

Utišavanje gena Scarlet metodom RNA interferencije kod rakova porodice Asellidae (Crustacea: Isopoda)

Kuzman, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:361224>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Martina Kuzman

**Utišavanje gena *Scarlet* metodom RNA
interferencije kod rakova porodice Asellidae
(Crustacea: Isopoda)**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Martina Kuzman

**Silencing of the *Scarlet* gene using RNA
interference in asellid crustaceans
(Crustacea: Isopoda: Asellidae)**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu genetiku, na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Helene Bilandžije, te komentorstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentale biologije.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Heleni Bilandžiji na mentorstvu, pruženoj prilici i strpljenju kroz cijeli ovaj proces, dr. sc. Jani Bedek na svom trudu, strpljenju, prenesenom znanju i suradnji, prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na komentorstvu, doktorandici Ladi Jovović na dizajniranju početnica gena *Scarlet* vrste *P. coxalis*, doktorandici Luciji Kauf na strpljenju i pomoći, ostalim doktorandicama iz Laboratorija za molekularnu genetiku na svojoj pomoći, te obitelji, prijateljima i partneru na podršci kroz studiji.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utišavanje gena *Scarlet* metodom RNA interferencije kod rakova porodice Asellidae (Crustacea: Isopoda)

Martina Kuzman

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

RNA interferencija je metoda kojom se, unosom dsRNA u organizam, uzrokuje utišavanje gena degradacijom ciljane mRNA. Na rakovima je to sve učestalija metoda istraživanja funkcije gena te je najbolja metoda unosa dsRNA mikroinjektiranje. Jednakožni slatkovodni rakovi vrste *Asellus aquaticus* i *Proasellus coxalis* pokazuju iznimnu fenotipsku plastičnost pigmentacije tijela. U pigmentaciju tijela jednakožnih rakova su uključeni omokromi; molekule koje nastaju od aminokiseline triptofana. U put biosinteze omokroma su uključeni enzimi i ABC transporteri, jedan od kojih je i protein Scarlet. U ovom istraživanju sam uz pomoć RNA interferencije, mikroinjektiranjem dsRNA gena *Scarlet* u organizam navedenih životinja pokušala utišati gen *Scarlet* i na taj način uzrokovati fenotipsku promjenu smanjenja pigmentacije tijela. Kod vrste *A. aquaticus* mikroinjektiranjem dsRNA gena *Scarlet* za vrijeme presvlačenja došlo je do značajnog smanjenja pigmentacije tijela. Mikroinjektirane jedinke vrste *P. coxalis* imale su visoku smrtnost, ali je primijećen trend posvijetljenja pigmentacije tijela. Najbolji efekt primijećen je kod jedinki mikroinjektiranih za vrijeme presvlačenja kod obje vrste.

Ključne riječi: dsRNA, omokromi, *Asellus aquaticus*, *Proasellus coxalis*, mikroinjektiranje, (58 stranica, 35 slika, 19 tablica, 40 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Helena Bilandžija
Komentor: prof. dr. dc. Domagoj Đikić

Ocjenitelji:
Prof. dr. sc. Domagoj Đikić
Prof. dr. sc. Biljana Balen
Izv. prof. dr. sc. Dubravko Pavoković

Rad prihvaćen: 06.09.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Silencing of the *Scarlet* gene using RNA interference in asellid crustaceans (Crustacea: Isopoda: Asellidae)

Martina Kuzman

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

RNA interference is a method used for silencing specific genes by introducing dsRNA into the organism which causes degradation of the target mRNA. This method is increasingly used for understanding the functions of genes in Crustaceans, and it was shown that the best method of introducing the dsRNA is by microinjection. Isopods *Asellus aquaticus* and *Proasellus coxalis* show high levels of phenotypic plasticity in body pigmentation. Ommochromes, molecules biosynthesized from the amino acid tryptophan, are responsible for body pigmentation in isopods. The ommochrome biosynthesis involves different enzymes and ABC transporters, including the protein Scarlet. Here, I tried to silence the *Scarlet* gene using RNA interference by microinjecting dsRNA in the organisms of the two above mentioned species. I expected this would cause a change in body pigmentation which would be shown as brightening of body color. In *A. aquaticus* microinjecting the dsRNA of the *Scarlet* gene in animals which were in moulting showed a significant reduction in body pigmentation. Microinjected *P. coxalis* showed high levels of mortality, but a trend of reduction in body pigmentation was noticed. The best effect was shown in animals which were in moulting at the time of microinjecting.

Keywords: dsRNA, ommochromes, *Asellus aquaticus*, *Proasellus coxalis*, microinjection
(58 pages, 35 figures, 19 tables, 40 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: dr. sc. Helena Bilandžija
Co-mentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Reviewers:

Prof. Domagoj Đikić, PhD
Prof. Biljana Balen, PhD
Assoc. Prof. Dubravko Pavoković, PhD

Thesis accepted: 06.09.2024.

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1.1. RNA interferencija.....	1
1.2. Modelni organizmi	3
1.2.1. <i>Proasellus coxalis</i>	4
1.2.2. <i>Asellus aquaticus</i>	5
1.3. Pigmentacija jednakonožnih rakova	6
1.3.1. Biosinteza omokroma	7
CILJ ISTRAŽIVANJA	10
MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. Sinteza dsRNA.....	11
3.1.1. Reverzna transkripcija	11
3.1.2. Početnice gena <i>Scarlet</i> vrste <i>P. coxalis</i>	11
3.1.3. Početnice gena <i>Scarlet</i> vrste <i>A. aquaticus</i>	12
3.1.4. Lančana reakcija polimerazom	12
3.1.5. <i>In vitro</i> transkripcija.....	16
3.1.6. Sinteza dsRNA zelenog fluorescirajućeg proteina	18
3.2. Mikroinjektiranje.....	20
3.2.1. Uvjeti čuvanja životinja.....	20
3.2.2. Odabir životinja za mikroinjektiranje	21
3.2.3. Mikroinjektor	22
3.2.4. Uhodavanje metode	24
3.3. Fotografiranje	25
3.4. Analiza fotografija	26
3.5. Obrada podataka	27
3.6. Statistička analiza.....	28
REZULTATI	29
4.1. Optimalni uvjeti PCR reakcije umnažanja gena <i>Scarlet</i>	29
4.2. Optimalni uvjeti mikroinjektiranja.....	32
4.2.1. Preživljenje vrste <i>A. aquaticus</i> nakon mikroinjektiranja.....	32
4.2.2. Preživljavanje vrste <i>P. coxalis</i> nakon mikroinjektiranja	33

4.2.3. Uvjeti mikroinjektiranja vrste <i>A. aquaticus</i>	34
4.2.4. Uvjeti mikroinjektiranja vrste <i>P. coxalis</i>	35
4.3. RNA interferencija gena <i>Scarlet</i> kod vrste <i>A. aquaticus</i>	35
4.3.1. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki u presvlačenju	35
4.3.2. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki koje nisu u presvlačenju.....	36
4.3.3. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP.....	37
4.3.4. Promjene pigmentacije kroz vrijeme jedinki koje nisu mikroinjektirane.....	38
4.3.5. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 2-3 dana.....	38
4.3.6. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 6-7 dana.....	39
4.3.7. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 9-10 dana.....	40
4.4. RNA interferencija gena <i>Scarlet</i> kod vrste <i>P. coxalis</i>	40
4.4.1. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki u presvlačenju	41
4.4.2. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki koje nisu u presvlačenju.....	42
4.4.3. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP.....	44
4.4.4. Promjene pigmentacije kroz vrijeme jedinki koje nisu mikroinjektirane.....	44
4.4.5. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 2-3 dana.....	45
4.4.6. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 4-5 dana.....	46
4.4.7. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 6-7 dana.....	47
4.4.8. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 9-10 dana.....	48
RASPRAVA.....	50
5.1. Buduća istraživanja.....	52
ZAKLJUČAK.....	53
LITERATURA	54

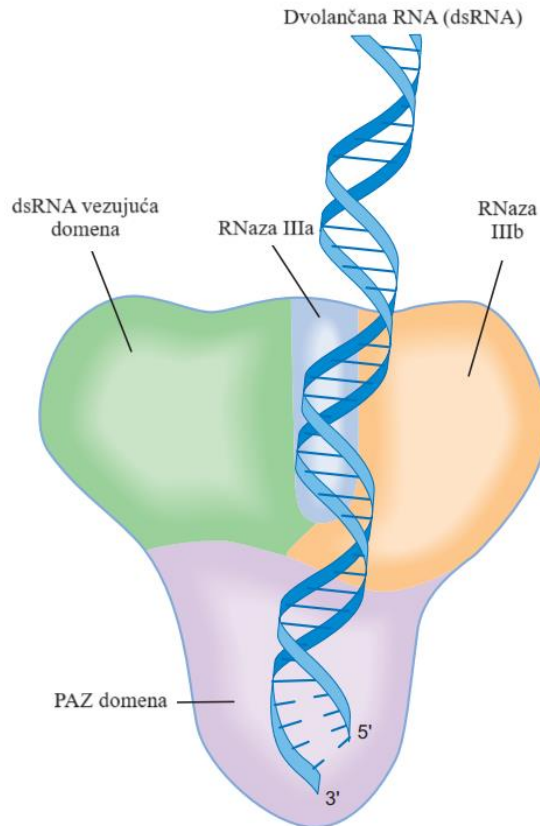
UVOD

Utišavanje gena putem RNA interferencije (dalje RNAi) je sve češće istraživano na rakovima (lat. *Crustacea*), jer su rašireni te nastanjuju različita staništa zbog čega čine odlične modelne organizme za razna istraživanja. RNAi je u kratko vrijeme postala jedna od glavnih metoda istraživanja gena, staničnih procesa i molekularnih mehanizama u rakova. Većina istraživanja napravljena je na deseteronožnim rakovima (lat. *Decapoda*) te postoji nekoliko istraživanja na rašljoticalcima (lat. *Cladocera*) (najviše na vrsti *Daphnia magna* (Straus 1820)) (Kato i sur. 2011; Pamuru i sur. 2012; Sharabi i sur. 2013). Ovakva istraživanja su bitna jer se dobivaju nova znanja o funkcijama gena koji imaju ulogu u razvoju, rastu, metabolizmu, reprodukciji te mnogim drugim funkcijama rakova (Sagi i sur. 2013; Ge i sur. 2020; Lin i sur. 2023). Pokazalo se da je injektiranje dsRNA najefikasnija metoda indukcije RNAi rakovima (Sagi i sur. 2013).

1.1. RNA interferencija

RNAi je molekularna metoda post-transkripcijskog utišavanja (eng. *knock-down* ili *silencing*) gena unošenjem dvolančane RNA (eng. *double stranded RNA*–dsRNA) u organizam. Utišavanje gena putem RNAi je otkriveno kod vrste *Caenorhabditis elegans* (Fire i sur. 1998). Mehanizam rada metode je specifičan za određenu sekvencu i uključuje degradaciju glasničke RNA (eng. *messenger RNA*–mRNA), koja je homologna sekvenci dsRNA (Vastenhouw i sur. 2006; Clark i Pazdernik 2013; Han 2018; Peijie i sur. 2021).

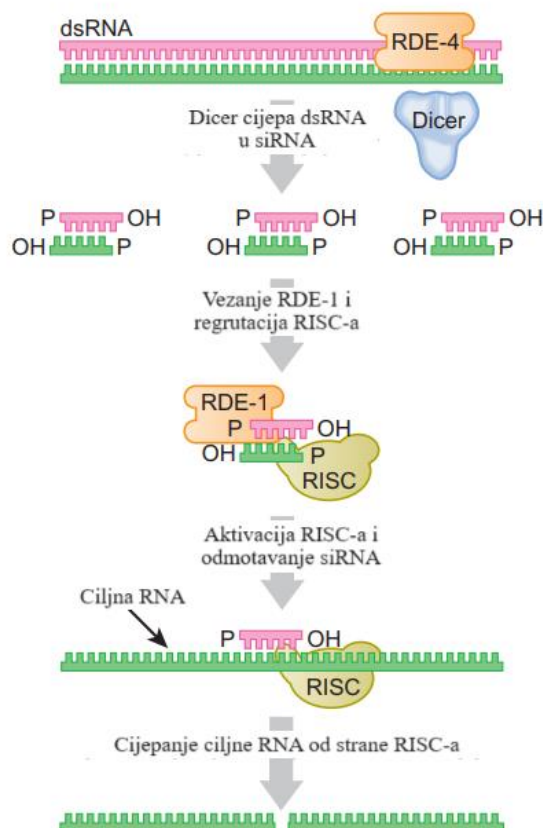
Nakon što se dsRNA unese u organizam, ona se prerađuje u jezgri te prenosi u citoplazmu. U citoplazmi ju prepoznaju vezujući protein RDE-4 (eng. *RNAi DEfective family member-4*) i ribonukleaza Dicer. Dicer je RNaza III koji u RNAi ima ulogu inicijacije procesa obzirom da cijepa dsRNA na male interferirajuće RNA (eng. *small interfering RNA*–siRNA) veličine 21-23 nukleotida (Agrawal i sur. 2003; Han 2018; Alshaer i sur. 2021; Peijie i sur. 2021). Enzim ima četiri domene koje pronalaze, vežu i cijepaju dsRNA (Slika 1). Prva jest dsRNA vezujuća domena, zatim slijedi PAZ domena koja se veže na 3'- nukleotidni privjesak (eng. *overhang*) na ciljnoj sekvenci i pridržava lanac, te dvije RNazne III domene koje cijepaju dsRNA (Agrawal i sur. 2003.; Pushparaj i sur. 2008.; Clark i Pazdernik 2013.).



Slika 1. Domene enzima Dicer (prilagođeno prema Clark i Pazdernik 2013)

Molekule siRNA su male molekule koje se sastoje od dva lanca; putnički lanac (eng. *passenger/ sense strand*) i vodeći lanac (eng. *guide/ antisense strand*), koji je komplementaran sekvenci ciljane mRNA. Nastala siRNA prepoznaje RDE-1 (eng. *RNAi DEfective family member-1*) koji zatim regrutira RNA-inducirani utišavajući kompleks (eng. *RNA-induced silencing complex–RISC*) te se siRNA i RISC spajaju (Pushparaj i sur. 2008; Clark i Pazdernik 2013; Alshaer i sur. 2021). Nukleazna aktivnost kompleksa RISC dio je obitelji Agronaut (Ago). Poznate su tri obitelji proteina nalik Agronautu, a za RNAi je važna obitelj Ago koja veže miRNA i siRNA. Protein Ago je središnja molekula kompleksa RISC koji svojom helikaznom aktivnošću odmotava dvolančane siRNA kako bi se dobili jednolančani kalupi, vodeći lanci. Drugi lanac, putnički, se odbacuje, a vodeći lanac se ukomponira u protein Ago2 dok enzim pretražuje citoplazmu kako bi pronašao komplementarnu sekvencu. Kada RISC pronađe komplementarnu sekvencu mRNA, on uvodi rezove po sredini te mRNA svojom RNaznom III domenom. Nakon što kompleks RISC pocijepa mRNA, dalje ju degradiraju RNaze. Ovaj

mehanizam se odvija u dijelu citoplazme koji se naziva P tijelo. P tijelo je mjesto puno enzima koji degradiraju mRNA (Clark i Pazdernik 2013; Alshaer i sur. 2021). Molekularni proces RNAi je prikazan na slici 2.



Slika 2. Molekularni proces RNA interferencije i djelovanja enzima Dicer i kompleksa RISC (prilagođeno prema Clark i Pazdernik 2013)

1.2. Modelni organizmi

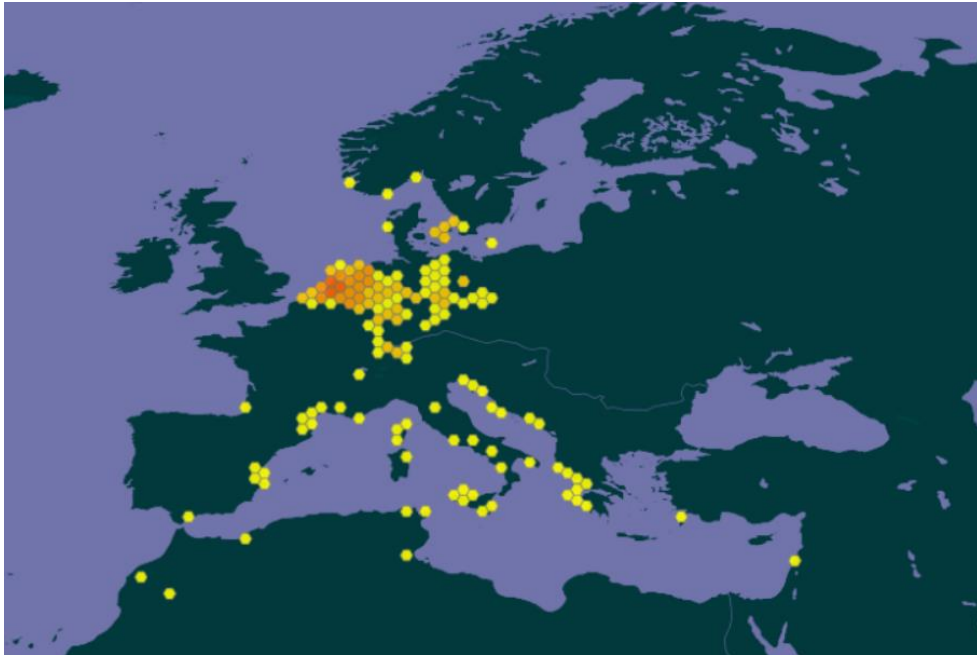
Slatkovodni jednakonožni rakovi (lat. Isopoda) su dorzoventralno spljošteni. Tijelo im je podijeljeno u tri tjelesna odjeljka tj. tagme; prva jest glava (lat. *cephalon*) zatim prsa (lat. *pereion*) te zadak (lat. *pleon*). Glava im je sastavljena od čeljusne glave s kojom je srastao prvi prsni kolutić sa čeljusnim nožicama. Prsa im imaju sedam odjeljaka/ tergita na kojima su noge za hodanje. Zadak je kratak, no na njemu su pleopodi koji služe za disanje, uropodi i gonade. Najpoznatiji predstavnik skupine jest vrsta *Asellus aquaticus* (Linnaeus 1758) (Habdija i sur. 2011).

1.2.1. *Proasellus coxalis*

Slatkovodni jednakonožni rakovi (lat. *Isopoda*) vrste *Proasellus coxalis* (Dollfus 1892) su životinje veličine 5-10 mm, smeđe boje, ponekad i bež (Slika 3). Rakovi vrste *P. coxalis* je opisao Dollfus 1892. godine prema jedinkama skupljenima na Srednjem istoku (Wouters i Vercauteren 2009). Nastanjuju estuarije i rijeke Mediteranskog mora. Vrsta se nalazi i u zapadnoj Europi gdje se vjeruje da je došla slučajno prijenosom brodovima pa se smatra invazivnom (Slika 4). Nisu najbolji plivači pa se nalaze u makrozoobentosu gdje se hrane organskim tvarima, te preferiraju vode sa slabijom strujom ili stajačice (VLIZ 2020).



Slika 3. Vrsta *Proasellus coxalis* (foto M. Kuzman)



Slika 4. Raširenost vrste *P. coxalis* (GBIF 2023)

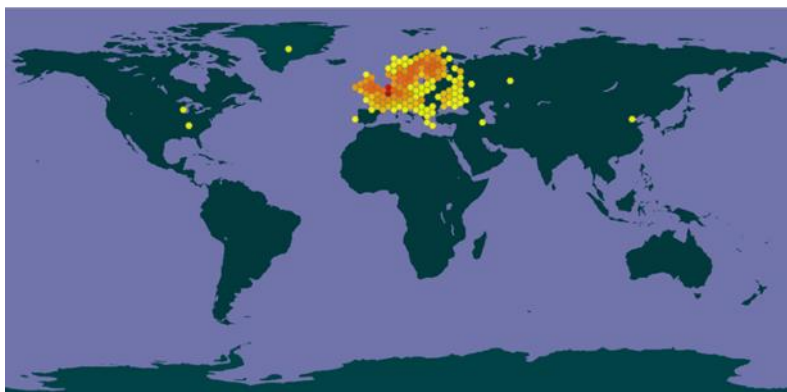
1.2.2. *Asellus aquaticus*

Asellus aquaticus (Linneaus 1758) je vrsta jednakonožnih rakova poznatih kao vodena uš ili vodenbabura (Slika 5). Rakovi su veličine 8-12 mm, tamno smeđe do sivkaste boje (Wouters i Vercauteren 2009).



Slika 5. Vrsta *Asellus aquaticus* (foto M. Kuzman)

Vrsta nastanjuje širok spektar umjetnih i prirodnih vodenih staništa (jezera, rijeke, potoci, ribnjaci) većinom u Europi (Slika 6) te je primijećeno da se vrsta fenotipski međusobno razlikuje ovisno o staništu. Rakovi vrste *A. aquaticus* su široko rasprostranjeni zbog mogućnosti da se prilagode različitim stresnim okolišnim čimbenicima (Verovnik i sur. 2005; Lafuente i sur. 2021).



Slika 6. Raširenost vrste *A. aquaticus* (GBIF 2023)

Vrsta *A. aquaticus* je fenotipski izuzetno varijabilna unutar i među generacijama te među populacijama koje nastanjuju podzemna staništa i onih koji nastanjuju nadzemna. Špiljske populacije i špiljske srodne vrste imaju potpuni ili djelomični nedostatak omatidija u oku, tjelesna pigmentacija im je vrlo varijabilna te može biti jako reducirana ili čak odsutna (Protas i sur. 2011; Mojaddidi i sur. 2018; Re i sur. 2018; Lafuente i sur. 2021; Baković i sur. 2021; Rodas i sur. 2023).

Vrsta predstavlja dobar modelni organizam obzirom da se brzo razmnožava te se nakon sakupljanja iz prirode dobro održava u laboratoriju za korištenje u istraživanjima (Lukić i sur. 2024). Koristi se kao modelni organizam za istraživanja u molekularnoj biologiji, ekotoksikologiji, ekologiji i mnogim drugim područjima, a obzirom da je većina genoma mapirana vrsta je i dobar model za istraživanja u području genetike i molekularne evolucije (Protas i sur. 2011; Re i sur. 2018; Lafuente i sur. 2021).

1.3. Pigmentacija jednakonožnih rakova

Pigmentacija jednakonožnih rakova je vrlo varijabilna, nadzemne vrste su obično svijetlo do tamno smeđe boje dok su podzemne vrste obično bezbojne ili slabije obojene (Lafuente i sur.,

2021). Za pigmentaciju jednakonožnih rakova su zaslužni omokromi (Needham 1970; Jovović i sur. nije objavljeno). Omokromi su vrsta pigmenata i boja (eng. *chrome*) koji nastaju od aminokiseline triptofana te predstavljaju krajnji produkt njegova metabolizma (Insausti i Casas 2009). Nalaze se u integumentu jednakonožnih rakova (Needham 1970).

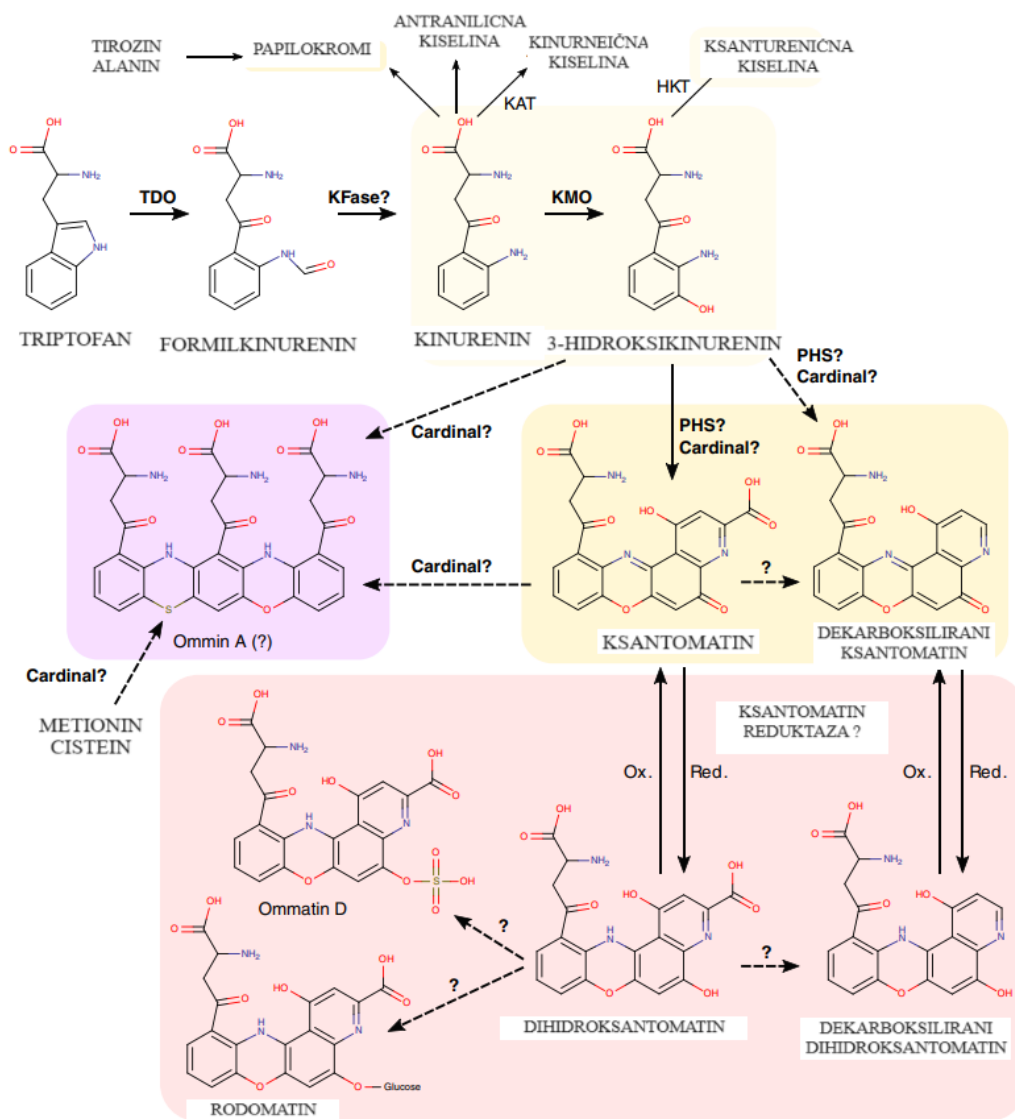
1.3.1. Biosinteza omokroma

Omokromima pripadaju tri obitelji molekula; omatini, omidini i omini. Oni su temeljeni ili na fenoksazonu (omatini) ili na fenotiazinskim prstenovima (omini i omidini). Neki omokromi su i dekarboksilirani oblici ksantomatina i H₂-ksantomatina. Najčešće se nalaze u omatidijama insekata ili u očima glavonožaca. Obojenja povezana s omokromima i njegovim prekursorima imaju ulogu u mimikriji, promjeni obojenja, kripsi i drugim funkcijama povezanim s obojenjem, a boja im najčešće varira od blago žute (ksantomatin) do smeđe do jarko crvene (H₂-ksantomatin) ili ljubičaste (omini) (Figon i Casas 2018).

Put sinteze omokroma se naziva triptofan–omokromski put. Biosinteza je povezana sa sazrijevanjem omokromasoma. Omokromasomi su dio obitelji organela povezanih s lizosomom (eng. *lysosome-related organelles (LROs) family*) koja uključuje i druge pigmentne organele. Nalaze se često blizu mitohondrija te imaju ulogu skladištenja omokroma (Linzen 1974; Figon i Casas 2018).

Nakon ili istovremeno s formacijom omokromasoma počinje i biosinteza omokroma (Slika 7). Sinteza započinje unosom triptofana u pigmentnu stanicu. Put započinje katalizacijom aminokiseline triptofan pomoću enzima triptofan 2,3 dioksigenaze (eng. *tryptophan 2,3-dioxygenase*–TDO) te nastaje formilkinurenin. Formilkinurenin zatim prelazi u kinurenin uz enzim kinurenin fomamidazu (eng. *kynurenine formamidase*–KFaza) ili spontano. Zatim kinurenin prelazi ili u antraniličnu kiselinu ili u kinureničnu kiselinu preko enzima 3-hidroksikinurenin transaminazu (eng. *3-hydroxykynurenine transaminase*–HKT) i kinurenin aminotransferazu (eng. *kynurenine aminotransferase*–KAT). Tijekom sinteze omokroma kinurenin prelazi u 3-hidroksikinurenin, što je katalizirano enzimom kinurenin 3-monooksigenaza (eng. *kynurenine 3-monooxygenase*–KMO). Potreban je nastanak dvije molekule 3-hidroksikinurenina koje će se kondenzirati u ksantomatin. To se događa ili spontano ili uz enzim fenooksazon sintazu (eng. *phenoxazone synthase*–PHS). Nastaje fenoksazonski prsten koji je ketonski derivat fenoksazina. Redoks reakcijom može nastati dihidroksantomatin

koji glikozilacijom prelazi rodomatin (dodatak glukoze) ili sulfonizacijom prelazi u omatin D (dodatak sumpora-S). Iz dihidroksantomatina može nastati i omin A za čiji su nastanak potrebne aminokiseline metionin i cistein (koje imaju atom S). Enzim koji katalizira zadnji korak nastanka omina naziva se kardinal (eng. *cardinal*) te koristi 3-hidroksikinurenin ili ksantomatin kao supstrat te formira ominu iz omatina i metionina/cisteina (Linzen 1974; Figon i Casas 2018).

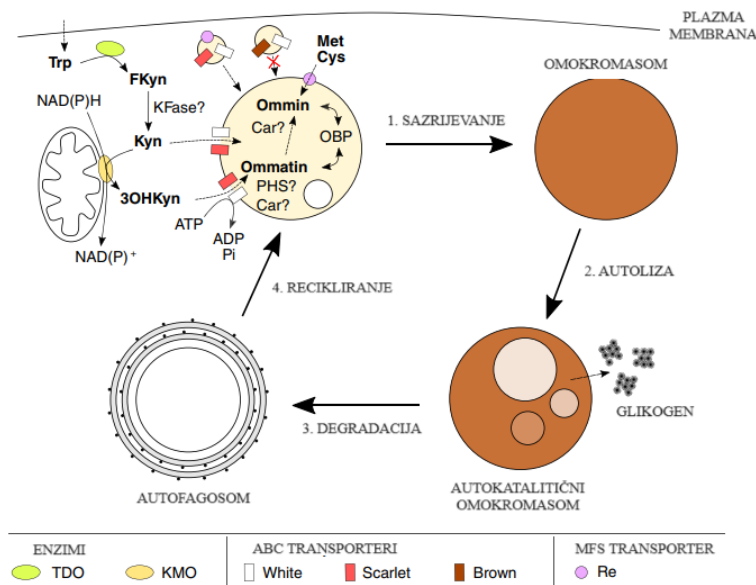


Slika 7. Proces biosinteze omokroma (prilagođeno prema Figon i Casas 2018)

Enzim KMO je lokaliziran na vanjskoj membrani mitohondrija dok su enzimi TDO i KFAza smješteni u citoplazmi (Figon i Casas, 2018). Obzirom na to potrebni su transporteri koji će supstrate prenositi preko membrana. To rade ATP-vezujući kasetni transporteri (eng. *ATP*

binding cassette family (ABC) of transporters). U obitelj ABC transportera pripadaju proteini White, Scarlet, Brown i Ok. Proteini White i Scarlet su lokalizirani na membrani omokromasoma te prenose prekursore omokroma iz citoplazme u lumen omokromasoma, što rezultira stvaranjem smeđeg pigmenta (Ismail i sur. 2020). ABC transporteri transportiraju 3-hidroksikinurenin i pterin, a specifičnost transporta ovih molekula ovisi o heterodimerizaciji proteina White s proteinima Scarlet, Brown ili Ok. Ovi ABC transporteri diktiraju boju omokroma u pigmentnim stanicama (Figon i Casas 2018).

Kao što je već spomenuto, sinteza omokroma je povezana sa sazrijevanjem omokromasoma. Proteini koji vežu omokrome tvore proteinski matriks unutar omokromasoma. Tijekom sazrijevanja se omokromasomi mogu spojiti sa transportnim vezikulama koje prenose protein White/ Scarlet, no protein Brown se ne može spojiti jer je on u kombinaciji s proteinom White specifičan za pterinosome. Omokromasomi u svom putu prolaze i reciklažu tako da nakon sazrijevanja postaju autokatalitički te potiču stvaranje glikogena u citoplazmi. Zatim se stvara autofagosom no on se ne spaja s lizosomom već se omokromasomi recikliraju i ponovno pune omokromima. Ovaj put je prikazan na slici 8 (Figon i Casas 2018).



Slika 8. Stvaranje i recikliranje omokroma i omokromasoma. 3OHkin (3-hidroksikinurenin); Car (kardinal); FKyn (formilkinurenin); Kyn (kinurenin) (prilagođeno prema Figon i Casas 2018)

CILJ ISTRAŽIVANJA

Metodološki cilj ovog rada je uspostaviti metodu utišavanja gena metodom RNAi kod jednakonožnih rakova. Hipoteza ovog rada je da će utišavanje gena *Scarlet*, koji sudjeluje u sintezi omokroma, RNAi dovesti do smanjenja ili gubitka pigmentacije kod vrsta *Asellus aquaticus* i *Proasellus coxalis*.

MATERIJALI I METODE

3.1. Sinteza dsRNA

3.1.1. Reverzna transkripcija

Za sintezu dsRNA gena *Scarlet* vrste *Asellus aquaticus* i *Proasellus coxalis* prvo sam reverzno transkribirala prethodno izoliranu RNA obje vrste koja je bila dostupna u Laboratoriju za molekularnu genetiku na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković te pohranjena na -80 °C. Reverznu transkripciju sam radila kako bi dobila komplementarnu DNA (eng. *copy/ complementary DNA*–cDNA) koju ću dalje koristiti u reakcijama lančane reakcije polimerazom (eng. *Polimerase chain reaction*–PCR). Reverznu transkripciju sam napravila po protokolu FastGene® Scriptase II cDNA Synthesis kita proizvođača NIPPON Genetics Europe.

Prvo sam pomiješala 500 ng RNA kalupa s 1 µL nasumičnih heksamera. Zatim sam dodala 2 µL deoksinukleotid trifosfata (eng. *deoxynucleotide triphosphate*–dNTP) te vodu bez ribonukleaza (RNaza) do volumena 12,5 µL. Smjesu sam ugrijala na 65 °C pet minuta kako bi došlo do denaturacije RNA, te brzo ohladila na ledu. Zatim sam dodala 4 µL 5x FastGene® Scriptase II pufera, 2 µL 0.1M ditionitriola (DTT) te 0,5 µL inhibitora RNaza. Nakon toga sam smjesu inkubirala na 25 °C dvije minute, ohladila na ledu i dodala 1 µL FastGene® Scriptase II. Zatim je uslijedila inkubacija na 42 °C 50 minuta tokom koje se dogodila sinteza cDNA, te još jedna inkubacija na 70 °C 15 minuta kako bi enzim prestao djelovati. Nakon sinteze, cDNA sam spremila na -20 °C do daljnjeg korištenja.

3.1.2. Početnice gena *Scarlet* vrste *P. coxalis*

Početnice za umnažanje gena *Scarlet* vrste *P. coxalis* su već dizajnirane i dostupne u Laboratoriju za molekularnu genetiku na Zavodu za molekularnu biologiju na Institutu Ruđer Bošković. Te početnice su dizajnirane na način da sadrže, na *forward* (F) sekvenci, privjesak (eng. *overhang*) koji odgovara promotoru za SP6, te na *reverse* (R) sekvenci, privjesak koji odgovara promotoru za T7. Sekvence *forward* i *reverse* početnica su sljedeće:

F GAGTATTTAGGTGACACTATAGGCGGATGTGGTTGTTGATGG

R GAGTAATACGACTCACTATAGGGTAGCTGGGCACTTGTGGTTC

Početnice sadrže privjesak koji odgovara promotoru za SP6 (F) i privjesak koji odgovara promotoru T7 (R) koji su označeni zelenom bojom, specifičnu sekvencu za gen od interesa (crno) te vodeću sekvencu (crveno). Finalni umnoženi produkt metodom PCR dug je 571 bazni par.

3.1.3. Početnice gena *Scarlet* vrste *A. aquaticus*

Početnice za vrstu *A. aquaticus* sam dizajnirala na temelju sekvence gena *Scarlet* koju sam izvadila iz transkriptoma dostupnih u Laboratoriju za molekularnu genetiku na Zavodu za molekularnu biologiju na Institutu Ruđer Bošković. To sam napravila u programu Geneious (Dotmatics, Novi Zeland). Početnice su dizajnirane na način da sadrže privjesak za dio T7 promotora koji će se produžiti kroz dvije PCR reakcije. U prvoj PCR reakciji koristila sam početnice koje sam dizajnirala, a u drugoj početnice s kompletnom sekvencom T7 promotora. Sekvence početnica koje sam dizajnirala su sljedeće:

F **CACTATAGGGAGG**CAATTGTTGACTCGTACCG

R **CACTATAGGGAGG**GTATCGTCTCGAATATCGC

Početnice sadrže privjesak s dijelom T7 promotora koji su označeni crvenom bojom i gen od interesa (crno) te je finalni umnoženi produkt PCR reakcije dug 455 baznih parova.

3.1.4. Lančana reakcija polimerazom

Nakon sinteze cDNA obje vrste, sekvencu gena *Scarlet* sam umnožila metodom PCR koristeći dizajnirane početnice.

Prvo sam trebala odrediti koju polimerazu koristiti te na kojoj temperaturi će se najbolje vezati dizajnirane početnice. Napravila sam PCR reakciju koristeći tri polimeraze u MasterMix-u; Phusion High-Fidelity PCR MM w/HF buffer (Thermo Scientific™), GoTaq® G2 Colorless MasterMix (Promega) i ALLIn™ HS Red Taq Master Mix (HighQu). Za svaki MasterMix sam odredila temperaturu vezanja početnica (eng. *melting temperature*–TM) preko kalkulatora za TM na internetskim stranicama proizvođača. TM vezanja početnica Phusion High-Fidelity PCR MM-a proizvođača Thermo Fisher Scientific izračunala sam preko Thermo Fisher TM kalkulatora (Thermo Fisher Scientific Inc. 2006-2024). TM vezanja početnica GoTaq® G2 Colorless MasterMix-a proizvođača Promega izračunala sam preko Promega TM kalkulatora (Promega Corporation 2024). TM vezanja početnica ALLIn™ HS Red Taq Master Mix-a proizvođača

HighQu izračunala sam prema uputama protokola korištenja (highQu GmbH ® 2024). Raspon temperatura korišten za Phusion PCR MM jest 51 °C–63 °C, za GoTaq MasterMix 52 °C– 64 °C, te za HS Red Taq MasterMix 55 °C– 65 °C. Kao kontrolu sam koristila 16S početnice koje su bile dostupne u Laboratoriju za molekularnu genetiku te je već ispitano njihovo umnažanje PCR reakcijom na cDNA obje vrste. U tablicama 1-6 se mogu vidjeti koncentracije i volumeni korišteni za ovu PCR reakciju te uvjeti PCR reakcije za svaki MasterMix.

Tablica 1. Komponente PCR reakcije Phusion PCR MM

Phusion MM		Scarlet/ 16S	
Komponenta		5 µL	10x
Forward	početnica	0,25	2,5
Reverse	početnica	0,25	2,5
Phusion	PCR MM	2,5	25
Voda bez RNaza		1,5	15
DNA kalup (cDNA)		0,5	5

Tablica 2. Uvjeti PCR reakcije Phusion PCR MM

PCR UVJETI Phusion			
Korak	Temperatura	Vrijeme	
Inicijalna denaturacija	98 °C	30 s	
Denaturacija	98 °C	10 s	
Vežanje početnica	Gradijent (51 °C-63 °C)	20 s	35x
Produljivanje	72 °C	25 s	
Finalno produljivanje	72 °C	7 min	
Kraj	4 °C	inf.	

Tablica 3. Komponente PCR reakcije GoTaq MasterMix

GoTaq MM	Scarlet/ 16S	
Komponenta	5 μL	10x
Forward početnica	0,25	2,5
Reverse početnica	0,25	2,5
GoTaq MasterMix	2,5	25
Voda bez RNaza	1,5	15
DNA kalup (cDNA)	0,5	5

Tablica 4. Uvjeti PCR reakcije GoTaq MasterMix

PCR UVJETI GoTaq			
Korak	Temperatura	Vrijeme	
Inicijalna denaturacija	95 °C	2 min	
Denaturacija	95 °C	45 s	
Vežanje početnica	Gradijent (52 °C-64 °C)	45 s	35x
Produljivanje	72 °C	45 s	
Finalno produljivanje	72 °C	7 min	
Kraj	4 °C	inf.	

Tablica 5. Komponente PCR reakcije HS Red Taq MasterMix

HS MM	Scarlet/ 16S	
Komponenta	5 μL	10x
Forward početnica	0,2	2
Reverse početnica	0,2	2
HS Red Taq MasterMix	2,5	25
Voda bez RNaza	1,6	16
DNA kalup (cDNA)	0,5	5

Tablica 6. Uvjeti PCR reakcije HS Red Taq MasterMix

PCR UVJETI HS		
Korak	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	95 °C	1 min
Denaturacija	95 °C	15 s
Vežanje početnica	Gradijent (55 °C-65 °C)	15 s
Produljivanje	72 °C	15 s
Kraj	4 °C	inf.

Dobiveni PCR produkt sam provjerila na 1,5%-tnom agaroznom gelu elektroforezom te sam ga pročistila kolonicama koristeći QIAquick® PCR Purification Kit prema protokolu. Dodala sam pet puta volumena pufera koji veže jednolančane ili dvolančane produkte PCR reakcija u jedan volumen PCR produkta i promiješala. Stavila sam QIAquick kolonicu u tubicu za sakupljanje od 2 mL. Smjesu pufera i PCR produkta sam prebacila u QIAquick kolonicu kako bi se vezala DNA, te sam centrifugirala 60 s na 17,900 x g (13,000 rpm). Bacila sam supernatant i vratila QIAquick kolonicu u istu tubicu za sakupljanje. Zatim sam u kolonicu dodala 750 µL pufera za ispiranje, centrifugirala 60 s na 17,900 x g (13,000 rpm), bacila supernatant i vratila QIAquick kolonicu u istu tubicu za sakupljanje. QIAquick kolonicu u tubici za sakupljanje od 2 mL sam još jednom centrifugirala 60 s na 17,900 x g (13,000 rpm) kako bi uklonila ostatak pufera za ispiranje. Nakon toga sam prebacila kolonicu u čistu tubicu od 1,5 mL. Kako bi eluirala DNA, dodala sam 30 µL pufera za eluaciju, ostavila da stoji jednu minutu te centrifugirala 60 s na 17,900 x g (13,000 rpm). Nakon pročišćivanja PCR produkta mjerila sam koncentraciju dobivene dsDNA na instrumentu Denovix Nanodrop DS-11 FX+ (DeNovix Inc., SAD).

Za vrstu *P. coxalis* dalje sam koristila pročišćeni PCR produkt kao kalup u reakciji *In vitro* transkripcije (dalje IVT), dok je za vrstu *A. aquaticus* bilo potrebno napraviti još jednu PCR reakciju s početnicom koja sadrži kompletni T7 promotor kako bi se produžio privjesak T7. U drugoj PCR reakciji sam kao kalup koristila pročišćeni PCR produkt prethodne PCR reakcije. Volumeni i koncentracije te uvjeti PCR reakcije su prikazani u tablicama 7 i 8. U reakciji je korišten NZYTaq II 2x Green Master Mix proizvođača NZYtech.

Tablica 7. Komponente druge PCR reakcije za vrstu *A. aquaticus*

Komponenta	Volumen 50 µL
T7 promotor početnica	3,2
NZYTaq II MasterMix	32
Voda bez RNaza	12,8
DNA kalup (PCR I produkt)	2

Tablica 8. Uvjeti druge PCR reakcije za vrstu *A. aquaticus*

PCR UVJETI		
Korak	Temperatura	Vrijeme
Počtna denaturacija	95 °C	3 min
Denaturacija	94 °C	30 s
Vežanje početnica	43°C	30 s
Produljivanje	72 °C	45 s
Finalno produljivanje	72 °C	5 min
Kraj	12 °C	inf.

Nakon druge PCR reakcije, produkt sam provjerila elektroforezom u 1,5%-tnom agaroznom gelu te sam ga pročistila kolonicama koristeći QIAquick® PCR Purification Kit prema već prikazanom protokolu.

3.1.5. *In vitro* transkripcija

Reakciju *in vitro* transkripcije sam radila po protokolu za pripremu RNAi za virnjake autorice Annabel Maisl koji je dostupan u Laboratoriju za molekularnu genetiku na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković. Kao DNA kalup sam koristila pročišćeni PCR produkt (*P. coxalis*) te pročišćeni produkt druge PCR reakcije (*A. aquaticus*). U reakciju sam dodala reagense navedene u tablici 9.

Tablica 9. Komponente IVT reakcije

Komponenta	Volumen za 1x (μL)
H ₂ O bez nukleaza	Do 50 μL
10x <i>in vitro</i> transkripcijski pufer (s 250 mM MgCl ₂)	5
25 mM ribonukleotid trifosfat	15
RNAsin (ribonukleazni inhibitor) (1-2U po 1 μL reakcije)	1.25
T7 polimeraza	8.5
Anorganska pirofosfataza	0.75
DNA kalup	Ukupno 1 μg
Dimetil sulfoksid	2.5 (100%)
Ukupno	50

Pufer (10x *in vitro* transkripcijski pufer) sam prvo ugrijala na 37 °C kako bi se spermidin koji se nalazi u puferu otopio i pravilno raspodijelio u otopini. Nadalje, T7 polimerazu sam dodala zadnju obzirom da je ona, prema uputama protokola, osjetljiva na mehaničke podražaje. U IVT reakciji za *A. aquaticus* sam koristila sve navedeno, dok sam u IVT reakciji za *P. coxalis* osim T7 polimeraze koristila i SP6 polimerazu (reakciju sam radila u duplo većem volumenu pa sam dodala 8.5 μL SP6 polimeraze i 8.5 μL T7 polimeraze) obzirom da su početnice za gen *Scarlet* vrste *P. coxalis* dizajnirane tako da imaju na jednoj strani privjesak SP6, a na drugoj strani privjesak T7, dok početnice za *A. aquaticus* imaju privjesak T7 na oba kraja.

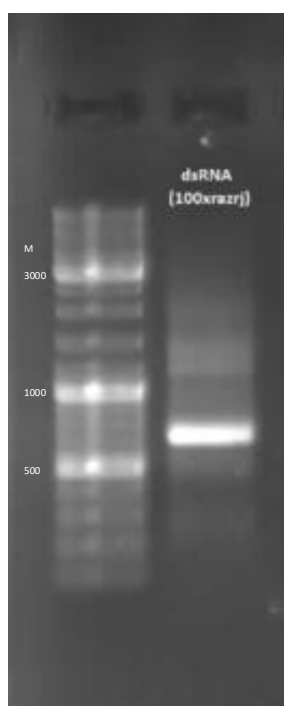
Nakon dodavanja svih komponenti, reakciju sam stavila na inkubaciju na 37 °C preko noći. Zatim slijedi grijanje uzorka na 95 °C 3 minute na Thermo mixer-u uz trešnju 700-900 rpm. Uzorke sam prvo ostavila da se hlade u ugašenom Thermo mixer-u 10 minuta, te ih zatim prebacila na stol kako bi se još 10 minuta hladili na sobnoj temperaturi.

Pročišćivanje uzoraka sam radila precipitacijom uz NaCl/Polietilen glikol (PEG)-8000 (2.5 M NaCl, 20% PEG-8000, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) prema protokolu.

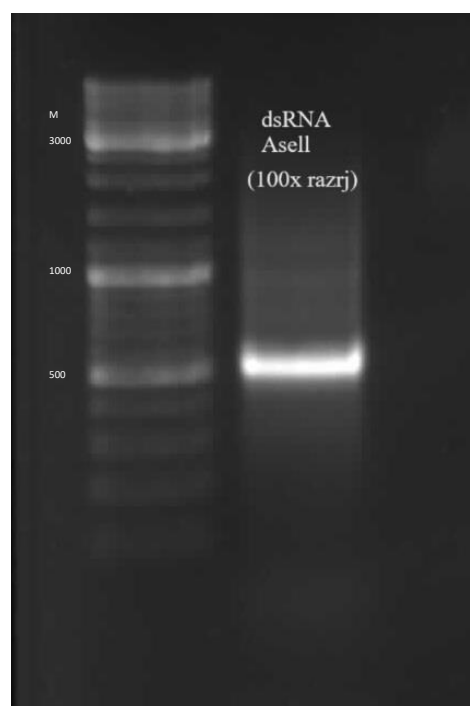
U volumen IVT reakcije sam dodala jednaki volumen NaCl/PEG-8000 otopine, smjesu sam vorteksirala te centrifugirala 20 minuta na 16000 x g na temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja sam bacila supernatant. Pelet sam isprala u 1 mL 70% EtOH, vorteksirala, te

centrifugirala pet minuta na 16000 x g na temperaturi od 4 °C. Bacila sam supernatant te ostavila da se suši na zraku jednu minutu. Pelet sam ponovno suspendirala s vodom očišćenom od RNaza dok ne zaostaje u nastavku za pipetu volumena 20 µL, te sam smjesu ugrijala na Thermo bloku na 50 °C dok se pelet nije otopio.

Nakon što se RNA otopila u vodi, napravila sam razrjeđenje 100x koje sam koristila za analizu dobivene dsRNA na 1.5% agaroznom gelu (Slika 9, 10) te za mjerenje koncentracije na spektrofotometru SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Njemačka). Ostatak dsRNA sam podijelila u tubice i spremila na -80 °C do korištenja.



Slika 9. 100x razrijeđena dsRNA gena *Scarlet* vrste *P. coxalis* na agaroznom gelu (foto M. Kuzman)



Slika 10. 100x razrijeđena dsRNA gena *Scarlet* vrste *A. aquaticus* na agaroznom gelu (foto M. Kuzman)

3.1.6. Sinteza dsRNA zelenog fluorescirajućeg proteina

Kao negativnu kontrolu mikroinjektiranja koristila sam dsRNA zelenog fluorescirajućeg proteina (eng. *green fluorescent protein*–GFP). GFP koristimo jer on nema utjecaj na rakove (Nagaraju i sur. 2011; Wang i sur. 2012), a služi kao kontrola mikroinjektiranja kako bi bila sigurna da stres od mikroinjektiranja ne utječe na smanjenje pigmentacije kod modelnih organizama. Prvo sam

napravila PCR reakciju u kojoj su korištene početnice T7AA18 i PR244, dok je kao DNA kalup korišten pPRT4P eGFP plazmid. I početnice i plazmid su dostupni u Laboratoriju za molekularnu genetiku na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković. Korišten je ALLIn™ HS Red Taq Master Mix proizvođača HighQu te je PCR reakcija postavljena prema uvjetima prikazanim u tablicama 10 i 11.

Tablica 10. Komponente za PCR reakciju proteina GFP

	Volumen
Komponenta	50 µL
Forward početnica	2,5
Reverse početnica	2,5
HS Red Taq Master Mix	25
Voda bez RNaza	10
DNA kalup (plazmid)	10

Tablica 11. Uvjeti PCR reakcije proteina GFP

PCR UVJETI			
Korak	Temperatura	Vrijeme	
Početna denaturacija	95 °C	30 s	
Denaturacija	95 °C	10 s	
Vežanje početnica	58°C	20 s	35x
Produljivanje	72 °C	30 s	
Finalno poroduljivanje	72 °C	5-10 min	
Kraj	14 °C	inf.	

Nakon PCR reakcije, produkt sam provjerila elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu te sam ga pročistila na kolonicama koristeći QIAquick® PCR Purification Kit prema protokolu opisanom na stranici 15. Nakon pročišćivanja sam izmjerila koncentraciju PCR produkta na uređaju Denovix Nanodrop DS-11 FX+ (DeNovix Inc., SAD). te postavila IVT reakciju prema ranije opisanom protokolu (stranica 17). Dobivenu dsRNA sam analizirala elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu, izmjerila sam koncentraciju na spektrofotometru SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Njemačka) te ostatak dsRNA podijelila u tubice i spremila na -80 °C do daljnjeg korištenja.

3.2. Mikroinjektiranje

3.2.1. Uvjeti čuvanja životinja

U Laboratoriju za molekularnu genetiku su dostupne laboratorijske kolonije rakova porodice Asellidae. Rakovi vrste *A. aquaticus* sakupljeni su na lokalitetu Sušik (Drežnica, Hrvatska), dio ih je sakupljen u potoku dok je dio sakupljen u ponoru. Rakovi vrste *P. coxalis* sakupljeni su na lokalitetu kanal Vranskog jezera (Vrana, Hrvatska). Rakove sam čuvala u plastičnim posudama koje sam napunila pripremljenom vodom za životinje. Vodu sam pripremala na način da sam u plastičnoj bačvi od 100 L pomiješala vodu iz slavine (eng. *tap water*, TAP) i vodu koja je prošla reverznu osmozu (RO) (Amtra Osmosis System 190 (Amtra, Njemačka)) kako bi se postigla električna vodljivost od 350-450 μ S. Zatim je voda prolazila kroz UV-C filter za sterilizaciju vode (JBL Procrystal UV-C Compact plus 18 W (JBL, Njemačka)) u intervalima od 30 minuta, 12 sati dnevno (TAP + RO UV voda). Posude s rakovima sam čuvala u inkubatoru (Slika 11) koji održava temperaturu 12 °C (*A. aquaticus*) ili 15 °C (*P. coxalis*) (inkubatori sa sustavom ladica (ST6, ST700; POL-ECO APARATURA, Poljska). U inkubatoru je postavljeno osvjetljenje u ciklusu 12 sati svjetlo – 12 sati mrak (engl. *light-dark*–LD) (Bridgelux® Gen 7 V10 Thrive™ Array (Bridgelux, SAD) (Lukić i sur. 2024).



Slika 11. Inkubator s izmjenom ciklusa osvjetljenja (foto M. Kuzman)

Kao hranu za rakove koristila sam kondicionirano lišće vrste *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn i *Acer* sp.. Rakovima sam redovito mijenjala vodu i dodavala hranu. Alate koje sam koristila za manipulaciju životinjama (meke pincete i kistovi) sam sterilizirala 70% etanolom i vrućom vodom (Lukić i sur. 2024).

3.2.2. Odabir životinja za mikroinjektiranje

Za mikroinjektiranje dsRNA ciljano sam tražila životinje koje su u presvlačenju (eng. *moulting*). Takvim životinjama kutikula puca između četvrtog i petog torakalnog segmenta tj. tergita i odbacuje se u dva dijela. Prvo se odbacuje posteriorni dio kutikule (iza četvrtog tergita), a anteriorni dio kutikule im ostane (Slika 12). Anteriorni dio svlaka životinje odbace nakon 24 do

48 sati od početka presvlačenja (Marcus 1990), no primijetila sam da ga neke jedinke mogu zadržati i do tjedan dana nakon početka presvlačenja.



Slika 12. *Proasellus coxalis* u presvlačenju (može se primijetiti da su prva četiri tergita tamnija od zadnja tri što ukazuje da je jedinka odbacila posteriorni dio svlaka) (foto M. Kuzman)

Birala sam jedinke u presvlačenju jer postoji hipoteza da je najveća sinteza gena *Scarlet* upravo tijekom presvlačenja obzirom da životinje nakon odbacivanja svlaka tamne (Figon i Casas 2018). No takvih jedinki nije bilo mnogo pa sam koristila i jedinke koje nisu bile u presvlačenju, ali sam ih birala da su jednake veličine.

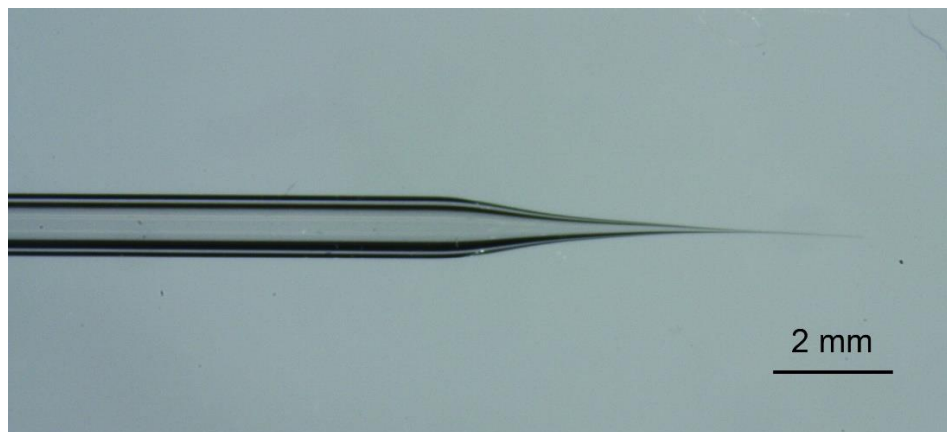
3.2.3. Mikroinjektor

Za mikroinjektiranje sam koristila μ PUMP *Microinjector with Internal Pressure Source* (World Precision Instruments, SAD) (Slika 13). Mikroinjektor koristi regulirani tlak zraka kako bi se otopina injektirala u stanicu. Injektirani volumen otopine varira u spektru od pikolitara do nanolitara. Prije korištenja treba se namjestiti tlak ubrizgavanja (eng. *injection pressure*–IP), kojim se određuje jačina ubrizgavanja otopine, zatim kompenzacijski tlak (eng. *compensation pressure*–CP), koji je važan kako se tekućina ne bi kapilarno vraćala u iglu i trajanje (eng. *duration*–D), prema uputama za korištenje mikroinjektora.



Slika 13. Aparatura za mikroinjektiranje (lupa, mikroinjektor, mikromanipulator) (foto M. Kuzman)

Igle koje sam koristila za mikroinjektiranje su dostupne u Laboratoriju za molekularnu genetiku. Za unos tekućine u iglu sam koristila Eppendorf Microloader nastavke za pipetu. Igle su staklene te se rade tako da se koristi izvlačač igle (eng. *needle puller*) te se izvuku do oko 5-6 cm duljine (Slika 14) (Kowalko, Ma i Jeffery 2016). Lin i sur. (2023) su također za mikroinjektiranje dsRNA u jednakožne rakove koristili staklene igle. Igle se trebaju rezati prije korištenja za mikroinjektiranje te se kalibriraju na lupi kako bi se odredio injektirani volumen. Kalibraciju sam napravila na način da sam, nakon rezanja igle, na povećanju 50x izmjerila promjer kapi preko okulara s mikrometarskom skalom. Taj promjer sam dijelila s 50 kako bi dobila veličinu u prostoru, te sam iz tog broja, preko formule i skale dostupne u uputama za korištenje mikroinjektora, izračunala volumen kapi.



Slika 14. Iгла za mikroinjektiranje dsRNA (preuzeto iz Kowalko, Ma i Jeffery 2016)

3.2.4. Uvodavanje metode

Cilj prvog eksperimenta bio je odrediti optimalne uvjete mikroinjektiranja, kako bi se smanjila smrtnost životinja nakon mikroinjektiranja te kako bih izvježbala samo mikroinjektiranje.

Prvo sam otopila 25 mg crvenog fenola (eng. *phenol red*) proizvođača Alfa Aesar (Thermo Fisher Scientific, SAD) u 50 mL destilirane vode kako bi dobila otopinu crvenog fenola (0,5 mg/mL) pogodnu za mikroinjektiranje. Pripremljenu otopinu crvenog fenola sam čuvala na sobnoj temperaturi do korištenja. Iako se otopina crvenog fenola inače koristi kao pH indikator, ja sam ga koristila kako bi mogla bolje vizualizirati uspješnost injektiranja otopine u životinju (Martin i sur. 2016; Xu i sur. 2019; Lin i sur. 2023).

Eksperiment sam postavila sa 27 jedinki vrste *A. aquaticus* i 59 jedinki vrste *P. coxalis*. Životinje sam prvo anestetizirala koristeći vodenu otopinu eugenola (ulje klinčića) koncentracije za *A. aquaticus* 0,37 $\mu\text{L}/\text{mL}$, a za *P. coxalis* 0,074 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Zatim sam mikroinjektirala otopinu crvenog fenola. Injektirala sam volumene 14,15 pL - 33,51 pL (promjer kapi na 50 x povećaju = 1,5 - 2 mm) kako bi odredila najveći volumen pri kojem životinje ne ugibaju. Volumen i koncentraciju mikroinjektirane dsRNA sam prilagodila prema Lin i sur. (2023) koji su pak uspjeli mikroinjektirati veći volumen dsRNA u životinje. Postavke mikroinjektora sam mijenjala dok nisam dosegla one s kojima sam najlakše probila kutikulu jedinke, a da se kutikula ne ošteti te životinja ne uquine. Počela sam sa IP = 67,1 PSI; CP = 0,01 PSI; D = 0,400 s i mijenjala dok nisam dosegla optimalne postavke. Životinje sam pokušala mikroinjektirati na različita mjesta (između drugog i trećeg tergita, između trećeg i četvrtog te između četvrtog i petog tergita).

Životinje su se nakon injektiranja čuvala u pločicama sa šest bunarića (eng. *six well plate*) napunjenim TAP + RO UV vodom do pola te su imale lišće kao hranu. Čuvala su se u inkubatoru bez izmjene svjetla na 12 °C.

Također sam injektirala životinje dva puta na dva različita mjesta (dvije jedinke vrste *P. coxalis* i osam jedinki vrste *A. aquaticus*). Umjesto vodenom otopinom eugenola, anestezirala sam i pet životinja svake vrste stavljanjem na led (Lin i sur. 2023).

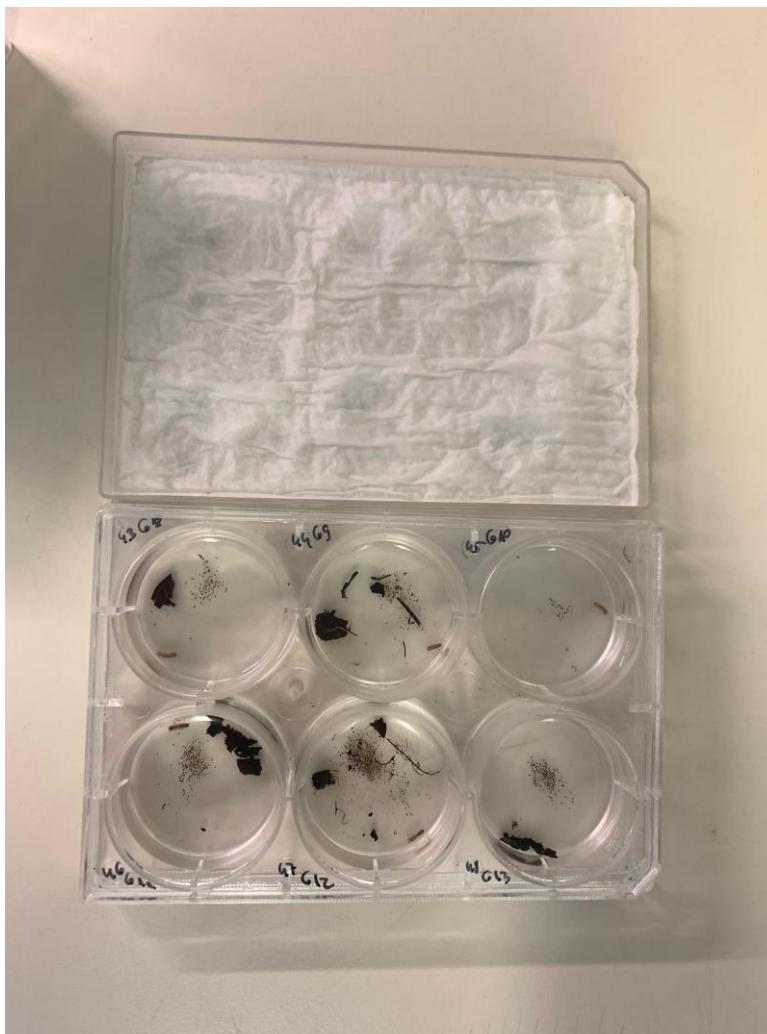
3.3. Fotografiranje

Životinje u eksperimentu sam fotografirala koristeći fotoaparata Canon EOS 250D i bljeskalice Speedlite 430EX III-RT (Slika 15) koji je bio spojen na lupu na povećanju 10-20 x, ovisno o veličini jedinke. Fotoaparat je bio postavljen na ručno fotografiranje (eng. *manual*), ISO 400, F00, 1/60, ravnoteža bijele boje (eng. *white balance*) je postavljena na bljeskalicu, te su se fotografije spremale na prijenosno računalo. Nakon fotografiranja sam ih mikroinjektirala.



Slika 15. Aparatura za mikroinjektiranje (Lupa, mikroinjektor, prijenosno računalo, fotoaparat, bljeskalice) (foto M. Kuzman)

Sve životinje u eksperimentu su prebačene u inkubator bez ciklusa zamjene osvjetljenja te su boravile u pločicama sa šest bunarića koji su bili pokriveni vlažnim papirnatim ručnikom te im je dodano kondicionirano lišće kao hrana (Slika 16). Životinje sam pratila i fotografirala svakih dva do tri dana.



Slika 16. Pločice sa šest bunarića napunjene s vodom, papirnatu ručnik na poklopcu, kondicionirano lišće u bunarićima (foto M. Kuzman)

3.4. Analiza fotografija

Sve fotografije sam analizirala programom ImageJ (National Institutes of Health, Wisconsin, SAD). Obilježja koja sam mjerila jesu pigmentacija tijela i pigmentacija pozadine koju sam mjerila kako bi mogla ujednačiti podatke fotografirane u različito vrijeme (Slika 17).

Pigmentaciju sam mjerila putem srednje vrijednosti sive boje (eng. *mean gray value*–MGV). MGV predstavlja zbroj svih sivih vrijednosti svih piksela na označenom dijelu podijeljen s brojem piksela. Veća MGV vrijednost znači da je jedinka svjetlija, dok manja MGV vrijednost označava da je jedinka potamnija. Odabrane mjere u programu su površina (eng. *Area*), Srednja vrijednost sive boje (eng. *Mean gray value*), minimalna siva vrijednost (eng. *Min gray value*), maksimalna siva vrijednost (eng. *Max gray value*) te sam koristila ROI (eng. *region of interest*) manager kako bi pratila označene dijelove brojevima. Tijekom označavanja sam izbjegavala dijelove gdje je pozadina neujednačena ili postoji sjena, te sam na životinji izbjegavala mjesta gdje je životinja prljava ili postoji odsjaj od blica.



Slika 17. Prikaz obrade podataka pigmentacije programom Image J vrste *A. aquaticus*. Brojevi 1-7 predstavljaju mjerenje MGV (eng. *Mean gray value*) pozadine; Broj 8 predstavlja probavni trakt; Brojevi 9-22 predstavljaju mjerenje MGV tergita (zbroj MGV tergita = MGV tijela) (foto

M. Kuzman)

3.5. Obrada podataka

Podatak o pigmentaciji tijela je dobiven prosječnom vrijednosti MGV desne i lijeve strane tijela koju sam podijelila s prosječnom vrijednosti MGV pozadine. Podatke prosječne vrijednosti MGV

tijela sam dijelila s prosječnom vrijednosti MGV pozadine kako bi ujednačila tj. normalizirala fotografije obzirom da su fotografije bile neujednačene iako su se koristile iste postavke svaki put.

3.6. Statistička analiza

Podatke sam testirala za normalnost distribucije pomoću testa Shapiro-Wilk. Razlike u promjeni istraživanog fenotipa među skupinama sam utvrdila testom Repeated measures ANOVA i uz Bonferroni i Holm post-hoc testove. Rezultate promjene pigmentacije nakon mikroinjektiranja sam popratila kroz vremenski slijed od 10 dana (0 dan, 2-3 dana, 4-5 dana, 6-7 dana i 9-10 dana). Zasebno sam obradila podatke za jedinke koje su mikroinjektirane s dsRNA gena *Scarlet*, u vremenu presvlačenja, za jedinke mikroinjektirane sa dsRNA izvan vremena presvlačenja kao i za kontrolne jedinke: one injektirane proteinom GFP te one koje nisu bile mikroinjektirane. Također sam međusobno usporedila podatke za 2-3 dana, 4-5 dana, 6-7 dana i 9-10 dana između četiri grupe jedinki (jedinke u presvlačenju, jedinke koje nisu u presvlačenju, GFP i negativna kontrola). Treba napomenuti da za sve vremenske periode nisu korišteni podatci istih jedinki već sam kombinirala ovisno kakve podatke i koliko njih sam imala, neke jedinke su praćene kroz sve vremenske periode te su korišteni u analizi dok su neki dodatno dodani jer iz njihove skupine nije ostalo puno preživjelih za analizu. Podatke za vrstu *P. coxalis* sam usporedila na isti način, no nisam koristila MGV cijelog tijela već sam za svaku jedinku izvukla podatke ta svaki tergite posebno (njih sedam) i te podatke sam koristila za usporedbu po grupama kao za vrstu *A. aquaticus*.

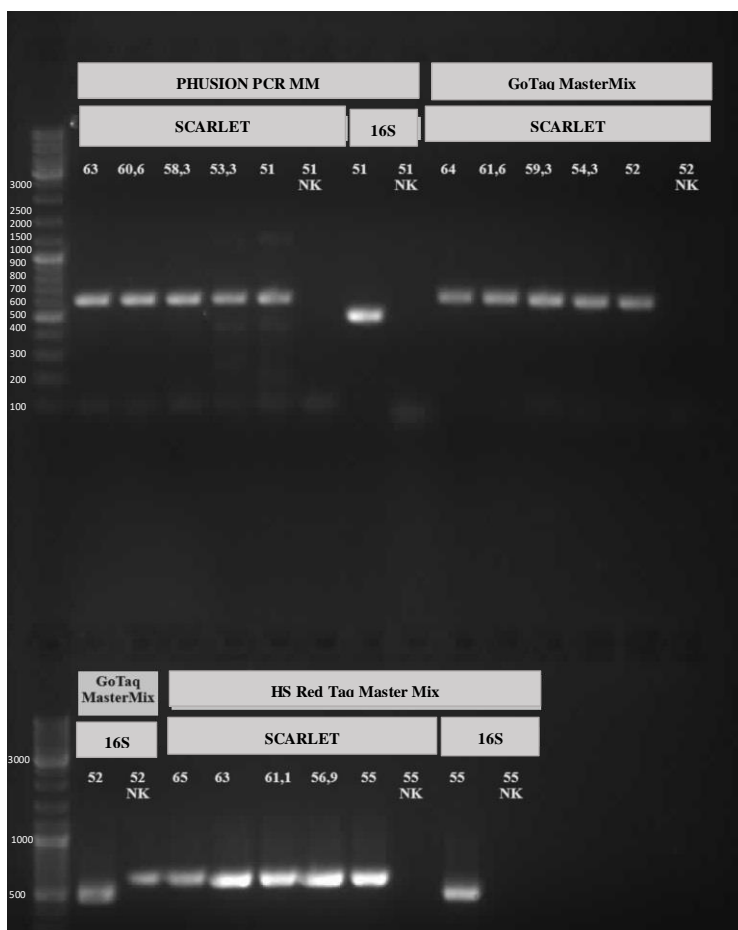
Analizu podataka sam radila u programu JASP, dok sam grafički prikaz podataka radila u programu Microsoft Excel. Za prikaz distribucije podataka u određenom vremenu (2-3 dana, 6-7 dana i 9-10 dana) između različitih grupa (jedinke u presvlačenju, jedinke koje nisu u presvlačenju, GFP i kontrola bez injektiranja), kao i za prikaz distribucije podataka unutar grupa (jedinke u presvlačenju, jedinke koje nisu u presvlačenju, GFP i kontrola bez injektiranja) kroz vrijeme (2-3 dana, 4-5 dana, 6-7 dana i 9-10 dana) koristila sam dijagram s okvirima i poveznicama (eng. *Box plot*), jer se on koristi za usporedbu skupina podataka koji su na neki način povezani. Okviri na dijagramu označavaju raspon koji sadrži srednjih 50% podataka (interkvartilni raspon–IQR). Donji i gornji dio okvira predstavljaju prvi kvartil (Q1) i treći kvartil

(Q3) podataka, a linija unutar okvira predstavlja medijan. Poveznice označavaju raspon podataka izvan IRQ, a podaci izvan poveznica predstavljaju stršeće vrijednosti (eng. *outlier*).

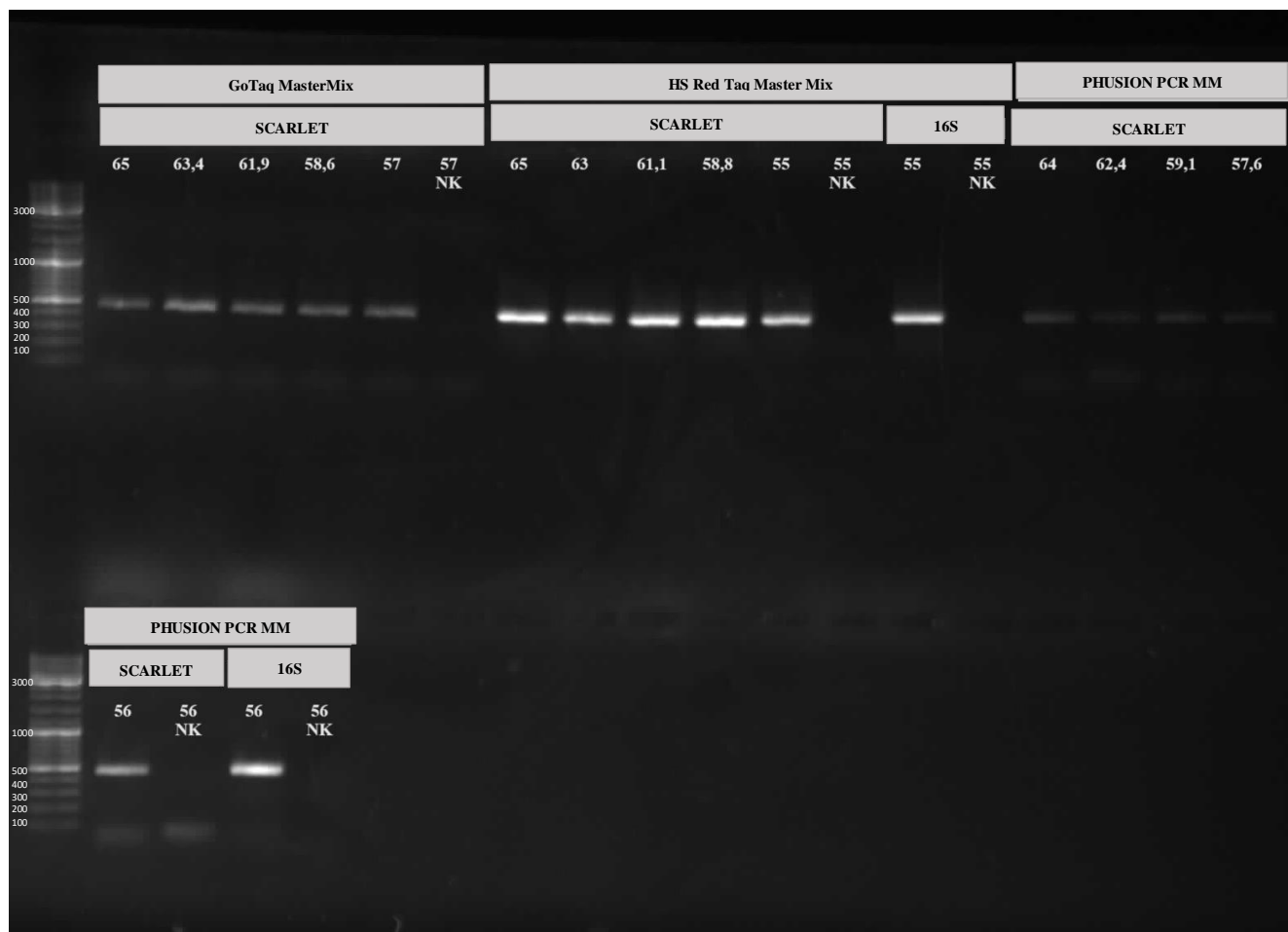
REZULTATI

4.1. Optimalni uvjeti PCR reakcije umnažanja gena *Scarlet*

Ovim eksperimentom sam odredila da je najoptimalnija polimeraza u MasterMix-u za reakciju umnažanja Scarlet sekvence iz cDNA vrste *Proasellus coxalis* GoTaq® G2 Colorless MasterMix proizvođača Promega pri temperaturi vezanja početnica od 52 °C, dok je za umnažanje Scarlet sekvence iz cDNA vrste *Asellus aquaticus* najoptimalniji ALLIn™ HS Red Taq Master Mix proizvođača HighQu pri temperaturi vezanja početnica od 60 °C (Slika 18, 19).



Slika 18. Rezultati PCR reakcije za određivanje optimalne polimeraze u MasterMix-u i temperature vezanja početnica za vrstu *P. coxalis* na agaroznom gelu. (16S – pozitivna kontrola, NK – negativna kontrola, broj – temperatura vezanja početnica) (foto M. Kuzman)



Slika 19. Rezultati PCR reakcije za određivanje optimalne polimeraze u MasterMix-u i temperature vezanja početnica za vrstu *A. aquaticus* na agaroznom gelu. (16S – pozitivna kontrola, NK – negativna kontrola, broj – temperatura vezanja početnica) (foto M. Kuzman)

Nakon određivanja optimalnih uvjeta PCR-a umnožila sam gen *Scarlet* PCR reakcijom prema uvjetima i koncentracijama prikazanim u tablicama ispod (12, 13, 14, 15).

Tablica 12. Komponente PCR reakcije za umnažanje gena *Scarlet* kod vrste *P. coxalis*

	Volumen
Komponenta	50 µL
Forward početnica	2,5
Reverse početnica	2,5
GoTaq MasterMix	25
Voda bez RNaza	15
DNA kalup (cDNA)	5

Tablica 13. Uvjeti PCR reakcije za umnažanje gena *Scarlet* kod vrste *P. coxalis*

PCR UVJETI			
Korak	Temperatura	Vrijeme	
Početna denaturacija	95 °C	2 min	
Denaturacija	95 °C	45 s	
Vežanje početnica	52 °C	45 s	35x
Produljivanje	72 °C	45 s	
Finalno produljivanje	72 °C	7 min	
Kraj	4 °C	inf.	

Tablica 14. Komponente PCR reakcije za umnažanje gena *Scarlet* kod vrste *A. aquaticus*

Komponenta	Volumen
	50 µL
Forward početnica	2
Reverse početnica	2
HS Red Taq MasterMix	25
Voda bez RNaza	16
DNA kalup(cDNA)	5

Tablica 15. Uvjeti PCR reakcije za umnažanje gena *Scarlet* kod vrste *A. aquaticus*

PCR UVJETI			
Korak	Temperatura	Vrijeme	
Početna denaturacija	95 °C	1 min	
Denaturacija	95 °C	15 s	
Vežanje početnica	60 °C	15 s	40x
Produljivanje	72 °C	15 s	
Kraj	4 °C	inf.	

4.2. Optimalni uvjeti mikroinjektiranja

Volumen mikroinjektiranja dsRNA od 33,51 pL se pokazao optimalnim jer je veći volumen (65,4 – 113,1 pL) zadao preveliku štetu životinji pa bi takve odmah uginule. Probala sam i sa injektiranjem manjeg volumena (14,14 pL), no manjim otvorom igle nisam mogla probiti kutikulu životinja.

Optimalne postavke mikroinjektora bile su IP = 79,2 PSI; CP = 0,30 PSI; D = 0,450 s. Većini životinja sam dsRNA mikroinjektirala između drugog i trećeg tergita, no najbolje se pokazalo injektiranje iza četvrtog tergita (Slika 20), jer injektirani volumen otopine prođe kroz cijelo tijelo životinje.



Slika 20. *A. aquaticus* s označenim mjestom mikroinjektiranja (bijelo; između četvrtog i petog tergita) (foto M. Kuzman)

4.2.1. Preživljenje vrste *A. aquaticus* nakon mikroinjektiranja

Jedinki vrste *A. aquaticus* je nakon tjedan dana preživjelo 14 (52%), dok je jedinki vrste *P. coxalis* preživjelo 23 (39%). U tablici 16 se vidi da su životinje korištene u prvom eksperimentu (16.01.2024.) imale najslabije preživljenje obzirom da sam njih prve mikroinjektirala i nisam još izvježbala manipulaciju mikroinjektorom. Vidi se da je i preživljenje pet jedinki koje su

anestezirane na ledu (23.01.2024.) manje obzirom da su se životinje lijepile za led i bilo ih je teško manipulirati. Također su životinje koje su injektirane u dva navrata (17. i 23.01.2024.) slabije preživljavale.

Iz ovog eksperimenta sam zaključila da je optimalni promjer kapljice 2 mm (50 x povećanje; volumen 33,51 pL), obzirom da se najviše tekućine unese u jedinku uz manju smrtnost. Najbolja anestezija jest vodenom otopinom eugenola.

Tablica 16. Preživljavanje jedinki vrste *A. aquaticus* mikroinjektiranih s otopinom crvenog fenola. Eu - eugenol kao anestetik, led - led kao anestetik, 2x= injektiranje u dva navrata

Datum mikroinjektiranja (način anestezije)	16.01.2024. (eu)	17.01./23.01.2024. (2x, eu)	23.01.2024. (led)	29.01.2024. (eu)
Promjer /volumen mikroinjektirane kapi (mm/pL)	0,03/14,14	0,02/4,2 0,04/33,5	0,04/33,5	0,04/33,5
Broj mikroinjektiranih jedinki	9	8	5	8
Preživljavanje:				
17.1.	2			
18.1.	2	8		
23.01.	2	8	2	
29.01.	2	4	2	
02.02.	2	4	2	7
06.02.	2	4	2	7
07.02.	2	4	1	7

4.2.2. Preživljavanje vrste *P. coxalis* nakon mikroinjektiranja

U tablici 17 se vidi da su životinje koje su prve mikroinjektirane (16.01.2024. – 02.02.2024.) imale najslabije preživljenje obzirom da nisam još bila izvježbala manipulaciju mikroinjektorom. Životinje koje su anestezirane na ledu (29.01.) nisu preživjele obzirom da su se lijepile za led, kao ni životinje koje su injektirane u dva navrata (16./17.01.). Injektirani volumen od 33,51 pL se pokazao optimalnim (promjer kapljice 2 mm (50 x povećanje)). Najbolja anestezija jest vodenom otopinom eugenola.

Tablica 17. Preživljavanje jedinki vrste *P. coxalis* mikroinjektiranih s otopinom crvenog fenola.

Eu - eugenol kao anestetik, led - led kao anestetik, 2x = injektiranje u dva navrata

Datum mikroinjektiranja (način anestezije)	16.01. 2024. (eu)	17.01. 2024. (eu)	16./17.01. 2024. (2x) (eu)	23.01. 2024. (eu)	29.01. 2024. (eu)	29.01. 2024. (led)	02.02. 2024. (eu)
Promjer /volumen mikroinjektirane kapi (mm/pL)	0,03/14,14	0,02/4,2	0,04/33,5	0,04/33,5	0,04/33,5	0,04/33,5	0,04/33,5
Broj mikroinjektiranih jedinki	9	7	2	11	5	5	20
Preživljavanje:							
17.1.	5						
18.1.	3	3	0				
23.01.	3	3	0				
29.01.	3	3	0	5			
02.02.	3	3		5	2	0	
06.02.	3	3		5	2	0	10
07.02.	3	3		5	2		10

4.2.3. Uvjeti mikroinjektiranja vrste *A. aquaticus*

Za mikroinjektiranje sa dsRNA gena *Scarlet* sam odvojila 35 životinja vrste *A. aquaticus*. Dio tih životinja je bio u presvlačenju (njih 18) dok ostale nisu bile u presvlačenju (17). Životinje sam anestezirala s vodenom otopinom eugenola. Nakon što je jedinka anestezirana prebacila sam ju iz otopine eugenola na agaroznu podlogu i fotografirala. Nakon fotografiranja, životinje sam mikroinjektirala iza četvrtog tergita koristeći dsRNA gena *Scarlet* (u 10 μ L dsRNA koncentracije 10225 ng/ μ L sam dodala 1 μ L otopine crvenog fenola kako bi vizualizirala ulaz dsRNA ispod kutikule). Volumen dsRNA gena *Scarlet* injektiran u životinje iznosio 33,51 pL, koncentracije $9,30 \times 10^{-3}$ ng/pL tj. injektirano je 0,31 ng dsRNA gena *Scarlet*.

Osim mikroinjektiranja molekule dsRNA gena *Scarlet* u jedinek vrste *A. aquaticus*, odvojila sam i 13 životinja za mikroinjektiranje s dsRNA proteina GFP. GFP je služio kao negativna kontrola mikroinjektiranja obzirom da dsRNA za GFP nema utjecaj na Asellidae jer nemaju gen za ovaj protein u svojem genomu. Životinje sam anestezirala na isti način kao i kod injektiranja dsRNA gena *Scarlet*, te fotografirala prije mikroinjektiranja. Mikroinjektirala sam volumen od 33,51 pL,

koncentracije $8,75 \times 10^{-3}$ ng/ pL tj. injektirano je 0,29 ng GFP dsRNA (u 7 μ L dsRNA proteina GFP koncentracije 10000 ng/ μ L sam dodala 1 μ L otopine crvenog fenola) iza četvrtog tergita.

Osim injektiranih životinja, odvojila sam i 7 životinja koje sam fotografirala te držala u istim uvjetima te su korištene kao negativna kontrola. Ta kontrola je potrebna s obzirom da rakovi porodice Asellidae mijenjaju pigmentaciju uslijed uvjeta života i prehrane (Baković i sur. 2021).

Treba napomenuti da ove životinje nisu sve injektirane u isto vrijeme već u različite dane kroz par mjeseci.

4.2.4. Uvjeti mikroinjektiranja vrste *P. coxalis*

Za mikroinjektiranje dsRNA gena *Scarlet* u vrstu *P. coxalis* odvojila sam 35 jedinki. Od tih 35 jedinki, 21 ih nije bilo u presvlačenju dok je ostalih 14 bilo. Jedinke sam, kao i one vrste *A. aquaticus*, anestezirala vodenom otopinom eugenola koncentracije 0,074 μ L/mL, jer su se jedinke vrste *P. coxalis* pokazale osjetljivijima na anestetik. Zatim sam istim postupkom kao kod mikroinjektiranja u jedinke *A. aquaticus* fotografirala i mikroinjektirala jedinke vrste *P. coxalis* koristeći dsRNA gena *Scarlet* (u volumen 20 μ L koncentracije 6600 ng/ μ L sam dodala 1 μ L otopine crvenog fenola) iza četvrtog tergita. Volumen dsRNA gena *Scarlet* injektiran u životinje iznosio je 33,51 pL, koncentracije $6,29 \times 10^{-3}$ ng/ pL tj. injektirano je 0,21 ng *Scarlet* dsRNA.

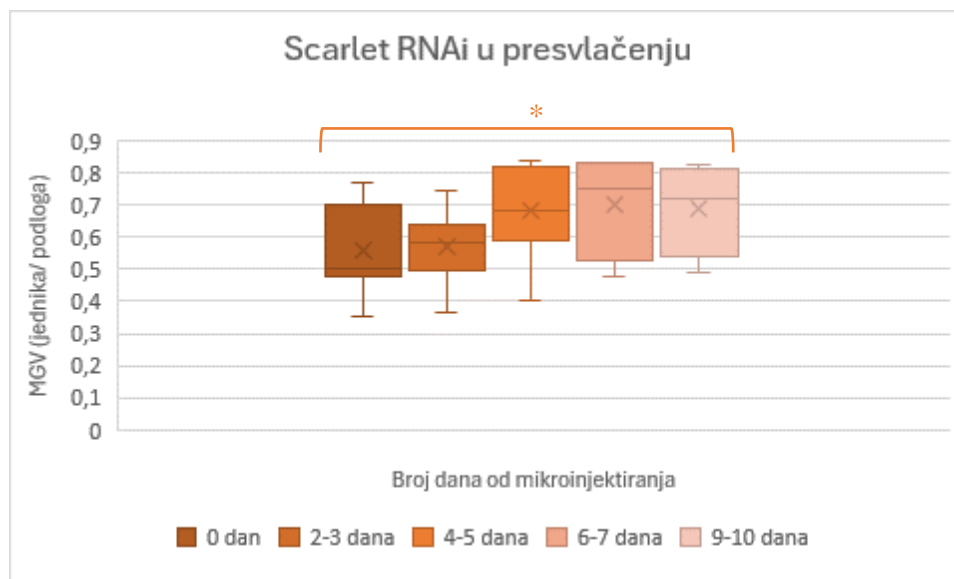
Također sam, kao i za jedinke vrste *A. aquaticus*, odvojila 14 jedinki koje sam fotografirala i mikroinjektirala sa dsRNA proteina GFP iste koncentracije kao i za *A. aquaticus*. Odvojila sam i 8 jedinki koje sam koristila kao negativnu kontrolu te su one samo fotografirane i čuvane u istim uvjetima kao jedinke mikroinjektirane s dsRNA.

4.3. RNA interferencija gena *Scarlet* kod vrste *A. aquaticus*

4.3.1. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki u presvlačenju

Za analizu sam koristila Repeated measures ANOVA test kojim sam ustanovila da postoji razlika od nultog dana, odnosno dana mikroinjektiranja, do 9-10 dana, ($p=0.025$), no nisam dobila statistički značajnu razliku u pigmentaciji jedinki između nultog i ostalih dana (post-hoc testovi).

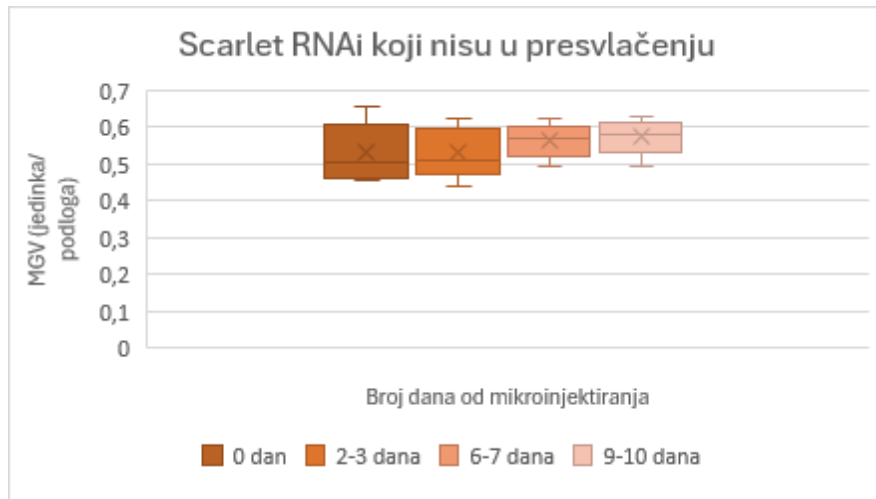
Na grafu na slici 21 se može vidjeti da medijan, odnosno vrijednost koja dijeli podatke u dvije jednake polovice, raste s vremenom, što znači da je su jedinke ipak posvijetlile od nultog do 9-10 dana.



Slika 21. Grafički prikaz MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (MGV jedinka/ MGV pozadina) jedinki vrste *A. aquaticus* mikroinjektiranih s dsRNA gena *Scarlet* za vrijeme presvlačenja u danima nakon mikroinjektiranja. $p < 0.05^*$

4.3.2. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki koje nisu u presvlačenju

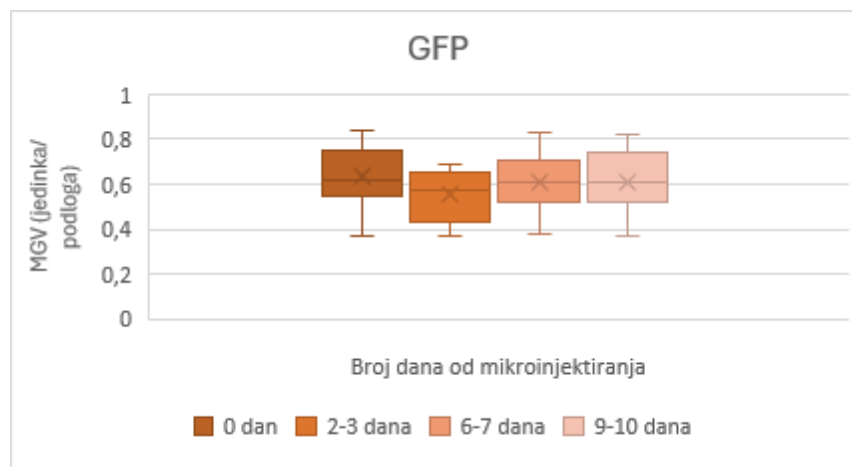
Utvdila sam da ne postoji statistički značajna razlika od dana injektiranja do zadnjeg dana fotografiranja ($p=0.090$), no na slici 22 se može vidjeti da su životinje ipak posvijetlile, obzirom da medijan raste s vremenom. Treba napomenuti da neke od ovih jedinki nisu fotografirane 4-5 dana nakon mikroinjektiranja, a onih koje jesu je bilo premalo za analizu.



Slika 22. Grafički prikaz MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (MGV jedinka/ MGV pozadina) jedinki vrste *A. aquaticus* mikroinjektiranih s dsRNA gena *Scarlet* izvan vremena presvlačenja u danima nakon mikroinjektiranja

4.3.3. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP

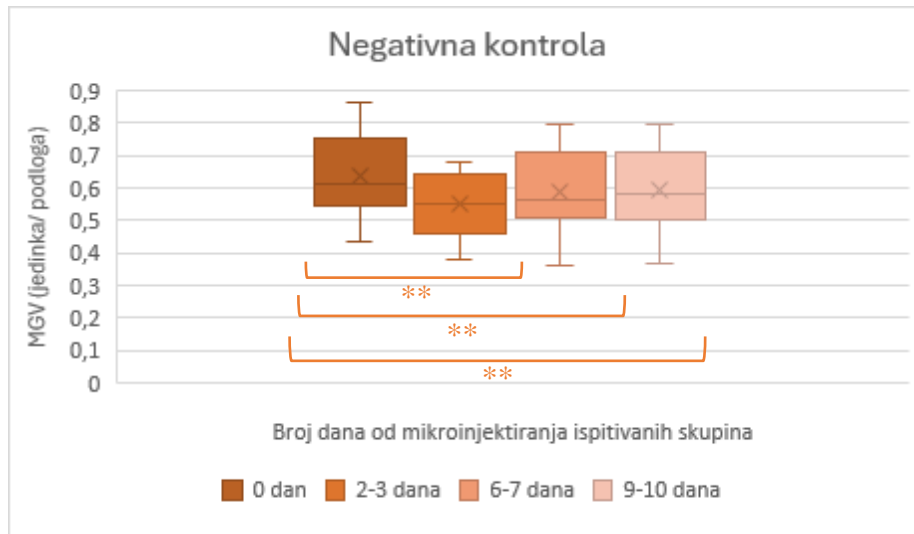
Na slici 23 se vidi da su jedinke injektirane s dsRNA proteina GFP ostale iste boje ili su čak potamnile obzirom da je medijan u svim vremenskim točkama otprilike jednak ili manji onome prije mikroinjektiranja ($p=0.06$).



Slika 23. Grafički prikaz MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (MGV jedinka/ MGV pozadina) jedinki vrste *A. aquaticus* mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP u danima nakon mikroinjektiranja

4.3.4. Promjene pigmentacije kroz vrijeme jedinki koje nisu mikroinjektirane

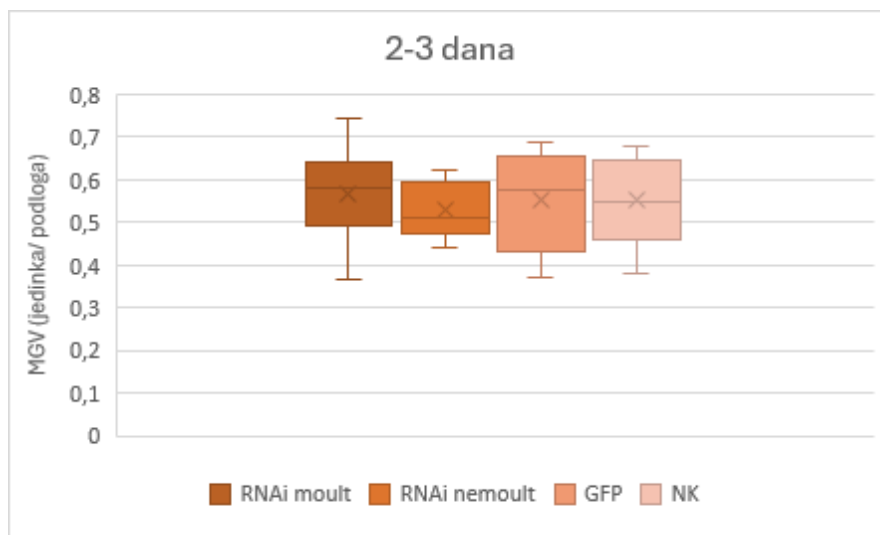
Na slici 24 se može vidjeti da kontrola u kojoj su jedinke koje nisu injektirane nije posvijetlila, već i potamnila ($p=8.394 \times 10^{-4}$) obzirom da se MGV vrijednost smanjuje s vremenom. Razlika se očituje već između dana injektiranja i 2-3 dana ($p_{\text{bonf}}=0.005$, $p_{\text{holm}}=0.003$) a jedinke su nastavile tamniti tijekom eksperimenta jer se očituje razlika i između dana injektiranja i 6-7 ($p_{\text{bonf}}=0.002$, $p_{\text{holm}}=0.002$) te 9-10 dana ($p_{\text{bonf}}=0.004$, $p_{\text{holm}}=0.003$).



Slika 24. Grafički prikaz MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (MGV jedinka/ MGV pozadina) jedinki vrste *A. aquaticus* koje nisu mikroinjektirane u danima nakon mikroinjektiranja ispitivanih skupina, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

4.3.5. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 2-3 dana

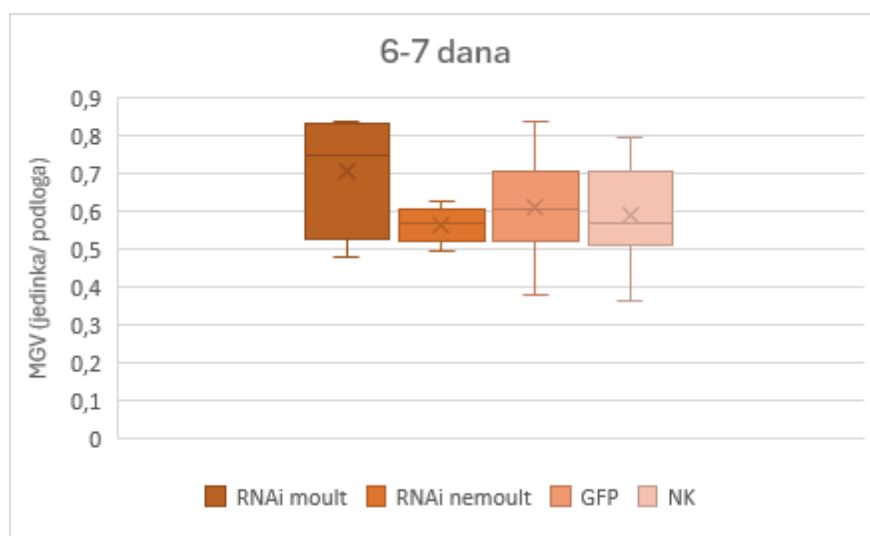
Na slici 25 se vidi da jedinke koje su mikroinjektirane u vremenu presvlačenja (RNAi moult) pokazuju najveće MGV vrijednosti tj. da su posvijetlile, no razlika među grupama nije statistički značajna ($p=0.215$). Jedinke mikroinjektirane izvan vremena presvlačenja (RNAi nemoult) nisu posvijetlile.



Slika 25. Grafički prikaz usporedbe MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (jedinka/ pozadina) jedinki vrste *A. aquaticus* mikroinjektiranih za vrijeme presvlačenja (RNAi moult), jedinki mikroinjektiranih izvan vremena presvlačenja (RNAi nemoult), jedinki mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP i negativne kontrole (NK) 2-3 dana nakon mikroinjektiranja

4.3.6. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 6-7 dana

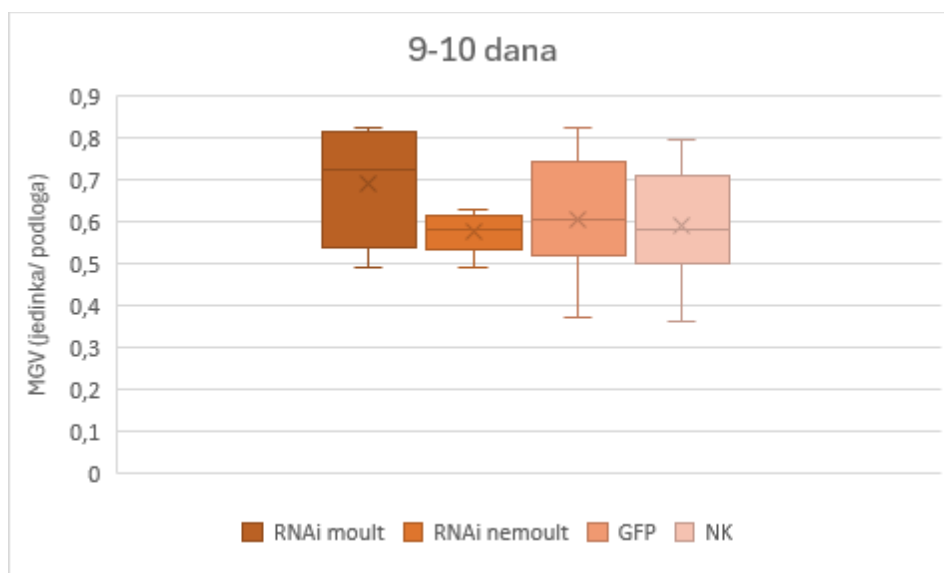
Na slici 26 se vidi da jedinke koje su mikroinjektirane u vremenu presvlačenja (RNAi moult) pokazuju najveće MGV vrijednosti, no razlika među grupama nije statistički značajna ($p=0.295$). Također jedinke iz RNAi moult grupe pokazuju veće MGV vrijednosti u odnosu na rezultate nakon 2-3 dana, dok RNAi ne moult pokazuje iste ili manje što ukazuje na malo potamnjenje.



Slika 26. Grafički prikaz usporedbe MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (jedinka/ pozadina) jedinki vrste *A. aquaticus* mikroinjektiranih za vrijeme presvlačenja (RNAi moult), jedinki mikroinjektiranih izvan vremena presvlačenja (RNAi nemoult), jedinki mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP i negativne kontrole (NK) 6-7 dana nakon mikroinjektiranja

4.3.7. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 9-10 dana

Na slici 27 se vidi da jedinke koje su mikroinjektirane u vremenu presvlačenja (RNAi moult) pokazuju najveće MGV vrijednosti, no razlika među grupama nije statistički značajna ($p=0.156$). Grupa RNAi nemoult ne pokazuje veliko posvjetljenje u odnosu na sliku 25, dok RNAi moult usporedbom grafova pokazuje posvjetljenje obzirom da su MGV vrijednosti veće.



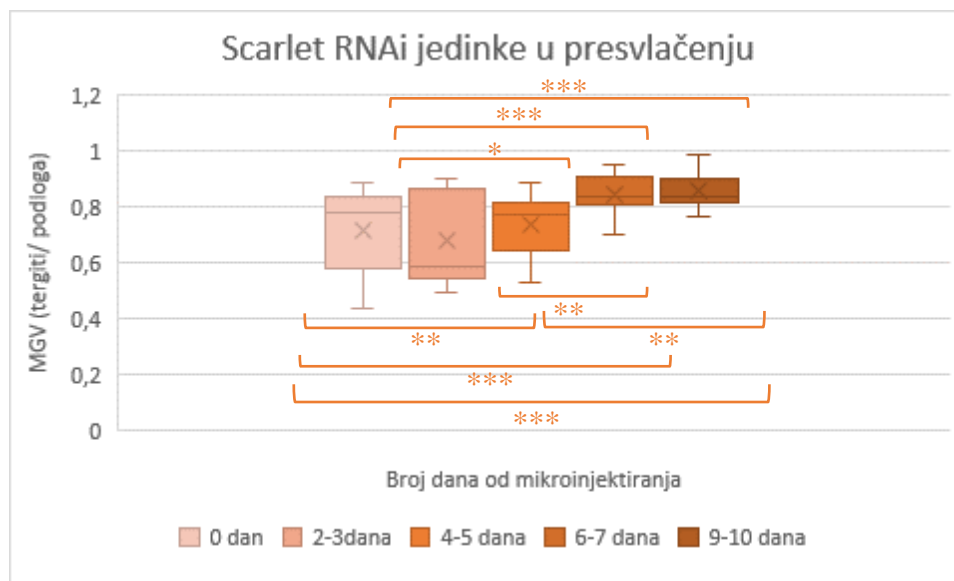
Slika 27. Grafički prikaz usporedbe MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (jedinka/ pozadina) jedinki vrste *A. aquaticus* mikroinjektiranih za vrijeme presvlačenja (RNAi moult), jedinki mikroinjektiranih izvan vremena presvlačenja (RNAi nemoult), jedinki mikroinjektiranih s GFP i negativne kontrole (NK) 9-10 dana nakon mikroinjektiranja

4.4. RNA interferencija gena *Scarlet* kod vrste *P. coxalis*

Jedinke vrste *P. coxalis* su pokazale veliku smrtnost tokom eksperimenta te nije bilo dovoljno podataka za statističku analizu među jedinkama pa sam podatke obradila po tergitima i tako ih uspoređivala.

4.4.1. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki u presvlačenju

Postoji značajna statistička razlika jedinki koje su bile u presvlačenju za vrijeme mikroinjektiranja s dsRNA gena *Scarlet* analizom po tergitema ($p=1.625 \times 10^{-16a}$). Prema post-hoc testovima postoji statistički značajna razlika između grupa prikazana u tablici 18. Statistički značajna razlika između dana mikroinjektiranja i 4-5 dana ukazuje na to da su jedinke tada krenule svijetliti, obzirom da između nultog dana i 2-3 dana nema statistički značajne razlike. Također postoji razlika između dana mikroinjektiranja i 6-7 dana te između dana mikroinjektiranja i 9-10 dana što ukazuje na dodatno svijetljenje jedinki. Postoji i značajna razlika između 2-3 dana i 6-7 dana te 2-3 dana i 9-10 dana te između 4-5 dana i 6-7 dana i 4-5 dana i 9-10 dana što također ukazuje na svijetljenje jedinki. Rezultati su grafički prikazani na slici 28.



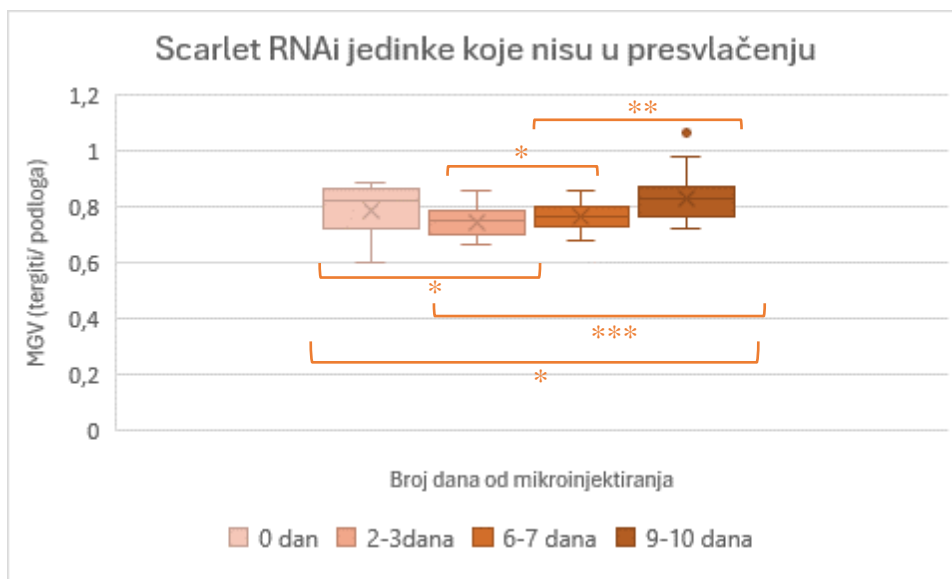
Slika 28. Grafički prikaz MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (MGV tergiti/ MGV pozadina) vrste *P. coxalis* mikroinjektiranih sa dsRNA gena *Scarlet* za vrijeme presvlačenja u određenim vremenskim periodima od mikroinjektiranja. $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$

Tablica 18. Usporedba p vrijednosti vrste *P. coxalis* mikroinjektiranih za vrijeme presvlačenja analizom po tergitima u određenim vremenskim periodima od mikroinjektiranja. Bonferroni post-hoc test (p_{bonf}), Holm post-hoc test (p_{holm}), $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

		BROJ DANA NAKON MIKROINJEKTIRANJA			
		2-3	4-5	6-7	9-10
NAKON	0 (nulti dan)	$p_{\text{bonf}}=1.000$	$p_{\text{bonf}}=0.007^{**}$	$p_{\text{bonf}}=5.412 \times 10^{-6}^{***}$	$p_{\text{bonf}}=1.427 \times 10^{-6}^{***}$
		$p_{\text{holm}}=0.372$	$p_{\text{holm}}=0.003^{**}$	$p_{\text{holm}}=3.789 \times 10^{-6}^{***}$	$p_{\text{holm}}=1.142 \times 10^{-6}^{***}$
DANA	2-3		$p_{\text{bonf}}=0.066$	$p_{\text{bonf}}=5.285 \times 10^{-7}^{***}$	$p_{\text{bonf}}=1.431 \times 10^{-7}^{***}$
			$p_{\text{holm}}=0.020^*$	$p_{\text{holm}}=4.756 \times 10^{-7}^{***}$	$p_{\text{holm}}=1.431 \times 10^{-7}^{***}$
BROJ	4-5			$p_{\text{bonf}}=0.019^*$	$p_{\text{bonf}}=0.005^{**}$
				$p_{\text{holm}}=0.008^{**}$	$p_{\text{holm}}=0.003^{**}$
MIKROINJEKTIRANJA	6-7				$p_{\text{bonf}}=1.000$
					$p_{\text{holm}}=0.232$

4.4.2. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki koje nisu u presvlačenju

Statističkom analizom je pokazano da postoji statistički značajna razlika jedinki mikroinjektiranih s dsRNA gena *Scarlet* analiziranih po tergitima ($p=1.441 \times 10^{-16a}$). Prema post-hoc testovima postoji statistički značajna razlika između skupina prikazana u tablici 19. Postoji statistički značajna razlika između dana mikroinjektiranja i 2-3 dana koja se očituje kao tamnjenje jedinki, dok razlika između dana mikroinjektiranja i 9-10 dana te između 2-3 dana i 6-7 dana ukazuju na svijetljenje. Također postoje razlike između 2-3 dana i 9-10 dana, te između 6-7 dana i 9-10 dana koje također ukazuju na svijetljenje. Rezultati su grafički prikazani na slici 29.



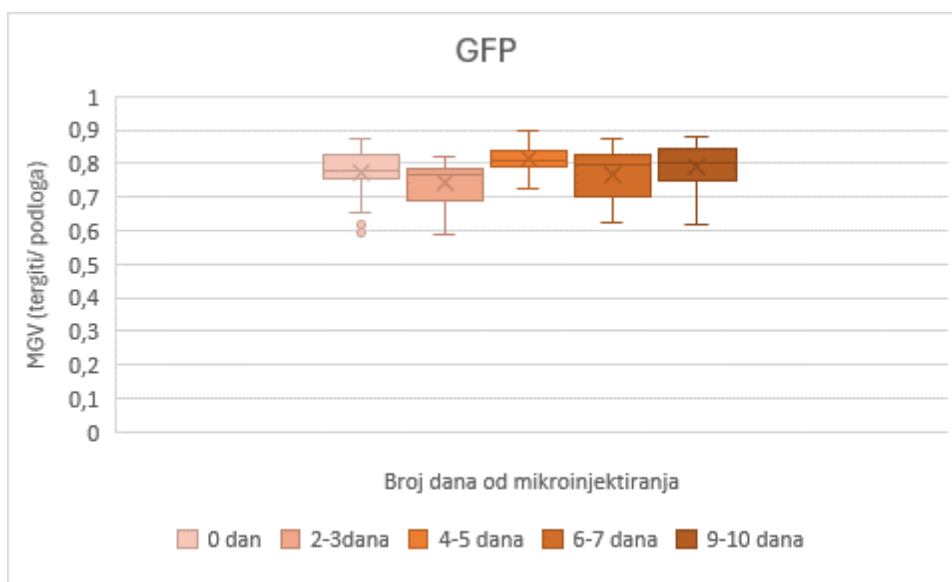
Slika 29. Grafički prikaz MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (MGV tergiti/ MGV pozadina) jedinki vrste *P. coxalis* mikroinjektiranih s dsRNA gena *Scarlet* izvan vremena presvlačenja u određenim vremenskim periodima od mikroinjektiranja, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

Tablica 19. Usporedba p vrijednosti vrste *P. coxalis* mikroinjektiranih izvan vremena presvlačenja analizom po tergitema u određenim vremenskim periodima od mikroinjektiranja. Bonferroni post-hoc test (p_{bonf}), Holm post-hoc test (p_{holm}), $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

BROJ DANA NAKON MIKROINJEKTIRANJA				
		2-3	6-7	9-10
BROJ DANA NAKON MIKROINJEKTIRANJA	0 (nulti dan)	$p_{\text{bonf}}=0.048^*$ $p_{\text{holm}}=0.032^*$	$p_{\text{bonf}}=1.000$ $p_{\text{holm}}=0.214$	$p_{\text{bonf}}=0.058$ $p_{\text{holm}}=0.032^*$
	2-3		$p_{\text{bonf}}=0.059$ $p_{\text{holm}}=0.032^*$	$p_{\text{bonf}}=2,941 \times 10^{-5}^{***}$ $p_{\text{holm}}=2,941 \times 10^{-5}^{***}$
	6-7			$p_{\text{bonf}}=0.003^{**}$ $p_{\text{holm}}=0.003^{**}$
	9-10			

4.4.3. Promjene pigmentacije kroz vrijeme nakon injektiranja jedinki mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP

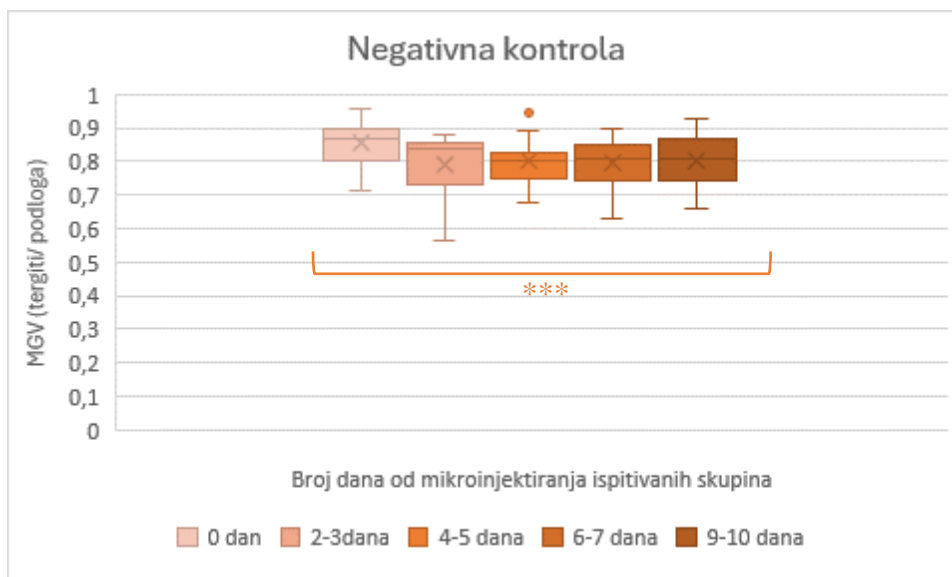
Kao što se vidi i na slici 30, pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u pigmentaciji jedinki mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP gena kroz vrijeme ($p=0.453$) te prema post-hoc testovima nema razlike među danima.



Slika 30. Grafički prikaz MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (MGV tergiti/ MGV pozadina) jedinki vrste *P. coxalis* mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP u određenim vremenskim periodima od mikroinjektiranja

4.4.4. Promjene pigmentacije kroz vrijeme jedinki koje nisu mikroinjektirane

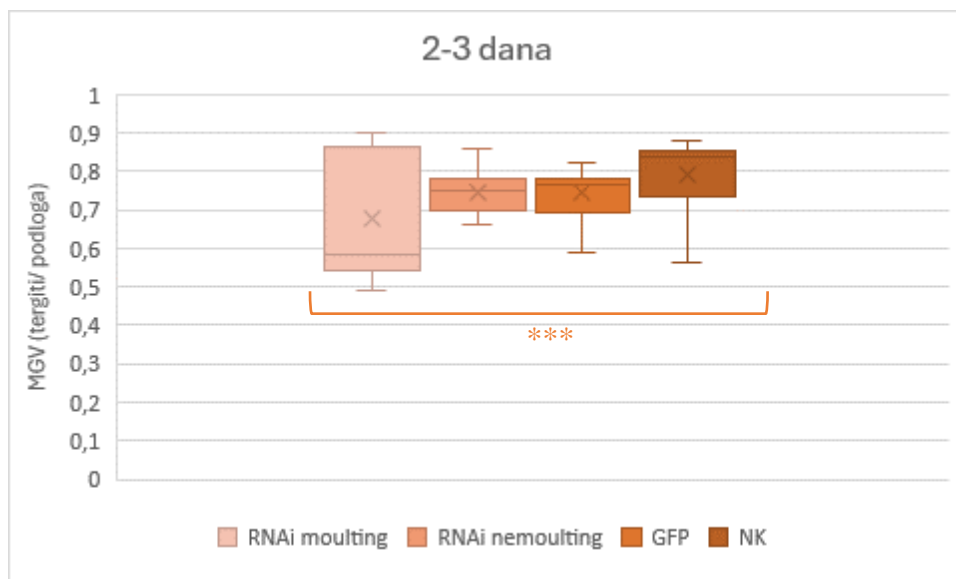
Postoji statistički značajna razlika u analizi tergita jedinki postavljenih kao negativna kontrola kroz vrijeme ($p=0.231^a$), no prema grafičkom prikazu rezultata (Slika 31) vidi se da su životinje potamnile od nultog do 9-10 dana.



Slika 31. Grafički prikaz MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (MGV tergiti/ MGV pozadina) vrste *P. coxalis* koje nisu mikroinjektirane u određenim vremenskim periodima od mikroinjektiranja ispitivanih grupa, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

4.4.5. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 2-3 dana

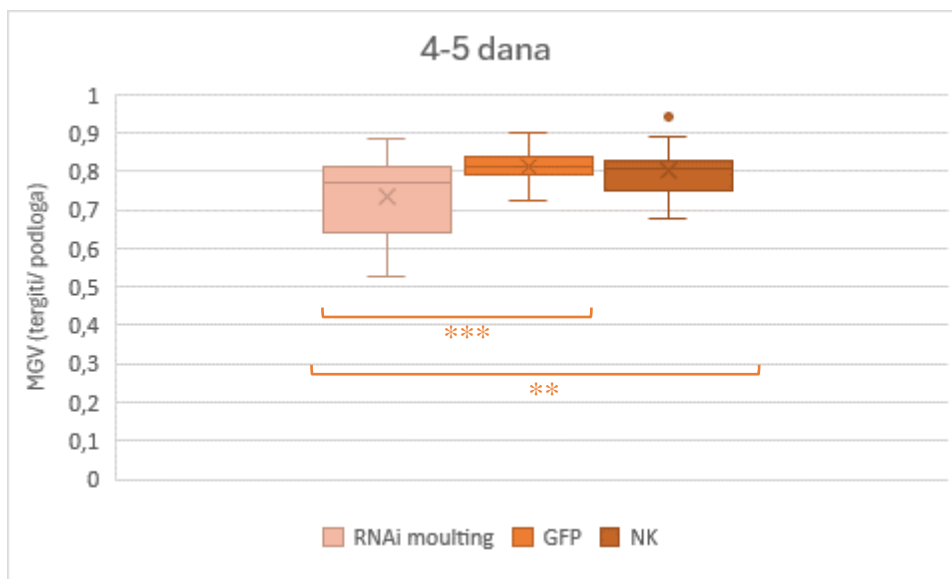
Usporedbom tergita grupi jedinki mikroinjektiranih s dsRNA gena *Scarlet* u vremenu presvlačenja, onih mikroinjektiranih s dsRNA gena *Scarlet* izvan vremena presvlačenja, jedinki mikroinjektiranih s dsRNA gena za GFP i negativne kontrole ustanovila sam da postoji razlika među grupama ($p = 0.012^a$) tj. na slici 32 se vidi da su NK jedinke svjetlije od jedinki RNAi moulting grupe. No prema post-hoc testovima nije značajna razlika među pojedinim grupama.



Slika 32. Grafički prikaz usporedbe MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (tergiti/ pozadina) jedinki vrste *P. coxalis* mikroinjektiranih za vrijeme presvlačenja (RNAi moult), jedinki mikroinjektiranih izvan vremena presvlačenja (RNAi nemoult), jedinki mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP i negativne kontrole (NK) 2-3 dana nakon mikroinjektiranja, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

4.4.6. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 4-5 dana

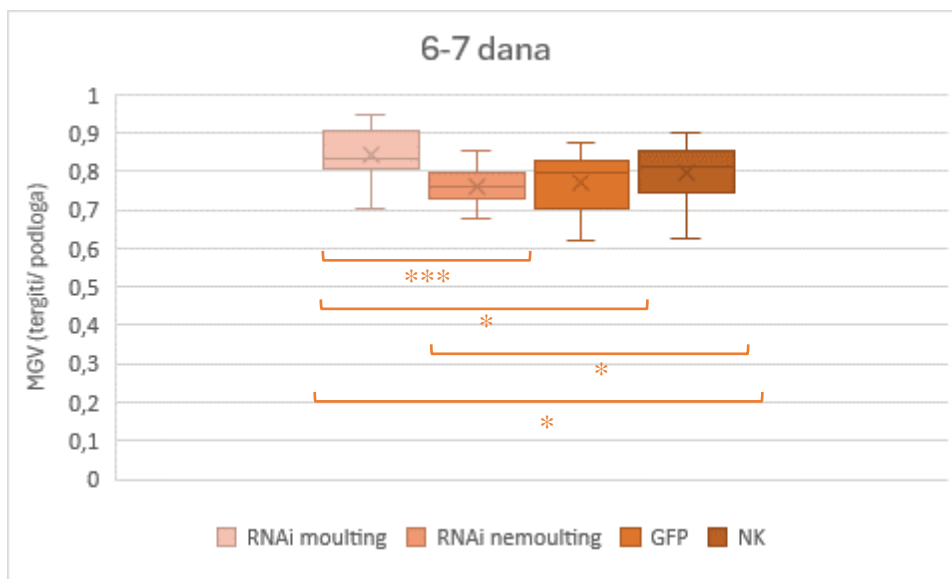
Analizom pigmentacije po tergitima jedinki mikroinjektiranih sa dsRNA gena *Scarlet* u vremenu presvlačenja, onih mikroinjektiranih s dsRNA za GFP i negativne kontrole (NK) ustanovljeno je da postoji razlika među grupama ($p = 4.047 \times 10^{-5}$). Prema post-hoc testovima postoji značajna razlika među jedinkama mikroinjektiranih u vremenu presvlačenja i GFP ($p_{\text{bonf}} = 3.654 \times 10^{-4}$; $p_{\text{holm}} = 3.654 \times 10^{-4}$), te među jedinkama mikroinjektiranih u vremenu presvlačenja i NK ($p_{\text{bonf}} = 0.006$; $p_{\text{holm}} = 0.004$). Između GFP i NK ne postoji razlika ($p_{\text{bonf}} = 1$; $p_{\text{holm}} = 0.596$). Rezultati su prikazani na slici 33. U ovu analizu nisu bile uključene jedinke mikroinjektiranih sa dsRNA gena *Scarlet* izvan vremena presvlačenja jer nisu fotografirane 4-5 dana nakon mikroinjektiranja ili su uginule pa ih je ostalo premalo za analizu.



Slika 33. Grafički prikaz usporedbe MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (tergiti/ pozadina) jedinki vrste *P. coxalis* mikroinjektiranih za vrijeme presvlačenja (RNAi moult), jedinki mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP i negativne kontrole (NK) 4-5 dana nakon mikroinjektiranja. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

4.4.7. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 6-7 dana

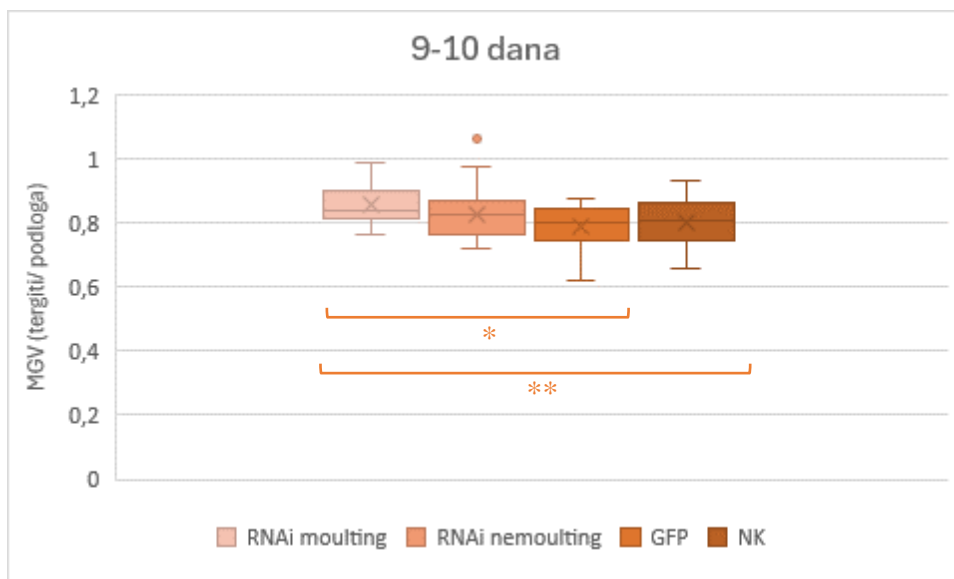
Statističkom analizom sam dobila da postoji razlika među grupama 6-7 dana nakon mikroinjektiranja ($p = 1.964 \times 10^{-5a}$), a post-hoc testovima sam ustanovila da postoji razlika među jedinkama mikroinjektiranim sa dsRNA gena *Scarlet* koje su bile u vremenu presvlačenja i onih koje su bile izvan vremena presvlačenja ($p_{\text{bonf}} = 2.756 \times 10^{-6}$; $p_{\text{holm}} = 2.756 \times 10^{-6}$). Ta razlika označava da su jedinke u presvlačenju svjetlije od onih izvan vremena presvlačenja. Također postoji razlika među jedinkama mikroinjektiranim s dsRNA gena *Scarlet* koje su bile u vremenu presvlačenja i onim mikroinjektiranim s dsRNA gena za GFP ($p_{\text{bonf}} = 0.021$; $p_{\text{holm}} = 0.014$), te negativne kontrole ($p_{\text{bonf}} = 0.013$; $p_{\text{holm}} = 0.011$) koja također označava svjetljenje jedinki u presvlačenju naspram kontrola. Postoji i razlika između jedinki mikroinjektiranim sa dsRNA gena *Scarlet* koje su bile izvan vremena presvlačenja i negativne kontrole ($p_{\text{bonf}} = 0.028$; $p_{\text{holm}} = 0.014$). Među ostalim grupama nema značajne razlike ($p > 0.05$). Rezultati su grafički prikazani na slici 34.



Slika 34. Grafički prikaz usporedbe MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (tergiti/ pozadina) jedinki jedinki vrste *P. coxalis* mikroinjektiranih za vrijeme presvlačenja (RNAi moult), jedinki mikroinjektiranih izvan vremena presvlačenja (RNAi nemoult), jedinki mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP i negativne kontrole (NK) 6-7 dana nakon mikroinjektiranja. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

4.4.8. Usporedba intenziteta pigmentacije između različitih skupina jedinki nakon 9-10 dana

Statističkom analizom sam dobila da postoji razlika među grupama 9-10 dana nakon mikroinjektiranja ($p = 0.001^a$), a post-hoc testovima sam ustanovila da postoji razlika među jedinkama mikroinjektiranim sa dsRNA gena *Scarlet* koje su bile u vremenu presvlačenja i grupe mikroinjektirane s dsRNA gena za GFP ($p_{\text{bonf}} = 0.022$; $p_{\text{holm}} = 0.018$), te jedinki mikroinjektiranih dsRNA gena *Scarlet* koje su bile u vremenu presvlačenja i negativne kontrole ($p_{\text{bonf}} = 0.002$; $p_{\text{holm}} = 0.002$). Među ostalim grupama nema značajne razlike ($p > 0.05$). Iako nema statističke značajnosti s ostalim grupama, usporedbom slike 35 i slike 34 se vidi da su i jedinke mikroinjektirane izvan vremena presvlačenja posvijetlile. Rezultati su grafički prikazani na slici 35.



Slika 35. Grafički prikaz usporedbe MGV (eng. *Mean gray value*) vrijednosti (tergiti/ pozadina) jedinki jedinki vrste *P. coxalis* mikroinjektiranih za vrijeme presvlačenja (RNAi moult), jedinki mikroinjektiranih izvan vremena presvlačenja (RNAi nemoult), jedinki mikroinjektiranih s dsRNA proteina GFP i negativne kontrole (NK) 9-10 dana nakon mikroinjektiranja. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

RASPRAVA

A. aquaticus je vrsta jednakonožnih rakova iz obitelji Asellidae koja se koristi u brojnim istraživanjima u područjima evolucije, ekotoksikologije, genetike te mnogim drugim (Protas i sur., 2011; Re i sur., 2018; Lafuente i sur., 2021). Nastanjuju različite okoliše te uspješno koloniziraju podzemlje, no većina molekularnih mehanizama koji su odgovorni za njihovu adaptabilnost su nepoznati (Jovović i sur. 2024). Iako je vrsta odličan modelni organizam, do sada nisu bili dostupni nikakvi alati funkcionalne genetike. Ovaj rad stoga predstavlja značajan doprinos tom području, jer sam uhodala metodu RNAi kojom se mogu utišati geni u ovoj vrsti, i time istražiti njihove funkcije. Također, ova su istraživanja po prvi puta funkcionalno dokazala da jednakonožni rakovi koriste omokrome u pigmentaciji tijela te potvrdila funkcionalnost gena *Scarlet* u putu sinteze omokroma kod jednakonožnih rakova obzirom da je mikroinjektiranje dsRNA ovog gena u rakova porodice Asellidae rezultiralo smanjenjem pigmentacije.

Prilikom uhodavanja metode RNAi zaključila sam da je smrtnost vrste *P. coxalis* veća nego kod *A. aquaticus*, te da većina životinja uginu neposredno nakon mikroinjektiranja ili tijekom eksperimenta. Moguće je da udio u smrtnosti ima i anestezija otopinom eugenola, obzirom da je tokom eksperimenta zabilježena i smrtnost negativne kontrole (Prilog). Nadalje, prema radu Lin i sur. (2023), koji su RNA interferenciju koristili za utišavanje gena koji imaju ulogu u cirkadijarnom ritmu morskog jednakonožnog raka *Eurydice pulchra*, sam odredila okvirni volumen mikroinjektirane dsRNA, no taj volumen nisam mogla doseći zbog smrtnosti. To nije imalo utjecaja na rezultate eksperimenta jer sam ipak uspjela izazvati fenotipske promjene s injektiranim volumenom. Kod Lin i sur. (2023) to nije bio slučaj te im je većina jedinki u eksperimentu preživljavala mikroinjektiranje, no dosta ih je ostalo imobilizirano. Treba napomenuti da su i oni zabilježili veću smrtnost kod mikroinjektoranja jednog tipa dsRNA (od tri), što ukazuje da su neki geni važniji za normalno funkcioniranje i preživljavanje životinja od drugih. Prema Ismail i sur. (2018), koji su metodom RNAi utišali gen *Scarlet* kod vrste *Daphnia magna*, gen *Scarlet* ima ulogu u obojenju oka, što su pokazali i Grubbs i sur. (2015) na vrsti *Tribolium castaneum*. Nadalje, Ismail i sur. (2021) navode da gen *Scarlet*, osim u obojenju oka *D. magna*, ima i ulogu u njenom neurološkom sustavu, a Cunningham i sur. (2018) pokazuju da može uzrokovati i neurodegeneraciju te lokomotornu disfunkciju vrste *Drosophila melanogaster*.

Kod vrste *A. aquaticus* primijećeno je smanjenje pigmentacije kod jedinki mikroinjektiranih za vrijeme presvlačenja (slika 17), dok je kod mikroinjektiranih jedinki izvan vremena presvlačenja zabilježen trend prosvjetljenja kutikule, no bez statističke značajnosti. Nadalje, jedinke vrste *P. coxalis* koje su mikroinjektirane u vremenu presvlačenja također pokazuju utišavanje gena *Scarlet* (slika 24, tablica 11), dok jedinke mikroinjektirane izvan vremena presvlačenja pokazuju isti trend, samo u manjoj mjeri (slika 25, tablica 12). Ovi rezultati upućuju da RNAi kao metoda utišavanja gena funkcionira kod ovih dviju vrsta, te da je za gene uključene u sintezu pigmenata kod jednakonožnih rakova optimalno vrijeme mikroinjektiranja u vrijeme presvlačenja. Moji rezultati također ukazuju na to da je sinteza pigmenata najintenzivnija tokom odnosno malo nakon presvlačenja (Campli i sur. 2024), što je u skladu sa Figon i Casas (2018) i Linzen (1974) koji opisuju omokrome kao krajnje produkte triptofanske detoksifikacije, a triptofan se kod kukaca javlja u visokim koncentracijama tokom presvlačenja. Prikazani rezultati su skladu sa rezultatima istraživanja Souza i sur. (2022) koji su, također metodom RNAi, izazvali fenotipsku promjenu obojenosti kukca *Nezara viridula* L. utišavanjem *White* gena koja se vidjela 2-10 dana nakon unosa dsRNA gena u organizam. Rezultati njihova istraživanja su bili bolji u jedinkama koje su tretirali 3-5 dana prije zadnjeg presvlačenja nimfi, u usporedbi s tretiranim već odraslim jedinkama. Kao i meni, najbolji rezultati su bili 4-10 dana nakon tretmana. Oni su jedinke pratili do 30 dana, a svoje rezultate su potvrdili koristeći *real-time* PCR te su radili dodatne kvantifikacije omokroma metodom tekuće kromatografije i masene spektrometrije visoke rezolucije te su pokazali smanjenje određenih omokromskih prekursora (3- hidroksikinurenina) u tretiranim jedinkama naspram kontrole. Tijekom eksperimenta sam zaključila i da je optimalno vrijeme praćenja fenotipa do 9-10 dana nakon mikroinjektiranja, budući da je kod obje vrste primijećeno slabljenje utjecaja injektirane dsRNA nakon tog vremenskog perioda (slike 17, 24), dok su Lin i sur. (2023) pratili promjene u cirkadijanom ritmu do tjedan dana, a Souza i sur. (2022) su zabilježili utišavanje željenog gena i do 30 dana nakon tretmana. Također, iako sam uspješno izazvala smanjenje pigmentacije utišavanjem gena *Scarlet*, zbog velike smrtnosti jedinki tokom eksperimenta vrste *P. coxalis* potrebno je dodatno uhodavanje metode.

Trend potamnjenja kontrola (slike 19, 20, 26, 27) u mojim istraživanjima (GFP i NK) u skladu je sa dosadašnjim istraživanjima koja rakove porodice Asellidae u literaturi opisuju kao fenotipski vrlo plastičnim vrstama (Protas i sur. 2011; Mojaddidi i sur. 2018; Re i sur. 2018; Lafuente i sur. 2021; Baković i sur. 2021; Rodas i sur. 2023) te su jedinke tamnije obojene u svijetlom staništu.

Protas i sur. (2011) su u svom radu naveli moguće gene koji imaju ulogu u pigmentaciji tijela vrste *A. aquaticus*, kojima pripada i *Scarlet*, te su utvrdili manju ekspresiju gena *Scarlet* jedinki koje nastanjuju špiljska staništa, koje su svjetlije obojene, u odnosu na one tamnije, koji nastanjuju površinska staništa. To je također u skladu s mojim istraživanjem gdje sam pokazala da gen *Scarlet* ima ulogu u pigmentaciji jednakonožnih rakova porodice Asellidae te sam ovim eksperimentima po prvi put i na funkcionalan način pokazala da su omokromi pigmenti odgovorni za obojenje tijela ovih rakova.

5.1. Buduća istraživanja

Metodu bi trebalo još dodatno prilagoditi vrsti *P. coxalis* kako bi se smanjila smrtnost. Rezultate bi dodatno trebalo analizirati lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu kako bi se potvrdilo da je stvarno došlo do utišavanja gena *Scarlet* koje je posljedično uzrokovalo pokazane fenotipske promjene, odnosno koje je uzrokovalo posvijetljenje životinja naspram kontrola. Također bi bilo dobro ponoviti istraživanje s većim brojem jedinki koje bi se mikroinjektirale sa dsRNA gena *Scarlet* kako bi, uzimajući u obzir smrtnost, imali veći broj podataka za statističku analizu.

ZAKLJUČAK

RNAi je metoda koja se sve češće koristi u genetičkim istraživanjima rakova. Iako nedostaje istraživanja RNAi kod jednakonožnih rakova, metoda na skupini ima veliki potencijal. Prethodno je pokazano da je mikroinjektiranje najbolja metoda unosa dsRNA u organizam životinje kako bi se potakla reakcija RNAi i kako bi došlo do utišavanja željenog gena. U ovom je istraživanju optimizirana i opisana primjena ove metode u jednakonožnim rakovima porodice Asellidae. Rezultati su potvrdili funkciju gena *Scarlet* u omokromskom sintetskom putu, jer mikroinjektiranjem dsRNA gena *Scarlet* dolazi do fenotipske promjene smanjenja pigmentacije u jednakonožnim rakovima porodice Asellidae. Dodatno, utvrđeno je da je sinteza omokroma veća u vrijeme presvlačenja u odnosu na vrijeme kad se jedinke ne presvlače, iako i tada postoji jer je utišavanje gena *Scarlet* i u jedinkama van vremena presvlačenja dovelo do smanjenja pigmentacije tijela.

LITERATURA

Agrawal N., Dasaradhi P. V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R. K., Mukherjee S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(4):657-85. doi: <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657-685>

Alshaer W., Zureigat H., Al Karaki A, Al-Kadash A., Gharaibeh L., Hatmal M. M., Aljabali A. A., Awidi A. (2021). siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *Eur J Pharmacol.* 905:174178. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174178. Epub 2021 May 24. Erratum in: *Eur J Pharmacol.* 2022 Feb 5;916:174741. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.17474>

Bakovic V., Martin Cerezo ML., Höglund A., Fogelholm J., Henriksen R., Hargeby A., Wright D. (2021). The genomics of phenotypically differentiated *Asellus aquaticus* cave, surface stream and lake ecotypes. *Mol Ecol.* 30(14):3530-3547. doi: <https://doi.org/10.1111/mec.15987>

Camppli G., Volovych O., Kim K., Veldsman W.P., Drage H.B., Sheizaf I., Lynch S., Chipman A.D., Daley A.C., Robinson-Rechavi M., Waterhouse R.M. (2024), The moulting arthropod: a complete genetic toolkit review. *Biol Rev.* doi: <https://doi.org/10.1111/brv.13123>

Clark D. P., Pazdernik N. J. (2013). Regulation at the RNA level. *Mol Biol.* 553–580. doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378594-7.00018-4>

Cunningham P. C., Waldeck K., Ganetzky B., Babcock D. T. (2018). Neurodegeneration and locomotor dysfunction in *Drosophila* scarlet mutants. *J Cell Sci.* 131(18). doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.216697>

Figon F., Casas J. (2018). Ommochromes in invertebrates: biochemistry and cell biology. *Biol Rev.* doi: <https://doi.org/10.1111/brv.12441>

Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello S. S. (1998.) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *C. elegans*. *Nat.* 391:806–811. doi: <https://doi.org/10.1038/35888>

Ge H. L., Tan K., Shi L. L., Sun R., Wang W. M., Li Y. H. (2020). Comparison of effects of dsRNA and siRNA RNA interference on insulin-like androgenic gland gene (IAG) in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Gene.* 144783. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144783>

- Grubbs N., Haas S., Beeman R.W., Lorenzen M. D. (2015). The ABCs of eye color in *Tribolium castaneum*: orthologs of the *Drosophila* white, scarlet, and brown genes. *Genet.* 199(3;1) 749–759. doi: <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173971>
- Habdija I., Primc Habdija B., Radanović I., Špoljar M., Matoničkin Kepčija R., Vujčić K., Vujčić S., Miliša M., Ostojić A., Sertić Perić M. (2011). Protista-protozoa i metazoa-invertebrata: Strukture i funkcije. Alfa. 584.
- Han H. (2018). RNA Interference to knock down gene expression. *Methods Mol Biol.* 1706, 293–302. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16
- Ismail N. I. B., Kato Y., Matsuura T., Watanabe H. (2018). Generation of white-eyed *Daphnia magna* mutants lacking scarlet function. *PLoS One.* 13(11). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205609>
- Ismail N. I. B., Kato Y., Matsuura T., Gómez-Canela C., Barata C., Watanabe H. (2021) Reduction of histamine and enhanced spinning behavior of *Daphnia magna* caused by scarlet mutant. *Gen.* 59(3). <https://doi.org/10.1002/dvg.23403>
- Jovović L., Bedek J., Malard F., Bilandžija H. (2024). *De novo* transcriptomes of cave and surface isopod crustaceans: insights from 11 species across three suborders. *Sci Data* 11. 595. doi: <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03393-y>
- Kato Y., Kobayashi K., Watanabe H., Iguchi T. (2011). Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: Deep conservation of a Doublesex gene in the sex-determining pathway. *PLoS Genet.* 2011, 7. doi: [10.1371/journal.pgen.1001345](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001345)
- Kowalko J.E., Ma L., Jeffery W.R. (2016). Genome editing in *Astyanax mexicanus* using Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs). *J Vis Exp.* (112). doi: <https://doi.org/10.3791/54113>
- Lafuente E., Lürig M. D., Rövekamp M., Matthews B., Buser C., Vorburger C., Räsänen K. (2021). Building on 150 years of knowledge: the freshwater isopod *Asellus aquaticus* as an integrative eco-evolutionary model system. *Front Ecol Evol.* 9, 748212. doi: <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.748212>

- Lin Z., Green E. W., Webster S. G., Hastings M. H., Wilcockson D. C., Kyriacou C. P. (2023). The circadian clock gene *bmall* is necessary for co-ordinated circatidal rhythms in the marine isopod *Eurydice pulchra* (Leach). PLoS Genet. 19(10). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1011011>
- Linzen B. (1974.). The tryptophan → ommochrome pathway in insects. Adv Insect Physio. 10, 117-246. doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60130-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60130-7)
- Lukić M., Jovović L., Bedek J., Grgić M., Kuharić N., Rožman T. (2024). A practical guide for the husbandry of cave and surface invertebrates as the first step in establishing new model organisms. PLoS One. 19(4). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0300962>
- Marcus J. H. (1990). Moulting as an Indicator of Growth in *Asellus aquaticus* (L., 1758) and *A. meridianus* Racovitza, 1919 (Isopoda). Crustaceana, 58(2), 136–143. <http://www.jstor.org/stable/20104536>
- Martin A., Serano J. M., Jarvis E., Bruce H. S., Wang J., Ray S., Barker C. A., O'Connell L. C., Patel N. H. (2016). CRISPR/Cas9 Mutagenesis Reveals Versatile Roles of Hox Genes in Crustacean Limb Specification and Evolution. Curr Biol. 26(1), 14-26. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.021>
- Mojaddidi, H., Fernandez, F. E., Erickson, P. A., Protas, M. E. (2018). Embryonic origin and genetic basis of cave associated phenotypes in the isopod crustacean *Asellus aquaticus*. Sci Rep. 8(1). doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34405-8>
- Nagaraju G.P.C., Rajitha B., Borst D.W. (2011). Molecular cloning and sequence of retinoid X receptor in the green crab *Carcinus maenas*: A possible role in female reproduction. J. Endocrinol. 210, 379–390. doi: <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0154>
- Needham A.E. (1970.). The integumental pigments of some isopod crustacea, Comp Biochem Physio. 35(3), 509-534. doi: [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(70\)90970-9](https://doi.org/10.1016/0010-406X(70)90970-9).
- Pamuru R.R., Rosen O., Manor R., Chung J.S., Zmora N., Glazer L., Aflalo E.D., Weil S., Tamone S.L., Sagi A. (2012). Stimulation of molt by RNA interference of the molt-inhibiting hormone in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. Gen Comp Endocrinol. 178, 227–236. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.05.007>

Peijie C., Guan P., Feng C., Irina S. D. (2021). Strain Improvement and Genetic Engineering of Trichoderma for Industrial Applications. *Encyclop Mycol.* 505-517. doi: [10.1016/B978-0-12-819990-9.00029-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819990-9.00029-9)

Protas M. E., Trontelj P., Patel N. H. (2011). Genetic basis of eye and pigment loss in the cave crustacean, *Asellus aquaticus*. *PNAS.* 108(14), 5702–5707. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1013850108>

Pushparaj P., Aarthi J.J., Manikandan J., Srinivasan D. K. (2008). siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo applications. *J Dent Res.* 87. 992-1003. doi: <https://doi.org/10.1177/154405910808701109>

Re C., Fišer Ž., Perez J., Tacdol A., Trontelj P., Protas M. E. (2018). Common genetic basis of eye and pigment loss in two distinct cave populations of the isopod crustacean *Asellus aquaticus*. *ICB.* 58(3), 421-430. doi: <https://doi.org/10.1093/icb/icy028>

Rodas L. R., Sarbu S. M., Bancila R., Price D., Fišer Ž., Protas M. (2023). Standing genetic variation as a potential mechanism of novel cave phenotype evolution in the freshwater isopod, *Asellus aquaticus*. *Evol Develop.* 25(2), 137-152. doi: <https://doi.org/10.1111/ede.12428>

Sagi A., Manor R., Ventura T. (2013). Gene silencing in crustaceans: from basic research to biotechnologies. *Genes.* 4(4), 620-645. doi: <https://doi.org/10.3390/genes4040620>

Sharabi O., Ventura T., Manor R., Aflalo E.D., Sagi A. (2013). Epidermal growth factor receptor in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Function and putative signaling cascade. *Endocrino.* 154, 3188–3196. doi: <https://doi.org/10.1210/en.2013-1259>

Souza D., Christensen S. A., Wu K., Buss L., Kleckner K., Darrisaw C., Shirk P. D., Siegfried B. D. (2022). RNAi-induced knockdown of white gene in the southern green stink bug (*Nezara viridula* L.). *Sci Rep.* 12(1), 10396. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14620-0>

Vastenhouw N. L., Brunschwig K., Okihara K. L., Müller F., Tijsterman M., Plasterk R. H. (2006). Gene expression: long-term gene silencing by RNAi. *Nat.* 442(7105):882. doi: <https://doi.org/10.1038/442882a>

Verovnik R., Sket B., Trontelj P. (2005). The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) proceeded from ancient refugia and was

directed by habitat connectivity. *Mol Ecol.* 14(14), 4355-4369. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02745.x>

Wang S., Chen A.J., Shi L.J., Zhao X.F., Wang J.X. (2012). TRBP and eIF6 homologue in *Marsupenaeus japonicus* play crucial roles in antiviral response. *PLoS One.* 7. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030057>

Wouters K., Vercauteren T. (2009). *Proasellus coxalis* sensu auct. (Crustacea, Isopoda) in a lowland brook in Heist-op-den-Berg: first record in Belgium. *Lauterbornia.* 67. 53-61.

Xu S., Pham T. P., Neupane S. (2020). Delivery methods for CRISPR/Cas9 gene editing in crustaceans. *MLST.* 2, 1-5. doi: <https://doi.org/10.1007/s42995-019-00011-4>

Web stranice:

Asellus aquaticus (Linnaeus, 1758) in GBIF Secretariat (2023). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> (pristupljeno 23.07.2024.)

highQu GmbH ® 2024. https://www.highqu.com/media/wysiwyg/ressources/manuals/HSM03_ALLin_HS_Red_Taq_Mastermix_PI.pdf (pristupljeno 15.07.2024.)

Proasellus coxalis (Dollfus, 1892) in GBIF Secretariat (2023). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> (pristupljeno 23.07.2024.)

Promega Corporation, 2024. <https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath/tm-calculator/> (pristupljeno 15.07.2024.)

Thermo Fisher Scientific Inc., 2006-2024. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html> (pristupljeno 15.07.2024.)

VLIZ Alien Species Consortium (2020). *Proasellus coxalis*. Non-native species of the Belgian part of the North Sea and bordering estuaries anno 2020. Flemish Institute for the Sea (VLIZ). 5 pp <https://www.vliz.be/niet-inheemse-soorten/en/proasellus-coxalis> (pristupljeno 15.07.2024.)

ŽIVOTOPIS

Martina Kuzman, završila Turističku gimnaziju u Turističkoj i ugostiteljskoj školi Dubrovnik, završila Preddiplomski studij biologije na Odjelu za Biologiju Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku. Trenutno pohađa Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija, modul: Fiziologija i imunobiologija. Obavljala je laboratorijsku stručnu praksu na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za molekularnu biologiju, Laboratorij za molekularnu genetiku.

PRILOG

U prilogu se nalaze dodatni rezultati koji pokazuju preživljenje jedinki u eksperimentu mikroinjektiranja dsRNA gena *Scarlet*, dsRNA proteina GFP te kontrole jedinki koje nisu injektirane koji su prikazani u tablicama P1 i P2.

Tablica P1. Preživljenje jedinki vrste *A. aquaticus* u eksperimentu zabilježeno u određenim vremenskim periodima od mikroinjektiranja (MI). Jedinke u presvlačenju (Moult), jedinke mikroinjektirane sa dsRNA gena *Scarlet* (RNAi), jedinke mikroinjektirane sa dsRNA proteina GFP (GFP), negativna kontrola jedinki koje nisu injektirane (NK), uginula (0), živa (1)

Oznaka	Napomena	Datum MI	2-3 dana nakon MI	4-5 dana nakon MI	6-7 dana nakon MI	9-10 dana nakon MI
RNAi1	Moult	5/6/24	1	1	1	1
RNAi2	Moult	5/6/24	0	0	0	0
RNAi3	Moult	5/6/24	1	1	1	1
RNAi4	/	5/6/24	0	0	0	0
GFP1	Moult	5/6/24	0	0	0	0
GFP2	/	5/6/24	1	1	1	1
GFP3	/	5/6/24	1	1	1	1
NK1	/	5/6/24	0	0	0	0
NK2	/	5/6/24	1	1	1	1
RNAi1	/	18/6/24	1	1	1	1
RNAi2	Moult	18/6/24	1	1	1	1
RNAi3	Moult	18/6/24	1	1	1	1
RNAi4	Moult	18/6/24	1	1	1	1
RNAi5	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi6	/	18/6/24	1	1	1	1
RNAi7	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi8	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi9	/	18/6/24	1	1	1	1
RNAi10	/	18/6/24	1	1	1	1

RNAi11	/	18/6/24	1	1	1	1
RNAi12	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi13	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi14	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi15	/	18/6/24	0	0	0	0
GFP1	/	18/6/24	0	0	0	0
GFP2	Moult	18/6/24	1	1	1	1
GFP3	/	18/6/24	1	1	1	1
GFP4	/	18/6/24	1	1	1	1
GFP5	/	18/6/24	1	1	1	1
GFP6	/	18/6/24	1	1	1	1
GFP7	/	18/6/24	1	1	1	1
GFP8	/	18/6/24	1	1	1	1
GFP9	Moult	18/6/24	1	1	1	1
GFP10	/	18/6/24	1	1	1	1
NK1	/	18/6/24	1	1	1	1
NK2	/	18/6/24	1	1	1	1
NK3	/	18/6/24	1	1	1	1
NK4	/	18/6/24	1	1	1	1
NK5	/	18/6/24	1	1	1	1
RNAi 8/4	Moult	8/4/24	1	1	1	1
RNAi 8/5	Moult	8/4/24	1	1	1	1
RNAi 8/6	Moult	8/4/24	1	1	1	1
RNAi 8/7	Moult	8/4/24	1	1	1	1
RNAi 8/8	Moult	8/4/24	1	1	1	1
RNAi 8/9	Moult	8/4/24	1	1	1	1
RNAi 8/10	Moult	8/4/24	1	1	1	1
RNAi 8/11	Moult	8/4/24	1	1	1	1
RNAi 20/1	Moult	20/3/24	0	0	0	0
RNAi 20/2	Moult	20/3/24	0	0	0	0

RNAi 20/3	Moult	20/3/24	0	0	0	0
RNAi 20/4	Moult	20/3/24	1	1	1	1
RNAi 11/1	/	11/3/24	1	1	1	1
RNAi 11/2	/	11/3/24	1	1	1	1
RNAi 11/3	/	11/3/24	0	0	0	0
RNAi 11/4	/	11/3/24	0	0	0	0

Tablica P2. Preživljenje jedinki vrste *P. coxalis* u eksperimentu zabilježeno u određenim vremenskim periodima od mikroinjektiranja (MI). Jedinke u presvlačenju (Moult), jedinke mikroinjektirane sa dsRNA gena *Scarlet* (RNAi), jedinke mikroinjektirane sa dsRNA GFP (GFP), negativna kontrola koja nije injektirana (NK), uginula (0), živa (1)

Oznaka	Napomena	Datum MI	2-3 dana nakon MI	4-5 dana nakon MI	6-7 dana nakon MI	9-10 dana nakon MI
RNAi1	Moult	5/6/24	1	1	1	1
RNAi2	/	5/6/24	0	0	0	0
RNAi3	Moult	5/6/24	1	1	1	1
RNAi4	Moult	5/6/24	1	1	1	1
GFP1	Moult	5/6/24	1	1	1	1
GFP2	/	5/6/24	0	0	0	0
GFP3	/	5/6/24	1	1	1	1
GFP4	Moult	5/6/24	1	0	0	0
NK1	/	5/6/24	1	1	1	1
NK2	/	5/6/24	1	1	1	1
NK3	/	5/6/24	1	1	1	1
RNAi1	/	18/6/24	0	0	0	0

RNAi2	Moult	18/6/24	1	1	1	1
RNAi3	Moult	18/6/24	1	1	1	1
RNAi4	Moult	18/6/24	1	1	1	1
RNAi5	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi6	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi7	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi8	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi9	/	18/6/24	1	1	1	1
RNAi10	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi11	/	18/6/24	1	0	0	0
RNAi12	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi13	/	18/6/24	0	0	0	0
RNAi14	/	18/6/24	1	1	1	1
RNAi15	/	18/6/24	0	0	0	0
GFP1	/	18/6/24	1	1	1	1
GFP2	Moult	18/6/24	0	0	0	0
GFP3	/	18/6/24	1	1	1	1
GFP4	/	18/6/24	0	0	0	0
GFP5	/	18/6/24	1	1	1	1
GFP6	/	18/6/24	0	0	0	0
GFP7	/	18/6/24	0	0	0	0
GFP8	/	18/6/24	0	0	0	0

GFP9	Moult	18/6/24	0	0	0	0
GFP10	/	18/6/24	0	0	0	0
NK1	/	18/6/24	0	0	0	0
NK2	/	18/6/24	1	1	1	1
NK3	/	18/6/24	1	1	1	1
NK4	/	18/6/24	0	0	0	0
NK5	/	18/6/24	1	1	1	1
RNAi 8/1	Moult	8/4/24	0	0	0	0
RNAi 8/2	Moult	8/4/24	1	1	1	1
RNAi 8/3	Moult	8/4/24	1	1	1	1
RNAi 22/1	Moult	22/4/24	0	0	0	0
RNAi 22/2	Moult	22/4/24	0	0	0	0
RNAi 22/3	Moult	22/4/24	0	0	0	0
RNAi 22/4	Moult	22/4/24	0	0	0	0
RNAi 22/5	Moult	22/4/24	0	0	0	0
RNAi 26/1	/	26/3/24	0	0	0	0
RNAi 26/2	/	26/3/24	0	0	0	0
RNAi 26/3	/	26/3/24	0	0	0	0
RNAi 26/4	/	26/3/24	0	0	0	0
RNAi 26/5	/	26/3/24	0	0	0	0
RNAi 26/6	/	26/3/24	0	0	0	0
RNAi 13/3	/	5/3/24	1	1	1	1
RNAi 13/5	/	5/3/24	0	0	0	0