

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Petra RANT

**NATANČNEJŠE KARTIRANJE KVANTITATIVNEGA LOKUSA
Fob3b ZA ZAMAŠČENOST V F₂ KRIŽANJU KONGENIH LINIJ
MIŠI**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**FINE MAPPING OF *Fob3b* OBESITY QTL IN F₂ CROSS OF
CONGENIC MOUSE LINES**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek visokošolskega strokovnega študija kmetijstvo - zootehnika. Opravljeno je bilo na Centru za rejo in poskuse na laboratorijskih miših in v genetskem laboratoriju na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo, imunologijo, splošno živinorejo in konjerejo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

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

Recenzent: prof. dr. Peter Dovč

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

Datum zagovora: 19. junij 2009

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.

Petra Rant

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Vs
DK UDK 575(043.2)=163.6
KG molekularna genetika/nalaganje maščevja/kongene linije/kvantitativni lokusi/laboratorijske miši
KK AGRIS L10
AV RANT, Petra
SA HORVAT, Simon (mentor)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2009
IN NATANČNEJŠE KARTIRANJE KVANTITATIVNEGA LOKUSA *Fob3b* ZA ZAMAŠČENOST V F₂ KRIŽANJU KONGENIH LINIJ MIŠI
TD Diplomsko naloga (visokošolski strokovni študij)
OP IX, 58 str., 15 pregl., 3 sl., 56 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Usmerjeno nalaganje maščevja pri domačih živalih postaja vse pomembnejši faktor pri ekonomiki vzreje. Na zamaščenost vpliva veliko število genov, okolje in interakcija med geni in okoljem. Identifikacija novih genov za to kompleksno lastnost je lahko koristna pri razumevanju pojava ter terapiji debelosti pri ljudeh in pri domačih živalih. Za odkrivanje novih lokusov, ki vplivajo na kvantitativne lastnosti – t.i. kvantitativnih lokusov (angl.: *quantitative trait loci*, QTL), so zelo primerni živalski modeli na glodavcih, ker imajo kratek generacijski interval ter dobro raziskane genomske vire. Raziskavo smo izvedli na linijah miši, ki so bile dvosmerno selekcionirane (53 generacij) na višji (debela linija F) oziroma nižji (vitka linija L) odstotek maščevja. Preučevali smo vpliv kongenega odseka *Fob3b* na kromosomu 15, na zamaščenost (skupni adipozni indeks), ter na maso posameznih maščobnih depojev (mezenterialne, abdominalne, femoralne in gonadne maščobe). Analizo smo izvedli na F₂ križancih miši med kongeno linijo 15FHM (M), ter debelo selekcijsko linijo F. Linija M ima kratek odsek v bližini QTLa *Fob3b*, ki izvira iz vitke linije L, sicer je genetsko ozadje enako linij F. Po križanju debele linije F s kongeno linijo M smo dobili F₁ generacijo heterozigotnih potomcev. F₁ potomce smo med seboj križali in dobili potomce F₂ generacije v skladu s 1. Mendlovim zakonom dedovanja 1:2:1 za genotipe FF, FL in LL, kar smo potrdili z χ^2 testom. Analiza fenotipskih podatkov (*t*-test) je pokazala, da področje *Fob3b* debele linije F statistično značilno povečuje maso mezenterialne maščobe pri samicah. Za ostale lastnosti nismo odkrili statistično značilnih povezav. V prihodnje bi bilo potrebno poizkus ponoviti na še večjem vzorcu F₂ živali – če bi slednji potrdili rezultate naše študije, potem je odkriti lokus lahko zanimiv za nadaljnje preučevanje genetskih dejavnikov na razvoj trebušne maščobe, ki pri ljudeh prispeva k razvoju metabolnega sindroma in drugih bolezni, pri domačih živalih pa predstavlja neželjeno komponentno rasti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDC 575(043.2)=163.6
CX molecular genetics/fat accretion/congenic lines/QTL/laboratory mice
CC AGRIS L10
AU RANT, Petra
AA HORVAT, Simon (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2009
TI FINE MAPPING OF *Fob3b* OBESITY QTL IN F₂ CROSS OF CONGENIC MOUSE LINES
DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
NO IX, 58 p., 15 tab., 3 fig., 56 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Obesity presents a growing health problem and an unwanted component of growth in domestic animals. Identification of new obesity causing genes will be useful in illuminating the genetic basis of this complex trait and might help to control obesity in humans and domestic animals. Fat accretion is controlled by several genetic and environmental factors as well as their interactions. Animal models, especially rodents, present a valuable tool for identification of loci affecting quantitative traits (QTL) due to their short generation interval and well established genomic resources. Our study focused on the polygenic mouse model divergently selected (53 generations) on high (Fat line, F) or low (Lean line, L) body fat percentage and evaluation of phenotypic effects of a genomic segment near QTL *Fob3b* from mouse chromosome 15 on various obesity-related traits such as weights of fat depots (mesenterial, abdominal, femoral in gonadal) and combined adipose index. Analysis was performed on an F₂ cross between a congenic line FHM (M) and a high fat selection line F. The congenic line M contains a short genomic segment around QTL *Fob3b* that originates from the lean line L but has otherwise a genetic background of line F. Parental lines F and L were crossed to produce F₁, which were in turn intercrossed to produce segregating F₂ population in line with the Mendelian inheritance 1:2:1 for genotypes FF, FL in LL as confirmed by a χ^2 test. Phenotypic analysis of F₂ data (*t*-test) demonstrated that *Fob3b* region from the F line statistically significantly increases the weight of mesenterial fat depot in females while no significant associations were found for other traits. In the future this experiment could be repeated on a bigger sample size and if this independent replicate confirmed our results then this locus might prove useful for further genetic and functional studies. Namely in humans mesenterial fat depot has a critical role in developing metabolic syndrome with very negative health consequences, on the other hand, if such locus affects mesenterial fat in domestic animals it could be used in selection schemes to decrease this fat depot in livestock species.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GENETIKA NALAGANJA MAŠČEVJA	3
2.1.1 Fiziologija nalaganja maščevja	3
2.1.2 Odkrivanje kvantitativnih lokusov (QTL)	3
2.1.3 Nalaganje maščevja pri živalih	6
2.2 RAZVOJ PREUČEVANIH LINIJ F IN L	14
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 OPIS LINIJ	16
3.1.1 Osnovni selekcijski liniji debelih (F) in vitkih (L) linij miši	16
3.1.2 Opis kongene linije M	16
3.2 OSKRBA MIŠI	18
3.2.1 Čiščenje	18
3.2.2 Oprema za miši, voda in krma	19
3.2.3 Postopki in vodenje evidence v koloniji	19
3.3 POSTOPKI V LABORATORIJU	23
3.3.1 Priprava DNA lizatov	23
3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. <i>polymerase chain reaction</i>)	24
3.3.3 Mikrosatelitski genetski označevalci (angl. <i>genetic markers</i>)	26
3.3.4 Agarozna gelska elektroforeza	27
3.4 POSTOPEK ZBIRANJA TKIV	29

3.4.1	Odstranitev mezenterialne maščobe	30
3.4.2	Odstranitev gonadne maščobe	30
3.4.3	Odstranitev abdominalne maščobe	30
3.4.4	Odstranitev femoralne maščobe	30
3.5	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	31
4	REZULTATI	32
4.1	GENOTIPIZIRANJE	32
4.2	FREKVENCA GENOTIPOV IN χ^2 TEST	35
4.3	ANALIZA FENOTIPSKIH IN GENOTIPSKIH PODATKOV V F ₂ GENERACIJI	37
4.3.1	Osnovna statistika fenotipskih podatkov	37
4.3.2	Statistični test (<i>t</i>-test) - razlike med genotipi	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1	RAZPRAVA	43
5.2	SKLEPI	48
6	POVZETEK	49
7	VIRI	51
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Tabela 1: Sestava surovih hranil (%) za krmno mešanico Altromin.....	19
Tabela 2: Kombinacije števil pri označevanju živali s ščipanjem ušes.....	21
Tabela 3: Proprava pufra za lizo.....	23
Tabela 4: Končne koncentracije reagentov v PCR reakciji.....	25
Tabela 5: Potek programa za reakcijo PCR.....	26
Tabela 6: Priprava 2 litra 0,5 X TBE pufra	28
Tabela 7: Zaporedje levega in desnega oligonukleotida za polimorfne genetske označevalce, katere smo uporabili v poizkusu (Ensembl genome browser, 2007).....	33
Tabela 8: Genetski in fizični položaj polimorfnih označevalcev na kromosomu 15 (Ensembl genome browser, 2007).....	34
Tabela 9: Frekvenca genotipov in χ^2 test za vse živali v poizkusu.....	35
Tabela 10: Frekvenca genotipov in χ^2 test za izločene živali	36
Tabela 11: Frekvenca genotipov in χ^2 test za živali s fenotipskimi podatki.....	36
Tabela 12: Povprečne vrednosti in standardne deviacije (STD)* za merjene vrednosti v F ₂ generaciji pri samicah	38
Tabela 13: Povprečne vrednosti in standardne deviacije (STD)* za merjene lastnosti v F ₂ generaciji za samce	39
Tabela 14: Primerjave med genotipi za različne lastnosti pri samicah.....	41
Tabela 15: Primerjave med genotipi za različne lastnosti pri samcih	42

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Sistem označevanja miši s ščipanjem ušes.....	22
Slika 2: Genetski označevalci, ki smo jih uporabili za genotipiziranje. F-linija FLI (debela linija), L-linija FHI (suha linija), F1-homozigot. Kontrole genskih označevalcev, kateri določajo razlike na <i>Fob3b</i> odseku kongene linije M.	32
Slika 3: Agarozni gel na katerem so nanešeni vzorci, ki so genotipizirani za marker <i>D15Mit261</i> . Na koncu so dodane standardne kontrole. S slike je razvidno, katere živali so na preučevanem odseku kromosomu 15 heterozigoti (F1) in katere homozigoti (F, L).....	33

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

FLI – linija selekcionirana na višji odstotek maščob (F- angl. fat)

LHI – linija selekcionirana na nižji odstotek maščob (L-angl. lean)

FHM – kongena linija M, ki ima *Fob3b* odsek kromosoma 15 iz vitke linije L

F1 – križanci prve generacije med linijo F in L

F2 – potomci križanja F₁ živali (druga generacija)

FF – homozigot za alele, ki izvirajo iz debele linije F

LL – homozigot za alele, ki izvirajo iz vitke linije L

FL - heterozigot

Fob3 – kongeni odsek na kromosomu 15, ki vpliva na zamaščenost

QTL – kvantitativni lokus (angl.: *quantitative trait loci*)

STD – standardna deviacija

ADI – adipozni indeks

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

1 UVOD

Z industrializacijo in preseljevanjem ljudi v velika mesta se je povečalo povpraševanje po kmetijskih pridelkih. Spremenila se je tako intenzivnost kmetijstva kot prehranjevanje ljudi. Kmetijske površine ne služijo samo za proizvodnjo hrane za preživetje lastne družine. Hrana je postala tržno blago, kar je pripeljalo do velikih rastlinskih in živalskih pridelovalnih obratov, ki zagotavljajo pridelavo velikih količin hrane za zadovoljitev potreb prebivalstva, ki živi v mestih. Spremenil se je tudi način življenja ljudi, vedno manj smo fizično aktivni, s tem porabimo manj energije in maščobe se bolj nalagajo v telesne rezerve. Posledica je debelost in tveganje za nastanek srčno žilnih bolezni, sladkorne bolezni. Rejci domačih živali se vedno bolj trudijo zmanjšati zamaščenost živali, zmanjšati stroške porabljene krme za enoto prirasta, imeti čim manjše izgube in čim ceneje pridelati hrano. Za nalaganje maščevja porabijo živali veliko energije, zato je zamastitev domačih živali velika izguba za rejca.

Naše telo se je skozi evolucijo spreminjalo, kar je bilo odvisno od količin hrane in temu je bila prilagojena selekcija. Preživeli so varčni genotipi, ker so bolje izkoriščali hrano. V zadnjih desetletjih pa so se razmere spremenile, ni več pomanjkanja hrane, geni, ki so se ohranjali milijone let, niso več zaželeni, saj v sedanjih razmerah (obilje hrane, visoko kalorična hrana, pomanjkanje fizične aktivnosti) vplivajo na povečevanje rezervnih maščob tako pri človeku kot pri živalih. Debelost je kompleksna lastnost, nanjo vpliva veliko število genov, ki se na kromosomih nahajajo v obliki kvantitativnih lokusov (QTL). Pri ljudeh in živalih je možno določiti lokacije področij v genomu, kjer ležijo lokusi za nalaganje maščevja. Veliko težje pa je natančnejše kartirati ta področja, sploh pri ljudeh in domačih živalih. Pri poskusnih živalih (podgane, miši) je možno natančnejše kartiranje doseči z metodo križanj kongenih linij, ki se razlikujeta v opazovani lastnosti in le v enem QTL segmentu. Predhodne raziskave križanja debele (linija F) in vitke (linija L) so nakazale, da ima odsek imenovan *Fob3b* na kromosomu 15 pri miših relativno velik vpliv na nalaganje maščevja.

Namen diplomske naloge je bil preučiti vpliv kongene linije M, ki je kongena na *Fob3b* odseku kromosoma 15 za nalaganje maščevja pri miših. Odkrivanje novih genov za

debelost je lahko uporabno pri razvijanju novih diagnostičnih in terapevtskih pristopov za zmanjšanje debelosti pri ljudeh ter za učinkovitejšo selekcijo domačih živali z manj telesnih maščob.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GENETIKA NALAGANJA MAŠČEVJA

2.1.1 Fiziologija nalaganja maščevja

Vzrok za debelost se skriva v motnjah ravnovesja med vnosom hrane in porabo energije. Ravnovesje uravnava zapleten fiziološki sistem, ki ga uravnava hipotalamus in povezuje številnih perifernih sistemov. Informacije o bilanci energije potujejo kot živčni in hormonalni signali do tkivnih jeder v notranjosti hipotalamusa in do zunanjega hipotalamusnega jedra. Do jedra pridejo informacije o vnosu hrane, razpoložljivih zalogah energije v maščobnem tkivu in telesni aktivnosti. Hipotalamus vpliva na fiziološke dejavnike in vedenjske spremembe preko avtonomnega živčevja in endokrnega sistema. V medsebojno delovanje so vključeni hormoni, neuropeptidi, neurotransmiterji, ki vplivajo na energijsko bilanco organizma. Ključni hormon je leptin, anoreksigeni hormon. Leptin se izloča iz belega maščobnega tkiva in po krvnem obtoku potuje do možganov, kjer spodbuja ali zavira sproščanje neurotransmiterjev, ki so odgovorni za kratkotrajno regulacijo apetita (Bell in sod., 2005).

Regulatorni sistem deluje v smeri zaščite organizma pred izgubo telesne mase, ne pa tudi v smeri pridobivanja teže. Koncentracija leptina v telesu se poveča ob povečanem nalaganju maščevja, poveča se zauživanje hrane in nastane več možnosti za razvoj debelosti. Evolucija teži k ohranjanju zaloga telesne maščobe za primer stradanja (Bell in sod., 2005).

Za razjasnitev fenotipskih podatkov se poizkuša poiskati in razjasniti kandidatne gene, ki naj bi vplivali na gensko osnovo nalaganja maščevja. Za razumevanje fenotipskih lastnosti telesne mase so močno pripomogle genske raziskave iskanja novih genov na živalih (Bell in sod., 2005).

2.1.2 Odkrivanje kvantitativnih lokusov (QTL)

Na nalaganje maščevja vpliva zapletena kombinacija genskih in okoljskih vplivov. Kot zelo dobra alternativa neposrednim študijam pri človeku so se izkazali poizkusi na

glodavcih. Poznavanje genov na živalskih modelih, ki vplivajo na presnovo in nalaganje maščevja, bi lahko pomembno pomagalo pri razvoju diagnostičnih metod pri domačih živalih in kot osnova za terapijo pri človeku. Genom je zelo dobro raziskan, prinaša pa nam tudi druge prednosti. Glodavci imajo visoko stopnjo reprodukcije, kratek generacijski interval, nizke stroške vzdrževanja, možnosti kontroliranja in standardizacije njihovega okolja ter relativno preprosto merjenje lastnosti (Jerez-Timaure in sod., 2005; Bunker in sod., 2005). Miši predstavljajo odličen model za raziskovanje lastnosti, saj so geni evolucijsko dovolj sorodni z geni pri domačih živalih in človeku (Mehrabian in sod., 1998). Poleg tega imamo pri miših razvite selekcionirane linije, ki so odlična osnova za raziskovanje in razumevanje kompleksne zgradbe procesov nalaganja maščevja (Jerez-Timaure in sod., 2005).

Na Biotehniški fakulteti, na Oddelku za zootehniko v Domžalah potekajo raziskave kvantitativnih lokusov (angl.: *quantitative trait loci* (QTL)) kromosoma 12 in 15, ki vsebujeta alelne variante, odgovorne za nalaganje maščevja pri miših in del teh raziskav je cilj pričujoče diplomske naloge. Študije so odkrile številne kromosomske regije, ki vsebujejo gene za debelost pri miših. Vendar pa so samo nekaj teh regij uporabili za natančnejše kartiranje kongenih linij (Diamant in sod., 2004).

Podrobno gensko kartiranje QTL na *Fob3* odseku na kromosomu 15 so preučevali tudi Stylianou in sod. (2004). Iz debele linije F in suhe linije L so s pomočjo rekombinantov pridobili kongeno linijo *F^{chr15L}*. Kongeno linijo so povratno križali z genskim ozadjem debele linije F in iz potomcev so izbrali rekombinante, ter razkrili, da je regija *Fob3* sestavljena iz vsaj dveh manjših, *Fob3a* in *Fob3b* regije.

Na kromosomu 2 so Lembertas in sod. (1997) prvi identificirali kvantitativni lokus za debelost. Ta regija na kromosomu 2 je homologna regiji na kromosomu 20 pri človeku. Leta 2004 so Warden in sodelavci kvantitativni lokus potrdili na drugi kongeni liniji miši. Estrada-Smith in sod. (2004) so podrobneje raziskali že prej odkrit kvantitativni lokus *MOB* na mišjem kromosomu, ki vpliva na debelost, odpornost na inzulin in dislipidemijo. Znotraj kvantitativnega lokusa so našli vsaj dva kandidatna gena. Jerez-Timaure in sod.

(2004) so izolirali in natančneje opredelili področje, kjer se nahaja kvantitativni lokus *MMU2* na mišjem kromosomu 2, ki ima vpliv na rast in debelost. Preučevali so linijo MB2, ki so jo dobili z zamenjavo alela *M16i* z alelom *C57BL/6J*. Pri petnajstih tednih starosti je bila opazna razlika med MB2 in starševsko linijo M16i. MB2 je bila za 15% lažja, imela je manjšo vsebnost maščobe, ne glede na količino zaužite krme in spol živali. Posredno je bila ugotovljena statistično značilna razlika za upad nivoja leptina, inzulina in glukoze pri preučevani liniji. Rezultati so potrdili prisotnost in velik vpliv kvantitativnega lokusa *C57BL/6J* na mišjem kromosomu 2. Kongena linija MB2 je lahko dober vir za prepoznavanje poti in mutacij genov, ki so odgovorni za rast in debelost. Pred to raziskavo so Diamont in sod. (2004) objavili rezultate raziskave na kongeni liniji miši BSB. Našli so pomemben QTL za odstotek telesne maščobe na kromosomu 2 v neposredni bližini lokusa *Agouti*.

York in sod. (1999) so preučevali pomemben prehransko odvisen lokus, ki je povezan z debelostjo, pri kongeni liniji na mišjem kromosomu 7. Ovrednotili so učinek visoko kalorične hrane. V F₂ generaciji so križali liniji miši CAST/Ei in C57BL/6J. Ozadje kromosoma kongene linije je bilo od linije C57BL/6J, kratek odsek kromosoma 7 pa od linije CAST/Ei. Rezultati so pokazali, da je imela kongena linija za 50 % nižjo vrednost podkožnega maščevja in maščobnih blazinic pri obeh spolih. Živali hranjene z nizko kalorično hrano niso pokazale statistično značilne razlike za nalaganje maščobnih depojev. Avtorji še poročajo, da oba gena v kongenem odseku vplivata na nalaganje maščevja, najbolj izrazito pri visoko kalorični hrani. Ni pa jim uspelo dokazati povezave med kongeno linijo in tem, koliko krme so živali dejansko zaužile. Diamont in Warden (2004) sta dokazala, da se na kvantitativnem lokusu kromosoma 7 nahajajo najmanj trije geni, ki vplivajo na debelost.

Veliko raziskav je bilo opravljenih tudi na gospodarsko pomembnih lastnostih pri domačih živalih. Preučevane so bile številne polimorfne regije, 16 pri človeku, 19 pri govedu in 6 pri prašičih. Pri človeku so preiskovali vzroke za debelost, sladkorno bolezen in možno povezavo z rakom na prostati. Pri govedu in prašičih so trenutne raziskave usmerjene v proizvodnjo in kakovost mesa, zauživanje krme, mlečnost, vpliv na razmnoževanje ter

nalaganje intramuskularne maščobe (Van der Lande in sod., 2005). Vzorčne mutacije iščejo s pomočjo QTL programov, odkrivanja polimorfizmov v kandidatnih genih in drugih genskih pristopov. Polimorfne gene odkrivamo z genotipizacijo (Renand in sod., 2003).

Iskanje polimorfizmov v kandidatnih genih, ki imajo statistično značilen učinek na pričakovano lastnost, lahko pripomore k identifikaciji genov, ki kontrolirajo to lastnost, ali pa predstavljajo genske označevalce za vzorčne kvantitativne lokuse (Bindon, 2004). Polimorfizme, ki se pojavljajo v kandidatnem genu lahko testiramo v različnih populacijah za njihove fenotipske učinke. Določen delež fenotipske variabilnosti lahko pojasnimo, če dokažemo statistično značilno povezavo med genotipom in preučevano lastnostjo. Preučevanje kandidatnih genov je enostavnejše kot iskanje QTL, ki zahtevajo dolgotrajne in kompleksne poizkuse. Poleg tega so polimorfizmi v kandidatnih genih bolj robustni (se pojavljajo v več različnih populacijah in pasmah kot QTL), možno je tudi odkriti polimorfizme z relativno nizkimi fenotipskimi učinki (Wu in sod., 2005).

2.1.3 Nalaganje maščevja pri živalih

2.1.3.1 Genomske analize za določanje QTL, ki vplivajo na zamaščevanje pri živalih

Objavljene so številne študije, ki preučujejo povezave polimorfizmov v kandidatnih genih na lastnosti rasti in klavne lastnosti (kakovost mesa, marmoriranost). Večina študij pri govedu izvira iz Severne Amerike in Avstralije (Renand in sod., 2003). V avstralski govedoreji je izboljšanje marmoriranosti postal pomemben dejavnik pri izvozu mesa. Znanstveniki so zelo pomagali rejcem z nasveti pri rejskih odločitvah, ki izboljšajo marmoriranost (Pernell, 2004). Za sedem pasem je že ocenjen njihov predviden odstotek intramuskularne maščobe. Ocene dednih lastnosti kažejo, da bo genski napredek večji, če bomo odbirali na odstotek marmoriranosti. CSIRO/MLA so odkrili alel za marmoriranost na kromosomu 14 pri govedu, ki vsebuje genske markerje za to lastnosti. Poimenovali so ga »*Gene STAR marbling*«, ki je sedaj v širši uporabi. Ostala obetajoča kromosomska področja se še raziskujejo (Bindon, 2004).

Vpliv prehrane je do neke mere še vedno problematičen. Splošno znano je, da visoko energijska žitna krma dosega boljše rezultate pri povečevanju marmoriranosti, kot prehranjevanje na paši z voluminozno krmo. Med žiti boljše učinke dosega koruza kot ječmen. Raziskave so bile opravljene tudi z večjo vsebnostjo beljakovin, maščob, z ali brez kalcija v krmi. Nič od tega ni prineslo oprijemljivih rezultatov. Edina izjema so avstralske velike farme, ki namensko vzrejajo govedino za japonsko tržišče. Njihovi rezultati pa zaradi komercialnih interesov niso javno dostopni (Bindon, 2004).

Trendi nakazujejo, da imajo potrošniki rajši marmorirano meso, ker je bolj mehko in sočno. Zanimivo pa je, da so znanstveniki ugotovili, da marmoriranost nima vpliva na okus, saj so snovi, ki izgrajujejo okus, topne v vodi (Bindon, 2004). Francozi pa poročajo o rezultatih, da odbiranje na povečano mišično maso prinaša mehkejšo meso, vendar slabšega okusa (Renand in sod., 2003).

Curi in sod. (2006) so raziskovali lastnosti rasti in klavne lastnosti v povezavi z genetskim polimorfizmom *GHI/Alu1* in *POUIF1/Hinf*^λ pri zebu govedu in križancih v intenzivnih rejah. Poizkus so izvedli na 79 živalih nellore pasme, 30 živalih conchim (5/8 šarole + 3/8 zebu) in 275 križancih med simentalškimi in angus očeti z nellore materami. Rezultati so pokazali statistično značilno razliko med genotipom LL na polimorfizmu *GHI/Alu1* za večjo telesno maso. Polimorfizem *POUIF1/Hinf*^λ pa ni pokazal statistično značilnega učinka. Na tej populaciji goveda v intenzivni reji je bila pred tem izvedena raziskava na polimorfna gena *CSN3* in *LGB*, ki sta bila znana po tem, da vplivata na preučevane lastnosti. Rezultati pa so pokazali prav nasprotno, saj polimorfizma nista imela nobenega vpliva na rast in klavne lastnosti (Curi in sod., 2005a). Curi in sod. (2005b) so na tej populaciji izvedli še eno raziskavo. Ocenjevali so učinke alelov in frekvence genov rastnih hormonov, in sicer polimorfizmov *IGF-1/SnaBi*, *IGF-IR/TaqI* in *GHRH/HowIII*. Opazna je bila povezava med genotipom rastnega hormona *IGF-1/SnaBi*, telesno težo in podkožnim maščevjem. *IGF-IR/TaqI* in genski polimorfizem *GHRH/HowIII* pa nista imela povezave s prirastom. Chaung in Kim (2005) sta preučevala lokalne pasme goveda v Koreji in prišla do statistično značilnih rezultatov iskanja polimorfizmov v *IGF-I* genu na telesno maso pri treh mesecih. Polimorfizmi v *MYF5* genu, pa niso pokazali statistično značilnih povezav.

Pri pasmi angus so Li in sod. (2004a) iskali polimorfizme v genih *IGF-1* in *MYF5*. Rezultati so pokazali ravno nasprotno kot raziskave na korejskih pasmah. *IGF-1* ni pokazal statistično značilne povezave, medtem ko so pri *MYF5* našli povezavo polimorfizmov z lastnostmi rasti in klavnimi lastnostmi. Pred tem je bila na angus govedu na *IGF-1* genu za lastnosti rasti izvedena še ena raziskava. Ge in sod. (2001) so raziskovali vpliv genskega markerja z inzulinu podobnim rastnim faktorjem *IGF-1* v krvnem serumu za lastnosti rasti. Cilj raziskave je bil oceniti genski marker na regiji promotorja v genu *IGF-1*. Markerje so iskali pri 760 teletih, ki so jih pridobili iz različnih linij, selekcioniranih na visoko in nizko koncentracijo *IGF-1* gena v krvnem serumu. Spremljali so priraste telet v različnih obdobjih po odstavitvi. Rezultati analiz so pokazali statistično značilno povezavo dominantnega genotipa BB, z večjim prirastom v prvih dvajsetih dneh po odstavitvi. Nižja koncentracija *IGF-1* gena v krvnem serumu je pokazala statistično značilno razliko pri dominantnih genotipih BB na večje pridobivanje teže po odstavitvi, medtem ko pri višji koncentraciji *IGF-1* gena v krvnem serumu niso našli statistično značilne razlike. Avtorji še navajajo, da bi bilo potrebno učinke potrditi še pri drugih populacijah goveda.

Li in sod. (1990) so odkrili mutacijo na genu *Pit-1*, ki privede do odsotnosti proizvodnje ravnega hormona. Na *Pit-1* genu je bila izvedena raziskava s pasmo angus. *Pit-1* gen je posredno povezan s sistemom *GH-IGF-1*, ki kontrolira razvoj hipofize in izražanje njenih hormonov. Uporabili so ga za raziskavo genskih markerjev, ki vplivajo na rast in klavne lastnosti. Odkrili so nekaj polimorfizmov na odseku 2 do 6 na *Pit-1* genu. Vpliv na rast in klavne lastnosti pa ni bila dokazana (Zaho in sod., 2004).

Poleg številnih študij polimorfizmov v genu *GH-IGF-1*, ki ima splošen vpliv na lastnosti rasti in zamaščenost, so raziskovalci preučevali tudi bolj specifične gene v fiziologiji nalaganja maščevja. Veliko raziskav je bilo opravljenih z *leptinskim* genom (*LEP*), ki kodira hormon, izražen večinoma v belem maščobnem tkivu. Schenkel in sod. (2005) so v svoji študiji raziskovali pet polimorfizmov v *leptinskem* genu. Analizirali so samo štiri, saj sta *UASMS2* in *UASMS3* popolnoma povezana. Rezultati so pokazali, da polimorfizma *E2JW* in *E2FB* potrjujeta statistično značilno povezavo za nalaganje maščevja in kakovost mesa. Polimorfizma *UASMS1* in *UASMS3* nista nakazala statistično značilne povezave.

Nkrumah in sod. (2005) pa so prišli do rezultata, da živali genotipa TT na *UASMS2* in živali genotipa GG na *UASMS3* vplivajo na rast, presnovo beljakovin in klavne lastnosti. Buchanan in sod. (2002) so dokazali, da imajo britanske pasme goveda večjo pogostost alel T, kontinentalne pasme pa alel C. Alele T so imele živali z boljšo konstrukcijo. Tudi Leganigro in sod. (2003) so dokazali, da *leptin* vpliva na nalaganje maščobnega tkiva.

Jiang in sod. (2005) so preučevali polimorfizem *TFAM* za marmoriranost in podkožno maščevje pri wagyu in limuzin pasmi goveda. Mitohondrijski faktor *TFAM* je protein, ki regulira iniciacijo prenosa in replikacijo mitohondrijske DNA (mtDNA). Pomanjkanje tega proteina v mtDNA naj bi bilo povezano z debelostjo pri miših. Avtorji so podali hipotezo o *TFAM* genu, ki naj bi vplival na nalaganje maščobnega tkiva in presnovo. V študiji na govedu so ugotovili, da *TFAM* igra pomembno vlogo pri presnovi maščob in je najverjetneje močan kandidatni gen za debelost pri sesalcih.

Na F₂ križancih med wagyu in limuzin so Michal in sod. (2006) analizirali *FABP4* gen na kromosomu 14, ki ima pomembno vlogo v metabolizmu maščob. Določeni polimorfizmi v genu *FABP4* imajo statistično značilne učinke za količino podkožne in intramascularne maščobe v F₂ populaciji križanja. Dodatna vrednost te študije je v tem, da *FABP4* kandidatni gen leži v področju, kjer je bil že predtem kartiran QTL za intramascularno maščobo. Rezultat je potrdil dejstvo, da je *FABP4* primeren kandidatni gen za nadaljnje raziskovanje zamaščevanja.

Na kromosomu 14 pri govedu se nahajata tudi genska polimorfizma v genu *TG* in v genu *DGATI*. Lokusa sta odgovorna za nalaganje intramascularne maščobe. Barendese je že leta 1999 patentiral označevalec v genu kot pozicijski in funkcionalni kandidatni gena za intramascularno maščobo. Alel *TG5* povišuje marmoriranost mesa in diagnostični test je že v komercialni rabi (imenovan »Gene STAR marbling«, Bindon, 2004). Študija Thaler in sod. (2003) je analizirala učinke, polimorfizma v genu *TG* in *DGATI* pri nemški črno-beli pasmi in charole pasmi. Avtorji poročajo o statistično značilnih učinkih na marmoriranost pri obeh pasmah, vendar so bili učinki vezani le na določeno skupino mišic. Polimorfizmi v genu *DGATI* so bili statistično značilni pri mišici *musculus semitendinosus*, medtem ko

so imeli polimorfizmi v genu *TG* pomemben učinek pri mišici *m. longissimus dorsi*. Študija je zanimiva tudi zaradi odkritja, da sta učinka dveh tesno vezanih genov *TG* in *DGATI* neodvisna in imata recesiven način dedovanja. Avtorji še dodajajo, da bo to dejstvo potrebno upoštevati pri ciljnih programih vezanih na polimorfizme v genih *TG* in *DGATI*, da bo dosežen optimalen genski napredek marmoriranosti.

Wu in sod. (2005) so testirali učinke polimorfizmov *DGATI*, *FABP3*, *GH*, *TG* in *leptina*, ki so znani po tem, da vplivajo na debelino podkožnega maščevja pri govedu. V tej raziskavi so uporabili Bayesianov model selekcije, da bi ocenili vplive petih genov s primerjavo na naključnih modelih. Fenotipske podatke so dobili od F₂ populacije wagyu in limozin črede goveda. Vseh pet kandidatnih genov je imelo statistično pomemben vpliv, vendar je bilo odstopanje podkožnega maščevja nesistematično. Gen *DGAT1* se je izkazal kot gen z največjim učinkom, ne glede na naključnost populacije. Imel je še dodatno največji vpliv na povečanje podkožnega maščevja.

Večina omenjenih študij na govedu v pričujoči diplomski nalogi temelji na raziskavah polimorfizmov, ki so odgovorni za marmoriranost, nalaganje maščevja, rast, presnovo, pred zakolom. Pomembno vlogo pri zagotavljanju mehkoobe mesa pa ne daje samo medmišična maščoba, ampak tudi zorenje mesa po zakolu. Casas in sod. (2006) so raziskovali vpliv encima *calpain* na genu *CAPN1* in encima *calpastatin* na genu *CAST* na mehkoobo in okusnost mesa. Ugotovili so, da polimorfizem v genu *CAST1* pomembno vpliva na mehkoobo in okusnost mesa, medtem ko polimorfizem v genu *CAST* ni nakazal statistično značilne povezave. Casas in sod (2000) so križali belgijsko plavo govedo z MARC III in piemonteze z ameriško angus pasmo. Želeli so določiti QTL za gospodarsko pomembne lastnosti. Pri križanju z belgijsko plavo pasmo so našli QTL na kromosomu 6, ki vpliva na rojstno maso, maso klavnega trupa in mišico hrbtne območja, za marmoriranost se QTL nahaja na kromosomu 17 in 27. Križanje s piemonteze pasmo je nakazalo QTL na kromosomu 5 in ima vpliv na količino maščobe.

Casas in sod. so leta 2003 objavili še eno študijo raziskovanja gospodarsko pomembnih lastnosti pri govedu. Križali so liniji *Bos indicus* z *Bos taurus*. Odkrili so QTL na

kromosomu 5, ki ima vpliv na rojstno maso in na hrbtno območje. Na kromosomu 6 se nahaja QTL, ki ima vpliv na hrbtno območje in na kromosomu 21 so našli QTL, ki ima vpliv na rojstno maso. Odkrili so še nekaj QTL na različnih kromosomih, ki so bili blizu statistično značilne povezave. Raziskali so celoten genom populacije križanja *Bos indicus* z *Bos taurus*.

Debelina podkožne maščobe na hrbtu je ena glavnih kvantitativnih lastnosti, ki vpliva na kakovost govejega mesa. Moore in sod. (2003) so natančneje preučili QTL odgovoren za nalaganje hrbtne maščobe pri govedu komercialne linije *Bos taurus*. Preučevali so QTL *SNP*, *DGATI*, *TG* in *EBV*. Rezultati so pokazali statistično značilno povezavo na kromosomu 14 za nalaganje hrbtne maščobe (*EBV*). Ostali QTL so statistično značilno povezavo nakazali, zato bi bilo v prihodnje smiselno raziskavo ponoviti na drugi populaciji živali.

Li in sod. (2004b) so prav tako preučevali debelino hrbtne maščobe pri komercialni liniji goveda *Bos taurus*. Opredelili so QTL na kromosomih 2, 5, 6, 19, 21 in 23. Na kromosomu 5 so našli eno statistično značilno povezavo, na kromosomu 6 tri, na kromosomu 19 tri, na kromosomu 21 eno in na kromosomu 23 eno. Rezultat je zanimiv za nadaljnje študije kartiranja na debelino hrbtne maščevja pri govedu.

Ikeobi in sod. (2002) so iskali in določili QTL, ki vpliva na težo abdominalne maščobe, kožnega maščevja in porazdelitev maščobe. Uporabili so 422 piščancev iz F₂ generacije (422 piščancev iz 30 križanih staršev). QTL za težo abdominalne maščobe so našli na kromosomih 3, 7, 15 in 28, na kromosomih 1, 5, 7 in 28 so našli QTL pri fenotipskih podatkih (pri zakolu). QTL, ki vpliva na kožno in podkožno maščevje so našli na 3, 7 in 13 kromosomu, medtem ko so QTL za težo kožnega maščevja ob zakolu našli na 3 in 28 kromosomu. QTL na 5, 7 in 15 kromosomu vpliva na težo kožnega maščevja in abdominalne maščobe. Spol in družina v teh poskusih nista imela nobenega vpliva. Za vse statistično značilne lokacije QTL so odkrili, da pomembno vplivajo na nalaganje maščevja v abdominalni votlini. Našli niso nobenega QTL, ki pomembno vpliva na nalaganje

kožnega maščevja, našli pa so en QTL, ki ima vpliv na razporeditev maščobe. QTL na kromosomu 7 je imel več kot 20 % vpliv nalaganje abdominalne maščobe.

Jennen in sod. (2004) so preiskovali in določali QTL, ki vpliva na nalaganje maščevja pri pitovnih piščancih. Uporabili so križance dveh različnih brojlerskih linij, ki izhajata iz pasme bela plimutka. Genotipizirali so 20 potomcev F₁ generacije in 456 potomcev F₂ generacije. Tri skupine iz F₃ generacije so služile za zbiranje fenotipskih podatkov. Zbirali so podatke o telesni teži, teži abdominalne maščobe in odstotek abdominalne maščobe pri starosti 7, 9 in 10 tednov. Našli so 26 QTL v 18 regijah v kromosomu 12. Na kromosomu 1 so našli QTL odgovoren za nalaganje abdominalne maščobe pri 10 tednih starosti. Za telesno težo pa so pri isti starosti našli QTL na kromosomu 13. Veliko domnevnih QTL so našli na kromosomih 1, 2, 4, 13, 15, in 18.

McElroy in sod. (2006) so raziskovali genske regije, ki vplivajo na odstotek belega mesa, rast in klavne lastnost v F₂ generaciji križancev dveh gensko različnih komercialnih pasem pitovnih piščancev. Genotipizirali so 430 potomcev F₂ generacije. Določili so šest QTL, ki vplivajo na odstotek belega mesa, rast in klavne lastnosti ter imajo lahko pomemben vpliv na nadaljnjo selekcijo.

Zhou in sod. (2006) so iskali QTL na pitovnih piščancih F₂ generacije, ki so jih pridobili s križanjem med brojlersko moško linijo in zelo gensko izenačeno populacijo ženskih živali pasem leghorn G-B2 in foyoumi M15,2. Podatke so zbirali za dvanajst lastnosti (mišična masa prsi, teža abdominalne maščobe, srca, jeter, vranice, mišice *femoris ibolik* in odstotke teh lastnosti). Celoten genom je bil genotipiziran z 269 mikrostetalitskimi označevalci. Določili so 61 in 45 QTL na različnih kromosomih za vseh dvanajst lastnosti. Rezultati te študije bodo povečali znanje o genskih markerjih, ki so povezani z značilnostmi telesne zgradbe in bodo pripomogli k procesu odkrivanja genov, ki vplivajo na preučevane lastnosti. Pridobljeno znanje bodo lahko vključili v selekcijske programe za izboljšanje genskega potenciala živali.

2.1.3.2 Kartiranje QTL homolognih z odsekom mišjega QTL *Fob3b*

V tem pregledu se bom omejila na lokuse, ki vplivajo na nalaganje maščobe pri domačih živalih. Omenila bom le raziskave, ki se nanašajo na homologno regijo na kromosomu 15 pri miših, na odsek M in so bili že raziskani pri govedu in kokoših, saj imamo na voljo le primerjalne podatkovne baze, genski seznam, ki vključuje kompletno informacijo genske pozicije (angl.: *homology files*) za govedo: miši, kokoši: miši. Primerjalna genska mapa je prosto dostopna na spletu (<http://pga.jax.org/qtl/index>). Za enkrat za ostale domače živali še ni na voljo podatkovnih baz, ki bi določile homologno regijo *Fob3b* mišjega genoma. Primerjalna genomika je vedno bolj pomembna in uporabna pri določevanju QTL v mnogih bioloških panogah (Burgess-Herbert, 2008).

- Govedo

Fob3b je homologen z odseki kromosomov 5, 14 in 17 pri govedu. Po pregledu literature smo našli štiri goveje QTL, ki so homologni s *Fob3b* regijo na kromosomu 15 pri miših. Casas in sod (2000) so belgijsko plavo govedo križali z MARC III in piemont z ameriško angus pasmo. Križanje s piemonteze pasmo je nakazalo QTL na kromosomu 5 na lokaciji 41-75 cM, ki ima vpliv na količino maščobe. Casas in sod. so leta 2003 objavili še eno študijo raziskovanja gospodarsko pomembnih lastnosti pri govedu. Križali so liniji *Bos indicus* z *Bos taurus* in odkrili so QTL na kromosomu 14 na lokaciji 0-22 cM. Moore in sod. (2003) so križali komercialno linijo *Bos taurus* in našli QTL homologen s *Fob3b* odsekom na kromosomu 14 pri govedu s centrom lokacije na 5,125 cM. Li in sod. (2004b) so prav tako preučevali nalaganje maščobe pri komercialni liniji goveda *Bos taurus*. Določili so homologen QTL na kromosomu 19. Našli so tri statistično značilne povezave na lokaciji 41.56-45.92 cM kromosoma 19.

- Kokoši

Fob3b je homologen z odseki kokošjih kromosomov 1 in 2. Pri pregledu literature smo našli dve objavi, ki poročajo o QTL, ki so homologni M odseku pri miših. Ikeobi in sod. (2002) so križali 422 piščancev iz F₂ generacije (422 piščancev iz 30 križanih staršev). Homologen QTL z mišjim *Fob3b* so našli na kromosomu 1 na lokaciji 1333-151 cM.

Jennen in sod. (2004) so preiskovali in določali QTL na kromosomu 1 na lokaciji 33-54 cM za težo abdominalne maščobe pri kokoših. Uporabili so križance dveh različnih brojlerskih linij, ki izhajata iz pasme bela plimutka.

2.2 RAZVOJ PREUČEVANIH LINIJ F IN L

Prvotni liniji F in L, ki smo jih uporabljali v raziskavi, izvirata iz Univerze v Edinburghu na Škotskem. Osnovno populacijo so razvili iz križanja dveh inbridiranih linij JU in CBA, kasneje pa so F₁ generacijo potomcev križali z gensko heterozigotno linijo CFLP, ki je bila pripeljana iz laboratorija Carnworth v Veliki Britaniji. Sledila je tako imenovana generacija 0, kjer so živali parili naključno z namenom povečanja populacije. Odbrali so tri lastnosti (apetit, debelost, proteini) in tako so nastale tri linije: A, F in P. Za vsako lastnost so selekcionirali tri linije, pri dveh je potekala divergentna selekcija, tretja pa je služila za kontrolno linijo (osebki naključno parjeni med seboj brez selekcije). Za vsako lastnost so redili miši v treh ponovitvenih linijah (skupaj 27 linij). Naše miši izvirajo iz F linije, zato se bomo v prihodnje opredelili le nanjo (Sharp in sod., 1984).

Miši linije F so odbirali na odstotek gonadne maščobe v telesu. Znotraj linije so odbirali živali z najvišjim odstotkom maščevja in živali z najnižjim odstotkom maščevja. Rezultati po 11 generacijah divergentne selekcije so pokazali približno enako spremembo odstotka gonadne maščobe v obe smeri. Pri miših, ki so bile selekcionirane na nižji odstotek gonadne maščobe, se ta zmanjšala za 44 odstotkov, pri miših selekcioniranih na višji odstotek gonadne maščobe, pa se je povečala za 36 odstotkov v primerjavi s kontrolno linijo (Sharp in sod., 1984).

V 20 generaciji so vse tri linije, selekcionirane na nižji ali višji odstotek maščevja združili v eno linijo. Tako so dobili osnovni dve liniji F (fat) in L (lean). Po 53. generaciji je imela linija F 22 odstotkov telesnega maščevja, L linija 4 odstotke, kontrolna linija pa 10 odstotkov (Buenger in Hill, 1999).

Po 59. generaciji so s križanjem in uporabo genetskih označevalcev določili položaj kvantitativnih lokusov, ki značilno vplivajo na nalaganje maščevja pri teh linijah. Najprej

so jih preizkusili na starševskih linijah F in L in ugotovili, da so polimorfni med dvema linijama. Horvat in sod. (2000) so ugotovili, da se kvantitativni lokusi za nalaganje maščevja nahajajo na kromosomih 2, 12, 15 in X. Avtorji še dodajajo, da imata največji vpliv kvantitativna lokusa na kromosomih 12 in 15 (t.i. *Fob2* in *Fob3*).

Horvat in sod. (2000) so križali F in L linijo, z namenom razvoja kongenih linij na kvantitativnem lokusu *Fob3* na kromosomu 15. Med potomci so izbrali tiste, ki so bili homozigotni na segmentu *Fob3* in jih povratno križali s prejemno linijo F. Po petih povratnih križanjih so dobili tri kongene podlinije, ki so jih poimenovali A, B in D. Linijo A so izgubili zaradi neplodnosti, B je ostala nespremenjena, pri D liniji so izvedli še eno povratno križanje in jo poimenovali U6. Med potomci U6 so dobili precej rekombinantov iz katerih so razvili štiri kongene linije FHU, FHK, FHV, FHW. Linija FHU je zaradi dolgega kongenega odseka na kromosomu 15 služila za razvijanje novih kongenih linij s povratnimi križanji in iskanjem rekombinatov. Nastale so linije FHB, FHP, FHG, FHL in FHM. Linija FHM je bila vključena v raziskavo na zamaščenost v pričujoči diplomski nalogi. Nadaljuje se še razvoj kongenih linij, ki na Oddelku za zootehniko (Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani) poteka na kvantitativnih lokusih na kromosomih 12 in 15.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPIS LINIJ

3.1.1 Osnovni selekcijski liniji debelih (F) in vitkih (L) linij miši

Liniji miši F in L prvotno izvirata iz laboratorija na Škotskem (Edinburgh) in sta rezultat več kot dvajsetletne divergentne (dvosmerne) selekcije. Populacijo miši iz katere so se razvile vse linije, so razvili s križanjem dveh inbridiranih linij JU in CBA, ter genetsko heterogene linije CFLP (Sharp in sod., 1984). Osnovna populacija je pred selekcioniranjem imela povprečni delež maščevja deset odstotkov telesne mase. Divergentna selekcija je obsegala 53 generacij, vendar se je selekcijski kriterij spreminjal. V prvih 20. generacijah so bile moške živali pri starosti desetih tednov selekcionirane na delež gonadne maščobe v treh ponovitvenih linijah. V 20. generaciji so vse tri ponovitvene linije pri vitki in debeli liniji križali med seboj in tako sta nastali osnovni liniji FLI (F-fat) in FHI (L-lean), ki sta bili takrat še neinbridirani. Po dvajseti generaciji se je selekcijski kriterij spremenil, tako da so celoten delež maščobnega tkiva v telesu moških živali določali z metodo sušenja zamrznjenih evtanaziranih živali pri 14 tednih. Po 53. generaciji je imela linija F 22 odstotkov, linija L pa 4 odstotke maščobnega tkiva (Bunger in Hill, 1999; Horvat in sod., 2000).

F, L in nekatere kongene linije so bile v letu 2003 pripeljane z Univerze v Edinburghu na Univerzo v Ljubljani in sicer najprej v mišjo kolonijo na Veterinarski fakulteti, v aprilu 2004 pa v mišjo kolonijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete. V naši raziskavi smo uporabili na začetku poskusa kongeni liniji FLI (F) in 15FHM (M).

3.1.2 Opis kongene linije M

Kongena linija nastane z načrtnim križanjem dveh linij živali, ki se močno razlikujeta v opazovani lastnosti. S povratnimi križanji prenesemo določen segment genoma iz ene linije, t.i. donorske linije na gensko ozadje druge linije, t.i. prejemne linije (Lembertas in sod., 1997). Med potomci izberemo tiste, ki imajo preneseni odsek na želenem delu genoma. Sledi večkratno povratno križanje izbranih potomcev s prejemno linijo in

ponoven izbor potomcev, ki so heterozigotni za opazovani odsek. Generacij povratnih križanj naj bi izvedli 10 do 12. Nato parimo heterozigotne potomce med seboj (t.i. intercross, F₁), da dobimo homozigote za želeni donorski odsek genoma (Walkeland in sod., 1997).

Pri raziskavah kvantitativnega lokusa za nalaganje maščevja *Fob3* na kromosomu 15 so prvotno križali med seboj liniji F in L. Med potomci so izbrali tiste, ki so bili heterozigotni na segmentu *Fob3* na kromosomu 15. Dobili so tri kongene podlinije A, B in D, ki so bile kongene na različnih mestih na *Fob3* odseku (Stylianou in sod., 2004). Linijo A so kasneje zaradi slabe reprodukcije izgubili, linijo B (15FHB) so še naprej povratno križali in je ostala nespremenjena. Pri liniji D so izvedli še eno povratno križanje in jo poimenovali U6. Med potomci U6 so dobili dovolj rekombinantov, da so jih križali med seboj. V generaciji F₂ so dobili štiri rekombinante, ki so bili homozigotni. Iz teh so razvili štiri nove kongene linije 15FHU, 15FHK, 15FHV in 15FHW. Linija 15FHU je zaradi dolgega kongenega odseka na kromosomu 15 služila naprej za pridobivanje novih rekombinantov. Nastale so kongene linije 15FHG, 15FHL in 15FHM.

Kongena linija M je kongena na kromosomu 15 na zelo kratkem odseku, ki vsebuje kvantitativni lokus *Fob3*. Celotno gensko ozadje od debele linije F, sam odsek od markerja *D15Mit68 do D15Mit70* pa od vitke linije L. Kongeni del je od donorske linije L. Ostali del *Fob3* odseka na kromosomu 15 je od prejemne linije F. Kongeni del L na *Fob3* odseku kongene linije M naj bi vplival na nalaganje maščevja pri sesalcih.

3.2 OSKRBA MIŠI

V prostoru z mišjo kolonijo se vzdržujejo konstantne razmere – temperatura (21°C), vlaga (relativna vlaga okrog 55%), neprekinjeno prezračevanje – najmanj deset izmenjav zraka na uro (klimatska naprava Rosenberg), ter osvetlitev: 12 ur svetlobe (podnevi) in 12 ur teme (ponoči).

Za delo v mišji koloniji se držimo pravil, ki dopuščajo le minimalen prenos okužb iz okolice. Vrata v kolonijo so vedno zaklenjena, tako da ne prihaja do vstopa nepooblaščenega osebja. Pred vhodom se nahaja dezinfekcijska bariera, ki služi za razkuževanje obutve - preprečitev prenosa okužbe iz okolice. Nato vstopimo v garderobo, kjer se preoblečemo v laboratorijska oblačila, zgornji in spodnji del ter obujemo gumijasto obutev. Na poti do prostora, kjer so živali, stopimo še dvakrat v razkuževalno bariero. Pred zadnjimi vrati gumijasto obutev zamenjamo z laboratorijsko obutvijo, oblečemo laboratorijsko haljo, na glavo si nataknemo posebno mrežico, čez obraz dihalno masko, ter na roke gumijaste rokavice. Vse to je nujno potrebno zaradi zaščite živali (preprečitev okužbe kolonije) ter zaradi zaščite samega obiskovalca (preprečitev alergij, itd...) Ves material, ki ga nosimo v kolonijo (npr. nove vreče s krmo, nastilom...) je treba pred vnosom razkužiti z razkužilom (Virkon S). Umite kletke vračamo v kolonijo skozi glavni vhod, umazane pa zlagamo iz kolonije skozi stranska vrata in tako preprečimo, da se križata čisti in umazani poti kroženja kletk ter ostale opreme.

3.2.1 Čiščenje

Čiščenje kletk poteka enkrat tedensko. Potrebno je pomiti kletke, dodati svež nastilj in svežo vodo. Skrbi se tudi za čistočo prostora, naprav in osebja, ki ima stik z živalmi. Prostor je potrebno redno sesati. Vsako stvar, ki pade na tla je potrebno temeljiti razkužiti. Osebje mora pogosto razkuževati roke, saj prihaja v stik z različnimi živalmi in priborom. Le z upoštevanjem pravil o minimalnem prenosu okužb iz okolice lahko zagotovimo visoke higienске in mikrobiološke standarde, ki so pomembni za verodostojnost zbranih podatkov poizkusa.

3.2.2 Oprema za miši, voda in krma

- Kletke

Za rejo miši se uporabljata dve vrsti kletk: manjše (Techniplast) in večje (Ehret). Manjše kletke so dimenzije 33 cm dolžina, X 16 cm širina in X 12,5 cm višina. V glavni sobi kolonije so tri stojala s takimi kletkami (na vsakem stojalu je 64 kletk), ter 1 stojalo z velikimi kletkami (na vsakem stojalu je 24 kletk). Velike kletke so dimenzije 38 cm dolžina, X 22 cm širina in X 15 cm višina.

- Voda

Vodo za živali pripravimo tako, da v 15-litrsko posodo dodamo 13 ml 37% HCl (zmanjšamo možnost okužbe) in potem napolnimo stekleničke.

- Krma (Altromin)

Brikete Altromin 1324 dajemo vsem živalim po volji.

Tabela 1: Sestava surovih hranil (%) za krmno mešanico Altromin

*SS	*SB	*SM	pepel	Kalcij	Fosfor	Magnezij	Natrij	Kalij
19	4	6	7	0,9	0,7	0,3	0,2	1

*SS = uha snov, *SB = surove beljakovine, *SM = surove maščobe

3.2.3 Postopki in vodenje evidence v koloniji

Ob prihodu v kolonijo se preveri v koledarju, katera opravila nas čakajo tisti dan: pregled na brejost, paritve, odstavitve, tehtanje.

- Postopek in vodenje evidence v primeru novih paritev

Miši dosežejo spolno zrelost okrog šestega do sedmega tedna starosti. Običajno smo parili enega samca z eno samico, v izjemnih primerih pa dve samici z enim samcem (t.i.

haremska paritev). Ko smo izbrane živali dali v isto kletko, smo paritev vpisali v rodovniško knjigo na list s paritvami.

Najprej smo vpisali številko paritve, ki je sledila številki prejšnje paritve. Zabeležili smo vse podatke o samici (samicah), samcu ter datum paritve. Na samo kletko s paritvijo smo vstavili listek, kamor smo prav tako zabeležili iste podatke.

Treba je poudariti, da beseda paritev ne predstavlja enkratnega akta parjenja dveh živali. Pod besedo paritev smatramo par (samec in samica), oziroma skupino miši (samec in več samic skupaj) od trenutka naprej, ko smo ju oz. jih dali v isto kletko (takrat, ko smo paritev zabeležili na list s paritvami). Paritev se konča takrat, ko živali ločimo med seboj ali izločimo. Tako v primeru paritve samca z eno samico dobimo v nekem časovnem obdobju več gnezd (teoretično lahko dobimo gnezdo na vsakih 21 do 22 dni), za katera pravimo, da izhajajo iz iste paritve (Prevoršek, 2005).

V primeru haremskih paritev (en samec in več samic skupaj) lahko dobimo hkrati več gnezd od različnih samic. Za vsa ta gnezda pravimo, da izhajajo iz ene (haremske) paritve. Pri haremskih paritvah ponavadi tudi ne moremo določiti, katera od samic v kletki je mati novega gnezda, zato samic z mladiči v takem primeru ne ločujemo od skupine. Samico, za katero predvidevamo, da je breja, lahko ločimo od skupine in jo prestavimo v svojo kletko. Če po določenem času nima gnezda, jo vrnemo nazaj, v nasprotnem primeru pa ostane sama z mladiči do odstavitve, nato jo ponovno parimo (Prevoršek, 2005).

- Pregled na brejost

18 do 20 dni po paritvi smo samice v paritvi pregledali na brejost. V primeru ocenjene brejosti smo na kletko vstavili listek "BREJA!" in živali opazovali. V primeru haremskih paritev smo brejo samico ločili od ostalih živali in jo prestavili v svojo kletko. Brejim živalim smo v kletko dodali tudi blazinice za gnezdenje iz bombaža angl. *nestlets* (Plexx, Nizozemska), iz katerih samice naredijo gnezdo.

- Novo gnezdo

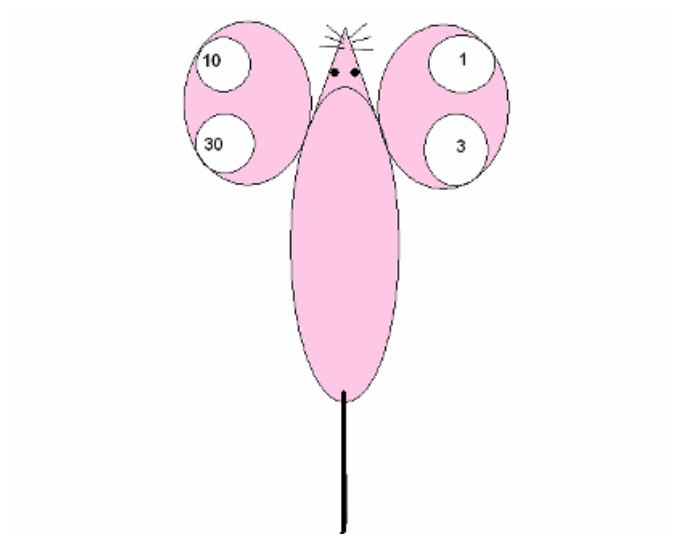
Gnezdo smo najprej zabeležili na listek na sami kletki (datum). Nato smo gnezdo zapisali še na list s paritvami v rodovniku – pogled na to stran nam v zelo kratkem času pove kakšno je stanje pri uspešnosti paritev. Pod list s paritvami smo vstavili nov bel list "NOVO GNEZDO" in nanj vpisali linijo, številko generacije, številko gnezda, datum paritve, podatke o starših, datum rojstva mladičev, število vseh rojenih in število mrtvorojenih mladičev.

- Odstavljanje

Mladiče smo odstavljali pri starosti treh tednov. V primeru, da so bili mladiči vidno oslabljeni (pogosto pri vitkejših samicah s prvim gnezdrom, samica nima dovolj mleka, veliko število mladičev v gnezdru) smo odstavitvev prestavili za nekaj dni. Ob odstavitvi smo mladiče najprej ločili po spolu in sicer na osnovi razdalje med anusom in spolnim organom. Pri samicah je ta razdalja krajša, pri samcih daljša. Pri odstavitvi smo mladiče označili s ščipanjem ušes, da smo jih kasneje lahko identificirali. Uporabljali smo sistem (Tabela 2 in Slika 1), ki nam je omogočal zadostno število ušesnih številok za eno gnezdo, je manj boleč in bolj praktičen, kot označevanje živali s ščipanjem prstov. Za ščipanje ušes smo uporabljali poseben ščipalec. Uporabljali smo še pinceto, označene 0,5 ml reagenčne posodice (Eppendorf, Nemčija) in 70 % etanol za spiranje ščipalca.

Tabela 2: Kombinacije številok pri označevanju živali s ščipanjem ušes

1 luknjica				2 luknjici, isto uho		2 luknjici, različno uho			
1	3	10	30	4	40	11	13	31	33
3 luknjice						4 luknjice		Drugo	
14		41	31	33	43	44		Brez	



Slika 1: Sistem označevanja miši s ščipanjem ušes

Odščipnjen del ušesnega tkiva (vzorec, ki smo ga potrebovali za genotipiziranje) smo s pinceto prestavili v 0,5 ml reagenčno posodico označeno s številko vzorca. Številko vsake označene živali smo zapisali na list, kjer je zabeleženo gnezdo in hkrati tudi na list "Evidenčni list ušesnih vzorcev", s katerega je potem točno razvidno, kateri vzorec pripada kateri živali. Vzorce smo nato shranili v zamrzovalniku na -20°C.

- Dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih

Veterinarska uprava Republike Slovenije je za vse postopke v tej diplomski nalogi, ki so del širše raziskave prof. dr. Simona Horvata izdala ustrezno dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih. Številka dovoljenja SI 323-02-221/2005/4.

3.3 POSTOPKI V LABORATORIJU

Pri postopkih v laboratoriju smo uporabljali 20 µl, 200 µl in 1000 µl pipete (Gilson), 50 µl in 10 µl večkanalno pipeto (Eppendorf), pipetne nastavke s filtrom (Greiner bio-one), pipetne nastavke brez filtra (Brand), reagenčne posodice (Eppendorf), centrifugo (Eppendorf), vodno kopel (Kambič), PCR aparat PTC-100 (MJ Research) in elektroforezo.

3.3.1 Priprava DNA lizatov

Priprava DNA-lizatov je v našem poskusu nadomestila izolacijo čiste DNA, ker je postopek izolacije preveč dolgotrajen za obdelavo tako velikega števila vzorcev. Po končani pripravi DNA-lizatov smo v supernatantu dobili tkivno-celični lizat, ki je še omogočal, da je verižna reakcija s polimerazo učinkovito delovala.

Vzorci smo najprej centrifugirali, da se je vzorec ušesa usedel na dno reagenčne posode. Nato smo dodali pufer za lizo (angl.: *lysis buffer*) in encim proteinazo K. Pufer za lizo smo pripravili iz sestavin v Tabeli 3.

Tabela 3: Propra pufera za lizo

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

Odščipnjeno ušesno tkivo smo lizirali po postopku Lairda in sodelavcev (1991), ki smo ga malce spremenili.

- V pufer za lizo smo dodali encim proteinazo K (koncentracija 10mg/ml) in sicer 20 µL proteinaze / na 1 mL pufera.
- 60 µL pufera s proteinazo K smo dodali v vsak vzorec.
- Vzorce smo 4-5 ur inkubirali v vodni kopeli pri 55°C in jih vsake pol ure nežno pretresli.

- Reagenčne posodice z vzorci smo centrifugirali 2 minuti pri 14000g.
- Sledila je 10 minutna inkubacija pri 95°C, s tem smo deaktivirali proteinazo K.
- Vzorce smo zopet centrifugirali pri 14000g, tokrat 10 minut, tako da so nerazgrajeni ostanki vzorca tvorili usedlino na dnu reagenčne posodice.
- Lizate smo nato razredčili v razmerju 1:25 z bi-deionizirano vodo in sicer 6μL lizata v 144μL vode.
- Ploščico z razredčenimi vzorci smo hranili v hladilniku pri 4°C.
- Nerazredčene lizate smo shranili nazaj v zamrzovalnik na -20°C.

3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl.: *polymerase chain reaction*)

Verižna reakcija s polimerazo je metoda za hitro pomnoževanje DNA *in vitro*.

En cikel verižne reakcije s polimerazo je sestavljen iz treh stopenj:

1. Denaturacija: z visoko temperaturo (92°-95°C) denaturiramo matrično DNA (komplementarni verigi se ločita).
2. Vezava začetnih oligonukleotidov: temperaturo znižamo pod temperaturo tališča vezave obeh začetnih nukleotidov.
3. Sinteza komplementarne verige: temperaturo dvignemo na optimalno območje za delovanje encima DNA polimeraze (68°-72°C).

V PCR mešanici (Tabela 4) imamo dva začetna oligonukleotida (angl. *primer*), encim DNA polimerazo, vse deoksiribonukleozid-trifosfate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), MgCl₂ in pufer. Začetna oligonukleotida (dolga okrog 20 bp) sta komplementarna vsak enemu koncu fragmenta, ki ga želimo pomnožiti, encim DNA polimeraza pa sintetizira del verige DNA, ki je med obema oligonukleotidoma. MgCl₂ in pufer, ki zagotavljata pogoje za optimalno delovanje encima, deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP) pa predstavljajo gradnike za novosintetizirane fragmente DNA.

Verižna reakcija s polimerazo je potekala v končnem volumnu 10 μ L z naslednjimi končnimi koncentracijami reagentov:

Tabela 4: Končne koncentracije reagentov v PCR reakciji

Končne koncentracije reagentov	Kol. reagenta / vzorec (μ l)
Bi-deionizirana voda (Sigma)	1,42
1 x Taq pufer (Fermentas)	1
200 μ M dNTP (mešanica dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1
2,5 mM MgCl ₂ (Fermentas)	1
0,25 μ M 5' začetni oligonukleotid (Biotech)	0,25
0,25 μ M 3' začetni oligonukleotid (Biotech)	0,25
0,4 U Ampli Taq polimeraza (Fermentas)	0,08
PCR mešanica skupaj:	5,00 μ l
DNA (1:25 lizat)	5,00 μ l

- Priprava PCR mešanice:
 - Na sobni temperaturi smo odtajali vse sestavine razen encima DNA polimeraze.
 - Nežno smo pretresli reagenčne posodice s sestavinami, jih centrifugirali in položili v posodo z ledom.
 - V označeno prazno reagenčno posodico smo odpipetirali sestavine PCR mešanice (s pipetnimi nastavki, ki imajo filter, da smo preprečili kontaminacijo).
 - Nazadnje smo odpipetirali DNA-polimerazo. Iz zamrzovalnika smo jo vzeli tik pred uporabo in jo takoj vrnili na -20°C.
 - Reagenčno posodico s PCR mešanico smo nežno pretresli in centrifugirali.
 - V vdolbinice na ploščici smo najprej nanesli PCR mešanico.
 - Mikrotitrsko ploščico smo centrifugirali v centrifugi Centric 322A (Tehtnica), ki ima rotorske nastavke za mikrotitrsko ploščice.
 - Na ploščico smo nanesli še vzorce (lizate), obvezno vsakega s svojim pipetnim nastavkom in ponovno centrifugirali.
 - Z 200 μ l pipeto smo odpipetirali eno kapljico mineralnega olja v vsako vdolbinico na ploščici.

- Mikrotitrsko ploščico smo pokrili s prozorno folijo in jo na hladilni plošči odnesli v PCR aparat.
- PCR reakcija je potekala v mikroprocesorsko vodenem termostatu PTC-100 (MJ Research).

Tabela 5: Potek programa za reakcijo PCR

1. korak:	95°C, 3 minute
2. korak	95°C, 1 minuta
3. korak	60°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	50°C, 30 sekund
8. korak	72°C, 30 sekund
9. korak	30- krat nazaj na 6. korak
10. korak	4°C

Če po končani reakciji PCR produktov nismo takoj preverili na agaroznem gelu, smo mikrotitrsko ploščico s PCR produkti shranili v hladilniku pri 4°C. Pred nanosom vzorcev na agarozni gel smo na mikrotitrsko ploščico nanegli nanašalni pufer (angl.: *loading buffer*), po 5µl na vzorec.

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

Mikrosatelitski označevalci so ponavljajoča se zaporedja DNA, ki ponavadi temeljijo na manj kot 100 ponovitvah (Schloetterer, 2004), od enega do šest baznih parov dolgih osnovnih enot in so naključno ter razmeroma pogosto razporejeni po genomih prokariontov in evkariontov. Za mikrosatelitske molekulske označevalce je značilna visoka stopnja polimorfnosti, prisotni pa so v kodirajočih in predvsem v nekodirajočih regijah genoma (Zane in sod., 2002).

3.3.4 Agarozna gelska elektroforeza

Gelska elektroforeza je standardna metoda za ločevanje, prepoznavanje in čiščenje fragmentov DNA. Uporabljata se dva različna tipa gelov - agarozni in poliakrilamidni, glede na velikost fragmentov, ki jih ločujemo. S poliakrilamidno gelsko elektroforezo ločujemo manjše fragmente DNA (od 5 do 500 baznih parov), z agarozno gelsko elektroforezo pa lahko tudi večje molekule (od 100 do 50.000 bp).

Na hitrost potovanja DNA skozi gel vplivajo:

- Velikost DNA fragmentov: krajši fragmenti DNA potujejo skozi gel hitreje, večji počasneje.
- Oblika DNA: najhitreje potuje skozi gel super zvrta krožna molekula DNA, nekoliko počasneje linearna in najpočasneje molekula v sproščeni obliki (pri plazmidih).
- Gostota gela: v gelu z visoko koncentracijo agaroze molekule DNA potujejo počasneje, zato lahko v gelu določene gostote ločujemo le molekule določene velikosti (večje molekule ločujemo v gelih manjše gostote, manjše molekule v gelih večje gostote).
- Jakost električnega polja: pri višji jakosti fragmenti DNA potujejo hitreje in je njihovo ločevanje slabše. Uporabljamo napetost največ 5 V/cm razdalje med elektrodama v elektroforezni kadički.
- Sestava in ionska jakost elektroforetskega pufru: če v pufru ni ionov, skozi gel ne teče tok in molekule se ne premikajo. Preveč ionov v pufru lahko povzroči veliko električno prevodnost gela, pri čemer se sprošča veliko toplote, ki lahko gel stopi.
- Barvilo etidijev bromid s svojim vgrajevanjem v DNA nekoliko zmanjša mobilnost molekul.

Uporabljali smo dva elektroforetska aparata (Flowgen, Ruddington, Velika Britanija) različnih dimenzij. Pri večjem aparatu, z razdaljo med elektrodami 44 cm, smo uporabljali gele dimenzij 25 X 32 cm. Pri manjšem elektroforetskem aparatu z razdaljo med elektrodama 24 cm smo uporabljali gel dimenzije 12 X 16,5 cm.

Za elektroforetski pufer smo uporabljali 0,5 X TBE, ki smo ga pripravili iz sestavin, naštetih v Tabeli 6.

Tabela 6: Priprava 2 litra 0,5 X TBE pufera

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

Pri našem delu smo uporabljali štiri odstotni agarozni gel. Agarozo smo inkubirali preko noči v 0,75 pufru na 4°C (hidracija). Pripravili smo ga s segrevanjem ustrezne količine agaroze v 0,5 X TBE pufru do vrelišča. Uporabljali smo SeaKem LE agarozo (Cambrex, Rutherford, ZDA) in MetaPhor agarozo (Cambrex, Rutherford, ZDA). Za kratek čas smo mešanico ohlajali na mešalcu, nato smo jo previdno vlili v elektroforetski kalup, vstavili glavničke in počakali, da se je strdila.

Ko se je gel strdil, smo nežno odstranili glavničke in ga položili v elektroforezno kadičko in po potrebi dolili elektroforezni pufer, ki mora pokrivati gel. Nato smo z večkanalno pipeto vzorce nanесли na gel in vklopili električni tok. Pri elektroforezi z razdaljo med elektrodama 44 cm smo uporabljali napetost 180 V za SeaKem LE agarozo in 160 V za MetaPhor agarozo, pri manjši elektroforezi (z razdaljo med elektrodama 24 cm) pa 90 V. Gele smo vozili različno dolgo, odvisno od hitrosti ločevanja alelov posameznega mikrosetalitnega lokusa (od 2 do 5 ur). Gele smo fotografirali v transiluminatorju Gel Doc 1000 in rezultate shranili kot *.tif datoteke.

3.4 POSTOPEK ZBIRANJA TKIV

Pri starosti 14 tednov smo živali žrtvovali, izrezali maščobne depoje in zabeležili teže. Pri sekcijah smo uporabljali: dve pinceti, dvoje škarij, desko za seciranje, vrečke, alkohol, bucike, CO₂ komoro za evtanazijo živali, papirnate brisače za čiščenje inštrumentov in tehtnico (Eppendorf, Nemčija).

Evtanazijo živali smo opravili s CO₂ v ustrezni komori po predpisanem strokovnem postopku. S secirnimi škarpami smo prerezali kožo pod prsnico in zastrigli ob robu vretenc v obe strani. Nato smo zarezali po sredini trebuha do spolnih organov in po sredini zadnjih okončin. Z bucikami smo pritrdili oba kraka kože.

Miši imajo osem glavnih maščobnih depojev. Štirje maščobni depoji se nahajajo v abdominalni votlini. Parna gonadna maščoba je največji maščobni depo, ki predstavlja okoli 30 % vse maščobe v telesu. Obdaja maternico (uterus) in jajčnik (ovarij) pri ženskih živalih, pri moških živalih obmodek (epididimis) in moda (testes). Retroperitonealni depo se nahaja ob notranji steni trebušne votline in je del abdominalne maščobe, ki obdaja ledvico. Če je zelo povečana se razširi v medenično votlino. Mezenterialna maščoba tvori mrežo, ki podpira oporek črevesja in oventralno maščobo. Oventralna maščoba se nahaja med želodcem in vranico. Med mezenterialno in oventralno maščobo se nahaja tkivo trebušne slinavke, ki ni maščobno tkivo in ga je potrebno ločiti od maščobnega tkiva. Parna podkožna depoja maščobe, ki jih lahko relativno enostavno odstranimo, ležita ob stegenskih mišicah (femoralna). Nahajata se pod kožo v zgornjem delu zadnjih okončin v dimljah (okrog stegenice) in obdajata limfne žleze. Subskapularni depo je mešanica rjavega in belega podkožnega maščobnega tkiva. Najdemo ga pod kožo med lopatico in hrbtenico. Plast rjave maščobe je na tem mestu velikokrat prekrita z belim maščobnim tkivom, kar je težko ločiti. Manjši maščobni depoji so tudi v srčnem ovoju in parni depo med glavnimi mišicami za kolenskim sklepom (Adipose tissue, 2008). V našem poizkusu smo odstranili mezenterialni, gonadni, abdominalni ter femoralni maščobni depo. Za potrebe nadaljnjih raziskav smo shranili gonadno maščobo in konico repa. Rep smo

odrezali na tretjini ter ga vložili v epico in zamrznili v posodi s tekočim dušikom. Gonadno maščobo smo po tehtanju obdelali na enak način in shranili v zamrzovalniku pri -80°C.

3.4.1 Odstranitev mezenterialne maščobe

S pinceto smo odmaknili jetra, prijeli želodec, prerezali nad želodcem (požiralnik) in pri danki. Prerezali smo tudi vezivno tkivo, s katerim so prebavila pritrjena v trebušno votlino. Črevesje smo odstranili, položili na secirno podlago in razgrnili. S pinceto smo ločili vso maščobo in jo stehali. Pri ločevanju maščobe in trebušne slinavke smo bili precej pozorni, saj sta zelo podobnega videza.

3.4.2 Odstranitev gonadne maščobe

Na levi strani miši smo zarezali ob modih (testes) in obmodku (epididimis). Tako smo odstranili celoten depo maščobe pri moških živalih. Pri ženskih živalih smo zarezali ob jajčniku (ovarij) in maternici (uterus). Maščobo smo stehali, zapisali težo, vložili v epico in ohladili v tekočem dušiku.

3.4.3 Odstranitev abdominalne maščobe

S pinceto primemo levo ledvico in odstranimo vso maščobo skupaj z ledvico. Nato obrežemo maščobo okrog ledvice. V tej poiščemo nadledvično žlezo in jo izrežemo. Maščobo stehamo in v evidenčni list zapišemo količino.

3.4.4 Odstranitev femoralne maščobe

Femoralni maščobni depo se nahaja pod kožo okrog stegenice. Odstranimo ga potem, ko smo že odstranili ledvico z abdominalno maščobo, saj se nahaja pod potrebušnino (pri domačih živalih flam) in stegnom. S pinceto primemo potrebušnino in jo potegnemo do hrbtenice ter izrežemo maščobni depo, ki se nahaja pod njo. Del femoralne maščobe se nahaja tudi na zadnji strani noge. Ta depo izrežemo tako, da odstranimo kožo z noge in ločimo z nje maščobo, stehamo in označimo.

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Frekvence alelov in genotipov smo statistično obdelali z χ^2 testom v programu Microsoft Excel (Vstavi funkcijo/Statistika/CHITEST).

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - P_i)^2}{P_i}$$

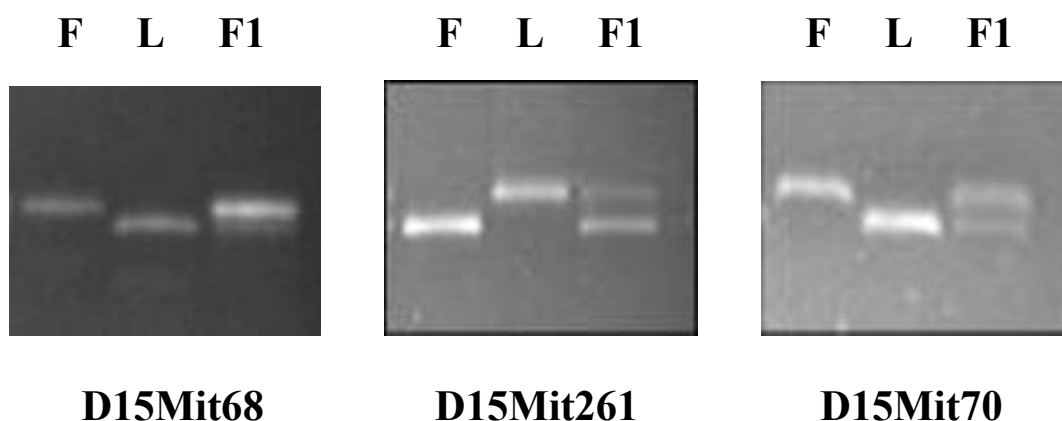
χ^2 je vrednost CHI z n-1 stopinj prostosti, O je opazovana frekvenca v i-tem razredu, P je pričakovana frekvenca v i-tem razredu.

Fenotipske podatke F₂ generacije smo primerjali s *t*-testom prav tako v programu Microsoft Excel (Vstavi funkcijo/statistika/TTEST). Če smo za določanje primerjave skupin izračunali verjetnosti, ki so bile manjše od 0,05, smo razlike med skupinami obravnavali kot statistično značilne.

4 REZULTATI

4.1 GENOTIPIZIRANJE

Vzorci tkiv smo pripravili in genotipizirali po postopkih opisanih v poglavju 3.3. Gele smo slikali na transiluminatorju, kateri omogoča prenos slike v računalniški program "Windows picture and fax viewer". Na agaroznem gelu so vzorci razvrščeni po ključu, ki je zabeležen v laboratorijskem dnevniku. Iz slik smo razbrali genotipe in jih vnesli v datoteko Microsoft Excel. Na koncu glavnička smo vedno dodali kontrole, da smo lahko razbrali genotipe za posamezen označevalec. Kontrole smo poimenovali F, L in F1. Prva kontrola je bila vedno homozigot FF (oba alela debele linije), druga homozigot LL (oba alela vitke linije) in zadnja heterozigot FL (po en alel debele in vitke linije). Kontrole so bile za razliko od vzorcev pripravljene iz očiščene DNA, F1 kontrola pa je mešanica F in L kontrole v razmerju 1:1. Na Sliki 2 so prikazane kontrole genskih označevalcev, ki določajo razlike na *Fob3b* odseku kongene linije M. To so trije genetski označevalci, pri katerih se homozigotni genotipi LL in FF ter heterozigotni genotip FL jasno ločijo na agaroznem gelu in določajo razlike na preučevanem odseku.

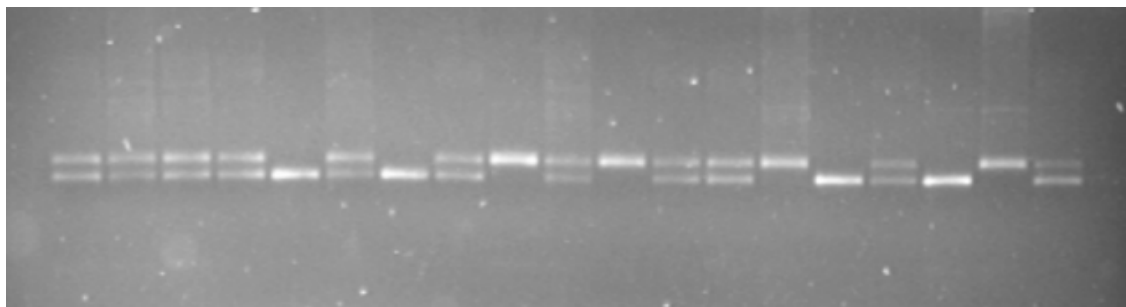


Slika 2: Genetski označevalci, ki smo jih uporabili za genotipiziranje. F-linija FLI (debela linija), L-linija FHI (suha linija), F1-homozigot. Kontrole genskih označevalcev, kateri določajo razlike na *Fob3b* odseku kongene linije M.

Slika 3 prikazuje primer agarozne gelske elektroforeze na katerem so nanešeni vzorci DNA miši iz F₂ generacije in tri standardne kontrole (linije F, L, F1). Vsak vzorec predstavlja drugo žival pod zaporedno številko. Številko imamo zapisano, da vemo kateri vzorec na glavničku pripada določeni miši. S slike je razvidno, da so prve štiri miši genotipa FL,

sledi FF, FL, FF, FL, LL, itd za marker *D15Mit261* na preučevanem *Fob3b* odseku kromosomu 15.

F L F1



Slika 3: Agarozni gel na katerem so nanesti vzorci, ki so genotipizirani za marker *D15Mit261*. Na koncu so dodane standardne kontrole. S slike je razvidno, katere živali so na preučevanem odseku kromosomu 15 heterozigoti (F1) in katere homozigoti (F, L).

Tabela 8 prikazuje začetke oligonukleotidnih polimorfnih markerjev dolge okrog 20 baznih parov, katere smo uporabili v našem poizkusu. To so tisti markerji, ki so delovali pri nizki kakovosti DNA in ni bilo potrebno izvesti fenolne ekstrakcije. Vsak marker vsebuje levi in desni oligonukleotid (angl.: *primer*), ki je komplementaren levemu in desnemu koncu fragmenta, ki želimo pomnožiti.

Tabela 7: Zaporedje levega in desnega oligonukleotida za polimorfne genske označevalce, katere smo uporabili v poizkusu (Ensembl genome browser, 2007)

Ime markerja	Zaporedje	
	Levi primer	Desni primer
D15Mit105	ACTGGCTTATCTAGCATTCTCCC	CATATTGTCTTATCAGCCATGTCC
D15Mit68	TTCCATGTGAGTTCCAAGCA	GAAGTGCATTCAGAATATTTGG
D15Mit1	AACATGGTCCCACAGGTGTC	AGTAGAAGCTGCAGCCCTGG
D15Mit261	AAGTATAGGCTGCACAGAGAAA	AAGTATAGGCTGCACAGAGAAACC
D15Mit70	CATCAAGGGGATAGAGAGTTGG	TGGGAATTGAGCCTGAGTCT
D15Mit107	CAACACTTATACTTGTGTCAGG	TCATGGTTGGAACAGCAGAC

Za genotipiziranje smo uporabljali mikrosetalitske genske označevalce (angl.: *genetic markers*). V Tabeli 7 so prikazani vsi polimorfni genski označevalci na kromosomu 15. S pripravo DNA lizatov nam vsi polimorfni genski označevalci niso delovali. Če bi želeli, da

bi delovali vsi markerji, bi morali za vsak vzorec izolirati čisto DNA. Gre za preveč dolgotrajen postopek, za tako število vzorcev. S pripravo DNA lizatov enostavneje pridemo do zanesljivih rezultatov. S temno barvo senčene markerje smo uporabili v poizkusu za pripravo DNA lizatov.

Tabela 8: Genetski in fizični položaj polimorfnihih označevalcev na kromosomu 15 (Ensembl genome browser, 2007)

Ime markerja	Genetski položaj (cM)*	Fizični (bp)**
D15Mit105	47.9	72327866-72327987
D15Mit93	43.7	72366926-72367069
D15Mit169	41.9	72644199-72644329
D15Mit197	41.9	72944849-72944959
D15Mit237	42.8	73707617-73707735
D15Mit235	38.7	73813986-73814108
D15Mit1001	syntenic	74008357-74008463
D15Mit279	syntenic	74046272-74046378
D15Mit29	42.8	74072411-74072559
D15Mit28	43.7	74742609-74742772
D15Mit117	43.4	75301541-75301686
D15Mit188a	44.1	76085109-76085288
D15Mit188b	syntenic	76085152-76085288
D15Mit68	44.1	76737437-76737548
D15Mit236	44.1	76871721-76871837
D15Mit146	45.1	77085042-77085166
D15Mit1	46.3	78544158-78544341
D15Mit119	46.5	78841447-78841571
D15Mit260	46.6	78936500-78964153 (+)
D15Mit260	46.6	78962797-78963023
D15Mit259	46.7	79390952-79391032
D15Mit71	46.7	79417691-79417816
D15Mit261	46.7	80063522-80063646
D15Mit2	46.9	80106957-80107049
D15Mit214	47.9	80293363-80293487
D15Mit31	48.5	80641774-80641961
D15Mit32	48.2	80641774-80641902
D15Mit69	48.2	80723539-80723672
D15Mit70	47.7	81029340-81029490
D15Mit118	48.5	81754880-81755000
D15Mit189	48.5	82468941-82469064
D15Mit134	46.0	82907626-82907771
D15Mit198	49.0	83296501-83296629
D15Mit33	48.6	83583505-83583652
D15Mit215	50.2	83718726-83718899
D15Mit107	49.0	84214263-84214412

* cM-genetsko razdaljo od centromere v centi morganih (cM)

**bp-fizična razdalja v bazičnih parih (bp)

4.2 FREKVENCA GENOTIPOV IN χ^2 TEST

Razmerje med frekvencami genotipov smo preverili z χ^2 statističnim testom v F₂ generaciji križanja kongenih linij miši. Razmerja na preučevanem odseku kromosomu 15 naj bi po 1. Mendlovemu zakonu dedovanja ustrezala razmerju, FF:FL:LL = 1:2:1. Zaradi genetske vezave so bile frekvence genotipov za vse tri markerje *D15Mit68*, *D15Mit261*, *D15Mit70* enake.

- Vse živali zajete v poizkusu

V F₂ generaciji križanja pričakujemo frekvenco genotipov med homozigoti FF, heterozigoti FL in homozigoti LL 1:2:1. Iz Tabele 9 vidimo, da živali statistično ne odstopajo od tega razmerja. To velja za χ^2 test obeh spolov skupaj ($\chi^2 = 0,464199046$) kot za frekvence genotipov znotraj samic ($\chi^2 = 0,309154835$) in samcev ($\chi^2 = 0,067205513$) vseh živali zajetih v poizkusu.

Tabela 9: Frekvenca genotipov in χ^2 test za vse živali v poizkusu

Frekvence	SAMICE + SAMCI			SAMICE			SAMCI		
	GENOTIP								
	FF	FL	LL	FF	FL	LL	FF	FL	LL
of	21	48	17	7	26	13	14	22	4
pf	21,5	43	21,5	11,5	23	11,5	10	20	10
χ^2	0,464199046			0,309154835			0,067205513		

of-opazovane frekvence, pf-pričakovane frekvence

FF,LL-homozigota za vse tri markerje (D15Mit68, D15Mit261, D15Mit70)

FL-heterozigot za vse tri markerje (D15Mit68, D15Mit261, D15Mit70)

- Izločene živali

V času poskusa je prišlo v koloniji do virusnega obolenja, zmanjšala se je reprodukcija in mladiči so slabše priraščali, tako da je bilo potrebno živali izločiti iz poskusa, ker niso predstavljale reprezentativnega vzorca. Iz Tabele 10 je razvidno, da izločene živali ne odstopajo od pričakovanega statističnega razmerja frekvenc genotipov, kar velja za χ^2 test obeh spolov ($\chi^2 = 0,171895325$) kot za frekvence genotipov znotraj samic ($\chi^2 = 0,191312674$) in samcev ($\chi^2 = 0,182683524$).

Tabela 10: Frekvenca genotipov in χ^2 test za izločene živali

Frekvence	SAMICE + SAMCI			SAMICE			SAMCI		
	GENOTIP								
	FF	FL	LL	FF	FL	LL	FF	FL	LL
of	8	7	8	3	4	6	5	3	2
pf	5,75	11,5	5,75	3,25	6,5	3,25	2,5	5	2,5
χ^2	0,171895325			0,191312674			0,182683524		

of-opazovane frekvence, pf-pričakovane frekvence

FF,LL-homozigota za vse tri markerje (D15Mit68, D15Mit261, D15Mit70)

FL-heterozigot za vse tri markerje (D15Mit68, D15Mit261, D15Mit70)

V Tabelah 9 in 10 χ^2 vrednost nikjer ni nižja od 0,05, kar pomeni, da so opazovane frekvence genotipov v F₂ križanju v razmerju kot smo pričakovali. χ^2 vrednosti so visoke, zato so genotipi v pričakovanem razmerju FF:FL:LL = 1:2:1.

- Živali za katere imamo fenotipske podatke

V Tabeli 11 vidimo, da razmerje genotipov obeh spolov skupaj statistično značilno odstopa ($\chi^2 = 0,044199243$) od pričakovanega razmerja genotipov pri živalih s fenotipskimi podatki. Znotraj frekvence genotipov samic ($\chi^2 = 0,121716513$) in samcev ($\chi^2 = 0,067205513$) razmerje ni statistično značilno odstopalo. Statistično značilna razlika v χ^2 testu nam kaže, da živali odstopajo od pričakovanega statističnega razmerja FF:FL:LL = 1:2:1.

Tabela 11: Frekvenca genotipov in χ^2 test za živali s fenotipskimi podatki

Frekvence	SAMICE + SAMCI			SAMICE			SAMCI		
	GENOTIP								
	FF	FL	LL	FF	FL	LL	FF	FL	LL
of	13	41	9	4	22	7	9	19	2
pf	15,75	31,5	15,75	8,25	16,5	8,25	7,5	15	7,5
χ^2	0,044199243			0,121716513			0,067205513		

of-opazovane frekvence, pf-pričakovane frekvence

FF,LL-homozigota za vse tri markerje (D15Mit68, D15Mit261, D15Mit70)

FL-heterozigot za vse tri markerje (D15Mit68, D15Mit261, D15Mit70)

4.3 ANALIZA FENOTIPSKIH IN GENOTIPSKIH PODATKOV V F₂ GENERACIJI

Tekom poizkusa smo zbirali genotipske podatke (glej poglavje 3.3) in fenotipske vrednosti. Živali smo tehtali ob odstavitvi (pri treh tednih), pri šestih, desetih in štirinajstih tednih (na dan sekcij). Drugi del fenotipskih podatkov smo dobili ob postopku zbiranja tkiv (poglavje 3.4). Podatke je bilo potrebno združiti in predpostaviti povezavo med njimi. Uporabili smo statistične metode za obrazložitev povezav med genotipskimi in fenotipskimi vrednostmi.

4.3.1 Osnovna statistika fenotipskih podatkov

Genotipske podatke smo najprej razdelili po spolu. Dobili smo dve skupini podatkov, ločeni za samice in samce. Vsako skupino posebej smo razdelili po genotipih v homozigote FF, heterozigote FL in homozigote LL. Za vsako žival smo imeli fenotipske podatke za opisane lastnosti, v Tabelah 12 in 13 pa predstavljamo povprečne vrednosti in standardne deviacije. V programu Microsoft Excel smo izračunali povprečje in odstopanje od povprečne vrednosti - standardni odklon teh vrednosti.

Tabela 12: Povprečne vrednosti in standardne deviacije (STD)* za merjene vrednosti v F₂ generaciji pri samicah

		SAMICE			
	Lastnost	Genotip	Povprečje	STD	N**
Telesna masa pri starosti (tedni)	3.	FF	10,83	3,07	4
		FL	9,96	2,28	22
		LL	9,67	1,55	7
	6.	FF	16,68	4,08	4
		FL	18,26	3,01	22
		LL	17,23	4,13	7
	10.	FF	23,50	2,31	4
		FL	23,20	2,20	22
		LL	22,47	3,14	7
	14.	FF	27,15	0,61	4
		FL	26,18	2,45	22
		LL	25,19	2,62	7
Maščobni depo (grami)	Mezenterialna	FF	0,41	0,07	4
		FL	0,33	0,06	22
		LL	0,29	0,08	7
	Gonadna	FF	0,50	0,05	4
		FL	0,42	0,10	22
		LL	0,39	0,14	7
	Abdominalna	FF	0,30	0,03	4
		FL	0,27	0,05	22
		LL	0,24	0,08	7
	Femoralna	FF	0,47	0,08	4
		FL	0,42	0,07	22
		LL	0,39	0,08	7

*STD-standardna deviacija

**N-velikost vzorca

Tabela 13: Povprečne vrednosti in standardne deviacije (STD)* za merjene lastnosti v F₂ generaciji za samce

		SAMCI			
	Lastnost	Genotip	Povprečje	STD	N**
Telesna masa pri starosti (tedni)	3.	FF	9,09	1,32	9
		FL	10,71	2,35	19
		LL	9,65	2,05	2
	6.	FF	19,91	3,73	9
		FL	21,55	3,12	19
		LL	21,35	2,05	2
	10.	FF	29,89	3,92	9
		FL	29,74	2,64	19
		LL	29,95	0,21	2
	14.	FF	34,53	3,67	9
		FL	33,55	3,11	19
		LL	32,15	1,91	2
Maščobni depo (grami)	Mezenterialna	FF	0,65	0,11	9
		FL	0,62	0,15	19
		LL	0,50	0,23	2
	Gonadna	FF	0,67	0,18	9
		FL	0,68	0,17	19
		LL	0,59	0,24	2
	Abdominalna	FF	0,29	0,07	9
		FL	0,28	0,06	19
		LL	0,26	0,12	2
	Femoralna	FF	0,61	0,12	9
		FL	0,57	0,09	19
		LL	0,51	0,14	2

*STD-standardna deviacija

**N-velikost vzorca

4.3.2 Statistični test (*t*-test) - razlike med genotipi

Vse lastnosti so bile v prvi fazi obdelane z modelom GLM, ki je upošteval lastnost, genotip in spol. Obdelali smo model, ki upošteva adetivni način dedovanja in model, ki predstavlja popolno domominanco. Rezultati analiz pri obeh alelih (adetivni, dominantni) niso bili po rezultatih modelov povsod statistično značilni, razen pri samicah pri mezenterialni maščobi. Adetivni model za mezenteialno maščobo pri samicah, je kazal večjo statistično značilnost ($P = 0.01273$), kot model, ki upošteva dominantni način dedovanja ($P = 0.03774$). S *t*-testom smo nato preverili statistično značilne razlike med genotipskimi skupinami.

t-test nam poda verjetnost, da neka dva vzorca izvirata iz istih temeljnih populacij, ki imata enako srednjo vrednost. Če so vrednosti manjše od 0,05, govorimo o statistično značilni razliki in ovržemo hipotezo, da vzorca izvirata iz istih populacij. V našem primeru bi to pomenilo, da genotip statistično značilno vpliva na neko lastnost, oziroma da so med tremi genotipi statistično značilne razlike. V tabeli 14 pri mezenterijskem maščobnem depozu samic opazimo statistično značilno razliko ($P > 0,04$) med homozigotnimi FF in heterozigotnimi mišmi, ter med homozigotnimi FF in homozigotnimi LL mišmi. S tem lahko ovržemo hipotezo, da miške izvirajo iz istih temeljnih populacij.

Tabela 14: Primerjave med genotipi za različne lastnosti pri samicah

SAMICE			FF	FL	LL
Telesna masa pri starosti (tedni)	3.	FF	1,00*	0,51	0,42
		FL	0,51	1,00	0,76
		LL	0,42	0,76	1,00
	6.	FF	1,00	0,36	0,83
		FL	0,36	1,00	0,48
		LL	0,83	0,48	1,00
	10.	FF	1,00	0,80	0,58
		FL	0,80	1,00	0,49
		LL	0,58	0,49	1,00
	14.	FF	1,00	0,45	0,19
		FL	0,45	1,00	0,37
		LL	0,19	0,37	1,00
Maščobni depo (grami)	Mezenterialni	FF	1,00	0,04	0,04
		FL	0,04	1,00	0,19
		LL	0,04	0,19	1,00
	Gonadni	FF	1,00	0,16	0,19
		FL	0,16	1,00	0,49
		LL	0,19	0,49	1,00
	Abdominalni	FF	1,00	0,27	0,17
		FL	0,27	1,00	0,22
		LL	0,17	0,22	1,00
	Femoralni	FF	1,00	0,21	0,17
		FL	0,21	1,00	0,40
		LL	0,17	0,40	1,00
ADI**	FF	1,00	0,14	0,17	
	FL	0,14	1,00	0,37	
	LL	0,17	0,37	1,00	

*verjetnost za Studentov *t*-test

**ADI-adipozni indeks

V tabeli 15, ki prikazuje razlike med genotipi, pri samcih nobena vrednost ni manjša od 0,05. To pomeni, da genotip pri samicah ne vpliva statistično značilno. Omenimo lahko nekatere vrednosti, ki so »blizu« statistične razlike, na primer pri starosti tri tedne 0,07, za razliko med heterozigotom FL in homozigotom FF.

Tabela 15: Primerjave med genotipi za različne lastnosti pri samcih

SAMCI			FF	FL	LL
Telesna masa pri starosti (tedni)	3.	FF	1,00*	0,07	0,61
		FL	0,07	1,00	0,55
		LL	0,61	0,55	1,00
	6.	FF	1,00	0,23	0,62
		FL	0,23	1,00	0,93
		LL	0,62	0,93	1,00
	10.	FF	1,00	0,91	0,98
		FL	0,91	1,00	0,91
		LL	0,98	0,91	1,00
	14.	FF	1,00	0,47	0,41
		FL	0,47	1,00	0,54
		LL	0,41	0,54	1,00
Maščobni depo (grami)	Mezenterialni	FF	1,00	0,64	0,19
		FL	0,64	1,00	0,31
		LL	0,19	0,31	1,00
	Gonadni	FF	1,00	0,89	0,59
		FL	0,89	1,00	0,50
		LL	0,59	0,50	1,00
	Abdominalni	FF	1,00	0,70	0,56
		FL	0,70	1,00	0,57
		LL	0,56	0,57	1,00
	Femoralni	FF	1,00	0,40	0,33
		FL	0,40	1,00	0,38
		LL	0,33	0,38	1,00
ADI**	FF	1,00	0,98	0,42	
	FL	0,98	1,00	0,39	
	LL	0,42	0,39	1,00	

*verjetnost za Studentov *t*-test

**ADI-adipozni indeks

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen diplomske naloge je bil preučiti vpliv kongenega dela L na *Fob3b* odseku kromosoma 15 kongene mišje linije M. Vplival naj bi na nalaganje maščobnega tkiva pri miših. Raziskava je potekala na populaciji F₂ generacije miši. Izhodiščni starševski liniji kongene linije M sta bili F in L, ki se v tej lastnosti močno razlikujeta med seboj, saj sta bili pred tem 53 generacij dvosmerno selekcionirani za nalaganje maščobnega tkiva (Horvat in sod., 2000). Kongena linija nastane z načrtnim križanjem dveh linij živali, ki se močno razlikujeta v opazovanih lastnostih. Med potomci povratnega križanja izberemo tiste, ki so heterozigoti na zelenem odseku genoma. Namen križanja je »čiščenje« genoma, saj s vsakim križanjem razpolovimo odstotek genoma donorske starševske linije in po 10. do 12. križanjih dosežemo, da kongena linija vsebuje 99,9 odstotka genoma prejemne linije (Walkeland in sod., 1997). Linija F je v raziskavi prejemna linija, linija L pa donorska linija področja *Fob3b* na kromosomu 15. V prvi generaciji F₁ smo križali samice debele linije F in samce kongene linije M. Kongena linija M je kongena na zelo kratkem odseku kromosomu 15, ki vsebuje lokus *Fob3b*. Celotno gensko ozadje je od debele linije F, le kratek odsek od markerja *D15Mit68* do *D15Mit70* je od vitke linije L. Potomci iz te generacije so bili vsi heterozigotni na preučevanem odseku. Nato smo izvedli medsebojno povratno križanje heterozigotov in tako pridobili F₂ generacijo. Križali smo heterozigotne živali v ožjem sorodstvu, bratje + sestre, dobili na lokusu bolj gensko izenačene genske zapise živali. F₂ generacija miši je bila tudi ciljna skupina raziskave. Namen je bil ugotoviti vpliv donorskega segmenta L na *Fob3b* odseku kromosoma 15 za nalaganje maščevja pri kongeni mišji liniji M.

Na osnovi mikrosatalitskih genskih označevalcev je potekalo genotipiziranje. Med starševskima linijama F in L so do sedaj na kromosomu 15 odkrili 23 polimorfni mikrosatalitskih označevalcev (Ensembl, 2007). Na začetku raziskave smo preverili kontrole F (homozigot FF), L (homozigot LL), F₁ (heterozigot FL) za vse genske označevalce. V nadaljevanju smo uporabili le tiste, ki so se dovolj jasno ločili na agaroznem gelu. Takih genskih označevalcev je bilo sedem, ostalih pa nismo mogli ločiti z

gelsko elektroforezo. Če bi želeli lokus *Fob3b* natančnejše kartirati še z ostalimi mikrosetalitskimi označevalci, bi se morali poslužiti drugih metod genotipiziranja. V našem primeru je kartiranje s sedmimi mikrosetalitskimi označevalci zadostovalo za natančno genotipiziranje.

Frekvence genotipov v F₂ generaciji smo preverili z χ^2 testom. Genotipe smo sicer preverjali že v F₀ generaciji samice linije F, samci linije M. Pričakovani genotipi samice debele F, samci vitki L na odseku *Fob3b*, gensko ozadje F. V F₁ generaciji dobimo na kongenem oseku *Fob3b* same heterozigotne FL potomce, ostali del genoma od debele linije F. Heterozigote FL smo v F₂ generaciji med seboj križali in dobili pričakovano razmerje genotipov FF:FL:LL = 1:2:1. χ^2 test za frekvenco genotipov v F₂ generaciji potrjuje dedovanje po Mendlovih zakonih, v našem primeru po 1. Mendlovem zakonu. Vrednost χ^2 mora biti večja od 0,05, da lahko govorimo, da so opazovane frekvence v skladu s pričakovanim razmerjem frekvenc genotipov. Če se pojavi χ^2 vrednost, ki je manjša od 0,05, govorimo o statistično značilni razliki (Tabela 9, samice+samci). Odstopanje od pričakovanega razmerja po Mendlovih zakonih je lahko posledica nepravilnega genotipiziranja, kar smo takoj ovrgli saj smo genotipiziranje trikrat ponovili, tudi z različno osebo, zamenjave vzorcev ali slabih, manjkajočih podatkov. Statistično značilna razlika lahko nastane tudi zaradi prisotnosti pojava »meiotic drive«, kar je manj verjetno, saj gre za redek pojav. Povzročajo ga odgovorni genski elementi, ki imajo za posledico, da razmerje alel v gametah heterozigota ni 1:1, kot pričakujemo po 1. Mendlovem zakonu. Odstopanje se lahko pojavi v mejozi ali po njej (Ardlie, 1998). V našem primeru smo imeli majhen vzorec in je to lahko posledica odstopanja. Z gotovostjo pa lahko zatrdimo, da je odstopanje posledica zmanjšanja števila homozigotov LL. Verjetno je, da je ta genotip imel manjšo preživitveno sposobnost med razvojem pred ali po rojstvu. Pri vitkih miših je bila ugotovljena slaba reprodukcija (Zanjekovič, 2007). Možno je, da segment kromosoma 15 v liniji M, ki izhaja iz vitke linije poleg možnega vpliva na telesno maščevje negativno vpliva tudi na reprodukcijo in morda tudi na odpornost živali. Manj verjetno je, da bi zamenjali vzorce, narobe genotipizirali in imeli slabe, manjkajoče podatke.

Po analizi genotipov smo analizirali tudi fenotipske podatke živali. Tekom poizkusa smo zbirali telesne mase pri 3., 6., 10. in 14. tednih starosti miši. Pri 14. tednih smo živali žrtvovali in stehali štiri večje maščobne depoje (mezenterialni, gonadni, abdominalni, femoralni maščobni depo). Razlike med genotipi, samice in samci ločeno, smo analizirali s statističnim testom (*t*-test). *t*-test nam poda verjetnost, da dva vzorca izvirata iz istih temeljnih populacij, ki imata enako srednjo vrednost. Pri vrednostih večjih od 0,05 lahko predpostavljamo, da genotip in fenotip nista povezana z nalaganjem maščobnega tkiva. Naše vrednosti standardne deviacije so rahlo višje od mejne vrednosti 0,05. Iz tega sledi, da kongena linija 15FHM ni statistično značilna za večino lastnosti. Iz tabele 10. je razvidno, da imajo miši FF v povprečju 0,40 g mezenterialne maščobe, miši FL 0,33g, miši LL pa 0,29g maščobe. Torej lahko sklepamo, da alel debele linije v homozigotnem stanju FF statistično značilno povišuje maso mezenterialne maščobe. Tudi nekatere ostale vrednosti so »blizu« praga statistične značilnosti. Upoštevati je potrebno, da imamo majhen vzorec in iz tolikšnega števila podatkov težko z gotovostjo potrdimo oziroma zavrnemo hipotezo, da med genotipi ni oziroma so statistično značilne razlike, razen pri mezenterialni maščobi, kjer lahko potrdimo, da alel debele linije F v homozigotnem stanju statistično značilno povišuje maso mezenterialne maščobe.

V koloniji je med poizkusom padla reprodukcija in odpornost živali. Pojavila se je tudi infekcija. Nekaj živali je poginilo, precej smo jih izločili, ker so zaostale v rasti in niso predstavljale reprezentativnega vzorca. Zakaj je prišlo do izpada, ne znamo natančno pojasniti, ker naknadni mikrobiološki testi niso kazali okužbe s standardnimi patogeni, ampak virusno okužbo dihal. Laboratorij-mišja kolonija naj bi bil sterilno okolje v katerem se ohranjajo konstantne razmere, temperatura 21°C, vlažnost 55 odstotna, neprekinjena ventilacija, konstantna osvetlitev 12 ur teme, 12 ur svetlobe ter vsaj minimalni higienski pogoji. Zagotavljanje konstantnih pogojev v koloniji je zahtevno in nenamerno se zgodi, da na kolonijo vpliva tudi zunanje okolje. Predvsem vlažnost zunanjega zraka sezonsko vpliva na minimalno nihanje vlažnosti zraka v koloniji. Zanimivo je, da se je reprodukcija zmanjšala ravno v zimskem času, saj v naravnem okolju pozimi reprodukcija ni aktivna. Vpliv zunanjega okolja na, po našem mnenju, konstantno laboratorijsko okolje, ni predmet analize tega diplomskega dela. Iz tega bi lahko izpeljali še marsikatero hipotezo. Vzrok v

nihanju reprodukcije je lahko tudi v izpadu električnega toka na oddelku. Prekinitve svetlobnega cikla naj bi imele dolgotrajne posledice na reprodukcijo živali (Taft, 2005). Krma bi lahko imela vpliv na reprodukcijo, saj samci uživajo isto krmo kot samice v času dojenja. Pri debelih samcih je sposobnost za oploditev manjša, ker naj bi izgubili interes za razmnoževanje (Taft, 2005). Našteti vplivi izhajajo iz vpliva okolja. Zelo pomembno vlogo ima genetski vpliv, ki prav tako lahko vpliva na reprodukcijo. Iz rezultatov lahko podamo hipotezo, da so homozigotne miši LL imele manjšo preživitveno sposobnost med razvojem pred in po rojstvu. Iz naših rezultatov lahko razberemo, da se liniji F in M statistično značilno razlikujeta v teži mezenterialne maščobe pri samicah. Znano je, da je mezenterialna maščoba nevarna za pojav diabetesa, srčno-žilnih bolezni in anatomsko je količina te maščobe pri ženskih živalih večja, kot pri moških. Podamo lahko hipotezo, da ima linija M manjši odstotek mezenterialne maščobe pri samicah.

Z χ^2 testom smo dokazali, da so frekvence genotipov v skladu z 1. Mendlovim zakonom dedovanja. Genotipi v razmerju FF:FL:LL = 1:2:1. Odstopanja od tega razmerja so bila v našem primeru posledica zmanjšanja homozigotov LL. Imeli so manjšo preživitveno sposobnost pred in po rojstvu, saj so bili bolj dovzetni za virusno okužbo, ki se je pojavila v koloniji v času poskusa. Pričakovali smo statistično značilne povezave med genotipom in fenotipom za nalaganje maščevja. Našli smo eno statistično značilno povezavo pri mezenterialni maščobi pri samicah, kar pomeni, da ima linija M vpliv na manjše nalaganje mezenterialnega maščevja pri samicah. Debeli aleli F povečujejo maso maščevja v trebušni votlini. Nalaganje maščevja v trebušni votlini vodi do nevarnih srčno-žilnih bolezni in diabetesa, ki so še posebej problematični pri samicah. To informacijo bi lahko uporabili za selekcijo pri domačih živalih in za terapijo, diagnostiko pri človeku. Potrebno bo preveriti vpliv homozigotne regije *Fob3b* za zamaščenost v trebušni votlini pri drugih vrstah domačih živali in človeku. S statističnimi metodami smo dokazali, da ima odsek *Fob3b* na kromosomu 15 vpliv na nalaganje mezenterialnega maščevja pri samicah, ne moremo pa zagotoviti, da je to edina statistično značilna povezava, saj smo med poskusom imeli težave z virusno okužbo, ki nam je zmanjšala reprodukcijo in oslabilo šibkejše živali genotipa LL. Poskus bi bilo koristno ponoviti z večjim številom živali, več pozornosti posvetiti izboljšanju reprodukcije in vzdrževanju konstantnih pogojev v mišji koloniji. V

nadaljnjih študijah bi bilo zanimivo razviti kongeno linijo, ko bi imela gensko ozadje od vitke linije L in kratek odsek *Fob3b* na kromosomu 15 od debele linije F. QTL *Fob3b* bi lahko imel še večje učinke na zamaščevanje pri miših kot kongena linija v pričujoči študiji.

5.2 SKLEPI

- Iz rezultatov lahko sklepamo, da so homozigotne LL miši imele manjšo preživetveno sposobnost med razvojem pred in po rojstvu.
- Z χ^2 testom smo dokazali, da so frekvence genotipov in alel v skladu s 1. Mendlovim zakonom dedovanja.
- Iz fenotipskih podatkov smo pričakovali več statistično značilnih razlik. Odkrili smo eno pri mezenterialni maščobi. Alel debele linije F statistično značilno povečuje maso mezenterialne maščobe pri samicah.
- Glede na to, da smo imeli majhen vzorec in težave z reprodukcijo, ne moremo z gotovostjo zavrniti hipoteze, da med genotipi ni statistično značilnih razlik.

6 POVZETEK

V svetu predstavlja debelost pri ljudeh vedno večji zdravstveni problem, prav tako je prekomerno zamaščevanje nezaželeno pri reji domačih živalih. Genetske raziskave za kvantitativnih lokusov povezanih z nalaganjem maščevja nam lahko odkrijejo nove gene povezane s to lastnostjo in predstavljajo nove tarče za razvoj zdravil ali genetskih označevalcev za odbiro manj zamaščenih domačih živali.

Na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani potekajo raziskave določanja genetske osnove za nalaganje maščevja pri laboratorijskih miših. V okviru te diplomske naloge smo preučevali kvantitativni lokus (angl.: *quantitative trait loci* (QTL)) *Fob3b*, ki se nahaja na kromosomu 15 in vpliva na nalaganje maščevja pri miših. V poskusu smo uporabili kongeno linijo M, ki je bila razvita iz rekombinantov, ki izhajajo iz populacije F₂ potomcev dveh starševskih linij F in L, ter vsebuje *Fob3b* odsek kromosoma iz vitke linije L.

Liniji F in L prvotno izhajata iz Univerze v Edinburghu, kjer sta bili dvosmerno selekcionirani na odstotek maščevja 53 generacij. Po končani selekciji sta se liniji zelo fenotipsko razlikovali, linija F je imela 22 odstotkov, linija L pa 4 odstotke telesnih maščob. Liniji predstavljala edinstven model za preučevanje genetske osnove poligene oblike debelosti.

V poizkusu smo želeli potrditi vpliv kongenega odseka *Fob3b* za nalaganje mezenterialne, abdominalne, femoralne, gonadne maščobe in pridobivanje teže pri različnih starostih za oba spola. Debelo linijo F prejemno linijo smo križali z donorsko kongeno linijo M. Genotipiziranje smo opravili s pomočjo mikrosatelitskih genskih označevalcev in postopkom agarozne genske elektroforeze. V F₁ generaciji so bili potomci heterozigotni na kongenem odseku *Fob3b*. F₁ potomce smo križali med seboj in dobili potomce v razmerju 1:2:1 = FF:FL:LL, kar ustreza razmerjem po 1. Mendlovemu zakonu dedovanja. To smo dokazali z χ^2 testom (hi testom) in s tem izključili napake pri genotipiziranju ali zamenjavi vzorcev. Analiza fenotipskih lastnosti v F₂ generaciji je potrdila vpliv QTL

Fob3b za nalaganje mezenterialne maščobe pri samicah. Za ostale parametre nismo našli statistično značilnih povezav.

Pri ženskih živalih je bolj opazno nalaganje mezenterialne maščobe, ki poveča tveganje za nastanek različnih bolezni (metabolni sindrom, kardiovaskularne bolezni). Ugotovitev, da kvantitativni lokus *Fob3b* na kromosomu 15 linije M vpliva na nalaganje mezenterialne maščobe pri samicah, bi lahko v prihodnje pripomogla pri načrtovanju poskusov za razvoj novih diagnostičnih ali terapevtskih pristopov za zdravljenje trebušne zamaščenosti pri ljudeh. Obenem ima odkriti QTL potencial kot genetski označevalec za zmanjšanje zamaščenosti v trebušni votlini pri domačih živalih.

7 VIRI

Adipose tissue. Wikipedia. http://en.wikipedia.org/wiki/adipose_tissue/ (20. mar. 2008)

Ardlie K.G. 1998. Putting the brake on drive: meiotic drive of *t* haplotypes in natural populations of mice. TIG, 14, 5: 189-193

Barandse W.J. 1999. Assessing lipid metabolism. Patent, International Publication Number: WO 99/23248. World International Property Organization.

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

Bindon B.M. 2004. A review of genetic and non-genetic opportunities for manipulation of marbling. Australian Journal of Experimental Agriculture, 44, 7: 687-696

Buchanan F.C., Fitzsimmons C.J., Van Kessel A.G., Thue T.D., Winkelman-Sim D.C., Schmutz S.M. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Genetic Selection Evolution, 34: 105-116

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

Bunger L., Lewis R.m., Rothschild M.F., Blasco A., Renne U., Simm G. 2005. Relationship between quantitative and reproductive fitness traits in animals. Philosophical Transactions of Royal Society, 360: 1489-1502

Burgess-Herbert S.L., Cox A., Tsaih S.W., Paigen B. 2008. Practical Applications of the Bioinformatics Toolbox for Narrowing Quantitative Trait Loci. *Genetics*, 180: 2227-2235

Casas E., Shackelford S.D., Keele J.W., Koohmaraie M., Smith T.P.L., Stone R.T. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *Journal of Animal Science*, 81: 2976-2983

Casas E., Shackelford S.D., Keele J.W., Stone R.T., Kappes S.M., Koohmaraie M. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *Journal of Animal Science*, 78: 560-569

Casas E., White S.N., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G., Chase Jr.C.C., Johnson D.D., Smith T.P.L. 2006. Effects of *calpastatin* and *-capain* markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, 84: 520-525

Chrung E.R., Kim W.T. 2005. Association of SNP marker in IGF-I and MYF5 candidate genes with growth traits in Korean cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 18, 8: 1061-1065

Curi R.A., de Oliveria H.N., Silveira A.C., Lopes C.R. 2005a. Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. *Livestock Production Science*, 94, 3: 159-167

Curi R.A., de Oliveria H.N., Gimenes M.A., Silveira A.C., Lopes C.R. 2005b. Effects of CSN3 and LGB gene polymorphisms on production traits in beef cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 2: 262-266

- Curi R.A., Palnieri D.A., Suguisawa L., de Oliveria H.N., Silveria A.C., Lopes C.R. 2006. Growth and carcass traits associated with Gh1/Alu I and POU1F1/Hinf I gene polymorphisms in Zebu and crossbred beef cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 1: 56-61
- 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: 452-459
- Diament A.L., Warden C.H. 2004. Multiple linked mouse chromosome 7 loci influence body fat mass. *International Journal of Obesity*, 28: 199-210
- Ensembl genome browser. 2007. <http://www.ensembl.org/> (12. feb. 2008)
- Estrada-Smith D., Castellani L.W., Wong H., Wen P.Z., Chui A., Lusk A.J., Davis R.C. 2004. Dissection of multigenic obesity traits in congenic mouse strains. *Mammalian Genome*, 15: 14-22
- Ge W., Davis M.E., Hines H.C., Irvin K.M., Simmen R.C. 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*, 79: 1757-1762
- Horvat S., Bunger L., Falconer V.M., Mackay P., Law A., Bulfield G., Keightley P.D. 2000. Mapping of obesity QTLs in a cross between mouse lines divergently selected on fat content. *Mammalian Genome*, 11, 1: 2-7
- Ikeobi C.O.N., Woolliams J.A., Morrice D.R., Law A., Windsor D., Burt D.W., Hocking P.M. 2002. Quantitative trait loci affecting fatness in chicken. *Animal Genetics*, 33: 428-435

Jennen D.G.J., Vereijken A.L.J., Bovenhuis H., Crooijmans R.P.M.A., Veenendaal A., Van der Poel J.J., Groenen M.A.M. 2004. Detection and Localization of Quantitative Trait Loci Affecting Fatness in Broilers. *Poultry Science*, 83: 295-301

Jerez-Timaure N.C., Eisen E.J., Pomp D. 2005. Fine mapping of a QTL region large effects on growth and fatness on mouse chromosome 2. *Physiological Genomics*, 21: 411-422

Jerez-Timaure N.C., Kearney F., Simpson E.B., Eisen E.J., Pomp D. 2004. Characterisation of QTL with Major Effect on Fatness and Growth on Mouse Chromosome 2. *Obesity Research*, 12, 9: 1408-1420

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

Laird P.W., Zijdeveld A., Linders K., Rudnicki M.A., Jaenisch R., Berns A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*, 19, 15: 4293

Legenerio R., Wiener P., Pilla F., Woolliams J.A., Williams J.L. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Animal Genetics*, 34: 371-374

Lembertas A.V., Perusse L., Chagnon Y.C., Fisher J.S., Warden C.H., Purcell-Huynh D.A., Dionne F.T., Gagnon J., Nadeau A., Lusk 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

- Li C., Basarab J., Snelling W.M., Benkel B., Murdoch B., Hanson C., Moore S.S. 2004a. Assessment of positional candidate genes *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. *Journal of Animal Science*, 82: 1-7
- Li C., Basarab J., Snelling W.M., Benkel B., Kneeland J., Murdoch B., Hansen C., Moore S.S. 2004b. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for backfat on bovine chromosomes 2, 5, 6, 19, 21, and 23 in a commercial line of *Bos taurus*. *Journal of Animal Science*, 82: 967-972
- Li S., Chranchaw E.B., Rawson E.J., Simms D.M., Swanson L.W., Rosenfeld M.G. 1990. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *Pit-1*. *Nature*, 347: 528-533
- McElroy J.P., Kim J.J., Harry D.E., Brown S.R., Dekkers J.C.M., Lamont S.J. 2006. Identification of Trait Loci Affecting White Meat Percentage and Other Growth and Carcass Traits in Commercial Broiler Chickens. *Poultry Sciences*, 85: 593-605
- Mehrabian M., Wen P.Z., Fisler J., Davis R.C., Lusk A.J. 1998. Genetic Loci Controlling Body Fat, Lipoprotein Metabolism and Insulin Levels in a Multifactorial Mouse Models. *Journal of Clinical Investigation*, 101, 11: 2485-2496
- Michal J.J., Zhang Z.W., Gaskins C.T., Jiang Z. 2006. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F-2 crosses. *Animal Genetics*, 37, 4: 400-402
- Moore S.S., Li C., Basarab J., Snelling W.M., Kneeland J., Murdoch B., Hanson C., Benkel B. 2003. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. *Journal of Animal Science*, 81: 1919-1925

- Nkrumah J.D., Li C., Yu J., Hansen C., Kreisler D.H., Moore S.S. 2005. Polymorphisms in the bovine leptin promotor associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *Journal of Animal Science*, 83: 20-28
- Pernell P.F. 2004. Industry application of marbling genetics: a brief review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44, 7: 697-703
- Prevoršek Z. 2005. Razvoj kongenih linij za natančnejše kartiranje kvantitativnega lokusaza nalaganje maščevja na kromosomu 15 pri miših. Diplomsko delo. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 78 str.
- Renand G., Larzul C., Le Bihan-Duval E., Le Roy P. 2003. Genetic improvement of meat quality in the different livestock species: present situation and prospects. *Productions Animales*, 16, 3: 159-173
- Schenkel F.S., Miller S.P., Ye X., Moore S.S., Nkrumah J.D., Li C., Yu J., Mandel I.B., Wilton J.W., Williams J.L. 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83, 9: 2009-2020
- Schlotterer C. 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5: 63-69
- 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

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

Taft R. 2005. Reproductive biology of the laboratory mouse. The Jackson laboratory.
http://www.jax.org/courses/archives/2003/colf03_taft.pdf (8. avg. 2005)

Thaller G., Kuhn C., Winter A., Ewald G., Bellmann O., Wegner J., Zuhlke H., Fries R. 2003. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics*, 34, 5: 354-357

Van der Lande T., Te Pas M.F.W., Veerkamp R.F., Liefers S.C. 2005. Leptin gene polymorphisms and their phenotypic associations. *Vitamins and Hormones - Advances in Research and Applications*, 71: 373-404

Walkeland 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

Warden C.H., Stone S., Chiu S., Diamant A.L., Corva P., Shattuck D., Riley R., Hunt S.C., Easlick J., Fisler J.S., Medrano J.F. 2004. Identification of a congenic mouse line with obesity and body length phenotypes. *Mammalian Genome*, 15: 460-471

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

York B., Truett A.A., Monteiro M.P., Barry S.J., Warden C.H., Neggert J.K., Maddatu T.P., West D.B. 1999. Gene-environment interaction: a significant diet-dependent obesity locus demonstrated in a congenic segment on mouse Chromosome 7. *Mammalian Genome*, 10: 457-462

Zanjkovič A. 2007. Plodnost laboratorijskih miši pri selekcioniranih linijah odbranih na večji oziroma manjši delež telesnih maščob. Diplomsko delo. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 88 str.

Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16

Zhao Q., Davis M.E., Hines H.C. 2004. Associations of polymorphisms in the *Pit-1* gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle. *Journal of Animal Science*, 82, 8: 2229-2233

Zhou H., Deeb N., Evock-Clover C.M., Ashwell C.M., Lamont S.J. 2006. Genome-Wide Linkage Analysis to Identify Chromosomal Regions Affecting Phenotypic Traits in the Chicken. II. Body Composition. *Poultry Science*, 85: 1712-1721

ZAHVALA

Ob zaključku se iskreno zahvaljujem prof. dr. Simonu Horvatu za vso strokovno pomoč, nasvete, potrpežljivost, podporo pri delu in izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Petru Dovču in prof. dr. Silvestru Žguru za končni pregled diplomske naloge in nasvetih pri izboljšavi teksta, dr. Nataši Siard za pregled in svetovanje.

Za uvajanje v laboratorijsko delo, nasvete in nesebično strokovno pomoč se zahvaljujem mladi raziskovalki Zali Prevoršek, tehnični sodelavki Ani Zanjковиč in zaposlenim v genetskem laboratoriju.

Mlademu raziskovalcu Gregorju Gorjancu se zahvaljujem za pomoč pri statistični obdelavi podatkov in Juretu Križaniču za tehnično pomoč.

Zahvalila bi se ge. Sabini Knehtel za pomoč pri vseh formalnostih v zvezi z diplomsko nalogo in študijem.

Laboratorijskim mišim za neprosto voljno sodelovanje v raziskavi.

Iztoku in Marjeti Kozmelj za vso podporo, pomoč in lektoriranje diplomske naloge ter Petri Prebeg, Petru Čadežu in Urški Thaler za vse spodbudne besede in prijateljstvo.

Staršema in bratu za spodbudo tekom celotnega študija, predvsem pa potrpežljivost ob zaključku diplomskega dela ter Murki hvala za spremljanje in podporo v najtežjih trenutkih življenja.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Petra RANT

**NATANČNEJŠE KARTIRANJE KVANTITATIVNEGA
LOKUSA *Fob3b* ZA ZAMAŠČENOST V F₂ KRIŽANJU
KONGENIH LINIJ MIŠI**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2009