

**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

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 stałocieplnych 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 stałocieplnych 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 nasycenia (indeksem saturacji, IS) oraz nienasycenia (indeksem nienasycenia, 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 walina) 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 nieselekcyjnymi, 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 nieselekcyjnymi, 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 różnic 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 selekcjonowanych 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) dodatnio 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 *Fsad2* wydają się mieć wpływ na tempo metabolizmu podstawowego u myszy selekcjonowanych 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 (Ix A 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 wzmożonymi 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 Δ 9-desaturase (SCD-1c) and Δ 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 ($\text{Na}^+/\text{K-ATPase}$) 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).