

**Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytutu Biologii**

Magdalena Czajkowska

**Polimorfizm genów szlaku przemian kwasów
tłuszczowych a profil lipidowy błon komórkowych
i tempo metabolizmu podstawowego u myszy
laboratoryjnej**

Rozprawa doktorska

Wykonana w Instytucie Biologii na Wydziale
Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku
Promotor rozprawy: dr hab. Mirosław Ratkiewicz prof. UwB

Białystok rok 2015

SPIS TREŚCI

PODZIĘKOWANIA	7
STRESZCZENIE	8
SUMMARY	14
WSTĘP	19
Genetyczne uwarunkowanie cech	19
Tempo metabolizmu podstawowego (BMR)	20
Syndrom metaboliczny	22
Teoria metronomu błonowego	23
<i>Struktura, skład oraz właściwości fizykochemiczne błon komórkowych</i>	23
<i>Założenia teorii metronomu błonowego</i>	24
<i>Teoria metronomu błonowego a wewnątrzgatunkowa zmienność BMR</i>	26
<i>Ograniczenia ewolucyjne</i>	27
Metabolizm kwasów tłuszczowych	29
<i>Desaturazy kwasów tłuszczowych</i>	30
<i>Stearoilo-CoA desaturazy (SCD)</i>	31
<i>Desaturazy kwasów tłuszczowych (FADS)</i>	32
<i>Elongazy</i>	32
<i>Białko wiążące sekwencję odpowiedzi na sterole (SREBP-1)</i>	33
Eksperymenty selekcyjne w badaniach zmienności organizmów	34
Wewnątrzgatunkowa weryfikacja teorii metronomu błonowego na poziomie molekularnym	35
Hipotezy badawcze	38
Cele pracy	39
MATERIAŁ I METODY	41
Obiekt badań	41
<i>Eksperyment selekcyjny</i>	42
<i>Materiał do badań i liczebność prób</i>	42
Analizy fizjologiczne	43
<i>Pomiar tempa metabolizmu podstawowego (BMR)</i>	43
Pobieranie materiału do badań	44

Analizy genetyczne	45
<i>Izolacja RNA</i>	45
<i>Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)</i>	46
<i>Izolacja DNA</i>	46
<i>Wybór genów do analiz</i>	47
<i>Geny kodujące desaturazy kwasów tłuszczowych</i>	47
<i>Scd1</i>	47
<i>Fads1</i>	48
<i>Fads2</i>	48
<i>Geny kodujące elongazy kwasów tłuszczowych</i>	49
<i>Elovl1</i>	49
<i>Elovl2</i>	50
<i>Elovl3</i>	50
<i>Elovl5</i>	51
<i>Elovl6</i>	51
<i>Gen kodujący białko regulatorowe SREBP-1c</i>	52
<i>Srebf1</i>	52
<i>Projektowanie starterów do reakcji PCR</i>	53
<i>Amplifikacja analizowanych genów metodą PCR</i>	53
<i>Oczyszczanie produktów reakcji PCR przed sekwencjonowaniem</i>	54
<i>Reakcja sekwencjonowania DNA</i>	55
<i>Usuwanie nieprzyłączonych dideoksynukleotydów (ddNTP) po reakcji sekwencjonowania</i>	56
<i>Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji sekwencjonowania DNA</i>	56
<i>Identyfikacja polimorfizmów w genach metabolizmu lipidów</i>	56
<i>Analiza poziomu ekspresji badanych genów</i>	57
<i>Analiza loci mikrosatelitarnego DNA</i>	58
Analizy biochemiczne	60
<i>Oznaczenie profilu lipidowego hepatocytów</i>	60
<i>Fracja lipidów całkowitych (TL)</i>	60
<i>Fracja fosfolipidów (PL)</i>	61
<i>Wyznaczenie aktywności pompy sodowo-potasowej (Na⁺/K⁺-ATPazy)</i>	62
Analizy statystyczne	63

<i>Analiza różnic w tempie metabolizmu podstawowego (BMR)</i>	63
<i>Zróźnicowanie genetyczne między liniami w genach polimorficznych</i>	63
<i>Analiza różnic w tempie metabolizmu podstawowego (BMR) między myszami posiadającymi odmienne genotypy</i>	64
<i>Analiza loci mikrosatelitarnego DNA</i>	64
<i>Wyznaczenia współczynnika inbredu (F_{IS})</i>	65
<i>Oszacowanie poziomu dryfu genetycznego</i>	65
<i>Identyfikacja loci poddanych działaniu selekcji</i>	66
<i>Analiza poziomu ekspresji badanych genów</i>	67
<i>Określenie różnic w profilu lipidowym</i>	67
<i>Określenie aktywności enzymów</i>	68
<i>Aktywność $\Delta 9$-desaturazy (SCD-1c)</i>	68
<i>Aktywność $\Delta 6$-desaturazy (D6D)</i>	69
<i>Wyznaczenie indeksu saturacji (IS) błon komórkowych</i>	70
<i>Wyznaczenie indeksu nienasycenia (IU) błon komórkowych</i>	70
<i>Wyznaczenie indeksu peroksydacji (IP) błon komórkowych</i>	71
<i>Różnice w aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+-ATPazy)</i>	71
<i>Analiza regresji</i>	71
WYNIKI	73
Analizy fizjologiczne	73
<i>Analiza różnic w tempie metabolizmu podstawowego (BMR)</i>	73
Analizy genetyczne	75
<i>Wyniki sekwencjonowania genów kodujących enzymy metabolizmu kwasów tłuszczowych</i>	75
<i>Analiza polimorfizmów sekwencji genów kodujących enzymy metabolizmu kwasów tłuszczowych</i>	76
<i>Polimorfizm w genie Scd1</i>	76
<i>Zróźnicowanie genetyczne w genie Scd1</i>	77
<i>Polimorfizm w genie Scd1 a zróźnicowanie w tempie metabolizmu podstawowego (BMR)</i>	78
<i>Polimorfizm w genie Fads2</i>	79
<i>Zróźnicowanie genetyczne w genie Fads2</i>	80
<i>Polimorfizm w genie Fads2 a zróźnicowanie w tempie</i>	

<i>metabolizmu podstawowego (BMR)</i>	82
<i>Zmienność genetyczna w 10 loci mikrosatelitarnego DNA</i>	82
<i>Wyznaczenie współczynnika inbredu (F_{IS})</i>	84
<i>Oszacowanie poziomu dryfu genetycznego</i>	84
<i>Identyfikacja loci poddanych działaniu selekcji</i>	85
<i>Analiza różnic w ekspresji genów szlaku metabolicznego kwasów</i> <i> tłuszczowych</i>	85
Analizy biochemiczne	86
<i>Analiza różnic w profilu lipidowym</i>	86
<i>Analiza różnic w aktywności enzymów</i>	89
<i>Aktywność $\Delta 9$-desaturazy (SCD-1c)</i>	89
<i>Aktywność $\Delta 6$-desaturazy (D6D)</i>	90
<i>Analiza różnic w indeksie saturacji (IS) i peroksydacji (IP) błon</i> <i> komórkowych</i>	91
<i>Indeks saturacji (IS) błon komórkowych</i>	91
<i>Indeks nienasycenia (IU) błon komórkowych</i>	92
<i>Indeks peroksydacji (IP) błon komórkowych</i>	92
<i>Różnice w aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+-ATPazy)</i>	93
<i>Wyniki analiz regresji</i>	93
DYSKUSJA	96
<i>Rola i miejsce teorii metronomu błonowego w badaniach biologicznych</i>	96
<i>Kontrowersje wokół teorii metronomu błonowego</i>	98
<i>Znaczenie eksperymentów selekcyjnych w badaniach zmienności na poziomie</i> <i> wewnątrzgatunkowym</i>	99
<i>Podejścia stosowane w genetyce cech ilościowych</i>	103
<i>Kandydaci na geny tempa metabolizmu podstawowego (BMR)</i>	104
<i>Rola kwasów tłuszczowych w regulacji tempa metabolizmu podstawowego</i> <i> (BMR)</i>	105
<i>Wpływ pojedynczego genu na zmienność tempa metabolizmu podstawowego</i> <i> (BMR)</i>	105
<i>Zmienność tempa metabolizmu podstawowego (BMR) wywołana sztuczną</i> <i> selekcją</i>	106
<i>Zmienność genetyczna myszy a selekcja prowadzona na niskie i wysokie</i>	

tempo metabolizmu podstawowego (BMR)	107
<i>Zmienność genetyczna w neutralnych dla doboru loci mikrosatelitarnego</i>	
<i>DNA</i>	107
<i>Zmienność genetyczna – loci poddane działaniu selekcji</i>	109
Weryfikacja teorii metronomu błonowego na poziomie wewnątrzgatunkowym..	113
Podsumowanie	120
LITERAURA	123
TABELE	136
WYKRESY	155
RYCINY	178
SUPLEMENT	185

PODZIĘKOWANIA

Chciałabym serdecznie podziękować mojemu promotorowi dr hab. Mirosławowi Ratkiewiczowi prof. UwB za cierpliwość, życzliwość i merytoryczne wsparcie na każdym etapie powstawania niniejszej rozprawy doktorskiej. Szczególnie dziękuję za wsparcie w trudnych momentach podczas realizacji projektu, interpretacji wyników oraz pisania rozprawy, a także za ciągłe inspiracje i nieustającą motywację.

Szczególne podziękowania kieruję również do wszystkich pracowników Zakładu Zoologii Kręgowców Instytutu Biologii UwB. Gdyby nie wsparcie takich życzliwych ludzi, z którymi mam szczęście współpracować na co dzień, jak Magda Świsłocka, Maciek Matosiuk, Norbert Duda, Anetta Borkowska, Marta Czernik, Asia Supruniuk i Piotr Rode, powstanie niniejszej rozprawy doktorskiej byłoby praktycznie niemożliwe.

Pragnę podziękować również wszystkim osobom, z którymi dane mi było współpracować w trakcie badań laboratoryjnych: Panu prof. Markowi Konarzewskiemu oraz wszystkim pracownikom Zakładu Ekologii Zwierząt IB za możliwość wykorzystania eksperymentu selekcyjnego prowadzonego w tym Zakładzie, panu dr Pawłowi Dobrzyniowi z Pracowni Molekularnej Biochemii Medycznej Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. N. Nenckiego PAN w Warszawie za pomoc w oznaczeniach kwasów tłuszczowych, Panu dr hab. Wiesławowi Babikowi z Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego za wprowadzenie mnie w tajniki pracy z RNA, Panu prof. dr hab. Sławomirowi Strumille, dr hab. Adamowi Tylickiemu oraz Magdzie Siemieniuk i Uli Czyżewskiej z Zakładu Cytobiochemii IB za pomoc w oznaczeniach kwasów tłuszczowych, Pani dr hab. Izabeli Świącickiej oraz Markowi Bartoszewiczowi za możliwość przeprowadzenia analiz real-time PCR w Zakładzie Mikrobiologii IB, a także prof. dr hab. Marii Zamarajewej z Zakładu Biofizyki za możliwość wykonania pomiarów aktywności pompy sodowo-potasowej.

Niniejsza rozprawa doktorska była finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N304 335639 oraz z projektu „Stypendia dla doktorantów województwa podlaskiego”, współfinansowanego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 8.2 Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji, ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz środków budżetu Województwa Podlaskiego.

STRESZCZENIE

Tempo metabolizmu podstawowego (BMR) jest cechą ilościową, warunkowaną przez wiele genów. BMR to cecha zmienna zarówno na poziomie międzygatunkowym, jak i wewnątrzgatunkowym. W 1999 roku Hulbert i Else, opierając się na licznych badaniach porównawczych zmiennocieplnych i stałociepnych gatunków zwierząt o różnej masie ciała, zaproponowali mechanizm tłumaczący w prosty sposób obserwowaną zmienność BMR na poziomie międzygatunkowym. Tak powstała teoria metronomu błonowego (ang. *membrane pacemaker theory of metabolism*, Hulbert i Else 1999), zgodnie z którą tempo metabolizmu podstawowego (BMR) zależy od składu lipidowego błon komórkowych. Zakłada ona, że zasadniczą rolę w kształtowaniu BMR odgrywa tzw. „indeks saturacji” (IS, ang. *saturation index*) membran biologicznych, wyrażany jako proporcja jednonienasyconych (MUFA) do wielonienasyconych (PUFA) kwasów tłuszczowych. Błony komórkowe gatunków o relatywnie wyższym BMR posiadają więcej kwasów PUFA, przy równocześnie niskim poziomie MUFA. Fizyczne właściwości kwasów PUFA zwiększają plastyczność membran biologicznych oraz wpływają na aktywność związanych z nimi białek, co prowadzi do wzrostu BMR. Z drugiej strony, wysoka zawartość kwasów PUFA zwiększa podatność błon komórkowych na uszkodzenia wywołane działaniem wolnych rodników, co przyczynia się do przyspieszenia procesów starzenia się organizmów o wysokim BMR (Hulbert, 2005). Jak do tej pory, zależności tych nie udało się stwierdzić na poziomie wewnątrzgatunkowym. Mimo iż teoria metronomu błonowego potwierdza się na poziomie porównań między różnymi gatunkami, czy gromadami kręgowców, to w obrębie gatunków zwierząt stałociepnych jej przewidywania mogą być niespełnione ze względu na mniejszy zakres obserwowanej zmienności, jak i negatywne skutki zwiększania wartości indeksu peroksydacji błon biologicznych.

Głównym celem niniejszych badań było ustalenie, czy obserwowane na poziomie wewnątrzgatunkowym różnice w profilu lipidowym błon komórkowych i tempie metabolizmu podstawowego (BMR) są spowodowane wpływem polimorfizmu w genach, kodujących enzymy szlaku przemian kwasów tłuszczowych oraz sprawdzenie, czy różnice te zmniejszają podatność membran na peroksydację, przy jednoczesnym zachowaniu dużej płynności błon komórkowych, niezbędnej do utrzymania wysokiego tempa metabolizmu podstawowego (BMR).

W ramach realizacji projektu badawczego wykorzystałam 120 samców myszy laboratoryjnych (*Mus musculus*), pochodzących z eksperymentu selekcyjnego na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego (BMR) prowadzonego w Zakładzie Ekologii Zwierząt Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku przez 32 pokolenia (F32). Do analiz wybrałam losowo 61 samców z linii L-BMR i 59 samców z linii H-BMR. W celu kontroli sił działania dryfu genetycznego użyłam 36 myszy z trzech niezależnych linii, nie selekcjonowanych na żadną cechę (US1, US2, US3) przez 16 pokoleń (F16), a także 78 myszy pochodzących z tego samego eksperymentu selekcyjnego, ale należących do pokolenia F22.

Wszystkie, biorące udział w eksperymencie zwierzęta zostały poddane pomiarom tempa metabolizmu podstawowego (BMR). Kolejnym etapem badań było zsekwencjonowanie i identyfikacja miejsc polimorficznych w genach, kodujących enzymy szlaku przemian kwasów tłuszczowych, tj. w sekwencjach genów trzech desaturaz: *Scd1*: $\Delta 9$ -desaturaza, *Fads1*: $\Delta 5$ -desaturaza, *Fads2*: $\Delta 6$ -desaturaza oraz elongaz: *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5*, *Elovl6*, a także genu białka regulatorowego SREBP-1c. Następnie sprawdziłam, czy obserwowane różnice w BMR pomiędzy liniami L-BMR i H-BMR nie wynikają z odmiennego stopnia ekspresji analizowanych genów. W celu wyznaczenia poziomu dryfu genetycznego, który może pojawić się w sztucznie prowadzonych selekcjach i spowodować przypadkowe zmiany częstości alleli, oszacowałam wskaźnik zróżnicowania genetycznego (F_{ST}) pomiędzy wszystkimi analizowanymi liniami myszy (L-BMR i H-BMR w F22 i w F32 oraz US: US1, US2 i US3) w 10 loci mikrosatelitarnego DNA, które stanowiły neutralne tło genetyczne. Dokonałam również jakościowego i ilościowego oznaczenia kwasów tłuszczowych w mysich hepatocytach we frakcji lipidów całkowitych (TL) oraz fosfolipidów (PL). Pozwoliło to na wyznaczenie indeksów aktywności enzymów kodowanych przez geny, w których wykryłam polimorfizmy, jak również na sprawdzenie, czy myszy z różnych linii selekcyjnych posiadają odmienny skład lipidowy błon komórkowych, skutkujący innym stopniem ich nasylenia (indeksem saturacji, IS) oraz nienasylenia (indeksem nienasylenia, IU), a co za tym idzie, zróżnicowaną podatnością na peroksydację (indeks peroksydacji, IP). Wykonałam także pomiary aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) oparte o techniki fluorymetryczne.

Myszy, pochodzące z linii selekcyjnych w pokoleniu F32 różniły się od siebie istotnie statystycznie (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$) pod względem tempa metabolizmu podstawowego (BMR). Samce z linii L-BMR posiadały istotnie niższe wartości

skorygowanego o masę ciała BMR również w stosunku do myszy z każdej z trzech linii kontrolnych (US; jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$). Nie wykazałam natomiast istotnych statystycznie różnic pomiędzy myszami z linii US oraz, co zaskakujące, pomiędzy liniami US a samcami z linii H-BMR.

Uzyskane przeze mnie, kompletne sekwencje odcinków egzonowych badanych genów nie wykazały zmienności w genie *Fads1*, w genach wszystkich elongaz oraz w genie *Srebf1*. Miejsca zmienne wykryłam natomiast w genach pozostałych dwóch desaturaz: *Scd1* oraz *Fads2*, kodujących odpowiednio: $\Delta 9$ -desaturazę (SCD-1c) oraz $\Delta 6$ -desaturazę (D6D). W przypadku genu *Fads2* zidentyfikowałam dwa miejsca zmienne, z czego pierwsze było niesynonimiczne (V/I) i całkowicie sprzężone z drugim, synonimicznym (F/F) SNP. Pozwoliło to mi na wskazanie dwóch alleli w genie *Fads2*, odpowiadających dwóm wariantom białka D6D: allelu G (wariant z waliną) oraz allelu A (wariant z izoleucyną). W przypadku genu *Scd1* również wykryłam dwa miejsca polimorficzne, z czego oba były synonimiczne i całkowicie ze sobą sprzężone. Na podstawie frekwencji alleli i genotypów w genach *Fads2* i *Scd1* pomiędzy myszami z linii L-BMR i H-BMR w F32 oraz pomiędzy trzema nieselekcjonowanymi liniami myszy wyznaczyłam współczynnik zróżnicowania genetycznego F_{ST} (*Fads2*: F32 $F_{ST} = 0,140$, $P < 0,05$; śr.US $F_{ST} = 0,045$, $P > 0,05$; *Scd1*: F32 $F_{ST} = 0,426$, $P < 0,05$; śr.US $F_{ST} = 0,458$, $P < 0,05$). Takie wartości współczynnika F_{ST} wskazują na umiarkowane i istotne zróżnicowanie genetyczne w genie *Fads2* między liniami selekcyjnymi przy jednoczesnym braku zróżnicowania pomiędzy liniami nieselekcjonowanymi oraz na bardzo wysokie i istotne zróżnicowanie w genie *Scd1* między L-BMR a H-BMR, a także pomiędzy liniami nieselekccyjnymi, co z kolei sugeruje, iż obserwowana zmienność w genie *Scd1* może być spowodowana przede wszystkim działaniem dryfu genetycznego, a nie wpływem selekcji.

Nie wykazałam różnic w ekspresji wszystkich badanych genów (*Scd1*, *Fads1*, *Fads2*, *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5*, *Elovl6* oraz *Srebf1*) pomiędzy myszami z linii selekcyjnych (L-BMR i H-BMR), a także w porównaniach tych linii z trzema liniami nieselekccyjnymi, podobnie jak w porównaniach osobników posiadających różne warianty alleli w genach *Scd1* oraz *Fads2*.

Myszy z linii selekcyjnych, posiadające różne genotypy w genie *Fads2*, różniły się między sobą pod względem tempa metabolizmu podstawowego (BMR). Homozygoty GG posiadały istotnie statystycznie wyższe BMR w stosunku do homozygot AA (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$), jak i heterozygot AG (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,01$). Nie wykazałam natomiast istotnych statystycznie różnic w BMR pomiędzy

zwierzętami posiadającymi allel A (o genotypie AA lub AG; $P = 0,70$). Podobnie, myszy posiadające różne allele w genie *Scd1* charakteryzowały się odmiennym tempem metabolizmu podstawowego (BMR). Homozygoty TT posiadały istotnie statystycznie niższe BMR w porównaniu do homozygot AA i heterozygot AT (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,001$).

Wartość współczynnika F_{ST} pomiędzy liniami selekcyjnymi L-BMR i H-BMR w pokoleniu F22 wskazuje na umiarkowane i istotne statystycznie zróżnicowanie genetyczne ($F_{ST} = 0,086$, $P < 0,001$) w 10 loci mikrosatelitarnego DNA, podczas gdy 10 generacji później (F32) wartość współczynnika F_{ST} wzrosła do 0,224 ($P < 0,001$). Średnia wartość F_{ST} oszacowana dla myszy z linii nioselekcjonowanych wyniosła 0,153 ($P < 0,001$). Analiza wartości F_{ST} w genie *Fads2* oraz w 10 loci mikrosatelitarnego DNA pomiędzy liniami L-BMR i H-BMR przy użyciu programu LOSITAN pokazała, że zróżnicowanie genetyczne pomiędzy liniami jest istotnie większe w locus *Fads2* niż w przypadku każdego z 10 loci mikrosatelitarnych DNA, co sugeruje, że locus to może być pod wpływem działania selekcji. Analogiczna analiza przeprowadzona dla genu *Scd1* także wskazała, że gen ten może być kandydatem na selekcję. Równocześnie jednak test na loci poddane działaniu selekcji w liniach nioselekcyjnych (US) ponownie wskazał gen *Scd1*, jako locus, na które działa dobór, co może sugerować, że pozytywny wynik testu przeprowadzonego w liniach selekcyjnych może być w tym przypadku błędny.

Myszy z linii L-BMR posiadały istotnie wyższą wartość indeksu aktywności D6D (IxA D6D) w stosunku do myszy z linii H-BMR ($P < 0,05$). Istotnie wyższymi wartościami IxA D6D charakteryzowały się również heterozygoty AG w stosunku do homozygot GG w genie *Fads2*. Myszy z linii L-BMR posiadały również istotnie wyższą wartość indeksu aktywności $\Delta 9$ -desaturazy (IxA SCD-1c) w porównaniu do myszy z linii H-BMR, podobnie jak homozygoty TT w porównaniu do homozygot AA oraz heterozygot AT ($P < 0,05$). Natomiast pomiary aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) nie wykazały istotnych statystycznie różnic zarówno między liniami L-BMR i H-BMR, jak i pomiędzy myszami, posiadającymi różne genotypy w genach *Scd1*, jak i *Fads2*.

Myszy z linii L-BMR posiadały istotnie niższą wartość IS w stosunku do myszy z linii H-BMR ($P < 0,001$), a jednocześnie nie różniły się wartościami indeksów nienasyceń (IU) oraz peroksydacji (IP). Natomiast w porównaniach pomiędzy myszami, posiadającymi różne genotypy w genie *Fads2* nie udało mi się wskazać istotnych

statystycznie różnić zarówno w IS, IU jak i w IP. Jedyne różnice wykazałam w wartości IS pomiędzy heterozygotami AT a homozygotami TT w genie *Scd1* ($P < 0,05$).

Analiza regresji wykazała istotną statystycznie korelację pomiędzy tempem metabolizmu podstawowego (BMR) w liniach myszy selekcionowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego przez 32 pokolenia (F32) a indeksami aktywności $\Delta 9$ -desaturazy oraz $\Delta 6$ -desaturazy. Tempo metabolizmu podstawowego (BMR) dodatkowo korelowało również z indeksem saturacji (IS). Natomiast brak było takich zależności pomiędzy BMR a indeksem nienasylenia (IU) i peroksydacji (IP) błon komórkowych.

Zidentyfikowane przeze mnie polimorfizmy w genach *Scd1* oraz *Fads2* wydają się mieć wpływ na tempo metabolizmu podstawowego u myszy selekcionowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) wartości tej cechy. Mimo że zróżnicowanie genetyczne w genie *Scd1* jest najprawdopodobniej wynikiem działania dryfu genetycznego, a nie skutkiem prowadzonej selekcji, to polimorfizm ten poprzez najprawdopodobniej zmianę kinetyki procesu translacji, wynikającej z odmiennych częstości występujących w komórkach cząsteczek tRNA (Komar, 2007), wydaje się wpływać na aktywność kodowanego enzymu, która jest wyższa w liniach myszy L-BMR. Natomiast test na loci poddane działaniu selekcji wskazał, że dywergencja genetyczna między selekcyjnymi liniami myszy w genie *Fads2* jest na tyle duża, że nie można jej tłumaczyć jedynie działaniem dryfu genetycznego. Polimorfizm ten jest o tyle istotny, że prowadzi do powstawania odmiennych wariantów białka, które z kolei wykazują zróżnicowanie w wartościach indeksu aktywności (IXA D6D) pomiędzy selekcyjnymi liniami myszy oraz zwierzętami posiadającymi różne genotypy w genie *Fads2*. Następstwem opisanych powyżej różnic w aktywnościach obu enzymów jest re-aranżacja składu błon komórkowych mysich hepatocytów, która w konsekwencji może wpływać na tempo metabolizmu podstawowego (BMR). Prowadzi ona do zróżnicowania w stopniu nasycenia membran biologicznych, rozumianej jako wartość indeksu saturacji (IS), ale odwrotnie niż zakłada to teoria metronomu błonowego. Co więcej, stopień płynności i przepuszczalności błon (IU) się nie zmienia, lecz pozostaje na wysokim poziomie, charakterystycznym dla gatunku, co znajduje swoje odzwierciedlenie w braku zróżnicowania w aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K -ATPazy). Z kolei, porównywalne wartości indeksu peroksydacji (IP) błon biologicznych u myszy z obu linii wskazują, że membrany zwierząt z linii wysokometabolicznej (H-BMR) są w równym stopniu chronione przed

wzmocnionymi procesami peroksydacji wywołanymi reaktywnym działaniem wolnych rodników co myszy z linii L-BMR, niż w sytuacji, gdy byłyby bardziej płynne.

Podsumowując, przeprowadzony w niniejszych badaniach test teorii metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) z wykorzystaniem technik biologii molekularnej nie zdołał jej potwierdzić na poziomie wewnątrzgatunkowym. Wyniki eksperymentu wskazują, iż w porównaniach zwierząt należących do jednego gatunku obserwowane zróżnicowanie tempa metabolizmu podstawowego (BMR) mogą wynikać z kompensowania przeciwstawnych mechanizmów. Kompensacja, poprzez utrzymywanie błon o większym stopniu saturacji, a jednocześnie tej samej płynności, chroni przed swoistą pułapką ewolucyjną w postaci podatności błon komórkowych na peroksydację. Niniejsze badania podkreślają także rolę desaturacji w szlaku metabolicznych przemian kwasów tłuszczowych i jej wpływ na tempo metabolizmu podstawowego (BMR) oraz sugerują, że szlak ten może pozostawać pod kontrolą genów.

SUMMARY

Basal metabolic rate (BMR) is a quantitative trait with variation potentially affected by many genes. This trait is variable at the interspecific as well as at the intraspecific level. In 1999 Hulbert and Else, based on numerous experimental and comparative studies on ectothermic and endothermic species that differ in body mass, proposed the mechanism explaining in a simply way the observed variability in BMR at the interspecific level. They have formulated the “membrane pacemaker theory of metabolism” (Hulbert and Else 1999), according to which basal metabolic rate is dependent on the lipids content in biological bilayers. This theory assume that the main role in BMR formation plays saturation index (SI) expressed as a monounsaturated (MUFA) to polyunsaturated (PUFA) fatty acids ratio. Cell membranes of the species with relatively higher BMR possess more PUFAs and less MUFAs at the same time. The biophysical properties of PUFAs increase membrane fluidity and affect activity of the membrane-associated enzymes, which lead to increase of BMR. On the other hand, high content(s) of the PUFAs increases the susceptibility of the cell membranes to damages cause by activity of the free radicals, which may accelerate the aging of organisms with high BMR (Hulbert, 2005). While the link between BMR and membrane lipid composition is clear on an interspecific level, the underlying mechanism linking them on an intraspecific level is not well understood. Although the “membrane pacemaker theory of metabolism” has been confirmed at the level of comparisons of different species, or even phyla of vertebrates, their predictions within a single endothermic species could not be fulfilled because of the much narrower range of the observed variation of a physiological trait like BMR, as well as the negative results of the increasing of the biological membranes peroxidation index (PI) values.

The main goal of present study was to establish whether differences observed at the intraspecific level in the lipid profile of cell membranes and basal metabolic rate (BMR) are caused by polymorphism(s) in genes encoding enzymes of the fatty acids metabolic pathway and verification if these differences decrease the biological bilayers susceptibility to peroxidation with keeping the great cell membranes fluidity in the same time, which is necessary in maintaining high level of basal metabolic rate (BMR).

For this purpose I used 120 males of laboratory mice (*Mus musculus*) selectively bred for low (L-BMR) and high (H-BMR) basal metabolic rate, which has been carried on

Department of Animals Ecology, Institute of Biology, University of Białystok for 32 generations (F32). I have chosen by chance 61 males from L-BMR line and 59 males from H-BMR line. For the evaluation of the force of genetic drift, I also used 36 mice from three unselected lines of mice (US1, US2, US3) that were bred at random in generation 16 (F16), as well as 78 mice, which were derived from the same stock of Swiss Webster mice used to produce the BMR-selected lines, but in generation 22 (F22).

I measured BMR of all mice used in this experiment. The next steps of this study were: DNA sequencing and polymorphic site identification for genes encoding enzymes of fatty acids metabolic pathway, i.e. in the sequences genes of three desaturases: *Scd1*: $\Delta 9$ -desaturase, *Fads1*: $\Delta 5$ -desaturase, *Fads2*: $\Delta 6$ -desaturase and elongases: *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5*, *Elovl6*, as well as in the gene of the regulatory protein SREBP-1c. Next, I checked, if the observed differences in BMR between L-BMR and H-BMR lines of mice may be the result of differences in genes expression. I estimated the average F_{ST} value for 10 microsatellites loci that, as a neutral markers, enable controlling the force of genetic drift, which could occur in an artificial selection experiments and led to accidental changing of allele's frequencies, between the studied lines of mice (L-BMR and H-BMR in F22 and F32 as well as US: US1, US2 and US3). I have also done the qualitative and quantitative estimation of fatty acids in the mice hepatocytes total lipids (TL) and phospholipids (PL) fraction. It allowed me to calculate the activity indexes of enzymes that were encoded by the polymorphic genes, as well as to test, if mice from the two selective lines differ with respect to lipids content of the cell membranes, which could led to different level of their saturation (saturation index, SI) and unsaturation (unsaturation index, UI) and consequently to various susceptibility to peroxidation (peroxidation index, PI). I also analyzed the sodium pump activity (Na^+/K^+ -ATPase) base on the fluorometric techniques.

Mice from the selected lines (F32) differed with respect to body-mass-corrected BMR (one-way ANOVA, $P < 0.05$). Mice from L-BMR line had a significantly lower BMR than individuals from H-BMR and unselected lines of mice (US; one-way ANOVA, $P < 0.05$ in both cases), whereas the latter two line did not differ ($P > 0.05$).

I successfully amplified the whole translated regions of all mouse genes encoding enzymes involved in fatty acids metabolic pathway (*Scd1*, *Fads1*, *Fads2*, *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5*, *Elovl6* and *Srebf1*). All but two were monomorphic. I detected the polymorphic sites in two desaturases genes: *Scd1* and *Fads2*, for $\Delta 9$ -desaturase (SCD-1c) and $\Delta 6$ -desaturase (D6D) respectively. In case of *Fads2* gene, there were two polymorphic

sites. The first substitution was non-synonymous (V/I) and tightly linked with the second, synonymous (F/F) one. This revealed the presence of two alleles in the *Fads2* gene which code two variants of D6D enzymes: one with valine (allele G) and the other with isoleucine (allele A). I also indicated two polymorphic sites in *Scd1* gene, but both of them were synonymous and completely linked. Based on the alleles and genotypes frequencies in *Fads2* and *Scd1* genes between the selected (F32) and the three of unselected lines of mice I estimated the F_{ST} values (*Fads2*: F32 $F_{ST} = 0.140$, $P < 0.05$; US $F_{ST} = 0.045$, $P > 0.05$; *Scd1*: F32 $F_{ST} = 0.426$, $P < 0.05$; US $F_{ST} = 0.458$, $P < 0.05$). These F_{ST} values suggest moderate and significant genetic differentiation in *Fads2* gene between the selected lines and low differentiation among three unselected lines. In case of *Scd1* gene the genetic differentiation was very great and significant between the selected lines, as well as among three unselected lines, which suggest that observed differentiation in this gene could be caused by genetic drift and not by selection.

I did not find any significant differences in the all studied genes (*Scd1*, *Fads1*, *Fads2*, *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5*, *Elovl6* and *Srebf1*) with respect to RNA expression between mice from L-BMR and H-BMR lines as well as between these lines and three unselected lines, as well as animals with different genetic variants in *Scd1* and *Fads2* genes (pairwise comparison, t test, $P > 0.05$).

Fatty acid desaturase 2 (*Fads2*) genotypes had significant effect on BMR of the selected mice from generation F32. Mice with genotype GG had significantly higher BMR than individuals with AA (one-way ANOVA, $P < 0.05$) and AG genotypes (one-way ANOVA, $P < 0.01$). BMR did not differ between mice possessing allele A (i.e., carrying the AA or AG genotypes; $P = 0.70$). Similarly, the variant alleles in *Scd1* gene had significant effect on BMR. Mice with genotype TT had significantly lower BMR than homozygotes AA and heterozygotes AT (one-way ANOVA, $P < 0.001$).

The F_{ST} value estimated for the 10 neutral microsatellite loci between H-BMR and L-BMR line of mice of the F22 indicated moderate and significant level of genetic differentiation ($F_{ST} = 0.086$, $P < 0.001$), whereas 10 generations later (F32), the F_{ST} value rose up to 0.224 ($P < 0,001$). The average F_{ST} value among the unselected lines was 0.152 ($P < 0.001$). Using the genotype data obtained from the 10 neutral microsatellite loci and the corresponding F_{ST} value in the *Fads2* gene between H-BMR and L-BMR lines (F22), it was possible to distinguish between the consequences of genetic drift and selection. Analysis using the program LOSITAN showed that the genetic differentiation among lines (as measured by F_{ST}) was significantly greater at the *Fads2* locus than the value for any of

the 10 microsatellite loci indicating that this locus may be under selection. The similar analysis for *Scd1* gene also indicated that this gene could be a candidate for selection. However, the test for loci under selection among unselected lines of mice (US) once again showed the *Scd1* gene, as a locus under selection, which could suggest this is a false positive result.

Mice from L-BMR line possessed significant higher value of D6D activity index (IxA D6D) than mice from H-BMR line ($P < 0.05$). Fatty acid desaturase 2 (*Fads2*) genotypes had also significant effect on the IxA D6D. Mice with AG genotype had significantly higher IxA D6D than individuals with GG genotypes ($P < 0.01$). Mice from L-BMR line possessed also significant higher value of $\Delta 9$ -desaturase activity index (IxA SCD-1c) than mice from H-BMR line, as well as homozygotes TT in comparison to homozygotes AA and heterozygotes AT ($P < 0.05$) in *Scd1* gene. However, the measurements of sodium pump activity (Na^+/K^+ -ATPase) did not indicate significant differences between L-BMR and H-BMR, as well as between mice with various genotypes in *Scd1* and *Fads2* genes.

Mice from L-BMR line possessed significant lower value SI than mice from H-BMR line ($P < 0.001$) and, in the same time, did not differ in unsaturation (UI) and peroxidation (PI) indexes values. The comparisons between mice with various genotypes in *Fads2* gene did not show significant differences in SI, as well as UI and PI. The only differences I indicated in SI value was between heterozygotes AT and homozygotes TT in *Scd1* gene ($P < 0.05$).

There was a significant relationship between basal metabolic rate (BMR) and $\Delta 9$ -desaturase and $\Delta 6$ -desaturase activity indexes in lines of mice selectively bred for low (L-BMR) and high (H-BMR) basal metabolic rate for 32 generations (F32). Basal metabolic rate positively correlated with saturation index (SI; $r = 0.45$, $P < 0.001$). However, no relationships were found between BMR and unsaturation (US) and peroxidation (PI) indexes of biological bilayers.

Polymorphisms in *Scd1* and *Fads2* genes, that I identified, seem to have impact on basal metabolic rate in mice selectively bred for low (L-BMR) and high (H-BMR) values of this trait. Although, the genetic differentiation in *Scd1* gene is probably the effect of genetic drift and not the result of the selection, this polymorphism may influence the encoded enzyme activity, which is higher in L-BMR line. Silent mutations could affect the activity of an enzyme due to changing the kinetics of translation process, which is result of divers frequencies of tRNA (Komar, 2007) molecules in cells. The test for loci under selection indicated, that genetic divergence between selected lines of mice in *Fads2* gene is

big enough that it could not be explained by genetic drift only. Moreover, this polymorphism led to different variants of protein, which consequently have different values of their activity indexes (IxA D6D) between selected lines of mice and between animals with distinct *Fads2* genotypes. The consequences of differences in above mentioned activity of both enzymes is the re-organization of lipids content in cell membranes of mice hepatocytes, which could influence on basal metabolic rate. This leads to differences in level of biological membrane saturation (SI), but in opposite way than predictions of the membrane pacemaker theory of metabolism. Moreover, the level of fluidity and permeability does not change, but it is on the same, high level that is characteristic for the species and consequently there are no differences in the sodium pump (Na⁺/K-ATPase) activity. On the other hand, the similar values of the cell membranes peroxidation index (IP) among mice from both selected lines indicate that membranes of animals from H-BMR line are protected from the increased peroxidation to the same extent caused by reactive oxygen species as mice from L-BMR line.

Taken together, the tests using techniques of molecular biology did not confirm the membrane pacemaker theory of metabolism (Hulbert and Else 1999) on intraspecific level. The results of the experiment point out that in comparisons between animals that belong to the same species the observed differences in basal metabolic rate (BMR) might be result of the diverse mechanisms. The mechanisms could protect mice from a kind of evolutionary trap, i.e. the susceptibility of biological membranes to peroxidation by the re-organization of lipids content in cell membranes which lead to the maintenance of higher level of cells membranes saturation and, at the same time, the similar level of their fluidity. The data presented here support the role of desaturation in fatty acids metabolic pathway and their impact on basal metabolic rate (BMR).

WSTĘP

Genetyczne uwarunkowanie cech

Niespełna 150 lat dzieli nas od opublikowania przez Grzegorza Mendla wyników badań nad dziedziczeniem cech grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*), które dały podwaliny rozwojowi nowej dziedziny biologii, jaką jest genetyka. Dalsze badania nad podstawami dziedziczenia doprowadziły do sformułowania w 1941 roku przez George W. Beadle i Edwarda L. Tatum hipotezy „jeden gen – jeden enzym”. Obecnie wiadomo, że wszystkie obserwowane cechy organizmów żywych zapisane są w genach, będących podstawowymi jednostkami dziedziczenia. Cechy charakteryzujące organizmy żywe można podzielić na jakościowe oraz ilościowe. Pierwsze z nich są zdeterminowane genetycznie w sposób bezpośredni i niezmienny, a czynniki środowiskowe nie mają na nie wpływu. Kodowane są one przez pojedyncze geny, a więc są cechami monogenowymi, wykazującymi brak cech pośrednich. Należą do nich na przykład liczba palców u rąk, liczba kręgów w kręgosłupie ssaków, czy też niektóre choroby, jak chociażby albinizm (Lokody, 2014). Natomiast cechy ilościowe, pozostające pod wpływem działania środowiska, zdeterminowane są przez wiele genów, których addytywny charakter daje obserwowaną wartość danej cechy. Do takich cech poligenowych o ciągłym charakterze należą np. wysokość ciała, kolor włosów, oczu i skóry, poziom inteligencji, jak również tempo metabolizmu podstawowego (BMR; Barton i Keightley 2002). Obecnie ogromny nacisk kładzie się na poznanie genów odpowiedzialnych za powstanie konkretnych cech, szczególnie tych związanych ze stanami chorobowymi człowieka. Stąd też obserwowany w ostatnich latach szybki rozwój takich dziedzin nauki, jak biologia molekularna, czy genomika funkcjonalna.

Dzięki zastosowaniu technik biologii molekularnej możliwe było chociażby poznanie ścieżek ewolucyjnych wielu organizmów, a uzyskane na podstawie markerów genetycznych wyniki pozwoliły definitywnie rozstrzygnąć wątpliwości dotyczące ich pokrewieństw filogenetycznych (Awise, 2008). Do aplikacyjnych osiągnięć ze świata biologii molekularnej można zaliczyć chociażby transgeniczne gatunki roślin i zwierząt hodowlanych, stworzone z zamiarem poprawy ich własności poprzez dodanie nowych cech lub ulepszenie już istniejących. Dalsze zaawansowanie technologiczne pozwoliło na

poznanie całych genomów wielu gatunków, w tym także człowieka, co przyczyniło się do pełniejszego zrozumienia procesów fizjologicznych, ale również stanów chorobowych ludzi oraz rozwinięcie nowoczesnych metod leczenia, do których można zaliczyć chociażby terapię genową. W tym miejscu swoje pole działania ma również genomika funkcjonalna zajmująca się poszukiwaniem genów odpowiedzialnych za powstawanie konkretnych cech (Chakravarti, 1999; Daniell, 2002; Allison, 2007; Yang i Rannala 2012).

Tempo metabolizmu podstawowego (BMR)

Tempo metabolizmu podstawowego (BMR, ang. *basal metabolic rate*) jest cechą ilościową (ang. *quantitative trait*) zdeterminowaną poligenowo, określającą minimalne, energetyczne koszty przeżycia organizmu. Za twórcę koncepcji BMR uznaje się francuskiego chemika i fizyka Antoine Lavoisiera, który odkrył rolę tlenu w procesie spalania. Postulował on, że podczas oddychania zwierząt główną rolę odgrywają tlen, pochodzący z wdychanego powietrza oraz węgiel i wodór, których źródłem jest pożywienie. Udowodnił, że tempo konsumpcji tlenu jest uzależnione od ilości spożywanego pokarmu, temperatury otoczenia oraz wykonywanej pracy mięśni, a jego badania uznaje się za pierwszy pomiar BMR (Blaxter, 1989; Lutz, 2002). W XX wieku pomiary tempa metabolizmu stały się ważną częścią eksperymentów bioenergetycznych i opierały się głównie na mierzeniu ilości konsumpcji tlenu, produkcji wydychanego dwutlenku węgla, czy ilości generowanego ciepła. Po odkryciu w 1895 roku przez A. Magnusa-Levy'ego związku między tempem metabolizmu człowieka a wydzielaniem hormonów przez tarczycę, pomiary BMR stały się ważnym badaniem klinicznym obrazującym pracę tego organu. Koniecznym stało się ujednoczenie warunków mierzenia tempa metabolizmu podstawowego. Ustalono, że prawidłowy pomiar powinien odbywać się na czczo, podczas spoczynku i w strefie temperatur termoneutralnych, czyli takich, w których organizm nie wydatkuje dodatkowej energii na dogrzewanie lub chłodzenie ciała. Natomiast w przypadku zwierząt zmiennocieplnych wprowadzono pojęcie standardowego tempa metabolizmu (SMR, ang. *standard metabolic rate*), powiązanego z BMR, uwzględniającego wyszczególnienie temperatury, w której metabolizm jest mierzony.

Tempo metabolizmu podstawowego (BMR) jest cechą ściśle związaną z masą ciała. Organizmy większe posiadają niższe BMR w przeliczeniu na gram masy ciała w porównaniu do tych lżejszych. Opisywana tu zależność ma charakter allometryczny. Jedną

z koncepcji tłumaczącą to zjawisko jest tzw. metaboliczna teoria ekologii (MTE), opierająca się na założeniu, iż w przyrodzie istnieje uniwersalny wykładnik allometrii, wynoszący 0,75, wynikający z fraktalnej struktury układów transportowych organizmów, takich jak układ krwionośny czy oddechowy (West i in. 1997; 2002). Alternatywna koncepcja skalowania allometrii zakłada, że zróżnicowanie tempa metabolizmu zachodzi poprzez ewolucyjne zróżnicowanie masy ciała w poszczególnych grupach systematycznych, związanych ze zmianą liczby i wielkości komórek. BMR zwierząt zbudowanych z relatywnie małych komórek powinno skalować się z wykładnikiem zbliżonym do jedności, podczas gdy jego wartość u organizmów o dużych komórkach wynosi 0,67 (Hemmingsen, 1960).

Zróżnicowanie w tempie metabolizmu podstawowego (BMR) jest również obserwowane w porównaniach zwierząt endotermicznych oraz egzotermicznych. Stałocieplny ssak ma siedmiokrotnie wyższe tempo metabolizmu podstawowego niż jaszczurka o podobnej masie ciała, co częściowo jest związane z różnicami w wielkości organów wewnętrznych, ale co bardziej istotne, z odmiennym metabolizmem komórkowym (Brand i in. 1991).

Do głównych komponentów składających się na metabolizm podstawowy organizmu (BMR) należy zaliczyć w 10% procesy niemitochondrialne, w 20% procesy przeciwdziałające przepływowi protonów w mitochondriach oraz, przede wszystkim, w 70% produkcję ATP (adenozynotrójfosforanu) w mitochondriach, z czego 20%-25% wykorzystywane jest przez pompę sodowo-potasową (Na^+/K^+ -ATPazę), kolejne 20%-25% związane jest z produkcją białek, ~5% z aktywnością pompy wapniowej (Ca^{2+} -ATPazy), ~7% z glukoneogenezą, ~2% z produkcją mocznika, ~5% z aktywnością ATPazy miozynowej oraz ~6% z pozostałymi procesami ATP-zależnymi (Rolfe i in. 1997). Aczkolwiek, należy w tym miejscu podkreślić, że powyższe dane stanowią średnią dla całego organizmu, a poszczególne wartości procentowe wahają się znacznie pomiędzy różnymi tkankami. I tak np. aktywność pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) w wątrobie pochłania ~10% przemian energetycznych, podczas gdy w mózgu i nerkach aż ~60% (Clausen i in. 1991). Co zaskakujące, zwierzęta stałocieplne i zmiennocieplne, różniąc się znacznie tempem metabolizmu podstawowego (BMR), posiadają te same jego komponenty, które występują w podobnych proporcjach (Brand i in. 1991).

Syndrom metaboliczny

BMR jest cechą ilościową, wpływającą na szereg zjawisk warunkujących prawidłowe funkcjonowanie całego organizmu. Obecnie badane są mechanizmy, które odpowiadają za zróżnicowanie BMR. Rozwiązanie tego problemu może okazać się równoznaczne z podjęciem skutecznej walki z tzw. zespołem metabolicznym (MS, ang. *metabolic syndrome*), będącym określeniem całej grupy chorób nękających współczesną cywilizację. Wystarczy wymienić tu chociażby otyłość, insulinooporność, nadciśnienie tętnicze i związane z nim choroby serca oraz zwiększone ryzyko zawałów.

Po raz pierwszy syndrom metaboliczny został opisany już w 1923 roku przez Kyлина (Vitarius, 2005), który w swoich badaniach klinicznych zauważył częste współwystępowanie nadciśnienia tętniczego, hiperglikemii i dny moczanowej (Sieradzki, 1997; Isomaa, 2003). Natomiast w 1988 roku Reaven wprowadził pojęcie zespołu X, jako określenie współwystępowania zaburzeń gospodarki węglowodanowej, lipidowej i nadciśnienia tętniczego. Zauważył on również, że insulinooporność i towarzysząca jej hiperinsulinemia wraz z nietolerancją glukozy lub pełnoobjawową cukrzycą stanowią niezależne czynniki ryzyka chorób naczyniowo-sercowych (Reaven, 1988). Późniejsze badania potwierdziły związek zespołu metabolicznego z otyłością (Kaplan, 1989) oraz miażdżycą (Alexander, 2003), a dowodów na to, iż to właśnie insulinooporność jest jego podłożem przyniosły badania Reavena i Ferranniniego (Gundry i in. 2004), którzy określili go „zespołem oporności na insulinę (ang. *insuline resistance syndrome*). W późniejszych latach ustalono, iż współistnienie metabolicznych czynników ryzyka określanych takimi terminami jak „zespół X” oraz „zespół oporności na insulinę” dotyczą tej samej grupy zaburzeń metabolicznych nazwanych wspólnie „zespołem metabolicznym” (Grundty i in. 2006). Obecnie do tego zespołu zalicza się insulinooporność, hiperinsulinemię, otyłość brzuszna, upośledzoną tolerancję glukozy, cukrzycę typu 2, mikroalbuminurię, hipertrójglicydemię, obniżenie stężenia cholesterolu frakcji HDL, nadciśnienie tętnicze, stan prozapalny i pozakrzepowy (Pacholczyk i in. 2008). Wszystkie powyższe zaburzenia metaboliczne zaliczane są do tzw. chorób cywilizacyjnych i dlatego poznanie mechanizmów warunkujących zmienność tempa metabolizmu podstawowego (BMR) może stanowić poważny krok naprzód w podjęciu z nimi skutecznej walki.

Teoria metronomu błonowego

Jednym z centralnych problemów badawczych ekologii fizjologicznej jest ustalenie ewolucyjnych mechanizmów zróżnicowania tempa metabolizmu podstawowego (BMR) zwierząt. Nie ulega wątpliwości, iż jest to cecha wysoce zmienna na poziomie międzygatunkowym (Benett i Ruben 1979; Hulbert i Else 1989; Else i in. 2004). W 1999 roku Hulbert i Else, opierając się na licznych badaniach porównawczych zmiennoocieplnych i stałocieplnych gatunków zwierząt o różnej masie ciała, zaproponowali mechanizm tłumaczący w prosty sposób obserwowaną zmienność BMR. Tak powstała teoria metronomu błonowego (ang. *membrane pacemaker*, Hulbert i Else 1999), zgodnie z którą tempo metabolizmu zależy od składu lipidowego błon komórkowych. Zasadniczą rolę odgrywa tu tzw. „indeks saturacji” (IS, ang. *saturation index*) membran biologicznych, wyrażany jako stosunek jednonienasyconych (MUFA, ang. *monounsaturated fatty acid*) do wielonienasyconych (PUFA, ang. *polyunsaturated fatty acid*) kwasów tłuszczowych. Błony komórkowe gatunków o relatywnie wyższym BMR posiadają więcej kwasów PUFA, przy równocześnie niskim poziomie kwasów MUFA. Fizyczne właściwości kwasów PUFA zwiększają plastyczność membran biologicznych oraz wpływają na aktywność związanych z nimi białek, co prowadzi do wzrostu BMR (Else i Wu 1999; Turner i in. 2003; 2005; Wu i in. 2004).

Struktura, skład oraz właściwości fizykochemiczne błon komórkowych

Błony komórkowe to półprzepuszczalne struktury, których podstawowymi składnikami są lipidy, steroidy i białka. Do pierwszej grupy związków można zaliczyć fosfolipidy, glikolipidy i lipidy obojętne. Główną strukturę błony komórkowej tworzą amfofilowe fosfolipidy zbudowane z hydrofilowych grup funkcyjnych na jednym biegunie oraz hydrofobowych łańcuchów węglowodorowych na drugim końcu. Ułożenie poszczególnych fosfolipidów w membranach biologicznych nie jest przypadkowe. Tworzą one dwie warstwy związane ze sobą wiązaniami niekowalencyjnymi, przy czym części polarne skierowane są na zewnątrz błony, a hydrofobowe łańcuchy kwasów tłuszczowych do wewnątrz. Mogą mieć one charakter nasycony, tj. posiadać tylko pojedyncze wiązania między atomami węgla w łańcuchu (C–C), lub nienasycony, o jednym podwójnym wiązaniu między atomami węgla (C=C; jednonienasycone kwasy tłuszczowe; MUFA) lub od dwóch do sześciu takich wiązań (wielonienasycone kwasy tłuszczowe; PUFA).

Większość kwasów tłuszczowych w błonach biologicznych kręgowców zawiera od 16 do 22 atomów węgla w łańcuchu, co obok liczby podwójnych wiązań, zostało uwzględnione w ogólnie przyjętej nomenklaturze. Natomiast pozycja wiązań C=C jest liczona od grupy karboksylowej i oznaczana symbolem „Δ”, lub alternatywnie, od grupy metylowej z zastosowaniem symbolu „n”, co również sugeruje przynależność do całej rodziny kwasów tłuszczowych.

Odkąd Singer i Nicholson (1972) zaproponowali swój model budowy błony komórkowej jako półpłynnej mozaiki, poznano wiele nowych faktów, dotyczących jej struktury. Obecnie wiadomo, że ma ona charakter dynamiczny. Cząsteczki głównego jej składnika, tj. fosfolipidów, mogą obracać się wokół własnej osi lub przemieszczać się w płaszczyźnie podwójnej warstwy (Edidin, 2003). Wymiana sąsiadujących cząsteczek fosfolipidów w jednej warstwie, tzw. dyfuzja boczna, zachodzi niezwykle szybko, bo z prędkością $\sim 1 \mu\text{s}$. Znacznie powolniej dochodzi do przemieszczania się fosfolipidów pomiędzy warstwami, czyli tzw. ruchów flip-flop, bo aż w przeciągu ~ 28 godzin. Okazało się również, że jedną z kluczowych cech wpływającą na właściwości fizykochemiczne błon komórkowych jest liczba wiązań podwójnych (C=C), która determinuje tzw. punkt topnienia (ang. *melting point*), będący temperaturą przejścia ze stanu stałego do ciekłokrystalicznego. Lee (1991) w swoich badaniach wykazał, że zwiększenie stopnia nienasylenia kwasów tłuszczowych znacznie obniża temperaturę punktu topnienia membran biologicznych. Późniejsze badania dowiodły, że przepuszczalność błon komórkowych zależy w głównej mierze od stopnia nienasylenia, jak i długości łańcuchów kwasów tłuszczowych. Obecność w membranach biologicznych dużej liczby nienasyconych kwasów tłuszczowych, zawierających wiele podwójnych wiązań powoduje, że ich długie łańcuchy acylowe ulegają wyginaniu, przez co następuje osłabianie oddziaływań van der Waalsa między sąsiadującymi łańcuchami (Cribier i in. 1993). Ruchliwość hydrofobowych łańcuchów zwiększa się wraz ze wzrostem liczby wiązań nienasyconych łańcucha węglowodorowego oraz jego skracaniem.

Założenia teorii metronomu błonowego

Założenia, na których oparta jest teoria Hulbert'a i Else'a można sprowadzić do trzech punktów. Pierwszy z nich zakłada, że dominującymi komponentami BMR są procesy biologiczne związane bezpośrednio bądź pośrednio z metabolicznymi kosztami utrzymania potencjałów błonowych, tj. zapewnienia właściwego gradientu jonów H^+ w błonach

mitochondrialnych, odpowiedniego stosunku jonów Na^+/K^+ oraz jonów Ca^{2+} w błonach komórkowych, które w ~50% składają się na tempo metabolizmu podstawowego (BMR). Poza tym tempo, z jakim zachodzą w komórkach wszystkie procesy syntezy, uzależnione jest od szybkości dostarczania substratów, które również odbywa się przez membrany biologiczne. Co więcej, procentowy udział tych komponentów w tempie metabolizmu podstawowego (BMR) jest podobny zarówno u gatunków zmiennocieplnych, jak i stałocieplnych (Brand i in. 1991).

Drugi argument użyty w teorii metronomu błonowego opiera się na badaniach empirycznych nad składem poszczególnych kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych zwierząt różniących się tempem metabolizmu podstawowego (BMR). Gudbjarnason i in. (1978) odkryli, że koncentracja wysocze wielonienasyconego (PUFA) kwasu dokozaheksaenowego (DHA, C22:6n-3) w fosfolipidach mięśnia sercowego bardzo ściśle korelowała z tętnem ssaków, którego wartość zmieniała się wraz z rozmiarami ciała od myszy po wieloryby. Powyższe badania były pierwszym impulsem do rozpoczęcia własnych eksperymentów przez Hulberta i Else. W późniejszych latach wykazali oni, że gatunki o wysokim BMR, tj. zwierzęta stałocieplne w porównaniu do zmiennocieplnych (Hulbert i Else 1989) oraz ssaki (Couture i Hulbert 1995; Hulbert i in. 2002b) i ptaki (Hulbert i in. 2002a) o małych rozmiarach ciała w stosunku do dużych, posiadały w swoich membranach większą ilość kwasów wielonienasyconych (PUFA), a w szczególności kwasu dokozaheksaenowego (DHA, C22:6n-3) przy jednoczesnym małym udziale kwasów jednonienasyconych (MUFA), głównie kwasu oleinowego (OA, C18:1n-9). Z kolei gatunki o niskim tempie metabolizmu podstawowego (BMR) wykazywały dokładnie odwrotne zależności.

Trzecie założenie opiera się na fizykochemicznych właściwościach błon komórkowych. Te bowiem, które są bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) charakteryzują się zdecydowanie większą przepuszczalnością (ang. *leaky membranes*) w porównaniu do tych o przeważającej ilości kwasów jednonienasyconych (MUFA). Takie lipidowe środowisko ma wpływ na aktywność białek błonowych, takich jak białka transportowe, kanały jonowe, czy receptory, które są pośrednio lub bezpośrednio związane z kosztownymi energetycznie procesami komórkowymi, składającymi się na ponad połowę BMR, tj. utrzymanie transmembranowego gradientu jonów Na^+/K^+ , Ca^{2+} , czy H^+ w mitochondriach. Postulat ten został w pełni potwierdzony przez późniejsze międzygatunkowe badania eksperymentalne nad aktywnością pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy), która, co wielokrotnie udowodniono, zależy od rodzaju otaczających ją

lipidów, a nie wyłącznie od właściwości samego enzymu (Else i Wu 1999; Turner i in. 2003; 2005; Wu i in. 2004). Szczególne znaczenie przypisuje się udziałowi wysoce wielonienasyconego kwasu dokosaheksaenowego, DHA (C22:6n-3), którego podwyższony poziom w błonach komórkowych koreluje ze zwiększoną aktywnością pompy sodowo-potasowej (Turner i in. 2003).

Teoria metronomu błonowego a wewnątrzgatunkowa zmienność BMR

Teoria metronomu błonowego opiera się głównie na międzygatunkowych badaniach porównawczych zwierząt zmiennoocieplnych ze stałocieplnymi oraz ptaków lub ssaków różniących się masą ciała (Else i Wu 1999; Hulbert i in. 2002a; 2002b; Wu i in. 2001; 2004; Turner i in. 2005). Sytuacja znacznie komplikuje się na poziomie wewnątrzgatunkowym. Okazuje się, iż zdecydowanie węższe spektrum zmienności, obserwowane między osobnikami jednego gatunku, znacznie utrudnia zweryfikowanie prawidłowości opisanych teorią metronomu błonowego. Jak dotychczas, zaledwie jedna praca badała związek między składem chemicznym kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych a zmiennością BMR na poziomie wewnątrzgatunkowym. Porównując skład membran biologicznych dwóch linii myszy laboratoryjnej selekcyjowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego, Brzęk i in. (2007) wykazali, iż mimo braku różnic w całkowitej ilości kwasów PUFA i MUFA oraz w wartości indeksu saturacji (IS), będącego miarą stopnia nasycenia błon komórkowych, badane linie myszy istotnie różniły się procentową zawartością poszczególnych kwasów tłuszczowych. Co zaskakujące, niektóre kwasy tłuszczowe, wykazały odwrotną zależność w stosunku do testowanej teorii (np. wielonienasycony kwas dokosaheksaenowy, DHA; C22:6n-3, występujący obficie w linii L-BMR). Innymi słowy, badane linie myszy posiadały błony komórkowe o podobnej plastyczności, ale różniły się profilem lipidowym, tzn. inną zawartością poszczególnych kwasów tłuszczowych.

Valencak i Ruf (2007) podjęli próbę przetestowania teorii metronomu błonowego Hulberta i Else (1999) na poziomie międzygatunkowym. Zastosowali oni modele statystyczne, uwzględniające kontrasty filogenetyczne, sprowadzające dane o zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych oraz dotyczące tempa metabolizmu podstawowego na jeden poziom ewolucyjny. Wyniki tych analiz potwierdziły silną korelację między tempem metabolizmu podstawowego (BMR) a masą ciała. Nie wykazali oni jednak istotnych statystycznie zależności pomiędzy zawartością wielonienasyconych kwasów

tłuszczowych (PUFA), w tym kwasu dokosaheksaenowego, DHA (C22:6n-3) a tempem metabolizmu podstawowego (BMR).

Niewykluczone, że różnice w tempie metabolizmu na poziomie wewnątrzgatunkowym wynikają ze zdecydowanie bardziej subtelnych mechanizmów, w stosunku do tych, opisanych teorią Hulbert'a i Else (1999). Dotychczasowe eksperymenty nie zdołały potwierdzić teorii metronomu błonowego, co więcej, nie wyjaśniały w żaden sposób mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowane różnice w profilu lipidowym błon komórkowych oraz w tempie metabolizmu podstawowego (BMR).

Ograniczenia ewolucyjne

Teoria metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) zakłada, że podwyższenie stopnia nienasylenia błon komórkowych rozumianego jako zwiększenie ilości kwasów tłuszczowych posiadających podwójne wiązania między atomami węgla (C=C) w membranach biologicznych, szczególnie tych wysoce wielonienasyconych, takich jak kwas dokozaheksaenowy, DHA (C22:6n-3) prowadzi do wzrostu ich płynności oraz zwiększa aktywność związanych z nimi białek, co w konsekwencji powoduje podwyższenie tempa metabolizmu podstawowego (BMR). Posiadanie wysokiego BMR wiąże się jednak z wieloma negatywnymi następstwami. Jest to bowiem równoznaczne z intensyfikacją procesów metabolicznych zachodzących w żywych komórkach. Kompleksy enzymatyczne wytwarzające energię, które zlokalizowane są w mitochondriach nie są jednak całkowicie sprawne. Ponad 10% tlenu zużywanego przez mitochondria i peroksosomy jest mianowicie przekształcana w tzw. reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), z czego ~5% to nadtlenek wodoru, a kolejne ~5% to częściowo zredukowana postać tlenu, tj. anion ponadtlenkowy (Floyd, 1996). W konsekwencji nie cały metabolizowany tlen dociera do końcowego enzymu redukującego go do wody, czyli do oksydazy cytochromowej, lecz w postaci reaktywnych form tlenu wycieka przez błony mitochondrialne (Chance i in. 1979). Wiadomo również, iż w miarę starzenia się spada także zdolność mitochondrialnej oksydazy cytochromowej do czteroelektronowej redukcji tlenu do wody, a obserwacja ta była podstawą sformułowanej przez Harmana (1956) tzw. wolnorodnikowej teorii starzenia się (ang. *the rate-of-living theory of aging*). Co więcej, wielokrotnie udowodniono, że wyższe stężenie reaktywnych form tlenu (ROS) posiadają organizmy charakteryzujące się wyższym tempem metabolizmu (Sohal i Weindruch 1996; Beckman i Ames 1998).

Organizmy żyjące w atmosferze tlenowej musiały zatem wykształcić skuteczne mechanizmy detoksykujące reaktywne formy tlenu (ROS). Jednym z enzymów, którego funkcja polega na przekształcaniu anionu nadadtlenkowego, który jako pierwszy powstaje w łańcuchu oddechowym, w nadtlenek wodoru jest dysmutaza nadadtlenkowa (Klotz i in. 2003). Następnie, szkodliwy dla komórek nadtlenek wodoru jest metabolizowany przez katalazę i peroksydazę glutationową do tlenu i wody (Bartosz, 1995). Reaktywne formy tlenu, które nie zostaną usunięte przez opisane powyżej systemy, uszkadzają przede wszystkim nici DNA oraz kwasy tłuszczowe zlokalizowane w błonach komórkowych.

Peroksydacja fosfolipidów membran biologicznych jest procesem wolnorodnikowym, polegającym na utlenieniu nienasyconych kwasów tłuszczowych, z których powstają nadtlenki lipidów. Rodniki lipidowe atakują następnie lawinowo kolejne, prawidłowe cząsteczki, a taka łańcuchowa reakcja w bardzo szybki sposób prowadzi do uszkodzenia błony komórkowej i w konsekwencji do śmierci komórki (Reimer i Jennings 1986; Bartosz, 1995). Oczywiście jest, że nie wszystkie błony komórkowe są w równym stopniu podatne na uszkodzenia. Holman (1954) wykazał, że poszczególne kwasy tłuszczowe, wchodzące w skład fosfolipidów membran biologicznych, różnią się od siebie w znacznym stopniu podatnością na peroksydację. W związku z tym, że wolne rodniki mają szczególne powinowactwo do wiązań podwójnych pomiędzy atomami węgla (C=C), najbardziej wrażliwe są wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA), a szczególnie te z rodziny n-3 w porównaniu do kwasów z rodziny n-6. Tym samym najbardziej podatny na peroksydację jest kwas dokozaheksaenowy, DHA (C22:6n-3), posiadający największą liczbę wiązań podwójnych, 6-krotnie bardziej niż dwunienasycony kwas linolowy, LA (C18:2n-6) i 320-krotnie niż jednonienasycony (MUFA) kwas oleinowy, OA (C18:1n-9). Innymi słowy, im bardziej wielonienasycony jest kwas tłuszczowy tym bardziej jest on podatny na reaktywne działanie wolnych rodników (Halliwell i Gutteridge 1999). Znając zatem skład kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych oraz wypadkową ich względnej wrażliwości na peroksydację, możliwe jest wyznaczenie tzw. indeksu peroksydacji (IP, ang. *peroxidation index*) każdej błony komórkowej (Hulbert i in. 2007).

Biorąc pod uwagę założenia, na których opiera się teoria metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999), zwierzęta posiadające błony komórkowe bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA), takie jak niewielkich rozmiarów ssaki lub ptaki, charakteryzujące się wysokim tempem metabolizmu podstawowego (BMR) powinny mieć błony komórkowe o zwiększonej podatności na działanie reaktywnych form tlenu (ROS), charakteryzujące się wysokimi wartościami indeksu peroksydacji (IP), co z kolei może

prowadzić do niszczenia komórek oraz przyspieszania procesów starzenia się organizmów. Opisane tu postulaty przyczyniły się do sformułowania teorii metronomu błonowego na temat starzenia się (ang. *membrane pacemaker theory of aging*; Hulbert, 2003; 2005; 2008; Hulbert i in. 2006; 2007), będącą uzupełnieniem wspomnianej wcześniej wolnorodnikowej teorii starzenia się (Harman, 1956) oraz późniejszej jej modyfikacji w postaci teorii stresu oksydacyjnego (Sohal i Weindruch 1996). Wynika z niej, że zwierzęta podwyższając tempo metabolizmu napotykać na pewnego rodzaju ograniczenie ewolucyjne w postaci podwyższonego ryzyka uszkodzenia błon komórkowych przez reaktywne formy tlenu (ROS). Ewolucja błon komórkowych w kierunku zwiększania ich płynności, a co za tym idzie przepuszczalności, może więc skutkować ich większą podatnością na peroksydację, co spowodowałoby znaczące upośledzenie funkcjonowania, a nawet ich zniszczenie.

Metabolizm kwasów tłuszczowych

Kwasy tłuszczowe, wchodzące w skład lipidów stanowią główne źródło energii, a jako strukturalne komponenty błon komórkowych są niezbędne do życia. Poza tym można je znaleźć również w woskach, olejach, sterolach, glicerofosfolipidach, sfingolipidach czy triacyloglicerolach. Uczestniczą one w wielu ważnych procesach komórkowych, takich jak regulacja kanałów jonowych, enzymów oraz odpowiedzi immunologicznej (Xiao i in. 2005; Takeuchi i in. 2010; Miles i Calder 2012). Jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA) odgrywają ważną rolę m. in. w różnicowaniu się komórek, w tym także komórek nerwowych (Bradley i in. 2008; Yonezawa i in. 2008), w kontroli pobierania pokarmu, poprzez stymulację ośrodków łaknienia w mózgu (Obici i in. 2002), czy też wpływają na procesy apoptozy i mutagenezy w niektórych odmianach nowotworów (Hardy i in. 2000). Natomiast wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) są zaangażowane w tak istotne procesy metaboliczne, jak chociażby rozwój mózgu (Simopoulos, 2011), endocytoza i egzocytoza (Grasso i Calderón 2013) oraz przesyłanie sygnałów komórkowych (Kim i in. 2010). Niektóre wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) są prekursorami eikozanoidów, do których zalicza się prostaglandyny, tromboksany, prostacykliny i leukotrieny (Calder, 2013), uczestniczące m. in. w odpowiedzi na zranienia czy odczyn zapalny organizmu (Rangel-Huerta i in. 2012). Dodatkowo, jako komponenty fosfolipidów, są one związane z wieloma chorobami człowieka. Można tu zaliczyć chociażby zaburzenia peroksysomalne (McNamara i in. 2010), nadmiar hormonu wzrostu,

prowadzący do gigantyzmu lub akromegalii (Murray i in. 1994; Nakamura i in. 1996), choroby immunologiczne, takie jak przewlekła obturacyjna choroba płuc oraz choroba zwyrodnieniowa stawów (Goldring i Berenbaum 2004), zaburzenia psychiczne (Lin i in. 2010), alkoholizm (Clugston i in. 2011), jak również wspomniany wcześniej zespół metaboliczny (Jafari i in. 2013; Juárez-López, 2013; Lorente-Cebrián, 2013; Spencer i in. 2013). W związku z tym, iż kwasy tłuszczowe pełnią tak wiele różnorodnych biologicznie funkcji, od ich prawidłowego metabolizmu zależy utrzymanie odpowiedniej równowagi lipidowej w organizmie, a tym samym jego prawidłowe funkcjonowanie.

Za powstawanie kwasów tłuszczowych w organizmach żywych odpowiedzialny jest przede wszystkim kompleks syntazy kwasów tłuszczowych (FAS, ang. *fatty acid synthase*), który jest praktycznie identyczny we wszystkich systemach biologicznych (Smith, 1994). Następnie, kwasy tłuszczowe powstałe w cytozolu na skutek aktywności tego enzymu lub dostarczone wraz z pokarmem, głównie o 16 lub 18 atomach węgla (C16 lub C18), ulegają dalszej desaturacji i elongacji w długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. W procesach tych kluczową rolę odgrywają enzymatyczne białka błonowe zlokalizowane w retikulum endoplazmatycznym, tj. elongazy i desaturazy kwasów tłuszczowych, katalizujące reakcje odpowiednio wydłużania i wprowadzania podwójnych wiązań do łańcucha węglowodorowego, a więc bezpośrednio odpowiedzialne za profil lipidowy komórek. Element spajający stanowi tu czynnik transkrypcyjny w postaci białka wiążącego sekwencję odpowiedzi na sterole SREBP-1 (ang. *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*), którego aktywacja prowadzi do zwiększenia ekspresji genów kodujących zarówno desaturazy, jak i syntazę kwasów tłuszczowych, FAS (Biddinger i in. 2006).

Desaturazy kwasów tłuszczowych

Desaturazy kwasów tłuszczowych to grupa enzymów odpowiedzialna za wprowadzanie podwójnych wiązań (C=C) do cząsteczki kwasów tłuszczowych. Komórki kręgowców posiadają w swoich membranach $\Delta 5$, $\Delta 6$ oraz $\Delta 9$ -desaturazy kwasów tłuszczowych, podczas gdy $\Delta 12$ i $\Delta 15$ -desaturazy, obecne u mikroorganizmów, roślin i niektórych bezkręgowców, zostały utracone w toku ewolucji. Z tego powodu nie są one zdolne do syntezy kwasów linolowego, LA (C18:2n-6) oraz α -linolowego, ALA (C18:3n-3), które muszą dostarczać wraz z pokarmem. Dlatego też kwasy te określa się jako niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT, ang. *essential fatty acids*, EFA). Liczba

po symbolu „ Δ ” oznacza pozycję podwójnego wiązania (C=C) w łańcuchu węglowodorowym. Desaturazy można podzielić na dwie rodziny, a mianowicie stearoilo-CoA desaturazy (SCD; ang. *stearoyl-Coenzyme A desaturases*; Paton i Ntambi 2009) oraz desaturazy kwasów tłuszczowych (FADS; ang. *fatty acid desaturases*; Nakamura i Nara 2004).

Stearoilo-CoA desaturazy (SCD)

Stearoilo-CoA desaturaza ($\Delta 9$ -desaturaza kwasów tłuszczowych) jest 37-kDa enzymem wprowadzającym podwójne wiązanie w pozycję $\Delta 9$, licząc od grupy karboksylowej łańcucha węglowodorowego kwasów palmitynowego (C16:0) i stearynowego (C18:0), prowadząc do powstania jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA), odpowiednio z rodziny kwasów omeg-7, tj. kwasu palmitooleinowego (C16:1n-7) oraz z rodziny kwasów omeg-9, tj. kwasu oleinowego (C18:1n-9, Rycina 1). Jako pierwsza została oczyszczona i scharakteryzowana $\Delta 9$ -desaturaza (SCD-1), pochodząca z wątroby szczura (Strittmatter i in. 1974). Zlokalizowana jest ona w retikulum endoplazmatycznym (ER) i funkcjonuje razem z NADH, reduktazą flawinową cytochromu b_5 , cytochromem b_5 , będącym akceptorem elektronów, oraz z tlenem (Enoch i in. 1976; Strittmatter i Enoch 1978; Heinemann i Ozols 2003; Paton i Ntambi 2009). Enzym w swojej budowie strukturalnej posiada trzy miejsca bogate w histydynę zlokalizowane w pozycjach 119, 156 oraz 296, niezbędne do jego katalitycznej aktywności, których zadaniem jest przyłączenie żelaza wewnątrz miejsca aktywnego (Shanklin i in. 1994). Ponadto składa się on z czterech odcinków transmembranowych z końcami terminalnymi NH_2 oraz COOH skierowanymi do cytozolu (Man i in. 2006).

Obecnie, u myszy znane są cztery izoformy $\Delta 9$ -desaturazy kwasów tłuszczowych, tj. SCD-1, SCD-2, SCD-3 oraz SCD-4 (Kaestner i in. 1989; Zheng i in. 2001; Miyazaki i in. 2003), wykazujące odmienną specyficzność tkankową. SCD-1 występuje w tkance tłuszczowej oraz w wątrobie (Ntambi i in. 1988), SCD-2 w mózgu oraz w tkance nerwowej (Kaestner i in. 1989), SCD-3 w komórkach łojowych skóry, a także w gruczołach napletka (Zheng i in. 2001), a SCD-4 w sercu (Guillou i in. 2010). Wykazują one aż 80-85% homologii sekwencji aminokwasowej (Ntambi, 1999). Natomiast człowiek posiada zaledwie dwie izoformy tego enzymu, a mianowicie SCD-1, wykazującą uniwersalną obecność w tkankach oraz SCD-5, podlegającą ekspresji jedynie w mózgu i trzustce (Wang i in. 2005).

Desaturazy kwasów tłuszczowych (FADS)

Drugą grupę desaturaz stanowi rodzina FADS, do której zalicza się $\Delta 5$ -desaturazę (D5D, FADS1, ang. *fatty acids desaturase 1*) oraz $\Delta 6$ -desaturazę kwasów tłuszczowych (D6D, FADS2, ang. *fatty acids desaturase 2*). Enzymy te odpowiedzialne są za syntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) poprzez wstawianie podwójnych wiązań (C=C) w pozycje odpowiednio $\Delta 5$ i $\Delta 6$ łańcucha węglowodorowego.

$\Delta 5$ -Desaturaza to enzym składający się z 444 aminokwasów, zlokalizowany w retikulum endoplazmatycznym (ER). Jak udowodnili de Antueno i in. (2001) wykazuje on powinowactwo do substratów należących zarówno do rodziny kwasów tłuszczowych omega-3, jak i omega-6, a mianowicie do kwasu dihomo- γ -linolowego, DGLA (C20:3n-6) metabolizowanego do kwasu arachidonowego (C20:4n-6) oraz do kwasu C20:4n-3 przekształcanego do kwasu eikozapentaenowego, EPA (C20:5n-3). Katalizuje on również jedną reakcję na szlaku przemian kwasów omega-9, gdzie wstawia podwójne wiązanie w cząsteczkę kwasu C20:2n-9, na skutek czego powstaje kwas eikozatrienowy (C20:3n-9; Rycina 1).

$\Delta 6$ -Desaturaza myszy i człowieka to enzym o masie 52-kDa, składający się, podobnie jak D5D, z 444 aminokwasów, zlokalizowany w retikulum endoplazmatycznym (ER). Katalizuje on reakcje desaturacji kwasu linolowego, LA (C18:2n-6) do kwasu γ -linolenowego, GLA (C18:3n-6) oraz kwasu C24:4n-6 do kwasu C24:5n-6 w szlaku przemian kwasów omega-6, a także kwasu α -linolenowego, ALA (C18:3n-3) do kwasu C18:4n-3 oraz kwasu C24:5n-3 do kwasu C24:6n-3 w szlaku przemian kwasów omega-3 (de Antueno i in. 2001). Ponadto wykazuje powinowactwo do kwasu oleinowego (C18:1n-9), przekształcając go w kwas C18:2n-9 (Rycina 1).

Podobnie, jak w przypadku $\Delta 9$ -desaturazy (SCD), enzymy z rodziny FADS należą do systemu enzymatycznego składającego się z NADH-cytochromu *b*₅ reduktazy oraz cytochromu *b* (Strittmatter i in. 1974; Sprecher, 1981), jednakże odkryta niedawno domena cytochromu *b* w budowie strukturalnej $\Delta 6$ -desaturazy wskazuje na możliwość funkcjonowania tego enzymu niezależnie od niego (Cho i in. 1999).

Elongazy

Za wydłużanie łańcuchów kwasów tłuszczowych o długości łańcuchów węglowodorowych powyżej 16 atomów węgla odpowiada grupa enzymów zwana

elongazami (ELOVL, ang. *elongation of very long chain fatty acid*). Wprowadzają one zawsze dwa atomy węgla, przez co w organizmach żywych występują cząsteczki kwasów tłuszczowych o parzystej ich liczbie. Sam proces elongacji można podzielić na cztery etapy. Pierwszy z nich to kondensacja acetylo-CoA i malonylo-CoA do β -ketoacylo-CoA przeprowadzana przez odpowiednią elongazę (ELOVL). Następnie dochodzi do reakcji redukcji, wymagającej obecności NADPH, podczas której 3-ketoacylo-CoA reduktaza (KAR) przekształca β -ketoacylo-CoA w β -hydroksyacylo-CoA. Ten z kolei, w trzecim etapie ulega dehydratacji przeprowadzanej przez 3-hydroksyacylo-CoA dehydratazę (HADC) na skutek czego powstaje enoilo-CoA, ulegający w ostatnim etapie ponownej redukcji z udziałem trans-2,3-enoilo-CoA reduktazy (TER) do acylo-CoA wydłużonego o dwa atomy węgla. Wszystkie enzymy uczestniczące w procesie elongacji zlokalizowane są w błonie retikulum endoplazmatycznego (ER) i są ze sobą fizycznie powiązane (Nugteren, 1965; Cinti i in. 1992).

Obecnie u ssaków znanych jest siedem elongaz (ELOVL1-ELOVL7) różniących się powinowactwem do substratów, a mianowicie elongazy ELOVL1, ELOVL3, ELOVL6 i ELOVL7 preferują nasycone (SFA) oraz jednonienasycone (MUFA) kwasy tłuszczowe, podczas gdy elongazy ELOVL2, ELOVL4 i ELOVL5 selektywnie wybierają wielonienasycone kwasy tłuszczowe, co zostało przedstawione na Rycinie 1 (Leonard i in. 2000b; Tvrdik i in. 2000; Moon i in. 2001; Wang i in. 2005; Agbaga i in. 2008; Kitazawa i in. 2009; Tamura i in. 2009). Wszystkie elongazy myszy, szczura i człowieka posiadają w swej budowie strukturalnej kilka miejsc konserwatywnych, niezbędnych do ich enzymatycznej aktywności, takich jak motywy HxxHH, KxxExxDT, HxxMYxYY, czy TxxQxxQ (Tvrdik i in. 2000; Jakobsson i in. 2006; Denic i Weissman 2007), a w obrębie danego gatunku wykazują 30% podobieństwo sekwencji aminokwasowej (Leonard i in. 2004).

Białko wiążące sekwencję odpowiedzi na sterole (SREBP-1)

SREBP-1 (ang. *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*) jest czynnikiem transkrypcyjnym w postaci białka wiążącego sekwencję odpowiedzi na sterole, który poprzez aktywację kaskady enzymatycznej reguluje syntezę cholesterolu, kwasów tłuszczowych, triglicerydów oraz fosfolipidów (Eberlé i in. 2004). W swojej budowie strukturalnej zawiera motywy helisa-pętla-helisa-zamek leucynowy (bHLH-LZ, ang. *helix-loop-helix-leucine zipper*). Występuje w postaci nieaktywnego prekursora, składającego się

z 1150 aminokwasów i przyłączającego się do membran retikulum endoplazmatycznego (Hua i in. 1995a). Forma nieaktywna białka jest zorganizowana w trzy domeny. Pierwsza z nich, licząc od końca $-NH_2$, ma długość około 480 aminokwasów i zawiera część aktywacyjną, region bogaty w serynę i prolinę oraz motyw bHLH-LZ odpowiedzialny za przyłączanie DNA i dimeryzację. Kolejna domena to hydrofobowy, transmembranowy segment o długości około 30 aminokwasów, podczas gdy ostatnia, składająca się z około 590 aminokwasów, zawiera odcinek regulatorowy z końcem $-COOH$. Podczas aktywacji białka SREBP-1 uwalniana jest jedynie pierwsza, NH_2 -terminalna domena, przekształcająca się w formę nuklearną (nSREBP), która w dalszym etapie transportowana jest do jądra komórkowego, gdzie reguluje ekspresję wielu genów (Nagoshi i in. 1999; Nagoshi i Yoneda 2001; Lee i in. 2003) związanych m. in. z metabolizmem kwasów tłuszczowych.

Obecnie znane są trzy izoformy białka SREBP, a mianowicie SREBP-1a, SREBP-1c oraz SREBP-2, z czego pierwsze dwa kodowane są przez pojedynczy gen (Hua i in. 1995b) i wykazują 47% homologii w stosunku do trzeciego. Białko SREBP-2 odpowiada głównie za regulację ekspresji genów związanych z syntezą i metabolizmem cholesterolu, podczas gdy izoformy SREBP-1 przyłączają się do genów kodujących enzymy przemian kwasów tłuszczowych (Brown i Goldstein 1997), przy czym SREBP-1c aktywuje te geny głównie w komórkach wątroby (Horton i in. 2002). Do sekwencji, które są celami czynnika transkrypcyjnego SREBP-1c, należą geny kodujące następujące białka enzymatyczne: acetylo-CoA syntaza (Luong i in. 2000), acetylo-CoA karboksylaza (Magana i in. 1997), syntaza kwasów tłuszczowych (FAS; Magana i Osborne 1996), Δ^9 -desaturaza kwasów tłuszczowych (stearoilo-CoA desaturaza, SCD1; Tabor i in. 1999), jak również Δ^5 -desaturaza (FADS1, D5D) i Δ^6 -desaturaza kwasów tłuszczowych (FADS2, D5D; Rimoldi i in. 2001; Matsuzaka i in. 2002a; Nara i in. 2002).

Eksperymenty selekcyjne w badaniach zmienności organizmów

Badanie zmienności cech pomiędzy różnymi gatunkami, czy też całymi grupami systematycznymi zwierząt nie nastęrcza obecnie większych trudności. Spowodowane jest to głównie dużymi różnicami wartości danej cechy, która jest wynikiem odmiennej drogi ewolucyjnej. Problemy pojawiają się natomiast na poziomie wewnątrzgatunkowym, gdzie spektrum zmienności znacznie się zawęża. Z pomocą przychodzą wówczas badaczom

eksperymenty selekcyjne z tzw. doбором sztucznym (sztuczną selekcją). Polegają one na pomiarze konkretnej cechy, a do kojarzeń wybierane są jedynie osobniki przeznaczone do wyprowadzenia następnego pokolenia o skrajnych jej wartościach (Koteja, 2009). Oznacza to, że w relatywnie krótkim czasie można uzyskać linie, charakteryzujące się pożądaną cechą, której zakres zmienności byłby niemożliwy do zaobserwowania w naturze. Eksperymenty selekcyjne mają tę przewagę nad badaniami w warunkach naturalnych, że oprócz samej procedury eksperymentalnej, pod kontrolą badacza pozostają wszystkie pozostałe czynniki, niemożliwe do przewidzenia w warunkach środowiska naturalnego. Takie selekcyjne modele można następnie wykorzystać w eksperymentach dotyczących mechanizmów ewolucyjnych (Konarzewski i in. 2005; Gębczyński i Konarzewski 2009), czy w identyfikacji na poziomie molekularnym genów odpowiedzialnych za obserwowane różnice na poziomie organizmalnym, także te, dotyczące cech ilościowych (QTL, ang. *quantitative trait loci*; Houle-Leroy i in. 2003; Nehrenberg i in. 2009). Eksperymenty te nie są niestety pozbawione pewnych wad utrudniających interpretację uzyskanych wyników. Podstawowym i często niezwykle poważnym ograniczeniem jest niewielka liczba osobników w hodowli w każdym pokoleniu, spowodowana ograniczeniami fizycznymi i organizacyjnymi zwierzątarni. W efekcie, oprócz selekcji sztucznej, niebagatelną rolę w takich eksperymentach odgrywa dryf genetyczny, którego działanie wzmacnia się z każdym kolejnym pokoleniem, mogąc maskować efekty selekcji lub je całkowicie zaburzać. Inny ważny aspekt, to konieczność replikacji, czyli przeprowadzenie eksperymentu selekcyjnego w kilku powtórzeniach, by wyeliminować błąd stochastyczny oraz utrzymywanie linii kontrolnych, gdzie zwierzęta kojarzone są zupełnie losowo.

Wewnątrzgatunkowa weryfikacja teorii metronomu błonowego na poziomie molekularnym

Jednym z centralnych problemów badawczych ekologii fizjologicznej jest ustalenie ewolucyjnych mechanizmów zróżnicowania tempa metabolizmu podstawowego (BMR) zwierząt. Nie ulega wątpliwości, iż na poziomie międzygatunkowym jest to cecha wysoce zmienna (Benett i Ruben 1979; Hulbert i Else 1989; Else i in. 2004), jednak na poziomie osobniczym w obrębie jednego gatunku, spektrum tej zmienności zdecydowanie zawęża się. Przyczyny zróżnicowania tempa metabolizmu na poziomie międzygatunkowym opisuje powszechnie przyjęta i uznawana teoria metronomu błonowego (ang. *membrane*

pacemaker, Hulbert i Else 1999), zgodnie z którą tempo metabolizmu zależy od składu lipidowego błon komórkowych.

Jako bardzo ważny komponent fosfolipidów budujących błony komórkowe, kwasy tłuszczowe wpływają na metabolizm komórek i w konsekwencji na BMR całego organizmu poprzez regulację płynności membran biologicznych, modulując przepływ jonów przez kanały jonowe (Chyb i in. 1999; Xiao i in. 2001) oraz aktywując związane z błonami enzymy, które są wrażliwe na biofizyczne właściwości lipidów (Goldberg i Zidovetzki 1997). Mimo, iż w bardzo licznych eksperymentach porównywano skład lipidowy błon komórkowych zwierząt różniących się tempem metabolizmu podstawowego na poziomie międzygatunkowym (Hulbert i Else 1989; Hulbert i in. 2002a; 2002b; Else i in. 2004), to rola kwasów tłuszczowych, zwłaszcza tych wielonienasyconych (PUFA), w kontroli BMR nie została nadal wyjaśniona na poziomie wewnątrzgatunkowym. Jednym z powodów zaistniałej sytuacji jest fakt, iż zakres zmienności takiej cechy fizjologicznej jak BMR jest znacznie węższy pomiędzy osobnikami należącymi do tego samego gatunku w porównaniu do różnic międzygatunkowych, a mechanizmy warunkujące obserwowaną zmienność mogą być znacznie subtelniejsze. W takich okolicznościach najlepszym rozwiązaniem jest zastosowanie jako obiektu badań zwierząt, pochodzących ze sztucznych eksperymentów selekcyjnych, które manipulują frekwencją genów bezpośrednio związanych z badaną cechą (Garland, 2002). Opisane wcześniej badania nad zmiennością tempa metabolizmu podstawowego (BMR) na poziomie wewnątrzgatunkowym (Brzęk i in. 2007) wykazały różnice w BMR, jak również w składzie lipidowym błon komórkowych (kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów) między liniami myszy selekcionowanymi na niskie i wysokie tempo metabolizmu podstawowego, sugerując, że obserwowana zmienność była na tyle duża, iż można ją wytłumaczyć działaniem selekcji, a nie wpływem dryfu genetycznego. Badania te przeprowadzono jednak na poziomie fenotypu, a nie genotypu i dlatego też nie wskazywały bezpośredniego źródła obserwowanej zmienności.

Przyczyn obserwowanych powyżej różnic dopatrywać się można ponadto we wrażliwości błon komórkowych na peroksydację. Jak zauważyli Valencak i Ruf (2007) wysoki udział kwasów PUFA w membranach biologicznych zwiększa podatność tych struktur na działanie wolnych rodników, posiadających szczególne powinowactwo do wiązań podwójnych pomiędzy atomami węgla, co w konsekwencji może prowadzić do ich degradacji.

A zatem, mimo iż teoria metronomu błonowego potwierdza się na poziomie porównań między różnymi gatunkami, czy wręcz gromadami kręgowców, to w obrębie gatunku

zwierząt stałocieplnych jej przewidywania mogą być niespełnione ze względu na negatywne skutki wzmożonego działania wolnych rodników. Co więcej, mechanizmy warunkujące zróżnicowanie tempa metabolizmu podstawowego na poziomie wewnątrzgatunkowym pozostają ciągle niewyjaśnione i, jak do tej pory, były badane tylko sporadycznie. W celu weryfikacji teorii metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) na poziomie wewnątrzgatunkowym niezbędnie jest zgromadzenie kompletnych danych, dotyczących profilu lipidowego błon komórkowych, polimorfizmu i ekspresji genów, kodujących enzymy odpowiedzialne za ten profil (desaturazy i elongazy kwasów tłuszczowych), a także ich aktywności oraz wyznaczenie indeksów peroksydacji (IP), nienasyceń (IU) i saturacji (IS) membran biologicznych z jednoczesnym oznaczeniem aktywności pompy sodowo-potasowej u osobników różniących się tempem metabolizmu podstawowego (BMR).

Hipotezy badawcze

Uwzględniając dotychczasową wiedzę na temat mechanizmów potencjalnie odpowiedzialnych za zróżnicowanie tempa metabolizmu podstawowego (BMR) między osobnikami selekcjonowanymi myszy laboratoryjnej, których dotyczy niniejsza rozprawa doktorska, postawiłam następujące hipotezy badawcze:

HIPOTEZA 1: Prawidłowości opisane w teorii metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999), które odnoszą się do porównań międzygatunkowych, mogą również występować na poziomie osobniczym.

HIPOTEZA 2: Międzyosobnicze różnice w profilu lipidowym błon komórkowych są spowodowane polimorfizmem i/lub odmienną ekspresją w genach kodujących enzymy szlaku przemian kwasów tłuszczowych. Skutkuje to odmiennymi wartościami indeksów saturacji (IS) i nienasylenia (IU) membran biologicznych, co prowadzi do zróżnicowania tempa metabolizmu podstawowego (BMR).

HIPOTEZA 3: Re-aranżacja składu kwasów tłuszczowych w membranach biologicznych może jednocześnie skutkować zróżnicowaną podatnością błon komórkowych na peroksydację.

HIPOTEZA 4: W sztucznych selekcjach eksperymentalnych działa dryf genetyczny, który zmieniając losowo frekwencję alleli może maskować efekty selekcji.

Cele pracy

W niniejszej rozprawie doktorskiej sformułowałam następujące cele, które mają służyć weryfikacji stawianych hipotez:

- CEL 1:** Weryfikacja teorii metronomu błonowego na poziomie wewnątrzgatunkowym, przeprowadzona metodami biologii molekularnej:
- ✓ zidentyfikowanie polimorfizmów sekwencji genów kodujących enzymy szlaku przemian kwasów tłuszczowych u osobników pochodzących z selekcyjnych linii myszy laboratoryjnych (*Mus musculus*) różniących się tempem metabolizmu podstawowego (BMR),
 - ✓ określenie wpływu genotypu na profil lipidowy,
 - ✓ określenie wpływu genotypu na tempo metabolizmu podstawowego (BMR),
 - ✓ oznaczenie stopnia ekspresji genów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych i sprawdzenie, czy ma on wpływ na profil lipidowy i tempo metabolizmu podstawowego (BMR),
 - ✓ oznaczenie aktywności enzymów metabolizmu lipidów, kodowanych przez różne, zidentyfikowane warianty genów polimorficznych,
 - ✓ przetestowanie, czy geny kodujące enzymy szlaku przemian kwasów tłuszczowych są pod wpływem selekcji prowadzonej w kierunku niskiego (L-BMR) i wysokiego (H-BMR) tempa metabolizmu podstawowego,
 - ✓ określenie różnic w aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) pomiędzy badanymi liniami selekcyjnymi myszy.
- CEL 2:** Zbadanie ograniczeń ewolucyjnych związanych z płynnością błon komórkowych i wzmożonym stresem oksydacyjnym występującym u gatunku charakteryzującego się wysokim tempem metabolizmu podstawowego (BMR):
- ✓ zweryfikowanie hipotezy, że myszy posiadające wyższe tempo metabolizmu podstawowego (H-BMR) posiadają niższą wartość indeksu saturacji (IS) i wyższą indeksu nienasylenia (IU) błon komórkowych, które w konsekwencji są bardziej podatne na peroksydację.

CEL 3: Określenie sił doboru naturalnego i dryfu genetycznego działających w sztucznie prowadzonej selekcji w kierunku niskiego i wysokiego tempa metabolizmu podstawowego (BMR) u myszy laboratoryjnej (*Mus musculus*).

MATERIAŁ I METODY

Obiekt badań

Mysz laboratoryjna (*Mus musculus*, Linn.) jest małym ssakiem, należącym do rzędu gryzoni (*Rodentia*), hodowanym i wykorzystywanym w badaniach naukowych, głównie z dziedziny genetyki, psychologii, medycyny, czy fizjologii. Historia hodowli gatunku sięga przełomu XIX i XX wieku, kiedy to zaczęto udomawiać myszy na terenie Azji i Japonii, a później także w Europie i Ameryce Północnej. Pierwszy szczep myszy laboratoryjnej powstał w Stanach Zjednoczonych w 1907 roku, kiedy to Clarence Cook Little wyselekcjonował inbredowy szczep DBA (ang. *Dilute, Brown and non-Agouti*). Liczne, późniejsze krzyżówki doprowadziły do powstania wielu szczepów myszy laboratoryjnych, których genom stanowi obecnie mieszanka czterech wyodrębnionych podgatunków, tj. *Mus musculus domesticus*, *Mus musculus musculus*, *Mus musculus castaneus* oraz *Mus musculus molossinus* (Wade i in. 2002).

Mysz laboratoryjna jest obiektem licznych badań i obok takich gatunków jak drożdże piekarskie (*Saccharomyces cerevisiae*), nicienie (*Caenorhabditis elegans*), muszka owocowa (*Drosophila melanogaster*), danio pręgowany (*Danio rerio*), rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*), czy żaba szponiasta (*Xenopus laevis*), jest organizmem modelowym. Do cech, którymi musi charakteryzować się taki obiekt badań należą m. in. łatwość i niski koszt hodowli, stosunkowo wysoka płodność, prosty sposób rozmnażania, krótki cykl życiowy, przy relatywnie wysokiej liczbie potomstwa, łatwość manipulacji w warunkach laboratoryjnych oraz znajomość pełnego genomu. Mysz laboratoryjna spełnia wszystkie powyższe warunki. Zwierzęta te osiągają dojrzałość płciową po 4 tygodniach, a średnia długość życia w warunkach hodowlanych to od 1,3 do 3 lat. Ciąża trwa od 19 do 21 dni, a po tym czasie w miocie pojawia się średnio od 1 do 10 młodych. Pełny genom myszy laboratoryjnej został zsekwencjonowany w 2002 roku przy użyciu szczepu C57BL/6 (Chinwalla i in. 2002). Na podkreślenie zasługuje to, że mimo dość dawnego rozdzielenia się myszy od ludzi w toku ewolucji od wspólnego przodka, które szacuje się na okres od 75 do 100 milionów lat temu, DNA myszy jest w około 85% identyczne z genomem ludzkim, a zaledwie 1% mysich genów nie ma swoich homologów u człowieka, co czyni je idealnym modelem w badaniach chorób ludzi.

Eksperyment selekcyjny

Do weryfikacji postawionych w pracy hipotez wykorzystałam myszy laboratoryjne pochodzące z eksperymentu selekcyjnego prowadzonego w Instytucie Biologii Uniwersytetu w Białymstoku przez Zakład Ekologii Zwierząt. Selekcja ta jest dwustronna, prowadzona zarówno w kierunku niskiego (L-BMR) jak i wysokiego tempa metabolizmu podstawowego (H-BMR), mierzonego w strefie termoneutralnej (31°C) u 3-miesięcznych myszy, będących na czczo i w spoczynku. Osobniki o najwyższym i najniższym poziomie BMR kojarzone są ze sobą w obrębie linii w celu uzyskania następnego pokolenia. Kojarzenie odbywa się na zasadzie unikania wsobności, tj. nie krzyżuje się rodzeństwa, a wśród 35 rodzin rodzice zawsze pochodzą ze wszystkich rodzin poprzedniego pokolenia, które dożyły do okresu reprodukcji, przy czym do rozrodu z każdej rodziny wybiera się nie więcej niż 3 osobniki obu płci.

Dużym utrudnieniem w prawidłowej interpretacji uzyskiwanych wyników badań, wykorzystujących zwierzęta pochodzące z powyższego eksperymentu selekcyjnego jest brak prowadzonych równoległe linii kontrolnych. Problem ten zniwelowałam do pewnego stopnia, przeprowadzając wszystkie analizy, nie tylko u myszy z linii selekcjonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-NMR) tempo metabolizmu podstawowego, lecz również dla trzech linii myszy szczepu Swiss-Webster nieselekcjonowanych na żadną cechę (US1, US2 i US3), stanowiących kontrolę dla odrębnego eksperymentu selekcyjnego. Zwierzęta te były również kojarzone losowo, z unikaniem wsobności, tj. nie krzyżuje się rodzeństwa, a wśród nowych 15 rodzin rodzice muszą pochodzić z co najmniej 10 poprzednich, w obrębie 3 niezależnych replikacji.

Materiał do badań i liczebność prób

Do badań wykorzystałam 61 samców (N=61) myszy laboratoryjnej, pochodzących z linii selekcjonowanej na niskie tempo metabolizmu podstawowego (L-BMR) oraz 59 samców (N=59) z linii wysokometabolicznej (H-BMR) w 32 pokoleniu (F32). Do analiz porównawczych, jak wspomniałam powyżej, użyłam także 36 samców z trzech linii nieselekcjonowanych na żadną cechę w przeciągu 16 pokoleń (F16): US1 (N=12), US2 (N=13) i US3 (N=11). Łącznie w eksperymencie wykorzystałam 156 myszy, z czego 120 pochodziło z eksperymentu selekcyjnego w pokoleniu F32, a 36 z linii nieselekcyjnych w pokoleniu F16.

Wszystkie procedury oraz analizy wykonane na wykorzystywanych w eksperymencie zwierzętach zostały przeprowadzone zgodnie z pozwoleniem Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku (nr pozwolenia: 4/2009 oraz 5/2010).

Dodatkowo, w celu oszacowania poziomu działania dryfu genetycznego, wykorzystałam tkanki 78 samców, pochodzących z linii selekcyjowanej na niskie (N=40) i wysokie (N=38) tempo metabolizmu podstawowego z pokolenia 22 (F22).

Wykorzystanie w badaniach jedynie samców nie było przypadkowe. Przede wszystkim uniknęłam nieprawidłowej interpretacji obserwowanych zależności wynikających z różnic pomiędzy płciami. Z drugiej strony, analizowane zwierzęta nie były obciążone dużymi kosztami związanymi z okresem ciąży, laktacji i opieki nad potomstwem, co mogłoby również wpłynąć na wyniki, szczególnie te związane z gospodarką tłuszczową organizmu oraz aktywnością białek enzymatycznych.

Analizy fizjologiczne

Pomiar tempa metabolizmu podstawowego (BMR)

Pomiary tempa metabolizmu podstawowego (BMR) przeprowadziłam przy użyciu zestawu respirometrycznego firmy Sable Systems w układzie otwartym. Poprawność wykonanych analiz gwarantowało spełnienie trzech podstawowych warunków, tj. zwierzęta nie wydatkowały energii na dodatkowe procesy fizjologiczne, takie jak termoregulacja, koszty energetyczne związane z trawieniem i obróbką spożytego pokarmu oraz poruszaniem się. Myszy podczas całej procedury pomiarowej pozostawały więc na czczo, były przetrzymywane w strefie temperatury termoneutralnej, a także przebywały w spoczynku.

Samce w wieku od 12 do 16 tygodnia życia, które na kilka godzin przed rozpoczęciem pomiarów były pozbawiane pokarmu, pozostawiając jedynie nieograniczany dostęp do wody, ważyłam z dokładnością do 0,1 g., a następnie umieszczałam pojedynczo w szczelnej komorze metabolicznej o objętości 350 ml. Komorę zanurzałam w wodzie o temperaturze 32°C, stabilizowanej z dokładnością do 0,2°C przy pomocy łaźni wodnej. W trakcie 3-godzinnego pomiaru przez komorę przepływało powietrze w ilości 400 ml/min, a jego próbki kierowane były poprzez multiplekser na analizator. Za poziom tempa

metabolizmu odpowiadającemu BMR uznawałam odczyt koncentracji tlenu stabilny w zakresie 0,01 %, utrzymujący się w czasie co najmniej 4 minut, co sugerowało, iż zwierzę w tym okresie pozostawało w spoczynku. Taki dobór warunków i kryteriów pomiarowych gwarantował ich wysoką powtarzalność i został wielokrotnie sprawdzony w trakcie prowadzenia eksperymentów bazujących na sztucznej selekcji (Książek i in. 2004).

Pobieranie materiału do badań

Ze względu na analizę genów jądrowych posiadających, jak u wszystkich *Eucariota*, liczne introny oraz na zaplanowane badanie ekspresji tych genów, w eksperymencie wykorzystałam sekwencje cDNA pozbawione intronów, uzyskane metodą RT-PCR. Do przeprowadzenia reakcji PCR z zastosowaniem RT polimerazy niezbędna była izolacja RNA z tkanek, w których badane geny ulegają ekspresji (tj. z wątroby). Dlatego też konieczne było uśmiercenie badanych zwierząt poprzez dyslokację rdzenia kręgowego. Następnie fragment świeżej wątroby o masie ok. 500 mg pobierałam do wolnej od RNaz fiolki Eppendorfa za pomocą sterylnego skalpela i bezpośrednio zanurzałam w płynie zabezpieczającym przed degradacją RNA (*RNAlater*, Qiagen). Natychmiastowa stabilizacja RNA w materiale biologicznym jest jednym z głównych warunków udanej izolacji RNA, ale także jest niezbędna do uzyskania prawidłowych wyników reakcji real-time PCR. Uśmiercenie zwierzęcia prowadzi bowiem do specyficznej lub niespecyficznej degradacji RNA oraz do zmian w ekspresji genów. Użycie *RNAlater* Stabilization Reagent (Qiagen) gwarantuje prawidłową stabilizację i ochronę komórkowego RNA w tkankach zwierzęcych. Tak zabezpieczona próba była przechowywana w temperaturze -20°C do momentu izolacji RNA.

W celu analizy krótszych fragmentów DNA, zawierających jedynie miejsca polimorficzne zidentyfikowane przeze mnie w sekwencjach cDNA w toku przeprowadzanych badań, pobrałam również materiał do izolacji DNA genomowego (gDNA). Przy użyciu sterylnego, jednorazowego skalpela pobrałam końce ogonów, odcinając fragmenty o długości od 0,5 do 1 cm, które następnie umieściłam w jałowych fiolkach Eppendorfa przetrzymywanych w temperaturze -20°C do chwili dalszych analiz.

Do analiz biochemicznych od każdej myszy pobierałam jeden z płatów wątroby. Tkanekę natychmiast przenosiłam do fiolek Eppendorfa, którą następnie zanurzałam w

ciekłym azocie. Tak zamrożone próby przetrzymywałam w temperaturze -80°C do momentu dalszych analiz.

Analizy genetyczne

Izolacja RNA

Izolację całkowitego RNA przeprowadziłam przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit firmy Qiagen (Hilden, Niemcy). Wchodzące w skład kitu kolumny ze złożem krzemionkowym oraz specjalne bufony pozwalają na związanie z membraną aż do 100 μg RNA dłuższego niż 200 nukleotydów. Ostatecznie skutkuje to izolacją całkowitego mRNA, ponieważ nici RNA krótsze niż 200 nukleotydów, do których należą 5.8S rRNA, 5S rRNA i tRNA, obejmujące razem 15 – 20% całkowitego RNA, nie przyłączają się do membrany.

Próbki wątroby o masie 15 mg poddałam lizie i homogenizacji z wykorzystaniem automatycznego homogenizatora BioGen PRO200 (PRO Scientific, USA) oraz zestawu wymiennych, autoklawowalnych końcówek homogenizujących Multi Gen-7 (PRO Scientific, USA) w obecności wysoce denaturującego buforu RLT, zawierającego izotiocyanian guanidyny (GITC), który natychmiast unieruchamia RNazy, co zapobiega degradacji RNA. Tak uzyskane homogenaty wirowałam 3 minuty przy 13200 obr./min. (Eppendorf Centrifuge 5415D, rotor F45-24-11). Supernatant, tj. płyn nad osadu, odpipetowałam do nowych fiolek Eppendorfa, do których następnie dodawałam 600 μl 70% alkoholu etylowego. Całość, po delikatnym wymieszaniu, przenosiłam na kolumny i wirowałam 15 sekund przy 10000 obr./min. W dalszym etapie związane ze złożem krzemionkowym kolumny RNA przepłukiwałam kolejno 700 μl buforu RW1, 500 μl buforu RPE, za każdym razem wirując 15 sekund przy 10000 obr./min. oraz 500 μl buforu RPE wirując 2 minuty przy 10000 obr./min. Ostatnim etapem izolacji było wypłukanie związanego z membraną kolumny RNA. W tym celu umieściłam kolumny w nowych, 1,5 ml fiolkach Eppendorfa, dodałam 30 μl wody wolnej od RNaz i wirowałam minutę przy 10000 obr./min.

Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

Bezpośrednio po izolacji RNA przeprowadziłam reakcję odwrotnej transkrypcji przy pomocy zestawu Omniscript Reverse Transcription firmy Qiagen (Hilden, Niemcy), w celu uzyskania cDNA, znacznie stabilniejszego niż RNA. W skład mieszaniny reakcyjnej o końcowej objętości 20 μl wchodziły 2 μl buforu RT (10x), 2 μl mieszaniny dNTP [5 mM], 1 μl enzymu RT, 1 μl inhibitora RNase [10 U/ μl , Promega], 2 μl startera oligo(dT)₁₈ [0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Genomed], 11 μl wolnej od RNaz wody oraz 1 μl próby RNA. Wszystkie etapy protokołu reakcji odwrotnej transkrypcji wykonywałam na lodzie, co znacznie zmniejszało ryzyko degradacji RNA przez RNazy. Reakcje RT przeprowadzałam przez 60 minut w termobloku (DIGI-BLOCK[®]JR, Laboratory Devised INC, USA) nagrzanym do temperatury 37°C. Otrzymane w ten sposób próby cDNA przechowywałam w temperaturze -20°C do momentu dalszych analiz.

Izolacja DNA

Izolację genomowego DNA (gDNA) przeprowadziłam z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology), opartego o technikę kolumnową, wykorzystującą zjawisko wiązania się DNA do złożów krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Wszystkie etapy wykonałam zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Za materiał wyjściowy posłużyły mi końce ogonów o długości 0,5 cm, które po rozmrożeniu poddałam trawieniu i lizie w roztworze zawierającym 100 μl buforu Tris, 50 μl niejonowego detergentu, w postaci uniwersalnego buforu lizującego LT oraz 20 μl roztworu Proteinyzy K, trawiącego białka komórkowe. Próby wymieszane przez worteksowanie (tecnoKartell TK3S) inkubowałam w temperaturze 50°C (Thermo Shaker Biosan TS-100) do momentu całkowitego strawienia tkanki, tj. do uzyskania jednorodnego homogenatu, co trwało zwykle około 4 godzin. W kolejnym etapie do prób dodawałam 150 μl buforu LT, intensywnie worteksowałam przez 20 sekund, po czym wirowałam przez 3 minuty przy 13200 obr./min. (Eppendorf Centrifuge 5415D, rotor F45-24-11). Pobrany supernatant przenosiłam na mikrokolumny ze złożem krzemionkowym, a następnie wirowałam minutę przy 13200 obr./min. Na tym etapie DNA wiązało się ze złożem kolumny, jednakże wymagało dalszego oczyszczenia. W tym celu przemywałam dwukrotnie mikrokolumnę roztworem płuczającym A1 dodając kolejno 500 μl i 400 μl za każdym razem odwirowując próby przez jedną i dwie minuty

przy 13200 obr./min. Końcowym etapem było uwolnienie oczyszczonego DNA ze złoża krzemionkowego poprzez dodanie na umieszczoną w nowej fiolce Eppendrofa kolumnę 150 µl roztworu Tris, ogrzanego uprzednio do temperatury 75°C i wirowanie przez minutę przy 13200 obr./min. Tak wyizolowane genomowe DNA przechowywałam w temperaturze -20°C do momentu dalszych analiz.

Wybór genów do analiz

Do analiz wybrałam geny kodujące enzymy metabolizmu kwasów tłuszczowych, odpowiedzialne za syntezę jednonienasyconych (MUFA) oraz wielonienasyconych (PUFA) kwasów tłuszczowych, ulegające ekspresji w wątrobie myszy domowej, tj. desaturazy (geny *Scd1*, *Fads1* i *Fads2*, kodujące odpowiednio Δ9-desaturazę, Δ5-desaturazę oraz Δ6-desaturazę kwasów tłuszczowych) i elongazy (geny *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5*, *Elovl6*, kodujące odpowiednio elongazy ELOVL1, ELOVL2, ELOVL3, ELOVL5, ELOVL6), a także gen białka regulatorowego SREBP-1c (*Srebf1*). Charakterystyka wszystkich zsekwencjonowanych genów została zebrana w Tabeli 1.

Geny kodujące desaturazy kwasów tłuszczowych

Scd1

Δ9-Desaturaza kwasów tłuszczowych (stearoilo-CoA desaturaza, SCD-1c), odpowiedzialna za syntezę jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA), kodowana jest przez gen *Scd1* (ang. *stearoyl-Coenzyme A desaturase 1*, *SCD*, *Scd-1*). Po raz pierwszy został on sklonowany u szczura (Thiede i in. 1986), a następnie u myszy (Ntambi i in. 1988). Poznano również odpowiednik tego genu u człowieka, który okazał się wysoce homologiczny w porównaniu do mysiego (Zhang i in. 1999). Obecnie w bazie GenBanku zdeponowane są jego odpowiedniki dla człowieka (*Homo sapiens*; nr GenBanku: NM_005063), szczura (*Rattus norvegicus*; nr GenBanku: NM_139192), szympansa zwyczajnego (*Pan troglodytes*; nr GenBanku: XP_001168563), makaka (*Macaca mulatta*; nr GenBanku: XP_001107910), bydła (*Bos taurus*; nr GenBanku: NM_173959), psa (*Canis lupus familiaris*; nr GenBanku: XP_543968), kury (*Gallus gallus*; nr GenBanku: NM_204890) oraz danio pręgowanego (*Danio rerio*; nr GenBanku: NM_001020705). Gen *Scd1* znajduje się na 19 chromosomie w genomie myszy, a

dokładnie na 37,98 cM (44394451 – 44407709 par zasad). Jego długość to 13259 nukleotydów, z czego jedynie sekwencje składające się na sześć egzonów o łącznej długości 1068 nukleotydów przepisywane są na mRNA. W wyniku procesu translacji powstaje białko liczące 355 aminokwasów. Ekspresja tego genu wykazuje najwyższy poziom w tkance tłuszczowej i wątrobie zwierząt będących na diecie bogatej w węglowodany (Ntambi i in. 1988).

Fads1

Gen kodujący $\Delta 5$ -desaturazę kwasów tłuszczowych (D5D; FADS1), biorącą udział w syntezie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) to *Fads1* (ang. *fatty acid desaturase 1*). Został on z powodzeniem sklonowany u człowieka (Cho i in. 1999a, Leonard i in. 2000a), szczura (Zolfaghari i in. 2001) i myszy (Matsuzaka i in. 2002a). Obecnie w bazie GenBanku zdeponowane są mysie homologii tego genu dla człowieka (*H. sapiens*; nr GenBanku: NM_013402), szczura (*R. norvegicus*; nr GenBanku: NM_053445), szympansa zwyczajnego (*P. troglodytes*; nr GenBanku: XP_001150290), bydła (*B. taurus*; nr GenBanku: XP_612398), psa (*C. lupus familiaris*; nr GenBanku: XP_005631706) oraz kury (*G. gallus*; nr GenBanku: XP_421052). W genomie myszy domowej gen *Fads1* znajduje się na 6,54 cM chromosomu 19 (10182888 – 10196870 par zasad), a jego długość to 13983 nukleotydów, przy czym niecałe 10%, tj. 1344 nukleotydów stanowią egzony w liczbie 12, kodujące enzym składający się z 447 aminokwasów. Za ekspresję tego genu w komórkach eukariotycznych odpowiada białko regulatorowe SREBP-1c oraz peroksymalny receptor aktywujący proliferację (PPAR, ang. *peroxisome proliferator-activated receptors*) (Cho i in. 1999a).

Fads2

$\Delta 6$ -Desaturaza kwasów tłuszczowych (D6D; FADS2), podobnie jak D5D katalizująca reakcje prowadzące do syntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), kodowana jest przez gen *Fads2* (ang. *fatty acid desaturase 2*). Po raz pierwszy został on sklonowany u sinicy z rodzaju *Synechocystis* (Reddy i in. 1993), a następnie u nicieni z gatunku *Caenorhabditis elegans* (Napier i in. 1998) i ogórecznika lekarskiego (*Borage officinalis*; Sayanova i in. 1997), co w dalszej kolejności pozwoliło na poznanie jego sekwencji u myszy i człowieka (Cho i in. 1999b) oraz szczura (Aki i in. 1999). W bazie

GenBanku zdeponowano dotychczas homologii genu *Fads2* dla człowieka (*H. sapiens*; nr GenBanku: NM_004265), szczura (*R. norvegicus*; nr GenBanku: NM_031344), szympansa zwyczajnego (*P. troglodytes*; nr GenBanku: XP_508482), makaka (*M. mulatta*; nr GenBanku: NM_001194717), bydła (*B. taurus*; nr GenBanku: NM_001083444), psa (*C. lupus familiaris*; nr GenBanku: XP_005631707), kury (*G. gallus*; nr GenBanku: NM_001160428), czy danio pręgowanego (*D. rerio*; nr GenBanku: NM_131645). Gen *Fads2* leży w bliskim sąsiedztwie z genem *Fads1*, tj. na 6,36 cM (10138654 – 10175993 par zasad) chromosomu 19, tworząc z nim wspólny klaster. Również identyczna liczba oraz podobieństwo organizacji intronów i egzonów obu genów wskazują na ich ewolucyjne pochodzenie od wspólnej sekwencji ancestralnej (Marquardt i in. 2000). Analogicznie zlokalizowane są homologiczne geny człowieka na chromosomie 11, wykazując 75% podobieństw sekwencji (Leonard i in. 2000). Mysi gen *Fads2* składa się z 37340 par zasad, 12 egzonów o łącznej długości 1335 par zasad, kodujących białko, na które składają się 444 aminokwasy. Podobnie, jak w przypadku genu *Fads1* jego ekspresja jest regulowana przez białko regulatorowe SREBP-1c oraz peroksymalny receptor aktywujący proliferację, PPAR (Cho i in. 1999a).

Geny kodujące elongazy kwasów tłuszczowych

Elov11

Gen *Elov11* (ang. *elongation of very long chain fatty acids 1*; *Ssc1*) znajduje się na 54,61 cM (118428093 – 118432953 par zasad) na czwartym chromosomie w genomie myszy, a jego długość to 4821 par zasad, z czego odcinek kodujący, na który składa się sześć egzonów, liczy sobie 609 nukleotydów. Tym samym, powstające w procesie translacji białko zawiera 202 aminokwasy. *Elov11* został zidentyfikowany jako ssaczy odpowiednik genu *Elo3/sur4* u drożdży (Oh i in. 1997; Tvrdik i in. 2000). Jak do tej pory poznano homologiczne sekwencje tego genu u człowieka (*H. sapiens*; nr GenBanku: NM_022821.3), szczura (*R. norvegicus*; nr GenBanku: NM_001044275.1), szympansa zwyczajnego (*P. troglodytes*; nr GenBanku: XP_001173591.1), makaka (*M. mulatta*; nr GenBanku: NM_001261559.1), bydła (*B. taurus*; nr GenBanku: NM_001034703.2), psa (*C. lupus familiaris*; nr GenBanku: XP_003639577.1), kury (*G. gallus*; nr GenBanku: NM_001012598.1), czy danio pręgowanego (*D. rerio*; nr GenBanku: NM_001005989.3). Gen *Elov11* ulega ekspresji we wszystkich tkankach, przez co enzym ELOVL1 uznawany

jest za „elongazę metabolizmu podstawowego” (ang. *housekeeping elongase*), a jego ekspresja nie zależy od takich czynników jak PPAR α , wątrobowy receptor X (LXR, ang. *Liver X Receptor*), białko regulatorowe SREBP-1c, czy implementacja pokarmu (Wang i in. 2006).

Elovl2

Na 20,38 cM (41182495 – 41220405 par zasad) chromosomu 13 w genomie myszy zlokalizowany jest gen *Elovl2* (ang. *elongation of very long chain fatty acids 2; Ssc2*) o długości 38021 par zasad, przy czym odcinek kodujący, składający się z 8 egzonów to łącznie 879 nukleotydów, przepisywanych w procesie translacji na język 282 aminokwasów. *Elovl2* został zidentyfikowany jako *Ssc2* (sekwencja podobna do *cig30-2*; ang. *sequence similarity to cig30-2*) w oparciu o homologię do genu *Elovl3* (Tvrđik i in. 2000). W bazie GenBanku zdeponowano do tej pory homologi tego genu dla człowieka (*H. sapiens*; nr GenBanku: NM_017770.3), szczura (*R. norvegicus*; nr GenBanku: NM_001109118), szympansa zwyczajnego (*P. troglodytes*; nr GenBanku: XP_001175069), makaka (*M. mulatta*; nr GenBanku: XP_001091337), bydła (*B. taurus*; nr GenBanku: NM_001083517), psa (*C. lupus familiaris*; nr GenBanku: XP_005640091), kury (*G. gallus*; nr GenBanku: NM_001197308), czy danio pręgowanego (*D. rerio*; nr GenBanku: NM_001040362). Gen *Elovl2* ulega ekspresji głównie w wątrobie i jądrach, aczkolwiek odpowiadające mu sekwencje mRNA są odnotowywane również w nerkach, mózgu, płucach oraz tkance tłuszczowej (Tvrđik i in. 2000; Wang i in. 2005). W regulacji ekspresji tego genu bierze udział białko SREBP-1c (Wang i in. 2006), podczas gdy insulina czy glukoza nie zmieniają poziomu mRNA, odpowiedzialnego za syntezę tego białka w tkankach.

Elovl3

Gen *Elovl3* (ang. *elongation of very long chain fatty acids 3; Cig30, CIN-2*) znajduje się na 38,75 cM (46131897 – 46135694 par zasad) na chromosomie 19 w genomie myszy, a jego długość to 3795 par zasad, z czego odcinek kodujący, na który składają się cztery egzony, liczy sobie 816 nukleotydów. Powstające w procesie translacji białko zawiera zatem 271 aminokwasów. Ekspresja tego genu wykazuje specyficzność tkankową (Jakobsson i in. 2006; Kitazawa i in. 2009). Pierwotnie został on określony jako enzym

indukcyjny zimna (ang. *cold-inducible*), ponieważ wykazywał wzmożoną ekspresję w brunatnej tkance tłuszczowej u myszy wystawionych na działanie niskiej temperatury (Tvrdik i in. 1997). Późniejsze badania wykazały również występowanie odpowiadającego mu mRNA w białej tkance tłuszczowej, gruczołach łojowych skóry oraz w wątrobie (Tvrdik i in. 1997; Westerberg i in. 2004). Znane homologi genu *Elovl3*, zdeponowane w bazie GenBanku to elongazy człowieka (*H. sapiens*; nr GenBanku: NM_152310), szczura (*R. norvegicus*; nr GenBanku: NM_001107602), szympansa zwyczajnego (*P. troglodytes*; nr GenBanku: XP_001171055), makaka (*M. mulatta*; nr GenBanku: NM_001194552), bydła (*B. taurus*; nr GenBanku: NM_001192306) oraz psa (*C. lupus familiaris*; nr GenBanku: XP_005637711).

Elovl5

43,36 cM (77917364 – 77984519 par zasad) chromosomu 9 to miejsce lokalizacji genu *Elovl 5* (ang. *elongation of very long chain fatty acids 5*; ELOVL family member 5) o długości 67154 par zasad, z czego 900 przypada na siedem egzonów, kodujących białko składające się z 299 aminokwasów. Gen ten podlega ekspresji w pewnym stopniu we wszystkich tkankach, wykazując najwyższy poziom w wątrobie, jądrach oraz nadnerczach (Leonard i in. 2000b), a za regulację tej ekspresji odpowiada głównie białko regulatorowe SREBP-1c (Qin i in. 2009). W bazie GenBanku zdeponowano homologi mysiego genu *Elovl5* dla człowieka (*H. sapiens*; nr GenBanku: NM_021814), szczura (*R. norvegicus*; nr GenBanku: NM_134382), szympansa zwyczajnego (*P. troglodytes*; nr GenBanku: NM_001246625), bydła (*B. taurus*; nr GenBanku: NM_001046597), psa (*C. lupus familiaris*; nr GenBanku: XP_852962), kury (*G. gallus*; nr GenBanku: NM_001199197), czy danio pręgowanego (*D. rerio*; nr GenBanku: NM_200453).

Elovl6

Gen *Elovl6* (ang. *elongation of very long chain fatty acids 6*; ELOVL family member 6, FAE, LCE) znajduje się na 58,05 cM (129 532 386 – 129 638 495 par zasad) na chromosomie 3 w genomie myszy, a jego długość to 106109 par zasad, z czego odcinek kodujący, na który składają się cztery egzony, liczy sobie 804 nukleotydów. Tym samym, powstające w procesie translacji białko zawiera 267 aminokwasów. Gen ten ulega ekspresji głównie w wątrobie i białej tkance tłuszczowej, a jego regulacja przez białko

SREBP-1c została stwierdzona przez Matsuzaka i in. (2002b), którzy zidentyfikowali gen *Elovl6* na podstawie analiz mikromacierzy i określili go jako FACE (ang. *fatty acyl-CoA elongase*). W bazie GenBanku dostępne są obecnie homologiczne sekwencje dla człowieka (*H. sapiens*; nr GenBanku: NM_024090), szczura (*R. norvegicus*; nr GenBanku: NM_134383), szympansa zwyczajnego (*P. troglodytes*; nr GenBanku: XP_517396), makaka (*M. mulatta*; nr GenBanku: NM_001266921), bydła (*B. taurus*; nr GenBanku: NM_001102155), psa (*C. lupus familiaris*; nr GenBanku: XP_545023), kury (*G. gallus*; nr GenBanku: NM_001031539), czy danio pręgowanego (*D. rerio*; nr GenBanku: NM_199532).

Gen kodujący białko regulatorowe SREBP-1c

Srebf1

Gen *Srebf1* (ang. *sterol regulatory element-binding transcription factor 1*, ADD-1, bHLHd1) koduje czynnik transkrypcyjny w postaci białka wiążącego sekwencję odpowiedzi na sterole SREBP-1. W tym pojedynczym genie zapisana jest informacja o sekwencji aminokwasów dwóch izoform białka, a mianowicie SREBP-1a oraz SREBP-1c, a to która z nich powstanie zależy od użycia alternatywnych miejsc startu transkrypcji. Dodatkowo różnią się one sekwencją pierwszego egzonu, tj. egzonu 1a lub 1c. SREBP-1c występuje w komórkach wielu różnych tkanek i narządów, ale szczególnie wysoki poziom ekspresji osiąga w wątrobie, tkance tłuszczowej, nadnerczach i mózgu (Shimano i in. 1997; Shimomura i in. 1997). U myszy gen ten zlokalizowany jest na 37,81 cM (60199089 – 60222581) chromosomu 11 i składa się z 19 egzonów. Całkowita długość genu to 23493 pary zasad, z czego 3405 jest przepisywanych na język 1134 aminokwasów. W bazie gen banku dostępne są obecnie homologiczne sekwencje dla człowieka (*H. sapiens*; nr GenBanku: NM_001005291), szczura (*R. norvegicus*; nr GenBanku: NM_001276707), szympansa zwyczajnego (*P. troglodytes*; nr GenBanku: XP_003315641), makaka (*M. mulatta*; nr GenBanku: XP_001095392), bydła (*B. taurus*; nr GenBanku: NM_001113302), psa (*C. lupus familiaris*; nr GenBanku: NM_001197083), kury (*G. gallus*; nr GenBanku: NM_204126), czy danio pręgowanego (*D. rerio*; nr GenBanku: NM_001105129).

Projektowanie starterów do reakcji PCR

Do zaprojektowania starterów użyłam programu Primer3 (Rozen i Skaletsky 2000), a ich jakość oszacowałam przy pomocy programu FastPCR (Kalendar i in. 2009). Dla każdego genu zaprojektowałam przynajmniej po jednej parze starterów, w taki sposób, by powielić cały kodujący odcinek badanego genu. Do tego celu wykorzystałam sekwencje genów referencyjnych zdeponowanych w bazie GenBanku, gdzie umieszczona jest informacja o kompletnym genomie myszy laboratoryjnej. Po jednej parze starterów wystarczyło do powielenia kompletnych, kodujących sekwencji genów *Scd1*, *Fads2*, *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5* oraz *Elovl6*. W przypadku genu *Fads1* zaprojektowałam dwie pary starterów, przy czym primer *forward* drugiej pary był komplementarny z końcowym odcinkiem sekwencji genu odczytanym po sekwencjonowaniu za pomocą pierwszej pary, co umożliwiło złożenie zachodzących częściowo na siebie sekwencji genu w całość. Podobną zasadę przyjąłam podczas projektowania starterów do amplifikacji genu *Srebfl*, przy czym w tym przypadku, z powodu bardzo długiej sekwencji kodującej tego genu, bo składającej się z 3405 par zasad, do jego powielenia potrzebnych było aż pięć par starterów.

W przypadku genów polimorficznych zaprojektowałam dodatkowe pary starterów, umożliwiające amplifikację krótszych sekwencji, zawierających jedynie miejsca zmienne. W związku z tym, że były one często umiejscowione na początku lub końcu danego egzonu konieczne było zlokalizowanie miejsc przyłączenia się starterów w intronach. Dlatego też, matrycą w reakcji PCR z wykorzystaniem tych primerów było genomowe DNA (gDNA). Wszystkie sekwencje zaprojektowanych przeze mnie i wykorzystanych w reakcji PCR starterów wraz z ich parametrami zostały przedstawione w Tabeli 2.

Amplifikacja analizowanych genów metodą PCR

Uzyskane w reakcji odwrotnej transkryptazy (RT) cDNA zostało następnie wykorzystane jako matryca do powielenia zaplanowanych w eksperymencie genów w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), która jest odtworzeniem replikacji DNA w warunkach laboratoryjnych. Amplifikację wszystkich fragmentów genów przeprowadziłam z zastosowaniem zestawu Qiagen Multiplex PCR oraz odpowiednich par starterów w postaci nieznakowanych oligonukleotydów zsyntezowanych przez firmę Genomed.

W celu powielenia kompletnych sekwencji wszystkich dziewięciu genów przeprowadziłam 14 różnych reakcji PCR, tj. po jednej dla genów *Scd1*, *Fads2*, *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5*, *Elovl6*, dwie dla *Fads1* oraz pięć dla *Srebf1*. Każda mieszanina reakcyjna, o końcowej objętości 5 μ l, zawierała 1,7 μ l Qiagen Multiplex PCR Master Mix (1x), w skład którego wchodzi polimeraza HotStarTaq, bufor z dodatkiem $MgCl_2$ i mieszanina dNTP, 0,3 μ l mieszaniny odpowiedniej pary starterów [2 μ M], 1 μ l wody wolnej od RNaz oraz 2 μ l cDNA. Tak przygotowane próby umieszczałam w termocyklerze GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Standardowy profil reakcji PCR składał się z etapu wstępnej denaturacji przeprowadzanej w temperaturze 95°C przez 15 minut, co zapewniało aktywację termostabilnej polimerazy Taq, a następnie trzech kolejnych etapów powtarzających się w 30 cyklach, tj. denaturacji podwójnej helisy DNA, zachodzącej w temperaturze 94°C przez 30 sekund, przyłączania starterów w temperaturze 57°C przez 90 sekund oraz elongacji łańcucha DNA w temperaturze 72°C przez minutę. Ostatnim etapem była końcowa elongacja, zachodząca w temperaturze 60°C przez 30 minut. Dla poszczególnych genów dokonałam optymalizacji warunków reakcji PCR, polegającej na modyfikacji temperatury przyłączania starterów oraz liczby cykli, co zostało zestawione w Tabeli 3.

Analogiczną procedurę pod względem rodzaju zastosowanych odczynników, składu mieszanin reakcyjnych oraz profilu reakcji PCR przeprowadziłam w przypadku powielenia krótszych fragmentów genów, zawierających zidentyfikowane w dalszym toku analiz miejsca polimorficzne, z tą różnicą, że matrycę stanowiło tu genomowe DNA (Tabela 3).

Obecność produktów PCR sprawdzałam za pomocą elektroforezy na 1,5 % żelu agarozowym (Reducta, Prona) w 10 x stężonym buforze TBE (Tris, kwas borowy, EDTA) z dodatkiem 2 μ l odczynnika GelRed (Biotium), który wiąże się z DNA oraz świeci w świetle promieniowania UV, emitowanego przez transilluminator (Herolab UVT-20M). Długość uzyskanych fragmentów DNA w postaci świecących prążków, odczytywałam porównując je z markerem FastRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas).

Oczyszczanie produktów reakcji PCR przed sekwencjonowaniem

Produkty reakcji PCR, jeszcze przed przeprowadzeniem reakcji sekwencjonowania, poddałam oczyszczeniu (ang. *clean-up*) z pozostałości nieprzyłączonych wolnych deoksynukleotydów (dNTP) oraz starterów w enzymatycznym procesie z zastosowaniem alkalicznej fosfatazy (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP, Fermentas), degradującej dNTP

i egzonukleazy I (ExoI, *E. coli*, Fermentas), usuwającej odcinki DNA o długości krótszej niż 100 par zasad. Ten etap analiz jest niezbędny do uzyskania czystych sekwencji DNA w obrazie elektroforetycznego rozdziału produktów reakcji sekwencjonowania. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło 0,5 µl Exo-I (20u/µl), 1 µl SAP (1u/µl) oraz 5 µl produktu reakcji PCR. Reakcję *clean-up* przeprowadzałam w termocyklerze GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) w optymalnej temperaturze działania enzymów, tj. w 37°C przez 15 minut, po czym następowała ich inaktywacja w temperaturze 85°C przez kolejne 15 minut.

Reakcja sekwencjonowania DNA

W celu uzyskania sekwencji nukleotydowych badanych genów przeprowadziłam reakcję sekwencjonowania DNA enzymatyczną metodą Sanger, opierającą się na zjawisku terminacji syntezy łańcucha DNA na skutek losowego wstawienia przez polimerazę DNA jednego z dideoksynukleotydów (ddNTP), nieposiadającego grupy hydroksylowej na końcu 3' deoksyrybozy, co uniemożliwia dalsze wydłużanie nici. Dodatkowe wyznakowanie poszczególnych rodzajów ddNTP różnymi barwnikami fluorescencyjnymi pozwala na przeprowadzenie reakcji w jednej fiołce.

Reakcję sekwencjonowania przeprowadziłam w termocyklerze GeneAmp® PCR System 9700 (Life Technologies) z wykorzystaniem odczynników BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). Mieszanina reakcyjna składała się z 1 µl buforu BDT (Life Technologies), 1 µl mieszaniny BDT v3.1, zawierającej znakowane nukleotydy i polimerazę DNA (Life Technologies), 1 µl startera rozcieńczonego do stężenia 3,2 pmol, 5 µl wody destylowanej (Qiagen) oraz 2 µl oczyszczonego produktu reakcji PCR. Nic DNA została zsekwencjonowana w obu kierunkach, co oznacza, że dla każdego produktu reakcji PCR przeprowadziłam dwie reakcje sekwencjonowania, jedną z zastosowaniem startera *forward*, a drugą z primerem *reverse*, w celu weryfikacji poprawności sekwencji. Zastosowany przeze mnie profil reakcji sekwencjonowania składał się z trzech etapów, powtarzających się w 25 cyklach, tj. denaturacji przebiegającej w temperaturze 96°C przez 20 sekund, przyłączenia startera w temperaturze 50°C przez 15 sekund oraz elongacji nici DNA w temperaturze 60°C przez 4 minuty.

Usuwanie nieprzyłączonych dideoksynukleotydów (ddNTP) po reakcji sekwencjonowania

Produkty reakcji sekwencjonowania oczyściłam z nieprzyłączonych dideoksynukleotydów (ddNTP), mogących zakłócać poprawny odczyt sekwencji DNA w automatycznym sekwenatorze kapilarnym, za pomocą zestawu ExTerminator kit (A&A Biotechnology). Wchodzące w skład zestawu kolumny posiadają specjalną membranę, mającą właściwość wiązania produktów reakcji sekwencjonowania, podczas gdy nieprzyłączone ddNTP przechodzą przez nią podczas wirowania.

W pierwszym etapie, zgodnie z protokołem postępowania dostarczonym przez producenta, do mieszaniny po reakcji sekwencjonowania dodałam 5 µl roztworu Mix Blue, który ułatwia kontrolę precypitacji DNA na membranie mikrokolumny oraz 100 µl roztworu wiążąco-płuczającego. Całość zmieszałam przez pipetowanie, naniosłam na kolumnę, a następnie wirowałam przez 30 sekund przy 3600 obr./min. (Eppendorf Centrifuge 5415D, rotor F45-24-11). Pozostałości soli wraz z innymi zanieczyszczeniami usunęłam dodając na mikrokolumnę 400 µl roztworu wiążąco-płuczającego i wirując przez 2 minuty przy 13200 obr./min. Oczyszczone i osuszone kolumny przenieśliam do nowych probówek Eppendorfa, po czym na membranę naniosłam 28 µl wody destylowanej (Qiagen), inkubowałam 5 minut w temperaturze pokojowej i wirowałam minutę przy 13200 obr./min.

Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji sekwencjonowania DNA

Produkty reakcji sekwencjonowania, oczyszczone z nieprzyłączonych dideoksynukleotydów (ddNTP) poddałam elektroforetycznemu rozdziałowi w 4-kapilarnym automatycznym sekwenatorze ABI 3130 Avant (Applied Biosystems), z wykorzystaniem polimera 3130 POP-7 Performance Optimized Polymer (Life Technologies) oraz bufora Genetic Analyzer 10X Running Buffer with EDTA (Life Technologies). Pojedynczy rozdział zachodził w temperaturze 60°C i trwał godzinę.

Identyfikacja polimorfizmów w genach metabolizmu lipidów

Istniejące miejsca polimorficzne zidentyfikowałam korzystając z programu BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.1. (Hall, 1999), używając narzędzia umożliwiającego

dopasowanie i wyrównanie porównywanych sekwencji DNA, a następnie potwierdziłam ich obecność manualnie w programie Chromas Lite v.2.01 (Technelysium Pty Ltd, 2005). Charakter mutacji punktowej, tj. stwierdzenie czy jest ona synonimiczna bądź niesynonimiczna, określiłam na podstawie internetowej bazy Consensus CDS (CCDS) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi>), umożliwiającej lokalizację danego polimorfizmu nukleotydowego w kodonie wraz z jednoczesnym odnalezieniem odpowiadającego mu aminokwasowu w białku.

Analiza poziomu ekspresji badanych genów

Analiza ekspresji genów została przeprowadzona z wykorzystaniem techniki real-time PCR. Dzięki zjawisku fluorescencji metoda ta pozwalała na śledzenie procesu namnażania DNA w czasie rzeczywistym i tym samym na dokonanie pomiarów początkowej ilości DNA, wyznaczonej na podstawie cyklu, w którym sygnał fluorescencji osiąga wartość graniczną, umożliwiającą jego wykrycie (ang. *threshold cycle*, C_t). Najczęściej stosowanym barwnikiem fluorescencyjnym jest SYBR Green I, który wiąże się do dwuniciowego DNA, co powoduje 1000-krotny wzrost jego fluorescencji. Wadą tego fluorochromu jest nieswoistość wiązania, ponieważ poza właściwymi produktami reakcji PCR, może przyłączać się on także do produktów niespecyficznych lub struktur typu primer-dimer. Dlatego też, oprócz krzywej wzrostu fluorescencji na końcu reakcji real-time PCR przeprowadza się dodatkowo krzywą topnienia DNA, pozwalającą na określenie czystości badanej próby.

W pierwszym etapie badań zaprojektowałam część starterów, tj. dla genów *Scd1*, *Fads2*, *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl6* oraz *Srebf1*, do powielenia krótkich, nieprzekraczających 150 par zasad fragmentów cDNA, stosując identyczną procedurę, jak w przypadku projektowania starterów do reakcji PCR. Pozostałe sekwencje starterów pochodziły z danych literaturowych, tj. dla genów *Fads1*, *Elovl3*, *Elovl5* z Wang i in. (2006), a dla genu β -aktyny z pracy Dobrzyń i in. (2010). Jakość wszystkich par starterów oszacowałam ponownie przy pomocy programu FastPCR (Kalendar i in. 2011). Sekwencje zaprojektowanych przeze mnie i wykorzystanych w reakcji real-time PCR starterów wraz z ich parametrami zostały zebrane w Tabeli 4.

Reakcję real-time PCR przeprowadziłam dla wszystkich badanych genów oraz genu metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping gene*), stanowiącego próbę endogenną, a którym w eksperymencie był gen β -aktyny z wykorzystaniem aparatu Step One Plus Real-

Time PCR System (Life Technologies). Wszystkie reakcje zachodziły w końcowej objętości 20 μ l, a w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło: 2 μ l cDNA (~20 ng), 10 μ l Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Fermentas), 1 μ l startera *forward* i 1 μ l startera *reverse* oraz 6 μ l wody wolnej od RNaz. Profil reakcji real-time PCR składał się z etapu wstępnej denaturacji, zachodzącej w 95°C przez 10 minut oraz 40 cykli reakcji real-time PCR, na które składały się denaturacja w temperaturze 95°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów w temperaturze 60°C przez 60 sekund oraz elongacja w temperaturze 72°C przez 30 sekund, po czym następowało sczytywanie krzywej topnienia, na którą składały się: denaturacja w temperaturze 95°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów w temperaturze 60°C przez minutę oraz elongacja w temperaturze 95°C przez 15 sekund. Poziom fluorescencji odczytywany był podczas elongacji, zarówno w reakcji real-time PCR, jak i podczas przeprowadzania krzywej topnienia. Reakcje dla wszystkich prób przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Poziom mRNA uzyskany dla każdego genu był normalizowany poprzez porównanie do uzyskanych ilości mRNA genu β -aktyny.

Analiza loci mikrosatelitarnego DNA

W celu wyznaczenia współczynnika inbredu (F_{IS}), będącego miarą kojarzeń w pokrewieństwie, oraz ustalenia siły działania dryfu genetycznego mogącego mieć wpływ na poziom zróżnicowania genetycznego między selekcionowanymi liniami myszy, wszystkie biorące w eksperymencie zwierzęta zgenotypowałam w loci mikrosatelitarnego DNA. Uzyskane dane posłużyły mi również do wyznaczenia locus/loci poddanych działaniu selekcji.

Łącznie przetestowałam 18 loci mikrosatelitarnego DNA, specyficznych dla myszy domowej i dostępnych w literaturze: MMGFAPD(D11), MUSMCK(D7) i MMCY03(D9) (Hearne i in. 1991) oraz w bazie internetowej Mouse Genome Informatics (www.informatics.jax.org): D1Mit150, D1Mit322, D2Mit295, D4Mit17, D5Mit95, D6Mit138, D8Mit215, D8Mit267, D10Mit20, D11Mit29, D11Mit176, D12Mit4, D13Mit149, D15Mit16, D17Mit51. Do dalszych analiz wybrałam jedynie loci, które okazały się polimorficzne. W badaniach zastosowałam łącznie 11 markerów (D1Mit322, D2Mit295, D5Mit95, D6Mit138, D10Mit20, D12Mit4, D15Mit16, D17Mit51, MUSMCKA(D7), MMCY03(D9), MMGFAPD(D11)), leżących na różnych chromosomach, a więc niesprzężonych ze sobą. Zostały one zgrupowane w dwóch panelach (MmI i MmII), umożliwiającą jednoczesną amplifikację kilku loci w jednej

reakcji multiplex PCR. Poszczególne loci były wyznakowane jednym z czterech barwników fluorescencyjnych (zielony – VIC, niebieski – FAM, czerwony – PET oraz żółty – NED), tak aby można było odróżnić te, których zakresy wielkości nachodziły na siebie (Tabela 5).

Wszystkie reakcje multiplex PCR przeprowadziłam w termocyklerze GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) z zastosowaniem kitu Qiagen Multiplex PCR, pozwalającego na jednoczesną amplifikację kilku fragmentów DNA, oraz odpowiednich par starterów w postaci znakowanych fluorescencyjnie oligonukleotydów (Life Technologies). W skład mieszaniny reakcyjnej o końcowej objętości 5 µl wchodziło: 2 µl genomowego DNA (~20 ng), 1,7 µl Qiagen Multiplex PCR Master Mix (1x), zawierającego HotStarTaq polimerazę, bufor z dodatkiem MgCl₂ i mieszaninę dNTP, 0,3 µl mieszaniny odpowiednich par starterów (końcowa koncentracja starterów podana została w Tabeli 5) oraz 1 µl wody wolnej od RNaz. Reakcja dla obu paneli przebiegała w następującym profilu temperaturowo-czasowym: wstępna denaturacja, zachodząca w temperaturze 95°C przez 15 minut, następnie 29 cykli, na które składały się denaturacja, mająca miejsce w temperaturze 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w 57°C przez 90 sekund oraz elongacja w temperaturze 72°C przez minutę, po których następowała końcowa elongacja w 60°C przez 30 minut.

W kolejnym etapie analiz produkty reakcji multiplex PCR (znakowane fluorescencyjnie fragmenty mikrosatelitarnego DNA) o objętości 1 µl poddałam denaturacji w obecności 10 µl formamidu: Hi-Di Formamide (Life Technologies) oraz 0,2 µl standardu wielkości: GeneScan 500-LIZ (Life Technologies), poprzez inkubację prób w temperaturze 95°C przez 5 minut z wykorzystaniem termocyklera GeneAmp® PCR System 9700 (Life Technologies) oraz szybkie schłodzenie, a następnie dokonałam ich elektroforetycznego rozdziału przy użyciu 4-kapilarnego, automatycznego sekwenatora ABI 3130 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems). Długość powielonych fragmentów mikrosatelitarnego DNA została odczytana automatycznie z wykorzystaniem narzędzia Auto Bin w programie GeneMapper 4.0 software (Applied Biosystems), którą następnie potwierdziłam manualnie. W ten sposób udało mi się uzyskać kompletne genotypy dla wszystkich analizowanych osobników we wszystkich badanych loci mikrosatelitarnych.

Analizy biochemiczne

Oznaczenie profilu lipidowego hepatocytów

Oznaczenia składu jakościowego i ilościowego kwasów tłuszczowych w tkankach wątroby myszy laboratoryjnej selekcionowanej na niskie i wysokie tempo metabolizmu podstawowego (BMR) zostały wykonane we frakcjach lipidów całkowitych (TL) oraz fosfolipidów (PL) w oparciu o chromatografię gazową (GC).

Frakcja lipidów całkowitych (TL)

Lipidy całkowite wyekstrahowałam zgodnie z procedurą opisaną przez Bligh'a i Dyer'a (1959). W tym celu, używając wagi AXIS AD 500 odważyłam 0,05 g fragmentów wątroby z dokładnością do 0,002 g, które następnie zhomogenizowałam z wykorzystaniem automatycznego homogenizatora BioGen PRO200 (PRO Scientific, USA) oraz zestawu wymiennych, autoklawowalnych końcówek homogenizujących Multi Gen-7 (PRO Scientific, USA) w 2 ml mieszaniny chloroform/metanol (2:1) z dodatkiem 1mM BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-metylpentanol). Po dodaniu 500 µl wody destylowanej, próby intensywnie worteksowałam (tecnoKartell TK3S) przez minutę, po czym wirowałam w temperaturze 4°C przez 10 minut przy 3000 obr./min. (Hermle Labortechnik Z36 HK). Podczas tego etapu płyn w probówkach rozwarstwiał się na dwie fazy, tj. górną, zawierającą wodę i metanol oraz dolną fazę organiczną z chloroformem i rozpuszczonymi w nim tłuszczami. Kolejnym krokiem było więc ściągnięcie fazy wodnej przy pomocy pipet Pasteura, przeniesienie fazy organicznej do nowych, zakręconych probówek typu Pyrex i odparowanie ich w strumieniu gazowego azotu. Następnie lipidy rozpuszczałam w 1 ml 14% BF₃-MeOH (14% roztwór trifluorku boru w metanolu) ze 100 µl standardu wewnętrznego 15:0/R2 (C15 R2 – kwas pentaheksaenowy z chloroformem) i inkubowałam w szczelnie zakręconych probówkach w temperaturze 100°C przez 30 min. Po wystudzeniu prób do temperatury pokojowej dodawałam 1 ml heksanu, następnie worteksowałam przez 30 sekund, dodawałam 500 µl wody destylowanej, ponownie worteksowałam 30 sekund i wirowałam w temperaturze 4°C przez 10 minut przy 3000 obr./min. Podczas wirowania płyn rozwarstwił się na dwie fazy, z czego górna zawierała heksan z rozpuszczonymi kwasami tłuszczowymi i tę właśnie warstwę przenosiłam za pomocą pipet Pasteura do nowych, zakręconych probówek typu Pyrex, po czym ponownie

próby odparowywałam w strumieniu gazowego azotu. Na koniec estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAMES; ang. *Fatty Acid Methyl Esters*) zawieszałam w 1 ml heksanu i przenosiłam do fiolek do analiz chromatografii gazowej (GC), które zostały wykonane w Pracowni Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych Zakładu Biochemii w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie przy współpracy z dr Pawłem Dobrzyniem.

Fracja fosfolipidów (PL)

Kwasy tłuszczowe we frakcji fosfolipidów (PL) wyekstrahowałam poprzez zhomogenizowanie 0,05 g fragmentów wątroby odważonych z dokładnością do 0,002 g przy pomocy wagi AXIS AD 500, z wykorzystaniem automatycznego homogenizatora BioGen PRO200 (PRO Scientific, USA) oraz zestawu wymiennych, autoklawowalnych końcówek homogenizujących Multi Gen-7 (PRO Scientific, USA) w 2 ml mieszaniny chloroform/metanol (2:1) z dodatkiem 1mM BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-metylpentanol). Po dodaniu 500 µl wody destylowanej, próby intensywnie worteksowałam (tecnoKartell TK3S) przez minutę, po czym wirowałam w temperaturze 4°C przez 10 minut przy 3000 obr./min. (Hermle Labortechnik Z36 HK). Podczas tego etapu płyn w probówkach rozwarstwiał się na dwie fazy, tj. górną, zawierającą wodę i metanol oraz dolną fazę organiczną z chloroformem i rozpuszczonymi w nim tłuszczami. Kolejnym krokiem było więc ściągnięcie fazy wodnej przy pomocy pipet Pasteura, przeniesienie fazy organicznej do nowych, zakręcanych probówek typu Pyrex i odparowanie ich w strumieniu gazowego azotu. Tak przygotowany ekstrakt rozpuściłam w 100 µl mieszaniny chloroform/metanol (2:1). Następnie próby rozdzieliłam metodą cienkowarstwowej chromatografii cieczowej; TLC (ang. *thin layer chromatography*) w układzie rozwijającym: heptan/eter izopropylu/kwas octowy (60/40/3, v/v/v) przez 50 minut na płytkach Silica Gel 60 (Merck). Prążki odpowiadające poszczególnym frakcjom lipidów zwizualizowałam w świetle UV emitowanym przez transilluminator (Herolab UVT-20M) w obecności 0,2% roztworu fluoresceiny w metanolu. Frakcja fosfolipidów pozostawała zaraz na starcie, a więc odpowiadały jej pierwsze prążki, za którymi kolejno widoczne były frakcje pozostałych lipidów, tj. monoglicerole (MG), diacyloglicerole (DAG), wolny cholesterol (CHOL), wolne kwasy tłuszczowe (FFA), trójglicerydy (TG) oraz estry cholesterolu (CE). Frakcję fosfolipidów zdrapałam przy pomocy skalpela, przeniosłam do probówek typu Pyrex, a następnie rozpuściłam w 1 ml 14% BF₃-MeOH (14% roztwór trifluorku boru w

metanolu) ze 100 μ l standardu wewnętrznego 15:0/R2 (C15 R2 – kwas pentaheksaenowy z chloroformem) i inkubowałam w szczelnie zakręconych probówkach w temperaturze 100°C przez 30 min. Po wystudzeniu prób do temperatury pokojowej dodawałam 1 ml heksanu, następnie worteksowałam (tecnoKartell TK3S) przez 30 sekund, dodawałam 500 μ l wody destylowanej, ponownie worteksowałam 30 sekund i wirowałam w temperaturze 4°C przez 10 minut przy 3000 obr./min. (Hermle Labortechnik Z36 HK). Podczas wirowania płyn rozwarstwił się na dwie fazy, z czego górna zawierała heksan z rozpuszczonymi kwasami tłuszczowymi i tę właśnie warstwę przenosiłam za pomocą pipet Pasteura do nowych, zakręconych probówek typu Pyrex, po czym ponownie próby odparowywałam pod azotem. Na koniec estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAMES) zawieszałam w 1 ml heksanu i przenosiłam do fiolek do analiz chromatografii gazowej (GC), która została przeprowadzona w Pracowni Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych Zakładu Biochemii w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie przy współpracy z dr Pawłem Dobrzyniem.

Wyznaczenie aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy)

Aktywność pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPaza) wyznaczyłam w homogenatach wątrobowych, pochodzących od wszystkich badanych myszy zarówno w liniach selekcyjnych (L-BMR i H-BMR), jak i w liniach nioselekcjonowanych (US1, US2, US3). Do tego celu wykorzystałam zestawy SensoLyte®FDP Protein Phosphatase Assay Kit *Fluorimetric* (AnaSpec), których działanie opiera się na pomiarze sygnału fluorescencji fluoresceiny, będącej końcowym produktem hydrolizy 3,6-difosforanu fluoresceiny (FDP).

Próbki wątroby o masie 20 μ g poddałam homogenizacji z wykorzystaniem automatycznego homogenizatora BioGen PRO200 (PRO Scientific, USA) oraz zestawu wymiennych, autoklawowalnych końcówek homogenizujących Multi Gen-7 (PRO Scientific, USA) w 100 μ l 1X stężonego buforu lizującego, w skład którego wchodziło 1 ml 10X stężony bufor lizujący (komponent C), 20 μ l Tryton X-100 (komponent D), 9 μ l wody destylowanej oraz inhibitory proteaz: 0,1 g aprotyniny, 0,1 g leupeptyny, 0,1 g pepstatyny A oraz 100 μ m fenylometylosulfonylu fluoru (PMSF). Tak przygotowane próby wirowałam przy użyciu wirówki Eppendorf Centrifuge 5430 R w temperaturze 4°C przez 10 minut przy 10000 obr./min., a następnie zebrałam supernatant do nowych probówek Eppendorfa. Kolejnym krokiem było przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

FDP. W tym celu mieszałam 50 µl komponentu A (FDP z 250 µl dimetylsulfotlenku; DMSO; komponent G) z 4,95 ml komponentu B (80 mM Tris-HCl o pH = 7,2; 4 mM MgCl₂; 0,5 mM EGTA; 5 mM fosforanu kreatyniny aktywowany przez 10 mM KCl) oraz z 15 µl komponentu F (1 M ditiotreitola; DTT). Pomiarów dokonałam na czarnych, 96-dołkowych płytkach, gdzie każdy dołek zawierał 50 µl próby oraz 50 µl mieszaniny reakcyjnej FDP. Płytki delikatnie wytrząsałam przy użyciu wortexu IKA MS 3 basic przez 30 sekund, a następnie przeprowadzałam detekcję siły fluorescencji przy użyciu fluorymetru Perkin Elmer LS55 Fluorescence Spectrometer. Odczytu kinetyki reakcji dokonałam przy długości fali emisji wynoszącej 528 nm oraz fali wzbudzenia równej 485 nm (Ex/Em=485/528 nm) ze sczytywaniem danych co 5 minut przez godzinę.

Analizy statystyczne

Analiza różnic w tempie metabolizmu podstawowego (BMR)

Dane dotyczące zróżnicowania w tempie metabolizmu podstawowego (BMR) pomiędzy myszami należącymi do linii selekcyjowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego w pokoleniu F32 oraz między myszami nie poddanymi selekcji na żadną z badanych cech (US1, US2, US3) zostały przetestowane za pomocą analizy wariancji i kowariancji. Zastosowano modele mieszane z przynależnością do linii jako efektem głównym oraz przynależnością do rodziny jako czynnikiem losowym, zagnieżdżonym w czynniku głównym, wykorzystując pakiet statystyczny SAS (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, USA).

Zróżnicowanie genetyczne między liniami w genach polimorficznych

W celu wyznaczenia frekwencji alleli w genach zawierających miejsca polimorficzne (*Scd1* i *Fads2*) w liniach selekcyjnych w pokoleniach F22 i F32 oraz w liniach nieselekcyjnych (US1, US2 i US3) użyłam programu Cervus v.3.0 (Kalinowski i in. 2007). Istotność statystyczna różnic we frekwencjach alleli dla wszystkich linii i we wszystkich generacjach została sprawdzona dokładnym testem Fishera (ang. *Fisher's exact test*), który jest dostępny w pakiecie statystycznym STATISTICA 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Dane dotyczące frekwencji genotypów zostały przetestowane statystycznie w kontekście

odchyień od równowagi Hardy-Weinberga z wykorzystaniem programu Genepop v4.0 (Rousset, 2008).

Wyznaczyłam wskaźnik zróżnicowania genetycznego (F_{ST}), mierzący wariancję we frekwencji alleli między porównywanymi próbami. Porównań dokonałam pomiędzy wszystkimi analizowanymi liniami myszy (L-BMR i H-BMR w F32 oraz pomiędzy parami linii nieselekcjonowanych na żadną cechę: US1 i US2, US1 i US3 oraz US2 i US3) dla obserwowanych mutacji w genach polimorficznych (*Scd1* i *Fads2*), przy użyciu programu FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995). Istotność statystyczną współczynnika F_{ST} testowałam stosując 1000 permutacji z uwzględnieniem poprawki Bonferroniego dla testów wielokrotnych. Oceny stopnia zróżnicowania genetycznego między porównywanymi liniami myszy dokonałam na podstawie skali Wrighta (1978):

$F_{ST} < 0,05$	niskie zróżnicowanie genetyczne między liniami;
$0,05 < F_{ST} < 0,15$	umiarkowane zróżnicowanie genetyczne między liniami;
$0,15 < F_{ST} < 0,25$	wysokie zróżnicowanie genetyczne między liniami;
$F_{ST} > 0,25$	bardzo wysokie zróżnicowanie genetyczne między liniami.

Analiza różnic w tempie metabolizmu podstawowego (BMR) między myszami posiadającymi odmienne genotypy

Wartości tempa metabolizmu podstawowego (BMR) porównałam dla wszystkich myszy pochodzących z obu linii selekcyjnych w pokoleniu F32, połączonych w jedną grupę, a posiadających różne genotypy w genach *Scd1* (AA, AT, TT) oraz *Fads2* (AA, AG, GG). Istotność statystyczną określiłam stosując test jednoczynnikowej ANOVA w programie STATISTICA 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Analiza loci mikrosatelitarnego DNA

W celu zidentyfikowania potencjalnych błędów w genotypowaniu, takich jak allele zerowe (ang. *null alleles*), powodujące nadmiar homozygot w badanej próbie, wynikający z mutacji w miejscu hybrydyzacji startera/starterów, tak zwane allele „jąkały” (ang. *stuttering*), czy brak amplifikacji dużych alleli (ang. *large allele drop-out*), użyłam programu Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout i in. 2004). Frekwencje alleli zerowych

wyznaczyłam dodatkowo korzystając z programu Cervus v.3.0 (Kalinowski i in. 2007). Na podstawie uzyskanych wyników z dalszych analiz wykluczyłam locus D2Mit295.

Na podstawie uzyskanych genotypów analizowanych zwierząt w 10 loci mikrosatelitarnego DNA, korzystając z programu Cervus v.3.0 (Kalinowski i in. 2007) wyznaczyłam wskaźniki zmienności genetycznej takie, jak średnia liczba alleli przypadająca na dany locus (N_A), heterozygotyczność obserwowana (H_o), czyli rzeczywisty udział heterozygot występujących w analizowanych próbach oraz heterozygotyczność oczekiwana (H_e), reprezentująca frekwencję heterozygot, której należałoby oczekiwać, jeśli populacja spełnia warunki równowagi Hardy'ego-Weinberga. Powyższe parametry porównywałam pomiędzy obiema liniami selekcyjnymi w pokoleniu F32 oraz F22, a także pomiędzy każdą linią selekcyjną w obu pokoleniach a trzema liniami niselekcyjnymi (US) oraz między myszami z obu pokoleń w obrębie każdej linii selekcyjnej. Istotność testowałam za pomocą 1000 permutacji przy pomocy programu FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995). Dodatkowo zidentyfikowałam również allele prywatne (N_p), czyli allele unikalne tylko dla danej populacji, czy też linii.

W dalszej kolejności dane uzyskane na podstawie analizy loci mikrosatelitarnego DNA posłużyły mi do wyznaczenia współczynnika inbredu F_{IS} (Wright, 1951) oraz oszacowania poziomu dryfu genetycznego.

Wyznaczenia współczynnika inbredu (F_{IS})

Aby określić efekt nielosowego kojarzenia zwierząt w obrębie każdej z analizowanych linii zarówno w pokoleniu F32, jak i w F22, wyznaczyłam przy pomocy programu FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995) współczynnik inbredu F_{IS} (Wright, 1951), będący miarą redukcji heterozygotyczności osobników. Istotność odchylenia tego parametru od zera testowałam za pomocą 1000 permutacji. W programie FSTAT wyznaczyłam również 95% przedział ufności (C.I.) tego parametru.

Oszacowanie poziomu dryfu genetycznego

W celu wyznaczenia poziomu dryfu genetycznego, który może pojawić się w sztucznie prowadzonych selekcjach i spowodować przypadkowe zmiany częstości alleli, oszacowałam wskaźnik zróżnicowania genetycznego (F_{ST} ; Wright, 1951) pomiędzy wszystkimi analizowanymi liniami myszy (L-BMR i H-BMR w F32 oraz pomiędzy

parami linii nieselekcjonowanych na żadną cechę: US1 i US2, US1 i US3 oraz US2 i US3) dla obserwowanych mutacji, a następnie porównałam jego wartość ze średnim zróżnicowaniem genetycznym w 10 loci mikrosatelitarnego DNA, które stanowiło neutralne tło genetyczne.

Dodatkowo te same analizy przeprowadziłam dla prób z pokolenia F22, które były wykorzystane wcześniej w innym eksperymencie (Brzęk i in. 2007). Takie podejście pozwoliło sprawdzić, jak w przeciągu 10 pokoleń zmieniła się frekwencja alleli w genach polimorficznych oraz w neutralnych loci mikrosatelitarnego DNA.

Poziom dryfu genetycznego kontrolowany był również poprzez testowanie istotności poziomu spadku zmienności genetycznej w każdej linii selekcyjnej w przeciągu 10 pokoleń, mierzonej średnią liczbą alleli przypadającą na dany locus (N_A), heterozygotycznością obserwowaną (H_o) oraz heterozygotycznością oczekiwaną (H_e) za pomocą testu 1000 permutacji przy pomocy programu FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995).

Identyfikacja loci poddanych działaniu selekcji

W celu identyfikacji loci poddanych działaniu selekcji użyłam programu LOSITAN (ang. *LOOKing for Selection In a TANGled dataset*; Antao i in. 2008). Program LOSITAN działa w oparciu o metodę FDist (Beaumont i Nichols 1996), wykorzystywaną dla markerów molekularnych kodominujących, takich jak mikrosatelitarny DNA, SNPs czy allozomy. Wykorzystuje zależność między współczynnikiem F_{ST} a heterozygotycznością oczekiwaną (H_e) dla wszystkich analizowanych loci w modelu wyspowym (ang. *island model*) do identyfikacji loci odbiegających (ang. *outlier loci*), czyli kandydatów na działanie selekcji, posiadających zbyt wysokie lub niskie wartości współczynnika F_{ST} w porównaniu do neutralnych oczekiwań.

Do przeprowadzenia testu na loci poddane działaniu selekcji użyłam jedynie te geny, w których zidentyfikowałam polimorfizmy, tj. gen *Scd1* oraz *Fads2*, a jako neutralne tło genetyczne wykorzystałam 10 loci mikrosatelitarnego DNA. Symulacja została wykonana w 50000 powtórzeń z wyznaczeniem górnych i dolnych granic wartości F_{ST} przy 95% poziomie ufności (95% C.I.). Loci wykraczające poza górny limit wartości F_{ST} uznawane były za te, na które działa selekcja.

Analogiczną analizę przeprowadziłam wśród myszy należących do trzech linii nieselekcjonowanych na żadną cechę (US) w przeciągu 16 pokoleń (F16). Pozwoliło mi to zweryfikować, czy pozytywny wynik testu na loci poddane działaniu selekcji, uzyskane

dla któregoś z genów polimorficznych, a mianowicie *Scd1* i/lub *Fads2*, nie jest spowodowany działaniem dryfu genetycznego.

Analiza poziomu ekspresji badanych genów

Wydajność reakcji (Eff) wyznaczyłam na podstawie krzywych standardowych z serii rozcieńczeń matrycy. Za poprawnie dobrane parametry reakcji uznałam te, przy których $Eff = 100 \pm 5\%$. W celu wyznaczenia względnego poziomu ekspresji badanych genów zastosowałam metodę Pfaffla (Pfaffl, 2001). Uzyskane wartości C_t dla porównywanych grup myszy przetestowałam statystycznie testem jednoczynnikowej ANOVA w programie STATISTICA 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Określenie różnic w profilu lipidowym

Poszczególne kwasy tłuszczowe we frakcjach lipidów całkowitych (TL) oraz fosfolipidów (PL) wyrażone w nmol/g świeżej tkanki przeliczyłam na wartości procentowe, które następnie wykorzystałam do obliczenia:

- ✓ frekwencji kwasów nasyconych, SFA (ang. *saturated fatty acid*), będących sumą procentowego udziału wszystkich kwasów tłuszczowych o pojedynczych wiązaniach między atomami węgla w łańcuchu węglowodorowym:

$$SFA (TL) = C14:0 (\%) + C16:0 (\%) + C18:0 (\%) + C20:0 (\%)$$

$$SFA (PL) = C16:0 (\%) + C18:0 (\%)$$

- ✓ frekwencji kwasów jednonienasyconych, MUFA, będących sumą procentowego udziału wszystkich kwasów tłuszczowych o jednym podwójnym wiązaniu między atomami węgla w łańcuchu węglowodorowym:

$$MUFA (TL) = C16:1n-7 (\%) + C18:1n-7 (\%) + C18:1n-9 (\%) + C20:1n-9 (\%)$$

$$MUFA (PL) = C16:1n-7 (\%) + C18:1n-7 (\%) + C18:1n-9 (\%)$$

- ✓ frekwencji kwasów wielonienasyconych, PUFA, będących sumą procentowego udziału wszystkich kwasów tłuszczowych o więcej niż jednym (od 2 do 6) podwójnym wiązaniu między atomami węgla w łańcuchu węglowodorowym:

$$\text{PUFA (TL)} = \text{C18:2n-6 (\%)} + \text{C18:3n-3 (\%)} + \text{C18:3n-6 (\%)} + \text{C20:4n-6 (\%)} + \\ \text{C20:5n-3 (\%)} + \text{C22:6n-3 (\%)}$$

$$\text{PUFA (PL)} = \text{C18:2n-6 (\%)} + \text{C20:4n-6 (\%)} + \text{C20:5n-3 (\%)} + \text{C22:6n-3 (\%)}$$

Różnice w procentowym udziale poszczególnych kwasów tłuszczowych we frakcjach lipidów całkowitych (TL) oraz fosfolipidów (PL), a także w ilości nasyconych (SFA), jednonienasyconych (MUFA) i wielonienasyconych (PUFA) kwasów tłuszczowych przetestowałam statystycznie testem jednoczynnikowej ANOVA w programie STATISTICA 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) dla porównywanych linii myszy (L-BMR, H-BMR w pokoleniu F32) oraz różnych genotypów w locus *Scd1* (AA, AT, AT) i *Fads2* (AA, AG, GG).

Określenie aktywności enzymów

Dane, pochodzące z oznaczenia kwasów tłuszczowych we frakcji lipidów całkowitych (TL) wykorzystałam do określenia aktywności enzymatycznych jedynie tych enzymów, które są produktami różnych, zidentyfikowanych wariantów (alleli) badanych genów. W trakcie analiz okazało się, że jedynie geny *Scd1*, kodujący $\Delta 9$ -desaturazę (SCD-1c; stearoilo-CoA desaturaza) oraz *Fads2*, kodujący $\Delta 6$ -desaturazę (D6D) zawierały miejsca polimorficzne. Do określenia aktywności enzymów zastosowałam metodę pośrednią, dzięki której można wyznaczyć tzw. indeks aktywności (IxA) badanego enzymu (Martinelli i in. 2008; Warensjö i in. 2009).

Aktywność $\Delta 9$ -desaturazy (SCD-1c)

Aktywność enzymatyczną desaturazy SCD-1c wyznaczyłam z proporcji produktu katalizowanej przez to białko reakcji, tj. kwasu oleopalmitynowego; PO (C16:1n-7) do substratu: kwasu palmitynowego (C16:0).

$$\text{IxA SCD-1c} = \text{PO (\%)} / \text{C16:0 (\%)}$$

gdzie:

IxA SCD-1c – indeks aktywności $\Delta 9$ -desaturazy (stearoilo-CoA desaturazy);

PO – kwas oleopalmitynowy (C16:1n-7);

C16:0 – kwas linolowy.

Uzyskane wartości indeksu aktywności $\Delta 9$ -desaturazy (SCD-1c; stearoilo-CoA desaturaza) dla porównywanych grup myszy, tj. linii selekcyjnych w pokoleniu F32 oraz różnych genotypów w genie *Scd1*, przetestowałam statystycznie testem jednoczynnikowej ANOVA w programie STATISTICA 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Aktywność $\Delta 6$ -desaturazy (D6D)

Aktywność enzymu D6D wyznaczyłam na podstawie danych, dotyczących ilościowego składu kwasów tłuszczowych we frakcji lipidów całkowitych (TL). Wyrażona została ona jako stosunek produktu: kwasu γ -linolenowego; GLA (C18:3n-6) do substratu: kwasu linolenowego; LA (C18:2n-6), będącego egzogennym kwasem tłuszczowym, a więc dostarczonym jedynie w pożywieniu.

$$\text{IxA D6D} = \text{GLA (\%)} / \text{LA (\%)}$$

gdzie:

IxA D6D – indeks aktywności $\Delta 6$ -desaturazy;

GLA – kwas γ -linolenowy (C18:3n-6);

LA – kwas linolowy (C18:2n-6).

Istotność statystyczną obserwowanych różnic w indeksie aktywności $\Delta 6$ -desaturazy (D6D) pomiędzy selekcyjnymi liniami myszy w pokoleniu F32 oraz pomiędzy poszczególnymi genotypami w genie *Fads2* przetestowałam testem jednoczynnikowej ANOVA w pakiecie STATISTICA 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Wyznaczenie indeksu saturacji (IS) błon komórkowych

Na podstawie danych uzyskanych z jakościowej i ilościowej analizy kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL) wyznaczyłam indeks saturacji (IS), tj. indeks nasylenia błon komórkowych, zgodnie z Hulbert i in. (2007):

$$IS = MUFA (\%) / PUFA (\%)$$

gdzie:

IS – indeks saturacji;

MUFA – jednonienasycone kwasy tłuszczowe;

PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe.

Uzyskane wartości indeksu saturacji (IS) dla porównywanych grup myszy, tj. linii selekcyjnych w pokoleniu F32 oraz różnych genotypów w genach *Scd1* oraz *Fads2*, przetestowałam statystycznie testem jednoczynnikowej ANOVA w programie STATISTICA 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Wyznaczenie indeksu nienasylenia (IU) błon komórkowych

Analogicznie, jak przy określaniu indeksu saturacji (IS), na podstawie danych uzyskanych z jakościowej i ilościowej analizy kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL) wyznaczyłam indeks nienasylenia (IU) błon komórkowych, określane również jako „indeks podwójnych wiązań” (ang. *double bond index*), który jest miarą zawartości podwójnych wiązań w membranach biologicznych, zgodnie z Hulbert i in. (2007):

$$IU = 1 \times (\% \text{ mononienasyconych kw. tłuszczowych}) + 2 \times (\% \text{ dinienasyconych kw. tłuszczowych}) + 3 \times (\% \text{ trinienasyconych kw. tłuszczowych}) + 4 \times (\% \text{ tetranienasyconych kw. tłuszczowych}) + 5 \times (\% \text{ pentanienasyconych kw. tłuszczowych}) + 6 \times (\% \text{ heksanienasyconych kw. tłuszczowych})$$

Uzyskane wartości indeksu nienasylenia (IU) błon komórkowych dla porównywanych grup myszy, tj. linii selekcyjnych w pokoleniu F32 oraz różnych genotypów w genach

Scd1 oraz *Fads2*, przetestowałam statystycznie testem jednoczynnikowej ANOVA w programie STATISTICA 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Wyznaczenie indeksu peroksydacji (IP) błon komórkowych

Podobnie, jak w przypadku wyznaczenia indeksu saturacji (IS) i nienasylenia (IU) błon komórkowych dane z oznaczeń kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL), będących głównymi komponentami membran biologicznych, posłużyły również do określenia indeksu peroksydacji (IP) zgodnie z Hulbert i in. (2007):

$$IP = 0,025 \times (\% \text{ mononienasyconych kw. tłuszczowych}) + 1 \times (\% \text{ dinienasyconych kw. tłuszczowych}) + 2 \times (\% \text{ trinienasyconych kw. tłuszczowych}) + 4 \times (\% \text{ tetranienasyconych kw. tłuszczowych}) + 6 \times (\% \text{ pentanienasyconych kw. tłuszczowych}) + 8 \times (\% \text{ heksanienasyconych kw. tłuszczowych})$$

Istotność statystyczną obserwowanych różnic w indeksie peroksydacji (IP) pomiędzy selekcyjnymi liniami myszy w pokoleniu F32 oraz pomiędzy poszczególnymi genotypami w genach *Scd1* oraz *Fads2* przetestowałam testem jednoczynnikowej ANOVA w pakiecie STATISTICA 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Różnice w aktywności pompy sodowo-potasowej (Na⁺/K⁺-ATPazy)

Wyniki pomiarów aktywności pompy sodowo-potasowej (Na⁺/K⁺-ATPazy) przetestowałam statystycznie testem jednoczynnikowej ANOVA w programie STATISTICA 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) porównując w parach badane linie myszy (L-BMR i H-BMR w pokoleniu F32 oraz trzy linie nieselekcyjne: US1, US2, US3), a także poszczególne genotypy w genach *Scd1* (AA, AT, TT) i *Fads2* (AA, AG, GG).

Analiza regresji

Posiadając kompletne dane dotyczące myszy selekcyjnych z pokolenia F32 wykonałam szereg analiz regresji w programie STATISTICA 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). W ten sposób oszacowałam zależność pomiędzy skorygowanym o masę ciała tempem metabolizmu podstawowego (BMR) w liniach myszy selekcyjnych (L-BMR i H-

BMR) a indeksem aktywności $\Delta 9$ -desaturazy (IxA SCD-1c; PO (%) / C16:0 (%) we frakcji TL), indeksem aktywności $\Delta 6$ -desaturazy (IxA D6D; GLA (%) / LA (%) we frakcji TL), procentowym udziałem nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA), procentowym udziałem jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA), procentowym udziałem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) we frakcjach lipidów całkowitych (TL) oraz fosfolipidów (PL), a także indeksem saturacji (IS), nienasycenia (IU) i peroksydacji (IP) błon komórkowych we frakcjach fosfolipidów (PL) oraz aktywnością pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy). Podobnie wyznaczyłam zależność między indeksem aktywności $\Delta 9$ -desaturazy (IxA SCD-1c; PO (%) / C16:0 (%) we frakcji TL) a procentowym udziałem jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) we frakcjach TL i PL oraz indeksem aktywności $\Delta 6$ -desaturazy (IxA D6D; GLA (%) / LA (%) we frakcji TL) a procentowym udziałem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) we frakcjach TL i PL. Podobnie przeprowadziłam korelację między oboma indeksami aktywności (IxA SCD-1c i IxA D6D) a indeksami saturacji (IS), nienasycenia (IU) i peroksydacji (IP) błon komórkowych we frakcjach fosfolipidów (PL).

WYNIKI

Analizy fizjologiczne

Analiza różnic w tempie metabolizmu podstawowego (BMR)

Pomiary tempa metabolizmu podstawowego (BMR) wykazały różnice między myszami pochodzącymi z linii selekcyjowanej na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego przez 32 pokolenia. Samce myszy, pochodzące z linii L-BMR posiadały istotnie statystycznie niższe wartości skorygowanego o masę ciała BMR ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) w stosunku do osobników z linii H-BMR w pokoleniu F32 ($P < 0,001$). Średnia wartość BMR zwierząt z linii L-BMR wyniosła $44,90 \pm 0,618 \text{ SE ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (SE, błąd standardowy), wahając się od $32,17 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ do $59,38 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Natomiast średnia wartość BMR myszy pochodzących z linii H-BMR wyniosła $66,56 \pm 1,469 \text{ SE ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, wahając się od $45,31 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ do $94,11 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Samce pochodzące z trzech linii nieselekcyjowanych na żadną cechę (US1, US2 i US3) nie różniły się istotnie statystycznie między sobą pod względem wartości BMR ($P > 0,05$ we wszystkich porównaniach). Najniższą średnią wartością BMR charakteryzowały się myszy z linii US3, która wyniosła $63,52 \pm 2,545 \text{ SE ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, wahając się od $45,02 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ do $75,26 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Nieco większe wartości BMR wykazywały zwierzęta z linii US1, gdzie średnia wyniosła $64,26 \pm 1,322 \text{ SE ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ z wartościami granicznymi od $55,98 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ do $72,12 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, podczas gdy myszy z linii US2 posiadały najwyższe BMR o wartości średniej $64,29 \pm 1,822 \text{ SE ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, wahając się od $53,91 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ do $76,31 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Wartość średnia BMR wyliczona dla wszystkich zwierząt, pochodzących z trzech linii nieselekcyjnych (US \bar{r} ., N=36) wyniosła $64,05 \pm 1,078 \text{ SE ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Wszystkie wartości średnie BMR zebrałam w Tabeli 6, a także przedstawiłam na Wykresie 1A.

Porównanie tempa metabolizmu podstawowego między trzema liniami nieselekcyjnymi (US1, US2 i US3), a liniami selekcyjowanymi (L-BMR i H-BMR) w pokoleniu 32 (F32) w teście jednoczynnikowej ANOVA, wykazało istnienie statystycznie istotnych różnic między linią L-BMR, a każdą z linii US ($P < 0,05$ we wszystkich porównaniach). Nie stwierdziłam natomiast statystycznie istotnych różnic w BMR pomiędzy myszami z linii nieselekcyjnych (US) a samcami z linii H-BMR ($P > 0,05$ we

wszystkich porównaniach). Wszystkie wartości F i P w teście jednoczynnikowej ANOVA w porównaniach BMR ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) pomiędzy myszami pochodzącymi z analizowanych linii zestawiałam w Tabeli 7.

Nieco inny obraz dały wyniki uzyskane z analizy wartości resztkowych BMR myszy pochodzących z linii selekcjonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego przez 32 pokolenia ($N=120$) oraz myszy z trzech linii nieselekcjonowanych na żadną cechę (US1, US2 i US3; $N=36$). Najniższe wartości resztkowe BMR posiadały zwierzęta z linii L-BMR o średniej wynoszącej $-9,01 \pm 0,805$ SE $\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, wahając się od $-19,97 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ do $3,64 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, a najwyższe z linii H-BMR ze średnią wartością równą $11,65 \pm 1,093$ SE $\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ i wartościami granicznymi od $-14,47 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ do $28,09 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Natomiast zwierzęta z linii nieselekcyjnych charakteryzowały się pośrednimi wartościami resztkowymi tempa metabolizmu podstawowego. Myszy z linii US1 posiadały średnie wartości resztkowe BMR wynoszące $-1,67 \pm 1,110$ SE $\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, wahające się od $-7,91 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ do $4,85 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Samce z linii US2 charakteryzowały się średnią wartością resztkową BMR równą $2,18 \pm 0,846$ SE $\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ o wartościach granicznych od $-2,91 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ do $7,72 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Natomiast zwierzęta z linii US3 wykazywały średnią wartość resztkową BMR wynoszącą $-1,64 \pm 2,535$ SE $\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, wahające się od $16,82 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ do $12,10 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Uśredniona wartość resztkowa BMR dla myszy z linii nieselekcyjnych zebranych w jedną grupę to $-0,27 \pm 0,936$ SE $\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Wszystkie średnie wartości resztkowe BMR zebrałam w Tabeli 6, a także przedstawiłam na Wykresie 1B.

Test jednoczynnikowej ANOVA wykazał istotne statystycznie różnice ($P < 0,001$) w porównaniach wartości resztkowych BMR ($\text{mL O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) pomiędzy myszami pochodzącymi z linii selekcjonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego przez 32 pokolenia (F32) oraz między samcami z obu linii selekcyjnych a myszami pochodzącymi z każdej z trzech linii nieselekcjonowanych na żadną cechę (US1, US2 i US3). Natomiast zwierzęta z linii US3 nie różniły się istotnie statystycznie od myszy zarówno z linii US1, jak i US2 ($P > 0,05$), podczas gdy pomiędzy liniami US1 i US2 nie wykazałam różnic w wartościach resztkowych BMR (Tabela 8).

Analizy genetyczne

Wyniki sekwencjonowania genów kodujących enzymy metabolizmu kwasów tłuszczowych

Dokonałam pomyślnej amplifikacji, a następnie zsekwencjonowałam wszystkie, zaplanowane w eksperymencie geny kodujące enzymy metabolizmu kwasów tłuszczowych, tj. trzy desaturazy: *Scd1*, *Fads1* oraz *Fads2*, pięć elongaz: *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5* i *Elovl6*, a także gen białka regulatorowego SREBP-1c, czyli *Srebf1*. Ponieważ matrycą w poszczególnych reakcjach łańcuchowej polimerazy (PCR) było cDNA, otrzymane sekwencje zawierały informację jedynie o odcinkach kodujących białko, a więc składały się z egzonów.

Sekwencja genu *Scd1* liczyła 1340 par zasad, podczas gdy cały odcinek mRNA tego genu to 1068 nukleotydów. Oznacza to, iż uzyskana przeze mnie sekwencja obejmowała kompletny odcinek kodujący genu, jak również fragmenty niepodlegające translacji na obu jego końcach. W przypadku powielonego w dwóch reakcjach PCR genu *Fads1*, po dopasowaniu obu sekwencji w programie BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.1. (Hall, 1999), uzyskałam odcinek o długości 1799 par zasad, a sekwencja mRNA tego genu to 1344 nukleotydów. Dla genu *Fads2*, którego mRNA liczy sobie 1335 par zasad, otrzymałam sekwencję o długości 1357 par zasad. W przypadku genów, kodujących elongazy kwasów tłuszczowych, tj. *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5* i *Elovl6* zsekwencjonowałam odcinki o długości odpowiednio 1043 par zasad, 1116 par zasad, 1150 par zasad, 1131 par zasad i 1030 par zasad, podczas gdy odpowiadające im sekwencje mRNA liczyły kolejno 609, 879, 816, 900 i 804 par zasad. Natomiast sekwencja powielonego w pięciu niezależnych reakcjach PCR genu *Srebf1* liczyła, po złożeniu i dopasowaniu wszystkich odcinków 3605 par zasad, z czego odcinek kodujący stanowiło 3405 nukleotydów. Tym samym w przypadku wszystkich dziewięciu genów uzyskałam kompletne sekwencje odcinków kodujących dla co najmniej 24 osobników, pochodzących z każdej linii (L-BMR, H-BMR w pokoleniu 32 oraz US1, US2 i US3 w pokoleniu 16). Łącznie powieliłam i zsekwencjonowałam 13571 par zasad u każdego osobnika (Tabela 2).

W przypadku zidentyfikowania polimorfizmów w analizowanym genie, dokonywałam dalszej amplifikacji krótszych fragmentów, które obejmowały dany odcinek polimorficzny sekwencji. Analizy takie przeprowadziłam dla wszystkich pozostałych myszy biorących udział w eksperymencie. Tym razem matrycą w reakcji PCR było genomowe DNA

(gDNA), a więc uzyskane fragmenty zawierały zarówno egzony, jak i introny. Takie krótsze sekwencje otrzymałam dla genów *Scd1* i *Fads2*, liczące 256 par zasad (*Scd1*) oraz 306 i 1006 par zasad (*Fads2*).

Analiza polimorfizmów sekwencji genów kodujących enzymy metabolizmu kwasów tłuszczowych

Uzyskane przeze mnie, kompletne sekwencje odcinków egzonowych genów, kodujących enzymy szlaku metabolicznego kwasów tłuszczowych, nie zawierały polimorfizmów w genach *Fads1*, *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5*, *Elovl6* oraz *Srebf1*, kodujących odpowiednio Δ 5-desaturazę kwasów tłuszczowych (D5D), elongazy kwasów tłuszczowych (ELOVL1, ELOVL2, ELOVL3, ELOVL5, ELOVL6) oraz białko regulatorowe SREBP-1c. Sekwencje te okazały się monomorficzne.

Miejsca zmienne zidentyfikowałam z kolei w genach pozostałych dwóch desaturaz: *Scd1* i *Fads2*, kodujących odpowiednio Δ 9-desaturazę (stearoilo-CoA desaturaza, SCD-1c) oraz Δ 6-desaturazę (D6D) kwasów tłuszczowych.

Wszystkie uzyskane przeze mnie sekwencje przedstawione zostały w Suplemencie, a dodatkowo sekwencje genów *Fads1*, *Fads2*, *Elovl2* oraz *Elovl5* zdeponowałam w bazie GenBanku (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) nr: HQ2264057 - HQ2264060 oraz KF987079 - KF987081.

Polimorfizm w genie Scd1

Poprzez sekwencjonowanie produktów łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) wykonanej przy użyciu starterów zaprojektowanych dla mysiego genu *Scd1*, uzyskałam jego kompletny, kodujący fragment składający się z 6 egzonów. Zidentyfikowałam dwa miejsca polimorficzne w całym, podlegającym translacji i liczącym 1068 pary zasad fragmencie, kodującym białko składające się z 355 aminokwasów.

Pierwszy zidentyfikowany przeze mnie polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP; ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) znajduje się na 75 pozycji drugiego egzonu, na 259 pozycji w sekwencji mRNA oraz na 859 pozycji w całym genie. Substytucja ta ma charakter tranzycji, gdzie purynowa guanina zostaje zastąpiona również purynową adeniną (G \leftrightarrow A), znajdującą się na trzecim miejscu w kodonie (ACG \leftrightarrow ACA). Tego typu mutacje niemal zawsze mają charakter milczący, co oznacza, że nie prowadzą do zmiany

aminokwasowej w białku, a w obu przypadkach kodowany jest polarny i alifatyczny hydroksyaminokwas: treonina (T↔ T), będący na 33 pozycji w białku.

Drugi SNP w genie *Scd1* ma charakter transwersji, gdzie purynowa adenina zostaje zastąpiona przez zasadę pirymidynową w postaci tyminy (A↔ T). Substytucja ta jest zlokalizowana w pozycji 80 w egzonie trzecim, w pozycji 538 w sekwencji mRNA i w pozycji 4329 w całym genie. Podobnie jak w przypadku pierwszego SNP mutacja ta jest synonimiczna i dotyczy trzeciego miejsca w kodonie (GCA↔ GCU), a w obu przypadkach kodowana jest niepolarna i alifatyczna alanina (A↔ A), znajdująca się na 126 pozycji w białku.

Oba zidentyfikowane w genie *Scd1* polimorfizmy SNP oddalone od siebie o 3470 par zasad, okazały się być całkowicie ze sobą sprzężone. Guanina w egzonie drugim powiązana jest z adeniną w egzonie trzecim, a adenina w egzonie drugim z tyminą w egzonie trzecim. Pozwoliło to na wskazanie dwóch alleli w genie *Scd1*: allelu A i allelu T. Rycina 2 przedstawia diagram opisywanej zmienności w genie *Scd1*.

Powyższy polimorfizm zidentyfikowałam we wszystkich badanych liniach myszy zarówno w układzie homozygotycznym (AA i TT), jak również w układzie heterozygotycznym (AT). Homozygoty AA nie wystąpiły jedynie w linii selekcyjowanej na niskie tempo metabolizmu (L-BMR) w 32 pokoleniu.

Zróźnicowanie genetyczne w genie Scd1

Myszy należące do dwóch linii selekcyjowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego przez 32 pokolenia (F32) różniły się od siebie pod względem zarówno frekwencji alleli, jak i genotypów w genie *Scd1*. Allel A był częściej reprezentowany w linii H-BMR i występował z frekwencją $F_A = 0,53$, podczas gdy wśród myszy z linii L-BMR pojawiał się bardzo rzadko: $F_A = 0,06$ (test dokładny Fishera, $P < 0,001$). Natomiast allel T dominował w linii L-BMR: $F_T = 0,94$ i był znacznie częstszy niż u myszy z linii H-BMR: $F_T = 0,47$. Tym samym w linii niskometabolicznej (L-BMR) dominowały homozygoty TT: $F_{TT} = 0,89$, podczas gdy myszy będące heterozygotami w locus *Scd1* występowały z frekwencją $F_{AT} = 0,11$, przy całkowitym braku homozygot AA. Zupełnie odmiennie przedstawia się rozkład frekwencji wśród zwierząt z linii H-BMR, gdzie najczęściej reprezentowane były heterozygoty AT: $F_{AT} = 0,46$, a zaraz po nich homozygoty AA: $F_{AA} = 0,30$ i TT: $F_{TT} = 0,24$.

W liniach myszy niselekcjonowanych na żadną cechę (US1, US2, US3) średnia frekwencja allelu A wyniosła $F_A = 0,72$ i różniła się istotnie od myszy z linii L-BMR w pokoleniu F32 (test dokładny Fishera, $P < 0,001$), jak również od myszy z linii H-BMR ($P < 0,01$). Allel T był reprezentowany zdecydowanie rzadziej: $F_T = 0,28$. Tym samym najliczniej reprezentowane były homozygoty AA: $F_{AA} = 0,67$, a pozostałe genotypy były mniej liczne z frekwencjami wynoszącymi odpowiednio: $F_{AT} = 0,11$ i $F_{TT} = 0,22$.

Analogiczne porównanie frekwencji alleli i genotypów w genie *Scd1* wykonałam dla myszy pochodzących z tego samego eksperymentu selekcyjnego, ale z pokolenia F22. Zwierzęta z obu linii selekcyjnych nie różniły się do siebie pod względem frekwencji alleli (test dokładny Fishera, $P > 0,05$): $F_A = 0,31$ w linii L-BMR i $F_A = 0,37$ w linii H-BMR, $F_T = 0,69$ w linii L-BMR i $F_T = 0,63$ w linii H-BMR. Bardzo podobnie przedstawia się również rozkład genotypów w obu porównywanych liniach, a mianowicie najmniej licznie reprezentowane były homozygoty AA: $F_{AA} = 0,10$ w linii L-BMR i $F_{AA} = 0,13$ w linii H-BMR, podczas gdy frekwencja heterozygot AT i homozygot TT była porównywalna: $F_{AT} = 0,43$ i $F_{TT} = 0,47$ w linii L-BMR oraz $F_{AT} = 0,47$ i $F_{TT} = 0,40$ w linii H-BMR.

W Tabeli 9 zestawiałam frekwencje alleli i genotypów w genie *Scd1* w liniach myszy selekcjonowanych na niskie i wysokie tempo metabolizmu podstawowego (L-BMR i H-BMR) z pokolenia F32 oraz F22 oraz w liniach niselekcjonowanych na żadną cechę (USśr.) w pokoleniu F16.

Na podstawie wariacji frekwencji alleli i genotypów w genie *Scd1* pomiędzy liniami myszy selekcjonowanymi na niskie i wysokie tempo metabolizmu podstawowego w 32 pokoleniu (F32) wyznaczyłam współczynnik zróżnicowania genetycznego $F_{ST} = 0,426$. Taka wartość współczynnika F_{ST} według skali Wrighta (1978) wskazuje na bardzo wysokie i istotne zróżnicowanie genetyczne pomiędzy liniami L-BMR i H-BMR (test permutacji, $P < 0,05$). Jednocześnie średnia wartość współczynnika F_{ST} pomiędzy trzema niselekcjonowanymi liniami myszy była również bardzo wysoka i istotnie różniła się od zera ($F_{ST} = 0,453$; wahając się w granicach od 0,033 do 0,723; $P < 0,05$ dla wszystkich porównań). Z kolei myszy z linii L-BMR i H-BMR z pokolenia 22 (F22) nie różniły się istotnie w locus *Scd1* (Tabela 10).

Polimorfizm w genie Scd1 a zróżnicowanie w tempie metabolizmu podstawowego (BMR)

Myszy z linii selekcjonowanych na niskie i wysokie tempo metabolizmu podstawowego (L-BMR i H-BMR) przez 32 pokolenia, posiadające odmienne warianty

genetyczne w genie *Scd1*, charakteryzowały się różnym tempem metabolizmu podstawowego. Homozygoty TT posiadały istotnie statystycznie niższe BMR wynoszące $49,62 \pm 1,317$ SE ml O₂ h⁻¹ g⁻¹ w stosunku do homozygot AA o BMR = $63,63 \pm 1,917$ SE ml O₂ h⁻¹ g⁻¹, jak i heterozygot AT, u których BMR = $63,15 \pm 2,719$ SE ml O₂ h⁻¹ g⁻¹ (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,001$). Nie wykazałam natomiast istotnych statystycznie różnic w BMR pomiędzy zwierzętami posiadającymi allel A (o genotypie AA lub AT; $P = 0,91$; Wykres 2A).

Identyczne zależności uzyskałam analizując wartości resztkowe BMR. Homozygoty TT o najniższej wartości resztkowej BMR, wynoszącej $-4,74 \pm 1,242$ SE ml O₂ h⁻¹ g⁻¹ różniły się istotnie statystycznie (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,001$) zarówno od homozygot AA o wartości resztkowej BMR równej $8,96 \pm 1,013$ SE ml O₂ h⁻¹ g⁻¹, jak i od heterozygot AT z wartością resztkową liczącą $8,78 \pm 2,403$ SE ml O₂ h⁻¹ g⁻¹, które z kolei nie różniły się od siebie nawzajem ($P = 0,96$; Wykres 2B).

Polimorfizm w genie Fads2

Powieliałam, a następnie zsekwencjonowałam kompletny, kodujący fragment mysiego genu *Fads2*, składający się z 12 egzonów. Podobnie jak w przypadku genu *Scd1* zidentyfikowałam dwa miejsca polimorficzne w całym, podlegającym translacji i liczącym sobie 1335 par zasad fragmencie, kodującym białko składające się z 434 aminokwasów.

Pierwszy zidentyfikowany przeze mnie polimorfizm pojedynczego nukleotydu ma charakter tranzycji, będącej mutacją punktową polegającą na zamianie jednej zasady purynowej lub pirymidynowej na drugą o takim samym charakterze chemicznym. W tym przypadku podstawieniu ulegają zasady purynowe, tj. guanina zostaje zastąpiona adeniną (G↔A). Miejsce zmienne znajduje się na 167 pozycji w egzonie trzecim, na 487 pozycji w sekwencji mRNA oraz na 12555 w całym genie. Nukleotydy te położone są na pierwszym miejscu w kodonie (GUC↔AUC), co często prowadzi do tzw. mutacji zmiany sensu, lub inaczej substytucji niesynonimicznych. Opisywany tu polimorfizm ma taki charakter i skutkuje zamianą aminokwasową w białku. Oznacza to, że każdy wariant genu daje w konsekwencji odmienny produkt, różniący się jednym aminokwasem, w którym walina, będąca niepolarnym i alifatycznym aminokwasem w pozycji 163 białka zostaje zastąpiona również niepolarną i alifatyczną izoleucyną (V↔I).

Drugi SNP w genie *Fads2* ma również charakter tranzycji i skutkuje zamianą jednej pirymidyny na inną (C↔T). Jest on zlokalizowany na pozycji 88 w egzonie dziewiątym, na

pozycji 1068 w sekwencji mRNA oraz na pozycji 34902 w całym genie. Ulegające zamianie nukleotydy położone są na trzecim miejscu w kodonie (TTC↔ TTT), co zawsze prowadzi do powstania tzw. mutacji milczących lub inaczej synonimicznych. Oznacza to, iż w obu przypadkach na skutek translacji w pozycji 256 białka podstawiony zostaje ten sam aminokwas, tj. fenyloalanina (F↔ F).

Podobnie, jak miało to miejsce w genie *Scd1*, oba zidentyfikowane polimorfizmy SNP, oddalone od siebie o 22347 par zasad, okazały się być całkowicie ze sobą sprzężone. Oznacza to, iż guanina w pierwszym SNP zawsze występowała z cytozyną w drugim SNP, podczas gdy adenina z pierwszego SNP z tyminą w drugim SNP. Dlatego właśnie w dalszych analizach skupiłam się jedynie na mutacji niesynonimicznej (G↔ A). Pozwoliło to na wskazanie dwóch alleli w genie *Fads2*, odpowiadających dwóm wariantom białka D6D, tj. allelu G (wariant z waliną; V) oraz allelu A (wariant z izoleucyną; I). Rycina 3 przedstawia diagram omówionej zmienności w genie *Fads2*.

Opisywany polimorfizm zaobserwowałam we wszystkich badanych liniach myszy zarówno w układzie homozygotycznym (GG i AA), jak również w układzie heterozygotycznym (AG).

Zróźnicowanie genetyczne w genie Fads2

Myszy należące do dwóch linii selekcyonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego przez 32 pokolenia (F32) różniły się od siebie pod względem zarówno frekwencji alleli, jak i genotypów w genie *Fads2*. Allel A odpowiadający za powstanie wariantu białka $\Delta 6$ -desaturazy kwasów tłuszczowych (D6D) z izoleucyną (I) w pozycji 163 białka był liczniejszy w linii L-BMR i występował z frekwencją $F_A = 0,34$, podczas gdy wśród myszy z linii H-BMR pojawiał się znacznie rzadziej: $F_A = 0,10$ (test dokładny Fishera, $P < 0,001$). W obu porównywanych liniach częściej występował allel G, który warunkuje powstanie izoformy enzymu D6D z waliną (V), aczkolwiek o wiele liczniej był on reprezentowany w linii H-BMR, bo aż w 90%, podczas gdy w linii L-BMR osiągał on frekwencję 66% (test dokładny Fishera, $P < 0,001$). Tym samym w linii wysokometabolicznej (H-BMR) dominowały homozygoty GG: $F_{GG} = 0,83$, podczas gdy myszy posiadające allel A, zarówno w układzie homozygotycznym (AA), jak i heterozygotycznym (AG) były rzadziej reprezentowane: $F_{AA} = 0,03$, $F_{AG} = 0,14$. Natomiast w linii L-BMR podobnie najrzadsze okazały się homozygoty AA: $F_{AA} =$

0,10, podczas gdy heterozygoty AG i homozygoty GG wykazywały podobne frekwencje: $F_{AG} = 0,47$, $F_{GG} = 0,43$.

W liniach myszy nieselekcjonowanych na żadną cechę (US1, US2, US3) średnia frekwencja allelu A wyniosła $F_A = 0,28$ i różniła się istotnie od myszy z linii H-BMR (test dokładny Fishera, $P < 0,001$), ale nie od myszy z linii L-BMR ($P > 0,05$) w pokoleniu F32. Uśredniona frekwencja genotypów dla zwierząt nieselekcyjnych wskazała na najniższą częstość występowania homozygot AA: $F_{AA} = 0,11$, nieco wyższą heterozygot AG: $F_{AG} = 0,33$ i najwyższą homozygot GG: $F_{GG} = 0,56$.

Podobnie, jak w przypadku genu *Scd1* analogiczne porównanie frekwencji alleli i genotypów w genie *Fads2* wykonałam dla myszy pochodzących z tego samego eksperymentu selekcyjnego, ale 10 pokoleń wcześniej (F22). Zwierzęta z obu linii selekcyjnych różniły się do siebie pod względem frekwencji alleli (test dokładny Fishera, $P < 0,001$). Allel A był bardzo rzadki w linii H-BMR: $F_A = 0,07$, podczas gdy w linii L-BMR występował z frekwencją $F_A = 0,41$, co oczywiście miało swoje przełożenie na częstość występowania genotypów. W linii H-BMR dominowały myszy posiadające genotyp GG: $F_{GG} = 0,87$, który był częstszy od heterozygot AG: $F_{AG} = 0,13$, przy braku homozygot AA. Natomiast myszy niskometaboliczne (L-BMR) najczęściej były heterozygotami w genie *Fads2*: $F_{AG} = 0,63$, a rzadziej homozygotami obu typów: $F_{GG} = 0,27$ i $F_{AA} = 0,10$.

W Tabeli 9 zestawiałam frekwencje alleli i genotypów w genie *Fads2* w liniach myszy nieselekcjonowanych na żadną cechę (USśr.), a także w selekcyjnych liniach myszy (L-BMR i H-BMR) z pokolenia F32 oraz F22.

Na podstawie frekwencji alleli i genotypów w genie *Fads2* pomiędzy liniami myszy selekcjonowanymi na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego w 32 pokoleniu (F32) wyznaczyłam współczynnik zróżnicowania genetycznego $F_{ST} = 0,140$. Taka wartość współczynnika F_{ST} według skali Wrighta (1978) wskazuje na umiarkowane i istotne (test permutacji, $P < 0,05$) zróżnicowanie genetyczne pomiędzy liniami L-BMR i H-BMR. Dla porównania, średnia wartość współczynnika F_{ST} pomiędzy trzema nieselekcjonowanymi liniami myszy była niska i nie różniła się istotnie od zera ($F_{ST} = 0,045$; wahając się w granicach od -0,044 do 0,117, $P < 0,05$ dla wszystkich porównań). Natomiast zróżnicowanie genetyczne pomiędzy liniami L-BMR i H-BMR zwierząt z pokolenia 22 (F22) było bardzo wysokie i istotnie statystycznie różniło się od zera (test permutacji, $P < 0,05$) z wartością $F_{ST} = 0,273$ (Tabela 10).

*Polimorfizm w genie *Fads2* a różnicowanie w tempie metabolizmu podstawowego (BMR)*

Myszy z linii selekcyjnych (L-BMR i H-BMR) w pokoleniu 32, posiadające odmienne genotypy w genie *Fads2*, różniły się również pod względem tempa metabolizmu podstawowego (BMR). Homozygoty GG posiadały istotnie statystycznie wyższe BMR, wynoszące $58,75 \pm 1,498$ SE ml O₂ h⁻¹ g⁻¹ w stosunku do homozygot AA o BMR równym $48,51 \pm 4,417$ SE ml O₂ h⁻¹ g⁻¹ (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$), jak i heterozygot AG, u których BMR wynosił $50,60 \pm 2,329$ SE ml O₂ h⁻¹ g⁻¹ (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,01$). Nie stwierdziłam istotnych statystycznie różnic w BMR pomiędzy zwierzętami posiadającymi allel A (o genotypie AA lub AG; $P = 0,70$; Wykres 3A).

Analiza wartości resztkowych BMR dała analogiczne wyniki. Homozygoty GG wykazywały istotnie wyższe BMR = $4,65 \pm 1,332$ SE ml O₂ h⁻¹ g⁻¹ niż homozygoty AA o BMR = $-4,45 \pm 4,845$ (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$), jak i heterozygoty AG o BMR = $-4,75 \pm 2,060$ SE ml O₂ h⁻¹ g⁻¹ ($P < 0,001$). Natomiast zwierzęta posiadające allel A, tj. o genotypach AA i AG nie różniły się od siebie ($P = 0,953$; Wykres 3B).

Zmienność genetyczna w 10 loci mikrosatelitarnego DNA

Uzyskałam kompletne genotypy w 11 loci mikrosatelitarnego DNA dla wszystkich myszy, biorących udział w eksperymencie, tj. 120 samców z linii selekjonowanych na niskie i wysokie tempo metabolizmu podstawowego (L-BMR, H-BMR) w pokoleniu 32 (F32) oraz 78 zwierząt z pokolenia 22 (F22), a także 36 myszy z trzech linii niselekcyjnych (US1, US2, US3) w pokoleniu 16. Genotypy te poddałam analizom pod kątem identyfikacji błędów w genotypowaniu, takich jak allele zerowe, tak zwane allele „jąkały”, czy brak amplifikacji dużych alleli w programie Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout i in. 2004). Jedynie locus D2Mit295 wykazywał obecność alleli zerowych, co dodatkowo potwierdziły obliczenia wykonane w programie Cervus v.3.0 (Kalinowski i in. 2007), gdzie frekwencja F_{Null} w tym locus wyniosła 0,311. Pozostałe markery, charakteryzowały się relatywnie niską frekwencją alleli zerowych (F_{Null}) w zakresie od - 0,002 w locus D15Mit16 do 0,144 w locus MMGFAPD(D11), co pozwoliło na ich wykorzystanie do dalszych analiz (Tabela 11).

Poziom zmienności genetycznej u badanych myszy w połączonej próbie, na którą składały się wszystkie linie we wszystkich pokoleniach, tj. 234 osobniki, dla 10 loci mikrosatelitarnego DNA był niski. W sumie uzyskałam 35 alleli, co daje średnią liczbę

alleli na locus wynoszącą 3,5. Liczba alleli w poszczególnych loci (N_A) była mała i wynosiła od 2 (MUSMCKA(D7), MMGFAPD(D11)) do 6 (D10Mit20). Najmniejszą heterozygotycznością obserwowaną i oczekiwaną ($H_o = 0,043$; $H_e = 0,058$) charakteryzował się marker MMGFAPD(D11), podczas gdy największą heterozygotyczność obserwowaną ($H_o = 0,568$) stwierdziłam w locus D5Mit95, a oczekiwaną ($H_e = 0,648$) w locus D10Mit20 (Tabela 11).

Porównując między sobą poszczególne linie myszy okazało się, że najniższą zmienność genetyczną w loci mikrosatelitarnego DNA wykazywały samce z linii L-BMR w pokoleniu F32, u których średnia liczba alleli na locus wyniosła zaledwie 2,2, a heterozygotyczność obserwowana ($H_o = 0,283$) i oczekiwana ($H_e = 0,292$) również osiągnęły najniższe wartości. Nieco wyższą zmiennością genetyczną charakteryzowały się myszy z linii H-BMR w pokoleniu F32, aczkolwiek różnice te w porównaniu do myszy z linii L-BMR nie były istotne statystycznie ($P > 0,05$). Porównując natomiast oba pokolenia linii selekcyjnych ze sobą okazało się, iż różnią się one istotnie statystycznie ($P < 0,05$) pod względem średniej liczby alleli na locus, która spadła z 2,4 w pokoleniu F22 do 2,0 w pokoleniu F32. Samce z linii H-BMR z pokolenia F22 nie różniły się pod względem porównywanych parametrów z myszami z tej linii z pokolenia F32 ($P > 0,05$). Natomiast zwierzęta w obrębie linii L-BMR w przeciągu 10 pokoleń wykazały istotny spadek zarówno w bogactwie allelicznym z 2,7 w pokoleniu F22 do 2,2 w pokoleniu F32 ($P < 0,01$), jak i heterozygotyczności oczekiwanej z $H_e = 0,366$ w pokoleniu F22 do $H_e = 0,292$ w pokoleniu F32 ($P < 0,01$). Najwyższą zmienność wykazywały natomiast myszy z linii nieselekcjonowanych na żadną cechę (US), gdzie średnia liczba alleli na locus była istotnie większa w stosunku do myszy z linii H-BMR w pokoleniu F32 oraz L-BMR w pokoleniu F22 ($P < 0,01$), a wartości średniej heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej wynoszące odpowiednio 0,405 i 0,431 były wyższe w porównaniu do myszy z linii L-BMR w pokoleniu F32 ($P < 0,05$; Tabela 12).

Liczba alleli prywatnych (N_p), tj. alleli unikalnych tylko dla danej linii wyniosła 7, z czego po dwa stwierdziłam w linii H-BMR w pokoleniu F32 (locus D6Mit138: allel 138; locus D10Mit20: allel 218) oraz w linii US2 (locus D15Mit16: allel 119; locus D17Mit51: allel 150), a po jednym w linii L-BMR w pokoleniu F32 (locus D5Mit95: allel 134), w linii L-BMR w pokoleniu F22 (locus D15Mit16: allel 127) oraz w linii US3 (locus D1Mit322: allel 332; Tabela 13).

Wyznaczenie współczynnika inbredu (F_{IS})

Uzyskana na podstawie danych pochodzących ze zgenotypowania analizowanych zwierząt w 10 loci mikrosatelitarnego DNA wartość współczynnika inbredu (F_{IS}) dla myszy z linii H-BMR w pokoleniach F22 i F32 była niska, ujemna i nieistotnie różna od zera (F22, $F_{IS} = -0,016$; F32, $F_{IS} = -0,048$), a dla myszy z linii L-BMR, niska i nieistotna statystycznie (F22, $F_{IS} = 0,072$; F32, $F_{IS} = 0,023$). Uzyskane wartości współczynnika F_{IS} wskazują na to, iż myszy w obrębie linii były krzyżowane w danym pokoleniu losowo, z minimalną wsobnością.

Oszacowanie poziomu dryfu genetycznego

Zróżnicowanie genetyczne, którego miarą jest współczynnik F_{ST} oszacowałam pomiędzy liniami selekcyjnymi (L-BMR vs H-BMR) w obu pokoleniach (F22 i F32), a także pomiędzy liniami myszy nioselekcjonowanymi na żadną cechę (wartość F_{ST} uśredniona dla wszystkich porównań między trzema liniami: US1, US2, US3) w genach polimorficznych (*Scd1* i *Fads2*) oraz w 10 loci mikrosatelitarnego DNA, stanowiącego neutralne tło genetyczne. Wartości współczynnika F_{ST} w genie *Scd1* pomiędzy liniami selekcyjnymi wskazują na brak zróżnicowania genetycznego w pokoleniu F22 ($F_{ST} = 0,00$; ns) oraz bardzo wysokie zróżnicowanie w pokoleniu F32 ($F_{ST} = 0,426$; $P < 0,001$) i podobnie wysokie, co jest dosyć zaskakujące, w liniach nioselekcjonowanych ($F_{ST} = 0,458$; $P < 0,001$).

Natomiast wartości współczynnika F_{ST} w genie *Fads2* pomiędzy liniami selekcyjnymi wskazują na bardzo wysokie i istotne zróżnicowanie genetyczne w pokoleniu F22 ($F_{ST} = 0,273$; $P < 0,05$), umiarkowane w pokoleniu F32 ($F_{ST} = 0,140$; $P < 0,05$), przy jednocześnie niskim i nieistotnym zróżnicowaniu w liniach nioselekcjonowanych ($F_{ST} = 0,045$; $P > 0,05$).

Wartość współczynnika F_{ST} uzyskana na podstawie 10 loci mikrosatelitarnego DNA, która może być uznana za miarę dryfu genetycznego, pomiędzy liniami selekcyjnymi L-BMR i H-BMR w pokoleniu F22 wskazuje na umiarkowane i istotne statystycznie zróżnicowanie genetyczne ($F_{ST} = 0,086$; 95% CI: 0,029 – 0,171; $P < 0,001$), podczas gdy 10 pokoleń później (F32) wartość współczynnika F_{ST} wzrosła do 0,224; 95% CI: 0,111 – 0,314; $P < 0,001$. Natomiast średnia wartość F_{ST} dla 10 loci mikrosatelitarnych

oszacowana dla myszy z linii nieselekcjonowanych (US) wyniosła 0,153; 95% CI: 0,058 – 0,250; $P < 0,001$. Uzyskane wyniki zestawiałam w Tabeli 10.

Identyfikacja loci poddanych działaniu selekcji

W celu wykrycia loci poddanych działaniu selekcji, a więc potencjalnie związanych z tempem metabolizmu podstawowego (BMR), w przypadku genu *Scd1* wybrałam myszy z pokolenia F32, gdzie wartość współczynnika F_{ST} oszacowana na podstawie neutralnych loci mikrosatelitarnego DNA była niższa niż w przypadku wartość F_{ST} w genie *Scd1*. Analiza wartości F_{ST} w genie *Scd1* oraz w 10 loci mikrosatelitarnego DNA pomiędzy liniami L-BMR i H-BMR w F32 przy użyciu programu LOSITAN (Antao i in. 2008) pokazała, że genetyczne zróżnicowanie pomiędzy liniami jest istotnie większe w locus *Scd1* niż w przypadku loci mikrosatelitarnego DNA, z wyjątkiem locus MUSMCK, co sugeruje, że locus to oraz *Scd1* mogą być pod wpływem działania selekcji (Rycina 4). Co więcej, mimo działania dryfu genetycznego w pokoleniu F32, wartość F_{ST} w genie *Scd1* jest prawie dwukrotnie wyższa, niż uzyskana dla loci mikrosatelitarnego DNA.

Identyczne analizy wykonałam dla drugiego polimorficznego genu, tj. *Fads2*. Jednakże w tym przypadku wybrałam jedynie myszy z pokolenia F22, gdzie wartość F_{ST} oszacowana na podstawie neutralnych loci mikrosatelitarnego DNA jest niższa niż wartość F_{ST} w genie *Fads2*. Analiza wartości F_{ST} w genie *Fads2* oraz w 10 loci mikrosatelitarnego DNA pomiędzy liniami L-BMR i H-BMR w F22 przy użyciu programu LOSITAN (Antao i in. 2008) pokazała, że genetyczne zróżnicowanie pomiędzy liniami jest istotnie większe w locus *Fads2* niż w przypadku każdego z 10 loci mikrosatelitarnego DNA, co sugeruje, że locus to podobnie jak gen *Scd1* może być pod wpływem działania selekcji (Rycina 5).

Natomiast test na loci poddane działaniu selekcji przeprowadzone wśród myszy należących do trzech linii nieselekcjonowanych na żadną cechę (US) w przeciągu 16 pokoleń (F16) wskazał, iż genetyczne zróżnicowanie pomiędzy liniami jest również istotnie większe w locus *Scd1* niż w przypadku loci mikrosatelitarnego DNA, z wyjątkiem locus D1Mit322 (Rycina 6).

Analiza różnic w ekspresji genów szlaku metabolicznego kwasów tłuszczowych

W przypadku wszystkich badanych genów, kodujących enzymy szlaku przemian kwasów tłuszczowych (*Scd1*, *Fads1*, *Fads2*, *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5*, *Elovl6*) oraz

geny, kodujące białko regulatorowe SREBP-1c (*Srebp1*), nie wykazałam różnic w ich ekspresji porównując ze sobą myszy z linii selekcjonowanych na niskie i wysokie tempo metabolizmu podstawowego (L-BMR i H-BMR) przez 32 pokolenia (F32), a także w porównaniach tych linii z trzema liniami nioselekcyjnymi (US1, US2, US3). Wartości $\Delta\Delta C_t$ wyznaczone metodą Pfaffla (Pfaffl, 2001) wahały się w przedziale od 0,5 w genach *Elovl1* i *Elovl3* (L-BMR vs USśr. oraz H-BMR vs USśr., w obu przypadkach) do 1,7 w genie *Elovl6* (L-BMR vs H-BMR) oraz w genie *Srebp1* (H-BMR vs USśr.). Wszystkie uzyskane wyniki nie były również istotne statystycznie (jednoczynnikowa ANOVA, $P > 0,05$ we wszystkich porównaniach).

Podobnie niskie i nieistotne wartości $\Delta\Delta C_t$ uzyskałam dla różnych wariantów genetycznych genów *Scd1* i *Fads2*, świadczące o braku różnic w ekspresji. Wartości $\Delta\Delta C_t$ wahały się od 1,0 (AA vs AT) do 1,4 (AA vs TT, AT vs TT) w genie *Scd1* oraz od 0,6 (AA vs GG) do 1,5 (AA vs AG) w genie *Fads2*.

Analizy biochemiczne

Analiza różnic w profilu lipidowym

Podczas określania profilu lipidowego hepatocytów myszy laboratoryjnych selekcjonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego przez 32 pokolenia (F32) udało się ustalić jakościowy i ilościowy skład 14 kwasów tłuszczowych we frakcji lipidów całkowitych (TL), spośród których cztery to kwasy nasycone (SFA), tj. kwasy mirystynowy (C14:0), palmitynowy (C16:0), stearynowy (C18:0) i arachidowy (C20:0), cztery to kwasy jednonienasycone (MUFA) z rodziny kwasów omeg-7, tj. kwasy palmitooleinowy (C16:1n-7) i C18:1n-7 oraz omega-9, tj. kwasy oleinowy (C18:1n-9) i eikozanowy (C20:1n-9), a pozostałe to kwasy wielonienasycone (PUFA) z rodziny kwasów omega-3, tj. kwasy α -linolenowy (C18:3n-3), eikozapentaenowy (C20:5n-3) i dokozaheksaenowy (C22:6n-3) oraz omega-6, tj. kwasy linolowy (C18:2n-6), γ -linolenowy (C18:3n-6) i arachidonowy (C20:4n-6). Natomiast we frakcji fosfolipidów (PL) nie udało się oznaczyć kwasów mirystynowego (C14:0), arachidowego (C20:0), eikozanowego (C20:1n-9), α -linolenowego (C18:3n-3), a także γ -linolenowego (C18:3n-6) z powodu ich śladowych ilości (Tabela 14).

Myszy należące do dwóch linii selekcionowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego w pokoleniu F32 różniły się pod względem procentowego udziału poszczególnych kwasów tłuszczowych zarówno we frakcji lipidów całkowitych (TL), jak i we frakcji fosfolipidów (PL). Samce z linii niskometabolicznej (L-BMR) posiadały istotnie więcej kwasów mirystynowego (C14:0), palmitooleinowego (C16:1n-7), wakcenenowego (C18:1n-7), α -linolenowego (C18:3n-3), γ -linolenowego (C18:3n-6) oraz dokozaheksaenowego (C22:6n-3) we frakcji lipidów całkowitych (TL) w porównaniu do myszy z linii wysokometabolicznej (H-BMR). Natomiast zwierzęta z linii H-BMR posiadały w swoich hepatocytach istotnie statystycznie więcej kwasów palmitynowego (C16:0), stearynowego (C18:0), arachidowego (C20:0), oleinowego (C18:1n-9) oraz arachidonowego (C20:4n-6). Z kolei procentowy udział kwasów eikozanowego (C20:1n-9), linolowego (C18:2n-6), a także eikozapentaenowego (C20:5n-3) we frakcji lipidów całkowitych (TL) nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy myszami z linii L-BMR i H-BMR. W przypadku frakcji fosfolipidów (PL) myszy z linii L-BMR charakteryzowały się wyższą zawartością kwasów palmitooleinowego (C16:1n-7) oraz linolowego (C18:2n-6), podczas gdy samce z linii H-BMR miały w swych hepatocytach więcej kwasów palmitynowego (C16:0) oraz oleinowego (C18:1n-9). Myszy z linii L-BMR i H-BMR w pokoleniu F32 nie różniły się natomiast pod względem procentowego udziału pozostałych kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL), tj. kwasów stearynowego (C18:0), wakcenenowego (C18:1n-7), arachidonowego (C20:4n-6), eikozapentaenowego (C20:5n-3) i dokozaheksaenowego (C22:6n-3). Powyższe wyniki wraz z wartościami *P* i *F* uzyskanymi w teście jednoczynnikowej ANOVA zestawiam w Tabeli 14.

Następnie określiłam różnice w składzie nasyconych (SFA), jednonienasyconych (MUFA) oraz wielonienasyconych (PUFA) kwasów tłuszczowych pomiędzy analizowanymi liniami myszy. Samce z linii L-BMR posiadały we frakcji lipidów całkowitych (TL) mniej kwasów SFA, a więcej kwasów MUFA w stosunku do zwierząt z linii H-BMR, podczas gdy kwasy PUFA nie różniły się istotnie statystycznie. Natomiast dane uzyskane z oznaczeń kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL) wskazały na istotnie mniejszy udział kwasów SFA i MUFA, a więcej PUFA u myszy z linii L-BMR w porównaniu do samców z linii H-BMR. Powyższe wyniki wraz z wartościami *P* i *F* uzyskanymi w teście jednoczynnikowej ANOVA zestawiam w Tabeli 14.

Podobne porównania przeprowadziłam dla myszy selekcionowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego przez 32 pokolenia,

posiadających odmienne genotypy w genie *Scd1* (AA, AT, TT). Test jednoczynnikowej ANOVA przeprowadzony dla danych z oznaczeń kwasów tłuszczowych we frakcji lipidów całkowitych (TL) wykazał, że samce będące homozygotami AA miały istotnie statystycznie mniej kwasów wakcenenowego (C18:1n-7) i dokozaheksaenowego (C22:6n-3) w stosunku do heterozygot AT oraz kwasów palmitoleinowego (C16:1n-7), wakcenenowego (C18:1n-7), α -linolenowego (C18:3n-3) i γ -linolenowego (C18:3n-6) w porównaniu do homozygot TT, które z kolei posiadały istotnie mniej kwasów palmitynowego (C16:0), stearynowego (C18:0), arachidowego (C20:0) i oleinowego (C18:1n-9). Heterozygoty AT charakteryzowały się natomiast wyższą zawartością kwasów palmitynowego (C16:0), arachidowego (C20:0), oleinowego (C18:1n-9), arachidonowego (C20:4n-6) i eikozapentaenowego (C20:5n-3), a niższą kwasów palmitoleinowego (C16:1n-7), wakcenenowego (C18:1n-7) i α -linolenowego (C18:3n-3) w stosunku do homozygot TT. Natomiast we frakcji fosfolipidów (PL) nie udało mi się wykazać istotnych różnic między homozygotami AA i heterozygotami AT, które z kolei charakteryzowały się istotnie wyższą zawartością kwasów palmitynowego (C16:0) i oleinowego (C18:1n-9), a niższą kwasu linolowego (C18:2n-6) w porównaniu do homozygot TT. Dodatkowo, homozygoty AA wyróżniał mniejszy procentowy udział kwasu palmitoleinowego (C16:1n-7), a heterozygoty AT większy kwasów wakcenenowego (C18:1n-7) i eikozapentaenowego (C20:5n-3) w stosunku do homozygot TT (Tabela 15).

Na podstawie danych uzyskanych z oznaczania kwasów tłuszczowych we frakcji lipidów całkowitych (TL) wykazałam, iż myszy o genotypach AA i AT w genie *Scd1* posiadały istotnie statystycznie więcej nasyconych (SFA), a mniej jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA), podczas gdy kwasy wielonienasycone (PUFA) osiągały podobne wartości wśród wszystkich trzech genotypów (Tabela 15). Natomiast wyniki uzyskane na podstawie analizy ilościowego składu kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL) wskazują, iż myszy będące homozygotami TT charakteryzowały się niższym udziałem kwasów SFA niż homozygoty AA, wyższą zawartością kwasów MUFA niż heterozygoty AT oraz kwasów PUFA w porównaniu do zwierząt o genotypach AA lub AT. Powyższe dane wraz z wartościami *P* i *F* uzyskanymi w teście jednoczynnikowej ANOVA zestawiałam w Tabeli 15.

Analogiczne analizy przeprowadziłam dla drugiego polimorficznego genu, tj. *Fads2*. Myszy posiadające genotyp AA w genie *Fads2* zawierały w swoich hepatocytach we frakcji lipidów całkowitych (TL) istotnie statystycznie mniej kwasu α -linolenowego (C18:3n-3), a więcej kwasu arachidonowego (C20:4n-6) w stosunku do heterozygot AG

oraz więcej kwasu dokozaheksaenowego (C22:6n-3) w porównaniu do homozygot GG. Te z kolei charakteryzowały się wyższą zawartością kwasów palmitynowego (C16:0), arachidowego (C20:0), oleinowego (C18:1n-9) i arachidonowego (C20:4n-6), a niższą kwasów mirystynowego (C14:0), wakcenenowego (C18:1n-7), α -linolenowego (C18:3n-3) oraz γ -linolenowego (C18:3n-6) w stosunku do heterozygot AG. Nie wykazałam natomiast istotnych statystycznie różnic w ilości kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL) pomiędzy homozygotami AA a zwierzętami o genotypach AG i GG. Jedynie heterozygoty AG różniły się od homozygot GG, zawierając istotnie mniej kwasu palmitynowego (C16:0) oraz więcej kwasu linolowego (C18:2n-6; Tabela 16).

Myszy posiadające różne warianty genetyczne w genie *Fads2* nie różniły się istotnie statystycznie pod względem ilości nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) we frakcji lipidów całkowitych (TL). Natomiast homozygoty GG charakteryzowały się mniejszą zawartością jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) niż heterozygoty AG, a homozygoty AA większym procentowym udziałem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w porównaniu do samców o genotypach AG lub GG. W przypadku frakcji fosfolipidów (PL) wykazałam, że homozygoty GG posiadały istotnie statystycznie więcej kwasów SFA niż myszy o genotypach AA lub AG, oraz mniej kwasów PUFA w porównaniu do heterozygot AG. Powyższe dane wraz z wartościami *P* i *F* uzyskanymi w teście jednoczynnikowej ANOVA zestawiałam w Tabeli 16.

Wszystkie profile lipidowe hepatocytów, tj. myszy z linii L-BMR i H-BMR z pokolenia F32 oraz z linii US, jak również myszy posiadających odmienne warianty genetyczne w genach *Scd1* i *Fads2*, wyznaczone z frakcji lipidów całkowitych (TL) i fosfolipidów (PL) przedstawiłam dodatkowo w Suplemencie (Ryciny S1 – S6) na wykresach kołowych.

Analiza różnic w aktywności enzymów

Aktywność Δ 9-desaturazy (SCD-1c)

Indeks aktywności Δ 9-desaturazy (SCD-1c) wyznaczyłam na podstawie stosunku procentowego udziału produktu reakcji katalizowanej przez ten enzym do jego bezpośredniego substratu, a mianowicie kwasu palmitooleinowego, PO (C16:1n-7) do kwasu palmitynowego (C16:0) we frakcji lipidów całkowitych (TL) wśród zwierząt należących do linii selekcyonowanej na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo

metabolizmu podstawowego przez 32 pokolenia oraz pochodzących z trzech linii nieselekcjonowanych na żadną cechę (US1, US2, US3). Myszy z linii niskometabolicznej (L-BMR) posiadały najwyższą wartość tego indeksu ($I_{xA} \text{ SCD-1c} = 0,07 \pm 0,002 \text{ SE}$), a najniższą zwierzęta z linii H-BMR ($I_{xA} \text{ SCD-1c} = 0,05 \pm 0,002 \text{ SE}$) oraz myszy z linii nieselekcyjnych ($I_{xA} \text{ SCD-1c} = 0,05 \pm 0,001 \text{ SE}$; Wykres 4A, Tabela 14). Różnice pomiędzy poszczególnymi liniami były istotne statystycznie w porównaniach wartości $I_{xA} \text{ SCD-1c}$ pomiędzy liniami selekcyjnymi (L-BMR vs H-BMR), linią L-BMR i każdą z linii nieselekcyjnych osobno (US1, US2, US3) oraz z wartością uśrednioną dla trzech linii nieselekcyjnych (US \bar{s} r.). Natomiast myszy z linii H-BMR nie różniły się istotnie statystycznie od zwierząt z poszczególnych linii nieselekcyjnych (Tabela 17).

Indeks aktywności $\Delta 9$ -desaturazy ($I_{xA} \text{ SCD-1c}$) został również wyznaczony dla myszy z linii selekcyjnych w pokoleniu F32 posiadających różne warianty genetyczne w genie *Scd1* (Wykres 4B, Tabela 15). Myszy posiadające allel A w genie *Scd1* (homozygoty AA i heterozygoty AT) nie różniły się od siebie ($P > 0,05$), ale różniły się istotnie statystycznie od osobników będących homozygotami TT (AA v TT: $P < 0,001$; AT v TT: $P < 0,01$; Tabela 15).

Aktywność $\Delta 6$ -desaturazy (D6D)

Analogicznie, jak w przypadku genu *Scd1*, wyznaczyłam również indeks aktywności $\Delta 6$ -desaturazy ($I_{xA} \text{ D6D}$), wyrażony jako stosunek procentowego udziału kwasu γ -linolenowego, GLA (C18:3n-6) do kwasu linolowego, LA (C18:2n-6) wśród myszy należących do linii selekcjonowanej na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu w przeciągu 32 pokoleń (F32) oraz myszy z trzech linii nieselekcjonowanych na żadną cechę (US1, US2 i US3). Najwyższą wartością tego indeksu charakteryzowały się myszy z linii L-BMR ($I_{xA} \text{ D6D} = 0,0042 \pm 0,00021 \text{ SE}$), pośrednią z linii H-BMR ($I_{xA} \text{ D6D} = 0,0036 \pm 0,00014 \text{ SE}$), a najniższą samce z linii nieselekcyjnych ($I_{xA} \text{ D6D}$ od $0,0015 \pm 0,00026 \text{ SE}$ do $0,0026 \pm 0,00024 \text{ SE}$; Wykres 5A, Tabela 14). Różnice w indeksie aktywności pomiędzy poszczególnymi liniami były istotne statystycznie w porównaniach wartości $I_{xA} \text{ D6D}$ pomiędzy liniami selekcyjnymi (L-BMR vs H-BMR), obiema liniami selekcyjnymi i każdą z linii nieselekcyjnych osobno (US1, US2, US3) i z wartością uśrednioną dla trzech linii nieselekcyjnych (US \bar{s} r.), a także pomiędzy liniami US1 i US3 (jednoczynnikowa ANOVA, Tabela 18).

Indeks aktywności $\Delta 6$ -desaturazy (IxA D6D) wyznaczyłam dla myszy posiadających różne allele w genie *Fads2* (Wykres 5B, Tabela 16). Homozygoty obu typów (AA i GG) nie różniły się od siebie, podobnie jak homozygota AA i heterozygota AG (jednoczynnikowa ANOVA, $P > 0,05$). Jedynie porównanie wartości IxA D6D pomiędzy homozygotami GG i heterozygotami AG dało wynik istotny statystycznie (Tabela 16).

Analiza różnic w indeksie saturacji (IS), nienasylenia (IU) i peroksydacji (IP) błon komórkowych

Uzyskane przeze mnie wyniki pozwoliły na wyznaczenie indeksu saturacji (IS), będącego miarą stopnia nasycenia błon komórkowych, indeksu nienasylenia (IU) stanowiącego wskaźnik natężenia podwójnych wiązań w membranach biologicznych oraz indeksu peroksydacji (IP), którego wartość świadczy o podatności błon komórkowych na działanie reaktywnych form tlenu. Metodycznie poprawnie jest, aby parametry te ustalać na podstawie danych pochodzących z frakcji fosfolipidów (PL), ponieważ to ona bezpośrednio związana jest z błonami komórkowymi (Hulbert i in. 2007), aczkolwiek dla porównania podaję również wartości powyższych parametrów uzyskanych z oznaczeń kwasów tłuszczowych we frakcji lipidów całkowitych (TL).

Indeks saturacji (IS) błon komórkowych

Indeks saturacji (IS), będący stosunkiem procentowego udziału jednonienasyconych (MUFA) do wielonienasyconych (PUFA) kwasów tłuszczowych (Hulbert i in. 2007) wyznaczyłam dla myszy pochodzących z linii selekcyonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego w 32 pokoleniu (F32) oraz dla różnych wariantów genetycznych w genach polimorficznych, tj. w genie *Scd1* i *Fads2*.

Uzyskane wyniki wskazują, iż myszy z linii L-BMR i H-BMR w pokoleniu F32 różniły się statystycznie pod względem wartości indeksu saturacji (IS). Samce z linii niskometabolicznej (L-BMR) posiadały istotnie niższą wartość tego indeksu w porównaniu do myszy z linii H-BMR (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,001$), podczas gdy IS obliczony na podstawie frakcji lipidów całkowitych (TL) dawał dokładnie odwrotne zależności, które również były istotnie statystycznie (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$; Tabela 14).

Porównując myszy o odmiennych genotypach w polimorficznych genach *Scd1* i *Fads2* okazało się, że jedynie homozygoty TT w genie *Scd1* wykazywały niższą wartość indeksu saturacji (IS) dla danych z frakcji fosfolipidów (PL) niż heterozygoty AT (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,001$), podczas gdy wszelkie pozostałe wartości dla obu genów i w obu frakcjach lipidów (PL i TL) nie różniły się istotnie od siebie (jednoczynnikowa ANOVA, $P > 0,05$; Tabela 15 i Tabela 16).

Indeks nienasycenia (IU) błon komórkowych

Indeks nienasycenia (IU) błon komórkowych, będący miarą natężenia ilości podwójnych wiązań w membranach biologicznych, wyznaczyłam dla obu linii selekcyjnych (L-BMR i H-BMR) w pokoleniu F32 oraz dla różnych alleli w genach *Scd1* i *Fads2*.

Myszy we wszystkich porównaniach, nie wykazywały różnic w wartości indeksu nienasycenia (IU) błon komórkowych obliczonego na podstawie danych z frakcji fosfolipidów (PL), co oznacza, że posiadały one podobne natężenie podwójnych wiązań w membranach biologicznych. Jedynie wyniki uzyskane na podstawie frakcji lipidów całkowitych (TL) wskazały na istotnie statystycznie wyższą wartość IU wśród zwierząt posiadających genotyp AT w genie *Scd1* w porównaniu do homozygot AA (Tabela 15) oraz homozygot AA w genie *Fads2* w stosunku do homozygot GG (Tabela 16).

Indeks peroksydacji (IP) błon komórkowych

Indeks peroksydacji (IP), będący miarą podatności błon komórkowych na reaktywne działanie tlenu, wyznaczyłam podobnie, jak w przypadku indeksu saturacji (IS) i nienasycenia (IU) membran biologicznych, dla linii L-BMR i H-BMR w pokoleniu F32 oraz dla wszystkich wariantów genetycznych w genach *Scd1* i *Fads2*.

Test jednoczynnikowej ANOVA przeprowadzony dla danych z oznaczeń frakcji fosfolipidów (PL) wykazał brak różnic w indeksie peroksydacji we wszystkich porównaniach ($P > 0,05$; Tabela 14, Tabela 15 i Tabela 16). Oznacza to, iż myszy niezależnie od przynależności do linii (L-BMR lub H-BMR) oraz od posiadanego genotypu zarówno w genie *Scd1* (AA/AT/TT), jak i w genie *Fads2* (AA/AG/GG), posiadały błony komórkowe w równym stopniu narażone na peroksydację. Jedynie wyniki uzyskane na podstawie frakcji lipidów całkowitych (TL) wskazały na istotnie statystycznie

wyższą wartość IP wśród zwierząt posiadających genotyp AT w genie *Scd1* w porównaniu do homozygot AA (Tabela 15).

Różnice w aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy)

Nie stwierdziłam istotnych statystycznie różnic w aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) pomiędzy liniami myszy pochodzącymi z linii selekcyonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego przez 32 pokolenia (F32), podobnie jak między trzema liniami nieselekcyonowanymi na żadną cechę (US1, US2, US3; jednoczynnikowa ANOVA, $P > 0,05$). Różnice te wystąpiły natomiast pomiędzy myszami z każdej z linii nieselekcyjnej, a obiema liniami selekcyjnymi (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,001$ we wszystkich porównaniach). Co zaskakujące, myszy z linii selekcyjnych (L-BMR i H-BMR) miały istotnie statystycznie wyższą aktywność pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) w stosunku do linii nieselekcyonowanych (Wykres 6A).

Nie udało mi się wykazać różnic w aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) pomiędzy myszami laboratoryjnymi selekcyonowanymi na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu, posiadającymi różne genotypy w genie *Fads2* (AA, AG i GG). Mimo, iż homozygoty AA wykazywały wyższą aktywność pompy sodowo-potasowej od homozygot GG i heterozygot AG, to różnice te nie były istotne statystycznie (jednoczynnikowa ANOVA, $P > 0,05$ we wszystkich porównaniach; Wykres 6C).

Jedynie różnice w aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) stwierdziłam dla obu typów homozygot w genie *Scd1*, tj. o genotypach AA i TT (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$). Homozygoty te nie różniły się natomiast od heterozygot AT ($P > 0,05$ w obu porównaniach; Wykres 6B).

Wyniki analiz regresji

Analiza regresji wykazała istotną statystycznie ujemną wartość współczynnika korelacji pomiędzy tempem metabolizmu podstawowego (BMR) w liniach myszy selekcyonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego przez 32 pokolenia (F32) a indeksem aktywności $\Delta 9$ -desaturazy (IxA SCD-1c; $r = -0,305$, $P < 0,001$; Wykres 7A) oraz indeksem aktywności $\Delta 6$ -desaturazy (IxA

D6D; $r = -0,197$, $P < 0,05$; Wykres 8A) wyznaczonymi na podstawie oznaczeń kwasów tłuszczowych we frakcji lipidów całkowitych (TL), a także procentowym udziałem nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA; $r = 0,269$, $P < 0,01$; Wykres 9A) i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA; $r = -0,271$, $P < 0,01$; Wykres 11A) we frakcji lipidów całkowitych (TL) oraz jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA; $r = 0,378$, $P < 0,001$; Wykres 12A) i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA; $r = -0,448$, $P < 0,001$; Wykres 14A) we frakcji fosfolipidów (PL). Tempo metabolizmu podstawowego (BMR) dodatkowo korelowało również z indeksem saturacji (IS; $r = 0,454$, $P < 0,001$; Wykres 15A) wyznaczonym na podstawie oznaczeń kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL). Natomiast brak było takich zależności pomiędzy BMR a procentowym udziałem nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA; $r = 0,125$, $P > 0,05$; Wykres 10A) we frakcji fosfolipidów (PL) oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA; $r = 0,027$, $P > 0,05$; Wykres 13A) we frakcji lipidów całkowitych (TL), a także pomiędzy BMR a indeksem nienasyceń (IU; $r = -0,066$, $P > 0,05$; Wykres 16A) i peroksydacji błon komórkowych (IP; $r = -0,060$, $P > 0,05$; Wykres 17A) obliczonych na podstawie danych z frakcji fosfolipidów (PL). Sprawdziłam również, czy tempo metabolizmu podstawowego koreluje z aktywnością pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy). Analiza regresji pokazała brak takiej zależności ($r = 0,163$; $P > 0,05$; Wykres 18A). W przypadku przeprowadzonych korelacji dla wartości resztkowych BMR uzyskałam podobne wyniki (Wykres 18B). Jedyne zaobserwowane różnice dotyczyły wpływu nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) we frakcji fosfolipidów (PL) na wartości resztkowe BMR, które były nieistotne statystycznie dla skorygowanego o masę tempa metabolizmu podstawowego (BMR), ale istotne dla wartości resztkowych BMR (Wykres 10).

Sprawdziłam również, czy indeksy aktywności $\Delta 9$ -desaturazy (IxA SCD-1c) oraz $\Delta 6$ -desaturazy (IxA D6D) kwasów tłuszczowych mają związek z indeksami saturacji (IS), nienasyceń (IU) oraz peroksydacji (IP) błon komórkowych, a także czy wpływają one na ilość odpowiednio jednonienasyconych (MUFA) i wielonienasyconych (PUFA) kwasów tłuszczowych. Analiza regresji wykazała dodatnią i istotną korelację pomiędzy IxA SCD-1c a procentowym udziałem jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) we frakcji lipidów całkowitych, TL ($r = 0,88$, $P < 0,001$; Wykres 19A) i fosfolipidów, PL ($r = 0,38$, $P < 0,001$; Wykres 19B) oraz indeksem saturacji (IS; $r = 0,303$, $P < 0,001$; Wykres 20A) oraz brak takiej zależności w przypadku indeksów nienasyceń (IU; $r = 0,179$, $P > 0,05$; Wykres 20B) i peroksydacji (IP; $r = 0,058$, $P > 0,05$; Wykres 20C). Natomiast myszy

posiadające wyższą wartość indeksu aktywności $\Delta 6$ -desaturazy (IxA D6D) charakteryzowały się mniejszą zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) we frakcji lipidów całkowitych, TL ($r = -0,34$, $P < 0,001$; Wykres 21A) oraz obniżoną saturacją błon komórkowych (IS; $r = -0,219$, $P < 0,05$; Wykres 22A) przy jednocześnie większej podatności membran biologicznych na peroksydację (IP; $r = 0,185$, $P < 0,05$; Wykres 22C). Z kolei indeks aktywności $\Delta 6$ -desaturazy (IxA D6D) nie wpływał na ilość kwasów PUFA we frakcji fosfolipidów, PL ($r = 0,18$, $P = 0,05$; Wykres 21B) oraz na indeks nienasycenia błon komórkowych (IU; $r = 0,175$, $P > 0,05$; Wykres 22B).

DYSKUSJA

Rola i miejsce teorii metronomu błonowego w badaniach biologicznych

Jednym z centralnych problemów badawczych ekologii fizjologicznej jest ustalenie przyczyn obserwowanej zmienności tempa metabolizmu podstawowego (BMR) zwierząt. Nawet siedmiokrotne zróżnicowanie tempa metabolizmu standardowego (SMR) stałocieplnego ssaka w porównaniu do zmiennoocieplnej jaszczurki o tych samych rozmiarach ciała wskazuje, że zagadnienie to jest nieodzownie związane z ewolucją jednej z najistotniejszych adaptacji fizjologicznych, jaką jest zdolność do utrzymywania stałej temperatury ciała (Brand i in. 1991). W przeciągu ostatnich kilkudziesięciu lat powstało wiele hipotez dotyczących ewolucji stałocieplności. Jedną z nich jest hipoteza autorstwa Benetta i Rubena (1979), według której silny nacisk ewolucyjny na podniesienie maksymalnej wydolności metabolicznej, tj. maksymalnego, chwilowego tempa metabolizmu (PMR, ang. *peak metabolic rate*) pociągał za sobą zwiększenie tempa metabolizmu podstawowego (BMR), co wiązało się ze wzmożoną produkcją ciepła, a w ostateczności, jako produktu ubocznego, z wykształceniem homotermii. Późniejsze hipotezy Farmera (2000) i Kotei (2000) zakładały, iż dobór faworyzował zdolność do długotrwałego podnoszenia maksymalnego tempa metabolizmu (PMR), np. w okresie opieki nad potomstwem, co zwiększało przeżywalność młodych, a więc ich dostosowanie (ang. *fitness*).

Powyższe hipotezy, oparte na założeniach ewolucyjnych, dopełnia teoria metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999), która w prosty sposób tłumaczy przyczyny obserwowanej zmienności tempa metabolizmu podstawowego (BMR) na poziomie organizacji komórkowej i wynikającej z niej modyfikacji procesów fizjologicznych. Już wcześniej autorzy tej teorii wykazali, iż stałocieplny szczur posiadał w swoich tkankach większy udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w porównaniu do tych samych rozmiarów zmiennoocieplnej agamy brodatej (*Amphibolurus vitticeps*) przy jednocześnie większej aktywności oksydazy cytochromowej (Hulbert i Else 1989). Mechanizm zaproponowany przez Hulberta i Else (1999) polega na modyfikacji płynności i przepuszczalności błon komórkowych poprzez zróżnicowanie składu kwasów tłuszczowych. Wysoki udział kwasów wielonienasyconych (PUFA), zwiększający

plastyczność membran biologicznych, prowadzi do podniesienia aktywności białek błonowych oraz kanałów jonowych, co przyczynia się do wzrostu tempa metabolizmu komórki, a w konsekwencji tempa metabolizmu całego organizmu. Teoria Hulberta i Else (1999) została potwierdzona w licznych badaniach porównawczych na poziomie międzygatunkowym. Gatunki charakteryzujące się wysokim tempem metabolizmu podstawowego (BMR), tj. zwierzęta stałocieplne w porównaniu do zmiennocieplnych (Hulbert i Else 1989) oraz ptaki (Hulbert i in. 2002a) i ssaki (Couture i Hulbert 1995; Hulbert i in. 2002b) różniące się masą ciała posiadały w swoich membranach większą ilość kwasów wielonienasyconych (PUFA), a w szczególności kwasu dokozaheksaenowego, DHA (C22:6n-3) przy jednoczesnym małym udziale kwasów jednonienasyconych (MUFA), głównie kwasu oleinowego, OA (C18:1n-9). Zwierzęta te wykazywały również istotnie wyższą aktywność pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy), która w dużej mierze zależy od rodzaju otaczających ją kwasów tłuszczowych (Else i Wu 1999; Turner i in. 2003; 2005; Wu i in. 2004).

Sformułowanie teorii metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) przyczyniło się w kolejnych latach również do lepszego poznania i zrozumienia mechanizmów związanych z procesami starzenia się. Wcześniejsze badania Harmana (1956) oraz Sohala i Weindrucha (1996) dowiodły, iż za uszkodzenia komórkowe, a w szczególności za degradację kwasów nukleinowych oraz kwasów tłuszczowych w błonach biologicznych, odpowiedzialne są tzw. reaktywne formy tlenu (ROS). Na podstawie własnych badań porównawczych Hulbert (2003) uzupełnił istniejącą już wolnorodnikową teorię starzenia się (Harman, 1956) oraz teorię stresu oksydacyjnego (Sohal i Weindruch 1996) o własną teorię metronomu błonowego na temat starzenia się. Badania dowiodły, iż gatunki zwierząt posiadające wyższe tempo metabolizmu podstawowego (BMR) charakteryzowały się krótszą maksymalną długością życia (MLSP; ang. *maximum life span*) w porównaniu do gatunków o niższym BMR. Spowodowane było to tym, iż zwierzęta te posiadały większy udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w swoich membranach biologicznych, które przez to były bardziej narażone na negatywne skutki działania wolnych rodników (Hulbert, 2003; 2005; 2008; Hulbert i in. 2006; 2007). Reaktywne formy tlenu (ROS), powodując narastającą akumulację uszkodzeń tkanek, prowadziły ostatecznie do szybszego starzenia się i śmierci organizmu (Brand, 2000; Hulbert, 2003; Barja, 2004; Speakman, 2005a). Liczne eksperymenty potwierdziły także ujemną zależność między ilością najbardziej wielonienasyconego kwasu tłuszczowego, tj. kwasu dokozaheksaenowego, DHA (C22:6n-3), a więc w najwyższym stopniu narażonego na

peroksydację, a maksymalną długością życia, MLSP (Pamplona i in. 1998; 1999; Portero-Otin i in. 2001; Hulbert, 2003; 2005).

Kontrowersje wokół teorii metronomu błonowego

Teoria metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) miała bardzo duży wkład w rozwój nauki, będąc ważnym elementem spajającym wiele teorii biologicznych i ewolucyjnych, dotyczących ewolucji stałocieplności, roli kwasów tłuszczowych, szczególnie tych wielonienasyconych (PUFA) w regulacji tempa metabolizmu podstawowego (BMR) oraz procesów związanych ze starzeniem się organizmów, co wielokrotnie potwierdziły liczne badania porównawcze na poziomie międzygatunkowym (Hulbert i in. 2002a; 2002b; Turner i in. 2005; Hulbert i in. 2006; 2007).

Z drugiej strony, próby przeprowadzenia podobnych korelacji z zastosowaniem modeli statystycznych uwzględniających jednocześnie efekt masy ciała, jak i kontrasty filogenetyczne dały wyniki będące w opozycji do tych opisanych zarówno w teorii metronomu błonowego oraz teorii metronomu błonowego na temat starzenia się (Speakman, 2005b; Valencak i Ruf 2007). Speakman (2005b) analizując dane literaturowe, dotyczące tempa metabolizmu podstawowego (BMR) oraz maksymalnej długości życia (MLSP) 249 gatunków ssaków nie wykazał zależności między tymi parametrami, a jedynie słabą korelację między MLSP a ilością kwasu dokosaheksaenowego, DHA (C22:6n-3). Z kolei Valencak i Ruf (2007), stosując te same metody statystyczne, przeanalizowali zależność między ilością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) wśród 42 gatunków ssaków a danymi literaturowymi na temat maksymalnej długości życia (MLSP) oraz tempa metabolizmu podstawowego (BMR). Zaobserwowali oni spadek maksymalnej długości życia (MLSP) wraz ze wzrostem proporcji kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 do kwasów z rodziny n-6 (n-3/n-6) w mięśniach szkieletowych. Jednocześnie nie uzyskali oni zależności zarówno między maksymalną długością życia (MLSP) a stopniem nasycenia membran biologicznych, rozumianej jako ilość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) lub liczba wiązań podwójnych oraz ilością kwasu dokosaheksaenowego, DHA (C22:6n-3). Co zaskakujące, stwierdzili oni również brak zależności między ilością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) a tempem metabolizmu podstawowego (BMR) oraz między maksymalną długością życia (MLSP) a tempem metabolizmu podstawowego (BMR), co przeczy zarówno teorii metronomu

blonowego (Hulbert i Else 1999), jak i teorii metronomu blonowego na temat starzenia się (Hulbert, 2003). Co więcej, w opozycji do wcześniejszych doniesień o pozytywnej zależności pomiędzy stopniem podatności membran biologicznych na peroksydację a tempem metabolizmu podstawowego; BMR (Hulbert i Else 2004), zastosowany przez Valencak i Ruf'a (2007) model regresji wskazał na spadek tempa metabolizmu podstawowego (BMR) wraz ze wzrostem indeksu peroksydacji (IP).

Założeniami leżącym u podstaw teorii metronomu blonowego (Hulbert i Else 1999) przeczą również wyniki uzyskane przez Polymeropoulos'a i in. (2012). Else i Hulbert (1985) w swoich badaniach porównawczych zwierząt stałocieplnych i zmiennocieplnych zaobserwowali pozytywną korelację między liczbą mitochondriów oraz całkowitą sumą powierzchni błony mitochondrialnej wszystkich tkanek a tempem metabolizmu podstawowego (BMR). Późniejsze badania potwierdziły, że skorygowane o masę ciała tempo metabolizmu podstawowego (BMR) pozytywnie koreluje z mitochondrialnym przepływem protonów (Porter i Brand 1993; Rolfe i in. 1999). Natomiast Polymeropoulos i in. (2012), porównując podobnych rozmiarów ciała torbacza, tj. oposa krótkoogonowego (*Monodelphis domestica*) z ssakiem łożyskowym, chomikiem syryjskim (*Mesocricetus auratus*) odnotowali zmniejszony o 60% mitochondrialny przepływ protonów u oposa, charakteryzującego się niższym o 40% tempem metabolizmu podstawowego (BMR).

Dotychczasowe eksperymenty, które potwierdziły teorię metronomu blonowego (Hulbert i Else 1999) dotyczyły porównania różnych gatunków zwierząt. Niestety w momencie próby sprowadzenia opisanych w teorii zależności na jeden poziom ewolucyjny, czego dowodzą wyżej wspomniane wyniki uzyskane przez Speakman'a (2005b) oraz Valencak i Ruf'a (2007), interpretacja wyników przestaje być tak klarowna i jednoznaczna. Sytuacja komplikuje się również na poziomie wewnątrzgatunkowym. Okazuje się, iż zdecydowanie węższe spektrum zmienności, obserwowane między osobnikami jednego gatunku, znacznie utrudnia zweryfikowanie prawidłowości opisanych teorią metronomu blonowego.

Znaczenie eksperymentów selekcyjnych w badaniach zmienności na poziomie wewnątrzgatunkowym

Tempo metabolizmu podstawowego (BMR) jest cechą o znaczącej wartości selekcyjnej. Oznacza to, że powinna być ona obiektem selekcji stabilizującej, która w

krótkim czasie doprowadza do zminimalizowania wariacji genetycznej, efektem czego może być mała zmienność BMR występująca w populacjach naturalnych (Clarke, 1979). Dlatego też różnice w wartościach badanej cechy w naturze mogą być zbyt małe, by można było je zaobserwować przy zastosowaniu standardowych metod pomiarowych o niewystarczającej czułości. Podobnie, analizy statystyczne wymagają istnienia pewnej minimalnej wariacji badanych zmiennych, by móc je zastosować do analizy zróżnicowania BMR, a ich moc była wystarczająca by zaobserwować przewidywane zależności (Falconer i Mackay 1996).

Efektywnym rozwiązaniem okazały się tu eksperymenty selekcyjne (Garland, 2002), znacznie osłabiające działanie doboru stabilizującego i prowadzące do powstania i pogłębienia zdecydowanie większej wariacji wielu cech, która nie utrzymała by się w warunkach środowiska naturalnego. Powstała na skutek prowadzenia sztucznych selekcji zmienność może być czasem porównywalna nawet do tej obserwowanej na poziomie międzygatunkowym (Garland, 2002). Kolejną zaletą eksperymentów selekcyjnych jest to, iż umożliwiają one analizę genotypu odpowiedzialnego za powstanie cech podlegających selekcji, jak i testowanie hipotez dotyczących cech bezpośrednio nieselekcjonowanych. Co więcej, do uzyskania widocznych efektów doboru działającego nawet na organizmy wyższe może wystarczyć zaledwie kilka pokoleń (Futuyma i Bennett 2009). Przykładem takiej selekcji jest eksperyment dotyczący adaptacji do niskiej temperatury u myszy domowej (Barnett i Dickson 1984a; 1984b), w którym osobniki odłowione z dzikiej populacji wykorzystano do założenia dwóch linii, z czego pierwsza prowadzona była w temperaturze pokojowej, a druga w temperaturze około 3°C. Widoczne efekty selekcji pojawiły się już po upływie 10 pokoleń. Myszy „zimnolubne” charakteryzowały się większą masą ciała, grubszą warstwą tkanki tłuszczowej, krótszymi ogonami, wcześniej osiągały dojrzałość płciową, a młode osobniki szybciej rosły, co było wynikiem tego, iż matki produkowały mleko o większej wartości kalorycznej. Niewątpliwie słabym punktem eksperymentu Barnett’a i Dickson’a był brak replikacji, co prowadziło do trudności we wnioskowaniu. W takiej sytuacji nie można mieć pewności, że zaobserwowane zmiany są wynikiem doboru, a nie powstały na skutek działania dryfu genetycznego (Konarzewski i in. 2005).

Drugi przykład eksperymentu z doбором sztucznym stanowi selekcja, w której myszy laboratoryjne selekcjonowane były w kierunku wysokiej spontanicznej aktywności lokomotorycznej mierzonej na bieżniach kołowych (Swallow i in. 1998). Równolegle prowadzone były linie kontrolne w czterech niezależnych replikacjach, co umożliwiło

rygorystyczne, statystyczne testowanie hipotez dotyczących efektów selekcji. Już po 10 pokoleniach myszy selekcyjonowane biegały 1,7 razy więcej niż kontrolne, a po 15 generacjach 2,7 razy więcej (Swallow i in. 1998).

W niniejszej rozprawie wykorzystałam myszy laboratoryjne pochodzące z dwóch linii selekcyjonowanych na skorygowane o masę ciała niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego w przeciągu 32 pokoleń (F32) w Zakładzie Ekologii Zwierząt, Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku. Prowadzona od wielu lat selekcja doprowadziła do powstania różnic w tempie metabolizmu podstawowego (BMR) rzędu 40-50% (Książek i in. 2004). Wspomniany eksperyment selekcyjny był wielokrotnie wykorzystany w wielu badaniach, które pozwoliły m.in. na stwierdzenie ujemnych korelacji genetycznych między tempem metabolizmu podstawowego (BMR) a (1) spoczynkowym tempem metabolizmu mierzonym w niskiej temperaturze (Gębczyński, 2005), (2) tempem regulatorowej termogenezy bezdrzeniowej (Gębczyński, 2008), (3) chwilowym, maksymalnym tempem metabolizmu (PMR) wymuszonym pływaniem (Książek i in. 2004; Brzęk i in. 2007), (4) masą białej i brunatnej tkanki tłuszczowej (Książek i in. 2004), (5) wielkością erytrocytów (Maciak i in. 2011; 2014), (6) masą grasicy w warunkach ograniczonej ilości pokarmu (Książek i Konarzewski 2012), (7) odpowiedzi immunologiczną w warunkach stresu wywołanego niską temperaturą (Książek i in. 2003), czy indeksem nienasycenia (IU) membran biologicznych (Brzęk i in. 2007). Z drugiej strony, powyższe linie selekcyjne myszy laboratoryjnej charakteryzują się pozytywną zależnością między tempem metabolizmu podstawowego (BMR) a (1) masą aktywnych metabolicznie organów wewnętrznych, takich jak serce, wątroba, nerki i jelito cienkie (Książek i in. 2004; Brzęk i in. 2007; Książek i Konarzewski 2012; Sadowska i in. 2013; Maciak i in. 2014), (2) konsumpcją pokarmu (Książek i in. 2009), (3) spontaniczną aktywnością (Gębczyński i Konarzewski 2009), (4) wydajnością enzymów oksydacyjnych (Książek i in. 2009), (5) odpowiedzi immunologiczną oraz masą śledziony i węzłów chłonnych w warunkach ograniczonej ilości pokarmu (Książek i Konarzewski 2012), a także wkładem w opiekę rodzicielską mierzoną jako tempo wzrostu młodych (Sadowska i in. 2013). Nie stwierdzono natomiast zależności między tempem metabolizmu podstawowego (BMR) a (1) maksymalną wydolnością termiczną mierzoną w heloxie, tj. atmosferze złożonej z helu i tlenu (Książek i in. 2004), (2) całkowitą produkcją ciepła w odpowiedzi na podanie noradrenaliny (Gębczyński, 2008) oraz (3) chwilowym, maksymalnym tempem metabolizmu (PMR) wymuszonym bieganiem na bieżni (Gębczyński i Konarzewski 2009).

Słabym punktem opisywanego eksperymentu selekcyjnego jest brak replikacji, co znacznie utrudnia interpretację uzyskiwanych wyników. Dlatego też, do celów porównawczych oraz kontroli siły dryfu genetycznego wykorzystałam trzy linie myszy laboratoryjnej nie selekcjonowane na żadną cechę (US1, US2 i US3) w przeciągu 16 pokoleń (F16), stanowiące kontrolę dla innego eksperymentu selekcyjnego prowadzonego na wysokie, chwilowe, maksymalne tempo metabolizmu (PMR) w Zakładzie Ekologii Zwierząt, Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku należące do tego samego szczepu Swiss Webster, co myszy selekcyjne.

Opisany powyżej eksperyment selekcyjny został również wykorzystany do przetestowania teorii metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) na poziomie wewnątrzgatunkowym. Porównując skład membran biologicznych myszy laboratoryjnych selekcjonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego w przeciągu 22 pokoleń (F22), Brzęk i in. (2007) wykazali, iż mimo braku różnic w całkowitej ilości zarówno jednonienasyconych (MUFA), jak i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) oraz w wartości indeksu saturacji (IS), wyrażonego proporcją kwasów MUFA/PUFA i będącego miarą stopnia nasycenia błon komórkowych, badane linie myszy istotnie różniły się procentową zawartością poszczególnych kwasów tłuszczowych. Co zaskakujące, w przypadku niektórych kwasów tłuszczowych, np. wysoce wielonienasyconego kwasu dokosaheksaenowego, DHA (C22:6n-3) Brzęki i in. (2007), wykazali całkowicie odwrotną zależność w stosunku do testowanej teorii. Ponadto, myszy z linii niskometabolicznej (L-BMR) posiadały istotnie statystycznie wyższą wartość indeksu nienasycenia (IU) błon komórkowych w porównaniu do myszy z linii wysokometabolicznej (H-BMR), co również jest w opozycji do założeń teorii metronomu błonowego. Innymi słowy, badane linie myszy posiadały błony komórkowe o podobnej sztywności, tj. o zbliżonej wartości indeksu saturacji (IS), a jednocześnie o odmiennym stopniu nienasycenia (IU), przez co różniły się profilem lipidowym, tzn. zawartością poszczególnych kwasów tłuszczowych. Wyniki w analizach wewnątrzgatunkowych uzyskane przez Brzęka i in. (2007) nie zdołały zatem potwierdzić membranowej teorii metronomu (Hulbert i Else 1999), co więcej, nie wyjaśniły one mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowane różnice w profilu lipidowym błon komórkowych, tłumacząc zróżnicowanie w tempie metabolizmu podstawowego (BMR) odmienną wielkością metabolicznie aktywnych organów, takich jak nerki czy wątroba. Dodatkowo, opisywany eksperyment nie uwzględniał wpływu polimorfizmu

genetycznego, który, ze względu na różnice filogenetyczne, może być testowany jedynie na poziomie wewnątrzgatunkowym.

Podejścia stosowane w genetyce cech ilościowych

Dobrze zaplanowane eksperymenty selekcyjne są niezwykle przydatnym narzędziem badawczym. Po upływie kilku pokoleń prowadzenia takich selekcji, gdy bezpośrednie efekty są już wyraźnie widoczne, można przystąpić do badania skorelowanych efektów doboru, czyli zmian innych cech niepodlegających bezpośredniej selekcji. W pierwszej kolejności badane są cechy różniące się na poziomie organizmalnym (Koteja i in. 1999; 2003; Swallow i in. 2001; Rezende i in. 2005; Kane i in. 2008), a następnie poszukiwane są głębsze mechanizmy odpowiedzialne za te zróżnicowanie (Rhodes i in. 2005). Dalsze etapy badań przeprowadza się na poziomie molekularnym, gdzie poszukiwane są geny odpowiedzialne za różnice na poziomie tkankowym i organizmalnym (Houle-Leroy i in. 2003), jak chociażby lokalizacja loci cech ilościowych, QTL (Nehrenberg i in. 2009), czy poszukiwanie genów kandydatów (ang. *candidate gene approach*) (Zhu i Zhao 2007). Obie wspomniane metody mają swoje wady i zalety. Analiza loci cech ilościowych (QTL) pozwala wskazać jedynie fragment na chromosomie, mierzony w centymorganach (cM), gdzie zlokalizowane są geny potencjalnie odpowiedzialne za badaną cechę. Ilość tych genów jest jednak często bardzo duża, dochodząc do kilkudziesięciu, a często setek i mieści się w obszarze nawet do ~20 cM. Ponadto, analizy loci cech ilościowych (QTL) są szeroko krytykowane za brak powtarzalności eksperymentów (Broman i Speed 1999). Drugie podejście do genetycznej identyfikacji cech ilościowych, tj. lokalizacja genów kandydatów, zakłada, że główny komponent fenotypowej zmienności cechy ilościowej jest spowodowany funkcjonalną mutacją w określonym genie. Natomiast geny „kandydaci” to geny o znanej funkcji biologicznej, bezpośrednio lub pośrednio regulujące procesy związane z badaną cechą. Podstawowym ograniczeniem w tym podejściu jest więc posiadanie wiedzy o fizjologii, biochemii, czy aspektach funkcjonalności przypuszczalnych genów kandydatów, na które miałyby oddziaływać dobór (Tabor i in. 2002).

Kandydaci na geny tempa metabolizmu podstawowego (BMR)

W kontekście przedstawionych powyżej problemów związanych z testowaniem teorii metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) uznałam za zasadne zaklasyfikowanie jako potencjalnych kandydatów geny kodujące enzymy i białka odpowiedzialne za profil lipidowy, a tym samym za stopień nienasycenia błon komórkowych, a więc wpływające na tempo metabolizmu podstawowego (BMR). W związku z tym, iż szlaki metaboliczne przemian kwasów tłuszczowych są u ssaków, w tym u myszy domowej, obecnie dobrze poznane (Rycina 1), a enzymy biorące w nich udział oraz kodujące je geny zostały już opisane i scharakteryzowane (Guillou i in. 2010), to zaproponowane geny spełniają wszystkie kryteria klasyfikujące do bycia odpowiednimi kandydatami (Tabor i in. 2002). Za powstawanie kwasów tłuszczowych w organizmie ssaków odpowiedzialna jest cała grupa białek enzymatycznych. Należy tu wymienić enzymy katalizujące reakcje wprowadzania podwójnych wiązań do cząsteczek kwasów tłuszczowych, a więc bezpośrednio odpowiedzialnych za profil lipidowy membran biologicznych, tj. $\Delta 5$, $\Delta 6$ i $\Delta 9$ -desaturazy kwasów tłuszczowych, kodowane odpowiednio przez geny *Fads1*, *Fads2* oraz *Scd1*, a także elongazy, wydłużające łańcuchy kwasów tłuszczowych, tj. ELOVL1-ELOVL7, kodowane przez geny o analogicznej nazwie (*Elovl1-Elovl7*). Element spajający stanowi tu białko regulatorowe SREBP-1c, którego aktywacja prowadzi do zwiększenia ekspresji genów kodujących zarówno desaturazy, jak i elongazy (Biddinger i in. 2006), kodowane przez gen *Srebfl*. W momencie, gdy selekcionowane linie myszy na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego przetrzymywano w jednakowych warunkach (temperatura, dieta) oraz, jak to zostało udowodnione wcześniej przez Brzęka i in. (2007), gdy wykazywały one różnice pod względem tempa metabolizmu podstawowego (BMR) oraz składu lipidowego błon komórkowych, założyłam, iż obserwowane zróżnicowanie między liniami L-BMR i H-BMR może wynikać z odmiennej aktywności desaturaz(y) i/lub elongaz(y) i/ lub białka regulatorowego SREBP-1c lub różnic w poziomie ekspresji kodujących je genów spowodowanych przez istniejące w nich polimorfizmy w obrębie kodujących je sekwencji DNA. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż zaproponowane przeze mnie geny kandydaci kodują enzymy, które bezpośrednio wpływają na stopień nienasycenia błon komórkowych, co jest zgodne z teorią metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) oraz ma swoje implikacje w zróżnicowaniu tempa metabolizmu podstawowego (BMR).

Rola kwasów tłuszczowych w regulacji tempa metabolizmu podstawowego (BMR)

Ostatnie kilka dekad to okres wzmożonych badań nad rolą kwasów tłuszczowych, zwłaszcza tych jednonienasyconych (MUFA) i wielonienasyconych (PUFA) w regulacji procesów biologicznych. Dzieje się tak dlatego, że są one zaangażowane w szereg różnorodnych procesów metabolicznych (Ariyama i in. 2010; Kim i in. 2010; Simopoulos, 2011; Moreno i in. 2012; Rangel-Huerta i in. 2012; Calder, 2013; Grasso i Calderón 2013), a zaburzenie ich metabolizmu i prawidłowej równowagi w organizmie może prowadzić do wielu poważnych dysfunkcji i chorób człowieka (Murray i in. 1994; Nakamura i in. 1996; Goldring i Berenbaum 2004; Lin i in. 2010; McNamara i in. 2010; Clugston i in. 2011), w tym także do tzw. zespołu metabolicznego (Pacholczyk i in. 2008; Jafari i in. 2013; Juárez-López, 2013; Lorente-Cebrián, 2013; Spencer i in. 2013). Nie dziwi więc fakt, iż obecnie na całym świecie prowadzi się intensywne badania nad mechanizmami, które odpowiedzialne są za zróżnicowanie BMR, w tym także u ludzi. Jest to o tyle istotne, że rozwiązanie tego problemu może okazać się równoznaczne z podjęciem skutecznej walki z nękającym współczesną cywilizację syndromem metabolicznym. Rzeczywiście, istnienie związku pomiędzy BMR a syndromem metabolicznym potwierdziły liczne badania (Ntambi i in. 2002; Biddinger i in. 2006).

Wpływ pojedynczego genu na zmienność tempa metabolizmu podstawowego (BMR)

Tempo metabolizmu podstawowego (BMR) jest cechą ilościową, wpływającą na szereg zjawisk warunkujących prawidłowe funkcjonowanie całego organizmu. Z całą pewnością BMR jest determinowany przez wiele genów. Niekiedy jednak wpływ nawet pojedynczego genu może być na tyle istotny, że jego usunięcie (ang. *knockout*), znacząco zmienia poziom tempa metabolizmu. Przykładem mogą być tu badania eksperymentalne nad otyłością, prowadzone na myszach pozbawionych genu kodującego $\Delta 9$ -desaturazę (SCD1^{-/-}), która jest odpowiedzialna za syntezę jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA). Badania te wykazały, iż myszy pozbawione genu *Scd1* (*Scd1*^{-/-}) charakteryzowały się mniejszym stłuszczeniem ciała oraz, co niezmiernie istotne, wyższym tempem metabolizmu podstawowego, BMR (Ntambi i in. 2002; Dobrzyń i in. 2004; Lee i in. 2004; Dobrzyń i Ntambi 2005). Eksperymenty genetyczne nad mysimi mutantami z deficytem aktywności $\Delta 9$ -desaturazy (SCD1) dostarczyły również informacji

o roli tych mutacji w licznych procesach komórkowych i fizjologicznych, takich jak choroby skóry (Zheng i in. 1999), czy synteza cholesterolu (Miyazaki i in. 2000). Natomiast myszy pozbawione genu *Fads2*, kodującego $\Delta 6$ -desaturazę (FADS2), będącego najważniejszym enzymem w syntezie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), posiadały zaburzoną równowagę lipidową nabłonka jelitowego, prowadzącego do jego owrzodzenia (Stroud i in. 2009).

Zmienność tempa metabolizmu podstawowego (BMR) wywołana sztuczną selekcją

Wyniki pomiarów tempa metabolizmu podstawowego (BMR) myszy z pokolenia 32 (F32) potwierdziły wpływ prowadzonej selekcji na BMR badanych zwierząt. Stwierdziłam statystycznie istotne różnice w tempie metabolizmu podstawowego (BMR) pomiędzy samcami należącymi do linii niskometabolicznej (L-BMR) i wysokometabolicznej (H-BMR), jak również pomiędzy zwierzętami z linii L-BMR i każdą z trzech linii nieselekcyjnych (US1, US2, US3). Różnic takich nie wykazałam natomiast pomiędzy trzema liniami nieselekcyjnymi (US), oraz, co zaskakujące, między nimi a zwierzętami z linii H-BMR (Tabela 6, Tabela 7, Wykres 1A). Brakowi różnic w wartościach BMR pomiędzy liniami H-BMR oraz US towarzyszyły również niskie i nieistotne statystycznie wartości współczynnika zróżnicowania genetycznego (F_{ST}) pomiędzy myszami pochodzącymi z linii H-BMR z pokolenia 22 (F22) oraz z pokolenia 32 (F32), uzyskane na podstawie 10 loci mikrosatelitarnego DNA oraz obu loci polimorficznych (*Scd1* i *Fads2*; Tabela 10). Brak różnic między myszami z linii H-BMR i liniami nieselekcyjnymi (US) może wynikać z faktu, iż wykorzystywane w niniejszych badaniach linie nieselekcyjne (US) nie stanowią faktycznej kontroli dla selekcji prowadzonej na niskie i wysokie tempo metabolizmu podstawowego (BMR), gdyż zaplanowano je jako kontrolę w zupełnie innym eksperymencie selekcyjnym, prowadzonym równolegle w Zakładzie Ekologii Zwierząt, Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku. Linie US wykorzystane były przeze mnie jedynie w celu kontroli działania dryfu genetycznego. Jednakże, zastosowanie wartości resztkowych tempa metabolizmu podstawowego (BMR) skutkowało spodziewanymi różnicami badanej cechy. Mianowicie myszy z linii nieselekcyjnych (US) osiągały wartości pośrednie pomiędzy obiema liniami selekcyjnymi (Tabela 6, Tabela 8, Wykres 1B).

Z drugiej strony Maciak i in. (2014) w swoich badaniach, w których wykorzystywali te same selekcyjne linie myszy tylko dwa pokolenia później (F34), uzyskali zbliżone wartości tempa metabolizmu podstawowego (BMR) w linii L-BMR ($43,06 \pm 1,55$ vs $44,90 \pm 0,62$ ml $O_2h^{-1}g^{-1}$) oraz w liniach US ($65,19 \pm 1,00$ vs $64,05 \pm 1,08$ ml $O_2h^{-1}g^{-1}$) i znacznie wyższe od tych uzyskanych przeze mnie w linii H-BMR ($75,52 \pm 1,56$ vs $66,56 \pm 1,47$ ml $O_2h^{-1}g^{-1}$). Należy tu jednak podkreślić, że wykorzystane przeze mnie samce wybierałam losowo, tj. po ok. 60 z każdej linii, podczas gdy Maciak i in. (2014) dokonywali pomiarów wielkości erytrocytów zwierząt o skrajnych wartościach tempa metabolizmu podstawowego (BMR). Z drugiej strony, tego typu pomiary są bardzo skomplikowane technicznie i nieodłącznie obciążone błędami pomiarowymi rzędu 15-20% (Konarzewski i in. 2005; Lighton, 2008). Mogą pojawić się one zwłaszcza w przypadku aktywniejszych zwierząt wysokometabolicznych, ponieważ wymagają co najmniej czterominutowego okresu spoczynku zwierzęcia, niezwykle trudnego do uzyskania u głodzonych gryzoni, które instynktownie podejmują aktywne próby zdobycia pokarmu.

Zmienność genetyczna myszy a selekcja prowadzona na niskie i wysokie tempo metabolizmu podstawowego (BMR)

Zmienność genetyczna w neutralnych dla doboru loci mikrosatelitarnego DNA

Badane przeze mnie linie myszy laboratoryjnej selekcionowane przez wiele pokoleń na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego charakteryzowały się niskim poziomem zmienności genetycznej. Świadczą o tym wyniki uzyskane na podstawie analizy genotypów dziesięciu loci mikrosatelitarnego DNA, a mianowicie mała średnia liczba alleli na locus (N_A) oraz niskie wartości heterozygotyczności oczekiwanej (H_e) i obserwowanej (H_o). Taka mała zmienność genetyczna jest częstym zjawiskiem w sztucznych hodowlach o ograniczonej liczbie osobników, co w kolejnych latach prowadzenia eksperymentu selekcyjnego może prowadzić do wzrostu wsobności i utraty zmienności w wyniku działania dryfu genetycznego (Łomnicki, 2009; Konczal, 2013). Rzeczywiście, w porównywanych przeze mnie liniach myszy z pokolenia F22 i F32 doszło do obniżenia poziomu zmienności genetycznej, przejawiającej się spadkiem średniej liczby alleli na locus (N_A). Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, iż w przeciągu dziesięciu pokoleń prowadzonej selekcji

około 14% zmienności genetycznej zostało utracone na skutek działania dryfu genetycznego. Spadek ten następował szczególnie w linii L-BMR, w której doszło do utraty aż 18,7% zmienności w F32 względem F22. Natomiast myszy z linii nieselekcjonowanych na żadną cechę (US) w pokoleniu F16 charakteryzowały się największą zmiennością genetyczną (Tabela 12), co jest wynikiem oczekiwanym ze względu na mniejszą liczbę pokoleń, w trakcie których działa dryf genetyczny w porównaniu z F22 czy F32.

Tak jak wspomniałam powyżej, częstym problemem w sztucznie prowadzonych selekcjach może być pojawiająca się wsobność, wynikająca z małej liczby osobników oraz braku przepływu genów między grupami. Aby ją oszacować, ponownie wykorzystałam dane uzyskane na podstawie genotypowania analizowanych zwierząt w 10 neutralnych i niekodujących loci mikrosatelitarnego DNA i wyznaczyłam wartość współczynnika inbredu (F_{IS}), który był niski i ujemny dla myszy z linii H-BMR w pokoleniach F22 i F32, a dla myszy z linii L-BMR, niski i nieistotny statystycznie. Uzyskane wartości współczynnika F_{IS} wskazują na to, iż zastosowany system kojarzeń w wykorzystanym przeze mnie eksperymencie selekcyjnym jest dobrany prawidłowo, a myszy w obrębie linii w danym pokoleniu były krzyżowane z minimalną wsobnością.

Neutralne tło genetyczne w postaci dziesięciu loci mikrosatelitarnego DNA wykorzystałam również do oszacowania sił dryfu genetycznego (Tabela 10). I tak, wartość współczynnika F_{ST} , który jest miarą dywergencji genetycznej między liniami L-BMR i H-BMR, wynikającą z faktu, że nie wymieniają one ze sobą genów, dla 10 neutralnych loci mikrosatelitarnego DNA wzrosła w przeciągu 10 pokoleń z 0,086 w pokoleniu F22 do 0,224 w pokoleniu F32. Jeżeli przyjmie się założenie, że loci mikrosatelitarne są całkowicie neutralne i nie leżą w pobliżu genów, na które działa dobór rozrywający między liniami, to uzyskany wynik oznacza, iż selekcjonowane linie myszy różnicowały się wskutek działania dryfu genetycznego, który po 22 pokoleniach spowodował około 9% dywergencji między liniami. Zróżnicowanie po kolejnych 10 pokoleniach wyniosło 22,4% (średnio 0,7% na pokolenie), co oznacza, że prawie co czwarta różnica obserwowana pomiędzy liniami selekcyjnymi może być wyłącznie efektem dryfu genetycznego. Natomiast wśród myszy z linii nieselekcyjnych (US) średnie F_{ST} wyniosło 0,152, co oznacza że u zwierząt, na które nie działa żadna presja selekcyjna, po 16 pokoleniach, w trakcie których nie było wymiany genów między liniami, dryf genetyczny doprowadził do dywergencji genetycznej między nimi rzędu 15%, tj. średnio niecałe 1% na pokolenie.

Powyższe wyniki, wskazujące na rolę dryfu genetycznego w kształtowaniu zmienności genetycznej wśród laboratoryjnych eksperymentów selekcyjnych, potwierdza między innymi praca Kane i in. (2008). W swoich badaniach stwierdzili oni bowiem fenotypową dywergencję cech związanych z tempem metabolizmu pomiędzy replikacyjnymi liniami myszy domowej selekcionowanymi na aktywność lokomotoryczną. Podobnie, Mathot i in. (2013) za przyczynę obserwowanych różni w korelacji między BMR a masą ciała pomiędzy sześcioma liniami selekcyjnymi zeberki timorskiej (*Taeniopygia guttata*), podają dobór naturalny. Niniejsze wyniki, jak i te uzyskane przez Kane i in. (2008) oraz Mathot i in. (2013) dostarczają dowodów na potencjalnie ważną rolę dryfu genetycznego w populacjach laboratoryjnych. Należy również pamiętać, że dryf genetyczny może mieć podobne znaczenie w małych, izolowanych populacji w środowisku naturalnym (Garland i Carter 1994).

Zmienność genetyczna – loci poddane działaniu selekcji

Z powodzeniem uzyskałam kompletne sekwencje wszystkich zaplanowanych w eksperymencie genów, kodujących enzymy szlaku metabolicznego kwasów tłuszczowych, tj. desaturaz (SCD-1c, D5D, D6D), elongaz (ELOVL1, ELOVL2, ELOVL3, ELOVL5, ELOVL6), jak również białka wiążącego sekwencję odpowiedzi na sterole (SREBP-1c) (Tabela 1, Tabela 2), co pozwoliło mi na zweryfikowanie polimorfizmów i przetestowanie, czy są one poddane działaniu selekcji sztucznej. Na uwagę zasługuje fakt, iż większość analizowanych przeze mnie genów, w tym wszystkie elongazy były monomorficzne. Miejsca zmienne (SNPs) zostały zidentyfikowane tylko w dwóch spośród dziewięciu badanych genów, tj. *Scd1* oraz *Fads2*, kodujących odpowiednio $\Delta 9$ -desaturazę (SCD-1c) i $\Delta 6$ -desaturazę kwasów tłuszczowych (D6D). W obu przypadkach stwierdziłam obecność dwóch polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), leżących w kodujących fragmentach genów. W genie *Scd1* polimorfizmy te były synonimiczne i całkowicie ze sobą sprzężone (Rycina 2). Natomiast w genie *Fads2*, spośród zidentyfikowanych polimorfizmów (SNPs), pierwszy okazał się być niesynonimiczny, a więc skutkował zamianą aminokwasów w białku, tj. waliny na izoleucynę, podczas gdy drugi SNP był synonimiczny i ponownie, całkowicie sprzężony z pierwszym (Rycina 3).

Polimorfizm w genie *Scd1* wykryłam wśród wszystkich analizowanych zwierząt zarówno w pokoleniu 32 (F32), jak i 22 (F22), a także wśród trzech linii myszy nieselekcionowanych na żadną cechę (US1, US2, US3). Frekwencje alleli i genotypów

różniły się pomiędzy liniami L-BMR i H-BMR z pokolenia F32 (Tabela 9). Udało się mi również wykazać związek pomiędzy polimorfizmem w genie *Scd1* a tempem metabolizmu podstawowego (BMR). Myszy posiadające allel A, tj. o genotypach AA lub AT były częstsze w linii H-BMR, przez co charakteryzowały się wyższym tempem metabolizmu podstawowego (BMR) w porównaniu do homozygot TT (Wykres 2). Ponadto, zwierzęta z linii nieselekcjonowanych na żadną cechę różniły się pod względem frekwencji alleli od obu linii selekcyjnych (L-BMR) i (H-BMR) w pokoleniu F32, choć wartości te były bardziej zbliżone do tych uzyskanych w linii wysokometabolicznej (H-BMR) o podobnym tempie metabolizmu podstawowego, BMR (Tabela 6, Tabela 7, Wykres 1A).

Z drugiej strony, zwierzęta z obu linii selekcyjnych w pokoleniu F22 nie różniły się od siebie pod względem frekwencji alleli w genie *Scd1*. Co więcej, bardzo wysokie i istotne statystycznie zróżnicowanie genetyczne pomiędzy liniami selekcyjnymi w pokoleniu F32, brak takiego zróżnicowania w pokoleniu F22 oraz podobnie, jak w pokoleniu F32 wysokie wartości współczynnika F_{ST} dla linii nieselekcyjnych (US) sugerują, iż obserwowana zmienność jest raczej wynikiem działania dryfu genetycznego, a nie skutkiem prowadzonej selekcji (Tabela 9).

Zatem, pozytywny wynik testu na selekcję w locus *Scd1* (Rycina 4) przeprowadzony w programie LOSITAN z wykorzystaniem 10 loci mikrosatelitarnego DNA jako neutralnego tła genetycznego okazał się prawdopodobnie artefaktem, a większe zróżnicowanie genetyczne w locus *Scd1* pomiędzy myszami pochodzącymi z linii selekcyjnych z pokolenia F32 w porównaniu do loci mikrosatelitarnego DNA jest raczej wynikiem działania dryfu genetycznego niż prowadzonej selekcji na tempo metabolizmu podstawowego (BMR). Dodatkowym argumentem potwierdzającym poprawność takiego wnioskowania jest wynik analogicznie przeprowadzonego testu wśród myszy należących do trzech linii nieselekcjonowanych na żadną cechę (US), który ponownie wskazał locus *Scd1*, jako kandydata na działanie selekcji (Rycina 6), choć myszy z linii US takiej selekcji nie podlegały. Tak więc przypadkowy, bo wynikający z działania dryfu genetycznego, wzrost częstości allelu A w genie *Scd1*, jednocześnie pokrył się z nieoczekiwanie wysokimi wartościami BMR u zwierząt pochodzących z linii nieselekcjonowanych na żadną cechę (US).

Natomiast polimorfizm, który zidentyfikowałam w genie *Fads2*, również występował wśród wszystkich analizowanych zwierząt zarówno w pokoleniu F32, jak i F22, a także wśród trzech linii myszy nieselekcjonowanych na żadną cechę (US1, US2, US3). Frekwencja alleli A i G w tym genie istotnie różniła się pomiędzy liniami L-BMR i H-

BMR w obu pokoleniach myszy (F22 i F32). Wariant $\Delta 6$ -desaturazy kwasów tłuszczowych (D6D) z waliną, a mianowicie allel G, był częstszy w linii H-BMR (Tabela 9) zarówno w pokoleniu F32, jak i w pokoleniu F22. Wysokie i istotne statystycznie różnicowanie genetyczne pomiędzy liniami selekcyjnymi w pokoleniu F22 oraz jednocześnie niskie i nieistotne różnicowanie pomiędzy trzema liniami nieselekcyjnymi, sugerują, że obserwowany polimorfizm w genie *Fads2* jest wynikiem działania selekcji, a nie dryfu genetycznego. Mimo, iż 10 pokoleń później wartość różnicowania genetycznego w genie *Fads2* pomiędzy liniami L-BMR i H-BMR zmniejszyła się z wysokiej do umiarkowanej, to nadal było większe w stosunku do tego obserwowanego u myszy z linii nieselekcyjnych (Tabela 10). Obserwowany spadek wartości współczynnika różnicowania genetycznego (F_{ST}) w genie *Fads2* w przeciągu 10 pokoleń może być bezpośrednim efektem takiego, a nie innego doboru myszy do kolejnego pokolenia w eksperymencie. Dodatkowo, maskujące działanie dryfu genetycznego, który pogłębia się z każdym kolejnym pokoleniem prowadzenia eksperymentu selekcyjnego, utrudnia, a niekiedy uniemożliwia testowanie działania selekcji.

Mając na uwadze powyższe wyniki, w celu wiarygodniejszej identyfikacji loci poddanych działaniu selekcji wykorzystałam jedynie myszy z pokolenia F22, gdzie poziom dryfu genetycznego był mniejszy i nie maskował efektu działania selekcji. Jako neutralne tło genetyczne dla genu *Fads2* ponownie posłużyłam się dziesięcioma loci mikrosatelitarnego DNA, wykorzystując program LOSITAN. Tylko w locus *Fads2* obserwowane różnicowanie genetyczne, wyrażone wartością współczynnika F_{ST} pomiędzy liniami L-BMR i H-BMR było na tyle duże, że nie można go tłumaczyć jedynie działaniem dryfu genetycznego, czyniąc ten gen kandydatem na działanie selekcji (Rycina 5). Co więcej, udało mi się również wykazać związek pomiędzy polimorfizmem w genie *Fads2* a tempem metabolizmu podstawowego (BMR). Myszy posiadające allel A, tj. o genotypach AA lub AG, charakteryzowały się niższym BMR w porównaniu do homozygot GG (Wykres 3). Natomiast analogicznie przeprowadzony test wśród myszy należących do trzech linii nieselekcjonowanych na żadną cechę (US) zgodnie z oczekiwaniami nie wskazał locus *Fads2*, jako kandydata na działanie selekcji (Rycina 6).

Co ciekawe, kiedy wykonałam dopasowanie (ang. *alignment*) wszystkich dostępnych sekwencji genu *Fads2* różnych ssaków zdeponowanych w internetowej bazie GenBanku (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), tj. człowieka (*Homo sapiens*; nr GenBanku: AF084559.1), orangutana sumatrzańskiego (*Pongo abelii*; nr GenBanku: NM_001135502.1), pawiana oliwkowego (*Papio anubis*; nr GenBanku: EU780003.1),

bydła domowego (*Bos taurus*; nr GenBanku: NM_001083444.1), dzika (*Sus scrofa*; nr GenBanku: GU250734.1), szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*; nr GenBanku: NM_031344.2) oraz myszy domowej (*Mus musculus*; nr GenBanku: AF084559.1), okazało się, że wariant $\Delta 6$ -desaturazy kwasów tłuszczowych (D6D) z izoleucyną w zidentyfikowanym przeze mnie miejscu polimorficznym jest charakterystyczny dla wszystkich porównywanych gatunków oraz myszy z linii niskometabolicznej (L-BMR), posiadających genotyp AA lub AG. Jedynie sekwencje genu *Fads2* myszy domowej z GenBanku oraz myszy selekcjonowanej na wysokie tempo metabolizmu (H-BMR) posiadały genotyp GG. Jako duże zwierzęta stałocieplne powyższe gatunki ssaków, dla których sekwencje genu *Fads2* zostały zdeponowane w GenBanku, posiadają niższe tempo metabolizmu podstawowego (BMR) w przeliczeniu na jednostkę masy ciała w porównaniu do niewielkich rozmiarów myszy domowej (Peters, 1983; Hayssen i Lacy 1985). Dlatego też nieprzypadkowym może być fakt, że mają one w tym miejscu białka ten sam wariant aminokwasowy w enzymie D6D, co myszy z linii niskometabolicznej (L-BMR). Wynik ten może dodatkowo potwierdzać, iż zidentyfikowany nowy polimorfizm w genie *Fads2* jest związany z tempem metabolizmu podstawowego (BMR).

Spośród wszystkich badanych przeze mnie genów szlaku przemian kwasów tłuszczowych, jedynie w genie *Fads2*, kodującym $\Delta 6$ -desaturazę (D6D), udało mi się zidentyfikować nowy, funkcjonalny polimorfizm. Nie wykazałam różnic na poziomie ekspresji tego, jak również wszystkich pozostałych genów, tj. *Scd1*, *Fads1*, *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5*, *Elovl6*, *Srebfl*. Analiza składu lipidowego kwasów tłuszczowych we frakcji lipidów całkowitych (TL) oraz fosfolipidów (PL) wykazała natomiast zróżnicowanie w procentowym udziale niektórych kwasów, zarówno pomiędzy liniami selekcyjnymi L-BMR i H-BMR, jak i pomiędzy myszami, posiadającymi różne genotypy w genie *Fads2*, głównie między heterozygotami AG a homozygotami GG. Oznacza to, iż obserwowane zróżnicowanie w profilu lipidowym, przy jednoczesnym braku różnic w ekspresji wszystkich badanych genów, może wynikać jedynie z odmiennej aktywności enzymów kodowanych przez polimorficzne geny.

Spośród wszystkich znanych ssaczych desaturaz kwasów tłuszczowych, a mianowicie $\Delta 9$ -desaturazy (SCD1), $\Delta 5$ -desaturazy (D5D) i $\Delta 6$ -desaturazy (D6D), jedynie D6D inicjuje kaskadę desaturacji i elongacji, podczas której egzogenne, a więc dostarczane tylko w diecie prekursor wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) są przekształcane do wysoce nienasyconych kwasów tłuszczowych (Stoffel i in. 2008). W momencie, gdy selekcjonowane linie myszy przetrzymywano w jednakowych warunkach, tj. w takiej

samej temperaturze oraz karmiono je identycznym pokarmem oraz, jak to zostało udowodnione wcześniej przez Brzęka i in. (2007), a następnie potwierdzone w badaniach własnych, gdy wykazywały one różnice pod względem BMR oraz składu lipidowego błon komórkowych, to przy stwierdzonym przeze mnie braku różnic w ekspresji badanych genów obserwowane zróżnicowanie między liniami L-BMR i H-BMR może wynikać z odmiennej aktywności desaturaz(y), spowodowanej przez istniejące w niej/nich polimorfizmy.

System selekcyjny, który wykorzystałam w badaniach własnych umożliwił mi określenie roli genetycznie uwarunkowanych wariantów $\Delta 6$ -desaturazy (D6D) w kontroli składu lipidowego hepatocytów, a przez to w regulacji tempa metabolizmu podstawowego (BMR). Badania genetyczne nad mysimi mutantami z deficytem aktywności $\Delta 6$ -desaturazy (D6D), będącej kluczowym enzymem w syntezie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), już wcześniej dostarczyły wielu informacji na temat roli nienasyconych kwasów tłuszczowych w procesach komórkowych i fizjologicznych, takich jak owrzodzenia jelit (Stroud i in. 2009), czy rozwój męskich komórek płciowych (Stoffel i in. 2008) oraz potwierdziły, że D6D jest jedyną desaturazą, która katalizuje reakcję przekształcenia kwasu linolowego; LA (C18:2n-6) do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA).

Weryfikacja teorii metronomu błonowego na poziomie wewnątrzgatunkowym

W celu przetestowania prawidłowości opisanych w teorii metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) na poziomie wewnątrzgatunkowym, zgromadziłam dane dotyczące polimorfizmu sekwencji DNA oraz ekspresji wszystkich analizowanych genów, aktywności enzymów, kodowanych przez polimorficzne sekwencje, a mianowicie $\Delta 9$ -desaturazy (SCD-1c) i $\Delta 6$ -desaturazy (D6D) oraz aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy), a także składu lipidowego błon komórkowych, na podstawie którego wyznaczyłam indeksy saturacji (IS), nienasycenia (IU) oraz peroksydacji (IP) błon biologicznych myszy selekcjonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego.

Do ustalenia indeksów aktywności $\Delta 9$ -desaturazy (IxA SCD-1c) oraz $\Delta 6$ -desaturazy (IxA D6D) wykorzystałam dane dotyczące procentowego udziału kwasów tłuszczowych we frakcji lipidów całkowitych (TL), ponieważ enzymy mają wpływ na ilości substratów i

produktów katalizowanych przez siebie reakcji w całej komórce, a nie tylko na ich udział w poszczególnych frakcjach (Martinelli i in. 2008; Warensjö i in. 2009). Tym samym wykazałam różnice pomiędzy myszami z linii L-BMR i H-BMR zarówno w IxA SCD-1c (Tabela 14, Tabela 17, Wykres 4A), jak i w IxA D6D (Tabela 14, Tabela 18, Wykres 5A) oraz pomiędzy genotypami AA i TT oraz AT i TT w genie *Scd1* (Tabela 15, Wykres 4B), a także pomiędzy genotypami AG i GG w genie *Fads2* (Tabela 16, Wykres 5B).

Zwierzęta z linii niskometabolicznej (L-BMR) charakteryzowały się wyższym indeksem aktywności $\Delta 9$ -desaturazy kwasów tłuszczowych (IxA SCD-1c) w porównaniu do myszy z linii wysokometabolicznej (H-BMR) oraz z linii nieselekcyjnych (Wykres 4A). Co więcej, zwierzęta z linii H-BMR oraz z linii nieselekcyjnych (US) o podobnym tempie metabolizmu podstawowego, BMR (Wykres 1A) nie różniły się także pod względem IxA SCD-1c (Tabela 17, Wykres 4A). W związku z tym, że enzym ten odpowiada za syntezę jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA), to procentowa zawartość tych kwasów we frakcji lipidów całkowitych (TL) u myszy z linii L-BMR była również większa (Tabela 14). Wyniki te bardzo dobrze korespondują z tymi uzyskanymi dla genotypów w genie *Scd1*, a mianowicie zwierzęta posiadające niskie tempo metabolizmu, a więc będące homozygotami TT w genie *Scd1* (Wykres 2), posiadały również wyższą wartość IxA SCD-1c (Tabela 15, Wykres 4B), co również przekładało się na większą zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) we frakcji lipidów całkowitych (TL) w porównaniu zarówno do homozygot AA, jak i heterozygot AT, które nie różniły się od siebie ani pod względem tempa metabolizmu podstawowego, BMR (Wykres 2), jak i IxA SCD-1c (Tabela 15, Wykres 4B) oraz procentowej zawartości kwasów MUFA we frakcji lipidów całkowitych, TL (Tabela 15). Co więcej, wartość IxA SCD-1c ujemnie korelowała z tempem metabolizmu podstawowego, BMR (Wykres 7) oraz dodatkowo z procentową zawartością kwasów MUFA we frakcji lipidów całkowitych, TL (Wykres 19A), oraz fosfolipidów, PL (Wykres 19B), co jest zgodne z teorią metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999). Jednakże teoria ta opiera się na składzie błon komórkowych, a więc odnosi się do ilości kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL). I tak, mimo wyższej aktywności desaturazy SCD-1c u myszy z linii L-BMR, nie miało to przełożenia na większą ilość kwasów MUFA we frakcji fosfolipidów (PL) w porównaniu do myszy z linii H-BMR (Tabela 14), a myszy o genotypie TT posiadały najniższy procentowy udział tych kwasów (Tabela 15), co z kolei przeczy założeniom teorii metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999). Powyższe wyniki sugerują, iż w porównaniach wewnątrzgatunkowych, mimo że teoria metronomu błonowego sprawdza

się na poziomie komórkowym, to na poziomie organizacji budowy membrany biologicznej może przyjmować całkowicie odwrotne zależności.

W celu sprawdzenia, w jaki sposób obserwowany polimorfizm w genie *Fads2*, kodującym $\Delta 6$ -desaturazę kwasów tłuszczowych (D6D), wpływa na BMR wyznaczyłam indeks aktywności tego enzymu (IxA D6D) na podstawie danych z oznaczeń procentowego udziału kwasów tłuszczowych we frakcji lipidów całkowitych (TL). Wysoka wartość IxA D6D charakteryzowała zwierzęta z linii niskometabolicznej, L-BMR (Tabela 14, Wykres 5A), a więc posiadające allel A w układzie homozygotycznym i heterozygotycznym (Wykres 3). Jednak porównanie wartości tego indeksu pomiędzy trzema genotypami w genie *Fads2* wskazało na istnienie istotnych statystycznie różnic jedynie między heterozygotami AG a homozygotami GG (Tabela 16, Wykres 5B). To, że homozygoty AA wykazały najniższe wartości IxA D6D można tłumaczyć jedynie bardzo małą liczbą osobników, bo wynoszącą zaledwie sześć sztuk. Niska wartość IxA D6D wśród homozygot GG, czy osobników z linii H-BMR, sugerowałaby że enzym wolniej katalizuje reakcje, a tym samym ilość syntezowanych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), będących produktami tego enzymu, powinna być mniejsza, co po raz kolejny jest w opozycji do teorii metronomu błonowego (Tabela 14, Tabela 16). Stwierdziłam również negatywną korelację między wartościami IxA D6D a procentowym składem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) we frakcji lipidów całkowitych, TL (Wykres 21A) i brak takiej zależności we frakcji fosfolipidów, PL (Wykres 21B). Co więcej, wartość IxA D6D ujemnie korelowała z tempem metabolizmu podstawowego, BMR (Wykres 8). Nie udało mi się jednak ustalić, jak aktywność tego enzymu przekłada się na ilość poszczególnych kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL). Może być to związane z tym, iż osobniki posiadające określone allozomy D6D, tj. heterozygoty AG: wariant z waliną i izoleucyną oraz homozygoty GG: wariant jedynie z waliną, wykazują odmienne powinowactwo do określonych substratów, wpływając na ich skład w błonach komórkowych. Aspekt ten wymaga jednak dalszych analiz.

Aby lepiej zrozumieć, w jaki sposób zidentyfikowany przeze mnie niesynonimiczny polimorfizm w genie *Fads2* może wpływać na aktywność kodowanego przez siebie białka, należałoby przyjrzeć się dokładnie błonowej topologii mysiej $\Delta 6$ -desaturazy kwasów tłuszczowych (D6D). Powyższy SNP jest mianowicie zlokalizowany w pierwszej z dwóch transbłonowej domenie, w odległości zaledwie 17 aminokwasów przed pierwszą z trzech konserwatywną domeną bogatą w histydyny, wiążącą niehemowe żelazo, co jest niezbędne

do uzyskania aktywności enzymatycznej (Shanklin i in. 1994). Ponadto, każda mutacja niesynonimowa, prowadząca do zmiany aminokwasowej, skutkuje powstawaniem białka o częściowo zmienionej konformacji. Takie zmiany mogą być subtelne, aczkolwiek kiedy są zlokalizowane w pobliżu ważnych funkcjonalnie regionów, mogą znacząco wpływać na zmiany w aktywności enzymatycznej (Ng i Henikoff 2001).

Opisywany powyżej, niesynonimiczny polimorfizm w genie *Fads2* prowadzi do produkcji dwóch wariantów białka D6D, różniących się przez to aktywnością enzymatyczną. O ile stosunkowo łatwo można wytłumaczyć taki mechanizm, o tyle trudno zrozumieć, skąd biorą się różnice w indeksie aktywności $\Delta 9$ -desaturazy kwasów tłuszczowych (IxA SCD-1c) kodowanej przez gen *Scd1*, nie wykazujący różnic w poziomie ekspresji, a w którym zidentyfikowany przeze mnie polimorfizm ma charakter mutacji „milczącej”. Odpowiedzi na to pytanie mogą dostarczać wyniki badań przeprowadzone przez Kimchi-Sarfaty i in. (2007). Dowiedli oni, iż synonimiczna mutacja w genie białka oporności wielolekowej (*MDRI*), kodującej glikoproteinę P z rodziny transporterów błonowych ABC, prowadzi do zmiany kinetyki procesu translacji, a w konsekwencji do odmiennej konformacji i funkcji powstającego białka. Natomiast Sauna i in. (2007) wykazali, że mutacja ta istotnie wpływa na skuteczność terapii chorób nowotworowych. A zatem, mutacje synonimiczne nie zawsze są „milczące” (Komar, 2007). Okazuje się, iż u wielu organizmów istnieje nierównomierne występowanie poszczególnych kodonów (Sharp i in. 1986), a ilość odpowiadających im cząsteczek tRNA jest proporcjonalna do częstości ich wykorzystywania w procesie translacji. Dlatego też, kodony rzadziej występujące w mRNA są wolniej przepisywane na język aminokwasów. To z kolei zmienia kinetykę procesu translacji, prowadząc do zmian w konformacji, a w konsekwencji może powodować różnice w aktywności powstającego białka (Komar, 2007). W przypadku zidentyfikowanej przeze mnie mutacji w genie *Scd1*, powstające cząsteczki mRNA różniły się występowaniem kodonów GCA i ACG w allelu A oraz GCU i ACA w allelu T (Rycina 2). Zgodnie z danymi literaturowymi (Castro-Chavez, 2012) częstość występowania tych kodonów w genomie człowieka, która jest proporcjonalna u myszy, wynosi odpowiednio 1,58% i 0,61% w przypadku allelu A oraz 1,84% i 1,51% w allelu T. Dane te potwierdzają zatem uzyskane przeze mnie wyniki dotyczące indeksów aktywności $\Delta 9$ -desaturazy kwasów tłuszczowych (IxA SCD-1c) kodowanej przez oba warianty genetyczne. Myszy, posiadające allel T w genie *Scd1*, składający się z częściściej występujących w genomie kodonów, charakteryzowały się wyższym IxA SCD-1c niż myszy posiadające w tym genie allel A, zawierający kodony rzadziej reprezentowane.

Jako wyznacznik tempa metabolizmu podstawowego (BMR), czyli swoisty metronom błonowy, często traktowany jest procentowy udział jego końcowego produktu, tj. kwasu dokozaheksaenowego, DHA (C22:6n-3) we frakcji fosfolipidów, PL (Hulbert i Else 1989; Couture i Hulbert 1995; Hulber i in. 2002a; 2002b). Nie udało mi się jednak odnotować istotnych statystycznie różnic w procentowym udziale kwasu DHA zarówno pomiędzy liniami selekcyjnymi myszy, tj. L-BMR i H-BMR (Tabela 14), jak również pomiędzy genotypami w genie *Fads2* (Tabela 16). Różnice takie zaobserwowałam natomiast w procentowym składzie kwasu DHA we frakcji lipidów całkowitych (TL) pomiędzy liniami selekcyjnymi oraz homozygotami AA i GG, aczkolwiek ponownie odwrotnie, niż zakłada to teoria metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999). Następnie sprawdziłam, czy badane linie myszy różnią się składem innych kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL), budujących ich błony komórkowe, szczególnie ilością kwasu oleinowego, OA (C18:1n-9), który według teorii metronomu jest wyznacznikiem niskiego tempa metabolizmu podstawowego (BMR). Udało mi się ustalić, że takie zróżnicowanie występuje zarówno między liniami (Tabela 14), jak i genotypami AA i AT a homozygotami TT w genie *Scd1* (Tabela 15). Jednakże, zwierzęta z linii L-BMR posiadały mniejszy udział kwasów OA we frakcji fosfolipidów (PL) niż samce z linii H-BMR, podczas gdy homozygoty TT, a więc charakteryzujące się niższym tempem metabolizmu podstawowego (BMR), posiadały również mniejszy udział tego kwasu w porównaniu do wysokometabolicznych homozygot AA i heterozygot AT, co po raz kolejny jest w opozycji do teorii metronomu błonowego.

Według teorii metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) zwierzęta o niższym tempie metabolizmu podstawowego (BMR) charakteryzują się wysokim udziałem jednonienasyconych (MUFA) i jednocześnie niską zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w membranach biologicznych, co z kolei przekłada się na wyższy indeks saturacji (IS), niższy indeks nienasyceń (IU), a więc mniejszą płynność błon komórkowych oraz niższą wartość indeksu peroksydacji (IP), będącą miarą podatności błon na destrukcyjne działanie reaktywnych form tlenu (ROS), w porównaniu do organizmów o wyższym tempie metabolizmu. Wyniki niniejszych badań nie zdołały jednak w żaden sposób potwierdzić przytoczonych powyżej założeń teorii. Co więcej, wykazałam dokładnie odwrotne zależności, a mianowicie, porównując myszy z linii selekcyjonowanej na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego odnotowałam istotnie mniejszy udział nasyconych (SFA) i jednonienasyconych (MUFA) oraz większy wielonienasyconych (PUFA) kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL) w linii L-BMR. Natomiast zwierzęta z linii H-

BMR charakteryzowały się wyższą wartością indeksu saturacji (IS) błon komórkowych, podczas gdy indeksy nienasylenia (IU) oraz peroksydacji (IP) nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy dwiema liniami selekcyjnymi (Tabela 14).

Poszukując odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób polimorfizmy w genach *Fads2* i/lub *Scd1* wpływają na tempo metabolizmu podstawowego (BMR), początkowo zakładałam, iż może mieć to związek z re-aranżacją składu kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych, wynikającą np. z odmiennej aktywności desaturaz SCD-1c (IxA SCD-1c) i/lub D6D (IxA D6D), tym samym zmieniającą stopień płynności błon (IS i/lub IU) oraz ich podatność na peroksydację (IP). Niniejsze badania nie zdołały potwierdzić tych hipotez. Okazało się bowiem, iż myszy należące do linii L-BMR i H-BMR miały odmienny profil lipidowy w błonach, co skutkowało różnicami w indeksie saturacji (IS), ale nie w indeksie nienasylenia (IU) oraz peroksydacji (IP) błon komórkowych (Tabela 14). Należy w tym miejscu podkreślić, iż mimo że oba indeksy, tj. saturacji (IS), jak również nienasylenia (IU) błon komórkowych odzwierciedlają w pewien sposób stopień ich plastyczności i płynności, to nie są to pojęcia równorzędne (Hulbert i in. 2007). Indeks saturacji (IS), będący stosunkiem jednonienasyconych (MUFA) do wielonienasyconych (PUFA) kwasów tłuszczowych, wskazuje na stopień nasycenia, a więc sztywności membran biologicznych. Natomiast indeks nienasylenia (IU) wskazuje na to, jaki wkład mają poszczególne frakcje nienasyconych kwasów tłuszczowych w finalną płynność błony, co w konsekwencji przekłada się na wartość indeksu peroksydacji (IP). Odnotowane przeze mnie różnice w indeksie saturacji (IS) oraz brak różnic w indeksach nienasylenia (IU) oraz peroksydacji (IP) są więc możliwe. Co więcej, różnice w stopniu nasycenia membran biologicznych (IS) były odwrotne w stosunku do założeń teorii metronomu. Oznacza to, że rzeczywiście wynikająca z odmiennej aktywności IxA SCD-1c (Wykres 20) oraz IxA D6D (Wykres 22) re-aranżacja składu błon komórkowych, doprowadziła do tego, iż zwierzęta z linii L-BMR posiadały błony mniej nasycone (IS), ale ciągle w podobnym stopniu przepuszczalne (IU) jak błony zwierząt z linii H-BMR, co z kolei zabezpieczało błony komórkowe przed zwiększeniem podatności na peroksydację, która u gatunku małego, stałocieplnego ssaka i tak osiąga górne wartości obserwowanej w przyrodzie zmienności (Tabela 14). Podobne zależności zaobserwowałam wśród myszy posiadających różne warianty w genie *Scd1*, a mianowicie homozygoty TT, charakteryzujące się niskim tempem metabolizmu podstawowego (BMR) posiadały mniejszą wartość indeksu saturacji (IS) w porównaniu do wysokometabolicznych heterozygot AT, przy jednocześnie nieróżniących się wartościach indeksów nienasylenia

(IU) i peroksydacji (IP) błon komórkowych (Tabela 15). Natomiast porównania genotypów w genie *Fads2* nie wykazały żadnych różnic zarówno w indeksach saturacji (IS), jak i nienasycenia (IU) i peroksydacji (IP) błon komórkowych. Jednakże, wspomniane wcześniej różnice w procentowym udziale wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) między różnymi wariantami genetycznymi genu *Fads2* wskazują, że brak różnic w wartościach poszczególnych indeksów (IS, IU, IP) wynika z re-aranżacji składu lipidowego błon komórkowych (Tabela 16).

Sytuacja komplikuje się w momencie testowania, jak poszczególne klasy kwasów tłuszczowych oraz wyznaczone na ich podstawie indeksy saturacji (IS), nienasycenia (IU) i peroksydacji (IP) korelują z BMR. Jedynym zgodnym z teorią metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) wynikiem jest ujemna zależność pomiędzy procentowym udziałem jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) we frakcji lipidów całkowitych (TL) a tempem metabolizmu podstawowego, BMR (Wykres 11). Jednak przeprowadzając analogiczną korelację dla kwasów MUFA we frakcji fosfolipidów (PL), a więc odnoszącej się do składu błon, zależność ta okazała się dodatnia, co przeczy teorii metronomu (Wykres 12). Niezgodne z założeniami teorii metronomu błonowego wyniki uzyskałam również dla nasyconych (SFA) i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA). Okazało się bowiem, że kwasy SFA we frakcji lipidów całkowitych (TL) dodatnio korelowały z BMR (Wykres 9), podczas gdy we frakcji fosfolipidów (PL) brak było takiej zależności (Wykres 10). Natomiast zależność między ilością kwasów PUFA a BMR we frakcji fosfolipidów (PL) była ujemna (Wykres 14) i nieistotna we frakcji lipidów całkowitych, TL (Wykres 13). Wynik ten jest w opozycji do uzyskanego przez Valencak i Ruf'a (2007), którzy nie stwierdzili zależności między kwasami n-3 PUFA a BMR. Może to wynikać z faktu, że w niniejszych badaniach zebrałam wszystkie rodziny kwasów PUFA, a nie ograniczyłam się jedynie do rodziny kwasów n-3. Co więcej, wykryłam dodatnią zależność pomiędzy indeksem saturacji (IS) a BMR (Wykres 15) oraz nieistotne korelacje dla indeksów IU (Wykres 16) i IP (Wykres 17), co po raz kolejny nie potwierdza zależności opisanych w teorii metronomu błonowego (Hulberta i Else 1999) na poziomie wewnątrzgatunkowym.

Teoria metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) zakłada, iż wzrost wartości indeksu saturacji (IS) błon komórkowych wpływa ujemnie na aktywność związanych z nimi białek błonowych, szczególnie pompy sodowo-potasowej (Na^+/K -ATPazy), co z kolei powinno prowadzić do spadku BMR. Niniejsze badania wskazują, iż myszy należące do linii L-BMR i H-BMR (Wykres 6A) oraz posiadające różne genotypy w genach *Scd1*

(Wykres 6B) oraz *Fasd2* (Wykres 6C) nie różniły się istotnie aktywnością pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy). Taki wynik nie dziwi, ponieważ enzym znajdował się w tak samo płynnym środowisku błonowym, rozumianym jako identyczna wartość indeksu nienasylenia błon biologicznych, IU (Tabela 14, Tabela 15, Tabela 16). Co więcej, przeprowadzona przeze mnie korelacja pomiędzy aktywnością pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) a tempem metabolizmu podstawowego (BMR) okazała się nieistotna statystycznie (Wykres 18). Wyniki badań, dotyczące aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) nie mogą więc ani potwierdzić ani podważyć teorii metronomu błonowego.

Podsumowanie

Teoria metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) stanowi ważny element spajający wiele teorii biologicznych i ewolucyjnych, a przede wszystkim tłumaczy w prosty sposób mechanizmy warunkujące zróżnicowanie tempa metabolizmu podstawowego (BMR) na poziomie międzygatunkowym. Z jednej strony jej założenia doskonale sprawdzają się w porównaniach różnych gatunków, czy też gromad zwierząt, a z drugiej, próby jej testowania w obrębie jednego gatunku przynoszą często odmienne i nierzadko przeciwstawne wnioski (Speakman, 2005b; Brzęk i in. 2007; Valencak i Ruf 2007; Polymeropoulos i in. 2012).

Jak do tej pory nikt nie próbował przetestować teorii metronomu błonowego na najniższym poziomie organizacji życia, a mianowicie na poziomie sekwencji genów oraz kodowanych przez nie białek odpowiedzialnych za skład lipidowy błon komórkowych z zastosowaniem technik biologii molekularnej. Wykorzystany przeze mnie system selekcyjny myszy prowadzony w Zakładzie Ekologii Zwierząt Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku okazał się trafnym narzędziem do testowania teorii metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999). Z drugiej jednak strony, długoletnia selekcja doprowadziła do zmniejszenia puli zmienności genetycznej, na którą mogłyby oddziaływać siły doboru, a zjawisko to pogłębiało się z każdym, kolejnym pokoleniem. Dodatkowo, dużą rolę w kształtowaniu zmienności genetycznej wśród eksperymentów selekcyjnych prowadzonych w laboratorium może odgrywać dryf genetyczny, którego efekty w znacznej mierze utrudniają prawidłowe, czy jednoznaczne wnioskowanie.

Zidentyfikowane przeze mnie polimorfizmy w genach *Scd1* oraz *Fsad2* wydają się mieć wpływ na tempo metabolizmu podstawowego u myszy selekcyonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) wartości tej cechy. Mimo że zróżnicowanie genetyczne w genie *Scd1* jest najprawdopodobniej wynikiem działania dryfu genetycznego, a nie skutkiem prowadzonej selekcji, to polimorfizm ten poprzez najprawdopodobniej zmianę kinetyki procesu translacji, wynikającej z odmiennych częstości występujących w komórkach cząsteczek tRNA (Komar, 2007), wydaje się wpływać na aktywność kodowanego enzymu, która jest wyższa w liniach myszy L-BMR. Natomiast test na loci poddane działaniu selekcji wskazał, że dywergencja genetyczna między selekcyjnymi liniami myszy w genie *Fads2* jest na tyle duża, że nie można jej tłumaczyć jedynie działaniem dryfu genetycznego, przynajmniej w pokoleniu F22. Polimorfizm ten jest o tyle istotny, że prowadzi do powstawania odmiennych pod względem funkcjonalnym wariantów białka. Warianty te wykazują zróżnicowanie w wartościach indeksu aktywności (IxA D6D) pomiędzy selekcyjnymi liniami myszy oraz zwierzętami posiadającymi różne genotypy w genie *Fads2*. Następstwem opisanych powyżej różnic w aktywnościach obu enzymów jest re-aranżacja składu błon komórkowych mysich hepatocytów, która w konsekwencji może wpływać na tempo metabolizmu podstawowego (BMR). Prowadzi ona do zróżnicowania w stopniu nasycenia membran biologicznych, rozumianej jako wartość indeksu saturacji (IS), ale odwrotnie niż zakłada to teoria metronomu błonowego. Co więcej, stopień płynności i przepuszczalności błon (IU) nie zmienia się, lecz pozostaje na wysokim poziomie, charakterystycznym dla gatunku, co znajduje swoje odzwierciedlenie w braku zróżnicowania w aktywności pompy sodowo-potasowej (Na⁺/K-ATPazy). W konsekwencji, porównywalne wartości indeksu peroksydacji (IP) błon biologicznych u myszy z obu linii wskazują, że membrany zwierząt z linii wysokometabolicznej (H-BMR) są w takim samym stopniu chronione przed wzmożonymi procesami peroksydacji wywołanymi reaktywnym działaniem wolnych rodników co myszy z linii L-BMR.

Podsumowując, przeprowadzony w niniejszych badaniach test teorii metronomu błonowego (Hulbert i Else 1999) z wykorzystaniem technik biologii molekularnej nie zdołał jej potwierdzić na poziomie wewnątrzgatunkowym. Wyniki eksperymentu wskazują, iż w porównaniach zwierząt należących do jednego gatunku obserwowane zróżnicowanie tempa metabolizmu podstawowego (BMR) mogą wynikać z odmiennych mechanizmów, które muszą poradzić sobie ze swoistą pułapką ewolucyjną w postaci podatności błon komórkowych na peroksydację. Niemożliwe byłoby podnoszenie stopnia nienasycenia błon komórkowych poprzez zwiększanie ilości wysoce wielonienasyconych

kwasów tłuszczowych (PUFA), takich jak np. kwas dokosaheksaenowy, DHA (C22:6n-3) bez zwiększania podatności błon na destrukcyjne działanie reaktywnych form tlenu (ROS). Ewolucja faworyzowałaby raczej re-aranżację, tj. modyfikację ilości poszczególnych kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych w taki sposób, aby pozostawić je nadal wysoce płynnymi i przynajmniej w równym stopniu podatnymi na peroksydację. Niniejsze badania podkreślają natomiast niewątpliwą rolę desaturacji w szlaku metabolicznych przemian kwasów tłuszczowych i jej wpływ na tempo metabolizmu podstawowego (BMR) oraz sugerują, że pozostaje ona pod kontrolą badanych genów.

LITERAURA

- Agbaga MP, Brush RS, Mandal MN, Henry K, Elliott MH, Anderson RE (2008) Role of Stargard-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 12843–12848.
- Aki T, Shimada Y, Inagaki K, Higashimoto H, Kawamoto S, Shigeta S, Ono K, Suzuki O (1999) Molecular cloning and functional characterization of rat Δ -6 fatty acid desaturase. *Biochem Biophys Res Commun*, 255: 575–579.
- Alexander CM (2003) The coming of age of the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 26: 3180–3181.
- Allison LA (2007) *Fundamental molecular biology*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Antao T, Lopes A, Lopes RJ, Beja-Pereira A, Luikart G (2008) LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a F_{ST} -outlier method. *BMC Bioinformatics*, 9:323.
- Ariyama H, Kono N, Matsuda S, Inoue T, Arai H (2010) Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem*, 285: 22027–22035.
- Avise JC (2008) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Second Edition, Sinauer Associates, Sunderland.
- Barja G (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci*, 27: 595–600.
- Barnett SA, Dickson RG (1984a) Changes among wild house mice (*Mus musculus*) bred for 10 generations in cold environment, and their evolutionary implications. *J Zool*, 203: 163–180.
- Barnett SA, Dickson RG (1984b) Milk-production and consumption and growth of young of wild mice after 10 generations in a cold environment. *J Physiol Lond*, 346: 409–417.
- Barton NH, Keightley PD (2002) Multifactorial genetics: Understanding quantitative genetic variation. *Nat Rev Genet*, 3: 11–21.
- Bartosz G (1995) *Druga twarz tlenu*. Warszawa, PWN.
- Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proc R Soc London Ser B*, 263: 1619–1626.
- Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 78: 547–581.
- Benett AF, Ruben JA (1979) Endothermy and activity in vertebrates. *Science*, 206: 649–653.
- Biddinger SB, Miyazaki M, Boucher J, Ntambi JM, Kahn CR (2006) Leptin suppresses stearoyl-CoA desaturase 1 by mechanisms independent of insulin and sterol regulatory-binding protein-1c. *Diabetes*, 55: 2032–2041.
- Blaxter K (1989) *Energy metabolism in animals and man*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biol Chem*, 37: 911–917.
- Bradley RL, Fisher FM, Maratos-Flier E (2008) Dietary fatty acids differentially regulated production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring)*, 16: 938–944.
- Brand MD (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol*, 35: 811–820.

- Brand MD, Couture P, Else PL, Withers KW, Hulbert AJ (1991) Evolution of energy metabolism: proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile. *Biochem J*, 275: 81–86.
- Broman KW, Speed TP (1999) A review of methods for identifying QTLs in experimental crosses. *Statistics in molecular biology and genetics*. Institute of Mathematical Statistics, Hayward, CA, pp: 114–142.
- Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89: 331–340.
- Brzęk P, Bielawska K, Książek A, Konarzewski M (2007) Anatomic and molecular correlates of divergent selection for basal metabolic rate in laboratory mice. *Physiol Biochem Zool*, 80: 401–499.
- Calder PC (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol*, 75: 645–662.
- Castro-Chavez F (2012) Most used codons per amino acid and per genome in the code of man compared to other organisms according to the rotating circular genetic code. *NeuroQuantology*, 9(4): 747–766.
- Chakravarti A (1999) Population genetics – making sense out of sequence. *Nat Genet*, 21: 56–60.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59: 527–605.
- Chinwalla T, Cook LL, Delehaunty KD, Fewell GA, Fulton LA, Fulton RS, Grawes TA, Hillier LW, Mardis ER, McPherson JD i in. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420: 520–562.
- Cho HP, Nakamura M, Clarke SD (1999a) Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem*, 274: 37335–37339.
- Cho HP, Nakamura MT, Clarke SD (1999b) Cloning, expression, and nutritional regulation of mammalian Δ -6 desaturase. *J Biol Chem*, 274: 471–477.
- Chyb S, Raghu R, Hardie R (1999) Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature*, 397: 255–259.
- Cinti DL, Cook L, Nagi MN, Suneja SK (1992) The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum. *Prog Lipid Res*, 31: 1–51.
- Clarke BC (1979) The evolution of genetic diversity. *Proc Royal Soc London B*, 205: 453–474.
- Clugston RD, Jiang H, Lee MX, Piantedosi R, Yuen JJ, Ramakrishnan R, Lewis MJ, Gottesman ME, Huang L-S, Goldberg IJ, Berk PD, Blaner WS (2011) Altered hepatic lipid metabolism in C57BL/6 mice fed alcohol: a targeted lipidomic and gene expression study. *J Lipid Res*, 52: 2021–2031.
- Couture P, Hulbert AJ (1995) Membrane fatty acid composition of tissues in related to body mass of mammals. *J Membr Biol*, 148: 27–39.
- Cribier S, Morrot G, Zachowski A (1993) Dynamics of the membrane lipid phase. *Prostaglandins Leucot Essent Fatty Acids*, 48: 27–32.
- Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat Biotech*, 20: 581–586.
- de Antueno RJ, Knickle LC, Smith H, Elliot ML, Allen SJ, Nwaka S, Winter MD (2001) Activity of human Delta5 and Delta6 desaturases of multiple n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett*, 509: 77–80.
- Denic V, Weissman JS (2007) A molecular caliper mechanism for determining very long-chain Fatty Acid length. *Cell*, 130: 663–677.
- Dobrzyń P, Dobrzyń A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, Friedman JM,

- Ntambi JM (2004) Stearoyl- CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Biochemistry*, 101: 6409–6414.
- Dobrzyń A, Ntambi JM (2005) The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73(1): 35–41.
- Dobrzyń P, Pyrkowska A, Jazurek M, Szymanski K, Langfort J, Dobrzyń A (2010) Endurance training-included accumulation of muscle triglycerides is coupled to upregulation of stearoyl CoA desaturase 1. *J Appl Physiol*, 109 (6): 1653–1661.
- Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 86: 839–848.
- Edidin M (2003) Lipid on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 414–418.
- Else PL, Hulbert AJ (1985) An allometric comparison of the mitochondria of mammalian and reptilian tissues: the implications for the evolution of endothermy. *J Comp Physiol B*, 156: 3–11.
- Else PL, Wu BJ (1999) What role for membranes in determining the higher sodium pump molecular activity of mammals compared to ectotherms? *J Comp Physiol B*, 169: 296–302.
- Else PL, Turner N, Hulbert AJ (2004) The evolution of endothermy: role for membranes and molecular activity. *Physiol Biol Zool*, 77: 950–957.
- Enoch HG, Catala A, Strittmatter P (1976) Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem*, 251: 5095–5103.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) Introduction to quantitative genetics. Longman House, Essex, England.
- Farmer CG (2000) Parental care: the key innovation to understanding endothermy and other convergent features of birds and mammals. *Am Nat*, 155: 326–334.
- Floyd RA (1996) Protective action of nitron-based free radical traps in neurodegenerative diseases. In: Fiskum G (eds) Neurodegenerative Diseases. Plenum Press, New York.
- Futuyma DJ, Bennett AF (2009) The importance of experimental studies in evolutionary biology. In: Garland T Jr, Rose MR (Eds) Experimental evolution: concepts, methods, and applications of selection experiments. University of California Press, Berkeley, California, p. 15–30.
- Gębczyński AK (2005) Daily variation of regulatory costs in laboratory mice selected for high and low basal metabolic rate. *J Therm Biol*, 30: 187–193.
- Gębczyński AK (2008) Nonshivering thermogenesis capacity versus basal metabolic rate in laboratory mice. *J Therm Biol*, 33: 250–254.
- Gębczyński AK, Konarzewski M (2009) Locomotor activity of mice divergently selected for basal metabolic rate: A test of hypotheses on the evolution of endothermy. *J Evol Biol*, 22: 1212–1220.
- Garland T Jr (2002) Selection experiments: an underutilized tool in biomechanics and organismal biology, In: Bels VL, Gasc JP, Casinos A (Eds) Biomechanics and Evolution, Oxford, BIOS Scientific, p. 23–56.
- Garland T Jr, Carter PA (1994) Evolutionary physiology. *Annu Rev Physiol*, 56: 579–621.
- Goldberg EM, Zidovetzki (1997) Effect of dipalmitoylglycerol and fatty acids on membrane structure and protein kinase C activity. *Biophys J*, 73: 2603–2614.
- Goldring MB, Berenbaum F (2004) The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res*, 427: S37–S46.

- Goudet J (1995) FSTAT (version 2.9.3): A computer program to calculate *F*-statistics. *J Hered*, 86: 485–486.
- Grasso EJ, Calderón RO (2013) Urothelial endocytic vesicle recycling and lysosomal degradative pathway regulated by lipid membrane composition. *Histochem Cell Biol*, 139: 249–265.
- Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C (2004) Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference of scientific issues related to definition. *Circulation*, 109: 433–438.
- Grundy SM, Cleeman JI, Daniels RS, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Spertus JA, Costa F, (2006) Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Curr Opin Cardiol*, 21: 1–6.
- Gudbjarnason S, Doell B, Oskardottir G, Hallgrímsson J (1978) Modification of cardiac phospholipids and catecholamine stress tolerance, In: de Duve C, Hayaishi O (Eds) *Tocopherol, Oxygen and Biomembranes*. Elsevier, Amsterdam, p: 297–310.
- Guillou H, Zdravec D, Martin PGP, Jacobsson A (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Inside from transgenic mice. *Prog Lipid Res*, 49: 186–199.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 41: 95–98.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*, 3rd edn. Oxford University Press, Oxford.
- Hardy S, Langeriel Y, Prentki M (2000) Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res*, 60: 6353–6358.
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11: 298–300.
- Hayssen V, Lacy RC (1985) Basal metabolic rates in mammals: taxonomic differences in the allometry of BMR and body mass. *Comp Biochem Physiol*, 81A: 741–754.
- Hearne CM, McAleer MA, Love JM, Aitman TJ, Cornall RJ, Ghosh S, Knight AM, Prins JB, Todd JA (1991) Additional microsatellite markers for mouse genome mapping. *Mamm Genome*, 1: 273–282.
- Heinemann FS, Ozols J (2003) Stearoyl-CoA desaturase, a short lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids*, 68: 123–133.
- Hemmingsen AM (1960) Energy metabolism as related to body size and respiratory surface and its evolution. Report of Steno Memorial Hospital, Nordisk Insulin Laboratory 9: 1–110.
- Holman RT (1954) Autoxidation of fats and related substances. In: Holman RT, Lundberg WO, Malkin T (Eds) *Progress in chemistry of fats and other lipids*, vol. 2. Pergamon Press, London, pp: 51–98.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109: 1125–1131.
- Houle-Leroy P, Gerland T, Swallow Jr JG, Guderley H (2003) Artificial selection for high activity favors mighty mini-muscles in house mice. *Am J Physiol*, 284: R433–R443.
- Hua X, Sakai J, Ho YK, Goldstein JL, Brown MS (1995a) Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J Biol Chem*, 270: 29422–29427.

- Hua X, Wu J, Goldstein JL, Brown MS, Hobbs HH (1995b) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics*, 25: 667–673.
- Hulbert AJ (2003) Life, death and membrane bilayers. *J Exp Biol*, 206: 2303–2311.
- Hulbert AJ (2005) On the importance of fatty acid composition of membrane for aging. *J Theor Biol*, 234: 277–288.
- Hulbert AJ (2008) Explaining longevity of different animals: is membrane fatty acid composition the missing link? *Age*, 30: 89–97.
- Hulbert AJ, Else PL (1989) Evolution of mammalian endothermic metabolism: mitochondrial activity and cell composition. *Am J Physiol*, 256: R63–R69.
- Hulbert AJ, Else PL (1999) Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J Theor Biol*, 199: 257–274.
- Hulbert AJ, Faulks SC, Buttemer WA, Else PL (2002a) Acyl composition of muscle membranes varies with body size in birds. *J Exp Biol*, 205: 3561–3569.
- Hulbert AJ, Rana T, Couture P (2002b) The acyl composition of mammalian phospholipids: allometric analysis. *Comp Biochem Physiol B*, 132: 515–527.
- Hulbert AJ, Else PL (2004) Basal metabolic rate: history, regulation, and usefulness. *Physiol Biochem Zool*, 77: 869–876.
- Hulbert AJ, Faulks SC, Harper JM, Miller RA, Buffenstein R (2006) Extended longevity of wild-derived mice is associated with peroxidation-resistant membranes. *Mech Aging Develop*, 127: 653–657.
- Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA (2007) Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiol Rev*, 87: 1175–1213.
- Isomaa B (2003) A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life Sci*, 73: 2395–2411.
- Jafari T, Fallah AA, Azadbakht L (2013) Role of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: A review of epidemiological and clinical studies. *Maturitas*, 74: 303–308.
- Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A (2006) Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res*, 45: 237–249.
- Juárez-López C, Klünder-Klünder M, Madrigal-Azcárate A, Flores-Huerta S (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce insulin resistance and triglycerides in obese children and adolescents. *Pediatr Diabetes*, 14: 377–383.
- Kaestner KH, Ntambi JM, Kelly Jr TJ, Lane MD (1989) Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem*, 264: 14755–14761.
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH (2009) FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3: 1–14.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol*, 16: 1099–1106.
- Kane SL, Garland T Jr, Carter PA (2008) Basal metabolic rate of aged mice is affected by random genetic drift but not by selective breeding for high early-aged locomotor activity or chronic wheel access. *Physiol Biochem Zool*, 81: 288–300.
- Kaplan NM (1989) The deadly quartet: upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia and hypertension. *Arch Intern Med*, 149: 1514–1520.
- Kim W, Khan NA, McMurray DN, Prior IA, Wang N, Chapkin RS (2010) Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling. *Prog Lipid Res*, 49: 250–261.

- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM (2007) A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315: 525–528.
- Kitazawa H, Miyamoto Y, Shimamura K, Nagumo A, Tokita S (2009) Development of a high-density assay for long-chain fatty acyl-CoA elongases. *Lipids*, 44: 765–773.
- Klotz LO, Kronecke KD, Buchczyk DP, Sies H (2003) Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defence against oxidative and nitrosative stress. *J Nutr*, 133: 1448S–1451S.
- Komar AA (2007) SNPs, silent but not invisible. *Science*, 315: 466–467.
- Konarzewski M, Książek A, Łapo IB (2005) Artificial selection on metabolic rates and related traits in rodents. *Integr Comp Biol*, 45: 416–425.
- Konczal MS (2013) Genomika adaptacji. *Kosmos*, 298: 13–29.
- Koteja P (2000) Energy assimilation, parental care and the evolution of endothermy. *Proc R Soc Lond B*, 267: 479–484.
- Koteja P (2009) Ewolucja eksperymentalna. *Kosmos*, 284–285: 459–474.
- Koteja P, Swallow JG, Carter PA, Garland T Jr (1999) Energy cost of wheel running in house mice: implications for coadaptation of locomotion and energy budgets. *Physiol Biochem Zool*, 72: 238–249.
- Koteja P, Swallow JG, Carter PA, Garland T Jr (2003) Different effects of intensity and duration of locomotor activity on circadian period (τ). *J Biol Rhythms*, 18: 491–501.
- Książek A, Konarzewski M, Chadzińska M, Cichoń M (2003) Costs of immune response in cold-stressed laboratory mice selected for high and low basal metabolic rates. *Proc R Soc B*, 270: 2025–2031.
- Książek A, Konarzewski M, Łapo IB (2004) Anatomic and energetic correlates of divergent selection for basal metabolic rate in laboratory mice. *Physiol Biochem Zool*, 77: 890–899.
- Książek A, Czerniecki J, Konarzewski M (2009) Phenotypic flexibility of traits related to energy acquisition in mice divergently selected for basal metabolic rate (BMR). *J Exp Biol*, 212: 808–814.
- Książek A, Konarzewski M (2012) Effect of dietary restriction on immune response of laboratory mice divergently selected for basal metabolic rate. *Physiol Biochem Zool*, 85: 51–61.
- Lee AG (1991) Lipids and their effects on membrane proteins: evidence against a role for fluidity. *Prog Lipid Res*, 30: 323–348.
- Lee SH, Dobrzyń A, Dobrzyń P, Rahman SM, Miyazaki M, Ntambi JM (2004) Lack of stearoyl-CoA desaturase 1 upregulates basal thermogenesis but causes hypothermia in a cold environment. *J Lipid Res*, 45: 1674–1682.
- Lee SJ, Sekimoto T, Yamashita E, Nagoshi E, Nakagawa A, Imamoto N, Yoshimura M, Sakai H, Chong KT, Tsukihara T, Yoneda Y (2003) The structure of important-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science*, 302: 1571–1575.
- Leonard AE, Kelder B, Bobik EG, Chuang LT, Parker-Barnes JM, Thurmond JM, Kroeger PE, Kopchick JJ, Huang YS, Mukerji P (2000a) cDNA cloning and characterization of human Delta5-desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. *Biochem J*, 347: 719–724.
- Leonard AE, Bobik EG, Dorado J, Kroeger PE, Chuang LT, Thurmond JM, Parker-Barnes JM, Das T, Huang YS, Mukerji P (2000b) Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochem J*, 350: 765–770.

- Leonard AE, Pereira SL, Sprecher H, Huang YS (2004) Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*, 43: 36–54.
- Lighton JRB (2008) Measuring metabolic rate rates: a manual for scientist. Oxford University Press, Oxford.
- Lin PY, Huang SY, Su KP (2010) A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. *Biol Psychiatry*, 68: 140–147.
- Lokody I (2014) Insight into monogenic disease. *Nat Rev Genet*, 15: 218.
- Lorente-Cebrián S, Costa AGV, Navas-Carretero S, Zabala M, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ (2013) Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J Physiol Biochem*, 69: 633–651.
- Luong A, Hannah VC, Brown MS, Goldstein JL (2000) Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, 275: 26458–26466.
- Lutz PL (2002) Rise of experimental biology: an illustrated history. Humana, Totawa, N.J.
- Łomnicki A (2009) Dryf genetyczny. *Kosmos*, 284–285: 377–384.
- Maciak S, Janko K, Kotusz J, Choleva L, Boroń A, Juchno D, Kujawa R, Kozłowski J, Konarzewski M (2011) Standard metabolic rate (SMR) is inversely related to erythrocyte and genome size in allopolyploid fish of the *Cobitis taenia* hybrid complex. *Funct Ecol*, 25: 1072–1078.
- Maciak S, Bonda-Ostaszewska E, Czarnołęski M, Konarzewski M (2014) Mice divergently selected for high and low basal metabolic rates evolved different cell size and organ mass. *J Evol Biol*, 27(3): 478–487.
- Magana MM, Osborne TF (1996) Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J Biol Chem*, 271: 32689–32694.
- Magana MM, Lin SS, Dooley KA, Osborne TF (1997) Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins. *J Lipid Res*, 38: 1630–1638.
- Man WC, Miyazaki M, Chu K, Ntambi JM (2006) Membrane topology of mouse stearyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem*, 281: 1251–1260.
- Martinelli N, Girelli D, Malerba G, Guarini P, Illig T, Trabetti E, Sandri M, Friso S, Pizzolo F, Schaeffer L, Heinrich J, Pignatti PF, Corrocher R, Olivieri O (2008) FADS genotype and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease. *Am J Clin Nutr*, 88: 941–949.
- Marquardt A, Stohr H, White K, Weber BH (2000) CDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics*, 66: 175–183.
- Mathot KJ, Martin K, Kempnaers B, Forstmeier W (2013) Basal metabolic rate can evolve independently of morphological and behavioural traits. *Heredity*, 111: 175–181.
- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hasty AH, Tamura Y, Osuga J, Okazaki H, Iizuka Y, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N (2002a) Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J Lipid Res*, 43: 107–114.
- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Takahashi A, Yato S, Sone H, Ishibashi S, Yamada N (2002b) Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J Lipid Res*, 43: 911–920.

- McNamara RK, Jandacek R, Rider T, Tso P, Dwivedi Y, Pandey GN (2010) Selective deficits in erythrocyte docosahexaenoic acid composition in adult patients with bipolar disorder and major depressive disorder. *J Affect Disord*, 126: 303–311.
- Miles EA, Calder PC (2012) Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr*, 107: 171–184.
- Miyazaki M, Kim YC, Gray-Keller MP, Attie AD, Ntambi JM (2000) The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem*, 275: 30132–30138.
- Miyazaki M, Jacobson MJ, Man WC, Cohen P, Asilmaz E, Friedman JM, Ntambi JM (2003) Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearoyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. *J Biol Chem*, 278: 33904–33911.
- Moon YA, Shah NA, Mohapatra S, Warrington JA, Horton JD (2001) Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, 276: 45358–45366.
- Moreno C, Macías Á, Prieto Á, de la Cruz A, González T, Valenzuela C (2012) Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac ion channels. *Front Physiol*, 3: 245.
- Murray JD, Oberbauer AM, Sharp KR, German JB (1994) Expression of an ovine growth hormone transgene in mice increases arachidonic acid in cellular membranes. *Transgenic Res*, 3: 241–248.
- Nagoshi E, Imamoto N, Sato R, Yoneda Y (1991) Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. *Mol Biol Cell*, 10: 2221–2233.
- Nagoshi E, Yoneda Y (2001) Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta. *Mol Cell Biol*, 21: 2779–2789.
- Nakamura MT, Phinney SD, Tang AB, Oberbauer AM, German JB, Murray JD (1996) Increased hepatic delta 6-desaturase activity with growth hormone expression in the MG101 transgenic mouse. *Lipids*, 31: 139–143.
- Nakamura MT, Nara TY (2004) Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr*, 24: 345–376.
- Nara TY, He WS, Tang C, Clarke SD, Nakamura MT (2002) The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human delta-6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*, 296: 111–117.
- Nehrenberg DL, Wang S, Hannon RM, Garland Jr T, Pomp D (2009) QTL underlying voluntary exercise in mice: interactions with the “mini muscle” locus and sex. *J Heredity*, 101: 42–53.
- Ng PC, Henikoff S (2001) Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*, 11(5): 863–874.
- Ntambi JM (1999) Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res*, 40: 1549–1558.
- Ntambi JM, Buhrow SA, Kaestner KH, Christy RJ, Sibley E, Kelly Jr TJ, Lane MD (1988) Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem*, 263: 17291–17300.
- Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD (2002) Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Physiology*, 99: 11482–11486.

- Nugteren DH (1965) The enzymic chain elongation of fatty acids by rat-liver microsomes. *Biochim Biophys Acta*, 106: 280–290.
- Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkani G, Rossetti L (2002) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes*, 51: 271–275.
- Oh CS, Toke DA, Mandala S, Martin CE (1997) ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem*, 272: 17376–17384.
- Pacholczyk M, Ferenc T, Kowalski J (2008) Zespół metaboliczny. Część I: Definicje i kryteria rozpoznawania zespołu metabolicznego. Epidemiologia oraz związek z ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych i cukrzycy typu 2. *Postępy Hig Med. Dosw*, 62: 530–542.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Ruiz C, Prat J, Bellmunt MJ, Barja G (1998) Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum lifespan in mammals. *J Lipid Res*, 39: 1989–1994.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A, Barja G (1999) Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Aging Dev*, 112: 169–183.
- Paton CM, Ntambi JM (2009) Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297: E28–E37.
- Peters RH (1983) The ecological implications of body size. Cambridge University Press, New York.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res*, 29: 2002–2007.
- Polymeropoulos ET, Heldmaier G, Frappell PB, McAllan BM, Withers KW, Klingenspor M, White CR, Jastroch M (2012) Polygenetic differences of mammalian basal metabolic rate are not explained by mitochondrial basal proton leak. *Proc R Soc B*, 279: 185–193.
- Porter RK, Brand MD (1993) Body mass dependence of H⁺ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate. *Nature*, 362: 628–630.
- Qin Y, Dalen KT, Gustafsson JA, Nebb HI (2009) Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXRalpha-SREBP-1c. *Biochim Biophys Acta*, 1791: 140–147.
- Rangel-Huerta OD, Aguilera CM, Mesa MD, Gil A (2012) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomised clinical trial. *Br J Nutr*, 107: 159–170.
- Reaven GM (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37: 1595–1607.
- Reddy AS, Nuccio ML, Gross LM, Thomas TL (1993) Isolation of a delta 6-desaturase gene from the *Cyanobacterium synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Plant Mol Biol*, 22: 293–300.
- Reimer KA, Jennings RB (1986) Myocardial ischemia, hypoxia and infarction. In: Fozzard HE (eds) The heart and Cardiovascular System. Raven Press, New York.
- Rezende EL, Chappell MA, Gomes FR, Malisch JL, Garland T Jr (2005) Maximal metabolic rates during voluntary exercise, forced exercise, and cold exposure in house mice selectively bred for high wheel-running. *J Exp Biol*, 208: 2447–2458.
- Rhodes JS, Gammie SC, Garland T Jr (2005) neurobiology of mice selected for high voluntary wheel-running activity. *Integr Comp Biol*, 45: 438–455.
- Rimoldi OJ, Finarelli GS, Brenner RR (2001) Effects of diabetes and insulin on hepatic delta6 desaturase gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 283: 323–326.
- Rolfe DFS, Brown GC (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard

- metabolic rate in mammals. *Physiol Rev*, 77: 731–758.
- Rolfe DFS, Newman JMB, Buckingham JA, Clark MG, Brand MD (1999) Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am J Physiol Cell Physiol*, 276: 692–699.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molec Ecol Res*, 8: 103–106.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*. Humana Press, Totawa, NJ, pp 365–386.
- Sadowska J, Gębczyński AK, Konarzewski M (2013) Basal metabolic rate is positively correlated with parental investment in laboratory mice. *Proc R Soc B*, 280: 20122576.
- Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM (2007) Silent polymorphism speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res*, 67: 9609–9612.
- Sayanova O, Smith MA, Lapinskas P, Stobart AK, Dobson G, Christie WW, Shewry PR, Napier JA (1997) Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 4211–4216.
- Shanklin J, Whittle E, Fox BG (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry*, 33: 12787–12794.
- Sharp PM, Tuohy TM, Mosurski KR (1986) Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 14: 5125–5143.
- Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL (1997) Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest*, 99: 846–854.
- Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (1997) Differential expression of exons 1a and 1c in mRNA for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest*, 99: 838–845.
- Sieradzki J (1997) Zespół polimetaboliczny. *Czynniki Rzyzka*, 25: 1–2.
- Simopoulos AP (2011) Evolutionary aspects of diet. The omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol*, 44: 203–215.
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720–731.
- Smith S (1994) The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J*, 8: 1248–1259.
- Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273: 59–63.
- Speakman JR (2005a) Review: Body size, energy metabolism and lifespan. *J Exp Biol*, 208: 1717–1730.
- Speakman JR (2005b) Correlation between physiology and lifespan – two widely ignored problems with comparative studies. *Aging Cell*, 4: 167–175.
- Spencer M, Finlin BS, Unal R, Zhu B, Morris AJ, Shipp LR, Lee J, Walton RG, Adu A, Erfani R, Campbell M, McGehee Jr RE, Peterson CA, Kern PA (2013) Omega-3 fatty acids reduce adipose tissue macrophages in human subjects with insulin resistance. *Diabetes*, 62: 1709–1717.
- Sprecher H (1981) Biochemistry of essential fatty acids. *Prog Lipid Res*, 20: 13–22.

- Stoffel W, Holz B, Jenke B, Binczek E, Gunter RH, Kiss C, Karakesisoglou I, Thevis M, Weber AA, Arnhold S, Addicks K (2008) Desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of ω 3 and ω 6-polyunsaturated fatty acids. *EMBO J*, 27: 2281–2292.
- Strittmatter P, Spatz L, Corcoran D, Rogers MJ, Setlow B, Redline R (1974) purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 71: 4565–4569.
- Strittmatter P, Enoch HG (1978) Purification of stearyl-CoA desaturase from liver. *Methods Enzymol*, 52: 188–193.
- Stroud CK, Nara TY, Roqueta-Rivera M, Radlowski EC, Lawrence P, Zhang Y, Cho BH, Segre M, Hess RA, Brenna JT, Haschek WM, Nakamura MT (2009) Disruption of *FADS2* gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. *J Lipid Res*, 50: 1870–1880.
- Swallow JG, Carter PA, Garland T Jr (1998) Artificial selection for increased wheel-running behavior in house mice. *Behav Genet*, 28: 227–237.
- Swallow JG, Koteja P, Carter PA, Garland T Jr (2001) Food consumption and body composition in mice selected for high wheel-running activity. *J Comp Physiol B*, 171: 651–659.
- Tabor DE, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA (1999) Identification of conserved cis-element and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearyl-CoA desaturase 1 and 2. *J Biol Chem*, 274: 20603–20610.
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM (2002) Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*, 3: 391–397.
- Takeuchi Y, Yahagi N, Izumida Y, Nishi M, Kubota M, Teraoka Y, Yamamoto T, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sekiya M, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Gotoda T, Ishibashi S, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H (2010) Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. *J Biol Chem*, 285: 11681–11691.
- Tamura K, Makino A, Hullin-Matsuda F, Kobayashi T, Furihata M, Chung S, Ashida S, Miki T, Fujioka T, Shiun T, Nakamura Y, Nakagawa H (2009) Novel lipogenic enzyme *ELOVL7* is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. *Cancer Res*, 69: 8133–8140.
- Thiede MA, Ozols J, Strittmatter P (1986) Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase. *J Biol Chem*, 261: 13230–13235.
- Turner N, Else PL, Hulbert AJ (2003) Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: implications for disease states and metabolism. *Naturwissenschaften*, 90: 521–523.
- Turner N, Hulbert AJ, Else PL (2005) Sodium pump molecular activity and membrane lipid composition in two disparate ectotherms, and comparison with endotherms. *J Comp Physiol B*, 175: 77–85.
- Tverdik P, Asadi A, Kozak LP, Nedergaard J, Cannon B, Jacobsson A (1997) Cig30 a mouse member of a novel membrane protein gene family, is involved in the recruitment of brown adipose tissue. *J Biol Chem*, 272: 31738–31746.
- Tverdik P, Westerberg R, Silve S, Asadi A, Jakobsson A, Cannon B, Loison G, Jacobsson A (2000) Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids. *J Cell Biol*, 149: 707–718.
- Valencak TG, Ruf T (2007) N-3 polyunsaturated fatty acid impair lifespan but have no role for metabolism. *Aging Cell*; 6: 15–25.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER:

- software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538.
- Vitarius JA (2005) The metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Mt Sinai J Med*, 48: 1679–1683.
- Wade CM, Kulbokas EJ, Kirby AW, Zody MC, Mullikin JC, Lander ES, Lindblad-Toh K, Daly MJ (2002) The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature*, 420: 574–578.
- Wang J, Yu L, Schmidt RE, Su C, Huang X, Gould K, Cao G (2005) Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun*, 332: 735–742.
- Wang Y, Botolin D, Xu J, Christian B, Busik J, Xu J, Jump DB (2005) Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lipid Res*, 46: 706–715.
- Wang Y, Botolin D, Xu J, Christian B, Mitchell E, Jayaprakasam B, Nair M, Peters JM, Busik J, Olson LK, Jump DB (2006) Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res*, 47: 2028–2041.
- Warensjö E, Rosell M, Hellenius M, Vessby B, de Faire U, Risérus U (2009) Associations between estimated fatty acids desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. *Lipids Health Dis*, 8: 37.
- West GB, Brown JH, Enquist BJ (1997) A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science*, 276: 122–126.
- West GB, Woodruff WH, Brown JH (2002) Allometric scaling of metabolic rate from molecules and mitochondria to cell and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 2473–2478.
- Westerberg R, Tvrdik P, Uden AB, Mansson JE, Norlen L, Jakobsson A, Holleran WH, Elias PM, Asadi A, Flodby P, Toftgård R, Capecchi MR, Jacobsson A (2004) Role for ELOVL3 and fatty acid chain length in development of hair and skin function. *J Biol Chem*, 279: 5621–5629.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323–354.
- Wu BJ, Else PL, Storlien LH, Hulbert AJ (2001) Molecular activity of Na⁺,K⁺-ATPase from different sources is related to the packing of membrane lipids. *J Exp Biol*, 204: 4271–4280.
- Wu BJ, Hulbert AJ, Storlien LH, Else PL (2004) Membrane lipids and sodium pumps of cattle and crocodiles: an experimental test of the membrane pacemaker theory of metabolism. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 287: 633–641.
- Xiao YF, Ke Q, Wang SY, Auktor K, Yang Y, Wang GK, Morgan JP, Leaf A (2001) Single point mutations affect fatty acid block of human myocardial sodium channel alpha subunit Na⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 3606–3611.
- Xiao YF, Sigg DC, Leaf A (2005) The antiarrhythmic effect of n-3 polyunsaturated fatty acids: modulation of cardiac ion channels as a potential mechanism. *J Memb. Biol*, 206: 141–154.
- Yang Z, Rannala B (2012) Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet*, 13: 303–314.
- Yonezawa T, Haga S, Kobayashi Y, Katoh K, Obara Y (2008) Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 367: 729–737.
- Zhang L, Ge L, Parimoo S, Stenn K, Prouty SM (1999) Human stearyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem J*, 340: 255–264.
- Zheng Y, Eilertsen KJ, Ge L, Zhang L, Sundberg JP, Prouty SM, Stenn KS, Parimoo S

- (1999) *Scd1* is expressed in sebaceous glands and is disrupted in the asebia mouse. *Nat Genet*, 23: 268–270.
- Zheng Y, Prouty SM, Harmon A, Sundberg JP, Stenn KS, Parimoo S (2001) *Scd3*-a novel gene of the stearyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics*, 71: 182–191.
- Zhu M, Zhao S (2007) Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int J Biol Sci*, 3(7): 420–427.
- Zolfaghari R, Cifelli CJ, Banta MD, Ross AC (2001) Fatty acid delta(5)-desaturase mRNA is regulated by dietary vitamin A and exogenous retinoic acid in liver of adult rats. *Arch Biochem Biophys*, 391: 8–15.