

Karakterizacija satelitnih DNA kukca brašnara *Tribolium freemani* Hinton

Veseljak, Damira

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:864868>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Damira Veseljak

Karakterizacija satelitnih DNA kukca brašnara
***Tribolium freemani* Hinton**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za strukturu i funkciju heterokromatina Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Brankice Mravinac. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Veliku zahvalnost željela bih uputiti svojoj mentorici dr. sc. Brankici Mravinac zbog neizmjerne podrške, pozitivnosti, strpljenja i vodstva tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam za sva znanja koje ste mi prenijeli, za savjete i za iskustvo koje sam stekla.

Također zahvaljujem djelatnicima Laboratorija za strukturu i funkciju heterokromatina Instituta Ruđer Bošković na pomoći, savjetima i suradnji.

Hvala mojoj obitelji na podršci i ljubavi te mojim prijateljima koji su mi uljepšali studentske dane.

Veliko hvala Nevenu na neiscrpoj emocionalnoj podršci i mnogo ljubavi te hvala njegovoj obitelji.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima bez čije stalne potpore, ljubavi i vjere ne bih bila to što sam danas.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Karakterizacija satelitnih DNA kukca brašnara *Tribolium freemani* Hinton

Damira Veseljak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Satelitne DNA su uzastopno ponavljajuće sekvence DNA dominantno smještene u heterokromatinskim regijama eukariotskih genoma. Iako često zaprimaju značajan udio u genomima, funkcija im još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Kukac brašnar *Tribolium freemani*, učestali štetnik u skladištima hrane, zanimljiv je za laboratorijska istraživanja zbog bliske srodnosti s modelnim organizmom *Tribolium castaneum*. Prije četvrt stoljeća u genomu vrste *T. freemani* opisana je satelitna DNA koja čini gotovo trećinu genomske sekvence. U ovom radu genom vrste *T. freemani* sekvenciran je tehnologijom sekvenciranja nove generacije (NGS) sa svrhom pronalaženja dosad neotkrivenih satelitnih DNA. Upotrebom bioinformatičkog alata TAREAN koji identificira potencijalne satelitne sekvence na temelju neposloženih NGS očitavanja otkriveno je šest novih, niskozastupljenih satelitnih DNA čiji kumulativni udio u genomu iznosi <0,2%. Uzastopno ponovljena organizacija ovih sekvenci uspješno je dokazana metodom hibridizacije Southern blot, dok je pomoću metode fluorescencijske hibridizacije *in situ* određen njihov kromosomski smještaj. Bioinformatičkom analizom utvrđeno je da u genomu sestrinske vrste *T. castaneum* postoje sekvence homologne novootkrivenim satelitnim DNA vrste *T. freemani*, a njihova usporedba pokazala je da satelitni monomeri unutar dviju vrsta evoluiraju slijedeći principe usklađene evolucije.

(59 stranica, 27 slika, 19 tablica, 68 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Tribolium freemani*, satelitna DNA, sekvenciranje nove generacije

Voditelj: Dr. sc. Brankica Mravinac, viši znanstveni suradnik

Suvoditelj: Dr. sc. Višnja Besendorfer, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Višnja Besendorfer, red. prof.

Dr. sc. Dijana Škorić, red. prof.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Rad prihvaćen: 28. 11. 2019

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Characterization of satellite DNAs of the flour beetle *Tribolium freemani* Hinton

Damira Veseljak

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Satellite DNAs are tandemly repeated sequences located mainly in the heterochromatic regions of the eukaryotic genomes. Even though they often take large parts of the genome, their function is still not entirely understood. The flour beetle *Tribolium freemani*, a common pest in food storage units, is experimentally interesting because its sibling species is *Tribolium castaneum*, a well-established model organism. Quarter of a century ago, the main satellite DNA that comprises one third of the *T. freemani* genome has been characterised. In this thesis the *T. freemani* genome was sequenced by Next Generation Sequencing (NGS) technology in order to detect the satellite sequences that were unidentified until now. Six new low-copy satellite DNAs with a combined percentage of <0.2% were discovered. This was done by using the bioinformatic pipeline TAREAN, which enables detection of putative satellite DNAs from unassembled short reads. The tandemly repeated organisation of these sequences has been successfully proven by using the Southern blot method, while their chromosomal location was determined by fluorescence *in situ* hybridization. Bioinformatical analysis showed that the newly detected *T. freemani* satellite DNAs have homologous sequences in their sibling species *T. castaneum*. The comparison showed that satellite monomers of the two species evolve by the principles of concerted evolution.

(59 pages, 27 figures, 19 tables, 68 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: *Tribolium freemani*, satellite DNA, Next Generation Sequencing

Supervisor: Dr. Brankica Mravinac, Senior Research Associate

Cosupervisor: Dr. Višnja Besendorfer, Prof.

Reviewers: Dr. Višnja Besendorfer, Prof.

Dr. Dijana Škorić, Prof.

Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 28. 11. 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Satelitne DNA.....	1
1.2. Kukac brašnar <i>Tribolium freemani</i>	3
1.3. Cilj istraživanja.....	5
2. MATERIJALI I METODE.....	6
2.1. Materijali.....	6
2.1.1. Životinjski materijal.....	6
2.1.2. Osnovne kemikalije.....	6
2.1.3. Puferi i otopine.....	6
2.1.4. Kompleti reagensija.....	8
2.1.5. Enzimi.....	8
2.1.6. Elektroforetski biljeg.....	8
2.1.7. Plazmidni vektor.....	9
2.1.8. Bakterijski soj.....	9
2.1.9. Tehnička oprema i uređaji.....	9
2.1.10. Ostali materijali.....	10
2.2. Metode.....	10
2.2.1. Izolacija genomske DNA.....	10
2.2.2. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama.....	11
2.2.3. Umnažanje odsječaka DNA metodom lančane reakcije polimerazom... 11	
2.2.3.1. Početnice.....	11
2.2.3.2. Reakcijske smjese PCR-a i uvjeti reakcija.....	12
2.2.4. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA u agaroznom gelu.....	14
2.2.5. Izolacija odsječaka DNA iz agaroznog gela.....	14
2.2.6. Kloniranje odsječaka DNA.....	14
2.2.6.1. Ligacija odsječaka DNA i plazmidnog vektora.....	14
2.2.6.2. Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica.....	15
2.2.6.3. PCR na bakterijskim kolonijama.....	15
2.2.6.4. Izolacija plazmidne DNA.....	16
2.2.6.5. Određivanje nukleotidnih sljedova kloniranih odsječaka DNA.....	16
2.2.7. Obilježavanje hibridizacijskih sonda.....	16

2.2.8 Hibridizacijska analiza prema Southernu.....	17
2.2.8.1. Prijenos odsječaka DNA na najlonsku membranu.....	17
2.2.8.2. Prehibridizacija i hibridizacija membrana.....	17
2.2.8.3. Otkrivanje hibridizacijskog signala.....	17
2.2.9. Fluorescencijska hibridizacija <i>in situ</i> (FISH).....	18
2.2.9.1. Priprema citogenetičkih preparata.....	18
2.2.9.2. Prehibridizacija i hibridizacija <i>in situ</i>	18
2.2.9.3. Otkrivanje fluorescencijskog signala.....	19
2.2.9.4. Mikroskopska analiza citogenetičkih preparata.....	19
2.2.10. Bioinformatička analiza.....	19
2.2.10.1. Analiza genoma vrste <i>T. freemani</i>	19
2.2.10.2. Analiza kloniranih odsječaka DNA.....	20
3. REZULTATI.....	22
3.1. Identifikacija satelitnih DNA u genomu vrste <i>T. freemani</i> sekvenciranom metodom NGS.....	22
3.2. Kloniranje i karakterizacija odsječaka sedam satelitnih DNA vrste <i>T. freemani</i> ...24	
3.3. Genomska organizacija satelitnih DNA.....	33
3.4. Kromosomska lokalizacija satelitnih DNA.....	37
3.5. Usporedba satelitnih DNA vrste <i>T. freemani</i> s ortolognim sekvencama iz genoma vrste <i>Tribolium castaneum</i>	41
4. RASPRAVA.....	52
5. ZAKLJUČAK.....	55
6. LITERATURA.....	56
7. PRILOZI.....	I

POPIS KRATICA

KRATICA	ZNAČENJE
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DAPI	engl. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride</i>
EDTA	engl. <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
FISH	fluorescencijska hibridizacija <i>in situ</i> ; engl. <i>fluorescence in situ hybridization</i>
HOR	engl. <i>Higher Order Repeat</i>
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktozid
LB	engl. <i>Luria Broth</i>
ML	engl. <i>Maximum Likelihood</i>
NGS	engl. <i>Next Generation Sequencing</i>
pb	parova baza
PBS	engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	lančana reakcija polimeraze; engl. <i>polymerase chain reaction</i>
satDNA	satelitna DNA
SDS	engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SOC	engl. <i>Super Optimal Broth with Catabolite Repression</i>
SSC	engl. <i>Saline Sodium Citrate</i>
TAE	engl. <i>Tris-Acetate-EDTA</i>
TAREAN	engl. <i>Tandem Repeat Analyzer</i>
TE	engl. <i>Tris-EDTA</i>
X-gal	5-brom-4-klor-3-indolil- β -D-galaktozid

1. UVOD

1.1. Satelitne DNA

Heterokromatinske regije eukariotskih genoma bogate su različitim tipovima ponavljajućih sekvenci DNA. Takve sekvence mogu biti raspršene po genomu, ali i nalaziti se u tandemskim ponavljanjima. Satelitne DNA (satDNA) primjer su nekodirajućih sekvenci čije se monomerne jedinice uzastopno ponavljaju mnogo puta gradeći pritom nizove duge i do nekoliko megabaza (Mb). Smještene su prvenstveno u području (peri)centromernog i subtelomernog heterokromatina (Garrido-Ramos, 2017.). Iako su dugi niz godina svrstavane u skupinu tzv. otpadnih DNA (eng. *junk DNA*) te se smatralo da su transkripcijski neaktivne, razvojem istraživanja postalo je jasno da satDNA obavljaju značajnu ulogu u eukariotskim genomima. Kao najčešća DNA gradivna komponenta aktivnih centromera, satDNA imaju ulogu u pravilnom razdvajanju kromosoma tijekom mitoze i mejoze (Schueler *i sur.*, 2001.). Preko mehanizama RNA interferencije (RNAi), transkripcijski aktivne satDNA reguliraju sklapanje i održavanje heterokromatina (Verdel *i sur.*, 2004.; Volpe *i sur.*, 2002.). Osim toga, pokazano je da satDNA sudjeluju i u regulaciji ekspresije gena (Ugarković, 2005.). Zbog svoje brze evolucije satDNA u centromerama mogu uzrokovati promjene u centromernim proteinima i tako posredno pomoći pri specijaciji vrsta (Henikoff *i sur.*, 2001.). Nadalje, postoje korelacije između prekomjerne ekspresije pericentromernih satDNA i razvoja pojedinih tumora ili genetičkih bolesti (Ferreira *i sur.*, 2015.).

Karakteristična struktura satDNA su monomeri uzastopno ponavljeni u orijentaciji glava-rep. Kod pojedinih satDNA uočene su također i jedinice organizacije višeg reda (eng. *higher-repeat order*, HOR) kod kojih monomeri grade novu jedinicu ponavljanja (Palomeque i Lorite, 2008.). Poznato je da u eukariotskim genomima postoji više tipova različitih satDNA koje se međusobno mogu razlikovati po nukleotidnim sekvencama, veličini ponavljajuće jedinice, zastupljenosti i lokaciji na kromosomu. Zbog toga se satDNA smatraju visoko varijabilnim dijelovima genoma (Garrido-Ramos, 2017.).

Kao i ostatak genoma, satDNA su podložne mutacijama. Usprkos mutacijama, nukleotidne sekvence monomera unutar pojedine satDNA ne razlikuju se mnogo (Plohl *i sur.*, 2012.). Razlog tome je širenje mutacija kroz satDNA porodicu stvarajući tako homogenizirane monomere. Homogenizirani monomeri fiksiraju se unutar vrste spolnim načinom razmnožavanja i mejozom. Takav način evolucije naziva se usklađena evolucija. Rezultat usklađene evolucije satelita je veća srodnost satelitnih monomera unutar vrste, nego što je sličnost monomera među različitim vrstama (Dover, 1986.). Mehanizmi zaslužni za homogenizaciju i fiksaciju mutacija u genomu su genska konverzija, nejednoliki crossing-over (eng. *unequal crossing over*), replikacija mehanizmom "kotrljajućeg prstena" (engl. *rolling-circle mechanism*) te mehanizmi zasnovani na transpoziciji (Plohl *i sur.*, 2012.). Genska konverzija omogućava širenje mutacija s jednog monomera na drugi ne mijenjajući pritom broj

kopija ponovljenih jedinica, dok nejednoliki crossing-over širi promjene i mijenja broj ponovljenih jedinica uzrokujući skraćivanje ili produljenje ponavljajućih nizova (Smith, 1976.).

U interpretaciji evolucije satDNA prisutna je također i hipoteza „satelitne knjižnice“ (eng. „*library*“ *hypothesis*). Hipoteza pretpostavlja da se u genomima srodnih vrsta mogu pronaći srodne satDNA naslijeđene od zajedničkog pretka koje su kod različitih vrsta evoluirale u različitim smjerovima mijenjajući prvenstveno broj kopija u pojedinoj vrsti, a manje samu sekvencu te se na taj način formira vrsno specifičan profil satDNA (Plohl *i sur.*, 2012.). Hipotezu su predložili Fry i suradnici istražujući satDNA glodavaca vrste *Dipodomys ordii* (Fry i Salser, 1977.), a eksperimentalno je po prvi puta dokazana kod kukaca roda *Palorus* (Meštrović *i sur.*, 1998.). „Satelitne knjižnice“ eksperimentalno su dokazane i kod više vrsta riba iz porodice Acipenseridae kod kojih su monomeri satDNA očuvani iako su se vrste odvojile prije 100 milijuna (Robles *i sur.*, 2004.). Visoku očuvanost satDNA pokazuju i vrste kukaca roda *Palorus* kod kojih je porodica satDNA pod nazivom PRAT očuvana najmanje 50-60 milijuna godina (Mravinac *i sur.*, 2002.) te vrste oblića roda *Meloidogyne* kod kojih su satDNA očuvane iako su se vrste odvojile prije 45 milijuna godina (Meštrović *i sur.*, 2006.).

Zbog svoje repetitivnosti i nukleotidne strukture, ali i ograničenja alata za sekvenciranje i softverskih tehnologija, detekcija novih satDNA ostaje izazov za istraživače (Treangen i Salzberg, 2011.). Računalni alati koji se koriste za detekciju novih satDNA često se oslanjaju na otkrivanje ponavljanja u već posloženim genomima kao npr. Tandem Repeat Finder (Benson, 1999.) ili otkrivaju nova ponavljanja na temelju sličnosti s već opisanim satDNA kao npr. RepeatMasker (Smith *i sur.*, 2015.). Budući da brojne tehnike pripreme za sekvenciranja uključuju metodu PCR, satelitni sljedovi bogati GC parovima baza mogu ostati skriveni. Nadalje, iako razvoj platforme Illumina omogućuje učinkovito sekvenciranje genoma pomoću kratkih očitavanja, takav pristup ne odgovara strukturi dužih ponavljajućih monomera većine satDNA (Lower *i sur.*, 2018.). Međutim, razvoj novih tehnologija u detektiranju satDNA usmjeren je prema rješavanju navedenih problema. Veliki pomak u analizi satDNA na temelju kratkih očitavanja dobivenih sekvenciranjem nove generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS) napravljen je razvojem računalnih alata kao što je primjerice program Repeat Explorer (Novák *i sur.*, 2013.; Novák *i sur.*, 2010.). Spomenuti računalni alat grupira očitavanja NGS u klastere (eng. *cluster*) često preklapajućih sekvenci te rezultate prikazuje u obliku grafičkog prikaza. Prednost ovakvog pristupa je da za navedenu detekciju i analizu satDNA nije potrebno imati posložen referentni genom. Detekcija niskozastupljenih repetitivnih sekvenci iz očitavanja NGS dodatno je olakšana razvojem programa TAREAN baziranom na programu Repeat Explorer (Novák *i sur.*, 2017.). Nakon otkrića 62 nove satDNA u genomu europskog skakavca *Locusta migratoria* koristeći navedeni pristup, Ruiz-Ruano i suradnici predlažu naziv satelitom koji obuhvaća skup različitih satDNA prisutnih u genomu pojedine vrste (Ruiz-Ruano *i sur.*, 2016.). Istraživanja satDNA olakšana bioinformatičkim metodama omogućila su karakterizaciju satelitoma brojnih vrsta kao što su primjerice riba *Megaleporinus*

macrocephalus u kojoj je otkriveno 154 satDNA (Utsunomia *i sur.*, 2019.), riba *Characidium gomesi* u kojoj je otkriveno 59 satDNA (Serrano-Freitas *i sur.*, 2019.) i paprati *Vandenboschia speciosa* u kojoj je otkriveno 11 satDNA (Ruiz-Ruano *i sur.*, 2019.).

1.2. Kukac brašnar *Tribolium freemani*

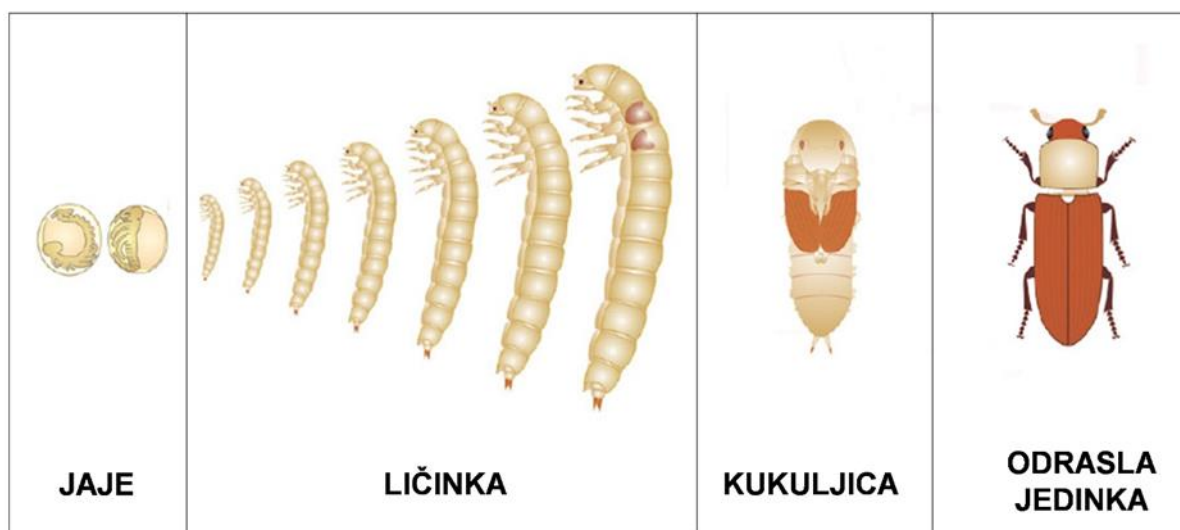
Kukac brašnar *Tribolium freemani* (Hinton, 1948.) pripadnik je porodice crnokrilaca (Tenebrionidae) iz reda kornjaša (Coleoptera) (Slika 1.). Rasprostranjen je štetnik na poljoprivrednim proizvodima i u skladištima hrane. Iako je postojanje vrste prvi puta potvrđeno u Kašmiru na Indijskom potkontinentu (Hinton, 1948.), kukac *T. freemani* rasprostranjen je i u Japanu i Brazilu gdje je stigao u pošiljkama žitarica (Nakakita *i sur.*, 1981.). Brašnar *T. freemani* holometabolna je vrsta. U svom životnom ciklusu prolazi potpunu preobrazbu kroz tri razvojne faze koje uključuju ličinku, kukuljicu i odrasli stadij (Slika 2.).



Slika 1. Odrasli stadij kukca *Tribolium freemani* (preuzeto iz <https://bugguide.net/node/view/710408/bgimage>)

Vrsta *T. freemani* blisko je srodna vrsti *Tribolium castaneum*. Srodnost vrsta dokazana je njihovim međusobnim križanjem pri čemu je dobiveno sterilno potomstvo (Nakakita *i sur.*, 1981.). Kukac brašnar *T. castaneum* predstavnik je porodice crnokrilaca, ali i čitavog reda kornjaša. Zbog lakog uzgoja u laboratoriju, brojnog potomstva i holometabolije, čest je modelni organizam u laboratorijskim istraživanjima. Molekularno-biološka proučavanja vrste *T. castaneum* dodatno su olakšana postojanjem sekvenciranog genoma pristupom „shotgun“ (Richards *i sur.*, 2008a.). Genom vrste *T. freemani* još nije sekvenciran. Usprkos tome, poznata je glavna satelitna DNA vrste *T. freemani* koja dominira genomom veličine 234 Mpb (Alvarez-Fuster *i sur.*, 1991.). Spomenuta satDNA čini 31% genoma kukca *T. freemani* i nalazi se u području centromernih i pericentromernih regija svih kromosoma (Juan *i sur.*, 1993.). Po

pitanju visoke zastupljenosti glavne satDNA u genomu, brašnar *T. freemani* nije izuzetak. Naime, karakteristika vrsta roda *Tribolium* je velik dio genoma sačinjen od uzastopno ponovljenih sekvenci. Tako je dokazano da glavni sateliti čine 40% genoma vrste *Tribolium confusum* (Plohl *i sur.*, 1993.), 21% genoma vrste *Tribolium brevicornis* (Mravinac *i sur.*, 2005.), 17% genoma vrste *Tribolium castaneum* (Ugarković *i sur.*, 1996b.) te 13% genoma vrste *Tribolium anaphe* (Mravinac *i sur.*, 2004.). Kod vrste *Tribolium audax* dvije dominantne satDNA zauzimaju 60% genoma (Mravinac i Plohl, 2010.), a kod vrste *Tribolium madens* 34% genoma (Ugarković *i sur.*, 1996a.).



Slika 2. Razvojni stadiji vrsta *Tribolium* (preuzeto i prilagođeno iz Jindra, 2019.).

S obzirom da genom vrste *T. freemani* dosad nije sekvenciran metodom NGS, ali i na temelju pronalaska više nisko zastupljenih satelitnih porodica unutar srodne vrste *Tribolium castaneum* (Pavlek *i sur.*, 2015.), moguće je pretpostaviti da genom vrste *T. freemani* sadrži veći broj zasad još nedetektiranih, nisko zastupljenih satDNA.

1.3. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je identificirati potencijalne, dosad neutvrđene satelitne DNA bioinformatičkom analizom kratkih odsječaka DNA dobivenih sekvenciranjem genoma vrste *T. freemani* pomoću metode NGS. Satelitnim sekvencama određenim bioinformatičkom analizom *in silico*, primjenom klasičnih molekularnih metoda željela se utvrditi genomska organizacija i kromosomski smještaj. Naposljetku, bioinformatičkom usporedbom novootkrivenih satDNA vrste *T. freemani* s već karakteriziranim satelitnim DNA vrste *T. castaneum* produbit će se znanje o evoluciji satDNA između blisko srodnih vrsta.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Životinjski materijal

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su kukci vrste *Tribolium freemani* Hinton. Inicijalna kultura pribavljena je iz insektarija Agricultural Research Service (Manhattan, Kansas, SAD) pri United States Department of Agriculture te se potom nastavila propagirati kao laboratorijska kultura u Laboratoriju za strukturu i funkciju heterokromatina.

2.1.2. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije korištene u ovom radu:

- etidijev bromid (Serva)
- etanol, NaOH, octena kiselina, KCl, NaCl, Na-citrat, Na-acetat, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ (Kemika)
- agaroz, orange G, etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), Tris, formaldehid, formamid (Sigma)
- 5-brom-4-klor-3-indolil-β-D-galaktozid (X-gal), izopropil-β-D-tiogalaktozid (IPTG) (Gibco-BRL)

2.1.3. Puferi i otopine

Puferi i otopine korištene u ovom radu:

- pufer 50×TAE (pH 8,0): 2 M Tris, 1 M octena kiselina, 50 mM EDTA
- tekuća hranjiva podloga LB (pH 7,0): bakto tripton (10 g/L), ekstrakt kvasca (5 g/L), NaCl (10 g/L)
- tekuća hranjiva podloga SOC: 2% bakto tripton, 0,5% ekstrakt kvasca, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoza
- kruta hranjiva podloga LB s antibiotikom (pH 7,0): LB agar (40 g/L) i ampicilin (0,1 μg/L)
- pufer G (pufer za izolaciju genomske DNA): 0,1 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA (pH 8,0), 0,5% SDS
- fenol:kloroform:izoamilni alkohol (25:24:1)

Otopine za hibridizaciju metodom prema Southernu:

- hibridizacijski pufer: 0,25 M fosfatni pufer (pH 7,2), 1 mM EDTA (pH 8,0), 20% SDS, 0,5% blocking reagent
- pufer za ispiranje: 20 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 1% SDS
- pufer 1 (pH 8,0): 0,1 M maleinska kiselina, 3 M NaCl, 0,3% Tween 20
- pufer 2: u puferu 1 otopljen blocking reagent finalne količine 1%
- pufer 3: 0,1 M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl
- pufer za skidanje sonde: 0,2 M NaOH, 0,1% SDS
- otopina za kemiluminiscenciju: CDP-star razrijeđen u puferu 3 u omjeru 1:50

Otopine za fluorescencijsku hibridizaciju *in situ* (FISH):

- denaturacijska otopina: 70% formamid u puferu 2×SSC
- pufer DeSO₄ (pH 7,0): 4×SSC, 20% dekstran-sulfat, 50 mM Na-fosfat
- hibridizacijska otopina: 60% deionizirani formamid, 40% DeSO₄ pufer
- pufer za ispiranje: 50% formamid u puferu 2x SSC
- pufer 4M: 4×SSC, 5% blokirajući reagens
- pufer 4T: 4×SSC, 0,05% Tween 20
- fiksativ (mješavina octene kiseline i etanola u omjeru 1:3)
- otopina DAPI-a u 2×SSC-u: 50 ng/ml, 2×SSC
- pufer 20×SSC (pH 7,0): 3M NaCl, 0,3 M Na-citrat
- pufer PBS (pH 7,4): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄
- 70% hladni etanol
- 90% hladni etanol
- 100% hladni etanol
- 2×SSC u 50% formamidu
- pufer 1×TE: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)
- *antifade* reagens Mowiol 4-88

2.1.4. Kompleti reagensija

Kompleti reagensija korišteni u ovom radu:

- komplet „QIAquick Gel Extraction Kit“ za pročišćavanje odsječaka DNA iz agaroznog gela (QIAGEN)
- komplet „GoTaq Flexi DNA Polymerase“ za lančanu reakciju polimerazom, koji sadrži: DNA polimerazu GoTaq (5U/μl), 5×koncentrirani pufer GoTaq Flexi i 25 mM MgCl₂ (Promega)
- komplet „GoTaq Green Master Mix“ za lančanu reakciju polimerazom, koji sadrži u 2× koncentriranom reakcijskom puferu Green GoTaq: DNA polimerazu GoTaq , 400 μM smjesu dNTP i 3mM MgCl₂ (Promega)
- komplet „pGEM-T Easy Vector System I“ za kloniranje produkata PCR-a koji sadrži: plazmidni vektor pGEM-T (50 ng/μl), enzim T4 DNA ligazu (3 Weiss U/μl) i 2× koncentrirani pufer za T4 DNA ligazu (Promega)
- komplet „High Pure Plasmid Isolation Kit“ za izolaciju plazmida (Roche Applied Science)

2.1.5. Enzimi

Enzimi korišteni u ovom radu:

- restriksijske endonukleaze s pripadajućim puferima za restriksijsku analizu *Mbo*I (New England Biolabs), *Cla*I (New England Biolabs), *Mva*I (Thermo Fisher Scientific), *Taq*I (Gibco-BRL), *Hinf*I (New England Biolabs), *Alu*I (New England Biolabs), *Rsa*I (Fermentas), *Hind*II (Roche Applied Science), *Dra*I (Fermentas), *Eco*RI (New England Biolabs), *Hpa*II (Fermentas), *Hae*III (Roche Applied Science), *Eco*RV (Fermentas)
- proteinaza K, RNaza A, pepsin (Roche Applied Science)

2.1.6. Elektroforetski biljeg

Elektroforetski biljeg korišten u ovom radu:

- Quick Load 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs), koji sadrži smjesu odsječaka DNA duljine 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1000 pb, 1200 pb, 1500 pb, 2000 pb, 3000 pb, 4000 pb, 5000 pb, 6000 pb, 8000 pb i 10000 pb

2.1.7. Plazmidni vektor

Za kloniranje produkata PCR-a korišten je plazmidni vektor pGEM-T iz kompleta „pGEM-T Easy Vector System I“ koji omogućuje AT-kloniranje. Taq polimeraza ugrađuje na 3' krajevima produkata PCR-a dodatan dATP, koji se u reakciji ligacije sparuje s komplementarnim timidinom na krajevima linearnog T-vektora.

Vektor pGEM-T sadrži gen za otpornost na antibiotik ampicilin (apm^r) što omogućuje selekciju transformiranih bakterija. Mjesto za kloniranje fragmenata se nalazi unutar gena lacZ koji kodira enzim β -galaktozidazu pa je putem α -komplementacije omogućena plavo-bijela selekcija transformanata.

2.1.8. Bakterijski soj

Za umnažanje plazmida korištene su ultrakompetentne bakterijske stanice vrste *Escherichia coli* soja XL10-Gold ($Tet^r \Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173endA1supE44thi-1recA1gyrA96relA1lac Hte [F' proAB lacIqZ\Delta M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]$) (Stratgene).

2.1.9. Tehnička oprema i uređaji

Tehnička oprema i uređaji korišteni u ovom radu:

- uređaj PCR 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- uređaj za horizontalnu elektroforezu DNA u agaroznom gelu (Bio-Rad)
- UV transiluminator sa sustavom za snimanje agaroznih gelova G:BOX (Syngene)
- hibridizacijska pećnica OV1 (Biometra)
- stolna mikrocentrifuga Minispin (Eppendorf)
- stolna tresilica Vibramax (Heidolph)
- termoblok (Bioblock Scientific)
- uređaj za brzo sušenje uzoraka Speed vac DNA120 (Thermo)
- sušionik (Shel Lab)
- termostatski inkubator (Sutjeska)
- vodena kupelj (Inko)
- uređaj za zataljivanje plastičnih vrećica (Gorenje)

- fotografsko crveno svjetlo (Kaiser)
- uređaj za fluorimetrijsko mjerenje koncentracije DNA Qubit (Invitrogen)
- konfokalni laserski pretražni mikroskop Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems)

2.1.10. Ostali materijali

Ostali materijali korišteni u ovom radu:

- pozitivno nabijene najlonske membrane (Roche Applied Science)
- papir Whatman 3MM
- papirnati ubrusi
- RF4 medicinski Röntgen filmovi NIF 18x 43,2 cm (Fotokemika)
- EFKE FR-210 razvijatelj za ručnu obradu Röntgen filmova (Fotokemika)
- EFKE FF-210 koncentrirani tekući fiksir za ručnu obradu svih vrsta Röntgen filmova (Fotokemika)

2.2. Metode

2.2.1. Izolacija genomske DNA

Ukupna genomska DNA vrste *Tribolium freemani* izolirana je prema protokolu za izolaciju genomske DNA iz tkiva kukaca pomoću organskih otapala. Tkivo kukaca je smrznuto u tekućem dušiku i smrvljeno u tarioniku. Smrvljeno tkivo resuspendirano je u puferu za izolaciju genomske DNA (100 mg tkiva u 1 ml pufera) uz dodatak proteinaze K (0,25 mg/ml) te inkubirano ~18 h u vodenoj kupelji pri temperaturi od 50 °C. Suspenziji je dodan jednak volumen fenola (pH 8,0) te je otopina promiješana invertiranjem i centrifugirana 9 min na 12 000 rpm. Vodena je faza nakon centrifugiranja prebačena u novu mikroeprijetu te je postupak ponavljen dva puta. Kod sljedećeg ponavljanja, vodenoj je fazi dodan jednak volumen otopine fenol:kloroform:izoamilni alkohol u omjeru 25:24:1 nakon čega se genomska DNA nalazi u gornjoj, vodenoj fazi. Genomska DNA taložena je pomoću 0,1 početnog volumena 3M natrijevog acetata (pH 4,7) i dva početna volumena ledenog 100% etanola inkubacijom 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije otopina je centrifugirana 15 min brzinom vrtnje 12 000 rpm. Uklonjen je supernatant i talogu dodan 75% ledeni etanol. Otopina je centrifugirana 7 min na 12 000 rpm. Supernatant je odvojen pažljivo vakuum sisaljkom te je talog osušen stajanjem na sobnoj temperaturi (~30 min). Nakon što se talog u potpunosti osušio,

otopljen je u 1× TE puferu (pH 8,0). Otopini je dodana RNaza A (10 µg/ml) i SDS (0,1%) te je inkubirana 1 sat na 37 °C u vodenoj kupelji. Ekstrakcija je provedena pomoću otopine fenol:kloroform:izoamilni alkohol. Uzorak je istaložen u 0,1 početnog volumena 3M natrijevog acetata (pH 4,7) i 2 volumena ledeno hladnog 100% etanola inkubacijom 10 min na sobnoj temperaturi i potom centrifugiranjem 15 min na 12 000 rpm. Talog je ispran 75% ledenim etanolom i otopina centrifugirana 7 min na 12 000 rpm. Supernatant je nakon centrifugiranja uklonjen te je talog ostavljen na sobnoj temperaturi kako bi se u potpunosti osušio. Suh talog otopljen je u puferu 1×TE (pH 8,0). Količina i kvaliteta ukupne izolirane genomske DNA procijenjene su elektroforezom u 1% agaroznom gelu usporedbom s DNA poznate koncentracije. Koncentracija je dodatno potvrđena pomoću fluorometrijskog mjerenja na uređaju Qubit.

2.2.2. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama

Razgradnja genomske DNA restrikcijskim endonukleazama provedena je prema uputama proizvođača, uz korištenje 10 U enzima po µg DNA. Uzorci genomske DNA razgrađeni restrikcijskim endonukleazama razdvojeni su u 1% agaroznom gelu u puferu 1×TAE uz dodatak etidijevog bromida (0,5 µg/ml). Uzorci DNA su nanoseni u jažice zajedno s otopinom Orange G u omjeru 6:1, podvrgnuti su elektroforezi pri naponu od 60 V. Korišten je elektroforetski biljeg Quick Load 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs). Nakon elektroforetskog razdvajanja uzoraka, agarozni gelovi fotografirani su pomoću uređaja G:BOX, koji također omogućava i računalnu pohranu fotografije gela.

2.2.3. Umnažanje odsječaka DNA metodom lančane reakcije polimerazom

Odsječci DNA potencijalnih satelita umnoženi su metodom lančane reakcije polimerazom (PCR).

2.2.3.1. Početnice

Korištene su početnice za umnažanje odsječaka sedam različitih potencijalnih satelitnih DNA: TFREEsat, freeCL101x112H, freeCL234x173H, freeCL300x120H, freeCL243x266L, freeCL510x326L i freeCL1021x332L. Nukleotidni sljedovi početnica i očekivane duljine satelitnih odsječaka DNA umnoženih metodom PCR navedeni su u tablici 1. Navedene oligonukleotidne početnice sintetizirane su u korisničkom servisu Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska). Pomoću gradijentnog PCR-a određene su optimalne temperature sparivanja pojedinog para početnica s kalupom DNA.

Tablica 1. Parovi početnica korišteni pri umnažanju sedam satelitnih DNA vrste *Tribolium freemani* metodom PCR te pretpostavljene duljine umnoženih odsječaka.

Satelitna DNA	Nukleotidni slijed početnica	Duljina umnoženih odsječaka
TFREEsat	TFREEsatpr3 5'-CAAGGGTCGAAACAGTTCCA-3'	319 pb (PCR „dimer“)
	TFREEsatpr4 5'-CAGGCAATCGATTGAAGTTCAAAA-3'	487 pb (PCR „trimer“)
freeCL101x112H	freeCL101x112Hpr1 5'-AAGACGTTTTTCAGTGAGTTTTATG-3'	206 pb (PCR „dimer“)
	freeCL101x112Hpr2 5'-GATTTTTGTACAGTTTGATGAA-3'	318 pb (PCR „trimer“) 430 pb (PCR „tetramer“)
freeCL234x173H	freeCL234x173Hpr1 5'-GGCGCATCCACCATTTTTCA-3'	228 pb (PCR „dimer“)
	freeCL234x173Hpr2 5'-TGTTCCATTGAATTCTGCGG-3'	461 pb (PCR „trimer“) 634 pb (PCR „tetramer“)
freeCL300x120H	freeCL300x120Hpr1 5'-TCACCCGAAAAACCCCTCTGAG-3'	225 pb (PCR „dimer“)
	freeCL300x120Hpr2 5'-AGGAGTAGGAGCCTGTCTTCTTCA-3'	345 pb (PCR „trimer“) 465 pb (PCR „tetramer“)
freeCL243x266L	freeCL243x266Lpr1 5'-CCCTAATTTGAATATGTCAACTCTG-3'	423 pb (PCR „dimer“)
	freeCL243x266Lpr2 5'-TTTTCTTACCCCTACCCCTT-3'	689 pb (PCR „trimer“)
freeCL510x326L	freeCL510x326Lpr1 5'-CCAGATAAACTCAGATTTGAC-3'	529 pb (PCR „dimer“)
	freeCL510x326Lpr2 5'-GATTCTTGCATATTTGAATTCT-3'	855 pb (PCR „trimer“)
freeCL1021x332L	freeCL1021x332Lpr1 5'-GATTCCAAAACCTGCCTCCA-3'	622 pb (PCR „dimer“)
	freeCL1021x332Lpr2 5'-ATTTTCGGTTATTGTGATCTTGA-3'	

2.2.3.2. Reakcijske smjese PCR-a i uvjeti reakcija

Reakcijske smjese potrebne za umnažanje satelitnih DNA pomoću metode PCR pripremane su u ukupnom volumenu od 30 µl. Smjesa je sadržavala 5× GoTaq Flexi Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM smjese dNTP, 0,4 µM specifičnih početnica, 0,25 U GoTaq polimeraze i 10 ng genomske DNA.

Programi ciklusa umnažanja pojedinih satelitnih DNA navedeni su u tablicama 2, 3, 4, 5, 6 i 7.

Tablica 2. Program ciklusa umnažanja satelitne DNA TFREEsat vrste *Tribolium freemani* metodom PCR.

PCR korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ponavljanja
Početna denaturacija	94 °C	3 min	1
Denaturacija	94 °C	15 s	35
Sparivanje	56 °C	15 s	35
Produljenje	72 °C	30 s	35
Završno produljenje	72 °C	10 min	1

Tablica 3. Program ciklusa umnažanja satelitnih DNA freeCL101x112H i freeCL300x120H vrste *Tribolium freemani* metodom PCR.

PCR korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ponavljanja
<i>Početna denaturacija</i>	94 °C	3 min	1
<i>Denaturacija</i>	94 °C	15 s	35
<i>Sparivanje</i>	65 °C	15 s	35
<i>Produljenje</i>	72 °C	20 s	35
<i>Završno produljenje</i>	72 °C	10 min	1

Tablica 4. Program ciklusa umnažanja satelitne DNA freeCL234x173H vrste *Tribolium freemani* metodom PCR.

PCR korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ponavljanja
<i>Početna denaturacija</i>	94 °C	3 min	1
<i>Denaturacija</i>	94 °C	15 s	35
<i>Sparivanje</i>	62 °C	15 s	35
<i>Produljenje</i>	72 °C	20 s	35
<i>Završno produljenje</i>	72 °C	10 min	1

Tablica 5. Program ciklusa umnažanja satelitne DNA freeCL243x266L vrste *Tribolium freemani* metodom PCR.

PCR korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ponavljanja
<i>Početna denaturacija</i>	94 °C	3 min	1
<i>Denaturacija</i>	94 °C	15 s	35
<i>Sparivanje</i>	61 °C	15 s	35
<i>Produljenje</i>	72 °C	30 s	35
<i>Završno produljenje</i>	72 °C	10 min	1

Tablica 6. Program ciklusa umnažanja satelitne DNA freeCL510x326L vrste *Tribolium freemani* metodom PCR.

PCR korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ponavljanja
<i>Početna denaturacija</i>	94 °C	3 min	1
<i>Denaturacija</i>	94 °C	15 s	35
<i>Sparivanje</i>	55 °C	15 s	35
<i>Produljenje</i>	72 °C	45 s	35
<i>Završno produljenje</i>	72 °C	10 min	1

Tablica 7. Program ciklusa umnažanja satelitne DNA freeCL1021x332L vrste *Tribolium freemani* metodom PCR.

PCR korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ponavljanja
<i>Početna denaturacija</i>	94 °C	3 min	1
<i>Denaturacija</i>	94 °C	15 s	35
<i>Sparivanje</i>	56 °C	15 s	35
<i>Produljenje</i>	72 °C	1 min	35
<i>Završno produljenje</i>	72 °C	10 min	1

2.2.4. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA u agaroznom gelu

Odsječci DNA umnoženi reakcijom PCR razdvojeni su elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem agaroze u 1×TAE puferu uz dodatak etidijevog bromida (0,5 µg/ml) za vizualizaciju DNA. Elektroforeza se odvijala pri sobnoj temperaturi u istom puferu. Za procjenu količine DNA koristila se λ-DNA poznate koncentracije, a za procjenu duljine odsječaka korišten je elektroforetski marker „Quick Load 2-Log DNA Ladder“.

Nakon elektroforetskog razdvajanja gelovi su fotografirani pomoću uređaja G:BOX.

2.2.5. Izolacija odsječaka DNA iz agaroznog gela

Dijelovi agaroznog gela s željenim odsječkom DNA izrezani su na transiluminatoru i izvagani. DNA je izolirana pomoću kompleta „QIAquick Gel Extraction Kit“ prema uputama proizvođača.

2.2.6. Kloniranje odsječaka DNA

Kloniranje odsječaka DNA provedeno je pomoću plazmidnog vektora pGEM-T iz kompleta „pGEM-T Easy Vector System I“ koji omogućuje AT kloniranje.

2.2.6.1. Ligacija odsječaka DNA i plazmidnog vektora

Reakcije ligacije izoliranih odsječaka DNA i vektora pGEM-T Easy provedene su pomoću enzima T4 DNA ligaza u 2× Rapid ligacijskom puferu preko noći na 4 °C. Omjer fragmenata DNA i vektora u reakciji iznosio je 3:1.

2.2.6.2. Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica

Kompetentne bakterijske stanice vrste *E. coli* transformirane su vektorom pGEM-T Easy metodom temperaturnog šoka. U 25 μ l otopine stanica dodan je 1 μ l β -merkaptetanola te je suspenzija inkubirana 10 minuta na ledu. Tako pripremljenim ultrakompetentnim stanicama dodano je 2 μ l ligacijske smjese nakon čega je slijedilo 30 minuta inkubacije na ledu. Stanice su podvrgnute temperaturnom šoku od 42 °C u trajanju od 30 sekundi inkubacijom otopine stanica i ligacijske smjese u vodenoj kupelji. Nakon toga stanice su inkubirane 2 minute na ledu i regenerirane 90 minuta u 250 μ l prethodno ugrijanog medija SOC uz neprekidnu trešnju od 250 rpm-a na temperaturi od 37 °C. Stanice su nasadene na selektivne krute podloge LB, s dodatkom ampicilina (100 μ g/ml), 40 μ l induktora IPTG (100 mM) te 40 μ l supstrata X-gal (20 mg/ml) i inkubirane preko noći na 37 °C.

2.2.6.3. PCR na bakterijskim kolonijama

Korištenjem plazmidnog vektora pGEM-T Easy omogućena je plavo-bijela selekcija kolonija. Kako bi se odredila veličina ugrađenih odsječaka DNA provodio se PCR na bakterijskim kolonijama (engl. *colony PCR*). Sterilnim nastavkom dotaknuta je određena bakterijska kolonija te je nastavak uronjen u mikroeprevetu s 10 μ l mQ-H₂O uz intenzivno resuspendiranje. Uzorak je denaturiran u uređaju za PCR pri 94 °C 10 minuta, zatim je ohlađen na ledu i kratko centrifugiran. Reakcija PCR-a provedena je u 5 μ l reakcijske smjese koja je sadržavala 2,5 μ l smjese 2 \times GoTaq Green Master Mix, 0,5 μ l denaturirane bakterijske kolonije, 0,4 μ M početnice M13R-pUC (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), 0,4 μ M početnice M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') i 1,6 μ l mQ-H₂O prema programu navedenom u tablici 8.

Tablica 8. Program ciklusa umnažanja bakterijskih kolonija metodom PCR.

PCR korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ponavljanja
<i>Početna denaturacija</i>	94 °C	2 min	1
<i>Denaturacija</i>	94 °C	15 s	30
<i>Sparivanje</i>	54 °C	15 s	30
<i>Produljenje</i>	72 °C	30 s	30
<i>Završno produljenje</i>	72 °C	5 min	1

Produkti reakcije PCR-a na bakterijskim kolonijama analizirani su u 1% agaroznom gelu. Kolonije koje su posjedovale odsječke DNA očekivane duljine uzgojene su u 4 ml tekuće selektivne podloge LB s dodatkom ampicilina (100 μ g/ml) preko noći na temperaturi od 37 °C uz neprekidnu vrtnju od 225 rpm.

2.2.6.4. Izolacija plazmidne DNA

Bakterije uzgojene preko noći u tekućoj selektivnoj podlozi LB oborene su kratkim centrifugiranjem. Plazmidna DNA izolirana je kompletom „High Pure Plasmid Isolation Kit“ prema uputama proizvođača te finalno isprana s kolone pomoću 100 µl elucijskog pufera. Koncentracija i kakvoća izolirane plazmidne DNA procjenjene su pomoću gel elektroforeze u 1% agaroznom gelu uz pomoć λ-DNA poznate koncentracije.

2.2.6.5 Određivanje nukleotidnih sljedova kloniranih odsječaka DNA

Nukleotidni slijedovi kloniranih odsječaka DNA određeni su servisu za sekvenciranje Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska) uz upotrebu spomenute plazmidne početnice M13R-pUC.

2.2.7 Obilježavanje hibridizacijskih sonda

Hibridizacijske sonde obilježene su digoksinom i biotinom uz pomoć metode lančane reakcije polimerazom gdje se kao kalup DNA koristila smjesa određenih klonova specifičnih za pojedinu satelitnu DNA (Tablica 9.).

Tablica 9. Smjese klonova sedam satelitnih DNA vrste *Tribolium freemani* korištene za obilježavanje hibridizacijskih sonda.

satelitna DNA	klonovi
TFREEsat	31, 32, 33
freeCL101x112H	1, 8, 14
freeCL234x173H	2, 15, 19, 27
freeCL300x120H	1, 6, 7
freeCL243x266L	2, 8, 10, 12
freeCL510x326L	3, 15, 16, 17
freeCL1021x332L	2, 5, 11, 35

Za detekciju potencijalnih satelitnih DNA metodom hibridizacije prema Southernu korištene su sonde obilježene digoksinom i biotinom, dok su kod metode fluorescencijske hibridizacije *in situ* korištene biotinom obilježene sonde. Obilježavanje sonda moguće je zbog korištenja smjese dNTP-ova koja sadrži digoksin ili biotin konjugiran na dUTP. Takvi se nukleotidi enzimi ugrađuju u nosivost sintetizirane lance DNA sonde. Umnažanje i obilježavanje potencijalnih satelitnih DNA provedeno je u 25 µl reakcijske smjese koja je sadržavala 5x

GoTaq Colorless pufer, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dCTP, 0,375 mM dTTP, 0,125 mM DIG-11-dUTP, 5 U GoTaq DNA polimeraze, 1 ng kalupa DNA i 10 μM specifičnih početnica za digoksinom obilježene sonde te 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dCTP, 0,32 mM dTTP, 0,18 mM biotin-16-dUTP, 5 U GoTaq DNA polimeraze, 1 ng kalupa DNA i 10 μM specifičnih početnica za sonde obilježene biotinom. Program umnažanja započet je dvominutnom početnom denaturacijom na 94 °C, a nastavio se kroz 40 ciklusa unutar kojih su se izmjenjivala 3 koraka: denaturacija na 94 °C 15 sekundi, sparivanje početnica kroz 15 sekundi te reakcija sinteze DNA na 72 °C 30 sekundi. Reakcija sparivanja provedena je na optimalnim temperaturama sparivanja pojedinih satelita kao što je navedeno u tablicama 2, 3, 4, 5, 6 i 7.

2.2.8 Hibridizacijska analiza prema Southernu

2.2.8.1. Prijenos odsječaka DNA na najlonsku membranu

Dvolančani fragmenti DNA razgrađeni restrikcijskim enzimima razdvojeni su agaroznom gel elektroforezom kao što je opisano u poglavlju 2.2.4. Nakon elektroforetskog razdvajanja na gel je položena pozitivno nabijena najlonska membrana (Roche Applied Science) dimenzija jednakih gelu. Fragmenti DNA preneseni su na membranu lužnatim transferom u otopini 0,4 M NaOH preko noći. Membrana je neutralizirana ispiranjem u puferu 2×SSC te u potpunosti osušena na zraku. Osušena membrana stavljena je u sterilizator na 20 min pri 120 °C kako bi se fragmenti DNA dodatno fiksirali.

2.2.8.2. Prehibridizacija i hibridizacija membrana

Prehibridizacija je provedena kroz 2 sata pri temperaturi od 65 °C (TFREEsat, freeCL300x120H, freeCL243x266L) ili 62 °C (freeCL101x112H, freeCL234x173H, freeCL510x326L, freeCL1021x332L) u hibridizacijskim cilindrima u kojima su se nalazili prethodno zagrijana hibridizacijska otopina i najlonske membrane s prenesenim DNA fragmentima. Hibridizacija je zatim provedena u svježem prethodno zagrijanom hibridizacijskom puferu u koji je dodana denaturirana sonda DNA specifična za pojedini satelit u koncentraciji od 20 ng/ml hibridizacijskog pufera. Hibridizacija se odvijala preko noći na temperaturi 62 °C- 65 °C, ovisno o temperaturi prehibridizacije.

2.2.8.3. Otkrivanje hibridizacijskog signala

Nakon hibridizacije membrane su isprane u puferu za ispiranje 3×20 min na temperaturi 3°C nižoj od temperature hibridizacije u hibridizacijskim cilindrima. Koraci otkrivanja

hibridizacijskog signala provedeni su u plastičnim kadicama na tresilici pri sobnoj temperaturi. Membrane su inkubirane 2 min u puferu 1 te zatim 30 min u puferu 2. Sljedeća inkubacija trajala je 30 min i provedena je u puferu 2 kojemu je dodana otopina antitijela. Za detekciju sonde obilježenih biotinom korišten je streptavidin-AP konjugat (Roche Applied Science) u omjeru 1:5 000, dok je za detekciju digoksigeninom obilježenih sonde korišten anti-DIG-AP konjugat u omjeru 1:15 000. Membrane su isprane u puferu 1 5×8 min i zatim u puferu 3 2×3 min. Sljedeća inkubacija provedena je u tamnoj komori. Membrane su inkubirane u zataljenoj prozirnoj plastičnoj vrećici u puferu 3 kojem je prethodno dodan supstrat za alkalnu fosfatazu CDP-Star (Roche Applied Science) u omjeru 1:50. Membrane su nakon toga izložene Röntgen filmu kroz potrebno vrijeme, ovisno o intenzitetu signala. Eksponirani Röntgen film razvijen je uranjanjem u fotografski razvijatelj, vodu te fiksir.

2.2.9. Fluorescencijska hibridizacija *in situ* (FISH)

2.2.9.1. Priprema citogenetičkih preparata

Tkivo za izradu kromosomskih preparata izolirano je iz gonada mužjaka vrste *T. freemani* u stadiju kukuljica. Izolirano tkivo inkubirano je 1 sat u kolcemidu (10 µg/ml). Inkubacijom u 0,075 M KCl kroz 15 minuta postignuto je stanje hipotoničkog šoka što je dovelo do puknuća stanica. Tkivo je prebačeno u fiksativ (octena kiselina:etanol u omjeru 1:3) te inkubirano 15 minuta. Trajni preparati pripremljeni su tzv. „squash“ tehnikom u 45% octenoj kiselini te su nakon toga uronjeni u tekući dušik. Preparati su u potpunosti osušeni na zraku i pohranjeni na -20 °C do ulaska u eksperiment FISH.

*2.2.9.2. Prehibridizacija i hibridizacija *in situ**

Preparati su isprani 5 minuta u puferu 2×SSC na 37 °C nakon čega im je dodan svjež pufer 2×SSC u kojem je bila otopljen RNaza A (100 µg/ml) te su inkubirani 1 sat na 37 °C. Nakon ispiranja preparata u otopini 2×SSC 3×5 minuta na 37 °C, tretirani su 10 mM otopinom HCl s otopljenim pepsinom (100 µl/ml) 10 minuta na 37°C. Uslijedilo je ispiranje u otopini 1×PBS 2×5 minuta na sobnoj temperaturi i u otopini 1×PBS koja sadrži otopljeni 50 mM MgCl₂. Preparati su inkubirani u otopini formaldehida (2,7 ml formaldehida u 100 ml pufera PBS s dodatkom 50 mM MgCl₂) 10 minuta, isprani u otopini 1×PBS i dehidrirani prolaskom kroz seriju hladnih etanola (70% → 90% → 100%, 3 min svaki) nakon čega su u potpunosti osušeni na zraku. Prije hibridizacije denaturacijom su razdvojeni dvolančani lanci DNA sonde i odsječci DNA na preparatima. Kromosomski preparati zagrijani su nekoliko minuta na 50-60 °C na poklopcu vodene kupelji te denaturirani u denaturacijskoj otopini (70% formamid u 2×SSC) točno 1:30 min na 70 °C, a potom odmah dehidrirani prolaskom kroz seriju hladnih etanola

(70% → 90% → 100%, 3 min svaki) te ostavljeni da se u potpunosti osuše na sobnoj temperaturi. Obilježene DNA sonde (200 ng) liofilizirane su nakon čega im je dodano 15 µl hibridizacijske otopine (60% formamid, 40% DeSO₄ pufer) i denaturirane su 5 min na 75 °C u vodenoj kupelji. Nakon denaturacije sonde su ohlađene na ledu kroz nekoliko minuta i nanese na kromosomske preparate. Hibridizacija se odvijala preko noći u vlažnoj komorici na 37 °C. Posthibridizacijsko ispiranje provedeno je u pred grijanom puferu 2×SSC koji je sadržavao 50% formamid tijekom 4×5 min na 37 °C, nakon čega je uslijedilo ispiranje u puferu 2×SSC 3×5 min na 37 °C.

2.2.9.3. Otkrivanje fluorescencijskog signala

Otkivanje fluorescencijskog signala započelo je inkubacijom preparata u puferu 4M u vlažnoj komorici na 37 °C kroz 30 minuta. U istim uvjetima preparat je inkubiran u puferu 4M koji sadrži avidin-FITC u razrjeđenju 1:500. Preparat je ispran 3×5 min u puferu 4T na sobnoj temperaturi te zatim inkubiran 20 min u puferu 4M koji sadrži α-avidin^{biotin} u omjeru 1:100 u vlažnoj komorici radi amplifikacije signala. Nakon ispiranja u puferu 4T 3×5 min na preparat je dodan 4M pufer s razrijeđenim avidin-FITC-om u omjeru 1:2000 i inkubacija je provedena kroz 20 min u vlažnoj komorici. Preparat je ispran 3×5 min u puferu 4T, 5 min u otopini 1×PBS i dehidriran prolaskom kroz seriju hladnih etanola (70% → 90% → 100%, 3 min svaki). Bojanje preparata provedeno je inkubacijom u otopini DAPI (50 ng DAPI/ml 2×SSC) 20 min na sobnoj temperaturi. Višak boje uklonjen je ispiranjem preparata u komorici s protočnom vodom. Preparati su isprani destiliranom vodom i u potpunosti osušeni na zraku. Prije mikroskopiranja preparati su uklopljeni u tzv. *antifade* reagens (Mowiol 4-88).

2.2.9.4. Mikroskopska analiza citogenetičkih preparata

Citogenetički preparati analizirani su pomoću konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa Leica TCS SP8 X. Dobivene slike procesirane su i analizirane programom Adobe Photoshop CS5.

2.2.10. Bioinformatička analiza

2.2.10.1. Analiza genoma vrste *T. freemani*

Genom vrste *T. freemani* sekvenciran je metodom sekvenciranja nove generacije uz korištenje platforme Illumina HiSeq. Sekvenciranjem je dobiveno 7 122 864 očitavanja (eng. *reads*) duljine 31-151 parova baza. S obzirom na veličinu genoma od 234 Mpb (Alvarez-Fuster

i sur., 1991.) ukupna duljina sekvenciranih odsječaka odgovara pokrivenosti genoma od približno 4×.

Za detekciju i analizu uzastopno ponovljenih sekvenca korišten je program TAREAN (Novák *i sur.*, 2017.). Kako bi se omogućila detekcija i niskozastupljenih satelitnih porodica, prije TAREAN analize bilo je neophodno iz ulaznog skupa podataka ukloniti očitavanja koja pripadaju glavnoj satelitnoj DNA vrste *T. freemani*, TFREE. Naime, visokozastupljena satelitna DNA TFREE čini prema eksperimentalnoj procjeni oko 30% genoma (Juan *i sur.*, 1993.), a prisutnost očitavanja koja joj pripadaju u ukupnom analiziranom setu podataka izrazito je limitirala TAREAN analizu u smislu količine maksimalnog broja očitavanja koje je analiza mogla uključiti. Stoga je pomoću programa Geneious11.1.4. (Biomatters Ltd) uz korištenje algoritma Geneious Mapper iz inicijalnog skupa od 7 122 864 očitavanja uklonjeno 2 267 638 očitavanja (31.84%) koja su dijelila visoku sličnost sa sekvencom glavne satelitne DNA TFREE. Korištenjem servera Galaxy te bioinformatičke platforme RepeatExplorer Utilities (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy/>) iz preostalih 4 855 226 očitavanja izdvojeno je 1500000 očitavanja upotrebom alata odabiranja sekvenci (engl. „*Sequence sampling*“) nasumičnim odabirom uz parametar: generator slučajnih brojeva =10 (engl. *random number generator seed =10*). TAREAN analiza provedena je pod sljedećim uvjetima: prag veličine klastera 0,001, spajanje klastera, bez filtriranja obilnih satelitnih ponavljanja (engl. *cluster size threshold 0,001, perform cluster merging, no automatic filtering of abundant satellite repeats, long and slow queue*).

2.2.10.2. Analiza kloniranih odsječaka DNA

Osnovno manipuliranje i uređivanje nukleotidnih sekvenci kloniranih odsječaka DNA dobivenih sekvenciranjem u korisničkom centru Macrogene provedeno je u programu Bioedit v.7.2.0. (Hall, 1999.). Izvornim nukleotidnim sekvencama odstranjena su vezna mjesta za početnice i određeni krajevi. Klonirani odsječci su sadržavali satelitne monomere, dimere ili trimere uz dodatak krnjih satelitnih fragmenata submonomerne dužine. U programu Geneious *in silico* su izlučeni cjeloviti monomeri iz nukleotidnih sekvenci kloniranih odsječaka. Izlučeni cjeloviti monomeri korišteni u daljnjim analizama.

Filogenetske analize započinjale su višestrukim sravnjivanjem nukleotidnih sljedova u programu ClustalX v2.21. (Larkin *i sur.*, 2007.). U programu MEGA6 v.06 (Tamura *i sur.*, 2013.) prvo je pomoću Model Testa za svako sravnjivanje odabran najbolji evolucijski model prema kojem je provedena analiza najveće vjerojatnosti (engl. *Maximum Likelihood*, ML) uz korištenje heurističke metode odabira stabla zamjene najbližih susjeda (engl. *Nearest Neighbor-Interchange*, NNI). Statistička podrška za topologiju filogenetskih stabala određena je na

temelju 500 replikacija (*bootstrap* ponavljanja). Filogenetska stabla grafički su uređena u programu FigTree v. 1.4.3. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Konsenzusni nukleotidni sljedovi satelitnih DNA vrste *T. freemani*, identificirani i analizirani u ovom radu, uspoređeni su s nukleotidnim sljedovima pohranjenima u genskoj bazi NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). U tu svrhu korišten je *on-line* alat BLAST (engl. Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *i sur.*, 1990.) za pretraživanje po sličnosti prema algoritmu blastn, koji omogućava pronalaženje nukleotidnih sljedova i s manjim stupnjem sličnosti.

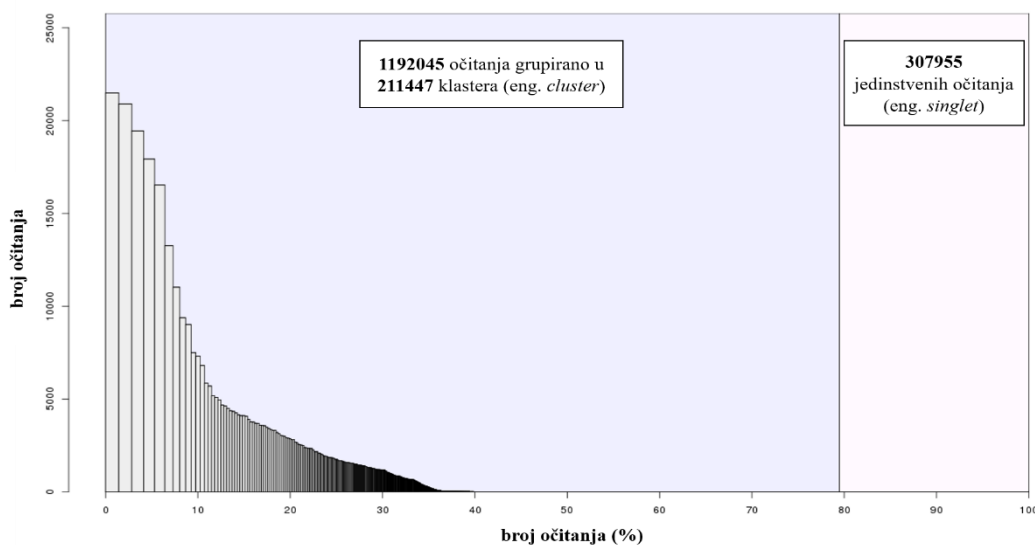
Nukleotidni sljedovi kloniranih odsječaka satelitnih DNA vrste *T. freemani* također su uspoređeni s ortolognim sekvencama iz genoma sestrinske vrste *T. castaneum*. U tu svrhu pretražena je baza sekvenciranog genoma vrste *T. castaneum* Tcas5.2, dostupna na serveru EnsembleMetazoa (http://metazoa.ensembl.org/Tribolium_castaneum/Info/Index). Spomenuta baza uključuje mape 10 sastavljenih kromosoma vrste *T. castaneum*, u sklopu kojih je anotirano približno 80% genoma. Preostalih neposloženih 20% genoma (~40 Mb) vrste *T. castaneum* djelomično je dostupno kroz 305 neposloženih skafolda (engl. *unplaced scaffolds*) te 1848 neposloženih jedinstvenih sekvenca (engl. *unplaced singletons*). Pomoću računalnog programa Geneious pretražen je genomski sklop Tcas5.2, kao i neposloženi skafoldi i jedinstvene sekvence te su u genomu vrste *T. castaneum* anotirani monomeri koji su zadovoljili kriterij minimalne sličnosti od 70% s konsenzus sekvencom pojedine satelitne DNA vrste *T. freemani*. Anotirani monomeri su *in silico* ekstrahirani iz genoma vrste *T. castaneum* te su korišteni u daljnjim usporedbama s kloniranim odsječcima vrste *T. freemani*. Prosječna udaljenost satelitnih monomera izračunata je u programu MEGA6 v.06 (eng. *Compute Within Group Mean Distance, Compute Between Group Mean Distance*). Standardna pogreška je određena na temelju 500 replikacija (*bootstrap* ponavljanja). Filogenetske analize napravljene su na prethodno opisan način upotrebom programa MEGA6 v.06.

3. REZULTATI

3.1. Identifikacija satelitnih DNA u genomu vrste *T. freemani* sekvenciranjem metodom NGS

Detekcija dosad neotkrivenih satDNA u genomu vrste *T. freemani* provedena je analizom nasumično odabranih 1 500 000 očitavanja, dobivenih NGS sekvenciranjem genoma na platformi Illumina. Očitavanja su bila duljine 151 nukleotid te je time približno osigurana jednostruka (1×) pokrivenost genoma. Treba istaknuti kako u spomenutih 1 500 000 očitavanja nisu bile prisutne sekvence visokozastupljene, glavne satDNA TFREEsat kako bi se spriječilo zasićenje programa TAREAN kojim je provedena detekcija novih satDNA.

Iz 1 500 000 nasumično odabranih očitavanja analizom TAREAN je 1 192 045 (79,47%) svrstano u 211 447 klastera (eng. *cluster*), dok su preostalih 307 955 (20,53%) nesvrstana jedinstvena očitavanja (eng. *singlet*) (Slika 3.). Unutar 211 447 klastera TAREAN analiza izdvojila je 88 potencijalnih satDNA, od kojih je 29 satDNA visoke vjerojatnosti (eng. *high confidence*) te 59 satDNA niske vjerojatnosti (eng. *low confidence*).



Slika 3. Histogram prikazuje rezultate TAREAN analize 1 500 000 očitavanja dobivenih metodom sekvenciranja nove generacije genoma vrste *Tribolium freemani*.

Uz glavni satelit TFREEsat za daljnju eksperimentalnu karakterizaciju odabrano je šest klastera čiji je grafički prikaz TAREAN kružna struktura karakteristična za uzastopno ponavljane sekvence (Tablica 10.). Odabrane su potencijalne satDNA freeCL101x112H, freeCL234x173H, freeCL300x120H, freeCL243x266L, freeCL510x326L i freeCL1021x332L. U nazivima satDNA prefiks „free“ označuje vrstu *T. freemani*, numeracija „CL“ broj klastera iz rezultata TAREAN analize i duljinu konsenzus sekvence nukleotidnog slijeda dok sufiks H označuje satDNA visoke vjerojatnosti, a L satDNA niske vjerojatnosti.

Tablica 10. Sumarni prikaz šest klastera dobivenih TAREAN analizom NGS podataka genoma vrste *Tribolium freemani* odabranih za daljnju eksperimentalnu karakterizaciju.

naziv satDNA	konsenzusni nukleotidni slijed	grafički prikaz klastera	zastupljenost u genomu
freeCL 101x112H	ATTGCTCGAAATAAACCTCTTTTCATCCAAACTGTAAACAAAAATCTTCTTTTGAGAG AGAATAAGACGTTTTTCAGTGAGTTTTATGAGAGTTGTTTCATTTCTGAAGCAAAGA		0,100%
freeCL 234x173H	GAATTTTTTAATAATTAGCCCGGCGCATCCACCATTTTCAAATTGAAATAATTTTT AAATAATTACTCGAGTAACCTAGTGGTAGTTAATAGCCAATATATTACGAAAAATG GCCGCACAATTCATGGAAACAAACAGTTTTGCTCTATGACTTTTAGTTTTTAAAAATAT		0,022%
freeCL 300x120H	GAAATCAAGGAAAAGGAGAAAACGCTGAGAAAGTAGAATTGAAAGAAGACAAGG CTCCTACTCCTAAAGACAAAACCTCTCACCGAAAACCTCTGAGATAAAACTCA AACCTGAC		0,010%
freeCL 243x266L	TTAATTTGGCCGATTTTTAATTTTTTAAATTTTGACATTTTGACCCCCACTACCCC CTAATTTGAATATGTCAACTCTGATTAGTGGAGCGTAATCAGGACCATAAGGGGTAC CCATGTGCAAAAAATGATCTCGATCAGATTATAAATGTAGATTTTCATTTTTTTTTCG AAATTTATCCCTCTTTTTAAGGGGTAGGGGTAGAGAAAAAATGAAAACATTTT TTTAAATGACCCCGAGCTTCCCTACTATAACATATA		0,020%
freeCL 510x326L	CCAGATAAACTCAGATTTGACAAAAAGAGAACGTTTATTCAAAAAATTTTATACTA GAGACCAAAAAACATTAGGTGTGGTTGGTCTTTGGTTTCAATCGAAGAAAACTTTTAT CATTACTGTCTTACTTCTTGGAGTTATTTTATTAATTTGGAGTTTTCTAACGTAAC GAGCCACAGAATTCAAATATGCAAGAATCTAGTCGCTAGGACTAACTTTTGAAGA TATCGTCAAAAAGTTTGGCTTCAATTGAAAATCTTCAAAAAGTGGCTTATTTTTTGAAG ATTTTTTCAAAAAATAGACGAAATATATGTAAGGA		0,003%
freeCL 1021x332L	TTGAACAAAAATGGAGGCAGTTTTGGAATCTCAAGCAATTCTAAGTCAGACTGACG TATTTTTAACATAAAATTTTCGGTTATTGTGATCGTGATTATTTTTATTGATAGGTTTG TAACGTGAAAATCTGACAAAAGTTGTTTTCTCGAATTTTACACAACCTTGACTCCA TTGTTGCACAATTTTGCCAGAAAACGGATAATTACCTAGTAAAAAGGGCTACAAGTA GTTTTTIGATCAATCTCCTGTTTTTATTTTTTATAATTTTGGTAGATATGAAAAAT TAAAAACAACCTTATTTTCGTTCAATTCAAAACCTAGGAGTCG		0,001%

3.2. Kloniranje i karakterizacija odsječaka sedam satelitnih DNA vrste *T. freemani*

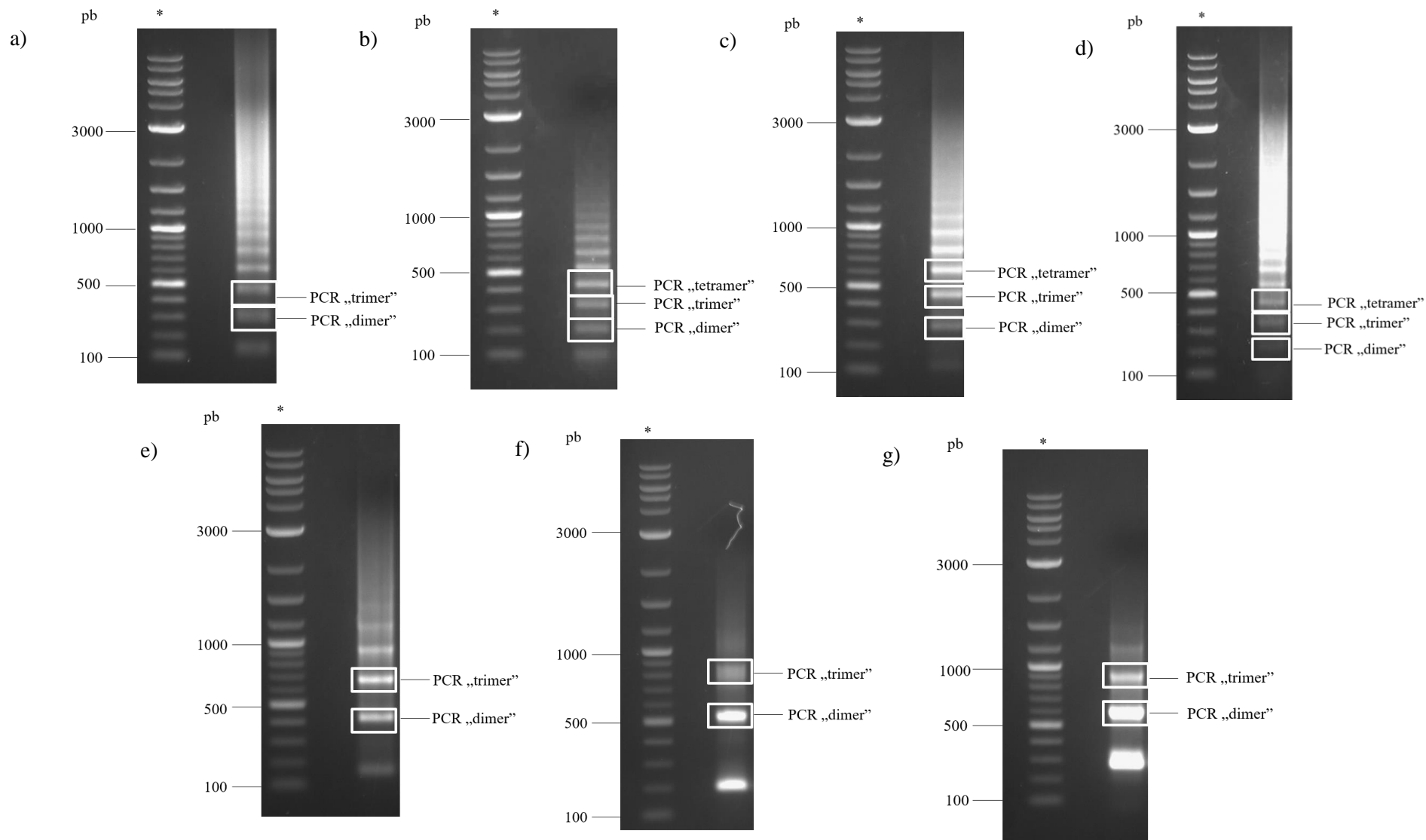
Uz šest klastera koji su odabrani za provjeru eksperimentalnim metodama, u analizu je uključena i glavna satDNA TFREEsat kao pozitivna kontrola. K tome u znanstvenoj literaturi i bazi podataka NCBI satDNA TFREE zastupljena je svega s jednim zapisom nukleotidnog slijeda te se ovim radom željelo pribaviti podatke za više satelitnih monomera TFREEsat u svrhu komparativnih studija.

Kako bi se dobio uvid u nukleotidne sljedove monomera potencijalnih satDNA, genomski odsječci koji sadrže sekvence od interesa klonirani su i sekvencirani. Uz konsenzus sekvence pojedinih satDNA TAREAN analiza predviđela je i ukupne udjele satDNA u genomu. Budući da je predviđen udio šest novodetektiranih satDNA u genomu <0,1%, odabrana je taktika kloniranja odsječaka umnoženih pomoću metode PCR. Za svaku je satDNA prema konsenzus sekvenci konstruiran specifičan par početnica te su iz izolirane genomske DNA vrste *T. freemani* odsječci umnoženi metodom PCR. Specifične početnice konstruirane su i za glavnu satDNA TFREEsat koja je također umnožena metodom PCR.

Rezultat umnažanja odsječaka metodom PCR provjeren je agaroznom gel elektroforezom. Zaključeno je kako su sekvence freeCL101x112H, freeCL234x173H, freeCL300x120H, freeCL243x266L, freeCL510x326L i freeCL1021x332L zaista prisutne u genomu u uzastopno ponovljenoj organizaciji. Dobiveni elektroforetski obrasci bili su ljestvičasti, a veličina elektroforetskih vrpca podudarala se s očekivanim duljinama monomera i njihovih višekratnika kod svih potencijalnih satDNA (Slika 4.).

Iz elektroforetskih agaroznih gelova dobivenih razdvajanjem produkata reakcije PCR izolirani su fragmenti koji su veličinom odgovarali tzv. „dimerima“ i „trimerima“. Kod satDNA freeCL101x112H, freeCL234x173H i freeCL300x120H izolirani su i „tetrameri“. Izolirane sekvence satDNA klonirane su u vektor pGEM-T Easy te su na temelju plavo-bijele selekcije odabrane kolonije koje su sadržavale plazmide s insertiranim odsječcima. Metodom PCR na bakterijskim kolonijama za daljnju analizu odabrane su kolonije koje su potencijalno nosile plazmide s ugrađenim odsječcima očekivane duljine. Pozitivni plazmidi su izolirani te im je nukleotidna sekvenca određena sekvenciranjem prema Sangeru.

Prema očekivanju, uz integralne satelitne monomere, svaki je klonirani odsječak u sebi sadržavao i krnje rubne fragmente submonomerne dužine. Za potrebe daljnjih bioinformatičkih analiza iz sekvenci kloniranih odsječaka *in silico* su ekstrahirani integralni satelitni monomeri (Tablica 11.). Monomeri svake satDNA međusobno su sravnjeni te im je analizirana duljina, AT sastav i varijabilnost.

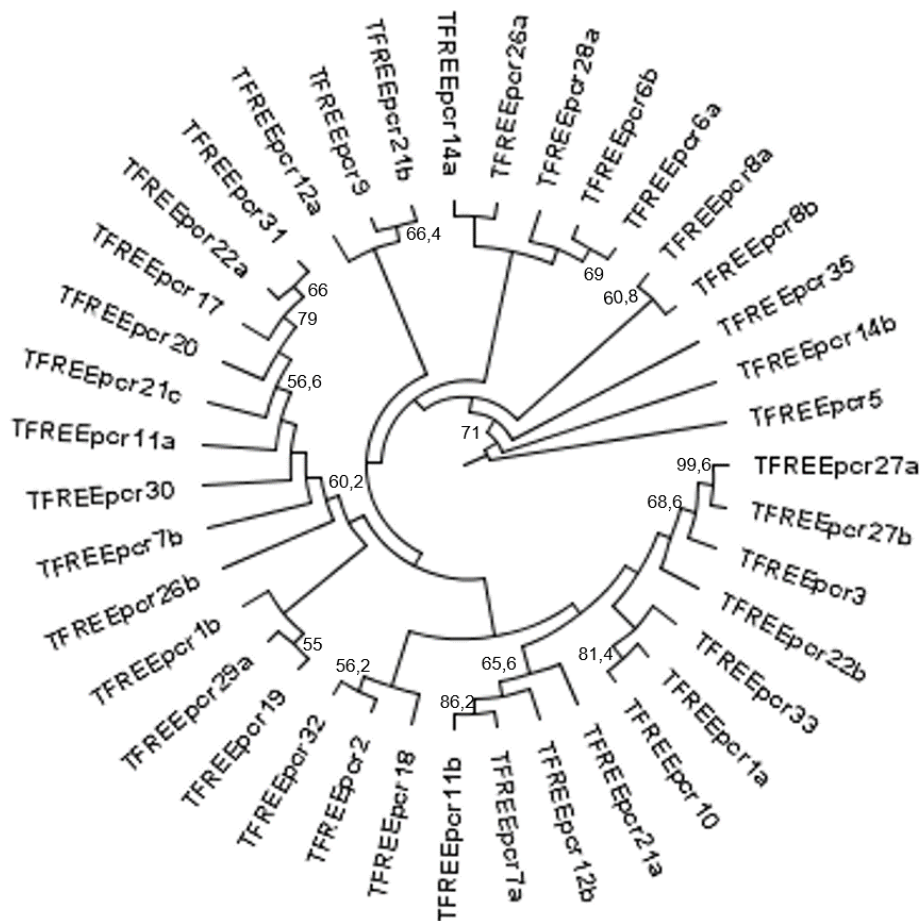


Slika 4. Prikaz elektroforetskog razdvajanja odsječaka satDNA TFREEsat (a), freeCL101x112H (b), freeCL234x173H (c), freeCL300x120H (d), freeCL243x266L (e), freeCL510x326L (f) i freeCL1021x332L (g) umnoženih metodom PCR iz genomske DNA vrste *Tribolium freemani*. Znakom * označen je položaj elektroforetskog biljega Quick Load 2-Log DNA Ladder. Bijelim pravokutnicima označeni su izolirani i klonirani fragmenti.

Tablica 11. Broj ekstrahiranih monomera sedam satelitnih DNA vrste *Tribolium freemani* dobivenih kloniranjem.

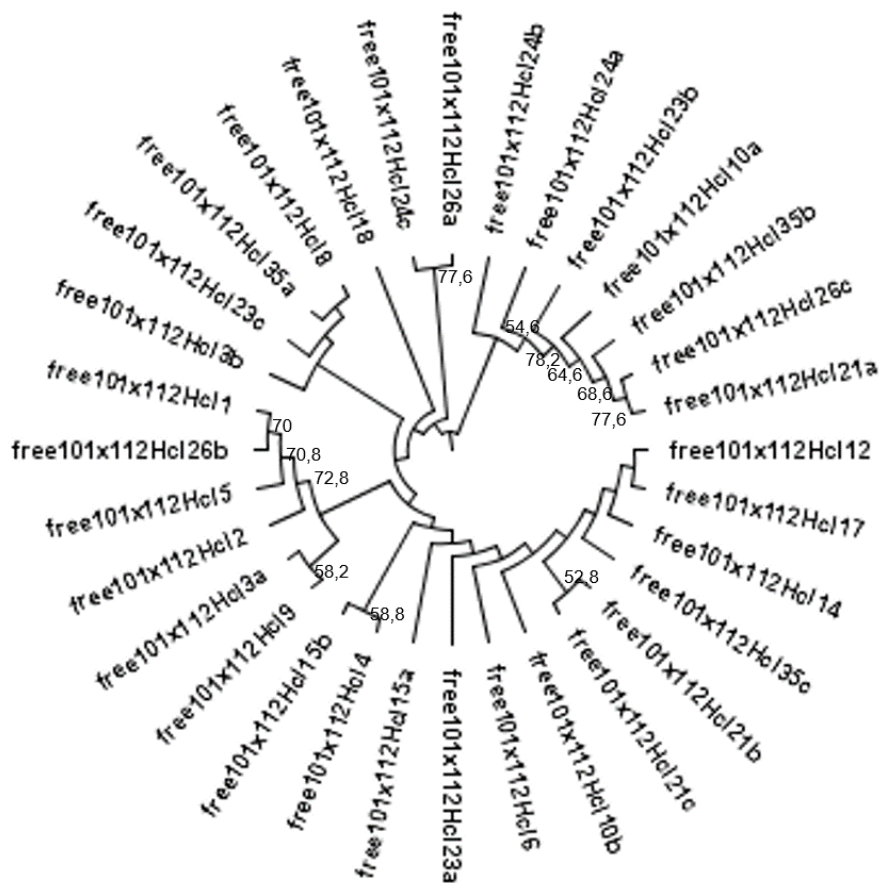
	PCR „dimeri“	PCR „trimeri“	PCR „tetrameri“	Ukupan broj ekstrahiranih monomera
TFREEsat	16	11	-	39
freeCL101x112H	11	3	5	32
freeCL234x173H	6	11	11	61
freeCL300x120H	6	7	10	50
freeCL243x266L	16	10	-	34
freeCL510x326L	20	2	-	24
freeCL1021x332L	18	-	-	18

Ukupno 39 monomera satDNA TFREEsat duljinom varira od 165 do 174 pb (prilozi 1,8), a njihov je prosječan AT sastav 70,9%. Nukleotidna različitost među monomerima izračunata je u programu DnaSP (Rozas *i sur.*, 2017.) te iznosi $Pi=0,07918 (\pm 0,00697)$. Na temelju sravnjenja monomera generiran je prikaz filogenetskog stabla metodom najveće vjerojatnosti, ML (Slika 5.). Susjedni monomeri (obilježeni sufiksima a i b) ekstrahirani iz klonova 6, 8 i 27 na stablu su se grupirali zajedno pokazujući natprosječno veću međusobnu sličnost. Budući da kod ostalih monomernih sekvenca izoliranih iz „dimernih“ i „trimernih“ odsječaka nije došlo do grupiranja u zasebne skupine, može se zaključiti kako monomeri satDNA TFREEsat nisu evoluirali u satelitne potporodice niti pokazuju organizaciju višeg reda.



Slika 5. Filogenetski odnosi monomera satDNA TFREEsat vrste *Tribolium freemani* dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu (T92). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

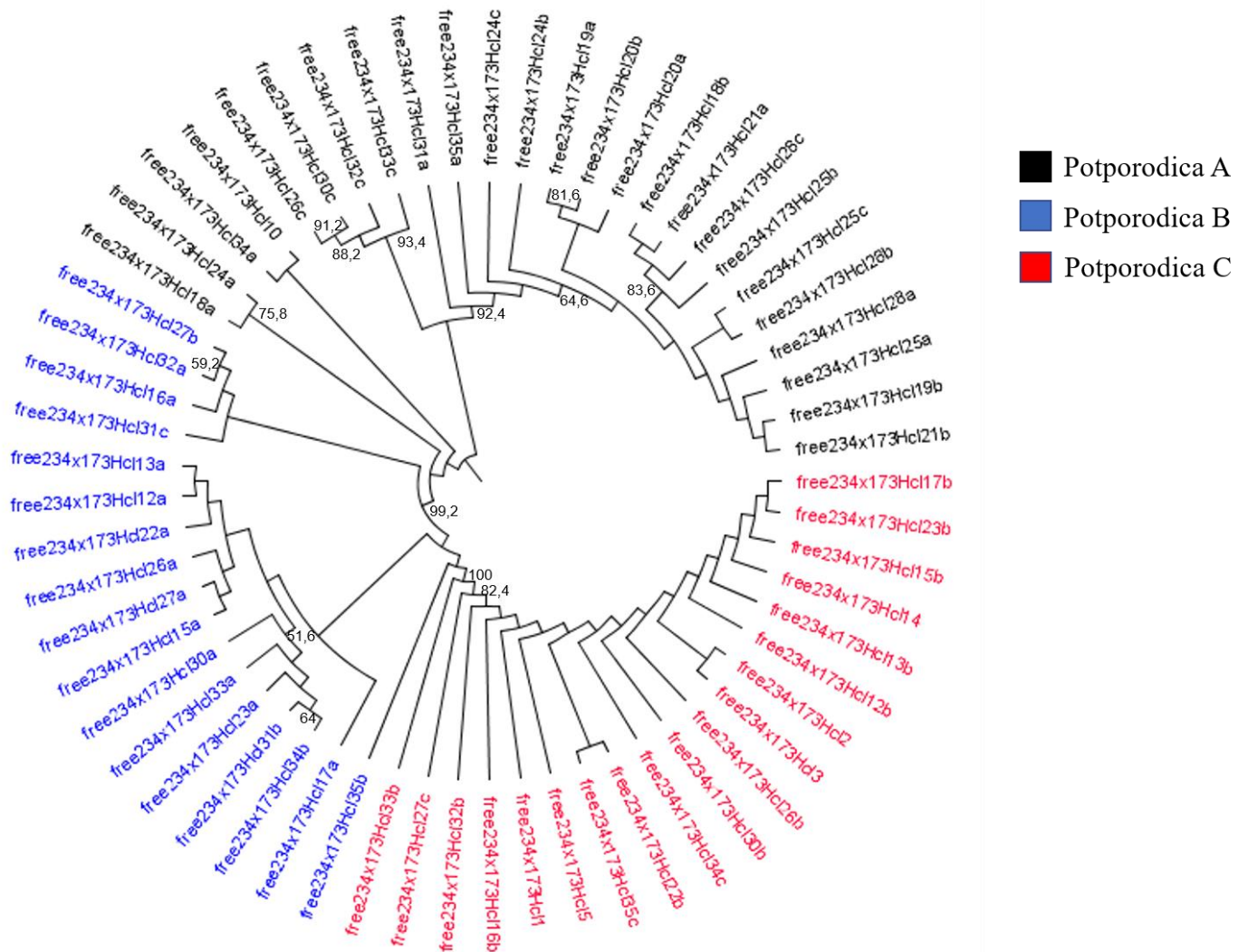
Duljina 32 monomera satDNA freeCL101x112H ekstrahirana *in silico* ne variraju mnogo duljinom (prilozi 2,9). Gotovo svi monomeri su duljine 112 pb, osim monomera freeCL101x112H24c (86 pb), monomera freeCL101x112H10a (111pb) i monomera freeCL101x112H26c (120 pb). Prosječan AT sastav iznosi 68,4%, a nukleotidna različitost $P_i = 0,08337 (\pm 0,00535)$. Na filogenetskom stablu (Slika 6.) nije došlo do značajnog grupiranja sekvenca ovisno o njihovom podrijetlu.



Slika 6. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL101x112H vrste *Tribolium freemani* dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu (T92). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

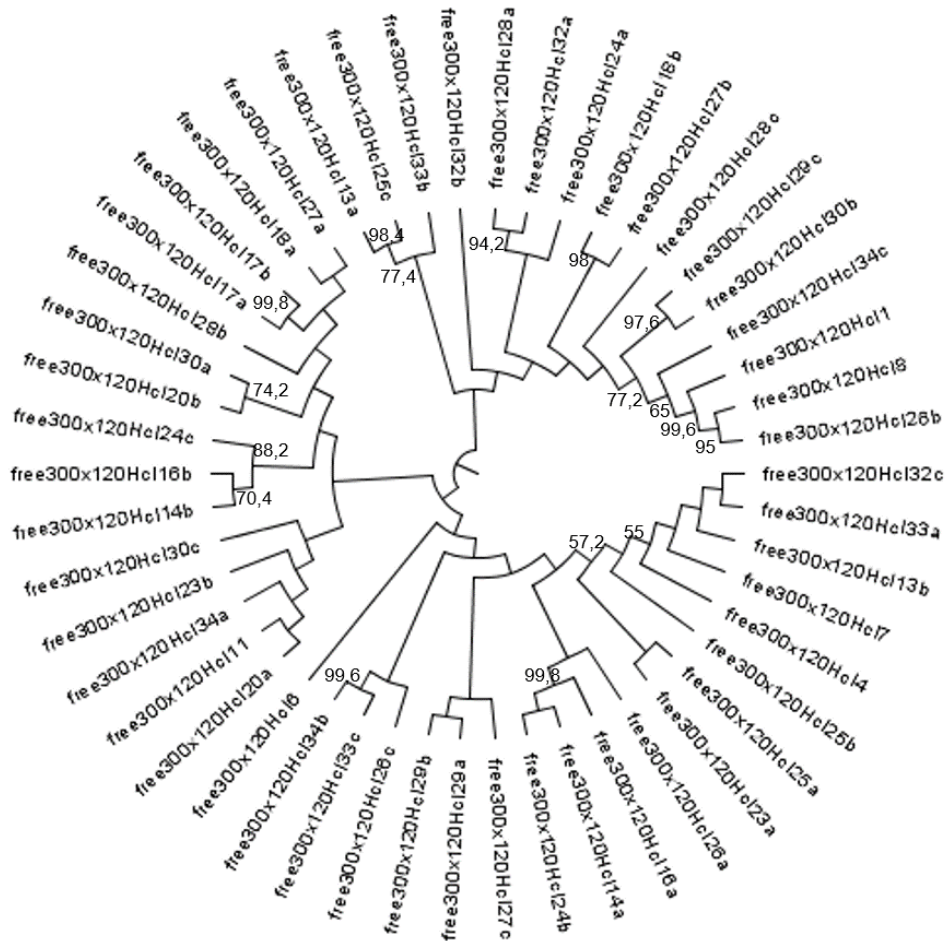
Duljina ukupno 61 monomera satDNA freeCL234x173H ekstrahiranih *in silico* varira od 170 do 174 pb (prilozi 3, 10), a prosječan AT sastav je 66,8%. Nukleotidna različitost među monomerima je prilično visoka i iznost $Pi=0,18906 (\pm 0,00900)$. Na filogenetskom stablu vidljivo je izdvajanje monomera u tri zasebne skupine, nazvane potporodicama A, B i C čije je razdvajanje podržano visokim *bootstrap* vrijednostima (Slika 7.). Pritom je uočeno da unutar tri potporodice, potporodica B i C pokazuju međusobno veću srodnost. Prosječna udvojena udaljenost (eng. *mean pairwise distance*) monomera potporodice A iznosi 0,121 ($\pm 0,033$), među monomerima potporodice B međusobna prosječna udaljenost iznosi 0,018 ($\pm 0,006$), a prosječna udaljenost među monomerima potporodice C iznosi 0,004 ($\pm 0,002$). Prosječna udvojena udaljenost pokazuje veću varijabilnost monomera potporodice A u odnosu na monomere potporodica B i C. Iako je prosječna udaljenost između monomera potporodice A visoka, udaljenosti među potporodicama su više. Prosječna udvojena udaljenost između potporodice A i potporodice B iznosi 0,192 ($\pm 0,062$), između potporodice A i potporodice C

iznosi 0,229 ($\pm 0,116$) dok između potporodice B i potporodice C prosječna udvojena udaljenost iznosi 0,130 ($\pm 0,046$).



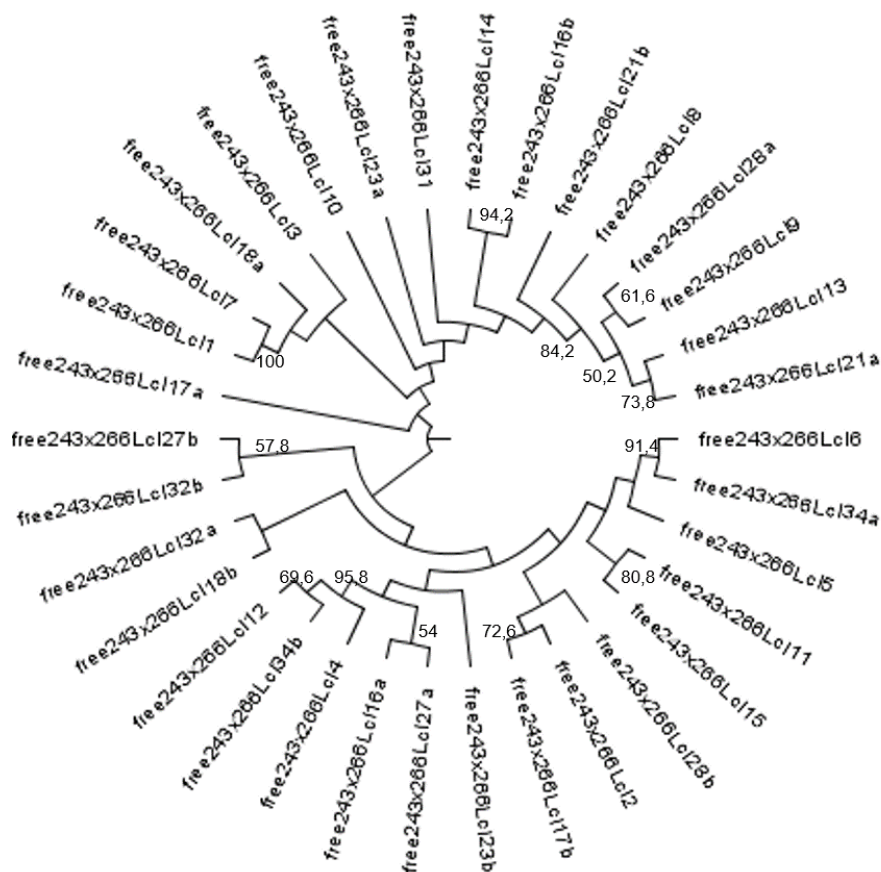
Slika 7. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL234x173H vrste *Tribolium freemani* dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu uz dodatak gamma distribucije (T92+G). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%). Monomeri potporodica A, B i C na stablu su označeni različitim bojama objašnjenim na popratnoj legendi.

Duljina svih 50 *in silico* ekstrahiranih monomera satelita freeCL300x120H iznosi 120 pb (prilozi 4, 11). Prosječan AT sastav je 59,1%, a različitost nukleotida $Pi= 0,11840 (\pm 0,0000492)$. Filogenetsko stablo nije pokazalo znakovitija grupiranja (Slika 8.).



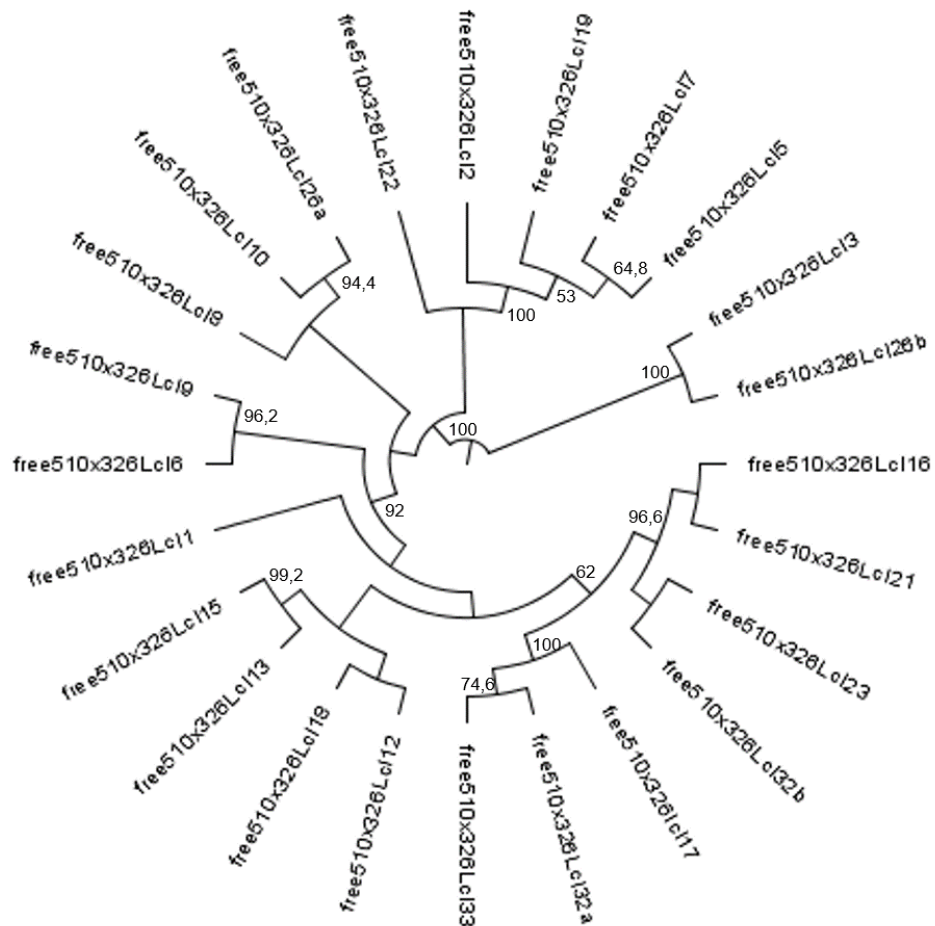
Slika 8. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL300x120H vrste *Tribolium freemani* dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu uz dodatak gamma distribucije (T92+G). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

34 ekstrahirana monomera satDNA freeCL243x266L duljinom variraju 265 – 270 pb (prilozi 5, 12), a njihov prosječan AT sastav iznosi 67,6%. Nukleotidna različitost među monomerima je $P_i = 0,09896 (\pm 0,00835)$, a filogenetsko stablo nije pokazalo grupiranja monomera s obzirom na podrijetlo (Slika 9.).



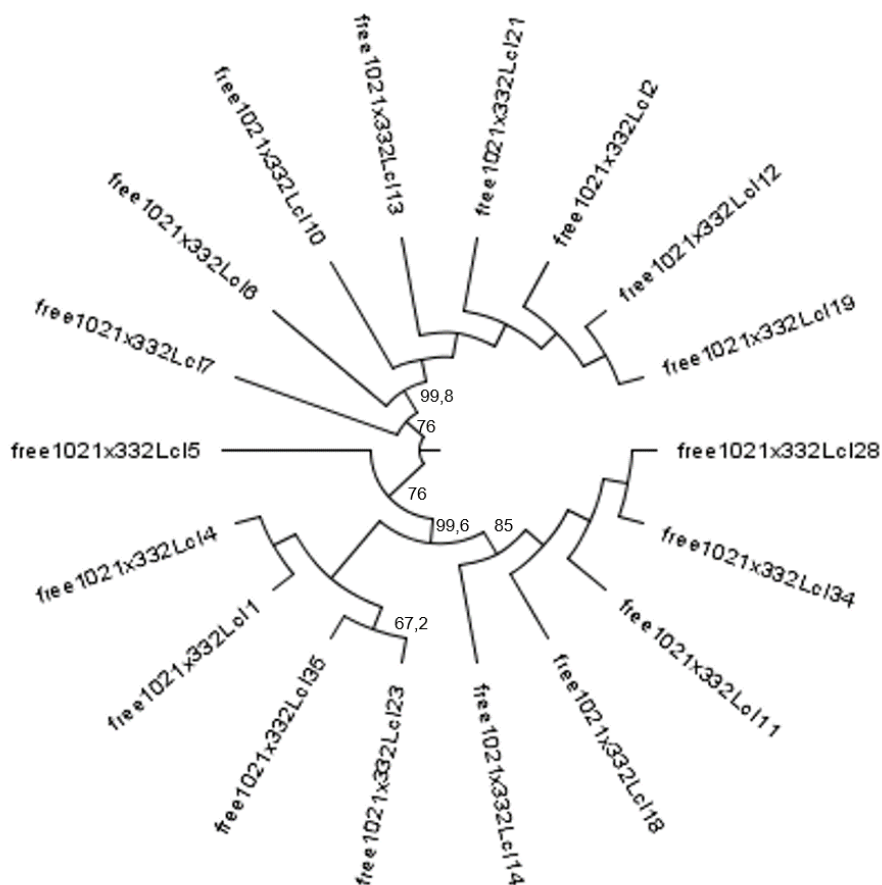
Slika 9. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL243x266L vrste *Tribolium freemani* dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu uz dodatak gamma distribucije (T92+G). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

Duljina 24 ekstrahirana monomera satDNA freeCL510x326L varira između 316 i 350 pb (prilozi 6, 13) s prosječnim AT sastavom od 71,8%. Nukleotidna različitost monomera iznosi $P_i=0,06338 (\pm 0,00707)$. Monomeri na filogenetskom stablu nisu pokazali grupiranja s obzirom na podrijetlo (Slika 10.).



Slika 10. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL510x326L vrste *Tribolium freemani* dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu uz dodatak invarijantnih mjesta (T92+I). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

Monomeri satDNA freeCL1021x332L, ekstrahirani *in silico*, duljinom variraju 284 – 338 pb (prilozi 7, 14). Prosječan AT sastav monomera iznosi 70,1%, a nukleotidna različitost $P_i = 0,02944 (\pm 0,00232)$. Nisku nukleotidnu različitost potvrđuje i filogenetsko stablo (Slika 11.) koje nije pokazalo značajno grupiranje sekvenca s obzirom na podrijetlo.

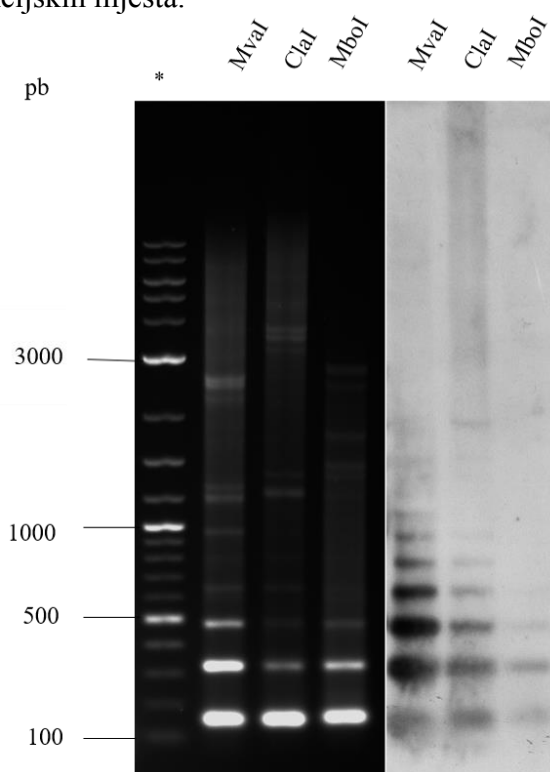


Slika 11. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL1021x332L vrste *Tribolium freemani* dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu (T92). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

3.3. Genomska organizacija satelitnih DNA

Genomska organizacija novootkrivenih satelita u genomu vrste *T. freemani* eksperimentalno je analizirana metodom prema Southernu. Za provedbu metode prema Southernu genomsku DNA je potrebno razgraditi restriktivnim endonukleazama koje prema bioinformatičkoj analizi konsenzus sekvence satDNA satelitne monomere cijepaju na samo jednom mjestu (tzv. konsenzus enzimi).

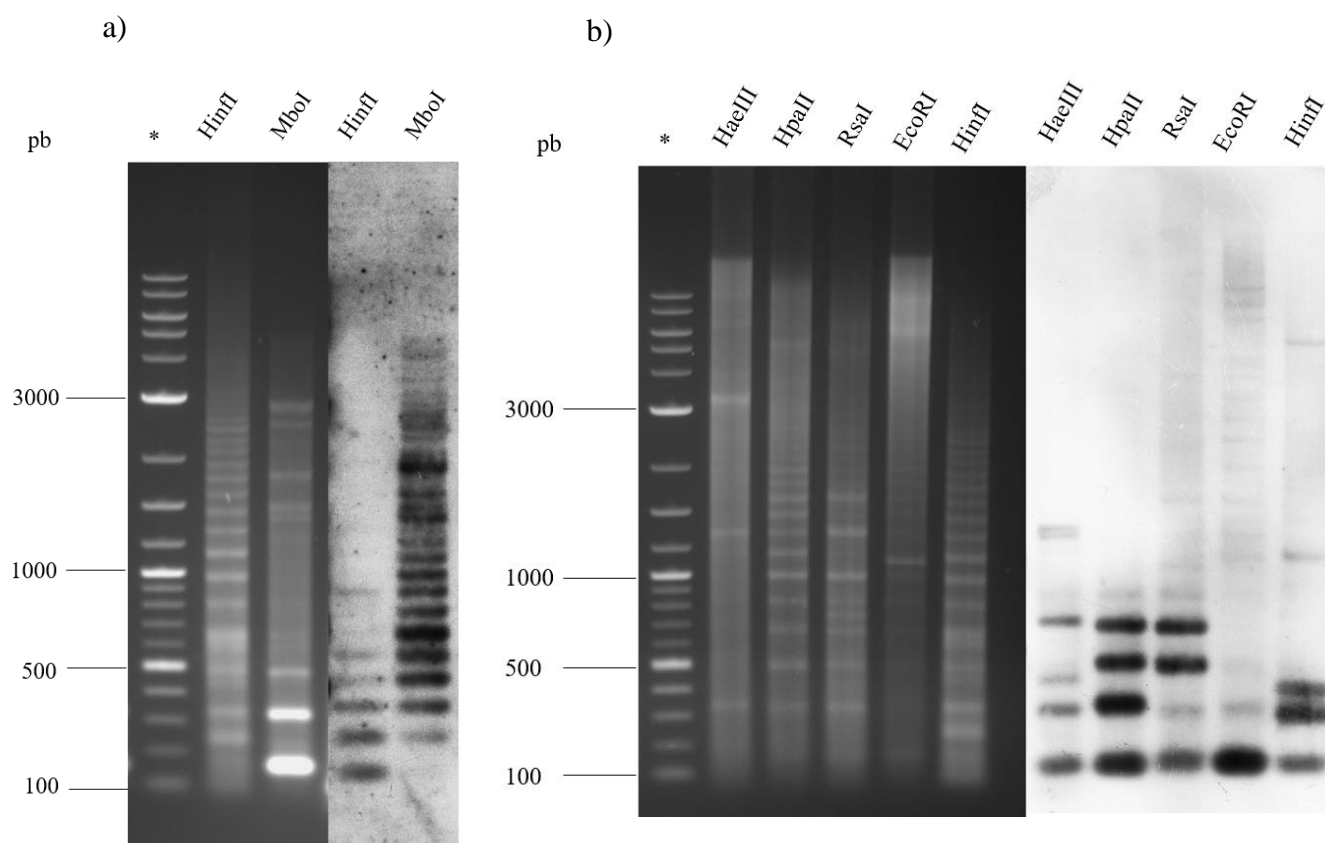
Kod satelita TFREEsat odabrana su tri komercijalno dostupna konsenzus enzima – restrikcijske endonukleaze *MboI*, *ClaI* i *MvaI* (Prilog 8.). Genomska je DNA pocijepana spomenutim enzimima te je hibridizirana sa sondom specifičnom za satelit TFREEsat (Slika 12.). Profil hibridizacije sve tri razgradnje je ljestvičast te se bazira na monomeru duljine 166 pb i njegovim višekratnicima jasno vidljivim sve do heptamera u *MvaI* razgradnji. Multimerne sekvence nastaju zbog točkastih mutacija prisutnih u mjestu prepoznavanja restrikcijskih enzima. Naime, izostanak cijepanja u restrikcijskom mjestu rezultira stvaranjem dimernih i multimernih odsječaka. Nadalje intenzitet profila kod različitih enzima također varira zbog različite očuvanosti restrikcijskih mjesta.



Slika 12. Elektroforetsko razdvajanje genomske DNA vrste *Tribolium freemani* razgrađene restrikcijskim enzimima *MboI*, *ClaI* i *MvaI* te hibridizacija sa sondom specifičnom za satelitnu DNA TFREEsat. Znakom * označen je položaj elektroforetskog biljega Quick Load 2-Log DNA Ladder.

Za satelitnu DNA freeCL101x112H odabrani su konsenzus enzimi *MboI* i *HinfI* (Prilog 9.). U razgradnji genomske DNA oba su enzima nakon hibridizacije sa sondom specifičnom za satelit freeCL101x112H dala ljestvičast profil temeljen na monomernom odsječku duljine 112 pb i njegovim višekratnicima (Slika 13a). U reakciji razgradnje enzimom *MboI* ljestvica je intenzivnija te izraženija i kod multimeru s velikim brojem parova baza što ukazuje na veću promjenjivost *MboI* restrikcijskog mjesta unutar monomera.

Organizacija satDNA freeCL234x173H istražena je u genomskoj DNA pomoću razgradnje konsenzus enzimima *HaeIII*, *HpaII*, *RsaI*, *EcoRI* i *HinFI* (Prilog 10.) te hibridizacijom sa specifičnom sondom. Dobiveni su ljestvičasti profili bazirani na monomernoj sekvenci duljine 173 pb (Slika 13b). Kod razgradnje enzimom *EcoRI* prisutan je intenzivan signal veličine monomernog odsječka i signal niskog intenziteta veličine dimernog odsječka što pokazuje veliku očuvanost restrikcijskog mjesta za ovaj enzim. Međusignali u linijama restrikcijskih razgradnja enzimima *HaeIII* i *HinFI* mogu se protumačiti pojavom novih mjesta prepoznavanja za spomenute restrikcijske enzime kod određenog broja monomera.

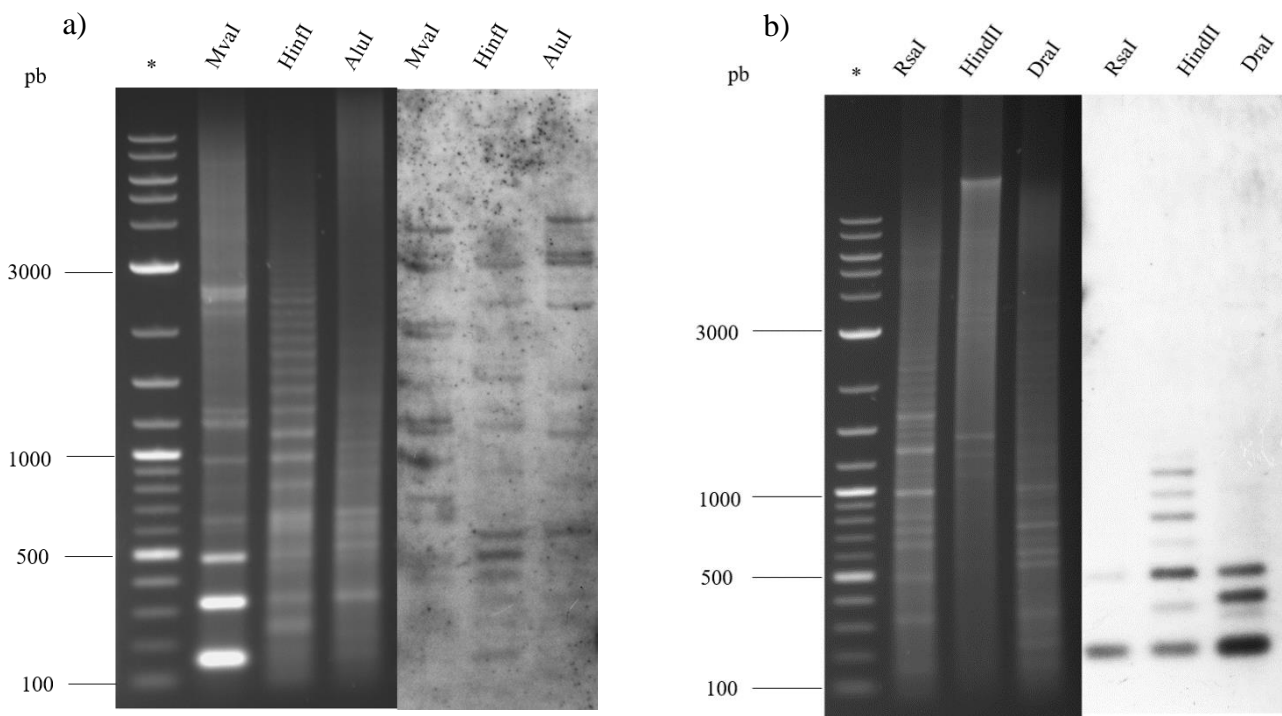


Slika 13. Elektroforetsko razdvajanje genomske DNA vrste *Tribolium freemani* razgrađene restrikcijskim enzimima *HinFI*, *MboI* (a) i *HaeIII*, *HpaII*, *RsaI*, *EcoRI*, *HinFI* (b) te hibridizacija sa sondom specifičnim za satelitne DNA freeCL101x112H (a) i freeCL234x173H (b). Znakom * označen je položaj elektroforetskog biljega Quick Load 2-Log DNA Ladder.

Prije hibridizacije sa specifičnom sondom za satDNA freeCL300x120H, genomska DNA tretirana je restrikcijskim enzimima *MvaI*, *HinFI* i *AluI* (Prilog 11.). Nakon hibridizacije kod svih je razgradnji primijećen ljestvičast profil temeljen na monomernoj sekvenci duljine 120 pb (Slika 14a). Međutim, regularnost „satelitne ljestvice“ najizraženija je u *HinFI* razgradnji do visine heksamera. Pojava sporadično intenzivnijih signala koji odgovaraju odsječcima >1 kb sugerira varijabilnost ciljnih mjesta za spomenute enzime unutar monomera

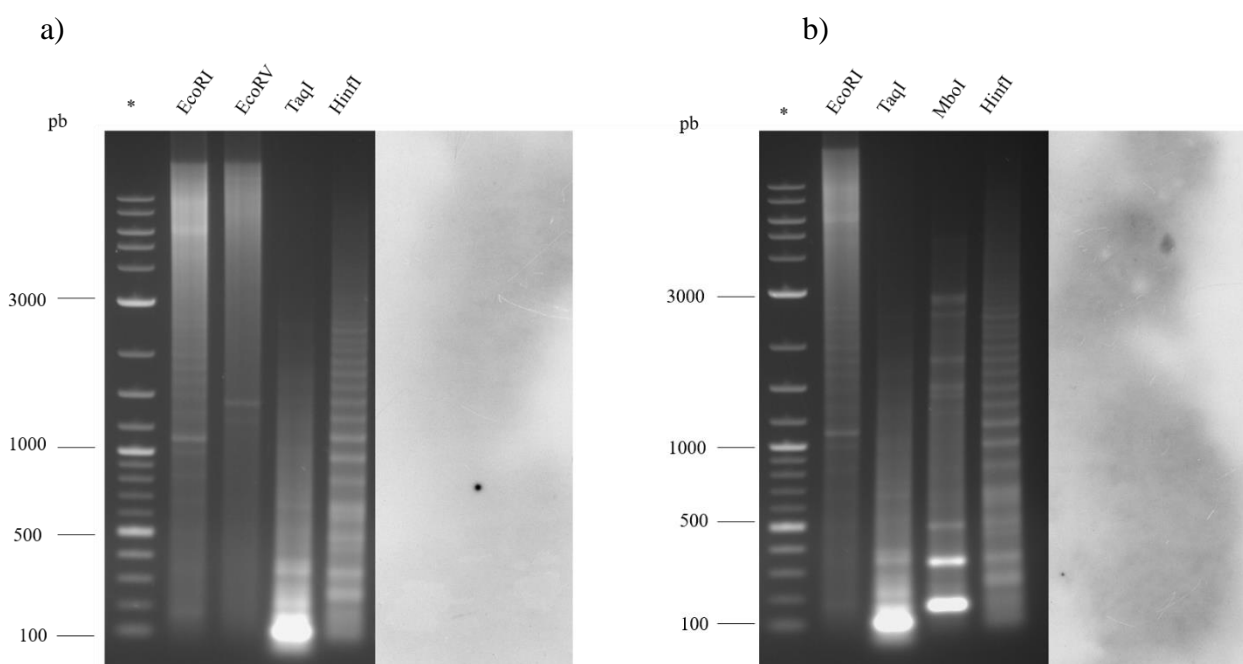
freeCL300x120H. Također, ne može se isključiti ni mogućnost da monomeri satDNA freeCL300x120H ne grade nužno izrazito duge uzastopne poteze, već se možda u manjem broju uzastopno nanizanih kopija nalaze uklopljeni unutar nekih drugih sekvenci. Pritom valja istaknuti da je hibridizacija sa sondom za satDNA freeCL300x120H dala signale prilično jake pozadinske hibridizacije, koja bi se mogla objasniti niskim udjelom ovog satelita u genomu te posljedično njegovom otežanom detekcijom.

U svrhu detekcije satDNA freeCL243x266L, genomska DNA razgrađena je konsenzus restriktivnim enzimima *RsaI*, *HindII* i *DraI* (Prilog 12.). Ljestvičast profil nakon hibridizacije sa sondom specifičnom za satDNA freeCL243x266L temeljen na monomernoj sekvenci duljine 266 pb prisutan je samo kod razgradnje enzimom *HindII* (Slika 14b). Kod restriktivne razgradnje enzimom *RsaI* prisutna je intenzivna vrpca koja odgovara duljini monomernog odsječka te veoma slaba vrpca koja odgovara duljini dimernog odsječka, dok su kod restriktivne razgradnje enzimom *DraI* spomenute vrpce jasno vidljive, no uz dodatak međusignala. Ljestvica koja se bazira samo na monomernim i dimernim vrpca pokazuje visokohomologne nizove monomera ukazujući na nisku varijabilnost satelita freeCL243x266L pokazanu i analizom monomernih sekvenci. Razgradnja enzimima *HindII* i *DraI* pokazuje i pojavu međusignala te samim tim i novih mjesta prepoznavanja spomenutih restriktivnih enzima kod određenog broja monomera.



Slika 14. Elektroforetsko razdvajanje genomske DNA vrste *Tribolium freemani* razgrađene restriktivnim enzimima *MvaI*, *HinfI*, *AluI* (a) i *RsaI*, *HindII* i *DraI* (b) te hibridizacija sa sondom specifičnom za satelitnu DNA freeCL300x120H (a) i freeCL243x266L (b). Znakom * označen je položaj elektroforetskog biljega Quick Load 2-Log DNA Ladder.

Za razgradnju satDNA freeCL510x326L odabrani su restrikcijski enzimi *EcoRI*, *EcoRV*, *TaqI* i *HinfI* (Prilog 13.), dok su za razgradnju satDNA freeCL1021x332L odabrani enzimi *EcoRI*, *TaqI*, *MboI* i *HinfI* (Prilog 14.). Hibridizacijom sa sondama specifičnim za spomenute satelite nisu dobiveni signali (Slika 15.). Prema TAREAN analizi udio satDNA freeCL510x326L u genomu vrste *T. freemani* je samo 0,003%, a satDNA freeCL1021x332L samo 0,001% što je za red veličine manje od udjela ostalih analiziranih satDNA. Zbog niskog udjela satDNA freeCL510x326L i freeCL1021x332L u genomu, detekcija metodom prema Southernu je otežana te je potrebno provesti daljnju optimizaciju eksperimenta kako bi se podigla razina osjetljivosti metode. Osjetljivost metode mogla bi se pojačati upotrebom veće količine genomske DNA ili upotrebom radioaktivno obilježene sonde.



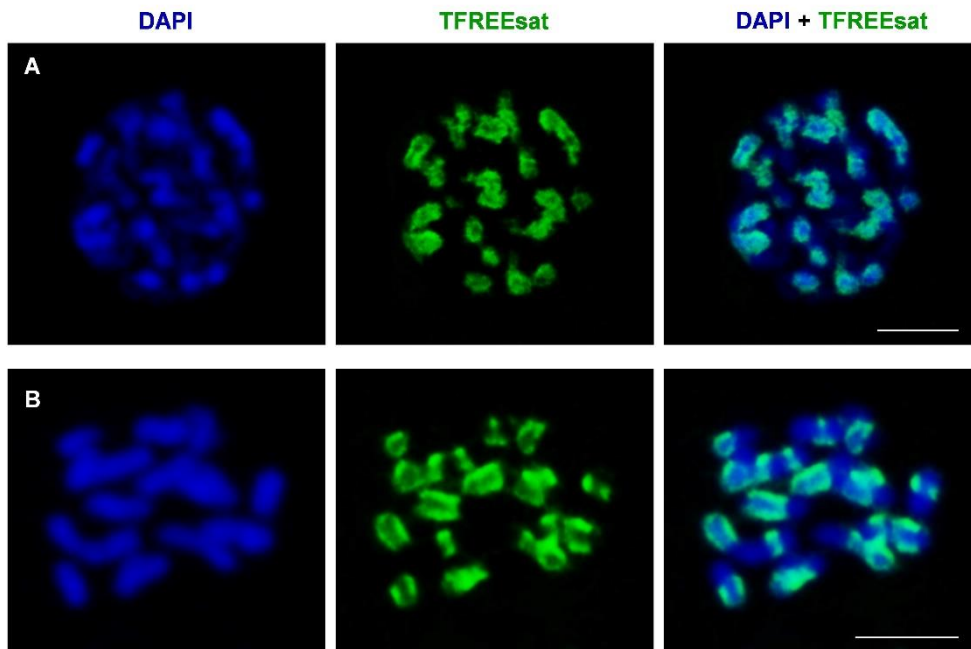
Slika 15. Elektroforetsko razdvajanje genomske DNA vrste *Tribolium freemani* razgrađene restrikcijskim enzimima *EcoRI*, *EcoRV*, *TaqI* i *HinfI* (a) i *EcoRI*, *TaqI*, *MboI* i *HinfI* (b) te hibridizacija sa sondom specifičnom za satelitne DNA freeCL510x326L (a) i freeCL1021x332L (b). Znakom * označen je položaj elektroforetskog biljega Quick Load 2-Log DNA Ladder.

3.4. Kromosomska lokalizacija satelitnih DNA

Položaj satelitnih DNA na kromosomima vrste *T. freemani* određen je pomoću metode FISH korištenjem biotinom obilježenih sonda specifičnih za određenu satelitnu DNA. Kako bi rezultati metode FISH bili što informativniji, za izradu preparata korištene su gonade mužjaka u stadiju kukuljice u čijim se stanicama nalazi najveći broj stanica u mejozi. Vrsta *T. freemani*

kao i većina porodice Tenebrionidae ima diploidan broj kromosoma $2n=20$ (Alvarez-Fuster *i sur.*, 1991.).

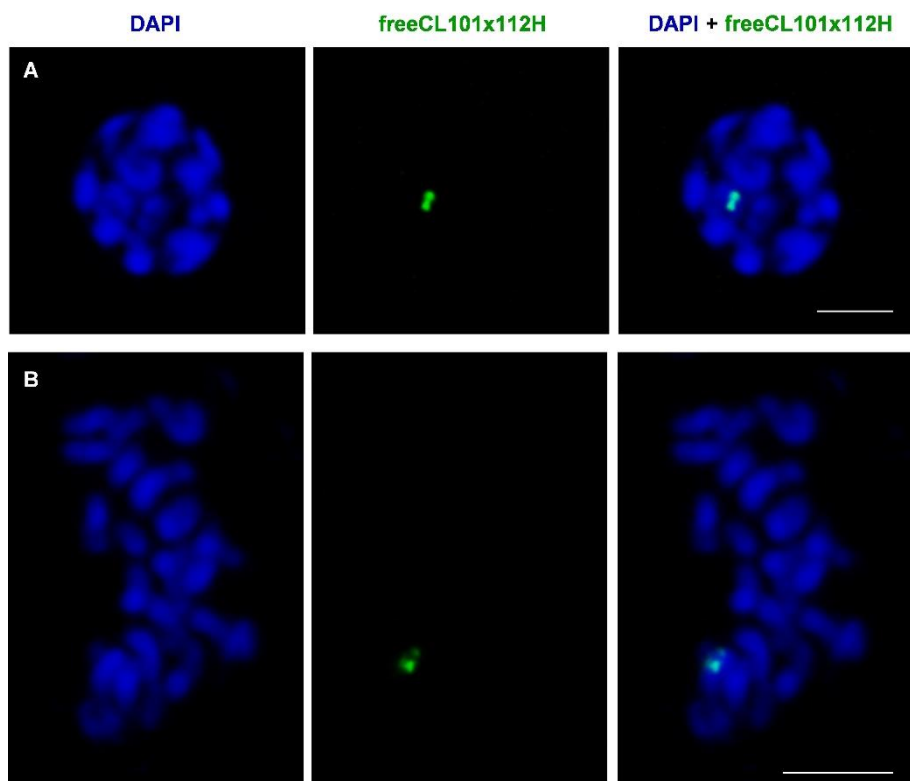
Hibridizacijom preparata sa sondom specifičnom za satelit TFREEsat dobiveni su signali u području pericentromernih i centromernih regija svih kromosoma vrste *T. freemani* (Slika 16.). Takvi su rezultati dosljedni prethodnim saznanjima o satDNA TFREEsat koja zauzima 31% genoma vrste *T. freemani* te se nalazi u blokovima pericentromernog heterokromatina (Juan *i sur.*, 1993.).



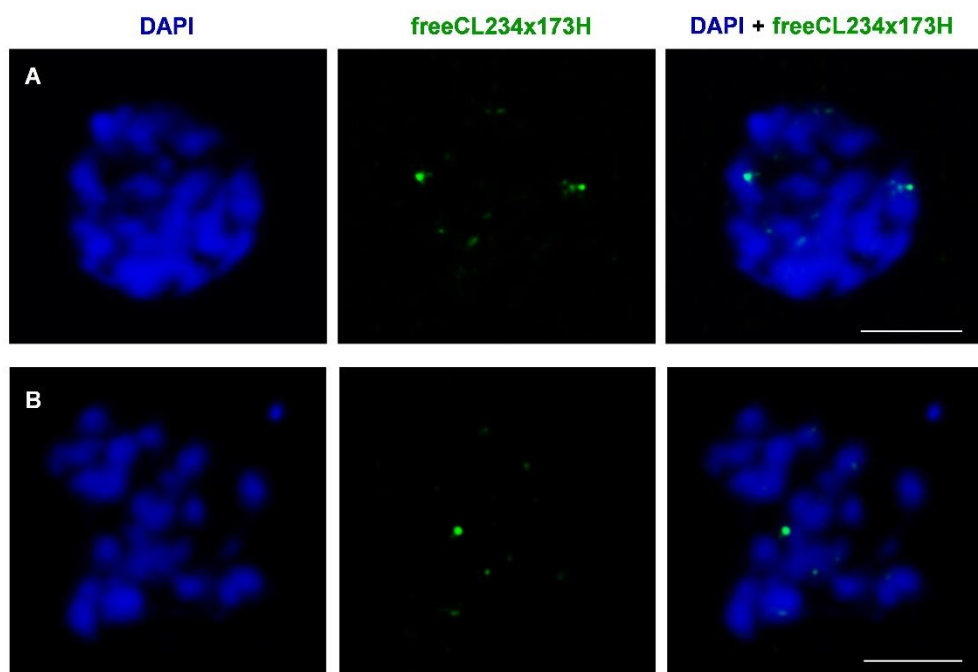
Slika 16. Kromosomi vrste *Tribolium freemani* u prometafazi (A) i metafazi (B) nakon bojanja fluorescencijskom bojom DAPI te nakon fluorescencijske hibridizacije *in situ* sa sondom specifičnom za satDNA TFREEsat. Crtica označava duljinu 5 μm .

Rezultati analize FISH sa sondom specifičnom za satDNA freeCL101x112H pokazuju postojanje dva signala na samo jednom kromosomu u haploidnom setu (Slika 17.). Zbog niske zastupljenosti satDNA freeCL101x112H u genomu moguće je da postoje dodatne regije zastupljenosti satelita freeCL101x112H koje su izvan mogućnosti detekcije metode FISH.

Analiza FISH sa sondom specifičnom za satelit freeCL234x173H rezultirala je pojavom signala na 4-5 kromosoma, pri čemu je signal intenzivniji na 1-2 kromsoma, dok je ostatak signala znatno slabiji te ne daje nedvosmislenu informaciju o točnom položaju satDNA freeCL234x173H (Slika 18.).



Slika 17. Kromosomi vrste *Tribolium freemani* u prometafazi (A) i metafazi (B) nakon bojanja fluorescencijskom bojom DAPI te nakon fluorescencijske hibridizacije *in situ* sa sondom specifičnom za satDNA freeCL101x112H. Crtica označava duljinu 5 μm .

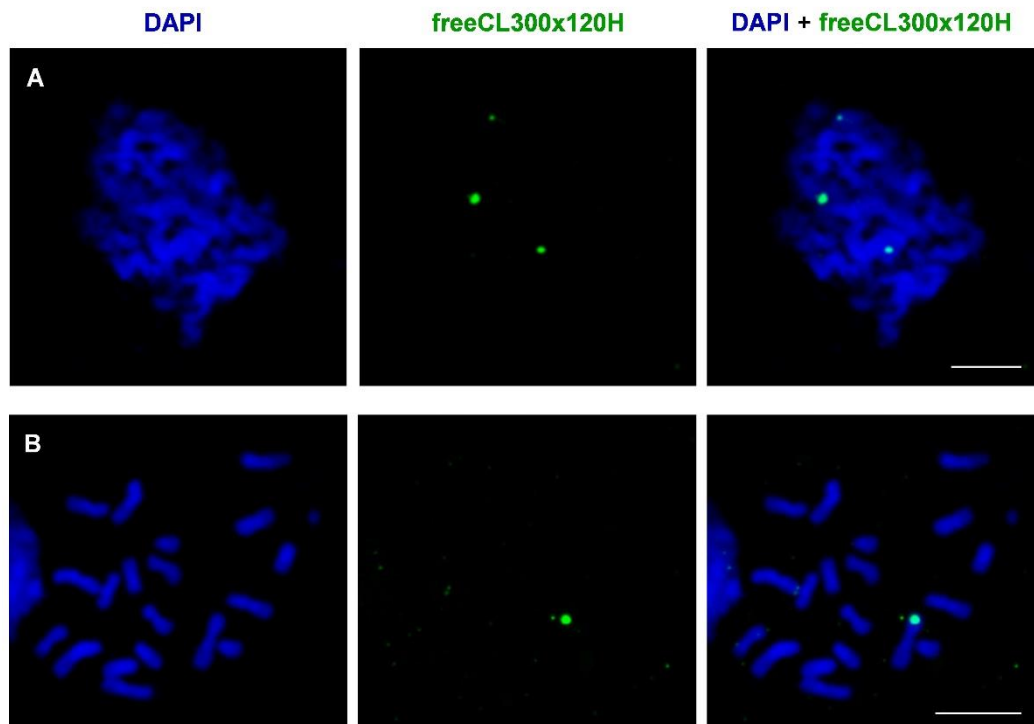


Slika 18. Kromosomi vrste *Tribolium freemani* u prometafazi (A) i metafazi (B) nakon bojanja fluorescencijskom bojom DAPI te nakon fluorescencijske hibridizacije *in situ* sa sondom specifičnom za satDNA freeCL234x173H. Crtica označava duljinu 5 μm .

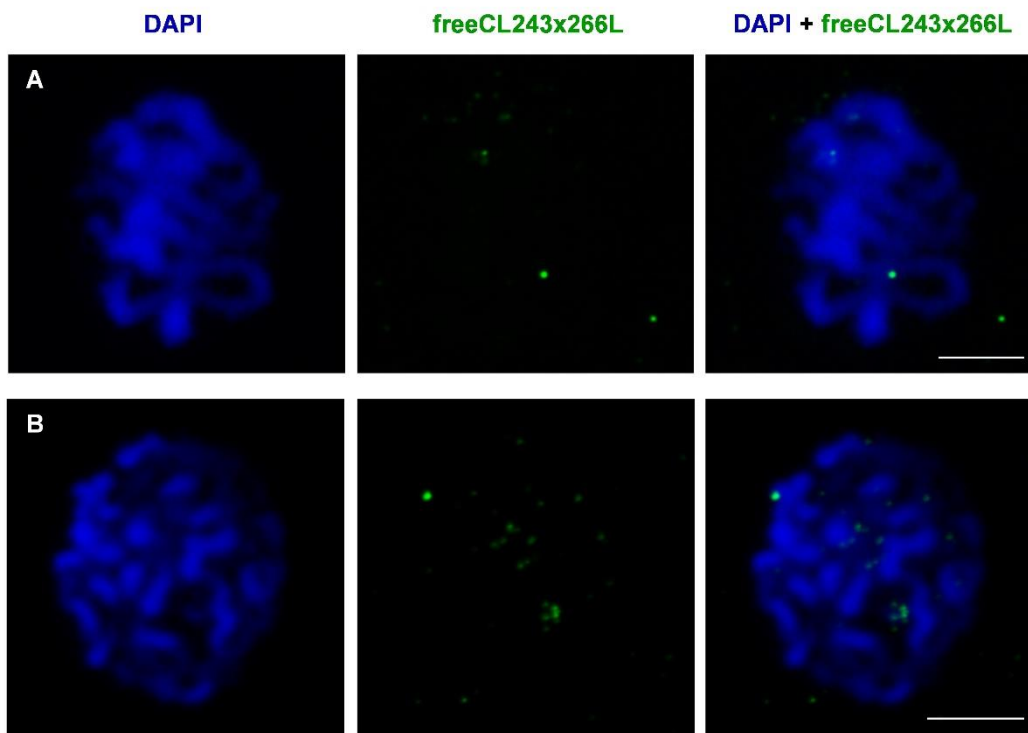
Analiza FISH sa sondom specifičnom za satDNA freeCL300x120H pokazuje tri odvojena signala na kromosomima u prometafazi, dok je na metafaznim kromosomima prisutan jedan snažan subtelomerni signal (Slika 19.). Prisutnost više signala na prometafaznim kromosomima može se objasniti nespecifičnim pozadinskim signalom ili drugačijom orijentacijom kromosoma na metafaznoj slici pri čemu nisu obuhvaćeni svi signali.

Rezultati analize FISH sa sondom specifičnom za satelit freeCL243x266L pokazuju raspršen signal duž kromosoma u prometafazi (Slika 20.).

Sateliti freeCL510x326L i freeCL1021x332L nisu detektirani pomoću opisanog eksperimentalnog postupka. Nizak udio ovih satelita u genomu vrste *T. freemani* vjerojatno je ispod razine osjetljivosti metode FISH.



Slika 19. Kromosomi vrste *Tribolium freemani* u prometafazi (A) i metafazi (B) nakon bojanja fluorescencijskom bojom DAPI te nakon fluorescencijske hibridizacije *in situ* sa sondom specifičnom za satDNA freeCL300x120H. Crtica označava duljinu 5 μ m.



Slika 20. Kromosomi vrste *Tribolium freemani* u prometafazi (A, B) nakon bojanja fluorescencijskom bojom DAPI te nakon fluorescencijske hibridizacije in situ sa sondom specifičnom za satDNA freeCL243x266L. Crtica označava duljinu 5 μ m.

3.5. Usporedba satelitnih DNA vrste *T. freemani* s ortolognim sekvencama iz genoma vrste *Tribolium castaneum*

Konsenzus nukleotidni sljedovi satelitnih DNA vrste *T. freemani* identificirani i analizirani u ovom radu korišteni su u BLAST pretrazi genske baze NCBI GenBank ne bi li se pronašla sličnost s literaturno opisanim sekvencama.

Pretraga BLAST pokazala je da od šest novootkrivenih satDNA vrste *T. freemani*, satDNA freeCL101x112H, freeCL234x173H, freeCL510x326L i freeCL1021x332L pokazuju najveću sličnost sa satDNA prethodno opisanim u genomu vrste *T. castaneum* (Pavlek *i sur.*, 2015.) (Tablica 12.). Pretraga lokalne, zasad još neobjavljene baze satelitnih sekvenca vrste *T. castaneum* (Mravinac, neobjavljeni rezultati) otkrila je da satDNA freeCL300x120H i freeCL243x266L najveću sličnost pokazuju također s dvije satDNA vrste *T. castaneum* (Tablica 12.).

Tablica 12. Usporedba šest novootkrivenih satelitnih DNA vrste *Tribolium freemani* i homolognih satelita iz vrste *Tribolium castaneum* upotrebom alata blastn.

sateliti iz vrste <i>T. freemani</i>	homologni sateliti iz vrste <i>T. castaneum</i>	E - vrijednost	sličnost
freeCL101x112H	Cast7 ^a	8e-14	81,32%
freeCL234x173H	Cast4 ^a	1e-27	89,42%
	Cast2 ^a	7e-18	80,18%
freeCL300x120H	TcaSat16-120 ^b	2e-23	93,55%
freeCL243x266L	TcaSat13-266 ^b	2e-27	86,73%
freeCL510x326L	Cast1 ^a	2e-16	84,95%
freeCL1021x332L	Cast9 ^a	9e-45	78,33%

^a Pavlek i sur. (2015)

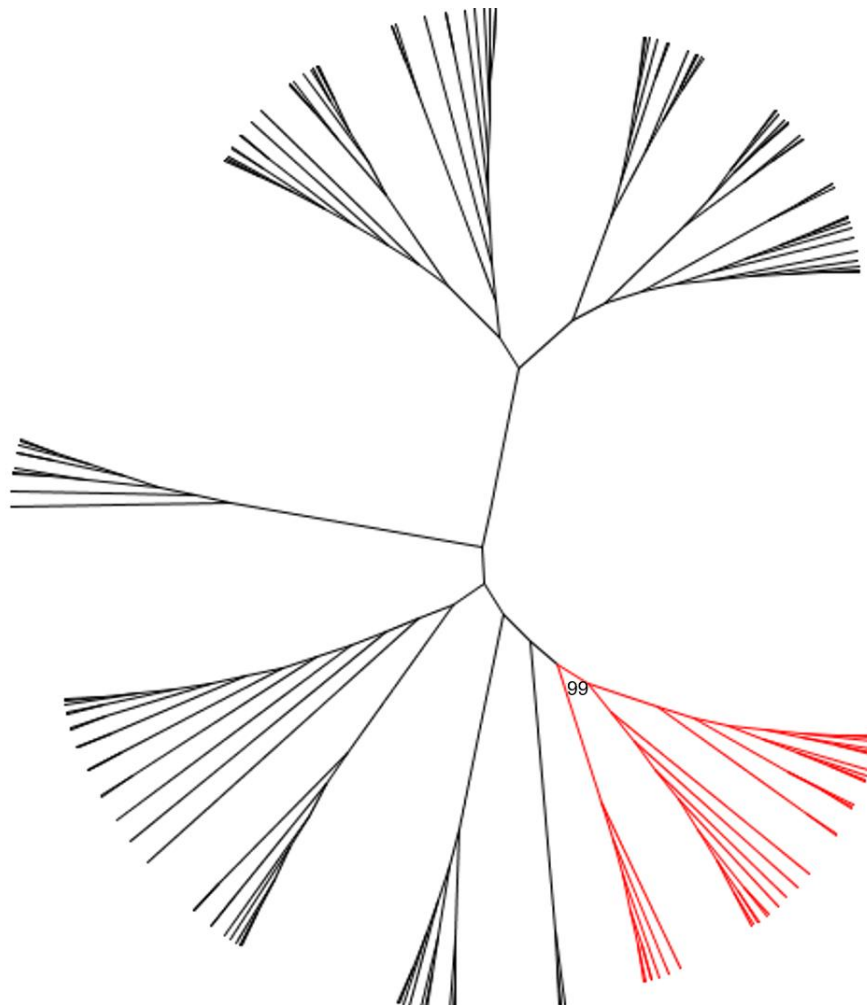
^b Mravinac, neobjavljeni rezultati

Budući da je genom kukca *T. castaneum* sekvenciran i javno dostupan, nukleotidni sljedovi kloniranih odsječaka satelitnih DNA vrste *T. freemani* uspoređeni su s ortolognim sekvencama iz genoma *T. castaneum*. U genomskom sklopu vrste *T. castaneum* Tcas5.2, kao i u njegovim neposloženim skafoldima i jedinstvenim sekvencama prvo su anotirani monomeri koji su zadovoljili kriterij minimalne sličnosti od 70% s konsenzus sekvencom pojedine satelitne DNA vrste *T. freemani*. Anotirani monomeri vrste *T. castaneum* su potom izlučeni *in silico* te korišteni u daljnjim usporedbama s kloniranim odsječcima vrste *T. freemani*. Napravljenja su sravnjenja monomera satDNA vrste *T. freemani* i ortolognih satelitnih monomera vrste *T. castaneum* te su razmotreni njihovi filogenetski odnosi.

SatDNA freeCL101x112H pokazala je najveću homologiju sa satDNA Cast7 iz vrste *T. castaneum* (Tablica 12.). Iako su sateliti homologni, prosječna udvojena udaljenost satelitnih monomera unutar vrste *T. freemani* je četverostruko niža nego udaljenost među monomerima iz vrste *T. castaneum* (Tablica 13.). Ipak, u međusobnoj usporedbi najveće udaljenosti pokazuju monomeri porijeklom iz različitih vrsta. Filogenetsko stablo (Slika 21.) usporedbe monomera iz dviju vrsta, nedvosmisleno pokazuje izdvajanje satelitnih monomera freeCL101x112H spram ortolognih sekvenca vrste *T. castaneum*.

Tablica 13. Prosječna udvojena udaljenost monomera satelitne DNA freeCL101x112H iz vrste *Tribolium freemani* i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum*. U zagradama su navedene standardne pogreške rezultata.

	freeCL101x112H	CASTfreeCL101x112H
freeCL101x112H	0,092 ($\pm 0,014$)	0,382 ($\pm 0,046$)
CASTfreeCL101x112H		0,340 ($\pm 0,028$)

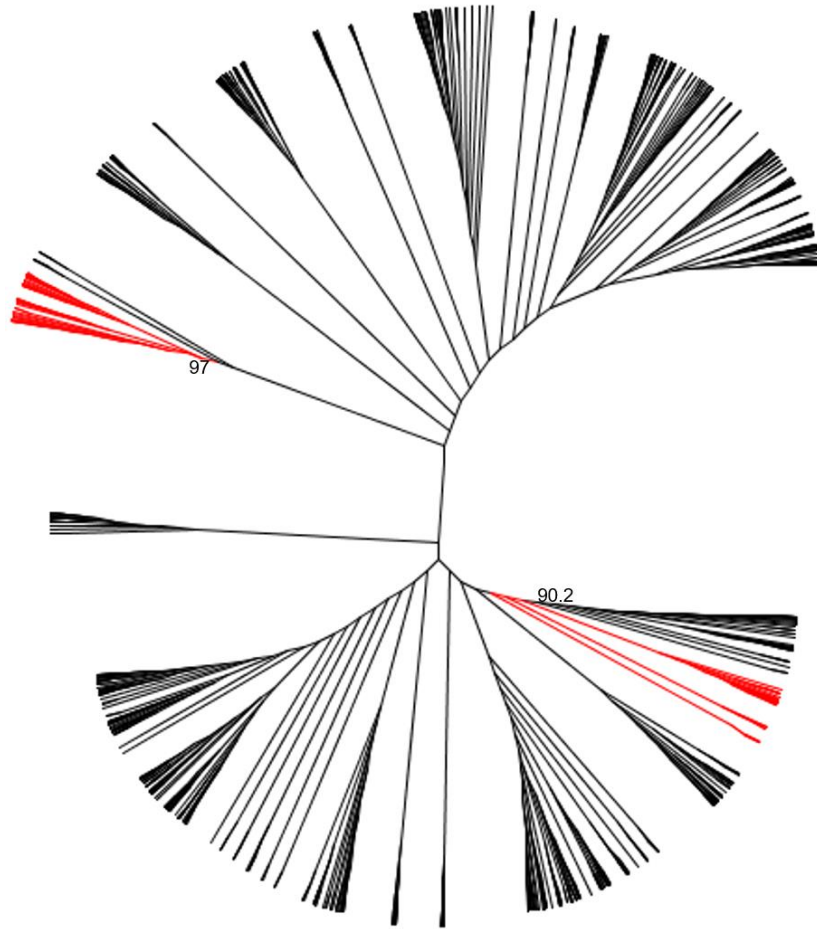


Slika 21. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL101x112H vrste *Tribolium freemani* (na stablu označeni crveno) i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum* (na stablu označeni crno) dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu uz dodatak gamma distribucije (T92+G). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

Monomeri satDNA freeCL234x173H iz brašnara *T. freemani* u usporedbi s ortolognim sljedovima iz vrste *T. castaneum* u filogenetskom se prikazu grupiraju u dvije skupine (Slika 22.). U jednu skupinu grupiraju se monomeri potporodice A, dok je druga skupina sačinjena od monomera potporodica B i C definiranih u poglavlju 3.2. Obje skupine kao najsirodnije sekvence podržavaju satelit Cast4 iz vrste *T. castaneum*, ali se u jednoj skupini monomera potporodice A uz dominantnu prisutnost monomera satelita Cast4 nalaze i monomeri koji pokazuju sličnost s satelitom Cast2 iz vrste *T. castaneum*. Ovi rezultati podupiru prethodna opažanja sličnosti nukleotidnih sljedova monomera satelita Cast4 i Cast2. Prosječna udvojena udaljenost među monomerima satDNA freeCL234x173H je visoka i iznosi 0,233, no slična udaljenost opažena je i unutar monomernih sljedova porijeklom iz genoma vrste *T. castaneum* (Tablica 14.). Treba naglasiti da je prosječna udaljenost monomera između vrsta očekivano viša te iznosi 0,325.

Tablica 14. Prosječna udvojena udaljenost monomera satelitne DNA freeCL234x173H iz vrste *Tribolium freemani* i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum*. U zagradama su navedene standardne pogreške rezultata.

	freeCL234x173H	CAST freeCL234x173H
freeCL234x173H	0,233 (±0,032)	0,325 (±0,030)
CAST freeCL234x173H		0,271 (±0,022)

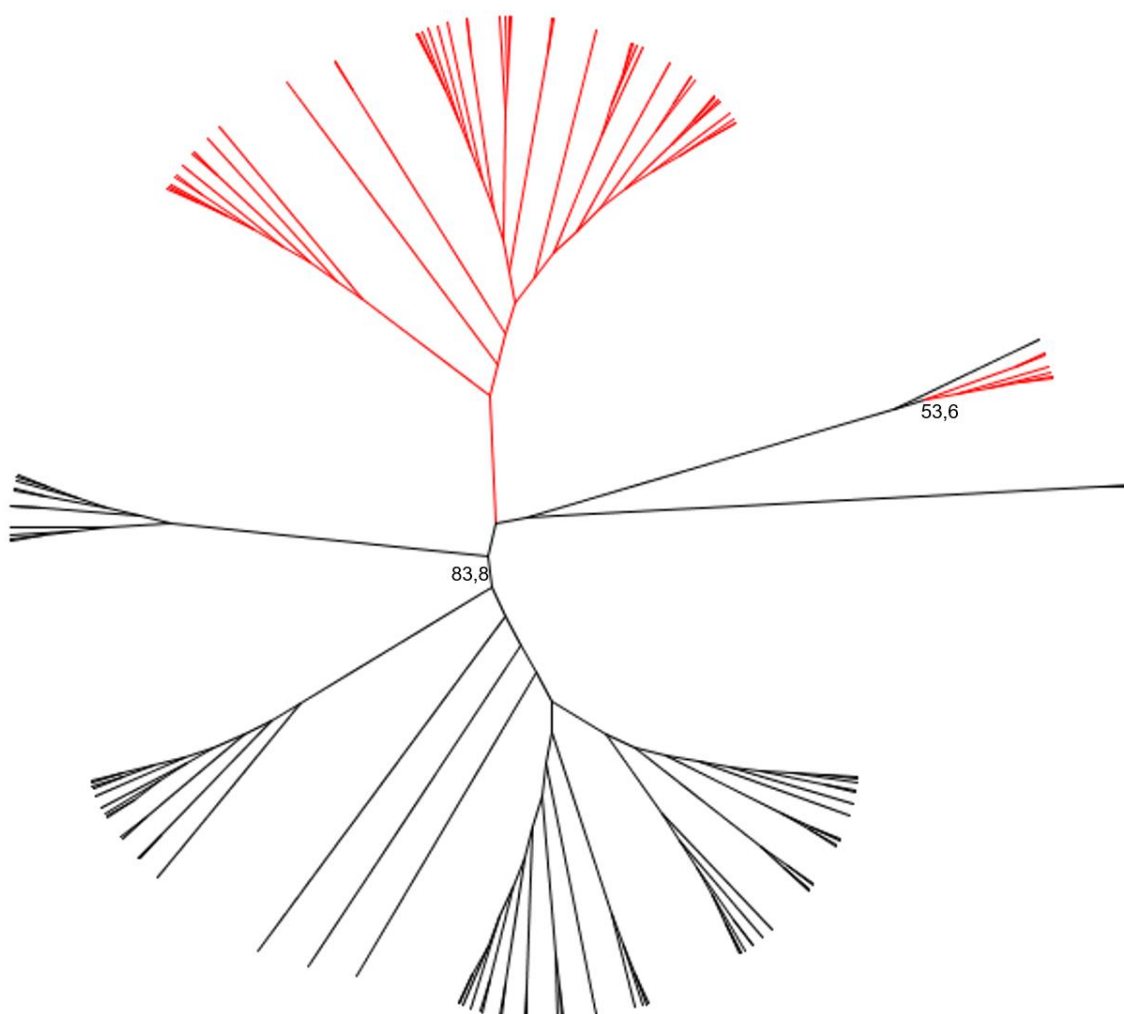


Slika 22. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL234x173H vrste *Tribolium freemani* (na stablu označeni crveno) i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum* (na stablu označeni crno) dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema General Time Reversible modelu uz dodatak gamma distribucije (GTR+G). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

Monomeri satDNA freeCL300x120H u genomu vrste *T. castaneum* najrodnijim prepoznaju monomere nisko zastupljenog satelita TcaSat16-120 (Mravinac, neobjavljeni rezultati). U filogenetskom prikazu međusobnih odnosa monomeri satDNA freeCL300x120H se grupiraju zajedno (Slika 23.). Iznimka je skupina monomera vrste *T. freemani* grupirana uz jednu ortolognu sekvencu iz vrste *T. castaneum*. Moguće je objašnjenje da je spomenuta sekvencu iz genoma *T. castaneum* sličnija monomerima iz vrste *T. freemani*, nego ostalim sekvencama iz kukca *T. castaneum*. Prosječna udvojena udaljenost monomera unutar vrsta manja je nego prosječna udaljenost monomera između vrsta *T. freemani* i *T. castaneum* (Tablica 15.).

Tablica 15. Prosječna udvojena udaljenost monomera satelitne DNA freeCL300x120H iz vrste *Tribolium freemani* i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum*. U zagradama su navedene standardne pogreške rezultata.

	freeCL300x120H	CASTfreeCL300x120H
freeCL300x120H	0,133 ($\pm 0,017$)	0,210 ($\pm 0,029$)
CASTfreeCL300x120H		0,125 ($\pm 0,016$)

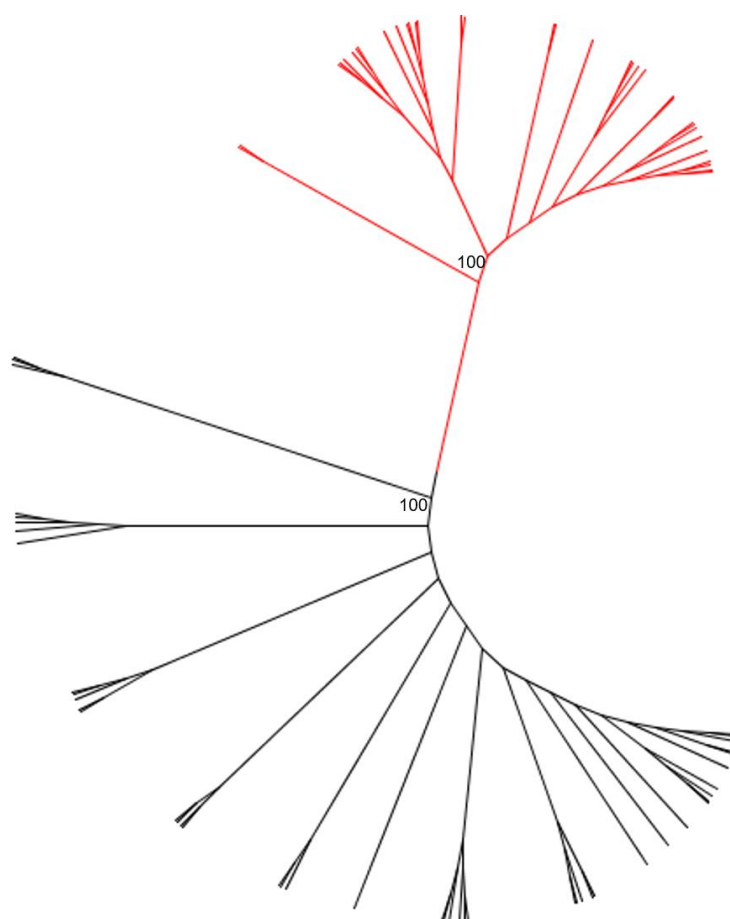


Slika 23. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL300x120H vrste *Tribolium freemani* (na stablu označeni crveno) i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum* (na stablu označeni crno) dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu uz dodatak gamma distribucije (T92+G). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

Satelitu freeCL243x266L u genomu vrste *T. castaneum* ortologna je satDNA TcaSat13-266 (Mravinac, neobjavljeni rezultati). Njihovom međusobnom usporedbom generirano je filogenetsko stablo koje pokazuje jasno grupiranje monomera satDNA freeCL243x266L s obzirom na vrstu kojoj pripadaju (Slika 24.). U međusobnoj usporedbi najveće prosječne udvojene udaljenosti pokazuju monomeri iz različitih vrsta (Tablica 16.).

Tablica 16. Prosječna udvojena udaljenost monomera satelitne DNA freeCL243x266L iz vrste *Tribolium freemani* i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum*. U zagradama su navedene standardne pogreške rezultata.

	freeCL243x266L	CASTfreeCL243x266L
freeCL243x266L	0,110 (±0,011)	0,288 (±0,031)
CASTfreeCL243x266L		0,108 (±0,010)

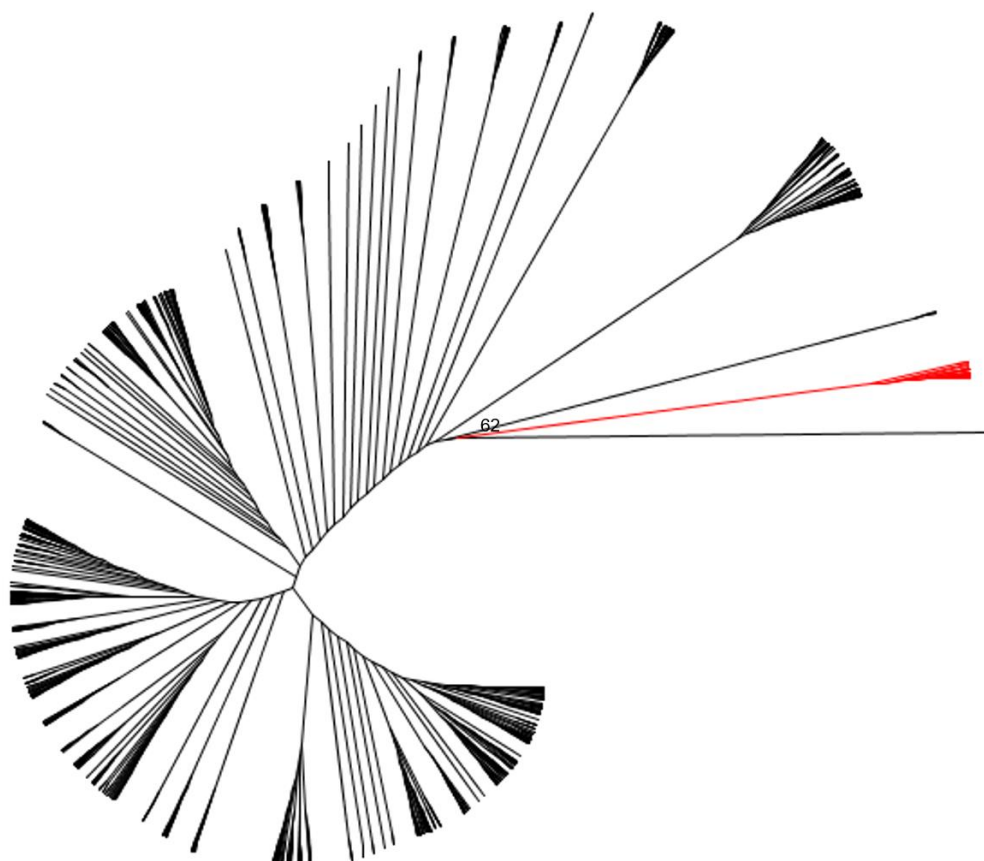


Slika 24. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL243x266L vrste *Tribolium freemani* (na stablu označeni crveno) i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum* (na stablu označeni crno) dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu uz dodatak gamma distribucije (T92+G). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

SatDNA freeCL510x326L najveću homologiju pokazala je sa satDNA Cast1 iz vrste *T. castaneum* (Tablica 12.). Satelitni monomeri freeCL510x326L na filogenetskom prikazu grupiraju se zajedno (Slika 25.). Prosječna udvojena udaljenost monomera unutar vrsta očekivano je niža, ali udaljenost unutar monomera iz vrste *T. castaneum* veoma je slična prosječnoj udaljenosti među vrstama što govori o velikoj varijabilnosti monomera iz vrste *T. castaneum* (Tablica 17.).

Tablica 17. Prosječna udvojena udaljenost monomera satelitne DNA freeCL510x326L iz vrste *Tribolium freemani* i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum*. U zagradama su navedene standardne pogreške rezultata.

	freeCL510x326L	CASTfreeCL510x326L
freeCL510x326L	0,112 (±0,010)	0,191 (±0,011)
CASTfreeCL510x326L		0,162 (±0,010)

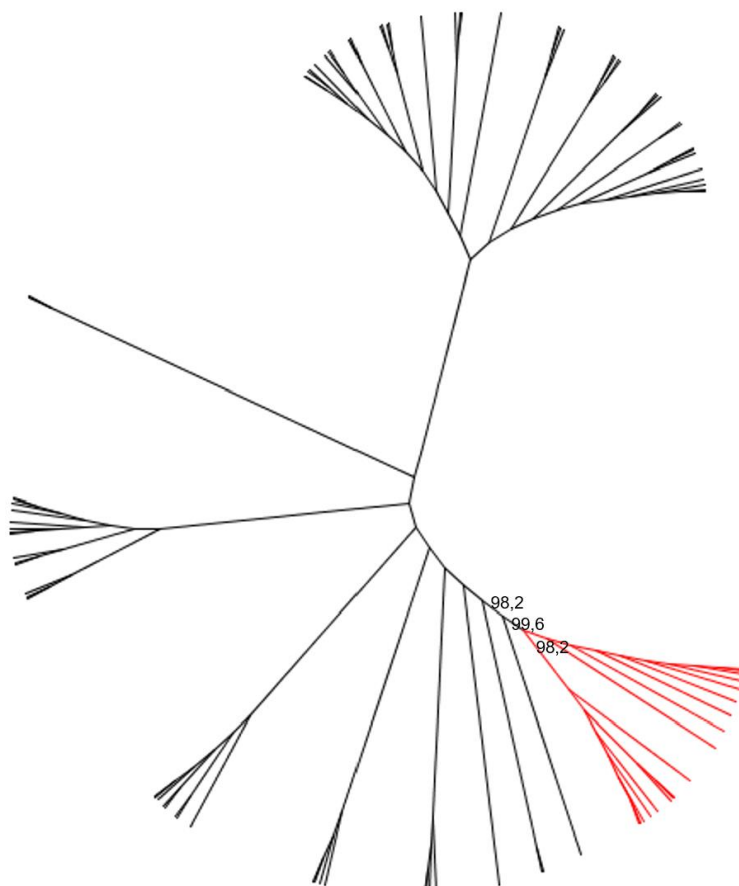


Slika 25. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL510x326L vrste *Tribolium freemani* (na stablu označeni crveno) i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum* (na stablu označeni crno) dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu uz dodatak gamma distribucije (T92+G). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

Najsrodniji monomerima satDNA freeCL1021x332L su monomeri satelita Cast9 iz genoma vrste *T. castaneum* (Tablica 12.). Na filogenetskom prikazu monomeri satDNA freeCL1021x332L izdvajaju se u zasebnu grupu (Slika 26.). Prosječna udvojena udaljenost među freeCL1021x332L monomerima je veoma niska, ali je varijabilnost homolognih monomera iz vrste *T. castaneum* veoma visoka (Tablica 18.) što potvrđuje veliku varijabilnost satelita Cast9 vrste *T. castaneum*.

Tablica 18. Prosječna udvojena udaljenost monomera satelitne DNA freeCL1021x332L iz vrste *Tribolium freemani* i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum*. U zagradama su navedene standardne pogreške rezultata.

	freeCL1021x332L	CASTfreeCL1021x332L
freeCL1021x332L	0,034 (±0,007)	0,319 (±0,024)
CASTfreeCL1021x332L		0,320 (±0,015)

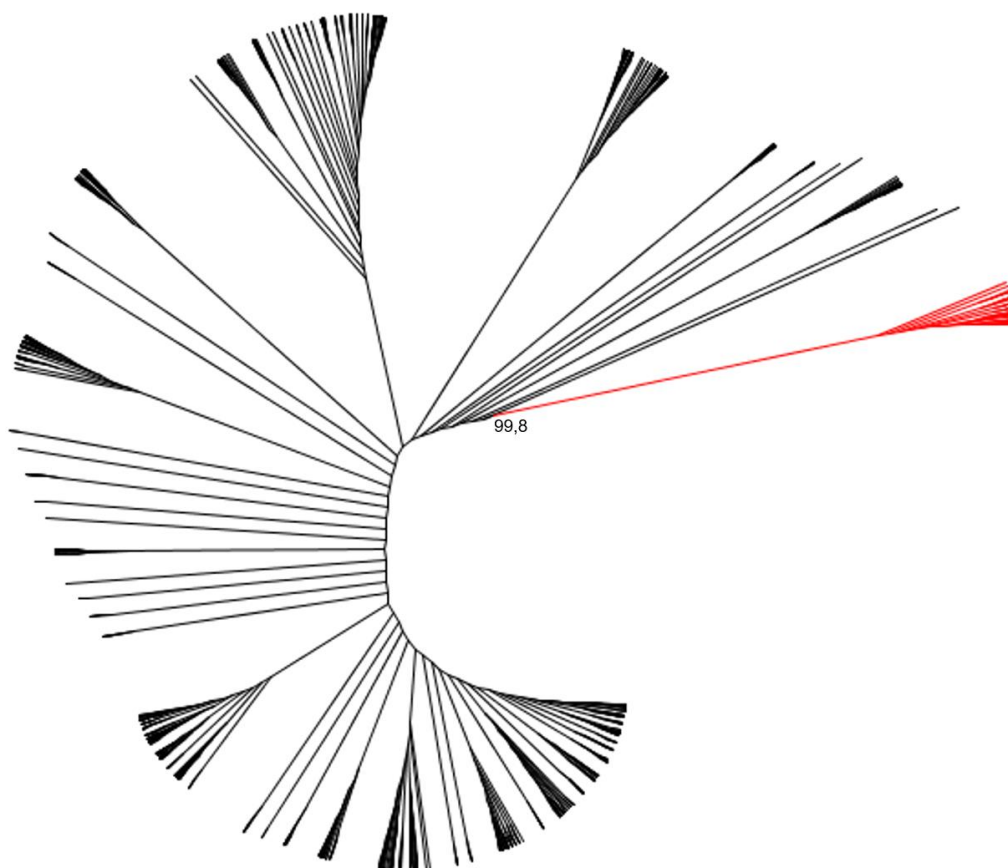


Slika 26. Filogenetski odnosi monomera satDNA freeCL1021x332L vrste *Tribolium freemani* (na stablu označeni crveno) i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum* (na stablu označeni crno) dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu uz dodatak gamma distribucije (T92+G). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

Uz analizu šest novootkrivenih, nisko zastupljenih satDNA vrste *T. freemani* i njima homolognih sekvenci iz genoma vrste *T. castaneum*, napravljena je analogna analiza i za glavni, visoko zastupljeni satelit TFREEsat. Usporedba kloniranih monomera TFREEsat i *in silico* ekstrahiranih homolognih monomera iz vrste *T. castaneum* pokazala je grupiranje monomera iste vrste na filogenetskom stablu (Slika 27.). Prosječna udvojena udaljenost monomera unutar vrsta je niska, dok je usporedba monomera između vrsta pokazala veliku prosječnu udvojenu udaljenost koja iznosi 0,306 (Tablica 19.).

Tablica 19. Prosječna udvojena udaljenost monomera satelitne DNA TFREEsat iz vrste *Tribolium freemani* i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum*. U zagradama su navedene standardne pogreške rezultata.

	TFREE	CASTTFREE
TFREE	0,090 (±0,010)	0,306 (±0,041)
CASTTFREE		0,129 (±0,015)



Slika 27. Filogenetski odnosi monomera satDNA TFREEsat vrste *Tribolium freemani* (na stablu označeni crveno) i homolognih monomera iz vrste *Tribolium castaneum* (na stablu označeni crno) dobiveni metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parametarskom modelu uz dodatak gamma distribucije (T92+G). Brojevi na granama predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 500 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

Sumarno, analiza satDNA vrste *T. freemani* pokazala je da svih sedam karakteriziranih satDNA imaju ortologne satDNA u vrsti *T. castaneum*. Uz postojanje homolognih sekvenca, za sve analizirane satDNA uočeno je da monomeri satDNA unutar vrsta pokazuju veću međusobnu sličnost, nego što je sličnost između vrsta.

4. RASPRAVA

Razumijevanje sastava i organizacije cjelokupnih eukariotskih genoma iznimno je važno kako bismo imali uvid u evoluciju genoma, ali i mehanizme nastanka određenih bolesti. Iako tehnike sekvenciranja DNA napreduju, pojedini dijelovi genoma i dalje su nedovoljno istraženi. Satelitne DNA spadaju u tu kategoriju. Njihova funkcija i evolucija i dalje nije u potpunosti jasna. Veliki pomaci u detekciji satDNA napravljeni su razvojem sekvenciranja NGS te novih računalnih programa. U ovom je radu po prvi puta genom vrste *T. freemani* sekvenciran metodom NGS. Takav pristup omogućio je detekciju i karakterizaciju šest novih satDNA. Dosad poznata glavna satDNA u genomu vrste *T. freemani* okarakterizirana je restriksijskom razgradnjom genomske DNA (Juan *i sur.*, 1993.). Restriksijska razgradnja genomske DNA omogućuje otkrivanje samo visokozastupljenih satDNA te su zbog toga preostale satDNA ostale neotkrivene. Naime, šest novootkrivenih satDNA čini manje od 0,2% genoma brašnara *T. freemani*. Kod srodne vrste *T. castaneum* glavni je satelit otkriven na isti način (Ugarković *i sur.*, 1996.) dok je pomoću sastavljenog genoma dobivenog pristupom „shotgun“ (Richards *i sur.*, 2008b.) otkriveno 9 novih satDNA porodica koje čine 4,3% genoma te se nalaze prvenstveno u eukromatinskim regijama DNA (Pavlek *i sur.*, 2015.). Osim kod kukaca roda *Tribolium*, okarakterizirane su i satDNA brojnih drugih eukariotskih vrsta kao što su skakavac *Pyrgomorpha conica* kod kojeg je pronađeno 76 novih porodica satDNA koje zajedno čine 9,4% genoma i među kojima su dvije porodice s dotad nezabilježenim kompleksnim strukturama (Ruiz-Ruano *i sur.*, 2018.). Nadalje, kod modelne mahovine *Physcomitrelapatens* pronađeno je pet satDNA porodica iako dotad nije imala karakteriziranih satelitnih ponavljanja (Kirov *i sur.*, 2018.).

Šest novootkrivenih satDNA vrste *T. freemani* duljinom monomera varira između 112 pb i 348 pb. AT sastav svih satDNA viši je od 59%. Ovi su rezultati u skladu s dosad karakteriziranim satelitima roda *Tribolium*. Duljina monomera satDNA karakteriziranih kod drugih vrsta roda *Tribolium* kreće se između 160 pb i 350 pb, a udio AT nukleotida je konstantno viša od 65% (Mravinac *i sur.*, 2004., 2005.; Mravinac i Plohl, 2010.; Pavlek *i sur.*, 2015.; Plohl *i sur.*, 1993.; Ugarković *i sur.*, 1996b., 1996a.) Duljine monomera 160-350 pb mogu se povezati s pakiranjem DNA u nukleosome. Naime, DNA molekula okružuje nukleosom $1,67\times$ pri čemu je duljina navoja 147 pb (Richmond i Davey, 2003.) te se pritom favoriziraju duljine satelitnih ponavljanja od ~170 pb ili ~340 pb koje se mogu pakirati u jedan ili dva nukleosoma. Duljine monomera satDNA freeCL101x112H i freeCL300x120H iznose 112 pb i 120 pb te su kraće od optimalne duljine navoja, ali ove brojke ne začuđuju s obzirom na velik raspon duljina satDNA eukariotskih organizama, a posebice životinja (Melters *i sur.*, 2013.). Primjerice, monomeri određenih porodica satDNA vrste oblića *Caenorhabditis elegans* veličinom se kreću od 50 do 58 pb (Subirana *i sur.*, 2015.), dok je kod goveda *Bos taurus taurus* otkriven satelit veličine 1402 pb (Taparowsky i Gerbi, 1982.). Visok udio AT nukleotida također je povezan s gušćim pakiranjem satDNA u nukleosome. Naime, sekvenca bogata AT

nukleotidima može povećati zakrivljenost DNA te time omogućiti lakše sklapanje nukleosoma (Barceló *i sur.*, 1998.; Meštrović *i sur.*, 2000.).

Većina satDNA karakterizirana u ovom radu pokazuju nisku nukleotidnu različitost ($P_i < 0,10$). Iako je niska nukleotidna različitost često pokazatelj evolucijski mladih sekvenci satDNA zbog brze evolucije satDNA, u ovome slučaju otkrivene su ortologne sekvence u genomu vrste *T. castaneum* koje ukazuju na postojanje satelitnih knjižnica. Teorija satelitnih knjižnica predviđa postojanje očuvanih porodica satDNA koje se mijenjaju umnažanjem u različitim vrstama pod pritiskom usklađene evolucije (Meštrović *i sur.*, 1998.). Vrste *T. castaneum* i *T. freemani* visoko su srodne te ne čudi homologija pronađena među monomerima satDNA. Silva i suradnici (2017.) pokazali su kako tri srodne vrste riba iz roda *Astyanax* među sobom dijele većinu satDNA iako su kod različitih vrsta iste satDNA pozicionirane na drugim kromosomima. Slična je pojava zabilježena i kod biljaka roda *Phaseolus* gdje su dva tipa satDNA pod nazivom *hipu* i *jumper* zabilježeni u osam različitih vrsta istoga roda (Ribeiro *i sur.*, 2017.). Osim toga, poznato je i da porodice satDNA mogu biti očuvane i kod vrsta koje nisu pripadnici istoga roda, već su evolucijski vrlo udaljene. Primjer tome je satelit dodeca koji je primarno detektiran u vrsti *Drosophila melanogaster*, no kasnije pronađen i u vrstama *Homo sapiens* i *Arabidopsis thaliana* (Abad *i sur.*, 1992.). Nadalje, postoji mogućnost pronalaska homolognih satDNA u drugim vrstama roda *Tribolium*. Iako su monomerne sekvence satelita iz vrsta *T. freemani* i *T. castaneum* ortologne, monomeri unutar vrsta pokazuju manju nukleotidnu različitost nego što je pokazuju međuvrsta monomeri zbog čega možemo reći da satDNA ovih vrsta prate načela usklađene evolucije. Proces homogenizacije, koji je jedan od ključnih načela usklađene evolucije, može objasniti i nisku nukleotidnu različitost među monomerima satDNA iz vrste *T. freemani*.

Iako je većina novootkrivenih satDNA vrste *T. freemani* pokazala homogenizaciju monomera, satelit freeCL234x170H pokazuje grupiranje monomera u tri potporodice među kojima su dvije međusobno sličnije. Stvaranje podskupina satDNA nije rijetkost. Smatra se da do njihovog formiranja dolazi zbog nejednake replikacije koja proizlazi iz okolišnih i genetičkih faktora. Oni mijenjaju strukturu heterokromatina i dovode do nestabilnosti i mijenjanja satelitnih ponavljanja (Pezer i Ugarković, 2008.). Najvažniji genetički faktori koji utječu na strukturu heterokromatina te tako i na stvaranje podskupina određenog satelita su replikacija mehanizmom "kotrljajućeg prstena" (Assum *i sur.*, 1993.) i nejednoliki crossing-over (Ma i Jackson, 2006.). Među zabilježenim satelitnim ponavljanjima grupiranim u potporodice nalazi se i satDNA TCAST2 vrste *T. castaneum* (Felicciello *i sur.*, 2014.). Autori rada smatraju kako su dvije potporodice satDNA TCAST2 evoluirale pomoću mehanizma „kotrljajućega kruga“. Predlažu da bi se ovaj mehanizam mogao koristiti kao mehanizam popravka mutiranih monomera satDNA pomoću homolognih segmenata. Podskupine satDNA uočene su i kod žaba vrsta *Rana graeca italica* i *Rana graeca graeca* (Picariello *i sur.*, 2002.). Iako su prethodno smatrane istom vrstom, karakterizacijom satDNA S1 otkrivene su porodice

S1a i S1b koje su specifične za određenu vrstu što je omogućilo opisivanje dvije nove vrste. Kod satDNA freeCL234x173H, otkrivene u genomu vrste *T. freemani* u ovom radu, zanimljiva je i činjenica da njezina potporodica A pokazuje homologiju s dva dosad opisana satelita vrste *T. castaneum* Cast2 i Cast4 dok potporodice B i C pokazuju homologiju samo sa satelitom Cast4 (Pavlek *i sur.*, 2015.). U načelu, satDNA freeCL234x173H veću sličnost pokazuje sa satelitom Cast4. SatDNA Cast4 unutar genoma vrste *T. castaneum* odlikuje se visokom nukleotidnom različitošću (21%) te tako ne začinuje pronalazak homologije s visoko varijabilnom satDNA freeCL234x173H. Ovi bi rezultati mogli svjedočiti bržoj evoluciji satelita unutar vrste *T. castaneum* pri čemu su iz jednog satelita fiksiranjem mutacija nastale satDNA Cast2 i Cast4.

Uzimajući u obzir nepostojanje asembliranog genoma vrste *T. freemani*, ne može se sa sigurnošću procijeniti pozicija novootkrivenih satDNA u genomu i na kromosomima. Rezultati eksperimenta FISH provedenog u ovom radu nisu dali nedvosmislenu informaciju o kromosomskoj lokalizaciji satelita. Budući da su karakterizirani sateliti niskozastupljeni u genomu, moguće je da postoje dodatne regije zastupljenosti pojedinih satelitnih ponavljanja koje se nalaze izvan mogućnosti detekcije metode FISH. Nadalje, pojedini signali intenzitetom su slabiji te postoji mogućnost hvatanja nespecifičnog pozadinskog signala. Iako je sekvenciranje NGS uvelike pomoglo u detekciji novih satDNA, i dalje postoje problemi u asembliranju i pozicioniranju otkrivenih repetitivnih regija. Tako se i kod organizama koji imaju sekvenciran genom satDNA otkrivaju i dalje. Primjer nepotpunog genoma je i ljudski genom kojem, iako je sekvenciran, nedostaju velike nukleotidne regije u centromernim regijama (Miga, 2015.). Razvoj metoda sekvenciranja dugih očitavanja omogućuje popunjavanje nedostataka u prethodno sekvenciranim genomima. Primjer tome je istraživanje Jain i suradnika (2018.) koji su pomoću sekvenciranja nanoporom (MinION sequencing device, Mk1B, Oxford Nanopore Technologies) asemblirali centromeru ljudskog kromosoma Y prvenstveno sastavljenu od satelitnog ponavljanja DYZ3. Iako je ovo istraživanje bilo olakšano postojanjem poznate strukture HOR-a satDNA DYZ3 te saznanjima izvedenim iz fizičkog mapiranja kromosoma Y, nesumnjivo je da će omogućiti i potaknuti daljnje studije koje će voditi kompletiranju ljudskog genoma što će omogućiti njegovo bolje razumijevanje. Za očekivati je da će nove tehnologije sekvenciranja, kao što je spomenuto sekvenciranje nanoporom ili sekvenciranje na platformama sustava *PacBio*, generirajući očitavanja ultradugih nukleotidnih poteza pridonijeti kompletiranju genoma i ostalih organizama. Međutim, genomi vrsta koje karakterizira visok udio ponavljajućih sekvenca, kao što je to slučaj kukca *T. freemani*, zasigurno će još neko duže vrijeme predstavljati veliki izazov za pravilno slaganje genomskih sekvenci.

5. ZAKLJUČAK

Identifikacija i karakterizacija satelitnih DNA kukca brašnara *T. freemani* provedena u ovom radu daje sljedeće zaključke:

1. Bioinformatička analiza kratkih odsječaka DNA genoma vrste *T. freemani* dobivenih sekvenciranjem NGS identificirala je šest novih satelitnih DNA dokazujući da u genomu ove vrste, osim glavne satelitne DNA, postoji i niz manje zastupljenih satelitnih porodica.
2. SatDNA freeCL101x112H, freeCL234x173H, freeCL300x120H, freeCL243x266L, freeCL510x326L i freeCL1021x332L identificirane *in silico* također su karakterizirane eksperimentalnim pristupom. Ponavljajuća organizacija ovih sekvenci dokazana je metodom hibridizacije Southern blot, a kromosomska lokalizacija pokazana je fluorescencijskom hibridizacijom *in situ*.
3. U genomu sestrinske vrste *T. castaneum* otkrivene su sekvence ortologne novootkrivenim satDNA vrste *T. freemani*. Na temelju njihove međusobne usporedbe zaključeno je da su satelitni monomeri unutar dviju vrsta evoluirali slijedeći principe usklađene evolucije.

6. LITERATURA

- Abad JP, Carmena M, Baars S, Saunders RD, Glover DM, Ludeña P, i sur. (1992). Dodeca satellite: a conserved G+C-rich satellite from the centromeric heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4663–7.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Alvarez-Fuster A, Juan C, Petitpierre E (1991). Genome size in *Tribolium* flour-beetles: inter- and intraspecific variation. *Genet Res* **58**: 1–5.
- Assum G, Fink T, Steinbeisser T, Fisel KJ (1993). Analysis of human extrachromosomal DNA elements originating from different beta-satellite subfamilies. *Hum Genet* **91**: 489–95.
- Barceló F, Gutiérrez F, Barjau I, Portugal J (1998). A theoretical perusal of the satellite DNA curvature in Tenebrionid beetles. *J Biomol Struct Dyn* **16**: 41–50.
- Benson G (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **27**: 573–580.
- Dover GA (1986). Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet* **2**: 159–165.
- Feliciello I, Akrap I, Brajković J, Zlatar I, Ugarković Đ (2014). Satellite DNA as a driver of population divergence in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Biol Evol* **7**: 228–39.
- Ferreira D, Meles S, Escudeiro A, Mendes-da-Silva A, Adegas F, Chaves R (2015). Satellite non-coding RNAs: the emerging players in cells, cellular pathways and cancer. *Chromosom Res* **23**: 479–493.
- Fry K, Salser W (1977). Nucleotide sequences of HS-alpha satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell* **12**: 1069–84.
- Garrido-Ramos MA (2017). Satellite DNA: An evolving topic. *Genes (Basel)* **8**
- Hall T (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**: 95–98.
- Henikoff S, Ahmad K, Malik HS (2001). The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* **293**: 1098–1102.
- Hinton HE (1948). A synopsis of the genus *Tribolium* MacLeay, with some remarks on the evolution of its species-groups (Coleoptera, Tenebrionidae). Department of Entomology, British Museum (Natural History). Species-groups of *Tribolium* Prototype of *Tribolium* Relation. *Evolution (NY)* .
- Jain M, Olsen HE, Turner DJ, Stoddart D, Bulazel K V, Paten B, i sur. (2018). Linear assembly of a human centromere on the Y chromosome. *Nat Biotechnol* **36**: 321–323.
- Jindra M (2019). Where did the pupa come from? The timing of juvenile hormone signalling supports homology between stages of hemimetabolous and holometabolous insects. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **374**: 20190064.

- Juan C, Vazquez P, Rubio JM, Petitpierre E, Hewitt GM (1993). Presence of highly repetitive DNA sequences in tribolium flour-beetles. *Heredity (Edinb)* **70**: 1–8.
- Kirov I, Gilyok M, Knyazev A, Fesenko I (2018). Pilot satellitome analysis of the model plant, *Physcomitrelapatens*, revealed a transcribed and high-copy IGS related tandem repeat. *Comp Cytogenet* **12**: 493–513.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, i sur. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.
- Lower SS, McGurk MP, Clark AG, Barbash DA (2018). Satellite DNA evolution: old ideas, new approaches. *Curr Opin Genet Dev* **49**: 70–78.
- Ma J, Jackson SA (2006). Retrotransposon accumulation and satellite amplification mediated by segmental duplication facilitate centromere expansion in rice. *Genome Res* **16**: 251–9.
- Melters DP, Bradnam KR, Young HA, Telis N, May MR, Ruby J, i sur. (2013). Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. *Genome Biol* **14**: R10.
- Meštrović N, Castagnone-Sereno P, Plohl M (2006). Interplay of selective pressure and stochastic events directs evolution of the MEL172 satellite DNA library in root-knot nematodes. *Mol Biol Evol* **23**: 2316–2325.
- Meštrovic N, Mravinac B, Juan C, Ugarkovic Đ, Plohl M (2000). Comparative study of satellite sequences and phylogeny of five species from the genus *Palorus* (Insecta, Coleoptera). *Genome* **43**: 776–785.
- Meštrović N, Plohl M, Mravinac B, Ugarković Đ (1998). Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus* : experimental evidence for the library hypothesis. *Mol Biol Evol* **15**: 1062–1068.
- Miga KH (2015). Completing the human genome: the progress and challenge of satellite DNA assembly. *Chromosom Res* **23**: 421–426.
- Mravinac B, Plohl M (2010). Parallelism in evolution of highly repetitive DNAs in sibling species. *Mol Biol Evol* **27**: 1857–1867.
- Mravinac B, Plohl M, Mestrovic N, Ugarković D (2002). Sequence of PRAT satellite DNA “frozen” in some Coleopteran species. *J Mol Evol* **54**: 774–783.
- Mravinac B, Plohl M, Ugarković Đ (2004). Conserved patterns in the evolution of *Tribolium* satellite DNAs. *Gene* **332**: 169–177.
- Mravinac B, Ugarković Đ, Franjević D, Plohl M (2005). Long inversely oriented subunits form a complex monomer of *Tribolium brevicornis* satellite DNA. *J Mol Evol* **60**: 513–525.
- Nakakita H, Imura O, Winks RG (1981). Hybridization between *Tribolium freemani* Hinton and *Tribolium castaneum* Herbst, and some preliminary studies on the biology of *Tribolium freemani* (Coleoptera : Tenebrionidae). *Appl Entomol Zool* **16**: 209–215.
- Novák P, Neumann P, Macas J (2010). Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics* **11**: 378.
- Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J (2013). RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from

- next-generation sequence reads. *Bioinformatics* **29**: 792–793.
- Novák P, Robledillo LÁ, Koblížková A, Vrbová I, Neumann P, Macas J (2017). TAREAN: A computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. *Nucleic Acids Res* **45**: .
- Palomeque T, Lorite P (2008). Satellite DNA in insects: a review. *Heredity (Edinb)* **100**: 564–573.
- Pavlek M, Gelfand Y, Plohl M, Meštrović N (2015). Genome-wide analysis of tandem repeats in *Tribolium castaneum* genome reveals abundant and highly dynamic tandem repeat families with satellite DNA features in euchromatic chromosomal arms. *DNA Res* **22**: 387–401.
- Pezzer Ž, Ugarković Đ (2008). Role of non-coding RNA and heterochromatin in aneuploidy and cancer. *Semin Cancer Biol* **18**: 123–130.
- Picariello O, Feliciello I, Bellinello R, Chinali G (2002). S1 satellite DNA as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana graeca graeca* and *Rana graeca italica* are different species. *Genome* **45**: 63–70.
- Plohl M, Lucijanić-Justić V, Ugarković D, Petitpierre E, Juan C (1993). Satellite DNA and heterochromatin of the flour beetle *Tribolium confusum*. *Genome* **36**: 467–475.
- Plohl M, Meštrović N, Mravinac B (2012). Satellite DNA evolution. *Genome Dyn* **7**: 126–152.
- Ribeiro T, Santos KGB dos, Richard MMS, Sévignac M, Thareau V, Geffroy V, i sur. (2017). Evolutionary dynamics of satellite DNA repeats from *Phaseolus* beans. *Protoplasma* **254**: 791–801.
- Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, Brown S, Denell R, Beeman RW, i sur. (2008). The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* **452**: 949–955.
- Richmond TJ, Davey CA (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**: 145–150.
- Robles F, la Herrán R de, Ludwig A, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M, Garrido-Ramos MA (2004). Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene* **338**: 133–142.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, i sur. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol Biol Evol* **34**: 3299–3302.
- Ruiz-Ruano FJ, Castillo-Martínez J, Cabrero J, Gómez R, Camacho JPM, López-León MD (2018). High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. *Chromosoma* **127**: 323–340.
- Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (2016). High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci Rep* **6**: 28333.
- Ruiz-Ruano FJ, Navarro-Domínguez B, Camacho JPM, Garrido-Ramos MA (2019). Characterization of the satellitome in lower vascular plants: The case of the endangered fern *Vandenboschia speciosa*. *Ann Bot* **123**: 587–599.
- Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard HF (2001). Genomic and

- genetic definition of a functional human centromere. *Science* **294**: 109–115.
- Serrano-Freitas ÉA, Silva DMZA, Ruiz-Ruano FJ, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Oliveira C, i sur. (2019). Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. *Mol Genet Genomics* doi:10.1007/s00438-019-01615-2.
- Silva DMZ de A, Utsunomia R, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Porto-Foresti F, Hashimoto DT, i sur. (2017). High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. *Sci Rep* **7**: 12726.
- Smith A, Hubley R, Green P (2015). RepeatMasker Open-4.0. at <<http://repeatmasker.org>>.
- Smith G (1976). Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* **191**: 528–535.
- Subirana JA, Albà MM, Messeguer X (2015). High evolutionary turnover of satellite families in *Caenorhabditis*. *BMC Evol Biol* **15**: 218.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725–9.
- Taparowsky EJ, Gerbi SA (1982). Structure of 1.71 lb gm/cm³ bovine satellite DNA: evolutionary relationship to satellite I. *Nucleic Acids Res* **10**: 5503–15.
- Treangen TJ, Salzberg SL (2011). Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat Rev Genet* **13**: 36–46.
- Ugarković D (2005). Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO Rep* **6**: 1035–1039.
- Ugarković D, Durajlija S, Plohl M (1996a). Evolution of *Tribolium madens* (Insecta, Coleoptera) satellite DNA through DNA inversion and insertion. *J Mol Evol* **42**: 350–358.
- Ugarković D, Podnar M, Plohl M (1996b). Satellite DNA of the red flour beetle *Tribolium castaneum*--comparative study of satellites from the genus *Tribolium*. *Mol Biol Evol* **13**: 1059–1066.
- Utsunomia R, Silva DMZ de A, Ruiz-Ruano FJ, Goes CAG, Melo S, Ramos LP, i sur. (2019). Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. *Sci Rep* **9**: 1–10.
- Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SIS, i sur. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**: 672–676.
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SIS, Martienssen RA (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**: 1833–1837.

http://metazoa.ensembl.org/Tribolium_castaneum/Info/Index

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy/>

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

7. PRILOZI

Prilog 1.

Tablica P1. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA TREEsat vrste *Tribolium freemani*.

Prilog 2.

Tablica P2. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL101x112H vrste *Tribolium freemani*.

Prilog 3.

Tablica P3. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL234x173H vrste *Tribolium freemani*.

Prilog 4.

Tablica P4. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL300x120H vrste *Tribolium freemani*.

Prilog 5.

Tablica P5. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL243x266L vrste *Tribolium freemani*.

Prilog 6.

Tablica P6. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL510x326L vrste *Tribolium freemani*.

Prilog 7.

Tablica P7. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL1021x332L vrste *Tribolium freemani*.

Prilog 8.

Slika P8. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA TFREESat vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu i mjesta rezanja restriktivskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu.

Prilog 9.

Slika P9. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL101x112H vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu i mjesta rezanja restriktivskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu.

Prilog 10.

Slika P10. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL234x173H vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu i mjesta rezanja restrikcijskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu.

Prilog 11.

Slika P11. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL300x120H vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu i mjesta rezanja restrikcijskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu.

Prilog 12.

Slika P12. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL243x266L vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu i mjesta rezanja restrikcijskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu.

Prilog 13.

Slika P13. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL510x326L vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu i mjesta rezanja restrikcijskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu.

Prilog 14.

Slika P14. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL1021x332L vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu i mjesta rezanja restrikcijskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu.

Prilog 1.

Tablica P1. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA TREEsat vrste *Tribolium freemani*.

naziv kloniranog odsječaka	duljina kloniranog odsječaka (pb)	daziv monomera ekstrahiranih iz kloniranog odsječaka	duljina ekstrahiranih monomera (pb)
TFREEpcr1	539	TFREEpcr1a	166
		TFREEpcr1b	166
TFREEpcr2	320	TFREEpcr2	169
TFREEpcr3	320	TFREEpcr3	169
TFREEpcr5	316	TFREEpcr5	166
TFREEpcr6	486	TFREEpcr6a	167
		TFREEpcr6b	167
TFREEpcr7	484	TFREEpcr7a	167
		TFREEpcr7b	166
TFREEpcr8	484	TFREEpcr8a	167
		TFREEpcr8b	166
TFREEpcr9	317	TFREEpcr9	166
TFREEpcr10	325	TFREEpcr10	174
TFREEpcr11	485	TFREEpcr11a	166
		TFREEpcr11b	168
TFREEpcr12	483	TFREEpcr12a	165
		TFREEpcr12b	167
TFREEpcr14	483	TFREEpcr14a	166
		TFREEpcr14b	166
TFREEpcr17	319	TFREEpcr17	166
TFREEpcr18	320	TFREEpcr18	169
TFREEpcr19	316	TFREEpcr19	165
TFREEpcr20	317	TFREEpcr20	166
TFREEpcr21	652	TFREEpcr21a	169
		TFREEpcr21b	166
		TFREEpcr21c	166
TFREEpcr22	485	TFREEpcr22a	166
		TFREEpcr22b	168
TFREEpcr26	483	TFREEpcr26a	166
		TFREEpcr26b	166
TFREEpcr27	485	TFREEpcr27a	167
		TFREEpcr27b	167
TFREEpcr28	317	TFREEpcr28a	166
TFREEpcr29	373	TFREEpcr29a	166
TFREEpcr30	319	TFREEpcr30	168
TFREEpcr31	318	TFREEpcr31	166
TFREEpcr32	320	TFREEpcr32	169
TFREEpcr33	320	TFREEpcr33	169
TFREEpcr35	317	TFREEpcr35	166

Prilog 2.

Tablica P2. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL101x112H vrste *Tribolium freemani*.

naziv kloniranog odsječka	duljina kloniranog odsječka (pb)	daziv monomera ekstrahiranih iz kloniranog odsječka	duljina ekstrahiranih monomera (pb)
free101x112Hcl1	206	free101x112Hcl1	112
free101x112Hcl2	206	free101x112Hcl2	112
free101x112Hcl3	318	free101x112Hcl3a	112
		free101x112Hcl3b	112
free101x112Hcl4	206	free101x112Hcl4	112
free101x112Hcl5	206	free101x112Hcl5	112
free101x112Hcl6	206	free101x112Hcl6	112
free101x112Hcl8	206	free101x112Hcl8	112
free101x112Hcl9	207	free101x112Hcl9	112
free101x112Hcl10	317	free101x112Hcl10a	111
		free101x112Hcl10b	112
free101x112Hcl12	202	free101x112Hcl12	112
free101x112Hcl14	207	free101x112Hcl14	112
free101x112Hcl15	318	free101x112Hcl15a	112
		free101x112Hcl15b	112
free101x112Hcl17	202	free101x112Hcl17	112
free101x112Hcl18	206	free101x112Hcl18	112
free101x112Hcl21	430	free101x112Hcl21a	112
		free101x112Hcl21b	112
		free101x112Hcl21c	112
free101x112Hcl23	431	free101x112Hcl23a	112
		free101x112Hcl23b	112
		free101x112Hcl23c	112
free101x112Hcl24	403	free101x112Hcl24a	112
		free101x112Hcl24b	112
		free101x112Hcl24c	86
free101x112Hcl26	434	free101x112Hcl26a	112
		free101x112Hcl26b	112
		free101x112Hcl26c	120
free101x112Hcl35	430	free101x112Hcl35a	112
		free101x112Hcl35b	112
		free101x112Hcl35c	112

Prilog 3.

Tablica P3. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL234x173H vrste *Tribolium freemani*.

naziv kloniranog odsječaka	duljina kloniranog odsječaka (pb)	daziv monomera ekstrahiranih iz kloniranog odsječaka	duljina ekstrahiranih monomera (pb)
free234x173Hcl1	286	free234x173Hcl1	173
free234x173Hcl2	286	free234x173Hcl2	173
free234x173Hcl3	286	free234x173Hcl3	173
free234x173Hcl5	285	free234x173Hcl5	173
free234x173Hcl10	285	free234x173Hcl10	173
free234x173Hcl12	460	free234x173Hcl12a	174
		free234x173Hcl12b	173
free234x173Hcl13	460	free234x173Hcl13a	174
		free234x173Hcl13b	173
free234x173Hcl14	286	free234x173Hcl14	173
free234x173Hcl15	460	free234x173Hcl15a	174
		free234x173Hcl15b	173
free234x173Hcl16	460	free234x173Hcl16a	174
		free234x173Hcl16b	173
free234x173Hcl17	460	free234x173Hcl17a	174
		free234x173Hcl17b	173
free234x173Hcl18	466	free234x173Hcl18a	173
		free234x173Hcl18b	173
free234x173Hcl19	459	free234x173Hcl19a	173
		free234x173Hcl19b	173
free234x173Hcl20	461	free234x173Hcl20a	173
		free234x173Hcl20b	173
free234x173Hcl21	447	free234x173Hcl21a	173
		free234x173Hcl21b	173
free234x173Hcl22	460	free234x173Hcl22a	174
		free234x173Hcl22b	173
free234x173Hcl23	460	free234x173Hcl23a	174
		free234x173Hcl23b	173
free234x173Hcl24	632	free234x173Hcl24a	173
		free234x173Hcl24b	173
		free234x173Hcl24c	172
free234x173Hcl25	631	free234x173Hcl25a	173
		free234x173Hcl25b	173
		free234x173Hcl25c	173
free234x173Hcl26	633	free234x173Hcl26a	174
		free234x173Hcl26b	173
		free234x173Hcl26c	171
free234x173Hcl27	635	free234x173Hcl27a	174
		free234x173Hcl27b	174
		free234x173Hcl27c	173
free234x173Hcl28	635	free234x173Hcl28a	174
		free234x173Hcl28b	173
		free234x173Hcl28c	173
free234x173Hcl30	610	free234x173Hcl30a	174
		free234x173Hcl30b	173
		free234x173Hcl30c	170

free234x173Hcl31	581	free234x173Hcl31a	170
		free234x173Hcl31b	173
		free234x173Hcl31c	173
free234x173Hcl32	626	free234x173Hcl32a	174
		free234x173Hcl32b	173
		free234x173Hcl32c	172
free234x173Hcl33	628	free234x173Hcl33a	174
		free234x173Hcl33b	173
		free234x173Hcl33c	171
free234x173Hcl34	633	free234x173Hcl34a	174
		free234x173Hcl34b	173
		free234x173Hcl34c	173
free234x173Hcl35	613	free234x173Hcl35a	173
		free234x173Hcl35b	174
		free234x173Hcl35c	173

Prilog 4.

Tablica P4. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL300x120H vrste *Tribolium freemani*.

naziv kloniranog odsječaka	duljina kloniranog odsječaka (pb)	daziv monomera ekstrahiranih iz kloniranog odsječaka	duljina ekstrahiranih monomera (pb)
free300x120Hcl1	225	free300x120Hcl1	120
free300x120Hcl4	224	free300x120Hcl4	120
free300x120Hcl6	225	free300x120Hcl6	120
free300x120Hcl7	223	free300x120Hcl7	120
free300x120Hcl8	225	free300x120Hcl8	120
free300x120Hcl11	222	free300x120Hcl11	120
free300x120Hcl13	280	free300x120Hcl13a	120
		free300x120Hcl13b	120
free300x120Hcl14	307	free300x120Hcl14a	120
		free300x120Hcl14b	120
free300x120Hcl16	307	free300x120Hcl16a	120
		free300x120Hcl16b	120
free300x120Hcl17	307	free300x120Hcl17a	120
		free300x120Hcl17b	120
free300x120Hcl18	345	free300x120Hcl18a	120
		free300x120Hcl18b	120
free300x120Hcl20	345	free300x120Hcl20a	120
		free300x120Hcl20b	120
free300x120Hcl23	345	free300x120Hcl23a	120
		free300x120Hcl23b	120
free300x120Hcl24	453	free300x120Hcl24a	120
		free300x120Hcl24b	120
		free300x120Hcl24c	120
free300x120Hcl25	454	free300x120Hcl25a	120
		free300x120Hcl25b	120
		free300x120Hcl25c	120
free300x120Hcl26	465	free300x120Hcl26a	120
		free300x120Hcl26b	120
		free300x120Hcl26c	120
free300x120Hcl27	465	free300x120Hcl27a	120
		free300x120Hcl27b	120
		free300x120Hcl27c	120
free300x120Hcl28	438	free300x120Hcl28a	120
		free300x120Hcl28b	120
		free300x120Hcl28c	120
free300x120Hcl29	456	free300x120Hcl29a	120
		free300x120Hcl29b	120
		free300x120Hcl29c	120
free300x120Hcl30	465	free300x120Hcl30a	120
		free300x120Hcl30b	120
		free300x120Hcl30c	120
free300x120Hcl32	465	free300x120Hcl32a	120
		free300x120Hcl32b	120
		free300x120Hcl32c	120

free300x120Hcl33	465	free300x120Hcl33a	120
		free300x120Hcl33b	120
		free300x120Hcl33c	120
free300x120Hcl34	465	free300x120Hcl34a	120
		free300x120Hcl34b	120
		free300x120Hcl34c	120

Prilog 5.

Tablica P5. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL243x266L vrste *Tribolium freemani*.

naziv kloniranog odsječka	duljina kloniranog odsječka (pb)	daziv monomera ekstrahiranih iz kloniranog odsječka	duljina ekstrahiranih monomera (pb)
free243x266Lcl1	422	free243x266Lcl1	266
free243x266Lcl2	423	free243x266Lcl2	266
free243x266Lcl3	424	free243x266Lcl3	267
free243x266Lcl4	424	free243x266Lcl4	266
free243x266Lcl5	422	free243x266Lcl5	265
free243x266Lcl6	422	free243x266Lcl6	266
free243x266Lcl7	421	free243x266Lcl7	265
free243x266Lcl8	424	free243x266Lcl8	266
free243x266Lcl9	422	free243x266Lcl9	266
free243x266Lcl10	423	free243x266Lcl10	266
free243x266Lcl11	423	free243x266Lcl11	266
free243x266Lcl12	423	free243x266Lcl12	266
free243x266Lcl13	423	free243x266Lcl13	266
free243x266Lcl14	423	free243x266Lcl14	266
free243x266Lcl15	422	free243x266Lcl15	265
free243x266Lcl16	687	free243x266Lcl16a	265
		free243x266Lcl16b	266
free243x266Lcl17	690	free243x266Lcl17a	266
		free243x266Lcl17b	266
free243x266Lcl18	691	free243x266Lcl18a	266
		free243x266Lcl18b	268
free243x266Lcl21	687	free243x266Lcl21a	266
		free243x266Lcl21b	265
free243x266Lcl23	638	free243x266Lcl23a	265
		free243x266Lcl23b	266
free243x266Lcl27	671	free243x266Lcl27a	265
		free243x266Lcl27b	270
free243x266Lcl28	675	free243x266Lcl28a	266
		free243x266Lcl28b	266
free243x266Lcl31	423	free243x266Lcl31	266
free243x266Lcl32	687	free243x266Lcl32a	267
		free243x266Lcl32b	265
free243x266Lcl34	689	free243x266Lcl34a	266
		free243x266Lcl34b	266

Prilog 6.

Tablica P6. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL510x326L vrste *Tribolium freemani*.

naziv kloniranog odsječka	duljina kloniranog odsječka (pb)	daziv monomera ekstrahiranih iz kloniranog odsječka	duljina ekstrahiranih monomera (pb)
free510x326Lcl1	541	free510x326Lcl1	338
free510x326Lcl2	552	free510x326Lcl2	350
free510x326Lcl3	547	free510x326Lcl3	343
free510x326Lcl5	552	free510x326Lcl5	350
free510x326Lcl6	552	free510x326Lcl6	348
free510x326Lcl7	552	free510x326Lcl7	350
free510x326Lcl8	552	free510x326Lcl8	348
free510x326Lcl9	551	free510x326Lcl9	348
free510x326Lcl10	540	free510x326Lcl10	337
free510x326Lcl12	553	free510x326Lcl12	349
free510x326Lcl13	552	free510x326Lcl13	348
free510x326Lcl15	552	free510x326Lcl15	348
free510x326Lcl16	551	free510x326Lcl16	348
free510x326Lcl17	548	free510x326Lcl17	346
free510x326Lcl18	552	free510x326Lcl18	348
free510x326Lcl19	553	free510x326Lcl19	350
free510x326Lcl21	550	free510x326Lcl21	348
free510x326Lcl22	546	free510x326Lcl22	345
free510x326Lcl23	550	free510x326Lcl23	348
free510x326Lcl26	864	free510x326Lcl26a	316
		free510x326Lcl26b	343
free510x326Lcl32	896	free510x326Lcl32a	346
		free510x326Lcl32b	348
free510x326Lcl33	549	free510x326Lcl33	346

Prilog 7.

Tablica P7. Prikaz duljina kloniranih odsječaka i duljina ekstrahiranih monomera satDNA freeCL1021x332L vrste *Tribolium freemani*.

naziv kloniranog odsječaka	duljina kloniranog odsječaka (pb)	daziv monomera ekstrahiranih iz kloniranog odsječaka	duljina ekstrahiranih monomera (pb)
free1021x332Lcl1	626	free1021x332Lcl1	337
free1021x332Lcl2	624	free1021x332Lcl2	335
free1021x332Lcl4	560	free1021x332Lcl4	284
free1021x332Lcl5	607	free1021x332Lcl5	318
free1021x332Lcl6	624	free1021x332Lcl6	335
free1021x332Lcl7	616	free1021x332Lcl7	317
free1021x332Lcl10	624	free1021x332Lcl10	336
free1021x332Lcl11	628	free1021x332Lcl11	332
free1021x332Lcl12	624	free1021x332Lcl12	335
free1021x332Lcl13	624	free1021x332Lcl13	335
free1021x332Lcl14	604	free1021x332Lcl14	332
free1021x332Lcl18	605	free1021x332Lcl18	332
free1021x332Lcl19	624	free1021x332Lcl19	335
free1021x332Lcl21	624	free1021x332Lcl21	335
free1021x332Lcl23	613	free1021x332Lcl23	337
free1021x332Lcl28	624	free1021x332Lcl28	332
free1021x332Lcl34	628	free1021x332Lcl34	332
free1021x332Lcl35	614	free1021x332Lcl35	338

Prilog 8.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
									
	Clal									
Consensus	GAGAAAATAAAATAAAATCAAAAATTTATAAAAAGTAAAAATAGTTCATAATTCAAAAACTATTAGGAATACGCGATTTTTTGAACCTCAATCGATTG									
TFREEp22bT.....									
TFREEp5TT.T.CT.T.....TTCC.....A.....CA..GG.....									
TFREEp14bTT.....T.A.....C.....T.....									
TFREEp8aT.....A.....C.....G.....									
TFREEp8bT.....T.A.....T.....C.....G.....									
TFREEp14aT.....CT.....									
TFREEp9A.....T.....T.....A.....C.....T.....									
TFREEp21bA.....T.....T.....A.....G.....									
TFREEp3T.....T.....T.....A.....G.....C.....A.....A.....									
TFREEp35T.....A.....									
TFREEp27aG.....C.....A.....T.....A.....									
TFREEp27bG.....C.....A.....T.....A.....									
TFREEp6bC.....A.....C.....A.....G.....T.....									
TFREEp26aTA.....									
TFREEp28aA.....									
TFREEp12aA.....C.....A.....T.....A.....G.....									
TFREEp6aC.....C.....A.....									
TFREEp26bT.....T.....T.....G.....A.....									
TFREEp20T.....A.....									
TFREEp7bA.....									
TFREEp21cA.....C.....T.....A.....									
TFREEp17T.....T.....A.....									
TFREEp22aT.....T.....T.....A.....									
TFREEp31T.....T.....A.....									
TFREEp30T.....T.....A.....									
TFREEp11aT.....T.....A.....									
TFREEp18A.....T.....T.....A.....									
TFREEp2G.....T.....									
TFREEp32T.....									
TFREEp1bC.....A.....									
TFREEp19G.....A.....									
TFREEp29aT.....T.....A.....									
TFREEp1a	C.....T.....T.....T.....C.....AA.....									
TFREEp21aT.....G.....									
TFREEp7aT.....A.....									
TFREEp11bT.....A.....A.....									
TFREEp10C.....AA.....									
TFREEp12bA.....									
TFREEp33									

	110	120	130	140	150	160	170
						
	MvaI						
	MboI						
Consensus	CCTGGATCATTTCATCGGCAAGGTCCAAACAGTCCACTGTTTCGAATATTCGAATAGTATAGCCGTAAGTG						
TFREEp22bT.....T.....						
TFREEp5AA.....G.....G.....G.CA..A..AT..C.....TC.....						
TFREEp14bAA.....G.....G.....T.....G..TC.....						
TFREEp8aAA.....C.....G.....G.....T.....T.....						
TFREEp8bAA..A.....						
TFREEp14aT.....C.....T.G.....G..GG.....A.....						
TFREEp9G.....G.....T.....						
TFREEp21bA.....G.....G.....C.....						
TFREEp3T.A.....T.....						
TFREEp35C.....G.....G.....T.....C.....						
TFREEp27aT.....T.....A.....G.....						
TFREEp27bT.....T.....A.....G.A.....						
TFREEp6bC.....G.....GG.....G.....T.....T.....						
TFREEp26aC.....G.....G.....A.....						
TFREEp28aG.....G.....T.....G.....						
TFREEp12aG.A..G.....						
TFREEp6aG.A..G.....						
TFREEp26bA.....A.....GAA.T.....C.....-A..C.....						
TFREEp20T.....A.....A.....GAA.T.....C.....						
TFREEp7bA.....A.....GA.T.....						
TFREEp21cA.....A.....GA.T.....						
TFREEp17A.....A.....GA.T.....						
TFREEp22aA.....GA.T.....						
TFREEp31A.....GA.T.....						
TFREEp30A.....GA.....TA.....						
TFREEp11aA.....GA.....						
TFREEp18C.....T.....T.....						
TFREEp2C.....T.....T.....						
TFREEp32C.....T.....T.....						
TFREEp1bT.....C.....G.....						
TFREEp19						
TFREEp29aT.....T.....						
TFREEp1aA.....T.....T.....C.....						
TFREEp21aA.....T.....T.....C.....C.....						
TFREEp7aC.....T.....C.....T.....C.....						
TFREEp11bC.....C.....T.....C.....						
TFREEp10A.....T.....T.....						
TFREEp12bA.....T.....C.....T.....						
TFREEp33A.....A.....T.....T.....						

Slika P8. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA TFREEsat vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu. Slovim su označene promjene unutar pojedinih uzoraka u odnosu na konsenzus sekvencu, točke predstavljaju podudarnost s prvom sekvencom, a crtice označavaju delecije unutar pojedinih odsječaka. Mjesta rezanja restriksijskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu navedene su iznad zapisa konsenzus sekvence.

Prilog 9.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
										
	HinfI					MboI					
Consensus	CGAAGCAAAGAATTGCTCGAAATAAACTCTTTTCATCCAAACTGTAACAAAATCTTTCTTTGAGAGAGAATAAGACGTTTTTCAGTGAGTTTTATGAGT										100
free101x112Hcl24bC..C.....C.....T.....A.....										92
free101x112Hcl15a	.A.T.....T.....A.....G.....										92
free101x112Hcl24cC.G.C..A.....A.....T.....										77
free101x112Hcl26aC..C..A.....T.....T.....										92
free101x112Hcl21bC.....T.....G..G.....T.....C										92
free101x112Hcl23aC.....G.....A.....G.....T.....										92
free101x112Hcl16C.....T.....A.....G.....G.....										92
free101x112Hcl21c	.T..C.....T.....G..G.....										92
free101x112Hcl10bC..T.....T.....G.....G.....										92
free101x112Hcl12C.....T.....G.....G.....										92
free101x112Hcl17C.....T.....G.....G.....										92
free101x112Hcl14C.....T.....G.....C.....										92
free101x112Hcl135cC.....T.....G.....										92
free101x112Hcl14T.....T.....T.....T.....T.....C										92
free101x112Hcl15b	.T.....T.....T.....T.....T.....										92
free101x112Hcl18T.....A.....A.....										92
free101x112Hcl135aC..G.....G.....A.....T...T...C.....										92
free101x112Hcl18C.....A.....T...T.....										92
free101x112Hcl23cG.....T...CT.....										92
free101x112Hcl12A.....G.....T.....										92
free101x112Hcl26bA.....T.....T...A.....G..G.....										92
free101x112Hcl15A.....T.....TC.....										92
free101x112Hcl11A.....T.....T...A.....										92
free101x112Hcl3bT.....T.....										92
free101x112Hcl19	.T.....G.....T.....										92
free101x112Hcl3aC.....T.....										92
free101x112Hcl24aC..C.....AA.....T.....										92
free101x112Hcl23bCT..C.....A.....T.....T.....T.....										92
free101x112Hcl10a	.T.....C.....C.....A.....C.....T.....T.....										91
free101x112Hcl135b	.T.....C.....C.....A.....T.....T.....C.....										92
free101x112Hcl26c	.T.....G..C..C.....A.....T.....T.....G.....										100
free101x112Hcl21a	.T.....C.....C.....A.....T.....G.....										92

	110	120
	
Consensus	TTATGAGAGTTGTTTCATTT 120	
free101x112Hcl24bA..... 112	
free101x112Hcl15aC.....A..... 112	
free101x112Hcl24cC..... 86	
free101x112Hcl26a	...A..... 112	
free101x112Hcl21b	...A.....A..... 112	
free101x112Hcl23a 112	
free101x112Hcl16T..... 112	
free101x112Hcl21c 112	
free101x112Hcl10b 112	
free101x112Hcl12 112	
free101x112Hcl17 112	
free101x112Hcl14 112	
free101x112Hcl135c 112	
free101x112Hcl14 112	
free101x112Hcl15b 112	
free101x112Hcl18	.G.....A..... 112	
free101x112Hcl135a 112	
free101x112Hcl18C..... 112	
free101x112Hcl23c 112	
free101x112Hcl12A..... 112	
free101x112Hcl26b 112	
free101x112Hcl15 112	
free101x112Hcl11 112	
free101x112Hcl3bC.....C..... 112	
free101x112Hcl19A..... 112	
free101x112Hcl3aA..... 112	
free101x112Hcl24aC..... 112	
free101x112Hcl23b	AC.....A..... 112	
free101x112Hcl10a	...A.....A.A..... 111	
free101x112Hcl135bA..... 112	
free101x112Hcl26cA..... 120	
free101x112Hcl21aA.....A..... 112	

Slika P9. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL101x112H vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu. Slovimama su označene promjene unutar pojedinih uzoraka u odnosu na konsenzus sekvencu, točke predstavljaju podudarnost s prvom sekvencom, a crtice označavaju delecije unutar pojedinih odsječaka. Mjesta rezanja restriktivskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu navedene su iznad zapisa konsenzus sekvence.


```

free234x173Hc128b      .....T..... 173
free234x173Hc121b      .....T..... 173
free234x173Hc125a      ..... 173
free234x173Hc133c      .....T.....TTAA...GTT... 171
free234x173Hc110      GT.....ATTT.....T...A...T...T...AGTTCT...G 173
free234x173Hc132c      GT.....ATTT.....T...A...T...T...A...C...TTC... 172
free234x173Hc126c      GT...C.....ATTT.....T...A...T...T...A...G...T...G... 171
free234x173Hc130c      GT...T...A...A...T...T...T...A...T...T...A...G...T...G... 170
                                RsaI
Consensus-PotporodicaC GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc132b      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc127c      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....GT...GAAA.GG.C.C-CCA...A...GGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc133b      GT.....TGT...CG.ATGTA.TA.....T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc111      GT.....C...TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc15       GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...GAAA.GG.C.C-CCA...G...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc116b      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc122b      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc12       GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc13       GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc121b      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc113b      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc114      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc115b      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc117b      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc123b      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc126b      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc130b      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc134c      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
free234x173Hc135c      GT.....TGT.G.CG.ATGTA.TA.....T...T...GAAA.GG.C.C-CCA...A...AGC...A...TTCA... 173
Consensus-PotporodicaB GT...T...T...T...T...T...T...TG...TT...AA...A...TTTC... 175
free234x173Hc131c      GT...T.G...T...T...T...T...T...TGC...GT...TT...CA...A...G...GCCGC... 173
free234x173Hc134b      GT...A.T...T...T...T...T...T...T...T...AA...AA...TA...TTC... 173
free234x173Hc131b      GT...T...T...T...T...T...T...T...T...AA...AA...TA...TTC... 173
free234x173Hc133a      GT...T...T...T...T...T...T...T...TT...AAA...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc115a      GT...T...T...T...T...T...T...T...TT...A...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc130a      GT...T...T...T...T...T...T...T...TT...AA...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc132a      GT...T...T...T...T...T...C...T...TT...A...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc127b      GT...T...T...T...T...T...T...T...TT...A...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc123a      GT...T...T...T...T...T...T...T...TT...AA...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc122a      GT...T...T...T...T...T...T...T...TT...A...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc116a      GT...T...T...T...T...T...C...T...TT...A...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc117a      GT...T...T...T...T...T...T...T...TT...A...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc126a      GT...T...T...T...T...T...T...T...TT...A...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc135b      GT...T...T...G...T...T...T...T...TT...A...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc112a      GT...T...T...T...T...T...T...T...TT...A...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc113a      GT...T...T...T...T...T...T...T...TT...A...AA...A...TTC... 174
free234x173Hc127a      GT...T...T...T...T...T...T...T...TT...A...AA...A...TTC... 174

```

Slika P10. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL234x173H vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu. Slovimama su označene promjene unutar pojedinih uzoraka u odnosu na konsenzus sekvencu, točke predstavljaju podudarnost s prvom sekvencom, a crtice označavaju delecije unutar pojedinih odsječaka. Crnom bojom obojana su imena monomera potporodice A, plavom bojom imena potporodice B i crvenom bojom imena monomera potporodice C. Mjesta rezanja restriksijskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu navedene su iznad zapisa konsenzus sekvence. Restriksijski enzimi specifični za konsenzus sekvence potporodica B i C obilježeni su iznad navedenih konsenzus sekvenci.

Prilog 11.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
										
	MvaI					HinfI/AluI					
	MvaI					MvaI					
Consensus	AAACCTGACGAAATHACTGAGAAGGAGAAAACGCCTGAGAAAGTAGAATTGAAAGAAGAAGAGCTCCTACTCCTAAAGACAAAACCTCCTCACCCGAAA										
free300x120Hc133cC..T..C.....T.....T.G.....AA..T.....C.....G										
free300x120Hc134bC..T..C.....T.....T.G.....A.....T.....T.....A.C.....G										
free300x120Hc11G.....AGA.A.....A..T.A.C.....AG.....T.T.C.....T.....A.....G										
free300x120Hc18G.....AG.A.....A..T.A.C.....AG.....T.T.C.....T.....A.....T.G										
free300x120Hc126bG.....AG.A.....A..T.A.C.....AG.....T.T.C.....T.....A.....T										
free300x120Hc129cT.....G.....AA.A.....A..TTA.C.....A.....C.....G.....C.....G.....T										
free300x120Hc130bG.....AG.A.....A..TTA.C.....A.....C.....G.....G.....G.....T										
free300x120Hc134cT.....G.....AG.TA.....C..T.A.C.....AAG.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc125aG.....AG.A.....A..A.....A.....GGA.....T.....G.....T.....G										
free300x120Hc128aG.....AG.A.....A..ATC.....T.....A.....T.....T.....T.....G										
free300x120Hc132aAA.....G.....AG.A.....A..ATC.....T.....A.....C.....C.....G.....T										
free300x120Hc117aCC..G.....G.....A.....A.....A.....A.....T.....T.....A.....T										
free300x120Hc117bCC.....G.....A.....A.....A.....A.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc128cG.....AG.A.....A..A.....A.....T.....TT.....C.....A.....T										
free300x120Hc125bT..A.....G.....T.....T.....T.....C.....A.....A.....T										
free300x120Hc123aT.....T.....G.....T.....T.....T.....G.....G.....A.....T										
free300x120Hc133bAG.A.....T.....A.....A.....A.....A.....C.....C.....G.....T										
free300x120Hc113aAG.AG.A.T.....A.....A.....A.....T.....T.....G.....G.....T										
free300x120Hc125cAG.AG.A.T.....G.....A.....G.A.....T.....G.....G.....T										
free300x120Hc114aG.....T.....A.....A.....T.....C.....C.....C.....T.....T										
free300x120Hc116aG.....T.....A.....A.....T.....C.....C.....C.....C.....C										
free300x120Hc124bG.....T.....A.....A.....T.....C.....C.....C.....C.....C										
free300x120Hc118aT.....T.....G.....A.....A.....T.....T.....T.....A.....A.....A										
free300x120Hc132c	G..T..T.....C...CA..C.C.T.....T.....T.....T.....A.....T										
free300x120Hc118bG.....AG.GA.....T.....G.....G.....C.....C.....T.....T										
free300x120Hc127bA.....G.....AG.A.....T.....G.....G.....C.....C.....T.....T										
free300x120Hc124aG.....AG.A.....T.....G.....G.....T.....T.....A.....A.....T										
free300x120Hc132bG.....AG.A.....A.....A.....A.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc113bA.T.....C..G.....C.T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc14T.....C.....C.T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc133aC.....C.T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc17C.....C.T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc126a	.G...G.....A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc120aG.....G.....AT.....T.....T.....T.....G.....T.....G										
free300x120Hc126cT.....G.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc134aG.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C										
free300x120Hc16A.....G.....G.....A.....A.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc127cTG.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc114bA.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc116bA.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc124cA.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc123bA.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc129aA.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc111A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc130cA.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc127aA.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc129bA.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc128bA.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc120bA.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc130aA.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
										
	110					120					
Consensus	AACCCCTGAGATAAAACTC										
free300x120Hc133c	G...T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc134b	G.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc11T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc18T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc126bT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc129cT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc130b	C..A.....G.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc134c	.T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc125aG.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc128aT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc132aT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc117aT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc117bT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc128cT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc125bT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc123aT.C.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc133bT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc113aT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc125cT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc114aC.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc116aT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc124bT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc118aT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc132cT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc118bT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc127bT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc124aG.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc132bT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc113bT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc14T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc133aT.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										
free300x120Hc17T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T										

```

free300x120Hc126a ..... 120
free300x120Hc120a ..... 120
free300x120Hc126c ..... 120
free300x120Hc134a .....TC..... 120
free300x120Hc16 .....C..... 120
free300x120Hc127c ..... 120
free300x120Hc114b .....T..... 120
free300x120Hc116b .....T..... 120
free300x120Hc124c ..... 120
free300x120Hc123b ..... 120
free300x120Hc129a ..... 120
free300x120Hc111 ..... 120
free300x120Hc130c ..... 120
free300x120Hc127a ..... 120
free300x120Hc129b ..... 120
free300x120Hc128b .....G..... 120
free300x120Hc120b ..... 120
free300x120Hc130a ..... 120

```

Slika P11. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL300x120H vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu. Slovimu su označene promjene unutar pojedinih uzoraka u odnosu na konsenzus sekvencu, točke predstavljaju podudarnost s prvom sekvencom, a crtice označavaju delecije unutar pojedinih odsječaka. Mjesta rezanja restrikcijskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu navedene su iznad zapisa konsenzus sekvence.

Prilog 12.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

RsaI

Consensus AGTACCCATGTGCAAAAAATGATCTCGATCAGATTATAAATGTAGATTTTCATTTTTTTTTTCGAAATTTATCCCTCTTTTTAAGGGGTAGGGGTAGA 100

free243x266Lc132b G.....GC.....G.....C.....C.....AA.....G... 98

free243x266Lc127b G.....A.....G.....T.....T.T.T.....A.....G.G 98

free243x266Lc11 G.....A.....G.....T.....G.A.C.G.A.....A..... 98

free243x266Lc17 G.....A.G.....A.C.AAT.G.....A.....AAC.GA.C.....C.....A.....A..... 97

free243x266Lc127a G.....GC.C.....C.....C.A.....GC.....A.....T.....TG.G.....G..A..... 98

free243x266Lc13 G.....GC.....G.....C.....TA..... 99

free243x266Lc116a G.....GC.C.....C.....C.A.....GC.....A.....A.....TT.T..... 97

free243x266Lc118a G.....G.C.....G.....GA.....A.....A..... 98

free243x266Lc134b G.....C.....C.....C.A.....G.....A.....A.....GAA.....T.....TT.T..... 98

free243x266Lc14 G.....C.....C.....C.A.A.....G.....A.....G.....AA.....T.....TT.T..... 98

free243x266Lc112 G.....C.....C.....C.A.....G.....A.....A.....AAA.....T.....TT.T..... 98

free243x266Lc118b G.....G.C.....C.....G.....A.....G..... 99

free243x266Lc132aA.....C.....G..... 98

free243x266Lc123aT.....A..... 97

free243x266Lc18G.....A..... 98

free243x266Lc128aA.A.....G.....G.....A..... 98

free243x266Lc19A.....A..... 98

free243x266Lc113 G.....C.....A..... 98

free243x266Lc121aA.....A..... 98

free243x266Lc121b G.....A..... 98

free243x266Lc110C.....T.....A..... 98

free243x266Lc131A.....A..... 98

free243x266Lc114T.....A..... 98

free243x266Lc116b G.....A..... 98

free243x266Lc117a G.....A.....G..... 98

free243x266Lc123b G.....A.....G.....T.....G.A.C.G.A.....A..... 98

free243x266Lc15G.....T.....A.....A..... 97

free243x266Lc111T.....A..... 98

free243x266Lc115T.....A..... 97

free243x266Lc16C.....A.....T.....T.....A..... 98

free243x266Lc134aC.....A.....T.....T.....A..... 98

free243x266Lc128bA.....A..... 98

free243x266Lc12A.....T.....C.....T..... 98

free243x266Lc117bA.....T.....C.....T..... 98

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

DraI **DraI**

Consensus GAAAAAAATTGAAAACATTTTTTTTAAATGACCCCGAGCTTCCCTACTATAACATATATTTAATTGGTCGATTTTAAATTTTTTAAATTTTGACATTTA 200

free243x266Lc132b .C.....CAAT.....A.....A.....T.....C.T.A.....G.T..... 192

free243x266Lc127b A.C.....T.....T.....A.T.T.A.....A.....T.....T.....A.T.AA..... 197

free243x266Lc11G.....A.....T.TT.....T.....T.G.....T.....G.....T.....T..... 193

free243x266Lc17C.....G.A.....T.....TT.....T.....T.G.....T.....T.....G.....T.....T..... 192

free243x266Lc127aC.G.....TA.....G.....T.....C..... 193

free243x266Lc13C.G.....G.....A.....A.....C.T..... 194

free243x266Lc116aC.....G.....A.....C.....A.....A..... 192

free243x266Lc118aC.G.G.....T.....C.....C.....A.A..... 193

free243x266Lc134bA.....C.....T.....A.....A..... 193

free243x266Lc14A.....C.....T..... 193

free243x266Lc112C.....G.....T..... 193

free243x266Lc118b A.....A.....T.....G.....G..... 195

free243x266Lc132aA.....T..... 194

free243x266Lc123aC.G.GG.....C.....C.....A..... 192

free243x266Lc18GA.....T.....T.....T.....C..... 193

free243x266Lc128aGA.....T.....T.....T.....C..... 193

free243x266Lc19GA.....T.....T.....T.....C..... 193

free243x266Lc113GA.....T.....T.....T.....C..... 193

free243x266Lc121aGA.....T.....T.....T.....C..... 193

free243x266Lc121bC.G.....TA.....T.....C..... 193

free243x266Lc110C.G.....T.....C..... 193

free243x266Lc131C.G.G.....C..... 193

free243x266Lc114C.G.G.....C.....A..... 193

free243x266Lc116bC.G.G.....C.....C.....A.A..... 193

free243x266Lc117aC.....A.....C.....A..... 193

free243x266Lc123bA.....A.....C.....T.....A.....A..... 193

free243x266Lc15A.....T.....C.....T.....A.....A..... 192

free243x266Lc111A.....A.....C.....T.....A.....A..... 193

free243x266Lc115A.....A.....C.....T.....A.....A..... 192

free243x266Lc16A.....A.....C.....T.....A..... 193

free243x266Lc134aA.....A.....C.....T.....A..... 193

free243x266Lc128bA.....A.....C.....T..... 193

free243x266Lc12A.....A.....C.....T..... 193

free243x266Lc117bA.....A.....C.....T..... 193

210 220 230 240 250 260 270

HindII

Consensus TTTTGACCCCCCACTACCCCCCAATTTTGAATATGTCAACTCTGATTAGTGGAGCGTAATCAGGACCCATAAGG 273

free243x266Lc132bTA.....C.....G.....AC.T.C..... 265

free243x266Lc127bA.....A.C.....T.....A.....A..... 270

free243x266Lc11T.....A.....G.....C.....AG.....C..... 266

free243x266Lc17T.....A.....G.....C.....AG.....C..... 265

free243x266Lc127aT.....G.....A.....A..... 265

free243x266Lc13T.....A..... 267

free243x266Lc116aT.....A..... 265

free243x266Lc118aA.....G.....C.....AG.....C..... 266

free243x266Lc134bT.....G.....T.....T.....A..... 266

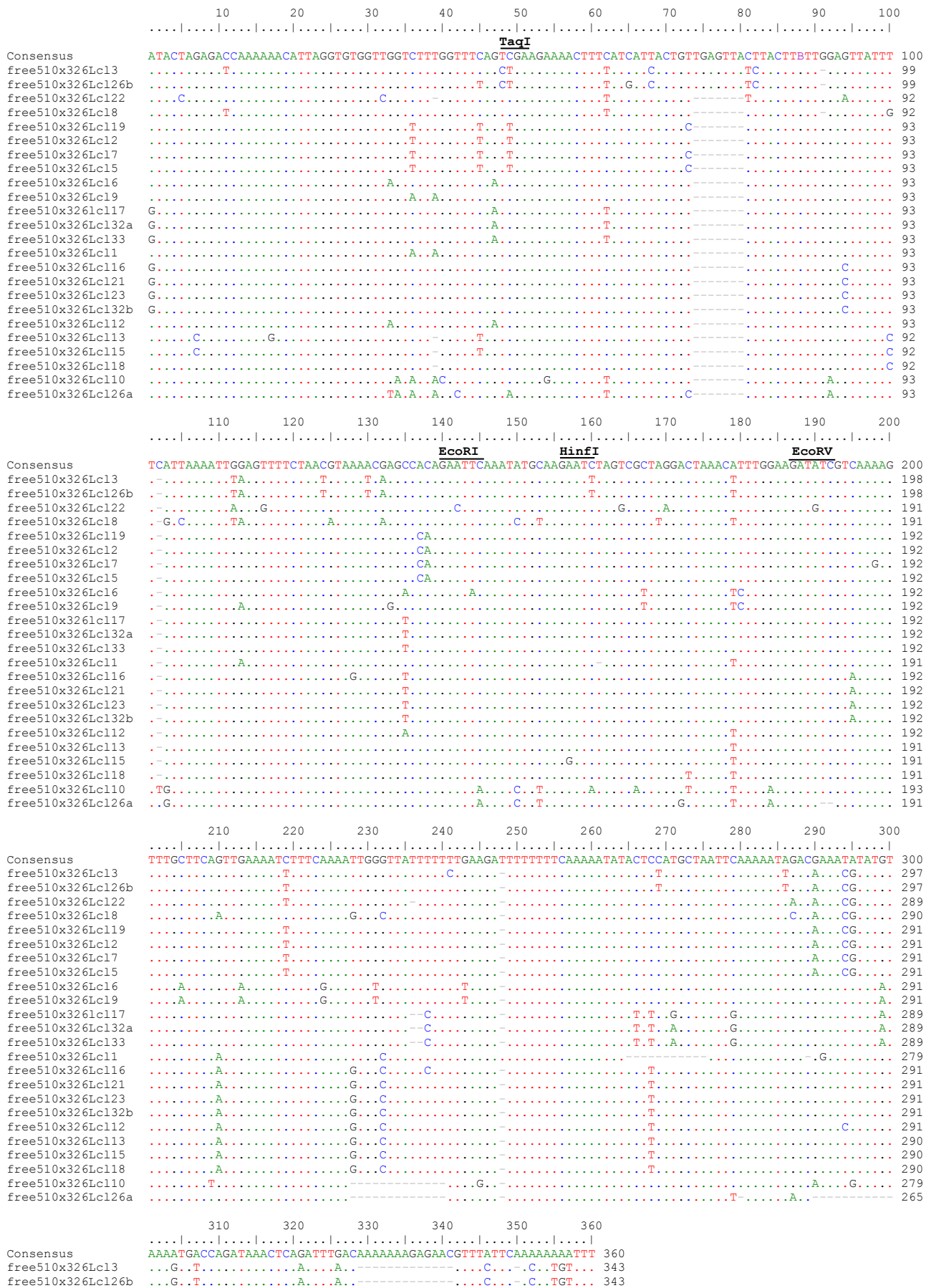
```

free243x266Lc14      ....T.....G.....T.....T.....T..... 266
free243x266Lc112    ....T.....G.....T.....T.....T..... 266
free243x266Lc118b   ....T.....T.....C.....T.....A.....T..... 268
free243x266Lc132a   ....T.....T.....T.....CG...A...C..... 267
free243x266Lc123a   ....T.....T.....G.....A.....A.....A..... 265
free243x266Lc18     ....T.....A.....A.....G..... 266
free243x266Lc128a   ....T.....A.....A..... 266
free243x266Lc19     ....G.....T.....T.....T..... 266
free243x266Lc113    ....T.....GA..... 266
free243x266Lc121a   ....T.....GA..... 266
free243x266Lc121b   ....A.....A.....A..... 265
free243x266Lc110    .A.....A.....A..... 266
free243x266Lc131    .C.....T.....T..... 266
free243x266Lc114    ....C.....A.....G..... 266
free243x266Lc116b   ....C.....A.....G..... 266
free243x266Lc117a   ....G.....A..... 266
free243x266Lc123b   ....T.....G.....T.....T.....T..... 266
free243x266Lc15     ....T.....G.....T.....T.....T..... 265
free243x266Lc111    ....T.....G.....T.....T.....T..... 266
free243x266Lc115    ....T.....G.....T.....T.....T..... 265
free243x266Lc16     ....T.....G.....T.....T.....T..... 266
free243x266Lc134a   ....T.....G.....TG.....T..... 266
free243x266Lc128b   ....T.....G.....T.....T.....T..... 266
free243x266Lc12     ....T.....G.....T.....T.....T..... 266
free243x266Lc117b   ....T.....G.....T.....T.....T..... 266

```

Slika P12. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL243x266L vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu. Slovimama su označene promjene unutar pojedinih uzoraka u odnosu na konsenzus sekvencu, točke predstavljaju podudarnost s prvom sekvencom, a crtice označavaju delecije unutar pojedinih odsječaka. Mjesta rezanja restriktijskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu navedene su iznad zapisa konsenzus sekvence.

Prilog 13.



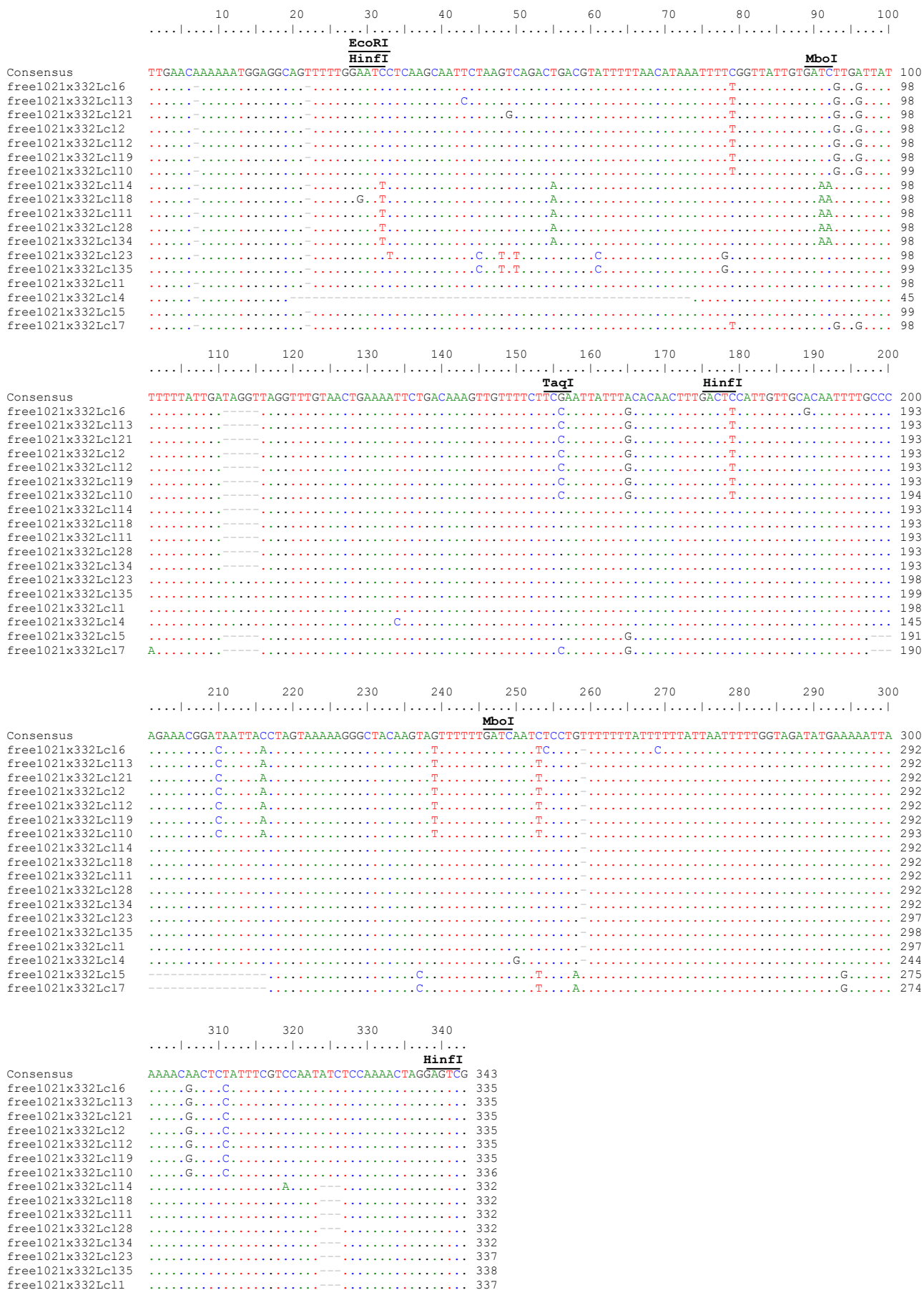
```

free510x326Lc122 ...G...T.....T--.....A... 345
free510x326Lc18 G.T.....C... 348
free510x326Lc119 G.....T.....A.....A.....A... 350
free510x326Lc12 G.....T.....A.....T.....A... 350
free510x326Lc17 G.....T.....A.....T.....A... 350
free510x326Lc15 G.....T.....A.....T.....A... 350
free510x326Lc16 .....A..... 348
free510x326Lc19 .....A..... 348
free510x326Lc117 .....A..... 346
free510x326Lc132a .....A..... 346
free510x326Lc133 .....A..... 346
free510x326Lc11 .....G.....T... 338
free510x326Lc116 .....A.A..... 348
free510x326Lc121 .....A..... 348
free510x326Lc123 .....A..... 348
free510x326Lc132b .....A..... 348
free510x326Lc112 .....C..... 349
free510x326Lc113 ..... 348
free510x326Lc115 ..... 348
free510x326Lc118 .....C..... 348
free510x326Lc110 ...G..GT.....C..... 337
free510x326Lc126a -----.....TA.....C..TT... 316

```

Slika P13. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL510x326L vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu. Slovimu su označene promjene unutar pojedinih uzoraka u odnosu na konsenzus sekvencu, točke predstavljaju podudarnost s prvom sekvencom, a crtice označavaju delecije unutar pojedinih odsječaka. Mjesta rezanja restriktivskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu navedene su iznad zapisa konsenzus sekvence.

Prilog 14.



```

free1021x332Lc14 ..... 284
free1021x332Lc15 .....G..... 318
free1021x332Lc17 .....G..... 317

```

Slika P14. Poravnanje sekvenci monomera satelitne DNA freeCL1021x332L vrste *Tribolium freemani* kloniranih u ovom radu. Slovimu su označene promjene unutar pojedinih uzoraka u odnosu na konsenzus sekvencu, točke predstavljaju podudarnost s prvom sekvencom, a crtice označavaju delecije unutar pojedinih odsječaka. Mjesta rezanja restriksijskih enzima korištenih u metodi hibridizacije po Southernu navedene su iznad zapisa konsenzus sekvence.

ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Damira Veseljak

Mjesto i godina rođenja: Varaždin, Hrvatska, 1995.

e-mail: damira.veseljak@gmail.com

Obrazovanje:

2017.-2019. *Diplomski studij*: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Diplomski studij molekularne biologije

2018.-2019. *Diplomski studij*: Fakultet znanosti, Sveučilište u Gironi, Diplomski studij molekularne biologije i biomedicine, Erasmus+ razmjena

2014.-2017. *Preddiplomski studij*: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Preddiplomski studij molekularne biologije

Iskustva:

2017. *Studentska praksa*: Institut Ruđer Bošković, Laboratorij za staničnu i molekularnu biologiju

2018. *Studentska praksa*: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zavod za mikrobiologiju, Virološki laboratorij

2018.-2019. *Studentska praksa*: Fakultet znanosti, Sveučilište u Gironi, Zavod za mikrobiologiju, Mikrobiologija gastrointestinalnih bolesti

2015. *Demonstratura*: kolegij Biologija stanice

2017. *Demonstratura*: kolegij Fiziologija bilja

2018. *Demonstratura*: kolegij Molekularna genetika

2014.-2018. Sudjelovanje na studentskoj manifestaciji Noć biologije

Vještine:

Strani jezici: engleski (izvrsno), njemački (dobro)

Računalne vještine: Odlično poznavanje MS Office aplikacija (Word, Excel, PowerPoint), Osnovno poznavanje programa BioEdit, MEGA, FigTree