

Detekcija i karakterizacija trim mobilnih elemenata u vrstama školjkaša cerastoderma edule i Glycymeris glycymeris

Cedilak, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:711303>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2019.

Andrea Cedilak

877/ MB

**DETEKCIJA I
KARAKTERIZACIJA TRIM
MOBILNIH ELEMENATA U
VRSTAMA ŠKOLJKAŠA
Cerastoderma edule i *Glycymeris
glycymeris***

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za strukturu i funkciju heterokromatina, Institut „Ruđer Bošković“, pod neposrednim voditeljstvom dr. sc. Eve Šatović, znanstvene suradnice i mentorstvom prof. dr. sc. Ivana-Krešimira Sveteca, a predan je na ocjenu Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

DETEKCIJA I KARAKTERIZACIJA TRIM MOBILNIH ELEMENATA U VRSTAMA

ŠKOLJKAŠA *Cerastoderma edule* i *Glycymeris glycymeris*

Andrea Cedilak, 877/MB

Sažetak: TRIM su mobilni elementi koji spadaju u skupinu neautonomnih retrotranspozona i do sada su dokazani u iznimno malom broju animalnih genoma. Školjkaši su skupina organizama još uvijek slabo okarakterizirana na genomskoj razini, no u najnovije vrijeme postali su predmetom istraživanja jer je prepoznata njihova gospodarska i ekološka važnost. U sklopu ovog rada provedena su istraživanja u svrhu detekcije i karakterizacije mobilnih elemenata TRIM u vrstama školjkaša *Cerastoderma edule* i *Glycymeris glycymeris* te njihova usporedba s elementima iz drugih vrsta školjkaša koji sadrže ove retroelemente. Postojanje elemenata dokazano je analizom otisaka kolonija, odnosno bioinformatičkom analizom sekvenciranih uzoraka. Dobiven je postotak sličnosti iznad 90% unutar vrste, odnosno 75% između ove dvije vrste. U drugom djelu ovog rada po prvi put je određivan udio TRIM elemenata u genomu za svih 11 vrsta korištenih u ovom radu te je kapljičnom analizom dobiveno da kod svih vrsta iznosi <1% genoma.

Ključne riječi: TRIM mobilni elementi, školjkaši, retrotranspozoni

Rad sadrži: 54 stranice, 23 slike, 6 tablica

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Neposredni voditelj: dr. sc. Eva Šatović, znanstveni suradnik

Mentor: prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Renata Teparić
2. Prof.dr.sc. Ivan-Krešimir Svetec
3. dr.sc. Eva Šatović
4. Doc.dr.sc. Anamarija Štafa (zamjena)

Datum obrane: 25.01.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Graduate Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Structure and Function of Heterochromatin

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF TRIM MOBILE ELEMENTS IN BIVALVE SPECIES *Cerastoderma edule* and *Glycymeris glycymeris*

Andrea Cedilak, 877/MB

Abstract: TRIM mobile elements belong to the group of non-autonomous retrotransposons whose presence has been observed in very few animal genomes. Bivalves are a group of organisms still poorly explored at the genome level that have recently become the research object of interest due to their economic and ecological importance. Within this work, detection and characterization of TRIM mobile elements in the bivalve species *Cerastoderma edule* and *Glycymeris glycymeris* was carried out, followed by the comparison with elements from other bivalve species containing these retroelements. The existence of elements has been proved with the colony lift, actually with bioinformatics analysis of sequenced samples. There is a percentage of similarity above 90% within the species, or 75% between these two species. In the second part of this paper, for the first time, a determined fraction of the TRIM elements in the genome for all 11 species used in this paper was obtained with dot blot analysis and it was obtained that in all species is <1% of the genome.

Keywords: TRIM mobile elements, bivalves, retrotransposons

Thesis contain: 54 pages, 23 figures, 6 tables

Original in: *Croatian*

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Principal investigator: Eva Šatović, Research associate

Mentor: Ivan-Krešimir Svetec, Full professor

Reviewers:

1. PhD. Renata Teparić, Associate professor
2. PhD. Ivan-Krešimir Svetec, Full professor
3. PhD. Eva Šatović, Research associate
4. PhD. Anamarija Štafa, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 25 January 2019

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Organizacija ponovljenih sekvenci DNA u genomima eukariotskih organizama.....	2
2.2. Raspršeno ponovljene sekvence	3
2.3. TRIM mobilni elementi	4
2.4. Osnovna obilježja školjkaša i njihovih genoma	5
2.5. Osnovna obilježja školjkaša <i>Cerastoderma edule</i> i <i>Glycymeris glycymeris</i> i njihova klasifikacija	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Materijali	10
3.1.1. Životinjski materijal	10
3.1.2. Osnovne kemikalije.....	10
3.1.3. Pufferi i otopine	11
3.1.4. Kompleti reagencija	11
3.1.5. Standard za elektroforezu	12
3.1.6. Plazmidi.....	12
3.1.7. Bakterijski soj.....	13
3.1.8. Početnice	13
3.2. Metode	13
3.2.1. Izolacija genomske DNA	13
3.2.2. Izrada parcijalnih genomskih biblioteka	14
3.2.3. Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica <i>E. coli</i>	14
3.2.4. Umnažanje odsječaka DNA metodom lančane reakcije polimerazom (eng. PCR).....	15
3.2.5. Elektroforeza DNA	15
3.2.6. Izolacija fragmenta DNA iz agaroznog gela	16

3.2.7.	Kloniranje fragmenata DNA dobivenih PCR reakcijom.....	16
3.2.8.	Sinteza obilježene DNA (DNA-sonda)	16
3.2.9.	Analiza otisaka kolonija (eng. <i>colony lift</i>)	17
3.2.10.	Izolacija plazmidne DNA	19
3.2.11.	Razgradnja plazmidne DNA restrikcijskim endonukleazama.....	20
3.2.12.	PCR na bakterijskim kolonijama (eng. <i>colony PCR</i>)	20
3.2.13.	Određivanje redosljeda nukleotida	21
3.2.14.	Bioinformatičke analize nukleotidnih sljedova	21
3.2.15.	Kapljična analiza DNA (eng. <i>dot blot</i>).....	21
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	24
4.1.	Detekcija TRIM mobilnih elemenata u genomima školjkaša <i>Cerastoderma edule</i> i <i>Glycymeris glycymeris</i>	24
4.2.	TRIM elementi u genomu školjkaša <i>Cerastoderma edule</i>	32
4.3.	TRIM elementi u genomu školjkaša <i>Glycymeris glycymeris</i>	35
4.4.	Udio TRIM elemenata u genomu školjkaša <i>Cerastoderma edule</i> i <i>Glycymeris glycymeris</i>	39
4.5.	Usporedba TRIM elemenata u genomima školjkaša <i>Cerastoderma edule</i> i <i>Glycymeris glycymeris</i>	40
4.6.	Udio TRIM elemenata u genomima različitih vrsta školjkaša i komparacija s vrstama <i>Cerastoderma edule</i> i <i>Glycymeris glycymeris</i>	44
4.7.	Evolucijska starost TRIM elementa	46
5.	ZAKLJUČCI	47
6.	LITERATURA	48
7.	PRILOZI	54

1. UVOD

Genomi eukariotskih organizama sadrže najvećim djelom nekodirajuće DNA sekvence čija funkcija nije poznata u potpunosti (Ohno, 1972). Tu spadaju i mobilni elementi retrotranspozoni koji imaju vrlo važnu ulogu u aktivnom restrukturiranju genoma, ali još uvijek nisu dovoljno istraženi u smislu funkcionalnog značaja i utjecaja na evoluciju. Upravo zato su glavni interes ovog istraživanja bili TRIM elementi (eng. *Terminal-Repeat Retrotransposons in Miniature*), najmanji do sad poznati retrotranspozoni, otkriveni i opisani kod velikog broja biljnih vrsta (Witte i sur., 2001; Yang i sur., 2007; Gao i sur., 2014; Yin i sur., 2014), a do sad prijavljeni samo kod neznatnog broja životinjskih vrsta (Zhou i Cahan, 2012; Koziol i sur., 2015).

Školjkaši su skupina organizama još uvijek slabo okarakterizirana na genomskoj razini, no u najnovije vrijeme postali su predmetom istraživanja jer je prepoznata njihova gospodarska i ekološka važnost. Kod školjkaša je do sada detaljno opisan samo jedan retrotranspozon i nekolicina DNA transpozona (Gaffney i sur., 2003; Kourtidis i sur., 2006; Šatović i Plohl 2013, 2017; Luchetti i sur., 2016), a zamijećena je i prisutnost TRIM elemenata kod nekoliko vrsta (Šatović, neobjavljeni rezultati).

Prvenstveni cilj ovog istraživanja je utvrditi postojanje TRIM mobilnih elemenata u vrstama školjkaša *C. edule* i *G. glycymeris*, nakon toga ih detaljnije opisati i usporediti sličnost unutar svake od vrsta, odnosno između te dvije vrste. Usporedbom dobivenih postotaka sličnosti unutar vrste, odnosno iz očuvanosti samih sekvenci, moguće je odrediti da li se radi o još uvijek aktivnim elementima. U drugom djelu ovog rada cilj je odrediti udio TRIM elementa u genomima školjkaša *C. edule* i *G. glycymeris* kao i u drugim vrstama školjkaša u kojima je prethodno dokazano prisustvo tog elementa te rezultate međusobno usporediti. Uzevši u obzir vrsnu distribuciju, moguće je procijeniti i minimalnu evolucijsku starost TRIM elementa.

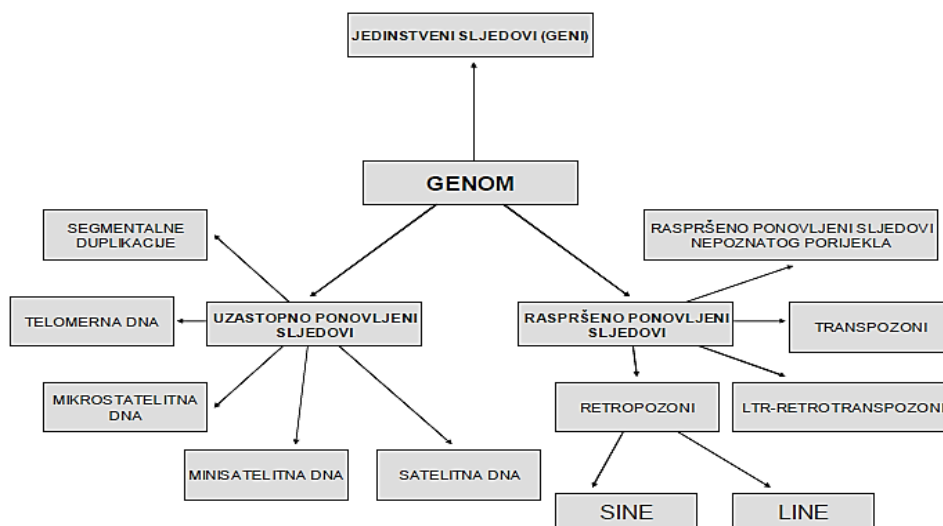
Imavši to u vidu, nadamo se da će ova, i nastavna istraživanja, pomoći u rasvjetljavanju važnih bioloških pitanja vezanih uz ulogu nekodirajućih ponovljenih sekvenci DNA u strukturiranju i evoluciji eukariotskog genoma.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Organizacija ponovljenih sekvenci DNA u genomima eukariotskih organizama

Genomi eukariotskih organizama sastoje se od kodirajućih i nekodirajućih sekvenci DNA (Slika 1), čiji omjeri u genomu variraju među različitim vrstama. Procijenjeno je da čak 99% ljudske DNA ne nosi protein-kodirajuću informaciju, a istraživanja pokazuju da se u toj DNA nalaze i vrlo važne regije koje reguliraju ekspresiju gena. Za nekodirajuću DNA se duže vrijeme mislilo da nema nikakvu funkciju i nazivali su je otpadnom ili “junk” DNA (Ohno, 1972).

Veći dio nekodirajućih sekvenci DNA čine različiti tipovi ponovljenih sekvenci, koje mogu biti uzastopno ili raspršeno ponovljene (dispergirane). Uzastopno ponovljene sekvence se razlikuju u duljini jedinice ponavljanja, duljini nizova koje tvore, mehanizmu nastanka, organizaciji i položaju na kromosomima te se prema tome dijele na mikrosatelitnu, minisatelitnu, satelitnu i telomernu DNA. Mikrosatelitna DNA se sastoji od uzastopno ponovljenih jedinica duljine 2-5 pb (parova baza) koje tvore nizove duljine do 500 pb dok kod minisatelitnih DNA takve jedinice imaju duljinu 10-100 pb i tvore nizove duljine 0,5 - 30 kb. Broj uzastopno ponovljenih jedinica kod satelitnih DNA može varirati od nekoliko do više tisuća parova baza te tvoriti nizove duljine nekoliko Mb. Satelitne DNA su najčešće smještene u području konstitutivnog heterokromatina, u centromernim, pericentromernim i subtromernim regijama kromosoma (Heitz, 1928; Plohl i sur., 2008), dok se telomerna ponavljanja nalaze na kromosomskim krajevima (Moran i Morish, 2005).



Slika 1. Vrste nukleotidnih sljedova u genomima eukariotskih organizama (Korlević, 2009).

2.2. Raspršeno ponovljene sekvence

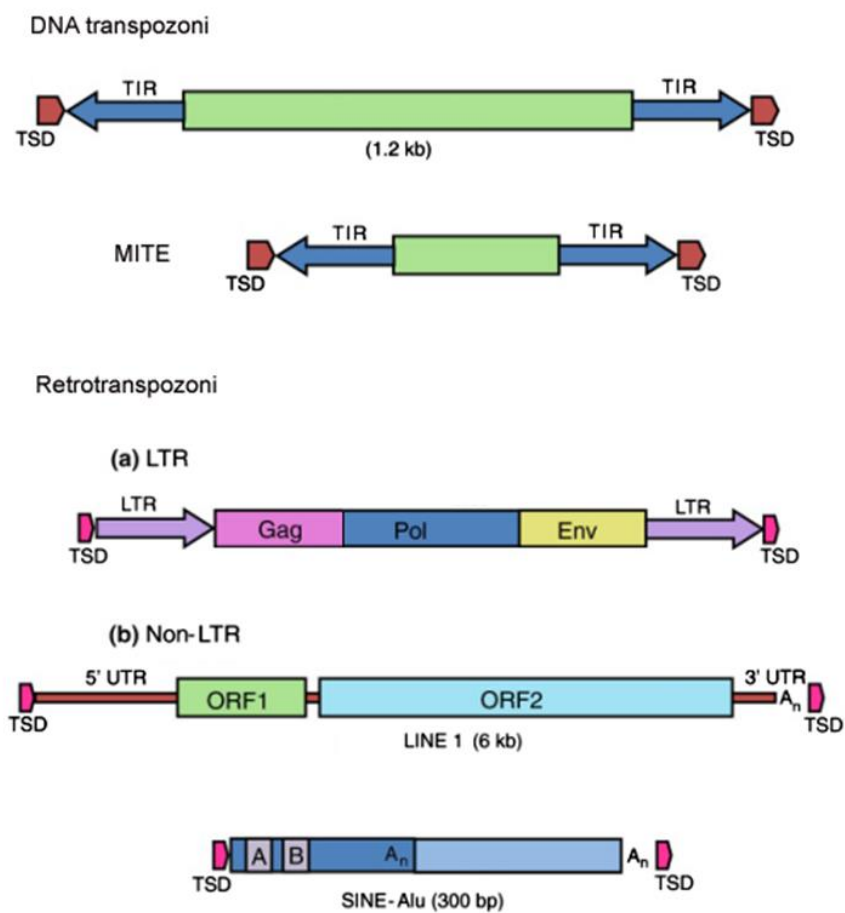
Raspršeno ponovljene sekvence nastaju kao posljedica premještanja mobilnih elemenata po genomu (pregledni prikaz u Moran i Morish 2005; Plohl i sur., 2012). U eukariotskim genomima postoji veliki broj različitih transponirajućih elemenata (Slika 2), koji su grupirani u dvije glavne skupine temeljene na mehanizmima transpozicije. Elementi klase I (retrotranspozoni) prenose se mehanizmom "*copy-and-paste*" posredovanim s RNA dok se elementi klase II (DNA transpozoni) propagiraju "*cut-and-paste*" mehanizmom (Finnegan, 1989; Kazazian, 2004; Jurka i sur., 2007). "*Copy-and-paste*" mehanizam se temelji na transkripciji s RNA Pol II („*copy*“), a zatim slijedi reverzna transkripcija i insercija u ciljno mjesto DNA („*paste*“), procesi posredovani reverznom transkriptazom i endonukleazom. Kod "*cut-and-paste*" mehanizma dolazi do izrezivanja segmenta DNA i ugradnje na drugo mjesto unutar genoma domaćina bez posredovanja RNA intermedijera (Wicker i sur., 2007; Wessler, 2006).

Svaka klasa posjeduje i autonomne i neautonomne elemente, pri čemu su autonomni sposobni samostalno generirati sve produkte potrebne za njihovu daljnju propagaciju dok neautonomni ovise o enzimima proizvedenim od strane autonomnih elemenata.

Na temelju strukture, retrotranspozoni su dalje podijeljeni u dvije glavne podklase: LTR retrotranspozone i non-LTR retrotranspozone (Wicker i sur., 2007). „LTR“ skraćena dolazi od eng. *Long Terminal Repeats* i označava sekvence koje se nalaze na krajevima retrotranspozona, ponovljene u direktnoj orijentaciji, a koje mogu biti duljine od 100 pb do 5 kb (Kumar i Bennetzen, 1999; Neumann i sur., 2003). Kod autonomnih LTR retrotranspozona unutrašnja regija sadrži najmanje dva gena (*gag* i *pol*) koji kodiraju proteine neophodne za retrotranspoziciju. U neautonomne LTR retrotranspozone pripadaju LARD (eng. *Large Retrotransposon Derivatives*) i TRIM elementi (eng. *Terminal-Repeat Retrotransposons in Miniature*), a međusobno se razlikuju u veličini (Kalendar i sur., 2004).

U skupinu non-LTR retrotranspozona ubrajamo LINE (eng. *Long Interspersed Nuclear Element*) i SINE (eng. *Short Interspersed Nuclear Element*) sekvence. LINE sekvence sadrže nekoliko gena među kojima je i gen za reverznu transkriptazu, što im omogućuje retrotranspoziciju. Zbog veličine elementa (oko 6 kb) često dolazi do otpuštanja reverzne transkriptaze prije dolaska do 5' kraja te nastanka skraćenih i inaktivnih LINE elemenata (Schueler i sur., 2001; Moran i Morish, 2005).

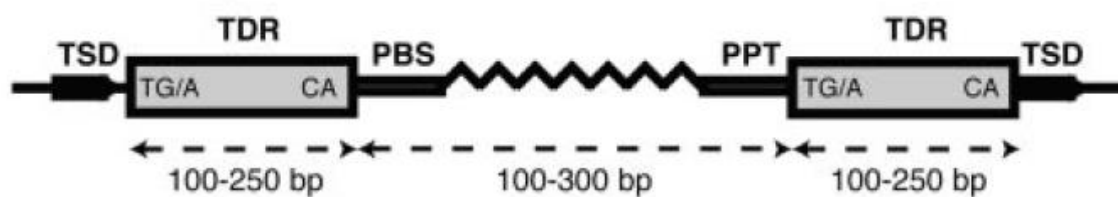
Za razliku od LINE sekvenci, SINE su relativno kratke (<700 pb) i ovise o enzimima proizvedenim od strane autonomnih LINE sekvenci (Maraia i Sarrowa, 1995).



Slika 2. Podjela raspršeno ponovljenih sekvenci (Šatović, 2013).

2.3. TRIM mobilni elementi

Ranije spomenuta skupina neautonomnih LTR retrotranspozona su TRIM mobilni elementi, specifični po svojoj maloj veličini (manje od 1000 pb) i nemogućnosti kodiranja proteina koji omogućavaju njihovo premještanje (mobilnost). TRIM mobilni elementi sadrže terminalna direktna ponavljanja (eng. *Terminal Direct Repeats*, TDR) duljine od 100 do 250 pb i unutarnju domenu duljine od 100 do 300 pb. Unutarnja domena započinje PBS mjestom (eng. *Primer Binding Site*) koje se nalazi nizvodno od 5' TDR-a i komplementarno je s tRNA, a završava polipurinskim traktom (eng. *polypurine tract*, PPT) koji se nalazi uzvodno od 3' TDR-a (Witte i sur., 2001; Zhou i Cahan, 2012). Na krajevima elementa se mogu naći TSD regije (eng. *Target Site Duplication*), segmentalne duplikacije mjesta insercije duljine oko 5 pb, nastale kao posljedica mobilnosti elementa (Slika 3).



Slika 3. Osnovna strukturalna građa TRIM mobilnih elemenata (Witte i sur., 2001).

Ovi elementi su izvorno pronađeni kod kukuruza i biljaka roda *Solanum* (Witte i sur., 2001) a kasnije se pokazalo da su široko rasprostranjeni u biljnome svijetu (Yang i sur., 2007; Gao i sur., 2014; Yin i sur., 2014). Njihova prisutnost u životinjskom svijetu je za sad utvrđena samo kod mrava *Pogonomyrmex barbatus* (Zhou i Cahan, 2012) i kod endoparazita skupine *Taeniid cestodes* (Kozioł i sur., 2015). TRIM elementi su uključeni u aktivno restrukturiranje genoma svojom prisutnošću u promotorskim i intronskim sekvencama, kao i u kodirajućim sljedovima. Kod mrava *Pogonomyrmex barbatus* dokazano je da se čak 38% TRIM elemenata nalazi blizu ili unutar samih gena. U biljnim vrstama su nađeni u velikom broju kopija i na različitim mjestima u genomu, pri čemu je TDR domena elemenata ostala značajno očuvana. Na primjer, primijećeno je 80-90% homologije među TDR sljedovima elemenata iz srodnijih vrsta, dok je kod udaljenijih vrsta taj postotak između 60 i 75% (Witte i sur., 2001).

Ovi elementi mogu biti uključeni i u transdukciju gena domaćina produljenjem prepisivanja ili poslužiti kao ciljna mjesta za daljnje ugradnje retrotranspozona (Witte i sur., 2001). Također, mogu se koristiti kao molekularni biljezi za razlikovanje biljnih vrsta (Antonius-Klemola i sur., 2006; Kwon i sur., 2007; Kalendar i sur., 2010; dos Santos i sur., 2012) i gljiva (Santana i sur., 2013).

2.4. Osnovna obilježja školjkaša i njihovih genoma

Koljeno Mollusca (mekušci) je vrlo raznolika i dobro istraжена skupina beskralježnjaka s oko 35 000 fosilnih i oko 100 000 recentnih vrsta. Većinom nastanjuju morske ekosustave, ali mogu se naći i u slatkim vodama te na kopnu. Mekušci se danas dijele na sedam razreda među kojima su i školjkaši (Bivalvia). Razredu školjkaša pripada oko 9200 vrsta koje su isključivo vezane za vodeni okoliš i sjedilački ili polusjedilački način života, pri čemu 8000 vrsta pripada morskim školjkašima (Habdija i sur., 2011).

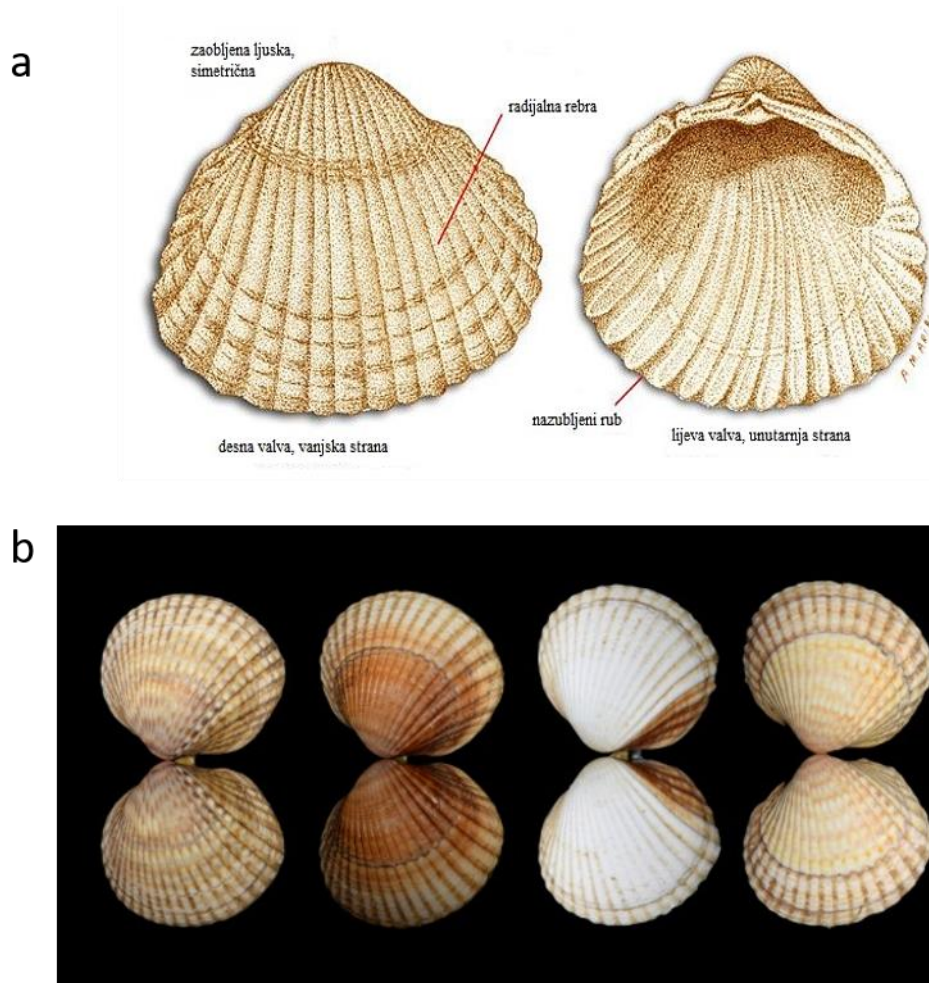
Prilagođeni su životu na različitim staništima pri čemu neke vrste žive na velikim dubinama uz malo izvora svjetlosti i kisika, a manji broj školjkaša su nametnici ili komenzali na spužvama, mnogočetinašima, rakovima i bodljikašima (Habdija i sur., 2011).

Školjkaši se još od davnina koriste u ljudskoj prehrani, no potrebno je znati da oni predstavljaju i potencijalnu opasnost za zdravlje ljudi. Konzumacija sirovih ili termički nedovoljno obrađenih školjkaša može ozbiljno ugroziti ljudsko zdravlje pa čak i dovesti do smrti. Opasnost se javlja zbog njihove vrlo brze filtracije vode koja može biti onečišćena raznim mikroorganizmima te zbog nakupljanja različitih ksenobiotskih supstanci (Čadež i Teskeredžić, 2005).

Zahvaljujući velikoj važnosti školjkaša u ekologiji i akvakulturi, broj istraživanja na razini genoma ovih organizama je u porastu. Prva sekvenciranja genoma školjkaša su provedeni na pacifičkoj kamenici *Crassostrea gigas* (Zhang i sur., 2012), bisernoj kamenici *Pinctada fucata* (Takeuchi i sur., 2012) i mediteranskoj dagnji *Mytillus galloprovincialis* (Murgarella i sur., 2016), a taj broj se popeo na 12 vrsta, prema podacima iz NCBI GenBank baze za 2018. godinu. U genomima školjkaša je do sad opisana nekolicina neautomnih DNA transpozona (elementi klase II) (Gaffney i sur., 2003; Kourtidis i sur., 2006; Šatović i Plohl 2013, 2017), dok je od elemenata klase I opisan samo jedan SINE retrotranspozon (Luchetti i sur., 2016). U sklopu ovog rada provedena su istraživanja u svrhu detekcije i karakterizacije TRIM mobilnih elemenata koji pripadaju skupini neautomnih LTR-retrotranspozona u vrstama školjkaša *Cerastoderma edule* i *Glycymeris glycymeris*.

2.5. Osnovna obilježja školjkaša *Cerastoderma edule* i *Glycymeris glycymeris* i njihova klasifikacija

Cerastoderma edule (Linnaeus, 1758) pripada porodici Cardiidae razreda Bivalvia (školjkaši) iz koljena Mollusca (mekušci). Ova vrsta nastanjuje obalna područja sjevernog i istočnog Atlantskog oceana, široko je rasprostranjena od Islanda i Norveške u Europi, do Senegala uz obalu zapadne Afrike. Jedna je od najpoželjnijih vrsta mekušaca smještena u uvalama i estuarijama Europe jer služi kao izvor hrane za rakove, ribu i ptice močvarice. Ovaj školjkaš je ovalnog oblika, prekriven rebrima koja su spljoštena u središnjem dijelu ljuske (Slika 4a) te obično doseže duljnu od 3,5 do 5 cm. Školjke su blijedo ili bjelkaste žute, grubo bijele ili smeđe boje (Slika 4b) (Davidson, 2016; Considine i Considine, 2013).



Slika 4. Prikaz ljuštura školjkaša *C. edule* (a) i morfoloških varijacija unutar iste vrste (b) (Anonimus 1, 2018).

Glycymeris glycymeris (Linnaeus, 1758) je vrsta morskog školjkaša koja pripada porodici Glycymerididae razreda Bivalvia, a nastanjuje europske vode u šljunčanim plažama na dubinama i do 100 m. Morfološke karakteristike ove vrste predstavlja gotovo kružni obris školjke i debela ljuštura koja doseže i do 6,5 cm duljine. Površina ljuštura varira u boji, koja može biti smeđa, žuta ili svijetlo crvena. Može biti u potpunosti u jednoj boji, ili može pokazati nepravilne, koncentrične uzorke ("cik-cak" uzorak) (Slika 5). Unutrašnjost ljuštura je smeđe boje unutar palijalne linije (dodirna točka dva mišića primicača). Unutarnja površina ljuštura ima šest do 12 zuba na obje strane kljuna (Sweetser, 2009).



Slika 5. Prikaz varijacija u morfologiji ljuštore školjkaša *G. glycymeris* (Anonimus 2, 2018).

Osim ova dva školjkaša od primarnog interesa, za komparativne analize je korišteno još 9 vrsta školjkaša (*Donax trunculus*, *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, *Venerupis corrugata*, *Polititapes rhomboides*, *Venus verrucosa*, *Dosinia exoleta*, *Magallana gigas*, *Mytilus galloprovincialis*) kod kojih je prethodno utvrđeno postojanje TRIM elementa (Šatović i sur., neobjavljeni rezultati). Klasifikacija svih školjkaša korištenih u sklopu ovoga rada nalazi se u Tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija 11 vrsta školjkaša korištenih u sklopu ovih istraživanja.

Carstvo	Koljeno	Razred	Podrazred	Nadred	Red	Nadporodica	Porodica	Rod	Vrsta	Prethodni naziv					
Animalia	Mollusca	Bivalvia	Heterodonta	Imparidentia	Cardiida	Tellinoidea	Donacidae	Donax	<i>Donax trunculus</i>						
						Cardioidea	Cardiidae	Cerastoderma	<i>Cerastoderma edule</i>						
						Veneroidea	Veneroidea	Veneridae	Ruditapes	<i>Ruditapes decussatus</i>					
												Venerupis	<i>Venerupis corrugata</i>	<i>Venerupis pullastra</i>	
												Polititapes	<i>Polititapes rhomboides</i>	<i>Venerupis rhomboides</i>	
												Venus	<i>Venus verrucosa</i>		
												Dosinia	<i>Dosinia exoleta</i>		
								Pteriomorphia		Ostreida	Ostreoidea	Ostreidae	Magallana	<i>Magallana gigas</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
										Arcida	Arcoidea	Glycimerydidae	Glycymeris	<i>Glycymeris glycymeris</i>	
					Mytilida	Mytiloidea	Mytilidae	Mytilus	<i>Mytilus galloprovincialis</i>						

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Životinjski materijal

Svih 11 vrsta školjkaša prikupljeno je na sjeverozapadu Španjolske, na području Galicije. Uzorke je prikupila i morfološki determinirala grupa prof. dr. sc. Juana Joséa Pasantesa „Population Genetics and Cytogenetics Group, Department of Biochemistry, Genetics and Immunology“ sa Sveučilišta u Vigu, Španjolska.



Slika 6. Zemljopisna karta Španjolske s označenim lokalitetom (Galicija) na kojima su prikupljene jedinke 11 vrsta školjkaša analiziranih u ovome radu.

3.1.2. Osnovne kemikalije

- etidijev bromid (Serva)
- etanol (Kemika)
- agaroza (Sigma)
- ampicilin (Sigma)

- orange G (Sigma)
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma)
- Tris (Sigma)
- 5-brom-4-klor-3-indolil- β -D-galaktozid (X-gal) (Gibco BRL)
- izopropil- β -D-tiogalaktozid (IPTG) (Gibco BRL)
- reagens za blokiranje (Roche)
- Tween 20 (Sigma)
- pozitivno nabijene najlonske membrane (Roche)
- kružne najlonske membrane promjera 8.2 cm (Hybond-N⁺, Amersham)
- RNaza A (Roche)

3.1.3. Pufferi i otopine

- tekuća LB hranjiva podloga: bakto tripton (10 g/L), ekstrakt kvasca (5 g/L), NaCl (10 g/L)
- kruta LB hranjiva podloga s antibiotikom; Luria agar (40 g/L), ampicilin (0.04 g/L)
- tekuća SOC hranjiva podloga: 2% bakto tripton, 0.5% ekstrakt kvasca, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoza
- denaturacijski puffer: 0.5M NaOH, 1.5M NaCl
- neutralizacijski puffer (pH 7,4): 0.5 M Tris-HCl, 1.5M NaCl
- hibridizacijski puffer: 0.25M fosfatni puffer, 1mM EDTA, 20% SDS, 0.5% blocking reagent
- puffer za ispiranje: 20mM Na₂HPO₄, 1mM EDTA, 1% SDS
- puffer 1(pH 8,0): 0.1M maleinska kiselina, 3M NaCl, 0.3% Tween 20
- puffer 2: puffer 1+1% blocking reagent
- puffer 3 (pH 9,5): 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl
- elektroforetski puffer -TAE (pH 8,3): 10 mM Tris-HCl, 20 mM Na-acetat, 2 mM EDTA (pufferu se dodaje etidijev bromid do konačne koncentracije od 0,5 μ g/ml)

3.1.4. Kompleti reagensija

- komplet „DNeasy Blood and Tissue Kit“ za izdvajanje DNA iz tkiva (QIAGEN)
- komplet „QIAquick Gel Extraction Kit“ za pročišćavanje odsječaka DNA iz agaroznog gela (QIAGEN)
- komplet „GoTaq Flexi DNA Polymerase“ za lančanu reakciju polimerazom (eng. „Polymerase Chain Reaction“, PCR), koji sadržava: DNA polimerazu GoTaq (5U/ μ l), 5x koncentrirani puffer GoTaq Flexi i 25mM MgCl₂ (Promega)

- komplet „GoTaq Green Master Mix“ za PCR reakciju, koji u 2x koncentriranom reakcijskom puferu Green GoTaq sadrži DNA polimerazu GoTaq (5 U/μl), 400μM smjesu dNTP i 3.5 mM MgCl₂ (Promega)
- komplet „QIAquick PCR Purification Kit“ za pročišćavanje produkata reakcije PCR-a (QIAGEN)
- komplet „pGEM-T Easy Vector System I“ za kloniranje produkata reakcije PCR-a koji sadrži: plazmidni vektor pGEM-T (50 ng/μl), enzim T4 DNA ligazu (3 Weiss U/μl) i 2x koncentrirani pufer za T4 DNA ligazu (Promega)
- komplet „High Pure Plasmid Isolation Kit“ za izolaciju plazmidne DNA (Roche)

3.1.5. Standard za elektroforezu

Kao elektroforetski biljeg veličine DNA odsječaka korišten je 2-Log DNA Ladder Mix (New England Biolabs), koji sadrži smjesu odsječaka DNA duljine: 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1000 pb, 1200 pb, 1500 pb, 2000 pb, 3000 pb, 4000 pb, 5000 pb, 6000 pb, 8000 pb i 10000 pb.

3.1.6. Plazmidi

Plazmid pUC19 je komercijalno dostupan kao prethodno pocijepan restriksijskim enzimom BamHI pri čemu je uklonjen fosfat kako bi se spriječila religacija samog vektora. Vektor sadrži gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin (amp^r) i omogućuje plavo-bijelu selekciju bakterijskih kolonija. pUC19/BamHI vektor (Fermentas) je korišten za ligaciju s restriksijskom smjesom DNA uzoraka školjkaša koji su pocijepani s restriksijskim enzimima BamHI i BglII koji ostavljaju identične krajeve.

Produkti PCR reakcije klonirani su u pGEM-T Easy plazmidni vektor iz kompleta "pGEM-T Easy Vector System I". Taq polimeraza ostavlja na 3' krajevima umnoženih odsječaka dAMP koji se komplementarno sparuje s dTTP na 5' krajevima vektora što omogućuje direktnu ligaciju produkata PCR-a. Ovakva se vrsta kloniranja u plazmidne konstrukte s 3' slobodnim dTTP-om naziva AT-kloniranje.

pGEM-T Easy vektor sadrži gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin (amp^r) što omogućuje selekciju bakterija koje su transformirane pGEM-T Easy plazmidom. Također, sadrži i lacZ gen koji kodira enzim β-galaktozidazu što omogućuje plavo-bijelu selekciju bakterijskih kolonija koje sadrže plazmid s ugrađenim DNA odsječkom od interesa.

3.1.7. Bakterijski soj

Za umnažanje plazmida korištene su kompetentne bakterijske stanice *E. coli* „XL10-Gold Ultracompetent Cells“ (Tet^rΔ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]) (Stratagene).

3.1.8. Početnice

Za umnažanje PCRom fragmenata koji sadrže TRIM elemente korištene su početnice DTC TDR F i DTC TDR R. Navedene oligonukleotidne početnice sintetizirane su u korisničkom servisu Invitrogen (SAD), a specifične su za početak i kraj TDR domena TRIM elementa. Nukleotidni sljedovi početnica su:

DTC TDR F: 5' – TTTACAGCCGCCACACAAGG - 3'

DTC TDR R: 5' – CCTAGCACCGGCTTAAGCGG – 3'

Za provjeru veličine fragmenata kloniranih u pGEM-T Easy plazmidni vektor korištene su početnice M13F i M13R. Navedene oligonukleotidne početnice također su sintetizirane u Invitrogen servisu, a specifične su za mjesta na plazmidu udaljena 101 (M13F), odnosno 133 pb (M13R) od mjesta insercije. Nukleotidni sljedovi početnica su:

M13F 5' – GTAAAACGACGGCCAGT – 3'

M13R 5' - CAGGAAACAGCTATGAC -3'

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija genomske DNA

Genomske DNA su izolirane komercijalnim kompletom „DNeasy Blood and Tissue Kit“, prema uputama proizvođača, iz tkiva aduktor mišića, nakon početne homogenizacije tkiva u tarioniku s tekućim dušikom. Uzorak je tretiran s 10 µl RNase A (10mg/ml) kroz 10 minuta, što je u protokolu proizvođača navedeno kao izborni korak. DNA je isprana s membrane s 100 µl elucijskog pufera. Koncentracije genomskih DNA određene su spektrofotometrijskim mjerenjem na Qubit uređaju prema protokolu proizvođača. Dodatno je provjerena kvaliteta izolirane DNA elektroforezom u 1% agaroznom gelu u usporedbi sa standardom 2-Log DNA Ladder Mixom.

3.2.2. Izrada parcijalnih genomskih biblioteka

Za restrikciju genomskih DNA školjkaša korišteni su restrikcijski enzimi BamHI i BglII koji prepoznaju različite heksanukleotidne motive, ali ostavljaju iste ljepljive krajeve. U svrhu izrade parcijalnih genomskih biblioteka provedena je restrikcija enzimima BamHI (Fermentas, 10U/μl) i BglII (Pharmacia Biotech, 15U/μl) u svrhu kloniranja u plazmidni vektor provedena je na sljedeći način:

57 μl (2.5 μg) genomske DNA vrste *Cerastoderma edule*

10 μl 10x restrikcijski pufer

0.5 μl BglII

0.75 μl BamHI

32 μl mQ voda

100 μl → 2.5 sata na 37°C

20 μl (2.5 μg) genomske DNA vrste *Glycymeris glycymeris*

10 μl 10x restrikcijski pufer

0.5 μl BglII

0.75 μl BamHI

69 μl mQ voda

100 μl → 2.5 sata na 37°C

Inaktivacija enzima provedena je na 65°C u trajanju od 20 minuta, a uspješnost restrikcije provjerena je putem gel elektroforeze. Dobiveni fragmenti su ligirani s pUC19 plazmidom koji je komercijalno dostupan kao prethodno porezan s BamHI enzimom i defosforiliran. Reakcije ligacije su provedene uz pomoć enzima „Quick Ligase“ (New England Biolabs) i pripadajućeg pufera na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta. Tako pripremljenim plazmidom se pristupilo transformaciji kompetentnih stanica.

3.2.3. Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica *E. coli*

„XL10-Gold Ultracompetent Cells“ transformirane su plazmidom metodom temperaturnog šoka. U 100 μl suspenzije kompetentnih stanica na ledu je dodano 2 μl β-merkaptetoetanol i 4 μl ligacijske smjese te je uslijedila inkubacija na ledu u trajanju od 30 minuta. Stanice su podvrgnute temperaturnom šoku trajanja 30 sekundi inkubacijom u vodenoj kupelji na temperaturi od 42°C te ponovnim vraćanjem na led 2 minute. Stanice su regenerirane 1 sat u SOC mediju na temperaturi od 37°C uz neprekidnu trešnju, nakon čega su nacijeppljene na selektivne krute podloge. Podlogama je prethodno dodan antibiotik ampicilin (finalne koncentracije 100 μg/ml) i kemikalije koje omogućuju plavo-bijelu selekciju: 40 μl

induktora IPTG (100 mM) i 40 μ l supstrata X-gal (20 mg/ml). Uzgoj je trajao preko noći na 37 °C, a transformanti na pločama su sadržavali različite fragmente genomske DNA školjkaša.

3.2.4. Umnažanje odsječaka DNA metodom lančane reakcije polimerazom (eng. PCR)

Fragmenti koji sadrže TRIM elemente iz izoliranih genomskih DNA vrsta *C. edule* i *G. glycymeris* umnoženi su metodom lančane reakcije polimerazom (PCR).

3.2.4.1. Sastav otopine za PCR

Umnažanje TRIM elemenata iz genomskih DNA školjkaša provedeno je u ukupnom reakcijskom volumenu od 35 μ l, a reakcijska smjesa je sadržavala:

5xGoTaq Flexi Buffer	7 μ l
dNTP mix (10mM)	0.7 μ l
Taq DNA polimeraze (5U/ μ l)	0.35 μ l
DTC TDR F početnica	1.4 μ l
DTC TDR R početnica	1.4 μ l
genomska DNA školjkaša (4 ng/ μ l)	1.5 μ l
mQ H ₂ O	17.75 μ l

Uvjeti umnažanja bili su sljedeći:

PCR korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	94°C	5 min	1
Denaturacija	94°C	30 s	35
Sparivanje	55°C	30 s	
Produljenje	72°C	30 s	
Završno produljenje	72°C	7 min	1

3.2.5. Elektroforeza DNA

PCR-om dobiveni fragmenti DNA razdvajani su elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu koji je prethodno pripremljen otapanjem agaroze u puferu 1x TAE uz dodatak etidijevog bromida (0.5 μ g/ml). Elektroforeza se odvijala u istom puferu pri 60 V.

Kao elektroforetski biljeg korišten je 2-Log DNA Ladder Mix u svrhu procjene duljine fragmenata, a za procjenu količine DNA korištena je λ -DNA poznate koncentracije. Gel je snimljen pomoću uređaja G:BOX koji omogućava računalnu pohranu fotografija gela.

3.2.6. Izolacija fragmenta DNA iz agaroznog gela

Na transiluminatoru koji omogućuje vizualizaciju DNA fragmenata zahvaljujući prisutnosti etidijevog bromida, izrezani su dijelovi gela koji su sadržavali fragmente DNA odgovarajuće veličine. Izolacija iz gela je provedena pomoću „QIAquick Gel Extraction Kit“, prema uputama proizvođača.

3.2.7. Kloniranje fragmenata DNA dobivenih PCR reakcijom

Za ligaciju je korišten plazmid pGEM-T Easy i PCR produkti dobiveni umnažanjem s genomskih DNA školjkaša početnicama specifičnim za TRIM element. U ovom je slučaju korišten enzim T4 DNA ligaza, a reakcija je provedena preko noći na 4°C. Transformacija je provedena na način kako je opisano u poglavlju 3.2.3. uz modifikaciju: korišteno je 25 μ l suspenzije bakterijskih kompetentnih stanica i 2.5 μ l ligacijske smjese.

3.2.8. Sinteza obilježene DNA (DNA-sonda)

Sonde za detekciju TRIM elemenata pripremljene su metodom obilježavanja sonde lančanom reakcijom polimerazom za 11 vrsta školjkaša. Prije obilježavanja prvo je pripremljena 10x koncentrirana otopina nukleotida, pri čemu je količina dTTP smanjena u odnosu na ostale nukleotide i zamijenjena digoksigeninom-obilježenim nukleotidom DIG -11-dUTP. Otopina za obilježavanje bila je ukupnog volumena 50 μ l i sljedećeg sastava:

2.5 μ l dATP (10 mM)
2.5 μ l dCTP (10 mM)
2.5 μ l dGTP (10 mM)
1.86 μ l dTTP (10 mM)
6.24 μ l DIG -11-dUTP (1 mM)
34.4 μ l mQ vode
50 μ l

Sinteza DNA sonde za svaku pojedinu vrstu školjkaša provedeno je u sljedećoj reakcijskoj smjesi:

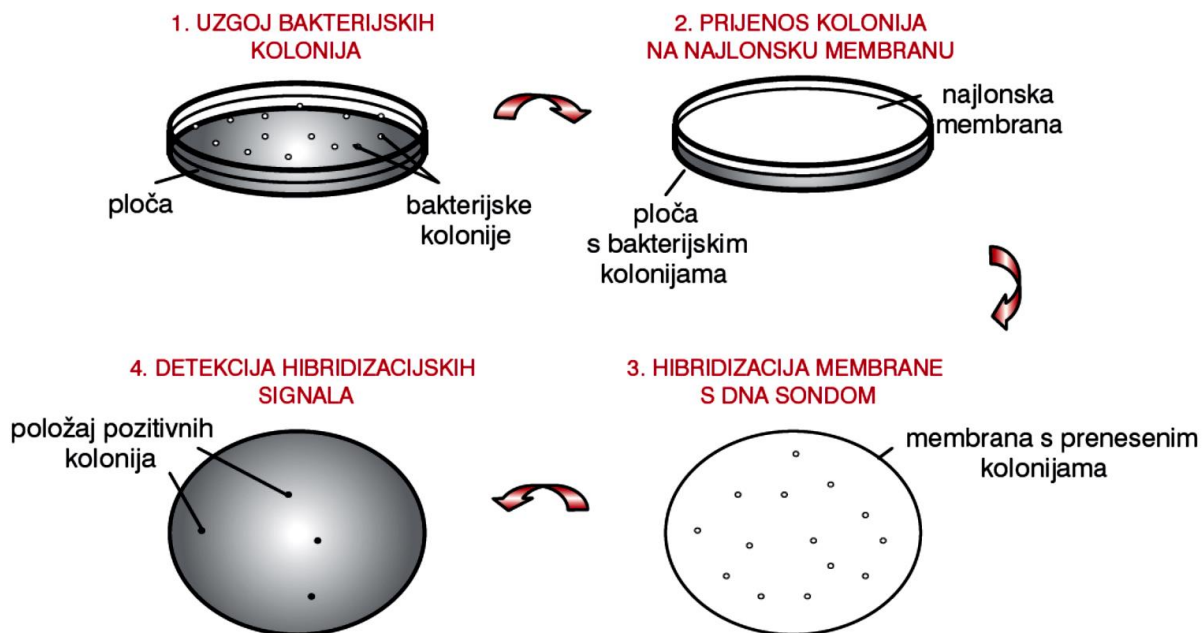
Komponenta	volumen
5x PCR pufer	4 μ l
dNTP mješavina (s DIG-11-dUTPom) 10x	2 μ l
25 mM MgCl ₂	1.2 μ l
TDR F početnica (10 pmol/ μ l)	2 μ l
TDR R početnica (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Go Taq Flexi polimeraza	0.1 μ l
plazmidna DNA s TRIM elementom školjkaša (5 ng/ μ l)	2 μ l
mQ	7.1 μ l
Ukupan volumen	20 μ l

Uvjeti umnažanja su bili sljedeći:

PCR koraci	Temperature	vrijeme	broj ciklusa
početna denaturacija	94°C	5 min	1
Denaturacija	94°C	30 s	35
Sparivanje	55°C	30 s	
Produljenje	72°C	30 s	
završno produljenje	72°C	7 min	1

3.2.9. Analiza otisaka kolonija (eng. *colony lift*)

Transformirane bakterijske stanice su nakon uzgoja na krutoj hranjivoj podlozi s dodanim ampicilinom prenešene na kružnu najlonsku membranu promjera 8.2 cm (Hybond-N⁺, Amersham). Membrana je prvo tretirana s denaturacijskim puferom, a potom s neutralizacijskim puferom. Nakon sušenja dodatno je inkubirana na 80°C u trajanju od jedan sat pri čemu su se molekule DNA fiksirale na membranu. Membrana je u nastavku hibridizirana sa specifičnom sondom i podvrgnuta procesu detekcije u svrhu utvrđivanja kolonija koje sadrže odsječak DNA od interesa (Slika 7).



Slika 7. Shematski prikaz analize otisaka kolonija (priručnik „Metode u molekularnoj biologiji“, 2007)

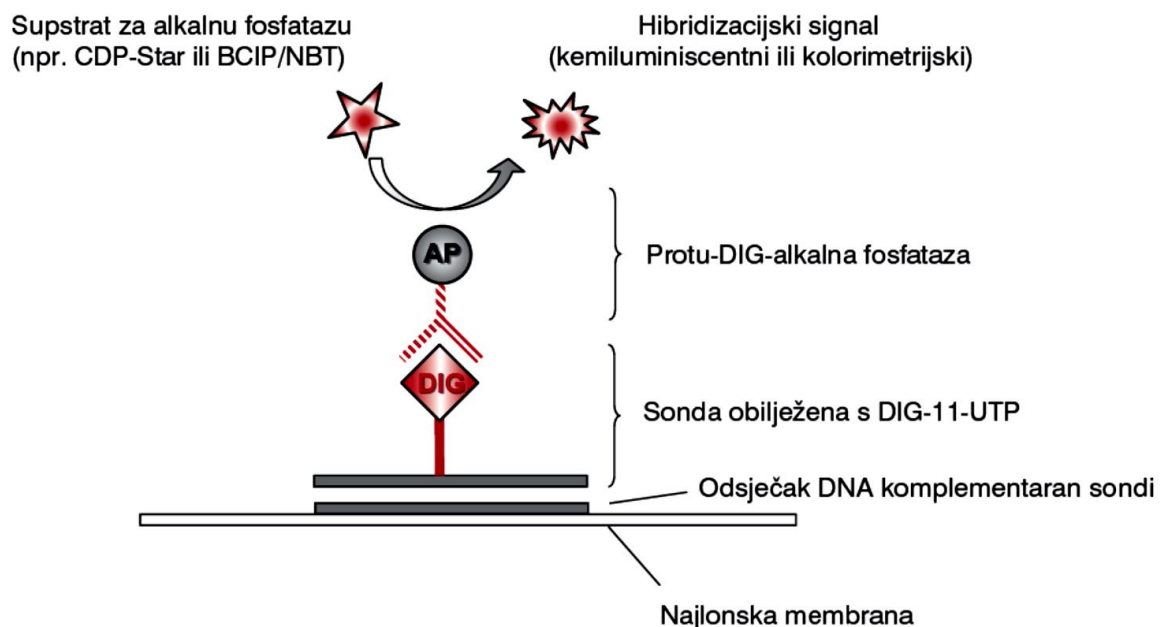
3.2.9.1. Southern hibridizacija

Membrane su prenešene u staklene tubuse, a sam proces predhibridizacije i hibridizacije odvijao se u hibridizacijskoj pećnici (Shimaden). Inkubacija u predhibridizacijskoj otopini (0,25 M Na_2HPO_4 pH 7,2, 1 mM EDTA, 20% SDS, 0,5% blokirajući reagens) se odvijala 1 sat, na istoj temperaturi na kojoj će se kasnije nastaviti hibridizacija. Predhibridizacijska otopina je zatim zamijenjena svježom, u koju je dodana obilježena sonda DNA konačne koncentracije 10 ng/ml, prethodno denaturirana zagrijavanjem 10 min na 100 °C. Hibridizacija se odvijala preko noći na temperaturi od 65 °C, koja dozvoljava sparivanje fragmenata čija je homologija >70%. Nakon hibridizacije membrane su ispirane 3×20 min u puferu za ispiranje (20 mM Na_2HPO_4 pH 7,2, 1 mM EDTA, 1% SDS) na temperaturi 3 °C nižoj od temperature hibridizacije.

3.2.9.2. Detekcija hibridizacijskog signala metodom kemiluminiscencije

Nakon završetka hibridizacije, membrane su podvrgnute postupku detekcije hibridizacijskih signala. Membrane su inkubirane 5 min u puferu 1 (0,1 M maleinska kiselina, 3 M NaCl, 0,3% Tween 20, pH 8,0) te 30 min u puferu 2 (1% blokirajući reagens u puferu I). Slijedile su inkubacije od 30 min u puferu 2 uz dodatak anti-digoksinogeninskih protutijela

(1:20.000), koja se vežu na DNA sondu, prethodno obilježenu DIG-11-UTPom. Nevezano protutitijelo je isprano inkubacijama 5×10 min u puferu I, zatim je membrana inkubirana 2×5 min u puferu 3 (0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl). S obzirom da je na protutitijelo vezan enzim alkalna fosfataza (Slika 8), na membranu je u mraku nanešen CDP-Star, kemiluminescentni supstrat alkalne fosfataze, razrijeđen 1:50 u puferu 3. Nakon toga membrana je zataljena u plastičnu vrećicu i na nju je položen autoradiografski film. Razgradnjom kemiluminescentnog supstrata dolazi do emitiranja svjetlosnog signala koji se detektirao na autoradiografskom filmu, a jačina dobivenih signala je varirala ovisno o duljini ekspozicije.



Slika 8. Shematski prikaz procesa detekcije hibridizacijskog signala (priručnik „Metode u molekularnoj biologiji“, 2007)

3.2.10. Izolacija plazmidne DNA

Bakterijske kolonije koje sadrže željeni fragment DNA uzgajane su preko noći u 5 ml tekuće podloge LB s ampicilinom. Nakon prekonoćnog uzgoja bakterijska suspenzija je centrifugirana 3 minute na 13000 rpm i supernatant je odbačen. Bakterijski talog je resuspendiran, a izolacija plazmidne DNA je provedena pomoću „High Pure Plasmid Isolation Kit“ sustava, prema uputama proizvođača.

3.2.11. Razgradnja plazmidne DNA restrikcijskim endonukleazama

Veličina ukloniranih genomskih fragmenata školjkaša u plazmidnim vektorima je provjerena restrikcijskom analizom. Nakon prekonoćne razgradnje plazmidne DNA provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu.

Restrikcija plazmida s enzimima EcoRI (Fermentas, 10U/ μ l) i XbaI (Fermentas, 10U/ μ l) u svrhu provjere veličine ukloniranog inserta provedena je na sljedeći način:

- 4 μ l (600 ng) plazmida
- 2 μ l 10x Tango Buffer
- 0.2 μ l EcoRI
- 0.4 μ l XbaI
- 3.4 μ l mQ voda
- 10 μ l \rightarrow preko noći na 37°C

3.2.12. PCR na bakterijskim kolonijama (eng. *colony PCR*)

S krute hranjive podloge koja je sadržavala plave i bijele kolonije nasumično je izabran dio bijelih kolonija koje su prenešene u mikroeprijetu i resuspendirane u 10 μ l mQ H₂O. Dobivena suspenzija korištena je kao izvor kalupa za *colony PCR* reakciju, a reakcijska smjesa je sadržavala:

bakterijska suspenzija	0.5 μ l
PCR Master Mix (sastav opisan u 2.1.4.)	2.5 μ l
M13N početnica (10 pmol/ μ l)	0.1 μ l
M13R početnica (10 pmol/ μ l)	0.1 μ l
mQ H ₂ O	2.3 μ l

Uvjeti umnažanja bili su sljedeći:

PCR koraci	temperatura	vrijeme	broj ciklusa
početna denaturacija	95°C	5 min	1
Denaturacija	95°C	30 s	25
Sparivanje	58°C	30 s	
Produljenje	72°C	30 s	
završno produljenje	72°C	7 min	1

Provjera veličine produkata nakon PCR-a provedena je elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Uzorci koji su sadržavali insert odgovarajuće veličine uzgojeni su u 5 ml tekuće selektivne podloge LB s dodatkom ampicilina (finalne koncentracije 100 µg/ml) preko noći, uz neprekidnu trešnju od 225 rpm. Nakon izolacije, plazmidi su poslani na određivanje nukleotidnog slijeda inserta.

3.2.13. Određivanje redosljeda nukleotida

Određivanje nukleotidnih sljedova provedeno je u servisu za sekvenciranje MacroGen (Amsterdam, Nizozemska). Fragmenti iz parcijalne genomske biblioteke školjkaša su sekvencirani u oba smjera koristeći komercijalno dostupne M13F-pUC19 i M13R-pUC19, početnice dok su PCR produkti sekvencirani u jednom smjeru koristeći M13R-pUC19 plazmidnu početnicu.

3.2.14. Bioinformatičke analize nukleotidnih sljedova

Bioinformatički program *Geneious 11.0.5 (Biomatters Ltd.)* korišten je za početnu obradu sekvenci, uklanjanje vektorskog dijela u sekvenciranim fragmentima, sravnjivanja TRIM elemenata, obilježavanje pojedinih segmenata sekvenci, utvrđivanje sličnosti među elementima, analizu restrikcijske mape, *dot-plot* analizu, određivanje konsenzus sekvence za pojedine skupine sekvenci te izradu filogenetskih stabala *neighbour-joining* metodom.

3.2.15. Kapljična analiza DNA (eng. *dot blot*)

Određivanje udjela određenog nukleotidnog slijeda DNA u ukupnoj genomskoj DNA školjkaša provedeno je kapljičnom analizom. Metoda se temelji na nanošenju na membranu serije razrjeđenja genomske DNA u prisutnosti serije razrjeđenja pozitivne i negativne

kontrole te hibridizacije s obilježenim nukleotidnim fragmentima od interesa. Pozitivna kontrola sadržavala je TRIM mobilne elemente školjkaša korištenih u ovom radu (Tablica 1). Kao negativne kontrole korištene su genomska DNA kukca kornjaša *Tenebrio molitor*, prazan plazmid pUC18 te klon CED AP1 koji sadrži nesrodnu sekvencu koja pokazuje sličnost s TRIM elementom samo na svojim krajevima. Količina genomske DNA nanosene na membranu se razlikuje za svaku vrstu ispitivanih školjkaša (Tablica 2) i određena je optimizacijom u svrhu postizanja intenziteta signala koji će biti u rasponu usporedivom s intenzitetima signala prisutnim u pozitivnoj kontroli. Serije razrjeđenja su pripremljene u puferu TE. Svi uzorci su denaturirani zagrijavanjem 5 min na 100 °C i naglo ohlađeni u ledu te pomiješani s 200 µl 20 × SSC pufera. Sva razrjeđenja su nanosena na najlonsku membranu pomoću vakuumske uređaja. Membrana je zatim osušena a DNA je vezana na membranu izlaganjem membrane na 120 °C u trajanju od 30 min. DNA na membrani je denaturirana u prisutnosti 0,4 M NaOH u trajanju od 10 min, a zatim neutralizirana ispiranjem u 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.2) te je membrana osušena na zraku. Proces hibridizacije se odvijao kako je opisano u 3.2.9.1., a proces detekcije kako je opisano u 3.2.9.2..

Autoradigrafski filmovi su potom skenirani, a određivanje količine DNA provedeno je denzitometrijom i usporedbom jačine signala genomskih i kontrolnih razrjeđenja ImageJ programom.

Tablica 2. Serije razrjeđenja genomskih DNA školjkaša te pozitivne i negativnih kontrola korištenih za kapljičnu analizu DNA.

	masa DNA (ng)						
<i>Cerastoderma edule</i> genomska DNA	13 000	6 500	3 250	1 625	812.5	406.2	203.1
<i>Glycymeris glycymeris</i> genomska DNA	10 000	5 000	2 500	1 250	625	312.5	156.2
<i>Polititapes rhomboides</i> genomska DNA	1750	875	437.5	218.75	109.38	54.69	27.34
<i>Mytilus galloprovincialis</i> genomska DNA	1750	875	437.5	218.75	109.38	54.69	27.34
<i>Venerupis corrugata</i> genomska DNA	1750	875	437.5	218.75	109.38	54.69	27.34
<i>Ruditapes decussatus</i> genomska DNA	4000	2000	1000	500	250	125	62.5
<i>Magallana gigas</i> genomska DNA	4000	2000	1000	500	250	125	62.5
<i>Donax trunculus</i> genomska DNA	4000	2000	1000	500	250	125	62.5
<i>Ruditapes philippinarum</i> genomska DNA	3500	1750	875	437.5	218.75	109.38	54.69
<i>Dosinia exoleta</i> genomska DNA	60	30	15	7.5	3.75	1.875	0.937
<i>Venus verrucosa</i> genomska DNA	350	175	87.5	43.75	21.875	10.937	5.468
Pozitivna kontrola TRIM element	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078	0.0039
Negativna kontrola genomska DNA kukca kornjaša <i>T. molitor</i>	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078	0.0039
Negativna kontrola prazan plazmid pUC18	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078	0.0039
Negativna kontrola klon CED AP1	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078	0.0039

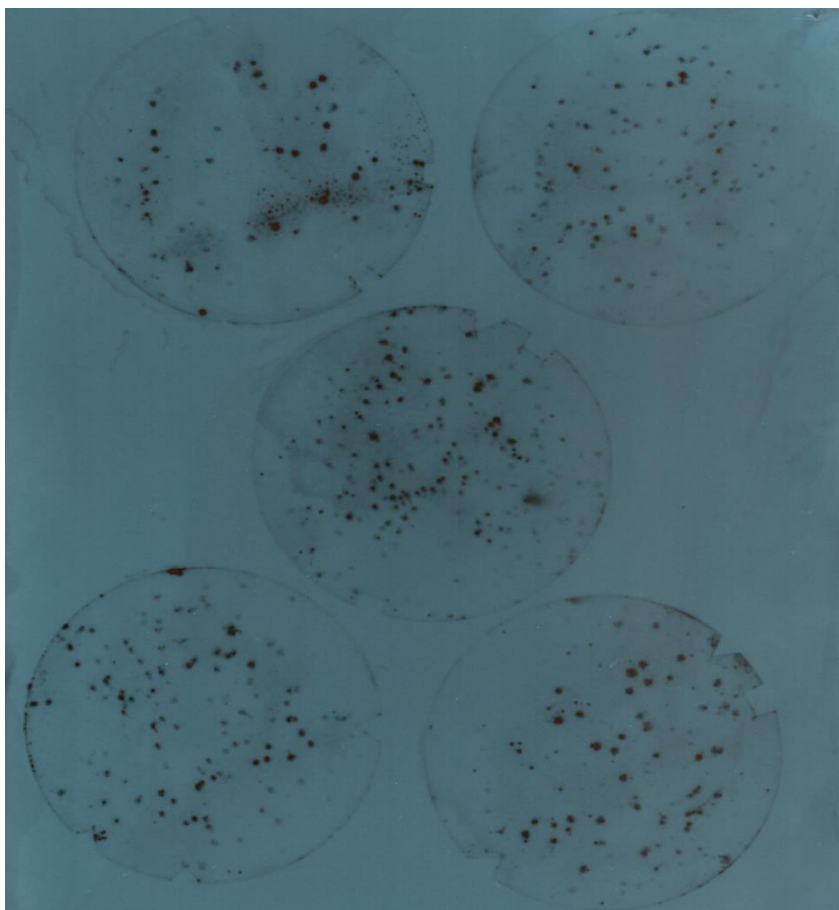
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Detekcija TRIM mobilnih elemenata u genomima školjkaša *Cerastoderma edule* i *Glycymeris glycymeris*

Kao posebna grupa LTR retrotranspozona izdvajaju se TRIM mobilni elementi, specifični po svojoj maloj veličini (<540 pb) i nemogućnosti kodiranja proteina vezanih uz mobilnost (Witte i sur., 2001). Zbog njihove veličine smatralo se da je mala mogućnost da sudjeluju u aktivnom restrukturiranju genoma, no dokazano je da svojom prisutnošću u promotorskim i intronskim sekvencama, kao i u kodirajućim slijedovima, utječu na gene na isti način kao što to čine i ostali LTR retrotranspozoni (Witte i sur., 2001; Nakatsuka i sur., 2006). Također mogu utjecati i na veličinu samog genoma bilo povećanjem (San Miguel i sur., 1996; Pearce i sur., 1996) ili smanjenjem broja kopija u genomu (Vicient i sur., 1999; Shirasu i sur., 2000; Petrov, 2001).

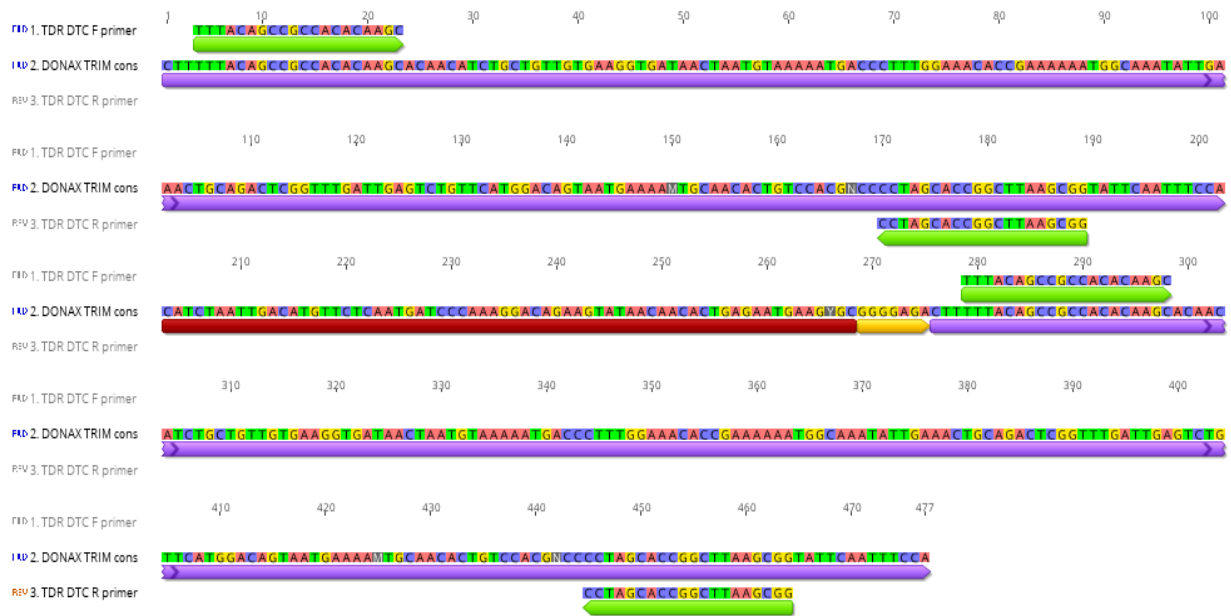
U sklopu ovoga rada, po prvi puta su otkriveni i opisani TRIM elementi u vrstama školjkaša *Cerastoderma edule* i *Glycymeris glycymeris*. Do sada su TRIM elementi detektirani kod više vrsta biljaka (Witte i sur., 2001; Yang i sur., 2007), a unutar životinjskog svijeta samo kod mrava (Zhou i Cahan, 2012) i endoparazita (Koziol i sur., 2015) te unutar razreda Bivalvia (Šatović, neobjavljeni rezultati). TRIM elementi iz udaljenih taksonomskih grupa najčešće ne pokazuju međusobnu nukleotidnu sličnost i zbog toga je teško utvrditi njihovu prisutnost.

U svrhu detekcije i karakterizacije TRIM mobilnih elemenata u genomu školjkaša *Cerastoderma edule* i *Glycymeris glycymeris*, napravljene su parcijalne genomske biblioteke tih vrsta, kako je opisano u 3.2.2. i 3.2.3.. Provedena je analiza otisaka kolonija, pri čemu je kao hibridizacijska sonda korišten TRIM element čija je prisutnost ranije dokazana kod vrste školjkaša *Donax trunculus* te su u ovom pokusu detektirane bakterijske kolonije koje potencijalno sadrže taj element (Slika 9). Dio kolonija koje su pokazale pozitivan hibridizacijski signal uzgojen je u tekućem mediju. Iz uzgojenih bakterijskih klonova izolirani su plazmidi kojima je određen nukleotidni slijed inserata.



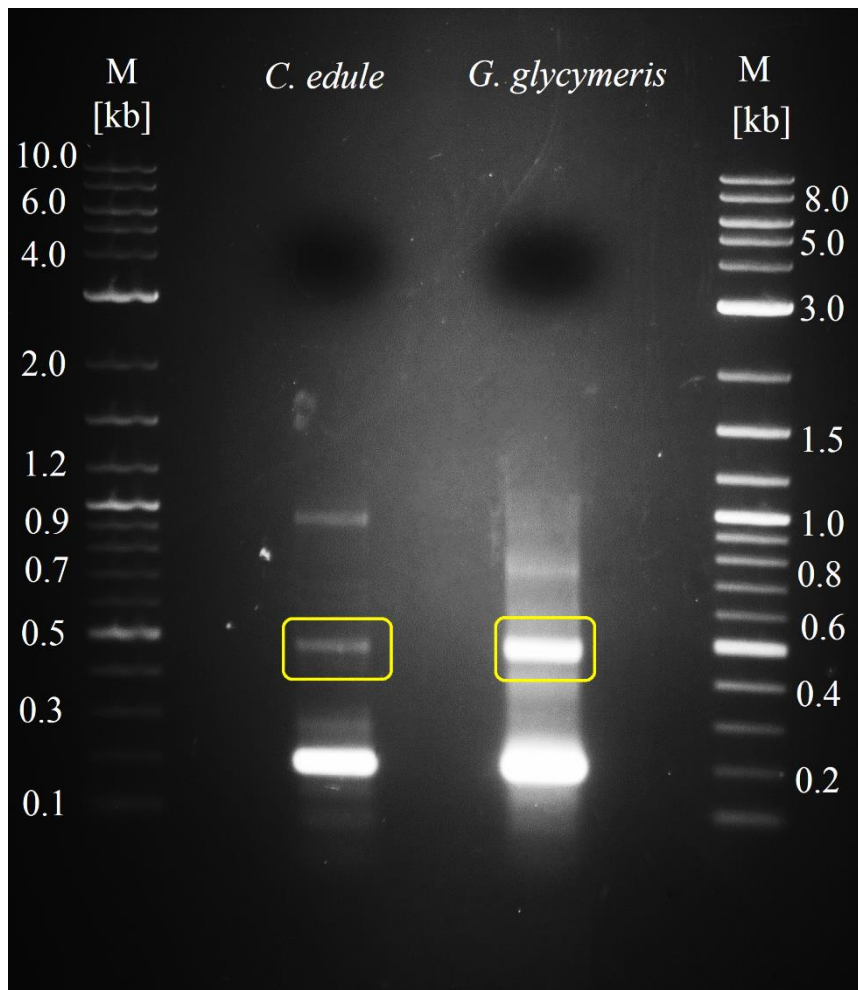
Slika 9. Autoradiografski film dobiven nakon analize otisaka kolonija kod vrste *C. edule*. Dio bakterijskih kolonija koje su dale pozitivan signal je korišten za daljnje analize kako bi se ustanovilo prisustvo TRIM elemenata.

Uočeno je da klonovi sadrže nesrodne sekvence koje samo u kratkim fragmentima (10-15 pb) pokazuju visok stupanj sličnosti s mobilnim elementom od interesa. Rezultati nisu bili zadovoljavajući te se pristupilo drugoj metodi izdvajanja TRIM elemenata. U tu svrhu, provedena je PCR reakcija na genomskim DNA dvije navedene vrste školjkaša, koristeći početnice specifične za TRIM element prethodno nađen kod školjkaša *Donax trunculus* (Slika 10).

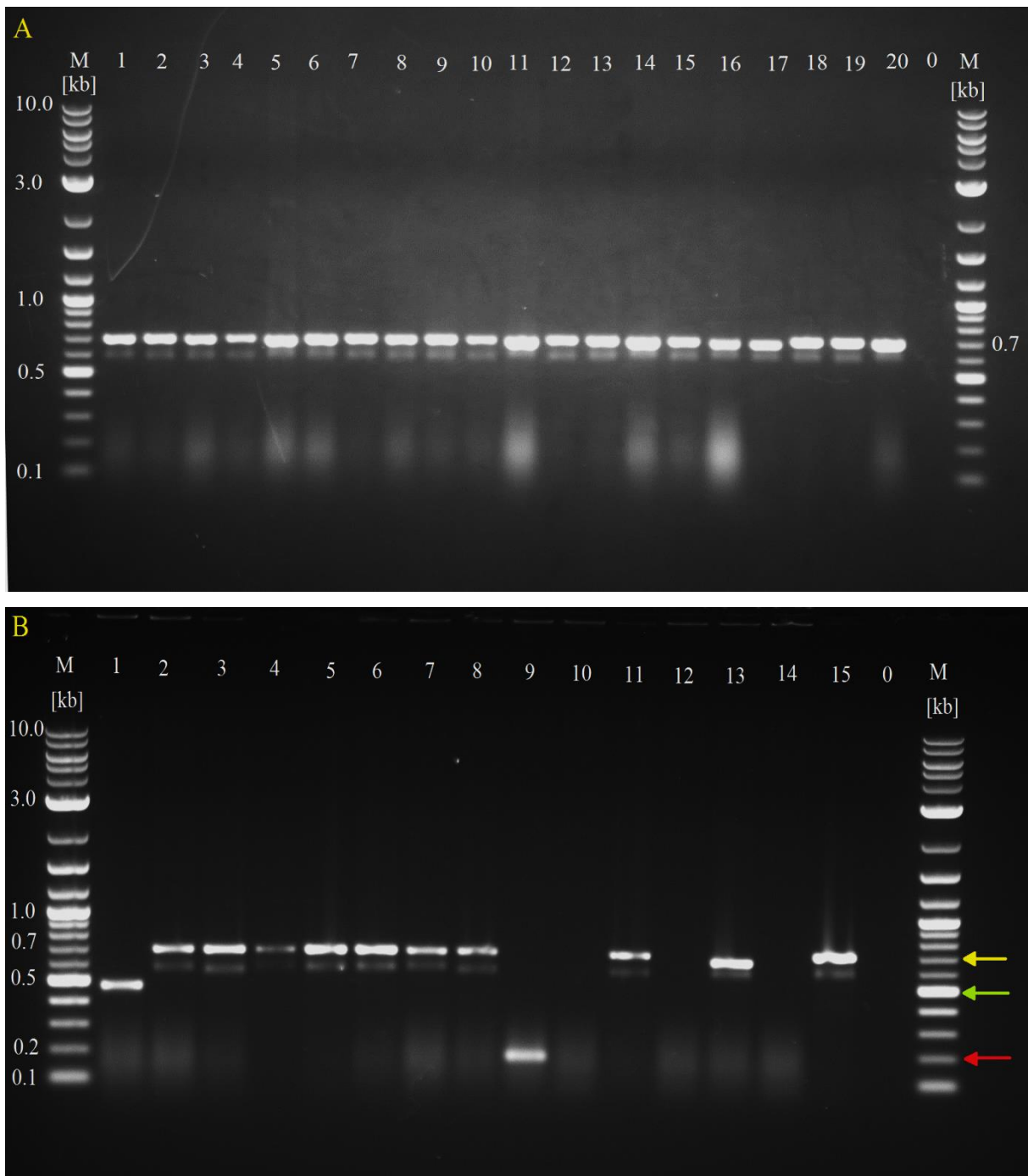


Slika 10. Mjesta komplementarnog sparivanja početnica DTC TDR F i DTC TDR R (zeleno) u odnosu na konsenzus sekvencu TRIM elementa vrste *Donax trunculus*. TDR domene TRIM elementa su označene ljubičastom, unutarnja domena crvenom, a polipurinski trakt žutom bojom.

S obzirom da je TDR domena prisutna u dvije kopije u sklopu TRIM elementa, PCR produkti će sadržavati DNA odsječke koji odgovaraju veličini jedne TDR domene (~200 pb), cjelokupnom elementu, moguće čak i uzastopno ponovljenim elementima ili dijelovima elementa (Slika 11). Fragmenti (~470 pb) koji su odgovarali veličini jednog cjelovitog elementa su ekstrahirani iz gela i klonirani u plazmidni vektor pGEM-T Easy. Na temelju plavo-bijele selekcije odabrane su pojedinačne bijele kolonije na kojima je proveden „*colony PCR*“ koristeći početnice M13F i M13R (Slika 12 A i B). Iz klonova koji su sadržavali odgovarajuće veličine inserta su izolirani plazmidi te su inserti sekvencirani koristeći komercijalno dostupnu plazmidnu početnicu M13R-pUC19.

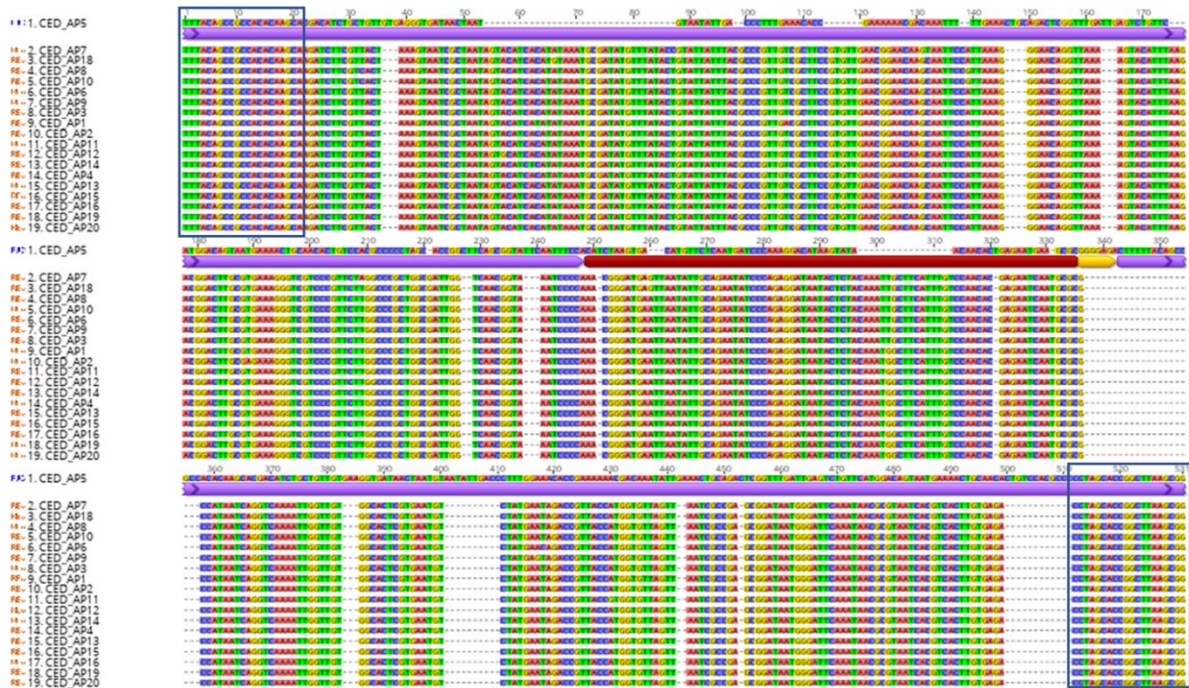


Slika 11. Gel elektroforeza produkata PCR reakcija provedenih na genomskim DNA školjkaša *C. edule* i *G. glycymeris* koristeći početnice specifične za TRIM element. Žutim kvadratićima su označeni cjeloviti TRIM elementi veličine oko 470 pb koji su izdvojeni iz gela.



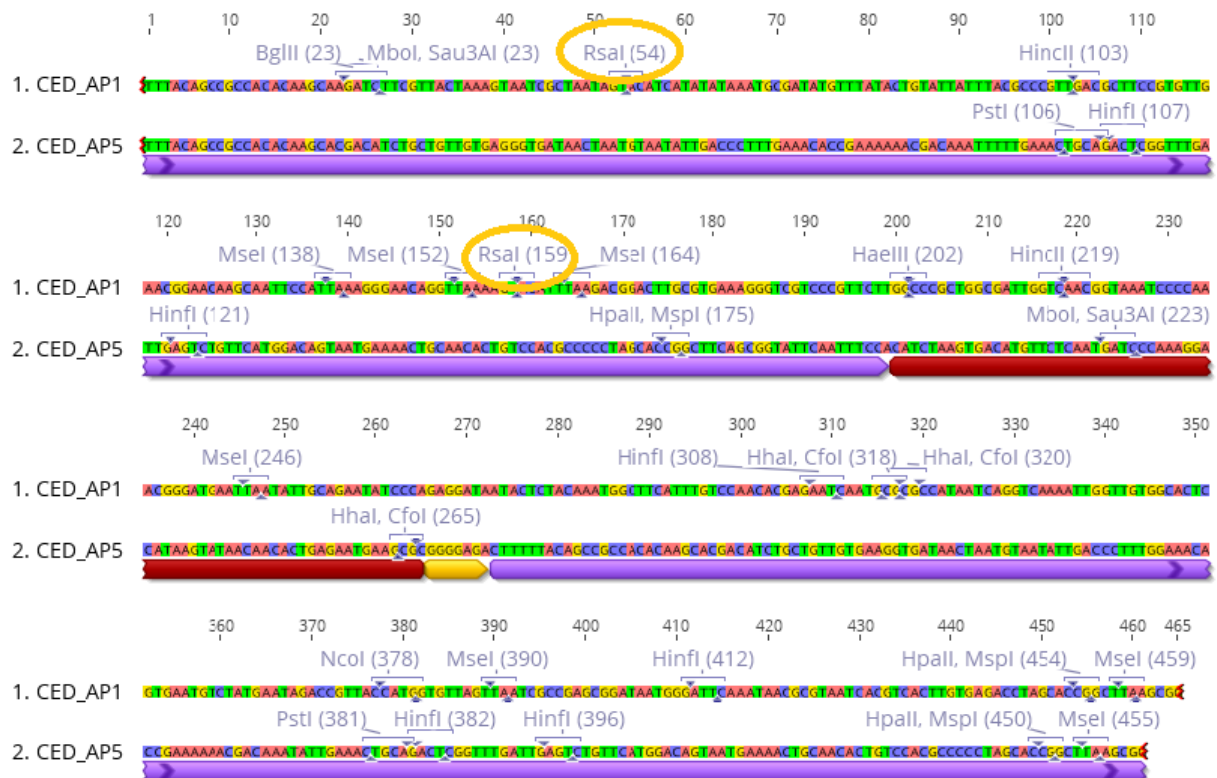
Slika 12. Gel elektroforeza „colony PCR“ produkata za vrste *C. edule* (A) i *G. glycymeris* (B). Na Slici A uzorci su označeni brojevima 1-20, brojkom 0 označena je negativna kontrola PCR reakcije (bez kalupa), a biljeg molekularnih veličina označen je sa M. Dobiveni fragmenti veličinom odgovaraju inserciji TRIM elementa. Na Slici B uzorci su označeni brojevima 1-15 a dobiveni fragmenti su različitih veličina. Crvena strelica prikazuje fragment najmanje veličine koji pripada praznom plazmidu, zelenom strelicom je označen fragment srednje veličine koji odgovara inserciji TDR domene, a najveći fragmenti označeni žutom strelicom predstavljaju insertirani TRIM element. Treba uzeti u obzir da su mjesta na plazmidu koja prepoznaju M13F i M13R početnice udaljena 101 odnosno 133 pb od mjesta insercije, čime od dobivenih DNA odsječaka treba odbiti 234 pb pri određivanju veličine inserta.

Rezultat sekvenciranja je pokazao da klon CED_AP5 ima sve elemente retrotranspozona TRIM, dok dio klonova kod vrste *C. edule* sadrži nesrodne sekvence čiji su krajevi visokohomologni s početkom i krajem TDR domena TRIM elementa što je rezultiralo njihovim umnažanjem s DTC TDR F i R početnicama. Uzevši u obzir da nesrodne sekvence i TRIM element rezultiraju istom veličinom PCR produkta, bilo je potrebno osmisliti način razlikovanja tih dvaju tipova sekvenci, u svrhu izdvajanja dodatnih kopija mobilnog elementa.



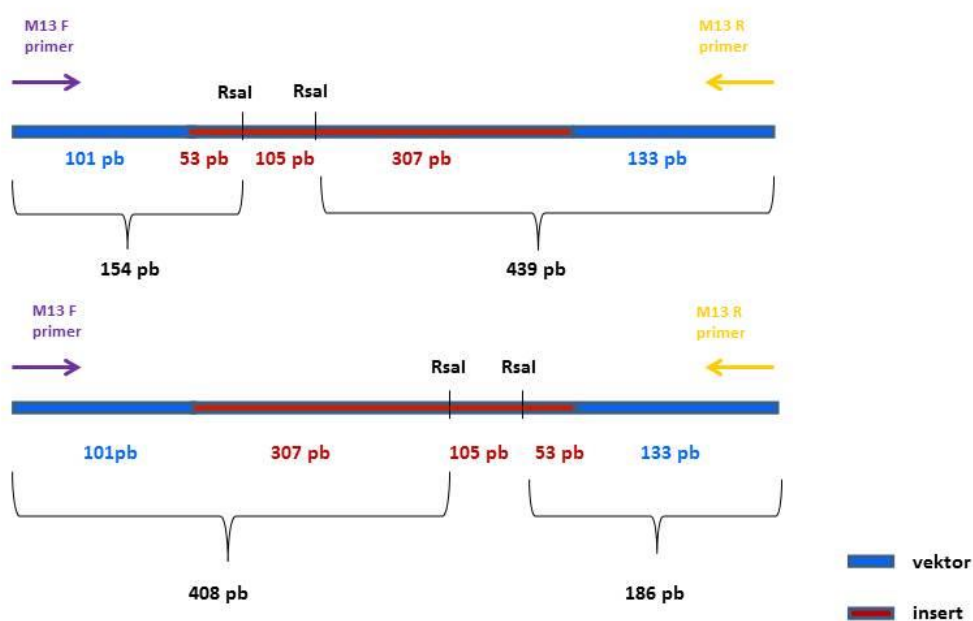
Slika 13. Svrstavanje sekvenci DNA nesrodnih TRIM elementu detektiranih kod vrste *C. edule*. Prikazani su u odnosu na TRIM element porijeklom iz CED_AP5 klon. TDR domene TRIM elementa su označene ljubičastom, unutarnja domena crvenom, a polipurinski trakt žutom bojom. Vidljiva je visoka homologija između dva tipa sekvenci na njihovim krajevima (obilježeno plavim kvadratima).

Kako bi omogućili izdvajanje samo sekvenci od interesa, provedena je *in silico* restrikcijska analiza na klonu CED_AP5 koji sadrži TRIM element i CED_AP1 koji sadrži nesrodnu sekvencu. Ustanovljeno je kako restrikcijsko mjesto za endonukleazu RsaI postoji samo kod nesrodnih sekvenci, ali ne i kod TRIM elementa (Slika 14). Zahvaljujući tome, moguće bi bilo razlikovanje dva tipa inserata nakon razgradnje produkata *colony PCR* reakcije restrikcijskim enzimom RsaI te razdvajanja dobivenih fragmenata gel elektroforezom.



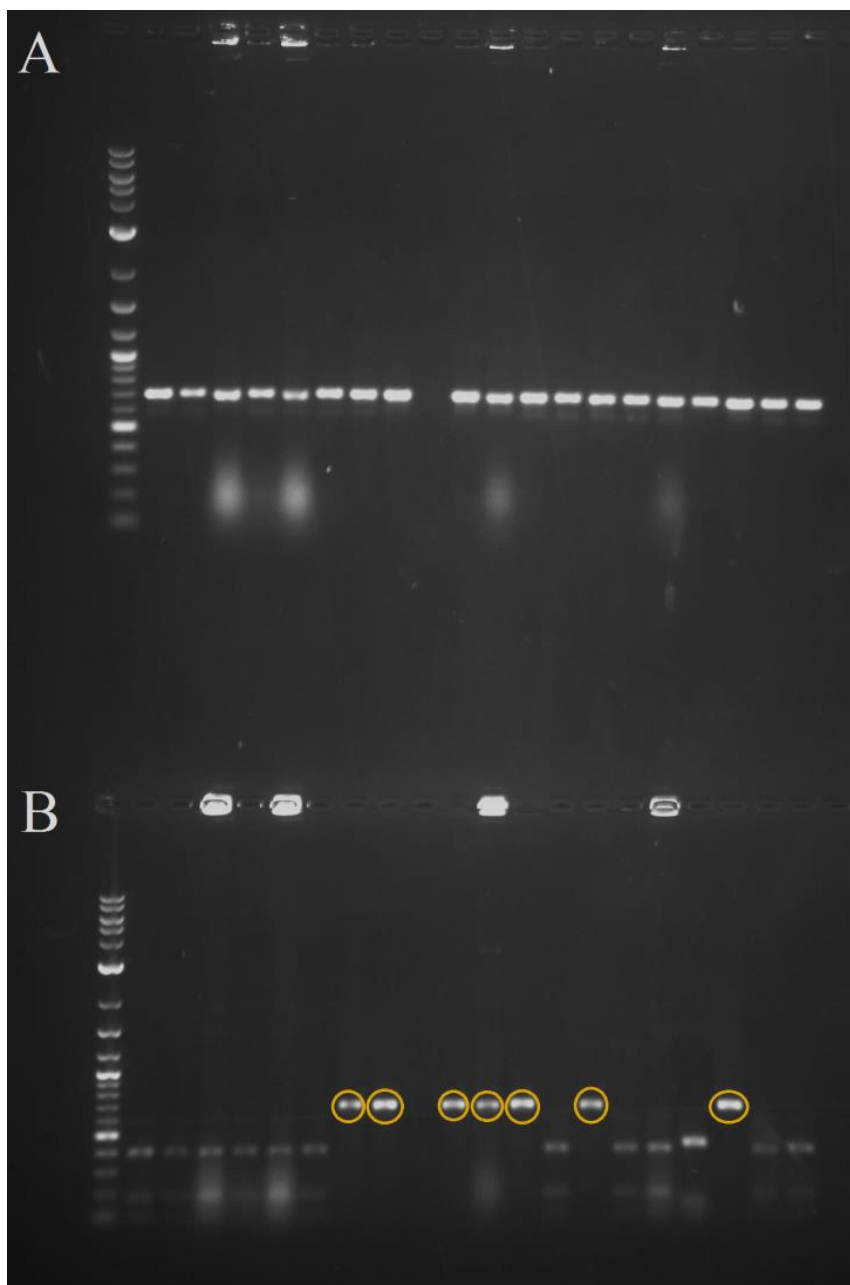
Slika 14. Razlikovna restrikcijska mjesta kod nesrodnih sekvenci (CED AP1) i TRIM elementa iz klonova CED AP5. Žutom bojom su zaokružena restrikcijska mjesta koja prepoznaje RsaI enzim, a koja se nalaze samo kod nesrodnih sekvenci.

Na osnovu položaja razlikovnog restrikcijskog mjesta utvrđene su očekivane veličine fragmenata koje nastaju restrikcijom PCR produkata enzimom RsaI, a iznose: 154 pb, 105 pb i 439 pb, odnosno: 408 pb, 105 pb i 186 pb u slučaju obrnute orijentacije inserta (Slika 15).



Slika 15. Prikazana su mjesta prepoznavanja enzima RsaI (restriksijska mapa) u sklopu PCR produkata te očekivane veličine fragmenata koji bi nastale kao posljedica djelovanja restriksijske endonukleaze. U obzir su uzete dvije moguće orijentacije ugradnje inserta u vektor. Vektorski dio je označen plavom bojom, insert crvenom, mjesto vezivanja M13F i M13R početnice ljubičastom, odnosno žutom bojom.

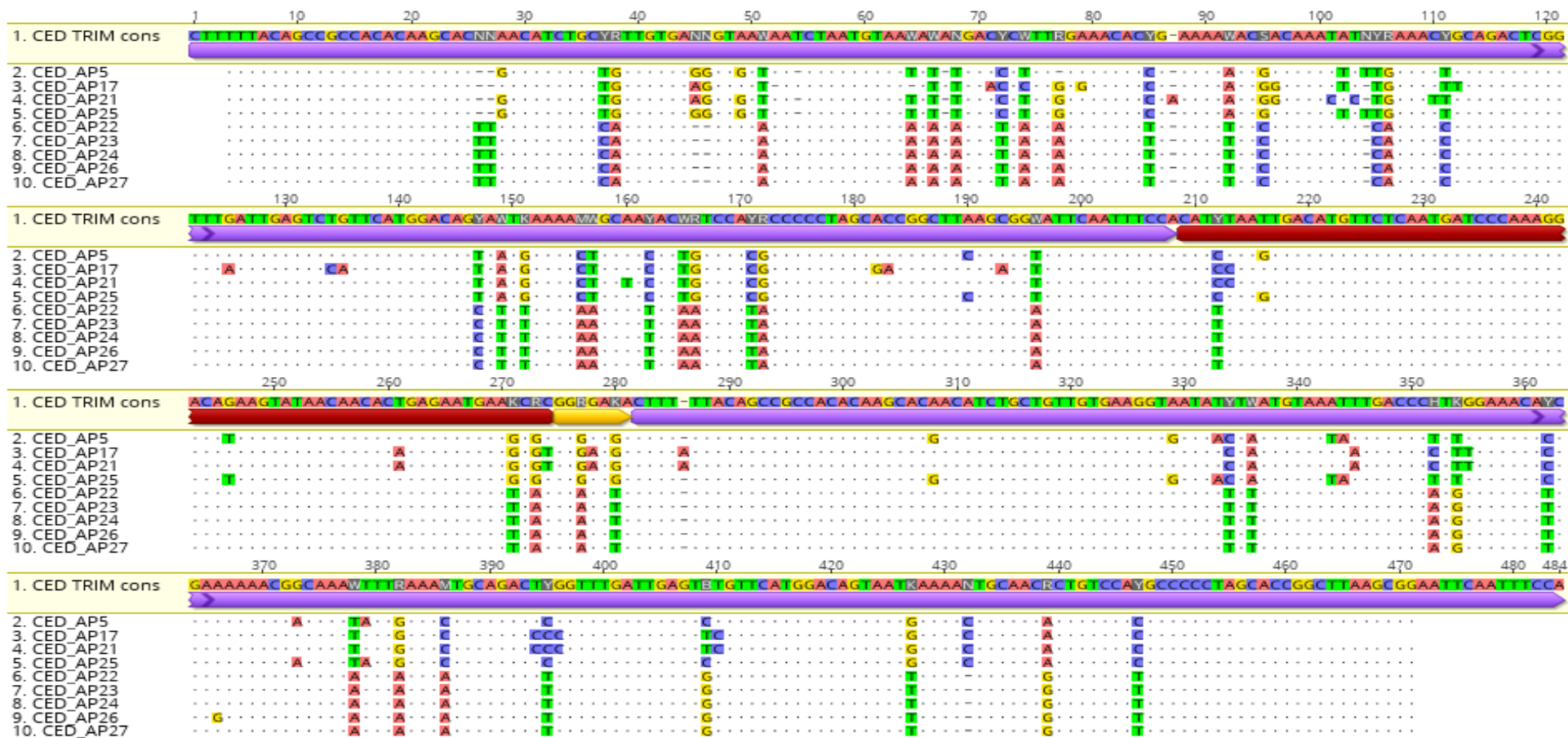
Nakon provođenja još jednog ciklusa kloniranja, ponovljen je PCR na bakterijskim kolonijama. Dio svakog uzorka podvrgnut je razgradnji s RsaI. Agaroznom gel elektroforezom istovremeno su razdvojene dvije frakcije istih uzoraka, dio na kojem nije provedena razgradnja (Slika 16A) i dio koji je podvrgnut razgradnji s RsaI (Slika 16B). Uzorci koji nakon tretmana s RsaI zadržavaju svoju izvornu veličinu od približno 690 pb (kod kojih nije došlo do cjepanja) predstavljaju potencijalne TRIM elemente (Slika 166B, zaokruženo). Ostali uzorci nakon razgradnje pokazuju profil odsječaka DNA očekivanih veličina i pripadaju nesrodnim sekvencama. Iz klonova koji su sadržavali željene veličine inserta izolirani su plazmidi te poslani na sekvenciranje.



Slika 16. Gel elektroforeza PCR produkata koji nisu podvrgnuti razgradnji (A) i nakon razgradnje restriktivnim enzimom RsaI (B). Žutom bojom su zaokruženi uzorci koji zadržavaju svoju izvornu veličinu i predstavljaju potencijalne TRIM elemente. Ostali uzorci nakon razgradnje pokazuju profil DNA odsječaka očekivanih veličina.

4.2. TRIM elementi u genomu školjkaša *Cerastoderma edule*

Iz školjkaša *C. edule* izdvojeno je 9 kopija LTR retrotranspozona porodice TRIM. Kod elementa prisutnog u ovoj vrsti duljina TDR domene iznosi 205 pb, unutarnja domena je duljine 66 pb, a 7 nukleotida čini polipurinski trakt. Na Slici 17 je prikazano sravnjenje nukleotidnih sljedova mobilnog elementa TRIM nađenih kod vrste *C. edule*.



Slika 17. Nukleotidni sljedovi TRIM elemenata vrste *C. edule*. Konzensus sekvencija za vrstu *C. edule* prikazana je punim nukleotidnim sljedom, podudarnost u odnosu na konzensus točkama, nukleotidne promjene odgovarajućim slovom, a delecije crticama. TDR domene TRIM elementa su označene ljubičastom, unutarnja domena crvenom, a polipurinski trakt žutom bojom.

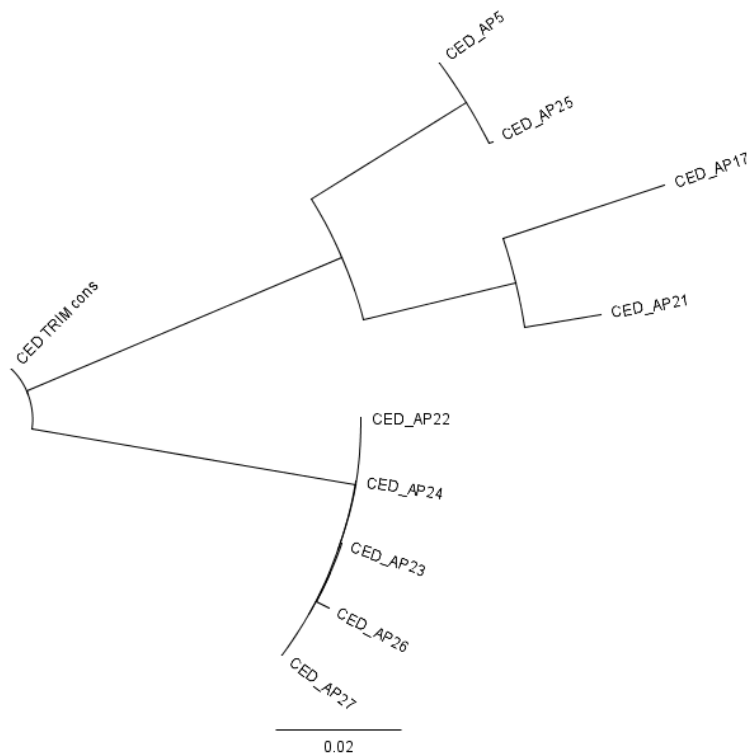
Iz sravnjenja prikazanog na Slici 17 vidljivo je da unutar iste vrste postoji grupiranje sekvenci s obzirom na nukleotidne promjene te da se TRIM elementi kod vrste *C. edule* mogu podijeliti u dvije skupine, pri čemu su prvu skupinu čine klonovi CED AP5, CED AP17, CED AP21 i CED AP25, a drugu CED AP22, CED AP23, CED AP24, CED AP26 i CED AP27. U bioinformatičkom programu Geneious napravljena je matrica sličnosti za dobivene TRIM elemente (Tablica 3) koja pokazuje postotak međusobne sličnosti u nukleotidnom sastavu između elemenata izdvojenih iz različitih klonova vrste *C. edule*. Iz Tablica 3 je vidljivo da je unutar prve skupine nukleotidna sličnost u rasponu od 90.65% do 99.78% (označeno žuto), dok je sličnost sekvenci u drugoj skupini veća, u rasponu od 99,78 do 100% (označeno plavo). Međusobna nukleotidna sličnost između te dvije skupine nije veća od 86.05% (označeno crveno) što je dodatna potvrda da je došlo do stvaranja dvije podgrupe elementa TRIM unutar iste vrste. Svi izolirani elementi su očuvane cjelovitosti, osim CED_AP17 koji je pretrpio kratku deleciju na 3' kraju druge TDR domene (Slika 17).

Tablica 3. Matrica nukleotidnih sličnosti TRIM elemenata iz različitih klonova vrste *C. edule*. Žuto su označeni klonovi iz prve skupine te primjer najviše i najniže vrijednosti međusobne sličnosti elemenata u toj skupini. Isti podaci za drugu skupinu su označeni plavom bojom. Crveno je označen primjer najvećeg postotka sličnosti između elemenata koji pripadaju različitim skupinama, a ružičasto najmanji.

%	CED TRIM cons	CED AP5	CED AP17	CED AP21	CED AP25	CED AP22	CED AP23	CED AP24	CED AP26	CED AP27
CED TRIM cons										
CED AP5	90.75									
CED AP17	88.73	90.65								
CED AP21	89.78	93.1	95.1							
CED AP25	90.86	99.78	90.87	93.32						
CED AP22	93.97	86.05	84.22	85.22	86.05					
CED AP23	93.97	86.05	84.22	85.22	86.05	100				
CED AP24	93.97	86.05	84.22	85.22	86.05	100	100			
CED AP26	93.76	85.84	84	85.01	85.84	99.78	99.78	99.78		
CED AP27	93.97	86.05	84.22	85.22	86.05	100	100	100	99.78	

Na temelju sravnjenja prikazanog na Slici 17 napravljeno je filogenetsko stablo za TRIM elemente školjkaša *C. edule* metodom *neighbour-joining* (Slika 18). Kao što je bilo za očekivati, i ovom metodom je pokazano jasno grupiranje elemenata u dvije skupine, a u prvoj skupini možemo uočiti i dodatnu podjelu na dvije podskupine. Postojanje dvije podskupine elemenata kod vrste *C. edule* najvjerojatnije je posljedica mutacijskih događaja u jednom od

elemenata, nakon čega se broj kopija te varijante povećao uslijed retrotranspozicijskih događaja u genomu i generirao dodatnu skupinu izrazito visoke homologije.



Slika 18. Filogenetsko stablo TRIM elemenata izdvojenih iz vrste *C. edule*. Crtica predstavlja genetsku udaljenost izračunatu prema Tamura-Nei parametarskom modelu.

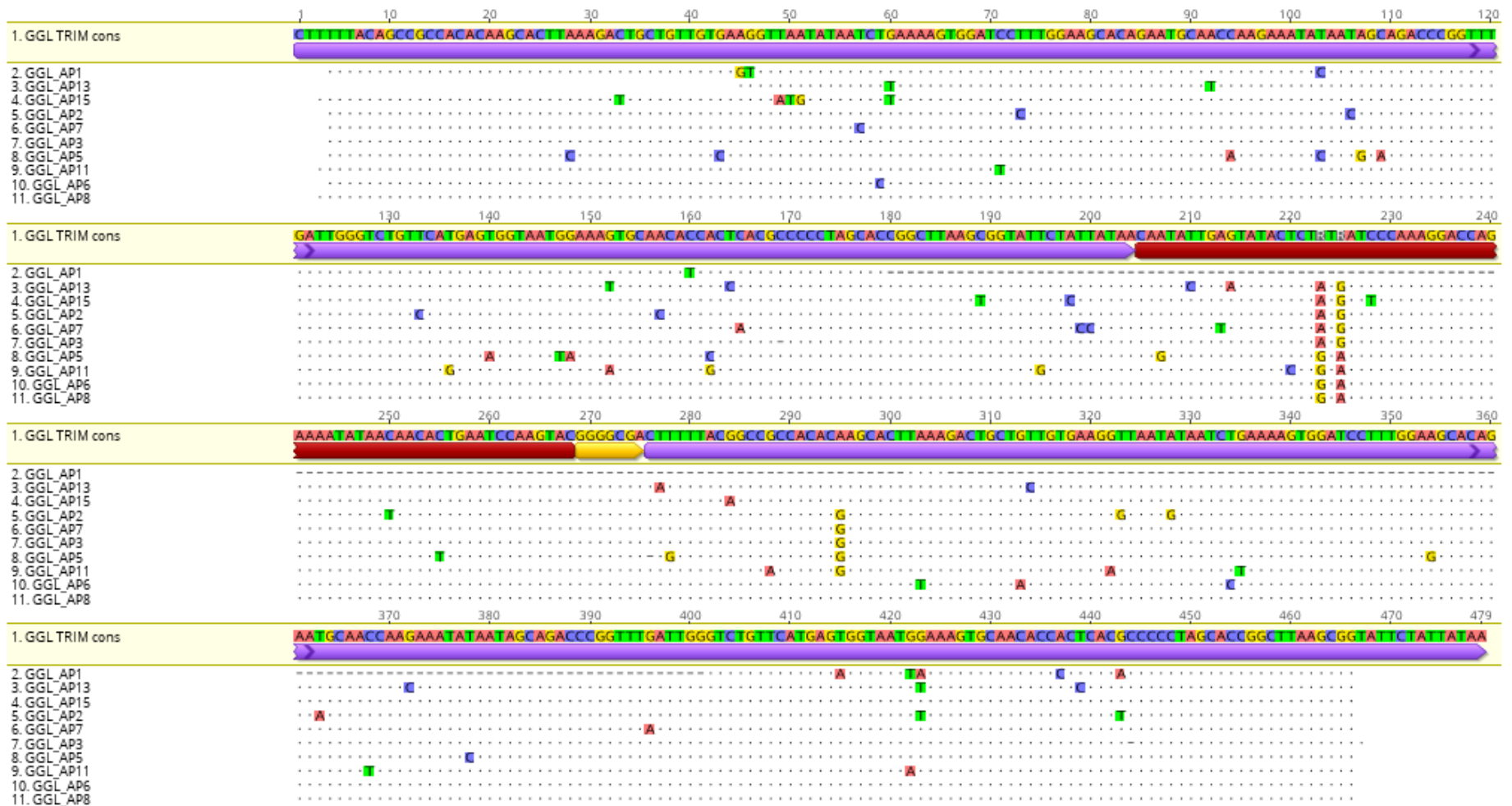
Izvršena je i osnovna analiza TRIM-elementu nesrodnih DNA sekvenci čiji krajevi su pokazivali visoku homologiju s korištenim početnicama i posljedično se umnažali DTC TDR F i R početnicama (Slika 13). Duljina tih nesrodnih sekvenci je odgovarala približnoj veličini TRIM elementa, a pretragom baza podataka nije pronađeno da su ove sekvence prethodno detektirane i opisane. „Dot-plot“ analizom utvrđeno je da ne sadrže nikakva unutarnja ponavljanja u nukleotidnoj sekvenci. Također, uspoređeni su s podacima pohranjenim u genskoj bazi NCBI GenBank te putem pretraživača *CENSOR* i s bazom *Repbase* koja sadrži kolekciju različitih tipova poznatih repetitivnih sekvenci i mobilnih elemenata. U oba slučaja, nije nađena sličnost ni s kojim do sad prijavljenim i opisanim nukleotidnim sljedovima. Za detaljniju karakterizaciju ove sekvence potrebno je daljnje istraživanje.

4.3. TRIM elementi u genomu školjkaša *Glycymeris glycymeris*

Kod vrste *Glycymeris glycymeris* izdvajanje TRIM elemenata bilo je olakšano u odnosu na vrstu *C. edule*, s obzirom da je TRIM-specifični par početnica DTC TDR F i R umnažao

samo željenu sekvencu. Nakon postupka opisanog u poglavlju 4.1., iz vrste školjkaša *G. glycymeris* izdvojeno je 10 kopija LTR retrotranspozona porodice TRIM između kojih postoji vrlo visok stupanj homologije. Kod elementa prisutnog u ovoj vrsti duljina TDR domene iznosi 204 pb, unutarnja domena je duljine 64 pb, a polipurinski trakt čini 7 nukleotida. Na Slici 19 je prikazano sravnjenje nukleotidnih sljedova mobilnog elementa TRIM nađenih kod vrste *G. glycymeris*.

Moguće je primijetiti da je TRIM element iz klona GGL_AP13 pretrpio deleciju od 40-ak pb u prvoj TDR domeni, dok je kod elementa iz klona GGL AP1 došlo je do značajnijih rearanžmana i delecija. Tom elementu nedostaje posljednjih 20-ak pb prve TDR domene, kompletna unutarnja domena te prvih 30-ak pb druge TDR domene.



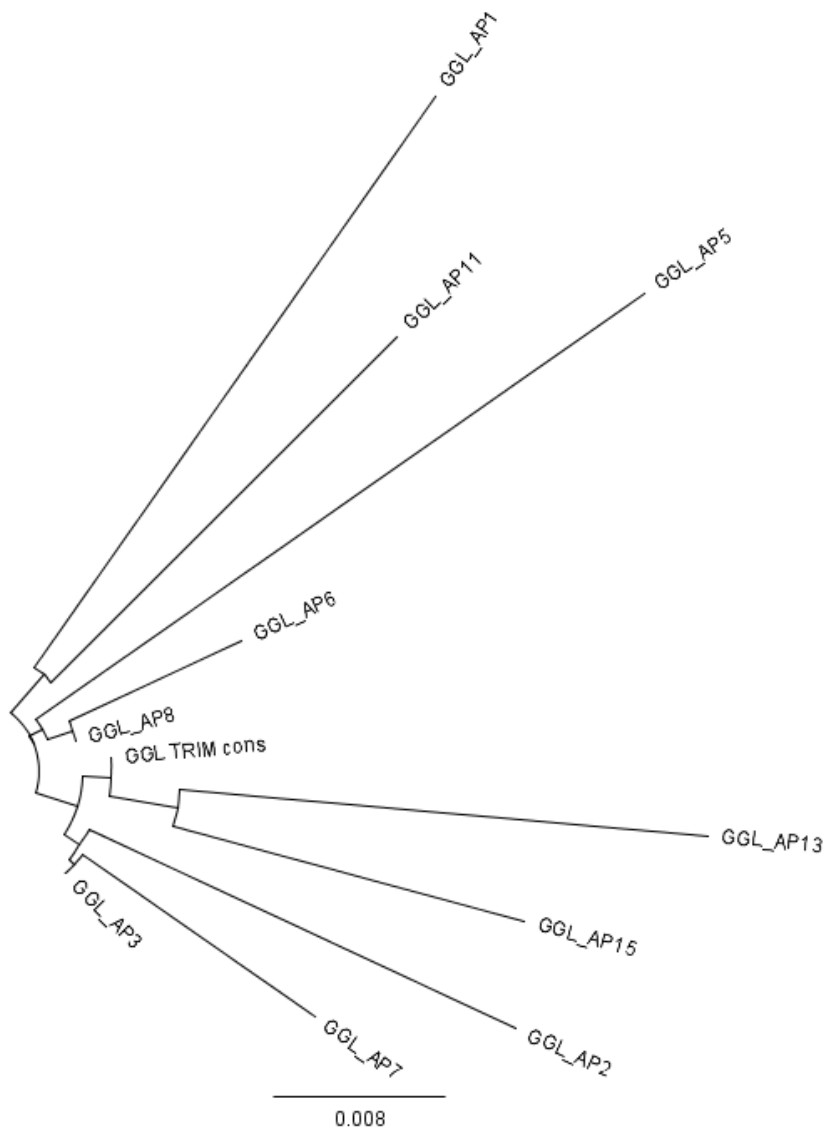
Slika 19 Nukleotidni sljedovi TRIM elemenata vrste *G. glycymeris*. Konsenzus sekvenca za vrstu *G. glycymeris* prikazana je punim nukleotidnim sljedom, podudarnost u odnosu na konsenzus točkama, nukleotidne promjene odgovarajućim slovom, a delecije crticama. TDR domene TRIM elementa su označene ljubičastom, unutarnja domena crvenom, a polipurinski trakt žutom bojom.

Napravljena je matrica međusobne sličnosti u nukleotidnom sastavu za TRIM elemente izdvojene iz različitih klonova vrste *G. glycymeris* (Tablica 4). Iz matrice je vidljivo da je nukleotidna sličnost između elemenata visoka te iznosi od 93.36% do 99.14% (plavo označeno). Iznimka je nizak postotak sličnosti elementa TRIM iz GGL klona AP1 u odnosu na ostale, što je posljedica njegove necjelovitosti, kao što je već ranije spomenuto. Kod ostalih, vrlo visok postotak ukazuje na konzerviranost TRIM elemenata unutar te vrste.

Tablica 4. Matrica nukleotidnih sličnosti elemenata TRIM iz različitih klonova vrste *G. glycymeris*. Označene su najviša i najniža vrijednost međusobne sličnosti elemenata u toj skupini.

%	GGL TRIM cons	GGL AP1	GGL AP13	GGL AP5	GGL AP11	GGL AP15	GGL AP2	GGL AP7	GGL AP6	GGL AP3	GGL AP8
GGL TRIM cons											
GGL AP1	50.97										
GGL AP13	97.16	45.02									
GGL AP5	96.11	49.35	93.36								
GGL AP11	97.20	50.11	94.31	94.38							
GGL AP15	97.84	49.89	95.97	93.95	95.04						
GGL AP2	97.41	50.11	95.26	93.95	95.03	95.68					
GGL AP7	98.27	50.54	95.73	94.82	95.90	96.54	96.54				
GGL AP6	98.92	50.54	95.97	95.46	96.54	96.76	96.33	97.19			
GGL AP3	99.14	50.54	96.68	95.68	96.76	97.41	97.41	98.27	98.06		
GGL AP8	99.78	50.97	96.92	96.33	97.41	97.63	97.19	98.06	99.14	98.92	

Napravljeno je filogenetsko stablo i za ovu vrstu (Slika 20). Kao što je bilo za očekivati, ne dolazi do jasnog i značajnog razdvajanja elemenata zbog njihove visoke homologije. U ovom slučaju možebitno razdvajanje u dvije skupine bi moglo biti utemeljeno na samo 2 razlikovne nukleotidne pozicije (pozicija 223 i 225 sravnjenja vidljivog na Slici 19).

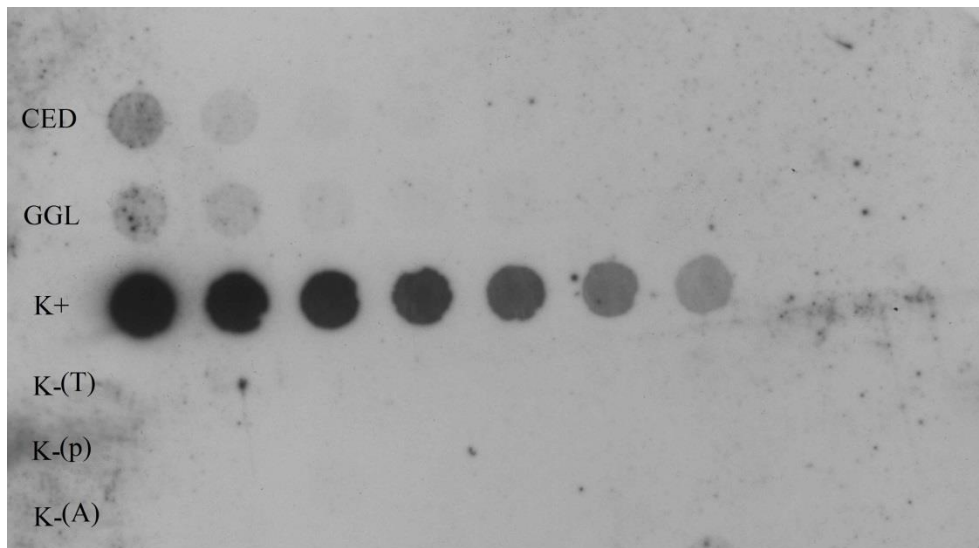


Slika 20. Filogenetsko stablo TRIM elemenata izdvojenih iz vrste *G. glycymeris*. Crtica predstavlja genetsku udaljenost izračunatu prema Tamura-Nei parametarskom modelu.

4.4. Udio TRIM elemenata u genomu školjkaša *Cerastoderma edule* i *Glycymeris glycymeris*

Udio TRIM mobilnih elemenata u ukupnoj genomskoj DNA školjkaša određen je pomoću kapljичne analize (eng. *dot blot*). Pozitivna kontrola sadržavala je TRIM mobilne elemente školjkaša kod kojih je ovaj element utvrđen. Količine DNA prisutne u serijama razrjeđenja genomskih DNA te pozitivne i negativnih kontrola su navedene u Tablici 2 u sklopu Materijala i metoda. Kao negativne kontrole korištene su genomski DNA kukca kornjaša *Tenebrio molitor*, prazan plazmid pUC18 te klon CED AP1, opisan u poglavlju 4.1., koji sadrži nesrodnu sekvencu koja pokazuje sličnost s TRIM elementom samo na svojim krajevima. Kao hibridizacijska proba korištene su obilježene TDR domene TRIM mobilnih

elemenata školjkaša navedenih u Tablici 1. U cilju nam je bilo postići dovoljno restriktivne uvjete hibridizacije u kojima ni nesrodne sekvence kratkih fragmenata homologije neće davati hibridizacijski signal te tako utjecati na rezultat eksperimenta. Analiza je provedena u različitim temperaturnim uvjetima koji omogućuju sparivanje nukleotidnih slijedova različitih stupnjeva homologije. Viša temperatura podrazumijeva i strože uvjete, odnosno sparivanje sonde i DNA odsječaka velike sličnosti. Nakon procesa optimizacije, temperatura od 68°C je određena kao optimalna za provođenje hibridizacije. Kao što je vidljivo na Slici 21, u negativnim kontrolama nema nespecifičnog vezivanja sonde pri tim uvjetima hibridizacije. Denzitometrijskom usporedbom jačine hibridizacijskog signala genomske DNA i pozitivne kontrole poznate količine mobilnog elementa, određeno je da je udio LTR retrotranspozona porodice TRIM u genomu *C. edule* izrazito nizak ($3.17 \cdot 10^{-5} \%$). Kod školjkaša *G. glycymeris* udio TRIM mobilnih elemenata je usporedivo mali i čini svega $4.69 \cdot 10^{-5} \%$ genoma.



Slika 21. Određivanje udjela TRIM mobilnih elemenata u genomske DNA školjkaša vrste *C. edule* i *G. glycymeris* putem kapljice analize. Nanešena su serijska razrijeđenja sljedećih uzoraka: CED = genomska DNA vrste *C. edule*; GGL = genomska DNA vrste *G. glycymeris*. Kao pozitivna kontrola K+ nanesen je TRIM element školjkaša; negativne kontrole su K- (T) = genomska DNA kukca brašnara *Tenebrio molitor*; K- (p) = prazan plazmid pUC18; K- (A) = klon CED AP1 koji sadrži nesrodne sekvence fragmentarne sličnosti s TRIM elementom.

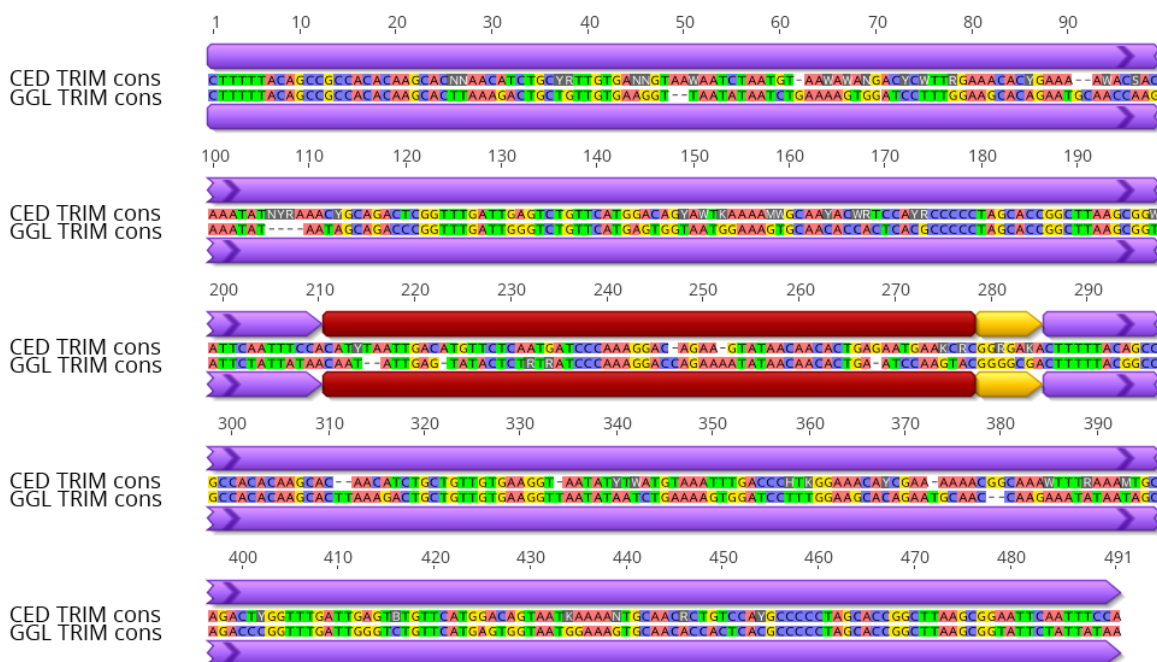
4.5. Usporedba TRIM elemenata u genomima školjkaša *Cerastoderma edule* i *Glycymeris glycymeris*

TRIM LTR retrotranspozoni nađeni u genomima školjkaša *C. edule* i *G. glycymeris* pokazuju neznatne razlike u svojoj osnovnoj strukturalnoj građi i duljini pojedinih dijelova. Dok je prosječna duljina TDR domene kod *C. edule* 205 pb ona kod vrste *G. glycymeris* iznosi 204 pb. Unutarnja domena se po duljini razlikuje u svega 2 nukleotida

(66 pb za *C. edule* i 64 pb za *G. glycymeris*), a polipurinski traktovi su jednake duljine (7 nukleotida).

Također, primjećena je i relativno dobra strukturna očuvanost samih elemenata. Kod mrava *Pogonomyrmex barbatus*, od 270 izvojenih kopija elementa PbTRIM, svega 67 je bilo cjelovito, a prevladavale su varijante samo s jednom TDR domenom (159 elemenata) i krnje varijante (44 elementa) (Zhou i Cahan, 2012). Kod istraživanih školjkaša, *C. edule* i *G. glycymeris*, primjećeno je da je većina nađenih kopija elementa cjelovita, uz povremenu prisutnost krnjih varijanti. Kod vrste *G. glycymeris* se izvio samo klon GGL AP1 kod kojeg su se dogodili značajniji genetički rearanžmani koji zahvaćaju sve dijelove elementa. Rearanžmani kod TRIM elemenata nisu rijetka pojava. Smatra se da su elementi s jednom TDR domenom posljedica događaja nejednolikog prekrivanja (crossing-over) između TDR domena različitih TRIM elemenata (Bennetzen i Kellog, 1997), pri čemu mogu nastati varijante s jednom ili 3 TDR domene.

Na temelju rezultata sekvenciranja klonova koji sadrže TRIM elemente napravljene su konsenzus sekvence za obje vrste školjkaša, prikazane na Slika 22. Usporedba konsenzus sekvenci TRIM elementa ove dvije vrste školjkaša pokazala je međusobnu sličnost u nukleotidnom sastavu od 75.08%.



Slika 22. Svrnjenje konsenzus sekvenci TRIM elemenata nađenih kod vrsti *C. edule* i *G. glycymeris*. TDR domene su označene ljubičastom bojom, unutarnje domene su označene crvenom, a polipurinski trakt žutom bojom.

Napravljena je matrica međusobnih sličnosti u nukleotidnom sastavu za sve TRIM elemente izdvojene iz različitih klonova vrsta *C. edule* i *G. glycymeris* (Tablica 5). Iz analize je isključen samo TRIM element iz klona GGL AP1 kod kojeg je došlo do značajnijih rearanžmana i delecija. Iz matrice je vidljivo da je nukleotidna sličnost između elemenata u rasponu od 70.22% i 75.37% (označeno).

TRIM elementi školjkaša *C. edule* i *G. glycymeris* općenito pokazuju visok stupanj homologije u nukleotidnoj sekvenci unutar svake od vrsta. Kod vrste *C. edule* dobiven je postotak sličnosti od 84 do 86.05%, a unutar svake njezine podskupine taj postotak je značajno veći (i do 100%). Za vrstu *G. glycymeris* uočen je vrlo visok postotak sličnosti od čak 93 - 99%, što je pokazatelj konzerviranosti ovih sekvenca unutar vrste tijekom evolucije. Karakteristike koje su primijećene kod TRIM elemenata, a koje ukazuju na njihovu nedavnu aktivnost su: visok stupanj homologije među TDR domenama pojedinog elementa, velika međusobna sličnost kopija s različitih genomskih lokacija te prisutnost TSD motiva kod gotovo svih kompletnih elemenata (Witte i sur., 2001; Zhou i Cahan, 2012). Primjećena visoka očuvanost u nukleotidnoj sekvenci TRIM elemenata kod vrsta *C. edule* i *G. glycymeris* pokazuje da se vjerojatno radi o aktivnim retroelementima, a ne o degeneriranim varijantama koje se međusobno vrlo razlikuju kao posljedica neaktivnosti i nakupljanja mutacija.

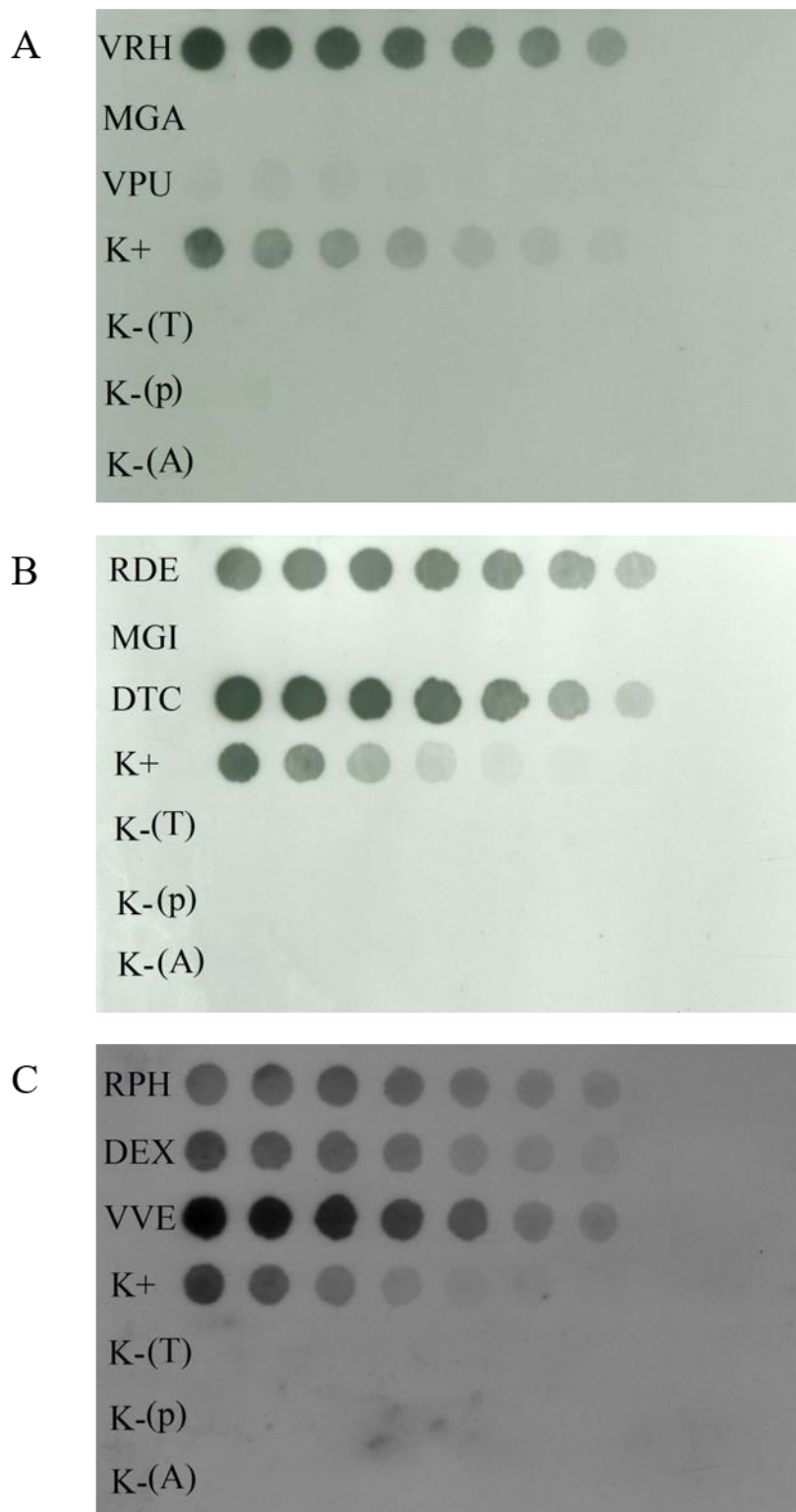
Tablica 5. Matrica nukleotidnih sličnosti TRIM elemenata svih klonova vrste *C. edule* i *G. glycymeris*. Žuto su označeni elementi iz vrste *C. edule*, a plavo elementi iz vrste *G. glycymeris*. Crveno je označena najveća sličnost između elemenata koji pripadaju različitim skupinama, a ružičasto najmanja.

	CED AP5	CED AP17	CED AP21	CED AP22	CED AP23	CED AP24	CED AP25	CED AP26	CED AP27	GGL AP2	GGL AP3	GGL AP5	GGL AP6	GGL AP7	GGL AP8	GGL AP11	GGL AP13	GGL AP15	
CED AP5																			
CED AP17	90.42																		
CED AP21	92.89	95.10																	
CED AP22	85.84	84.00	85.22																
CED AP23	85.84	84.00	85.22	100.00															
CED AP24	85.84	84.00	85.22	100.00	100.00														
CED AP25	99.78	90.65	93.10	85.84	85.84	85.84													
CED AP26	85.04	83.19	84.43	99.14	99.14	99.14	85.04												
CED AP27	85.84	84.00	85.22	100.00	100.00	100.00	85.84	99.14											
GGL AP2	74.53	71.96	73.53	72.63	72.63	72.63	74.74	72.42	72.63										
GGL AP3	74.95	72.39	74.37	72.84	72.84	72.84	75.16	72.84	72.84	97.41									
GGL AP5	73.05	70.22	72.90	70.74	70.74	70.74	73.26	70.74	70.74	93.74	95.46								
GGL AP6	74.53	71.74	73.74	72.21	72.21	72.21	74.74	72.21	72.21	96.33	98.06	95.25							
GGL AP7	74.11	71.52	73.53	72.00	72.00	72.00	74.32	72.00	72.00	96.54	98.27	94.60	97.19						
GGL AP8	75.16	72.61	74.58	73.05	73.05	73.05	75.37	73.05	73.05	97.19	98.92	96.11	99.14	98.06					
GGL AP11	73.47	70.87	72.90	71.79	71.79	71.79	73.68	71.79	71.79	95.03	96.76	94.17	96.54	95.90	97.41				
GGL AP13	74.88	71.60	74.02	72.12	72.12	72.12	75.12	72.12	72.12	95.26	96.68	93.36	95.97	95.73	96.92	94.31			
GGL AP15	74.74	72.77	74.16	72.63	72.63	72.63	74.95	72.63	72.63	95.69	97.41	93.75	96.77	96.55	97.63	95.05	95.98		

4.6. Udio TRIM elemenata u genomima različitih vrsta školjkaša i komparacija s vrstama *Cerastoderma edule* i *Glycymeris glycymeris*

Udio TRIM mobilnih elemenata u genomima drugih vrsta školjkaša određen je putem kapljične analize (Slika 23) pri istim uvjetima hibridizacije kao za vrste *C. edule* i *G. glycymeris*. Klasifikacija ostalih vrsta školjkaša korištenih za ovaj eksperiment je navedena u Tablici 1. Količine DNA u serijskim razrjeđenjima navedene su u Tablici 2 poglavlja Materijali i metode. U Tablici 6 su prikazane izračunate vrijednosti udjela TRIM elemenata u genomima različitih vrsta školjkaša nakon skeniranja filmova i denzitometrijske kvantifikacije pomoću programa ImageJ. Kod vrste *Ruditapes decussatus* (RDE) udio TRIM elemenata iznosi oko 0,03%, kod vrsta *Donax trunculus* (DTC) i *Venus verrucosa* (VVE) 0,05%, kod *Ruditapes philippinarum* (RPH) i *Polititapes rhomboids* (VRH) 0,19%, a kod školjkaša *Dosinia exoleta* (DEX) udio u genomu je 0,65%. Kod ostalih školjkaša, *Venerupis corrugata* (VPU), *Magallana gigas* (MGI) i *Mytilus galloprovincialis* (MGA) udio TRIM elemenata u genomu je bio ispod razine detekcije. Zajedničko svim ispitanim vrstama, uključivo *C. edule* (CED) i *G. glycymeris* (GGL), je nizak udio LTR retrotranspozona porodice TRIM u genomu, <1%.

Uočeno je da njihova zastupljenost varira ovisno o vrsti i ne ovisi o međusobnoj filogenetskoj udaljenosti ispitanih vrsta. Ta činjenica bi ukazivala na zasebnu dinamiku propagacije koju su TRIM elementi imali u svakoj od ispitanih vrsta kroz evoluciju. Kod svih analiziranih vrsta zastupljenost u genomu je niska (< 1%), pri čemu je kod vrsta *C. edule* i *G. glycymeris* taj postotak iznimno nizak te iznosi $3.17 \cdot 10^{-5}$, odnosno $4.69 \cdot 10^{-5}$, gotovo na rubu detekcije metode. Nizak udio ovih raspršeno ponovljenih sekvenci u genomima školjkaša nije iznenađenje, uzevši u obzir da je za ove organizme karakteristična istovremena prisutnost velikog broja različitih niskozastupljenih repetitivnih sljedova (Šatović i sur., 2018).



Slika 23. Određivanje udjela TRIM mobilnih elemenata u genomima školjkaša putem kapljичne analize. Nanesena su serijska razrijeđenja sljedećih uzoraka: Pozitivna kontrola K+ je TRIM element; negativne kontrole su K- (T) = genomska DNA kukca kornjaša *T. molitor*; K- (p) = prazan plazmid pUC18; K- (A) = klon CED AP1. Nanesena su i serijska razrijeđenja genomske DNA školjkaša: VRH = *Polititapes rhomboides*; MGA = *Mytilus galloprovincialis*; VPU = *Venerupis corrugata* (a) RDE = *Ruditapes decussatus*; MGI = *Magallana gigas*; DTC = *Donax trunculus* (b) RPH = *Ruditapes philippinarum*; DEX = *Dosinia exoleta*; VVE = *Venus verrucosa* (c).

Tablica 6. Udio TRIM mobilnih elemenata u genomima školjkaša obrađenih u sklopu ovoga rada.

TRIM	% u genomu
<i>Cerastoderma edule</i>	3.17*10 ⁻⁵
<i>Glycymeris glycymeris</i>	4.69*10 ⁻⁵
<i>Polititapes rhomboids</i>	0.190904264
<i>Ruditapes decussatus</i>	0.029808561
<i>Donax trunculus</i>	0.051049285
<i>Ruditapes philippinarum</i>	0.193686432
<i>Dosinia exoleta</i>	0.647378974
<i>Venus verrucosa</i>	0.052644598
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	nemjerljivo niska, ispod razine detekcije
<i>Magallana gigas</i>	
<i>Venerupis corrugata</i>	

4.7. Evolucijska starost TRIM elementa

Uzevši u obzir klasifikaciju školjkaša korištenih u ovom istraživanju (Tablica 1), možemo primijetiti da pripadaju dvama podrazredima unutar razreda Bivalvia: Heterodonta (*C. edule*) i Pteriomorphia (*G. glycymeris*). Prisutnost TRIM mobilnog elementa unutar oba podrazreda ukazuje na postojanje zajedničkog pretka koji je sadržavao taj element. Pošto je procijenjeno vrijeme diverzifikacije podrazreda Pteriomorphia 516 milijuna godina (Bieler i sur. 2014), to je ujedno i minimalno evolucijsko vrijeme starosti ovog LTR retrotranspozona porodice TRIM.

5. ZAKLJUČCI

- 1) U sklopu ovog istraživanja po prvi puta je izoliran i određen primarni nukleotidni slijed LTR retrotranspozona porodice TRIM kod školjkaša *Cerastoderma edule* i *Glycymeris glycymeris* koji pokazuju neznatne razlike u svojoj osnovnoj strukturnoj građi i duljini pojedinih modula.
- 2) Primijećena visoka očuvanost u nukleotidnoj sekvenci TRIM elemenata unutar svake od vrsta ukazuje na to da se vrlo vjerojatno radi o aktivnim mobilnim elementima.
- 3) TRIM elementi u genomima školjkaša *C. edule* i *G. glycymeris* sačinjavaju tek mali dio ukupnog genoma. Kod *C. edule* je to $3.17 \cdot 10^{-5}\%$, a kod *G. glycymeris* $4.69 \cdot 10^{-5}\%$.
- 4) Udio TRIM elemenata u genomima drugih vrsta školjkaša također je vrlo nizak i kod svih vrsta čini <1% genoma.
- 5) Nizak udio ovih repetitivnih sekvenci u genomima ispitanih organizama u skladu je s dosad primijećenim trendom o postojanju velikog broja nisko zastupljenih ponovljenih sekvenci u genomima školjkaša.
- 6) Na temelju dobivenih rezultata procijenjena minimalna evolucijska starost TRIM elementa iznosi 516 milijuna godina.

6. LITERATURA

Anonimus 1, (2018)

(a)

http://www.ictieterm.es/nombre_cientifico.php?nc=200 (pristupljeno 12. 7. 2018.)

(b)

<http://fisherscollection.com/product/cerastoderma-edule-4-juveniles/> (pristupljeno 12. 7. 2018.)

Anonimus 2, (2018)

<http://fisherscollection.com/product/glycymeris-glycymeris-juveniles-8-11mm-3213/>
(pristupljeno 13. 7. 2018.)

Antonius-Klemola, K., Kalendar, R., Schulman, A.H. (2006) TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. *TAG Theor Appl Genet Theoretische und angewandte Genetik* **112**, 999-1008.

Bennetzen, J.L., Kellogg, E.A. (1997) Do Plants Have a One-Way Ticket to Genomic Obesity? *The Plant cell* **9**, 1509–1514.

Bieler, R., Mikkelsen, P. M., Collins, T., Glover, E., González, V., Graf, D., Giribet, G. (2014) Investigating the Bivalve Tree of Life – an exemplar-based approach combining molecular and novel morphological characters. *Invertebrate Systematics*, **28**, 32–115.

Considine, D., Considine, G. (2013) Van Nostrand's Scientific Encyclopedia, 9. izd., Springer Science & Business Media, New York.

Čadež, V., Teskeredžić, E. (2005) Patogeni mikroorganizmi i toksini koje prenose školjkaši iz onečišćenih područja-zoonoze. *Ribarstvo* **63**, 135-145.

Davidson, A. (2014) The Oxford Companion to Food, 3. izd., Oxford University Press, Ujedinjeno Kraljevstvo.

Dos Santos, L.V., de Queiroz, M.V., Santana, M.F., Soares, M.A., de Barros, E.G., de Araújo, E.F., Langin, T. (2012) Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using RetroCl1 sequences. *World J Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1087-1095.

Finnegan, D.J. (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.* **4**, 103-107.

Gaffney, P.M., Pierce JC, Mackinley AG, Titchen DA, Glenn WK (2003) Pearl, a novel family of putative transposable elements in bivalve mollusks. *Journal of molecular evolution* **56**, 308–316.

Gao, Z., Lee, P., Stafford, J.M., von Schimmelmann, M., Schaefer, A., Reinberg, D. (2014) An AUTS2-Polycomb complex activates gene expression in the CNS. *Nature* **516**, 349-354.

Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M. (2011) Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata. *Strukture i funkcije*. Alfa, Zagreb, str. 216-279.

Heitz, E. (1928) Das Heterochromatin der Moose. *I Jahrb Wiss Bot* **69**, 762-818.

Jurka, J., Kapitonov, V.V., Kohany, O., Jurka, M.V. (2007) Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev. Genomics Hum. Genet.* **8**, 241-59.

Kalendar, R., Antonius, K., Smykal, P., Schulman, A.H. (2010) iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor Appl Genet.* **121**, 1419-1430.

Kalendar, R., Vicent, C.M., Peleg, O., Anamthawat-Jonsson, K., Bolshoy, A. (2004) Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes. *Genetics* **166**, 1437-1450.

Kazazian, H.H. Jr (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* **5664**, 1626-1632.

Korlević, M. (2009) Evolucija satelitnih DNA u vrstama oblića roda *Meloidogyne*, diplomski rad (<https://repozitorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf%3A3733/datastream/PDF/view>).

Kourtidis, A., Drosopoulou, E., Pantzartzi, C.N., Chintiroglou, C.C., Scouras, Z.G. (2006) Three new satellite sequences and a mobile element found inside HSP70 introns of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Genome* **49**, 1451–1458.

Koziol, U., Radio, S., Smircich, P., Zarowiecki, M., Fernandez, C., Brehm, K. (2015) A novel terminal-repeat retrotransposon in miniature (TRIM) is massively expressed in *Echinococcus multilocularis* stem cells. *Genome Biol Evol.* **7**, 2136-2153.

Kumar, A., Bennetzen, J.L. (1999) Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet.* **33**, 479-532.

Kwon, S.J., Kim, D.H., Lim, M.H., Long, Y., Meng, J.L. (2007) Terminal repeat retrotransposon in miniature (TRIM) as DNA markers in *Brassica* relatives. *Mol Genet Genomics* **278**, 361-370.

Luchetti, A., Šatović, E., Mantovani, B., Plohl, M. (2016) RUDI, a short interspersed element of the V-SINE superfamily widespread in molluscan genomes. *Mol Genet Genomics* **291**, 1419–1429.

Maraia, R.J., Sarrowa, J., Maraia, R. (1995) The impact of short interspersed elements (SINEs) on the gost genome. *R.G. Landes, Austin* 163-196.

Metode u molekularnoj biologiji, izdavač: Institut Ruđer Bošković, grupa od 119 autora, glavna urednica: Andreja Ambriović Ristov, (2007).

Moran, J.V., Morrish, T.A. (2005) Chromosomes: Noncoding DNA (Including Satellite DNA). U: *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & Sons, London. doi :10.1038/0003823

Murgarella, M., Puiu, D., Novoa, B., Figueras, A., Posada, D., Canchaya, C. (2016) A First Insight into the Genome of the Filter-Feeder Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* **11**(3): e0151561.

Nakatsuka, T., Nishihara, M., Mishiba, K., Hirano, H., Yamamura, S. (2006) Two different transposable elements inserted in flavonoid 3', 5'-hydroxylase gene contribute to pink flower coloration in *Gentiana scabra*. *Mol Gen Genomics* **275**, 231-241.

Neumann, P., Pozarkova, D., Macas, J. (2003) Highly abundant pea LTR retrotransposon OGRE is constitutively transcribed and partially spliced. *Plant Mol. Biol.* **53**, 399-410.

Ohno, S. (1972) So much “junk” DNA in our genome. *Brookhaven Symp. Biol.* **23**, 366-370.

Pearce, S.R., Harrison, G., Li, D., Heslop-Harrison, J.S., Kumar, A., Flavell, A.J. (1996) The Ty1-copia group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 305-315.

Petrov, D.A. (2001) Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet.* **17**, 23-28.

Plohl, M., Luchetti, A., Mestrovic, N., Mantovani, B. (2008) Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* **409**, 72–82.

Plohl, M., Meštrović, N., Mravinac, B. (2012) Satellite DNA evolution. U: *Genome dynamics*. (ured. Garrido- Ramos M) Karger AG, Basel, 126–152.

SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P.S., Edwards, K.J., Lee, M., Avramova, Z., Bennetzen, J.L. (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* **274**, 756-768.

Santana, M.F., Batista, A.D., Ribeiro, L.E., de Araújo, E.F., de Queiroz, M.V. (2013) Terminal repeat retrotransposons as DNA markers in fungi. *Journal of basic microbiology* **53**, 823-827.

Schueler, M.G., Higgins, A.W., Rudd, M.K., Gustashaw, K., Willard, H.F. (2001) Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* **294**, 109-115.

Shirasu, K., Schulman, A.H., Lahaye, T., Schulze-Lefert, P. (2000) A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Res.* **10**, 908-915.

Sweetser, W. (2009) *The Connoisseur's Guide to Fish & Seafood*, 1. izd., Sterling, United States.

Šatović, E. (2013) Organizacija ponovljenih sekvenci DNA u genomima tri vrste školjkaša, doktorska dizertacija

(http://rektorat.unios.hr/molekularna/dokumenti/storage/završeni_doktorati/eva_satovic.pdf).

Šatović, E., Plohl, M. (2013) Tandem repeat-containing MITEs in the clam *Donax trunculus*. *Genome Biol Evol* **5** (12), 2549-2559.

Šatović, E., Plohl, M. (2017) Two new miniature inverted-repeat transposable elements in the genome of the clam *Donax trunculus*. *Genetica* **145**, 379-385.

Šatović, E., Vojvoda Zeljko, T., & Plohl, M. (2018). Characteristics and evolution of satellite DNA sequences in bivalve mollusks. *The European Zoological Journal*, 85(1), 95–104.

Takeuchi, T., Kawashima, T., Koyanagi, R. (2012) Draft genome of the pearl oyster *Pinctada fucata*: a platform for understanding bivalve biology. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **19**, 117–130.

Vicient, C.M., Suoniemi, A., Anamthawat-Johnson, K., Tanskanen, J., Beharav, A., Nevo, E., Schulman, A.H. (1999) Retrotransposon BARE-1 and Its Role in Genome Evolution in the Genus *Hordeum*. *Plant cell* **11**, 1769-1784.

Wessler, S.R. (2006) Transposable elements and the evolution and the evolution of eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 17600-17601.

Wicker, T., Sabot, F. Hua-Van, A., Benntzen, J.L., Capy, P. (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* **8**, 973-982.

Witte, C.P., Le, Q.H., Bureau, T., Kumar, A. (2001) Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13778–13783.

Yang, T.J., Kwon, S.J., Choi BS (2007) Characterization of terminal-repeat retrotransposon in miniature (TRIM) in *Brassica* relatives. *TAG. Theoretical and applied genetics* **114**, 627–636.

Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R.L., Benedetti, E., Grompe, M., Koteliansky, V., Sharp, P.A., Jacks, T., Anderson, D.G. (2014) Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol* **32**, 551-553.

Zhang, G., Fang, X., Guo, X. (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**, 49–54.

Zhou, Y., Cahan, S.H. (2012) A novel family of terminal-repeat retrotransposon in miniature (TRIM) in the genome of the red harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*. *PloS one* **7**: e53401.

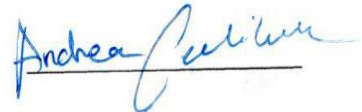
7. PRILOZI

POPIS KRATICA I PUNIH NAZIVA KORIŠTENIH KEMIJSKIH SPOJEVA

CDP-Star	dinatrij 2-kloro-5-(4-metoksi-spiro{1,2-dioksetan-3,2'-(5'-kloro) triciklo [3.3.1.1 ^{3,7}]dekan}-4-il)-1-fenil fosfat
DIG	Digoxigenin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	Etilen diamin tetraoctena kiselina
Gb	giga baza
IPTG	Izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
Mb	mega baza
mQ H ₂ O	deionizirana destilirana voda
pb	parova baza
PBS	<i>Primer binding site</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (lančana reakcija polimerazom)
PPT	<i>Polypurine tract</i>
RNA	ribonukleinska kiselina
Rpm	revolutions per minute (broj okretaja po minuti)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (natrijev dodecil-sulfat)
TDR	<i>Terminal direct repeat</i> (terminalna direktna ponavljanja)
TRIM	<i>Terminal-repeat retrotransposons in miniature</i>
Tween20	polisorbat 20-surfraktant
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -galaktozid

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink, reading "Andrea Cutilane", written over a horizontal line.

Ime i prezime studenta