

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Daša JEVŠINEK SKOK

**VLOGA GENETSKE VARIABILNOSTI NEKODIRajočIH RNA PRI
NALAGANJU Maščobe SESALCEV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE ROLE OF GENETIC VARIABILITY OF NON-CODING RNAs FOR
FAT DEPOSITION IN MAMMALS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 14.11.2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje bioinformatika. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Tanja Kunej, za somentorico pa prof. dr. Milena Kovač.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr Gregor ANDERLUH
Kemijski inštitut Ljubljana

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

Članica: prof. dr. Milena KOVAČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Tomaž CURK
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za računalništvo in informatiko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Daša JEVŠINEK SKOK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 575(043.3)=163.6
KG bioinformatika/prioritizacija/ncRNA/miRNA/snoRNA/UCR/nalaganje maščobe
KK AGRIS L10/5213/5300
AV JEVŠINEK SKOK, Daša, uni. dipl. inž. zoot.
SA KUNEJ, Tanja (mentorica)/ KOVAČ, Milena (somentorica)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje bioinformatika
LI 2014
IN VLOGA GENETSKE VARIABILNOSTI NEKODIRajočIH RNA PRI NALAGANJU MAŠČOBE SESALCEV
TD Doktorska disertacija
OP XIV, 108 str., 19 pregl., 36 sl., 22 pril., 129 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Maščobe so za delovanje organizma nujno potrebne, vendar so pogosto omenjene le njihove negativne lastnosti. Večina do sedaj znanih lokusov za nalaganje maščobe je protein-kodirajočih genov in lokusov za kvantitativne lastnosti (QTL-ov). Število raziskav vpleteneosti nekodirajočih RNA (ncRNA) v nalaganje maščobe narašča, vendar so bile s to lastnostjo do sedaj neposredno povezane le mikro RNA (miRNA). Cilj doktorske naloge je bil preveriti vpleteneosti treh izbranih razredov ncRNA: mikro RNA (miRNA), malih nukleolarnih RNA (snoRNA) in zelo ohranjenih regij genoma (UCR) v nalaganje maščobe pri miši, govedu in prašiču. V ta namen smo izdelali genomski atlas za ncRNA "*ncRNA Genomics Atlas*", ki vsebuje zbirko znanja s 7.213 geni za ncRNA, 1.089 protein-kodirajočimi geni in 1.784 polimorfizmi v genih za ncRNA. Posodobili smo obstoječe bioinformacijsko orodje miRNA SNiPer in razvili orodji snoRNA SNiPer in UCR SNiPer. Specializirani del atlasa "*ncRNA Obesity Atlas*" vsebuje analizo vloge ncRNA pri nalaganju maščobe. Razvili smo metodo za analizo vpliva znanih polimorfizmov na kompleksne lastnosti pri inbridiranih linijah miši s pristopom *in silico*. Preverili smo vpliv 924 polimorfizmov v ncRNA genih na 112 lastnosti zamaščevanja pri inbridiranih linijah miši. Potrdili smo vpliv 748 SNP-jev na nalaganje maščobe. Razvili smo indeks za razvrščanje polimorfizmov po prioriteti (LPI) ter z njim razvrstili polimorfizme, ki smo jih povezali z nalaganjem maščobe. Dodatno smo določili pozicijska kandidatna območja z ncRNA za nalaganje maščobe s prekrivanjem več lokusov pri vseh treh proučevanih vrstah z najbolj obetavnima paroma miRNA/gostiteljski gen: *miR-218-2/Slit3* in *miR-335/Mest*. V doktorski nalogi smo dokazali vpliv vseh treh proučevanih razredov ncRNA na nalaganje maščobe. Izdelana zbirka "*ncRNA Genomics Atlas*" in razvite metode bo možno uporabiti tudi za raziskave drugih kompleksnih lastnosti, zato raziskava predstavlja pomemben prispevek k znanosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDK 575(043.3)=163.6
CX bioinformatics/prioritization/ncRNA/miRNA/snoRNA/UCR/fat deposition
CC AGRIS L10/5213/5300
AU JEVŠINEK SKOK, Daša
AA KUNEJ, Tanja (supervisor)/KOVAČ, Milena (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme
in Biosciences, Field: Bioinformatics
PY 2014
TI THE ROLE OF GENETIC VARIABILITY OF NON-CODING RNAs FOR FAT
DEPOSITION IN MAMMALS
DT Doctoral dissertation
NO XIV, 108 p., 19 tab., 36 fig., 22 ann., 129 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Fats are essential for the functioning of an organism; however, often they are referred to only by their negative traits. Majority of known loci associated with fat deposition are protein coding genes and QTL. Number of studies regarding non-coding RNA (ncRNA) involvement in fat deposition is increasing, however previously only miRNA were directly associated with fat deposition. The aim of the doctoral dissertation was to verify the involvement of three classes of ncRNA: microRNA (miRNA), small nucleolar RNA (snoRNA), and ultraconserved regions (UCR) in fat deposition in mouse, cattle and pig. For this purpose ncRNA Genomics Atlas was developed which contains knowledge base including 7.213 ncRNA genes, 1.089 overlapping protein coding genes and 1.784 polymorphisms. We updated previously developed bioinformatics tool miRNA SNiPer and developed two new tools snoRNA SNiPer and UCR SNiPer. In specialized part of genomic atlas "*ncRNA Obesity Atlas*" the role of ncRNA on fat deposition was investigated. A method for analyzing the effect of known polymorphisms on complex traits in inbred mice strains using *in silico* approach was developed. We performed an association analyses between 924 polymorphisms in ncRNA genes and 112 fat deposition traits in inbred mice strains. We confirmed the effect of 748 SNPs on fat deposition. The locus prioritization index (LPI) was developed and used for classification of polymorphisms associated with fat deposition. Additionally, we determined the positional candidate regions with ncRNA for fat deposition by superimposition of multiple loci in all three studied species, with the most promising miRNA/host gene pairs: *miR-218-2/Slit3* and *miR-335/Mest*. Impact of three classes of ncRNA on fat deposition was confirmed in this doctoral dissertation. Developed ncRNA Genomics Atlas and developed methods can be used for research of other complex traits, therefore this study represents an important contribution to science.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XIII
Okrajšave in simboli	XV
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKAVE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 MAŠČOBNO TKIVO	4
2.1.1 Adipogeneza in nalaganje maščobe	5
2.1.2 Debelost	8
2.2 PROUČEVANJE KOMPLEKSNIH LASTNOSTI	8
2.2.1 Biološke mreže in poti	9
2.2.2 Razvrščanje kandidatnih lokusov po prioriteti	11
2.3 NEKODIRajoče RNA	16
2.3.1 Mala nukleolarna RNA (snoRNA)	17
2.3.2 Mikro RNA (miRNA)	20
2.3.3 Zelo ohranjene regije genoma (UCR)	23
2.3.4 ncRNA povezane z nalaganjem maščobe	23
2.3.5 Gostiteljski geni za ncRNA	25
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 MATERIALI	27
3.1.1 Podatkovne zbirke in bioinformacijska orodja	27
3.1.2 Podatki za asociacijsko analizo pri miši	29
3.1.3 Vzorci goveda	29

3.2	METODE	31
3.2.1	Bioinformacijske metode	31
3.2.1.1	Razvoj genomskega atlasa za ncRNA	31
3.2.1.2	Analiza genomske razporeditve ncRNA pri miši, govedu in prašiču	31
3.2.1.3	Analiza prekrivanj genomskeh lokacij zapisov ncRNA z lokusi za kvantitativne lastnosti	32
3.2.1.4	Nadgradnja in izdelava orodij za iskanje polimorfizmov v ncRNA genih	33
3.2.1.5	Funkcijska analiza ncRNA genov in njihovih gostiteljskih genov	34
3.2.1.6	Določanje tarčnih genov za miRNA pri miši	34
3.2.2	Molekularno-genetske metode	35
3.2.3	Statistične metode	36
3.2.4	Analiza vpliva polimorfizmov v ncRNA genih na lastnosti zamaščevanja pri inbridiranih linijah miši	37
3.2.5	Analiza vpliva polimorfizmov v miRNA genih na pitovne in klavne lastnosti pri govedu	38
4	REZULTATI	39
4.1	SPLOŠNI DEL GENOMSKEGA ATLASA " <i>ncRNA Genomics Atlas</i> "	40
4.1.1	Izdelava zbirke znanja z ncRNA geni, njihovimi gostiteljskimi geni in polimorfizmi	41
4.1.1.1	Gostiteljski geni za ncRNA gene pri miši, govedu in prašiču	41
4.1.1.2	Analiza genetske variabilnosti ncRNA genov	44
4.1.2	Razvoj bioinformacijskih orodij za iskanje polimorfizmov v ncRNA genih	45
4.1.2.1	Nadgradnja bioinformacijskega orodja miRNA SNiPer	45
4.1.2.2	Razvoj bioinformacijskih orodij snoRNA in UCR SNiPer	49
4.1.3	Genomska razporeditev ncRNA genov pri miši, govedu in prašiču	51
4.1.4	Funkcijska analiza gostiteljskih genov za ncRNA	52
4.2	RAZVOJ SPECIALIZIRANEGA GENOMSKEGA ATLASA ZA NALAGANJE MAŠČOBE " <i>ncRNA Obesity Atlas</i> "	53
4.2.1	Prekrivanje ncRNA genov z lokusi za nalaganje maščobe	54
4.2.2	Razvoj metode za razvrščanje polimorfizmov po prioriteti glede na vpliv na fenotip pri miši	57

4.2.2.1	Analiza vpliva polimorfizmov v ncRNA genih na lastnosti zamaščevanja pri miši	63
4.2.2.2	Razvrščanje lokusov za nalaganje maščobe po prioriteti	63
4.2.2.3	Razvoj spletne aplikacije za prikaz rezultatov asociacijske analize pri miši	67
4.2.3	Analiza tarčnih genov in genov udeleženih v biogenezo miRNA pri miši	68
4.2.4	Preverjanje genetske variabilnosti miRNA genov pri govedu	72
4.2.5	Analiza vpliva polimorfizmov v miRNA genu <i>bta-mir-2313</i> na lastnosti rasti in klavne lastnosti lisastega goveda	73
4.2.6	Pozicijska kandidatna območja z ncRNA geni z vplivom na fenotip	76
4.3	POVZETEK POTEKA DELA	79
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	82
5.1	RAZPRAVA	82
5.1.1	Splošni del genomskega atlasa za ncRNA	83
5.1.2	Genomski atlas z ncRNA za nalaganje maščobe "ncRNA Obesity Atlas"	86
5.2	SKLEPI	92
6	POVZETEK (SUMMARY)	95
6.1	POVZETEK	95
6.2	SUMMARY	96
7	VIRI	98
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Seznam uporabljenih podatkovnih zbirk in bioinformacijskih orodij	27
Preglednica 2: Osnovne statistike za pitovne in klavne lastnosti pri lisastem govedu	30
Preglednica 3: Kvantitativni lokusi za rast in nalaganje maščobe pri miši	32
Preglednica 4: Kvantitativni lokusi za rast in nalaganje maščobe pri govedu	33
Preglednica 5: Kvantitativni lokusi za rast in nalaganje maščobe pri prašiču	33
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	35
Preglednica 7: Razdelitev informacijskih vrednosti polimorfizmov (PIC) glede na stopnjo informativnosti	37
Preglednica 8: Vsebina zbirke znanja za ncRNA	41
Preglednica 9: Število znanih SNP-jev in SNP-jev na DNA-mikromrežah pri miši, govedu in prašiču	44
Preglednica 10: Primerjava verzij orodja miRNA SNiPer 1.0, 1.1, 2.0 in 3.0	45
Preglednica 11: Mikro RNA geni s polimorfizmi v zapisu za zrelo miRNA in območju <i>seed</i> pri štirih vrstah domačih živali (prašič, konj, govedo in kokoš)	47
Preglednica 12: Povzetek rezultatov funkcijске analize gostiteljskih genov za ncRNA	52
Preglednica 13: Primer meritev za telesno maso pri miših, ki smo jim priredili genotipske podatke za dva SNP-ja	58
Preglednica 14: Primer rezultata asociacijske študije za dva SNP-ja, vrednosti PIC in LPI	59
Preglednica 15: Polimorfne miRNA in njihovi tarčni geni, predhodno povezani z nalaganjem maščobe pri miši	69
Preglednica 16: Rezultat asociacijske analize med polimorfizmi v genu <i>bta-mir-2313</i> in klavnimi lastnostmi pri lisastem govedu	75
Preglednica 17: Število določenih pozicijskih kandidatnih območij v genomu miši, goveda in prašiča glede na deset kombinacij kriterijev	78
Preglednica 18: Shema poteka dela. Namen, metodologija in glavni rezultati raziskave.	80
Preglednica 19: Potencialni kandidatni geni za nalaganje maščobe, določeni na podlagi kolokacije ncRNA/HG	88

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Diferenciacija maščobnih celic (adipogeneza)	7
Slika 2: Shema delovanja orodja Endevour	12
Slika 3: Shematski prikaz delovanja podatkovne zbirke ToppGene Suite	13
Slika 4: Tok informacij za iskanje kandidatnih genov z orodjem PGMapper	15
Slika 5: Razdelitev molekul ncRNA	17
Slika 6: Sekundarni struktura snoRNA	19
Slika 7: Model za biogenezo miRNA pri sesalcih	22
Slika 8: Temperaturni pogoji za PCR	35
Slika 9: Shema poteka statističnih analiz za govedo (A) in miš (B)	36
Slika 10: Vhodna stran genomskega atlasa ncRNA "ncRNA Genomics Atlas"	39
Slika 11: Grafični povzetek razvoja genomskega atlasa "ncRNA Genomics Atlas"	40
Slika 12: Število ncRNA genov in njihovih gostiteljskih genov pri miši, govedu in prašiču	42
Slika 13: Vhodna stran in izpis spletnne aplikacije za izpis kataloga parov ncRNA/HG	43
Slika 14: Začetna stran orodja miRNA SNiPer 3.0	46
Slika 15: Rezultat orodja miRNA SNiPer 3.0 s prikazom genetske variabilnosti miRNA <i>ssc-mir-4334</i> pri prašiču	49
Slika 16: Začetni strani in izpis orodij snoRNA SNiPer (A) in UCR SNiPer (B)	50
Slika 17: Genske karte s prikazom genomske razporeditve ncRNA genov	51
Slika 18: Število gostiteljskih genov za ncRNA povezanih z nalaganjem maščobe pri miši, govedu in prašiču. Število genov povezanih z nalaganjem maščobe/število znanih gostiteljskih genov za ncRNA gene in njihov presek	54
Slika 19: Prekrivanje genomskih lokacij miRNA <i>bta-mir-2369</i> , QTL-ov in gena <i>PTPRG</i> na BTA22 pri govedu	56
Slika 20: Prekrivanje dveh kopij snoRNA gena <i>SNORA70</i> , SNP-ja rs80889550 in QTL-ov na SSC11 pri prašiču	57

Slika 21:	Primer izpisa alelnih različic za dva SNP-ja pri 17 linijah inbridiranih miši, pridobljenih iz podatkovne zbirke MPD	58
Slika 22:	Vpliv polimorfizmov rs6363045 in rs29154152 na telesno maso pri inbridiranih linijah miši	65
Slika 23:	Vpliv polimorfizmov rs48226634 in rs46215658 na telesno maso pri inbridiranih linijah miši	66
Slika 24:	Spletna aplikacija za prikaz rezultatov analize vpliva polimorfizmov v ncRNA genih na lastnosti zamaščevanja pri miši	67
Slika 25:	Primer izpisa rezultata asociacijske analize za SNP rs33654526 z uporabo spletne aplikacije	68
Slika 26:	Mreža interakcij med mmu-miR-7b, mmu-miR-149 ter njunimi tarčami, predhodno povezanimi z nalaganjem maščobe	70
Slika 27:	Geni za biogenezo miRNA, kot gostiteljski in/ali tarčni geni za miRNA pri miši. Prekrivanje miRNA genov (<i>mmu-mir-3572</i> , <i>mmu-mir-1306</i> , <i>mmu-mir-1956</i> , <i>mmu-mir-5113</i> in <i>mmu-mir-693</i>), SNP-ja rs31571372, gostiteljskih genov (<i>Cnot3</i> , <i>Dgcr8</i> , <i>Eif4e</i> , <i>Tnrc6b</i> in <i>Xpo5</i>), ter eksperimentalno potrjenih tarčnih mest v gostiteljskih genih za miRNA.	71
Slika 28:	Rezultat orodja miRNA SNIper 3.0: genetska variabilnost miRNA <i>bta-mir-2313</i> in <i>bta-mir-2489</i> pri govedu	72
Slika 29:	Rezultat eksperimentalnega preverjanja prisotnosti polimorfizmov v miRNA genih <i>bta-mir-2313</i> (A) in <i>bta-mir-2489</i> (B) pri govedu	73
Slika 30:	Diagram lastnih vrednosti za določanje potrebnega števila komponent za asociacijsko analizo pri govedu	74
Slika 31:	Prekrivanje genomskeh lokacij miRNA <i>bta-mir-2313</i> s QTL-i pri govedu	75
Slika 32:	Analiza haplotipov za štiri SNP-je v genu <i>bta-mir-2313</i>	76
Slika 33:	Kombinacije prekrivanj genomskeh lokacij lokusov za določanje pozicijskih kandidatnih območij z ncRNA geni	77
Slika 34:	Ohranjenost kolokacije parov ncRNA/HG v pozicijskih kandidatnih območjih za nalaganje maščobe pri miši, govedu in prašiču	79
Slika 35:	Shema poteka dela	81
Slika 36:	Določanje novih kandidatnih genov na podlagi kolokacije ncRNA genov in protein-kodirajočih genov	87

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Opisna statistika analiziranih lastnosti pri miši
- Priloga B: Polimorfizmi s komercialnih DNA-mikromrež, ki se nahajajo v genih za ncRNA
- Priloga C: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v biološke procese pri miši
- Priloga D: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v celične procese pri miši
- Priloga E: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v molekularne funkcije pri miši
- Priloga F: Gostiteljski geni vpleteni v biološko pot "*Axon guidance*" pri miši
- Priloga G: Gostiteljski geni vpleteni v biološko pot "*Ribosome*" pri miši
- Priloga H: Interakcije med proteini, ki jih kodirajo gostiteljski geni za ncRNA pri miši
- Priloga I: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v biološke procese pri govedu
- Priloga J: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v celične procese pri govedu
- Priloga K: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v molekularne funkcije pri govedu
- Priloga L: Gostiteljski geni vpleteni v biološko pot "*Ribosome*" pri govedu
- Priloga M: Interakcije med proteini, ki jih kodirajo gostiteljski geni za ncRNA pri govedu
- Priloga N: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v biološke procese pri prašiču
- Priloga O: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v celične procese pri prašiču
- Priloga P: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v molekularne funkcije pri prašiču
- Priloga R: Gostiteljski geni vpleteni v biološko pot "*Ribosome*" pri prašiču

- Priloga S: Interakcije med proteini, ki jih kodirajo gostiteljski geni za ncRNA pri prašiču
- Priloga T: Seznam parov ncRNA/HG razvrščenih po prioriteti glede na njihovo vlogo pri nalaganju maščobe
- Priloga U: Rezultat genotipizacije bikov lisaste pasme
- Priloga V: Matrika korelacij med lastnostmi izmerjenimi pri lisastem govedu
- Priloga Z: Matrika lastnih vektorjev

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
Air RNA	protismerna <i>IGF2R</i> RNA (angl. <i>antisense IGF2R</i> RNA)
AJAX	skupina tehnologij za izdelavo dinamičnih spletnih strani (angl. <i>Asynchronous JavaScript and XML</i>)
BBS syndrome	sindrom Bardet-Biedl
bta	<i>Bos taurus</i>
C	citozin
CGA	pristop s kandidatnimi geni (angl. <i>Candidate Gene Approach</i>)
CSS	prekrivni slogi (angl. <i>Cascading Style Sheets</i>)
D'	koeficient vezavnega neravnovesja
DNP	dvojni polimorfizem nukleotidov (angl. <i>double nucleotide polymorphism</i>)
GWAS	asociacijska analiza na ravni celotnega genoma (angl. <i>genome wide association study</i>)
G	gvanin
GWISS	analiza <i>in silico</i> na ravni celotnega genoma (angl. <i>genome-wide in silico screening</i>)
HG	gostiteljski gen (angl. <i>host gene</i>)
HTML	označevalni jezik (angl. <i>hyper text markup language</i>)
lincRNA	velike medgenske RNA (angl. <i>large intergenic non-coding RNAs</i>)
LPI	indeks za razvrščanje lokusov po prioriteti (angl. <i>locus prioritization index</i>)
MGI	podatkovna zbirka " <i>Mouse Genome Informatics</i> "
miRNA	mikro RNA
mmu	<i>Mus musculus</i>
MPD	podatkovna zbirka " <i>Mouse Phenome Database</i> "
NCBI	Nacionalni center za biotehniološke podatke (angl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
ncRNA	nekodirajoča RNA (angl. <i>non-coding RNA</i>)
PCA	analiza glavnih komponent (angl. <i>Principal Components Analysis</i>)
PIC	informacijska vrednost polimorfizma (angl. <i>polymorphism information content</i>)
piRNA	angl. <i>PIWI-interacting RNA</i>
PPI	proteinske interakcije (angl. <i>protein-protein interactions</i>)
PIN	mreža proteinskih interakcij (angl. <i>protein-protein interaction network</i>)
QTL	lokus za kvantitativne lastnosti (angl. <i>quantitative trait loci</i>)
rasiRNA	angl. <i>repeat associated siRNA</i>
RGD	podatkovna zbirka " <i>Rat Genome Database</i> "
scnRNA	angl. <i>small-scan RNA</i>
siRNA	mala interferenčna RNA (angl. <i>small interfering RNA</i>)
Sindrom PWS	sindrom Prader-Willi
snoRNA	mala nukleolarna RNA (angl. <i>small nucleolar RNA</i>)
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. <i>single nucleotide polymorphisms</i>)

snRNA	mala jedrna RNA (angl. <i>small nuclear RNA</i>)
ssc	<i>Sus scrofa</i>
T	timin
tasiRNA	transdelujoča RNA (angl. <i>trans-acting siRNA</i>)
TF	prepisovalni dejavnik (angl. <i>transcription factor</i>)
Xist RNA	angl. <i>X-inactive specific transcript (non-protein coding)</i>
UCR	zelo ohranjene regije (angl. <i>ultraconserved regions</i>)
URL	enolični krajevnik vira (angl. <i>uniform resource locators</i>)

1 UVOD

Odkrivanje genetskih vzrokov za zamaščevanje je pomembno z živinorejskega, prehranskega in medicinskega vidika. Takšne informacije so za živinorejo in prehrano pomembne zaradi zahtev porabnikov po hrani, ki je za zdravje manj škodljiva. Zmotno je mišljenje, da se je treba mastnim živilom izogibati. Nasprotno, maščobe so za delovanje organizma nujno potrebne. Čeprav so potrebe organizma po njih majhne, je vnos kakovostnih maščob pomemben za delovanje organizma, saj so maščobne kisline graditelji celičnih membran in neposredno vplivajo na njihovo trdnost in prepustnost in s tem na funkcionalne lastnosti celic. Premalo ustreznih maščob v prehrani lahko povzroči pomanjkanje esencialnih maščobnih kislin in s tem zmanjšano sposobnost organizma za absorpcijo vitaminov A, D, E in K, ki so topni le v maščobah. Glavna naloga maščob je vir energije, poleg tega skrbijo tudi za normalno rast, razvoj in delovanje celic, živcev, mišic in telesnih tkiv. So pomemben element pri izgradnji prostaglandinov, ki delujejo protivnetno, prav tako pa dajejo maščobe hrani njen značilni vonj in okus. Medmiščna maščoba (angl. *intramuscular fat*; IMF) daje mesu sočnost in mehkobo, medtem ko je prekomerno nalaganje maščobe neželeno zaradi vse večjega povpraševanja porabnikov po izdelkih, ki varujejo zdravje in tudi iz ekonomskih razlogov, saj je reja mesnatih živali lahko bolj učinkovita. Prekomerno uživanje maščob lahko privede do povišane telesne mase in debelosti, kar predstavlja povišano tveganje za številne bolezni, povezane s to lastnostjo tako pri ljudeh kot tudi živalih. V aplikativnih raziskavah v medicini in veterini je proučevanje prekomernega nalaganja maščobe in debelosti usmerjeno k razvoju orodij za identifikacijo visokega tveganja za debelost, kot tudi za izvajanje ciljnih terapij za nadzor debelosti in z njo povezanih bolezni. Identifikacija genetskih vzrokov za nalaganje maščobe je v zadnjem desetletju pomembno področje raziskav za izboljšanje tako diagnostike kot tudi preprečevanja in zdravljenja debelosti, zato je odkrivanje lokusov za nalaganje maščobe ključ do zdravljenja in nadzora motenj, povezanih s to boleznijo. Znano je, da imajo nekateri ortologni geni enake ali podobne različice lokusov za kvantitativne lastnosti (angl. *quantitative trait loci*; QTL), zato novejše bioinformacijske metode že vključujejo tudi identifikacijo novih biooznačevalcev s primerjalnim pristopom. Hiter razvoj molekularno-genetskih tehnik je privadel do ogromnih količin podatkov, saj je bilo z nalaganjem maščobe povezanih že preko 1.700 lokusov.

Iz tega razloga je nujno te lokuse pričeti razvrščati po prioriteti (angl. *prioritization*) z namenom odkrivanja biooznačevalcev z večjim vplivom na to lastnost. Večina omenjenih lokusov je genov, ki kodirajo proteine, QTL-ov in mikro RNA (miRNA), ki jih uvrščamo med nekodirajoče RNA (angl. *noncoding RNA*; ncRNA). Vloga ncRNA je najbolj raziskana pri ljudeh, medtem ko je pri ostalih vrstah, predvsem domačih živalih bistveno manj raziskana. Izsledki raziskav so najpogosteje objavljeni v literaturi, obstaja tudi nekaj podatkovnih zbirk s temi informacijami, vendar so prosto dostopne podatkovne zbirke za ncRNA najpogosteje namenjene zbiranju le fizičnih lastnosti posameznih razredov ncRNA in so pri tem omejene še na vrsto proučevanega organizma. Zato je bil namen doktorske disertacije izdelati centralno mesto za proučevanje ncRNA in njihovega vpliva na kompleksne lastnosti, s študijo primera za nalaganje maščobe.

1.1 CILJI RAZISKAVE

Cilj doktorske naloge je raziskati vlogo ncRNA pri nalaganju maščobe za miš, govedo in prašiča ter v ta namen:

- 1) izdelati genomski atlas za ncRNA "*ncRNA Genomics Atlas*";
 - a) zbrati znane gene za miRNA, snoRNA in UCR-je pri miši, govedu in prašiču,
 - b) določiti genomske lokacije ncRNA glede na zadnje verzije genoma,
 - c) proučiti genetsko variabilnost ncRNA genov ter njihovo prekrivanje z drugimi genomskimi elementi,
- 2) izdelati genomski atlas z ncRNA za nalaganje maščobe "*ncRNA Obesity Atlas*";
 - a) preveriti vpletost gostiteljskih genov v nalaganje maščobe pri vseh treh vrstah,
 - b) analizirati vpliv polimorfizmov v ncRNA genih na nalaganje maščobe pri miši,
 - c) na podlagi prekrivanj več lokusov identificirati pozicijska kandidatna območja za nalaganje maščobe.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na namen in cilje dela smo postavili dve hipotezi:

- 1) Z integracijo vseh do sedaj poznanih genetskih vzrokov za nalaganje maščobe je možno identificirati pozicijska kandidatna območja z ncRNA z večjim vplivom na to lastnost.
- 2) Genetska variabilnost ncRNA (miRNA, snoRNA in UCR) in njihovih tarč ter poznavanje njihovega uravnavanja nam omogoča razvijati nove potencialne genetske označevalce za nalaganje maščobe v inbridiranih linijah miši, slovenski populaciji bikov lisastega goveda v progenem testu in slovenskih lokalnih genotipih prašičev.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MAŠČOBNO TKIVO

Maščobe so za delovanje organizma nujno potrebne, vendar so pogosto omenjene le njihove negativne lastnosti. Najpomembnejša funkcija maščobnega tkiva je zagotavljanje energetskih potreb. Sestavlja ga funkcionalno specifična tkiva, udeležena pri vseh energetskih procesih. Pomembnost maščobnega tkiva se pokaže pri patološki izgubi letega. Maščobe so v prehrani v manjših količinah zelo pomembne, celo nepogrešljive, saj imajo pomembno prehransko-fiziološko vlogo in ne služijo le kot zaloga energije. Tako pre malo kot preveč maščob lahko predstavlja resno grožnjo zdravju in je povezana z razvojem sladkorne bolezni tipa 2, povišanim krvnim tlakom ter srčno žilnimi boleznimi (Klaus in Keijer, 2004).

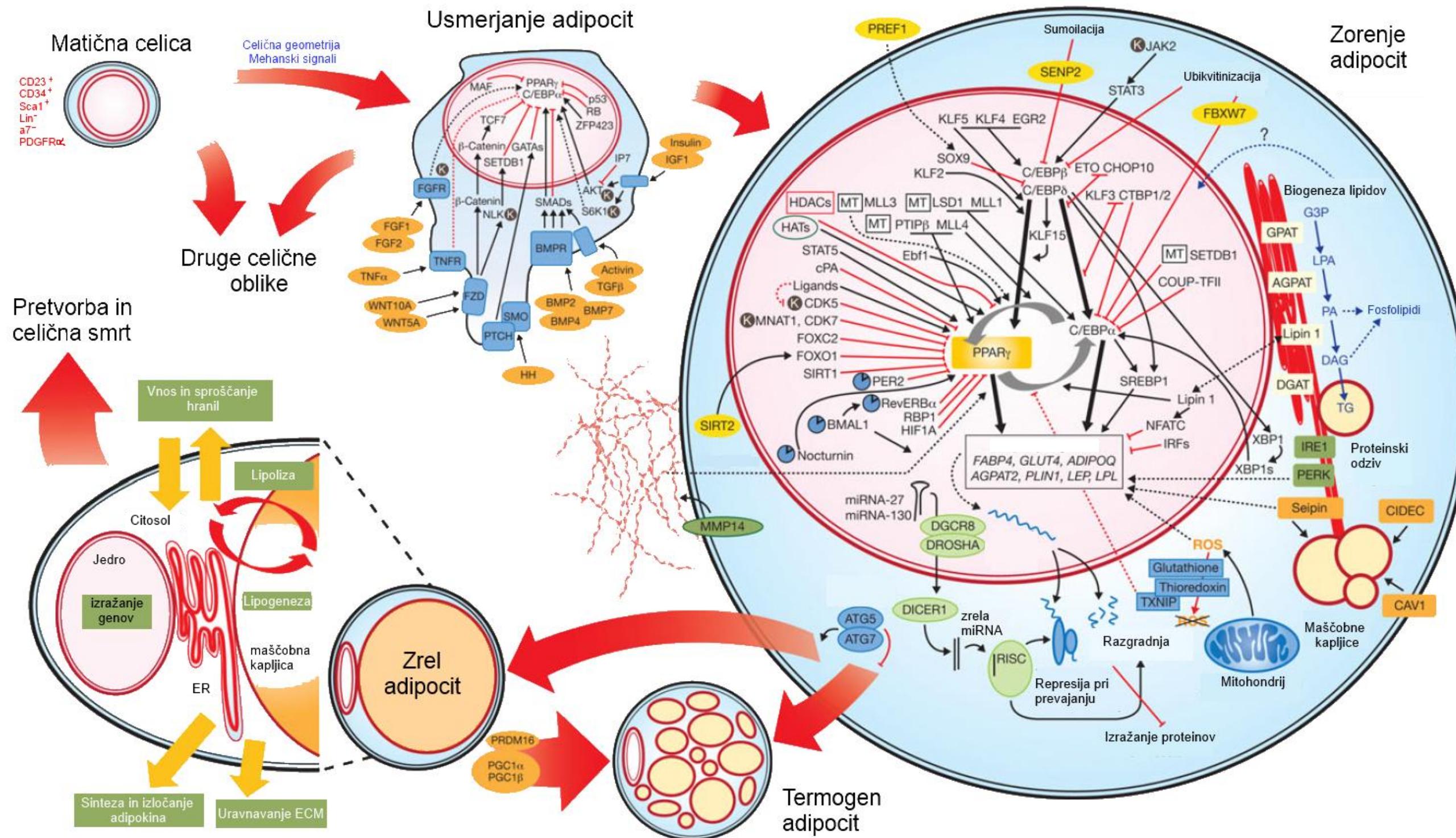
Po histološki funkciji ločimo dva tipa maščobnega tkiva; belo (angl. *white adipose tissue*; WAT) in rjavo (angl. *brown adipose tissue*; BAT). Bele adipocite najdemo v belem maščobnem tkivu in vsebujejo unilocularne lipidne kapljice, ki imajo večjo sposobnost skladiščenja maščob, kot rjave multilocularne lipidne kapljice (Trujillo in Scherer, 2006). Dejavnost BAT je bistveno višja od WAT, saj sodelujejo pri vzdrževanju telesne temperature, spodbujanju prezimovanja in porabi presežka energije iz hrane. Termogeneza BAT je zelo pomembna za presnovo pri dojenčkih, ki se z odraščanjem zmanjšuje in je pri odraslih osebkih zanemarljiva (Klaus in Keijer, 2004). Porazdelitev maščobnega tkiva je različna glede na spol, starost in vrsto. Belo maščobno tkivo delimo na podkožno in interno maščobno tkivo. Podkožno maščobno tkivo je definirano kot sloj maščobnega tkiva med dermisom in aponevrozami ter mišičnimi ovojnicami. Interno maščobno tkivo razdelimo na medmišično ali intermuscularno, medcelično mišično ali intramuscularno ter maščobo telesnih votlin in notranjih organov (Shen in sod., 2003). S tehnoškega in prehranskega vidika sta najpomembnejši mišična in podkožna maščoba (Žemva in sod., 2010). Podkožno maščobo pred zaužitjem zlahka ločimo od mesa, medtem ko je mišična maščoba v mišici prisotna kot celična ali medcelična maščoba. Večje količine intramuscularne maščobe so vidne kot mrežasto razporejene lise med vlakni, medtem ko manjše količine s prostim očesom praviloma ne zaznamo. Prisotnost vidne intramuscularne maščobe imenujemo marmoriranost, ki prispeva k dobrim senzoričnim lastnostim mesa, saj vpliva predvsem na mehkobo, sočnost, aroma in barvo.

2.1.1 Adipogeneza in nalaganje maščobe

Adipogeneza je proces diferenciacije maščobnih celic (adipocitov) iz mezenhimskih matičnih celic (angl. *mesenchymal stem cells*; MSCs), ki so praviloma obdane z drugimi celicami kot so fibroblasti, preadipocitne celice, endotelijskih celic, živčnih in imunskih celic (Cinti, 2005). Matične celice iz katerih izvirajo adipociti imajo sposobnost razviti se v različne tipe celic, kot so: adipociti, osteoblasti, hondrociti (angl. *chondrocytes*) in miociti (Lowe in sod., 2011). Med adipogenezo se celice maščobnega tkiva delijo in diferencirajo v celice, ki sprejemajo lipide (Akimoto in sod., 2005). Nastanek adipocitov iz izvornih celic vključuje kompleksen in zelo usklajen mehanizem izražanja genov (slika 1). Razumevanje delovanja prepisovalnih dejavnikov (angl. *transcription factor*; TF), ki uravnavajo adipogenezo je v zadnjih letih praktično nespremenjeno (White in Stephens, 2011). Pozornost raziskovalcev se je preusmerila na številne druge vidike razvoja maščobnih celic, vključno s prizadevanji za opredelitev, izolacijo in manipulacijo ustreznih prekurzorskih izvornih celic. Nedavne študije so pokazale nove biološke poti v MSC, ki lahko vplivajo na odločitev celic za njen razvoj v adipocit. Na ta proces vplivajo številni signali, vključno z zunajceličnimi dejavniki, kot so proteini za morfogenezo kosti (angl. *bone morphogenetic proteins*; BMPs) (Huang in sod., 2009), transformirajoči rastni faktor (angl. *transforming growth factor*; TGF) (Zamani in Brown, 2011), inzulinu podoben rastni faktor 1 (angl. *insulinlike growth factor 1*; IGF1) (Kawai and Rosen, 2010a), interlevkin 17 (angl. *interleukin 17*; IL17) (Zúñiga in sod., 2010), fibroblastni rastni faktor 1 (FGF1) (Widberg in sod., 2009), FGF2 (Xiao in sod., 2010) in aktivin (Zaragozi in sod., 2010). Nekateri dejavniki lahko na adipogenezo delujejo tako spodbujevalno, kot tudi zaviralno. Ob odkrivanju vse večjega števila TF-jev, ki nadzorujejo adipogenezo, so bili opisani tudi številni novi mehanizmi, ki urejajo njihovo delovanje. Že več let je namreč znano, da histonske acetiltransferaze (HATs) in histonske deacetilaze (HDACs) vplivajo na aktivnost TF-jev adipogeneze. Selektivno izbiranje različnih HATs in HDACs s strani PPAR γ omogoča temu TF-ju, da različno učinkuje na različne promotorje (Guan in sod., 2005). Integracija genomske analiz spremembe kromatina, strukture, izražanja mRNA in vezava TF-jev je prikazala dinamično preoblikovanje kromatina in njegov vpliv na izražanje genov (Mikkelsen in sod., 2010; Steger in sod., 2010). Mikro RNA predstavljajo nova odkritja mehanizmov za kontrolo izražanja genov.

Z izražanjem miRNA med diferenciacijo MSC pri človeku so našli miRNA sprožene v procesu adipogeneze (Oskowitz in sod., 2008). Izbitje gena *DICER1* ali *DROSHA*, ki kodirata istoimenska encima potrebna za funkcionalno tvorbo miRNA, zavira adipogenezo. Specifične miRNA, vključno z mir-130, mir-27 (Lin in sod., 2009) in mir-378 (Gerin in sod., 2010), lahko uravnavajo izražanje genov, ki nadzorujejo adipogenezo in lipogenezo. Poleg tega lahko posamezne miRNA vplivajo na več tarč ali delujejo skupaj (Singh in sod., 2009). To daje miRNA možnost za uravnavanje večih tarč na enoten način, ki modulirajo tako razvoj, kot njihovo funkcijo. Zapleti v procesu adipogeneze lahko vodijo do metabolnih bolezni, saj nepravilno delovanje maščobnih celic pomembno prispeva k presnovnim boleznim in debelosti (Unger in Scherer, 2010). Izboljšanje funkcije adipocitov in komplementacija ali zamenjava slabo delujočih adipocitov bi lahko ugodno vplivala na pogoste presnovne bolezni. Pri ljudeh se vsako leto zamenja približno deset odstotkov adipocitov, kar pomeni, da lahko zagotavljanje zadostne metabolne fleksibilnosti adipocitov znatno izboljša presnovne bolezni (Spalding in sod., 2008).

Maščobnokislinska sestava podkožne in mišične maščobe domačih živali je pomembna z vidika tehnološke in prehranske kakovosti. Uživanje hrane neustrezne kakovosti lahko privede do prekomernega nalaganja maščobe, to pa do številnih resnih bolezenskih stanj. Prehransko ugodna maščobnokislinska sestava pomeni večjo vsebnost večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK), med njimi tudi esencialnih α -linolenske in linolne maščobne kisline, in enkrat nenasičenih maščobnih kislin (ENMK) ter s tem nižjo vsebnost nasičenih maščobnih kislin (NMK) (Žemva in sod., 2010).



Slika 1: Diferenciacija maščobnih celic (adipogeneza). ECM: zunajcelični matriks (prirejeno po Lowe in sod., 2011)

Figure 1: Differentiation of fat cells (adipogenesis). ECM: extracellular matrix (adapted from Lowe et al., 2011)

2.1.2 Debelost

Debelost predstavlja povišano tveganje za številne bolezni, nesposobnost opravljanja vseh življenjsko pomembnih funkcij. Poznamo tri podskupine debelosti glede na vzrok njenega nastanka: sindromno, monogeno in poligeno debelost (Herrera in Lindgren, 2010). Za sindromno debelost je značilno, da so pacienti klinično debeli, imajo telesne okvare in razvojne anomalije specifičnih organov (npr. sindrom Prader Willi; PWS). Debelost, ki jo povzroči en sam gen, imenujemo monogena debelost in je resnejša v primerjavi s poligeno debelostjo, ki je posledica manjših prispevkov številnih genov. Študije poligene debelosti temeljijo na asociacijskih analizah fenotipskih lastnosti ter genotipov določenih s polimorfizmi posameznih nukleotidov (angl. *single nucleotide polymorphisms*; SNP) ali ponovitvami nukleotidov ((CA)_n ali mikrosatelitih) lociranih znotraj ali v bližini kandidatnega gena. Ti geni so vključeni v številne biološke funkcije, kot so: uravnavanje vnosa hrane, poraba energije, metabolizem glukoze in lipidov ter razvoj maščobnega tkiva (Mutch in sod., 2005; Mutch in Clément, 2006). Odkritje čim večjega števila lokusov za nalaganje maščobe je pomembno tako za razvoj orodij za identifikacijo visokega tveganja za debelost, kot tudi za izvajanje ciljnih terapij za debelost, ki bi pomagale pri nadzoru debelosti in z njo povezanih bolezni (Jiang in sod., 2007). Takšne informacije so zelo uporabne tudi za živinorejo, zaradi zahtev porabnikov po manj mastni in bolj zdravi hrani. Kljub temu daje mesu sočnost in mehkobo prav intramuskularna maščoba (IMF), zato je selekcija na zmanjšanje maščobnega tkiva in povišanje vsebnosti IMF cilj živinorejcev (Elías Calles in sod., 2000).

2.2 PROUČEVANJE KOMPLEKSNIH LASTNOSTI

V konvencionalni (angl. *forward*) genetiki lastnosti proučujemo v smeri od fenotipa do genotipa (Hardy in sod., 2010). V več kot 100 letih raziskav je bilo odkritih veliko spontanih ali izzvanih mutacij pri različnih vrstah. Na teh izsledkih raziskav temelji obratna genetika (angl. *reverse genetics*), ki se je pojavila v 80-ih letih z razvojem molekularnih orodij. Lastnost proučujemo v smeri od genotipa do fenotipa. Kompleksne genetske lastnosti so posledica interakcije večjega števila genov v kombinaciji z vplivi iz okolja. Za proučevanje teh lastnosti sta uveljavljena dva pristopa: asociacijska študija na ravni celotnega genoma (angl. *genome-wide association study*; GWAS) in pristop s kandidatnimi geni (angl. *candidate gene approach*; CGA). Pristop GWAS nudi pregled

kromosomskih regij QTL-ov s pomočjo DNA označevalcev na ravni družine ali populacije, ki običajno vsebuje veliko število kandidatnih genov. Pристop s kandidatnimi geni je v primerjavi z GWAS učinkovitejša in cenejša metoda za direktno odkrivanje kandidatnih genov. Pристop CGA se je izkazal kot zelo koristen pri proučevanju genetske strukture kompleksnih lastnosti in se veliko uporablja za raziskave genetskih bolezni, asociacijske analize, iskanje biooznačevalcev in tarčnih zdravil tako pri živalih kot pri ljudeh (Zhu in Zhao, 2007). Znani so trije pristopi za izbiro kandidatnih genov za mapiranje QTL-ov (Jiang in sod., 2009): 1.) fiziološki pristop (angl. *physiological approach*), ki temelji na genih z znano biološko funkcijo in delovanjem na razvoj ali fiziologijo proučevane lastnosti, 2.) pristop s pozicijskim kloniranjem (angl. *positional cloning approach*), ki upošteva gene v bližini prej identificiranih regij QTL-ov in 3.) primerjalni pristop, pri katerem lokuse z zanimimi polimorfizmi in njihovimi fenotipskimi učinki pri eni vrsti prouči kot kandidate za podobne variacije pri drugih vrstah (Jiang in sod., 2006).

Velik napredek na področju proučevanja kompleksnih lastnosti predstavlja razvijanje biooznačevalcev po metodi *in silico* na ravni celotnega genoma (angl. *genome-wide in silico screening; GWISS*) (Godnic in sod., 2013; Jevšinek Skok in sod., 2013). Gre za pristop, pri katerem zberemo, filtriramo ter analiziramo vse možne genomske podatke z različnih podatkovnih zbirk. V skladu z biološko ontologijo in kompleksnimi statističnimi metodami nato računalniško identificiramo potencialne kandidatne gene. Takšni analizi sledi eksperimentalno preverjanje.

2.2.1 Biološke mreže in poti

Učinkovito odzivanje posamezne celice na dražljaje v okolju narekujejo zapletene molekulske mreže. Informacije v primarnih podatkovnih zbirkah in v literaturi so zelo obsežne in njihova količina hitro narašča, zato jih je vedno težje vključiti v raziskave. Primernejše je zbiranje sklepov eksperimentov iz literature in podatkovnih zbirk v zbirke znanja, ki so sestavljene iz potrjenih bioloških metabolnih poti (Viswanathan in sod., 2008).

Sistemska biologija (angl. *systems biology*) se osredotoča na pridobivanje kvantitativnih opisov celotnih bioloških sistemov, vključno s celičnimi funkcijami. Na ta način je mogoče izvajati računalniško vodeno razvijanje novih zdravil, naprednih terapij za zdravljenje kompleksnih bolezni, in *in silico* razvoj kemikalij, sestavin živil in farmacevtskih izdelkov. Vključuje tako kombinacijo novih eksperimentalnih tehnik iz različnih disciplin, kot tudi funkcionalno genomiko, bioinformatiko in matematično modeliranje, zaradi česar so podatki dostopnejši (Mustacchi in sod., 2006). Njen cilj je identificirati določene genetske in molekularne značilnosti za boljšo diagnostiko bolezni (Vodovotz in sod., 2008). Pravilno izvajanje kompleksnih bioloških sistemov poteka z usklajevanjem velikega števila dogodkov in njihovih sodelujočih komponent. Razumevanje razvojnih in celičnih dogodkov na molekularni ravni je postalo osrednje vprašanje sodobne molekularne biologije. Sistematični pristopi študij velikega števila proteinov, metabolitov ter njihovih modifikacij so razkrili kompleksne molekularne mreže. Analiza teh mrež omogoča nove vpoglede v razumevanje osnovnih mehanizmov, ki nadzorujejo normalne celične procese in patologije bolezni. Pojav visoko zmogljivih tehnik je omogočil obsežno identifikacijo komponent (genov, RNA in proteinov), njihovih vzorcev izražanja in njihove biokemijske in genetske interakcije. Koristne so za pridobivanje velike količine bioloških podatkov in nam dajo dragocene informacije o funkcijah posameznih komponent in nepričakovane povezave med komponentami in celičnimi procesi (Zhu in sod., 2007). Podatke o medsebojnem delovanju molekul, zbrane s pomočjo individualnih študij in obsežnimi pregledi lahko sestavimo v obliki mreže, katere topološka struktura vsebuje značilne biološke lastnosti (npr.: proteinske interakcije, fosforilacijo proteinov, presnovne interakcije in mreže genetskih interakcij). Interakcije so pogosto združene v mreže, sestavljene iz proteinov (ali genov), imenovanih vozlišča in povezav med njimi, opredeljenih kot robovi (v neusmerjenih mrežah) ali loki (v usmerjenih mrežah). Usmerjenost mreže je odvisna od značilnosti bioloških podatkov. Mreže proteinskih in genetskih interakcij so običajno predstavljene v neusmerjeni mreži, medtem ko so vezava TF-jev, fosforilacija in presnovne mreže usmerjene interakcije. Topologija mreže ima ključno vlogo pri razumevanju arhitekture le-te. Številne pogosto uporabljene topološke lastnosti vključujejo stopnjo (angl. *degree*), premer (angl. *diameter*), koeficient grupiranja (angl. *clustering coefficient*), razdaljo oz. dolžino poti (angl. *distance*) in v mestnost (angl. *betweenness*) (Albert, 2007).

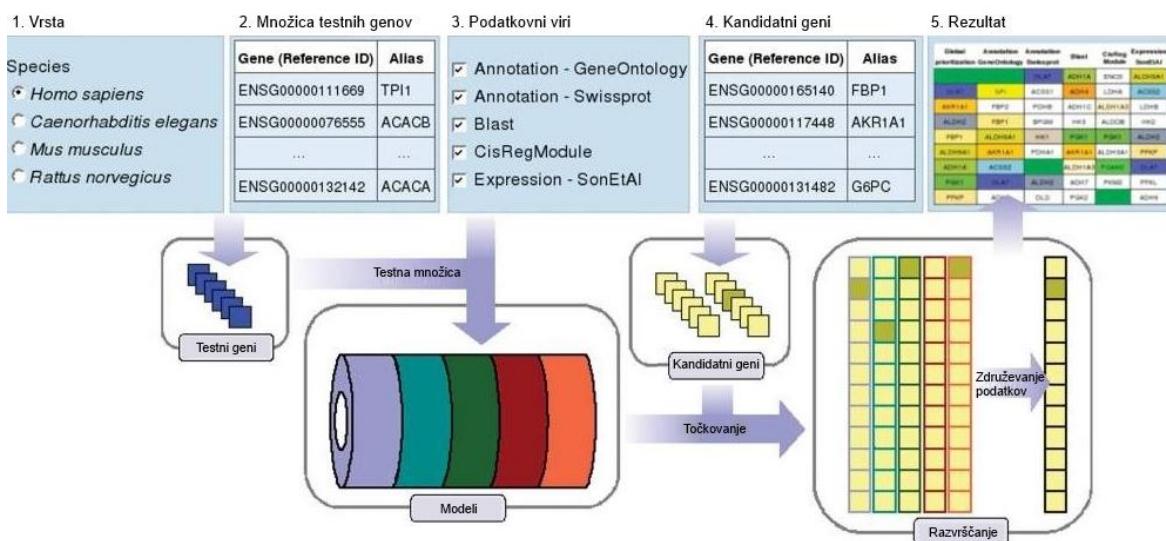
V prihodnosti bo mogoče zgraditi bolj popolne in natančne mreže, na primer z identifikacijo tarč vseh relevantnih TF-jev in določitev mrež proteinskih interakcij pri ljudeh in številnih drugih organizmih. Integracija vseh interakcij oz. modifikacij, skupaj z njihovo dinamiko bo razkrila, kako kompleksni so biološki procesi, kot so celična proliferacija in razvoj in kako jih je mogoče nadzorovati (Zhu in sod., 2007).

Analize bioloških poti se nanašajo na računalniške pristope, ki se uporabljam za preiskovanje obnašanja omrežja kot sistema. Na splošno jih lahko razvrstimo v dve vrsti: strukturne analize omrežja in dinamične analize. Strukturalna analiza poti opredeljuje globalne kvalitativne, medtem ko dinamična analiza (matematično modeliranje z višjo resolucijo) pojasnjuje podrobne kvantitativne lastnosti sistema. Dinamična analiza zahteva več informacij o reakcijskih parametrih in več začetnih pogojev, kot strukturni pristop (Viswanathan in sod., 2008).

2.2.2 Razvrščanje kandidatnih lokusov po prioriteti

Namen razvrščanja genov po prioriteti (angl. *gene prioritization*) je identifikacija najbolj obetavnih genov v množici kandidatov z integracijo prosto dostopnih in lastnih genomskega podatkov (Masoudi-Nejad in sod., 2012). Cilj razvrščanja genov po prioriteti je povečati doprinos eksperimentalnemu potrjevanju ali funkcionalnim analizam s poudarkom na bolj obetavnih kandidatnih genih. Trenutno najpogosteje uporabljeni pristopi sta iskanje vzročnih genov za bolezni na ravni celotnega genoma in na podlagi kandidatnih genov. Prvi pristop temelji na analizi celotnega genoma brez predhodnih predpostavk o funkcionalnih značilnostih proučevanih lastnosti. Za iskanje vzročnih genov za kompleksne lastnosti se je kot zelo zanesljiv pokazal pristop s kandidatnimi geni (Chen in sod., 2009a). Z obema pristopoma dobimo množico lokusov s potencialnim vplivom na proučevano lastnost, zato je nujno te lokuse pričeti razvrščati glede na prioriteto. V ta namen so bila razvita številna bioinformacijska orodja, ki večinoma temeljijo na do sedaj znanih podatkih o kandidatnih genih in povezovanju genov z biološkimi procesi (Tranchevent in sod., 2011). Nekatera izmed omenjenih orodij so: Endeavour (Aerts in sod., 2006; Tranchevent in sod., 2008), TOPPGENE (Chen in sod., 2009b), PiNGO (Smoot in sod., 2011), BITOLA (Hristovski in sod., 2005), PHENOPRED (Radivojac in sod., 2008), GENE PROSPECTOR (Yu in sod., 2008), PGMAPPER (Xiong in sod., 2008) in drugi.

Trenutna verzija orodja Endeavour omogoča analizo pri štirih vrstah, in sicer: človeku, miši, podgani in nematodi *C. elegans*. Razvrščanje genov po prioriteti vključuje štiri korake (slika 2). Po izboru vrste, uporabnik iz različnih virov podatkov določi množico testnih genov. Ti testni geni so nato razvrščeni glede na točkovanie v modelu. Kot rezultat dobimo, za vsak vir podatkov, seznam kandidatnih genov razvrščenih po prioriteti. V zadnjem koraku Endeavour združi vsako od teh razvrstitev iz različnih virov podatkov v eno samo razvrstitev in s tem omogoči prioritizacijo posameznega testnega gena.

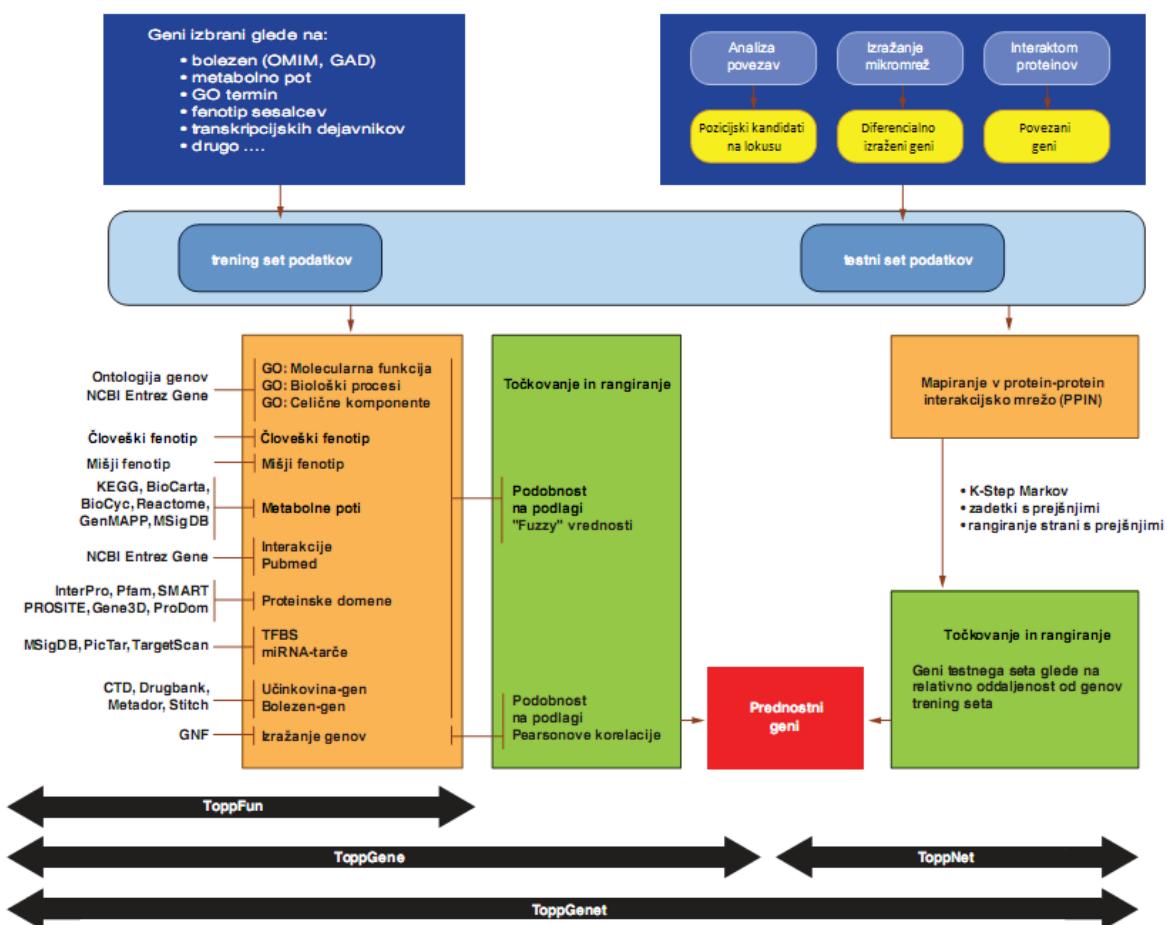


Slika 2: Shema delovanja orodja Endeavour (Tranchevent in sod., 2008)

Figure 2: Operating diagram of Endeavour tool (Tranchevent *et al.*, 2008)

ToppGene Suite je prosto dostopna podatkovna zbirka sestavljena iz štirih sklopov: ToppFun, ToppGene, ToppNet in ToppGeNet. Shematski prikaz organizacije in delovanja podatkovne zbirke ToppGene Suite je prikazan na sliki 3 (Chen in sod., 2009). Geni v učni množici so določeni na podlagi njihovih parametrov ali trenutni določitvi genov (geni povezani z boleznimi, fenotipi, biološkimi potmi ali terminom genske ontologije. Vir testne množice genov so lahko kandidatni geni iz analize povezav ali analiz diferenčnega izražanja genov. Sklop ToppFun združuje informacije o določitvi funkcije genov iz številnih podatkovnih zbirk in je s tem vključen v izgradnjo učne množice genov. V sklopu ToppGene izračunamo oceno podobnosti za vsak testirani gen s primerjavo obogatenih izrazov v učni množici genov. Končni seznam genov, razporejenih po prioriteti, je izračunan na podlagi agregatnih vrednosti štirinajstih ocen podobnosti.

V sklopu ToppNet, sta testna in učna množica genov, prikazani kot mreža proteinskih interakcij. Trenutna verzija orodja omogoča analize samo za človeka in miš, kaj je največja pomanjkljivost, sicer zelo uporabnega, orodja.



Slika 3: Shematski prikaz delovanja podatkovne zbirke ToppGene Suite (Chen in sod., 2009)

Figure 3: Schematic representation of workflow of the ToppGene Suite database (Chen et al., 2009)

PiNGO je orodje za iskanje kandidatnih genov v bioloških mrežah (Smoot in sod., 2011). Uporabnik lahko omeji iskanje na gene s posebnimi znanimi funkcijami ali izključi gene določenega funkcionalnega razreda. PiNGO zagotavlja podporo za številne organizme in sheme ontologije genov in ga je mogoče enostavno prilagoditi za druge organizme in funkcionalne klasifikacije. PiNGO se izvaja kot vtičnik za Cytoscape, priljubljeni orodje za vizualizacijo mrež.

BITOLA je interaktivni biomedicinski podporni sistem, ki temelji na zbiranju literature (Hristovski in sod., 2005). Namen sistema je pomagati raziskovalcem pri odkrivanju novih

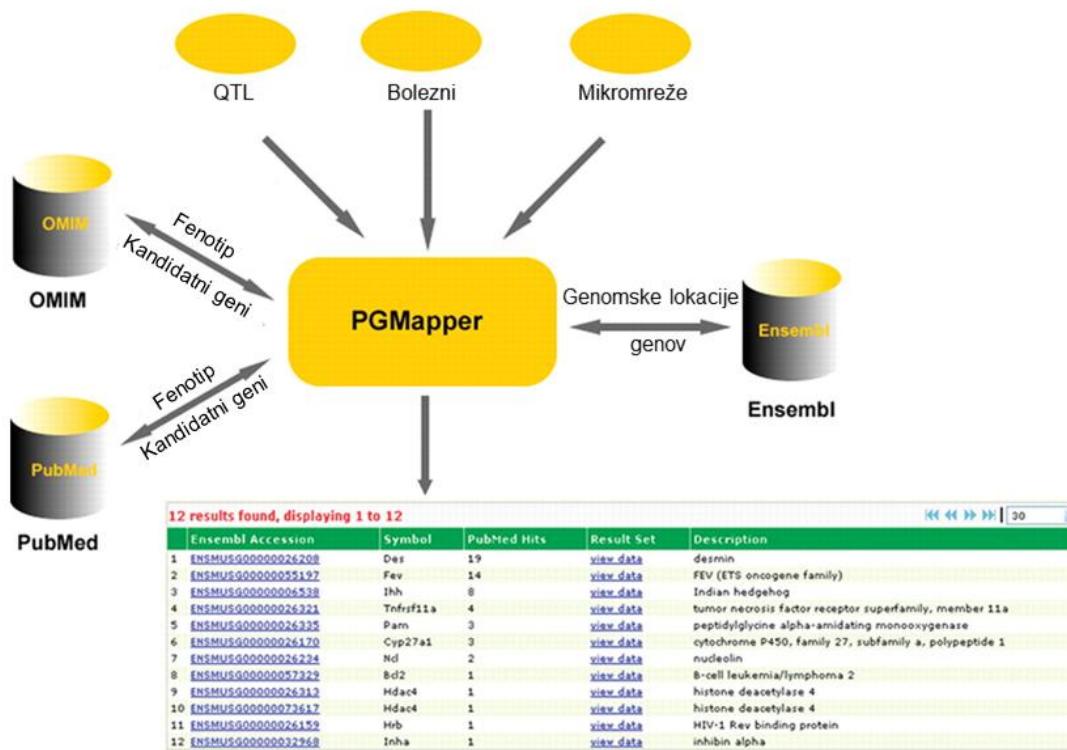
odnosov med biomedicinskimi koncepti s pregledom bibliografske podatkovne zbirke MEDLINE®. Sistem je obogaten z znanji o znanih kromosomskih lokacijah bolezni, kakor tudi kromosomskih lokacijah kandidatnih genov iz virov, kot so Entrez Gene, HUGO in OMIM. Sistem BITOLA se lahko uporablja tudi kot alternativni način za iskanje po podatkovni bazi MEDLINE® (www.mf.uni-lj.si/bitola).

PhenoPred (<http://www.phenopred.org/>) je spletno orodje za odkrivanje novih povezav med geni in boleznimi pri ljudeh. Temelji na znanih povezavah gen-bolezen, podatkih o proteinskih interakcijah, funkcionalnih povezavah proteinov na molekularni ravni in podatkih o aminokislinskem zaporedju proteinov. Principi strojnega učenja se uporabljam za integracijo heterogenih podatkovnih virov. PhenoPred za svoje delovanje uporablja podatkovni zbirki HUGO Gene Nomenclature za gensko nomenklaturo in Disease Ontology (DO) za imena bolezni. Orodje lahko uporabljam za razvrščanje genov po prioriteti glede na verjetnost, da je gen povezan z določeno boleznijo ali za prioritizacijo bolezni za določen gen.

Gene Prospector (Yu in sod., 2008) je ena od komponent zbirke HuGE Navigator, integrirane zbirke znanja genetskih povezav in sorodnih informacij epidemiologije človeškega genoma. Gene Prospector je bioinformacijsko orodje za razvrščanje, rangiranje in prikaz informacij o genih v povezavi s človeškimi boleznimi, dejavniki tveganja in drugih fenotipov. Iskalni pojmi lahko vključujejo bolezni, dejavnike tveganja in fenotipe. Orodje je prosti dostopno na naslovu URL:

<http://www.hugenavigator.net/HuGENavigator/geneProspectorStartPage.do>.

PGMapper (<http://www.genediscovery.org/pgmapper/index.jsp>) je programsko orodje za samodejno usklajevanje fenotipa z geni iz določene genomske regije ali skupine podanih genov (Xiong in sod., 2008). Združuje podatke o genomske lokacijah genov iz podatkovne zbirke Ensembl in informacije o funkciji genov iz zbirk OMIM in PubMed (slika 4). Orodje je bilo izdelano leta 2008 in je bilo do junija 2013 štirikrat posodobljeno. Trenutna verzija orodja PGMapper omogoča iskanje kandidatnih genov za 43 vrst, vključno z rastlinami.

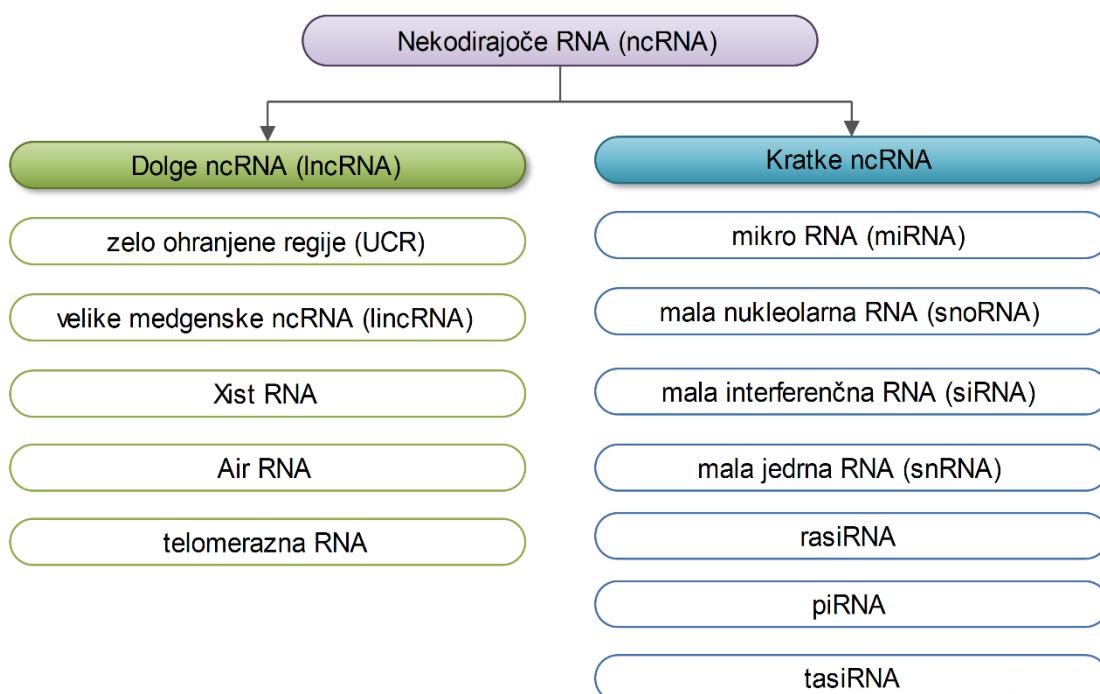


Slika 4: Tok informacij za iskanje kandidatnih genov z orodjem PGMapper (Xiong in sod., 2008)

Figure 4: Information flow of candidate gene search using PGMapper tool (Xiong et al., 2008)

2.3 NEKODIRAOČE RNA

V celici so poleg informacijske RNA (angl. *messenger RNA*; mRNA) tudi RNA, ki ne kodirajo proteinov (ncRNA). Udeležene so v uravnavanje izražanja genov in predstavljajo večinski delež RNA v celici (Buckingham, 2003). V zadnjem desetletju število identificiranih ncRNA strmo narašča, kar kaže na to, da naše razumevanje zgradbe genoma in komponent funkcionalnih mrež še zdaleč ni popolno (Costa, 2007). Znana je vloga ncRNA v osnovnih celičnih procesih, kot so procesiranje RNA, uravnavanje izražanja genov med razvojem in diferenciacijo na transkripcijski, potranskripcijski in/ali translacijski ravni, vendar je mnogo funkcij ncRNA še vedno neznanih (Bejerano in sod., 2004; Mercer in sod., 2009). Geni, ki kodirajo ncRNA, se prepišejo v prepise, ki delujejo kot strukturne, katalitične ali regulatorne molekule RNA. Nekodirajoče RNA so lahko vključene v prevajanje RNA (ribosomska RNA in prenašalna RNA) ali izrezovanje intronov iz prekurzorske mRNA (majhna jedrna RNA), medtem ko imajo druge sposobnost spremiščanja ostalih skupin ncRNA (Ferdin in sod., 2010). Nekodirajoče RNA trenutno razvrščamo na podlagi dolžine na dolge ncRNA (angl. *long non-coding RNA*; lncRNA) in kratke ncRNA (Mercer in sod., 2009; Kunej in sod., 2012a) (slika 5). Trenutno najbolj proučevani razredi kratkih ncRNA so: miRNA, mala interferenčna RNA (angl. *small interfering RNA*; siRNA), rasiRNA (angl. *repeat-associated siRNA*), mala jedrna RNA (angl. *small nucleolar RNA*; snRNA), snoRNA, piRNA (angl. *PIWI-interacting RNA*) in tasiRNA (angl. *trans-acting siRNA*). Vedno več pozornosti so deležne tudi dolge ncRNA. Med lncRNA spadajo zelo ohranjene genomske regije (angl. *ultraconserved regions*; UCR), Air RNA (angl. *antisense IGF2R RNA*), Xist RNA (angl. *X-inactive specific transcript (non-protein coding)*), velike medgenske ncRNA (angl. *large intergenic non-coding RNAs*; lincRNA), telomerazne RNA in številne druge.



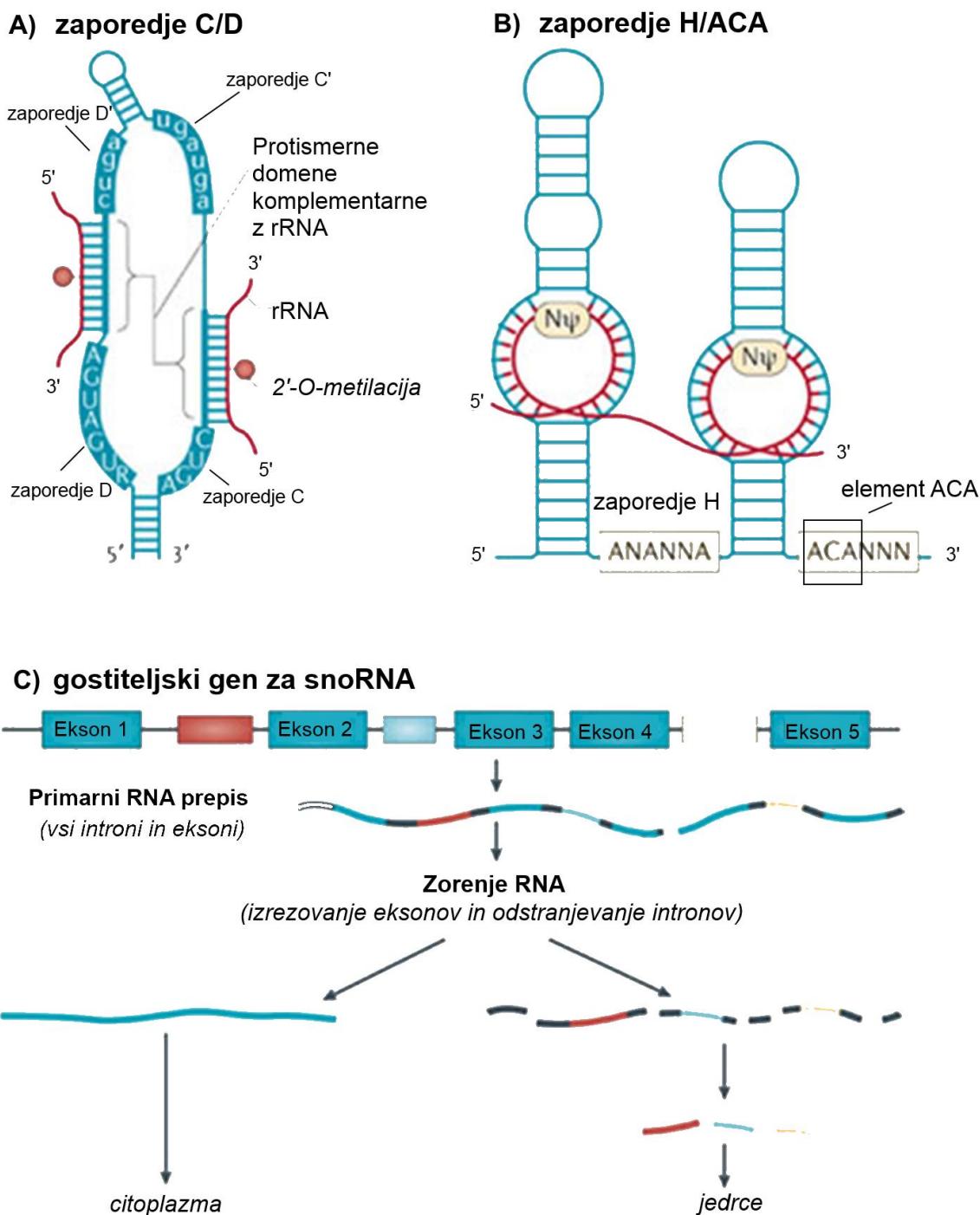
Slika 5: Razdelitev molekul ncRNA (prijejeno po Kunej in sod., 2012a). Air RNA: antisense IGF2R RNA; piRNA: PIWI-intreracting RNA; rasiRNA: repeat-associated siRNA; tasiRNA: trans-acting siRNA; Xist RNA: X-inactive specific transcript RNA

Figure 5: Classification of ncRNA molecules (adapted from Kunej et al., 2012a). Air RNA: antisense IGF2R RNA; piRNA: PIWI-intreracting RNA; rasiRNA: repeat-associated siRNA; tasiRNA: trans-acting siRNA; Xist RNA: X-inactive specific transcript RNA

2.3.1 Mala nukleolarna RNA (snoRNA)

Mala nukleolarna RNA pri sesalcih je nekodirajoča RNA dolžine 60-300 baznih parov (Kiss-Laszlo in sod., 1996; Tollervey in Kiss, 1997; Weinstein in Steitz, 1999; Mattick in Makunin, 2006). Kot pove ime samo, se snoRNA nahaja v jedrcu (angl. *nucleolus*) in kot posebna oblika snoRNA v Cajalovih telescih, to je mala za Cajalova telesca značilna RNA (angl. *small cajal body-specific RNA*; scaRNA) (Tycowski in sod., 2009). Zanje je značilno, da vodi nekatere kemijske spremembe nukleotidov drugih nekodirajočih RNA. Večina snoRNA vodi spremembe po translaciji rRNA (angl. *posttranslational modifications*). Te spremembe so pomembne za tvorbo ustreznih ribosomov (Decatur in Fournier, 2002). Male nukleolarne RNA delimo v dva razreda: snoRNA C/D (angl. *C/D box snoRNA*) (slika 6a) z zaporedjem C in D ter snoRNA H/ACA (angl. *H/ACA box snoRNA*) (slika 6b) z zaporedjem H in elementom ACA (Williams in Farzaneh, 2012).

Kratke zanke te elemente približajo drug drugemu in tako tvorijo male nukleolarne ribonukleoproteine (angl. *small nucleolar ribonucleoprotein*; snoRNAP) (Kiss, 2001). Male nukleolarne RNA so udeležene v dva različna tipa sprememb po translaciji: zaporedje C/D tvori tarčno mesto za 2'-O-metilacijo ribosomov (angl. *2'-O-ribosome methylation*), medtem ko zaporedje H/ACA tvori tarčno mesto za pretvorbo uridinov v psevdouridine (Williams in Farzaneh, 2012). Pri sesalcih je večina zapisov za snoRNA v intronih gostiteljskih genov (Tycowski in sod., 1996; Smith in Steitz, 1998; Dieci in sod., 2009). Vendar so snoRNA in miRNA mobilne, zato povezava inton-RNA evolucijsko ni povsem stabilna (Hoeppner in sod., 2009). Mala nukleolarna RNA, ki se nahaja znotraj intronov protein-kodirajočih genov, se prepiše v pre-mRNA gostiteljskega gena. Kot posledica so tkivno specifične snoRNA, med katerimi so najbolj zanimive snoRNA, specifične za možgane. Proteini snoRNP se že v tej fazи vežejo na zaporedje snoRNA v intronu. Med izrezovanjem intronov iz pre-mRNA se izrežejo tudi geni za snoRNA (slika 6c). Mala nukleolarna RNA se po eksonukleolitičnem procesiranju preseli v Cajalovo telesce, kjer poteka nadaljnje zorenje, od tam pa kot zrela snoRNA v jedrce, kjer opravlja svojo nalogu.



Slika 6: Sekundarni struktura snoRNA. A) snoRNA C/D in B) snoRNA H/ACA ter C) sinteza snoRNA pri sesalcih (prirejeno po Williams in Farzaneh, 2012)

Figure 6: Secundary structure of snoRNA. A) snoRNA C/D and B) snoRNA H/ACA and C) synthesis of snoRNA in mammals (adapted from Williams and Farzaneh, 2012)

Glavna vloga snoRNA je enaka v vseh organizmih, v katerih je prisotna, vendar se tako organizacija v genomu kot tudi strategija izražanja genov za snoRNA med vrstami zelo razlikuje. Geni za snoRNA se lahko prepisujejo neodvisno, imajo lasten promotor, ali pa so v intronih drugih genov. Prepisovanje genov za snoRNA znotraj intronov je lahko odvisno ali neodvisno od izrezovanja le-teh. V obeh primerih se lahko pojavijo kot en sam gen ali kot gruča več genov snoRNA (Chanfreau in sod., 1998; Petfalski in sod., 1998; Qu in sod., 2001; Brown in sod., 2008). Izražanje različnih snoRNA se lahko zelo razlikuje glede na to v intronu katerega protein-kodirajočega gena se nahaja ter okoljskih ali drugih dejavnikov (Dieci in sod., 2009). Evolucijsko se ohranjajo le geni, ki imajo visoko raven izražanja, zato snoRNA najdemo predvsem v intronih vzdrževalnih genov (angl. *housekeeping genes*), saj so se zaradi visoke ravni izražanja izkazali za idealni gostiteljski gen za snoRNA. Mutacije v snoRNA genih, epigenetsko utišanje ali povišano izražanje teh genov lahko privede do različnih bolezni, kot so sindrom Prader-Willi, avtizem, multipla skleroza in različne oblike raka.

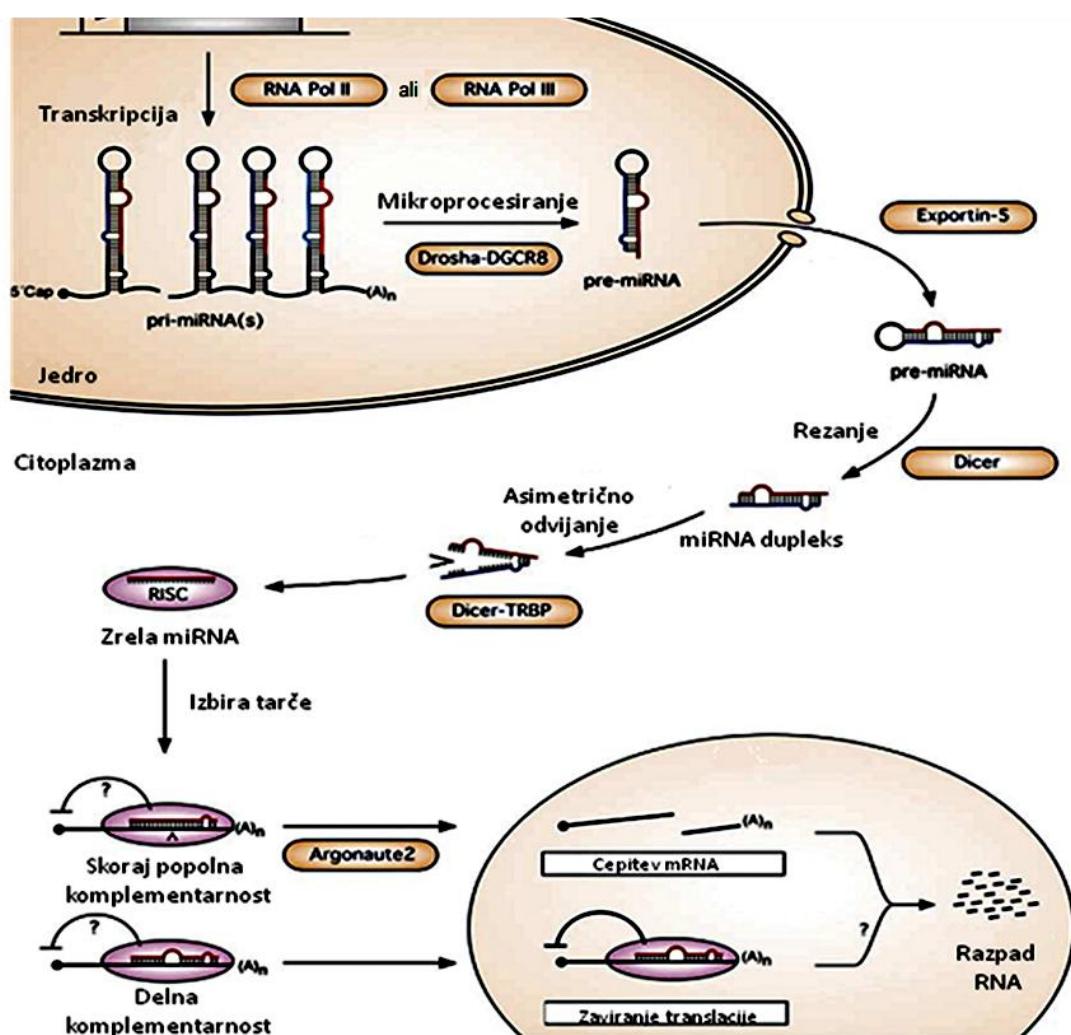
2.3.2 Mikro RNA (miRNA)

Mikro RNA so kratke nekodirajoče molekule RNA dolžine 21 nukleotidov, katerih baze se po transkripciji povežejo z mRNA. Več kot 30 % miRNA je povezanih z uravnavanjem genov znotraj genoma človeka. Geni za miRNA so približno 50-krat kraši od genov, ki kodirajo proteine. Za razliko od genov za snoRNA, geni za miRNA niso tako pogosto zastopani v intronih drugih genov, vendar pa nekatere miRNA izvirajo iz prekurzorjev snoRNA (Dieci in sod., 2009).

Zorenje manjših molekul pri procesiranju snoRNA je lahko ključ do razumevanja vloge snoRNA v celici. Ender (2008) je dokazal, da med procesiranjem zaporedja H/ACA snoRNA ACA45 procesira 20-25 nukleotidov dolge molekule RNA, ki so podobne miRNA, povezane s proteini Argonaut (AGO) in tarčno specifične mRNA vključno s CDK11 v celici. Študije so pokazale, da se lahko zaporedja H/ACA (Scott in sod., 2009) in zaporedja C/D (Ono, 2011) procesirajo v male RNA, nekaj tudi v miRNA. Procesiranje snoRNA do funkcionalnih malih RNA, vključno z miRNA, je lahko razlog za njihove regulatorne funkcije, vendar je o tem znanega premalo (Esquela-Kerscher in Slack, 2006; Brameier in sod., 2011; Ono, 2011; Scott in Ono, 2011).

Mikro RNA prepiše RNA polimeraza II (RNA Pol II) ali polimeraza III (RNA Pol III), kot prekurzor molekule s kapo na 5' koncu in 3' repom poli-A (slika 7). Ti daljši prepisi genov primarne miRNA (pri-miRNA) se zrežejo s pomočjo kompleksa DROSHA – DGCR8 (pri nekaterih vrstah znan tudi pod imenom Pasha), ki naredi zankasto strukturo – prekurzorsko miRNA (pre-miRNA) dolgo približno 70 nukleotidov. Encim DROSHA spada med endonukleaze RNaze III, medtem ko je DGCR8 vezavni protein, ki služi kot merilo za mesto reza oddaljenega 11 nukleotidov od zanke. S tem se zaključi prva faza procesiranja miRNA, ki poteka v jedru. Ekspordin-5 z GTP vezavnim proteinom Ran tvori jedrno transportni kompleks, ki prenese pre-miRNA skozi jadrne pore v citoplazmo (Chu in Rana, 2007; Jeffrey, 2008).

Po prehodu pre-miRNA iz jedra v citoplazmo encim Dicer razreže pre-miRNA na približno 22 nukleotidov dolge dvostranske RNA molekule, ki jih imenujemo zrele miRNA (angl. *mature miRNA*). Dicer je RNaza III, ki je bil prvotno odkrit v svoji vlogi utišanja genov, kjer procesira dolge dvostranske RNA v siRNA in usmerja RNA-interferenco (RNAi). Dicer se veže z vezavnim proteinom TRBP (angl. *TAR RNA binding protein*), kar najverjetneje prenosti iniciatorski in efektorski korak delovanja miRNA. Zrela miRNA je vstavljeni v ribonukleoproteinski kompleks - miRNP, ki je podoben kompleksu RISC (angl. *RNA-induced silencing complex*), ki je efektor RNAi (Kim, 2005; Wienholds in Plasterk, 2005; Taccioli in sod., 2009). Del zrele miRNA, 2-7 oz. 2-8 nukleotidov na 5'-koncu miRNA, imenovano tudi območje »seed«, je odgovoren za prepoznavanje in vezavo miRNA na mRNA in s tem ključnega pomena za uravnavanje izražanja tarčnih genov (Sun in sod., 2009).



Slika 7: Model za biogenezo miRNA pri sesalcih (prijejeno po Wienholds in Plasterk, 2005)

Figure 7: A model for the miRNA biogenesis in mammals (adapted from Wienholds and Plasterk, 2005)

Spremembe v vzorcu izražanja miRNA so lahko posledica polimorfizmov v genih za miRNA, njihovih tarčah ali genih, ki kodirajo proteine sodelujoče v biogenezi miRNA (angl. *silencing machinery*). Izraz miR-SNP se nanaša na polimorfizem v miRNA genu, medtem ko miR-TS-SNP označuje SNP-je v tarčnih mestih (angl. *target sites*; *TS*) za vezavo miRNA na mRNA (Sun in sod., 2009). Polimorfizmi v genih za miRNA spremenijo njihov zapis in s tem omogočijo, izničijo ali zmanjšajo sposobnost vezave na tarčno mesto (Saunders in sod., 2007).

2.3.3 Zelo ohranjene regije genoma (UCR)

O zaporedjih UCR, ki spadajo med dolge nekodirajoče RNA, je znanega zelo malo. Zelo ohranjene genomske regije so definirane kot genomski odseki daljši od 200 bp, popolnoma ohranjeni med genomi človeka, miši in podgane (Bejerano in sod., 2004). Do sedaj so jih odkrili 481. Veliko teh regij kaže tudi veliko stopnjo ujemanja z genomi kokoši in psa (95-99 %), mnoge so močno ohranjene tudi pri ribah. Čeprav te regije predstavljajo majhen delež genoma, naj bi imele pomembno vlogo pri uravnavanju genov. Pogosto se prekrivajo z eksoni genov, ki so vključeni v procesiranje RNA, ležijo v intronih ali njihovi okolici, ki so vpleteni v uravnavanje prepisovanja in razvoja. Znano je, da so UCR-ji razporejeni po celotnem genomu; v genomu človeka se nahajajo na vseh kromosomih, razen na kromosomih 21 in Y. Glede na njihovo lokacijo UCR-je razdelimo v delno-eksonske (angl. *partly exonic*), neeksonske (angl. *non-exonic*) in potencialno-eksonske (angl. *possibly exonic*) elemente (Bejerano in sod., 2004). Visoka ohranjenost zaporedij še ni nujno ključna za preživetje organizma. To so z delecijo štirih UCR-jev pri miši dokazali Ahituv in sodelavci (2007). Znotraj UCR-jev so pri človeku našli 31 polimorfizmov (Bejerano in sod., 2004; Wojcik in sod., 2010; Shen in sod., 2011). Ti rezultati potrjujejo dejstvo, da so UCR-ji mesta z zelo nizko stopnjo variabilnosti pri zdravi populaciji (Wojcik in sod., 2010).

2.3.4 ncRNA povezane z nalaganjem maščobe

Polimorfizmi v miRNA (miR-SNP) vplivajo na biološke funkcije miRNA in s tem na uravnavanje genov, vključenih v številne biološke poti, kot so: celična smrt, celična proliferacija, odpornost na stres in metabolizem maščob. Mikro RNA lahko povzročijo povišano ali znižano izražanje tarčnih protein-kodirajočih genov z vezavo na njihove 3'-UTR, 5'-UTR, promotorske ali kodirajoče regije tarčnih genov (Kunej in sod., 2012b). Genske variabilnosti v miRNA tarčah, miRNA genih in genih, ki kodirajo proteine za procesiranje miRNA prispevajo k razlikam v fenotipu (Mishra in sod., 2008). Georges in sod. (2007), te genske variabilnosti povezujejo z dovetnostjo za bolezni in proizvodnimi lastnostmi. Polimorfizmi v genih za miRNA lahko vodijo v pridobitev ali izgubo funkcije miRNA, kar je odvisno od tega ali delujejo na vezavno mesto za miRNA, ga generirajo ali degenerirajo. V predhodnih raziskavah so bile izmed ncRNA z nalaganjem maščobe direktno povezane le miRNA (Romao in sod., 2011). Mikro RNA uravnavajo izražanje

genov in igrajo ključno vlogo pri različnih bioloških procesih, kot so: diferenciacija celic, proliferacija, celična smrt, metabolizem in energetska homeostaza (Bao in sod., 2011). Številne študije potrjujejo vpliv miRNA tudi na uravnavanje diferenciacije adipocitov (Esau in sod., 2004; Kajimoto in sod., 2006; Georges in sod., 2007; Ortega in sod., 2010). Med kratkimi ncRNA so bile v povezavi s PWS z debelostjo posredno povezane le še snoRNA (Sahoo in sod., 2008; de Smith in sod., 2009), morebitna vpletjenost ostalih ncRNA v razvoj debelosti še ni poznana. Izražanje 21-ih miRNA je v popolnoma diferenciranih adipocitih modulirano deveti dan in ne v zgodnjih fazah diferenciacije, kar kaže na to, da lahko miRNA modulirajo funkcijo adipocitov po diferenciaciji, ne da jo sprožijo. Delecija miR-14 pri *D. melanogaster* (dme-miR-14) je povzročila povišanje ravni triacilgliceridov in diacilgliceridov, medtem ko ima povišano število kopij miR-14 obraten učinek. Iz tega lahko sklepamo, da bi bile miRNA lahko vključene v uravnavanje metabolizma maščobe, vendar gena, ki bi ustrezal dme-miR-14 v genomu sesalcev še niso našli.

Z namenom, da bi odkrili miRNA, pomembne med diferenciacijo adipocitov, so protismerne oligonukleotide (angl. *antisense oligonukleotides*; ASO), ki ciljajo 86 človeških miRNA transficirali v kultivirane človeške pre-adipocite in ocenili njihovo sposobnost modulacije adipocitov. Z inhibicijo miRNA v pre-adipocitih z uporabo oligonukleotidov ASO v kombinaciji z analizo izražanja miRNA v diferencirajočih se adipocitih je bila odkrita ena miRNA; miR-143, ki ima funkcijo spodbujanja diferenciacije adipocitov (Esau in sod., 2004; Xie in sod., 2009). Analize so pokazale, da je med diferenciacijo adipocitov rahlo povečano izražanje dveh razredov miRNA, miR-143 in družine miR-17/92. Inhibicija izražanja miR-143 z ASO povzroči inhibicijo adipogeneze *in vitro*, medtem ko čezmerno izražanje miR-143 nekoliko poveča tvorbo adipocitov *in vitro* (Lin in sod., 2009).

Identifikacija miR-143, kot pomembnega regulatorja diferenciacije adipocitov kaže na to, da so miRNA potencialne tarče zdravil za debelost in metabolne bolezni (Esau in sod., 2004). Poleg omenjenega uravnavanja adipocitov, so miR-143 povezali še s povečanim številom pre-adipocitov (Kajimoto in sod., 2006), znižanim številom maščobnih celic (Ortega in sod., 2010), debelostjo (Takanabe in sod., 2008) ter povečano tvorbo maščobnih celic (Lin in sod., 2009). Pri vretenčarjih sta miR-375 in miR-376, ki se izražata v β -

celicah trebušne slinavke vključeni v kontrolo izločanja inzulina. Ohranjena miR-1 ima močan vpliv na mišično diferenciacijo in mišično funkcijo pri nevretenčarjih in sesalcih (Lin in sod., 2009). Izražanje miR-27 (miR-27a in miR-27b) je bilo povišano v maščobnem tkivu genetsko debelih *ob/ob* miši. Odkrili so, da sta na uravnavanje izražanja miR-27 vplivala tudi okoljski stres in pomanjkanje kisika. Podatki kažejo, da je miR-27 pomemben negativni regulator adipogeneze in da ima pomembno vlogo v regulaciji funkcije maščevja v povezavi z debelostjo (Lin in sod., 2009).

Genetske analize razvojnih okvar pri *C. elegans* in *D. melanogaster* so identificirale prve miRNA in poudarile njihovo vlogo v razvoju. Kasnejša identifikacija večine razvojnih genov med miRNA tarčami pri rastlinah je potrdila njihovo ključno vlogo pri razvoju in diferenciaciji. Študije razporeditve tarčnih mest med živalskimi geni kažejo, da imajo živalske miRNA dodatne funkcije (Georges in sod., 2007). Utišanje genov z miRNA se je izkazalo kot ključni regulator celične diferenciacije in homeostaze, ki pri metazojih zaseda precejšen del zaporedja. Tudi ta del zaporedja je podvržen svojemu deležu mutacij, od katerih so nekatere selekcijsko nevtralne, druge ugodne in bolj pogosto nekoliko škodljive. Polimorfizmi, ki se pojavljajo v tem delu zaporedja, vsekakor prispevajo k fenotipskim razlikam. Zanimiv primer, kako motnje izražanja miRNA prispevajo k fenotipski variabilnosti, je kalipigni fenotip (angl. *callipyge phenotype*) hipertrofija mišic pri ovcah pasme teksel (angl. *Texel*), na kromosomu 18 (Freking in sod., 2002; Georges in sod., 2007).

2.3.5 Gostiteljski geni za ncRNA

Intronske miRNA se izražajo skupaj z mRNA gostiteljskih genov (angl. *host genes*), kar kaže na uporabo skupnega prepisovalnega mehanizma (Baskerville in Bartel, 2005). V določenih primerih se lahko zapisi za miRNA nahajajo tako v eksonu kot v intronu, kar je odvisno od alternativnega izrezovanja iz gostiteljskega transkripta. En gostiteljski transkript lahko vsebuje več prekrivajočih miRNA, ki tvorijo gručo, in se lahko izrežejo iz istega primarnega transkripta. Vpliv dolžine gostiteljskega gena na število prekrivanj z miRNA geni še ni znan. Ugotovili so, da se miRNA pogosteje nahajajo znotraj kratkih gostiteljskih genov. Odločilni dejavnik pri soizražanju miRNA in gostiteljskega gena je evolucijska ohranjenost. Mikro RNA, ki so bile evolucijsko ohranjene so se običajno izražale skupaj s svojimi gostiteljskimi geni, medtem ko so se miRNA, ki niso bile

evolucijsko ohranjene, le redko izražale skupaj z gostiteljskimi geni (He in sod., 2012). V nekaterih primerih je lahko uravnavanje izražanja miRNA dosežena z epigeneskimi spremembami regulatornih elementov gostiteljskega gena, ki se lahko nahajajo daleč stran od miRNA lokusa (Grady in sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Podatkovne zbirke in bioinformacijska orodja

Uporabili smo podatkovne zbirke in bioinformacijska orodja navedena v preglednici 1.

Preglednica 1: Seznam uporabljenih podatkovnih zbirk in bioinformacijskih orodij

Table 1: List of used databases and bioinformatics tools

Ime	URL	Uporaba	Referenca
Podatkovne zbirke			
AmiGO	http://amigo.geneontology.org/	povezava do genske ontologije	(Carbon in sod., 2009)
Affymetrix	http://www.affymetrix.com	podatki z DNA-mikromreže za miš	/
Animal Genome Databases and Tools	http://www.animalgenome.org/	podatki z DNA-mikromreže za govedo in prašiča	(Groenen, 2013)
AnimalQTLdb	http://www.animalgenome.org/	zbiranje QTL-ov	(Hu in sod., 2007)
DrugBank	http://www.drugbank.ca/	analiza tarčnih genov za miRNA	(Law in sod., 2014)
ENCODE	http://genome.ucsc.edu/ENCODE/	analiza tarčnih genov za miRNA	(The ENCODE Project Consortium, 2011)
Ensembl e74	http://www.ensembl.org	zbiranje genomskeih lokacij polimorfizmov in snoRNA genov	/
KEGG ¹	http://www.genome.jp/kegg/	analiza bioloških poti	(Kanehisa in Goto, 2000; Kanehisa in sod., 2014)
MicroCosm Targets	http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/	analiza tarčnih genov za miRNA	(Griffiths-Jones in sod., 2008)
miRBase (verzija 20)	http://www.mirbase.org/	zbiranje genomskeih podatkov za miRNA gene	(Kozomara in Griffiths-Jones, 2014)
miRecords	http://mirecords.umn.edu	analiza tarčnih genov za miRNA	(Xiao in sod., 2009)
miRTarBase	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/	analiza tarčnih genov za miRNA	(Hsu in sod., 2014)
Mouse Genome Informatics; MGI	http://www.informatics.jax.org/	zbiranje genotipskeih podatkov za inbridirane linije miši	(Blake in sod., 2014)
Mouse Phenome Database; MPD	http://phenome.jax.org	zbiranje genotipskeih in fenotipskeih podatkov za inbridirane linije miši	(Grubb in sod., 2009)
MySQL	http://dev.mysql.com/	shranjevanje podatkov	/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	preverjanje statusa validacije polimorfizmov	/

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime	URL	Uporaba	Referenca
Obesity Gene Atlas	http://www.integratomics-time.com/fat_deposition	preverjanje lokusov za nalaganje maščobe	(Kunej in sod., 2012c)
TargetScan	http://www.targetscan.org/	analiza tarčnih genov za miRNA	(Lewis in sod., 2005)
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu	identifikacija UCR-jev in določanje njihovih genomskeh lokacij	(Karolchik in sod., 2014)
Orodja			
Ime	URL	Uporaba za:	Referenca
CyTargetLinker	http://apps.cytoscape.org/apps/cytarg etlinker	analiza tarčnih genov za miRNA	(Kutmon in sod., 2013)
Cytoscape	http://www.cytoscape.org/	vizualizacija odnosov med molekulami	(Smoot in sod., 2011b)
Ensembl/ Biomart e74	http://www.ensembl.org/biomart	zbiranje genomskeh podatkov za ncRNA gene	/
Flash GViewer	http://gmod.org/wiki/Flash_GViewer	grafični prikaz genomskeh lokacij lokusov	/
Gephi	https://gephi.org/	prikaz odnosov med molekulami in lastnostmi	(Bastian in sod., 2009)
Gexf-JS Web Viewer	https://github.com/raphv/gexf-js.	spletni prikaz odnosov med molekulami oz. lastnostmi	/
JMP	http://www.jmp.com/software/	analiza glavnih komponent	(SAS Institute Inc., 2010)
miRNA-SNiPer 3.0	http://www.integratomics-time.com/miRNA-SNiPer	analiza genetske variabilnosti miRNA genov	(Jevšinek Skok in sod., 2013)
PhpMyAdmin	www.phpmyadmin.net	upravljanje z MySQL preko spletja	/
Primer 3	http://frodo.wi.mit.edu/primer3	določanje začetnih oligonukleotidov	(Koressaar in Remm, 2007)
PyCoGent	http://pycogent.org/	identifikacija UCR-jev	(Knight in sod., 2007)
SAS/STAT	http://www.sas.com/en_us/software/analytics/stat.html	asociacijska analiza	(SAS Institute Inc., 2011)
STRING ² software 9.1	http://string-db.org	funkcijska analiza	(Franceschini in sod., 2013)
The Haploview 4.2	http://www.broadinstitute.org/	analiza vezavnega neravnovesja	(Barrett in sod., 2005)
UCSC/BLAT ³	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start	poravnavna zaporedij UCR	(Kent, 2002)

¹KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, ²STRING: Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins; ³UCSC: University of California, Santa Cruz;

3.1.2 Podatki za asociacijsko analizo pri miši

Podatke za asociacijsko študijo pri miši smo pridobili iz podatkovne zbirke Mouse phenome database (MPD) (Grubb in sod., 2009). Zbrali smo podatke za 17 inbridiranih linij miši: 129S1/SvImJ, A/J, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, C57BL/6J, C57BL/6NJ, CAST/EiJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LP/J, NOD/ShiLtJ, NZO/HILtJ, PWK/PhJ, SPRET/EiJ in WSB/EiJ (<http://www.sanger.ac.uk/resources/mouse/genomes>). Trenutni nabor podatkov obsega meritve za več kot 3.500 lastnosti, izmerjenih pri inbridiranih linijah miši. Izmerjene lastnosti so razdeljene v 32 skupin, in sicer: videz in barva kožuha, obnašanje, klinična kemija, hematologija, lipidi, ksenobiotiki, sestava telesa, telesne maščobne blazinice, telesna teža, velikost in rast, kosti, možgani, rak, kardiovaskularni sistem, poškodbe tkiv in celic, razvoj, uho, endokrini sistem, oko, žolčnik, imunski sistem, prednostno zauživanje, ledvica, jetra, dolgoživost, metabolizem, mišice, živčni sistem, nevrosenzorika, reprodukcija, dihalni sistem, spalni vzorci, vranica. Izmed 3.500 izmerjenih lastnosti smo izbrali 185, povezanih z zamaščevanjem in rastjo. Med njimi smo 73 lastnosti izločili, saj porazdelitev zanje ni ustrezala definiciji normalne porazdelitve. Ostalih 112 lastnosti je razdeljenih v tri skupine: 75 lastnosti v skupino masa telesa, velikost in rast, 35 lastnosti v skupino sestava telesa ter dve lastnosti v skupino maščobni depoji. Najmanj meritev je bilo opravljenih za lastnost: "masa telesne maščobe, brez glave" (52 meritev), medtem ko je bilo za lastnost "telesna masa na začetku testa" izmerjenih 930 meritev (priloga A). Večlastnostno analizo smo izvedli med 924 polimorfizmi v zapisih za ncRNA (247 v miRNA genih, 625 v snoRNA genih, 52 v UCR-jih) in 112 lastnostmi zamaščevanja. V analizo smo zajeli lastnosti, izmerjene pri najmanj dveh inbridiranih linijah miši, po liniji sta bila izmerjena vsaj dva osebka.

3.1.3 Vzorci goveda

Vzorce DNA slovenske avtohtone pasme cikasto govedo smo pridobili v okviru Javne službe nalog genske banke v živinoreji, ki jo z namenom ohranjanja živalskih genskih virov vodijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani (vodja prof. dr. Dragomir Kompan). Vzorce goveda lisaste pasme smo pridobili v okviru projekta ARRS mapiranja genoma (J4—9252 *MAS za pitovne in klavne lastnosti pri kombiniranih pasmah goveda*, vodja prof. dr. Milena Kovač) iz preizkusa potomcev.

Preglednica 2: Osnovne statistike za pitovne in klavne lastnosti pri lisastem govedu

Table 2: Descriptive statistics for growth and carcass traits in Simmental cattle

Lastnost	Število	Srednja vrednost	Standardni odklon	Minimum	Maksimum
Masa loja	151	21,76	4,26	12,84	38,85
Masa mesa	151	123,26	10,74	101,09	152,85
Masa ob zakolu	152	651,91	43,5	550,00	760,00
Masa toplih polovic	152	365,57	28,43	302,00	445,00
Masa kit	151	3,86	0,7	2,42	8,02
Delež prednje četrti	151	42,98	1,06	40,17	45,53
Delež zadnje četrti	151	57,03	1,06	54,47	59,83
Delež loja	151	12,31	2,22	7,17	21,04
Delež mesa	151	69,67	2,15	62,19	74,17
Razmerje med mesom in lojem	151	5,88	1,26	2,96	10,22
Masa manjvrednih telesnih delov	151	37,83	2,07	32,44	42,78
Masa večvrednih telesnih delov	151	65,15	1,24	62,49	68,67
Dolžina trupa	152	140,2	3,66	128,00	149,40
Delež večvrednih telesnih delov	151	56,4	1,13	53,30	59,70
Indeks konformacije	152	62,21	4,46	48,09	74,39
Klavnost	152	56,06	1,9	51,20	62,65
Masa prednje četrti	151	76,04	6,62	60,80	96,80
Masa zadnje četrti	151	100,83	7,6	85,10	121,50
Masa kosti	151	27,98	2,27	23,30	35,31
Prsna globina	152	41,95	1,87	34,40	48,80
Subjektivna ocena loja	152	7,72	1,12	3,00	12,00

Na razpolago smo imeli fenotipizirane družine polbratov (152) ter njihovih očetov (28) (preglednica 2). Fenotipski podatki zajemajo naslednje lastnosti: dolžina trupa, prsna globina, klavnost, indeks konformacije, masa kit in kosti, masa ob zakolu, masa toplih polovic, masa in delež: prednje in zadnje četrti, mesa, loja, večvrednih telesnih delov, razmerje med mesom in lojem, subjektivna ocena loja. Z analizo glavnih komponent (angl. *Principal Components Analysis; PCA*) smo definirali štiri glavne komponente, ki smo jih uporabili za asociacijsko analizo.

3.2 METODE

3.2.1 Bioinformacijske metode

3.2.1.1 Razvoj genomskega atlasa za ncRNA

Za izdelavo genomskega atlasa za ncRNA "*ncRNA Genomics Atlas*" smo uporabili označevalni jezik HTML (angl. *HyperText Markup Language*). Besedila v jeziku HTML so zapisana v obliki datotek ASCII in jih uporabljamo za prikaz spletnih strani in drugih informacij, ki jih je mogoče prikazati v spletnem brskalniku. Za opis predstavitev (videz in obliko) spletne dokumentacije smo v jezik HTML vključili prekrivne sloge (angl. *Cascading Style Sheets*; CSS). Atlas "*ncRNA Genomics Atlas*" je dostopen na naslovu URL: http://www.integratomics-time.com/ncRNA_genomics_atlas.

- Za izdelavo spletnih aplikacij za prikaz parov ncRNA/HG in rezultatov asociacijske študije pri miši smo uporabili skupek odprtokodne programske opreme (LAMP), ki vsebuje štiri tehnologije (Linux, Apache, MySQL in PHP). S programskim orodjem PhpMyAdmin smo podatke za aplikacijo uvozili v relacijsko podatkovno zbirko MySQL.
- Za prikaz genomske porazdelitve lokusov smo uporabili orodje Flash GViewer, ki je namenjeno prikazu genomskih lokacij pri katerikoli vrsti, saj omogoča vnos podatkov o številu in dolžini kromosomov. V obliki animiranega prikaza smo na genske karte za miš, govedo in prašiča razporedili dve vrsti lokusov: 1. lokuse označene s puščico, za prikaz genov ali SNP-jev in 2. lokuse označene z vzdolžno črto, za prikaz QTL-ov. Na shemi smo lokuse različnoobarvali in jih označili z imeni.
- Za prikaz proteinskih interakcij (angl. *protein-protein interactions*; PPI) ter grafični prikaz povezav med polimorfizmi v ncRNA in lastnostmi zamaščevanja pri miši smo uporabili orodje Gephi ter vtičnik "Gexf-JS Web Viewer".

3.2.1.2 Analiza genomske razporeditve ncRNA pri miši, govedu in prašiču

Genomske podatke o ncRNA in njihovih gostiteljskih genih smo pridobili iz podatkovnih zbirk: Ensembl e74, UCSC Genome Browser in miRBase (preglednica 1). Za identifikacijo genomskega lokacij UCR-jev pri govedu in prašiču ter določitev novih genomskega lokacij pri miši glede na trenutne verzije genoma smo uporabili bioinformacijsko orodje

UCSC/BLAT. Polimorfizme znotraj UCR-jev smo iskali s pomočjo Python-ove knjižnice PyCoGent. Rezultat smo ročno preverili z orodjem Biomart e74. Polimorfizme v snoRNA smo poiskali z orodjem Biomart e74. Genetsko variabilnost miRNA smo preverili s prosto dostopnim orodjem miRNA-SNiPer 3.0 (Jevšinek Skok in sod., 2013).

Preverili smo prekrivanje genomskih lokacij zapisov za ncRNA in SNP-je s komercialnih DNA-mikromrež (angl. *DNA-microarray*):

- "Mouse Diversity Genotyping Array" (Affymetrix, ZDA) za miš,
- "Bovine HD 770K" (Illumina, ZDA) za govedo in
- "Pig 60K SNP" (Illumina, ZDA) za prašiča.

Podatke z DNA-mikromreže za miš "Mouse Diversity Genotyping Array" smo pridobili na uradni spletni strani podjetja Affimetrix (<http://www.affymetrix.com/>) ter za govedo in prašiča na spletni strani "Animal Genome Databases and Tools".

3.2.1.3 Analiza prekrivanj genomskih lokacij zapisov ncRNA z lokusi za kvantitativne lastnosti

Genomske lokacije ncRNA pri govedu in prašiču smo prekrili z lokacijami lokusov za kvantitativne lastnosti. Iz podatkovne zbirke AnimalQTLdb smo pridobili 8.305 QTL-ov za 467 različnih lastnosti pri govedu in 9.862 QTL-ov za 653 različnih lastnosti pri prašiču. Za miš smo iz podatkovne zbirke MGI pridobili 1.332 QTL-ov za 190 lastnosti. V specializiranem delu genomskega atlasa smo ncRNA gene prekrili s QTL-i za rast in nalaganje maščobe pri miši (preglednica 3) ter za pitovne in klavne lastnosti pri govedu (preglednica 4) in prašiču (preglednica 5).

Preglednica 3: Kvantitativni lokusi za rast in nalaganje maščobe pri miši

Table 3: Quantitative trait loci for growth and fat deposition in mouse

Lastnost	QTL
telesna masa in rast	"Body weight", "Early growth adjusted", "Early growth", "Weight 10 weeks", "Weight 3 weeks", "Weight 6 weeks"
debelost	"Diet-induced obesity", "Obesity", "Obesity resistance", "Type 2 diabetes modifying"
maščobni depoji	"Epididymal fat pad weight", "Epididymal fat percentage", "Subcutaneous fat pad percentage", "Subcutaneous fat pad weight"

Preglednica 4: Kvantitativni lokusi za rast in nalaganje maščobe pri govedu

Table 4: Quantitative trait loci for growth and fat deposition in cattle

Lastnost	QTL
telesna masa in rast	"Body size", "Body weight", "Body weight (18 months)", "Body weight (birth)", "Body weight (initial)", "Body weight (mature)", "Body weight (mean)", "Body weight (slaughter)", "Body weight (weaning)", "Body weight (yearling)", "Body weight at castration", "BWF scaled by BWI", "Carcass weight",
maščobni depoji	"Fat melting point", "Fat percentage", "Fat thickness at the 12th rib", "Fat trim yield", "Fat weight", "Intramuscular fat", "Kidney fat weight", "Kidney", "Pelvic and heart fat percentage", "Kidney, pelvic, and heart fat weight", "Marbling score", "Marbling score (EBV)", "Meat fat content".

Preglednica 5: Kvantitativni lokusi za rast in nalaganje maščobe pri prašiču

Table 5: Quantitative trait loci for growth and fat deposition in pig

Lastnost	QTL
telesna masa in rast	"Body weight", "Body weight (10 weeks)", "Body weight (13 weeks)", "Body weight (15 weeks)", "Body weight (16 days)", "Body weight (17 weeks)", "Body weight (19 weeks)", "Body weight (21 weeks)", "Body weight (22 weeks)", "Body weight (25 weeks)", "Body weight (3 weeks)", "Body weight (30 weeks)", "Body weight (34 weeks)", "Body weight (46 days)", "Body weight (5 weeks)", "Body weight (birth)", "Body weight (end of test)", "Body weight (slaughter)", "Body weight (weaning)", "Body weight linear", "Carcass fat-free weight", "Carcass weight (cold)", "Carcass weight (hot)", "Carcass width (minimum)", "Fat area percentage in carcass", "Fat percentage in carcass", "Fat protein content", "Halfcarcass weight",
raven holesterola	"Cholesterol level", "Cholesterol level in meat", "HDL cholesterol", "HDL/LDL ratio"
maščoba	"Abdominal fat percentage", "Abdominal fat weight", "Adipocyte diameter", "Average backfat thickness", "Backfat (13 weeks of age)", "Backfat (17 weeks of age)", "Backfat (22 weeks of age)", "Backfat (40 kg live weight)", "Backfat (60 kg live weight)", "Backfat (average) thickness - by Fat-O-Meater", "Backfat (average) thickness - ultrasound", "Backfat above muscle dorsi", "Backfat at first rib", "Backfat at last lumbar", "Backfat at last lumbar (14 weeks)", "Backfat at last rib", "Backfat at last rib (10 weeks)", "Backfat at last rib (13 weeks)", "Backfat at last rib (16 weeks)", "Backfat at last rib (19 weeks)", "Backfat at last rib (22 weeks)", "Backfat at last rib (26 weeks)", "Backfat at mid-back", "Backfat at P2 position", "Backfat at rump", "Backfat at tenth rib", "Backfat at tenth rib (10 weeks)", "Backfat at tenth rib (13 weeks)", "Backfat at tenth rib (16 weeks)", "Backfat at tenth rib (19 weeks)", "Backfat at tenth rib (22 weeks)", "Backfat between 3rd and 4th last ribs", "Backfat between 6th and 7th ribs", "Backfat between the last 3rd and 4th lumbar", "Backfat linear at last rib", "Backfat linear at tenth rib", "Backfat percentage", "Backfat thickness (EBV)", "Backfat thickness between 3rd and 4th rib", "Backfat weight", "Bacon depth", "Fat to meat ratio", "Fat weight (total)", "Fat-cuts percentage", "Ham fat percentage", "Ham fat thickness", "Ham fat weight", "Ham meat weight", "Ham percentage", "Ham weight"

3.2.1.4 Nadgradnja in izdelava orodij za iskanje polimorfizmov v ncRNA genih

Genomske podatke za ncRNA gene smo prenesli v relacijsko podatkovno zbirko MySQL. S pomočjo skripte, napisane v skriptnem jeziku Perl smo izvedli poizvedbe po relacijski zbirki glede na uporabnikov vnos v uporabniški vmesnik. Spletni aplikaciji sta dostopni na naslovih URL: <http://www.integratomics-time.com/snorna-sniper> (snoRNA SNiPer) in <http://www.integratomics-time.com/ucr-sniper> (UCR SNiPer).

Predhodno razvito bioinformacijsko orodje miRNA SNiPer 1.0 smo dopolnili z genomskimi podatki glede na zadnje ujemajoče se verzije genoma pri 16 vrstah: človek [GRCh37], šimpanz [PanTro2.1], prašič [Sscrofa9], konj [EquCab2], miš [GRCm38], oposum [MONDOM5], kljunaš [OANA5], podgana [RGSC3.4], kokoš [WASHUC2], avstralski zebrasti ščinkavec [taeGut3.2.4], riba napihovalka [Tetraodon8], zebraica [Zv9], orangutan [PPYG2], makak [MMUL1.0], govedo [UMD3.1] in vinska mušica [BDGP5.0] (Jevšinek Skok in sod., 2013).

3.2.1.5 Funkcijska analiza ncRNA genov in njihovih gostiteljskih genov

Med 1.551 protein-kodirajočimi geni in 221 miRNA geni v genomskem atlasu za nalaganje maščobe "Obesity Gene Atlas" (Kunej in sod., 2012c) smo preverili, kateri lokusi (miRNA, HG ali pari ncRNA/HG) so predhodno že bili povezani z nalaganjem maščobe.

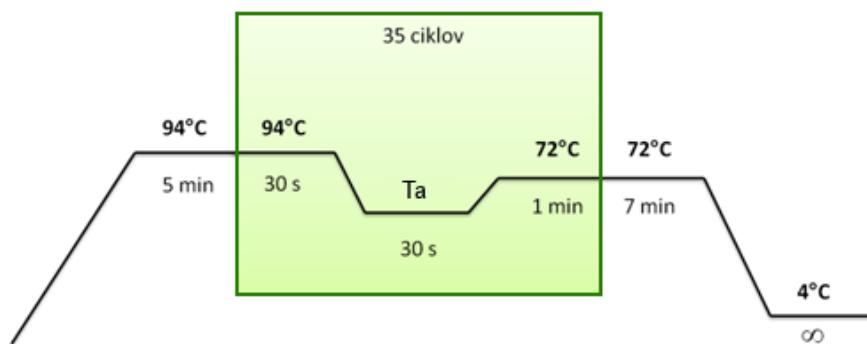
Za analizo povezav gostiteljskih genov za ncRNA gene z 1) gensko ontologijo, 2) biološkimi potmi in mrežami pri miši, govedu in prašiču smo uporabili podatkovno zbirko STRING 9.1 s pripadajočim orodjem. Orodje podatkovne zbirke STRING 9.1, združuje informacije o interakcijah iz presnovnih poti, kristalnih struktur, eksperimentov vezave in razmerij zdravilo – tarča (Franceschini in sod., 2013). Rezultati so razvrščeni po p-vrednosti, ki je izračunana na podlagi hipergeometrične distribucije in korigirana z Bonferroni korekcijskim faktorjem. Za grafični prikaz proteinskih interakcij med proteini, ki jih kodirajo gostiteljski geni za ncRNA gene, smo uporabili orodje Gephi (Bastian in sod., 2009).

3.2.1.6 Določanje tarčnih genov za miRNA pri miši

Tarčne gene za polimorfne miRNA pri miši smo poiskali in prikazali v mreži interakcij z vtičnikom CyTargetLiner za orodje Cytoscape. Vtičnik CyTargetLinker omogoča vključevanje elementov v mreži, ki jo naredi uporabnik v regulatorne interakcijske mreže (angl. *regulatory interaction networks*; RegINs). Te mreže vsebujejo podatke zbrane iz zbirk: DrugBank, ENCODE, MicroCosm, TargetScan, miRecords in miRTarBase.

3.2.2 Molekularno-genetske metode

Izolacijo DNA iz mišičnega tkiva lisastega goveda smo izvedli s kompletom reagentov DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Nemčija), medtem ko smo DNA iz semena bikov izolirali s fenolno ekstrakcijo. Genotipizacijo smo izvedli s sekvenciranjem po Sangerju. Začetne oligonukleotide smo izbrali s programskim orodjem Primer3 (preglednica 6). Delovno raztopino začetnih oligonukleotidov (10 pm/ μ l) smo pripravili iz založne raztopine (angl. stock) 250 pm/ μ l. Verižne reakcije s polimerazo smo izvedli pod temperaturnimi pogoji, prikazanimi na sliki 8. Temperature prileganja začetnih oligonukleotidov so prikazane v preglednici 6. Po PCR smo produkt očistili po protokolu proizvajalca (Applied Biosystems, ZDA). Nukleotidno zaporedje smo ugotavljali s kapilarno elektroforezo Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems, ZDA).



Slika 8: Temperaturni pogoji za PCR. Ta; temperatura prileganja začetnih nukleotidov

Figure 8: Temperature conditions for PCR. Ta; annealing temperature

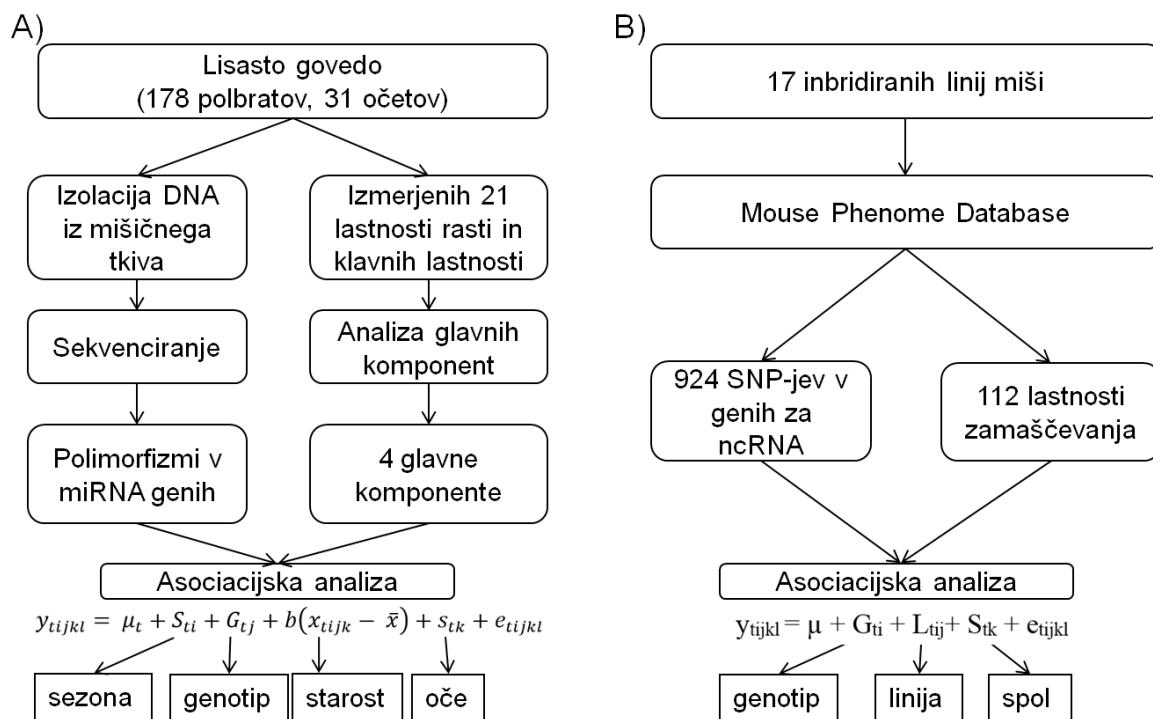
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Table 6: Primers for polymerase chain reaction (PCR)

Oznaka	Nukleotidno zaporedje	Ta
bta-mir-2313-F	5'-GCACAGACTCTCAGCCACTG-3'	59 °C
bta-mir-2313-R	5'-CTGACTGAGGCTCTCGCTCT-3'	59 °C
bta_seed_2489-F	5'-TGCTTCTGGCCAATAATCC-3'	56 °C
bta_seed_2489-R	5'-CCTCAGAGGATGCCAGTGAT-3'	56 °C

3.2.3 Statistične metode

Vpliv polimorfnih ncRNA genov na nalaganje maščobe in rast smo preverili pri inbridiranih linijah miši in lisistem govedu. Potek zbiranja genotipskih in fenotipskih podatkov za asociacijsko analizo je prikazan na sliki 9.



Slika 9: Shema poteka statističnih analiz za govedo (A) in miš (B)

Figure 9: Workflow of statistical analysis for cattle (A) and mouse (B)

3.2.4 Analiza vpliva polimorfizmov v ncRNA genih na lastnosti zamaščevanja pri inbridiranih linijah miši

Pri inbridiranih linijah miši smo analizirali vpliv polimorfizmov v ncRNA genih na lastnosti nalaganja maščobe. Informacije pridobljene iz podatkovne zbirke MPD smo statistično obdelali z večlastnostno analizo s statističnim paketom SAS/STAT (SAS Institute Inc., 2011) in pri tem uporabili sledeči model:

$$y_{ijkl} = \mu + G_{ti} + L_{tij} + S_{tk} + e_{ijkl} \quad (1)$$

kjer y_{ijkl} predstavlja opazovano lastnost; μ_t =srednja vrednost za lastnost; G_{ti} = SNP ($i = 1-951$); L_{tij} = ugnezden vpliv linija ($i = 1-17$) znotraj genotipa ($j = 1, 2$); S_{tk} = spol ($k = m, ž$) in e_{ijkl} = ostanek.

Za polimorfizme v ncRNA genih pri miši smo izračunali frekvence alelov in informacijsko vrednost polimorfizma (angl. *Polymorphism Information Content*; PIC) ter jih glede na stopnjo informativnosti, razdelili v pet razredov (preglednica 7). Vrednost PIC smo izračunali po naslednji matematični formuli:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \quad (2)$$

kjer k predstavlja število alelov in p_i pogostost i-tega alela (Nei, 1972; Anderson in sod., 1993).

Preglednica 7: Razdelitev informacijskih vrednosti polimorfizmov (PIC) glede na stopnjo informativnosti

Table 7: Classification of polymorphism information content (PIC) according to the degree of informativity

Razred PIC	Vrednost	Stopnja informativnosti
1	0,10-0,20	zelo nizka
2	0,21-0,30	nizka
3	0,31-0,40	srednja
4	0,41-0,45	visoka
5	< 0,45	zelo visoka

Razvili smo indeks za razvrščanje lokusov po prioriteti (angl. *locus prioritization index*; LPI), ki smo ga izračunali z vsoto produktov med relativnimi težami (w_i) in vrednostmi po i-tih kriterijih. Upoštevali smo štiri kriterije: 1. število linij miši, pri katerih so bile lastnosti izmerjene ($w = 0,4$), 2. vrednost PIC ($w = 0,3$), 3. delež povezav polimorfizma z lastnostmi za nalaganje maščobe ($w = 0,2$) in 4. oceno razlik med aleloma ($w = 0,1$).

3.2.5 Analiza vpliva polimorfizmov v miRNA genih na pitovne in klavne lastnosti pri govedu

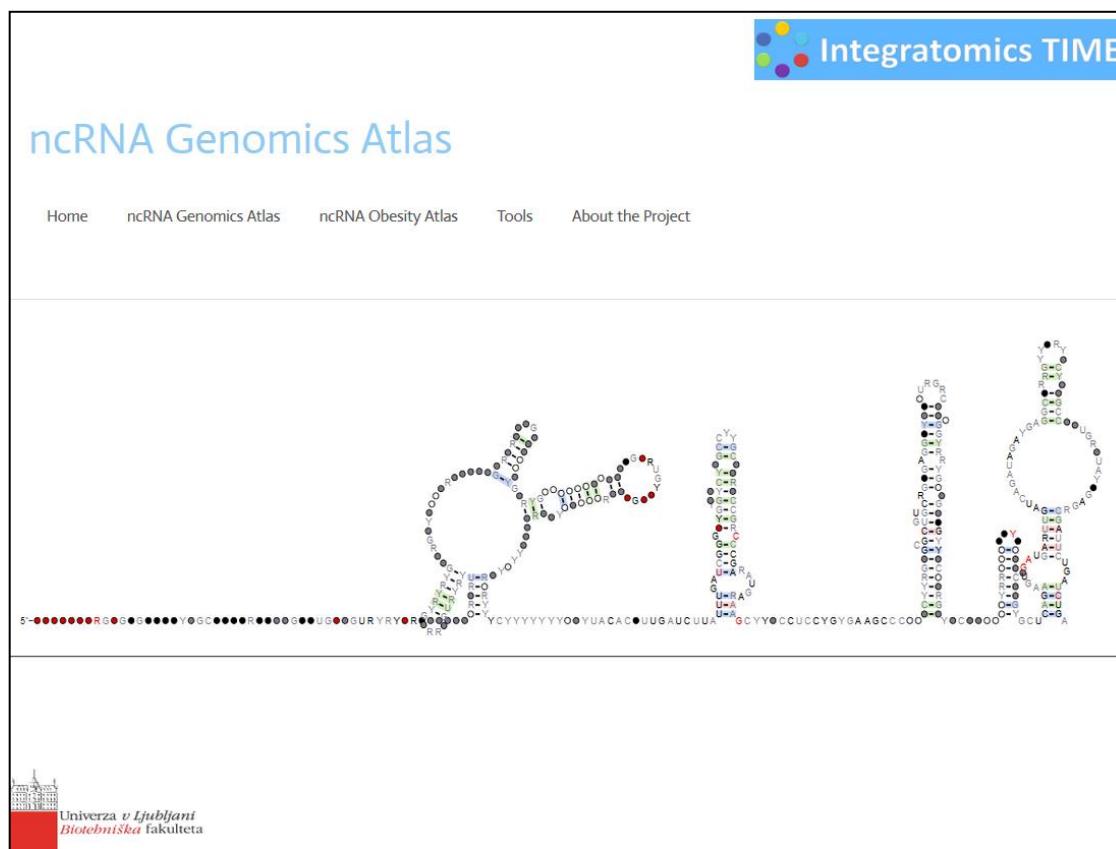
Vezavno neravnovesje (angl: *linkage disequilibrium*; LD) za štiri polimorfizme v *bta-mir-2313* genu smo analizirali s programskim orodjem The Haplovew 4.2 (Barrett in sod., 2005). S programskim orodjem JMP (SAS Institute Inc., 2010) smo v analizi glavnih komponent definirali štiri glavne komponente, s katerimi smo preverili vpliv polimorfizmov v miRNA genih na pitovne in klavne lastnosti. Asociacijsko analizo smo izvedli s statističnim paketom SAS/STAT (SAS Institute Inc., 2011), pri tem smo uporabili sledeči model:

$$y_{tijkl} = \mu_t + S_{ti} + G_{tj} + b(x_{tijk} - \bar{x}) + s_{tk} + e_{tijkl} \quad (3)$$

kjer y_{tijkl} predstavlja glavno komponento; μ_t srednjo vrednost za lastnost; S_{ti} sezono ($i = 1 - 7$); G_{tj} SNP ($j = 1 - 4$), x_{tijk} starost, s_{tk} očeta ($k = 1 - 31$) in e_{tijkl} ostanek.

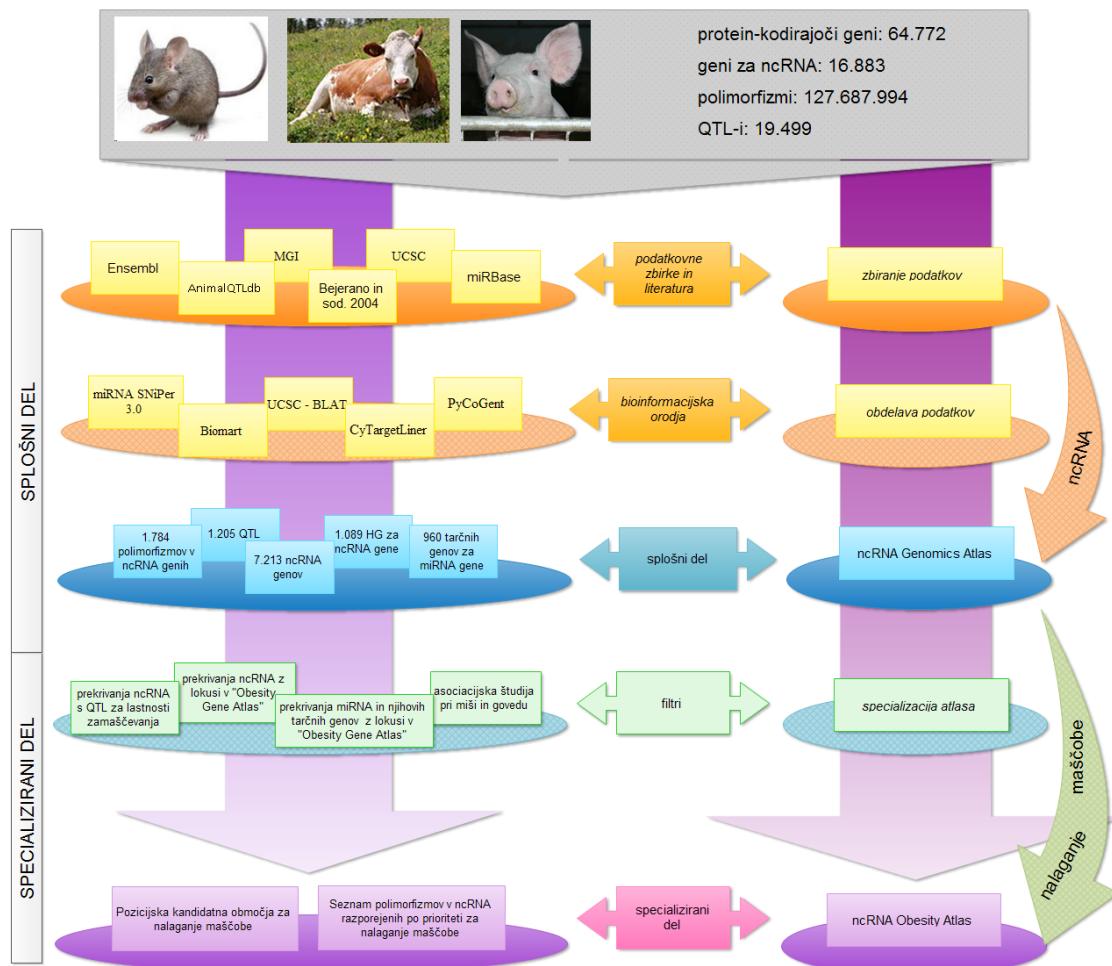
4 REZULTATI

Izdelali smo genomski atlas za proučevanje ncRNA genov "*ncRNA Genomics Atlas*", ki je prosti dostopen na naslovu URL: http://www.integratomics-time.com/ncRNA_genomics_atlas (slika 10). Atlas smo razdelili na splošni del in specializirani del za nalaganje maščobe (slika 11). V splošnem delu smo z integracijo znanih genomskeh podatkov izdelali zbirko znanja za ncRNA gene, ki smo jo uporabili v nadaljnjih analizah za proučevanje vloge ncRNA v genomu. Na podlagi zbranih podatkov in opravljenih analiz smo razvili specializirani del "*ncRNA Obesity Atlas*"; spletno mesto za proučevanje vloge genetske variabilnosti ncRNA genov pri nalaganju maščobe sesalcev. Genomski atlas je zasnovan tako, da ga je možno dopolnjevati z novimi razredi ncRNA in fenotipskimi podatki tako v splošnem kot tudi specializiranem delu.



Slika 10: Vhodna stran genomskega atlasa ncRNA "*ncRNA Genomics Atlas*"

Figure 10: The entry page of *ncRNA Genomics Atlas*



Slika 11: Grafični povzetek razvoja genomskega atlasa "*ncRNA Genomics Atlas*"

Figure 11: Graphical abstract of "*ncRNA Genomics Atlas*" development

4.1 SPLOŠNI DEL GENOMSKEGA ATLASA "*ncRNA GENOMICS ATLAS*"

V splošnem delu genomskega atlasa "*ncRNA Genomics Atlas*" smo izdelali zbirko znanja z ncRNA geni, njihovimi gostiteljskimi geni in polimorfizmi. Podatkovno zbirko smo uporabili za izpis kataloga parov ncRNA/HG, izdelavo genskih kart, analizo vpletenosti gostiteljskih genov v biološke in celične procese, molekularne funkcije, biološke poti in proteinske interakcije.

4.1.1 Izdelava zbirke znanja z ncRNA geni, njihovimi gostiteljskimi geni in polimorfizmi

Zbirko znanja z geni za ncRNA, gostiteljskimi geni in polimorfizmi smo izdelali na podlagi zadnjih verzij genomskega brskalnikov. Pri treh živalskih vrstah smo zbrali 7.213 genov za ncRNA, ki se prekrivajo s 1.089 protein-kodirajočimi geni in imajo v genskem zapisu 1.784 polimorfizmov (preglednica 8). Podatke za genomske lokacije miRNA in snoRNA genov smo pridobili iz podatkovnih zbirk, medtem ko smo jih za UCR-je pridobili iz literature (Bejerano in sod., 2004). Genomske lokacije UCR-jev so znane le za človeka, zato smo poravnali 481 genomske zaporedij znanih UCR-jev pri človeku z genomi miši, goveda in prašiča. V genomu miši smo našli popolno ujemanje vseh 481 zaporedij, pri govedu 359 in pri prašiču 267 zaporedij ter jim določili genomske lokacije. Pri govedu je bilo 461 UCR-jev v primerjavi z genomom človeka, miši in podgane ohranjenih vsaj 99 %, pri prašiču je takšnih regij 426, medtem ko je samo devet regij ohranjenih manj kot 95 %.

Preglednica 8: Vsebina zbirke znanja za ncRNA

Table 8: The content of ncRNA knowledge base

Vrsta živali	Razred ncRNA	Št. genov za ncRNA	Št. parov ncRNA/HG	Št. SNP-jev v genih za ncRNA
Miš	miRNA	1.908	265	247
	snoRNA	1.603	275	625
	UCR	481*	107	52
Govedo	miRNA	783	254	84
	snoRNA	846	222	316
	UCR	359*	77	139
Prašič	miRNA	326	64	3
	snoRNA	640	163	309
	UCR	267*	74	9

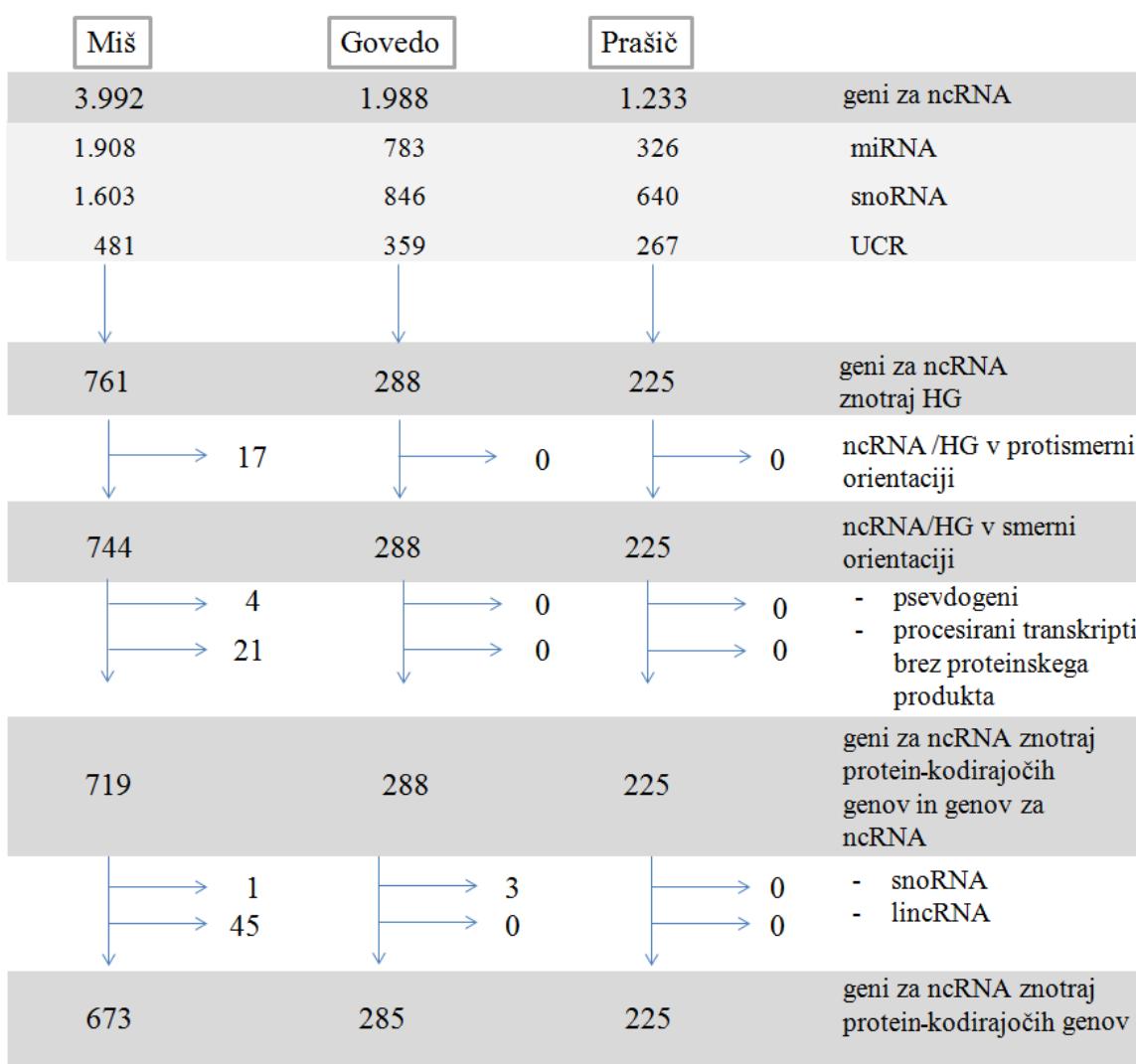
*: število UCR-jev, ki se 100 % ujemajo z zaporedji pri človeku

4.1.1.1 Gostiteljski geni za ncRNA gene pri miši, govedu in prašiču

Genomske lokacije zapisov za ncRNA smo prekrili z lokacijami za gostiteljske gene. Med gostiteljskimi geni za ncRNA smo našli psevdogene, procesirane prepise brez proteinskega produkta, protein-kodirajoče gene in gene za ncRNA (slika 12). Pri miši je intragenskih ncRNA 19 % (761/3.992), pri govedu 14,5 % (288/1.988) in pri prašiču 18 % (225/1.233). Največ gostiteljskih genov pri vseh treh vrstah je protein-kodirajočih genov. V nadaljnje analize smo vključili gostiteljske gene, ki kodirajo proteine, zato smo pri miši izločili

protismerno orientirane gene, psevdogene, procesirane prepisi brez proteinskega produkta in gene za druge ncRNA.

Pri govedu smo izločili tri gene za snoRNA, ki so se prekrivali z miRNA in so v zbirku znanja že vključeni kot ncRNA geni. Pri prašiču se, glede na zadnje verzije genoma, geni za ncRNA prekrivajo le s protein-kodirajočimi geni. V zbirkici znanja je 1.501 par ncRNA/HG. Med vsemi tremi živalskimi vrstami je enakih 11 gostiteljskih genov za ncRNA, in sicer *Ddx39b*, *Dnm2*, *Eef2*, *Elmo3*, *Faf1*, *Myh7b*, *Nop58*, *Phb2*, *Prpf39*, *Tnpo2* in *Zranb2*. Med govedom in mišjo je enakih 40, prašičem in mišjo 56 in med govedom in prašičem 26 gostiteljskih genov.



Slika 12: Število ncRNA genov in njihovih gostiteljskih genov pri miši, govedu in prašiču

Figure 12: Number of ncRNA genes and their host genes in mouse, cattle and pig

Katalog parov ncRNA/HG smo v genomski atlas za ncRNA dodali v obliki spletne aplikacije (http://www.integratomics-time.com/ncRNA_genomics_atlas/catalogue.html). Uporabnik označi živalsko vrsto in v iskalno polje vnese simbol za ncRNA ali gostiteljski gen (slika 13). Izpis v obliki kataloga poda naslednje informacije: simbol in identifikacijsko številko, razred oz. tip ter genomske lokacije ncRNA gena in njegovega gostiteljskega gena ter živalsko vrsto.

ncRNA Genomics Atlas

Home ncRNA Genomics Atlas ncRNA Obesity Atlas Tools About the Project

Catalog of ncRNA host genes

Select species:

Mouse
 Cattle
 Pig

AND

Search by ncRNA or host gene name (write entries in separate lines):

Examples:
miRNA gene (eg. *mmu-mir-25*)
snoRNA gene (eg. *SNORA11*)
UCR (eg. > *uc.43+*)
Host gene name (eg. *Zfp84*)

Result

Catalog of ncRNA host gene pairs												
ncRNA name	ncRNA ID	ncRNA type	ncRNA chr	ncRNA start	ncRNA end	Host gene symbol	Host gene ID	Host gene type	Host chr	Host start	Host end	Species
Gm26448	ENSMUSG00000064380	snoRNA	9	120129351	120129553	Rpsa	ENSMUSG00000032518	protein_coding	9	120127766	120132369	mouse
Gm26447	ENSMUSG00000064382	snoRNA	16	23111301	23111429	Eif4e2	ENSMUSG00000022884	protein_coding	16	23107444	23114136	mouse
Snora73a	ENSMUSG00000064387	snoRNA	4	132352775	132352979	Rcc1	ENSMUSG00000028896	protein_coding	4	132331919	132353605	mouse
Rnu73b	ENSMUSG00000064390	snoRNA	3	86140618	86140688	Rps3a1	ENSMUSG00000028081	protein_coding	3	86137940	86142702	mouse
Gm22247	ENSMUSG00000064410	snoRNA	4	46495155	46495285	Nans	ENSMUSG00000028334	protein_coding	4	46489248	46503632	mouse

Slika 13: Vhodna stran in izpis spletne aplikacije za izpis kataloga parov ncRNA/HG

Figure 13: The entry page of the web application for ncRNA/HG pairs catalog output

4.1.1.2 Analiza genetske variabilnosti ncRNA genov

Z namenom preveriti polimorfizme v genih za ncRNA, ki se nahajajo na komercialnih DNA-mikromrežah smo proučili tri komercialne DNA-mikromreže, in sicer: "Mouse Diversity Genotyping Array" za miš, "Bovine HD 770K" za govedo in "Pig 60K SNP" za prašiča. Preverili smo število znanih polimorfizmov v trenutnih verzijah genoma miši, goveda in prašiča ter število polimorfizmov na komercialnih DNA-mikromrežah (preglednica 9). Med polimorfizmi na mikromreži pri miši je 76 SNP-jev v genih za ncRNA: 17 v miRNA, 54 v snoRNA in pet v UCR-jih (priloga B). Med njimi se deset ncRNA genov prekriva s protein-kodirajočimi geni, in sicer *SNORD45B/Rabggtb*, *GM26202/Rpl17*, *GM26495/Ptprb*, *GM26277/Pole*, *GM24401/Pcdhga9*, *GM23547/PHB2*, *SCARNA10/Ncapd2*, *mmu-mir-764/Htr2c*, *mmu-mir-3058/Nudt4* in *mmu-mir-3062/Pfas*. Pri govedu je na mikromreži 35 SNP-jev v genih za ncRNA: 27 v snoRNA in osem v miRNA. Med njimi se šest snoRNA in trije miRNA geni prekrivajo s protein-kodirajočim genom: *SNORD19/GNL3*, *SNORD14/RPS13*, *SNORA72/CTNNA2*, *SNORA66/ATP1B1*, *SNORA14/TOMM20*, *SCARNA7/KPNA4*, *bta-mir-874/KLHL3*, *bta-mir-2369/PTPRG* in *bta-mir-2355/KLF7*. Pri prašiču je med SNP-ji na DNA-mikromreži SNP rs8089550, ki se nahaja v genu za snoRNA *SNORA70*.

Preglednica 9: Število znanih SNP-jev in SNP-jev na DNA-mikromrežah pri miši, govedu in prašiču

Table 9: The number of known SNPs and SNPs on DNA-arrays for mouse, cattle and pig

Vrsta	Verzija genoma	Št. SNP-jev	DNA-mikromreža	Št. SNP-jev na DNA-mikromreži	Št. SNP-jev na DNA-mikromreži v ncRNA genih
Miš	GRCh37	75.968.355	Mouse Diversity Genotyping Array	623.124	76
Govedo	UMD3.1	23.000.375	Bovine HD 770K	840.032	35
Prašič	Sscrofa10.2	28.719.264	Pig 60K SNP	64.000	1

4.1.2 Razvoj bioinformacijskih orodij za iskanje polimorfizmov v ncRNA genih

Za iskanje polimorfizmov v ncRNA genih smo do sedaj razvili tri orodja: miRNA, snoRNA in UCR SNiPer. V okviru te naloge smo posodobili orodje miRNA SNiPer in razvili dve novi orodji, in sicer snoRNA in UCR SNiPer.

4.1.2.1 Nadgradnja bioinformacijskega orodja miRNA SNiPer

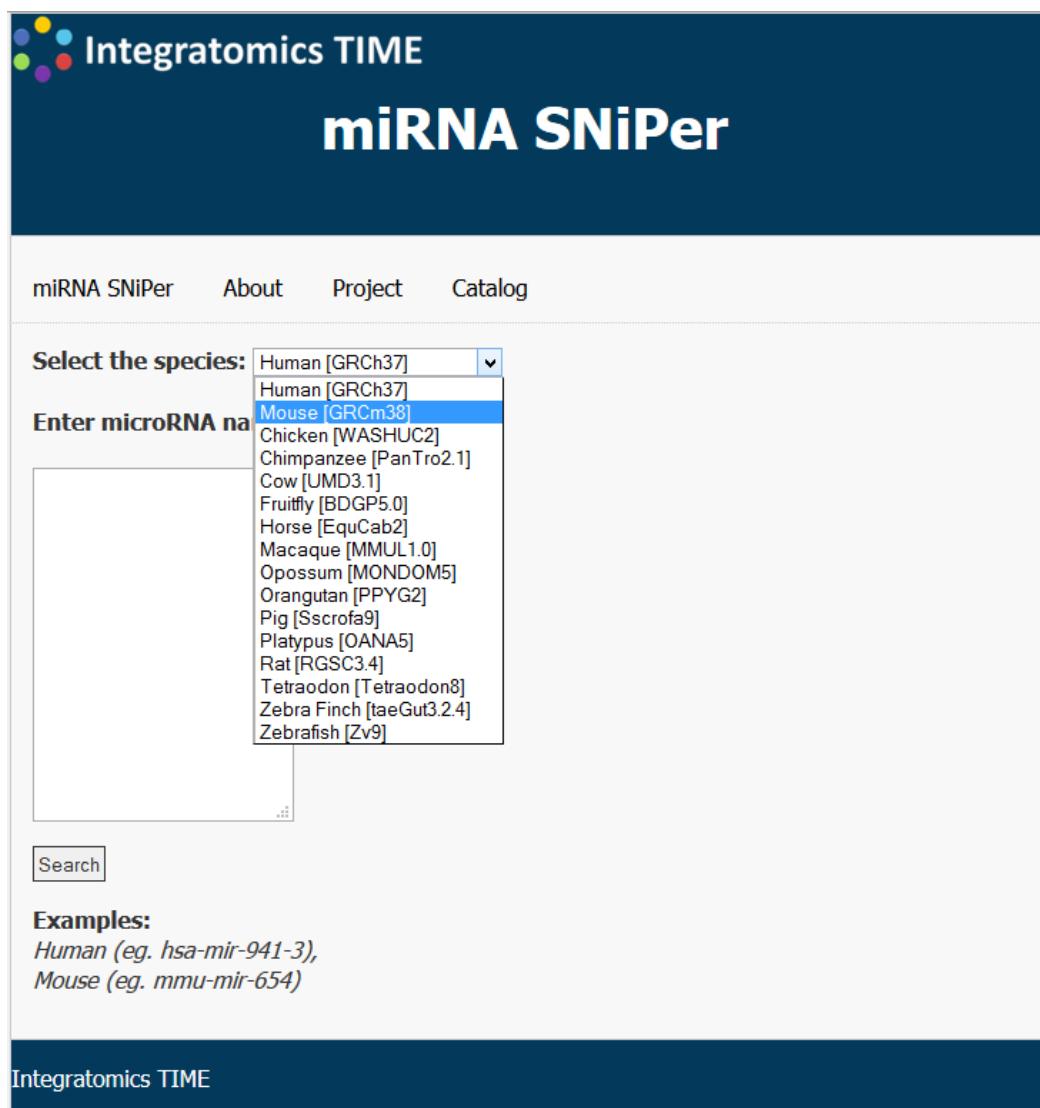
Prva verzija orodja miRNA SNiPer 1.0 je bila namenjena iskanju polimorfizmov v treh regijah miRNA, in sicer pre-miRNA, zreli miRNA in območju *seed* pri 13 vrstah vretenčarjev (Zorc in sod., 2012). Orodje smo do sedaj trikrat posodobili skladno z novimi verzijami podatkovnih zbirk Ensembl, miRBase in TargetScan (preglednica 10).

Preglednica 10: Primerjava verzij orodja miRNA SNiPer 1.0, 1.1, 2.0 in 3.0

Table 10: The comparison of miRNA SNiPer versions 1.0, 1.1, 2.0 and 3.0

Verzija:				Vrsta:		
miRNA SNiPer	Ensembl	miRBase	TargetScan	število	v vseh verzijah orodja miRNA SNiPer	samo v eni od verzij orodja miRNA SNiPer
1.0 1.1	64	18	5.2	13	človek, šimpanz, prašič, konj, miš, oposum, kljunaš, podgana, kokoš, avstralski zebrasti ščinkavec, riba	pes
2.0	67 (prašič 66)	18	5.2	13	napihovalka in zebrica	
3.0	68 (prašič 66)	19	6.2	16	orangutan, makak, govedo vinska mušica	

Prvotno verzijo orodja miRNA SNiPer smo posodobili v verzijo 1.1 in ga uporabili za izdelavo kataloga genetske variabilnosti miRNA pri kokoši, prašiču, govedu in konju (Jevšinek Skok in sod., 2012). Zadnja posodobljena verzija orodja (verzija 3.0) omogoča iskanje polimorfizmov v miRNA za 16 živalskih vrst (slika 14), in sicer: človek, šimpanz, prašič, konj, miš, oposum, kljunaš, podgana, kokoš, avstralski zebrasti ščinkavec, riba napihovalka, zebrica, orangutan, makak, govedo in vinska mušica (Jevšinek Skok in sod., 2013). Z uporabo orodja miRNA SNiPer smo izdelali katalog polimorfizmov v zreli miRNA in regiji *seed* pri štirih vrstah domačih živali: govedo, kokoš, konj in prašič. Opis orodja, povezava do pripadajočih katalogov polimorfizmov v miRNA genih ter opis razlik med verzijami (preglednica 10) so dostopni na <http://www.integratomics-time.com/miRNA-SNiPer/about.php>.



Slika 14: Začetna stran orodja miRNA SNiPer 3.0

Figure 14: Home page of the miRNA SNiPer 3.0 tool

Preglednica 11: Mikro RNA geni s polimorfizmi v zapisu za zrelo miRNA in območju *seed* pri štirih vrstah domačih živali (prašič, konj, govedo in kokoš)

Table 11: MicroRNA genes with polymorphisms located within their mature and seed regions in four livestock species (pig, horse, cattle and chicken)

Vrsta [verzija genoma]	Gostiteljski gen za miRNA gene	Orientacija/ genomska lokacija	Polimorfne zrele miRNA	Polimorfizmi v zapisu za zrelo miRNA (odebeljeno označeni polimorfizmi v regiji <i>seed</i>)
<ul style="list-style-type: none"> • Prašič [Scrofa9] • 271 miRNA • 545,950 polimorfizmov 	<i>F1SR76_PIG</i>	as / intron 10	<i>ssc-miR-4334-3p</i>	rs10719650
			<i>ssc-miR-4334-5p</i>	rs10719651
• Konj [EquCab2]	medgenski	-	<i>eca-miR-514</i>	rs69481895
<ul style="list-style-type: none"> • Govedo [UMD3.1] • 766 miRNA • 2,201,071 polimorfizmov 	medgenski	-	<i>bta-miR-1260b</i>	rs134960452
	<i>CL041_BOVIN</i>	s / intron 3	<i>bta-miR-1291</i>	rs110817643
	<i>SNORA2</i>	s		
	medgenski	-	<i>bta-miR-132</i>	rs133988074
	<i>MIB1</i>	as / intron 12	<i>bta-miR-133a-2</i>	rs137070651
	<i>TAGL2</i>	s / intron 1	<i>bta-miR-1584-3p</i>	rs110121441
	<i>F1MBP1_BOVIN</i>	s / intron 1	<i>bta-miR-1777b</i>	rs133532692
	medgenski	-	<i>bta-miR-2285m-4</i>	rs109856770
	medgenski	-	<i>bta-miR-2286</i>	rs132885360 rs135512047
	<i>RIN2</i>	s / intron 4	<i>bta-miR-2305</i>	rs135483577
	<i>GRAMD1B</i>	s / intron 2	<i>bta-miR-2313-3p</i>	rs41761413
	<i>MADD</i>	s / intron 14	<i>bta-miR-2318</i>	rs134638324
	medgenski	-	<i>bta-miR-2321</i>	rs137731966
	<i>SF3B3_BOVIN</i>	s / intron 20	<i>bta-miR-2324</i>	rs134817229
	<i>PTPRG</i>	s / intron 1	<i>bta-miR-2369</i>	rs136780194 rs134753593
	medgenski	-	<i>bta-miR-2402</i>	rs137803906
	medgenski	-	<i>bta-miR-2403</i>	rs135523674
	<i>LAMB1</i>	s / intron 11	<i>bta-miR-2418</i>	rs110555814
	medgenski	-	<i>bta-miR-2419-3p</i>	rs43400521
	<i>NCKAP5L</i>	s / intron 1	<i>bta-miR-2425-3p</i>	rs134756375
	medgenski	-	<i>bta-miR-2436-3p</i>	rs135821414
	<i>HTT</i>	s / intron 20	<i>bta-miR-2450c</i>	rs42658514
	medgenski	-	<i>bta-miR-2455</i>	rs137716256
	medgenski	-	<i>bta-miR-2467-5p</i>	rs109063650
	<i>D3JUI8_BOVIN</i>	s / intron 2	<i>bta-miR-2484</i>	rs135930835
	<i>SNORD61</i>	s		
	<i>SAMD12</i>	s / intron 4	<i>bta-miR-2489</i>	rs110544069 rs109834057
	medgenski	-	<i>bta-miR-2892</i>	rs109795153
	medgenski	-	<i>bta-miR-2899</i>	rs109462250

se nadaljuje

nadaljevanje

• Vrsta [verzija genoma] • št. miRNA genov • št. polimorfizmov	Gostiteljski gen za miRNA gene	Orientacija/ genomska lokacija	Polimorfne zrele miRNA	Polimorfizmi v zapisu za zrelo miRNA (odebeljeno označeni polimorfizmi v regiji seed)
• Govedo [UMD3.1] • 766 miRNA 2,201,071 polimorfizmov	<i>PEG3</i>	s / ekson 8	<i>bta-miR-2900</i>	rs137603330
	medgenski	-	<i>bta-miR-2903</i>	rs134036560
	medgenski	-	<i>bta-miR-29b-2</i>	rs133392085
	medgenski	-	<i>bta-miR-29d</i>	rs137831203
	medgenski	-	<i>bta-miR-29e</i>	rs41825418
	<i>F1MIB7_BOVIN</i>	s / intron 6	<i>bta-miR-338</i>	rs133207384
	medgenski	-	<i>bta-miR-375</i>	rs134683062
	medgenski	-	<i>bta-miR-411c-5p</i>	rs132740734
	<i>MEGF6</i>	s / intron 3	<i>bta-miR-551a</i>	rs136014887
	<i>KAT6B</i>	s / intron 2	<i>bta-miR-584-3</i>	rs135786138
• Kokoš [WASHUC2] • 499 miRNA • 3,292,991 polimorfizmov	medgenski	-	<i>bta-miR-940</i>	rs110936400
	<i>PTPRG</i>	s / intron 2	<i>gga-miR-1550-5p</i>	rs14981477
	medgenski	-	<i>gga-miR-1568</i>	rs14511527 rs14511526
	<i>CELF2</i>	s / intron 1	<i>gga-miR-1596-3p</i>	rs15190357
	medgenski	-	<i>gga-miR-1605</i>	ss538056207
	medgenski	-	<i>gga-miR-1614-3p</i>	rs15172520
	<i>ENSGALG00000005676</i>	s / intron 12	<i>gga-miR-1625-3p</i>	ss538087094
	<i>XYLT1</i>	s / intron 5	<i>gga-miR-1644</i>	rs14076349
	medgenski	-	<i>gga-miR-1648-3p</i>	rs14281065 rs14281066
	<i>E1C752_CHICK</i>	s / intron 2	<i>gga-miR-1657</i>	rs14934924
	<i>GMPS</i>	s / intron 13	<i>gga-miR-1658-3p</i>	rs16681031 rs16681032
			<i>gga-miR-1658-5p</i>	rs16681033
	medgenski	-	<i>gga-miR-1675</i>	rs16643637
	<i>TRAIP</i>	s / intron 4	<i>gga-miR-1678</i>	ss537949696
	medgenski	-	<i>gga-miR-1703</i>	rs16718265
	<i>TTK</i>	s / intron 4	<i>gga-miR-1712-5p</i>	rs15403608
	medgenski	-	<i>gga-miR-1747</i>	ss538180149
	<i>COL27A1</i>	s / intron 17	<i>gga-miR-455-5p</i>	rs15031616
	medgenski	-	<i>gga-miR-460b-5p</i>	ss538066607

s: smerno orientirana gena; as: protismerno orientirana gena; -: podatek ni smiseln

Kot primer uporabe orodja miRNA SNIper smo poiskali polimorfizme v genih za miRNA pri prašiču. V iskalno okno smo vnesli vse znane miRNA gene pri prašiču. Na osnovi trenutne verzije genoma prašiča so v miRNA genih prisotni le trije polimorfizmi, vsi v *ssc-mir-4334* na kromosomu 15. Dva SNP-ja se nahajata v zreli miRNA (rs10719650 in rs10719651), medtem ko je SNP rs10719649 v pre-miRNA (slika 15).

miRNA name	miRNA	mature miRNA	variation	details
ssc-mir-4334	<i>Sus scrofa</i> 15:114394216-11 4394284[+]	ssc-miR-4334-5p Mature: 114394226-114394244 Seed: 114394227-114394233 CUGUGCUGAG CCU GGAG U GAC GGGGG UGAA AGGCAGAGGUCCUGGUCC U GGAGGAGCUCCCCAU GUGG	rs10719651	In mature 114394237 SNP (G > A)
			rs10719650	In pre-mature 114394266 SNP (G > A)
			rs10719649	In pre-mature 114394280 SNP (A > G)
	<i>Sus scrofa</i> 15:114394216-11 4394284[+]	ssc-miR-4334-3p Mature: 114394256-114394275 Seed: 114394257-114394263 CUGUGCUGAG CC U C GGAG U GAG GGGGG UGAAAG GGCAGAG U CC C U G UC C U C AG G AG C U C CC A GUGG	rs10719651	In pre-mature 114394237 SNP (G > A)
			rs10719650	In mature 114394266 SNP (G > A)
			rs10719649	In pre-mature 114394280 SNP (A > G)

Slika 15: Rezultat orodja miRNA SNiPer 3.0 s prikazom genetske variabilnosti miRNA *ssc-mir-4334* pri prašiču

Figure 15: The result of the miRNA SNiPer 3.0 tool showing genetic variability of miRNA *ssc-mir-4334* in pig

4.1.2.2 Razvoj bioinformacijskih orodij snoRNA in UCR SNiPer

Poleg nadgradnje orodja miRNA SNiPer smo razvili dve novi orodji, in sicer snoRNA SNiPer (slika 16A) za iskanje genetske variabilnosti snoRNA genov ter UCR SNiPer (slika 16B) za iskanje polimorfizmov v UCR-jih. Osnova za orodje je zbirka znanja za ncRNA, ki smo jo razvili. Uporabniški vmesnik omogoča zbiranje med tremi živalskimi vrstami ter določanje območja na genomu. Orodje izpiše katalog polimorfizmov v genih za snoRNA oz. UCR, ki so na genomu locirani v območju, označenem v aplikaciji. Katalog vsebuje podatke analize genomske razporeditve ncRNA genov, njihovih gostiteljskih genov in polimorfizmov ter prekrivanj s SNP-ji s komercialnih DNA-mikromrež. V izpisu so naslednji podatki: tip ncRNA gena (snoRNA oz. UCR), polimorfizmi v ncRNA genih s povezavo do spletne strani NCBI, genomske lokacije ncRNA genov in polimorfizmov na genomu. V stolpcu "SNP Array" so z imenom mikromreže označeni polimorfizmi na njej. Spletni aplikaciji sta dostopni na naslovih URL: <http://www.integratomics-time.com/snorna-sniper> (snoRNA SNiPer) in <http://www.integratomics-time.com/ucr-sniper> (UCR SNiPer).

A

snoRNA	CHR	START	END	SNP	SNP position	SNP flanking sequence	SNP Array
Gm23406	16	90602496	90602617	rs33511954	90602532	AAGGCCTTAAAGATCGAGTTCTCA[C-T]TGCTGGACATGAACATAAAAGAA	/
Gm23427	10	4775500	4775590	rs50305053	4775558	GCGCAAGGCCACCATGTTCTCAAGGGT[G-T]CTCAAACCCGTGATATTATA	/
Gm23432	3	119638744	119638874	rs30221316	119638784	TAATTATTCAAGGTGTTCATGGGCA[A-G]JAGTGTAGACATAGCCCTCTTCACC	/
Gm23432	3	119638744	119638874	rs30221319	119638831	CACCTACTCTGCCACCTACTGATGG[A-G]CATGCCAACAGCAGCACCTGC	/
Gm23439	2	107886508	107886639	rs47617971	107886613	ACTGACACACATAGACACAGCAG[G-C]TACACATACATAGCTAGAGGCA	/
Gm23440	3	78979922	78980051	rs465355275	78979938	AGGTGTTGAGGGAGTTGCTGT[G-T]CATAGGTGATCATAGTGGCAGA	/
Gm23443	4	93545150	93545277	rs28118885	93545223	GCCCCAGTGTCAAGGCCACTCTTCTCT[G-C]TTACGACCCAAAGACAGTGCA	Mouse Diversity Genotyping Array

B

UCR	CHR	START	END	SNP	SNP chr	SNP pos	SNP flanking sequence	SNP Array
>uc.150+	16	84111588	84111849	rs81264485	16	84111700	AGGAAGTTAAATTCTCTGCTCT[G-C]TGAAGCTAGACAAGAAATTAAATGA	/
>uc.150+	16	84111588	84111849	rs81264486	16	84111694	GTTGGTAGGAAGTTAAATTCTCTC[G-C]CTCTGTOAAGCGTAGACAAAGAATT	/
>uc.150+	16	84111588	84111849	rs81264487	16	84111692	AGGTGTTGAGGAAGTTAAATTCTCTC[G-C]TACCTCTCTGTOAAGGGTAGACAAAGAA	/
>uc.150+	16	84111588	84111849	rs81264488	16	84111675	TGTTCAAGTAGAAATGAGGTTGGT[G-A]GGAAAGTTAAATTCTCTCTGCTCTG	/
>uc.150+	16	84111588	84111849	rs81264489	16	84111666	GAGAAAATTAACCTCTACCCACCT[G-C]TACCTGAACATGAATAAT	/
>uc.403+	6	28164492	28164697	rs81264493	6	28164655	TTTCTGCCCGTCTAAATACAAAGC[G-C]TACACATGATCAAGCCAGCATCAG	/
>uc.403+	6	28164492	28164697	rs81264492	6	28164642	CATGAAAATTAATGATTCTGCCCGT[A-C]TAAATACAAAGCCAAACATCTGATCA	/

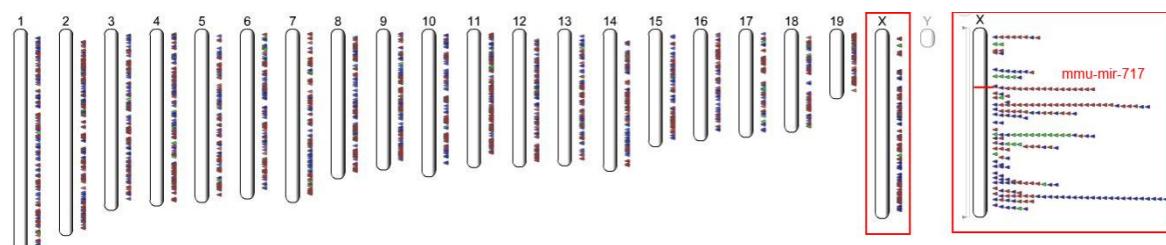
Slika 16: Začetni strani in izpis orodij snoRNA SNiPer (A) in UCR SNiPer (B)

Figure 16: Home pages and result table of tools snoRNA SNiPer (A) and UCR SNiPer (B)

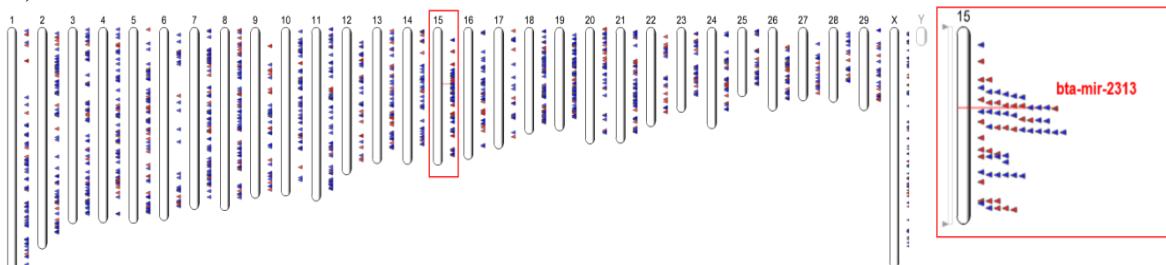
4.1.3 Genomska razporeditev ncRNA genov pri miši, govedu in prašiču

Izdelali smo genske karte s prikazom lokacij ncRNA genov za miš (slika 17A), govedo (slika 17B) in prašiča (slika 17C). Na gensko karto za miš smo vnesli 3.992 ncRNA genov, za govedo 1.988 in za prašiča 1.233 genov. Genske karte so dostopne na spletni strani http://www.integratomics-time.com/ncRNA_genomics_atlas/genomic-map.html, kjer uporabnik izbere živalsko vrsto. S klikom na kromosom dobimo interaktivni prikaz, kjer različno obarvane puščice prikazujejo razporeditev ncRNA genov na tem kromosому. Rdeče puščice označujejo miRNA gene, modre snoRNA gene in zelene UCR-je.

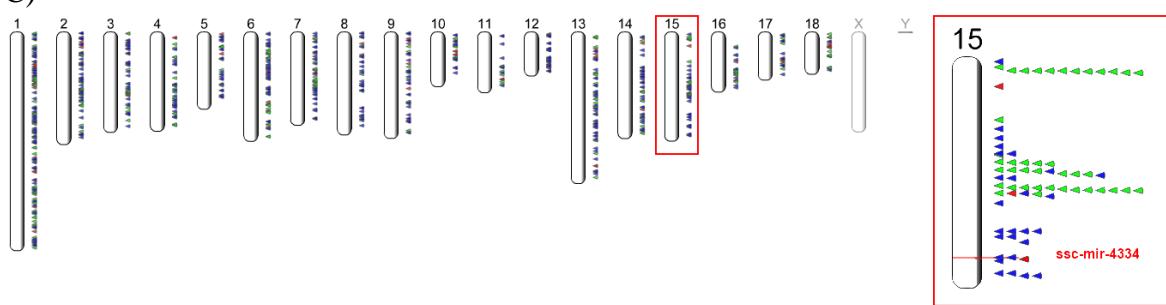
A)



B)



C)



Slika 17: Genske karte s prikazom genomske razporeditve ncRNA genov. Pri miši s povečavo MMUX (A), pri govedu s povečavo BTA15 (B) ter pri prašiču s povečavo SSC15 (C). Rdeča puščica: miRNA, modra: snoRNA, zelena: UCR

Figure 17: Gene maps with genomic distribution of ncRNA genes. In mouse with closeup of MMUX (A), in cattle with closeup of BTA15 (B), and in pig closeup of SSC15 (C). Red arrow: miRNA, blue : snoRNA, green: UCR

4.1.4 Funkcijska analiza gostiteljskih genov za ncRNA

Trenutno ni prosto dostopnega orodja za neposredno funkcijsko analizo ncRNA genov, zato smo vlogo ncRNA v genomu predpostavili na podlagi funkcijске analize njihovih gostiteljskih genov. S funkcijsko analizo smo proučili vpletost gostiteljskih genov za ncRNA gene v biološke in celične procese, molekularne funkcije ter biološke poti in mreže. V analizo smo vključili 630 gostiteljskih genov za ncRNA pri miši, 519 pri govedu in 292 pri prašiču. Pri miši, govedu in prašiču smo identificirali biološke in celične procese, molekularne funkcije ter biološke poti in mreže s 95-odstotnim intervalom zaupanja (preglednica 11). Gensko ontologijo in obogatene biološke poti smo omejili na tiste s p-vrednostjo nižjo od 0,05. Vozliščem v PPI smo izračunali stopnjo centralnosti in določili vozlišča z visoko stopnjo centralnosti, tako imenovane centralne molekule. V splošnem delu genomskega atlasa smo vpletost gostiteljskih genov za ncRNA v biološke in celične procese, molekularne funkcije ter biološke poti prikazali v obliki tabel s povezavo do primarnega vira (GO, KEGG). Mreže proteinskih interakcij smo prikazali v grafični obliki, kjer vozlišča predstavljajo proteine, povezovalniki pa odnose med njimi. S klikom na vozlišče se v prikaznem oknu izpišejo statistike zanj.

Preglednica 12: Povzetek rezultatov funkcijске analize gostiteljskih genov za ncRNA

Table 12: Results of functional analysis of ncRNA host genes

Vrsta	Biološki procesi	Celični procesi	Molekularne funkcije	Biološke poti
Miš	39	43	28	2
Govedo	2	33	7	1
Prašič	9	12	8	1

Pri miši so gostiteljski geni za ncRNA vpleteni v 39 bioloških procesov (priloga C), 43 celičnih procesov (priloga D), 28 molekularnih funkcij (priloga E) in v dve obogateni biološki poti (priloga F in priloga G). Največ gostiteljskih genov (315) je vpletenih v celične procese (angl. *cellular process*), znotrajcelične procese (angl. *intracellular part*) in vezavo (angl. *binding*). V bioloških poteh "Axon guidance" (priloga F) in "Ribosome" (priloga G) so udeleženi gostiteljski geni za ncRNA in so na sliki označeni z zvezdico. Vozlišča v PPI pri miši z visoko stopnjo centralnosti so: Gnb2l1, Rpl4, Eef2, Rpl6, Rpl3, Rpsa in so na mreži označena z rdečo barvo (priloga H).

Pri govedu so gostiteljski geni za ncRNA vpleteni v dva biološka procesa: "*Pozitivno uravnavanje izražanja genov*" in "*Pozitivno uravnavanje metabolnih procesov RNA*" (priloga I) v 33 celičnih procesov (priloga J), sedem molekularnih funkcij (priloga K) in v obogateno biološko pot "*Ribosome*" (priloga L). Največ gostiteljskih genov je vpletenih v celične procese (angl. *cell*) in molekularno funkcijo "*Aktivnost strukturnih molekul*" (angl. *structural molecule activity*). Vozlišča v PPI pri govedu z visoko stopnjo centralnosti so: Rps3, Rpl3, Rpl23, Rpl2, Eef2 in so na mreži označena z rdečo barvo (priloga M).

Pri prašiču so gostiteljski geni za ncRNA vpleteni v devet bioloških procesov (priloga N), 12 celičnih procesov (priloga O), osem molekularnih funkcij (priloga P) in v obogateno biološko pot "*Ribosome*" (priloga R). Največ gostiteljskih genov je vpletenih v "*Metabolne procese makromolekul v celici*" (angl. *cellular macromolecule metabolic process*), medcelične procese in molekularno funkcijo "*Vezava nukleinskih kislin*" (angl. *nucleid acid binding*). Vozlišča v PPI pri prašiču z visoko stopnjo centralnosti so: Rps8, Rpl5, Rpl30, Rps12, Rpl4, Rpl12 in so na mreži označena z rdečo barvo (priloga S).

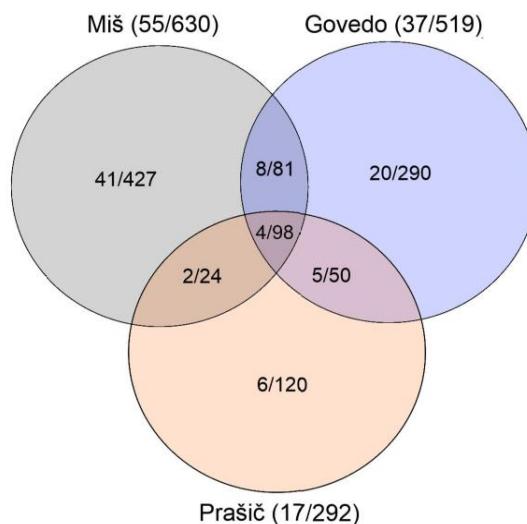
Na osnovi funkcijске analize gostiteljskih genov za ncRNA gene smo ugotovili, da so gostiteljski geni statistično značilno povezani s številnimi termini genske ontologije, biološkimi potmi in tvorijo kompleksne biološke mreže, pri vseh treh proučevanih vrstah.

4.2 RAZVOJ SPECIALIZIRANEGA GENOMSKEGA ATLASA ZA NALAGANJE MAŠČOBE "*ncRNA Obesity Atlas*"

Del genomskega atlasa "*ncRNA Genomics Atlas*" je namenjen proučevanju vloge ncRNA pri nalaganju maščobe, zato smo ta specializirani del atlasa poimenovali "*ncRNA Obesity Atlas*". Z namenom določiti pozicijska kandidatna območja z ncRNA s potencialnim vplivom na nalaganje maščobe smo lokacije ncRNA genov prekrili s protein-kodirajočimi geni povezanimi z nalaganjem maščobe in znanimi QTL-i ter pri miši preverili vpletenost vseh znanih polimorfizmov v ncRNA genih v nalaganje maščobe.

4.2.1 Prekrivanje ncRNA genov z lokusi za nalaganje maščobe

Za ncRNA gene in gostiteljske gene za ncRNA smo preverili, če so že bili predhodno povezani z lastnostmi zamaščevanja. V genomskem atlasu za nalaganje maščobe "Obesity gene atlas" (Kunej in sod., 2012c) smo našli 86 gostiteljskih genov za ncRNA gene, ter 43 miRNA z vplivom na nalaganje maščobe. Med gostiteljskimi geni so štirje protein-kodirajoči geni (*CHM*, *PRRC2A*, *SLIT3* IN *THRA*), gostiteljski geni za ncRNA pri vseh treh vrstah (slika 18). Para ncRNA/HG, kjer sta tako ncRNA kot protein-kodirajoči gen že bila povezana z nalaganjem maščobe sta: *mir-448/Htr2c* pri miši ter *mir-335/MEST* pri govedu in prašiču.



Slika 18: Število gostiteljskih genov za ncRNA povezanih z nalaganjem maščobe pri miši, govedu in prašiču.

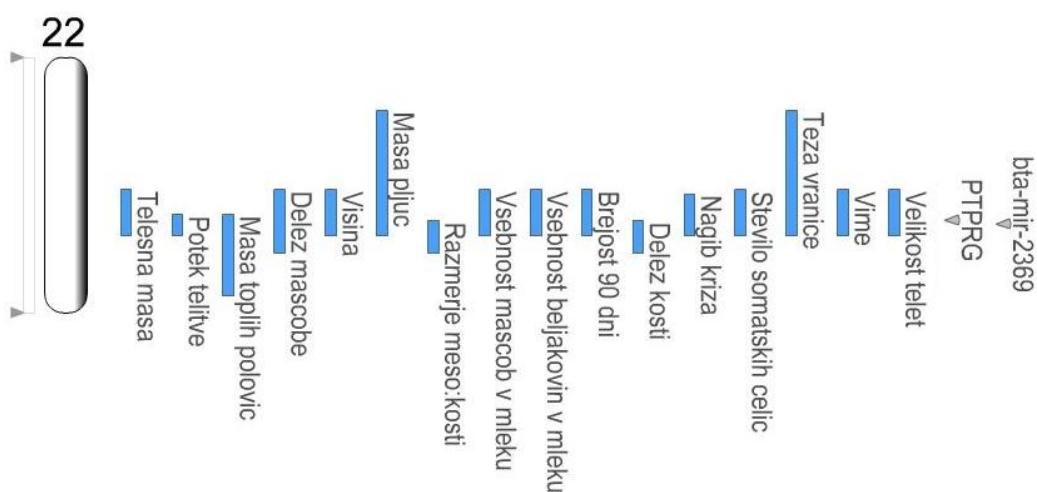
Število genov povezanih z nalaganjem maščobe/število znanih gostiteljskih genov za ncRNA gene in njihov presek

Figure 18: Number of host genes for ncRNA associated with fat deposition in mouse, cattle and pig and.
Number ob ncRNA obesity related HG/all known ncRNA host genes and their transection

Genomske lokacije za ncRNA gene pri miši, govedu in prašiču smo prekrili z vsemi zanimimi QTL-i in podrobneje proučili tiste za nalaganje maščobe. Pri miši se ncRNA geni prekrivajo s 450 QTL-i. Z največ (27) QTL-i se prekriva skupina ncRNA genov na kromosому 11: *mmu-mir-6921*, *Gm24151*, *snord65*, *snord49*, *mmu-mir-6922*, *mmu-mir-49a* in *Gm22599*. Območje z največ prekrivajočih se lokusov za nalaganje maščobe pri miši je v območju 5.4 Mbp na MMU10 (76008926-81416297 bp), kjer se 105 ncRNA genov prekriva s šestimi QTL-i za lastnosti rasti in nalaganja maščobe.

Poleg tega smo določili pozicijsko kandidatno območje v velikosti 55.5 Mbp na MMU11 s 85 ncRNA geni (24 miRNA, 32 snoRNA in 29 UCR). Med njimi je 11 polimorfnih ncRNA genov: *Gm23514*, *mmu-mir-6409*, *Gm26070*, *Gm22599*, *Gm24151*, *mmu-mir-216a*, *Gm23772*, *Gm22789*, *Gm22284*, *mmu-mir-6406* in *mmu-mir-678*.

Pri govedu se 927 ncRNA genov prekriva z 290 QTL-i za 12 lastnosti. Največ zapisov za ncRNA (454) se prekriva s QTL-i za: količino mleka (angl. *milk yield*), sledijo QTL-i za maso toplih polovic (angl. *carcass weight*; 410), količino proteinov v mleku (angl. *milk protein yield*; 393), rojstno maso (angl. *body weight (birth)*; 390) in količino maščob v mleku (angl. *milk fat yield*; 382). Mikro RNA *bta-mir-2309* se prekriva z 49 QTL-i pri govedu, sledijo snoRNA *snoU2* s 43 prekrivajočimi QTL-i ter *bta-mir-218* in *bta-mir-2393* s 40 prekrivajočimi QTL-i. Za lastnosti zamaščevanja je pri govedu določenih 25 QTL-ov. Z največ (desetimi) QTL-i za lastnosti nalaganja maščobe se prekriva gen za *bta-mir-2917* na kromosому 2, z devetimi QTL-i za nalaganje maščobe se prekrivata dve snoRNA (*SCARNA17* in *SCARNA18*) na kromosomu 6 in trije ncRNA geni na kromosomu 7 (*bta-mir-1434*, *SNORD37*, *bta-mir-2456*). Z osmimi QTL-i se prekriva 16 ncRNA genov (*bta-mir-339b*, *bta-mir-2393*, *SNORA70*, *bta-mir-367*, *bta-mir-302c*, *snoU2*, *SNORA70*, *bta-mir-6535*, *SNORA62*, *bta-mir-302b*, *bta-mir-7-3*, *bta-mir-2444*, *snoU2-30*, *bta-mir-302d*, *bta-mir-302a*, *SNORA76*). Območje z največ prekrivanj lokusov z vplivom na nalaganje maščobe pri govedu je na kromosomu 22 (40172533-40172602 bp), kjer se prekrivajo QTL-i, protein-kodirajoči gen in polimorfen ncRNA gen (slika 19). Na tem območju so QTL-i za 16 lastnosti, med njimi trije za rast in klavne lastnosti, protein-kodirajoči gen *PTPRG* in ncRNA gen *bta-mir-2369* s štirimi SNP-ji. V regiji *seed* se nahajata rs136780194 in rs134753593, v zreli miRNA rs135405976 in v zaporedju pre-miRNA rs135082893, ki je eden izmed SNP-jev na komercialni DNA-mikromreži "Bovine HD 770K".



Slika 19: Prekrivanje genomskeh lokacij miRNA *bta-mir-2369*, QTL-ov in gena *PTPRG* na BTA22 pri govedu

Figure 19: Overlap of genomic locations of miRNA *bta-mir-2369*, QTL, and *PTPRG* gene on BTA22 in cattle

Pri prašiču se zapisi za ncRNA gene prekrivajo s 500 QTL-i za 11 lastnosti. Kvantitativni lokusi z največjim številom prekrivajočih se elementov so: kakovost mesa in klavna kakovost (angl. *meat and carcass quality QTL*; 858), QTL-i povezani z zdravjem (angl. *health QTL*; 804), proizvodne (angl. *production QTL*; 784) in reprodukcijske lastnosti (angl. *reproduction QTL*; 706) ter lastnosti zunanjosti (angl. *exterior QTL*; 695). S 97 QTL-i se pri prašiču prekriva UCR *uc.189+*, miRNA *ssu-mir-219* in štiri snoRNA: *SNORD83*, *SNORA38*, *SNORA72*, *SNORA70*. Podrobnejše smo proučili prekrivanje ncRNA genov s QTL-i za lastnosti zamaščevanja, rasti in klavne lastnosti. Pri prašiču je za lastnosti zamaščenosti in z njimi povezanimi lastnostmi (npr. vsebnost holesterola v krvi) določenih 82 QTL-ov. Skupina devetih ncRNA genov z največ prekrivanj s QTL-i (30-34) za lastnosti zamaščenosti na kromosому 7 zajema območje 16,7 Mbp (v območju med 27509227 in 44193612 bp). V skupini je šest snoRNA (*SNORA72*, *SNORD83*, *SNORA38*, *SNORD83*, *SNORA27*, *SNORA70*), dva UCR-ja (*uc.189* in *uc.190*) in ena miRNA *ssc-mir-219*. Genomske lokacije ncRNA genov smo prekrili s SNP-ji s komercialne DNA-mikromreže "Pig 60K SNP" pri prašiču. Identificirali smo območje na kromosomu 11 (49690591-57574984 bp) z največ prekrivajočih se lokusov. Na sliki 20 je prikazano prekrivanje QTL-ov in dveh kopij snoRNA gena *SNORA70*, in sicer *SNORA70* (ENSSSCG00000019565) z modro barvo in kopija *SNORA70* (ENSSSCG00000021526) z roza barvo. Kopiji *SNORA70* s SNP-ji rs335687945, rs344074606, rs326182583, rs80867485, rs80943302 in enim SNP-jem rs80889550 s komercialne DNA-mikromreže

"Pig 60K SNP", se prekrivata s 30 QTL-i (od tega 12 za lastnosti rasti in nalaganja maščobe). Ostali prekrivajoči QTL-i na tem območju so: čas namenjen pitju, raven interferona gama, koncentracija hemoglobina, število eozinofilcev, masa mesa na ledjih in vratu, mišična vlakna, delež mesa, izceja, telesna maso ob odstavitevi, pri 19-ih tednih in ob zakolu, debelina hrbtnne slanine, število funkcionalnih in nefunkcionalnih seskov ter število mrtvorojenih pujskov.



Slika 20: Prekrivanje dveh kopij snoRNA gena *SNORA70*, SNP-ja rs80889550 in QTL-ov na SSC11 pri prašiču

Figure 20: Overlap of two copies of snoRNA gene *SNORA70* with SNP rs80889550, and QTL on SSC11 in pig

4.2.2 Razvoj metode za razvrščanje polimorfizmov po prioriteti glede na vpliv na fenotip pri miši

Razvili smo metodo za asociacijsko analizo *in silico*, s katero lahko pri inbridiranih linijah miši preverjamo vpliv znanih polimorfizmov na fenotip (Zorc in sod., 2012). Na podlagi rezultata analize smo izračunali indeks za razvrščanje lokusov po prioriteti (LPI).

Genomske podatke proučevanih polimorfizmov in meritve za lastnosti nalaganja maščobe smo pridobili v podatkovni zbirki MPD. Rezultat genotipizacije miši 17 inbridiranih linij za primer dveh SNP-jev je prikazan na sliki 21. Za SNP1 imata liniji miši NOD/ShiLtJ in PWK/PhJ alelno različico T, ostalih 15 linij ima alelno različico C. Za SNP2 imajo štiri linije miši (CRST/EiJ, PWK/PhJ, SPRET/EiJ in WSB/EiJ) alelno različico G, medtem ko ima ostalih 13 linij alelno različico A.

SNP	C57BL/6J	129S1/SvImJ	A/J	AKR/J	BRLB/cJ	C3H/HeJ	C57BL/6N	CAST/EiJ	CBR/J	DBA/2J	FVB/NJ	LP/J	NOD/ShiLtJ	NZD/HILtJ	PNK/PhJ	SPRET/EiJ	WSB/EiJ
SNP1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	T	C	C
SNP2	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	G	G	G	G	G

Slika 21: Primer izpisa alelnih različic za dva SNP-ja pri 17 linijah inbridiranih miši, pridobljenih iz podatkovne zbirke MPD

Figure 21: An example of allelic variants for two SNPs in 17 inbred mouse strains, obtained from MPD database

Meritvam za posamezne živali znotraj linije smo priredili genotipske podatke polimorfizmov, vključenih v asociacijsko analizo (preglednica 13). Meritve in rezultat genotipizacije nista nujno opravljena v istem laboratoriju in pri živalih istih linij, zato se matrika vhodnih podatkov za analizo razlikuje glede na razpoložljive podatke.

Preglednica 13: Primer meritov za telesno maso pri miših, ki smo jim priredili genotipske podatke za dva SNP-ja

Table 13: An example of measurements for mouse body weight with assigned genotypic data for two SNPs

Meritev	Linija	Spol	Oznaka živali	Vrednost [g]	SNP1	SNP2
Telesna masa	129S1/SvImJ	m	455477	20	C	A
Telesna masa	129S1/SvImJ	m	455479	21	C	A
Telesna masa	129S1/SvImJ	ž	455481	19.3	C	A
Telesna masa	CAST/EiJ	ž	458807	15.3	C	G
Telesna masa	CAST/EiJ	m	458809	16	C	G
Telesna masa	CAST/EiJ	m	458815	16	C	G
Telesna masa	CAST/EiJ	ž	474295	13.9	C	G
Telesna masa	CAST/EiJ	m	479946	15.6	C	G
Telesna masa	CAST/EiJ	m	486868	16.3	C	G
Telesna masa	NOD/ShiLtJ	ž	452310	25.7	T	A
Telesna masa	NOD/ShiLtJ	m	452312	26.3	T	A
Telesna masa	NOD/ShiLtJ	m	452314	27.3	T	A
Telesna masa	NOD/ShiLtJ	m	465307	28.1	T	A

Postopek zbiranja podatkov iz zbirke MPD smo opravili za vse analizirane polimorfizme. Z asociacijsko študijo smo nato preverili njihov vpliv na fenotip pri inbridiranih linijah miši. Iz frekvence alel smo SNP-jem izračunali vrednosti PIC in jih razvrstili v pet razredov, od najbolj do najmanj informativnega.

Rezultate asociacijske analize in izračune vrednosti PIC smo uporabili za razvoj indeksa za razvrščanje polimorfizmov glede na njihov vpliv genetske variabilnosti na proučevano lastnost (LPI). Pri vrednotenju smo upoštevali vsoto produktov med relativnimi težami in vrednostmi po posameznih kriterijih, in sicer:

1. število linij miši, na katerih so bile lastnosti izmerjene ($w = 0,4$),
2. vrednost PIC ($w = 0,3$),
3. delež povezav polimorfizma s proučevanimi lastnostmi ($w = 0,2$) ter
4. oceno razlik med aleloma ($w = 0,1$).

Za vsako povezavo med SNP-jem in lastnostjo smo izračunali LPI in za vsak polimorfizem določili njegov najvišji LPI (LPI_{max}). V preglednici 14 je prikazan rezultat asociacijske analize za dva poljubna SNP-ja; označena kot SNP1 in SNP2. Za SNP1 je LPI_{max} 0,66 in za SNP2 0,86. Na podlagi LPI_{max} , smo nato SNP-je razvrstili po prioriteti, glede na njihov vpliv na fenotip.

Preglednica 14: Primer rezultata asociacijske študije za dva SNP-ja, vrednosti PIC in LPI

Table 14: An example of association study results for two SNPs, PIC values and LPI

SNP	Ozn.	Meritev/lastnost	Ocena	Std Err	P_vr.	Št. linij	PIC	LPI
SNP1	14319	Delež telesne mase, ki pripada maščobi	0,37	0,12	0,0031	15	0,23	0,66
SNP1	11515	Delež telesne mase, ki pripada maščobi, brez glave	0,84	0,11	< 0,0001	13	0,26	0,65
SNP1	10305	Telesna masa na začetku testiranja	0,35	0,07	< 0,0001	14	0,24	0,65
SNP1	10306	Telesna masa na začetku testiranja	0,31	0,06	< 0,0001	14	0,24	0,64
SNP1	10330	Končna masa, brez glave	0,31	0,08	< 0,0001	14	0,24	0,64
SNP1	10328	Masa pustega tkiva, brez glave,	0,22	0,07	0,0027	14	0,24	0,64
SNP1	44103	Telesna masa na koncu testiranja	0,93	0,11	< 0,0001	12	0,28	0,64
SNP1	44105	Delež spremembe telesne mase v testiranem obdobju	0,93	0,24	0,0003	12	0,28	0,64
SNP1	44104	Telesna masa na koncu testiranja	0,75	0,13	< 0,0001	12	0,28	0,63
SNP1	44102	Telesna masa na začetku testiranja	0,71	0,13	< 0,0001	12	0,28	0,63
SNP1	44101	Telesna masa na začetku testiranja	0,67	0,11	< 0,0001	12	0,28	0,63
SNP1	11514	Masa tkiva, brez glave	0,15	0,06	0,0090	13	0,26	0,62
SNP1	35704	Telesna masa na začetku testiranja	0,57	0,19	0,0034	14	0,13	0,58
SNP1	2906	Končna telesna masa	0,53	0,09	< 0,0001	14	0,13	0,58
SNP1	10401	Telesna masa	1,47	0,09	< 0,0001	10	0,18	0,55
SNP1	32603	Telesna masa	0,85	0,15	< 0,0001	11	0,17	0,54
SNP1	40404	Telesna masa	2,30	0,15	< 0,0001	7	0,24	0,54
SNP1	6308	Povprečje telesne mase	0,72	0,08	< 0,0001	11	0,17	0,54

se nadaljuje

nadaljevanje

SNP	Ozn.	Meritev/lastnost	Ocena	Std Err	P_vr.	Št. linij	PIC	LPI
SNP1	32620	Indeks telesne mase (BMI)	0,68	0,25	0,0085	11	0,17	0,54
SNP1	32604	Dolžina telesa od baze spodnjih sekalcev do baze anusa	0,63	0,17	0,0003	11	0,17	0,54
SNP1	33265	Masa na začetku testiranja, vse generacije združene	0,62	0,10	< 0,0001	11	0,17	0,54
SNP1	9206	Telesna masa na koncu testiranja	0,51	0,11	< 0,0001	11	0,17	0,53
SNP1	9205	Telesna masa na začetku testiranja	0,42	0,10	< 0,0001	11	0,17	0,53
SNP1	46407	Delež telesne mase, ki pripada maščobi, celo telo z glavo	0,82	0,19	< 0,0001	10	0,18	0,53
SNP1	46417	Delež telesne mase, ki pripada maščobi, celo telo z glavo, samo inbridirane linije	0,82	0,19	< 0,0001	10	0,18	0,53
SNP1	17201	Masa celega telesa	1,81	0,10	< 0,0001	6	0,28	0,52
SNP1	23002	Telesna masa	1,44	0,07	< 0,0001	4	0,38	0,52
SNP1	30408	Telesna masa	0,56	0,09	< 0,0001	10	0,18	0,52
SNP1	17106	Masa pustega tkiva, brez glave	1,51	0,11	< 0,0001	5	0,32	0,52
SNP1	23003	Telesna masa	1,18	0,07	< 0,0001	4	0,38	0,51
SNP1	23001	Telesna masa	0,38	0,12	0,0016	3	0,44	0,51
SNP1	23004	Telesna masa	0,85	0,06	< 0,0001	4	0,38	0,50
SNP1	23005	Telesna masa	0,74	0,06	< 0,0001	4	0,38	0,50
SNP1	15126	Delež maščobe, brez glave	1,08	0,17	< 0,0001	6	0,28	0,50
SNP1	17105	Masa maščobnega tkiva, brez glave	0,99	0,27	0,0006	5	0,32	0,50
SNP1	22417	Delež telesne maščobe, brez glave	1,04	0,15	< 0,0001	6	0,28	0,50
SNP1	22412	Masa pustega tkiva, brez glave	0,85	0,13	< 0,0001	7	0,24	0,50
SNP1	34609	Končna telesna masa, brez telovadnega kolesa	0,95	0,16	< 0,0001	6	0,28	0,50
SNP1	22401	Telesna masa	0,83	0,14	< 0,0001	7	0,24	0,50
SNP1	23006	Telesna masa	0,57	0,06	< 0,0001	4	0,38	0,50
SNP1	15128	Masa pustega tkiva, brez glave	0,92	0,12	< 0,0001	6	0,28	0,49
SNP1	23009	Telesna masa	0,51	0,06	< 0,0001	4	0,38	0,49
SNP1	23008	Telesna masa	0,48	0,06	< 0,0001	4	0,38	0,49
SNP1	22415	Masa telesne maščobe, brez glave	0,79	0,15	< 0,0001	6	0,28	0,49
SNP1	22410	Skupna masa tkiva, brez glave	0,66	0,15	< 0,0001	7	0,24	0,49
SNP1	23007	Telesna masa	0,42	0,06	< 0,0001	4	0,38	0,49
SNP1	22750	Telesna masa	0,58	0,13	< 0,0001	7	0,24	0,49
SNP1	15125	Telesna masa	0,69	0,14	< 0,0001	6	0,28	0,49
SNP1	22416	Delež telesne maščobe, brez glave	0,51	0,18	0,0052	7	0,24	0,49
SNP1	15129	Masa tkiva, brez glave	0,62	0,15	< 0,0001	6	0,28	0,49
SNP1	23012	Telesna masa	0,26	0,06	< 0,0001	4	0,38	0,49
SNP1	23130	Telesna masa	0,48	0,14	0,0011	7	0,24	0,48
SNP1	34610	Končna telesna masa, s telovadnim kolesom (6 tednov)	0,36	0,09	0,0002	6	0,28	0,48
SNP1	2905	Telesna masa	0,18	0,10	0,0870	12	0,15	0,00
SNP1	2933	Razmerje spremembe telesne mase	0,20	0,22	0,3547	12	0,15	0,00
SNP1	9101	Telesna masa	0,19	0,07	0,0121	15	0,23	0,00
SNP1	14308	Telesna masa	0,10	0,09	0,2645	15	0,23	0,00
SNP1	14316	Masa tkiva, brez glave	0,11	0,09	0,2273	15	0,23	0,00
SNP1	14318	Masa pustega tkiva, brez glave	0,10	0,09	0,2371	15	0,23	0,00
SNP1	17107	Delež maščobe, brez glave	0,04	0,29	0,8806	5	0,32	0,00
SNP1	22402	Telesna masa	0,23	0,14	0,1019	6	0,28	0,00

se nadaljuje

nadaljevanje

SNP	Ozn.	Meritev/lastnost	Ocena	Std Err	P_vr.	Št. linij	PIC	LPI
SNP1	22411	Skupna masa tkiva,brez glave	0,21	0,13	0,1099	6	0,28	0,00
SNP1	22751	Telesna masa	0,03	0,14	0,8430	6	0,28	0,00
SNP1	23013	Telesna masa	0,12	0,06	0,0468	4	0,38	0,00
SNP1	23014	Telesna masa	0,11	0,07	0,1052	4	0,38	0,00
SNP1	23131	Telesna masa	0,03	0,20	0,8681	5	0,32	0,00
SNP1	31885	Masa pustega tkiva, brez glave	0,16	0,11	0,1266	13	0,14	0,00
SNP1	32606	Masa epididimalne maščobne blazinice, kot delež telesne	0,38	0,19	0,0524	11	0,17	0,00
SNP1	32608	Masa retroperitonealne maščobne blazinice, kot delež telesne	0,52	0,20	0,0123	11	0,17	0,00
SNP1	44106	Delež spremembe telesne mase v testiranem obdobju	0,29	0,23	0,2143	12	0,28	0,00
SNP1	44405	Telesna masa mladiča 3 dan	0,31	0,25	0,2232	10	0,18	0,00
SNP2	9101	Telesna masa	1,52	0,07	<0,0001	15	0,39	0,86
SNP2	14308	Telesna masa	1,43	0,06	<0,0001	15	0,39	0,86
SNP2	14316	Masa tkiva, brez glave	1,40	0,06	<0,0001	15	0,39	0,86
SNP2	14318	Masa pustega tkiva, brez glave	1,49	0,06	<0,0001	15	0,39	0,86
SNP2	10305	Telesna masa na začetku testiranja	1,65	0,05	<0,0001	14	0,41	0,85
SNP2	10306	Telesna masa na začetku testiranja	1,60	0,05	<0,0001	14	0,41	0,85
SNP2	10328	Masa pustega tkiva, brez glave,	1,58	0,06	<0,0001	14	0,41	0,85
SNP2	10330	Končna masa, brez glave	1,45	0,06	<0,0001	14	0,41	0,85
SNP2	14319	Delež telesne mase, ki pripada maščobi	1,02	0,09	<0,0001	15	0,39	0,85
SNP2	11514	Masa tkiva, brez glave	1,60	0,05	<0,0001	13	0,43	0,83
SNP2	2906	Končna telesna masa	1,90	0,06	<0,0001	14	0,34	0,82
SNP2	11515	Delež telesne mase, ki pripada maščobi, brez glave	0,73	0,08	<0,0001	13	0,43	0,81
SNP2	35704	Telesna masa na začetku testiranja	1,75	0,10	<0,0001	14	0,34	0,81
SNP2	31885	Masa pustega tkiva, brez glave	1,76	0,07	<0,0001	13	0,36	0,80
SNP2	25001	Dolžina telesa (od konice nosu do baze repa)	2,32	0,09	<0,0001	12	0,28	0,74
SNP2	25026	Površina telesa brez glave	2,16	0,09	<0,0001	12	0,28	0,74
SNP2	44103	Telesna masa na koncu testiranja	2,19	0,11	<0,0001	12	0,28	0,74
SNP2	25006	Telesna masa	1,99	0,09	<0,0001	12	0,28	0,73
SNP2	25041	Masa tkiva, brez glave	1,88	0,09	<0,0001	12	0,28	0,73
SNP2	25046	Masa pustega tkiva, brez glave,	1,97	0,09	<0,0001	12	0,28	0,73
SNP2	44101	Telesna masa na začetku testiranja	2,01	0,11	<0,0001	12	0,28	0,73
SNP2	44102	Telesna masa na začetku testiranja	1,99	0,13	<0,0001	12	0,28	0,73
SNP2	44104	Telesna masa na koncu testiranja	2,09	0,13	<0,0001	12	0,28	0,73
SNP2	6308	Povprečje telesne mase	2,25	0,06	<0,0001	11	0,30	0,72
SNP2	32604	Dolžina telesa od baze spodnjih sekalcov do baze anusa	1,97	0,12	<0,0001	11	0,30	0,72
SNP2	25031	Indeks telesne mase (BMI)	1,45	0,12	<0,0001	12	0,28	0,71
SNP2	32603	Telesna masa	1,78	0,11	<0,0001	11	0,30	0,71
SNP2	10401	Telesna masa	1,85	0,07	<0,0001	10	0,32	0,70
SNP2	25036	Delež maščobe, brez glave	0,86	0,14	<0,0001	12	0,28	0,69
SNP2	44405	Telesna masa mladiča 3 dan	1,62	0,18	<0,0001	10	0,32	0,69
SNP2	11001	Telesna masa	1,54	0,09	<0,0001	9	0,35	0,68
SNP2	32620	Indeks telesne mase (BMI)	0,76	0,18	0,0019	11	0,30	0,68
SNP2	32608	Masa retroperitonealne maščobne blazinice, kot delež telesne	0,65	0,14	0,0008	11	0,30	0,67

se nadaljuje

nadaljevanje

SNP	Ozn.	Meritev/lastnost	Ocena	Std Err	P_vr.	Št. linij	PIC	LPI
SNP2	2905	Telesna masa	2,23	0,11	<0,0001	12	0,15	0,66
SNP2	9205	Telesna masa na začetku testiranja	2,06	0,10	<0,0001	11	0,17	0,64
SNP2	9206	Telesna masa na koncu testiranja	2,06	0,11	<0,0001	11	0,17	0,64
SNP2	25002	Dolžina telesa (od konice nosu do baze repa)	1,49	0,17	<0,0001	11	0,17	0,62
SNP2	30408	Telesna masa	1,94	0,09	<0,0001	10	0,18	0,62
SNP2	25003	Dolžina telesa (od konice nosu do baze repa)	1,67	0,18	<0,0001	10	0,18	0,61
SNP2	40404	Telesna masa	2,30	0,15	<0,0001	7	0,24	0,59
SNP2	34610	Končna telesna masa, s telovadnim kolesom (6 tednov)	2,27	0,10	<0,0001	6	0,28	0,58
SNP2	24701	Telesna masa na začetku testiranja	1,79	0,16	<0,0001	7	0,24	0,57
SNP2	34609	Končna telesna masa, brez telovadnega kolesa	2,08	0,16	<0,0001	6	0,28	0,57
SNP2	17201	Masa celega telesa	1,81	0,10	<0,0001	6	0,28	0,56
SNP2	24702	Telesna masa na koncu testiranja	1,77	0,13	<0,0001	6	0,28	0,56
SNP2	17106	Masa pustega tkiva, brez glave,	1,51	0,11	<0,0001	5	0,32	0,55
SNP2	2933	Razmerje spremembe telesne mase	0,21	0,21	1,0000	12	0,15	0,00
SNP2	17105	Masa maščobnega tkiva, brez glave	0,99	0,27	0,0308	5	0,32	0,00
SNP2	17107	Delež maščobe, brez glave	0,04	0,29	1,0000	5	0,32	0,00
SNP2	24703	Delež spremembe telesne mase v testiranem obdobju	0,74	0,39	1,0000	6	0,28	0,00
SNP2	32606	Masa epididimalne maščobne blazinice, kot delež telesne	0,46	0,13	0,0483	11	0,30	0,00
SNP2	44105	Delež spremembe telesne mase v testiranem obdobju	0,68	0,24	0,3647	12	0,28	0,00
SNP2	44106	Delež spremembe telesne mase v testiranem obdobju	0,86	0,23	0,0233	12	0,28	0,00

Ozn.: oznaka za lastnost v podatkovni zbirki MPD, Ocena: ocena razlik med aleloma, StdErr: standardna napaka ocene, P_vr.: p-vrednost

Z opisano metodo za asociacijsko analizo *in silico*, lahko z obstoječim nizom podatkov analiziramo vpliv več kot 56 milijonov polimorfizmov na 3.510 lastnosti izmerjenih za 35 fenotipskih področij pri miši.

4.2.2.1 Analiza vpliva polimorfizmov v ncRNA genih na lastnosti zamaščevanja pri miši

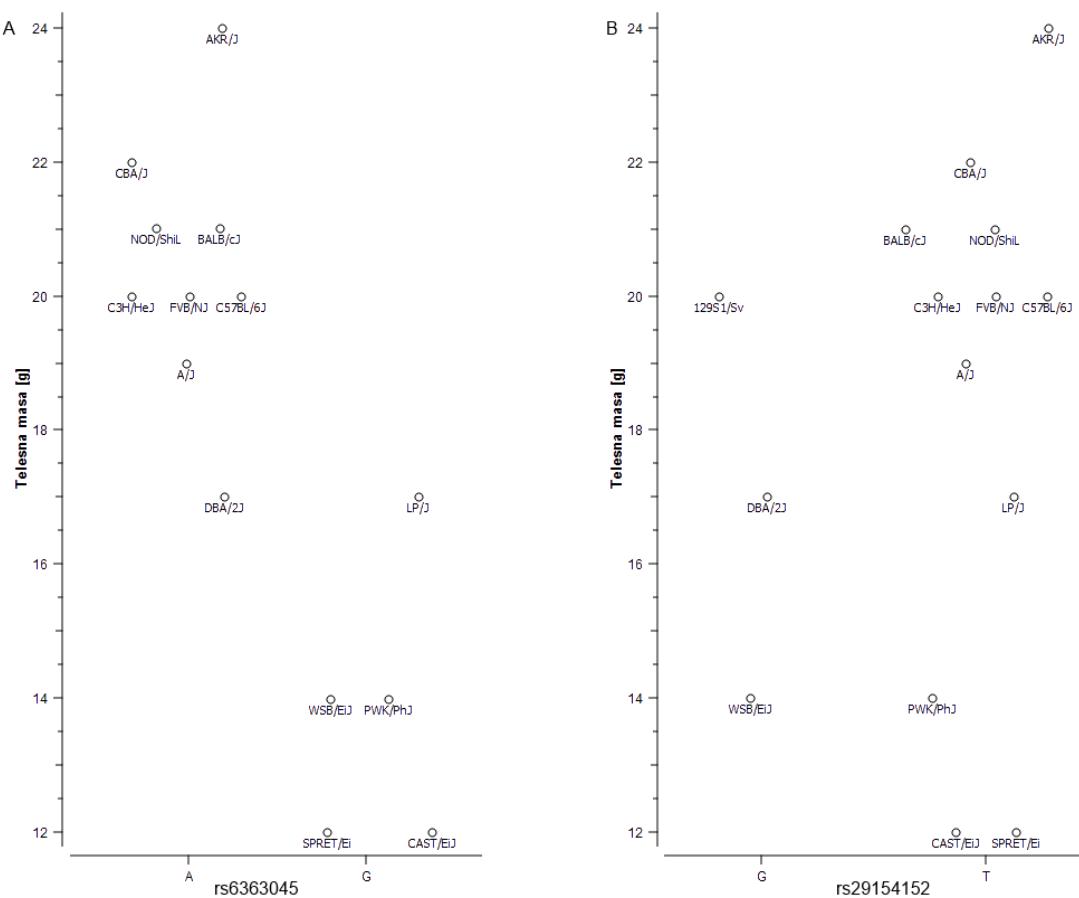
Metodo za asociacijsko analizo *in silico* smo uporabili za preverjanje vpliva vseh znanih polimorfizmov v ncRNA genih na lastnosti zamaščevanja pri inbridiranih linijah miši. V analizo smo vključili 924 polimorfizmov v ncRNA genih (274 v miRNA, 625 v snoRNA in 52 v UCR-jih) in 112 lastnosti zamaščevanja. Na podlagi razpoložljivih podatkov je bilo možno izvesti 48.802 asociacijskih analiz. Vpliv polimorfizma na nalaganje maščobe smo potrdili pri 29.610 primerih, kar zajema 748 SNP-jev in 94 lastnosti. Med 748 SNP-ji z najvišjo informacijsko vrednostjo ($\text{PIC} = 0,4978$; razred 5), je z največ lastnostmi povezan SNP rs29525585, v snoRNA/HG paru *Gm25076/2410131K14Rik*, ki vpliva na 72/105 analiziranih lastnosti (69 %). Najvišji delež povezav med analiziranimi SNP-ji in lastnostmi zamaščevanja, med polimorfizmi z zelo visoko stopnjo informativnosti ($\text{PIC} < 0,45$; razred 5) imata polimorfizma rs27306452 (v snoRNA *Gm25090*) in rs6363045 (v miRNA/HG paru *mmu-miR-1948/Ttc39c*), ki vplivata na 80 % analiziranih lastnosti (52/65).

Kot testni SNP smo za analizo izbrali rs46215658, ki se nahaja na kromosому MMU5 in se ne prekriva z znanimi geni za ncRNA ali protein-kodirajočimi geni. Po enakem postopku kot ostalih 924 polimorfizmov smo preverili vpliv tega polimorfizma na 112 lastnosti nalaganja maščobe.

4.2.2.2 Razvrščanje lokusov za nalaganje maščobe po prioriteti

Po asociacijski analizi smo za 29.610 povezav med 748 SNP-ji in lastnostmi za nalaganje maščobe izračunali LPI. Za vsak SNP smo določili najvišji LPI (LPI_{\max}), s katerim smo analizirane SNP-je razvrstili po prioriteti. Na ta način smo razvrstili 748 SNP-jev, od katerih se 199 SNP-jev nahaja v miRNA genih, 512 v snoRNA genih in 37 v UCR. Med ncRNA geni s SNP-jem z vplivom na nalaganje maščobe, se jih 288 nahaja znotraj gostiteljskih protein-kodirajočih genov. Rezultat asociacijske analize za polimorfizme v omenjenih parih ncRNA/HG z LPI_{\max} je prikazan v prilogi T. Šest SNP-jev z najvišjo informacijsko vrednostjo ($\text{PIC} 0,45 - 0,50$; razred 5), se nahaja v parih ncRNA/HG, pri katerih je bil gostiteljski gen predhodno povezan z nalaganjem maščobe: *Abcc4*, *Gpc3*, *Slit3*, *Gsr*, *Map2* in *Vps13b*.

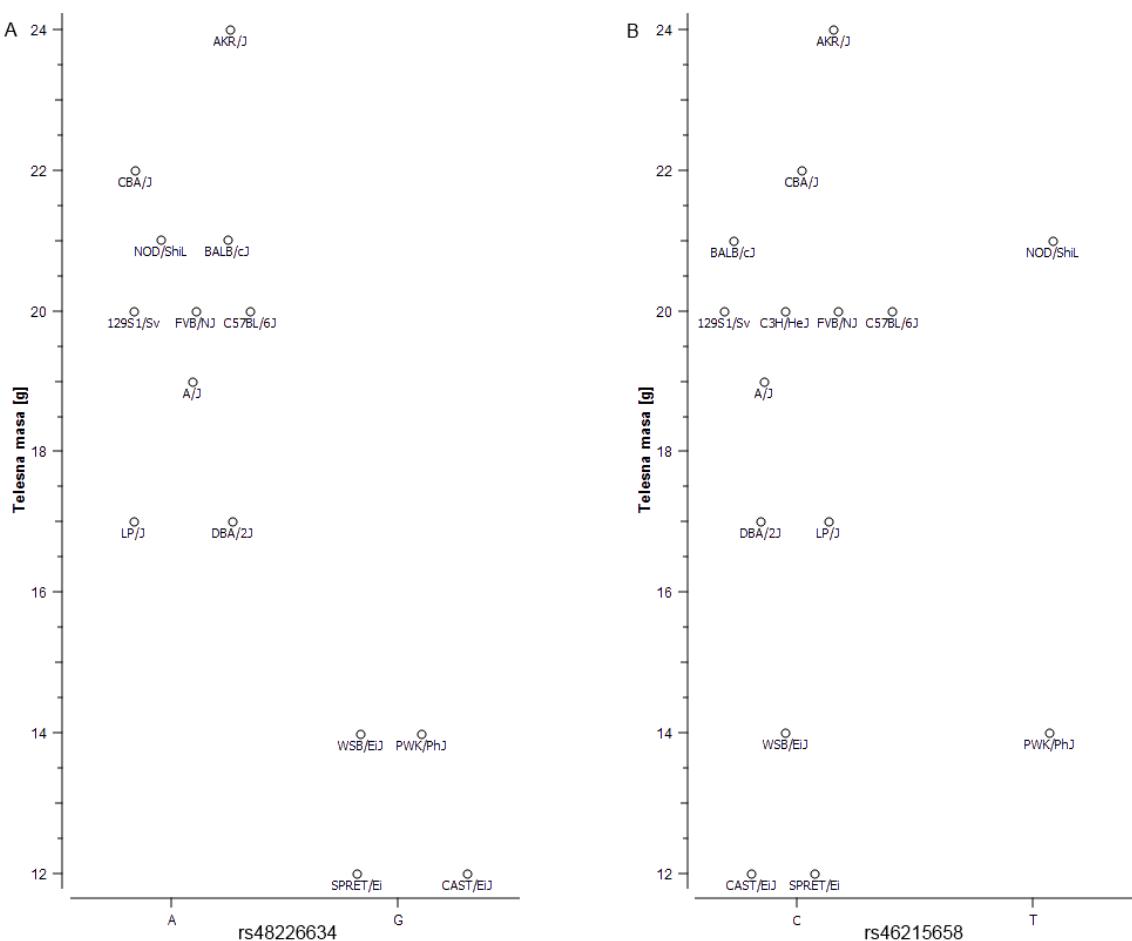
Grafično smo prikazali rezultat analize povezav med štirimi polimorfizmi in telesno maso inbridiranih linij miši (slika 22 in 23). Za prikaz smo izbrali SNP rs6363045 z vrha (1/748) in SNP rs29154152 z zadnje tretjine seznama polimorfizmov (545/748), razvrščenih glede na LPI_{max} . Poleg tega smo grafično prikazali rezultat še za SNP rs48226634, ki se nahaja znotraj miRNA gena *mmu-miR-7b*, ortolog katerega je bil predhodno povezan z nalaganjem maščobe pri človeku. Za testni SNP smo naključno izbrali medgenski polimorfizem rs46215658 na kromosomu MMU5. Na sliki 22 sta prikazana SNP-ja z visoko stopnjo informativnosti, vrednost PIC za rs6363045 je 0,48 (razred 5) in za rs29154152 0,42 (razred 4). Vpliv SNP-ja rs6363045 smo potrdili pri 80 % analiziranih lastnosti (52/65), medtem ko SNP z zadnje tretjine seznama vpliva na 36 % analiziranih lastnosti (33/91). Polimorfizem rs48226634, s srednjo stopnjo informativnosti (PIC = 0,39; razred 3), vpliva na 86 % analiziranih lastnosti (46/53). Vpliv na lastnost telesna masa smo tako potrdili za SNP-ja rs6363045 (slika 22A) in rs48226634 (slika 23A), medtem ko SNP-ja rs29154152 (slika 22B) in rs46215658 (slika 23B) ne vplivata na telesno maso pri miši. Med opazovanimi linijami miši so z višjo telesno maso miši linij AKR/J, CBA/J, NOD/ShiLtJ, BALB/cJ, 129S1/SvImJ, C3H/HeJ, FVB/NJ, C57BL/6J in A/J, medtem ko imajo miši linij DBA/2J, LP/J, WSB/EiJ, PWK/PhJ, SPRET/EiJ in CAST/EiJ nižjo telesno maso.



Slika 22: Vpliv polimorfizmov rs6363045 in rs29154152 na telesno maso pri inbridiranih linijah miši.
Telesna masa miši za SNP z vrha (A) in dna (B) seznama polimorfizmov, razvrščenih po prioriteti glede na LPI_{max} .

Figure 22: Influence of polymorphisms rs6363045 and rs29154152 on body weight in inbred mouse strains.
Body mass of mouse strains for SNP from the top (A) and bottom (B) of the polymorphism list, prioritized according to LPI_{max} .

Na seznamu polimorfizmov, razvrščenih po prioriteti je SNP rs6363045 (slika 22A) uvrščen na prvo mesto ($LPI_{max} = 0,895$), medtem ko je SNP rs29154152 (slika 22B) uvrščen v zadnjo tretjino seznama, na mesto 545/748 ($LPI_{max} = 0,687$). Za lastnost telesna masa pri miših je ocena razlik med aleloma za rs6363045 1,208 ($p < 0,0001$) in za SNP rs29154152 -0,302 ($p = 0,3544$). Razlike med linijami miši z višjo telesno maso so opazne pri rs6363045, kjer imajo vse težje miši alelno različico A in lažje alelno različico G. V telesni masi miši, ki imajo za SNP rs29154152 alelno različico C in tistimi z alelno različico T, ni razlik.



Slika 23: Vpliv polimorfizmov rs48226634 in rs46215658 na telesno maso pri inbridiranih linijah miši.

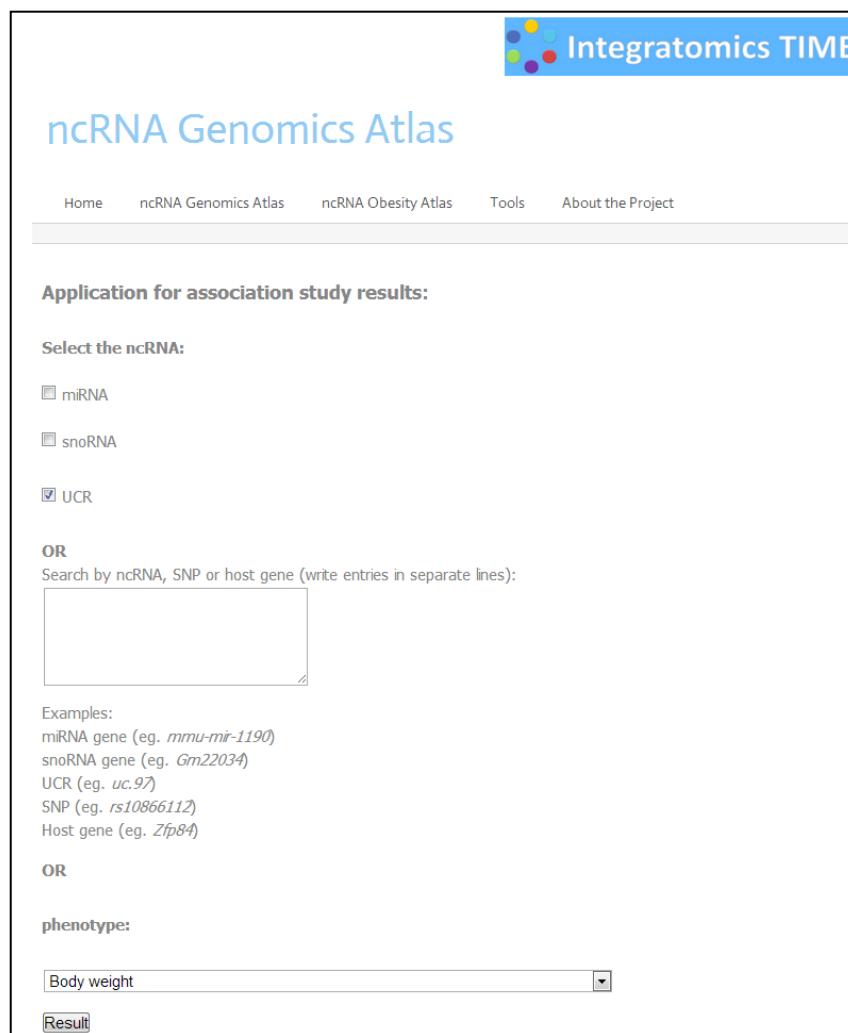
Telesna masa miši za SNP v genu za *mmu-mir-7b* (A) in testnem SNP-ju (B).

Figure 23: Influence of polymorphisms rs6363045 and rs29154152 on body weight in inbred mouse strains.
Body mass for SNP residing within *mmu-mir-7b* (A) and test SNP (B).

Na seznamu polimorfizmov, razvrščenih z LPI_{max} je SNP rs48226634 na 26. mestu ($LPI_{max} = 0,8636$). Za lastnost telesna masa pri miših je ocena razlik med aleloma za rs48226634 1,5197 ($p < 0,0001$), kjer je vidna razlika med težjimi in lažjimi linijami miši (slika 23A). Indeks LPI_{max} za testni polimorfizem rs46215658 je 0,66, kar ga uvršča na 668. mesto na seznamu polimorfizmov razvrščenih z indeksom LPI_{max} . Za telesno maso pri miši smo imeli na voljo podatke za 15 linij miši. Med njimi imajo alelno različico C linije 129S1/Sv, A/J, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, C57BL/6J, CAST/EiJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LP/J, SPRET/Ei in WSB/EiJ, medtem ko imata alelno različico T liniji NOD/ShiL in PWK/PhJ (slika 23B). Med linijama NOD/ShiL in PWK/PhJ ter ostalimi linijami v telesni masi ni razlik, saj je ocena razlik med aleloma 0,1894 ($p = 0,0121$).

4.2.2.3 Razvoj spletne aplikacije za prikaz rezultatov asociacijske analize pri miši

Rezultat asociacijske analize smo v atlasu "ncRNA Obesity Atlas" predstavili s spletno aplikacijo (http://www.integratomics-time.com/ncRNA_genomics_atlas/association.html). Uporabniški vmesnik omogoča zbiranje med tremi razredi ncRNA (miRNA, snoRNA in UCR), iskanje z identifikacijsko številko ncRNA gena, gostiteljskega gena ali polimorfizma ter iskanje po lastnosti vključeni v analizo (slika 24).



Slika 24: Spletna aplikacija za prikaz rezultatov analize vpliva polimorfizmov v ncRNA genih na lastnosti zamaščevanja pri miši

Figure 24: Web application for displaying results of the analysis of the effect of ncRNA gene polymorphisms on fat deposition traits in mouse

Izpis rezultatov asociacijske analize je prikazan na sliki 25. Rezultatom analize (ocena razlik med aleloma (angl. *estimate*), standardna napaka ocene (angl. *standard error*; StdErr), p-vrednost po Bonferroni korekciji (P-bonf)) smo dodali osnovne informacije o polimorfizmu (identifikacijska številka SNP-ja, alelni varianti, pogostost alelov, vrednost PIC ter informacijo o genu za ncRNA, v katerem smo našli polimorfizem ter gostiteljskem genu. Spletno mesto je namenjeno proučevanju vpleteneosti ncRNA v nalaganje maščobe in je prosto dostopno na naslovu URL: http://www.integratomics-time.com/ncRNA_genomics_atlas/association.html.

Association between ncRNA and obesity related traits: body weight																
ncRNA	SNP	Host gene	Host gene name	Code	Measurement	Units	Allel1	Allel2	Freq_Allel1	Freq_Allel2	PIC	Estimate	StdErr	P-bonf	Type	Comments
uc.108	rs33654526	/	/	10401	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	-0.7655	0.0541	<.0001	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	11001	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	-0.3045	0.0647	0.0006	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	14308	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	-0.7318	0.0492	<.0001	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	15125	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	0.3169	0.1106	0.5359	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	15402	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	0.2022	0.053	0.0166	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	2905	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	-0.5737	0.0572	<.0001	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	9101	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	-0.8292	0.0757	<.0001	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	22401	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	-0.4549	0.1057	0.0033	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	22402	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	0.1397	0.128	1	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	22750	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	-0.3281	0.103	0.1856	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	22751	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	0.05471	0.1271	1	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	23001	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	-0.3801	0.119	0.1597	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	23002	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	-14.356	0.065	<.0001	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	23003	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	-11.766	0.0654	<.0001	UCR	/
uc.108	rs33654526	/	/	23004	body weight	g	C	T	9	7	0.49219	-0.8507	0.0638	<.0001	UCR	/

Slika 25: Primer izpisa rezultata asociacijske analize za SNP rs33654526 z uporabo spletne aplikacije
Figure 25: An example of result output of association analysis for SNP rs33654526 using the web application

4.2.3 Analiza tarčnih genov in genov udeleženih v biogenezo miRNA pri miši

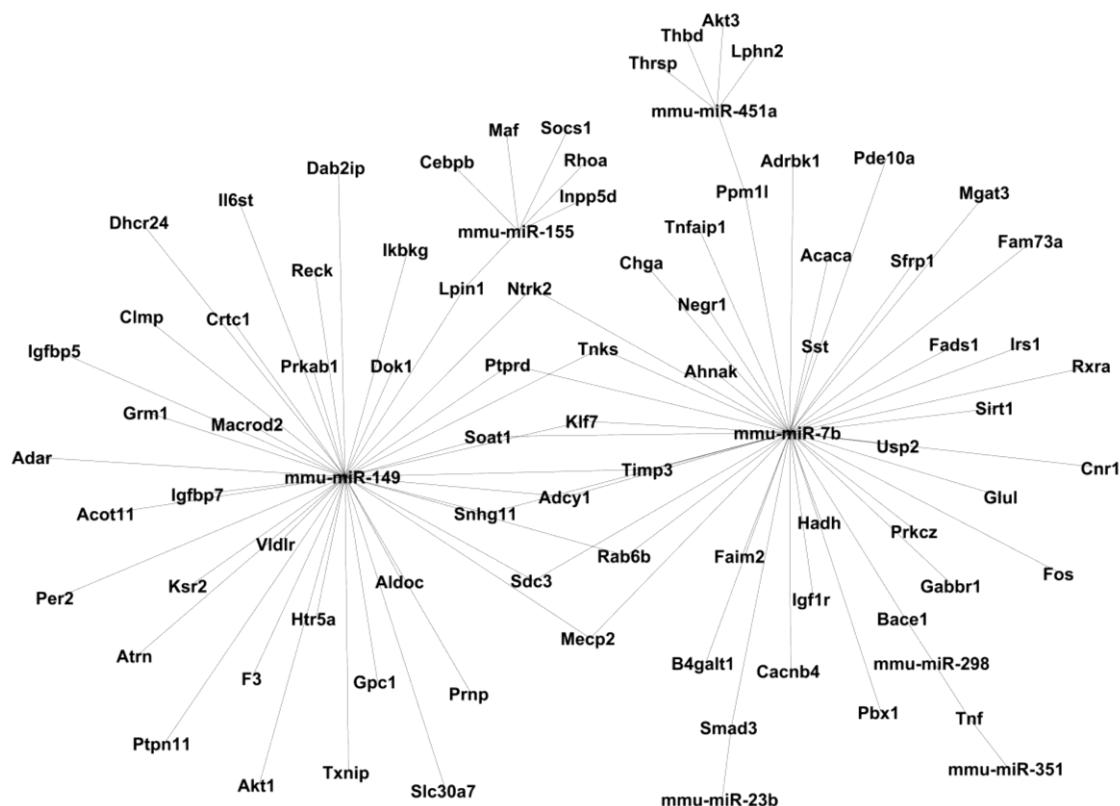
Pri razvoju novih molekularnih označevalcev za nalaganje maščobe smo poleg genetske variabilnosti miRNA genov upoštevali tudi dve drugi kategoriji miRNA reguloma, in sicer: mehanizem za procesiranje miRNA in miRNA tarče. Za polimorfne miRNA pri miši smo poiskali tarčne gene in preverili njihovo vpleteneost v nalaganje maščobe. Za 680 polimorfnih miRNA je trenutno poznanih 940 eksperimentalno potrjenih tarčnih genov. V genomskem atlasu za debelost (Kunek in sod., 2012c) smo preverili, če imajo tarčni geni ali z njimi povezane miRNA že znano vlogo pri nalaganju maščobe. Z lastnostmi zamaščevanja je bilo povezanih 106 tarčnih genov in 13 miRNA v paru z 61 tarčnimi geni (preglednica 15). Izdelali smo mrežo interakcij med polimorfnimi miRNA in njihovimi tarčnimi geni, ki so že bili povezani z nalaganjem maščobe (slika 26). Mikro RNA *mmu-miR-7b* in *mmu-miR-149* imata največ tarčnih genov, od tega 11 skupnih: *Klf7*, *Timp3*, *Snhg11*, *Ntrk2*, *Rab6b*, *Soat1*, *Mecp2*, *Adcy1*, *Sdc3*, *Ptprd* in *Tnks*.

Preglednica 15: Polimorfne miRNA in njihovi tarčni geni, predhodno povezani z nalaganjem maščobe pri miši

Table 15: Polymorphic miRNA and their target genes, previously associated with fat deposition in mouse

miRNA	Tarčni gen
mmu-miR-107	<i>Hif1a</i>
mmu-miR-135b	<i>I11r1</i>
mmu-miR-141	<i>Klf5, Zeb1</i>
mmu-miR-146a	<i>Ifng, Nos2, Stat1, Traf6</i>
mmu-miR-149	<i>Acot11, Adar, Adcy1, Akt1, Aldoc, Atnr, Clmp, Crtc1, Dab2ip, Dhcr24, Dok1, F3, Gpc1, Grm1, Htr5a, Igfbp5, Igfbp7, Ikbkg, Il6st, Klf7, Ksr2, Lpin1, Macrod2, Mecp2, Ntrk2, Per2, Prkab1, Prnp, Ptprn11, Ptprd, Rab6b, Reck, Sdc3, Slc30a7, Snhg11, Soat1, Timp3, Tnks, Txnip, Vldlr</i>
mmu-miR-150	<i>Vegfa</i>
mmu-miR-155	<i>Cebpb, Inpp5d, Lpin1, Maf, Rhoa, Socs1</i>
mmu-miR-206	<i>Bdnf, Id2</i>
mmu-miR-20a	<i>App, Pten, Stat3</i>
mmu-miR-20b	<i>Hif1a, Vegfa</i>
mmu-miR-216a	<i>Pten</i>
mmu-miR-23b	<i>Smad3</i>
mmu-miR-294	<i>Cdkn1a</i>
mmu-miR-295	<i>Cdkn1a</i>
mmu-miR-298	<i>Bace1, Tnf</i>
mmu-miR-29a	<i>Insig1, Zfp36</i>
mmu-miR-34a	<i>Bcl2</i>
mmu-miR-351	<i>Tnf</i>
mmu-miR-429	<i>Flt1, Zeb1</i>
mmu-miR-449a	<i>Bcl2, Ccnd1, E2f3, Myc</i>
mmu-miR-451a	<i>Akt3, Lphn2, Ppm1l, Thbd, Thrsp</i>
mmu-miR-466l	<i>I110</i>
mmu-miR-468	<i>Hells</i>
mmu-miR-669b	<i>Arg1</i>
mmu-miR-7b	<i>Acaca, Adcy1, Adrbk1, Ahnak, B4galt1, Bace1, Cacnb4, Chga, Cnr1, Fads1, Faim2, Fam73a, Fos, Gabbr1, Glul, Hadh, Igf1r, Irs1, Klf7, Mecp2, Mgat3, Negrl, Ntrk2, Pbx1, Pde10a, Ppm1l, Prkcz, Ptprd, Rab6b, Rxra, Sdc3, Sfrp1, Sirt1, Smad3, Snhg11, Soat1, Sst, Timp3, Tnfaip1, Tnks, Usp2</i>
mmu-miR-96	<i>Gstm1</i>

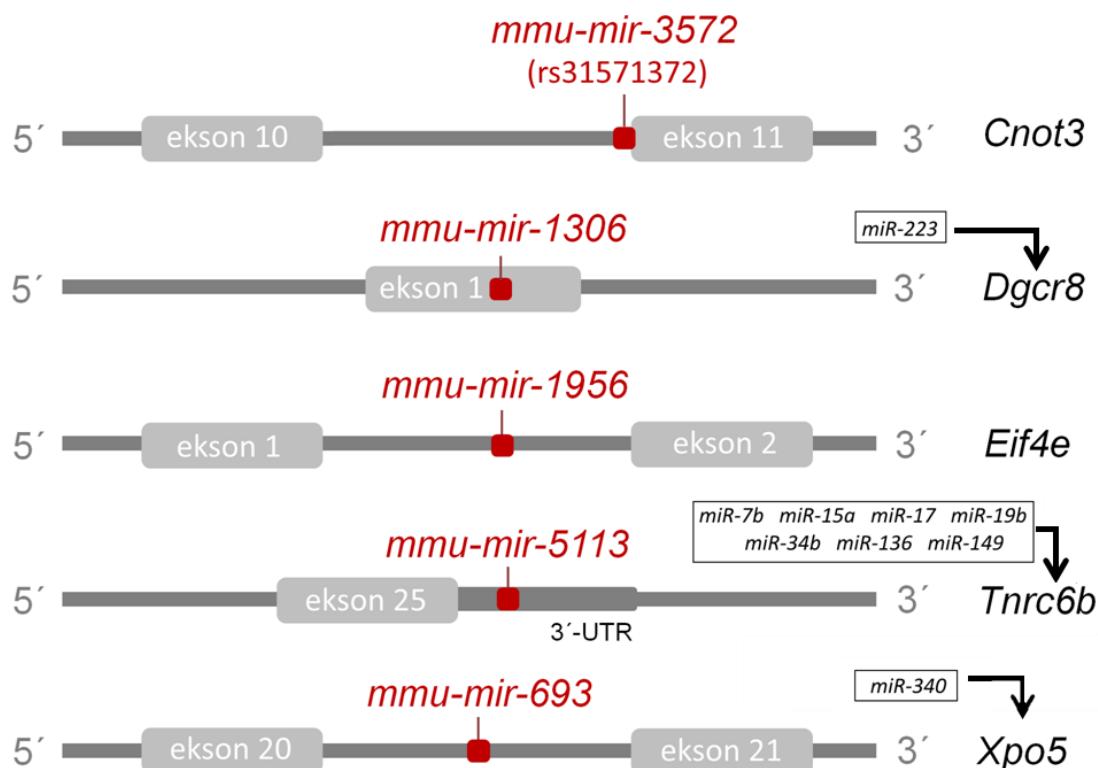
odebeljeno: pari miRNA/HG, ki so bili predhodno v ločenih študijah povezani z nalaganjem maščobe



Slika 26: Mreža interakcij med mmu-miR-7b, mmu-miR-149 ter njunimi tarčami, predhodno povezanimi z nalaganjem maščobe

Figure 26: Interaction network between mmu-miR-7b, mmu-miR-149 and their targets, previously associated with fat deposition

Za polimorfne miRNA z eksperimentalno preverjenimi tarčnimi geni (preglednica 15) smo preverili uvrstitev na lestvici polimorfizmov razporejenih po prioriteti za nalaganje maščobe. Na lestvico je uvrščenih devet miRNA genov, in sicer najvišje *mmu-miR-7b* na 26. mestu (prva desetina seznama), sledijo *mmu-miR-216a* na 197 mestu in *mmu-miR-468* na 216. mestu (tretja desetina seznama), *mmu-miR-96* na 302. mestu (četrta desetina seznama), *mmu-miR-351* in *mmu-miR-23b* v peti desetini seznama, *mmu-miR-669b* in *mmu-miR-429* v sedmi desetini seznama in na predzadnjem mestu *mmu-miR-206*. Potrdili smo vpliv polimorfizma rs48226634 v genu *mmu-mir-7b* na 46 lastnosti zamaščevanja. Polimorfizem rs48226634 ima, med analiziranimi lastnostmi, največji vpliv na telesno maso (LPI = 0,8636), kjer je ocena razlik med aleloma 1,5197 in p-vrednost < 0,0001 (slika 23A).



Slika 27: Geni za biogenezo miRNA, kot gostiteljski in/ali tarčni geni za miRNA pri miši. Prekrivanje miRNA genov (*mmu-mir-3572*, *mmu-mir-1306*, *mmu-mir-1956*, *mmu-mir-5113* in *mmu-mir-693*), SNP-ja rs31571372, gostiteljskih genov (*Cnot3*, *Dgcr8*, *Eif4e*, *Tnrc6b* in *Xpo5*), ter eksperimentalno potrjenih tarčnih mest v gostiteljskih genih za miRNA (označeno s puščico).

Figure 27: Genes encoding for miRNA processing machinery as host and/or target genes for miRNAs in mouse. Overlapping miRNA genes (*mmu-mir-3572*, *mmu-mir-1306*, *mmu-mir-1956*, *mmu-mir-5113* and *mmu-mir-693*), SNP rs31571372, host genes (*Cnot3*, *Dgcr8*, *Eif4e*, *Tnrc6b*, and *Xpo5*), and experimentally validated miRNA targets sites within host genes (marked with arrow).

Geni za biogenezo so lahko gostiteljski geni in hkrati tarčni geni za miRNA (slika 27). Med gostiteljskimi geni za miRNA pri miši je pet genov, ki kodirajo proteine udeležene v procesiranju miRNA, in sicer: *Cnot3*, *Dgcr8*, *Eif4e*, *Tnrc6b*, in *Xpo5*. Geni *Dgcr8*, *Tnrc6b*, in *Xpo5* so tarčni geni za devet miRNA: *mmu-mir-7b*, *mmu-mir-15a*, *mmu-mir-17*, *mmu-mir-19b*, *mmu-mir-34b*, *mmu-mir-136*, *mmu-mir-149*, *mmu-mir-223* in *mmu-mir-340*. V območju zrele miRNA *mmu-mir-3572*, v genu *Cnot3* se nahaja polimorfizem rs31571372, z visoko stopnjo informativnosti (PIC = 0,48; razred 5). V asociacijski analizi *in silico* pri miši smo potrdili vpliv tega SNP-ja na 35 lastnosti za nalaganje maščobe in ga na seznam polimorfizmov, razvrščenih glede na LPI_{max}, uvrstili na 288. mesto (LPI_{max} = 0,772). Za

SNP rs48226634 v *mmu-mir-7b*, s tarčnim genom *Tnrc6b* smo z asociacijsko analizo *in silico*, potrdili močan vpliv na nalaganje maščobe pri miši.

4.2.4 Preverjanje genetske variabilnosti miRNA genov pri govedu

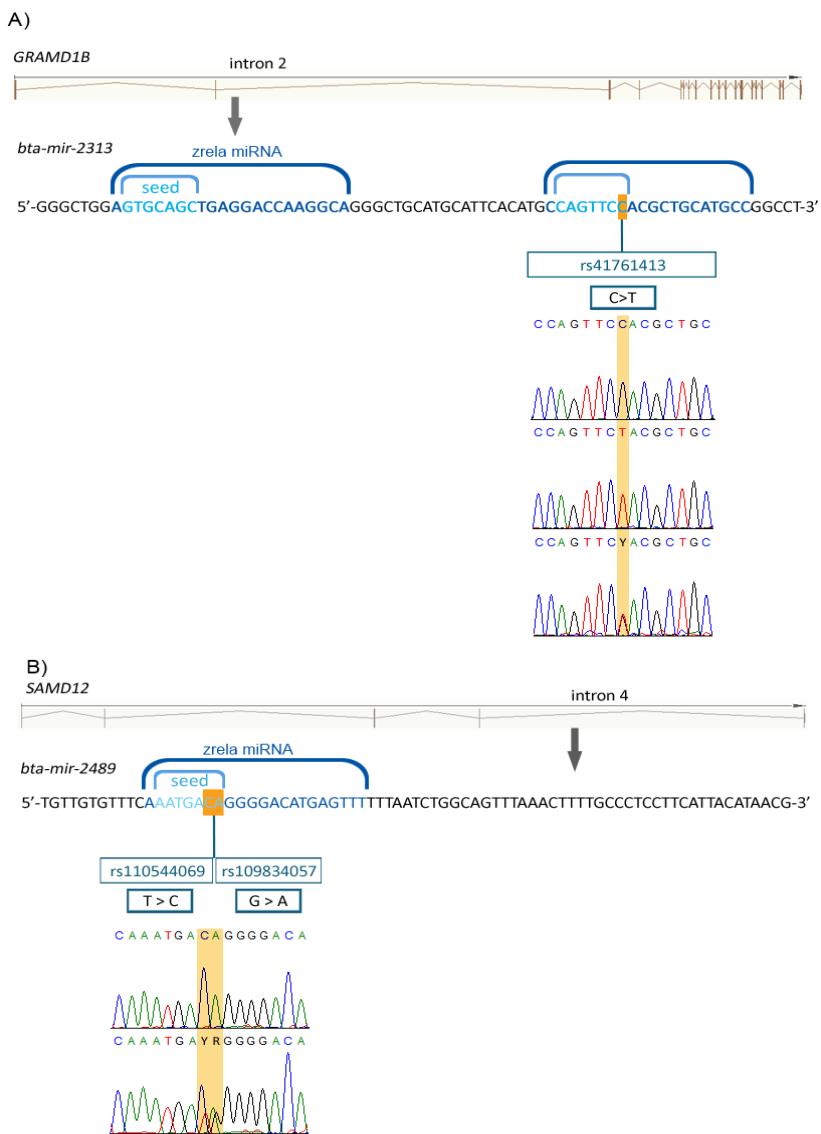
Genetsko variabilnost genov za miRNA pri govedu smo preverili z orodjem miRNA SNiPer 3.0 (slika 28). Pri 17 miRNA smo našli 19 polimorfizmov v območju *seed* (miR-seed-SNP), med katerimi dva SNP-ja rs110544069 in rs109834057 tvorita DNP (angl. *double nucleotide polymorphism*) v *bta-mir-2489* (Jevšinek Skok in sod., 2013).

miRNA name	miRNA	mature miRNA	variation	details
bta-mir-2313	Bos taurus 15:34628901-34628957 [+]	bta-miR-2313-5p Mature: 34628908-34628929 Seed: 34628909-34628915 from TargetScan GGCUGG A GUGC CAGC UGAGGG ACCAAGGC GA GCUGCAUGC AU CAUCAGCCAGUUC C ACGCUGCA UGC CG CCU	rs41761413	In pre-mature 34628957 SNP (C > T)
		bta-miR-2313-3p Mature: 34628950-34628969 Seed: 34628951-34628957 GGGCU GG AGUG CAGC UGAGGG ACCAAGGC GG GCAUGCAUUC AU CAUG CCAGUUC CACGCUGCAU GCC GGCU	rs41761413	In seed 34628957 SNP (C > T)
bta-mir-2489	Bos taurus 14:48094677-48094754 [+]	bta-miR-2489 Mature: 48094688-48094709 Seed: 48094689-48094695 from TargetScan UGUJUGGUUU CA AU GAC A GGGG ACA UGAGU UU UUUAUCUG GC AGUUUAACUUUJUGCCCUCU UCAUUACAUAA CG	rs110544069	In seed 48094694 SNP (C > T)
			rs109834057	In seed 48094695 SNP (A > G)
			rs136326300	In pre-mature 48094753 SNP (C > T)

Slika 28: Rezultat orodja miRNA SNiPer 3.0: genetska variabilnost miRNA *bta-mir-2313* in *bta-mir-2489* pri govedu

Figure 28: The result of the miRNA SNiPer 3.0 tool: genetic variability of miRNA *bta-mir-2313* and *bta-mir-2489* in cattle

Večina polimorfizmov v zapisih za miRNA pri govedu ima, glede na podatke v podatkovnih zbirkah NCBI in Ensembl, neznan status validacije. Poleg tega so lahko polimorfizmi v podatkovnih zbirkah posledica napak sekvenciranja, zato smo eksperimentalno preverili tri polimorfizme v območju *seed*, odgovornem za vezavo miRNA na mRNA. V slovenski populaciji lisastega goveda smo eksperimentalno potrdili SNP rs41761413 v *bta-mir-2313* (slika 29A) in pri cikastem govedu DNP v *bta-mir-2489* (slika 29B).



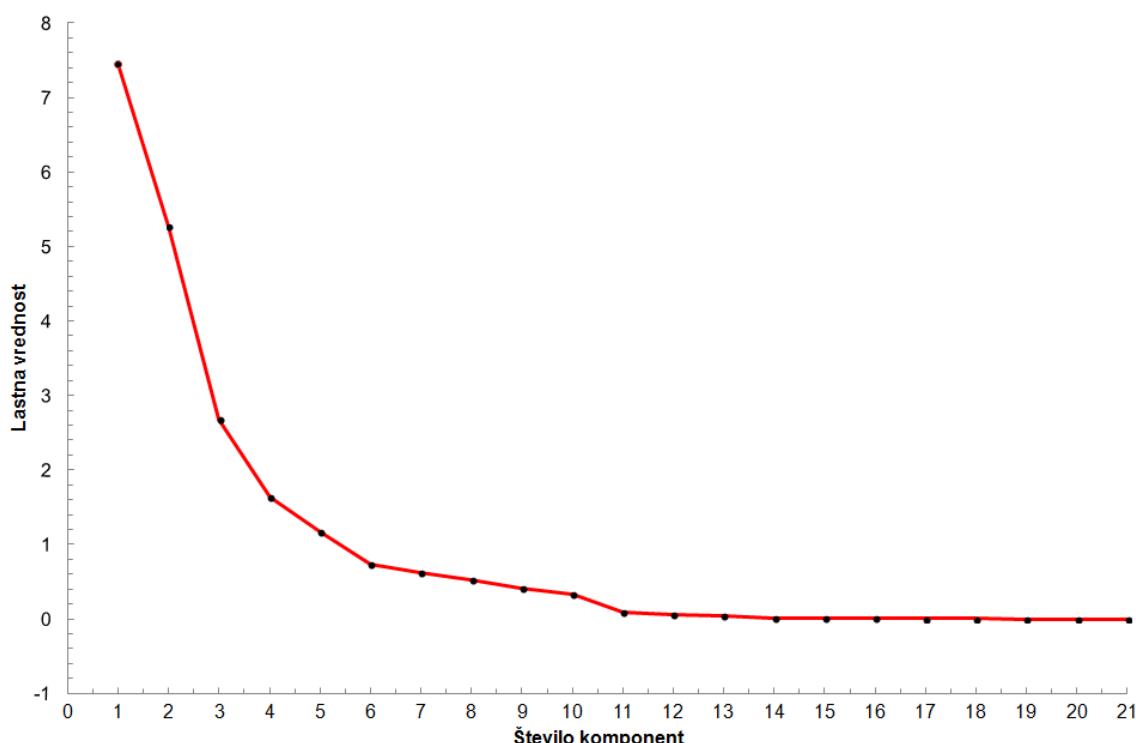
Slika 29: Rezultat eksperimentalnega preverjanja prisotnosti polimorfizmov v miRNA genih *bta-mir-2313*
(A) in *bta-mir-2489* (B) pri govedu

Figure 29: Results of experimental validation of polymorphisms residing within miRNA genes *bta-mir-2313*
(A) and *bta-mir-2489* (B) in cattle

4.2.5 Analiza vpliva polimorfizmov v miRNA genu *bta-mir-2313* na lastnosti rasti in klavne lastnosti lisastega goveda

V genu *bta-mir-2313* v populaciji bikov lisaste pasme smo poleg miR-seed-SNP rs41761413 potrdili še tri SNP-je v pri-miRNA (priloga U). Za preverjanje vpliva teh štirih polimorfizmov na klavne lastnosti, izmerjene na liniji klanja, smo imeli na voljo meritve za 21 lastnosti izmerjene pri 152 bikih iz kontrole priteje. Z namenom nadomestiti večje število spremenljivk (lastnosti) v asociacijski analizi z manjšim številom njihovih

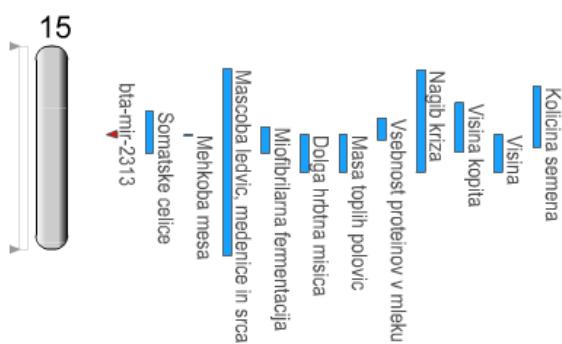
obteženih vsot (komponent), smo v analizi glavnih komponent izračunali korelacije med opazovanimi lastnostmi (priloga V). Prve štiri komponente pojasnijo 81 % skupne variabilnosti osnovnih spremenljivk. Tudi diagram lastnih vrednosti (slika 30), ki prikazuje velikost lastne vrednosti, glede na njeno zaporedno mesto (angl. *scree plot*), nakazuje na to, da so štiri glavne komponente dovolj za analizo.



Slika 30: Diagram lastnih vrednosti za določanje potrebnega števila komponent za asociacijsko analizo pri govedu

Figure 30: Scree plot used to determine the relevant number of principal components for association analysis in cattle

Na podlagi matrike lastnih vektorjev (priloga Z) smo poimenovali prve štiri glavne komponente. Prvo glavno komponento smo poimenovali "prirast", drugo "zamaščenost", tretjo "večvredni telesni deli" in četrto "oblika telesa". Prva komponenta ima najvišje vrednosti za maso mesa, maso toplih polovic in maso ob zakolu, druga za maso loja, tretja za maso in delež večvrednih telesnih delov ter četrta za indeks konformacije. Indeks konformacije je razmerje med maso klavnih polovic, dolžino trupa in prsno globino (Osterc in Čepin, 1984).



Slika 31: Prekrivanje genomskeh lokacij miRNA *bta-mir-2313* s QTL-i pri govedu

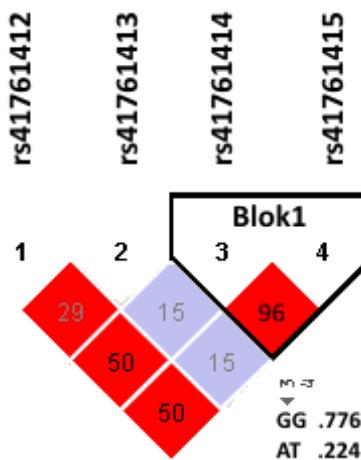
Figure 31: Overlaps of genomic locations of miRNA *bta-mir-2313* with QTL in cattle

Gen za *bta-mir-2313* se prekriva s štirimi QTL-i za proizvodne in klavne lastnosti: maso topnih polovic, dolgo hrbitno mišico, mehkobo mesa ter maščobo ledvic, medenice in srca (slika 31). Preverili smo vpliv genetske variabilnosti tega gena na lastnosti rasti in klavne lastnosti izmerjene v slovenski populaciji lisastega goveda. Za asociacijsko analizo smo uporabili ocene komponent dobljene s PCA ter rezultat genotipizacije bikov iz kontrole priteje. Ugotovili smo, da polimorfizma rs41761414 in rs41761415 v genu za *bta-mir-2313* vplivata na obliko telesa pri govedu, medtem ko drugih razlik ni. Ocene srednje vrednosti po metodi najmanjših kvadratov za komponento poimenovano "oblika telesa" je najvišja pri živalih z alelno različico AA za SNP rs41761414 in TT za SNP rs41761415 (preglednica 16).

Preglednica 16: Rezultat asociacijske analize med polimorfizmi v genu *bta-mir-2313* in klavnimi lastnostmi pri lisastem govedu

Table 16: The results of association analysis between polymorphisms within *bta-mir-2313* gene and carcass related traits in the Slovenian Simmental cattle

SNP	Alel	Frekvenca alelov	Oblika telesa		
			Ocena srednje vrednosti	Standardni odklon	p-vrednost
rs41761414	AA	10,64	0,67	0,27	0,026
	GA	50,35	-0,03	0,14	
	GG	39,01	0,35	0,15	
rs41761415	GG	38,06	0,35	0,16	0,020
	GT	50,00	-0,04	0,14	
	TT	11,94	0,70	0,27	



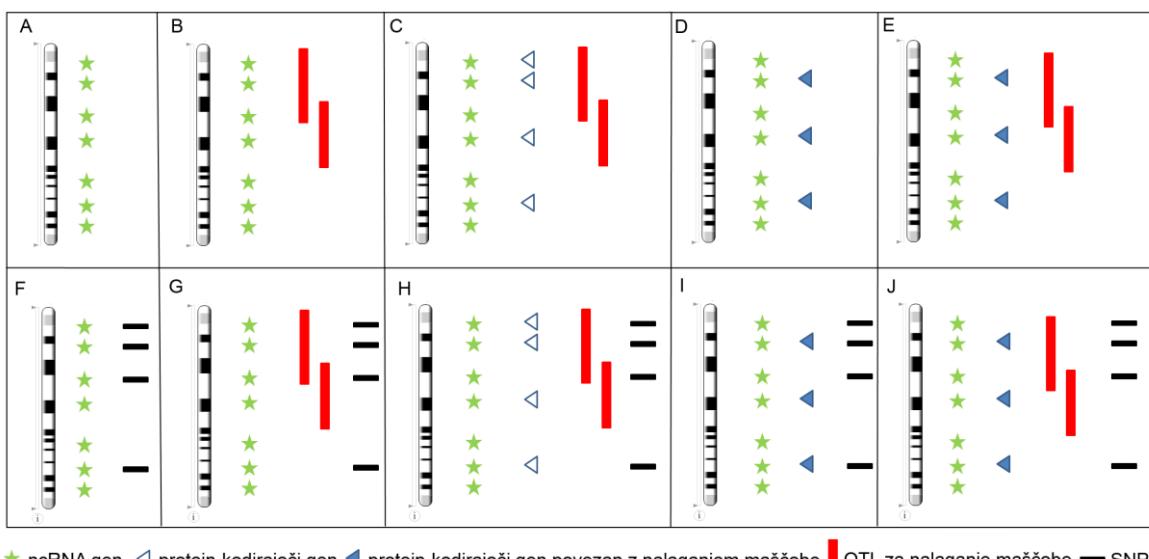
Slika 32: Analiza haplotipov za štiri SNP-je v genu *bta-mir-2313*

Figure 32: Haplotype analysis for four SNPs within *bta-mir-2313* gene

Za polimorfizme v genu *bta-mir-2313* smo izračunali genetsko neravnovesje (LD). Barvna shema kvadratov prikazuje vrednosti D' in LOD, medtem ko števila v njih predstavljajo delež pojasnjene variance (slika 32). Rdeči kvadrati prikazujejo najvišje vezavno neravnovesje, kjer je $LOD \geq 2$ in $D' = 1$, medtem ko modra barva kvadratov pomeni nizko vezavno neravnovesje ($LOD < 2$ in $D' = 1$). Delež pojasnjene variance za polimorfizma rs41761414 in rs41761415 je 96 % ($r^2 = 0,96$), $D' = 1$ ter vrednost LOD = 11,07. Polimorfizma rs41761414 in rs41761415 sta v visokem genetskem neravnovesju in tvorita haplotipski blok.

4.2.6 Pozicijska kandidatna območja z ncRNA geni z vplivom na fenotip

Za določanje pozicijskih kandidatnih območij za nalaganje maščobe smo, pri vseh treh proučevanih vrstah, prekrili genomske lokacije ncRNA genov, gostiteljskih genov in QTL-ov za nalaganje maščobe. Tem trem tipom lokusov smo pri miši dodali še lokacije polimorfizmov z vplivom na lastnosti zamaščevanja (slika 33). V desetih korakih smo upoštevali različne kombinacije prekrivanj genomskeh lokacij lokusov in pri vsakem koraku določili število ncRNA genov, ki se prekrivajo z ostalimi lokusi (preglednica 17).



Slika 33: Kombinacije prekrivanj genomskega razpona lokusov za določanje pozicijskih kandidatnih območij z ncRNA geni. A: ncRNA geni razporejeni po genomu, B: prekrivanje ncRNA genov in QTL-ov, C: prekrivanje ncRNA genov, protein-kodirajočih genov in QTL-ov, D: prekrivanje ncRNA genov in protein-kodirajočih genov, povezanih z nalaganjem maščobe, E: prekrivanje ncRNA genov, protein-kodirajočih genov za nalaganjem maščobe in QTL-ov, F-J: prekrivanjem, opisanim pod točkami A-E, dodani polimorfizmi z vplivom na nalaganje maščobe pri miši

Figure 33: Combinations of overlaps in genomic locations of loci for determination of the position of candidate areas with ncRNA genes. A: genomic distribution of ncRNA genes , B: overlaps of ncRNA genes and QTL for fat deposition traits C: overlaps of ncRNA genes, protein-coding genes and QTL for fat deposition traits D: overlaps of ncRNA genes and protein-coding genes associated with fat deposition, E: overlaps of ncRNA genes, protein-coding genes for fat deposition and QTL for fat deposition traits, F-J: overlaps of genomic locations of the loci described under A-E, with the addition of polymorphisms associated with fat deposition in mice

Genomske lokacije ncRNA genov (slika 33A) smo prekrili s QTL-i za nalaganje maščobe (slika 33B), pri tem se je pri miši s QTL-i prekrivalo 1.807 ncRNA genov, pri govedu 827 in pri prašiču 847 ncRNA genov (preglednica 17). V tretjem koraku smo prekrili genomske lokacije ncRNA genov, protein-kodirajočih genov in QTL-ov za lastnosti nalaganja maščobe (slika 33C). S QTL-i za nalaganje maščobe se prekriva 528 parov ncRNA/HG pri miši, 400 pri govedu in 293 pri prašiču. V četrtem koraku smo ncRNA gene prekrili s protein-kodirajočimi geni z vplivom na nalaganje maščobe (slika 33D) in v petem koraku tem parom dodali še QTL-e za lastnosti nalaganja maščobe (slika 33E).

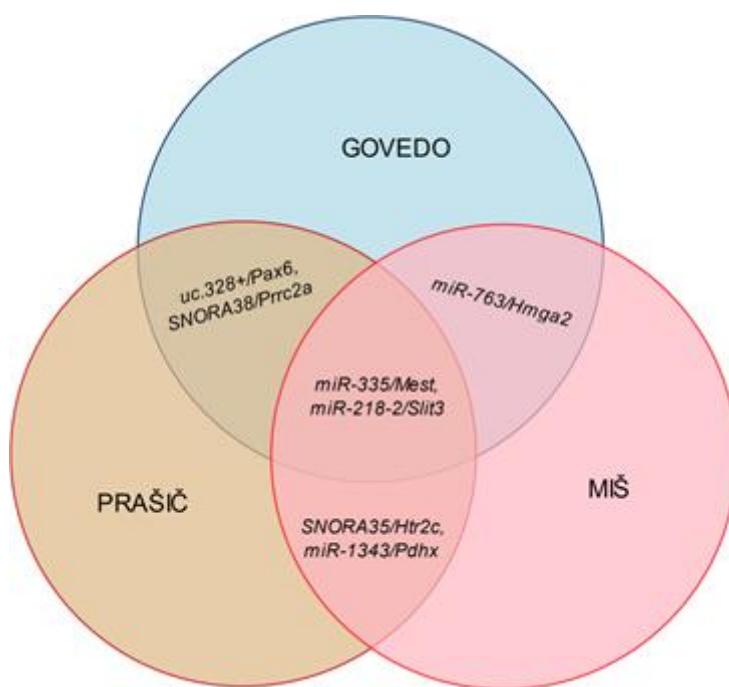
Preglednica 17: Število določenih pozicijskih kandidatnih območij v genomu miši, goveda in prašiča glede na deset kombinacij kriterijev

Table 17: Number of determined positional candidate regions in mouse, cattle, and pig genome using ten criteria combinations

Kombinacija prekrivanj genomskeh lokacij	Pozicija			Asociacijska študija	Št. ncRNA genov za:		
	Prekrivanje ncRNA gena in:		SNP z vplivom na nalaganje maščobe		miš	govedo	prašič
	HG	HG za nalaganje maščobe					
1	x	x	x	x	3.992	1.986	1.233
2	x	x	✓	x	1.807	827	847
3	✓	x	✓	x	528	400	293
4	/	✓	x	x	75	43	18
5	/	✓	✓	x	53	32	17
6	x	x	x	✓	748	/	/
7	x	x	✓	✓	252	/	/
8	✓	x	✓	✓	92	/	/
9	/	✓	x	✓	13	/	/
10	/	✓	✓	✓	8	/	/

HG: gostiteljski gen za ncRNA; ✓: kriterij je upoštevan; x: kriterij ni upoštevan; /: podatek ni smiseln

Prekrivanje genomskeh lokacij ncRNA genov, protein-kodirajočih genov ter QTL-ov za nalaganje maščobe je najbolj zaostrena kombinacija kriterijev, ki smo jo uporabili pri vseh treh vrstah. Pri miši je takšnih prekrivanj 53, pri govedu 32 in pri prašiču 17. Pri vseh treh vrstah sta med pozicijskimi kandidatnimi območji za nalaganje maščobe dva para miRNA/HG: *miR-218/Slit3* in *miR-335/Mest* (slika 34). Pri dveh vrstah smo določili pozicijska kandidatna območja z enakimi ncRNA/HG pari, in sicer: *uc.328+/Pax6*, *SNORA38/Prrc2a* pri govedu in prašiču, *SNORA35/Htr2c*, *miR-1343/Pdhx* pri prašiču in miši ter par *miR-763/Hmga2* pri govedu in miši.



Slika 34: Ohranjenost kolokacije parov ncRNA/HG v pozicijskih kandidatnih območjih za nalaganje maščobe pri miši, govedu in prašiču

Figure 34: Conservation of ncRNA/HG pairs within positional candidate regions for fat deposition in mouse, cattle, and pig

Pri miši smo poleg omenjenih kombinacij prekrivanj dodali še polimorfizme v ncRNA genih, za katere smo v asociacijski študiji dokazali vpliv na nalaganje maščobe (slika 33F-J). Pri miši se osem polimorfnih ncRNA genov, z vplivom na nalaganje maščobe, prekriva s protein-kodirajočimi geni in QTL-i za nalaganje maščobe. Ti pari ncRNA/HG so: *Gm26070/Slit3*, *Gm24729/Map2*, *Gm26236/Eng*, *Gm24771/Vps13b*, *Gm24727/Gsr*, *mmu-mir-6384/Gpc3*, *mmu-mir-717/Gpc3*, *mmu-mir-764/Htr2c*. Z upoštevanjem prekrivanj genomskeh lokacij vseh tipov lokusov smo določili močnejša pozicijska kandidatna območja za nalaganje maščobe s protein-kodirajočim genom *Slit3*. Gen *Slit3* je gostiteljski gen za dve ncRNA (*mmu-mir-218-2* in *Gm26070*) pri miši, miRNA genu *bta-mir-218-2* pri govedu in *ssc-mir-218b* pri prašiču.

4.3 POVZETEK POTEKA DELA

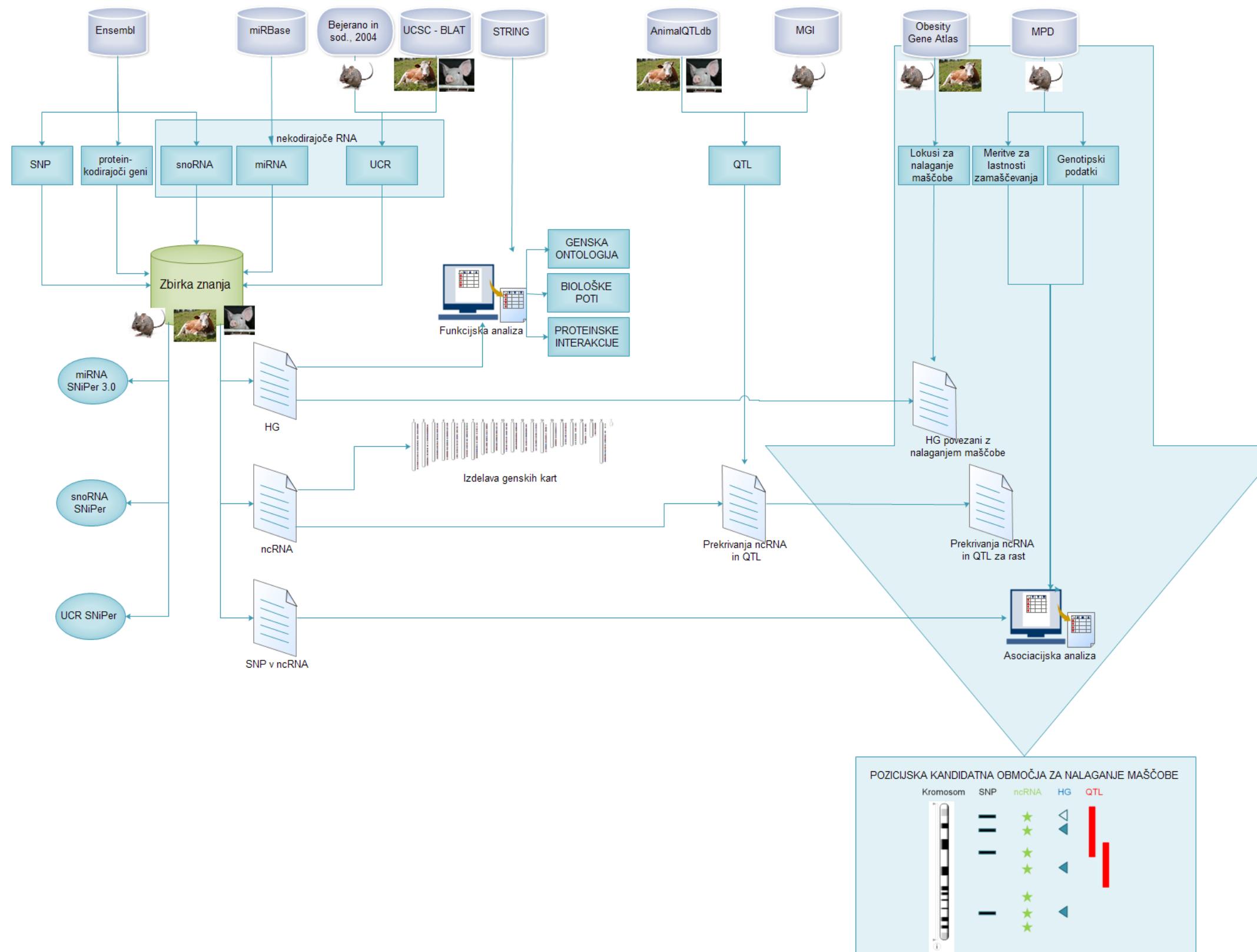
V preglednici 18 so prikazani namen, metodologija in glavni rezultati raziskave s povezavo na poglavje. Rezultate raziskave smo združili v genomske atlas, na podlagi katerega smo z različnimi pristopi razvili nove potencialne biooznačevalce za nalaganje maščobe (slika 35).

Preglednica 18: Shema poteka dela. Namen, metodologija in glavni rezultati raziskave.

Table 18: Workflow of the study. The purpose, methodology and main results of the study.

	Namen	Metodologija	Rezultat	Poglavlje
Genomski atlas za ncRNA	Izdelati zbirko znanja za ncRNA: zbrati ncRNA gene, polimorfizme in HG za ncRNA gene	Ensembl/BioMart UCSC-BLAT miRNA SNiPer 3.0 PyCoGent	7.213 ncRNA 1.784 polimorfizmov v ncRNA genih 1.089 HG	4.1 4.1.1
	Razviti orodja za iskanje polimorfizmov v ncRNA genih	MySQL Perl	Dve novi orodji: snoRNA in UCR SNiPer Nadgradnja orodja miRNA SNiPer	4.1.2.2
	Preveriti ujemanje lokacij genov za ncRNA in SNP-jev na DNA-mikromrežah	DNA-mikromreže: Bovine HD 770K Pig 60K SNP Mouse Diversity Genotyping Array	Miš: 76 SNP-jev, 70 ncRNA, 10 HG Govedo: 36 SNP-jev; 29 ncRNA; 14 HG Prašič: 1 SNP; snoRNA; 1 HG	4.1.1.2
	Analizirati vpletenost HG v gensko ontologijo in obogatene biološke poti	STRING software 9.1	GO Biološke poti Miš 110 2 Govedo 42 1 Prašič 29 1	4.1.4
	Preveriti prekrivanje ncRNA genov in HG z lokusi za nalaganje maščobe	Obesity Gene Atlas	85 HG 44 miRNA 2 para miRNA/HG: -mir-448/Htr2c (miš), -mir-335/Mest (miš, govedo, prašič)	4.2.1
	Analizirati vpliv polimorfnih ncRNA genov na nalaganje maščobe pri miši	Večlastnostna analiza SAS/STAT 9.3: - 924 SNP-jev - 112 lastnosti	48.802 analiz → 29.837 povezav 748 SNP-jev z vplivom na nalaganje maščobe	4.2.2.1
	Razvrstiti polimorfizme v ncRNA genih glede na njihov vpliv na fenotip	Indeks za razvrščanje SNP-jev po prioriteti (LPI _{max})	Seznam 748 polimorfizmov	4.2.2.2
	Poiskati tarčne gene za miRNA pri miši	CyTargetLinker	Največ tarčnih genov mmu-miR-7b in mmu-miR-149	4.2.3
	Preveriti genetsko variabilnost miRNA genov pri govedu	miRNA SNiPer 3.0 vzorci goveda PCR, sekvenciranje	Potrdili SNP-je v miRNA genih bta-mir-2313 in bta-mir-2489	4.2.4
	Določiti pozicijska kandidatna območja z ncRNA geni za nalaganje maščobe	Prekrivanje genov za ncRNA s: HG in QTL-i za nalaganje maščobe	Pozicijska kandidatna območja: 53 pri miši, 32 pri govedu in 17 pri prašiču. Pri vseh treh vrstah: miR-218-2/Slit3, miR-335/Mest	4.2.6
Specializirani del: "ncRNA obesity atlas"	Izdelati genomski atlas za ncRNA	MySQL HTML CSS	Spletno mesto – ncRNA Genomics Atlas, ncRNA Obesity Atlas	4.1 4.2

HG: gostiteljski gen, PIC: informacijska vrednost polimorfizma, ncRNA nekodirajoče RNA, QTL: lokusi za kvantitativne lastnosti, MIG: Mouse Genome Informatics, GO: genska ontologija



Slika 35: Shema poteka dela
Figure 35: Workflow of the study

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Trend genetskih raziskav temelji na asociacijskih študijah celotnega genoma, kar je privelo do ogromnih količin podatkov. Primer obsežnih raziskav je proučevanje nalaganja maščob, saj so s predhodnimi raziskavami potrdili vpliv velikega števila lokusov na to lastnost. Večina do sedaj znanih lokusov za nalaganje maščobe je protein-kodirajočih genov in QTL-ov, vendar v zadnjem desetletju odkrivajo, da so v ta proces udeležene tudi miRNA. Od leta 2004, ko je bila prvič potrjena regulatorna funkcija miRNA pri diferenciaciji adipocitov, je bilo z nalaganjem maščobe povezanih 221 miRNA (Kunej in sod., 2012c). Z nalaganjem maščobe je bilo do sedaj povezanih 6,82 % (1.551/22.740) znanih ortolognih protein-kodirajočih in 11,58 % (221/1.908) miRNA genov pri miši. Med vsemi razredi ncRNA so bile z debelostjo neposredno povezane le miRNA, ki so tudi najbolj raziskane ncRNA (Esau in sod., 2004; Kajimoto in sod., 2006; Georges in sod., 2007; Ortega in sod., 2010). Znana je vloga ncRNA pri mnogih osnovnih celičnih procesih (Bejerano in sod., 2004; Mercer in sod., 2009), zato je smiselno njihovo vpletjenost v nalaganje maščobe podrobno proučiti. Trenutne verzije prosto dostopnih podatkovnih zbirk za ncRNA so najpogosteje omejene na zbiranje fizičnih lastnosti posameznih razredov ncRNA in posamezno vrsto. V ta namen smo izdelali centralno mesto za proučevanje ncRNA in njihovega vpliva na kompleksne lastnosti, s primerom študije za nalaganje maščobe. Razvili smo genomski atlas za tri razrede ncRNA pri miši, govedu in prašiču. Genomski atlas "*ncRNA Genomics Atlas*" smo razdelili na splošni in specializirani del in je zasnovan tako, da ga bo možno dopolnjevati z novimi razredi ncRNA in fenotipskimi podatki tako v splošnem kot tudi specializiranem delu. Možnost vključevanja novih podatkov je odvisna od pogostosti, skladnosti in obsega nadgradnje podatkovnih zbirk, ki pri našem delu predstavljajo primarni vir podatkov.

5.1.1 Splošni del genomskega atlasa za ncRNA

Splošni del genomskega atlasa "*ncRNA Genomics Atlas*", ki smo ga razvili, je namenjen zbiranju ncRNA genov ter splošnemu proučevanju vloge ncRNA. Genomski atlas za ncRNA vsebuje zbirko znanja z geni za ncRNA, protein-kodirajočimi geni in polimorfizmi ter analize vpleteneosti gostiteljskih genov v biološke in celične procese, molekularne funkcije ter biološke poti in mreže. Izpis parov ncRNA/HG iz zbirke znanja je možen z uporabo spletne aplikacije, ki smo jo razvili v ta namen. Genomske podatke za miRNA, snoRNA, protein-kodirajoče gene ter polimorfizme smo z delno avtomatizacijo pridobili iz različnih podatkovnih zbirk, medtem ko smo genomske podatke za UCR-je pridobili z algoritmom BLAT (Kent, 2002). Genomske lokacije UCR-jev so znani le pri človeku in so določeni na verziji genoma NCBI34/hg16, ki je bila objavljena julija 2003 (Bejerano in sod., 2004). Zbirko UCR-jev pri človeku smo dopolnili z identifikacijo UCR-jev pri miši, govedu in prašiču. S poravnavo genomskeih zaporedij znanih UCR-jev pri človeku smo identificirali UCR-je pri miši, govedu in prašiču v skladu s trenutnimi verzijami genoma. Zaporedja zelo ohranjenih regij so Bejerano in sod. (2004) določili s poravnavo genoma človeka, miši in podgane, vendar bi bilo za bolj natančno definicijo, potrebno poravnati nove verzije genoma med več vrstami ter natančno določiti dolžino in delež medvrstne ohranjenosti teh regij.

Genomske lokacije ncRNA genov smo prikazali na genskih kartah. Genske karte omogočajo celoten pregled nad genomsko razporeditvijo ncRNA genov ter identifikacijo pozicijskih kandidatnih območij z večjo gostoto ncRNA genov na genomu in so uporabne za predstavitev rezultatov, saj so na njih natančno določene genomske lokacije proučevanih lokusov in morebitnih prekrivanj med njimi. Nekateri raziskovalci genske karte in lokuse na njih še vedno rišejo ročno, kar je zamuden in nenatančen postopek. Za izdelavo genskih kart smo uporabili orodje Flash GViewer (http://gmod.org/wiki/Flash_GViewer), ki je trenutno najbolj uporabno prosto dostopno orodje za animiran prikaz genomskih lokacij lokusov. Orodje omogoča vnos podatkov o številu in dolžini kromosomov pri katerikoli vrsti, vendar je okno delovne površine fiksno in omejeno s strani proizvajalca. Z dodanim drsnikom bi bilo orodje uporabnejše, saj bi omogočalo prikaz večjega števila prekrivajočih se lokusov. Rešitev vidimo v izdelavi

novega orodja, ki bo uporabniku omogočalo vnos velikega števila lokusov na več ravneh in dodanim drsnikom, ki bi rešil težavo s prostorsko omejitvijo.

Bioinformacijske metode omogočajo pregled velikega števila podatkov, kar je v skladu z obratno genetiko (angl. *reverse genetics*), saj lahko molekularne označevalce določamo v smeri od fenotipa proti genotipu. V podatkovnih zbirkah so pogosta neskladja v verzijah genoma, kar lahko privede do napačnih rezultatov, saj se genomske lokacije med verzijami močno razlikujejo. Dostopnost podatkov v zbirkah je za vrsto in tip proučevanega lokusa specifična. Najbolj proučevani vrsti sta človek in miš, medtem ko je podatkov za domače živali veliko manj. V predhodnih raziskavah smo razvili prosto dostopno orodje miRNA SNiPer za iskanje polimorfizmov v treh regijah miRNA genov, in sicer pre-miRNA, zreli miRNA in regiji *seed*. Orodje miRNA SNiPer smo v prvotni verziji 1.0 zasnovali za 13 vrst vretenčarjev in ga do sedaj že trikrat posodobili v skladu z zadnjimi verzijami genoma. Zadnja posodobitev orodja miRNA SNiPer (verzija 3.0) omogoča iskanje polimorfizmov za 16 živalskih vrst, med njimi štiri vrste domačih živali: prašič, konj, govedo in kokoš. Izdelali smo katalog polimorfnih miRNA pri prašiču, konju, govedu in kokoši. Katalog predstavlja kontrolo razvitega orodja, saj so vsi polimorfizmi v genih za miRNA ročno preverjeni. Med preverjanjem smo našli veliko nepravilnosti v zbirkah iz katerih črpamo podatke, kar nam služi za razvoj kontrolnih programov za to orodje. Posodobitev razvitih orodij je odvisno predvsem od posodobitev primarnih podatkovnih zbirk. Dinamika posodobitev zbirk, iz katerih črpamo podatke za orodja, ki jih razvijamo, se med podatkovnimi zbirkami razlikuje. Podatkovno zbirko Ensembl tako posodabljajo štiri do petkrat letno, medtem ko je podatkovna zbirka miRBase praviloma posodobljena enkrat letno. Pri uvažanju podatkov je potrebna kontrola, saj se verzije genoma med zbirkami lahko razlikujejo, kar pomeni razlike v genomske lokacijah. Po avtomatiziranem uvozu podatkov je pomembno podatke preveriti tudi ročno.

Poleg orodja miRNA SNiPer smo razvili še dve bioinformacijski orodji snoRNA in UCR SNiPer za iskanje genetske variabilnosti snoRNA genov in UCR-jev pri miši, govedu in prašiču, ki jih nameravamo v prihodnje, po vzoru orodja miRNA SNiPer, nadgraditi za več vrst. V izpis orodij snoRNA in UCR SNiPer smo dodali informacijo o SNP-jih na DNA-mikromrežah, ki se nahajajo znotraj snoRNA genov in UCR-jev. Uporaba DNA-mikromrež, se je v živinoreji izkazala kot učinkovito orodje za asociacijske analize na

ravni celotnega genoma, še zlasti pri govedu, kjer število polimorfizmov presega 800.000. Na komercialnih DNA-mikromrežah se nahajajo tudi polimorfizmi v ncRNA genih, in sicer: 76 SNP-jev na "Mouse Diversity Genotyping Array, 36 SNP-jev na "Bovine HD 770K" in en SNP na "Pig 60K SNP". Tako lahko raziskovalci z uporabo orodij, razvitih v tej nalogi, bolje interpretirajo rezultate analiz GWAS. Poleg tega, lahko v svoji populaciji proučijo vlogo genetske variabilnosti ncRNA genov, ki jih zajema analiza z DNA-mikromrežami.

Z uporabo bioinformacijskega orodja miRNA SNiPer 3.0 smo poiskali SNP-je v genih za miRNA pri kokoši, prašiču, govedu in konju (Jevšinek Skok in sod., 2013). Večina polimorfizmov v zapisih za miRNA ima, glede na podatke v podatkovnih zbirkah NCBI in Ensembl, neznan status validacije, zato smo pri govedu med 19 miR-seed-SNP-ji za eksperimentalno potrjevanje izbrali tri: rs41761413 v *bta-mir-2313* ter rs110544069 in rs109834057, ki v *bta-mir-2489* tvorita DNP. Genomsko lokacijo gena za miRNA *bta-mir-2313* smo prekrili z znanimi QTL-i za govedo in našli prekrivanje tega območja s QTL-i za plodnost, rast in klavne lastnosti. V genu za *bta-mir-2313* smo poleg miR-seed-SNP-ja potrdili še tri polimorfizme v pri-miRNA in za vse štiri polimorfizme preverili vpliv na klavne lastnosti, izmerjene v naši populaciji lisastega goveda. Za dva polimorfizma v pre-miRNA, ki sta v genetskem neravnovesju, smo potrdili vpliv na obliko telesa. Meritve smo pridobili iz kontrole prieje, kjer se rejec glede na tržno ceno klavne živine, lahko odloči o prodaji živali. Tržna cena je najbolj odvisna od subjektivne ocene zamaščenosti (pokritost z lojem), zato želimo zamaščenost standardizirati, da bi se klavne lastnosti živali čim bolj izrazile. V prihodnjih raziskavah bi bilo zato smiselno proučiti vpliv polimorfizmov v ncRNA genih na pitovne in klavne lastnosti živali v izenačenih pogojih reje.

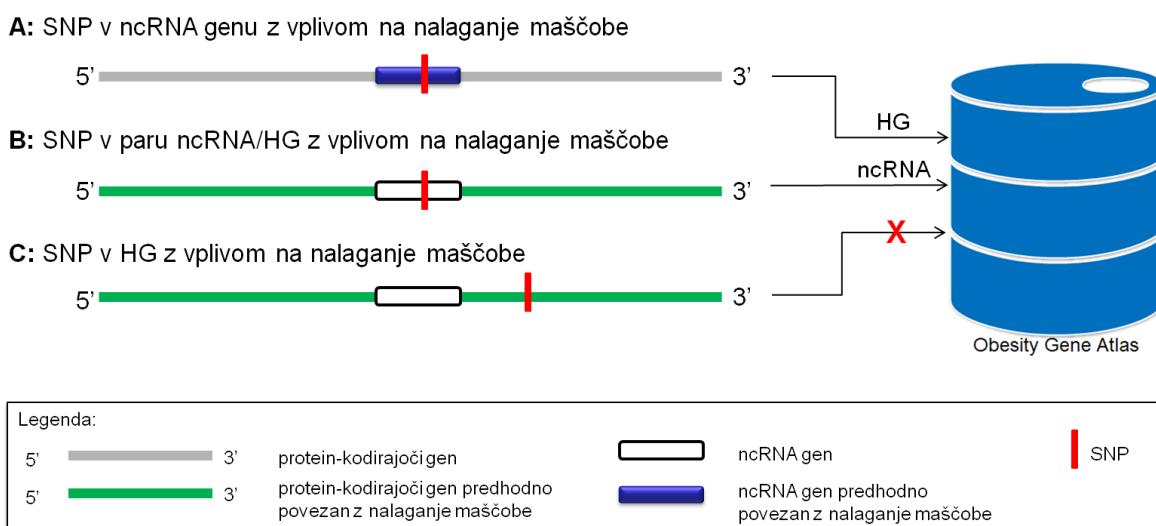
Predhodne raziskave so pokazale, da se intronske miRNA izražajo skupaj z mRNA gostiteljskih genov, kar kaže na uporabo skupnega prepisovalnega mehanizma (Baskerville and Bartel, 2005). Iz tega razloga smo v genomski atlas "ncRNA Genomics Atlas" dodali gostiteljske gene za ncRNA. V trenutnih verzijah genoma miši, se lokacije za ncRNA gene prekrivajo s psevdogeni, procesirani prepisi brez proteinskega produkta, protein-kodirajočimi geni in ostalimi ncRNA geni. Pri govedu se ncRNA geni prekrivajo s protein-kodirajočimi geni, nekatere miRNA se prekrivajo s snoRNA, medtem ko se na trenutni verziji genoma prašiča prekrivajo le s protein-kodirajočimi geni. V nadaljnje analize smo

vključili le protein-kodirajoče gostiteljske gene, saj večina orodij za funkcijске analize sprejme le identifikacijske številke ali simbole genov za proteine. Za proučevanje vloge ncRNA smo s funkcijsko analizo preverili vpletjenosti gostiteljskih genov za ncRNA v biološke in celične procese, molekularne funkcije, biološke poti in mreže. Gostiteljski geni so udeleženi v številne osnovne molekularne funkcije, biološke in celične procese. Pri vseh treh vrstah so gostiteljski geni za ncRNA udeleženi v biološko pot "Ribosome". Rezultat funkcijske analize smo vključili v splošni del genomskega atlasa "*ncRNA Genomics Atlas*" in služi kot izhodišča za proučevanje vloge ncRNA v organizmu. Grafični prikaz proteinskih interakcij med gostiteljskimi geni za ncRNA in njihovimi sosedji prikazuje odnose med proteini, njihov opis ter statistike izračunane v analizi. Na grafu izstopajo vozlišča z visoko stopnjo centralnosti, tako imenovane centralne molekule (angl. *hubs*), poleg tega iskalno okno omogoča enostavno iskanje proteinov na grafu.

5.1.2 Genomski atlas z ncRNA za nalaganje maščobe "ncRNA Obesity Atlas"

Specializirani del genomskega atlasa "*ncRNA Obesity Atlas*" je namenjen proučevanju vloge ncRNA pri nalaganju maščobe. V predhodni raziskavi smo izdelali genomski atlas lokusov za debelost "Obesity Gene Atlas" (Kunej in sod., 2012c). Za ncRNA, njihove gostiteljske gene in pare ncRNA/HG, zbrane v tej nalogi, smo v omenjenem atlasu preverili, če so že bili povezani z nalaganjem maščobe. Našli smo 86 gostiteljskih genov, med njimi štiri pri vseh treh proučevanih vrstah, ter 43 miRNA z vplivom na to lastnost. Para ncRNA/HG, kjer sta tako ncRNA kot protein-kodirajoči gen že bila povezana z nalaganjem maščobe, sta: *mir-448/Htr2c* pri miši ter *mir-335/Mest* pri govedu in prašiču. V ločenih študijah je bilo v tkivu belega in podkožnega maščevja pri človeku in miši, ugotovljeno močno izražanje mir-335 (Klöting in sod., 2009; Nakanishi in sod., 2009), kot tudi njegovega gostiteljskega gena *Mest* (Takahashi in sod., 2005). Prav tako so med seboj neodvisne študije potrdile vlogo *mir-448* pri tvorbi maščobnih celic (Kinoshita in sod., 2010) in vpliv gena *Htr2c* na debelost in sladkorno bolezen tipa 2 (Yuan in sod., 2000) ter nalaganje maščobe in pridobivanje telesne mase (Reynolds in sod., 2003; Ellingrod in sod., 2005). Študije, kjer so z isto lastnostjo povezali tako ncRNA kot tudi njen gostiteljski gen, kažejo na njuno skupno delovanje. Zato je upravičeno sklepati, da so ncRNA, ki se nahajajo znotraj kandidatnih genov za debelost prav tako povezane s to lastnostjo. Nove kandidatne lokuse lahko določimo na podlagi kolokacije ncRNA genov in protein-

kodirajočih genov, ki so že bili povezani z nalaganjem maščobe (slika 36). Lokus v paru ncRNA/HG, ki predhodno ni bil povezan z nalaganjem maščobe, vendar na mestu prekrivanja vsebuje SNP z vplivom na to lastnost, je primeren kandidat za vključitev v genomski atlas "Obesity Gene Atlas" (slika 36A in B). Gene za ncRNA, ki se prekrivajo z gostiteljskim genom z dokazanim vplivom na nalaganje maščobe, kjer se SNP nahaja izven območja prekrivanja ncRNA/HG, je smiselno eksperimentalno preveriti (slika 36C). Za 157 potencialnih kandidatnih lokusov za nalaganje maščobe, določenih na podlagi kolokacije ncRNA/HG (preglednica 19), je potrebno pred vključitvijo v genomski atlas "Obesity Gene Atlas" preveriti njihov vpliv na lastnosti zamaščevanja. Z bioinformacijskimi metodami bi bilo smiselno preveriti prekrivanja vseh treh genomskega elementov: SNP, miRNA in HG, pri čemer mora biti vsaj eden od genov (za miRNA ali HG) predhodno že povezan z nalaganjem maščobe, kot je prikazano na sliki 36.



Slika 36: Določanje novih kandidatnih genov na podlagi kolokacije ncRNA genov in protein-kodirajočih genov. HG: gostiteljski gen

Figure 36: Determination of candidate genes based on co-locations ncRNA genes and protein-coding host genes. HG: host gene

Preglednica 19: Potencialni kandidatni geni za nalaganje maščobe, določeni na podlagi kolokacije ncRNA/HG

Table 19: Potential candidate genes for fat deposition, determined on the basis of ncRNA/HG co-location

Lokus	Simbol gena
HG	<i>Mcm7, Large, Nfyc, Pank1, Rtl1, Tmem180, Ptk2, Tango2, Ttll10, Gabre, Vezt, Sgcz, Ccdc55, Rab3gap2, Wdr82p1, Smc4, Ctdsp1, Huwe1, Wwp2, Copz1, Copz2, Zranb2, Dnm1, Trpm3, Trpm1, Arrb1, Eml2, Evl, Znf521, Nsrp1, Astn1, Kiaa1797, Dkc1, Egfl7, Wdr82</i>
snoRNA	<i>Snora66, Snora42, Snora11, Snora43, Snora38, Snord56, Snora71, Snou109, Snord86, Snora40, Gm25129, Gm24355, Gm23442, Gm23346, Gm25187, Gm24791, Gm24373, Gm25795, Snora35, Gm26070, Gm26186, Gm26310, Gm24729, Gm24727, Gm24771, Gm26215, Gm23182, Gm26236, Gm25617, Snora61, Snora21, Snora27, Snora67, Snora76</i>
miRNA	<i>mir-218-2, mir-361, mir-378a, mir-448, mir-483, mir-592, mir-599, mir-717, mir-721, mir-763, mir-764, mir-875, mir-1264, mir-1298, mir-1912, mir-1938, mir-1954, mir-1958, mir-3095, mir-3473f, mir-5120, mir-5123, mir-6353, mir-6362, mir-6384, mir-6391, mir-6400, mir-6418, mir-6899, mir-6921, mir-6922, mir-6939, mir-6969, mir-6972, mir-6974, mir-6976, mir-6978, mir-6990, mir-7000, mir-7009, mir-7023, mir-7086, mir-7116, mir-7226, mir-7678, mir-8095, mir-33a, mir-33b, mir-149, mir-335, mir-1343, mir-1835, mir-2300a, mir-2300b, mir-2307, mir-2351, mir-2355, mir-2359, mir-2388, mir-2407, mir-2408, mir-2442, mir-2450a, mir-2450b, mir-2450c, mir-2451, mir-6529, mir-6529b, mir-7858, mir-21, mir-218b,</i>
UCR	<i>uc.222+, uc.223+, uc.224+, uc.225+, uc.226+, uc.227+, uc.328+, uc.378+, uc.414+, uc.43+, uc.138+, uc.322+, uc.411+, uc.412+, uc.414+, uc.222+, uc.328+</i>

Za proučevanje vpliva ncRNA na fenotip smo njihove genomske lokacije prekrili s QTL-i pri vseh treh vrstah ter podrobno proučili območja, kjer se ncRNA geni prekrivajo s QTL-i za nalaganje maščobe. Znano je namreč, da imajo nekateri ortologni geni ohranjene biološke in biokemijske poti, ki pojasnijo enake ali podobne razlike QTL-ov med različnimi živalskimi vrstami (Rothschild in sod., 2007). Območja z največ prekrivajočih se lokusov za nalaganje maščobe smo uporabili kot kriterij pri identifikaciji pozicijskih kandidatnih območij za nalaganje maščobe pri vseh treh vrstah. Pri miši smo za določanje pozicijskih kandidatnih območij upoštevali tudi vpliv polimorfizmov v ncRNA genih na lastnosti nalaganja maščobe, ki smo ga proučili z asociacijsko analizo.

Miši inbridiranih linij so genetsko identične, zato predstavljajo dobro izhodišče za potrditev vzročnih genov. V predhodnih raziskavah smo pri treh inbridiranih linijah miši potrdili vpliv polimorfizma rs30372501 v območju *seed* miRNA gena *mmu-mir-717*, ki pri miši leži znotraj introna 3 gostiteljskega gena *Gpc3* (Kunej in sod., 2010). Alelna različica A je bila prisotna pri linijah miši C57BL/6J in DBA/2J, za kateri je značilno povišano nalaganje maščobnega tkiva (angl. *the high fat line*), medtem ko je bila alelna različica G prisotna le pri liniji 129/Sv, ki kaže nižje vrednosti za vse lastnosti povezane z debelostjo (angl. *the lean line*).

Vpliv polimorfizma rs30372501 na lastnosti zamaščevanja smo potrdili tudi z asociacijsko analizo *in silico*, kjer smo analizirali povezavo med tem SNP-jem in 2.586 lastnostmi (Zorc in sod., 2012). Na ta način smo razvili metodo za analizo vpliva znanih polimorfizmov na kompleksne lastnosti pri inbridiranih linijah miši.

Podatkovno zbirko MPD večkrat mesečno dopolnijo z novimi meritvami in rezultati genotipizacije iz različnih virov oz. laboratorijev. Trenutno lahko z obstoječim nizom podatkov analiziramo vpliv več kot 56 milijonov polimorfizmov na 3.510 lastnosti razvrščenih v 35 področij. Razvili smo metodo za asociacijsko analizo *in silico* in jo uporabili za preverjanje vpliva 924 polimorfizmov v ncRNA genih na 112 lastnosti zamaščevanja pri inbridiranih linijah miši. Vpliv genetske variabilnosti ncRNA na nalaganje maščobe smo potrdili s 748 SNP-ji z vplivom na 94 lastnosti. Vhodni podatki za posamezno analizo so odvisni od meritev v podatkovni zbirki.

Eden glavnih ciljev selekcije domačih živali je izbira živali za starše naslednjih generacij (Malovrh in sod., 2003). Genetsko vrednost živali sestavlja dve vrsti komponent: aditivne in neaditivne komponente. Za aditivno genetsko vrednost pogosto uporabljamo izraz plemenska vrednost. Odbira živali za pleme poteka na osnovi napovedi agregatnega genotipa, ki vključuje napovedi plemenskih vrednosti ovrednotene z ekonomskimi težami. Po vzoru napovedi agregatnega genotipa v živinoreji, smo v nalogi uvedli indeks za razvrščanje polimorfizmov glede na vlogo genetske variabilnosti na proučevano lastnost (LPI). Pri vrednotenju smo upoštevali vsoto produktov med relativnimi težami in vrednostmi po posameznih kriterijih. Indeks smo izračunali za vsako povezavo med SNP-jem in lastnostjo in med njimi za vsak polimorfizem določili najvišji indeks (LPI_{max}). Z indeksom LPI_{max} smo lahko SNP-je, za katere smo potrdili vpliv na zamaščevanje, razvrstili po prioriteti. Grafično smo predstavili povezavo štirih polimorfizmov s telesno maso inbridiranih linij miši. Za prikaz smo izbrali SNP z vrha in zadnje tretjine seznama polimorfizmov, razvrščenih glede na LPI_{max} . Ortologni gen *miR-7b*, je bil predhodno že povezan z nalaganjem maščobe pri človeku (Cho in sod., 2011), zato smo dodatno prikazali tudi povezavo polimorfizma v miRNA genu *mmu-miR-7b*. Kot testni SNP smo izbrali medgenski polimorfizem na kromosому 5 pri miši. Po enakem postopku kot polimorfizme v ncRNA genih smo analizirali vpliv tega polimorfizma na 112 lastnosti zamaščevanja. Vseh parov ncRNA/HG, kjer smo potrdili vpliv polimorfizma na

proučevano lastnost, je 288. Najbolje ocenjen par ncRNA/HG je *mmu-miR-1948/Ttc39c* in najslabše *Gm22303/Rock2*. Prvih deset parov ncRNA/HG s seznama: *mmu-mir-1948/Ttc39c*, *Gm23530/Csmd3*, *Gm25226/Plxnb3*, *uc.239/Tox*, *Gm23939/Snrpe*, *Gm26039/Nup54*, *mmu-mir-3094/Nfx1*, *Gm22023/Pir*, *Gm25406/Lclat1* in *Gm24730/Fbxl17*, obravnavamo kot močnejše kandidatne lokuse za nalaganje maščobe. Za vse tri proučevane razrede ncRNA smo dokazali vpliv na lastnosti zamaščevanja, med katerimi je največ (68,5 %) lokusov, genov za snoRNA. Male nukleolarne RNA so bile predhodno že povezane s sindromom Prader-Willi, kjer je kot klinični znak prisotna tudi debelost (Sahoo in sod., 2008; de Smith in sod., 2009), vendar pri tem ni znano ali gre za vzročne ali sekundarne dejavnike, zato bi bilo potrebno vlogo snoRNA pri nalaganju maščobe podrobno proučiti. Na spletno mesto "ncRNA Obesity Atlas" smo dodali spletno aplikacijo z rezultati analize ter grafični prikaz povezav med ncRNA in proučevano lastnostjo. Iskanje lokusov ali proučevane lastnosti, v sicer kompleksnem grafu, je olajšano z iskalnim oknom. Spletна aplikacija je lahko v pomoč raziskovalcem pri postavljanju hipotez, kot tudi pri razpravi in predstavitvi lastnih rezultatov.

Pri razvoju novih molekularnih označevalcev za nalaganje maščobe smo upoštevali tri kategorije miRNA reguloma: miRNA gene, miRNA tarče in mehanizem za procesiranje miRNA. Polimorfizmi v miRNA genih, njihovih tarčah ter genih udeležene v biogenezi miRNA so bili predhodno že povezane z nalaganjem maščobe. Med geni, ki kodirajo proteine udeležene v procesiranje miRNA, sta bila z nalaganjem maščobe pri miši povezana gena *Cnot3* in *Drosha*. Znižano izražanje gena *Cnot3* učinkovito zniža vsebnost maščobe pri miših (Morita in sod., 2011), medtem ko izničenje gena *Drosha*, povzroči prekomerno nalaganje maščobe in znižano vsebnost mišičnine pri miši (Chong in sod., 2008). Za polimorfne miRNA smo našli eksperimentalno potrjene tarčne gene, med katerimi sta imeli največ tarč, predhodno povezanih z nalaganjem maščobe, *mmu-mir-7b* in *mmu-mir-149*. Med gostiteljskimi geni za miRNA je pet genov, ki kodirajo proteine udeležene v biogenezo miRNA. Med njimi je tudi gen *Cnot3*, ki se prekriva s polimorfno miRNA *mmu-mir-3572* s SNP-jem rs31571372 v območju zrele miRNA. Z asociacijsko analizo *in silico* pri miši smo ta polimorfizem povezali s 35 lastnostmi za nalaganje maščobe. Poleg tega smo pri miši našli devet miRNA, ki imajo za tarčni gen, protein-kodirajoči gen udeležen v procesiranje miRNA. Med njimi je tudi miRNA gen *mmu-mir-7b*, za katerega smo dokazali močan vpliv na lastnosti nalaganja maščobe. Mikro RNA

mmu-mir-7b je z največ tarčnimi geni, predhodno povezanimi z nalaganjem maščobe in najvišjim LPI_{max}, potencialni biooznačevalci za nalaganje maščobe. Vlogo miRNA gena *mir-7b* pri nalaganje maščobe bi bilo zato smiselno eksperimentalno preveriti še pri drugih vrstah.

Doktorsko nalogo smo zaključili z integracijo vseh pridobljenih informacij o ncRNA za identifikacijo pozicijskih kandidatnih območij z ncRNA geni z večjim učinkom na nalaganje maščobe. Zbrane podatke o genomske razporeditvi genov za ncRNA, gostiteljskih genov in QTL-ov za nalaganje maščobe ter rezultat asociacijske analize smo uporabili za določanje pozicijskih kandidatnih območij z ncRNA geni. Z največ QTL-i za nalaganje maščobe pri miši, se prekriva skupina ncRNA genov na kromosому 11. S 27 QTL-i se prekriva 85 ncRNA (24 miRNA, 32 snoRNA in 29 UCR), med katerimi je 11 polimorfnih. Med njimi sta dve intragenski ncRNA (*Gm26070* in *mmu-mir-678*) ter 8 intergenskih ncRNA, in sicer: *Gm23514*, *mmu-mir-6409*, *Gm22599*, *Gm24151*, *mmu-mir-216a*, *Gm23772*, *Gm22789*, *Gm22284* in *mmu-mir-6406*. Vsi polimorfizmi so uvrščeni na seznam polimorfizmov, razvrščenih po prioriteti. Najvišje, na štirinajstem mestu, na seznamu je snoRNA *Gm23514* (LPI_{max} = 0,8353) in najnižje (445. po prioriteti), miRNA *mmu-mir-678* (LPI_{max} = 0,7202). Med intragenskimi ncRNA so, pri vseh treh proučevanih vrstah, močnejša pozicijska kandidatna območja s paroma *miR-218-2/Slit3* in *miR-335/Mest*. S prekrivanjem genomskih lokacij vseh tipov lokusov: ncRNA in protein-kodirajočih genov, QTL-ov za nalaganje maščobe in polimorfizmov, smo pri vseh treh proučevanih vrstah, določili pozicijska kandidatna območja za nalaganje maščobe z genom *Slit3*, ki je gostiteljski gen za *Gm26070*, *mmu-mir-218-2*, *bta-mir-218-2* in *ssc-mir-218b*.

Genomski atlas "ncRNA Genomics Atlas" predstavlja centralno mesto za raziskave vloge ncRNA v organizmu in s specializiranim delom atlasa omogoča proučevanje vpletenenosti ncRNA v nalaganje maščobe. Kljub prizadovanju razumeti mehanizem nalaganja maščobe je to obsežen projekt, ki zahteva tesno sodelovanje bioinformatikov in ostalih raziskovalcev s področja bioznanosti. Večina laboratoriјev je še vedno usmerjena v generiranje velike količine informacij, zato priložnost vidimo v integraciji obstoječih podatkov in identifikaciji potencialnih biooznačevalcev z razvrščanjem lokusov po prioriteti.

5.2 SKLEPI

V delovnih hipotezah smo predvideli, 1) da je z integracijo vseh do sedaj poznanih genetskih vzrokov za nalaganje maščobe možno identificirati pozicijska kandidatna območja z ncRNA geni z večjim vplivom na to lastnost in, 2) da nam genetska variabilnost ncRNA genov (miRNA, snoRNA in UCR) in njihovih tarč ter poznavanje njihovega uravnovanja, omogoča razvijati nove potencialne genetske označevalce za nalaganje maščobe v inbridiranih linijah miši, slovenski populaciji bikov lisastega goveda v progenem testu in slovenskih lokalnih genotipih prašičev.

Za potrjevanje hipotez smo najprej izdelali zbirko znanja za ncRNA gene in na podlagi letne izdelali centralni genomski atlas "*ncRNA Genomics Atlas*" za proučevanje vpliva ncRNA genov na kompleksne lastnosti pri miši, govedu in prašiču. Razvili smo "*ncRNA Obesity Atlas*", kjer smo predstavili rezultat proučevanja vpletenenosti ncRNA genov v proces nalaganja maščobe pri vseh treh vrstah.

1. Rezultate splošnega dela genomskega atlasa za ncRNA lahko strnemo v tri sklepe:

- "*ncRNA Genomics Atlas*" vsebuje zbirko znanja s 7.213 genov za ncRNA, ki se prekrivajo 1.089 protein-kodirajočimi geni in imajo v genskem zapisu 1.784 polimorfizmov pri miši, govedu in prašiču.
- Izdelali smo katalog parov ncRNA/HG, ki je v obliki spletnne aplikacije dostopen na naslovu URL:
http://www.integratomics-time.com/ncRNA_genomics_atlas/catalogue.html.
- Za iskanje polimorfizmov v genih za ncRNA pri miši, govedu in prašiču smo:
 - posodobili obstoječe bioinformacijsko orodje miRNA SNiPer,
 - razvili dve novi orodji: snoRNA SNiPer in UCR SNiPer

2. Rezultati specializiranega dela genomskega atlasa za ncRNA "*ncRNA Obesity Atlas*" so:

- Razvili smo "*ncRNA Obesity Atlas*"; genomski atlas za proučevanje vloge ncRNA pri nalaganju maščobe sesalcev s pozicijskimi kandidatnimi območji ter spletno aplikacijo s polimorfizmi v ncRNA genih z vplivom na nalaganje maščobe pri miši.

- Geni za ncRNA se prekrivajo s QTL-i za 74 lastnosti za rast in nalaganje maščobe pri miši, 15 pitovnih in klavnih lastnosti pri govedu in 81 pri prašiču.
- Razvili smo metodo za *in silico* analizo vpliva znanih polimorfizmov na kompleksne lastnosti pri inbridiranih linijah miši. Metodo smo uporabili za preverjanje vpliva 924 polimorfizmov v ncRNA genih na 112 lastnosti zamaščevanja pri inbridiranih linijah miši. Potrdili smo vpliv 748 SNP-jev na lastnosti nalaganja maščobe pri miši. S tem smo potrdili hipotezo 2.
- Uvedli smo uporabo indeksa za razvrščanje polimorfizmov po prioriteti glede na njihov vpliv na fenotip (LPI_{max}) in izdelali seznam s 748 SNP-ji z vplivom na nalaganje maščobe.
- Z asociacijsko študijo pri miši smo dokazali vpliv vseh treh razredov ncRNA (miRNA, snoRNA in UCR) na nalaganje maščobe. S tem smo potrdili hipotezo 2.
- Poleg genetske variabilnosti miRNA genov so za razvoj biooznačevalcev za nalaganje maščobe obetavni tudi polimorfizmi v tarčnih genih za miRNA in genih udeleženih v njihovo biogenezo. Ta sklep se nanaša na hipotezo 2.
- Določili smo pozicijska kandidatna območja za nalaganje maščobe. Z upoštevanjem kriterijev prekrivanja ncRNA genov s protein-kodirajočimi geni ter QTL-i za nalaganje maščobe smo določili 53 pozicijskih kandidatnih območij pri miši, 32 pri govedu in 17 pri prašiču. Pri vseh treh vrstah sta med pozicijskimi kandidatnimi območji za nalaganje maščobe dva para miRNA/HG, in sicer *miR-218/Slit3* in *miR-335/Mest*. S tem smo potrdili hipotezo 1.

Poleg pozicije ncRNA genov smo pri miši upoštevali tudi njihovo funkcijo in kot kriterij vključili rezultat asociacijske analize. Tako smo določili potencialne biooznačevalce za nalaganje maščobe, in sicer: *SNORA65*, *SNORA44*, *SNORA20*, *miR-184* in *miR-296*, saj se ti geni pri vseh treh vrstah prekrivajo s QTL-i za nalaganje maščobe, medtem ko smo z asociacijsko analizo pri miši njihov vpliv še dodatno potrdili. S tem smo potrdili hipotezo 1.

Kot je razvidno iz sklepov, smo potrdili obe hipotezi, saj smo z integracijo vseh do sedaj poznanih genetskih vzrokov za nalaganje maščobe identificirali pozicijska kandidatna območja za nalaganje maščobe ter razvili nove potencialne genetske označevalce. Genomski atlas in metode uporabljene v tej nalogi bo možno uporabiti tudi za druge kompleksne lastnosti, zato naloga predstavlja pomemben prispevek k znanosti.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Prekomerno nalaganje maščobe vodi v debelost in z njo povezane bolezni zato so najpogosteje omenjene le njihove negativne lastnosti. Maščobe so v prehrani v manjših količinah zelo pomembne, celo nepogrešljive, zato je odkritje genetskih vzrokov za nalaganje maščobe pomembno z živinorejskega, prehranskega in medicinskega vidika. Večina lokusov do sedaj povezanih z nalaganjem maščobe je protein-kodirajočih genov in QTL-ov. Število raziskav vpletosti ncRNA v nalaganje maščobe narašča, vendar so bile v predhodnih raziskavah z nalaganjem maščobe neposredno povezane le miRNA. Podatkovne zbirke za ncRNA so najpogosteje namenjene zbiranju genomskeh lokacij genov za posamezne razrede ncRNA in so poleg tega omejene še na vrsto organizma. Največ podatkov za ncRNA je dostopnih za miš in človeka ter nižje razvite vrste, kot sta npr. *C. elegans*, *D. melanogaster*, medtem ko je za domače živali teh podatkov malo. Cilj doktorskega dela je bil razviti centralno mesto za proučevanje ncRNA in njihovega vpliva na kompleksne lastnosti. V ta namen smo razvili genomski atlas za tri razrede ncRNA pri miši, govedu in prašiču, ki smo ga poimenovali "*ncRNA Genomics Atlas*" in je prosti dostopen na naslovu URL: http://www.integratomics-time.com/ncRNA_genomics_atlas. Zbrali smo 7.213 genov za ncRNA, ki se prekrivajo s 1.089 protein-kodirajočimi geni in imajo v genskem zapisu 1.784 polimorfizmov pri miši, govedu in prašiču. Identificirali smo 481 UCR-jev pri miši, 359 pri govedu in 267 pri prašiču ter jim določili lokacije na genomu. Katalog parov ncRNA/HG v obliki spletnne aplikacije je dostopen na naslovu URL: http://www.integratomics-time.com/ncRNA_genomics_atlas/catalogue.html. Za iskanje genetske variabilnosti genov za ncRNA pri miši, govedu in prašiču smo razvili bioinformacijski orodji snoRNA SNiPer in UCR SNiPer. Poleg tega smo nadgradili obstoječe orodje miRNA SNiPer. Genomske lokacije ncRNA genov se prekrivajo s 415 QTL-i pri miši (74 QTL za nalaganje maščobe), 290 QTL-i pri govedu (25 QTL-ov za nalaganje maščobe) in s 500 pri prašiču (82 QTL-ov za nalaganje maščobe). V specializiranem delu genomskega atlasa za ncRNA smo razvili "*ncRNA Obesity Atlas*"; genomski atlas za proučevanje vloge ncRNA pri nalaganju maščobe sesalcev. Razvili smo metodo za analizo vpliva znanih polimorfizmov na kompleksne lastnosti pri inbridiranih linijah miši s pristopom *in silico*. Metodo smo uporabili za asociacijsko analizo med 924

polimorfizmi v ncRNA genih (274 v miRNA, 625 v snoRNA in 52 v UCR) in 112 lastnostmi zamaščevanja pri inbridiranih linijah miši. Za razvrščanje polimorfizmov glede na njihov vpliv na fenotip smo uvedli uporabo indeksa za razvrščanje po prioriteti (LPI) in z njim izdelali seznam 748 SNP-jev z vplivom na fenotip pri miši. V prvo desetino seznama je uvrščenih: 32 SNP-jev v 30 ncRNA genih (7 miRNA, 22 snoRNA in enem UCR-ju). Ustreznost metode razvrščanja lokusov z LPI smo potrdili s primerjavo razlik med telesno maso pri miših z alelnima variantama za SNP z vrha in dna seznama. Določili smo pozicijska kandidatna območja z ncRNA geni za nalaganje maščobe. Z upoštevanjem kriterijev prekrivanja ncRNA genov s protein-kodirajočimi geni in QTL-i za nalaganje maščobe smo določili 53 pozicijskih kandidatnih območij pri miši, 32 pri govedu in 17 pri prašiču. Kot močnejša pozicijska kandidatna območja smo, pri vseh treh vrstah, določili območja s paroma *miR-218-2/Slit3* in *miR-335/Mest*. Genomski atlas za ncRNA in pristop za razvoj biooznakevalcev uporabljen v tej nalogi bo možno uporabiti tudi za druge kompleksne lastnosti, zato naloga predstavlja pomemben prispevek k znanosti.

6.2 SUMMARY

Excessive fat deposition leads to obesity and obesity related diseases, thus it is most often referred to by its negative traits. Small quantities of fats in the diet are very important, even essential, therefore, the discovery of the genetic causes for fat deposition is important from animal breeding, nutritional and medical point of view. Majority of loci associated with fat deposition are protein coding genes and QTL. Number of research regarding ncRNA involvement in fat deposition is increasing, but previously only miRNA were directly associated with fat deposition. Noncoding RNA databases are most commonly used for collecting physical properties of genes for particular classes of ncRNA, and they are still limited to the species. Most data for ncRNA is available for mouse, human, *C. elegans*, *D. melanogaster* etc., while data for livestock is limited. The aim of doctoral thesis was to develop central web site for studying ncRNA and their effect on complex traits. For this purpose, a genomic atlas for three classes of ncRNA in mouse, cattle and pig named "*ncRNA Genomics Atlas*" was developed and is freely available at URL address: http://www.integratomics-time.com/ncRNA_genomics_atlas. Using integrative approach 7.213 ncRNA genes, overlapping with 1.089 protein coding genes, with total of 1.784 polymorphisms in mouse, cattle and pig, were obtained. We identified 481 UCRs in

mouse, 359 in cattle and 267 in pig and determined their genomic locations. Catalog of ncRNA/HG pairs in the form of web application is available at URL address: http://www.integratomics-time.com/ncRNA_genomics_atlas/catalogue.html. For detection of genetic variability of ncRNA in mouse, cattle, and pig, bioinformatics tools snoRNA SNiPer and UCR SNiPer were developed. In addition, previously developed bioinformatics tool miRNA SNiPer was updated. Genomic locations of ncRNA genes overlap 415 QTL in mouse (74 QTL for fat deposition), 290 QTL in cattle (25 QTL for fat deposition) and 500 QTL in pig (82 QTL for fat deposition). Genomics atlas for studying the role of ncRNA in fat deposition "*ncRNA Obesity Atlas*" was included as specialized part of genomic atlas. A method for analyzing the effect of known polymorphisms on complex traits in inbred mice strains was developed using *in silico* approach. The method was used for association analyses between 924 polymorphisms in ncRNA genes (miRNA: 274, snoRNA: 625 and UCR: 52 SNPs) and 112 fat traits in inbred mice strains. For the classification of polymorphisms in relation to their impact on the phenotype, prioritization index (LPI) was developed. A list of 748 SNPs included in association study in mouse was created. In the first tenth of the list 32 SNPs residing within 30 ncRNA genes (7 miRNA, 22 snoRNA and one UCR) are ranked. Suitability of the method for the classification of loci with the index was confirmed by comparing the differences between the body weight in mice with allelic variants of SNPs from the top and the bottom of the prioritization list. By following criteria for overlaps of ncRNA genes with protein-coding genes with an effect on fat deposition and QTL for fat deposition characteristics 53 positional candidate regions in mice, 32 in cattle and 17 in pig were determined. In all three species, regions with *miR-218-2/Slit3* and *miR-335/Mest* were identified as stronger positional candidate regions. Genomics atlas for ncRNA and approach used in this work will be applicable to other complex characteristics; therefore the work represents an important contribution to science.

7 VIRI

- Anderson J.A., Churchill G.A., Autrique J.E., Tanksley S.D., Sorrels M.E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome Research*, 36: 181-186
- Aerts S., Lambrechts D., Maity S., Van Loo P., Coessens B., De Smet F., Tranchevent L.-C., De Moor B., Marynen P., Hassan B., Carmeliet P., Moreau Y. 2006. Gene prioritization through genomic data fusion. *Nature Biotechnology*, 24: 537–544
- Ahituv N., Zhu Y., Visel A., Holt A., Afzal V., Pennacchio L. A., Rubin E. M. 2007. Deletion of ultraconserved elements yields viable mice. *Plos Biology*, 5, 9: 1906–1911
- Akimoto T., Ushida T., Miyaki S., Akaogi H., Tsuchiya K., Yan Z., Williams R.S., Tateishi T. 2005. Mechanical stretch inhibits myoblast-to-adipocyte differentiation through Wnt signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329: 381–385
- Albert R. 2007. Network inference, analysis, and modeling in systems biology. *The Plant Cell*, 19: 3327–3338
- Bao B., Wang Z., Li Y., Kong D., Ali S., Banerjee S., Ahmad A., Sarkar F.H. 2011. The complexities of obesity and diabetes with the development and progression of pancreatic cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1815, 2: 135–146
- Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21: 263–265
- Baskerville S., Bartel D.P. 2005. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11, 3: 241–247
- Bastian M., Heymann S., Jacomy M. 2009. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. V: International AAAI Conference on Weblogs and Social Media. <http://www.aaai.org/ocs/index.php/ICWSM/09/paper/view/154> (14. feb. 2014)
- Bejerano G., Pheasant M., Makunin I., Stephen S., Kent W.J., Mattick J.S., Haussler D. 2004. Ultraconserved elements in the human genome. *Science*, 304: 1321–1325
- Brameier M., Herwig A., Reinhardt R., Walter L., Gruber J. 2011. Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs. *Nucleic Acids Research*, 39: 675–686
- Brown J.W.S., Marshall D.F., Echeverria M. 2008. Intronic noncoding RNAs and splicing. *Trends in Plant Science*, 13: 335–342

- Buckingham S. 2003. The major world of microRNAs. V: Horizon Symposia Understanding the RNAissance, 2003.
<http://www.nature.com/horizon/rna/background/micrornas.html> (24. mar. 2010)
- Chanfreau G., Legrain P., Jacquier A. 1998. Yeast RNase III as a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *Journal of Molecular Biology*, 284: 975–988
- Chen J., Aronow B.J., Jegga A.G. 2009a. Disease candidate gene identification and prioritization using protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 10: 73-83
- Chen J., Bardes E.E., Aronow B.J., Jegga A.G. 2009b. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Research*, 37: W305–W311
- Cho J.A., Park H., Lim E.H., Lee K.W. 2011. MicroRNA expression profiling in neurogenesis of adipose tissue-derived stem cells. *Journal of Genetics*, 90: 81–93
- Chong M.M.W., Rasmussen J.P., Rudensky A.Y., Rundensky A.Y., Littman D.R. 2008. The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 205: 2005–2017
- Chu C.Y., Rana T.M. 2007. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *Journal of Cellular Physiology*, 213, 2: 412-419
- Cinti S. 2005. The adipose organ. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 73: 9–15
- Costa F.F. 2007. Non-coding RNAs: lost in translation? *Gene*, 386: 1–10
- De Smith A.J., Purmann C., Walters R.G., Ellis R.J., Holder S.E., Van Haelst M.M., Brady A.F., Fairbrother U.L., Dattani M., Keogh J.M., Henning E., Yeo G.S., O’Rahilly S., Froguel P., Farooqi I.S., Blakemore A.I. 2009. A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Human Molecular Genetics*, 18: 3257–3265
- Decatur W., Fournier M. 2002. rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences*, 27: 344–351
- Dieci G., Preti M., Montanini B. 2009. Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility. *Genomics*, 94: 83–88
- Elías Calles J.A., Gaskins C.T., Busboom J.R., Duckett S.K., Cronrath J.D., Reeves J.J., Wright R.W. 2000. Differences among Wagyu sires for USDA carcass traits and palatability attributes of cooked ribeye steaks. *Journal of Animal Science*, 78: 1710–1715

- Ellingrod V.L., Perry P.J., Ringold J.C., Lund B.C., Bever-Stille K., Fleming F., Holman T.L., Miller D. 2005. Weight gain associated with the -759C/T polymorphism of the 5HT2C receptor and olanzapine. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 134B: 76–78
- Ender C. 2008. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol. Cell*, 32: 519–528
- Esau C., Kang X., Peralta E., Hanson E., Marcusson E.G., Ravichandran L. V., Sun Y., Koo S., Perera R.J., Jain R., Dean N.M., Freier S.M., Bennett C.F., Lollo B., Griffey R. 2004. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 52361–52365
- Esquela-Kerscher A., Slack F. 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6: 259–269
- Franceschini A., Szklarczyk D., Frankild S., Kuhn M., Simonovic M., Roth A., Lin J., Minguez P., Bork P., von Mering C., Jensen L.J. 2013. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research*, 41: D808–D815
- Freking B.A., Murphy S.K., Wylie A.A., Rhodes S.J., Keele J.W., Leymaster K.A., Jirtle R.L., Smith T.P. 2002. Identification of the single base change causing the callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only known example of polar overdominance in mammals. *Genome Research*, 12, 10: 1496–1506
- Georges M., Coppieters W., Charlier C. 2007. Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17: 166–176
- Gerin I., Bommer G.T., McCoin C.S., Sousa K.M., Krishnan V., MacDougald O.A. 2010. Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism*, 299: E198–E206
- Godnic I., Zorc M., Jevšinek Skok D., Calin G.A., Horvat S., Dovc P., Kovac M., Kunjej T. 2013. Genome-Wide and Species-Wide In Silico Screening for Intronogenic MicroRNAs in Human, Mouse and Chicken. *PLoS ONE*, 8: e65165, doi: 10.1371/journal.pone.0065165: 14 str.
- Grady W.M., Parkin R.K., Mitchell P.S., Lee J.H., Kim Y.H., Tsuchiya K.D., Washington M.K., Paraskeva C., Willson J.K., Kaz A.M., Kroh E.M., Allen A., Fritz B.R., Markowitz S.D., Tewari M. 2008. Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene*, 27, 27: 3880–3888
- Grubb S.C., Maddatu T.P., Bult C.J., Bogue M.A. 2009. Mouse phenome database. *Nucleic Acids Research*, 37: D720–D730

- Guan H.-P., Ishizuka T., Chui P.C., Lehrke M., Lazar M.A. 2005. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes & Development*, 19: 453–461
- Hardy S., Legagneux V., Audic Y., Paillard L. 2010. Reverse genetics in eukaryotes. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 102: 561–580
- Herrera B.M., Lindgren C.M. 2010. The Genetics of Obesity. *Current Diabetes Reports*, 10: 498–505
- Hoeppner M.P., White S., Jeffares D.C., Poole A.M. 2009. Evolutionarily stable association of intronic snRNAs and microRNAs with their host genes. *Genome Biology and Evolution*, 1: 420–428
- Hristovski D., Peterlin B., Mitchell J.A., Humphrey S.M. 2005. Using literature-based discovery to identify disease candidate genes. *International Journal of Medical Informatics*, 74: 289–298
- Huang H., Song T.-J., Li X., Hu L., He Q., Liu M., Lane M.D., Tang Q.-Q. 2009. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 12670–12675
- Jeffrey S. 2008. Cancer biomarker profiling with microRNAs. *Nature Biotechnology*, 26, 4: 400-401
- Jevšinek Skok D., Godnic I., Zorc M., Horvat S., Dovc P., Kovac M., Kunej T. 2013. Genome-wide in silico screening for microRNA genetic variability in livestock species. *Animal Genetics*, 44: 669–677
- Jevšinek Skok D., Kunej T., Renčelj A., Razpet A., Dovč P., Žgur S., Petrič N., Planinc M., Malovrh Š., Kovac M., Horvat S. 2012. Genetic variability of microRNA genes in farm animals. *Acta Argiculturae Slovenica*, 76: 137–141
- Jiang Z., Michal J.J., Chen J., Daniels T.F., Kunej T., Garcia M.D., Gaskins C.T., Busboom J.R., Alexander L.J., Wright R.W., Macneil M.D. 2009. Discovery of novel genetic networks associated with 19 economically important traits in beef cattle. *International Journal of Biological Sciences*, 5: 528–542
- Jiang Z., Michal J.J., Williams G.A., Daniels T.F., Kunej T. 2006. Cross species association examination of UCN3 and CRHR2 as potential pharmacological targets for antiobesity drugs. *PLoS ONE*, 1: e80, doi: 10.1371/journal.pone.0000080: 8 str.
- Jiang Z., Pappu S.S., Rothschild M.F. 2007. Hitting the jackpot twice: identifying and patenting gene tests related to muscle lipid accumulation for meat quality in animals and type 2 diabetes/obesity in humans. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 1: 100–111

- Kajimoto K., Naraba H., Iwai N. 2006. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *RNA*, 12: 1626–1632
- Kent W.J. 2002. BLAT---The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Research*, 12: 656–664
- Kim V.N. 2005. RNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 6, 5: 376-385
- Kinoshita M., Ono K., Horie T., Nagao K., Nishi H., Kuwabara Y., Takanabe-Mori R., Hasegawa K., Kita T., Kimura T. 2010. Regulation of adipocyte differentiation by activation of serotonin (5-HT) receptors 5-HT_{2AR} and 5-HT_{2CR} and involvement of microRNA-448-mediated repression of KLF5. *Molecular Endocrinology*, 24: 1978–1987
- Kiss T. 2001. Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of Cellular RNAs. 2001. *The EMBO Journal*, 20, 14: 3617-3622
- Kiss-Laszlo Z., Henry Y., Bachellerie J., Caizergues-Ferrer M., Kiss T. 1996. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell*, 85: 1077–1088
- Klaus S., Keijer J. 2004. Gene expression profiling of adipose tissue: *Nutrition*, 20: 115–120
- Klöting N., Berthold S., Kovacs P., Schön M.R., Fasshauer M., Ruschke K., Stumvoll M., Blüher M. 2009. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS ONE*, 4: e4699, doi: 10.1371/journal.pone.0004699: 6 str.
- Kunej T., Jevsinek Skok D., Horvat S., Dovc P., Jiang Z. 2010. The Glypican 3-Hosted Murine Mir717 Gene: Sequence Conservation, Seed Region Polymorphisms and Putative Targets. *International Journal of Biological Sciences*, 6: 769–772
- Kunej T., Čeh E., Jevsinek Skok D., Ogorevc J., Frdin J., Godnič I., Zorc M., Dovč P. 2012a. Podatkovne zbirke in bioinformacijska orodja za raziskave mikro RNA. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 65 str.
- Kunej T., Godnic I., Horvat S., Zorc M., Calin G.A. 2012b. Cross Talk Between MicroRNA and Coding Cancer Genes. *The Cancer Journal*, 18: 223–231
- Kunej T., Jevsinek Skok D., Zorc M., Ogrinc A., Michal J.J., Kovac M., Jiang Z. 2012c. Obesity Gene Atlas in Mammals. *Journal of Genomics*, 1: 44–55
- Lin Q., Gao Z., Alarcon R.M., Ye J., Yun Z. 2009. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS Journal*, 276: 2348–2358
- Lowe C.E., O’Rahilly S., Rochford J.J. 2011. Adipogenesis at a glance. *Journal of Cell Science*, 124: 2681–2686

- Malovrh Š., Gorjanc G., Kovač M. 2003. Napoved plemenskih vrednosti in postopek odbire pri merjascih. Spremljanje proizvodnosti prašičev. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 4-15
- Masoudi-Nejad A., Meshkin A.M.A., Haji-Eghrari B., Bidkhorri G. 2012. Candidate gene prioritization. Molecular Genetics and Genomics: MGG, 287: 679–698
- Mattick J.S., Makunin I. V. 2006. Non-coding RNA. Human Molecular Genetics, 15: 17–29
- Mercer T.R., Dinger M.E., Mattick J.S. 2009. Long non-coding RNAs: insights into functions. Nature Reviews. Genetics., 10: 155–159
- Mikkelsen T.S., Xu Z., Zhang X., Wang L., Gimble J.M., Lander E.S., Rosen E.D. 2010. Comparative epigenomic analysis of murine and human adipogenesis. Cell, 143: 156–169
- Mitra K., Carvunis A.-R., Ramesh S.K., Ideker T. 2013. Integrative approaches for finding modular structure in biological networks. Nature Reviews. Genetics, 14: 719–732
- Morita M., Oike Y., Nagashima T., Kadomatsu T., Tabata M., Suzuki T., Nakamura T., Yoshida N., Okada M., Yamamoto T. 2011. Obesity resistance and increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in Cnot3^{+/−} mice. The EMBO journal, 30: 4678–4691
- Mustacchi R., Hohmann S., Nielsen J. 2006. Yeast systems biology to unravel the network of life. Yeast, 23: 227–238
- Mutch D.M., Clément K. 2006. Unraveling the Genetics of Human Obesity. PLoS Genetics, 2: e188, doi: 10.1371/journal.pgen.0020188: 8 str.
- Mutch D.M., Wahli W., Williamson G. 2005. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 19: 1602–1616
- Nakanishi N., Nakagawa Y., Tokushige N., Aoki N., Matsuzaka T., Ishii K., Yahagi N., Kobayashi K., Yatoh S., Takahashi A., Suzuki H., Urayama O., Yamada N., Shimano H. 2009. The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice. Biochemical and Biophysical Research Communications, 385: 492–496
- Nei M. 1972. Genetic Distance between Populations. The American Naturalist, 106: 283–292
- Ono M. 2011. Identification of human miRNA precursors that resemble box C/D snoRNAs. Nucleic Acids Research, 39: 3879–3891

- Ortega F.J., Moreno-Navarrete J.M., Pardo G., Sabater M., Hummel M., Ferrer A., Rodriguez-Hermosa J.I., Ruiz B., Ricart W., Peral B., Fernández-Real J.M. 2010. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS ONE*, 5: e9022, doi: 10.1371/journal.pone.0009022: 9 str.
- Oskowitz A.Z., Lu J., Penfornis P., Ylostalo J., McBride J., Flemington E.K., Prockop D.J., Pochampally R. 2008. Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 18372–18377
- Osterc J., Čepin S., 1984. Ocenjevanje goved. Ljubljana, ČZP Kmečki glas:114 str.
- Petfalski E., Dandekar T., Henry Y., Tollervey D. 1998. Processing of the precursors to small nucleolar RNAs and rRNAs requires common components. *Molecular And Cellular Biology*, 18: 1181–1189
- Qu L.H., Meng Q., Zhou H., Chen Y.Q. 2001. Identification of 10 novel snoRNA gene clusters from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 29: 1623–1630
- Radivojac P., Peng K., Clark W.T., Peters B.J., Mohan A., Boyle S.M., Mooney S.D. 2008. An integrated approach to inferring gene-disease associations in humans. *Proteins - Structure Function and Bioinformatics*, 72: 1030–1037
- Reynolds G.P., Ph D., Zhang Z., Zhang X. 2003. Polymorphism of the Promoter Region of the Serotonin 5-HT 2C Receptor Gene. *The American Journal of Psychiatry*, 160: 677–679
- Romao J.M., Jin W., Dodson M. V, Hausman G.J., Moore S.S., Guan le L. 2011. MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, 236: 997–1004
- Rothschild M.F., Hu Z.L., Jiang Z. 2007. Advances in QTL mapping in pigs. *International Journal of Biological Sciences*, 3: 192–197
- Sahoo T., del Gaudio D., German J.R., Shinawi M., Peters S.U., Person R.E., Garnica A., Cheung S.W., Beaudet A.L. 2008. Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nature Genetics*, 40: 719–721
- SAS Institute Inc. 2010. JMP®, Version 9. Cary, NC
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Software, Version 9.3. Cary, NC
- Saunders M.A., Liang H., Li W.H. 2007. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 3300–3305

- Scott M.S., Avolio F., Ono M., Lamond A.I., Barton G.J. 2009. Human miRNA precursors with box H/ACA snoRNA features. *PLoS Computational Biology*, 5, 9: e1000507, 10.1371/journal.pcbi.1000507: 3 str.
- Scott M.S., Ono M. 2011. From snoRNA to miRNA: dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie*, 93: 1987–1992
- Shen W., Wang Z., Punyanita M., Lei J., Sinav A., Kral J.G., Imielinska C., Ross R., Heymsfield S.B. 2003. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obesity Research*, 11: 5–16
- Shen H., Lu C., Jiang Y., Tang J., Chen W., Zhang H., Zhang Q., Wang J. C., Liang J., Hu Z., Shen H. 2011. Genetic variants in ultraconserved elements and risk of breast cancer in Chinese population. *Breast Cancer Research and Treatment*, 128, 3: 855–861
- Singh R., Xiang Y., Wang Y., Baikati K., Cuervo A.M., Luu Y.K., Tang Y., Pessin J.E., Schwartz G.J., Czaja M.J. 2009. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119: 3329–3339
- Smith C.M., Steitz J.A. 1998. Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. *Molecular and Cellular Biology*, 18: 6897–6909
- Smoot M., Ono K., Ideker T., Maere S. 2011. PiNGO: a Cytoscape plugin to find candidate genes in biological networks. *Bioinformatics*, 27: 1030–1031
- Spalding K.L., Arner E., Westermark P.O., Bernard S., Buchholz B. a, Bergmann O., Blomqvist L., Hoffstedt J., Näslund E., Britton T., Concha H., Hassan M., Rydén M., Frisén J., Arner P. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453: 783–787
- Steger D.J., Grant G.R., Schupp M., Tomaru T., Lefterova M.I., Schug J., Manduchi E., Stoeckert C.J., Lazar M.A. 2010. Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state. *Genes & Development*, 24: 1035–1044
- Sun G., Yan J., Noltner K., Feng J., Li H., Sarkis D.A., Sommer S.S., Rossi J.J. 2009. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*, 15: 1640–1651
- Taccioli C., Fabbri E., Visone R., Volinia S., Calin G.A., Fong L.Y., Gambari R., Bottoni A., Acunzo M., Hagan J., Iorio M. V, Piovan C., Romano G., Croce C.M. 2009. UCbase & miRfunc: a database of ultraconserved sequences and microRNA function. *Nucleic Acids Research*, 37: D41–D48
- Takahashi M., Kamei Y., Ezaki O. 2005. Mest / Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size. *American Journal of Physiology*, 288: 117–124

- Takanabe R., Ono K., Abe Y., Takaya T., Horie T., Wada H., Kita T., Satoh N., Shimatsu A., Hasegawa K. 2008. Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376, 4: 728-732
- Tollervey D., Kiss T. 1997. Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Current Opinion in Cell Biology*, 9: 337–342
- Tranchevent L.-C., Barriot R., Yu S., Van Vooren S., Van Loo P., Coessens B., De Moor B., Aerts S., Moreau Y. 2008. ENDEAVOUR update: a web resource for gene prioritization in multiple species. *Nucleic Acids Research*, 36: W377–W384
- Tranchevent L.-C., Capdevila F.B., Nitsch D., De Moor B., De Causmaecker P., Moreau Y. 2011. A guide to web tools to prioritize candidate genes. *Briefings in Bioinformatics*, 12: 22–32
- Trujillo M.E., Scherer P.E. 2006. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocrine Reviews*, 27: 762–778
- Tycowski K.T., Shu M., Kukoyi A., Steitz J.A. 2009. A conserved WD40 protein binds the cajal body localization signal of scaRNP particles. *Molecular Cell*, 34: 47–57
- Tycowski K.T., Shu M.D., Steitz J.A. 1996. A mammalian gene with introns instead of exons generating stable RNA products. *Nature*, 379: 464–466
- Unger R.H., Scherer P.E. 2010. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21: 345–352
- Viswanathan G.A., Seto J., Patil S., Nudelman G., Sealfon S.C. 2008. Getting Started in Biological Pathway Construction and Analysis. *PLoS Computational Biology*, 4, 2: e16, doi: 10.1371/journal.pcbi.0040016: 5 str.
- Vodovotz Y., Csete M., Bartels J., Chang S., An G. 2008. Translational System Biology of Inflammation. *PLoS Computational Biology*, 4, 4: e1000014, doi:10.1371/journal.pcbi.1000014: 6 str.
- Weinstein L.B., Steitz J.A. 1999. Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Current Opinion in Cell Biology*, 11: 378–384
- White U.A., Stephens J.M. 2011. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 318: 10–14
- Widberg C.H., Newell F.S., Bachmann A.W., Ramnoruth S.N., Spelta M.C., Whitehead J.P., Hutley L.J., Prins J.B. 2009. Fibroblast growth factor receptor 1 is a key regulator of early adipogenic events in human preadipocytes. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 296: E121–E131

- Wienholds E., Plasterk R. H. 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters*, 579, 26: 5911-5922
- Williams G.T., Farzaneh F. 2012. Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer? *Nature Reviews. Cancer*, 12: 84–88
- Wojcik S. E., Rossi S., Shimizu M., Nicoloso M. S., Cimmino A., Alder H., Herlea V., Rassenti L. Z., Rai K. R., Kipps T. J., Keating M. J., Croce C. M., Calin G. A. 2010. Non-codingRNA sequence variations in human chronic lymphocytic leukemia and colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 31, 2: 208–215
- Xiao L., Sobue T., Esliger A., Kronenberg M.S., Coffin J.D., Doetschman T., Hurley M.M. 2010. Disruption of the Fgf2 gene activates the adipogenic and suppresses the osteogenic program in mesenchymal marrow stromal stem cells. *Bone*, 47: 360–370
- Xie H., Lim B., Lodish H. F. 2009. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes*, 58, 5: 1050–1057
- Xiong Q., Qiu Y., Gu W. 2008. PGMapper: a web-based tool linking phenotype to genes. *Bioinformatics*, 24: 1011–1013
- Yu W., Wulf A., Liu T., Khouri M.J., Gwinn M. 2008. Gene Prospector: An evidence gateway for evaluating potential susceptibility genes and interacting risk factors for human diseases. *BMC Bioinformatics*, 9: 528-537
- Yuan X., Yamada K., Koyama W., Nonaka K. 2000. Identification of polymorphic loci in the promoter region of the serotonin 5-HT 2C receptor gene and their association with obesity and Type II diabetes. *Diabetologia*, 43: 373–376
- Zamani N., Brown C.W. 2011. Emerging Roles for the Transforming Growth Factor- β Superfamily in Regulating Adiposity and Energy Expenditure. *Endocrine Reviews*, 32: 387–403
- Zaragosi L.-E., Wdziekonski B., Villageois P., Keophiphath M., Maumus M., Tchkonia T., Bourlier V., Mohsen-Kanson T., Ladoux A., Elabd C., Scheideler M., Trajanoski Z., Takashima Y., Amri E.-Z., Lacasa D., Sengenes C., Ailhaud G., Clément K., Bouloumié A., Kirkland J.L., Dani C. 2010. Activin a plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes*, 59: 2513–2521
- Zhu M., Zhao S. 2007. Candidate gene identification approach: progress and challenges. *International Journal of Biological Sciences*, 3: 420–427
- Zhu X., Gerstein M., Snyder M. 2007. Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes & Development*, 21: 1010–1024

Zorc M., Jevsinek Skok D., Godnic I., Calin G.A., Horvat S., Jiang Z., Dovc P., Kunej T.
2012. Catalog of MicroRNA Seed Polymorphisms in Vertebrates. PLoS ONE, 7:
e30737, doi: 10.1371/journal.pone.0030737: 8 str.

Zúñiga L.A., Shen W.-J., Joyce-Shaikh B., Pyatnova E.A., Richards A.G., Thom C.,
Andrade S.M., Cua D.J., Kraemer F.B., Butcher E.C. 2010. IL-17 regulates
adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. Journal of Immunology, 185: 6947–
6959

Žemva M., Malovrh Š., Levart A., Kovač M., Furman M., Fettgewebes F. 2010. Fatty acid
composition of meat and adipose tissue from Krškopolje pigs and commercial
fatteners in Slovenia. Archiv für Tierzucht, 53: 73–84

ZAHVALA

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

Za komentarje, predloge in pomoč pri izvedbi naloge se zahvaljujem somentorici prof. dr. Mileni Kovač.

Za pregled doktorske disertacije in koristne napotke se zahvaljujem tudi doc. dr. Tomažu Curku in prof. dr. Gregorju Anderluhu.

Za strokovno pomoč in številne razprave se zahvaljujem Minji, Tini, Janji in Špeli.

Hvala sodelavcem Oddelka za zootehniko in raziskovalne mreže Integratomics TIME.

Družini in prijateljem najlepša hvala za spodbudo.

Hvala vsem, ki ste prispevali košček v tem mozaiku!

Doktorski študij je delno sofinancirala Evropska unija, in sicer iz Evropskega socialnega sklada. Sofinanciranje se izvaja v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007 - 2013, 1. razvojne prioritete Spodbujanje podjetništva in prilagodljivosti; prednostne usmeritve 1. 3: Štipendijske sheme.

PRILOGE

Priloga A: Opisna statistika analiziranih lastnosti pri miši

Oznaka za lastnost	Lastnost	Število	Srednja vrednost	Standardni odklon	Minimum	Maksimum
10305	Telesna masa na začetku testiranja	790	21,38	5,98	8,70	39,10
10306	Telesna masa na začetku testiranja	789	23,71	7,06	10,00	49,60
10328	Masa pustega tkiva, brez glave,	787	17,27	4,75	7,30	29,90
10330	Končna masa, brez glave	787	23,34	7,82	9,20	53,20
10401	Telesna masa	259	20,81	4,52	11,20	30,60
11001	Telesna masa	268	19,04	4,34	10,60	32,60
11514	Masa tkiva, brez glave	607	19,76	5,82	8,20	37,30
11515	Delež telesne mase, ki pripada maščobi, brez glave	607	19,04	5,96	7,90	44,00
14308	Telesna masa	756	25,52	7,29	8,89	50,50
14316	Masa tkiva, brez glave	756	24,99	7,41	7,73	51,10
14318	Masa pustega tkiva, brez glave	755	18,75	4,62	6,00	30,66
14319	Delež telesne mase, ki pripada maščobi	755	23,56	7,56	9,13	47,00
15125	Telesna masa	112	25,04	4,30	17,60	35,80
15126	Delež maščobe, brez glave	111	15,42	3,94	8,07	27,10
15128	Masa pustega tkiva, brez glave	111	20,52	3,75	13,20	29,80
15129	Masa tkiva, brez glave	111	24,29	4,44	16,90	35,60
15402	Telesna masa	542	24,62	4,11	15,60	38,80
17105	Masa maščobnega tkiva, brez glave	626	5,98	3,22	1,75	17,40
17106	Masa pustega tkiva, brez glave,	626	20,17	4,51	10,10	32,40
17107	Delež maščobe, brez glave	625	21,63	6,38	9,35	39,80
17201	Masa celega telesa	208	24,53	5,46	13,20	37,90
19501	Telesna masa na začetku testa	300	24,78	2,74	17,80	34,10
19502	Razmerje spremembe telesne mase v času testa	299	0,95	0,07	0,75	1,16
22401	Telesna masa	195	21,66	3,07	15,90	30,80
22402	Telesna masa	135	26,91	4,27	18,70	36,30
22410	Skupna masa tkiva,brez glave	195	21,61	3,04	15,30	30,80
22411	Skupna masa tkiva,brez glave	140	26,25	4,61	17,20	35,60
22412	Masa pustega tkiva, brez glave	195	17,09	2,52	12,70	24,60
22415	Masa telesne maščobe, brez glave d	140	6,08	2,54	2,30	13,10
22416	Delež telesne maščobe, brez glave	195	20,80	4,68	12,40	40,20
22417	Delež telesne maščobe, brez glave	140	22,59	6,58	10,70	40,80
22750	Telesna masa	191	22,20	3,10	16,20	30,80
22751	Telesna masa	139	26,98	4,20	16,90	39,30
23001	Telesna masa	531	10,20	1,44	5,91	14,90
23002	Telesna masa	736	14,98	2,53	7,50	23,50
23003	Telesna masa	735	17,95	2,39	9,93	25,10
23004	Telesna masa	735	19,32	2,59	11,70	26,40

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka za lastnost	Lastnost	Število	Srednja vrednost	Standardni odklon	Minimum	Maksimum
23005	Telesna masa	735	20,63	2,77	13,60	28,00
23006	Telesna masa	723	21,62	2,97	13,20	29,60
23007	Telesna masa	719	22,60	3,15	14,40	31,40
23008	Telesna masa	720	23,35	3,27	14,70	32,60
23009	Telesna masa	720	24,29	3,49	15,30	33,70
23012	Telesna masa	709	26,28	4,08	12,40	37,50
23013	Telesna masa	708	26,77	4,18	13,40	38,50
23014	Telesna masa	701	27,33	4,50	15,60	40,80
23130	Telesna masa	193	22,27	3,03	16,20	29,90
23131	Telesna masa	103	25,41	3,78	19,00	34,50
24701	Telesna masa na začetku testiranja	181	31,24	7,57	13,90	51,60
24702	Telesna masa na koncu testiranja	146	29,06	6,86	14,40	47,70
24703	Delež spremembe telesne mase v testiranem obdobju	146	-6,22	5,19	-19,00	7,40
25001	Dolžina telesa (od konice nosu do baze repa)	407	8,70	0,75	6,00	11,40
25002	Dolžina telesa (od konice nosu do baze repa)	414	10,10	0,62	9,00	12,00
25003	Dolžina telesa (od konice nosu do baze repa)	365	9,99	0,64	8,50	12,40
25006	Telesna masa	407	27,45	7,95	12,30	53,50
25026	Površina telesa brez glave	407	22,64	4,53	11,70	34,20
25031	Indeks telesne mase (BMI)	407	3,55	0,56	2,02	5,31
25036	Delež mašcobe, brez glave	407	23,57	6,08	12,40	44,10
25041	Masa tkiva, brez glave	407	26,09	8,07	11,10	52,90
25046	Masa pustega tkiva, brez glave,	406	19,70	5,28	8,80	37,50
25901	Masa telesne mašcobe, brez glave	109	4,48	3,57	0,00	20,00
25912	Masa pustega tkiva, brez glave	70	23,18	3,50	17,30	31,70
25913	Skupna masa tkiva telesa, brez glave	70	30,54	5,65	21,00	45,50
25921	Masa maščobnega tkiva telesa, brez glave	52	6,09	2,79	2,20	16,20
25922	Masa pustega tkiva, brez glave	52	23,78	3,01	17,10	30,70
25923	Skupna masa tkiva,brez glave	52	31,90	5,22	21,00	47,40
27404	Skupna masa tkiva,brez glave	554	23,24	5,06	12,70	36,94
27405	Masa pustega tkiva, brez glave	516	18,90	3,73	10,20	29,90
27407	Telesna masa	554	24,77	5,01	13,00	37,74
27408	Dolžina telesa (od konice nosu do baze repa)	554	8,55	0,34	7,40	9,50
27409	Površina telesa brez glave	554	21,75	2,84	14,20	30,03
27411	Indeks telesne mase (BMI)	554	3,36	0,50	2,09	4,75
2806	Končna masa telesa	304	34,04	12,69	18,20	66,90
28301	Bazna masa telesa	422	23,52	2,20	15,40	30,50
28302	Končna masa telesa	422	36,09	6,07	20,90	56,10

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka za lastnost	Lastnost	Število	Srednja vrednost	Standardni odklon	Minimum	Maksimum
28303	Razmerje spremembe telesne mase	422	1,54	0,23	0,72	2,54
2833	Razmerje spremembe telesne mase	304	1,05	0,17	0,62	1,67
2905	Telesna masa	865	22,94	4,54	11,20	36,70
2906	Končna telesna masa	813	25,44	6,30	9,32	43,80
2933	Razmerje spremembe telesne mase	741	1,17	0,16	0,65	1,83
30408	Telesna masa	415	21,31	4,35	11,70	31,80
31885	Masa pustega tkiva, brez glave	112	16,39	4,34	7,50	32,80
32603	Telesna masa	323	29,96	6,04	16,40	45,00
32604	Dolžina telesa od baze spodnjih sekalcev do baze anusa	323	8,76	0,61	7,10	10,30
32606	Masa epididimalne maščobne blazinice, kot delež telesne	323	1,91	1,18	0,00	7,29
32620	Indeks telesne mase (BMI)	323	3,88	0,47	2,70	5,49
33265	Masa na začetku testiranja, vse generacije združene	930	22,93	3,54	14,30	34,00
33401	Telesna masa	100	22,88	5,67	13,30	43,50
33431	Telesna masa	100	24,73	6,64	12,40	45,20
34609	Končna telesna masa, brez telovadnega kolesa	96	23,70	5,04	12,40	34,30
34610	Končna telesna masa, s telovadnim kolesom (6 tednov)	89	22,98	4,64	11,60	34,70
35704	Telesna masa na začetku testiranja	448	21,98	5,33	10,10	44,00
36601	Telesna masa pri testiranju	545	20,10	3,35	12,40	31,60
39301	Delež spremembe telesne mase, 1 dan po infekciji (d0=100%)	129	98,04	3,22	89,10	105,80
39303	Delež spremembe telesne mase, 7 dan po infekciji (d0=100%)	86	88,93	8,52	72,30	104,40
40404	Telesna masa	130	22,14	3,09	12,50	29,00
42803	Delež telesne mase, ki pripada maščobi, brez glave	437	21,96	6,20	11,20	43,00
44101	Telesna masa na začetku testiranja	170	20,40	4,34	11,40	37,60
44102	Telesna masa na začetku testiranja	170	20,40	4,31	11,70	36,20
44103	Telesna masa na koncu testiranja	170	18,63	4,57	10,77	33,30
44104	Telesna masa na koncu testiranja	167	16,67	4,38	8,60	31,47

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka za lastnost	Lastnost	Število	Srednja vrednost	Standardni odklon	Minimum	Maksimum
44105	Delež spremembe telesne mase v testiranem obdobju	170	0,91	0,08	0,74	1,39
44106	Delež spremembe telesne mase v testiranem obdobju	167	0,81	0,08	0,61	1,05
44405	Telesna masa mladiča 3 dan	260	1,38	0,17	0,94	1,94
44505	Telesna masa mladiča 3 dan	358	1,40	0,12	1,07	1,95
46407	Delež telesne mase, ki pripada maščobi, celo telo z glavo	704	14,85	6,96	0,00	36,94
46417	Delež telesne mase, ki pripada maščobi, celo telo z glavo, samo inbridirane linije	267	16,13	6,55	0,00	32,94
46427	Delež telesne mase, ki pripada maščobi, celo telo z glavo, samo linije AXB BXA	184	12,65	6,16	1,19	30,90
6308	Povprečje telesne mase	323	23,29	4,62	10,70	37,00
9101	Telesna masa	658	17,95	4,49	7,40	32,10
9205	Telesna masa na začetku testiranja	248	21,87	4,49	11,60	34,80
9206	Telesna masa na koncu testiranja	248	20,76	4,17	11,20	30,90

Priloga B: Polimorfizmi s komercialnih DNA-mikromrež, ki se nahajajo v genih za ncRNA

Vrsta	Tip ncRNA	Simbol ncRNA	SNP		Kromosom	Lokacija SNP-ja
			rs številka	oznaka na mikromreži		
miRNA	miš	<i>mmu-mir-1899</i>	rs37424894	JAX00685238	9	8246806
		<i>mmu-mir-1899</i>	rs29926616	JAX00167977	9	8246866
		<i>mmu-mir-1948</i>	rs6363095	JAX00080476	18	12873364
		<i>mmu-mir-3058</i>	rs48058754	JAX00296631	10	95021911
		<i>mmu-mir-3062</i>	rs26905641	JAX00314561	11	68804143
		<i>mmu-mir-453</i>	rs36962618	JAX00345740	12	110973887
		<i>mmu-mir-5618</i>	rs47669177	JAX00685156	9	7784403
		<i>mmu-mir-6238</i>	rs49401528	JAX00639533	7	61147252
		<i>mmu-mir-6238</i>	rs47922811	JAX00639531	7	61147198
		<i>mmu-mir-6238</i>	rs49066331	JAX00639532	7	61147229
		<i>mmu-mir-6354</i>	rs33765586	JAX00275389	1	170949201
		<i>mmu-mir-6394</i>	rs51621506	JAX00647863	7	103454206
		<i>mmu-mir-6397</i>	rs28147878	JAX00561555	4	107760030
		<i>mmu-mir-741</i>	rs29051496	JAX00180092	X	64050013
		<i>mmu-mir-743a</i>	rs29048185	JAX00712971	X	64029949
		<i>mmu-mir-764</i>	rs29276186	JAX00720952	X	143436815
snoRNA	miš	<i>Gm23860</i>	rs27655957	JAX00544370	4	7748168
		<i>Gm24177</i>	rs27815924	JAX00551196	4	54016947
		<i>Gm23950</i>	rs27878355	JAX00552936	4	64105811
		<i>Gm23443</i>	rs28118885	JAX00558028	4	93211914
		<i>Gm23993</i>	rs47352232	JAX00573287	5	8242751
		<i>Gm24079</i>	rs31420425	JAX00584113	5	62914681
		<i>Gm26277</i>	rs33721714	JAX00591891	5	110757167
		<i>Gm26013</i>	rs46979058	JAX00137234	5	151513532
		<i>Gm23960</i>	rs33653014	JAX00604578	6	20963135
		<i>Gm26021</i>	rs29604946	JAX00139255	6	29184490
		<i>Gm24008</i>	rs31493606	JAX00623222	6	115673849
		<i>Gm24843</i>	rs31778302	JAX00146306	6	124008628
		<i>Gm23547</i>	rs50633230	JAX00624965	6	124665392
		<i>Scarna10</i>	rs47166356	JAX00625047	6	125136610
		<i>Gm24966</i>	rs49031232	JAX00640778	7	66599453
		<i>Gm25860</i>	rs50059792	JAX00647166	7	100296395
		<i>Gm25169</i>	rs29703386	JAX00660001	8	7638841
		<i>Gm24455</i>	rs38175889	JAX00686258	9	15118363
		<i>Gm23949</i>	rs38104031	JAX00703336	9	99650902

nadaljevanje

se nadaljuje

Vrsta	Tip ncRNA	Simbol ncRNA	SNP		Kromosom	Lokacija SNP-ja
			rs številka	oznaka na mikromreži		
miš	snoRNA	<i>Gm25979</i>	rs51480821	JAX00014918	10	11050390
		<i>Gm25613</i>	rs51040669	JAX00287703	10	39829284
		<i>Gm23906</i>	rs47866073	JAX00017942	10	51608493
		<i>Snord7</i>	rs28226268	JAX00029715	11	83107834
		<i>Gm25610</i>	rs50365368	JAX00325703	12	12020536
		<i>Gm25917</i>	rs51724230	JAX00334530	12	57353429
		<i>Gm23508</i>	rs36500565	JAX00345704	12	110891314
		<i>Gm23596</i>	rs52241966	JAX00380517	14	55780412
		<i>Gm24280</i>	rs32496368	JAX00388728	14	105370734
		<i>Gm25276</i>	rs4163306	JAX00066627	16	13531524
		<i>Snord52</i>	rs49324463	JAX00437166	17	35087907
		<i>Snord52</i>	rs45654518	JAX00437167	17	35087928
		<i>Gm24228</i>	rs48723029	JAX00080714	18	16033298
		<i>Gm24401</i>	rs31761166	JAX00456427	18	37865658
		<i>Gm26202</i>	rs38756114	JAX00465246	18	75161586
		<i>Gm24124</i>	rs37635695	JAX00471095	19	13710175
		<i>Gm24006</i>	rs37409343	JAX00476422	19	35277822
		<i>Gm24173</i>	rs31932903	JAX00241864	1	11124271
		<i>Gm24548</i>	rs29692244	JAX00252094	1	58211872
		<i>Gm23939</i>	rs33536242	JAX00267660	1	135497917
		<i>Snord47</i>	rs33754226	JAX00273555	1	162968243
		<i>Gm24472</i>	rs31588254	JAX00109995	3	86870888
		<i>Gm24216</i>	rs33216452	JAX00531352	3	98928135
		<i>Gm24216</i>	rs33217504	JAX00531353	3	98928195
		<i>Gm23750</i>	rs13477352	JAX00112021	3	114527125
		<i>Gm26495</i>	rs50219045	JAX00299679	10	115777646
		<i>Gm25058</i>	rs26855077	JAX00304115	11	11813708
		<i>Gm25408</i>	rs49716862	JAX00329441	12	31742038
		<i>Gm25232</i>	rs30191941	JAX00357392	13	48667725
		<i>Gm24432</i>	rs31612531	JAX00082078	18	34253139
		<i>Gm25418</i>	rs50516331	JAX00468885	18	90674031
		<i>Gm26183</i>	rs38061619	JAX00470654	19	11769610
		<i>Gm25168</i>	rs30698876	JAX00000950	1	15748003
		<i>Gm24633</i>	rs31044209	JAX00001231	1	19503951
		<i>Snord45b</i>	rs30609338	JAX00114933	3	153573540
	UCR	<i>uc.171+</i>	rs30279798	JAX00363866	13	77629926

nadaljevanje

se nadaljuje

Vrsta	Tip ncRNA	Simbol ncRNA	SNP		Kromosom	Lokacija SNP-ja
			rs številka	oznaka na mikromreži		
miš	UCR	<i>uc.426+</i>	rs31128319	JAX00452604	18	15003555
		<i>uc.429+</i>	rs31424513	JAX00081417	18	25399726
		<i>uc.242+</i>	rs31140534	JAX00516032	3	18614044
		<i>uc.211+</i>	rs29806600	JAX00609990	6	51829584
govedo	miRNA	<i>bta-mir-551b</i>	rs135711811	BovineHD0100028452	1	99671783
		<i>bta-mir-874</i>	rs110808436	BovineHD0700014785	7	50687460
		<i>bta-mir-764</i>	rs133587516	BovineHD3000019754	X	67800471
		<i>bta-mir-6527</i>	rs110672364	BovineHD1300023001	13	79549829
		<i>bta-mir-2462</i>	rs133596376	BovineHD0700024144	7	82645316
		<i>bta-mir-2369</i>	rs135082893	BovineHD2200011437	22	40172586
		<i>bta-mir-2355</i>	rs110782690	BovineHD0200027534	2	95834624
		<i>bta-mir-2371</i>	rs133066290	BovineHD2200013049	22	45084598
	snoRNA	SCARNA7	rs133705548	BovineHD0100030506	1	107820072
		SNORA70	rs135104642	BovineHD0100034278	1	121125892
		SNORA79	rs109774736	BovineHD0100037081	1	130552719
		SNORA11	rs132926338	BovineHD0200029367	2	102308633
		SNORA43	rs42249591	BovineHD0200003620	2	12832541
		SCARNA20	rs136026391	BovineHD0400020849	4	75346071
		SNORA3	rs110016656	BovineHD0400006485	4	21852570
		SNORA18	rs135059982	BovineHD0500003865	5	12836050
		SNORA38	rs137713244	BovineHD0500008515	5	28986902
		SNORA31	rs133120689	BovineHD0800009190	8	30260549
		SNORA18	rs133363655	BovineHD0900025760	9	91240255
		SNORA72	rs133404339	BovineHD1000003558	10	10652275
		SNORA72	rs133437696	BovineHD1100016016	11	55128107
		SNORA18	rs137236454	BovineHD1300007217	13	25002226
		SNORA70	rs136752160	BovineHD1800019296	18	42440004
		SNORA1	rs110296962	BovineHD2100007848	21	27129698
		SNORD113	rs110348734	BovineHD2100019803	21	67516022
		SNORD19	rs42013153	BTB-00854474	22	48727610
		SNORA22	rs109574741	BovineHD2500005793	25	20969537
		SNORA14	rs42139330	BovineHD2800002365	28	7940937
		SNORD27	rs42187697	BFGL-NGS-114737	29	41854768
		snoU13	rs135857998	BovineHD3000038329	X	134464778
prašič	snoRNA	SNORA70	rs80889550	H3GA0031885	11	49690635

Priloga C: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v biološke procese pri miši

Biološki proces	Št. HG	p-bonf
<i>Cellular process</i>	315	0,0004
<i>Metabolic process</i>	238	< 0,0001
<i>Cellular metabolic process</i>	222	< 0,0001
<i>Primary metabolic process</i>	215	< 0,0001
<i>Macromolecule metabolic process</i>	186	< 0,0001
<i>Cellular macromolecule metabolic process</i>	180	< 0,0001
<i>Regulation of metabolic process</i>	158	0,0024
<i>Regulation of primary metabolic process</i>	140	0,0026
<i>Regulation of cellular metabolic process</i>	138	0,0165
<i>Positive regulation of biological process</i>	136	0,0041
<i>Regulation of macromolecule metabolic process</i>	134	0,0022
<i>Cellular nitrogen compound metabolic process</i>	130	0,0110
<i>Nitrogen compound metabolic process</i>	130	0,0210
<i>Positive regulation of cellular process</i>	130	0,0004
<i>Cellular component organization or biogenesis</i>	129	0,0001
<i>Nucleobase-containing compound metabolic process</i>	126	0,0062
<i>Cellular component organization</i>	122	0,0006
<i>Cellular component organization or biogenesis at cellular level</i>	115	< 0,0001
<i>Cellular biosynthetic process</i>	114	0,0278
<i>Regulation of nitrogen compound metabolic process</i>	113	0,0081
<i>Protein metabolic process</i>	112	0,0008
<i>Regulation of nucleobase-containing compound metabolic process</i>	112	0,0076
<i>Gene expression</i>	110	0,0007
<i>Cellular component organization at cellular level</i>	108	< 0,0001
<i>Regulation of gene expression</i>	106	0,0213
<i>Cellular protein metabolic process</i>	100	< 0,0001
<i>Cellular macromolecule biosynthetic process</i>	95	0,0222
<i>Macromolecule biosynthetic process</i>	95	0,0354
<i>Positive regulation of metabolic process</i>	85	0,0210
<i>Positive regulation of macromolecule metabolic process</i>	83	0,0029
<i>Positive regulation of cellular metabolic process</i>	81	0,0220
<i>Macromolecule modification</i>	79	0,0221
<i>Regulation of developmental process</i>	69	0,0237
<i>Regulation of cell differentiation</i>	53	0,0377
<i>Cellular response to stress</i>	42	0,0332
<i>Positive regulation of developmental process</i>	42	0,0146
<i>Positive regulation of cellular component organization</i>	34	0,0257
<i>Positive regulation of cell differentiation</i>	33	0,0356
<i>Translation</i>	27	0,0486

HG: gostiteljski gen, p-bonf: p-vrednost po Bonferroni korekciji

Priloga D: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v celične procese pri miši

Celični proces	Št. HG	p-bonf
<i>Intracellular part</i>	345	< 0,0001
<i>Cell</i>	343	0,0016
<i>Cell part</i>	341	0,0023
<i>Intracellular</i>	334	< 0,0001
<i>Intracellular organelle</i>	312	< 0,0001
<i>Intracellular membrane-bounded organelle</i>	286	< 0,0001
<i>Cytoplasm</i>	284	< 0,0001
<i>Nucleus</i>	208	< 0,0001
<i>Cytoplasmic part</i>	194	< 0,0001
<i>Organelle part</i>	179	< 0,0001
<i>Intracellular organelle part</i>	178	< 0,0001
<i>Macromolecular complex</i>	145	< 0,0001
<i>Protein complex</i>	119	0,0001
<i>Intracellular non-membrane-bounded organelle</i>	116	< 0,0001
<i>Membrane-enclosed lumen</i>	91	< 0,0001
<i>Nuclear part</i>	91	< 0,0001
<i>Intracellular organelle lumen</i>	88	< 0,0001
<i>Organelle lumen</i>	88	< 0,0001
<i>Nuclear lumen</i>	83	< 0,0001
<i>Cell projection</i>	55	0,0291
<i>Nucleoplasm</i>	54	< 0,0001
<i>Cytosol</i>	50	0,0006
<i>Nucleoplasm part</i>	48	< 0,0001
<i>Golgi apparatus</i>	44	0,0330
<i>Microtubule cytoskeleton</i>	37	0,0048
<i>Ribonucleoprotein complex</i>	30	0,0003
<i>Chromosome</i>	28	0,0147
<i>Centrosome</i>	24	0,0018
<i>Chromosomal part</i>	24	0,0266
<i>Microtubule organizing center</i>	24	0,0048
<i>Nuclear chromosome</i>	21	0,0006
<i>Nuclear chromosome part</i>	20	0,0004
<i>Nuclear body</i>	17	0,0002
<i>Cytosolic part</i>	14	0,0053
<i>Nuclear chromatin</i>	12	0,0152
<i>Cytosolic ribosome</i>	11	0,0016
<i>Cytosolic large ribosomal subunit</i>	9	0,0004
<i>Large ribosomal subunit</i>	9	0,0061
<i>Nuclear speck</i>	8	0,0094
<i>H4/H2A histone acetyltransferase complex</i>	4	0,0207
<i>Nua4 histone acetyltransferase complex</i>	4	0,0207
<i>Delta DNA polymerase complex</i>	2	0,0231
<i>Endothelial microparticle</i>	2	0,0231

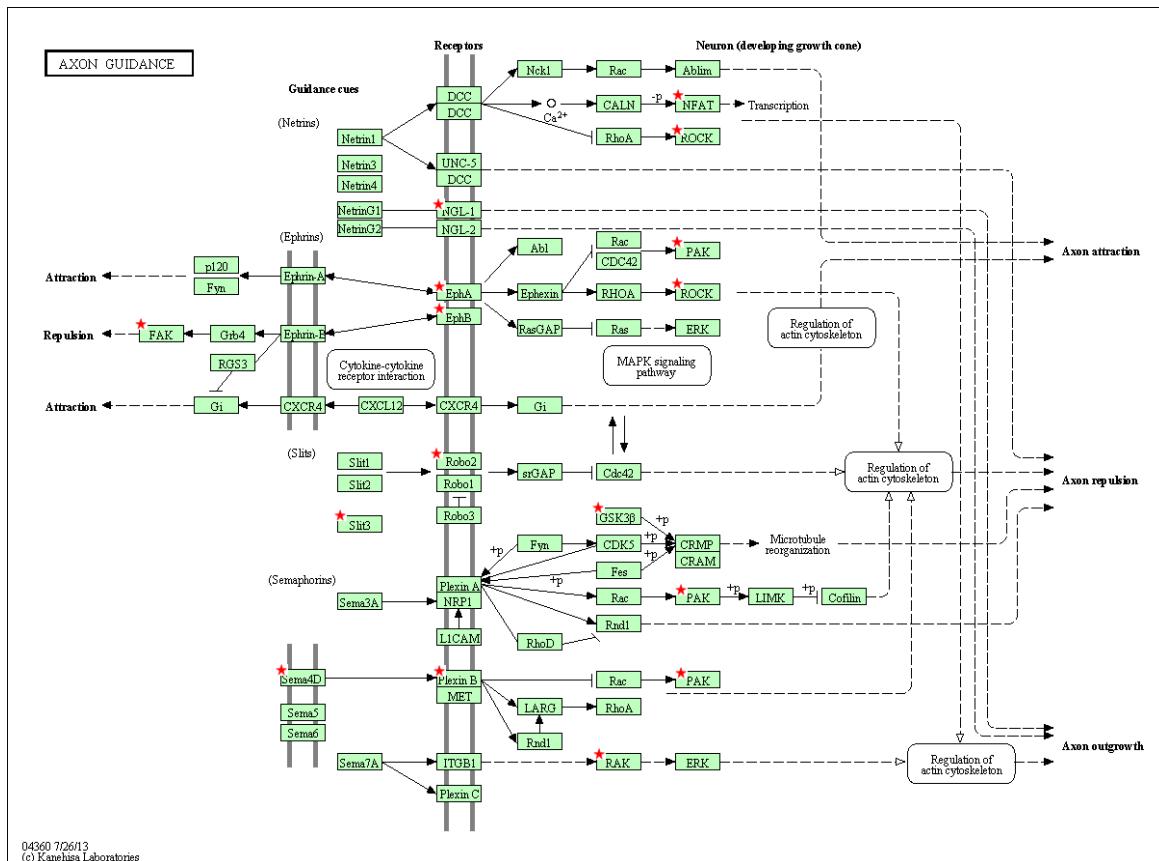
HG: gostiteljski gen, p-bonf: p-vrednost po Bonferroni korekciji

Priloga E: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v molekularne funkcije pri miši

Molekularna funkcija	Št. HG	p-bonf
<i>Binding</i>	285	0,0106
<i>Protein binding</i>	248	< 0,0001
<i>Catalytic activity</i>	141	0,0298
<i>Nucleic acid binding</i>	103	< 0,0001
<i>Nucleoside phosphate binding</i>	96	< 0,0001
<i>Nucleotide binding</i>	96	< 0,0001
<i>Organic cyclic compound binding</i>	96	< 0,0001
<i>Small molecule binding</i>	96	< 0,0001
<i>Ribonucleotide binding</i>	88	< 0,0001
<i>Purine nucleotide binding</i>	88	< 0,0001
<i>Purine ribonucleotide binding</i>	87	< 0,0001
<i>Purine ribonucleoside triphosphate binding</i>	86	< 0,0001
<i>Adenyl nucleotide binding</i>	79	< 0,0001
<i>Adenyl ribonucleotide binding</i>	79	< 0,0001
<i>ATP binding</i>	78	< 0,0001
<i>DNA binding</i>	74	0,0012
<i>Transferase activity</i>	58	0,0429
<i>Enzyme binding</i>	57	0,0028
<i>RNA binding</i>	47	< 0,0001
<i>Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups</i>	42	0,0001
<i>Kinase activity</i>	34	0,0020
<i>Protein domain specific binding</i>	34	0,0189
<i>Phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor</i>	32	0,0002
<i>Kinase binding</i>	26	0,0429
<i>Chromatin binding</i>	21	0,0117
<i>Helicase activity</i>	12	0,0251
<i>Protein transporter activity</i>	10	0,0106
<i>DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase activity</i>	4	0,0189

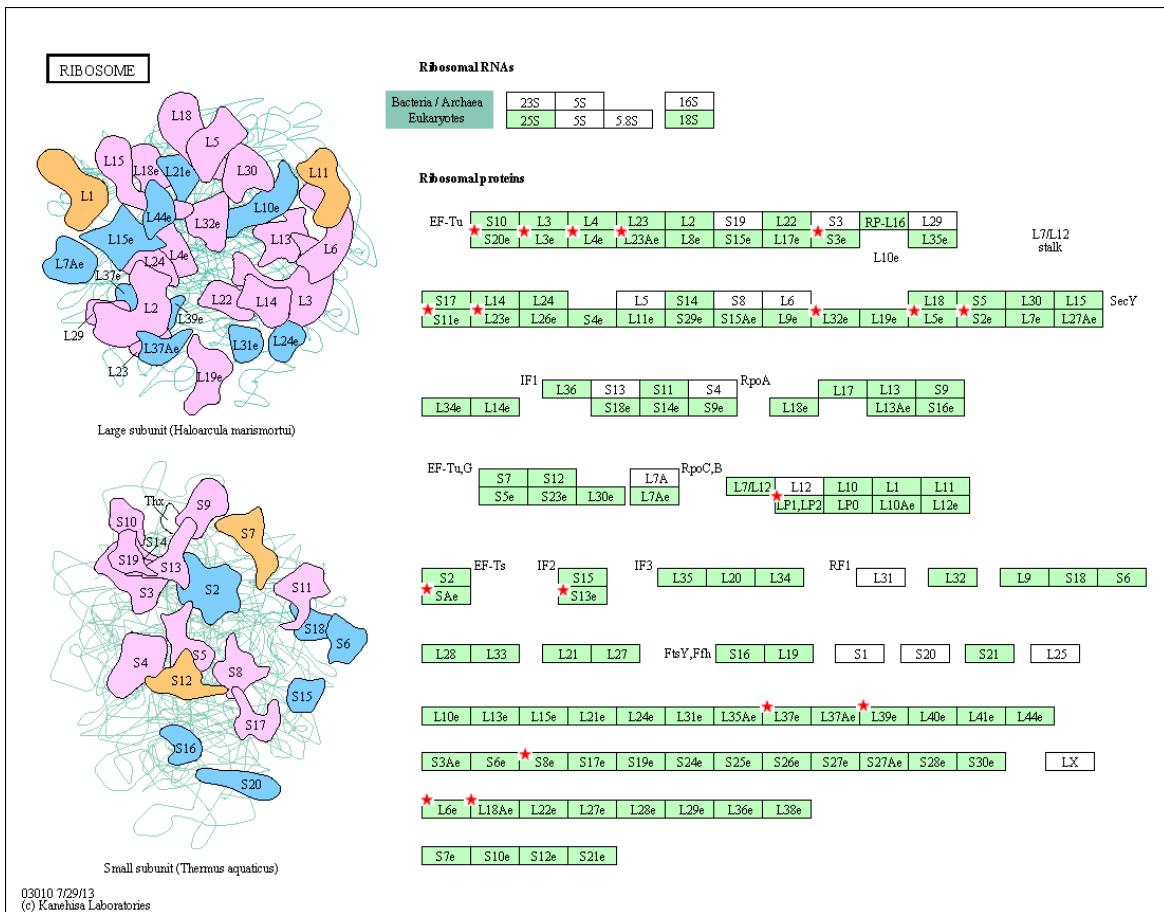
HG: gostiteljski gen, p-bonf: p-vrednost po Bonferroni korekciji

Priloga F: Gostiteljski geni vpleteni v biološko pot "Axon guidance" pri miši



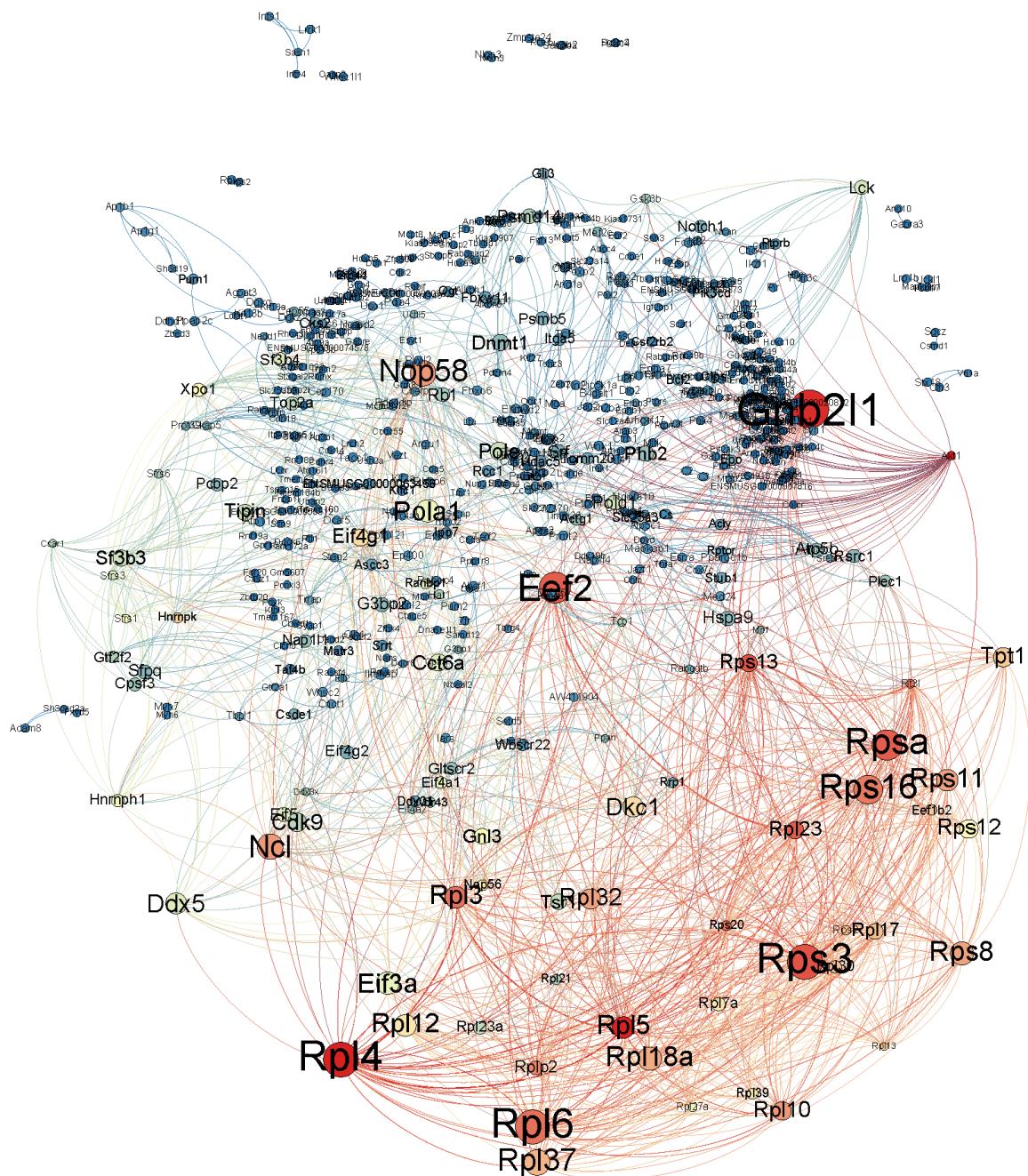
rdeča zvezdica: gostiteljski gen za ncRNA

Priloga G: Gostiteljski geni vpleteni v biološko pot "Ribosome" pri miši



rdeča zvezdica: gostiteljski gen za ncRNA

Priloga H: Interakcije med proteini, ki jih kodirajo gostiteljski geni za ncRNA pri miši



Priloga I: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v biološke procese pri govedu

Biološki proces	Št. HG	p-bonf
<i>Positive regulation of gene expression</i>	41	0,0129
<i>Positive regulation of RNA metabolic process</i>	39	0,0193

HG: gostiteljski gen, p-bonf: p-vrednost po Bonferroni korekciji

Priloga J: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v celične procese pri govedu

Celični proces	Št. HG	p-bonf
<i>Cell</i>	286	< 0,0001
<i>Cell part</i>	286	< 0,0001
<i>Intracellular</i>	264	< 0,0001
<i>Intracellular part</i>	248	< 0,0001
<i>Intracellular organelle</i>	221	< 0,0001
<i>Intracellular membrane-bounded organelle</i>	186	0,0170
<i>Cytoplasm</i>	180	0,0037
<i>Nucleus</i>	138	< 0,0001
<i>Organelle part</i>	121	0,0038
<i>Intracellular organelle part</i>	120	0,0037
<i>Macromolecular complex</i>	98	0,0009
<i>Intracellular non-membrane-bounded organelle</i>	85	0,0003
<i>Nuclear part</i>	60	0,0018
<i>Intracellular organelle lumen</i>	52	0,0212
<i>Membrane-enclosed lumen</i>	52	0,0326
<i>Organelle lumen</i>	52	0,0214
<i>Nuclear lumen</i>	48	0,0067
<i>Ribonucleoprotein complex</i>	34	< 0,0001
<i>Nucleolus</i>	23	0,0194
<i>Ribosome</i>	20	0,0001
<i>Ribosomal subunit</i>	13	0,0001
<i>Cytosolic part</i>	12	0,0037
<i>Cytosolic ribosome</i>	12	< 0,0001
<i>Adherens junction</i>	11	0,0067
<i>Anchoring junction</i>	11	0,0123
<i>Cell cortex</i>	9	0,0393
<i>Cell-substrate adherens junction</i>	8	0,0170
<i>Cell-substrate junction</i>	8	0,0209
<i>Focal adhesion</i>	8	0,0123
<i>Cytosolic small ribosomal subunit</i>	7	0,0005
<i>Small ribosomal subunit</i>	7	0,0038
<i>Cytosolic large ribosomal subunit</i>	5	0,0255
<i>Basal cortex</i>	2	0,0255

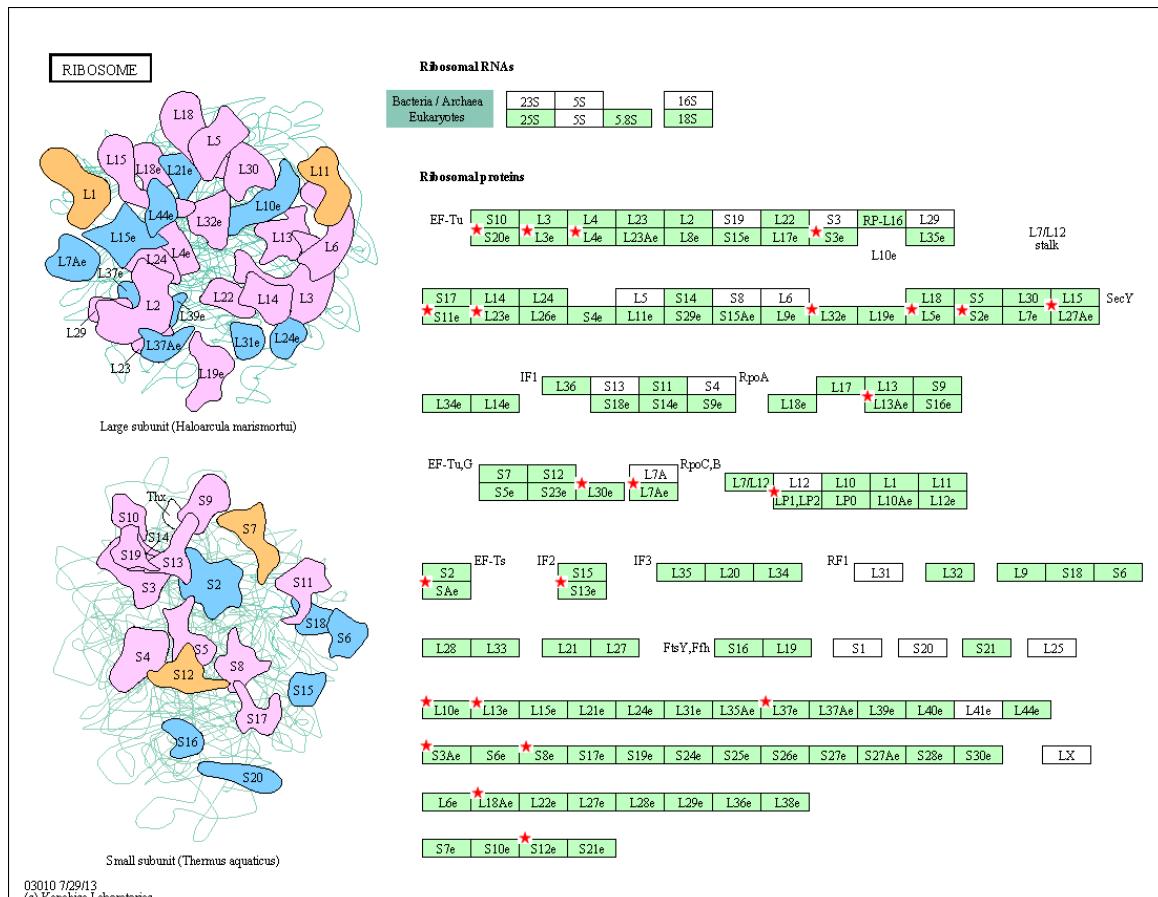
HG: gostiteljski gen, p-bonf: p-vrednost po Bonferroni korekciji

Priloga K: Rezultat analize vpletjenosti gostiteljskih genov v molekularne funkcije pri govedu

Molekularna funkcija	Št. HG	p-bonf
<i>Structural molecule activity</i>	26	0,0226
<i>Actin binding</i>	18	0,0213
<i>Structural constituent of ribosome</i>	17	0,0080
<i>Protein transporter activity</i>	11	0,0094
<i>Leucine zipper domain binding</i>	4	0,0052
<i>LRR domain binding</i>	4	0,0226
<i>Pantothenate kinase activity</i>	3	0,0414

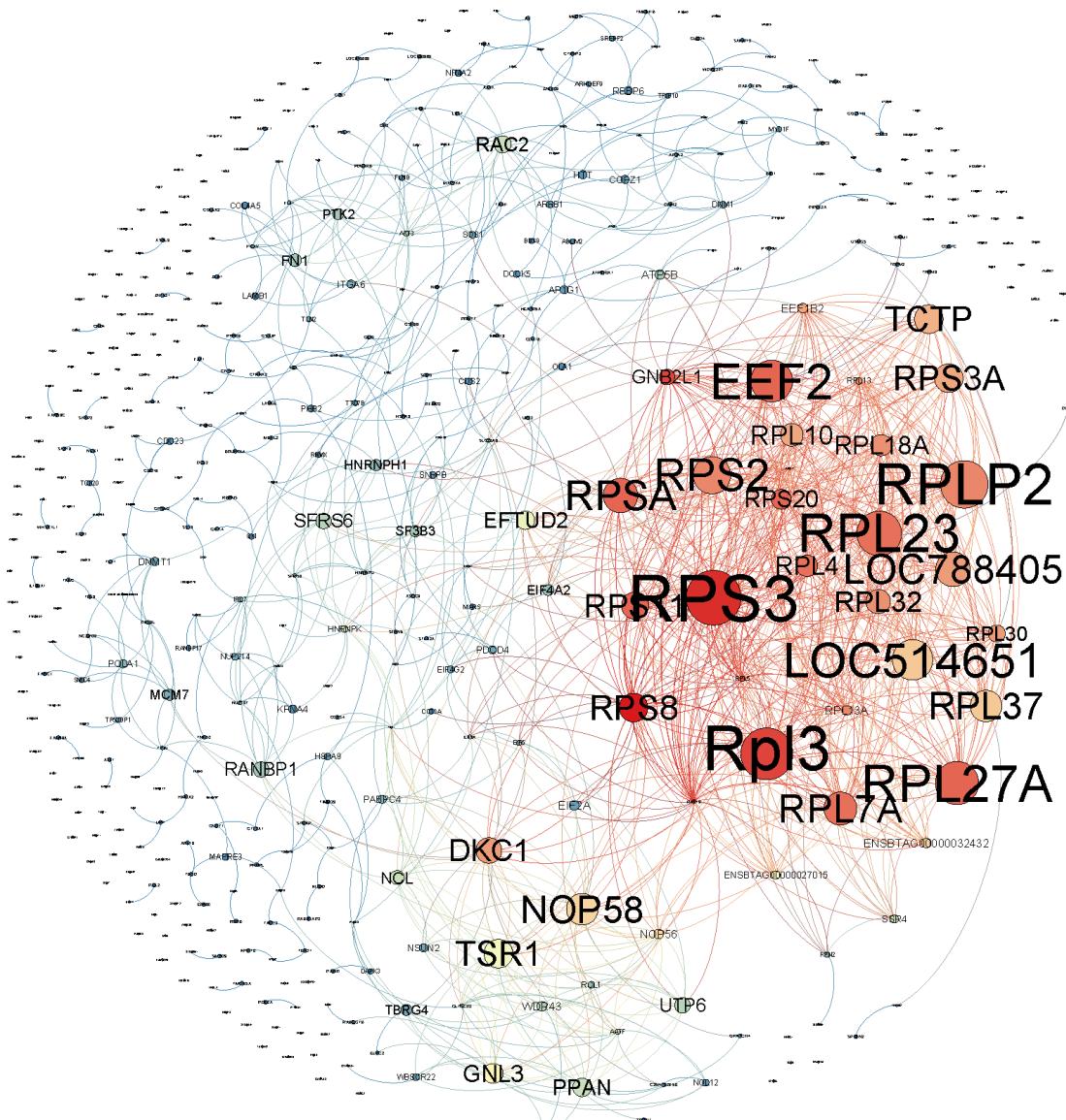
HG: gostiteljski gen, p-bonf: p-vrednost po Bonferroni korekciji

Priloga L: Gostiteljski geni vpleteni v biološko pot "Ribosome" pri govedu



rdeča zvezdica: gostiteljski gen za ncRNA

Priloga M: Interakcije med proteini, ki jih kodirajo gostiteljski geni za ncRNA pri govedu



Priloga N: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v biološke procese pri prašiču

Biološki proces	Št. HG	p-bonf
<i>Cellular macromolecule metabolic process</i>	52	0,0065
<i>Gene expression</i>	33	0,0001
<i>Translation</i>	15	0,0254
<i>Nuclear mrna splicing, via spliceosome</i>	5	0,0350
<i>RNA splicing, via transesterification reactions</i>	5	0,0350
<i>RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile</i>	5	0,0350
<i>Coenzyme A biosynthetic process</i>	3	0,0350
<i>Coenzyme A metabolic process</i>	3	0,0460
<i>mRNA splice site selection</i>	3	0,0460

HG: gostiteljski gen, p-bonf: p-vrednost po Bonferroni korekciji

Priloga O: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v celične procese pri prašiču

Celični proces	Št. HG	p-bonf
<i>Intracellular</i>	108	0,0003
<i>Intracellular part</i>	101	0,0003
<i>Intracellular organelle</i>	92	0,0004
<i>Cytoplasmic part</i>	60	0,0039
<i>Intracellular organelle part</i>	52	0,0046
<i>Macromolecular complex</i>	46	0,0027
<i>Intracellular non-membrane-bounded organelle</i>	42	0,0001
<i>Ribonucleoprotein complex</i>	21	< 0,0001
<i>Ribosome</i>	14	< 0,0001
<i>Cytosolic part</i>	11	< 0,0001
<i>Ribosomal subunit</i>	11	< 0,0001
<i>Cytosolic ribosome</i>	9	< 0,0001

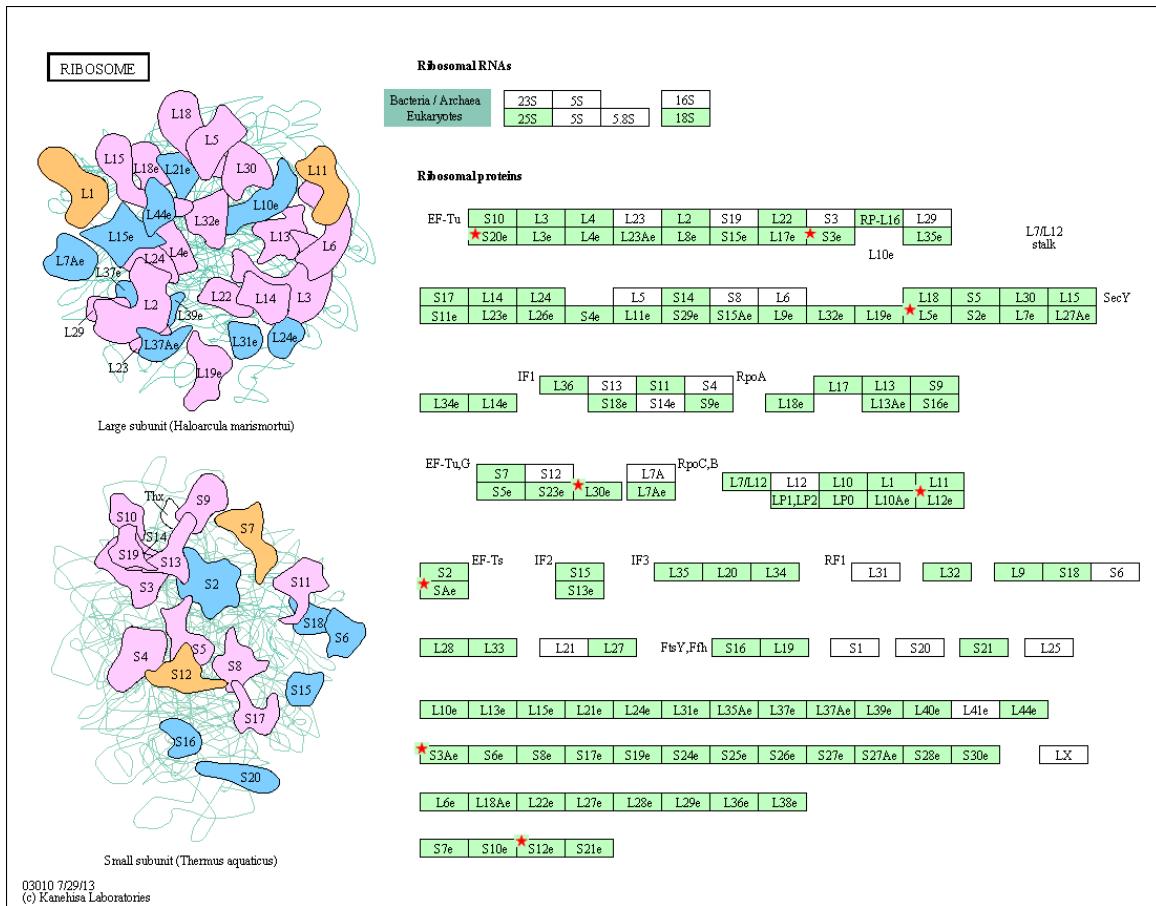
HG: gostiteljski gen, p-bonf: p-vrednost po Bonferroni korekciji

Priloga P: Rezultat analize vpletenosti gostiteljskih genov v molekularne funkcije pri prašiču

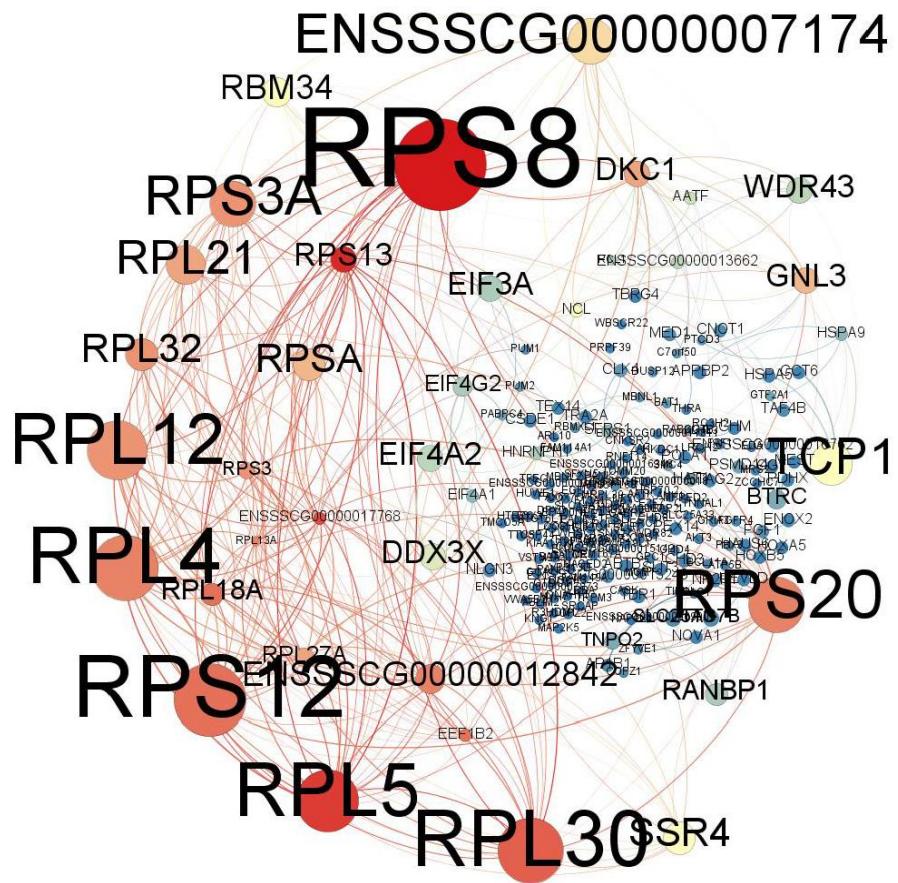
Molekularna funkcija	Št. HG	p-bonf
<i>Nucleic acid binding</i>	48	0,0062
<i>Nucleoside phosphate binding</i>	41	0,0196
<i>Nucleotide binding</i>	41	0,0196
<i>Organic cyclic compound binding</i>	41	0,0196
<i>RNA binding</i>	19	0,0008
<i>Structural molecule activity</i>	16	0,0023
<i>Structural constituent of ribosome</i>	14	< 0,0001
<i>Pantothenate kinase activity</i>	3	0,0031

HG: gostiteljski gen, p-bonf: p-vrednost po Bonferroni korekciji

Priloga R: Gostiteljski geni vpleteni v biološko pot "Ribosome" pri prašiču



Priloga S: Interakcije med proteini, ki jih kodirajo gostiteljski geni za ncRNA pri prašiču



Priloga T: Seznam parov ncRNA/HG razvrščenih po prioriteti glede na njihovo vlogo pri nalaganju maščobe pri miši

Gostiteljski gen	ncRNA	SNP	Število linij	PIC	Delež povezav	Ocena razlik med aleloma	LPI _{max}
<i>Ttc39c</i>	<i>mmu-mir-1948</i>	rs6363045	15	0,480	0,80	1,208	0,895
<i>2410131K14Rik</i>	<i>Gm25076</i>	rs29525585	15	0,498	0,69	1,224	0,883
<i>Csmd3</i>	<i>Gm23530</i>	rs49249902	15	0,498	0,71	1,007	0,880
<i>Plxnb3</i>	<i>Gm25226</i>	rs3161207	15	0,480	0,73	1,208	0,880
<i>Tox</i>	<i>uc.239</i>	rs32131119	15	0,480	0,69	1,352	0,876
<i>Snrpe</i>	<i>Gm23939</i>	rs33536242	15	0,480	0,70	1,101	0,870
<i>Nup54</i>	<i>Gm26039</i>	rs33701322	15	0,498	0,67	0,775	0,864
<i>Nfx1</i>	<i>mmu-mir-3094</i>	rs27786269	15	0,391	0,86	1,520	0,864
<i>Pir</i>	<i>Gm22023</i>	rs31442039	15	0,391	0,86	1,520	0,864
<i>Lclat1</i>	<i>Gm25406</i>	rs49281152	15	0,391	0,86	1,520	0,864
<i>Fbxl17</i>	<i>Gm24730</i>	rs49696438	15	0,391	0,86	1,520	0,864
<i>Abcc4</i>	<i>mmu-mir-6391</i>	rs48510543	15	0,444	0,73	1,340	0,863
<i>Srr</i>	<i>Snord91a</i>	rs26888773	15	0,444	0,71	1,433	0,861
<i>Tox3</i>	<i>uc.401</i>	rs33008407	15	0,480	0,68	0,872	0,859
<i>Fzd6</i>	<i>Gm24789</i>	rs49211380	15	0,444	0,75	1,021	0,857
<i>Rpl13a</i>	<i>mmu-mir-5121</i>	rs29866531	15	0,480	0,68	0,790	0,856
<i>Zc3h3</i>	<i>Gm23747</i>	rs37207545	15	0,444	0,72	1,172	0,855
<i>Gabre</i>	<i>mmu-mir-224</i>	rs3161168	15	0,444	0,69	1,355	0,855
<i>Smoc1</i>	<i>mmu-mir-3067</i>	rs47467186	15	0,480	0,65	0,939	0,854
<i>Snrnp70</i>	<i>Gm22478</i>	rs6252200	15	0,391	0,82	1,301	0,848
<i>Zc3h12d</i>	<i>mmu-mir-5104</i>	rs49386391	15	0,444	0,63	1,355	0,842
<i>Ccnf</i>	<i>mmu-mir-5134</i>	rs51625895	15	0,444	0,67	1,077	0,842
<i>Pkn2</i>	<i>Gm25965</i>	rs31076049	15	0,498	0,58	0,581	0,839
<i>Aspg</i>	<i>mmu-mir-3073a</i>	rs29163360	15	0,498	0,57	0,531	0,835
<i>Ctdsp2</i>	<i>mmu-mir-546</i>	rs13469653	15	0,444	0,67	0,864	0,835
<i>Ipo7</i>	<i>Snora23</i>	rs32105629	15	0,391	0,80	1,009	0,835
<i>Rnf215</i>	<i>mmu-mir-3060</i>	rs45735915	15	0,444	0,62	1,107	0,832
<i>Etl4</i>	<i>Gm25859</i>	rs49360178	15	0,498	0,51	0,699	0,828
<i>Ifld1</i>	<i>Gm25373</i>	rs38325445	15	0,498	0,52	0,612	0,827
<i>Hat1</i>	<i>uc.97</i>	rs28296350	15	0,480	0,58	0,544	0,827
<i>Tnik</i>	<i>mmu-mir-466q</i>	rs52368901	15	0,498	0,53	0,536	0,827
<i>Zbtb40</i>	<i>Gm23834</i>	rs27573671	15	0,498	0,51	0,646	0,826
<i>Fam69a</i>	<i>Snord21</i>	rs32052896	15	0,391	0,71	1,262	0,824
<i>Decr1</i>	<i>mmu-mir-6400</i>	rs27737396	15	0,320	0,88	1,463	0,823
<i>Tmem245</i>	<i>Gm22300</i>	rs27854379	15	0,320	0,88	1,463	0,823
<i>Eda</i>	<i>mmu-mir-676</i>	rs29080583	15	0,320	0,88	1,463	0,823
<i>Gm5134</i>	<i>mmu-mir-6409</i>	rs30045452	15	0,320	0,88	1,463	0,823
<i>Slmap</i>	<i>Gm24031</i>	rs36257887	15	0,320	0,88	1,463	0,823
<i>Ppp2r3a</i>	<i>Gm24338</i>	rs36462019	15	0,320	0,88	1,463	0,823
<i>Rps16</i>	<i>AF357399</i>	rs36618044	15	0,320	0,88	1,463	0,823
<i>Rcl1</i>	<i>mmu-mir-101b</i>	rs37852090	15	0,320	0,88	1,463	0,823
<i>Pax2</i>	<i>mmu-mir-6405</i>	rs38439039	15	0,320	0,88	1,463	0,823
<i>Slc16a10</i>	<i>Gm25613</i>	rs46768869	15	0,320	0,88	1,463	0,823
<i>Fgf12</i>	<i>mmu-mir-690</i>	rs52187776	15	0,320	0,88	1,463	0,823
<i>Slit3</i>	<i>Gm26070</i>	rs28234988	15	0,480	0,54	0,584	0,820
<i>Srcap</i>	<i>Snora30</i>	rs32325060	15	0,444	0,58	0,909	0,817

se nadaljuje

nadaljevanje

Gostiteljski gen	ncRNA	SNP	Število linij	PIC	Delež povezav	Ocena razlik med aleloma	LPI _{max}
<i>9030624J02Rik</i>	<i>Gm26147</i>	rs31060731	15	0,498	0,47	0,590	0,816
<i>Thsd4</i>	<i>Gm22099</i>	rs30521782	15	0,480	0,54	0,454	0,816
<i>Pabpc4</i>	<i>Gm25788</i>	rs27532712	15	0,391	0,72	0,913	0,815
<i>Ero1lb</i>	<i>Gm25483</i>	rs47738618	14	0,459	0,67	0,759	0,814
<i>Gpc3</i>	<i>mmu-mir-717</i>	rs30372501	15	0,444	0,56	0,862	0,812
<i>Csmd1</i>	<i>Gm25278</i>	rs32830939	15	0,391	0,68	1,055	0,811
<i>Idh3b</i>	<i>Snord57</i>	rs27275806	15	0,391	0,68	1,007	0,810
<i>Dars2</i>	<i>Gm26224</i>	rs33754948	15	0,498	0,45	0,506	0,809
<i>Olfr322</i>	<i>Gm22599</i>	rs49680173	15	0,391	0,67	1,055	0,809
<i>Rfx1</i>	<i>mmu-mir-709</i>	rs46835154	15	0,498	0,47	0,356	0,809
<i>Ccdc88c</i>	<i>mmu-mir-1190</i>	rs29188975	15	0,444	0,56	0,719	0,807
<i>Zfp286</i>	<i>Gm24151</i>	rs26970180	15	0,480	0,47	0,622	0,807
<i>Sfmbt2</i>	<i>mmu-mir-467b</i>	rs51808091	14	0,500	0,51	0,758	0,805
<i>N4bp2</i>	<i>Gm24346</i>	rs29734309	15	0,444	0,58	0,491	0,804
<i>Ank2</i>	<i>Gm25501</i>	rs30557782	13	0,426	0,65	1,649	0,791
<i>Rpsa</i>	<i>Gm26448</i>	rs47613192	15	0,444	0,50	0,468	0,787
<i>Rnf41</i>	<i>Gm26347</i>	rs29336106	15	0,444	0,46	0,627	0,783
<i>Ap2b1</i>	<i>Snord7</i>	rs28226268	15	0,444	0,42	0,890	0,783
<i>Hebp1</i>	<i>Gm22881</i>	rs46613404	15	0,444	0,44	0,691	0,781
<i>Uvrag</i>	<i>Gm23479</i>	rs45929231	15	0,444	0,47	0,384	0,778
<i>Inpp5b</i>	<i>mmu-mir-698</i>	rs27569360	15	0,231	0,90	1,519	0,776
<i>Dock5</i>	<i>mmu-mir-6539</i>	rs31156374	15	0,231	0,90	1,519	0,776
<i>Hs3st4</i>	<i>Gm25759</i>	rs32845448	15	0,231	0,90	1,519	0,776
<i>Trp73</i>	<i>Gm26036</i>	rs33033206	15	0,231	0,90	1,519	0,776
<i>Negr1</i>	<i>Gm24373</i>	rs37101821	15	0,231	0,90	1,519	0,776
<i>Lats2</i>	<i>Gm26440</i>	rs49369889	15	0,231	0,90	1,519	0,776
<i>Olfr849</i>	<i>Gm23048</i>	rs51172844	15	0,231	0,90	1,519	0,776
<i>Cnot3</i>	<i>mmu-mir-3572</i>	rs31571372	15	0,480	0,35	0,326	0,772
<i>Gsr</i>	<i>Gm24727</i>	rs30229782	15	0,391	0,53	0,713	0,769
<i>Ubr5</i>	<i>Gm22353</i>	rs33175111	15	0,231	0,90	1,285	0,769
<i>Fig4</i>	<i>Gm25526</i>	rs36408037	15	0,231	0,90	1,285	0,769
<i>Oosp1</i>	<i>Gm26183</i>	rs37711756	15	0,231	0,90	1,285	0,769
<i>Atp5b</i>	<i>Gm25206</i>	rs38518404	15	0,231	0,90	1,285	0,769
<i>Lrriq1</i>	<i>Gm25376</i>	rs45941407	15	0,231	0,90	1,285	0,769
<i>Ptprb</i>	<i>Gm26495</i>	rs50219045	15	0,231	0,90	1,285	0,769
<i>1700028P14Rik</i>	<i>Gm22144</i>	rs30450380	15	0,391	0,53	0,459	0,761
<i>Ndufb10</i>	<i>Snora64</i>	rs47826253	14	0,500	0,37	0,292	0,760
<i>Ell2</i>	<i>Gm23127</i>	rs29244315	15	0,320	0,67	0,841	0,760
<i>Zfp84</i>	<i>mmu-mir-1964</i>	rs36922258	15	0,320	0,64	1,020	0,759
<i>Rabif</i>	<i>Gm25612</i>	rs30866897	15	0,231	0,81	1,502	0,757
<i>Prdm2</i>	<i>Gm22039</i>	rs27591003	14	0,500	0,36	0,235	0,757
<i>Cct6a</i>	<i>Gm23245</i>	rs46881057	15	0,391	0,51	0,424	0,755
<i>BC031181</i>	<i>Gm23301</i>	rs38756114	15	0,391	0,48	0,614	0,755
<i>Rb1</i>	<i>mmu-mir-687</i>	rs49403636	15	0,391	0,47	0,524	0,750
<i>Trnau1ap</i>	<i>Snora44</i>	rs27556392	15	0,320	0,60	0,935	0,748
<i>Eif4g3</i>	<i>mmu-mir-6399</i>	rs27576349	13	0,473	0,42	0,899	0,747
<i>Rbks</i>	<i>mmu-mir-3473e</i>	rs49531270	15	0,320	0,54	1,295	0,747
<i>Eng</i>	<i>Gm26236</i>	rs27208064	15	0,231	0,78	1,247	0,742
<i>Wfdc6b</i>	<i>Gm24473</i>	rs27316088	15	0,231	0,78	1,247	0,742
<i>Tmem212</i>	<i>Gm26040</i>	rs29594328	15	0,231	0,78	1,247	0,742

se nadaljuje

nadaljevanje

Gostiteljski gen	ncRNA	SNP	Število linij	PIC	Delež povezav	Ocena razlik med aleloma	LPI _{max}
<i>5830418K08Rik</i>	<i>Gm22620</i>	rs37481432	15	0,231	0,78	1,247	0,742
<i>Atg5</i>	<i>mmu-mir-1929</i>	rs46329746	15	0,231	0,78	1,247	0,742
<i>Cdh18</i>	<i>Gm24656</i>	rs47118937	15	0,231	0,78	1,247	0,742
<i>Galnt7</i>	<i>Gm25379</i>	rs31373694	15	0,231	0,77	1,285	0,741
<i>Adamts3</i>	<i>Gm25758</i>	rs37104876	14	0,408	0,51	0,284	0,735
<i>Zfp407</i>	<i>uc.440</i>	rs48294219	15	0,320	0,55	0,773	0,732
<i>Pcdhga9</i>	<i>Gm24401</i>	rs31761166	14	0,459	0,35	0,210	0,729
<i>Wdr43</i>	<i>Snord92</i>	rs48564915	15	0,231	0,72	1,191	0,728
<i>Dcps</i>	<i>Gm24262</i>	rs36892210	13	0,355	0,72	0,340	0,722
<i>Pfas</i>	<i>mmu-mir-3062</i>	rs26905641	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Igf2bp1</i>	<i>mmu-mir-3063</i>	rs27086902	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Mrrf</i>	<i>uc.267</i>	rs27159946	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Abhd12</i>	<i>Gm23598</i>	rs27353129	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Fbxo3</i>	<i>Gm24644</i>	rs27378144	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Tgs1</i>	<i>Gm22541</i>	rs27697513	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Mms22l</i>	<i>uc.195</i>	rs27769969	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Mpped2</i>	<i>Gm22813</i>	rs28330308	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Prpf38b</i>	<i>uc.36</i>	rs29685768	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Prmt2</i>	<i>mmu-mir-678</i>	rs30049312	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>1700007G11Rik</i>	<i>Gm24279</i>	rs31911362	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>2810403A07Rik</i>	<i>Gm25945</i>	rs32897087	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Clcn5</i>	<i>mmu-mir-501</i>	rs33335695	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Iars</i>	<i>Gm25394</i>	rs36303967	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Mgat5</i>	<i>Gm23734</i>	rs36379733	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Brsk2</i>	<i>mmu-mir-3104</i>	rs38006026	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Cpsf3</i>	<i>Gm25821</i>	rs45756758	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Anxa2</i>	<i>mmu-mir-3109</i>	rs46515841	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Nudt4</i>	<i>mmu-mir-3058</i>	rs48058754	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Itfg3</i>	<i>Gm23123</i>	rs48128267	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Olf165</i>	<i>Gm25762</i>	rs48427556	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>2010111I01Rik</i>	<i>mmu-mir-23b</i>	rs49196631	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Dgkh</i>	<i>Gm26251</i>	rs49329742	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Acat3</i>	<i>Snora20</i>	rs50667971	15	0,124	0,95	1,446	0,720
<i>Lrp1b</i>	<i>mmu-mir-6336</i>	rs27126190	15	0,124	0,90	1,587	0,714
<i>Taf4b</i>	<i>uc.426</i>	rs31128319	15	0,124	0,90	1,587	0,714
<i>St18</i>	<i>uc.237</i>	rs36307162	15	0,124	0,90	1,587	0,714
<i>Map3k4</i>	<i>Gm24794</i>	rs47133854	13	0,473	0,31	0,557	0,714
<i>Map2</i>	<i>Gm24729</i>	rs51347904	15	0,320	0,48	0,619	0,713
<i>Kif16b</i>	<i>Gm22310</i>	rs27188622	13	0,355	0,66	0,408	0,711
<i>Vps13b</i>	<i>Gm24771</i>	rs46145808	12	0,444	0,48	0,703	0,710
<i>Mcm7</i>	<i>mmu-mir-25</i>	rs49082844	15	0,124	0,84	1,847	0,710
<i>Sf3a3</i>	<i>mmu-mir-697</i>	rs27569440	15	0,231	0,67	0,716	0,702
<i>BC017158</i>	<i>mmu-mir-3103</i>	rs33212236	15	0,320	0,43	0,554	0,700
<i>Lrba</i>	<i>uc.149</i>	rs31283097	15	0,320	0,40	0,571	0,694
<i>Man1c1</i>	<i>mmu-mir-6403</i>	rs28291831	13	0,260	0,78	0,764	0,691
<i>Rock2</i>	<i>Gm22303</i>	rs29154152	13	0,426	0,36	0,303	0,688
<i>Cd74</i>	<i>mmu-mir-5107</i>	rs8255114	15	0,124	0,80	1,375	0,686
<i>Btrc</i>	<i>uc.308</i>	rs47973723	15	0,320	0,38	0,307	0,682
<i>Mertk</i>	<i>Gm23172</i>	rs51671082	10	0,480	0,40	1,334	0,681
<i>Lama2</i>	<i>Gm23353</i>	rs48204878	14	0,133	0,85	1,552	0,681

se nadaljuje

nadaljevanje

Gostiteljski gen	ncRNA	SNP	Število linij	PIC	Delež povezav	Ocena razlik med aleloma	LPI _{max}
<i>Dhx15</i>	<i>uc.141</i>	rs13469695	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Pdss1</i>	<i>Gm25544</i>	rs27126836	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Lrsam1</i>	<i>Snora65</i>	rs27171152	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Med22</i>	<i>Gm22879</i>	rs27185445	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Mapkap1</i>	<i>uc.270</i>	rs27192054	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Zdhhc15</i>	<i>Gm22430</i>	rs29078780	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Htr2c</i>	<i>mmu-mir-764</i>	rs29276186	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Eef1b2</i>	<i>Snora41</i>	rs30000017	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>St3gal2</i>	<i>Gm26132</i>	rs31273843	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Acpt</i>	<i>Gm26247</i>	rs32347966	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Tshz3</i>	<i>uc.452</i>	rs32568344	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Lmln</i>	<i>mmu-mir-1947</i>	rs32577509	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Ccar1</i>	<i>uc.285</i>	rs37005101	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Tcf12</i>	<i>uc.388</i>	rs37191576	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Pole</i>	<i>Gm26277</i>	rs47248803	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Cep55</i>	<i>Gm23300</i>	rs47982488	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Bnc1</i>	<i>Gm25907</i>	rs49135114	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Slmo1</i>	<i>Gm24900</i>	rs49323706	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Gsk3b</i>	<i>Gm25617</i>	rs50788165	15	0,124	0,82	0,942	0,677
<i>Ttl10</i>	<i>mmu-mir-429</i>	rs33219725	15	0,231	0,54	0,684	0,674
<i>Serpine3</i>	<i>Gm25162</i>	rs31279090	15	0,231	0,44	0,936	0,661
<i>Psmb5</i>	<i>mmu-mir-686</i>	rs8244167	15	0,231	0,44	0,936	0,661
<i>Rnf144a</i>	<i>mmu-mir-6538</i>	rs48713816	15	0,231	0,46	0,736	0,659
<i>Skap2</i>	<i>uc.211</i>	rs29806600	12	0,278	0,48	1,491	0,635
<i>Cdhr4</i>	<i>Gm24944</i>	rs33278878	12	0,278	0,53	1,049	0,631
<i>Ccdc7</i>	<i>Gm22545</i>	rs32856583	15	0,231	0,28	0,922	0,627
<i>Zfpm2</i>	<i>uc.245</i>	rs3707261	15	0,231	0,28	0,922	0,627
<i>Ext1</i>	<i>uc.246</i>	rs46759302	15	0,231	0,28	0,922	0,627
<i>2210408I21Rik</i>	<i>uc.171</i>	rs30279798	15	0,124	0,60	0,771	0,625
<i>Eif5</i>	<i>Snora28</i>	rs29211536	15	0,124	0,50	0,766	0,604
<i>Odc1</i>	<i>Gm22748</i>	rs3720247	15	0,124	0,35	1,078	0,582
<i>Adam3</i>	<i>Gm26208</i>	rs51194685	15	0,124	0,35	1,078	0,582
<i>Lrrc4c</i>	<i>Gm22957</i>	rs51082624	15	0,124	0,26	0,636	0,549
<i>D19Ertd737e</i>	<i>uc.311</i>	rs48287107	15	0,124	0,28	0,428	0,547
<i>Zbtb20</i>	<i>uc.121</i>	rs48914854	15	0,124	0,24	0,500	0,541

PIC: informacijska vrednost polimorfizma (angl. *polymorphism information content*); LPI: indeks za razvrščanje lokusov po prioriteti (angl. *locus prioritization index*)

Priloga U: Rezultat genotipizacije bikov lisaste pasme

Oznaka vzorcev	rs41761412	rs41761413	rs41761414	rs41761415
Očetje				
O1	GA	CT	GA	GT
O2	GA	CC	GA	GT
O3	GG	TT	GG	GG
O4	GA	CT	GA	GT
O5	AA	CC	AA	TT
O6	TG	CC	GG	GG
O7	AA	CC	AA	TT
O8	GA	CC	GA	GT
O9	TG	CT	GG	GG
O10	AA	CC	AA	TT
O11	AA	CC	AA	TT
O12	GA	CC	GA	GT
O13	GA	CT	GA	GT
O14	GG	CT	GG	GG
O15	TG	CC	GG	GT
O16	GG	TT	GG	GG
O17	GG	CT	GG	GG
O18	GG	CC	GG	GG
O19	GA	CT	GA	GT
O20	GA	CT	GA	GT
O21	GA	CT	GA	GT
O22	GG	CT	GG	GG
O23	AA	CC	AA	TT
O24	TG	CT	GG	GG
O25	AA	CC	AA	TT
O26	GG	CT	GG	GG
O27	TA	CT	GG	GG
Potomci				
P1	GA	TT	GG	GG
P2	TG	CT	GG	GG
P3	GG	CT	GG	GG
P4	GG	CT	GG	GG
P5	GG	TT	GG	GG
P6	GG	TT	GG	GG
P7	GA	CT	GA	GT
P8	TA	CC	GA	GT
P9	TA	CC	GA	GT
P10	GA	CT	GA	GT
P11	GA	CC	GA	GT
P12	GG	TT	GG	GG
P13	AA	CC	AA	TT
P14	GG	CT	GG	GG
P15	GT	CC	GG	GG
P16	AG	CT	GA	GT
P17	GA	CC	GA	GT
P18	GG	CT	GG	GG
P19	GG	CT	GG	GG

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka vzorcev	rs41761412	rs41761413	rs41761414	rs41761415
P20	GA	CT	GA	GT
P21	GA	CC	GA	GT
P22	GA	CC	GA	GT
P23	TG	CC	GG	GG
P24	GG	TT	GG	GG
P25	GA	CT	GA	GT
P26	GG	CT	GG	GG
P27	TT	CC	GA	GT
P28	TA	CC	GA	GT
P29	GA	CT	GA	GT
P30	GG	TT	GG	GG
P31	GG	TT	GG	GG
P32	GA	CC	GA	GT
P33	AA	CC	AA	TT
P34	AA	CC	AA	TT
P35	GG	CT	GG	GG
P36	GA	CT	GA	GT
P37	AA	CC	AA	TT
P38	TG	CC	GG	GG
P39	AA	CC	AA	TT
P40	TA	CC	GG	GG
P41	GA	CT	GA	GT
P42	GG	CT	GG	TT
P43	TG	CT	GG	GG
P44	TG	CC	GG	GG
P45	GG	TT	GG	GG
P46	GA	CT	GA	GT
P47	GG	CT	GG	GG
P48	TA	CC	GA	GT
P49	TT	CC	GA	GT
P50	TA	CC	GA	GT
P51	GG	CT	GG	GG
P52	GA	CT	GA	GT
P53	GA	CC	GA	GT
P54	GA	CT	GA	GT
P55	GA	CC	GA	GT
P56	TT	CC	GG	GG
P57	GG	CT	GG	GG
P58	TA	CC	GA	GT
P59	TG	CC	GG	GG
P60	TG	CC	GG	GG
P61	GG	CT	GG	GG
P62	AA	CC	AA	TT
P63	TG	CT	GG	GG
P64	GG	TT	GG	GG
P65	AA	CC	AA	TT
P66	GG	CT	GG	GG
P67	GA	CC	GA	GT
P68	GA	CT	GA	GT
P69	GG	CT	GG	GG
P70	GG	CC	GG	GG

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka vzorcev	rs41761412	rs41761413	rs41761414	rs41761415
P71	GG	CT	GG	GG
P72	AA	CC	AA	TT
P73	GA	CT	GA	GT
P74	TG	CT	GA	GT
P75	GA	CC	GA	GT
P76	GA	CT	GA	GT
P77	GA	CT	GA	GT
P78	GA	CC	GA	GT
P79	GA	CT	GA	GT
P80	AA	CC	AA	TT
P81	GA	CC	GA	GT
P82	AA	CC	AA	TT
P83	AA	CC	AA	TT
P84	TA	CC	GA	GT
P85	GA	CC	GA	GT
P86	GA	CT	GA	GT
P87	AA	CC	AA	TT
P88	TG	CC	GG	GG
P89	GA	CC	GA	GT
P90	GA	CT	GA	GT
P91	GA	CT	GA	GT
P92	GA	CT	GA	GT
P93	GA	CT	GA	GT
P94	TG	CT	GG	GG
P95	GG	TT	GG	GG
P96	GG	TT	GG	GG
P97	GA	CT	GA	GT
P98	GA	CT	GA	GT
P99	TA	CC	GA	GT
P100	GA	CT	GA	GT
P101	GG	TT	GG	GG
P102	GA	CC	GA	GT
P103	GA	CC	GA	GT
P104	AA	CC	AA	TT
P105	GA	CC	GA	GT
P106	GA	CC	GA	GT
P107	GG	TT	GG	GG
P108	GG	CT	GG	GG
P109	GA	CT	GA	CT
P110	GG	CT	GG	GG
P111	GA	CT	GA	GT
P112	GA	CT	GA	GT
P113	TA	CC	GA	GT
P114	AA	CC	AA	TT
P115	GA	CC	GA	GT
P116	GA	CC	GA	GT
P117	AA	CT	AA	GT
P118	GG	CT	GG	GG
P119	GA	CT	GA	CT
P120	GG	CT	GG	AG

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka vzorcev	rs41761412	rs41761413	rs41761414	rs41761415
P121	GA	CC	GA	GT
P122	TA	CC	GA	GT
P123	GA	CC	GA	GT
P124	GG	TT	GG	GG
P125	GG	CT	GG	GG
P126	GA	CT	GA	GT
P127	TG	CT	GG	GG
P128	GA	CC	GA	GT
P129	GA	CT	GA	GT
P130	GA	CT	GA	GT
P131	TA	CC	GA	GT
P132	GA	CT	GA	GT
P133	GG	TT	GG	GG
P134	GG	CC	GG	GG
P135	TG	CC	GG	GG
P136	GA	CC	GA	NA
P137	GA	CT	GA	GT
P138	GA	CT	GA	GT
P139	AA	CC	AA	TT
P140	GA	CT	GA	GT
P141	GA	CT	GA	GT
P142	GA	CC	GA	GT
P143	GG	CT	GG	GG
P144	GG	TT	GG	GG
P145	TG	CC	GG	GG
P146	GA	CT	GA	GT
P147	TT	CC	GG	GG
P148	TG	CC	GG	GG
P149	GG	TT	GG	GG
P150	TG	CT	GG	GG
P151	TA	CC	GA	GT
P152	GG	TT	GG	GG
P153	TG	CT	GG	GG
P154	GA	CT	GA	GT
P155	GG	TT	GG	GG
P156	AA	CC	AA	TT
P157	GA	CC	GA	GT
P158	GT	CC	GG	GG

NA: podatek ni na voljo

Priloga V: Matrika korelacijskih koeficijenje med lastnostmi izmerjenimi pri lisastem govedu

	dl	dm	m_zakol	mtp	s_loj	dt	pg	kl	ik	m_pc	m_zc	d_pc	d_zc	mm	ml	_mki	mko	dvtd	dmvtd	dmtm	dml
dl	1,0000	-0,8923	0,1448	-0,0157	0,4377	0,0437	0,0475	-0,3219	-0,0622	-0,1041	0,0838	-0,3628	0,3628	-0,3192	0,9161	-0,0168	-0,2276	-0,5346	-0,1134	-0,6838	-0,9612
dm	-0,8923	1,0000	-0,0614	0,1379	-0,3718	-0,0034	-0,0646	0,4352	0,1842	0,2211	0,0224	0,4091	-0,4092	0,4618	-0,7743	-0,0892	0,0163	0,3746	-0,0414	0,8070	0,8882
m_zakol	0,1448	-0,0614	1,0000	0,8999	-0,0400	0,6683	0,2782	0,0917	0,5497	0,8324	0,8920	0,1090	-0,1090	0,7762	0,4877	0,4956	0,6724	-0,2773	-0,2248	0,0130	-0,1384
mtp	-0,0157	0,1379	0,8999	1,0000	-0,0633	0,6305	0,2612	0,5159	0,6786	0,9553	0,9638	0,2298	-0,2298	0,9358	0,3784	0,5372	0,7086	-0,2165	-0,2672	0,3873	0,0176
s_loj	0,4377	-0,3718	-0,0400	-0,0633	1,0000	-0,1001	0,1121	-0,0711	-0,1003	-0,1548	0,0175	-0,3454	0,3454	-0,1892	0,3770	-0,0457	-0,1917	-0,1023	0,1029	-0,2526	-0,4006
dt	0,0437	-0,0034	0,6683	0,6305	-0,1001	1,0000	0,3776	0,1269	0,0717	0,5877	0,6253	0,0798	-0,0797	0,5584	0,2925	0,3297	0,5146	-0,1561	-0,1305	0,0729	-0,0642
pg	0,0475	-0,0646	0,2782	0,2612	0,1121	0,3776	1,0000	0,0525	-0,4752	0,2345	0,2673	0,0045	-0,0045	0,2086	0,1477	0,1466	0,2708	-0,0597	0,0135	-0,0145	-0,0236
kl	-0,3219	0,4352	0,0917	0,5159	-0,0711	0,1269	0,0525	1,0000	0,4684	0,5356	0,4406	0,3065	-0,3065	0,6026	-0,0980	0,2576	0,2902	0,0587	-0,1615	0,8601	0,3160
ik	-0,0622	0,1842	0,5497	0,6786	-0,1003	0,0717	-0,4752	0,4684	1,0000	0,6630	0,6370	0,2169	-0,2170	0,6667	0,2070	0,3598	0,4109	-0,1433	-0,2511	0,3912	0,0554
m_pc	-0,1041	0,2211	0,8324	0,9553	-0,1548	0,5877	0,2345	0,5356	0,6630	1,0000	0,8700	0,4863	-0,4863	0,9376	0,2865	0,5066	0,6976	-0,2818	-0,4300	0,4721	0,0986
m_zc	0,0838	0,0224	0,8920	0,9638	0,0175	0,6253	0,2673	0,4406	0,6370	0,8700	1,0000	-0,0056	0,0056	0,8756	0,4615	0,5843	0,6959	-0,1680	-0,1270	0,3030	-0,0773
d_pc	-0,3628	0,4091	0,1090	0,2298	-0,3454	0,0798	0,0045	0,3065	0,2169	0,4863	-0,0056	1,0000	-1,0000	0,3502	-0,2371	0,0074	0,1834	-0,2665	-0,6445	0,4221	0,3424
d_zc	0,3628	-0,4092	-0,1090	-0,2298	0,3454	-0,0797	-0,0045	-0,3065	-0,2170	-0,4863	0,0056	-1,0000	1,0000	-0,3502	0,2372	-0,0074	-0,1833	0,2665	0,6445	-0,4222	-0,3425
mm	-0,3192	0,4618	0,7762	0,9358	-0,1892	0,5584	0,2086	0,6026	0,6667	0,9376	0,8756	0,3502	-0,3502	1,0000	0,0758	0,4689	0,6474	-0,0717	-0,2621	0,6392	0,3178
ml	0,9161	-0,7743	0,4877	0,3784	0,3770	0,2925	0,1477	-0,0980	0,2070	0,2865	0,4615	-0,2371	0,2372	0,0758	1,0000	0,2162	0,0777	-0,5822	-0,2158	-0,4728	-0,8783
_mki	-0,0168	-0,0892	0,4956	0,5372	-0,0457	0,3297	0,1466	0,2576	0,3598	0,5066	0,5843	0,0074	-0,0074	0,4689	0,2162	1,0000	0,4996	-0,0591	-0,0064	0,1522	0,0096
mko	-0,2276	0,0163	0,6724	0,7086	-0,1917	0,5146	0,2708	0,2902	0,4109	0,6976	0,6959	0,1834	-0,1833	0,6474	0,0777	0,4996	1,0000	0,0680	-0,0301	0,2077	0,1704
dvtd	-0,5346	0,3746	-0,2773	-0,2165	-0,1023	-0,1561	-0,0597	0,0587	-0,1433	-0,2818	-0,1680	-0,2665	0,2665	-0,0717	-0,5822	-0,0591	0,0680	1,0000	0,7785	0,2289	0,5331
dmvtd	-0,1134	-0,0414	-0,2248	-0,2672	0,1029	-0,1305	0,0135	-0,1615	-0,2511	-0,4300	-0,1270	-0,6445	0,6445	-0,2621	-0,2158	-0,0064	-0,0301	0,7785	1,0000	-0,1378	0,1349
dmtm	-0,6838	0,8070	0,0130	0,3873	-0,2526	0,0729	-0,0145	0,8601	0,3912	0,4721	0,3030	0,4221	-0,4222	0,6392	-0,4728	0,1522	0,2077	0,2289	-0,1378	1,0000	0,6784
dml	-0,9612	0,8882	-0,1384	0,0176	-0,4006	-0,0642	-0,0236	0,3160	0,0554	0,0986	-0,0773	0,3424	-0,3425	0,3178	-0,8783	0,0096	0,1704	0,5331	0,1349	0,6784	1,0000

_mki: masa kit, d_pc: delež prednje četrti, d_zc: delež zadnje četrti, dl: delež loja, dm: delež mesa, dml: razmerje med mesom in lojem, dmtm: masa manjvrednih telesnih delov, dmvtd: masa večvrednih telesnih delov, dt: dolžina trupa, dvtd: delež večvrednih telesnih delov, ik: indeks konformacije, kl: klavnost, m_pc: masa prednje četrti, m_zakol: masa ob zakolu, m_zc: masa zadnje četrti, mko: masa kosti, ml: masa loja, mm: masa mesa, mtp: masa toplih polovic, pg: prsna globina, s_loj: subjektivna ocena loja

Priloga Z: Matrika lastnih vektorjev

	Prin1	Prin2	Prin3	Prin4	Prin5	Prin6	Prin7	Prin8	Prin9	Prin10	Prin11	Prin12	Prin13	Prin14	Prin15	Prin16	Prin17	Prin18	Prin19	Prin20	Prin21
dl	-0,10584	0,39533	-0,10794	0,09250	0,08747	-0,00151	-0,11141	0,15767	0,01245	0,20492	-0,02690	0,21589	0,19988	-0,21827	-0,36274	0,29407	0,36967	0,48388	-0,00194	0,00021	0,03799
dm	0,13911	-0,37071	0,02440	0,01006	0,08973	-0,31597	0,01272	-0,26027	-0,04532	0,16028	-0,00909	-0,21541	-0,11303	0,19769	0,13025	-0,18733	0,20588	0,64104	-0,00196	0,00110	-0,18778
m_zakol	0,28302	0,21184	0,08563	-0,09666	-0,20682	-0,21287	0,18971	-0,10622	-0,13977	0,16198	-0,00572	0,08867	-0,23375	0,56194	-0,29936	0,42022	-0,16921	-0,06326	-0,00092	-0,00003	-0,00863
mtp	0,34354	0,12779	0,07854	0,02979	0,03022	-0,09579	0,02771	0,03853	-0,08002	0,06659	0,02446	0,12712	-0,30037	-0,10571	-0,27168	-0,57557	0,14715	-0,04293	0,00375	0,00013	0,53727
s_loj	-0,08857	0,18543	0,07386	0,14304	0,53035	0,00759	0,73072	-0,18482	0,26085	-0,11410	0,02931	-0,02182	-0,00046	0,00273	-0,00358	0,00196	0,00066	0,00104	0,00017	-0,00002	-0,00183
dt	0,21134	0,13915	0,10821	-0,35268	-0,04179	-0,30955	-0,20564	-0,01914	0,74943	-0,11034	0,03465	0,07597	-0,07621	-0,11452	0,19485	0,12491	-0,00606	0,03400	-0,00083	-0,00015	0,07197
pg	0,07199	0,08530	0,11402	-0,60393	0,41410	0,11265	-0,02585	0,01907	-0,43350	0,11924	-0,02811	0,03090	-0,15882	-0,17313	0,32250	0,20240	-0,02127	0,05792	-0,00184	-0,00004	0,12940
kl	0,22696	-0,12584	0,01472	0,25717	0,47419	0,20458	-0,31960	0,29358	0,09564	-0,14974	0,05970	0,23432	-0,40523	0,14258	-0,10972	0,04619	-0,03358	-0,01366	-0,00042	-0,00004	-0,34812
ik	0,24609	0,03421	-0,02876	0,53346	-0,21423	-0,05787	0,13196	0,04226	-0,10828	0,01887	0,04569	0,09395	-0,23485	-0,28254	0,52088	0,32480	-0,02880	0,09712	-0,00241	-0,00006	0,19838
m_pc	0,35712	0,07366	-0,05372	-0,01585	0,00876	-0,00752	0,07063	0,07695	-0,02669	0,11177	0,01028	-0,09707	0,21508	-0,31242	-0,16691	-0,11885	-0,61724	0,19935	-0,42405	-0,01886	-0,20846
m_zc	0,31135	0,17668	0,18296	0,06401	0,03729	-0,09520	-0,03282	-0,03289	-0,10903	0,00272	-0,05522	-0,07165	0,25408	0,06353	0,16049	-0,04081	0,53036	-0,33887	-0,49109	-0,02119	-0,26045
d_pc	0,17339	-0,16469	-0,43111	-0,14588	-0,05026	0,17315	0,20576	0,20620	0,13877	0,24217	0,09029	-0,02110	0,00001	0,05007	0,04077	0,01391	0,15158	-0,06903	-0,02967	0,70628	-0,00238
d_zc	-0,17339	0,16473	0,43111	0,14580	0,05024	-0,17306	-0,20574	-0,20607	-0,13861	-0,24242	-0,09031	0,02125	0,00000	-0,05048	-0,04094	-0,01332	-0,15060	0,06674	-0,02896	0,70672	0,00250
mm	0,35636	-0,01265	0,07557	0,03038	0,05520	-0,16927	0,01920	-0,07173	-0,08641	0,10494	-0,02249	-0,17244	0,16017	-0,33287	-0,15544	0,04548	0,05153	-0,22395	0,69129	0,02824	-0,29343
ml	0,03952	0,41607	-0,07055	0,09313	0,08876	-0,01482	-0,09359	0,14760	-0,00618	0,21511	-0,03400	0,21906	0,31277	0,39975	0,42124	-0,34277	-0,19529	0,08852	0,27596	0,01204	-0,05240
_mki	0,19501	0,10473	0,17025	0,02933	-0,12025	0,71786	-0,11793	-0,53677	0,18657	0,18877	-0,06025	-0,03932	-0,03450	0,01596	0,00616	-0,00324	0,02844	0,09691	0,04500	0,00203	0,00279
mko	0,26315	0,05279	0,17939	-0,16004	-0,23917	0,26441	0,21577	0,34308	-0,08160	-0,62206	0,02888	-0,11738	0,13724	0,12186	0,00884	-0,02114	0,11065	0,32071	0,14557	0,00638	-0,00508
dvt	-0,05938	-0,23788	0,42911	0,01277	-0,06944	0,06290	0,17495	0,36263	0,14811	0,31705	-0,67479	0,08005	-0,00791	-0,01633	0,00453	0,00433	-0,00829	0,00061	-0,00045	-0,00004	0,00736
dmvtd	-0,13562	-0,05330	0,51516	0,02843	-0,05329	0,06391	0,04516	0,27325	0,06820	0,35251	0,69161	-0,14550	0,01911	0,01161	0,00152	-0,00016	0,00467	0,00216	0,00012	0,00006	-0,00316
dmtm	0,22126	-0,27910	0,01812	0,17189	0,34099	0,00620	-0,21061	0,01539	0,05208	-0,02711	-0,01860	-0,23341	0,45157	0,21865	-0,06005	0,26485	-0,07946	-0,02984	-0,00004	-0,00006	0,53983
dml	0,10132	-0,38962	0,11519	-0,08564	-0,04825	-0,02559	0,12994	-0,20155	-0,06351	-0,06438	0,17455	0,78834	0,30554	-0,04958	-0,01973	0,00370	0,00709	0,00425	0,00170	-0,00001	-0,02082

_mki: masa kit, d_pc: delež prednje četrti, d_zc: delež zadnje četrti, dl: delež loja, dm: delež mesa, dml: razmerje med mesom in lojem, dmtm: masa manjvrednih telesnih delov, dmvtd: masa večvrednih telesnih delov, dt: dolžina trupa, dvtd: delež večvrednih telesnih delov, ik: indeks konformacije, kl: klavnost, m_pc: masa prednje četrti, m_zakol: masa ob zakolu, m_zc: masa zadnje četrti, mko: masa kosti, ml: masa loja, mm: masa mesa, mtp: masa toplih polovic, pg: prsna globina, s_loj: subjektivna ocena loja