNA preverili na 0,8 % agaroznem gelu.

3.2.2 Elektroforeza DNA v agaroznem gelu

Elektroforeza na agaroznem gelu je metoda za ločevanje molekul DNA po velikosti. To metodo smo uporabljali za preverjanje uspešnosti izolacije DNA, uspešnosti produktov PCR in RFLP. Opazovanje DNA omogoča EtBr (etidijev bromid), ki interkalira med baze DNA in fluorescira pri svetlobi valovne dolžine okoli 300 nm. Koncentracijo agaroznega gela smo prilagodili namenu uporabe. Za preverjanje uspešnosti izolacije DNA smo uporabili 0,8 % agarozni gel.

Predhodno smo pripravili elektroforetski pufer (TBE pufer):

- 0,045 M Tris boratni pufer
- 0,001 M EDTA

Za pripravo 0,8 % agaroznega gela smo potrebovali:

- | | |
|---|--------|
| ▪ 0,5x TBE pufer | 60 µl |
| ▪ agaroha (Sigma Chemical Co., St Louis, ZDA) | 0,48 g |
| ▪ EtBr (0,5 µl/ml) | 0,5 µl |

Agarozni gel smo pripravili iz agaroze in pufra TBE. Mešanico smo zavreli v mikrovalovni pečici, da se je agaroha raztopila in jo nato ohladili na mešalu. Agarozni mešanici smo dodali etidijev bromid (0,1 mg/ml) in zmes dobro premešali.

Za preverjanje koncentracije DNA smo uporabili horizontalno elektroforezno enoto (Pharmacia, GNA 100). V model za gel smo vlili agaroho v tekoči obliki in vstavili glavnice. Ko se je gel strdil, smo ga skupaj z modelčkom vstavili v elektroforezno enoto z 0,5x pufrom TBE.

V luknjice na gelu smo previdno nanesli 5 do 15 µl vzorca, kateremu smo dodali 2µl aplikacijskega pufra za nanašanje vzorcev (0,25 % ksilen cianol v 40 % saharozi). Aplikacijski pufer obarva in zgosti vzorec, zato ga lažje nanesemo na gel. Poleg tega ima

barvilo v nevtralnem pufru negativen naboј, zato med elektroforezo potuje v isti smeri kot DNA. To nam omogoča opazovanje poti DNA med elektroforezo.

Elektroforeza je potekala v horizontalni elektroforezni kadi pri sobni temperaturi od 15 do 25 minut, pri jakosti električnega toka 7 V/cm (Pharmacia, GNA 100). Po končani elektroforezi smo vzorce fotografirali s sistemom Gel Doc 1000 (BioRad, ZDA) pri 302 nm. Z elektroforezo smo preverili uspešnost izolacije DNA.

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo

PCR (*angl. Polymerase chain reaction*) je metoda za sintezo nukleinskih kislin v *in vitro* pogojih (Mullis in Falooma, 1987), ki omogoča pomnoževanje specifičnih odsekov DNA. Začetek sinteze določimo z začetnimi oligonukleotidi (*angl. primer*), ki so komplementarni z mejnimi zaporedji nukleotidov ciljne DNA. Z reakcijo PCR smo uporabljali za pomnoževanje odseka DNA v promotorju in intronu II gena *TFAM*.

Sestavine, ki smo jih potrebovali za 10 µl reakcijo, so:

▪ Bidestilirana voda	6,25 µl
▪ 1x PCR pufer (Ferments, Litva)	1 µl
▪ 200 µM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,6 µl
▪ 25 mM MgCl ₂	0,6 µl
▪ 5' začetni oligonukleotid (L)	0,25 µl
▪ 3' začetni oligonukleotid (D)	0,25 µl
▪ Taq DNA polimeraza (Fermentas, Litva)	0,05 µl
▪ DNA	1 µl

Reakcijsko mešanico smo pripravili v ločenem prostoru, kjer ni nevarnosti kontaminacije z DNA in PCR produkti predhodnih reakcij. Ker je aktivnost polimeraze temperaturno pogojena, smo DNA polimerazo vzorcem dodali na ledu. Vzorce smo vstavili v mikroprocesorsko voden termostat (Applied Biosystem Gene Amp PCR System 9700, ZDA).

Reakcija je potekla v treh stopnjah. Začne se z denaturacijo pri temperaturi 95°C in poteka 5 minut. Sledi ji 35 ciklov po naslednjem vrstnem redu: denaturacija pri 95°C (1 min), vezava začetnih oligonukleotidov pri 61°C (30 sek.) in sinteza komplementarne verige pri 72°C (1 min). Reakcijo smo končali s podaljšano sintezo komplementarne verige pri 72°C (5 min). Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabljali pri reakciji PCR so navedena v preglednici 1.

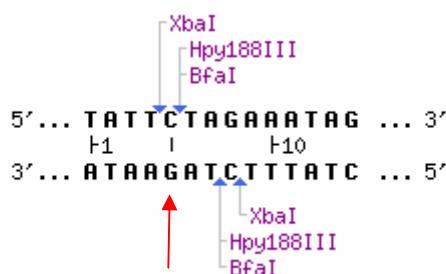
Pregl. 1: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za reakcijo PCR

Področje v genu	Levi začetni oligonukleotid (ime, nukleotidno zaporedje)	Desni začetni oligonukleotid (ime, nukleotidno zaporedje)	Ta
Promotor	Pro5F: CCTGACCTCAGAGCAGCG	Pro5R: CCTGGACTCAAAGCCATCAT	61°C
Intron 2*	Intron2ECF: TGCAGAACCTAACCAATTGCG	Intron2ECR: TC <u>G</u> ACTCCTACATT <u>TG</u> AGAAGA TG	61°C

*Zaporedje začetnih oligonukleotidov je bilo določeno na zaporedju DNA pri prašiču, od zaporedja pri konju se razlikuje v dveh nukleotidih desnega začetnega oligonukleotida (podprtano). Ta= temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov

3.2.4 Restriktivna analiza; polimorfizem dolžin restriktivskih fragmentov

Restriktivski encim je bakterijski encim, ki reže DNA na specifičnih delih sekvence. Restriktivno analizo - RFLP (angl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) smo izvedli za SNP v intronu II. S programom NEBcutter smo ugotovili, da je za ugotavljanje zamenjave C/T možno uporabiti Encim *Xba*I, ki ima prepoznavno zaporedje TCTAGA. Če je prisoten C (citozin), kot na sliki 8, bo prišlo do cepitve produkta PCR, v primeru, da je na tem mestu T (timin) encim *Xba*I ne bo cepil.



Sl. 8: Zamenjava C>T v intronu II gena *TFAM* pri konju in mesto prepoznavanja restriktivskega encima *Xba*I

Sestavine, ki smo jih potrebovali za 10 µl reakcijo, so:

▪ Bidestilirana voda	2,8 µl
▪ restriktijskega encima <i>Xba</i> I	0,2 µl (2 U)
▪ produkt PCR	6 µl
▪ pufer - Buffer Tango (Fermentas, Vilnius, Litva)	1 µl

Vzorce smo inkubirali čez noč pri 37°C.

3.2.5 Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje)

Z reakcijo PCR smo pomnožili željeni odsek in sekvenciranje izvedli v sodelovanju s podjetjem Macrogen (Seul, Južna Koreja).

Ugotavljanja nukleotidnega zaporedja poteka po naslednjem principu:

Sekvenčna reakcija se izvaja s komercialnim kompletom ABI PRISM *Big Dye*TM, *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems). Že pripravljeno komercialno mešanico *Big Dye*TM razredčimo s 5x pufom za sekvenciranje (Tris-HCl, pH 9,0, MgCl₂) v razmerju 1:2. Reakcijsko mešanico pripravimo v ledni kopeli.

V reagenčni epruveti pripravimo 15 µl mešanice:

- 4,5 µl redčene raztopine *Big Dye*TM;
- 3,2 pmolov začetnega oligonukleotida;
- 200 – 500 ng dvostranske DNA (dsDNA) oz.
- 30 – 90 ng produkta PCR oz.
- 0,6 – 1 µg DNA
- bidestilirana voda (Sigma) do 15 µl

Reakcija teče v cikličnem termostatu GeneAmp PCR 2400 (Perkin Elmer). Začne se s 5-minutno denaturacijo pri 95°C, tej pa sledi 30 ciklov.

- denaturacija pri 95°C , 10 sekund
- prileganje začetnega oligonukleotida pri 50°C , 5 sekund;
- sinteza / terminacija pri 60°C , 4 minute

Fluorescentno označeni dideoksi-nukleotidi (ddNTP, terminatorji) se med sekvenčno reakcijo naključno vgrajujejo v novo sintetizirano DNA. Ker DNA-polimeraza ne more nadaljevati sinteze preko ddNTP, so produkti reakcije različno dolgi in se končujejo z označenimi ddNTP.

Po končani reakciji označene fragmente obarjamo z dodatkom 2 μl 3 M Na-acetata, pH 4,6 in 50 μl ledeno hladnega 96-odstotnega etanola. Fragmente obarjamo 10 minut v ledni kopeli, zatem pa 30 minut centrifugiramo pri 20.000 x g. Oborino DNA speremo s 70% etanolom, posušimo v vakuumski centrifugacijski rezervoar in raztopimo v 12 μl komercialno pripravljene raztopine TSR (angl. *Template Suppression Reagent*, PE Applied Biosystems). Po 2-minutni denaturaciji pri 95°C in ohlajanju v ledni kopeli nukleotidno zaporedje vzorcev analiziramo s kapilarno elektroforezo v aparaturi ABI PRISM® 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems) (Slika 9). Ločevanje fragmentov temelji na principu kapilarne elektroforeze. Elektroforetska ločitev poteka pri visoki električni poljski jakosti v kapilarah iz silicijevega dioksida, napolnjenih s polimerom POP6 (PE Applied Biosystems). Za obdelavo podatkov se uporablja programski paket DNA Sequencing Analysis Software 3,0 (PE Applied Biosystems).



Sl. 9: Aparatura za kapilarno elektroforezo (ABI PRISM® 310 Genetic Analyser, PE Applied Biosystems)

3.2.6 Bioinformatske metode

Pri delu smo uporabili številne podatkovne zbirke in bioinformatske metode.

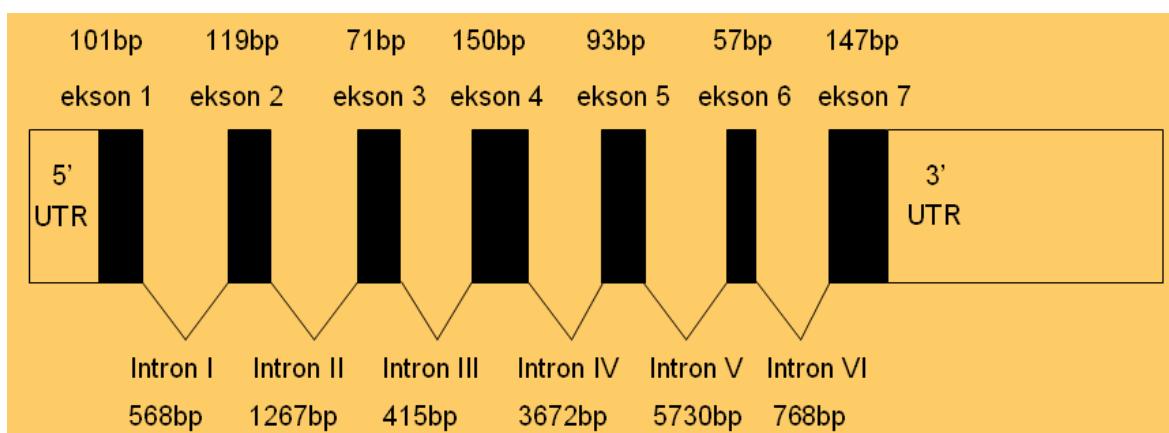
Pregl. 2: Podatkovne zbirke in bioinformatske metode, ki smo jih uporabljali pri delu

Podatkovne zbirke		
NCBI	podatkovna zbirka, iz katere smo pridobili nukleotidno zaporedje	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Ensembl Genome Browser	podatkovna zbirka, iz katere smo pridobili nukleotidno zaporedje	http://www.ensembl.org/index.html
Horse Genome Browser Gateway	Projekt sekvenciranja konjskega genoma	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway
Horse SNPs		http://www.broad.mit.edu/mammals/horse/snps/
Bioinformatske metode		
Primer 3	iskanje zaporedij začetnih oligonukleotidov	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
The Seqence Manipulation Suite	urejanje in analiza nukleotidnih zaporedji	http://bioinformatics.org/sms/index.html
Matinspector	analiza vezave transkripcijskih faktorjev	http://www.genomatix.de/
NEBcutter	program za iskanje restrikcijskih encimov	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php
ORFfinder	Bralni okvir, ki pokaže kako se prepisujejo nukleotidi	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi
MultAlin	Poravnava/primerjava nukleotidnih zaporedij (Corpet s sod., 1988)	http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html
MEGA3	Urejanje nukleotidnih zaporedij	http://www.megasoftware.net/

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENA *TFAM*

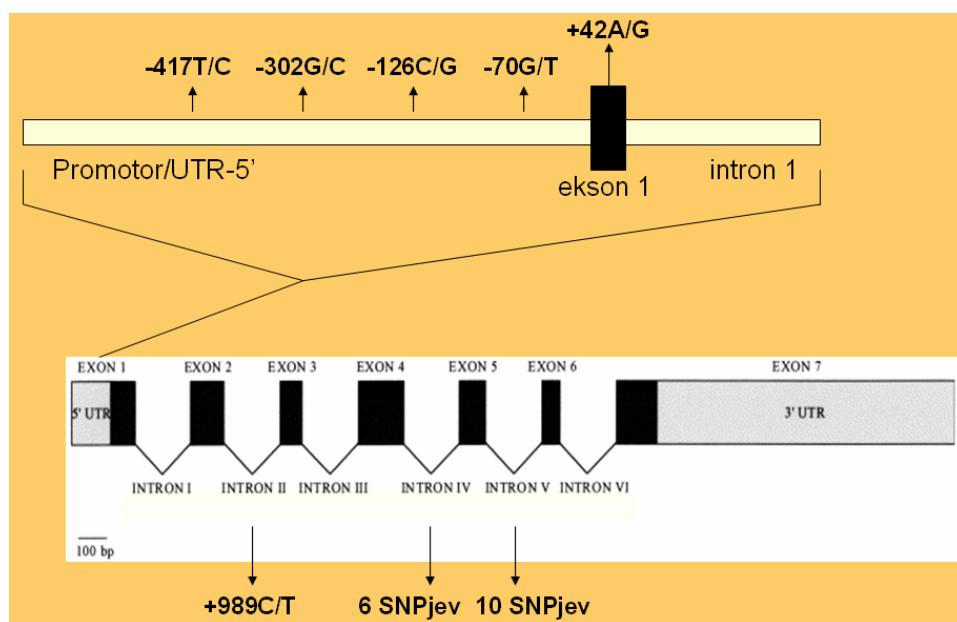
Nukleotidno zaporedje gena *TFAM* pri konju smo pridobili iz podatkovne zbirke Horse (*Equus caballus*) Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Kot referenčno sekvenco za pridobitev nukleotidnega zaporedja gena *TFAM* pri konju smo uporabili cDNA gena *TFAM* pri prašiču (NCBI AY923074), ki smo ga pridobili iz podatkovne zbirke NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Iz baze podatkov je bilo možno pridobiti podatek, da se gen *TFAM* pri konju nahaja na kromosomu 1. S primerjavo nukleotidnega zaporedja cDNA in genov pri drugih vrstah smo ugotovili, da je organizacija gena *TFAM* enaka kot pri drugih sesalskih vrstah (7 eksonov in 6 intronov). Organizacija gena *TFAM* pri konju, z navedenimi dolžinami eksonov in intronov je prikazana na sliki 10. Pridobiti je bilo možno nukleotidno zaporedje za vse eksone in introne v celoti. Nukleotidno zaporedje gena *TFAM* pri konju je navedeno v prilogi 1.



Sl. 10: Organizacija gena *TFAM* pri konju, z navedenimi dolžinami eksonov in intronov

4.2 ANALIZA GENETSKE VARIABILNOSTI GENA *TFAM*

Našli smo 22 SNP-jev in sicer 6 eksperimentalno, z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja (promotor, ekson 1 in intron II) ter 16 SNP-jev s pomočjo iskanja v podatkovni zbirki sekvenciranja konjskega genoma (introna IV in V) (Slika 11).



Sl. 11: SNP-ji gena *TFAM* pri konju

4.2.1 Analiza polimorfizmov v območju promotorja in eksona 1

Z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja gena *TFAM* pri sedmih konjih (Slika 12), ki pripadajo štirim različnim pasmam (lipicanec, slovenska toplokrvna pasma, posavec in kasač) smo našli štiri SNP-je v območju promotorja (C-417T, C-302G, G-126C, A-70G) in enega v eksonu 1 (G+42A), slika 12. Na vseh petih mestih, kjer smo ugotovili SNP-je, smo razliko v nukleotidnem zaporedju ugotovili samo pri lipicancih.

Sl. 12: Primerjava nukleotidnih zaporedij v promotorju in eksonu 1 gena *TFAM* pri sedmih konjih, ki pripadajo štirim različnim pasmam (lipicanec, slovenska toplokrvna pasma (SLT), posavec in kasač)

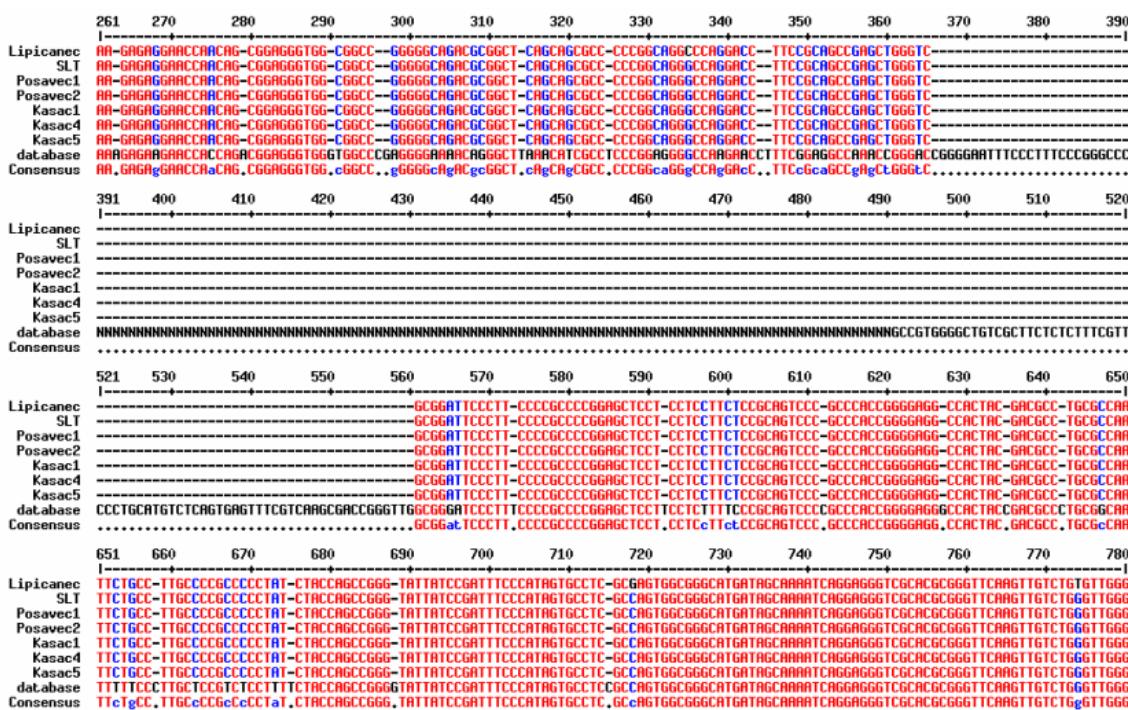
Zamenjava A/G v eksonu 1 ne spremeni aminokisline (sinonimna zamenjava), ker oba tripla CTA in CTG kodirata aminokislino leucin (slika 13). SNP v prvem eksonu ne povzroči sprememb, ki bi vplivale na aminokislinsko zaporedje proteina TEAM.

1 atggcgcttctccggggcgtgtggggcgtgctgagcggcctaagc
M A L L R G V W G V L S G L S

1 atggcgcttctccggggcgtgtggggcgtgctgagcggcctgagc
M A L L R G V W G V L S G L S

Sl. 13: Mesto SNP-ja v eksonu 1. Na sliki je prikazano, da zamenjava A/G ne povzroči zamenjave aminokisline.

Dodatno smo poleg posameznih razlik v nukleotidnem zaporedju ugotovili tudi večjo razliko, in sicer 195 bp dolgo insercijo v nukleotidnem zaporedju, pridobljenem iz podatkovne zbirke sekvenciranja konjskega genoma (del promotorja distalno od -129 bp) (Slika 14). Ker je bilo nukleotidno zaporedje pri sedmih konjih enako, smo predvidevali, da predstavlja insercija nukleotidnega zaporedja napako. Z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja smo pridobili 524 bp zaporedja 5'UTR/promotorja. Nukleotidno zaporedje iz podatkovne zbirke projekta konjskega genoma smo v tem delu nadomestili z nukleotidnim zaporedjem, ki smo ga pridobili z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja pri sedmih konjih, ki pripadajo štirim pasmam.



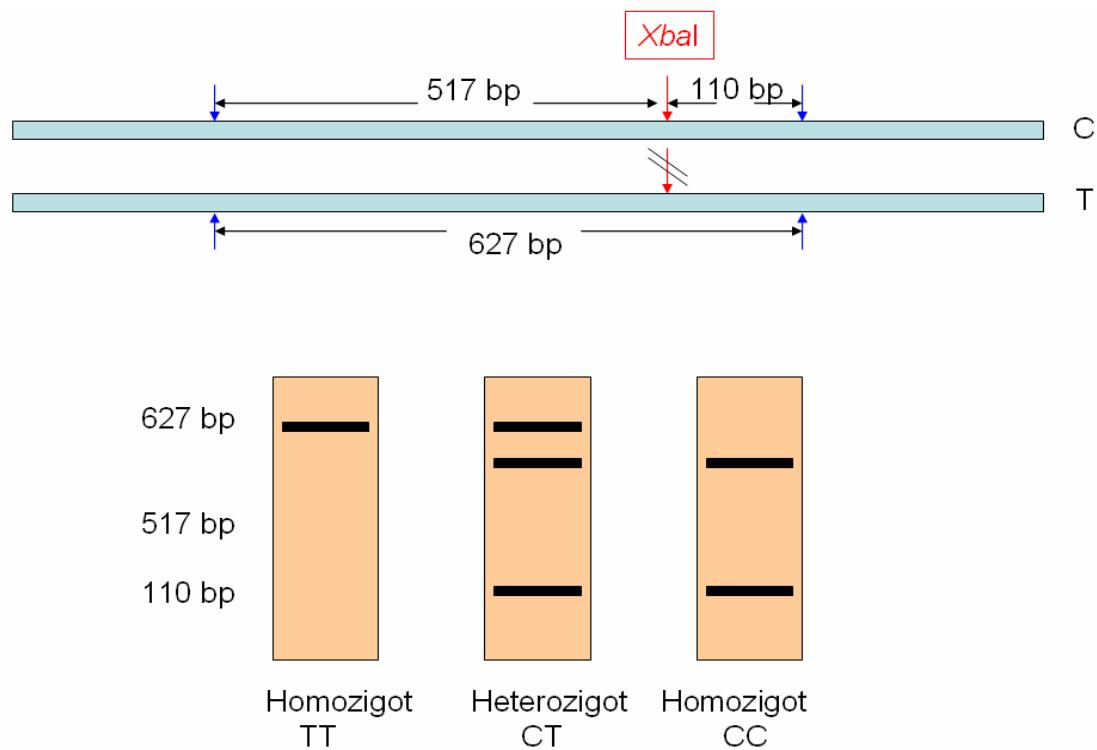
Sl. 14: Primerjava nukleotidnih zaporedij promotorjev gena *TFAM* pri sedmih konjih in nukleotidnega zaporedja iz podatkovne zbirke projekta konjskega genoma. Na sliki je vidna 195 bp dolga insercija. N: neznano nukleotidno zaporedje.

4.2.2 Analiza polimorfizma C989T v intronu 2 z metodo RFLP

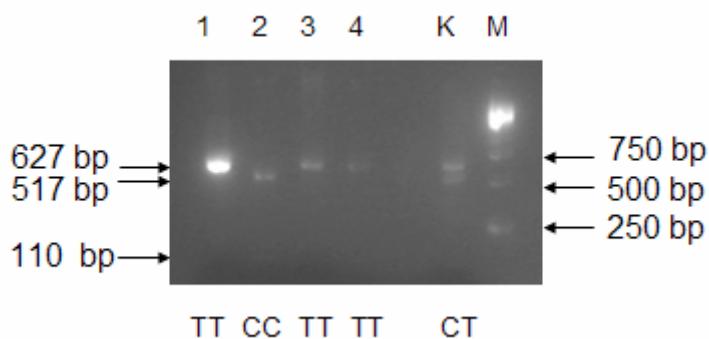
Nukleotidna zamenjava C>T se nahaja na mestu +989 od začetka znanega zaporedja cDNA, zato smo SNP poimenovali C989T. Nukleotidno zaporedje, ki smo ga pomnoževali pri metodi PCR ter SNP T>C so prikazani na sliki 15. Shema in slika agaroznega gela za analizo SNP sta prikazani na slikah 16 in 17.

tgcagaaaacctaaccattcggttgatggcgtgtgaaataggagttatgacatattttaccaaa
tagaaatgcgttaaatataattgggaactgatgaaaggatt[T/C]tagaaatagcagcatgtag
agtaaaaagccccccggggaaagaggatggaaaacttgaattttggctagttgccattgccttagag
gaccactgaagagtcccttaatctctgcttagtcctcgcctcaggaaattgttaatgaagtt
gcaaagaaaataacttctcttgaagtgttctgtaaactgtaaagctctataacaattactgttaatt
tcgagagctttcaactgaaaattagttctgtctgggtcctgaagaaagtttccaggttagga
tgtttgttgcctccctagaaaaggctgtgggccttcattgtgttatagtgtaaagataataact
aaattaacaatagctaacccttgcttatgattctaaaggccttcacatgcagtaatcacagggc
acttgtggaaatcaaatgagctataataaaaattctcacattataaaagagttgggtgaagaggcat
gcttaagtactcacatcttctaaaatgttaggagttga

Sl. 15: Nukleotidno zaporedje, ki smo ga pomnoževali pri metodi PCR-RFLP za analizo SNP-ja C989T. Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov je podčrtano.



Sl. 16: Shema analize PCR-RFLP za C989T v intronu II gena *TFAM*

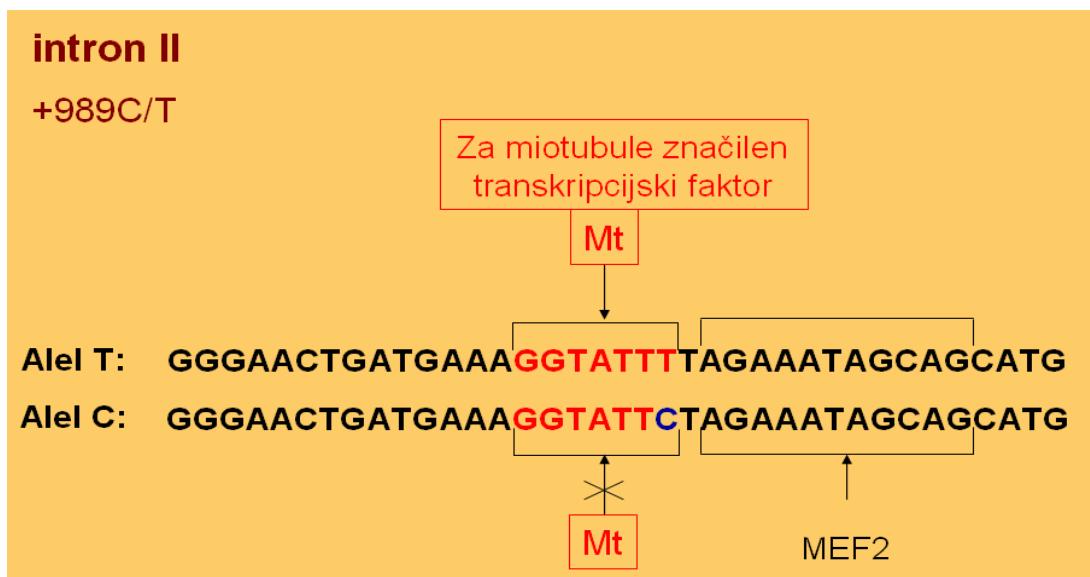


1-4: kasači, M: označevalec molekulskih mas, K: kontrola – heterozigot.

Sl. 17: Agarozni gel PCR-RFLP za analizo C989T v intronu II gena *TFAM*

Analizo PCR-RFLP smo izvedli pri štirih kasačih in enim kontrolnem vzorcu z znanim genotipom. Štiri živali so imele genotip TT in ena genotip CC, frekvenca alela T je bila 0,75.

Z uporabo programa Matinspector smo ugotovili, da se SNP +989C/T nahaja v potencialnem vezavnem mestu za transkripcijski faktor Mt (angl. myotube). V primeru alela T Mt veže to prepoznavno nukleotidno zaporedje. V primeru alela C vezavnega mesta ni. Ob vezavnem mestu za Mt smo našli tudi vezavno mesto za MEF2, kar prikazuje slika 18.



Sl. 18: Prikazano je območje Mt z vezavo alela T ali alela C in vezavno mesto za MEF2

4.2.3 *In silico* ugotavljanje polimorfizmov v genu *TFAM*

Iz podatkovne zbirke Horse (*Equus caballus*) Genome Browser Gateway je bilo možno pridobiti informacijo o 16 SNP-jih v genu *TFAM*. V prilogi A je celotno nukleotidno zaporedja gena *TFAM*, na njem so označeni vsi SNP-ji. V prilogi B so navedeni podatki o lokaciji šestih SNP-jev iz introna 4 in desetih SNP-jev iz introna 5.

4.3 AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE TFAM PRI KONJU

Aminokislinsko zaporedje gena *TFAM* pri konju (slika 19) smo ugotovili s programom ORF finder (Open Reading Frame finder) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>).

```

1 atggcgcttctccggggcgtgtggggcgtgctgagcggcctaagc
   M A L L R G V W G V L S G L S
  46 aagtccggagcggacactgtgcgcgagctgtggaaagtccggctgcgc
   K S G A D L C A S C G S R L R
  91 tctcccttcagtttgcgtataatgccgagggtggtttgcgtccgcc
   S P F S F A Y M P R W F S S A
136 ttgggttagtttatccaaagaagcctatgacttcatacgttcgattt
   L G S Y P K K P M T S Y V R F
181 tctaaagaacagctacccatatttagagctcagaaccagatgcg
   S K E Q L P I F R A Q N P D A
226 aaaaactcagaactaattaaaaaaaaatcgcccaggatggagggaa
   K N S E L I K K I A Q V W R E
271 cttcctgattcagagaaaaaaatatatgaagatgcttacagggca
   L P D S E K K I Y E D A Y R A
316 gactggcaggcatacaaagaagagataaaacagacttcaagaacag
   D W Q A Y K E E I N R L Q E Q
361 ctaactccaagtcaatgttatctttggaaaaaaaatcacacaa
   L T P S Q M V S L E K E I T Q
406 aaacgtttaaaaaagaagcattaataaaaaagagattaacaatg
   K R L K K K A L I K K R L T M
451 ctggaaaaaccaaaaagacctcgctcagcttataacattttata
   L G K P K R P R S A Y N I F I
496 tctgaatgcttccaggaagctaaggatggccatcacaggtaaaa
   S E C F Q E A K D G P S Q V K
541 ctgaagactgtaaaatgaaaaactggaaaaatctctctagttctcaa
   L K T V N E N W K N L S S S Q
586 aagcaagtatattcaacttgtaatgtatgacaaaaattcgttat
   K Q V Y I Q L A N D D K I R Y
631 tataatgaaatgaaatcttggaaagaacaaatgattgaagttgga
   Y N E M K S W E E Q M I E V G
676 cgaaatgatcttatacgtcgcaaagtgaagcaccaagcaaaagat
   R N D L I R R K V K H Q A K D
721 ggcactgaggagtgttaa 738
   G T E E C *

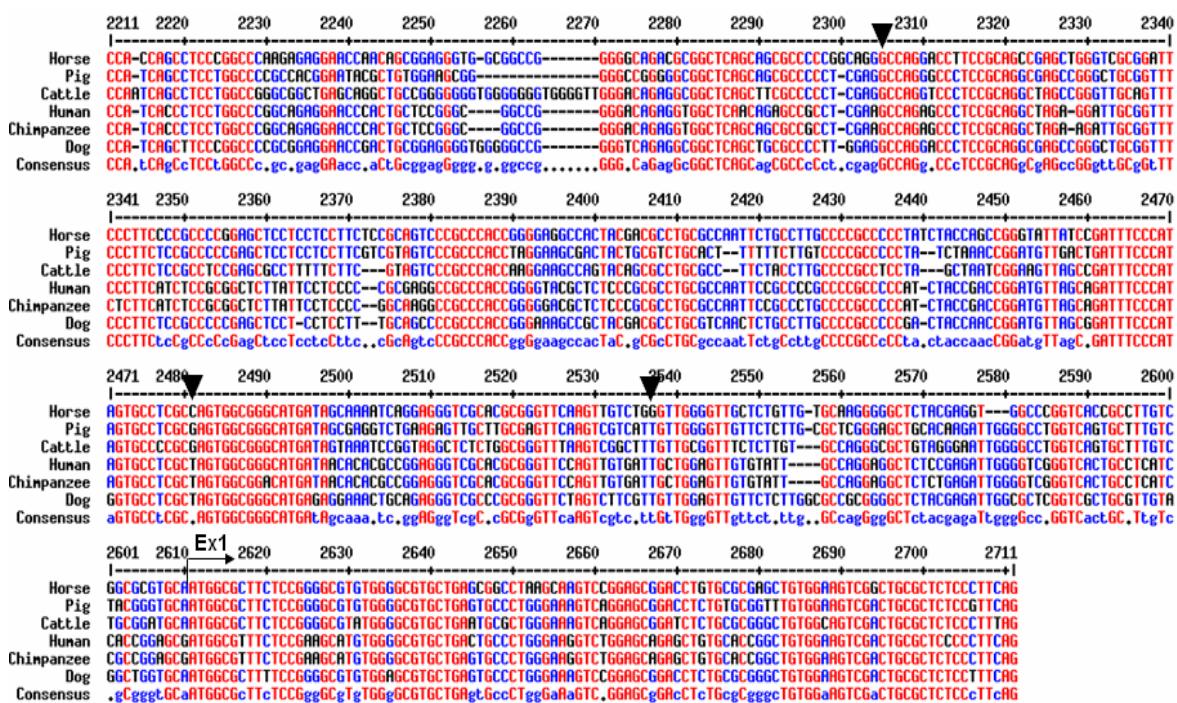
```

Sl. 19: Aminokislinsko zaporedje gena *TFAM* pri konju

Analiza zaporedja cDNA za TFAM konja je pokazala odprt bralni okvir 738 nukleotidov, ki kodirajo protein, zgrajen iz 245 aminokislin.

4.4 PRIMERJAVA ZAPOREDJA PROMOTORJA GENA *TFAM* Z ZAPOREDJEM PRI DRUGIH VRSTAH

Zaporedja gena *TFAM* pri drugih vrstah (slika 20) smo pridobili iz podatkovne zbirke Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>). V območju promotorja smo našli več ohranjenih območij. Posebno dobro je bilo ohranjeno vezavno območje, ki se prične -115 bp distalno in ima dolžino 37 bp. To ohranjeno območje vsebuje tudi SNP - 126 C/G.



Sli. 20: Primerjava nukleotidnega zaporedja promotorja gena *TFAM* pri šestih vrstah. S puščicami so označena mesta SNP-jev pri konju: C-302G, G-126C in A-70G

5 ZAKLJUČKI

Raziskav, pri katerih bi iskali genetske markerje za selekcijo na mišično moč in tekovalne lastnosti je zelo malo. Preliminarni rezultati skupine raziskovalcev (Park in sod. 2003) so pokazali razliko v razporeditvi alelov med težkimi pasmami konjev in luhkimi pasmami, pri katerih so izvajali selekcijo na hitrost in tekovalne lastnosti. Z namenom iskanja gentskih markerjev z vplivom na fizične sposobnosti konjev smo analizirali genetsko variabilnost gena *TFAM*.

5.1 DOLOČANJE IN PRIMERJAVA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

Meje med eksoni in introni konjskega gena *TFAM* smo določili s primerjavo genomske sekvence gena *TFAM* pri konju in cDNA drugih vrst. Celotna struktura gena *TFAM* pri konju je podobna osnovni organizaciji značilni za sesalce (sedem eksonov in šest intronov).

V območju promotorja smo ugotovili številna ohranjena območja. V prihodnjih raziskavah bi bilo potrebno z metodo EMSA analizirati, kateri transkripcijski faktorji se vežejo v ohranjenih območjih.

5.2 ANALIZA GENETSKE VARIABILNOSTI GENA TFAM

5.2.1 Analiza polimorfizmov z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja

Z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja gena *TFAM* pri sedmih konjih, ki pripadajo štirim različnim pasmam (lipicanec, slovenska toplokrvna pasma, posavec in kasač) smo našli 5 SNP-jev. Zanimivo je, da so bili SNP-ji prisotni samo pri lipicancu.

SNP, ki se nahaja v promotorju ali intronu nima vpliva na protein, ker se ne prepisuje. Kadar pa je SNP v eksonu, lahko vpliva na aminokislinsko zaporedje. V eksonu 1, smo našli SNP, vendar pa na tem mestu ne pride do zamenjave aminokislin, ker oba tripla pomenita zapis za leucin. Vendar pa bi lahko v tem primeru imel regulatorno funkcijo

mehanizem preferenčnosti rabe določenih kodonov, ki kodirajo isto amino kislino (*angl. codon usage*). Konj ima preferenco za določen kodon, oziroma aminokislino, če pa se na tem mestu pojavi SNP, obstaja možnost, da ima to mesto regulatorno vlogo in vpliv na učinkovitost translacije.

Osnovni mehanizem transkripcije mitohondrijske DNA uravnava mitohondrijsko biogenezo in izražanje genov. Mitohondriji so odgovorni za energijski metabolizem. SNP-ji v promotorju so mogoče povezani s stopnjo izraženosti gena *TFAM* in posledično z mitohondrijskim številom in fizičnimi sposobnostmi živali. Za potrditev teorije bi bilo potrebno testirati SNP-je na populaciji konj z različnimi fizičnimi sposobnostmi npr. tekmovalni časi kasačev. Odkrite genetske spremembe na genu *TFAM* pri konju so potencialno uporabne za na markerje oprto selekcijo (*marker assisted selection; MAS*) pri tekmovalnih konjih. V prihodnosti bi bilo potrebno razviti molekularne markerje, ki vplivajo na koncentracijo ali funkcijo beljakovin in sicer z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja eksonov.

Sposobnosti za najvišjo stopnjo dresure imajo le nekateri nadpovprečni konji. Dejstvo je, da so lipicansi žrebcii najprimernejši konji za Dunajsko jahalno šolo klasične dresure. Bistveno je, da imajo živali močno in pravilno grajeno telo (Lipicanci, 2007). Za potrditev te hipoteze bi morali opraviti več poskusov pri lipicancih iz različnih linij in z različnimi dresurnimi sposobnostmi.

Nukleotidno zaporedje iz podatkovne zbirke sekvenciranja konjskega genoma se je v območju promotorja razlikovalo od zaporedja pri naših sedmih konjih. V podatkovni zbirki smo namreč našli 195 bp dolgo insercijo v nukleotidnem zaporedju promotorja, ki leži 273 bp distalno od začetka prepisovanja. Nukleotidno zaporedje vseh sedmih konj se je ujemalo, zato smo predvidevali, da vsebuje nukleotidno zaporedje sekvenciranja konjskega genoma v območju promotorja napake. Vzrok tej razlike z našim zaporedjem, ki tega dela nima, je lahko napaka pri določanju nukleotidnega zaporedja, lahko pa je vzrok tudi Insercija/Delecija repetitivnega elementa, npr. elementa SINE (*angl. Short Interspersed Repetitive Element*), kajti v projektu konjski genom in našem poskusu so bile uporabljeni različni pasme. V prihodnje bi bilo potrebno to območje promotorja s preverjanjem nukleotidnega zaporedja analizirati vzorce več živali.

5.2.2 Analiza polimorfizma C989T v intronu II z metodo RFLP

V predhodnih raziskavah je bila ugotovljena frekvenca alela T 1 (slovenski galoper) in 0,72 (lipicanec) (Kunej in sod., 2005). V naši raziskavi smo analizirali DNA štirih kasačev in ugotovili frekvenco alela T 0,75. Za natančnejšo oceno frekvence bi bilo potrebno analizirati večje število vzorcev.

Polimorfizem C989T povzroči pridobitev/izgubo potencialnega vezavnega mesta za traskripcijski faktor Mt. Zanimivo je dejstvo, da je Mt vpletен tudi v regulacijo gena za dezmin. Dokazano je bilo, da Mt sodeluje s transkripcijskima faktorjema MyoD1 in MEF2 in skupaj vplivajo na največjo možno izraženost gena za dezmin (Gao in sod., 1998).

V prihodnjih raziskavah bi bilo potrebno potencialno vezavno mesto za Mt na mestu zamenjave C989T potrditi z metodo elektroforeznega zamika (EMSA; *angl. Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Obstaja torej možnost, da bi Mt lahko igral specifično vlogo pri stimulaciji biogeneze mitohondrijev v mišicah in da SNP +989C/T preko Mt vpliva na razvoj mišic in fizično sposobnost konj.

V bližini vezavnega mesta za Mt smo ugotovili tudi vezavno mesto za MEF2, smiselno pa bi bilo analizirati tudi obstoj vezavnega mesta MyoD1.

5.2.3 *In silico* ugotavljanje polimorfizmov v genu *TFAM*

Podatki o polimorfizmih iz podatkovne zbirke projekta sekvenciranja konjskega genoma so nas presenetili zaradi prisotnosti večjega števila SNP-jev v dveh krajših območjih intronov IV in V. V intronu IV se nahaja 6 SNP-jev na območju 498 bp in v intronu V 10 SNP-jev na območju 619 bp. Rezultate bi bilo potrebno preveriti, ker obstaja možnost, da so podatki o SNP-jih napačni, vendar pa je v intronih pričakovano več SNP-jev kot v eksonih. V primeru, da ugotovljeni SNPji obstajajo, pa bi to ugotovitev lahko razložili z dejstvom, da so SNP-ji v teh območjih bolj pogosti, kar na omenjena območja ni bilo selekcijskega pritiska. SNP-ji so lahko tudi nevtralni glede fiziološkega učinka, obstaja pa tudi možnost, da selekcija deluje v smeri ohranjanja polimorfnosti.

5.3 AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE TFAM PRI KONJU

Protein pri konju je zgrajen iz 245 aminokislin. Pri drugih vrstah so dolžine aminokislinske sekvence sledeče; miš 243 ak, podgana 244 ak ter prašič in človek 246 ak.

6 POVZETEK

1. Z informacijami v podatkovnih zbirkah smo pridobili celotno zaporedje gena *TFAM* pri konju; za vse eksone, introne ter 524 bp območja 5'UTR/promotorja.
2. V genu za *TFAM* pri konju smo v prvem eksonu ugotovili polimorfizem G+42A, ki pa ne vpliva na aminokislinsko zaporedje proteina TFAM.
3. Potrdili smo, da je frekvenca mutacij v genu za *TFAM* pri različnih pasmah različna; z analizo polimorfizma C989T v intronu II smo ugotovili frekvenco alela T pri kasaču 0,75, v predhodnih raziskavah pa 1 (slovenski galoper) in 0,72 (lipicanec).
4. Polimorfizme smo našli v promotorju, intronu II, IV in V. Ker na regulacijo izražanja genov vplivajo predvsem polimorfizmi v promotorju in intronih, ki so bliže 5' koncu gena, je možno, da ugotovljeni polimorfizmi gena *TFAM* pri konju vplivajo na njihove fizične sposobnosti.
5. Nadaljnji poskusi na podlagi te študije bodo omogočili razvoj genetskih markerjev z vplivom na fizične sposobnosti konj.

7 VIRI

Alam T.I., Kanki T., Muta T., Ukaji K., Abe Y., Nakayama H., Takio K., Hamasaki N., Kang D. 2003. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. Nucleic acids research, 31: 1640-1645

Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.

Broad Institute. Horse Genom Project.

<http://www.broad.mit.edu/mammals/hors/> (7. maj 2007)

Casas F., Pineau T., Rochard P., Rodier A., Daury L., Dauca M., Cabello G., Wrutniak-Cabello C. 2000. New molecular aspects of regulation of mitochondrial activity by fenofibrate and fasting. FEBS letters, 482: 71-74

Cell biology. Academy of Athens.

<http://www.bioacademy.gr/lab/lab.php?lb=3&pg=1> (8. nov. 2007)

Chang D.D., Clayton D.A. 1984. Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial dna. Cell, 36: 635-643

D'Souza G.G., Weissig V. 2004. Approaches to mitochondrial gene therapy. Current gene therapy, 4: 28-317

Dovč P., Kunej T., Razpet A., Jiang Z. 2006. Molecular analysis of the equine TFAM gene. V: International conference on animal genetics, Porto Seguro, Brazil, 20-25 avg. 2006 (neobjavljeno)

Ekstrand M.I., Falkenberg M., Rantanen A., Park C.B., Gaspari M., Hultenby K., Rustin P., Gustafsson C.M., Larsson N.G. 2004. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. Human molecular genetics, 13: 935-944

Falkenberg M., Gaspari M., Rantanen A., Trifunovic A., Larsson N.G., Gustafsson C.M. 2002. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. Nature genetics, 31: 289-294

Gao J., Li Z., Paulin D. 1998. A Novel Site, Mt, in the Human Desmin Enhancer Is Necessary for Maximal Expression in Skeletal Muscle. The jurnal of biological chemistry, 273: 9-6402

Griffiths A., Wessler S.R., Lewontin R.C., Gelbart W.M., Suzuki D.T., Miller J.H. 2005. Introduction to genetic analysis. 8th ed. New York, W. H. Freeman and Company: 782 str.

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

Kanki T., Ohgaki K., Gaspari M., Gustafsson C.M., Fukuoh A., Sasaki N., Hamasaki N. Kang D. 2004. Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. *Molecular and cellular biology*, 24: 9823-9834

Kunej T., Jiang Z., Razpet A., Dovč P. 2005. Sequence analysis of the equine *tfam* gene using comparative approach. V: 6th meeting of the Slovenian biochemical society with international participation, Lipica, 21-25 sept. 2005. Kos J., Cimerman N., Drobnič-Košorok M. (ur.). Ljubljana, Slovensko biokemijsko društvo: 105 str.

Larsson N.G., Wang J., Wilhelmsson H., Oldfors A., Rustin P., Lewandoski M., Barsh G. S., Clayton D.A. 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature genetics*, 18: 231-236

Lipicanci. Kobilarna Hosta.

<http://hosta-lipizzans.eu/lipicanec.html> (6. nov. 2007)

Lluís F., Perdiguero E., Nebreda A.R., Muñoz-Cánoves P. 2006. Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. *Trends in cell biology*, 16: 36-44

McCulloch V., Shadel G.S. 2003. Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. *Molecular and cellular biology*, 23: 24-5816

Neuromuscular differentiation. ENS Lyon.

www.ens-lyon.fr/LBMC/schaeffer/pres-uk.htm (15. nov. 2007)

Park H.B., Marklund S., Jeon J.T., Mickelson J.R., Valberg S.J., Sandberg K., Andersson 2003. Molecular characterization and mutational screening of the PRKAG3 gene the horse. *Cytogenetic and genome research*, 102: 216

Reyes A., Mezzina M., Gadaleta G. 2002. Human mitochondrial transcription factor A (mtTFA): Gene structure and characterization of related pseudogenes. *Gene*, 291: 223-232

Stuart J.A., Brown M.F. 2006. Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta*, 1757: 79-89

Voet D., Voet J.G. 1995. Biochemistry. 2nd edition. New York, John Wiley and Sons: 1361 str.

Yahi H., Philipot O., Guasconi V., Fritsch L., Ait-Si-Ali S. 2006. Chromatin modification and muscle differentiation. *Expert opinion on therapeutic targets*, 10: 34-923

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Dovču za strokovno pomoč. Somentorici doc. dr. Tanji Kunej za spodbudo, potrpežljivost in usmerjanje pri izdelavi diplomskega dela in udeležbi na mednarodni študentski konferenci Life With Science.

Hvala vsem iz laboratorija za genetiko, ki so mi pomagali pri delu v laboratoriju. Sebastijanu za pomoč pri predstavitev za konferenco.

Hvala ga. Sabini Knehtl za vse koristne informacije in napotke v času študija.

Hvala Markotu in vsem prijateljem, ki so me poslušali, spodbujali in pomagali med študijem in pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala staršem za podporo in pomoč.

PRILOGE

Priloga A:

Nukleotidno zaporedje gena *TFAM*

Nukleotidno zaporedje gena *TFAM* pri konju. Eksoni so označeni z zeleno barvo. SNP-ji, ki smo jih odkrili s sekvenciranjem so označeni z modro bravo, SNP-ji, ki smo jih pridobili na podlagi informacij iz baze podatkov projekta sekvencirana konjskega genoma so označeni z rumeno barvo. Podprtani so začetni oligonukleotidi, ki smo jih izbrali za analizo RFLP v intronu II.

ttatttcgattcttagaagaaccaattggcttttctttggtagtttgactgcaaataa
aattggtattcaaaaacgatgttgggctgtcctggtagtggtaattcgcatgctctgc
ttcactggccggggttgcagattcagatcccaggttcggacctagcatcactcgtcaagccatg
gtgtggcagcatcctgcataaaatagagaaagattggcacagatgttagctcagtgacaacttcct
caagaaaaagaggaagactgacagtgggttagctcagggcctatcttcacaaaaaccaaaa
caaaacaaaaaaaaaatgatggcactcataacttagggtgtccactgtatccaatgacagtata
ctctgcgtctactgcttccacatccaaaggccctgaaattctaacagcttactgtacactgcaaa
atcttatctcttacaccttatcacctaactttatctcataaaaacattcctctccaataaccc
ctttagttgttagaatagtaaggtaattcttagatagatagaagtagtccagaaattaattg
caaagactctctaaagaaatcatttaacaattatactttctcagGTATATATTCAACTTGCT
AATGATGACAAAATTCGTTATTATAATGAAATGAAATCTTGGGAAGAACAAATGATTGAAGTTGGA
CGAAATGATCTTATACGTCGCAAAGTGAAGCACCAAGCAAAAGATGGCACTGAGGAGTGT**TAA**aat
agaagattgagttatgttcacagtagatagacatgagaaaccaatttaggtccaaatacgtgaaggt
gctgtaaaattagaaaggataaagttggtaa

Priloga B:

Podatki o SNP-jih

Podatki o SNP-jih, ki smo jih pridobili iz podatkovne zbirke projekta sekvenciranja konjskega genoma.

SNP 47455674 (intron 4)

caggatttctcgtttagctccacaatttgtgtatgggccttcctgtgtccatgtggattatgcctaaaaattctgttaa
tgtTNGTTTTTTtaaatacagaaaattattgctaacagttggagggtggaaagtccaagatcaaggccccatcatggtagcctat
ggtag[C/G]gcctctgggtcatagctggcacccctactgtgcctcacatggtagaaggCCTCGAATACAGTTTAGGA
AGGAGCGAAAGCAAACATCTTCTGTCCtttaatttttaatgaattttttaGGTCAAAGATGAGATTAT
TTATGCATGCAACTTCATAAATTATTGTTGAACTCAGTGAATATGAAA

SNP 47455583 (intron 4)

ctNctggggattctgcattNtaaatccgttgctttctggcttcccagtgccagctggaaattagctttctgggttaggtcagtcaggtaacc
atttctctgttttagcttcacaatttgtgtatgggccttcctgtgtccatgtggattatgcctaaaaattctgttaatgt[T/G]
]GTTTTTTTtaaatacagaaaattattgctaacagttggagggtggaaagtccaagatcaaggccccatcatggtagcctatggtag
agNgccctctgggtcatagctggcacccctactgtgcctcacatggtagaaggCCTCGAATACAGTTTAGGAAGGAG
CGAAAGCAAACATCTTCTGTCCtttaat

SNP 47455403

aactgtacccatctccacagactaactgtttaccctttgtatgataaaatgtcctgaatctaccatggggattttaaaaactctttaa
acagacttcaatcagttccgttttagccgtacattcacctctatcttataccatctgtNtgctgccagttcNtgacctNctgggattctgc
att[C/G]taaataccgttgctttctggcttcccagtgccagctggaaattagctttctgggttaggtcagtcaggtaaccattctgcctttta
gcttccacaatttgtgtatgggccttcctgtgtcttgcattgtggattatgcctaaaaattctgttaatgtTNGTTTTTTtaaat
aacagaa

SNP 47455385

aatNgtaccattgcccccaactgtacccatctccacagactaactctgtttaccctttgtatgataaaatgtcctgaatctaccatgggg
gattttaaaaactctttaaacagacttcaatcagttccgttttagccgtacattcacctctatcttataccatctgtNtgctgccagttcNtg
cct[G/A]cttggggattctgcattNtaaatccgttgctttctggcttcccagtgccagctggaaattagctttctgggttaggtcagtcag
taccattctctgttttagctccacaatttgtgtatgggccttcctgtgtcttgcattgtggattatgcctaaaaattctgttaatgtT
NGT

SNP 47455378

tttcagaatNgtaccattgcccccaactgtacccatctccacagactaactctgtttaccctttgtatgataaaatgtcctgaatctaccat
ggggggattttaaaaactctttaaacagacttcaatcagttccgttttagccgtacattcacctctatcttataccatctgtNtgctgccag
tc[T/G]tgacctNctggggattctgcattNtaaatccgttgctttctggcttcccagtgccagctggaaattagctttctgggttaggtca
gtcagttaccattctctgttttagctccacaatttgtgtatgggccttcctgtgtcttgcattgtggattatgcctaaaaattctgttt
aa

SNP 47455365

tttaatctccgggttcagaatNgtaccattgcccccaactgtacccatctccacagactaactctgtttaccctttgtatgataaaatgtcct
gaatctaccatggggattttaaaaactctttaaacagacttcaatcagttccgttttagccgtacattcacctctatcttataccatct
g[A/G]tgctgccagttcNtgacctNctggggattctgcattNtaaatccgttgctttctggcttcccagtgccagctggaaattagctt
cttgggttaggtcagtcagttaccattctctgttttagctccacaatttgtgtatgggccttcctgtgtcttgcattgtggattatgcct
aaa

SNP 47455188

atgtggtttgttcttttcaccccccctcttttgcctgactctagaactctNttattgttaagcatctcgaactggctctaattt
cttgctttctgtattgtttcttaNcctattgtttcttcaggATACTGCAtacatttcNcctaattccccggtttcagaat[A/G]gtacc
attgcccccaactgtacctcatccacagactaactctgtttaccctttgcataatgtcctgaatctaccatggggggattaaaa
actctttaaacagacttcaatcagtctcctgttttagcctgacattcaccttatctgNtgctgccagttcNtgacctNcct

SNP 47455164

cctttgtattgttgtcccttgaatgtggttggttcttttcaccccccctcttttgcctgactctagaactctNttattgttaagcatc
ttcgaactggctctaatttctgtttctgtattgtttcttaNcctattgtttcttcaggATACTGCAtacatttc[G/A]cttaatctc
ccggtttcagaatNgtaccattcccccaactgtacctcatccacagactaactctgtttaccctttgcataatgtcctgaatctac
ccatggggggattaaaaactctttaaacagacttcaatcagtctcctgttttagcctgacattcaccttatcttataccatctg

SNP 47455125

tctgttagcttctgtatggcggttggaaagtataaaggcctttgattgtggccttgaatgtggttggttcttttcaccccccctcttttctt
gtcctgactctagaactctNttattgttaagcatctcgaactggtctctaatttctgtttctgtattgtttctta[C/G]cctatttgc
cttcaggATACTGCAtacatttcNcctaattccccggtttcagaatNgtaccattcccccaactgtacctcatccacagactaact
ctgtttaccctttgcataatgtcctgaatctaccatggggggattaaaaactctttaaacagacttcaatcagtctcctg

SNP 47455056 A/G

agggtggcacagatgttagctcaggcaaatcttcaacaacaaCAACAAACGAAA Tattgctttctctgttagcttgc
tttgagaagtataaaggcctttgattgtggccttgaatgtggttggttcttttcaccccccctcttttgcctgactctagaactct
t[A/G]ttattgttaagcatctcgaactggtctctaatttctgtttctgtattgtttcttaNcctattgtttcttcaggATACTGCAt
acatttcNcctaattccccggtttcagaatNgtaccattcccccaactgtacctcatccacagactaactctgtttaccctttgc
atgataaa

SNP 47452032 G/T

AGAGAGAAAAGAAAAAGAAGGGAAAATAGTGAAGTTGTANAGTGCTGGAGTCTACAGTAGTT
TAATGACTGAAAGGTTCAAAAGAAGGAAGTGGTCTCTAGATGTAATCAGAGGAGCCCTCCTT
TTACTTATGAATAAAAGTTGAGTTGTTACTGACTATAATCAAATTGCCATTAAAAGCCACATAA
TTTTATAAA[T/G]TATAGGTGCTAGTCTCTATCAAATTCAAGAAACTAAATAGGTTAGGATAATT
AATATCCCTCATCTCTGAACCTAAATTATAGCAAGGGATACTGGGTATTCTTCCGTCT
TTCTTCCCCCTCTTGTACCTAGTAACACATGTATTGAGGTTAAAGGTTGAGAGACATGC
AGAGAAGGAAGTGAAATG

SNP 47451871

ctagggttccaggatcgaatctggcaccactcatcaagccaNgctgagggggcatccacatgccacaactagaaggac
tacaaaaatacaaaactatgtacggggaggctggggagaaaaaggaaaaatgaatctaaaaaaaaaaaaaGAGAGAGAAAA
GAAAAAGAAGGGAAAATAGTGAAGTTGA[G/A]AGTGTCTGGAGTCTACAGTAGTTAATGACT
GAAAGGTTCAAAAGAAGGAAGTGGTCTCTAGATGTAATCAGAGGAGCCCTCCTTTACTTAT
GAATAAAAGTTGAGTTGTTACTGACTATAATCAAATTGCCATTAAAAGCCACATAATT
ANTATAGGTGCTAGTCTCTATCAAATTCAAGAAACTAAATA

SNP 47451715 C/T

TACCAACTAGTTAGAGATCANGTGAGAAATGTGGGAATCAAGAACAGTTGAAAATGAAGTACNTA
AGAGAGAAATCCCTAGCAGTAGTTCTAGAAACAGAACAGGGACggggccggccNtgtggctgagtggtaagt
cacaggctctcgccagcctagggttaccaggatcgaatctggcaccactcatcaagcca[T/C]gctgagggggcatccacatg
ccacaactagaaggacactacaactaaaaatacaaaactatgtacggggaggctggggagaaaaaggaaaaatgaatctaaaaa

aaaaaaaaGAGAGAGAAAAGAAAAAGAAGGGAAAATAGTGAAGTTGTANAGTGTCTGGAGTCTAC
AGTAGTTAACGTGAAAGGTTCAAAA

SNP 47451629 A/C

accggaaacctgaagccTGAGAGTTTTCCCTGACTCCATTCTCACTCCCTGTCGGAATTTTCTTC
CCATTAAAGATTCCCGTACCAACTAGTTAGAGATCANGTGAGAAATGTGGGAATCAAGAAGT
TGAAAATGAAGTACNTAAGAGAGAAATCCCTAGCAGTAGTTCTAGAACACAGAAGGGGACggcc
ggcc[C/A]tgtggctgagtggtaagttcacaggctgctcggcagcctagggttaccagttcaatc
Ngctgagggggcatcccacatgccacaactagaaggacctaactaaaaataaaaaactatgtacc
ggggaggctctgggaga
aaaagaaaaatgaatctaaaaaaaaaaaaaa

SNP 47451575

gcttatacttttagatggagtggtgactccaaagcttctatctgttagaaccggaaacctgaagccTGAGAGTTTTCCCT
GACTCCATTCTCACTCCCTGTCGGAATTTCTTCCATTAAAGATTCCCGTACCAACTAGT
TAGAGATCANGTGAGAAATGTGGGAATCAAGAAGTTGAAATGAAGTAC[G/C]TAAGAGAGAAA
TCCCTAGCAGTAGTTCTAGAACACAGAAGGGGACggggccNtgtggctgagtggtaagttcacaggctcg
cttgcagcctagggttaccagttcaatcctggcaccactcatcaagccaNgctgagggggcatccc
acatgccacaactagaagga
cctacaactaaaaataaaaaacta

SNP 47451535

tacgaatctaagaagagtgtgattttcagtcttcagcttatactctgttagatggagtggtgactccaaagcttctatctgttagaaccg
gaaacctgaagccTGAGAGTTTTCCCTGACTCCATTCTCACTCCCTGTCGGAATTTTCTTCCA
TTAAAGATTCCCGTACCAACTAGTTAGAGATCA[G/T]GTGAGAAATGTGGGAATCAAGAAGTT
GAAAATGAAGTACNTAAGAGAGAAATCCCTAGCAGTAGTTCTAGAACACAGAAGGGGACggcc
gccNtgtggctgagtggtaagttcacaggctgctcggcagcctagggttaccagttcaatc
tgtggggcatcccacat

N= SNP

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Mateja POKLUKAR

**ANALIZA POLIMORFIZMOV GENA *TFAM*
PRI KONJU (*Equus caballus*)**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2007

