

Karakterizacija tirozinaze u stigobiontskom rodu školjkaša *Congeria Partsch, 1835* i njegovim nadzemnim srodnicima

Radečić, Karlo

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:217:098125>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO–MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Karlo Radečić

**Karakterizacija tirozinaze u stigobiontskom rodu školjkaša
Congeria Partsch, 1835 i njegovim nadzemnim srođnicima**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju na Institutu „Ruđer Bošković“ pod vodstvom mentorice dr.sc. Helene Četković, znanstvene savjetnice i suvoditelja izv. prof. dr. sc. Damjana Franjevića s Biološkog odsjeka PMF-a, predan je na ocjenjivanje Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u svrhu stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

ZAHVALE

Zahvaljujem dr. sc. Heleni Četković, znanstvenoj savjetnici, voditeljici ovoga rada i izv. prof. dr. sc. Damjanu Franjeviću, suvoditelju ovoga rada na mentorstvu i vrijednim stručnim savjetima.

Dr. sc. Heleni Bilandžiji zahvaljujem na neposrednom vođenju ovoga rada. Zahvaljujem na prilici za rad na istraživanju podzemnih životinja, područja u kojem je dr. sc. Bilandžija istaknuti znanstvenik. Zahvaljujem na uloženoj trudu, svemu naučenom i na iscrpnim stručnim savjetima.

Dr. sc. Heleni Četković i dr. sc. Andreji Mikoč zahvaljujem na gostoprimstvu u Laboratoriju za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju na Institutu „Ruđer Bošković“.

Njima te Silvestru Beljanu, Matiji Harcetu, Andrei Hloušek-Kasun i Petri Mikolčević zahvaljujem na korisnim savjetima te ugodnoj atmosferi u laboratoriju.

Zahvaljujem Silvestru Beljanu na sekvenciranju.

Zahvaljujem biospeleologu Branku Jalžiću i Heleni Bilandžiji na svojem i njihovom sudjelovanju u terenskom prikupljanju uzoraka.

Zahvaljujem svima koji su na mene tijekom studija djelovali poticajno i pozitivno. Hvala mojim prijateljima na svim ugodnim trenucima i na podršci!

Osobito zahvaljujem svojoj obitelji na nesebičnoj podršci, strpljenju i što su mi uvijek omogućavali da neometano djelujem u smjeru svojih interesa.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Karakterizacija tirozinaze u stigobiontskom rodu školjkaša *Congerina* Partsch, 1835 i njegovim nadzemnim srodnicima

Karlo Radečić
Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rod *Congerina* s tri recentne opisane vrste koje žive u podzemlju dinarskog krša jedina je stigobiontska svojta školjkaša na svijetu. Za razliku od nadzemnih srodnika, ovi su školjkaši izgubili pigmentaciju tkiva, što je obilježje mnogih podzemnih životinja. Molekularna osnova gubitka pigmentacije u životinja slabo je poznata. Cilj je ovog rada identificirati molekularnu osnovu gubitka pigmentacije u tri vrste stigobiontske svojte *Congerina* uspoređivanjem primarne strukture DNA i proteina njihovih homologa tirozinaze s onima dvaju nadzemnih (*Dreissena*, *Mytilopsis*) rodova porodice školjkaša Dreissenidae. Iz literature je poznato da je tirozinaza važan enzim za pigmentaciju školjkaša te da katalizira prvi korak u biosintezi melanina. Sekvence tirozinaze školjkaša porodice Dreissenidae dobivene su pretragom ranije sekvenciranog transkriptoma korištenjem alata PIA (filogenetički obaviještena anotacija) te sekvenciranjem produkata, fragmenata homologa tirozinaze, umnoženih lančanom reakcijom polimerazom. Spektrofotometrijskom analizom provjerena je aktivnost enzima fenoloksidaza, kojima pripada tirozinaza, te je provedena filogenetička analiza tirozinaze u ovoj porodici. Osobitosti sekvenci tirozinaze vrste *Congerina jalzici* u odnosu na ostale svojte te manja aktivnost fenoloksidaza u odnosu na nadzemnog srodnika (*Dreissena*) pokazuju da je gubitak pigmentacije u ove svojte možda posljedica mutacijskih promjena u tirozinazi što je važan doprinos razumijevanju gubitka pigmentacije u drugih podzemnih životinja osim modelnog organizma – meksičke tetre (*Astyanax mexicanus*).

(117 stranica, 49 slika, 38 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: gubitak pigmentacije, podzemne životinje, mutacije, filogenetička analiza, evolucija

Voditelj: dr. sc. Helena Četković, znanstvena savjetnica

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević
2. prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš
3. prof. dr. sc. Zlatko Liber

Rad prihvaćen: 31. siječnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of biology

Graduation Thesis

The characterization of tyrosinase in stygobiotic bivalve genus *Congeria* Partsch, 1835 and its surface relatives

Karlo Radečić
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Genus *Congeria* with three extant species which live in the subterranean habitats of the Dinaric karst is the only stygobiotic taxon of bivalves. Unlike its surface relatives, these bivalves lost tissue pigmentation, which is a feature that many subterranean animals have in common. The molecular causes of the loss of pigmentation in animals is scarcely known. The aim of this research is to identify the molecular cause of the loss of pigmentation in the genus *Congeria* by comparing the primary structure of DNA and protein homologues of tyrosinase between stygobiotic and two surface genera (*Dreissena*, *Mytilopsis*) of the bivalve family Dreissenidae. It is known in literature that tyrosinase is an enzyme important for pigmentation in bivalves and that it catalyses the first step in the biosynthesis of melanine. The sequences of tyrosinase of bivalves of the family Dreissenidae were found by searching the transcriptome (sequenced before) using a tool called PIA (*phylogenetically-informed annotation*) and by sequencing products, fragments of tyrosinase homologs, amplified using polymerase chain reaction (PCR). The enzymatic activity of phenoloxidases, to which tyrosinase belongs, was tested by spectrophotometric analysis. The phylogenetic analysis of tyrosinases of this bivalve family was also performed. The unique features of tyrosinase sequences of *Congeria jalzici* in comparison to other members of the family and the lower phenoloxidase activity, compared to surface-living *Dreissena*, show that the loss of pigmentation in this species is possibly the consequence of mutations in tyrosinase. This is an important contribution to understanding the loss of pigmentation of subterranean animals outside the model organism – the Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*).

(116 pages, 48 figures, 38 tables, 56 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library.

Key words: loss of pigmentation, subterranean animals, mutations, phylogenetic analysis, evolution

Supervisor: Sc. D. Helena Četković, Scientific Adviser

Co-supervisor: Sc. D. Damjan Franjević, Associate Professor

Reviewers:

1. Sc. D. Damjan Franjević, Associate Professor
2. Sc. D. Vlatka Zoldoš, Professor
3. Sc. D. Zlatko Liber, Professor

Thesis accepted: 31/01/2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Osnovna obilježja mekušaca (Mollusca) i školjkaša (Mollusca: Bivalvia)	1
1.2. Rod <i>Congeria</i> – jedina stigobionska svojta školjkaša na svijetu i njegovi nadzemni srodnici	4
1.2.1. Taksonomija i srodstveni odnosi unutar roda <i>Congeria</i> i porodice Dreissenidae...	4
1.2.2. Osnovna obilježja biologije i anatomije školjkaša roda <i>Congeria</i>	7
1.2.3. Biogeografska i evolucijska povijest porodice Dreissenidae	9
1.3. Osobitosti evolucijskih procesa u podzemlju	10
1.4. Tirozinaza i pigmentacija u školjkaša	17
1.4.1. Uloga tirozinaze u biosintezi melanina	17
1.4.2. Strukturna obilježja i evolucija tirozinaze	19
1.4.3. Molekularna pozadina gubitka pigmentacije	23
1.4.4. Imunološka uloga melanizacije	24
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	25
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1. Materijali	26
3.2. Metode	32
3.2.1. Identifikacija homologa tirozinaze iz transkriptoma korištenjem filogenetički obaviještene anotacije (PIA)	32
3.2.2. Bioinformatičko provjeravanje rezultata dobivenih alatom PIA	33
3.2.3. Provjera očuvanosti aktivnog mjesta tirozinaze na razini proteinske sekvence ..	35
3.2.4. Filogenetička analiza homologa tirozinaze porodice Dreissenidae	35
3.2.5. Izolacija i provjera izolirane RNA	37
3.2.6. Pročišćavanje RNA uzorka od DNA	38
3.2.6.1. Rezultat provjere izolirane RNA elektroforezom u agaroznom gelu	40
3.2.6.2. Provjera prisutnosti genomske DNA u uzorcima RNA	41
3.2.7. Sinteza cDNA.....	42
3.2.8. Provjera prisutnosti genomske DNA u cDNA	44
3.2.8.1. Rezultat provjere prisutnosti genomske DNA u uzorcima cDNA	45
3.2.9. Dizajniranje početnica	46
3.2.10. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	49

3.2.11. Elektroforeza nukleinskih kiselina u agaroznom gelu	56
3.2.12. Pročišćavanje PCR produkata i izolacija DNA iz agaroznog gela	56
3.2.13. Rezultati PCR reakcija namijenjenih umnožavanju fragmenata tirozinaze	57
3.2.13.1. TYRA_Drei_F2 + TYRA_Drei_R2	59
3.2.13.2. TYRA_Drei_F3 + Overhang	59
3.2.13.3. TYRB_Drei_ZajF2 + TYRB_Drei_ZajR2	62
3.2.13.4. Neuspješne reakcije	62
3.2.14. TA kloniranje	64
3.2.14.1. Dodavanje A-deoksinukleotida na 3' kraj PCR produkta	67
3.2.15. Određivanje primarne strukture DNA primjenom Sangerove dideoksi metode	68
3.2.16. Spektrofotometrijsko utvrđivanje aktivnosti fenoloksidaza	71
4. REZULTATI	75
4.1. Nukleotidne i proteinske sekvence tirozinaze dobivene pretragom transkriptoma pomoću alata PIA	75
4.2. Rezultati filogenetičke analize	78
4.3. Rezultati sekvenciranja i analiza dobivenih sekvenci	87
4.4. Rezultati spektrofotometrijske analize aktivnosti fenoloksidaza	99
5. RASPRAVA	103
6. ZAKLJUČAK	110
7. LITERATURA	111
8. PRILOZI	118

POPIS KRATICA

L-DOPA	L-3,4-dihidroksifenilalanin
ML	metoda maksimalne vjerodostojnosti (engl. <i>maximum likelihood</i>)
MP	metoda maksimalne štedljivosti (engl. <i>maximum parsimony</i>)
oca2	<i>oculocutaneus albinism</i> (gen)
ORF	otvoreni okvir čitanja (engl. <i>open reading frame</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDCA	pirol-2,3-dikarboksilna kiselina
PIA	filogenetički obaviještena anotacija (engl. <i>phylogenetically-informed annotation</i>)
PTCA	pirol-2,3,5-trikarboksilna kiselina
PTU	feniltiourea

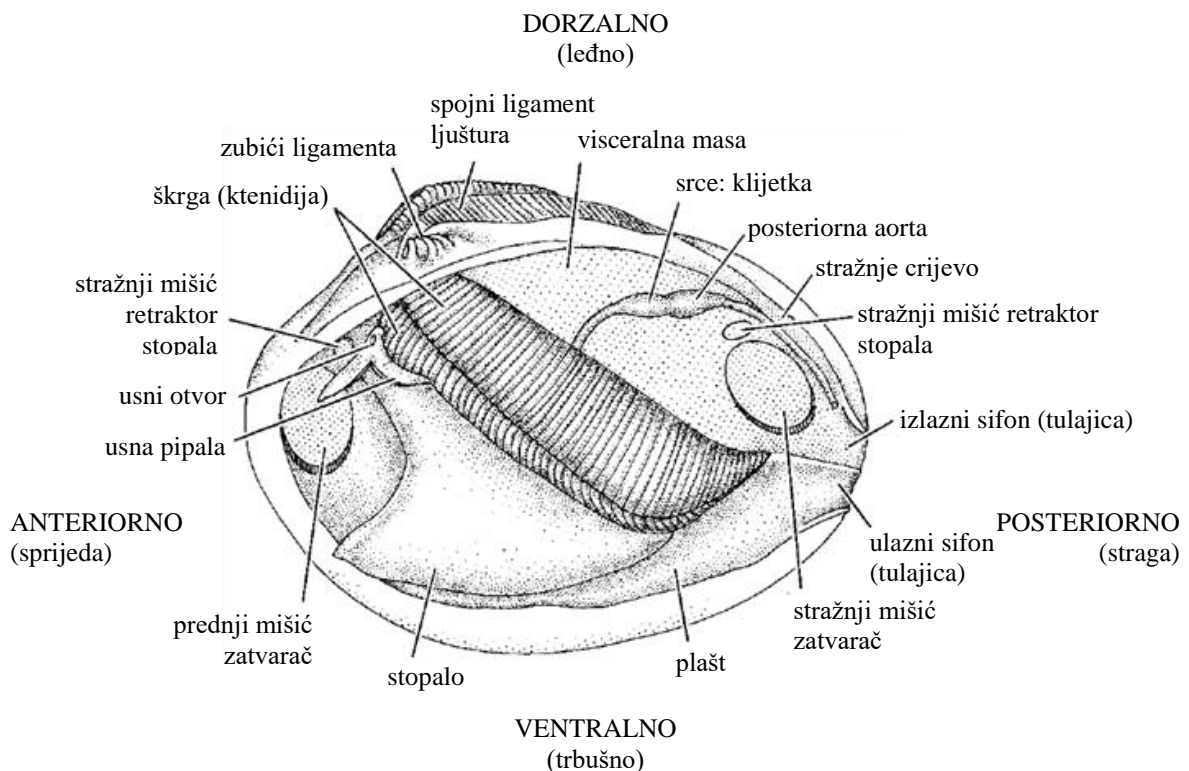
1. UVOD

1.1. Osnovna obilježja mekušaca (Mollusca) i školjkaša (Mollusca: Bivalvia)

Školjkaši (Bivalvia), s oko 9 200 opisanih vrsta, jedan su od osam razreda koljena mekušaca (Mollusca), koji su s oko 80 000 opisanih vrsta, nakon člankonožaca (Arthropoda), druga najbrojnija skupina životinja. Ostali razredi mekušaca su Solenogastres, Caudofoveata (zajedno nazvani bezljušturašima), jednoljušturaši (Monoplacophora), mnogoljušturaši (Polyplacophora), koponošci (Scaphopoda), puževi (Gastropoda) i glavonošci (Cephalopoda) (BRUSCA, MOORE i SHUSTER, 2016).

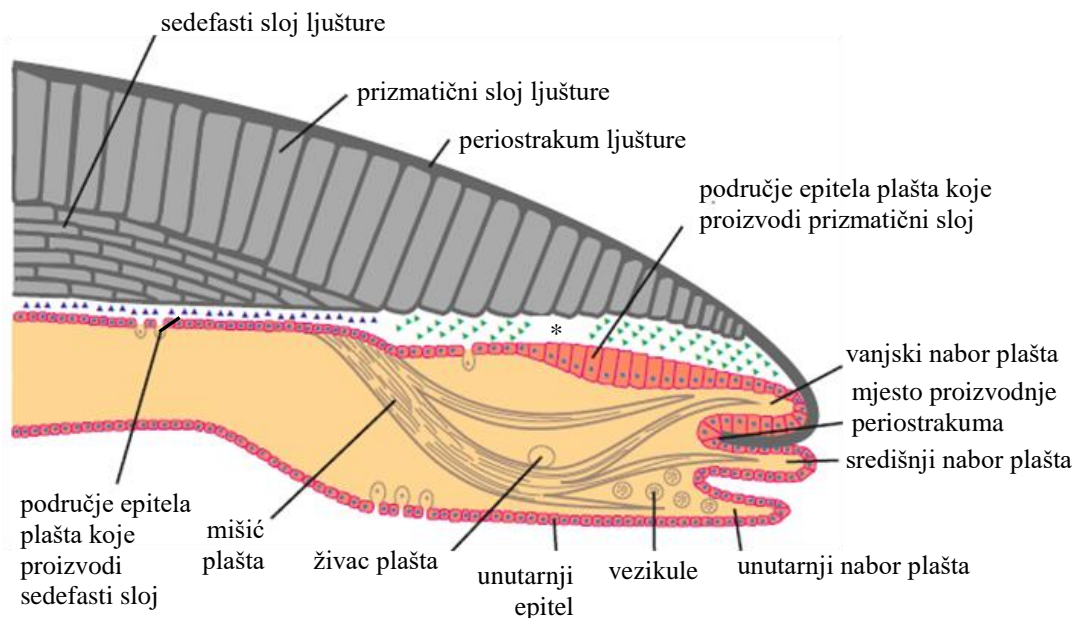
Apomorfije koje evolucijski definiraju koljeno mekušaca su ventralno stopalo, dorzalni plašt i radula (trenica), organ u usnoj šupljini koji omogućuje usitnjavanje hrane (NIELESEN, 2012). Najočitija apomorfija razreda školjkaša gubitak je radule: školjkaši se hrane filtracijom hranjivih čestica iz vode. Plašt mekušaca oblaže plaštanu šupljinu, u kojoj se nalaze škrge (koje se u mekušaca zovu ktenidije) (Sl. 1.1. i 1.6.), i u koju se otvaraju crijevni i spolni otvor te otvor metanefridija (organ za osmoregulaciju i ekskreciju). Gonade svoje produkte izvide ili u metanefridij ili izravno u plaštanu šupljinu. Osim primarne tjelesne šupljine, obložene ekstracelularnim matriksom, kojom struji optjecajna tekućina otvorenog optjecajnog sustava (hemolimfa), mekušci imaju i sekundarnu tjelesnu šupljinu – celom, obloženu epitelom mezodermalnog podrijetla (celotelom). Celom mekušaca predstavlja perikard u kojemu se nalazi srce. Srce je obloženo podocitima koji omeđuju filtracijske pukotine te se hemolimfa iz srca filtrira u perikard iz kojega filtrat preuzima metanefridij (SCHMIDT-RHAESA, 2007).

Plašt većine mekušaca stvara ljušturu koja može biti jednodijelna (jednoljušturaši, koponošci, puževi), sastavljena od osam pločica (mnogoljušturaši), a u školjkaša je dvodijelna. Ljuštura mekušaca građena je od kalcijeva karbonata uloženog u proteinski matriks u slojevima i često je prekrivena tankim organskim slojem koji se naziva periostrakum, a građen je od konhina (kinonski, obojeni proteini). Ispod periostrakuma slojevi su kalcijeva karbonata koji mogu biti različitih kristalnih oblika (prizmatični, sferični, laminarni, ukriženi). U većine mekušaca gornji je sloj prizmatičan, a donji ukriženi, dok je u jednoljušturaša, glavonožaca te nekih školjkaša i puževa donji sloj sedefast (laminarni) (Sl. 1.2.) (BRUSCA, MOORE i SHUSTER, 2016). Različite dijelove ljušture (periostrakum i dva vapnenačka sloja) proizvode posebna područja plašta (KOCOT *et al.*, 2016), kako je prikazano na Sl. 1.2.



Slika 1.1. Anatomija školjkaša vidljiva nakon uklanjanja lijeve ljušture i pripadajućeg dijela plašta. Visceralna masa dio je tijela koji sadrži većinu probavnog, ekskrecijskog, živčanog sustava i srce.

Preuzeto i prilagođeno prema: BRUSCA, MOORE i SHUSTER (2016).



Slika 1.2. Shematski prikaz prereza plašta i ljušture školjkaša. Specifična područja plaštanog epitela proizvode periostrakum, prizmatični i sedefasti (laminarni) sloj ljušture. Zvezdicom (*) je označen izvanplaštani prostor.

Preuzeto i prilagođeno prema: KOCOT *et al.* (2016).

U školjkaša se dvije ljuštore drže spojnim ligamentom, a njihovo zatvaranje omogućuje par mišića zatvarača (Sl. 1.1.). U mekanu podlogu školjkaši se mogu uvući ventralnim stopalom, a neki se za čvrstu podlogu vežu bisusnim nitima (Sl. 1.6.).

Plast školjkaša na posteriornoj strani tijela oblikuje strukture koje prolaze između lagano otvorenih ljuštura i omogućuju komunikaciju životinje s vodenim (slatkovodnim ili morskim) okolišem, a zovu se sifoni (tulajice) (Sl. 1.1., 1.5A i 1.6.). Dovodnim sifonom u plaštanu šupljinu ulazi voda koja opskrbljuje životinju hranjivim česticama i otopljenim kisikom, a odvodni sifon izvodi iz plaštane šupljine deoksigeniranu vodu u koju svoj sadržaj donose crijevni otvor i otvor metanefridija (i, u nekih, zasebni spolni otvor). Neki se školjkaši mogu cijeli ukopati u mekani sediment te sifonima komunicirati s vodenim okolišem iznad sedimenta.

Parne škrge trepetljikama škržnog žlijeba omogućuju odabir i prijenos hranjivih čestica prema anteriornoj strani tijela gdje se oko usta nalaze usna pipala (Sl. 1.1. i 1.6.). Ona sadrže osjetne strukture i omogućuju odabir hrane koja će ući u probavni sustav.

Od osjetljivih struktura, u školjkaša nalazimo plaštana pipala (s mehanoreceptorskim i kemoreceptorskim stanicama), obično u području sifona; par statocista u stopalu (organi za ravnotežu); kemoreceptor osfradij, a neki školjkaši imaju fotoreceptore (oči), raspoređene duž ruba plašta ili na sifonima (BRUSCA, MOORE i SHUSTER, 2016).

Većina školjkaša razdvojena je spola, a razvoj im je s ličinačkim stadijem ili izravan, bez stadija ličinke.

1.2. Rod *Congeria* – jedina stigobiontska svojta školjkaša na svijetu i njegovi nadzemni srodnici

1.2.1. Taksonomija i srodstveni odnosi unutar roda *Congeria* i porodice Dreissenidae

Porodica školjkaša Dreissenidae Gray in Turton, 1840 obuhvaća četiri recentna roda: *Congeria* Partsch, 1835, *Dreissena* van Beneden, 1835, *Mytilopsis* Conrad, 1857 i *Rheodreissena* Geda *et al.*, 2018 (GEDA *et al.*, 2018). Svojt *Congeria* pripadaju jedini recentni stigobiontski školjkaši na svijetu (BILANDŽIJA *et al.*, 2013a; CULVER i PIPAN, 2009; SKET, 2004; MORTON, VELKOVHRH i SKET, 1998). Termin stigobionti označava vodene organizme koji nastanjuju isključivo podzemna staništa (CULVER i PIPAN, 2009).

Premda je rod *Congeria* dugo bio poznat paleontolozima na temelju ljuštura, slovenski je malakolog Jože Bole 1962. godine opisao novu – i jedinu živuću – vrstu za taj rod – *Congeria kusceri* Bole, 1962, no budući da je njegova publikacija objavljena na slovenskom jeziku, nije naišla na značajan odjek u svjetskoj zoologiji pa su mnogi do 90-ih godina prošlog stoljeća rod *Congeria* smatrali izumrlim (MORTON, VELKOVHRH i SKET, 1998). Opis biologije i anatomije jedinog živućeg stigobiontskog školjkaša na svijetu na engleskom jeziku (MORTON, VELKOVHRH i SKET, 1998) bio je preduvjet za prepoznavanje jedinstvenosti ove svojte u svjetskoj znanosti. Na temelju molekularne filogenetike i suptilnih morfoloških razlika (morfologija spojnog ligamenta ljuštura), opisane su dvije nove stigobiontske vrste roda *Congeria* – *C. jalzici* Morton i Bilandžija, 2013 te *C. mulaomerovici* Morton i Bilandžija, 2013 (BILANDŽIJA *et al.*, 2013a). Tri stigobiontske vrste ovoga roda žive u mračnim i hladnim podzemnim vodama dinarskog krša na lokalitetima u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini te jednom lokalitetu u Sloveniji. Špilje u kojima ih nalazimo pripadaju četirima geografskim regijama međusobno hidrološki izoliranima (Sl. 1.3.). *C. jalzici* dolazi u području bazena rijeke Like u Hrvatskoj i području Bele Krajine u Sloveniji, *C. mulaomerovici* u području bazena rijeke Sane u sjeverozapadnoj Bosni, a *C. kusceri* u području bazena rijeke Neretve u južnoj Dalmaciji i Hercegovini (BILANDŽIJA *et al.*, 2013a). Endemski karakter vrste *C. kusceri* istaknut je u hrvatskim sveučilišnim udžbenicima MATONIČKINA, HABDIJE i PRIMC (1998) te HABDIJE *et al.* (2011) u vrijeme kad je bila poznata samo jedna recentna vrsta roda *Congeria*.

Područje dinarskog krša inače je vruća točka bioraznolikosti te se odlikuje jedinstvenom podzemnom faunom. Osim jedine recentne stigobiontske svojte školjkaša, u podzemlju dinarskog krša žive i *Eunapius subterraneus* (Porifera: Spongillidae)(ogulinska špiljska spužvica) – jedina slatkovodna stigobiontska spužva na svijetu, *Velkovrhia enigmatica*

(Cnidaria: Hydrozoa) – jedini stigobiontski žarnjak, *Marifugia cavatica* (Polychaeta: Serpulidae) – jedini stigobiontski mnogočetinaš, a *Proteus anguinus* (čovječja ribica) (Amphibia: Urodela) jedini je neamerički stigobiontski vodozemac (SKET, 2004).

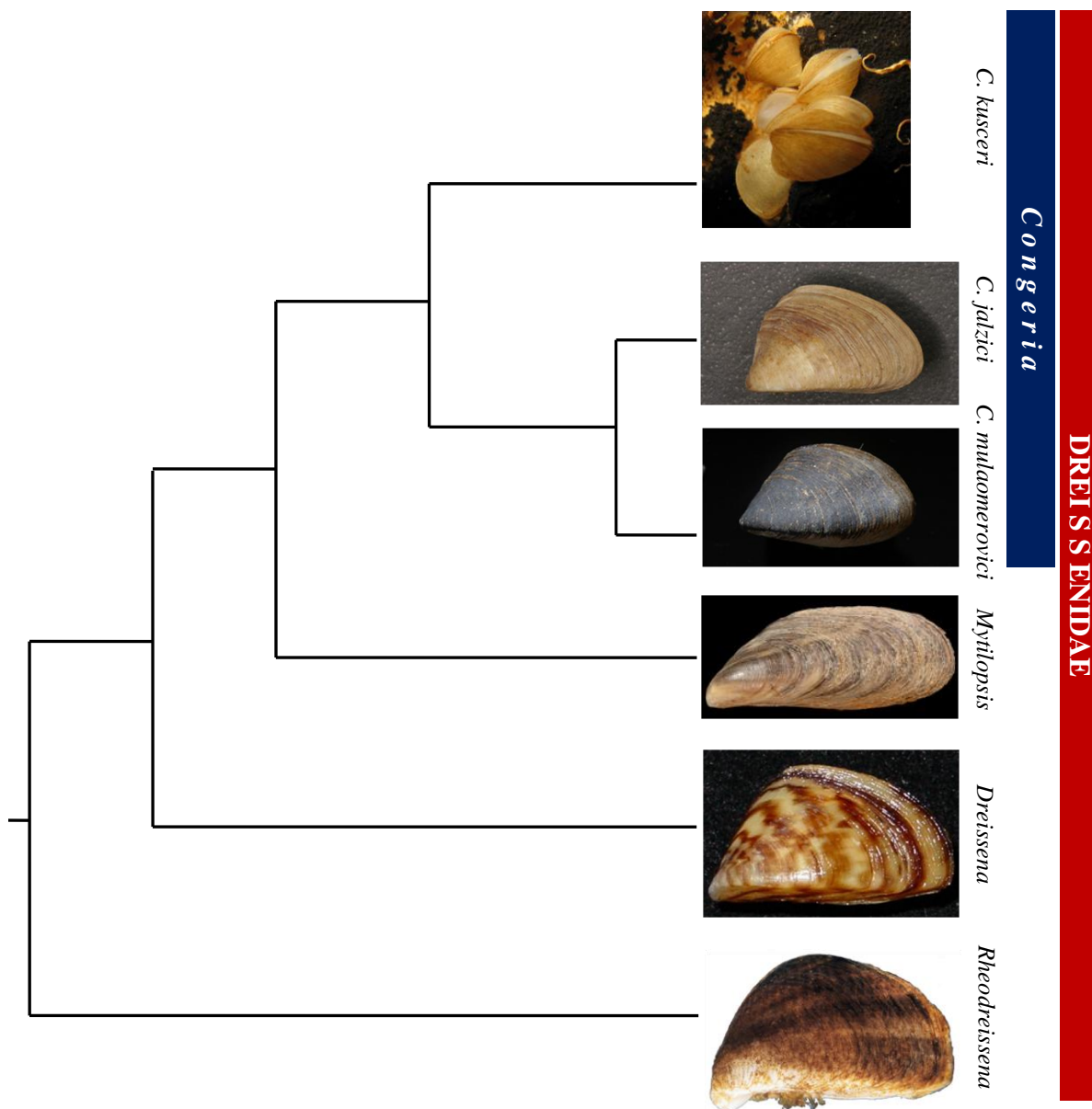
SCHÜTT (1991) opisuje riječnog nadzemnog školjkaša iz Venezuele kao novu živuću svojtu roda *Congeria* pod nazivom *C. hoeblichii*. Molekularna filogenetička analiza koju su proveli GEDA *et al.* (2018) snažno podržava ovu svojtu južnoameričkih školjkaša kao sestrinsku skupini koju čine sve ostale svojte porodice Dreissenidae (*Congeria*, *Mytilopsis*, *Dreissena*) potvrđujući srodstvene odnose posljednja tri navedena roda koje su dobili BILANDŽIJA *et al.* (2013a). Za svojtu sestrinsku skupini koju čine svi ostali pripadnici porodice Dreissenidae GEDA *et al.* (2018) uvode novi rod – *Rheodreissena* Geda *et al.*, 2018 pa je originalnom nazivu vrste školjkaša iz Venezuele ime promijenjeno u *Rheodreissena hoeblichii* (Schütt, 1991). Srodstveni odnosi četiriju rodova porodice Dreissenidae, uključujući srodstvene odnose triju vrsta roda *Congeria*, prikazani su kladogramom na Sl. 1.4.



Slika 1.3. Rasprostranjenje triju recentnih vrsta roda *Congeria* u podzemlju dinarskog krša. Brojkama od 1 do 4 naznačene su četiri geografsko-hidrološke regije međusobno hidrološki izolirane. Lokaliteti: I – Izvir Jamske Školjke; M – Markov ponor, L – špiljski sustav Lukina jama–Trojama, DP – Dankov ponor, O – Okno, S – Suvaja, Db – Dabarska pećina; T –Tihaljina, J – Jasna Ponor, P – pukotina u

tunelu Polje Jezero – Peračko Blato, J – Jama u Predolcu, G – Gradnica, Z – Žira, D – Doljašnica, Pl – Plitica.

Preuzeto i prilagođeno prema: BILANDŽIJA *et al.* (2013a).



Slika 1.4. Srodstveni odnosi četiriju recentnih rodova porodice Dreissenidae.

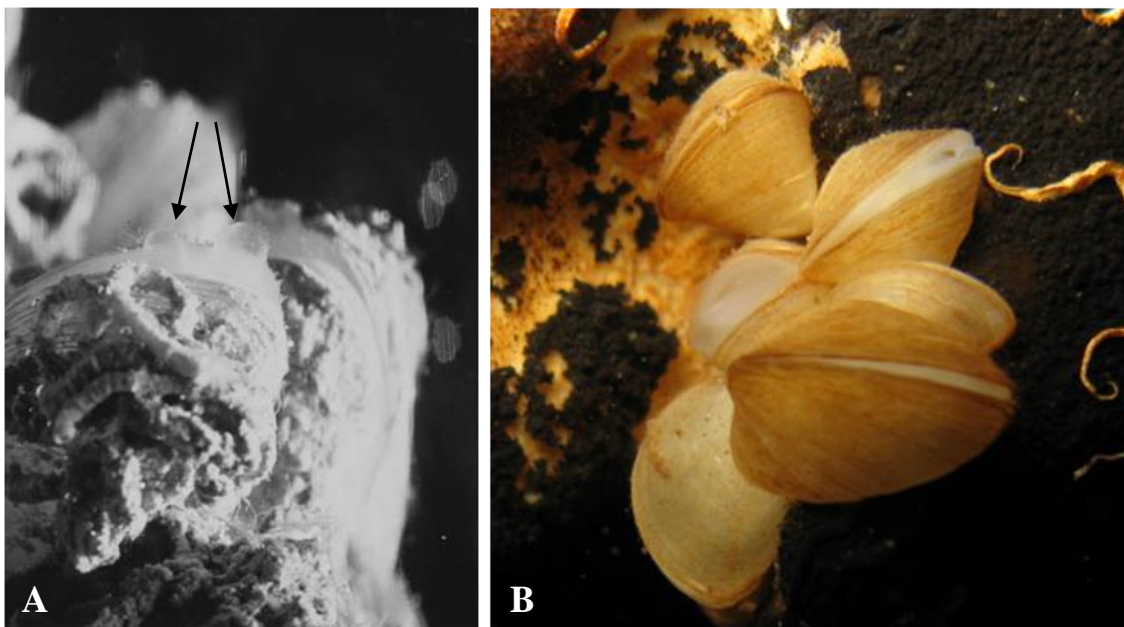
Filogenetički odnosi nacrtani prema: GEDA *et al.* (2018) (sve svojte) te BILANDŽIJA *et al.* (2013a) (sve svojte osim *Rheodreissena*). Među navedenim rodovima samo rod *Congeria* obuhvaća recentne stigobionske vrste.

Autori fotografija: *C. kusceri* (Helena Bilandžija), *C. jalzici* i *C. mulaomerovici* (preuzeto iz: BILANDŽIJA *et al.*,2013a), *Mytilopsis* (Amgueddfa Cymru), *Dreissena* (Amy Benson), *Rheodreissena* (Nathan K. Lujan; preuzeto iz: GEDA *et al.*,2018).

1.2.2. Osnovna obilježja biologije i anatomije školjkaša roda *Congeria*

Biologiju i anatomiju školjkaša roda *Congeria* detaljno su opisali MORTON, VELKOVHRH i SKET (1998) u vrijeme kad su živi primjerci bili dostupni samo iz Bosne i Hercegovine. BILANDŽIJA *et al.* (2013a) za potrebe opisa novih vrsta (*C. jalzici* i *C. mulaomerovici*) detaljno opisuju građu ljuštura i formalno opisuju dvije nove vrste na temelju malih razlika u građi spojnog ligamenta ljuštura. Sve tri vrste zadržale su predački, plesiomorfni oblik ljušture, no zabilježena je i njezina ekofenotipska plastičnost. Pripadnici ovog roda malene su životinje. Na njihovim se ljušturama često mogu naći cijevi mnogočetinaša *Marifugia cavatica* (Sl. 1.5A).

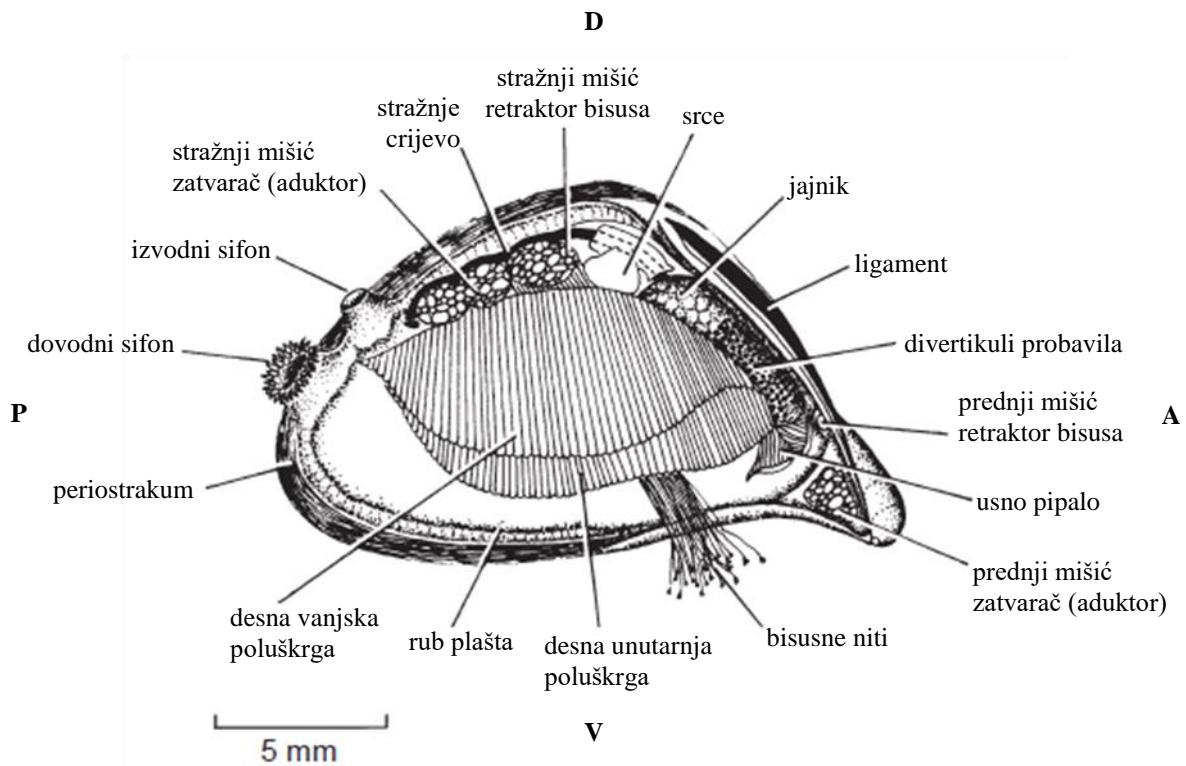
Anatomija životinje vidljiva nakon uklanjanja jedne ljušture i pripadajućeg dijela plašta prikazana je na Sl. 1.6. Obilježja morfologije i anatomije MORTON, VELKOVHRH i SKET (1998) opisuju kao adaptacije na podzemni način života: pripadnici roda *Congeria* imaju bezbojna tkiva (gubitak pigmentacije) (Sl. 1.5B), slabo razvijena osjetila (nemaju fotoreceptore ni statociste, ali imaju osfradij), jednostavnije i kraće probavilo od predstavnika rodova *Mytilopsis* i *Dreissena* (uslijed ograničenog izvora hrane na njihovim staništima), velike škrge (ktenidije) i mala usna pipala (Sl. 1.6.) (isti adaptacijski kontekst: škrge sudjeluju u prehrani školjkaša, a usna pipala ne koriste za odbacivanje hrane koje ionako ima malo) itd.



Slika 1.5. Školjkaš *Congeria kusceri*. (A) Na ljušturama se vide cijevi stigobiontskog mnogočetinaša *Marifugia cavatica*. Strelicama su označeni sifoni (tulajice). (B) Jedinke *C. kusceri* u Jami u Predolcu u Metkoviću. Između rastvorenih ljuštura vidi se bezbojno tkivo.

(A) Preuzeto i prilagođeno prema: MORTON, VELKOVHRH i SKET (1998). Autor fotografije: Boris Sket. (B) Autorica fotografije: Helena Bilandžija.

Jedinstveno obilježje školjkaša ovog roda, primijećeno u sve tri vrste, jest i mogućnost dugog razdoblja preživljavanja izvan vode, na vlažnim špiljskim zidovima. U vrste *C. jalzici* u Markovu ponoru zamijećene su jedinice koje na zidovima iznad vode drže otvorene ljuštore kroz koje proviruju sifoni (tulajice) što ukazuje na njihovu aktivnost (nisu u dormantnom stanju). Ovaj obrazac ponašanja možda im omogućuje skupljanje malih količina vode, npr. kapljica koje padaju sa špiljskog stropa, a koje bi im priskrblyivale otopljeni kisik i čestice hrane (JOVANOVIĆ GLAVAŠ, JALŽIĆ i BILANDŽIJA, 2017).



Slika 1.6. Organi plaštane šupljine vrste *Congeria kusceri* vidljivi nakon uklanjanja desne ljuštore i pripadajućeg plašta.

Oznake: A – anteriorno, P – posteriorno, D – dorzalno, V – ventralno.

Preuzeto i prilagođeno prema: MORTON, VELKOVHRH i SKET (1998).

1.2.3. Biogeografska i evolucijska povijest porodice Dreissenidae

BILANDŽIJA *et al.* (2013a) daju osvrt na evolucijsku povijest porodice Dreissenidae u biogeografskom kontekstu na temelju procijenjenog vremena divergencija sestrinskih skupina metodom molekuskog sata uzimajući u obzir podatke o fosilnim ostacima porodice. Filogenetički kontekst dan je kladogramom na Sl. 1.4.

Procijenjeno vrijeme pojave porodice Dreissenidae (prije 37.4 milijuna godina) odgovara vremenu nastanka mora Paratethys, velikog plitkog euroazijskog mora koje je obuhvaćalo područje središnje Europe i dosegalo do središnje Azije, te vremenu pojave prvih pouzdano interpretiranih fosila ove porodice. Procijenjeno je vrijeme divergencije između predaka živućih predstavnika rodova *Mytilopsis* i *Congeria* prije 22.8 milijuna godina. Danas pripadnike svojte *Mytilopsis* nalazimo uglavnom na obalnim staništima bočatih i slatkih voda subtropskog područja zapadne polutke (Europu ne nastanjuju), a europsko kopno broji mnoge izumrle predstavnike ovog roda (GEDA *et al.*, 2018). Pretpostavlja se da je *Mytilopsis* kolonizirao američki kontinent, a nakon odvajanja svojti *Congeria* i *Mytilopsis* u Europi, na tom je kontinentu rod *Mytilopsis* izumro (BILANDŽIJA *et al.*, 2013a). Procijenjeno vrijeme divergencije od pretka današnjih stigobiontskih vrsta roda *Congeria* jest prije 5.4 milijuna godina, što otprilike odgovara nestanku Panonskoga mora. Moguće je da su predci današnjih živućih predstavnika ovog roda kolonizirali podzemlje dinarskog krša iz Panonskog mora prilikom njegova nestajanja (BILANDŽIJA *et al.*, 2013a).

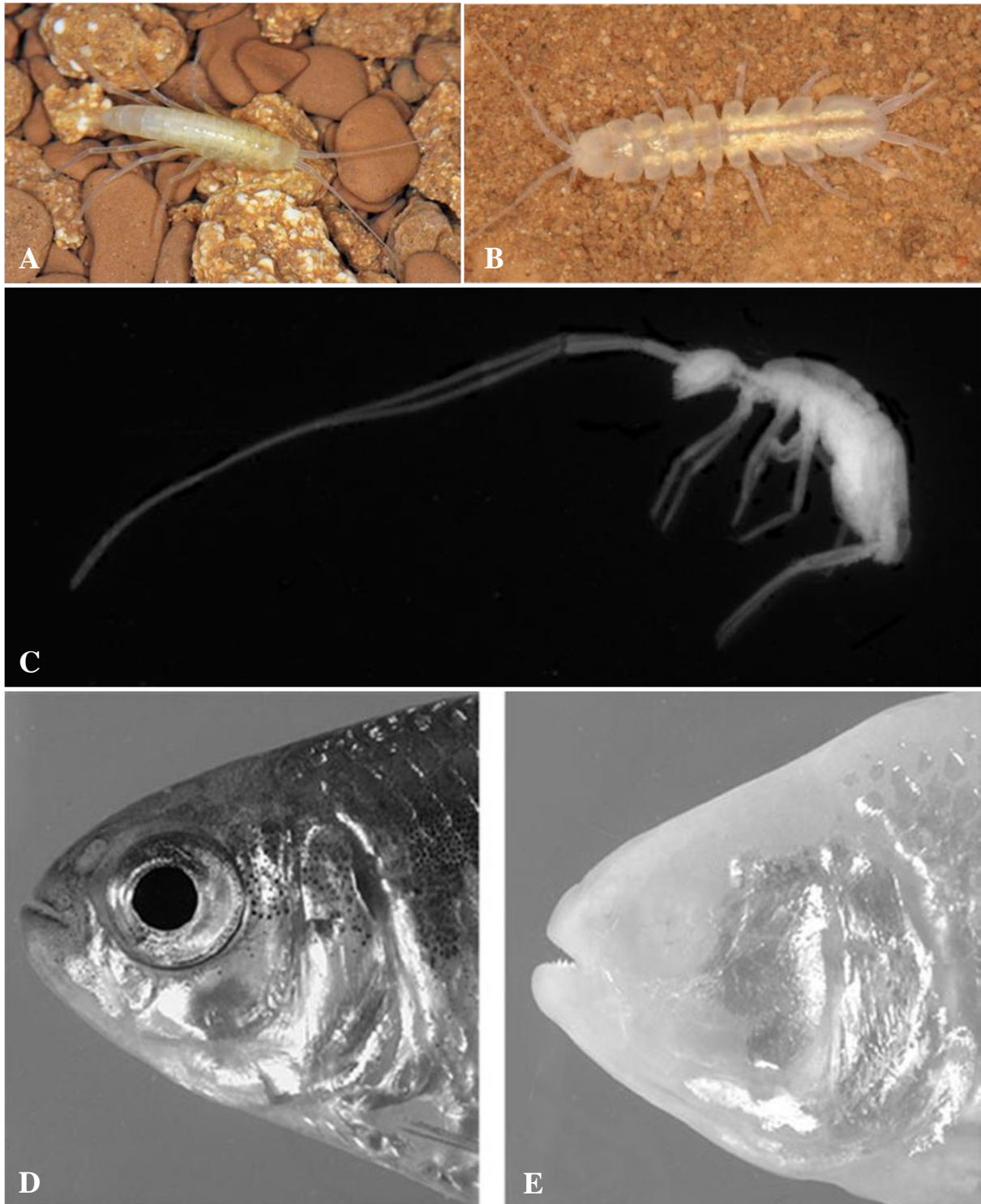
Uključivši u procjenu vremena divergencije unutar porodice Dreissenidae i novoopisanu te molekularno karakteriziranu svojtu *Rheodreissena* (sestrinska skupina skupini (*Congeria*+*Mytilopsis*)+*Dreissena*) (Sl. 1.4.) GEDA *et al.* (2018) dobivaju starije podrijetlo porodice Dreissenidae i procjenjuju starost od 57.8 milijuna godina. Budući da živući predstavnici skupine koja je sestrinska svim ostalim pripadnicima porodice Dreissenidae danas nastanjuje Južnu Ameriku, dvije svojte s američkim predstavnicima (*Mytilopsis* i *Rheodreissena*) dozvoljavaju mogućnost neotropskog podrijetla porodice kao drugu mogućnost uz gore navedeni model europskog podrijetla (GEDA *et al.*, 2018). Ipak, za razliku od američkog kontinenta na kojem nema takvih fosila, Europa je bogata fosilnim nalazima roda *Mytilopsis*. Obje mogućnosti podrazumijevaju dvije preoatlantske migracije (GEDA *et al.*, 2018). Ako je podrijetlo porodice europsko, Ameriku su neovisno kolonizirali *Rheodreissena* i *Mytilopsis*. Ako je podrijetlo porodice neotropsko, Europu je kolonizirao zajednički predak skupine (*Congeria*+*Mytilopsis*)+*Dreissena*, a poslije je *Mytilopsis* iz Europe kolonizirao Ameriku i naposljetku izumro u Europi.

1.3. Osobitosti evolucijskih procesa u podzemlju

Najočitija specifičnost podzemnih staništa s kojom se životinje koje ih naseljavaju suočavaju jest mrak. Podzemne životinje potječu od nadzemnih predaka koji su u podzemna staništa ušli aktivno ili pasivno (npr. strujom vode). Vrste koje koloniziraju špilje u pravilu su noćne životinje koje imaju neke preadaptacije koje im omogućuju preživljavanje u špiljskim staništima (npr. imaju male oči i dobro razvijena osjetila za okus, miris, orijentaciju koja im omogućuju snalaženje u uvjetima potpunog mraka) (WILKENS i STRECKER, 2017). Mnoge životinje koje nastanjuju podzemna staništa pokazuju specifična morfološka obilježja koja nazivamo troglomorfnim obilježjima (CULVER i PIPAN, 2009). Ista troglomorfnost obilježja pojavila su se u različitim svojti neovisno konvergentnom evolucijom.

Razlikujemo progresivna i regresivna troglomorfnost obilježja (Sl. 1.7.). Progresivna su ona koja kompenziraju utjecaj mraka na preživljavanje. Takva su obilježja produljeni tjelesni privjesci koji se koriste kao taktilno sredstvo i pojačana razvijenost osjetila neovisnih o svjetlu, npr. osjetila mirisa i okusa. Regresivna troglomorfnost obilježja uključuju gubitak pigmentacije i regresiju očiju (različitog intenziteta, sve do potpune anoftalmije), no treba imati na umu da nisu svi stanovnici špilja depigmentirani i anoftalmični, npr. od 27 špiljskih populacija koštunjače meksičke tetre (*Asytanax mexicanus*), što je danas najproučavaniji špiljski organizam, samo su tri albino populacije (WILKENS i STRECKER, 2017).

Povijesno, od razmatranja Lamarcka i Darwina do današnjih dana, različitim se evolucijskim konceptima nastojalo objasniti troglomorfnost obilježja životinja. Četiri su osnovne kategorije: teorija pojačane uporabe i neuporabe organa (lamarkizam); ortogenetski pristup (npr. životinje nisu depigmentirane i anoftalmične zato što žive u podzemlju, nego žive u podzemlju jer su depigmentirane i anoftalmične); adaptacionistička paradigma i uloga prirodne selekcije; te tumačenja u skladu s neutralnom mutacijskom teorijom (CULVER i PIPAN, 2009). Danas se u znanosti lamarkizam i ortogenetski pristup ne koriste za objašnjavanje troglomorfije. U objašnjavanju troglomorfnih obilježja navedene kategorije objašnjenja nisu nužno međusobno isključive. Darwin, koji je smatrao da je „prirodni odabir bio najvažniji, ali ne i jedini uzrok preinačavanja“ (DARWIN, 2008:14), imajući, dakle, pluralistički, a ne radikalno selekcionistički pogled na evoluciju (GOULD i LEWONTIN, 1979), razmišljajući o troglomorfnim obilježjima posegnuo je ne samo za prirodnom selekcijom nego i za lamarkističkim tumačenjem. U *Podrijetlu vrsta* piše: „Kad je neka životinja nakon nebrojenih naraštaja tijekom vremena dospjela do najdubljih šupljina, prema mome načinu



Slika 1.7. Neka progresivna i regresivna troglomorfna obilježja. Progresivno obilježje: produljeni tjelesni privjesci. Regresivna obilježja: depigmentacija, anoftalmija. (A) Rakušac *Niphargus rostratus* Sket, 1971 (Arthropoda: Crustacea: Amphipoda); (B) Jednakonožni rak *Proasellus hercegovinensis* (S. Karaman, 1933) (Arthropoda: Crustacea: Isopoda); (C) Neopisani skokun (Arthropoda: Hexapoda: Entognatha: Collembola) iz špilje u Kambodži; (D, E) Meksička tetra, *Astyanax mexicanus* (Actinopterygii: Characidae): jedinka riječne populacije (D) i jedne od tri albino špiljske populacije (E).

Autori fotografija: (A, B) Jana Bedek, preuzeto sa: <http://www.biospeologica-dinarica.org>; (C) Louis Deharveng; (D, E) William R. Jeffery; C – E preuzeto iz: CULVER & PIPAN (2009).

shvaćanja, neuporaba je već više ili manje u potpunosti zbrisala oči, a prirodni je odabir često izveo ostale promjene, primjerice povećao je dužinu ticala ili pipala kao nadomjestak za sljepoću.“ (DARWIN, 2008:123). Smatrao je, dakle, prirodnu selekciju odgovornom za fiksaciju progresivne, ali ne i regresivne osobine.

Od Darwinova vremena do naših dana progresivna obilježja nebrojeno su puta opisana u kontekstu adaptacionističke paradigme, a mnogi primjeri takvih tumačenja dobro su dokumentirani rezultatima detaljnih pokusa i izvođenjem adekvatnih zaključaka tako da nema sumnje da je prirodna selekcija uključena u fiksaciju progresivnih troglomorfnih obilježja. Unatoč dugoj listi neselekcionističkih razmatranja o evoluciji podzemnih životinja, adaptacionistička paradigma veoma je snažna među današnjim biospeleolozima te gotovo svi opisi morfologije podzemnih životinja uključuju raspravu o tome na koji je način dana morfologija adaptivna u nekom okolišu (CULVER & PIPAN, 2009). U mnogim publikacijama razmišljanja o adaptaciji i ulozi prirodne selekcije nisu adekvatno razrađena i često se svode na neprovjerene spekulacije ili tzv. *just-so stories*. *Pričanje priča* umjesto znanstvene strogosti i praksa da se svaka opisiva osobina nekog organizma automatski objašnjava kao adaptacija potaknule su GOULDA i LEWONTINA (1979) na poznatu kritiku takvog, neznanstvenog „adaptacionističkog programa“. To, dakle, nije kritika prirodne selekcije, nego kritika nekritičkog razmišljanja o njoj.

U tumačenju regresivnih obilježja poput depigmentiranosti i redukcije očiju u literaturi se koriste argumenti za i protiv djelovanja prirodne selekcije. Tumačenja iz adaptacionističke perspektive temelje se na dvama čestim argumentima. Prema prvom, prirodna selekcija zaslužna je za regresiju organa (npr. oka) pri čemu je selektivna sila visoka energetska cijena razvoja strukture (npr. vidnog aparata; vidi MORAN, SOFTLEY i WARRANT (2015) za energetske cijene vidnog aparata u koštunjače meksičke tetre, *Astyanax mexicanus*, ali i WILKENS i STRECKER (2017):193). WILKENS i STRECKER (2017) smatraju uobičajeno mišljenje kako su špilje općenito vrlo siromašne hranjivim tvarima nerealnim, a argument o visokoj energetske cijeni razvoja organa neuvjerljivim navodeći primjer tropskih i nekih subtropskih špilja koje mogu obilovati guano ptica i šišmiša i detritusom donesenim strujom vode, a koje nastanjuju mnoge životinje reducirane pigmentacije i očiju. Drugi česti argument je pleiotropija: isti geni uključeni su u evolucijsku regresiju jednih (npr. razvoj oka) i evolucijski progres drugih osobina (npr. pojačani razvitak osjetila okusa; vidi YAMAMOTO *et al.* (2009) za odnos između regresije oka i povećanja veličine čeljusti i broja okusnih pupoljaka u meksičke tetre, ali i WILKENS i STRECKER (2017):194–195). BILANDŽIJA *et*

al.(2013b) istražili su mogućnost tzv. sekundarne pleiotropije kao objašnjenja zašto bi prirodna selekcija odabrala regresiju pigmentacije, odnosno albinizam u meksičke tetre. Svjesni kako polazeći od prirodne selekcije kao moguće evolucijske sile koja generira albinizam „nekoliko mogućih prednosti može biti zamišljeno *a priori*... ali ne postoje dokazi za njih“, dizajnirali su pokus za testiranje hipoteze da albinizam pridonosi povećanoj sintezi molekula kateholaminskog sustava koji je odgovoran za obrasce ponašanja koji bi mogli biti od adaptivne vrijednosti u špiljskom staništu. Kao primjer takvog ponašanja navode smanjeno vrijeme sna koje bi moglo pridonijeti povećanom prikupljanju hrane. Put sinteze melanina i kateholaminski sintetski put povezani su molekulom L-tirozina. U biosintezi melanina u kralježnjaka prvi je korak pretvorba L-tirozina u molekulu L-DOPA što katalizira enzim tirozinaza. Gen *oca2* (*oculocutaneous albinism*) vjerojatno omogućuje dostupnost L-tirozina tirozinazi. U tri od ukupno 27 špiljskih populacija meksičke tetre konvergentno se pojavio albinizam i u sve tri za to je odgovorna mutacija u genu *oca2* (JEFFEREY *et al.*, 2015). Zbog mutacije u tom genu ne dolazi do pretvorbe L-tirozina u molekulu L-DOPA pa se stvara višak L-tirozina koji je dio i kateholaminskog puta koji dovodi do sinteze neuromodulatora (dopamin, norepinefrin, epinefrin) koji utječu na ponašanje. Rezultati pokusa (BILANDŽIJA *et al.*, 2013b) pokazuju značajni porast L-tirozina i neuromodulatora u nehranećem stadiju ličinke i mozgu odraslih špiljskih riba (populacija Pachón) u odnosu na površinske jedinke, dok je utišavanje (engl. *knockdown*) gena *oca2* u embrijima površinske ribe odgodilo razvoj melanofora i podiglo razinu L-tirozina i dopamina. Na temelju ovih rezultata, BILANDŽIJA *et al.* (2013b) i JEFFEREY *et al.* (2015) (ista skupina autora) smatraju da je uloga prirodne selekcije u fiksaciji albinizma u ove vrste moguća. WILKENS i STRECKER (2017) ovu hipotezu smatraju dvojbenom zbog toga što su spomenuti obrasci ponašanja poligenska svojstva i zbog toga što su od 27 špiljskih populacija samo tri albino, a sve populacije pokazuju zajedničke obrasce ponašanja. S druge strane, JEFFEREY *et al.* (2015) smatraju malo vjerojatnim da bi albinizam nastao u tri populacije neovisno mutacijom u istom genu da nije riječ o djelovanju prirodne selekcije. Nastavivši istraživanje moguće adaptivne vrijednosti tzv. sekundarne pleiotropije u meksičke tetre, BILANDŽIJA *et al.* (2018) eksperimentalno su istražili vezu između depigmentacije i otpornosti na anesteziju (AR), što je oblik ponašanja koji su uzeli kao mjeru fiziološke aktivnosti/budnosti/svjesnosti, odnosno mogućnosti odgovaranja na podražaje. Ta je osobina potencijalno veoma važna životinji u mraku špilje za skupljanje hrane i reagiranje na promjene u okolišu. Autori nalaze da je AR veća u albino špiljskim populacijama nego u onima reducirane pigmentacije te obrnuto proporcionalnu vezu između broja melanofora i stupnja AR-a. Utišavanje gena *oca2* u površinske ribe dovelo je do

smanjenja pigmentacije i povećanja AR-a. Polazeći od otpornosti na anesteziju kao oblika ponašanja sličnog, ali ne i identičnog budnosti (reduciranom snu), autori smatraju da je poveznica između melaninskog i kateholaminskog sintetskog puta od potencijalne adaptivne važnosti: mutacija u genu *oca2* dovodi do depigmentacije i povećane količine L-tirozina raspoloživog za sintetski put neuromodulatora poput norepinefrina. Povećana sinteza norepinefrina dovodi do povećane otpornosti na anesteziju, a oblici ponašanja slični tome mogli su biti važna adaptacija prilikom naseljavanja špilja u meksičke tetre.

WILKENS i STRECKER (2017) smatraju da je evolucija regresivnih troglomorfničkih osobina najbolje objašnjena neutralnom mutacijskom teorijom. Prema ovoj teoriji, regresija u evoluciji špiljskih životinja nije posljedica djelovanja selekcije, nego odsustva selekcije. Naime, pretpostavlja se kako je varijabilnost posljedica mutacija i kako se tijekom evolucije pojavljuju i regresivne mutacije. Selekcija uklanja regresivne mutacije koje bi dovele do ugrožavanja funkcije važnoga organa. Budući da oko, npr., u mračnoj špilji nije ni korisno ni štetno (neutralno je), selekcija neće djelovati uklanjanjem regresivnih mutacija jer životinje s funkcionalnim okom u špilji nemaju selektivnu prednost. Nakupljanjem regresivnih mutacija dolazi do regresije strukture. WILKENS i STRECKER (2017) smatraju da je dobar argument u korist ovakvog objašnjenja regresije varijabilnost regresivnih struktura u špiljskih životinja: varijabilnost morfoloških obilježja poput oka i stupnja pigmentacije u špiljskih životinja govori protiv djelovanja selekcije budući da prirodna selekcija smanjuje varijabilnost. NIEMILLER *et al.* (2012) istraživali su rodopsin u porodici koštunjača Amblyopsidae koja sadrži i špiljske svojte. Raspored mutacija odgovornih za gubitak funkcije rodopsina u filogeničkom kontekstu pokazuje da je rodopsin u špiljskih svojti ove skupine izgubio funkciju neovisno tri puta. Autori ustanovljuju da je omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija pet puta veći u špiljskih nego u nadzemnih riba ove porodice i interpretiraju rezultat kao odsustvo djelovanja selekcije na rodopsin u špiljskih riba. U prilog neutralnoj mutacijskoj teoriji, prema kojoj biološki nefunkcionalne osobine koje nisu pod utjecajem selekcije pokazuju genetičku i fenotipsku varijabilnost, ide i veća varijabilnost rodopsina u špiljskih nego u nadzemnih riba ove skupine (NIEMILLER *et al.*, 2012). Prisutnost funkcionalnog rodopsina u nekim špiljskih svojti ove porodice autori smatraju posljedicom relativno nedavne kolonizacije špiljskog staništa od strane nadzemnih predaka. CALDERONI *et al.* (2016) proučavali su melanopsin *opn4m2* u špiljske somalijske koštunjače *Phreatichthys andruzzii* uspoređujući ga s melanopsinom u srodnih vrsta. Melanopsin ove vrste obilježen je mutacijama koje uzrokuju nemogućnost reakcije cirkadijanog sata na svjetlosne podražaje.

Analize koje su autori proveli pokazuju da je melanopsin u ove špiljske svojte pod relaksiranom selekcijom te autori postavljaju hipotezu kako je neutralna evolucija nastupila zbog toga što je prirodna selekcija prestala djelovati na očuvanje sustava (reakcija cirkadijanog sata na svjetlo) koji je nefunkcionalan u mraku.

Zanimljive su Darwinove misli iz *Podrijetla vrsta* koje podsjećaju na postavke neutralne mutacijske teorije: „Na udar prirodnog odabira neće doći varijacije koje nisu ni korisne ni štetne...“ (DARWIN, 2008:74); „Kad bi se, na primjer, moglo dokazati da svaki dio organizacije teži da se mijenja više u smjeru smanjivanja nego u smjeru povećavanja, mogli bismo razumjeti kako neki organ, koji je postao nekoristan, može biti učinjen rudimentarnim, neovisno o djelovanju neuporabe i kako da najzad bude potisnut: jer varijacije u smjeru smanjivanja prirodni odabir ne bi dalje provjeravao.“ (DARWIN, 2008:414). Ovo je još jedan primjer Darwinova evolucijskog pluralizma.

Još jedno pitanje na koje znanstvenici daju različite odgovore jest koliko je vremena potrebno za uspostavljanje troglomornih obilježja. CULVER i PIPAN (2009) navode kako je vrijeme potrebno za uspostavu adaptacije prema izračunima korištenjem metode molekulskog sata u rasponu od nekoliko milijuna godina. Naravno, vrijeme potrebno za promjene nije u svakom kontekstu jednako. Npr., nadzemna meksička tetra (*Astyanax*) predstavlja iznimku među vrstama koštunjača koje su nastanile špilje zbog toga što za razliku od drugih vrsta nije noćna vrsta. Tijekom pasivnog naseljavanja špilja u sjevernom Meksiku, površinska riba bila je podvrgnuta nagloj i brznoj promjeni iz svjetla u potpuni mrak (WILKENS i STRECKER, 2017). Bilandžija *et al.* (neobjavljeni rezultati) stavili su površinsku meksičku tetru u uvjete mraka i nakon jedne generacije dobili fenotip koji se inače povezuje s adaptacijama na podzemni način života koje nastaju tijekom dugog evolucijskog vremena (povećano nakupljanje masti, hormonalne promjene, povećana otpornost na gladovanje itd.). Nasljeđivanje ovih stečenih fenotipskih osobina u sljedećim generacijama autori identificiraju kao primjer procesa koji je Conrad Waddington nazvao genetičkom asimilacijom. WADDINGTON (1953) je eksperimentalno na vinskih mušicama pokazao da okolišni šok može izazvati fenotipsku promjenu u organizmu koja se uz djelovanje (umjetne) selekcije nakon određenog broja generacija javlja u visokoj frekvenciji bez ponovljenog okolišnog poticaja. Prema WADDINGTONU (1953), „naslijeđena osobina“ inkorporira se u genetički ustroj što pokazuje da prirodna selekcija ne djeluje samo na povećanje frekvencije adaptivno vrijedne osobine nego odabire i stabilizaciju njezina razvitka, a takva fenotipska promjena poligenska je. ROHNER *et al.* (2013) proučavali su, u kontekstu naseljavanja špilje od strane meksičke tetre,

potencijalnu važnost kriptične varijabilnosti u veličini oka koja se fenotipski manifestira u uvjetima okolišnog stresa. Pokus ima postavke utemeljene na klasičnom Waddingtonovu pokusu. Autori su embrije površinske ribe tretirali inhibitorom radikalom (čimbenik stresa u pokusu) koji je doveo do inhibicije proteina temperaturnog šoka HSP90 i do fenotipske manifestacije dotad kriptične varijabilnosti u veličini oka. Umjetnom selekcijom odabrali su za križanje jedinke najmanjih očiju te u F₂ generaciji dobili jedinke malih očiju i veličine orbite (očne šupljine) u odnosu na kontrolnu skupinu, što implicira da je došlo do nasljeđivanja malih očiju bez prisutnosti stresa (radikola) (ROHNER *et al.*, 2013). Upotrijebivši kao čimbenik stresa vodu najmanjeg konduktiviteta zabilježenog u špiljama u kojima meksička tetra dolazi, zabilježili su nadregulaciju proteina HSP90 na isti način kao i pri tretiranju inhibitorom. Dakle, iako se regresivne mutacije najčešće pojavljuju *de novo* i nasumično nakon što površinska svojta naseli špilju (WILKENS i STRECKER, 2017), moguća je i važna uloga kriptične varijabilnosti koja se fenotipski manifestira u uvjetima okolišnog stresa (kakav bi se očekivao pri naseljevanju mračnog podzemnog staništa), a ta varijacija potom može biti objekt djelovanja prirodne selekcije (ROHNER *et al.*, 2013). S druge strane, prema WILKENSU i STRECKERU (2017), zastupnicima neutralne mutacijske teorije, bilo da je riječ o kriptičnoj varijabilnosti ili *de novo* mutacijama, aleli su u uvjetima potpunog mraka neutralni.

1.4. Tirozinaza i pigmentacija u školjkaša

1.4.1. Uloga tirozinaze u biosintezi melanina

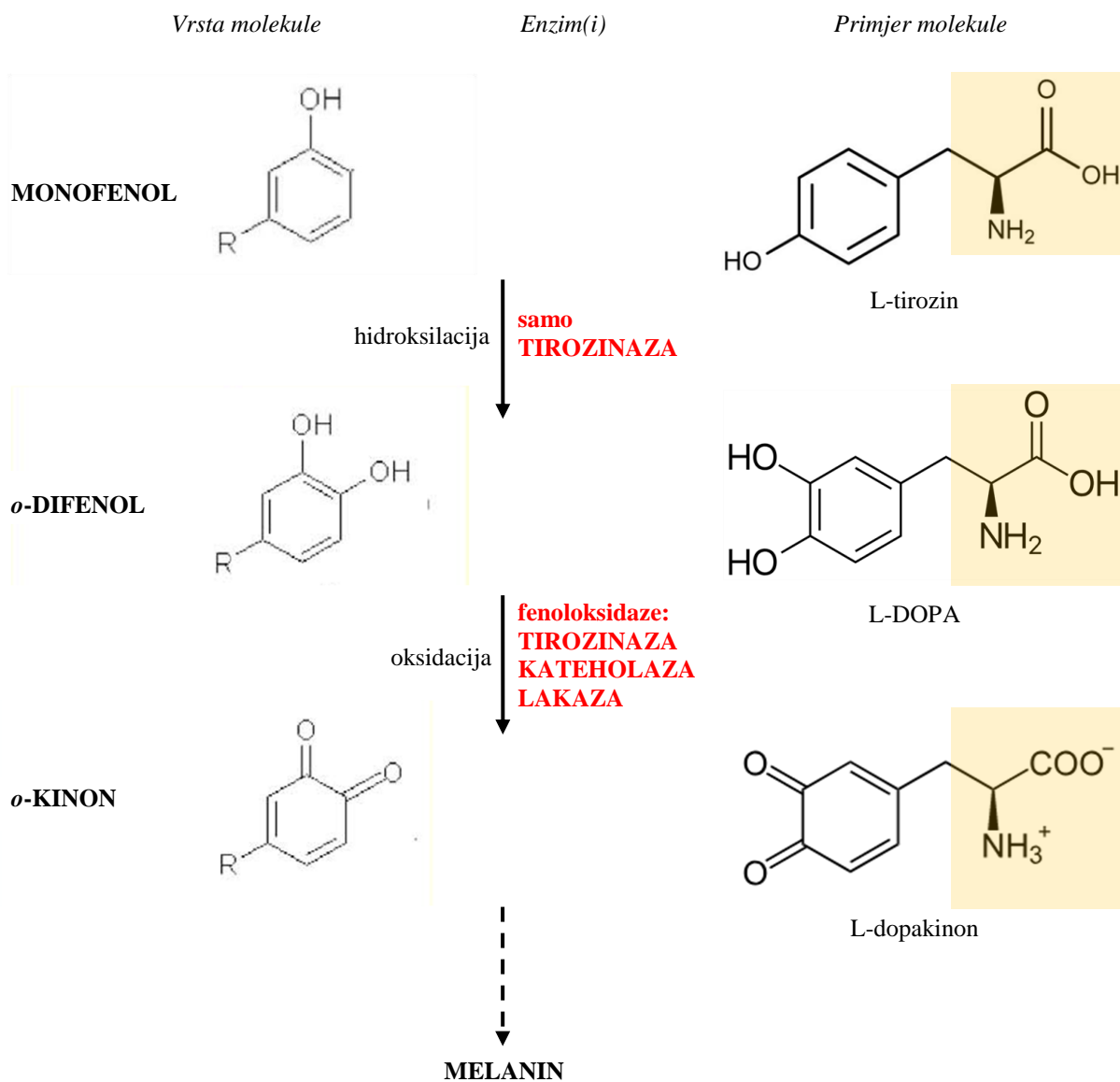
Pigmentacija u životinja ima različite funkcije među kojima su zaštita od štetnog UV-zračenja, zaštitna ili aposemantička obojenost, privlačenje potencijalnih partnera za razmnožavanje. Životinje podzemnih staništa, od kojih su mnoge depigmentirane, ne trebaju ove funkcije budući da žive u uvjetima mraka (BILANDŽIJA *et al.*, 2017).

Mekušci imaju pigmentirana tkiva i ljuštore, a među njihovim pigmentima je i melanin. Melanin u mekušaca dolazi u dva oblika, kao eumelanin (smeđi ili crni pigment) i feomelanin (crveni, žuti ili smeđi pigment), nađen u mnogoljušturaša (WILLIAMS, 2017). Biosintetski put melanina najbolje je istražen u kralježnjaka. Prvi korak je hidroksilacija L-tirozina u L-3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA) i katalizira ga enzim tirozinaza. L-DOPA se dalje oksidira u L-dopakinon i nakon niza intermedijernih produkata sintetizira se melanin (BILANDŽIJA, ČETKOVIĆ i JEFFEREY, 2012). Potpuni biosintetski put melanina u mekušaca nije poznat, ali tirozinaza je vjerojatno jedan od najvažnijih enzima u njemu (WILLIAMS, 2017).

Tirozanaze, kateholaze i lakaze tri su skupine enzima koje zajedničkim imenom zovemo fenoloksidaze. U literaturi se nerijetko upotrebljavaju neprecizni pojmovi, npr. pojmovi „tirozinaze“ i „fenoloksidaze“ koriste se kao sinonimi, iako to nisu (LUNA-ACOSTA *et al.*, 2017). Fenoloksidaze su metaloproteini (bakar-vezujući proteini) i oksidoreduktaze (kataliziraju oksidaciju fenolnih spojeva u prisustvu kisika). Tirozinaze, kateholaze i lakaze kataliziraju oksidaciju *o*-difenola (kateholazna ili difenoloksidazna aktivnost), no samo tirozinaze mogu katalizirati ortohidroksilaciju monofenola (krezolazna ili monofenoloksidazna aktivnost) (LUNA-ACOSTA *et al.*, 2017), što je prikazano na Sl. 1.8. Dakle, samo tirozinaza može katalizirati hidroksilaciju L-tirozina u molekulu L-DOPA, prvi korak u biosintetskom putu melanina, dok sljedeći korak, oksidaciju L-DOPA → L-dopakinon (obojeni spoj) mogu katalizirati sve tri skupine fenoloksidaza (Sl. 1.8.). Isprekidana crta na Sl. 1.8. predstavlja niz reakcija koje naposljetku dovode do sinteze melanina.

Supstrati fenoloksidaza brzo se autooksidiraju u prisutnosti kisika, bez prisutnosti enzima, zbog čega je u mjerenju fenoloksidazne aktivnosti u pokus potrebno uključiti i reakcije autooksidacije (u odsutnosti enzima) (LUNA-ACOSTA *et al.*, 2017).

Fenoloksidaze u školjkaša uključene su u stvaranje obojenih proteina u plaštu, škragama i stopalu te u izgradnju i popravak ljuštura (LUNA-ACOSTA *et al.*, 2017). U Tablici 1.1. navedena je uloga fenoloksidaza u različitim tkivima školjkaša.



Slika 1.8. Enzimatska aktivnost fenoloksidaza i biosintetski put melanina. Prikazane su vrste reakcije koju katalizira samo tirozinaza te reakcija koju mogu katalizirati sve tri skupine fenoloksidaza. Desno su navedeni konkretni kemijski spojevi početnog dijela biosintetskog puta melanina. Hidroksilaciju L-tirozina u molekulu L-DOPA katalizira isključivo tirozinaza. Isprekidanom strelicom naznačen je niz reakcija koji naposljetku dovodi do sinteze melanina.

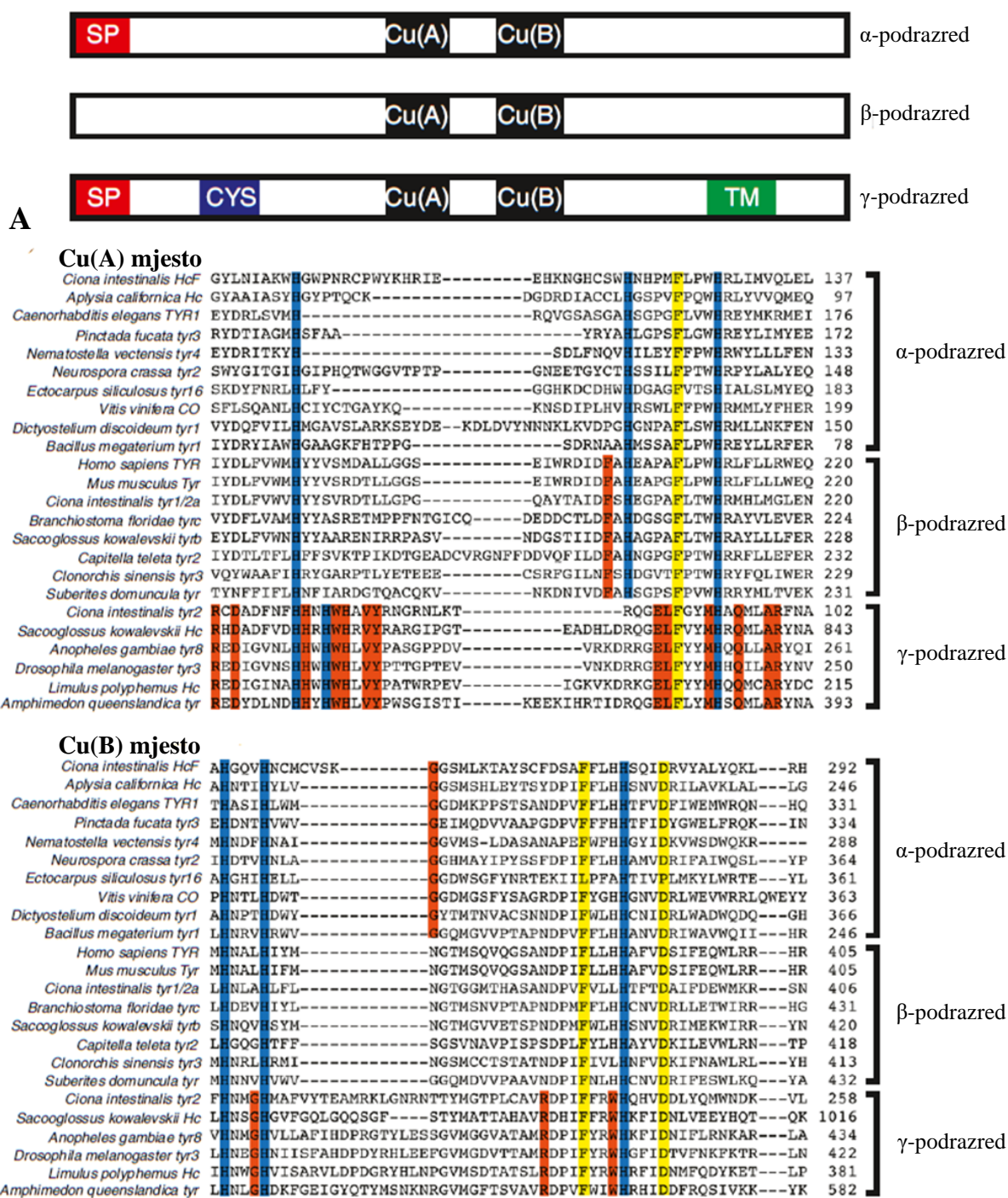
Tablica 1.1. Uloga fenoloksidaza u školjkaša. Navedeno prema: LUNA-ACOSTA *et al.*, 2017.

Tkivo/organ	Uloga fenoloksidaza
plašt i ljuštura	proizvodnja i popravak ljušture
škrge	dopamin je potencijalni inhibitor trepetljivih vlakana u škragama; reakcijama koje kataliziraju fenoloksidaze troši se dopamin
stopalo	pričvršćivanje za podlogu zahvaljujući obojenim proteinima u čijoj sintezi sudjeluju fenoloksidaze
hemociti i plazma	imunološka uloga

U posljednje vrijeme u više je vrsta školjkaša eksperimentalno pokazana vrlo vjerojatnom uloga tirozinaze u izgradnji ljuštore (školjke) i pigmentaciji. NAGAI *et al.* (2007) lokalizirali su ekspresiju tirozinaze (*Ptf1* i *Ptf2*) u vrste *Pinctada fucata*. Obrazac ekspresije u epitelu plašta sugerira ulogu tirozinaze u biosintezi melanina cijele ljuštore (*Ptf1*), odnosno sedefastog sloja (*Ptf2*) (vidi Sl. 1.2. na kojoj su označeni dijelovi epitela plašta koji stvaraju periostrakum te prizmatični i sedefasti sloj ljuštore). TAKGI i MIYASHITA (2014) proučavali su tirozinazu u vrste *Pinctada fucata*. Na temelju obrasca ekspresije mRNA u dijelu plašta koji proizvodi sedefasti sloj zaključuju da tirozinaza sudjeluje u stvaranju sedefastog sloja. Ekspresiju tirozinaze nalaze i u stopalu, hepatopankreasu i mišićima zatvaračima navodeći da to sugerira da tirozinaza sudjeluje u sintezi melanina koji uklanja slobodne radikale koji nastaju u brojnim oksidacijskim procesima u stanici. YU *et al.* (2014) lokalizirali su tirozinazu (*CgTyr1* i *CgTyr2*) u vrste *Crassostrea gigas*. Najveću ekspresiju *CgTyr2* nalaze u rubu plašta što sugerira ulogu u stvaranju periostrakuma/pigmentaciji. CHEN *et al.* (2017) istraživali su tirozinazu (*HcTyr*) i tirozinazi nalik protein (*HcTyp-1*) u vrste *Hyriopsis cumingii* koja obuhvaća jedinke s purpurnim i bijelim sedefastim slojem ljuštore. Tirozinazna aktivnost u plaštu, koji pokazuje najveću ekspresiju ovih gena, veća je u forme s purpurnim sedefastim slojem. Na temelju obrasca ekspresije autori zaključuju da su ovi geni potencijalno uključeni u stvaranje sedefastog sloja (*HcTyr*, *HcTyp-1*) i periostrakuma (*HcTyp-1*) te da su potencijalno uključeni u pigmentaciju sedefastog sloja ljuštura. YU *et al.* (2018) nalaze najveću ekspresiju tirozinaze u vrste *Pteria penguin* u plaštu. Utišavanje tirozinaze RNA-interferencijom dovelo je do značajnog smanjenja ukupnog sadržaja molekula PDCA (pirol-2,3-dikarboksilna kiselina) i PTCA (pirol-2,3,5-trikarboksilna kiselina) koje su marker eumelanina. Autori zaključuju da tirozinaza ove svojte ima ključnu ulogu u sintezi melanina.

1.4.2. Strukturna obilježja i evolucija tirozinaze

Tirozinaze pripadaju bakrovim (bakar-vezujućim) proteinima tipa 3. Svi proteini ove skupine imaju par bakar-vezujućih mjesta u aktivnom mjestu enzima – Cu(A) i Cu(B). Na temelju konzeviranih domena i motiva bakrovi proteini tipa tri podijeljeni su u tri podrazreda. α -podrazred ina N-terminalni signalni peptid što upućuje na sekreciju ili lokalizaciju u vezikulama. β -podrazred nema signalni peptid i lokaliziran je u citoplazmi. γ -razred osim N-terminalnog signalnog peptida posjeduje i regiju bogatu cisteinom te transmembransku regiju koja upućuje na vezanje ovog proteina na citoplazmatsku membranu (AGUILERA, MCDUGALL i DEGNAN, 2013). Shematski prikaz proteina navedenih triju podrazreda dan je na Sl. 1.9A.



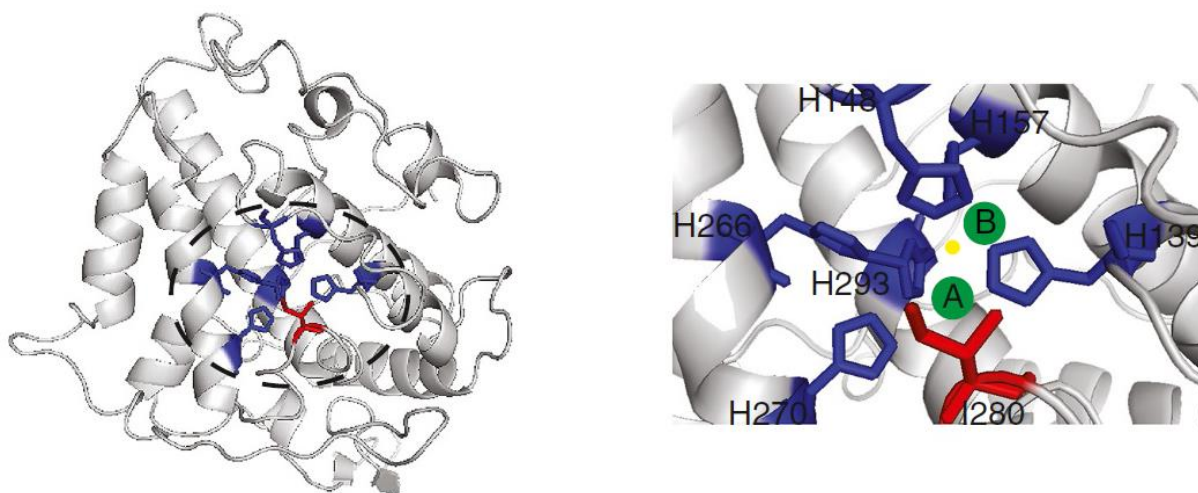
B

Slika 1.9. Strukturna obilježja bakar-vezujućih proteina tipa tri. (A) Shematski prikaz strukture proteina triju podrazreda. Cu(A) i Cu(B) su bakar-vezujuća mjesta aktivnog mjesta enzima, SP – signalni peptid, CYS – regija bogata cisteinom, TM – transmembranska regija. Tirozinaze mekušaca proteini su α -podrazreda. (B) Cu(A) i Cu(B) mjesto imaju konzervirane motive karakterističnog rasporeda histidinskih ostataka (označeni plavo): $H_1(n)-H_2(8)-H_3u$ Cu(A) i $H_1(3)-H_2(n)-H_3u$ Cu(B). Žuto su označena još tri karakteristična mjesta konzerviranih aminokiselinskih ostataka, a crveno su označena mjesta aminokiselinskih ostataka konzerviranih karakteristično za pojedinačne podrazrede.

Preuzeto i prilagođeno prema: AGUILERA, MCDUGALL i DEGNAN (2013).

Cu(A) i Cu(B) su bakar-vezujuća mjesta kojima se vežu bakrovi ioni u aktivnom mjestu enzima. Cu(A) mjesto ima konzervirani motiv $H_1(n)-H_2(8)-H_3$ pri čemu je H histidinski ostatak, a n varijabilni broj aminokiselinskih ostataka između prvog i drugog konzerviranog histidinskog ostatka. Konzervirani motiv Cu(B) mjesto je $H_1(3)-H_2(n)-H_3$ (Sl. 1.9B). U sva tri podrazreda nalazimo i konzervirana mjesta aminokiselinskih ostataka fenilalanina (F), četiri mjesta uzvodno od H_3 u Cu(A) i Cu(B), i asparaginske kiseline (D), četiri mjesta nizvodno od H_3 u Cu(B) (Sl. 1.9B). Pojedinačni podrazredi imaju karakteristične aminokiselinske ostatke. Tirozinaze mekušaca pripadaju α -podrazredu koji se odlikuje konzerviranim ostatkom glicina (G) u Cu(B) mjestu (Sl. 1.9.B) (AGUILERA, MCDOUGALL i DEGNAN, 2013). Mjesta konzerviranih histidinskih ostataka potencijalno su važna za strukturnu konformaciju proteina, dok razlike mogu utjecati na preferencije za supstrate (AGUILERA, MCDOUGALL i DEGNAN, 2013).

Na Sl. 1.10. prikazano je aktivno mjesto tirozinaze mekušaca. Prikazano je šest konzerviranih histidinskih ostataka Cu(A) i Cu(B) mjesta, dva bakrova atoma i molekula kisika. Aminokiselinski ostatak koji može blokirati pristup supstratu u aktivno mjesto enzima označen je crveno. U tirozinaza mekušaca na ovom mjestu dolazi aminokiselinski ostatak valina ili izoleucina koji su dovoljno maleni da omoguće dovlačenje supstrata u aktivno mjesto enzima (monofenola u Cu(A)-vezno mjesto i difenola u Cu(B)-vezno mjesto) (AGUILERA, MCDOUGALL i DEGNAN, 2013).



Slika 1.10. Aktivno mjesto tirozinaze mekušaca. Plavo su označena po tri konzervirana histidinska ostatka Cu(A) i Cu(B) mjesta. Zeleno su označeni atomi bakra, a žuto molekula kisika. Crveno je označen aminokiselinski ostatak koji može blokirati pristup supstratu u aktivno mjesto enzima. U Cu(A) mjestu tirozinaza katalizira hidroksilaciju monofenola, a u Cu(B) mjestu oksidaciju *o*-difenola. Prvu navedenu reakciju može katalizirati samo tirozinaza. Preuzeto iz: AGUILERA, MCDOUGALL i DEGNAN (2013).

Filogenetička analiza pokazuje kako je najstariji α -podrazred koji posjeduju eubakterije, arhebakterije i eukarioti, β -podrazred pojavio se unutar eukariota, a γ -podrazred apomorfija je Metazoa (životinja) (AGUILERA, MCDOUGALL i DEGNAN, 2013). Hemocijanini su proteini srodni tirozinazama i također pripadaju bakrovim proteinima tipa tri. Zbog kompleksne organizacije u jedinice i domene u njihovu aktivnom mjestu nema mjesta za fenolne spojeve pa ne mogu katalizirati njihovu oksidaciju. Mali prostor u aktivnom mjestu dovoljan je za vezanje molekule kisika (O_2) pa hemocijanini imaju transportnu i spremišnu ulogu u mekušaca, člankonožaca i plaštenjaka. Hemocijanini mekušaca, člankonožaca i plaštenjaka neovisno su evoluirali od tirozinaza (AGUILERA, MCDOUGALL i DEGNAN, 2013).

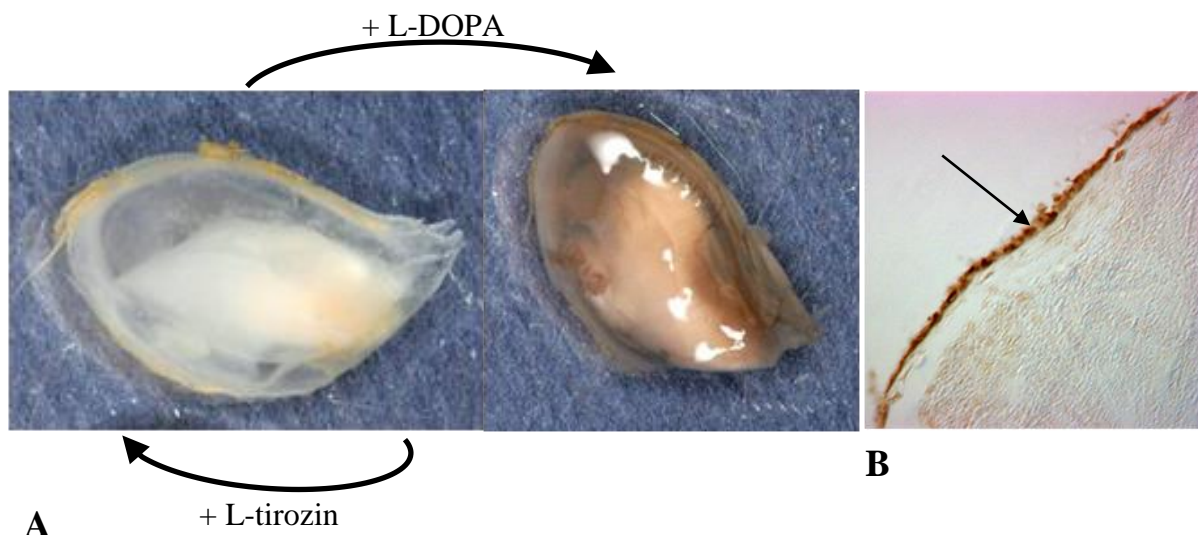
AGUILERA, MCDOUGALL i DEGNAN (2014) proveli su filogenetičku analizu tirozinaze u mekušaca. Sekvence tirozinaza grupirale su se u dva velika kladija koji su autori nazvali TYRA i TYRB. Tirozinaza A bila je prisutna u zajedničkog pretka školjkaša, puževa i glavonožaca, a tirozinaza B apomorfija je razreda Bivalvia. Filogenija koju su dobili podržana je niskom mjerom pouzdanosti za mnoge grane, što autori, kao mogućnost, pripisuju visokoj konzerviranosti aminokiselinskih ostataka bakar-vezujućih mjesta, no jasno razdvaja skupine TYRA i TYRB. Svoje školjkaša *Pinctada* spp. i *Crassostrea gigas* doživjele su značajnu ekspanziju gena za tirozinazu, npr. u svoje *C. gigas* identificirano je 27 različitih formi, potencijalno različitih gena. Za usporedbu, u sipe (*Sepia officinalis*) identificiran je jedan gen za tirozinazu, a u nekih školjkaša i puževa 1 – 2 gena. Usporedba ekson – intron arhitekture gena za tirozinazu pokazuje da nema značajne konzerviranosti unutar i između navedena dva klastera. Autori utvrđuju da je ekspresija tirozinaze u svoji *P. maxima* i *P. margaritifera* značajno viša u plaštu nego u drugim tkivima. Manje ekspanzije tirozinaze karakteristične za pojedine skupine školjkaša dobivene ovom filogenetičkom analizom ostavljaju otvorenom mogućnost da je tirozinazna porodica gena doživjela ekspanziju u više evolucijskih grana mekušaca (AGUILERA, MCDOUGALL i DEGNAN, 2014).

1.4.3. Molekularna pozadina gubitka pigmentacije

Premda je u mnogih podzemnih svojti životinja došlo do gubitka pigmenta u manjoj ili većoj mjeri, molekularna pozadina gubitka pigmentacije (npr. koji korak u biosintetskom putu melanina je promijenjen) slabo je poznata (BILANDŽIJA, ČETKOVIĆ i JEFFEREY, 2012) i postoje podaci za samo nekoliko svojti.

U tri špiljske populacije meksičke tetre (*Astyanax mexicanus*) pojavio se konvergentno albinizam i u sve tri populacije posljedica je mutacije u istom genu (*oca2*), kako je ranije navedeno. Gubitak pigmenta u ove svojte posljedica je promjene u prvom koraku biosinteze melanina (BILANDŽIJA *et al.*, 2013b). U špiljskih cvrčaka iz skupine Fulgoromorpha iz Hrvatske i Havaja albinizam je također posljedica promjene u prvom koraku biosinteze melanina (BILANDŽIJA, ČETKOVIĆ i JEFFEREY, 2012). Autori su proveli pokuse uranjanja fiksiranih životinja u otopine supstrata (L-tirozin, L-DOPA) i inhibitora (PTU, feniltiourea i dr.). Dodatak supstrata L-DOPA doveo je sinteze melanina, a dodatak L-tirozina nije. Korištenjem inhibitora autori su pokazali specifičnost enzimatski kataliziranih reakcija. Enzim koji katalizira prvi korak sinteze melanina u kukaca, tirozin hidroksilaza, prisutan je u špiljskih cvrčaka što znači da je neki nepoznati faktor (ili više njih) uključen u promjenu na prvom koraku sinteze (BILANDŽIJA, ČETKOVIĆ i JEFFEREY, 2012). U albino meksičke tetre tirozinaza, enzim koji katalizira prvi korak biosinteze melanina, također je funkcionalan, no mutacija u genu *oca2* vjerojatno onemogućuje pristup supstrata (L-tirozina) enzimu (BILANDŽIJA *et al.*, 2013b).

Provjera biosinteze melanina dodatkom supstrata prema gore navedenoj metodologiji (BILANDŽIJA, ČETKOVIĆ i JEFFEREY, 2012) provedena je i na stigobionskom školjkašu *Congeria* sp. Ova svojta ima bezbojna tkiva (Sl. 1.5B) i različito obojenu ljušturu (vidi ljušturu na Sl. 1.4. i 1.5B). Budući da dodatak L-tirozina nije doveo do pigmentacije albino tkiva, a dodatak molekule L-DOPA jest (Sl. 1.11.), albinizam u ove svojte također je najvjerojatnije posljedica promjene u prvom koraku biosinteze melanina (Helena Bilandžija, neobjavljeno).



Slika 1.11. Depigmentacija tkiva stigobiontskog školjkaša *Congeria* sp. najvjerojatnije je posljedica promjene u prvom koraku biosinteze melanina. **(A)** Dodatkom L-tirozina, bezbojno tkivo životinje ne oboji se, dok nakon dodatka supstrata L-DOPA dolazi do pigmentacije. Hidroksilaciju tirozina u molekulu L-DOPA, ovdje odsutni prvi korak biosinteze melanina, katalizira enzim tirozinaza. **(B)** Prerez plašta nakon uranjanja životinje u supstrat (L-DOPA). Strelicom je naznačena specifična lokalizacija pigmenta u epitelu plašta.

Autorica fotografija: Helena Bilandžija.

1.4.4. Imunološka uloga melanizacije

Zaštitna uloga melanina u životinja ne obuhvaća samo zaštitu od sunčeva UV-zračenja. Melanin može djelovati u zaštiti stanica od slobodnih radikala koji nastaju oksidacijskim procesima. TAKGI i MIYASHITA (2014) sugeriraju takvu ulogu melanina u školjkaša *Pinctada fucata*.

U člankonožaca se melanizacija pojavljuje kao dio imunološkog odgovora na ranjavanje. BILANDŽIJA *et al.* (2017) uspjeli su izazvati melanizaciju ne samo u nadzemnih nego i u špiljskih albino člankonožaca amputacijom tjelesnih privjesaka. Filogenetički raspored melanizacije kao odgovora na ranjavanje implicira da je ova reakcija ancestralna za člankonošce te da je u nekih skupina sekundarno izgubljena. Postoji mogućnost da su različiti oblici melanizacije, npr. melanizacija kao odgovor na ranjavanje i tjelesna pigmentacija različito regulirani procesi s različitim elementima enzimske mašinerije (BILANDŽIJA *et al.*, 2017).

Pokusi provedeni na školjkašima pokazuju da lakaze, enzimi iz skupine fenoloksidaza, imaju imunološku, antioksidativnu i detoksifikacijsku ulogu u školjkaša zbog čega bi se potencijalno mogli koristiti kao bioindikator okolišnog stresa (LUNA-ACOSTA *et al.*, 2017). Lakaze su, kao i ostale fenoloksidaze, uključene u biosintetski put melanina (Sl. 1.8.).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Cilj istraživanja je identificirati molekularnu osnovu gubitka pigmentacije u stigobiontskom rodu školjkaša *Congeria*. Pripadnici ove svojte imaju bezbojna (depigmentirana) tkiva te je u njih najvjerojatnije došlo do promjene u prvom koraku biosintetskog puta melanina. Reakciju tog koraka katalizira enzim tirozinaza, za koji je iz literature poznato da je važan za pigmentaciju školjkaša. Uspoređivanjem primarne strukture DNA i proteina homologa tirozinaze stigobiontskog i dvaju nadzemnih, pigmentiranih rodova (*Dreissena*, *Mytilopsis*) porodice Dreissenidae cilj je provjeriti je li za gubitak pigmentacije u svojti *Congeria* odgovorna promjena u tirozinazi. Sekvence tirozinaze iz porodice Dreissenidae dosad nisu poznate iz literature.
2. Budući da je tijekom evolucije nekih svojti školjkaša došlo do ekspanzije tirozinaze, cilj je filogenetičkom analizom provjeriti je li tirozinaza i u porodici Dreissenidae doživjela diverzifikaciju.
3. Spektrofotometrijskom analizom na funkcionalnoj će se razini provjeriti aktivnost fenoloksidaza – skupine proteina kojima pripada tirozinaza – iz lizata tkiva pripadnika porodice Dreissenidae (*Congeria*, *Dreissena*). Cilj je usporediti aktivnost fenoloksidaza između stigobiontske i nadzemne svojte školjkaša.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

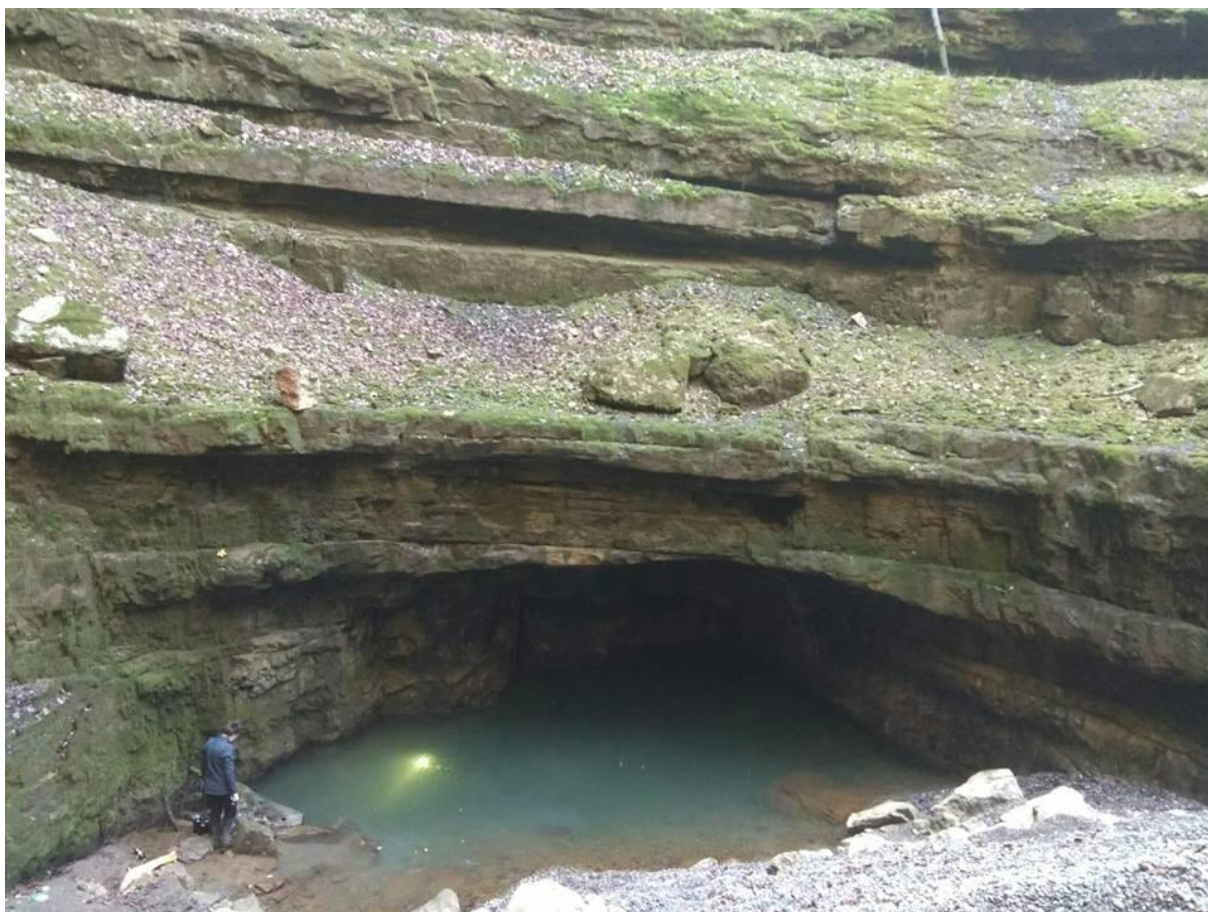
3.1.1. Osnovni materijali: uzorci

U Tablici 3.1. dan je popis uzoraka korištenih u ovome radu uz pripadajuće lokalitete na kojima su uzorci skupljeni. Svojte roda *Congerina* skupljene su biospeleološkim aktivnostima. Svih pet svojti korišteno je za izolaciju RNA (i daljnju sintezu cDNA). Jedinke školjkaša koje su korištene za izolaciju RNA dugoročno su pohranjene u otopini *RNA later*, koja omogućuje zaštitu RNA i sprječava njezinu degradaciju, na temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kratkoročno pohranjene jedinke korištene za izolaciju RNA pohranjene su u otopini *RNA later* i reagensu Trizol (u kojem se tkivo školjkaša kasnije homogenizira). Važno je odgovarajućim priborom (npr. skalpelom) pažljivo napraviti mali otvor između dviju ljuštura kako bi tkivo životinje bilo uronjeno u reagens (*RNA later*/Trizol). Za potrebe spektrofotometrijske analize skupljeni su živi uzorci svojti *C. kusceri*, *C. jalzici* i *Dreissena polymorpha*. Ove su jedinke čuvane žive u hladnoj vodi (temperature oko $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) koja je prikupljena na mjestima njihova uzorkovanja.

Za potrebe skupljanja svježih uzoraka svojte *C. mulaomerovici* za izolaciju RNA, sudjelovao sam u terenskom prikupljanju uzoraka na lokalitetu Oko, Lušci Palanka u sjevernoj Bosni i Hercegovini (Sl. 3.1.). Jedinkama ove svojte, koje je ronilac Branko Jalžić prikupio u plastičnu bocu, skalpelom sam lagano razdvojio ljušturu i spremio školjkaše u laboratorijske tubice (od 2 mL) u reagensu za zaštitu RNA do izolacije iste (*RNA later*/Trizol).

Tablica 3.1. Popis uzoraka školjkaša korištenih u ovome radu i pripadajućih lokaliteta.

Svojta	Lokalitet na kojemu je svojta sakupljena
<i>Congerina jalzici</i>	Markov Ponor, Lipovo polje, Lika (za izolaciju RNA); špiljski sustav Lukina Jama–Trojama, Velebit (za izolaciju RNA); ponor Dražica, Lipovo polje (za spektrofotometrijsku analizu)
<i>Congerina kusceri</i>	Jama u Predolcu, Metković
<i>Congerina mulaomerovici</i>	Oko, Lušci Palanka, sjeverna Bosna i Hercegovina
<i>Dreissena polymorpha</i>	jezero Jarun, Zagreb
<i>Mytilopsis</i> sp.	rijeka Magothy River, Maryland, SAD



Slika 3.1. Ulaz u špiljski sustav na lokalitetu Oko, Lušci Palanka, sjeverna Bosna i Hercegovina. Na fotografiji se vide dr. sc. Helena Bilandžija i svjetlo ronioca i biospeleologa Branka Jalžića s kojima sam sudjelovao u prikupljanju uzoraka svojte *Congerina mulaomerovici*.

3.1.2. Osnovne kemikalije

- voda za PCR (mQ)
- voda bez RNaza (*RNase free water*) za izolaciju RNA i sintezu cDNA
- agaroz (Sigma-Aldrich)
- agar – *Bacto Agar* (Difco Laboratoires)
- antibiotik kanamicin (Sigma-Aldrich)
- TRIzol reagens (Invitrogen)
- izopropanol (Invitrogen)
- etanol (Kemika)
- kloroform

- L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) (Sigma-Aldrich)
- feniltiourea (PTU) (Sigma-Aldrich)
- kvašičev ekstrakt – *Bacto Yeast Extract* (Becton, Dickinson and Company)
- tripton – *Bacto Tryptone* (Becton, Dickinson and Company)
- natrijev klorid (Kemika)

3.1.3. Puferske otopine

- za elektroforezu u agaroznom gelu: TAE pufer (0,04 M Tris-acetat, 1 mM EDTA; pH = 8.3)
- za spektrofotometrijsku analizu: Tris pufer (0.1 M Tris HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂; pH = 7.0)

3.1.4. Biljezi i boje

- DNA biljeg za elektroforezu: Gene Ruler, Mass Ruler (Thermo Scientific)
- boja za nanošenje PCR produkata u gel za elektroforezu: *DNA Loading Dye* (6x) (Thermo Scientific)
- boja za nanošenje RNA u gel za elektroforezu: *RNA loading Dye* (2x) (Thermo Scientific)
- etidijev bromid (koncentracija matične otopine: 10 mg/mL)

3.1.5. Enzimi

- otopine za PCR koje sadrže pufer i enzim – DNA polimerazu
 - a) *Phusion High Fidelity Master Mix with HF Buffer* (2x) (New England Biolabs/NEB)
 - b) *PreMix Ex Taq* (2x) (TaKaRa)
 - c) *Ready Mix Taq PCR Reaction Mix* (2x) (Sigma-Aldrich)
 - d) *JumpStart Taq ReadyMix*(2x) (Sigma-Aldrich)
- zasebni DNA polimeraza i pufer za PCR (korišteni za dodavanje 3'-(A)_n repa na PCR produkt koji nije dobiven korištenjem otopine za PCR s *Taq* polimerazom prije TA kloniranja): *TaKaRa LA Taq DNA Polymerase* (5 U/μL) i *10x PCR Buffer with Mg²⁺*(TaKaRa)

3.1.6. Bakterijski soj

Za transformaciju rekombinantnim plazmidom u postupku TA kloniranja korišten je sljedeći bakterijski soj: One Shot TOP10 kemijski kompetentne stanice bakterije *E. coli* (Thermo Scientific) (genotip: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74recA1 araD139* Δ (*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*).

3.1.7. Plazmid

Kao vektor u reakciji ligacije inserta (PCR produkt) i vektora u postupku TA kloniranja korišten je plazmid pCRTM4-TOPO (Thermo Scientific).

3.1.8. Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Za uzgoj transformiranih bakterijskih stanica (*E. coli*) korištena je tekuća ili kruta LB podloga. Tekuća LB podloga pripravljena je u sljedećem sastavu: tripton (10 g/L), kvašćev ekstrakt (5 g/L), natrijev klorid (10 g/L). pH tekućeg LB medija namješten je na 7.0 nakon čega je autoklaviran. Za krutu LB podlogu tekući medij pripremljen je na isti način, ali je prije autoklaviranja dodan i agar (15 g/L). U sastav medija za izradu krute LB podloge dodan je antibiotik kanamicin (konačna koncentracija: 50 μ g/mL). Za reakciju transformacije bakterijskih stanica pri postupku TA kloniranja korišten je S.O.C. medij sljedećeg sastava: 2% tripton, 0.5% kvašćev ekstrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoza.

3.1.9. Oligonukleotidi (početnice za PCR)

U Tablici 3.2. navedeni su naziv, namjena i nukleotidni slijed početnica (engl. *primers*) korištenih za lančanu reakciju polimerazom (PCR) u ovome radu. Značenje degenerativnih baza u degenerativnim početnicama, koje su u nukleotidnim sljedovima u Tablici 3.2. podcrtane, dano je u Tablici 3.3. Imena degenerativnih baza definira Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC). Početnice u osjenčenom dijelu Tablice 3.2. dizajnirane su za potrebe ovoga rada.

Tablica 3.2. Naziv, namjena i nukleotidni slijed početnica korištenih u ovome radu. Početnice u osjenčenom dijelu tablice dizajnirane su za potrebe ovoga rada. Podcrtane su degenerativne baze.

Namjena početnica	Naziv početnice	Nukleotidni slijed
umnožavanje homologa tirozinaze prema kalupu koji čini cDNA školjkaša	TYRA_Drei_F1	5' GAK <u>GT</u> STAYGAAGTAAGGGA 3'
	TYRA_Drei_R1	5' GAR <u>TT</u> GTGRGTGCTYTCC 3'
	TYRA_Drei_F2	5' CGGATATAGGACTCG <u>S</u> CAGGA 3'
	TYRA_Drei_R2	5' <u>S</u> ATTWATATCGGTGTCRCAATA 3'
	TYRA_Drei_F3	5' CAACTGGT <u>W</u> TAAYTATACD <u>G</u> GACAC 3'
	TYRB_Drei_CongF1	5' TCGATAATGACTTGCCACC 3'
	TYRB_Drei_CongR1	5' GTC <u>W</u> ATAAATGCGTGGTGGA 3'
	TYRB_Drei_ZajF2	5' ATGGACAACCCGGTAMACACAAT 3'
	TYRB_Drei_ZajR2	5' TT <u>S</u> CATATATGAATC <u>W</u> AGTGTGTCC 3'
	TYRB_Drei_CongF3	5' GGAGCAATCAATGGCGTC 3'
	TYRB_Drei_DreissF3	5' CAR <u>C</u> ATCC <u>Y</u> CACGAGCAG 3'
	TYRB_Drei_MytF	5' AGACGACTATCCGACGGAGAGAGA 3'
	Overhang	5' GCGTAAGTGACTAGCGTG 3'
sinteza cDNA	Oligo-T + Overhang	5' GCGTAAGTGACTAGCGTGTTTTTTTTTTTTT <u>VN</u> 3'
umnožavanje gena za 18S rRNA (provjera prisutnosti genomske DNA u cDNA)	18S-1	5' CTGGTGCCAGCAGCCGCGG 3'
	18S-4	5' TTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC 3'
PCR na bakterijskim kolonijama (<i>Colony PCR</i>); sekvenciranje fragmenata dobivenih nakon TA kloniranja	M13 Forward (-20)	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
	M13 Reverse	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
provjera prisutnosti DNA u uzorcima RNA	COH	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'
	COL	5' TTGT <u>GR</u> GCTGGCTTGGTG 3'

Tablica 3.3. Značenje IUPAC-ova koda za degenerativne baze u sastavu nukleotidnog slijeda početnica iz Tablice 3.2.

Kod za degenerativnu bazu (IUPAC)	Odgovarajuće baze
D	A ili G ili T
K	G ili T
M	A ili C
N	bilo koja baza
R	A ili G
S	G ili C
V	A ili C ili G
W	A ili T
Y	C ili T

3.1.10. Komercijalno dostupni kompleti

Korišteni su komercijalno dostupni kompleti namijenjeni za:

- sintezu cDNA (iz RNA reverznom transkripcijom)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems);
- pročišćavanje fragmenata DNA iz agaroznog gela
QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- pročišćavanje uzoraka RNA od DNA
DNA-free™ Kit (Ambion)
- pročišćavanje PCR produkata
QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)
- TA kloniranje
TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing(Invitrogen)
- izolaciju plazmidne DNA
QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN)
- određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu
Quick Start Bradford Protein Assay (BIO-RAD)

3.2. Metode

3.2.1. Identifikacija homologa tirozinaze iz transkriptoma korištenjem filogenetički obaviještene anotacije (PIA)

Kako bi se pronašle nukleotidne i proteinske sekvence homologa tirozinaze u pet svojti školjkaša porodice Dreissenidae (*Congeria jalzici*, *C. kusceri*, *C. mulaomerovici*, *Dreissena polymorpha* i *Mytilopsis* sp.), pretražen je transkriptom ovih svojti korištenjem alata nazvanog filogenetički obaviještena anotacija (engl. *phylogenetically-informed annotation*) (PIA) koji predstavlja noviji pristup u korištenju filogenetičkih alata za pretraživanje transkriptoma nemodelnih organizama, a opisali su ga SPEISER *et al.* (2014). Transkriptom navedenih svojti ranije je sekvencirala dr. sc. Helena Bilandžija (neobjavljeno).

Alat PIA optimiziran je za pretragu transkriptoma životinja (Metazoa), a repertoar gena čije je homologe moguće pronaći ovim alatom obuhvaća gene važne za strukturu i funkciju organa osjetljivih na svjetlo i gene uključene u procese povezane sa svjetlošću i fotorepcijom. Među njima su geni važni za fototransdukciju, razvoj oka i drugih fotoreceptora, geni uključeni u cirkadijane ritmove te geni za enzime koji prenose i stvaraju pigmente (melanine, omokrome, pterine, hemove) (SPEISER *et al.*, 2014).

PIA je dostupna javno i besplatno (<http://galaxy-dev.cnsi.ucsb.edu/pia/>) uz upute za korištenje. Za pretraživanje homologa od interesa u transkriptomu neke svojte najprije je potrebno učitati transkriptom te svojte, nakon čega je moguće dobiti odgovarajuće proteinske sekvence ORF-ova (otvorenih okvira čitanja; engl. *open reading frames*). Među ponuđenim genima valja odabrati specifične gene ili skupinu gena čije se homologe u transkriptomu želi pretražiti. Za potrebe ovoga rada odabran je repertoar gena povezan s melaninima budući da su ciljni geni homolozi tirozinaze u školjkašima. Alat PIA koristeći algoritam BLAST pretražuje učitani transkriptom i nalazi ili ne nalazi homologe ciljnog gena (skupine gena). Opcija „tab2trees“ omogućuje dobivanje PDF dokumenta s unaprijed konstruiranim filogenetičkim stablima za pojedine gene iz skupine gena od interesa tako da filogenetičkim stablima pridružuje i nalaze homologa ciljnog gena pronađene u učitanom transkriptomu. Kako izgleda jedno takvo filogenetičko stablo, prikazano je na Sl. 3.2. Ako je PIA pronašla potencijalni homolog/homologe ciljnog gena u transkriptomu, na stablu će ti homolozi biti označeni žutim kružićem i oznakom „QUERY“. Na Sl. 3.2. vide se dva takva nalaza. O pouzdanosti nalaza govori prisutnost oznake „LANDMARK1“ u kladiju u kojem se nalaze nalazi te pouzdanost filogenetičkih odnosa u kladiju koji sadržava oznake „QUERY“ i „LANDMARK1“. Oznaka „LANDMARK1“ označava homolog ciljnog gena u nekom

organizmu u kojem je njegova prisutnost i funkcionalno pouzdano prepoznata: prisutnost ove oznake kao bliskog srodnika nalaza od interesa („QUERY“) upućuje da je nalaz od interesa ortolog ciljnog gena. Pouzdanost filogenetičkih oznaka podrazumijeva da su svojte koje su na stablu prikazane kao najrodnije nalazima („QUERY“) zaista blisko srodne svojti čiji je transkriptom učitani. Za dva nalaza na Sl. 3.2. zadovoljena su ova dva uvjeta (položaj oznaka „LANDMARK1“ i prisutnost blisko srodnih vrsta u kladiju u kojem se oznake „QUERY“ nalaze; nalazi predstavljaju školjkaša *C. kusceri*, a njemu četiri, prema stablu, najrodnije svojte zaista jesu mekušci). Na stablu se mogu pojaviti i oznake „LANDMARK2“ koje predstavljaju srodne sekvence gena/proteina koji imaju drugačiju funkciju od onih od interesa.

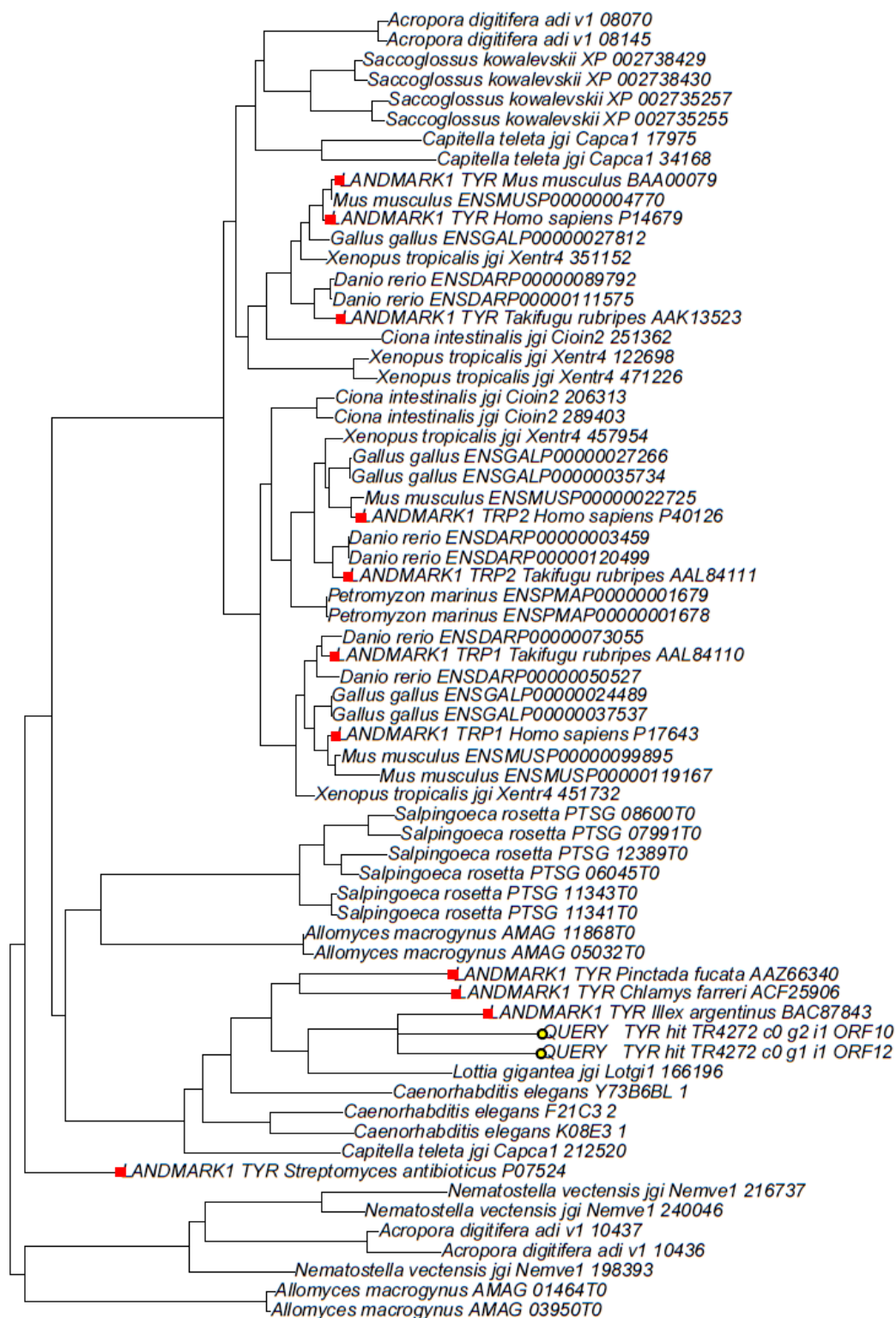
Osim PDF dokumenta s filogenetičkim stablima za različite gene, PIA kao rezultat daje i popis nukleotidnih i proteinskih sekvenci za repertoar gena obuhvaćen ovim alatom. Među njima je moguće pronaći one koji su kao geni/proteini od interesa prepoznati smještajem nalaza na filogenetičkim stablima.

3.2.2. Bioinformatičko provjeravanje rezultata dobivenih alatom PIA

Nukleotidne i proteinske sekvence potencijalnih homologa tirozinaze dobivenih pretraživanjem transkriptoma pet svojti školjkaša korištenjem alata PIA dodatno su provjerene usporedbom s javno dostupnim sekvencama u banci gena (GenBank) uz pomoć algoritma BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Za nukleotidne i proteinske sekvence školjkaša za koje je BLAST potvrdio da pripadaju tirozinazi načinjen je usporedan prikaz slijeda nukleotida te aminokiselina proteinske sekvence korištenjem javno dostupnog alata za prevođenje nukleotidne u proteinsku sekvencu bioinformatičkog portala ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>). Među različitim varijantama otvorenog okvira čitanja (ORF) što se dobiju upisivanjem nukleotidne sekvence, lako je prepoznati pravi ORF koji nakon početne aminokiseline (metionin) i neprekinutog slijeda aminokiselina na kraju ima Stop kodon (u ostalim, neodgovarajućim varijantama ORF-ova slijed aminokiselina isprekidan je više puta Stop kodonima).

Prisutnost signalnog peptida u proteinskim sekvencama provjerena je korištenjem alata SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (PETERSEN *et al.*, 2011). Za korištenje ovog programa potrebno je unijeti proteinsku sekvencu u FASTA formatu. Ukoliko program prepozna signalni peptid, prikazat će proteinsku sekvencu zrelog proteina, s uklonjenim signalnim peptidom. Usporedbom ili poravnanjem ukupne proteinske sekvence i one zrelog proteina dolazi se do aminokiselinske sekvence signalnog peptida na N-kraju proteina.



Slika 3.2. Primjer filogenetičkog stabla dobivenog korištenjem alata PIA.

Prikazano je filogenetičko stablo za tirozinazu (TYR) dobiveno nakon učitavanja transkriptoma školjkaša *Congeria kusceri* i provedene analize u alatu PIA. Dva nalaza označena žutim kružićima i oznakom „QUERY“ predstavljaju potencijalne homologe tirozinaze koje je PIA pronašla u transkriptomu ove vrste. U kladiju u kojem su ovi nalazi prisutni su i oznake „LANDMARK1“ koji predstavljaju homologe tirozinaze funkcionalno prepoznate u navedenim svojstama. Kladij koji čine dva nalaza za *C. kusceri* s ostale četiri svojte ima smislene filogenetičke odnose: ostali organizmi (školjkaši rodova *Pinctada* i *Chlamys*, puž roda *Lottia* i glavonožac roda *Illex*) također su mekušci.

3.2.3. Provjera očuvanosti aktivnog mjesta tirozinaze na razini proteinske sekvence

Dobivene proteinske sekvence potencijalnih homologa tirozinaze poravnate se pomoću alata za poravnavanje Tcoffee (<http://tcoffee.crg.cat/>). Na temelju poravnanja proučen je stupanj očuvanosti inače konzerviranih pozicija pojedinih aminokiselina koje vjerojatno imaju važnu ulogu u strukturnoj konformaciji enzima.

3.2.4. Filogenetička analiza homologa tirozinaze porodice Dreissenidae

Filogenetička analiza homologa tirozinaze provedena je korištenjem metoda maksimalne vjerodostojnosti (engl. *maximum likelihood*) i maksimalne štedljivosti (engl. *maximum parsimony*). Dvije navedene metode te metode udaljenosti (engl. *distance methods*) i bayesovske metode (engl. *Bayesian inference*) četiri su osnovne metode molekularne filogenetike koje je moguće koristiti imajući na raspolaganju ulazne podatke, tj. poravnanje sekvenci čiji se srodstveni odnos želi ispitati (BARTON *et al.*, 2007). Prije same analize metodom maksimalne vjerodostojnosti potrebno je odabrati evolucijski model, dok je metoda maksimalneštedljivosti jedina od četiri navedene metode u kojoj se ne polazi od evolucijskog modela. Korištenjem maksimalne vjerodostojnosti cilj je procijeniti parametre koji maksimaliziraju vjerodostojnost, definiranu jednadžbom, svakog pojedinačnog stabla te izabrati stablo koje ima najveću vjerodostojnost. Korištenjem metode maksimalne štedljivosti (parsimonije) za dani skup podataka (poravnanje sekvenci) procjenjuje se najvjerojatnija ancestralna sekvenca te se izračunava najmanji mogući broj promjena na temelju kojih se može objasniti evolucijski proces zadan određenom topologijom stabla. Između analiziranih stabala izabire se najštedljivije stablo (ono koje implicira najmanji broj promjena), odnosno skupina najštedljivijih stabala.

Kao mjera pouzdanosti za provedene filogenetičke analize koristi se mjera stalnosti (engl. *bootstrap*). *Bootstrap* analiza podrazumijeva veći broj nasumičnih uzorkovanja iz osnovnog seta podataka (poravnanja) pri čemu se u jednom uzorkovanju određeni stupac poravnanja može uzorkovati više puta, što znači da se neki stupci uopće neće uzorkovati. Iz svakog ovakvog pseudouzorka konstruira se stablo, a konsenzus-stablo sadrži grane koje se pojavljuju na većini tako dobivenih stabala. *Bootstrap*, koji se kao brojčana vrijednost pojavljuje uz grananje na stablu, predstavlja postotak u kojem je neka skupina dobivena takvim slučajnim uzorkovanjem (SCHMIDT i VON HAESELER, 2009).

Filogenetička analiza provedena je na 111 proteinskih sekvenci mekušaca koje su poravnate pomoću alata T-Coffee. Poravnanje je dodatno „ručno“ uređeno u programu BioEdit (HALL, 1999; <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) kako bi za

filogenetičku analizu bilo odabrano područje aktivnog mjesta enzima koje sadrži Cu(A) i Cu(B) područja. Aktivno mjesto tirozinaze odabrano je za filogenetičku analizu zbog toga što je u proteinima tirozinaze to najviše konzervirana regija (AGUILERA, MCDOUGALL i DEGNAN, 2014). Odabrana regija na poravnanju je sadržavala 213 aminokiselinskih mjesta. U sastavu 111 proteinskih sekvenci su sekvence porodice Dreissenidae dobivene u ovome radu (17); sekvence tirozinaze karakterizirane i funkcionalno koje su pronađene u literaturi (7) (pristupni brojevi iz baze podataka GenBank za te sekvence dani su u Tablici 3.4.) te sekvence koje su za filogenetičku analizu tirozinaze u mekušaca koristili AGUILERA, MCDOUGALL i DEGNAN (2014), ustupljene ljubaznošću prof. Degnana. U konačni sastav od 111 sekvenci nisu ušle one koje ne pokrivaju u potpunosti odabrano područje od 213 aminokiselinskih mjesta.

Filogenetička analiza metodom maksimalne vjerodostojnosti provedena je u programu MEGA7 (KUMAR, STECHER & TAMURA, 2016) korištenjem postavki koje su koristili AGUILERA, MCDOUGALL&DEGNAN (2014) za filogenetičku analizu tirozinaze u mekušaca: model supstitucije WAG, gama-distribucija, četiri diskretne kategorije, polazak od nasumičnog stabla i 1000 *bootstrap* replika. Ovom metodom provedene su dvije neovisne analize s istim postavkama. U istom programu (MEGA7) provedena je i filogenetička analiza metodom maksimalne štedljivosti uz 1000 *bootstrap* replika.

Poravnanje 111 aminokiselinskih sekvenci tirozinaza mekušaca poslužilo je također i za dodatno provjeravanje očuvanosti inače konzerviranih pozicija aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu enzima u proteinskim sekvencama školjkaša porodice Dreissenidae dobivenim u ovome radu.

Tablica 3.4. Pristupni brojevi za proteinske sekvence tirozinaze školjkaša u kojih su ovi proteini funkcionalno opisani, korišteni za filogenetičku analizu u ovom radu. Navedena je publikacija u kojoj su sekvence pronađene. Uvid u ove publikacije dan je u Uvodu.

Ime svojte	Pristupni broj (GenBank)	Publikacija
<i>Pinctada fucata</i>	AB353113.1	TAKGI i MIYASHITA (2014)
<i>Pinctada fucata</i>	BAF42771.1	NAGAI <i>et al.</i> (2007)
	BAF42772.1	
<i>Pteria penguin</i>	AVI16673.1	YU <i>et al.</i> (2018)
<i>Crassostrea gigas</i>	NP_001292221.1	YU <i>et al.</i> (2014)
	NP_001292226.1	
<i>Hyriopsis cumingii</i>	APC92581.1	CHEN <i>et al.</i> (2017)

3.2.5. Izolacija i provjera izolirane RNA

Ukupna RNA iz pet svojti školjkaša (*Congerja jalzici*, *C. kusceri*, *C. mulaomerovici*, *Dreissena polymorpha*, *Mytilopsis* sp.) izolirana je prema protokolu proizvođača reagensa TRIzol koji je korišten (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf). Postupak se može podijeliti u dva osnovna dijela. Prvi predstavlja liza tkiva (stanica) i odvajanje triju faza od kojih jedna sadrži RNA. Drugi dio predstavlja postupni proces izolacije RNA.

Tkivo školjkaša za izolaciju RNA bilo je pohranjeno u reagensu TRIzol (oko 1000 μ L) ili je iz otopine *RNA later* premješteno, nakon izdvajanja iz ljuštura, u tubice za homogenizaciju u koje je dodan TRIzol. Za homogenizaciju je korišteno 50 – 100 mg tkiva. Tkivo školjkaša u tubicama s TRIzolom homogenizirano je korištenjem ULTRA TURRAX homogenizatora. Između homogenizacija dviju različitih svojti dio uređaja koji uranja u tubicu temeljito je dezinficiran varikinom te ispran destiliranom vodom i obrisan papirom. Tubice cijelo vrijeme stoje na ledu osim pri samom procesu homogenizacije. Dobivenim homogenatima dodano je po 200 μ L kloroforma. Nakon dodatka kloroforma potrebno je tubicu sigurno zatvoriti i snažno protresti 15 sekundi (ovaj korak nije naveden u protokolu proizvođača, a bez njega razdvajanje faza koje slijedi nije uvijek uspješno). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (2 – 3 min) i centrifugiranja (15 min, 12 000 x g, 4 °C) pojavljuju se tri sloja: donji (crveni), interfaza i gornji – bezbojna tekuća faza. Bezbojna gornja faza sadrži RNA te ju je pipetiranjem potrebno prenijeti u novu tubicu pazeći da se ništa od interfaze ili donjeg sloja ne prenese zajedno s njom.

Drugi dio postupka uključuje precipitaciju RNA (nakon dodatka izopropanola), ispiranje RNA etanolom i otapanje RNA u vodi bez RNaza i napravljen je prema protokolu proizvođača. Izoliranu RNA treba pohraniti na –80 °C.

Za potrebe mjerenja koncentracije RNA i provjere RNA elektroforezom u agaroznom gelu pripremljena su za svaku svojtu razrjeđenja 1/10 za koja je korištena voda bez RNaza. Koncentracija razrijeđene RNA izmjerena je korištenjem spektrofotometra *NanoDrop* (Thermo Scientific). Rezultate mjerenja pomnoženi su sa deset kako bi se dobile koncentracije RNA za pet navedenih svojti.

Za analizu RNA elektroforezom u 1,5%-tnom agaroznom gelu primijenjen je sljedeći postupak: 1. uzorci razrijeđene RNA pomiješani su s jednakim volumenom pufera (*RNA Loading Dye*, 2x, Thermo Scientific); 2. kratko centrifugiranje; 3. uzorci su zagrijani na 95 °C 5 min kako bi se razbile sekundarne strukture RNA; 4. još vrući uzorci nanoseni su na gel korištenjem nastavaka za pipete s filterom. Elektroforeza je provedena pri naponu od 100 V.

Lančanom reakcijom polimerazom (PCR) provjerena je čistoća izolirane RNA, odnosno prisutnost genomske DNA u uzorcima RNA. Upotrebene su početnice za umnožavanje gena za podjedinicu citokrom oksidaze u školjkaša porodice Dreissenidae (nazvane COH i COL). Njihove su sekvence dane u Tablici 3.2. U Tablici 3.5. dan je sastav reakcijske smjese, a u tablici 3.6. uvjeti PCR reakcije.

Tablica 3.5. Sastav reakcijske smjese za provjeru prisutnosti DNA u uzorku RNA. Kalup: RNA (*Congerina jalzici*, *C. kusceri*, *C. mulaomerovici*, *Dreissena polymorpha*, *Mytilopsis* sp.); pozitivna kontrola: kalup – cDNA (*C. jalzici*); negativna kontrola: bez kalupa.

Komponenta reakcije	Volumen [μ L] po reakciji
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Ready Mix Taq PCR Reaction Mix (2x)</i>	5,0
početnica za COI (COH)	0,3
početnica za COI (COL)	0,3
kalup	1,0
voda za PCR	3,4
Ukupno:	10 μL

Tablica 3.6. Uvjeti PCR reakcije za provjeru prisutnosti DNA u uzorku RNA.

Korak	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	1:00	1
Denaturacija	94	0:30	30
Prijanjanje	50	0:30	
Elongacija	72	0:30	
Završna elongacija	72	5:00	1

3.2.6. Pročišćavanje RNA uzorka od DNA

U uzorku cDNA svojte *Congerina jalzici* ustanovljena je i genomska DNA zbog čega je uzorak RNA na temelju kojeg je sintetizirana cDNA pročišćen djelovanjem DNaze. Tretiranje RNA napravljeno je korištenjem kompleta *DNA-freeTM Kit* (Ambion) prema uputama proizvođača slijedeći rigorozni tretman (za > 200 μ g nukleinske kiseline/mL). RNA je razrijeđena do koncentracije 0,2 μ g/ μ L (ta je koncentracija pročišćene RNA navedena u Tablici 3.10.). Sastav reakcije za tretiranje DNazom dan je u Tablici 3.7.

Tablica 3.7. Sastav reakcije za tretiranje DNA u uzorku RNA DNazom.

Reagens	Volumen
DNaza I pufer	5,0 μL (= 0,1 V)
rDNaza I	1,0 μL (2 x 0,5 μL)
RNA (<i>C. jalzici</i>) (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	44 μL
Ukupni volumen:	50 μL

Reakcija je lagano promiješana. Prvo je dodano 0,5 μL DNaze te je reakcija inkubirana na 37 °C 30 minuta. Potom je dodano još 0,5 μL DNaze te je reakcija inkubirana na 37 °C 30 minuta. Dodano je zatim 5,0 μL reagensa za inaktivaciju DNaze te inkubirano na sobnoj temperaturi (> 2 min) uz kvrcanje po tubici (radi redisperzije reagensa). Centrifugirano je na 10 000 x g 1 min 30 s. Pročišćena RNA (supernatant) prenesena je u novu tubicu.

Nakon pročišćavanja RNA, PCR-om je provjerena prisutnost genomske DNA u uzorku RNA svojte *C. jalzici*. U Tablici 3.8. dan je sastav reakcijske smjese, a u Tablici 3.9. uvjeti PCR reakcije.

Tablica 3.8. Sastav reakcijske smjese za provjeru prisutnosti DNA u uzorku RNA. Kalup: RNA (*Congeria jalzici*), pozitivna kontrola: kalup – cDNA koja sadrži i genomsku DNA (*C. jalzici*).

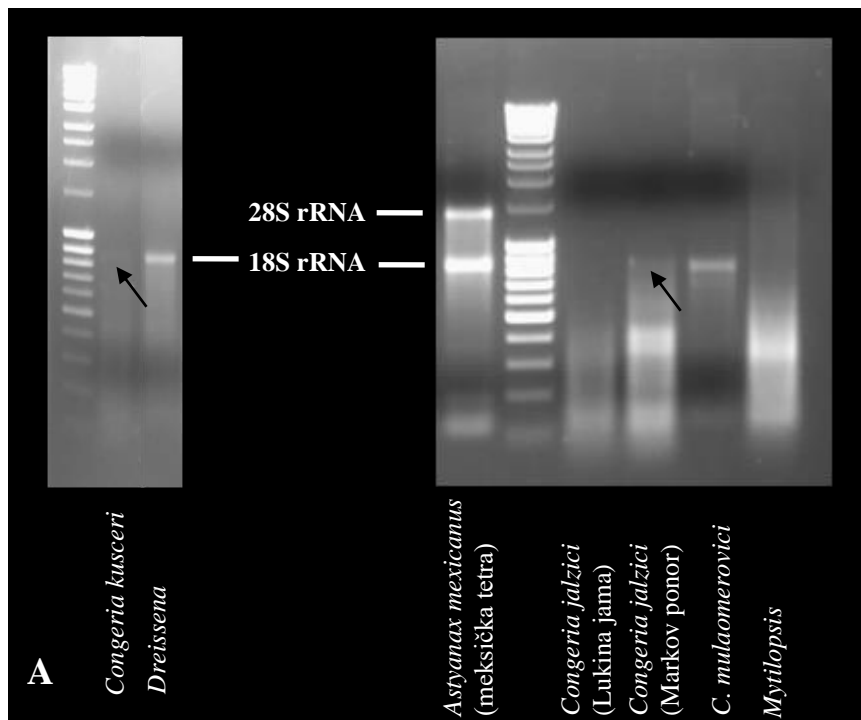
Komponenta reakcije	Volumen [μL] po reakciji
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Ex Taq Mix</i> (2x)	5,0
početnica za COI (COH)	0,3
početnica za COI (COL)	0,3
Kalup	1,0
voda za PCR	3,4
Ukupno:	10 μL

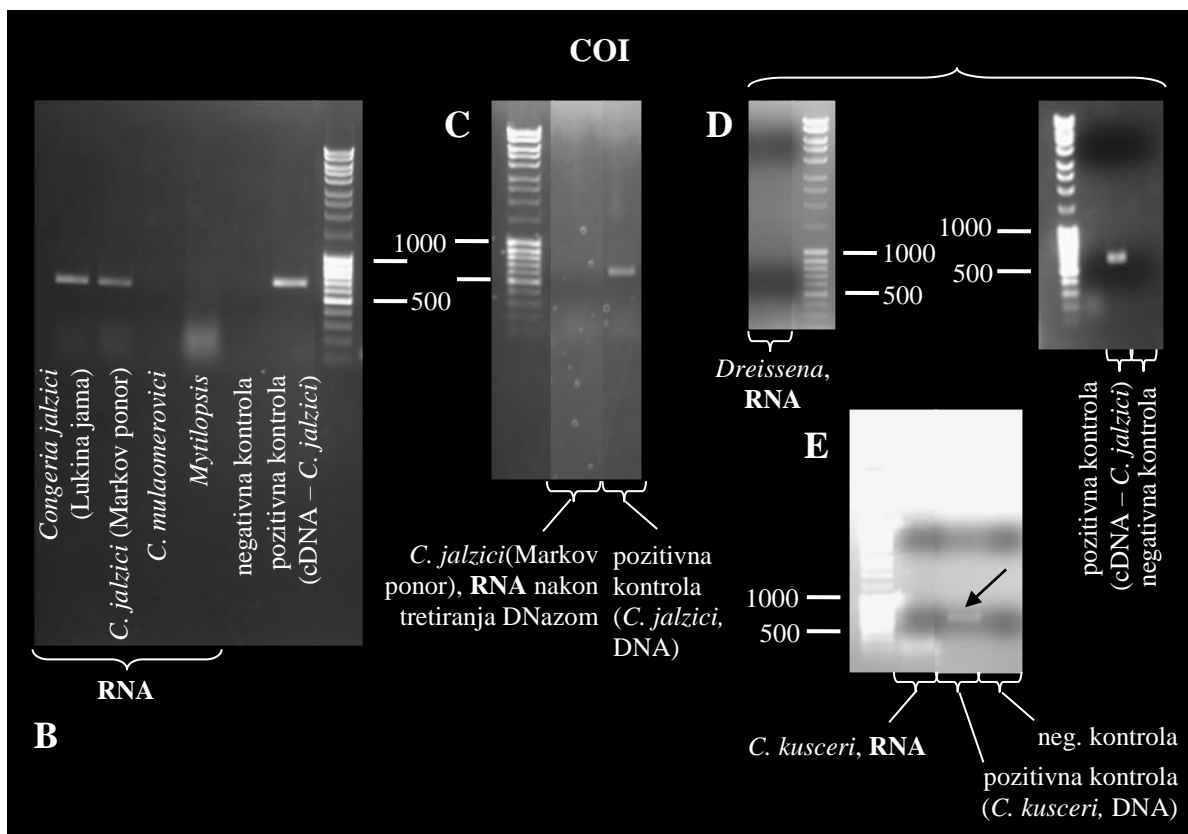
Tablica 3.9. Uvjeti PCR reakcije za provjeru prisutnosti DNA u uzorku RNA (*C. jalzici*).

Korak	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	2:00	1
Denaturacija	94	0:30	30
Prijanjanje	48	0:30	
Elongacija	72	0:45	
Završna elongacija	72	5:00	1

3.2.6.1. Rezultat provjere izolirane RNA elektroforezom u agaroznom gelu

Na Sl. 3.3A prikazan je rezultat elektroforeze u agaroznom gelu. Kao kontrola, prikazane su pruge koje odgovaraju 18S rRNA i 28S rRNA meksičke tetre (*Astyanax mexicanus*) čija je RNA analizirana na istom agaroznom gelu u neovisnom pokusu (dr. sc. Helena Bilandžija). Za sve svojte porodice Dreissenidae čija je izolirana RNA dala pozitivan rezultat na gelu vide se samo pruge za 18S rRNA. Slabije vidljive pruge naznačene su strelicom. Pruga za 18S rRNA dobivena je za jedan od dva uzorka RNA svojte *Congerina jalzici* pa je samo RNA koja je dala pozitivan rezultat iskorištena za sintezu cDNA u ove svojte. *Mytilopsis* sp. jedina je svojta koja ne pokazuje nijednu od dviju očekivanih pruga za rRNA, no taj je uzorak, kao jedini svoje svojte, iskorišten za sintezu cDNA.





Slika 3.3. Provjera izolirane RNA. (A) Rezultat analize izolirane RNA iz pet svojiti školjkaša porodice Dreissenidae elektroforezom u 1,5%-tnom agaroznom gelu. Kontrola: RNA meksičke tetre (*Astyanax mexicanus*) iz neovisnog pokusa (dr. sc. Helena Bilandžija). Pruge 18S rRNA koje se slabo vide naznačene su strelicom. *Mytilopsis* sp. jedina je od pet svojiti školjkaša čija izolirana RNA nije pokazala prugu za 18S rRNA. (B, D, E) Provjera čistoće izolirane RNA u svojiti *Congeria jalzici*, *C. mulaomerovici* i *Mytilopsis* sp. (B), *Dreissena polymorpha* (D) i *C. kusceri* (E). Jedino je RNA svojite *C. jalzici* bila kontaminirana genomskom DNA (B). Uzorak RNA *C. jalzici* pročišćen je DNazom (C) i iskorišten za sintezu cDNA u ove svojite.

3.2.6.2. Provjera prisutnosti genomske DNA u uzorcima RNA

Kontaminacija uzoraka RNA genomskom DNA provjerena je PCR reakcijom korištenjem početnica za umnožavanje gena za podjedinicu citokrom oksidaze (COI) (Sl. 3.3B, D, E). Jedino je RNA svojite *C. jalzici* pokazala kontaminaciju genomskom DNA (Sl. 3.3B). Uzorak RNA koji je pokazao prugu za 18S rRNA u agaroznom gelu (vidi Sl. 3.3A) razrijeđen je i podvrgnut tretmanu DNazom. Dio pročišćene RNA iskorišten je u PCR reakciji s početnicama za umnožavanje podjedinice citokrom oksidaze (COI). Negativan rezultat u uzorku pročišćene RNA i pozitivan u reakciji koja je kao kalup sadržavala DNA upućuje na zaključak da je RNA uspješno pročišćena od DNA (Sl. 3.3C). Pročišćena RNA iskorištena je za sintezu cDNA u svojite *C. jalzici*.

3.2.7. Sinteza cDNA

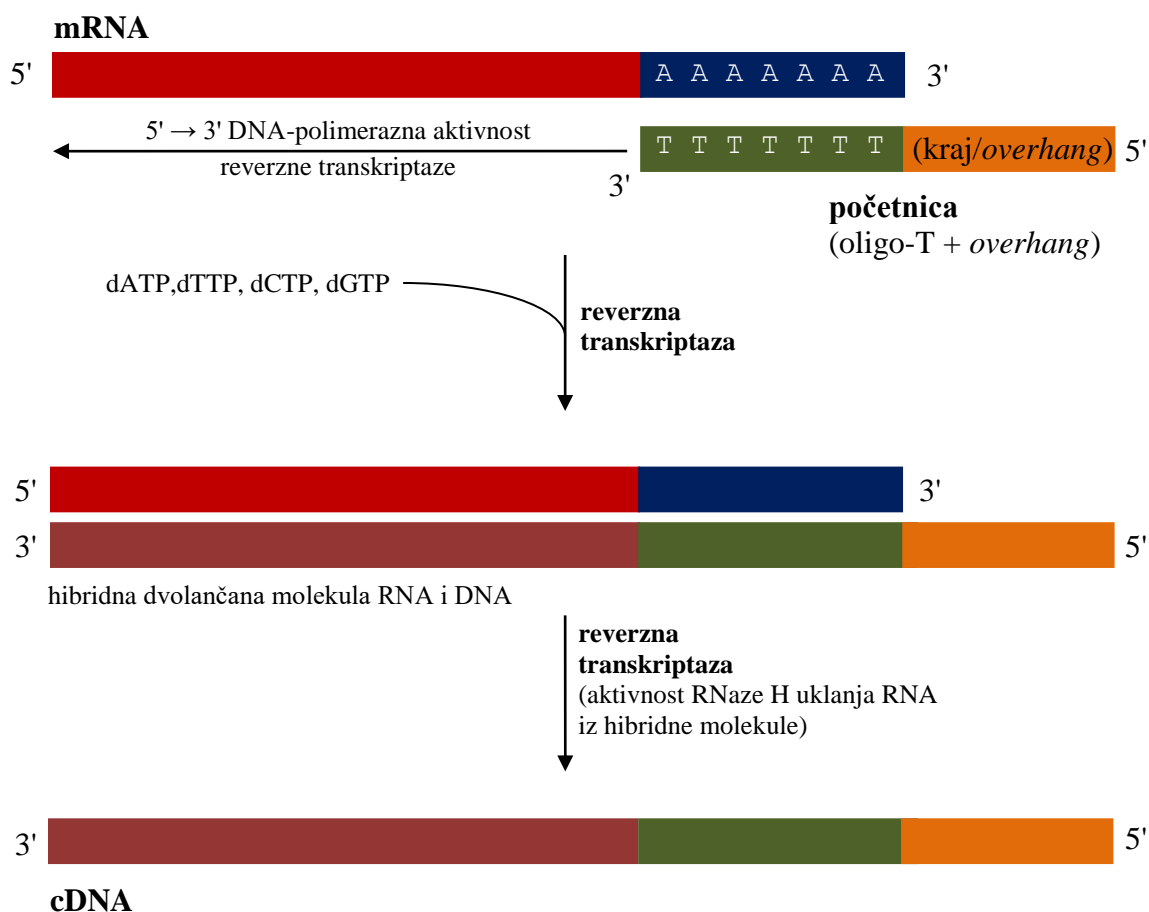
Sinteza cDNA iz izolirane RNA provedena je korištenjem komercijalno dostupnog kompleta *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) korištenjem uputa proizvođača. Korištenjem ovog kompleta na kraju postupka dobiva se jednolančana komplementarna DNA (cDNA). Umjesto nasumičnih početnica korištena je početnica Oligo-T + Overhang čija je sekvenca dana u Tablici 3.2.

Reverzna transkripcija ili obrnuto prepisivanje proces je kojim se molekula RNA djelovanjem enzima reverzne transkriptaze uz prisutnost smjese dNTP-ova prepisuje u molekulu DNA koja se naziva komplementarna DNA ili cDNA. Reverzna transkriptaza je RNA-ovisna DNA polimeraza koja ima dva oblika aktivnosti. Jedan je 5' → 3' DNA-polimerazna aktivnost kojom na temelju nukleotidnog slijeda molekule RNA produžuje početnicu komplementarno sparenu za molekulu RNA i tako sintetizira cDNA, a drugi je aktivnost RNaze H kojom uklanja RNA iz nastale hibridne RNA–DNA molekule (BORDUKALO NIKŠIĆ, 2007a). Ove dvije aktivnosti reverzne transkriptaze prikazane su na Sl. 3.4. koja prikazuje sintezu cDNA prema kalupu koji čini glasnička RNA (mRNA).

Budući da samo mRNA sadrži poli-A produžetak, korištenjem početnice s oligo-T nukleotidnim sastavom sintetizirat ćemo samo cDNA komplementarnu glasničkoj RNA, čiji je udio u ukupnoj staničnoj RNA znatno manji od ribosomske RNA (BORDUKALO NIKŠIĆ, 2007b). cDNA ne sadrži introne.

Budući da za sintezu cDNA nije upotrijebljena oligo-T početnica, već oligo-T + Overhang početnica, moguće je koristiti Overhang početnicu za PCR reakcije u kojima je kalup sintetizirana cDNA te nije potrebno dizajnirati posebnu početnicu komplementarnu 3' kraju sekvence od interesa.

Prema uputi proizvođača u navedenom kompletu za sintezu cDNA, u 10 µL RNA (sa ili bez dodane vode bez RNaza), koje s 10 µL *Master Mixa* čine ukupnih 20 µL reakcije, treba biti manje od 2 µg RNA. Količina RNA korištena za sintezu cDNA dana je u Tablici 3.10.



Slika 3.4. Djelovanje reverzne transkriptaze pri sintezi cDNA. Na slici je, kao i u ovom radu, uzeta početnica koja ima oligo-T mjesto zbog čega će se sintetizirati cDNA samo prema kalupu koji predstavlja mRNA (koja ima poli-A produžetak).

Tablica 3.10. Količina RNA korištena za sintezu cDNA i pretpostavljena koncentracija cDNA.

Svojta	Koncentracija RNA [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Volumen RNA za sintezu cDNA [μL]	Količina RNA u uzorku ($V = 20 \mu\text{L}$) [μg] ($< 2 \mu\text{g}$)	Pretpostavljena koncentracija cDNA [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
<i>Congerija jalzici</i>	0,2	8,0	1,6	0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
<i>Congerija kusceri</i>	0,9013	1,5	1,352	0,068 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
<i>Congerija mulaomerovici</i>	0,8054	2,0	1,61	0,081 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
<i>Dreissena</i>	1,2411	1,2	1,49	0,075 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
<i>Mytilopsis</i>	1,5	1,0	1,5	0,075 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

3.2.8. Provjera prisutnosti genomske DNA u cDNA

Prisutnost genomske DNA u uzorcima cDNA pokazuje da uzorak RNA koji je upotrebljen za sintezu cDNA nije bio čist, već da je sadržavao i genomsku DNA. Dakle, provjera prisutnosti genomske DNA u cDNA provjera je čistoće RNA koja je poslužila kao kalup za sintezu cDNA.

Prisutnost genomske DNA provjerena je u uzorcima cDNA svojti *C. kusceri* i *D. polymorpha* kao dodatna provjera čistoće RNA ranije provjerene kako je opisano u potpoglavlju 3.2.5. Za provjeru prisutnosti genomske DNA u cDNA korištene su početnice za umnožavanje gena za 18S rRNA. U uzorcima cDNA koji sadrže genomsku DNA očekuje se umnožavanje. U uzorcima cDNA koji ne sadrže genomsku DNA ne bi trebalo doći do umnožavanja početnicama za 18S rRNA, budući da je cDNA sintetizirana Oligo-T + Overhang početnicama koje umnožavaju samo mRNA koja ima poli-(A) rep. U Tablici 3.11. dan je sastav PCR reakcije, a u Tablici 3.12. uvjeti PCR reakcije (*Touch Down PCR*). Kao pozitivna kontrola uzeta je genomaska DNA svojte *Mytilopsis*.

Tablica 3.11. Sastav reakcijske smjese za provjeru prisutnosti genomske DNA u cDNA. Kalup: cDNA (*C. kusceri*, *D. polymorpha*), pozitivna kontrola: kalup – genomaska DNA (*Mytilopsis*).

Komponenta PCR reakcije	V [μ L] po reakciji
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Ready Mix (Sigma Jump Start Taq)</i> (2 x konc.)	5,0
F početnica za 18S rRNA [10 μ M] [konačna konc.: 0,3 μ M]	0,3
R početnica za 18S rRNA [10 μ M] [konačna konc.: 0,3 μ M]	0,3
kalup (cDNA/genomaska DNA)	0,3
voda za PCR	4,1
Ukupno:	10 μL

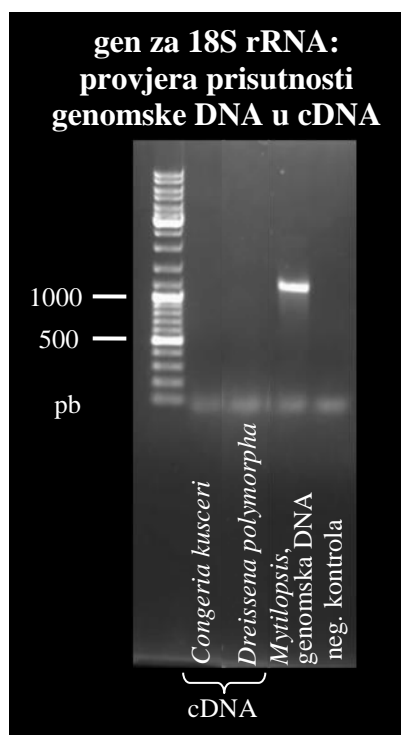
Tablica 3.12. Uvjeti PCR reakcije (*Touch Down PCR*) za provjeru prisutnosti genomske DNA u cDNA.

Korak	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	2:00	1
Denaturacija	94	0:30	3
Prijanjanje	65	0:30	
Elongacija	72	1:00	
Denaturacija	94	0:30	3
Prijanjanje	60	0:30	
Elongacija	72	1:00	

Denaturacija	94	0:30	30
Prijanjanje	55	0:30	
Elongacija	72	1:00	
Završna elongacija	72	5:00	1

3.2.8.1. Rezultat provjere prisutnosti genomske DNA u uzorcima cDNA

Kao dodatna provjera čistoće uzoraka RNA svojti *C. kusceri* i *D. polymorpha*, provedena je PCR reakcija za umnožavanje gena za 18S rRNA. Pozitivan rezultat očekuje se u uzorku koji sadrži genomsku DNA, a negativan u uzorku koji sadrži samo cDNA zato što je cDNA za potrebe ovoga rada sintetizirana prema kalupu koji predstavlja mRNA (korištenjem Oligo-T + Overhang početnice). Na Sl. 3.5 prikazan je rezultat provjere koji pokazuje da uzorci sintetizirane cDNA ne sadrže genomsku DNA (18S rRNA umnožila se samo u reakciji pozitivne kontrole u kojoj je kalup genomska DNA; ovdje svojte *Mytilopsis* sp.).



Slika 3.5. Provjera prisutnosti genomske DNA u cDNA svojti *C.kusceri* i *D. polymorpha*.

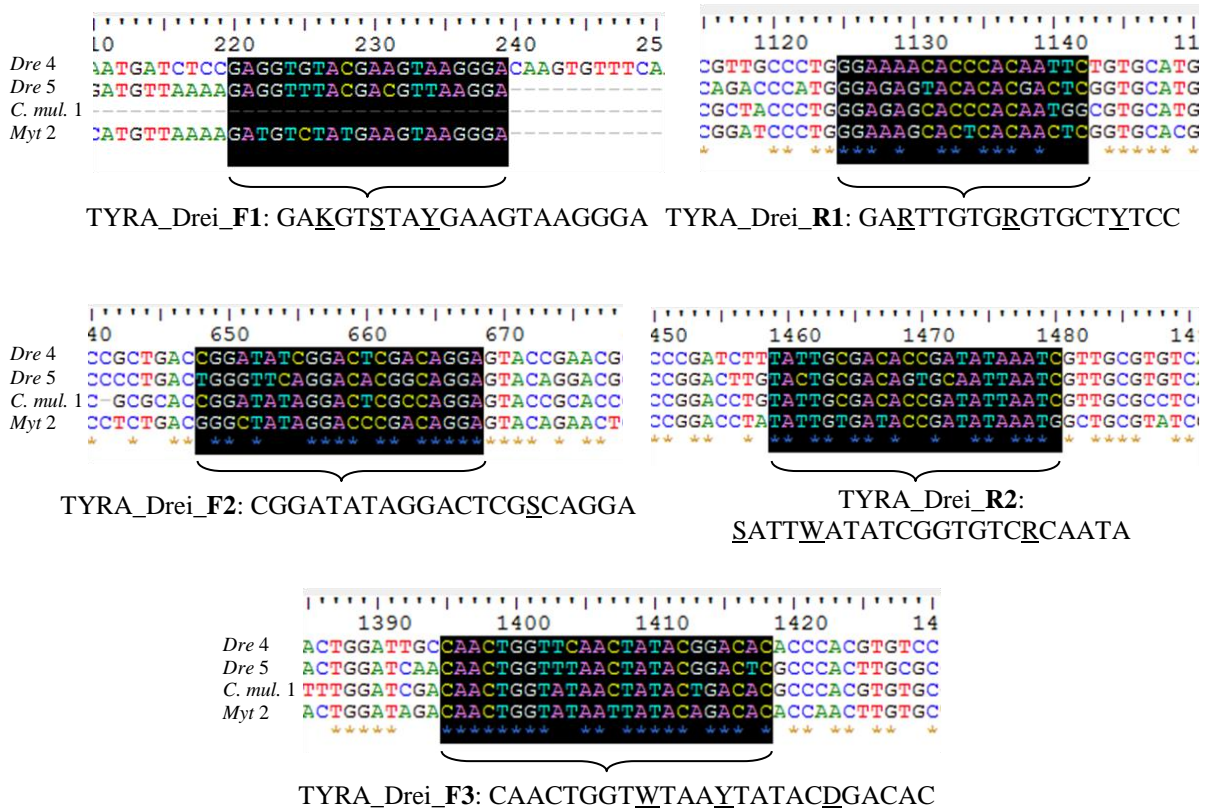
3.2.9. Dizajniranje početnica

Početnice dizajnirane za potrebe ovoga rada navedene su u osjenčenom dijelu Tablice 3.2. Namijenjene su umnažanju fragmenata homologa tirozinaze u pet svojti školjkaša korištenih u radu. Na temelju poravnanja nukleotidnih i proteinskih sekvenci dobivenih alatom PIA i na temelju rezultata filogenetičke analize ustanovljeno je postojanje dviju osnovnih skupina u koje se grupiraju sekvence zbog čega su posebno dizajnirane početnice za skupinu nazvanu TYRA i skupinu nazvanu TYRB. Na svakom od dva poravnanja nukleotidnih sekvenci „ručno“ su pronađena mjesta pogodna za dizajn početnica, a početnice su dodatno provjerene kao pogodne (teoretski, ne stvaraju dimere i ukosnice) korištenjem programa PrimerSelect. Duljina početnica obično iznosi 18 – 24 pb, a preporučljiv ukupni udio G i C nukleotida je oko 45 – 55% (KATUŠIĆ HEĆIMOVIĆ, 2007a), u skladu s čim su dizajnirane početnice i za potrebe ovog rada.

Za obje spomenute skupine (TYRA i TYRB) duljina nukleotidne sekvence na poravnanju smještanjem početnica podijeljena je na tri dijela uz pretpostavku da će sekvencu biti jednostavnije dobiti PCR-om razloženu na tri manja fragmenta. Za skupinu TYRA dizajnirane su početnice za umnožavanje fragmenata tirozinaze iz svih pet svojti (Sl. 3.6.), a za skupinu TYRB za treći odlomak nukleotidne sekvence dizajnirane su posebne nizvodne (engl. *forward*) početnice za svojte roda *Congerina*, a posebne za svojtu *Dreissena*, dok su za prvi odlomak dizajnirane početnice za svojte roda *Congerina* (s namjerom umnožavanja fragmenta iz svojte *C. kusceri* jer su ostale dobro pokrivenne sekvencama iz transkriptoma) (Sl. 3.7.). Oznake „Cong“, odnosno „Dreiss“ u nazivima početnica za umnažanje tirozinaza skupine TYRB pokazuju umnažanju kojih svojti je namijenjena početnica, a oznaka „Zaj“ u imenima početnica TYRB_Drei_ZajF2 i TYRB_Drei_ZajR2 znači „zajednički“, dakle, ove su početnice namijenjene umnažanju tirozinaze i iz svojti roda *Congerina* i svojte *Dreissena*. Za svojtu *Mytilopsis* dizajnirana je posebna nizvodna početnica (TYRB_Drei_MytF). Za nizvodne početnice namijenjene umnažanju trećeg fragmenta tirozinaze (i za tirozinazu skupine TYRB za svojtu *Mytilopsis*) nije dizajnirana uzvodna (engl. *reverse*) početnica kao dio trećeg para početnica budući da njezinu ulogu preuzima početnica Oligo-T + Overhang čija je sekvenca također dana u Tablici 3.2.

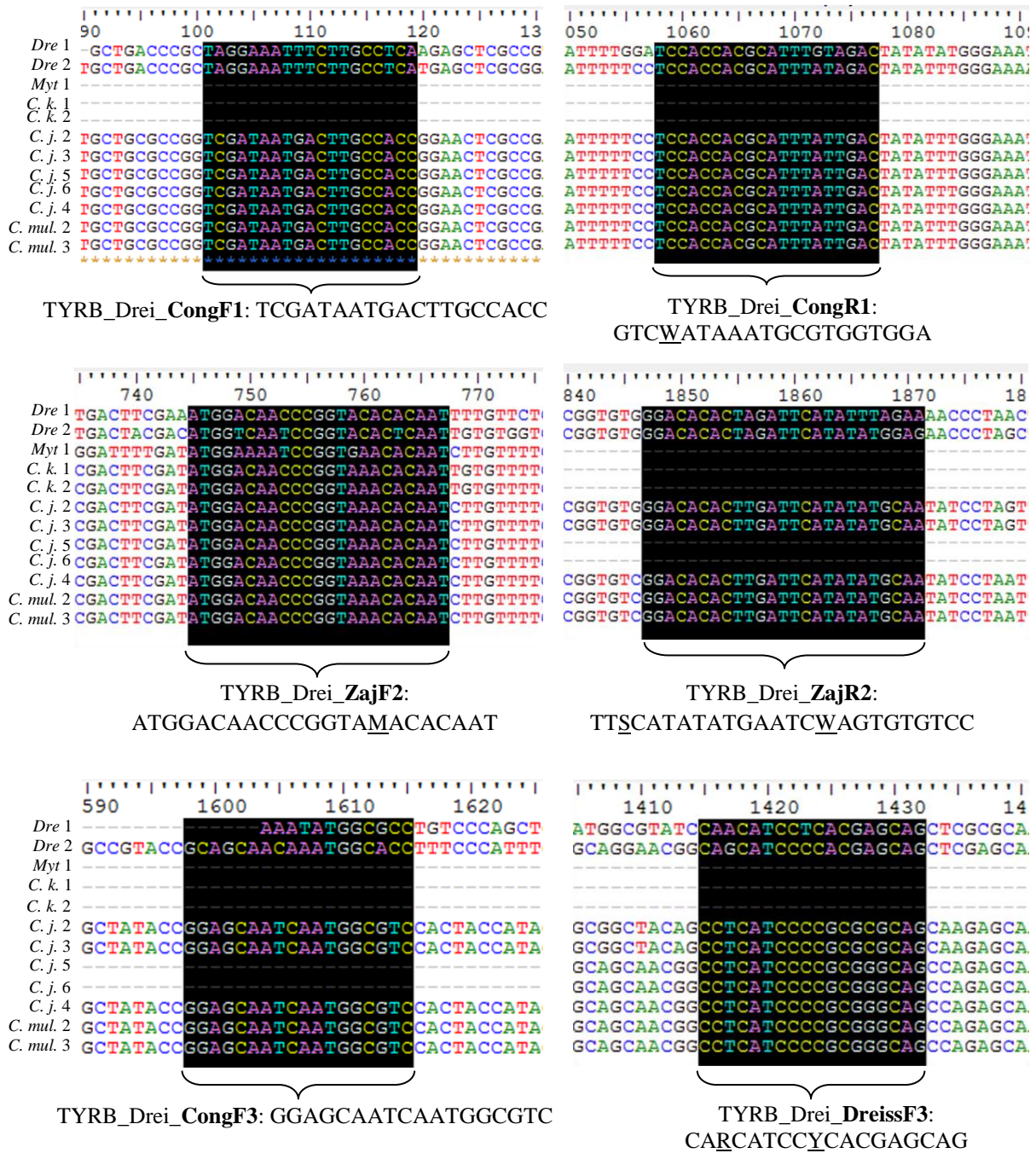
Pri dizajniranju nekih početnica morale su biti upotrebljene i degenerativne baze pa je riječ o degenerativnim početnicama. Značenje koda takvih baza prema IUPAC-u dano je u Tablici 3.3. Degenerativne početnice predstavljaju smjesu oligonukleotidnih sekvenci u kojima neka

mjesta sadrže više mogućih baza tako da smjesa sadrži različite početnice sličnog nukleotidnog slijeda i sadrži sve moguće kombinacije početnica.



Slika 3.6. Mjesta u poravnanju nukleotidnih sekvenci skupine TYRA za koja se očekuje sparivanje s naznačenim dizajniranim početnicama. U nukleotidnom slijedu početnica zapisanom u 5'→3' smjeru podcrtane su degenerativne baze. Poravnanje završava pozicijom 2178.

(Za značenje brojki u kriticama imena svojti, vidi potpoglavlje 4.1. i Tablicu 4.1.)



Slika 3.7. Mjesta u poravnanju nukleotidnih sekvenci skupine TYRB za koja se očekuje sparivanje s naznačenim dizajniranim početnicama. U nukleotidnom slijedu početnica zapisanom u 5'→3' smjeru podcrtane su degenerativne baze. Poravnanje završava pozicijom 2420.

(Za značenje brojki u kraticama imena svojti, vidi potpoglavlje 4.1. i Tablicu 4.1.)

3.2.10. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*) (PCR) temeljna je metoda molekularne biologije koja omogućuje umnožavanje molekule DNA u velikom broju kopija djelovanjem enzima DNA polimeraze. Osim polimeraze, za PCR reakciju potrebni su i kalup – DNA koju želimo umnožiti, par početnica koje se mogu komplementarno spariti s kalupom, puferna otopina koja sadrži vodu i ione koji pogoduju uspješnoj PCR reakciji (osobito su važni Mg^{2+} ioni) te dNTP-ovi. Danas su komercijalno dostupne i otopine za PCR (*Master Mix*), gotove reakcijske smjese koje sadrže već pomiješan pufer, polimerazu i dNTP-ove što smanjuje vrijeme potrebno za pripremu reakcije i smanjuje mogućnost kontaminacije uzorka.

Tri su osnovna koraka jednog ciklusa reakcije PCR-a, a ciklus se obično ponavlja 30 – 35 puta (ovisno o uputama proizvođača i osobinama kalupa i početnica). Prvi korak je denaturacija molekule DNA, odnosno razdvajanje dvaju komplementarnih lanaca. Time se na molekulama DNA oslobađaju mjesta za vezanje nizvodne (engl. *forward*; F) i uzvodne (engl. *reverse*; R) početnice. Drugi korak je prijanjanje početnica na molekulu DNA, odnosno komplementarno sparivanje početnica s DNA. Preporučena temperatura prijanjanja/sparivanja je 50 – 65 °C (KATUŠIĆ HEĆIMOVIĆ, 2007a). Posljednji korak jednog ciklusa u reakciji PCR-a predstavlja elongacija tijekom koje se sintetizira novi lanac DNA 5' → 3' DNA-polimeraznom aktivnosti DNA polimeraze. Od jedne molekule DNA na kraju ciklusa nastaju dvije dvolančane molekule DNA. U sljedećem ciklusu dvolančana molekula DNA ponovno se denaturira i ciklus se nastavlja.

Proizvođači polimeraza i pufera za PCR, odnosno gotovih otopina koje sadrže pomiješane polimerazu i pufer preporučuju uvjete (trajanje i temperaturu) za pojedine dijelove ciklusa i broj ciklusa u skladu s osobitostima svojih proizvoda. U program za PCR treba uključiti i korak inicijalne denaturacije i završne elongacije kako bi se molekule DNA na početku reakcije pravilno denaturirale te kako bi ekstenzija u 5' → 3' smjeru došla do 3' kraja lanca DNA.

Varijanta PCR reakcije u kojoj se najprije odvija po nekoliko skupina ciklusa na temperaturama višim od konačne temperature prijanjanja, pri čemu se u svakoj sljedećoj skupini ciklusa temperatura prijanjanja smanjuje, a na kraju se provodi najveći dio ciklusa na konačnoj temperaturi prijanjanja, zove se na engleskom jeziku *Touch Down PCR*. Na ovaj način povećava se specifičnost PCR reakcije: na početnim temperaturama prijanjanja s DNA će se komplementarno spariti početnice na specifičnim mjestima najveće (potpune) komplementarnosti. Nespecifično vezanje početnica daje neželjene PCR produkte.

Gradient PCR varijanta je PCR reakcije u kojoj se u jednom PCR uređaju istovremeno odvija više reakcija s više različitih temperatura prijanjanja. Gradijent temperature uspostavljen je između prvog i zadnjeg reda za PCR tubice u PCR uređaju.

Sve DNA polimeraze sintetiziraju DNA u 5' → 3' smjeru, a kalup za DNA polimerazu može biti i jednolančana molekula DNA. Stoga je PCR reakcijom moguće umnožiti jednolančanu cDNA koja nastaje reverznom transkripcijom prema kalupu – RNA korištenjem komercijalno dostupnog paketa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) kojim je cDNA sintetizirana za potrebe ovoga rada.

Za PCR se koriste termostabilne DNA polimeraze. Neke među njima posjeduju, a druge ne posjeduju 3' → 5' egzonukleaznu aktivnost. *Taq* polimeraza ne posjeduje tu aktivnost, dakle nema sposobnost popravka krivo sparene baze. Ova polimeraza odlikuje se deoksinukleotidil transferaznom aktivnosti, što znači da dodaje A-deoksinukleotid na 3' kraj PCR produkta. Zbog toga je PCR produkte dobivene korištenjem *Taq* polimeraze (i njezinih derivata) moguće direktno koristiti za TA kloniranje. Polimeraze koje imaju sposobnost popravka krivo sparene baze (engl. *proofreading*) zahvaljujući 3' → 5' egzonukleaznoj aktivnosti pogodne su za PCR reakcije u kojima je važna velika vjerodostojnost sinteze slijeda DNA (KATUŠIĆ HEĆIMOVIĆ, 2007b). Takva je polimeraza u sastavu otopine za PCR *Phusion High Fidelity Master Mix with HF Buffer* koja je korištena u ovom radu. PCR produkti dobiveni korištenjem ove otopine ne mogu se direktno koristiti za TA kloniranje jer nemaju slobodni (nespareni) A-deoksinukleotid na 3' kraju lanca.

Slijedi popis reakcijskih smjesa i uvjeta za PCR reakcije korištenih u ovom radu. Nisu posebno naznačene korištene negativne kontrole, reakcije koje sadrže sve komponente osim kalupa. Broj ciklusa, trajanje ciklusa i pripadajuće temperature odabrane su prema uputama proizvođača, vodeći računa o očekivanoj veličini PCR produkata i početnicama koje su korištene. Za odabir temperature prijanjanja početnica korišteni su dostupni kalkulatori:

a) <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html> (Thermo Scientific) i

b) <https://tmcalculator.neb.com/#!/main> (NEB).

Posljednji navedeni kalkulator korišten je za PCR reakcije u kojima je korišten *Phusion High Fidelity Master Mix with HF Buffer*, što predstavlja većinu PCR reakcija provedenih za potrebe ovoga rada.

3.2.10.1. TYRA_Drei_F1 + TYRA_Drei_R1

Tablica 3.13. Sastav PCR reakcije. Kalup: svih pet svojti školjkaša iz ovoga rada.

Komponenta PCR reakcije	V [μ L] po reakciji
voda za PCR	12,3
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Ex Taq Mix</i> (2x konc.)	15,0
F početnica: TYRA_Drei_F1 [20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,9
R: početnica TYRA_Drei_R1 [20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,9
kalup (cDNA)	0,9
Ukupno:	30 μL

Tablica 3.14. Uvjeti PCR reakcije.

Korak	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	1:00	1
Denaturacija	94	0:20	30
Prijanjanje	55 / 49 (gradijent)	0:30	
Elongacija	72	1:00	
Završna elongacija	72	10:00	1

3.2.10.2. TYRA_Drei_F2 + TYRA_Drei_R2

Tablica 3.15. Sastav PCR reakcije. Kalup: svih pet svojti školjkaša iz ovoga rada.

Komponenta PCR reakcije	V [μ L] po reakciji
voda za PCR	4,1
F početnica: TYRA_Drei_F2 [20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,3
R početnica: TYRA_Drei_R2 [20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,3
Kalup (cDNA)	0,3
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Phusion Mix</i> (2x konc.)	5,0
Ukupno:	10 μL

Tablica 3.16. Uvjeti PCR reakcije. Kalup: (b) *Dreissena*; (a) ostale četiri svojte.

Korak	Temperatura(°C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	98	0:30	1
Denaturacija	98	0:10	35
Prijanjanje	64 / 59 (a) 59 / 54 (b)	0:30	
Elongacija	72	0:25	
Završna elongacija	72	5:00	1

PCR produkt dobiven za svojtu *Dreissena* reamplificiran je (Tablica 3.17.).

Tablica 3.17. Sastav PCR reakcije za reamplifikaciju PCR produkta (*Dreissena*). Uvjeti PCR reakcije kao u Tablici 3.16.

Komponenta PCR reakcije	V [μ L] po reakciji
voda za PCR	10,25
F početnica: TYRA_Drei_F2A [20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,75
R početnica: TYRA_Drei_R2 [20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,75
Kalup: PCR produkt (<i>Dreissena</i>) iz prethodne reakcije	0,75
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Phusion Mix</i> (2x konc.)	12,5
Ukupno:	25 μL

3.2.10.3. TYRA_Drei_F3 + Overhang

Tablica 3.18. Sastav PCR reakcije. Kalup: navedeno u tablici;

opaska: (a) *C. mulaomerovici*, *Mytilopsis*; (b) *C. jalzici*, *Dreissena*, *Mytilopsis*.

Komponenta PCR reakcije	V [μ L] po reakciji		
	Kalup (cDNA):		<i>C. kusceri</i>
	<i>C. j.</i> , <i>C. m.</i> , <i>Dre</i> , <i>Myt</i>		
voda za PCR	3,2 (a)	3,7 (b)	6,8
F početnica: TYRA_Drei_F3 [20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,3		0,6
R početnica: Overhang [10 μ M] [konačna konc.: 0,5 μ M]	0,5		1,0
kalup (cDNA)	1,0 (a)	0,5 (b)	1,6
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Phusion Mix</i> (2x konc.)	5,0		10,0
Ukupno:	10 μL		20 μL

Tablica 3.19. Uvjeti PCR reakcije. Kalup: (a) *C. mulaomerovici*, *Mytilopsis*; (b) *Dreissena*, *Mytilopsis*; (c) *C. kusceri*; (d) *C. jalzici*.

Korak	Temperatura(°C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	98	0:30	1
Denaturacija	98	0:10	35
Prijanjanje	60 / 50 (a) 61 / 52(b) 64 / 59(c) 57 / 59(d)	0:30	
Elongacija	72	0:25 (a) 0:28 (b) 1:00 (c) 0:45 (d)	
Završna elongacija	72	5:00	1

PCR produkt dobiven za svojtu *Dreissena* reamplificiran je radi korištenja za TA kloniranje (Tablice 3.20. i 3.21.)

Tablica 3.20. Sastav PCR reakcije za reamplifikaciju.

Komponenta PCR reakcije	V [μ L] po reakciji
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Ready Mix (Sigma Jump Start)</i> (2x konc.)	5,0
F početnica: TYRA_Drei_F3 [20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,3
R početnica: Overhang [10 μ M] [konačna konc.: 0,5 μ M]	0,5
kalup (PCR produkt: <i>Dreissena</i> iz prethodne reakcije)	(vidi ispod)
voda za PCR	3,9
Ukupno:	10 μl

Reakcija 1.	Reakcija 2.	Reakcija 3.
U MM uronjen je nastavak pipete koji je prethodno bio provučen kroz gel prije izolacije DNA (<i>Dreissena</i>) iz gela.	Kalup: 0,3 μ L kalupa (DNA, <i>Dreissena</i> , izolirana iz gela)	Kalup: 1,0 μ L kalupa (DNA, <i>Dreissena</i> , izolirana iz gela)

Tablica 3.21. Uvjeti PCR reakcije.

Korak	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	2:00	1
Denaturacija	94	0:30	35
Prijanjanje	50	0:30	
Elongacija	72	0:48	
Završna elongacija	72	5:00	1

3.2.10.4. TYRB_Drei_CongF1 + TYRB_Drei_CongR1

Tablica 3.22. Sastav PCR reakcije. Kalup: cDNA svojte *Congerius kusceri*.

Komponenta PCR reakcije	V [μ L] po reakciji
voda za PCR	4,1
F početnica: TYRB_Drei_CongF1[20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,3
R: početnica TYRB_Drei_CongR1[20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,3
kalup (cDNA)	0,3
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Phusion Mix</i> (2x konc.)	5,0
Ukupno:	30 μL

Tablica 3.23. Uvjeti PCR reakcije.

Korak	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	98	0:30	1
Denaturacija	98	0:10	35
Prijanjanje	61	0:30	
Elongacija	72	0:35	
Završna elongacija	72	5:00	1

3.2.10.5. TYRB_Drei_ZajF2 + TYRB_Drei_ZajR2

Tablica 3.24. Sastav PCR reakcije. Kalup: sve svojte (isključujući *Mytilopsis*).

Komponenta PCR reakcije	V [μ L] po reakciji
voda za PCR	4,1
F početnica: TYRB_Drei_ZajF2[20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,3
R početnica: TYRB_Drei_ZajR2[20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,3
kalup (cDNA)	0,3
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Phusion Mix</i> (2x konc.)	5,0
Ukupno:	10 μL

Tablica 3.25. Uvjeti PCR reakcije.

Korak	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	98	0:30	1
Denaturacija	98	0:10	35
Prijanjanje	65	0:30	
Elongacija	72	0:35	
Završna elongacija	72	5:00	1

3.2.10.6. TYRB_Drei_CongF3/DreissF3 + Overhang

Tablica 3.26. Sastav PCR reakcije. Kalup: tri vrste roda *Conger*a (s početnicom TYRB_Drei_CongF3) i svojta *Dreissena* (s početnicom TYRB_Drei_DreissF3).

Komponenta PCR reakcije	V [μ L] po reakciji
voda za PCR	3,7
F početnica: TYRB_Drei_CongF3 [20 μ M]/ TYRB_Drei_DreissF3 [20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,3
R početnica: Overhang [10 μ M] [konačna konc.: 0,5 μ M]	0,5
kalup (cDNA)	0,5
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Ex Taq Mix</i> (2x konc.)	5,0
Ukupno:	10 μL

Tablica 3.27. Uvjeti PCR reakcije.

Korak	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	1:00	1
Denaturacija	94	0:20	30
Prijanjanje	49,5	0:30	
Elongacija	72	1:00	
Završna elongacija	72	10:00	1

3.2.10.7. TYRB_Drei_MytF3 + Overhang

Tablica 3.28. Sastav PCR reakcije. Kalup: cDNA (*Mytilopsis*).

Komponenta PCR reakcije	V [μ L] po reakciji
voda za PCR	6,8
F početnica: TYRB_Drei_MytF3 [20 μ M] [konačna konc.: 0,6 μ M]	0,6
R: početnica: Overhang [10 μ M] [konačna konc.: 0,5 μ M]	1,0
DMSO	0,6
kalup (cDNA)	1,0
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Phusion Mix</i> (2x konc.)	10,0
Ukupno:	20 μL

Tablica 3.29. Uvjeti PCR reakcije.

Korak	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	98	0:30	1
Denaturacija	98	0:10	35
Prijanjanje	57	0:30	
Elongacija	72	1:15	
Završna elongacija	72	10:00	1

3.2.11. Elektroforeza nukleinskih kiselina u agaroznom gelu

Elektroforezom PCR produkata u agaroznom gelu provjerava se uspješnost PCR reakcije. Ova metoda omogućuje identifikaciju DNA, određivanje veličine fragmenata (pomoću DNA biljega koji je smjesa DNA fragmenata poznatih duljina u parovima baza), a iz agaroznog gela fragmenti DNA (PCR produkti) mogu se izrezati i naknadno pročitati. Metoda se zasniva na različitoj pokretljivosti fragmenata DNA različite molekulske mase u električnom polju. Negativno nabijene molekule DNA kreću se u istosmjernom električnom polju od negativne (katode) prema pozitivnoj elektrodi (anodi). DNA molekule manje molekulske mase (kraći fragmenti) kreću se brže od DNA molekula veće molekulske mase (duži fragmenti).

Za elektroforezu RNA korišten je 1,5%-tni, a za elektroforezu DNA 1%-tni agarozni gel. Interkalirajuća boja etidijev bromid dodana je u TAE pufer koji se koristi za pripremu agaroznih gelova kako bi se pruge nukleinskih kiselina mogle zamijetiti na UV-transiluminatoru i uređaju za snimanje gelova za elektroforezu. Za elektroforezu korištene su dvije kadice: veća (*Sub-Cell GT Cell*) pri naponu od 60 – 100 V i manja (*Mini-Sub Cell GT Systems*) pri naponu od 60 V. Proizvođač je BIO RAD.

3.2.12. Pročišćavanje PCR produkata i izolacija DNA iz agaroznog gela

PCR produkti namijenjeni sekvenciranju pročišćeni su od ostalih sastojaka reakcijske smjese za PCR (DNA polimeraze, početnica, dNTP-ova) pomoću kompleta *QIAquick PCR Purification Kit* (QUIAGEN) prema uputama proizvođača. DNA pruge od interesa zamijećene u agaroznom gelu, namijenjene reamplifikaciji, sekvenciranju ili korištenju za TA kloniranje pročišćene su iz agaroznog gela korištenjem kompleta *QIAquick Gel Extraction Kit* (QUIAGEN) prema uputama proizvođača. U završnom koraku, eluciji DNA s kolonice, korišteno je 30 µL mQ vode ili pufera za eluciju prisutnog u navedenom kompletu.

3.2.13. Rezultati PCR reakcija namijenjenih umnožavanju fragmenata tirozinaze

Dizajn početnica za umnožavanje tirozinaze u školjkaša porodice Dreissenidae (početnice seta TYRA i TYRB; vidi Tablicu 3.2.) takav je da je provedeno umnožavanje homologa tirozinaze u planiranim fragmentima: F1 + R1, F2 + R2, F3 + Overhang. Pokrivenost triju fragmenata skupina TYRA i TYRB sekvencama dobivenim pretragom transkriptoma i sekvencama dobivenim sekvenciranjem PCR produkata sažeto je prikazana u Tablicama 3.30. (TYRA) i 3.31. (TYRB).

Tablica 3.30. Pokrivenost fragmenata tirozinaze skupine TYRA sekvencama dobivenim pretragom transkriptoma i sekvencama dobivenim sekvenciranjem PCR produkata. T – transkriptom.

Svojta	Fragment F1 + R1	Fragment F2 + R2	Fragment F3 + O	Opaska	
TYRA					
<i>C. jalzici</i>	amplifikacijom dobiveno više pruga, fragment sekvenciran nakon TA kloniranja nije potvrđen kao tirozinazni	neuspješna amplifikacija	uspješna amplifikacija, fragment sekvenciran nakon TA kloniranja	potvrđena pripadnost svojte skupini TYRA sekvenciranjem (nema odgovarajućeg nalaza iz transkriptoma)	
<i>C. kusceri</i>		uspješna amplifikacija, sekvenciran PCR produkt	uspješna amplifikacija, sekvenciran PCR produkt	potvrđena pripadnost svojte skupini TYRA sekvenciranjem (nema odgovarajućeg nalaza iz transkriptoma)	
<i>C. mulaomerovici</i>		T: djelomično pokriven	neuspješna amplifikacija	uspješna amplifikacija, sekvenciran PCR produkt	sekvencirani PCR produkt možda pripada paralogu različitom od onoga dobivenog pretragom transkriptoma
			T: pokriven		
<i>Dreissena</i>		T: pokriven	uspješna amplifikacija, sekvenciran PCR produkt	uspješna amplifikacija, fragment sekvenciran nakon TA kloniranja	
	T: pokriven		T: pokriven		
<i>Mytilopsis</i> sp.	T: pokriven	neuspješna amplifikacija	neuspješna amplifikacija		
		T: pokriven	T: uglavnom nije pokriven		

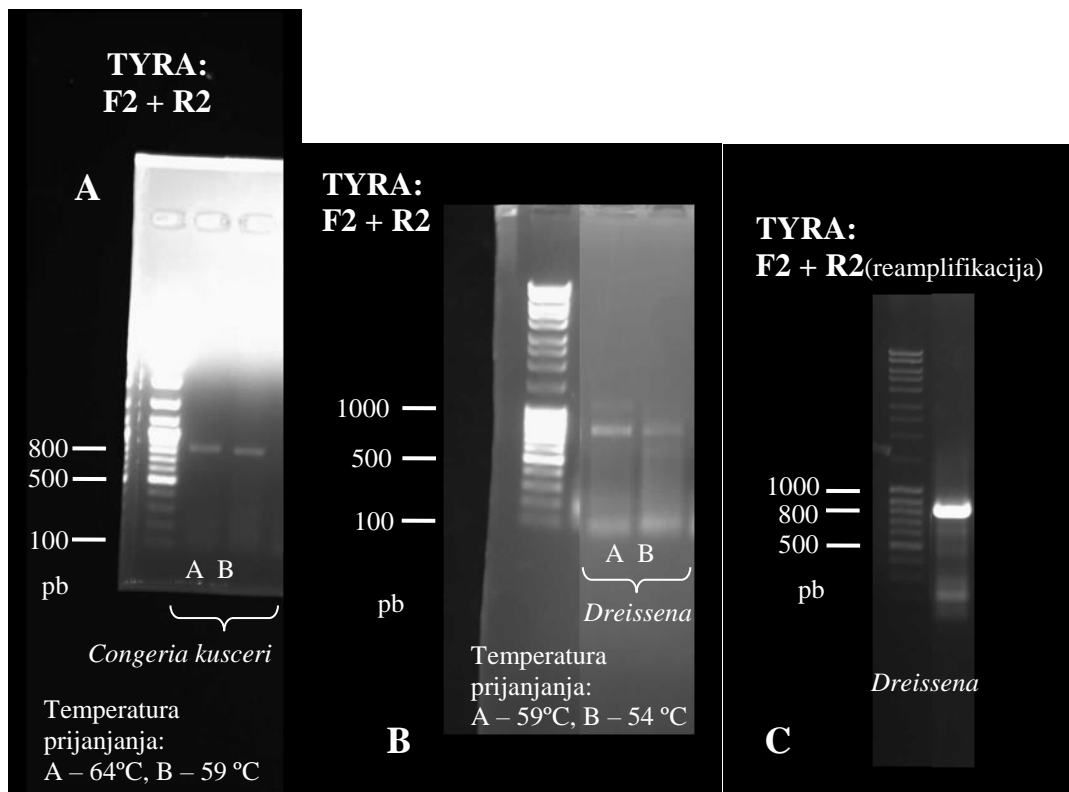
Tablica 3.31. Pokrivenost fragmenata tirozinaze skupine TYRB sekvencama dobivenim pretragom transkriptoma i sekvencama dobivenim sekvenciranjem PCR produkata. T – transkriptom.

Svojta	Fragment F1 + R1	Fragment F2 + R2	Fragment F3 + O	Opaska
TYRB				
<i>Congerija jalzici</i>	T: pokriven	neuspješna amplifikacija	neuspješna amplifikacija	
		T: pokriven	T: uglavnom pokriven, sekvence <i>C. jal.</i> 5 i 6 nisu, kraće su	
<i>C. kusceri</i>	neuspješna amplifikacija	uspješna amplifikacija, sekvenciran PCR produkt	neuspješna amplifikacija	
	T: djelomično pokriven	T: uglavnom nije pokriven	T: nije pokriven	
<i>C. mulaomerovici</i>	T: pokriven	uspješna amplifikacija, sekvenciran PCR produkt	neuspješna amplifikacija	
		T: pokriven	T: uglavnom pokriven	
<i>Dreissena polymorpha</i>	T: pokriven	neuspješna amplifikacija	neuspješna amplifikacija	
		T: pokriven	T: pokriven	
<i>Mytilopsis</i> sp.	T: djelomično pokriven	T: uglavnom nije pokriven	T: nije pokriven	neuspješna amplifikacija korištenjem početnica TYRB_Drei_MytF i Overhang

Slijedi najprije popis pozitivnih rezultata PCR reakcija koje su naposljetku dovele do dobivanja sekvenci fragmenata tirozinaze nakon sekvenciranja u DNA servisu Zavoda za molekularnu biologiju na Institutu „Ruđer Bošković“.

3.2.13.1. TYRA_Drei_F2 + TYRA_Drei_R2

Ovim parom početnica uspješno su umnoženi fragmenti tirozinaze svojti *C. kusceri* (Sl. 3.8A) i *Dreissena*. DNA *C. kusceri* pročišćena je iz agaroznog gela i pripremljena za sekvenciranje. DNA svojte *Dreissena* (Sl. 3.8B, stupac „B“, donja pruga) pročišćena je iz gela i reamplificirana kako je navedeno u prethodnom poglavlju. Reamplificirana DNA (Sl. 3.8C) pročišćena je iz gela i pripremljena za sekvenciranje.

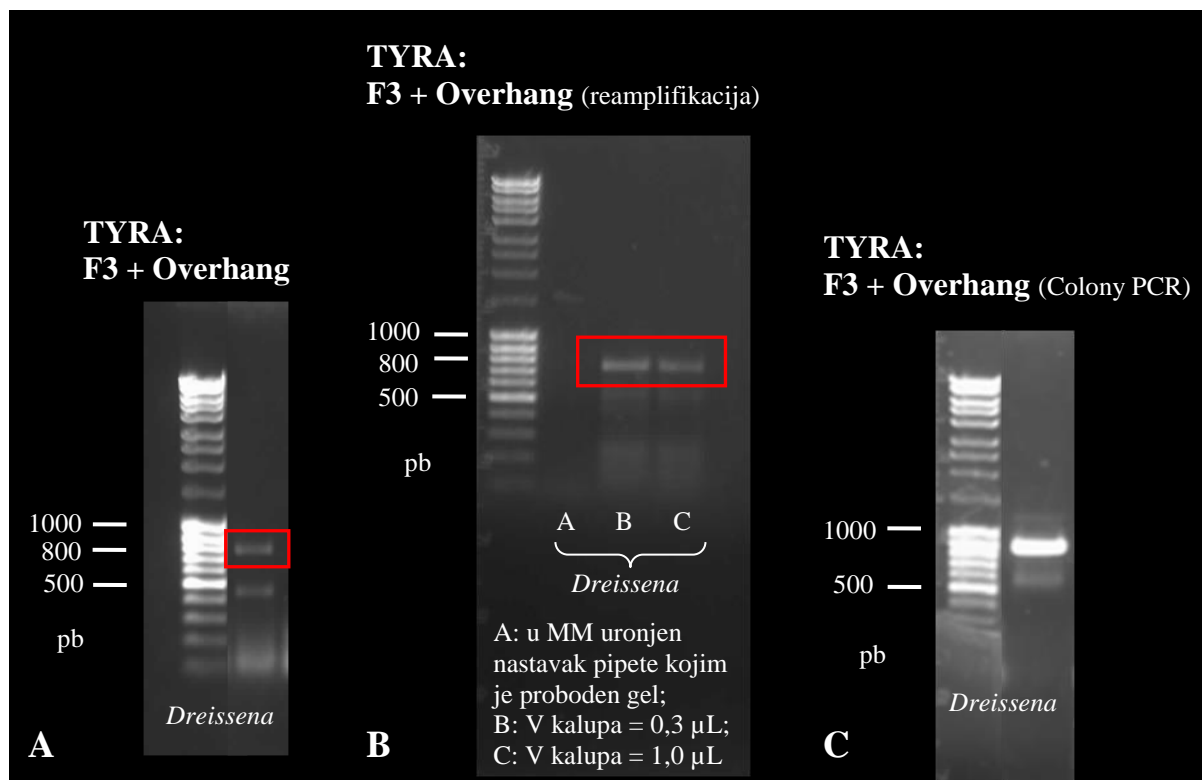


Slika 3.8. Rezultati PCR reakcija za umnožavanje fragmenta tirozinaze korištenjem početnica TYRA_Drei_F2 i TYRA_Drei_R2. (A)*C. kusceri*; (B)*D. polymorpha* čija je „B“ pruga reamplificirana (C).

3.2.13.2. TYRA_Drei_F3 + Overhang

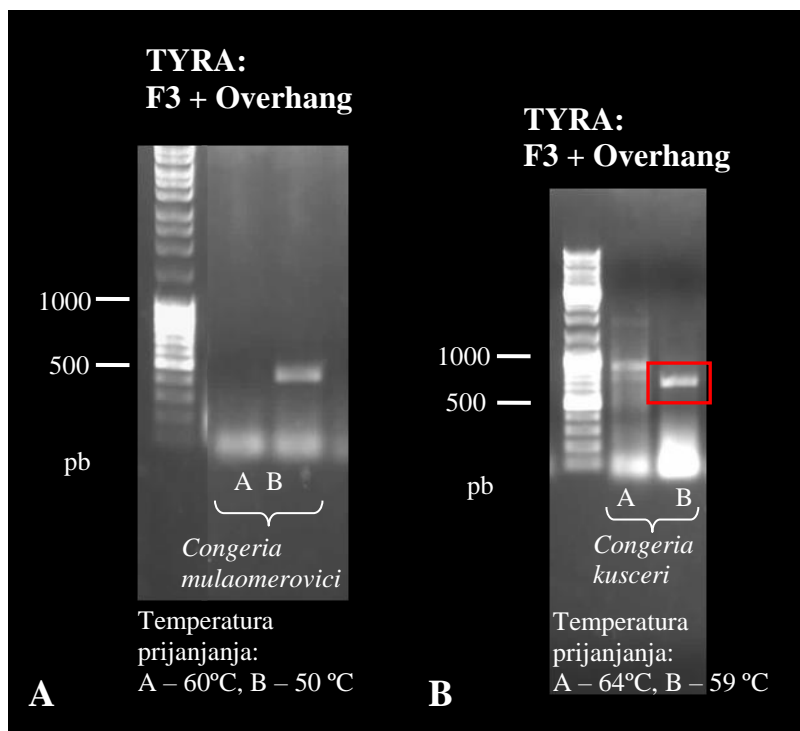
Ovim parom početnica uspješno su umnoženi fragmenti tirozinaze svojti *C. kusceri*, *C. jalzici*, *C. mulaomerovici* i *D. polymorpha*.

DNA svojte *D. polymorpha* (Sl. 3.9A) iskorištena je za reamplifikaciju. Reamplificirana DNA (Sl. 3.9B) pročišćena je iz gela i iskorištena u TA kloniranju. Uspješnost transformacije bakterija rekombinantnim plazmidom provjerena je PCR reakcijom na bakterijskim kolonijama (*Colony PCR*-om) (Sl. 3.9C). Plazmidna DNA izolirana na kraju procesa TA kloniranja pripremljena je za sekvenciranje.

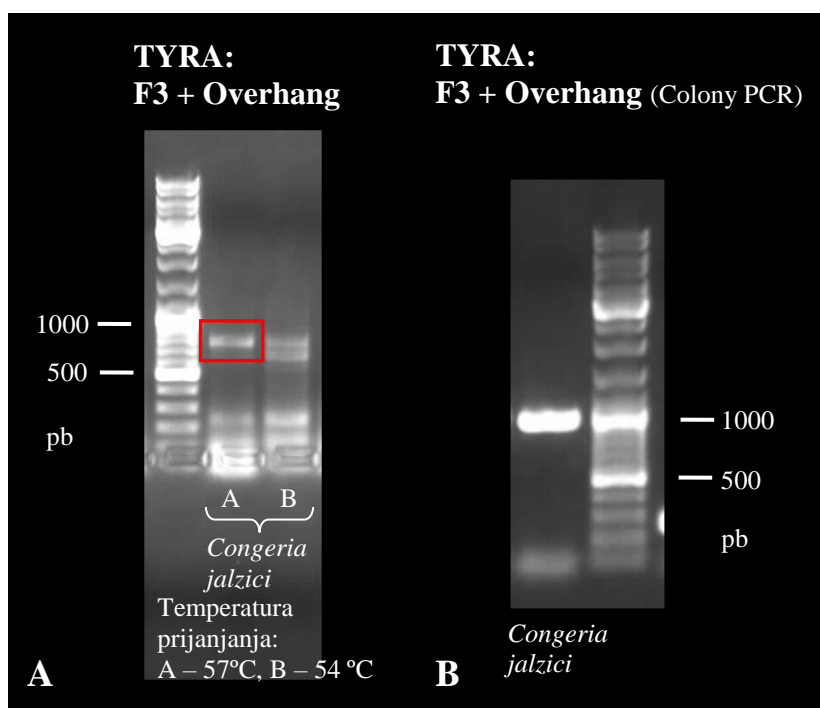


Slika 3.9. Rezultat PCR reakcija za umnožavanje fragmenta tirozinaze korištenjem početnica TYRA_Drei_F3 i Overhang u svojoj *D. polymorpha*. DNA iz (A) iskorištena je za reamplifikaciju (B), a reamplificirana DNA upotrijebljena je za TA kloniranje. Uspješnost transformacije bakterija provjerena je PCR reakcijom na bakterijskim kolonijama (Colony PCR-om) (C).

Pruga „B“ *C. mulaomerovici* (Sl. 3.10A) i označena pruga *C. kusceri* (Sl. 3.10B) pročišćene su iz gela te je DNA pripremljena za sekvenciranje. DNA *C. jalzici* označena na Sl. 3.11A pročišćena je iz gela i iskorištena za TA kloniranje. Uspješnost transformacije bakterija rekombinantnim plazmidom provjerena je Colony PCR-om (Sl. 3.11B). Plazmidna DNA izolirana je i pripremljena za sekvenciranje.



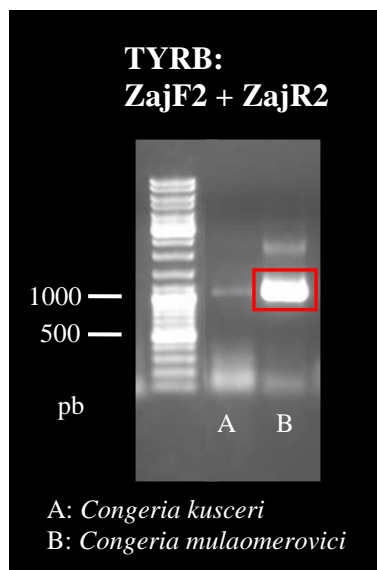
Slika 3.10. Rezultat PCR reakcija za umnožavanje fragmenta tirozinaze korištenjem početnica TYRA_Drei_F3 i Overhang u svojti *C. mulaomerovici* (A) i *C. kusceri* (B). U (B) je označena pruga DNA koja je pročišćena iz gela.



Slika 3.11. Rezultat PCR reakcije za umnožavanje fragmenta tirozinaze korištenjem početnica TYRA_Drei_F3 i Overhang u svojte *C. jalzici*. Označena DNA u (A) pročišćena je iz gela i iskorištena za TA kloniranje. Uspješnost transformacije bakterijskih stanica rekombinantnim plazmidom provjerena je Colony PCR-om (B).

3.2.13.3. TYRB_Drei_ZajF2 + TYRB_Drei_ZajR2

Ovim parom početnica uspješno su umnoženi fragmenti tirozinaze svojti *C. kusceri* i *C. mulaomerovici* (Sl. 3.12.). DNA pročišćena iz gela pripremljena je za sekvenciranje.



Slika 3.12. Rezultat PCR reakcije za umnožavanje fragmenta tirozinaze korištenjem početnica TYRB_Drei_ZajF2 i TYRB_Drei_ZajR2 u svojti *C. kusceri* i *C. mulaomerovici*. Označena pruga u (B) i pruga u (A) iste veličine pročišćene su iz gela te je DNA pripremljena za sekvenciranje.

3.2.13.4. Neuspješne reakcije

Navedene su PCR reakcije koje su provedene, ali naposljetku nisu dovele do dobivanja željenih sekvenci fragmenata tirozinaze.

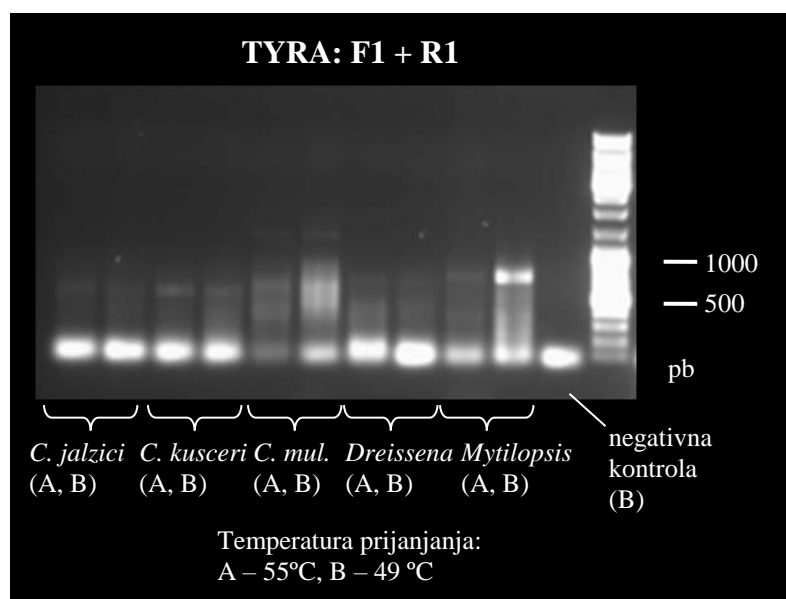
Na Sl. 3.13. prikazan je rezultat PCR reakcije dobivene korištenjem početnica TYRA_Drei_F1 i TYRA_Drei_R1 za svih pet svojti. Pripremljene su reakcijske smjese ukupnog volumena 30 μ L. Pola volumena svake reakcije iskorišteno je za elektroforezu u agaroznom gelu (Sl. 3.13.). Po 15 μ L neiskorištenog PCR produkta pročišćeno je i korišteno u reakciji TA kloniranja. Uspješno je ukloniran fragment svih pet svojti. Plazmidna DNA izolirana je i pripremljena za sekvenciranje. Za svih pet svojti dobivene su sekvence, no se identificirati kao tirozinazne pretragom korištenjem algoritma BLAST niti poravnanjem sekvencama dobivenim pretragom transkriptoma.

Korištenjem početnica TYRA_Drei_F2 i TYRA_Drei_R2 dobiveni su PCR produkti u svojti *C. kusceri* i *Dreissena* za koje su naposljetku dobivene odgovarajuće sekvence, što u ostalih svojti nije bio slučaj.

Korištenjem početnica TYRB_Drei_CongF1 i TYRB_Drei_CongR1 neuspješno je pokušano umnožavanje fragmenta tirozinaze u *C. kusceri*. Ostale svojte nisu bile uključene u reakciju jer su sekvence bile dobro pokrivenne transkriptomom, tj. nalazima dobivenim korištenjem alata PIA.

Korištenjem početnica TYRB_Drei_CongF3/TYRB_Drei_DreissF3 i Overhang neuspješno je pokušano umnožavanje fragmenata tirozinaze u tri vrste roda *Conger* i svojte *D. polymorpha*, kao i korištenjem početnica TYRB_Drei_MytF3 i Overhang u svojte *Mytilopsis*.

Mytilopsis sp. jedina je od pet korištenih svojti školjkaša za koju nisam uspio dobiti sekvencu ni za jedan fragment tirozinaze.



Slika 3.13. Rezultat PCR reakcije za umnožavanje fragmenta tirozinaze korištenjem početnica TYRA_Drei_F1 i TYRA_Drei_R1 u svih pet svojti. Po 15 μ L sačuvanog PCR produkta koji nisu naneseni na agarozni gel iskorišteni su za TA kloniranje. Sekvenciranjem su naposljetku dobivene sekvence koje nisu identificirane kao tirozinazne.

3.2.14. TA kloniranje

Postupak TA kloniranja upotrijebljen je radi sekvenciranja PCR produkata u onim slučajevima kad PCR reakcijom nije dobivena samo jedna DNA pruga po reakciji i kad je sekvenciranje određenih fragmenata rezultiralo neupotrebljivim sekvencama. Cilj je TA kloniranjem naposljetku dobiti DNA fragmente pogodne za sekvenciranje. TA kloniranje provedeno je prema uputama proizvođača kompleta *TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing* (Invitrogen).

Postupak TA kloniranja sastoji se od nekoliko etapa, a PCR produkt koji se može dati sekvencirati dobiva se najranije treći dan od početka pokusa. Početni korak u reakciji TA kloniranja jest ligacija inserta i vektora pri čemu je vektor plazmid, a insert PCR produkt čiju primarnu strukturu želimo odrediti. Ligacijom PCR produkta i plazmida nastaje rekombinantni plazmid (Sl. 3.14.). Budući da plazmid (pCR™4-TOPO; Thermo Scientific) koji se koristi za TA kloniranje ima na 3' kraju T-deoksinukleotidni nesporeni produžetak, PCR produkt koji se može koristiti za reakciju ligacije s takvim vektorom mora na 3' kraju imati odgovarajući A-deoksinukleotidni nesporeni produžetak (Sl. 3.14.). Sposobnost dodavanja A-deoksinukleotida na 3' kraj PCR produkta ima *Taq* polimeraza, kako je ranije navedeno. Stoga PCR produkt s kojim se ulazi u reakciju ligacije mora biti rezultat umnažanja *Taq* polimerazom, a ako je riječ o PCR produktu koji nije umnožen *Taq* polimerazom, inkubacijom s *Taq* polimerazom treba porčišćenom PCR produktu dodati A-deoksinukleotidni produžetak na 3' kraju. U Tablici 3.32. dan je pripremljeni sastav reakcijske smjese za ligaciju.

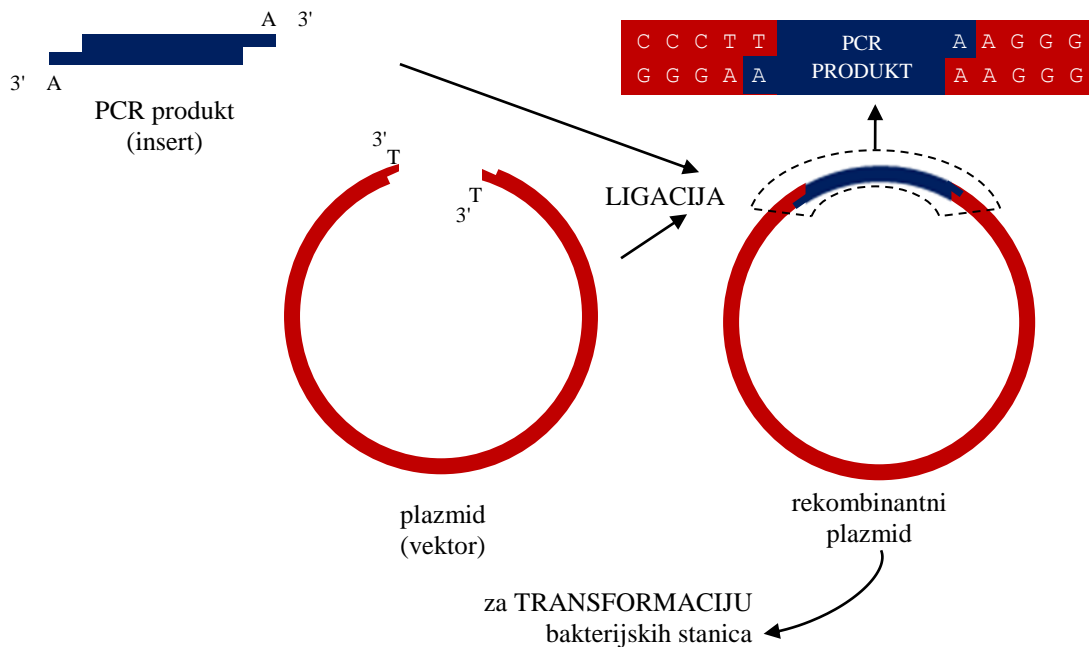
Tablica 3.32. Sastav reakcijske smjese za ligaciju.

Reagens	Volumen
PCR produkt	4 µl
Otopina soli (iz kompleta)	1 µl
TOPO vektor (iz kompleta)	1 µl
Ukupni volumen:	6 µl

Reakcija je lagano promiješana i inkubirana na sobnoj temperaturi (više od 5 min).

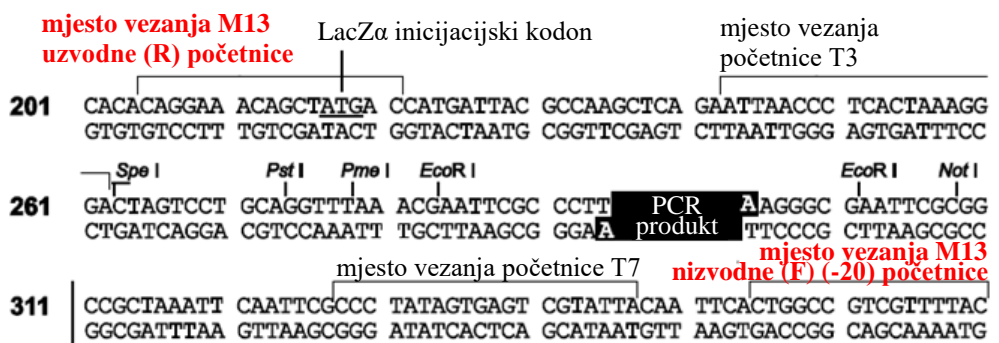
Sljedeći je korak transformacija kemijski kompetentnih bakterijskih stanica soja One Shot TOP10 (Thermo Scientific) koji čine kemijski kompetentne stanice bakterije *E. coli*. Postupak transformacije napravljen je sljedećim postupcima: 1. 2 µl TOPO klonirajuće reakcije dodano je u tubicu s bakterijskim stanicama i lagano promiješano; 2. tubice su inkubirane na ledu (do 30 min); 3. temperaturni šok: stanice su stavljene 30 sekundi na 42 °C bez miješanja; 4.

odmah potom tubice su stavljene na led; 5. u tubicu je dodano 250 μ l S.O.C. medija sobne temperature; 6. horizontalno tresenje tubice (200 rpm, 37 $^{\circ}$ C, 1 sat); 7. prenošenje transformiranih bakterija na selektivne LB ploče koje sadrže kanamicin (50 μ g/mL). Ploče su inkubirane tijekom noći na 37 $^{\circ}$ C.



Slika 3.14. Reakcija ligacije inserta i vektora početna je reakcija TA kloniranja. Rekombinantni plazmidi koji nastaju reakcijom ligacije koriste se za transformaciju kompetentnih bakterijskih stanica.

Na Sl. 3.15. prikazana je karta vektora – plazmida (pCRTM4-TOPO) korištenog u reakciji. Gen *ccdB*, koji je letalan za *E. coli* (produkt ekspresije ovoga gena sprječava rast bakterija; BERNARD *et al.*, 1994) spojen je s C-krajem LacZa fragmenta. Na Sl. 3.15. prikazano je mjesto start kodona (ATG) za LacZa fragment. Ligacija PCR produkta i plazmida dovodi do pomicanja okvira čitanja u rekombinantnom plazmidu što poremećuje ekspresiju spoja LacZa-*ccdB* te se letalni *ccdB* gen ne eksprimira. Dakle, ako na ploči sa selektivnom kanamicinskom podlogom narastu bakterijske kolonije, to znači da je poremećena ekspresija letalnog gena *ccdB*, a to znači da je PCR produkt uspješno spojen s plazmidom u rekombinantni vektor.



Slika 3.15. Karta plazmida korištenog u TA kloniranju za potrebe ovoga rada. Insercija PCR produkta u plazmid dovodi do stvaranja rekombinantnog plazmida u kojemu je ekspresija letalnog *ccdB* gena (u spoju *LacZα-ccdB*) poremećena, što znači da samo uspješno transformirane bakterije uspijevaju preživjeti na selektivnoj podlozi. Označena su mjesta vezanja nizvodne i uzvodne M13 početnice korištene u ovome radu.

Preuzeto i prilagođeno prema protokolu za uporabu kompleta *TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing* (Invitrogen).

Narastle kolonije provjerene su PCR reakcijom na bakterijskim kolonijama (*Colony PCR*). Pripremljena je *Master Mix* otopina sastava danog u Tablici 3.33. Za *Colony PCR* nastavkom pipete takne se odabrana kolonija kako bi se uzeo malo biomase te se potom uroni u tubice koje sadrže po 10 μ L priređenog *Master Mix*a.

Tablica 3.33. Sastav *Master Mix*a za provjeru bakterijskih kolonija PCR-om (*Colony PCR*).

Komponenta PCR reakcije	V [μ L] po reakciji
gotova reakcijska smjesa za PCR: <i>Ex Taq Mix</i> (2x konc.)	5,0
F početnica (M13 Forward (-20)) (iz kompleta)	0,3
R početnica (M13 Reverse) (iz kompleta)	0,3
voda (iz kompleta)	4,4
Ukupno:	10 μL

U Tablici 3.34. dani su uvjeti za *Colony PCR*. Uvjeti za inicijalnu denaturaciju i završnu elongaciju postavljeni su prema uputi proizvođača. Inicijalna denaturacija dovodi do lize bakterijskih stanica i inaktivacije nukleaza. Cilj je *Colony PCR*-umnožiti plazmide koji sadrže inkorporirani PCR produkt od interesa čiju primarnu strukturu želimo odrediti. Na Sl. 3.15. prikazana su mjesta prijanjanja M13 nizvodne i uzvodne početnice.

Tablica 3.34. Uvjeti za PCR na bakterijskim kolonijama (*Colony PCR*).

Korak	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	10:00	1
Denaturacija	94	0:30	35
Prijanjanje	50	0:45	
Elongacija	72	1:00	
Završna elongacija	72	10:00	1

Sljedeći je korak prekonoćni uzgoj bakterijskih stanica. U falkonicu za svaku testiranu koloniju dodana su po 2 mL tekućeg LB medija sobne temperature i 2 μ L kanamicina (50 ng/ μ l). U medij s antibiotikom ubačen je nastavak pipete kojim je prethodno uzeto malo biomase iz odabrane bakterijske kolonije na ploči. Falkonica s LB medijem, kanamicinom i nastavkom umočenim u koloniju ostavljena je na 37 °C tijekom noći u tresilici.

Završni korak predstavlja izolacija plazmidne DNA iz naraslih bakterijskih stanica što je učinjeno korištenjem kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN). Zamućenje LB medija u falkonici pokazuje da su bakterijske stanice narasle. Iz falkonica tekućinu treba premjestiti u tubicu od 2 μ L i centrifugirati 3 min na više od 8000 rpm pri sobnoj temperaturi. Za dno tubice uhvatit će se bakterijske stanice. Tubicu je moguće okrenuti naopako i izliti tekućinu. Tako izdvojene bakterijske stanice mogu se čuvati na –20 °C. Postupak je nastavljen prema protokolu.

3.2.14.1. Dodavanje A-deoksinukleotida na 3' kraj PCR produkta

Za PCR produkt koji nije umnožen *Taq* polimerazom potrebno je PCR produktu dodati dATP kao produžetak na 3' krajevima. Za potrebe ovoga rada pripremljena je smjesa čiji je sastav dan u Tablici 3.35. Smjesa je inkubirana 15 min na 72 °C. Korištena DNA polimeraza, *TaKaRa LA Taq* polimeraza odgovorna je za stvaranje smjese produkata s 3'-A-privjescima i tupih krajeva te pokazuje, prema navodu proizvođača, 80%-tnu učinkovitost ligacije PCR produkta u T-vektor.

Tablica 3.35. Sastav smjese za inkubaciju PCR produkta.

Komponenta smjese	V [μ L] po reakciji
PCR produkt	17,78
0,2 mM dATP	0,12
10x PCR pufers Mg^{2+} (TaKaRa)	2,0
TaKaRa La Taq DNA polimeraza (5U/ μ L) [finalno: 0,5 U]	0,1
Ukupno:	20 μL

3.2.15. Određivanje primarne strukture DNA primjenom Sangerove dideoksi metode

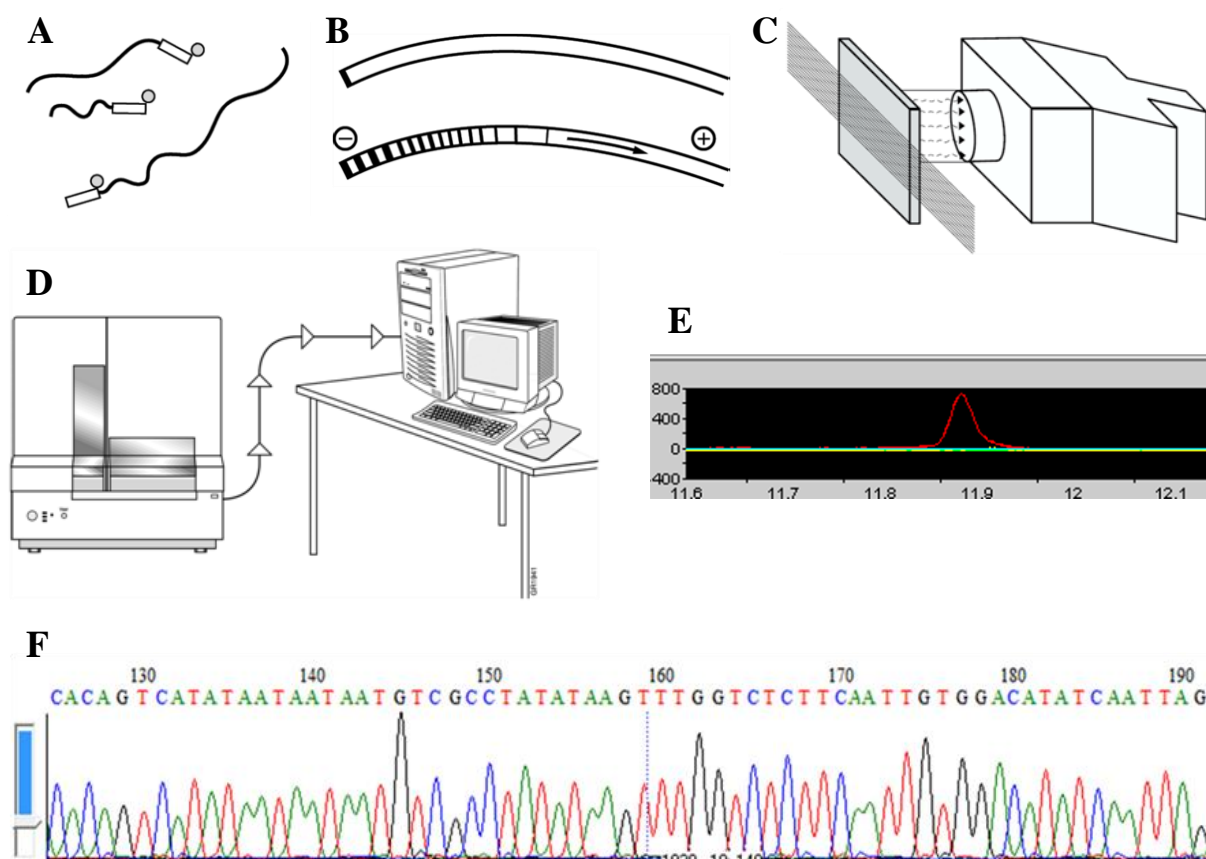
PCR produkti od interesa pročišćeni iz agaroznog gela, PCR produkti pročišćeni iz reakcijske smjese nakon završetka PCR reakcije i pročišćeni rekombinantni plazmidi *E. coli*, s insertom – PCR produktom, nastali reakcijom ligacije pri TA kloniranju, dani su na sekvenciranje, odnosno određivanje primarne strukture (slijeda nukleotida) molekule DNA u DNA servis Zavoda za molekularnu biologiju na Institutu „Ruđer Bošković“. Uređaj (DNA sekvenator) koji se ondje koristi jest *ABI-PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), a za sekvenciranje se koristi i komplet *ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (Thermo Scientific). Za sekvenciranje je potrebno pripremiti po dvije reakcijske smjese za jedan PCR produkt od kojih je svaka ukupnog volumena 15 μ L te sadrži vodu, početnicu (0,5 μ L) i DNA (PCR produkt) od interesa (korišteni su volumeni od 5 i 10 μ L). U jednu smjesu dodaje se nizvodna (F), a u drugu uzvodna (R) početnica. Za sekvenciranje rekombinantnih plazmida u koje je ugrađen PCR produkt korištene su M13 početnice iz kompleta za TA kloniranje, a za sekvenciranje ostalih uzoraka odgovarajuće početnice kojima su PCR produkti umnoženi.

Navedeni uređaj omogućuje određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA primjenom Sangerove dideoksi metode. Preduvjet za sekvenciranje je postojanje početnice koja se komplementarno sparuje s DNA od interesa. Kao monomeri za sintezu molekule DNA koju katalizira DNA polimeraza koriste se ne samo deoksinukleozid-trifosfati (dNTP-ovi: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) nego i dideoksinukleozid-trifosfati (ddNTP-ovi: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) u omjeru s većim udjelom dNTP-ova. Budući da su ddNTP-ovi inhibitori DNA polimeraze, ugradnjom ddNTP-a u molekulu DNA obustavlja se njezina sinteza (SANGER, NICKLEN i SOULSON, 1977). Za razliku od dNTP-ova, ddNTP-ovi nemaju na trećem ugljikovu atomu deoksiriboze –OH skupinu čime je onemogućeno upostavljanje fosfodieterske veze između ddNTP-a i sljedećeg dNTP-a kojim bi DNA polimeraza produžila lanac. Produkt reakcijske smjese koja sadrži sve dNTP-ove i jednu od četiri vrste ddNTP-ova bit će

umnožene DNA molekule različitih duljina koje su ovisne o mjestu ugradnje ddNTP-a. Svaka od četiri reakcijske smjese (s dodana četiri različita ddNTP-a) testira se poliakrilamidnom elektroforezom pri čemu dolazi do razdvajanja DNA fragmenata različitih duljina. Usporedbom četiri obrasca rasporeda pruga (A, T, C, G) dobiva se slijed nukleotida u molekuli DNA.

Gore navedeni uređaj suvremeni je automatizirani uređaj u kojemu se četiri reakcije ne odvijaju zasebno, već zajedno, budući da je svaki ddNTP obilježen drugom fluorescentnom bojom (Sl. 3.16A). Molekule DNA koje se razlikuju veličinom za jedan nukleotid razdvajaju se u dugim i tankim kapilarama procesom kapilarne elektroforeze (kraće molekule putuju brže od dužih) (Sl. 3.16B). Fragmenti dopijevaju u područje komore za detekciju (Sl. 3.16C) gdje se nalaze na putu ekscitacijske zrake zbog čega dolazi do fluorescencije boje vezane za DNA. CCD kamera prevodi fluorescencijsku u elektroničku informaciju i dostavlja je računalu s kojim je uređaj za sekvenciranje povezan (Sl. 3.16D). Podaci se obrađuju i prikazuju u obliku elektroferograma koji prikazuje relativnu koncentraciju boje (na y-osi) u ovisnosti o proteklom vremenu (na x-osi) (Sl. 3.16E). Na Sl. 3.16F prikazan je fragment jednog elektroferograma. Osim elektroferograma, rezultat se dobiva i u obliku DNA sekvence u FASTA formatu.

Kad su obje sekvence DNA molekula sintetiziranih iz oba smjera (dvjema različitim početnicama) dale dobar rezultat na elektroferogramu, napravljena je konsenzus sekvenca (engl. *contig*) njihovim djelomičnim preklapanjem korištenjem programa Sequencher5.4.6. Sekvence su provjerene poravnanjem sa očekivano srodnim sekvencama dobivenim iz transkriptoma korištenjem alata PIA te pretragom u algoritmu BLAST. Loše sekvencirani krajevi (ustanovljeni analizom elektroferograma), ručno su uklonjeni sa sekvenci, a za sekvencirane plazmide uvidom u kartu prikazanu na Sl. 3.15. određen je položaj PCR produkta u sekvenci.



Slika 3.16. Sekvenciranje temeljeno na Sangerovoj dideoksi metodi korištenjem uređaja *ABI-PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer* koji se koristi na Institutu „Ruđer Bošković“. (A) molekule DNA označene fluorescentnim bojama; (B) fragmenti DNA različite veličine (duljine) razdvajaju se kapilarnom elektroforezom; (C) fragmenti DNA u komori za očitavanje fluorescencije; (D) podaci iz uređaja za sekvenciranje prenose se u računalo; (E) elektroferogram prikazuje ovisnost relativne koncentracije pojedine boje (y-os) o protoku vremena (x-os); (F) izvadak iz jednog od elektroferograma dobivenih za potrebe ovoga rada.

(A – E) Preuzeto iz uputstva za korištenje uređaja:

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_041300.pdf.

Dobivene nukleotidne sekvence prevedene su alatom bioinformatičkog portala ExPASy u proteinske sekvence koje su poravnate s pretpostavljeno srodnim sekvencama dobivenim korištenjem alata PIA radi identifikacije eventualnih razlika između špiljskih svojti (*Conger* sp.) i pigmentiranih nadzemnih svojti školjkaša.

3.2.16. Spektrofotometrijsko utvrđivanje aktivnosti fenoloksidaza

Spektrofotometrijski je provjerena i uspoređena aktivnost fenoloksidaza u lizatima školjkaša *Congerija jalzici*, *C. kusceri* i *Dreissena polymorpha*. Uspoređena je aktivnost fenoloksidaza: 1. između svojti *C. jalzici* i *D. polymorpha*; 2. između svojti *C. kusceri* i *D. polymorpha* (jedinki zračenih UV-om i nezračenih jedinki); 3. između različitih tkiva *D. polymorpha* (mišići, plašt, sifon, škrge); 4. između jedinki *D. polymorpha* s neoštećenim i ciljano oštećenim škragama. Slijedi protokol optimiziran za provođenje spektrofotometrijskih pokusa.

I. Homogenizacija tkiva. Za svaki uzorak uzeto je po nekoliko živih jedinki svake svojte školjkaša (pri tome je trebalo voditi računa o tome da su jedinke roda *Congerija* manje od jedinki svojte *Dreissena*; mogu se uzeti manje jedinke svojte *Dreissena* ili više jedinki roda *Congerija* nego svojte *Dreissena*). Pomoću odgovarajućeg pribora (škarice, pincete) odvojene su ljuštore školjkaša te pod stereomikroskopom (lupom) izdvojeno ukupno tkivo školjkaša u Petrijevu zdjelicu ili tubicu koja stoji na ledu. Pojedinačna tkiva svojte *Dreissena* odmah su stavljena u hladne tubice. Važno je tkivo držati na hladnom čim se izdvoji iz ljuštura kako bi se smanjila degradacija proteina. Prethodno, ako je bilo potrebno, odrezane su bisusne niti svojte *Dreissena* radi kasnije lakše homogenizacije tkiva. U jednoj seriji pokusa (usporedba: *C. jalzici/Dreissena*) tkivo je premješteno u hladni tarionik. U hladnoj komori (ledenici) u tarionik u kojemu se nalazi tkivo školjkaša uliven je tekući dušik te je tkivo snažno usitnjeno tučkom dok se nije dobila praškasta homogena smjesa. Usitnjeno tkivo premješteno je špatulom u prethodno ohlađenu falkonicu u koju je zatim dodan Tris pufer. U drugoj seriji pokusa (usporedba: *C. kusceri/Dreissena*; usporedba aktivnosti u pojedinim tkivima školjkaša te između ozlijeđenih i neozlijeđenih jedinki svojte *Dreissena*) tkivo je homogenizirano direktno u tubici korištenjem homogenizatora ULTRA-TURRAX nakon što je u tubice dodan Tris pufer. Odabran je ovaj način homogenizacije zato što bi iz različitih izoliranih tkiva svojte *Dreissena* teško bilo usitnjavanjem tarionikom i tučkom dobiti dovoljno usitnjenog materijala/tkiva za daljnju analizu te zbog toga što je metoda praktičnija. Tris pufer treba dodati u tubice za usitnjavanje homogenizatorom tako da pokrije tkivo životinje i razinu tubice u kojoj homogenizator usitnjava tkivo. Tkivo školjkaša usitnjeno na ova dva načina podvrgnuto je zatim daljnjem usitnjavanju sonikacijom. Ovim procesom tkivo i stanice usitnjavaju se ultrazvukom. Tijekom sonikacije tubice/falkonice s homogeniziranim tkivom u Tris puferu stoje u kutiji s ledom kako bi se spriječila degradacija proteina. Korišteni su sljedeći uvjeti sonikacije: amplituda = 50, 2 puta po 5 min, pulsiranje svake dvije sekunde. Lizat nastao nakon sonikacije treba premjestiti u tubicu od 2 mikrolitra i centrifugirati (10 000

g, 10 min, 4 °C; uvjeti centrifugiranja prema: LUNA-ACOSTA *et al.*, 2011). Supernatant koji sadrži proteine premješten je u novu tubicu i stavljen na led.

II. Priprema supstrata i inhibitora. Kao supstrat za određivanje aktivnosti fenoloksidaze korištena je 10 mM L-DOPA (2 mg/mL). U falkonicu sa supstratom u prahu neposredno prije spektrofotometrijskog mjerenja dodan je odgovarajući volumen Tris pufera kako bi supstrat bio 10 puta koncentriran (20 mg/mL). Za provjeru specifičnosti fenoloksidazne enzimatske reakcije korišten je i specifični inhibitor ove skupine enzima, feniltiourea (PTU) (0,1%-tna u konačnoj otopini). Pripremljena je otopina 1%-tne feniltiouree.

III. Zračenje školjkaša. Jedinke svojiti *Dreissena* i *C. kusceri* zračene su UV-svjetlom (254 nm) u UV-komori (zračenje je otprilike 0,06 J/cm² na svake 3 min). Za potrebe zračenja živih školjkaša nježno im je uklonjena jedna ljuštura. U jednom pokusu, u kojem je uspoređivana aktivnost fenoloksidaza između svojiti *C. jalzici* i *Dreissena*, jedinke svojite *Dreissena* zračene su tri puta po 3 min s pauzom od oko 2 h 30 min između dva zračenja jedan dan prije provođenja spektrofotometrijske analize te još jednom ujutro na dan eksperimenta 3 min. Između zadnjeg zračenja i izolacije tkiva napravljena je pauza dulja od pola sata. U drugom pokusu, u kojem je uspoređivana aktivnost fenoloksidaza između svojiti *C. kusceri* i *Dreissena*, jedinke obiju svojtizračene su četiri puta u jednom danu, od prijepodneva do večeri, svaki put oko 10 min, s pauzama od najmanje sat vremena te još jednom ujutro na dan eksperimenta prije samog homogeniziranja tkiva, s tim da je napravljena pauza između zadnjeg zračenja i izolacije tkiva veća od pola sata. Školjkaši su zračeni u plastičnim posudama s hladnom vodom skupljenom na mjestu njihovih nalazišta, a tijekom zračenja posude su stajale na podlozi malih ledenih spremnika („pingvina“). Prije homogenizacije zračenih jedinki svojite *Dreissena* pod stereomikroskopom (lupom) iritiranjem iglicom i promatranjem reakcije kontrakcije potvrđeno je da su školjkaši živi, iako sa slabim odgovorom na podražaj. Zbog male veličine jedinki *C. kusceri* na ovaj način nije bilo moguće provjeriti reakciju na podražaj.

IV. Mjerenje koncentracije proteina u lizatu metodom po Bradfordu i priprema lizata za spektrofotometrijsku analizu. Potrebno je odrediti koncentraciju proteina u različitim lizatima koji se uspoređuju kako bi se mogli pripremiti lizati s jednakom koncentracijom proteina za spektrofotometrijsko mjerenje. Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu korištenjem sljedećeg protokola:

1. Pripremiti kivete za nulti uzorak (*blank*), standarde koji sadrže otopine goveđeg serumskog albumina te za triplikate lizata školjkaša koji se uspoređuju.

2. U svaku kivetu dodati 1 mL Bradford reagensa.

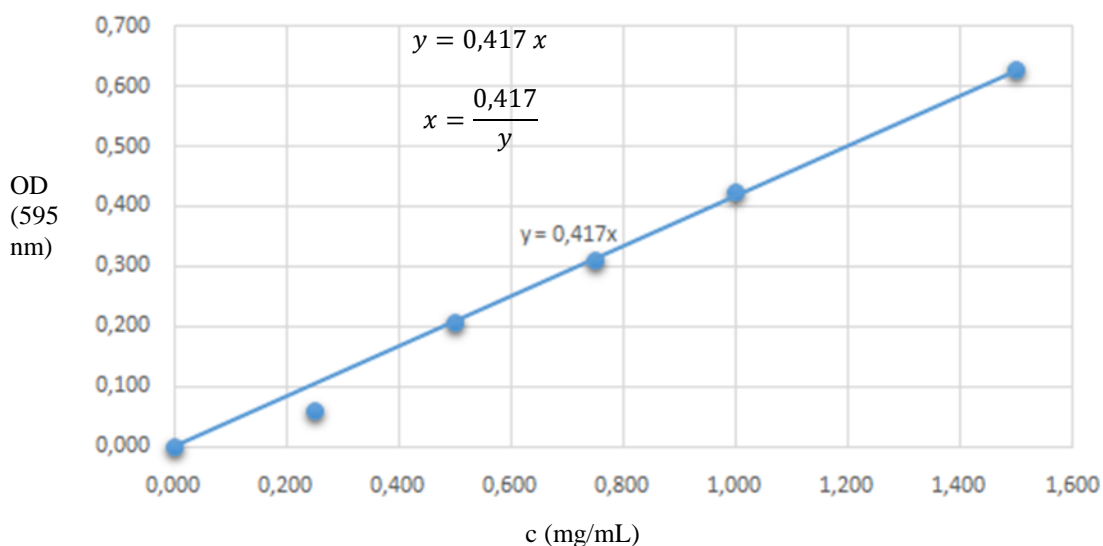
3. U kivete za standarde dodati i po 20 μL otopina goveđeg serumskog albumina različitih koncentracija (0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 $\mu\text{g/mL}$). (Nije nužno upotrijebiti sve koncentracije albumina, npr. one veće od 1.0 $\mu\text{g/mL}$). Nakon dodavanja serumskog albumina, kivetu poklopiti parafilmom i prstom te dobro promiješati. Navedeni proteini uzeti su iz kompleta *Quick Start Bradford Protein Assay* (BIO-RAD).

4. Pripremiti alikvot lizata školjkaša razrijeđen 10 puta (npr. uzeti 7 μL lizata svakog školjkaša, dodati 63 μL Tris pufera te dobivenu otopinu dobro promiješati vorteksiranjem). Tako će biti pripremljena 10 puta razrijeđena proteinska otopina iz lizata školjkaša od koje se mogu odvojiti po tri alikvota od 20 μL po svakoj svojti.

5. U pripadajuće 3 kivete (za svaki uzorak) dodati po 20 μL deset puta razrijeđenog lizata i dobro promiješati.

6. Izmjeriti apsorbanciju za sve kivete pri valnoj duljini 595 nm.

7. Iz vrijednosti koncentracija albuminskog seruma (os x) i pripadajućih OD očitavanja na spektrofotometru pri valnoj duljini od 595 nm (os y) dobije se pravac s pripadajućom jednadžbom pravca ($y = ax$) (Sl. 3.17.). Pri tome je y vrijednost OD očitavanja, x koncentracije proteina, dok je a koeficijent pravca. Iz jednadžbe pravca na temelju OD očitavanja za kivete s lizatima dobiva se koncentracija proteina u 10 puta razrijeđenim lizatima školjkaša. Vrijednost OD očitavanja dobivena je kao aritmetička sredina triju očitanih vrijednosti.



Slika 3.17. Primjer standardne krivulje dobivene nakon mjerenja apsorbancije (pri 595 nm) u uzorcima goveđeg serumskog albumina različitih koncentracija. Na apscisi su vrijednosti koncentracije (mg/mL), a na ordinati vrijednost optičke gustoće očitana na spektrofotometru. Iz jednadžbe pravca $y = ax$ može se odrediti koncentracija proteina $x = a / y$ pri čemu je a koeficijent pravca, a y vrijednost optičke gustoće za ispitani uzorak dobivena kao aritmetička sredina triplikalnog mjerenja.

8. U svakom setu uzoraka koji se međusobno uspoređuju konačna koncentracija proteina određena ovom metodom mora biti jednaka (npr. lizat svojti *Congerina* i *Dreissena*; lizati pojedinih tkiva svojte *Dreissena* moraju imati jednaku koncentraciju kako bi se uzorci mogli smisleno uspoređivati). Sve uzorke jednog seta treba razrijediti Tris puferom do koncentracije uzorka koji ima najmanju koncentraciju proteina.

V. Spektrofotometrijska analiza. Sastav kiveta (ukupni volumen je 1 mL) za usporedbu aktivnosti fenoloksidaza između (brojke su vrijednosti u mikrolitrima):

a) svojti roda *Congerina* i *Dreissena* (uključujući i zračene uzorke): *blank* (lizat odgovarajućeg uzorka školjkaša, 100; Tris pufer, 900); mjerenje aktivnosti (lizat, 100; L-DOPA, 20 mg/mL, 100; Tris pufer, 800); mjerenje aktivnosti uz prisutnost inhibitora (lizat, 100; L-DOPA, 20 mg/mL, 100; PTU, 1%-tna, 100; Tris pufer, 700);

b) različitih tkiva svojte *Dreissena*: *blank* (lizat odgovarajućeg uzorka tkiva, 100; Tris pufer, 900); mjerenje aktivnosti (lizat, 100; L-DOPA, 20 mg/mL, 100; Tris pufer, 800);

c) školjkaša ozlijeđenih i neozlijeđenih škrgi (*Dreissena*): isto kao u (b)

Ispitana je i autooksidacija supstrata (L-DOPA) za svaki pokus sa sljedećim sastavom kiveta: *blank* (Tris pufer, 1000); mjerenje aktivnosti (L-DOPA, 20 mg/mL, 100; Tris pufer, 900), mjerenje aktivnosti uz prisutnost inhibitora (L-DOPA, 20 mg/mL, 100; PTU, 1%-tna, 100; Tris pufer, 800).

Najprije je u svaku kivetu dodan odgovarajući volumen Tris pufera, a neposredno prije spektrofotometrijskog mjerenja i odgovarajući volumeni lizata (držani u kutiji s ledom) i neposredno prije pripravljeni 10 puta koncentrirane 10 mM otopine supstrata (supstratu u prahu dodan je odgovarajući volumen Tris pufera). Deset puta koncentrirani inhibitor (PTU, 1%) može se napraviti ranije i čuvati na hladnom.

Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 490 nm (LUNA-ACOSTA *et al.*, 2011) UV-spektrofotometrom CAM SPEC M-330.

4. REZULTATI

4.1. Nukleotidne i proteinske sekvence tirozinaze dobivene pretragom transkriptoma pomoću alata PIA

Korištenjem alata PIA (filogenetički obaviještena anotacija) za svaku od pet svojiti školjkaša porodice Dreissenidae korištenih u ovome radu dobivene su, pretragom transkriptoma, nukleotidne i proteinske sekvence potencijalnih homologa tirozinaze. Dobivene sekvence dodatno su provjerene kao tirozinazne korištenjem algoritma BLAST. Popis sekvenci pod nazivom koji dodjeljuje PIA dan je u Tablici 4.1. u kojoj je, radi praktičnosti, svakom nalazu dodijeljena kraća oznaka na koju se referira u nastavku rada. Samo jedan nalaz dobiven korištenjem alata PIA nije potvrđen kao pripadajući tirozinazi i dodatnom provjerom korištenjem algoritma BLAST. Riječ je o jednom od nalaza za svojtu *Dreissena polymorpha* te on nije dalje korišten i nije naveden u tablici. Sekvence *C. jal.* 5 i 6 identične su.

Usporedni prikaz dobivenih nukleotidnih i proteinskih sekvenci dan je u Prilogu 1. Na Sl. 4.1. prikazano je poravnanje proteinskih sekvenci u području aktivnog mjesta tirozinaze koje sadrži Cu(A) i Cu(B) mjesta. Na tom su poravnanju na dobivenim sekvencama u Cu(A) i Cu(B) regijama označena mjesta konzerviranih histidinskih ostataka (Cu(A): H₁(n)–H₂(8)–H₃; Cu(B):H₁(3)–H₂(n)–H₃) i ostalih konzerviranih aminokiselinskih ostataka bakrovih proteina tipa tri kojima tirozinaze pripadaju. Konzervirani G-ostatak, udaljen četiri pozicije nizvodno od drugog H-ostatka područja Cu(B), karakterističan za α -podrazred bakrovih proteina tipa tri kojima pripadaju tirozinaze mekušaca, prisutan je u svim sekvencama osim *Dre 1* i *Dre 2* koje na tom mjestu imaju D-ostatak (Sl. 4.1B).

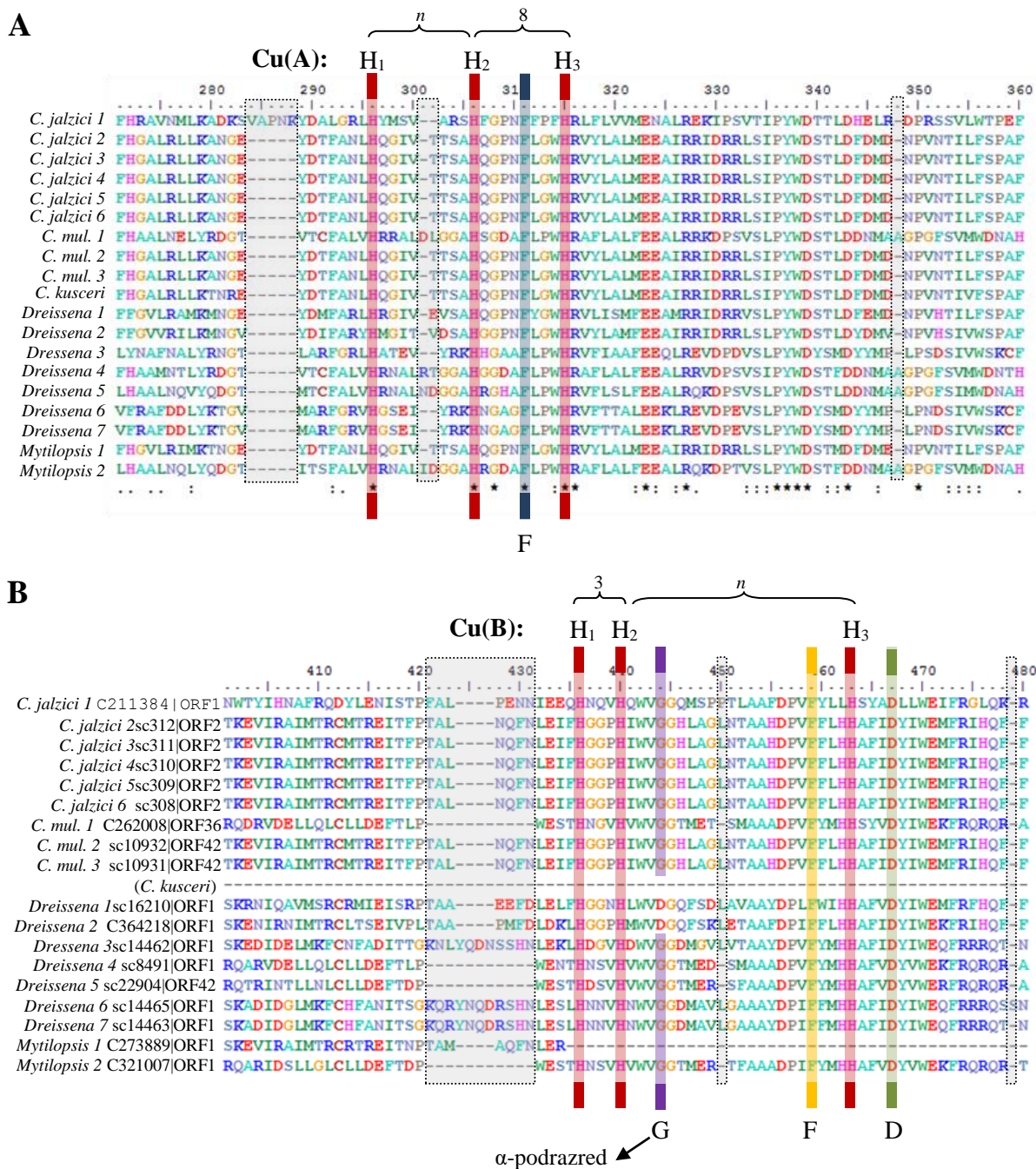
Tablica 4.1. Popis sekvenci tirozinaze dobivenih korištenjem alata PIA.

Šifra	Naziv koji je dodijelila PIA	Duljina nukleotidne sekvence (broj nukleotida)	Duljina proteinske sekvence (broj aminokiselina)
<i>Congeria jalzici</i>			
<i>C. jal.</i> 1	TYR hit C211384 ORF1	1986	661
<i>C. jal.</i> 2	TYR hit scaffold312 ORF2	2346	781
<i>C. jal.</i> 3	TYR hit scaffold311 ORF2	2295	764
<i>C. jal.</i> 4	TYR hit scaffold310 ORF2	2346	781
<i>C. jal.</i> 5	TYR hit scaffold309 ORF2	iden-	1542
			513

<i>C. jal.</i> 6	TYR hit scaffold308 ORF2	tične	1542	513
<i>Congerina kusceri</i>				
<i>C. k.</i> 1	TYR hit TR4272 c0_g2_i1 ORF10		663	221
<i>C. k.</i> 2	TYR hit TR4272 c0_g1_i1 ORF12		663	221
<i>Congerina mulaomerovici</i>				
<i>C. mul.</i> 1	TYR hit C262008 ORF36		1353	450
<i>C. mul.</i> 2	TYR hit scaffold10932 ORF42		2226	741
<i>C. mul.</i> 3	TYR hit scaffold10931 ORF42		2259	752
<i>Dreissena polymorpha</i>				
<i>Dre</i> 1	TYR hit scaffold16210 ORF1		2217	738
<i>Dre</i> 2	TYR hit C364218 ORF1		2337	778
<i>Dre</i> 3	TYR hit scaffold14462 ORF1		1326	441
<i>Dre</i> 4	TYR hit scaffold8491 ORF1		1926	641
<i>Dre</i> 5	TYR hit scaffold22904 ORF42		2136	711
<i>Dre</i> 6	TYR hit scaffold14465 ORF1		1188	396
<i>Dre</i> 7	TYR hit scaffold14463 ORF1		1683	560
<i>Mytilopsis</i> sp.				
<i>Myt</i> 1	TYR hit C273889 ORF1		531	177
<i>Myt</i> 2	TYR hit C321007 ORF1		1491	497

Na usporednom prikazu nukleotidnih i proteinskih sekvenci u Prilogu 1. označeni su osim konzerviranih aminokiselinskih ostataka aktivnog mjesta tirozinaze i start kodon, signalni peptid proteina i stop kodon, kad su prisutni, prema legendi danoj u završnom odlomku slike. Potencijalni signalni peptid određen je korištenjem alata SignalP4.1, kako je navedeno u prethodnom poglavlju. Dio signalnog peptida u sekvencama *C. mul.* 2 i *C. mul.* 3 (Prilog 1I) pretpostavljen je prema završnim aminokiselinama signalnog peptida u sekvencama *C. jal.* 2 – 6 (Prilog 1B–E) budući da su *C. jalzici* i *C. mulaomerovici* između tri vrste roda *Congerina* međusobno najrodnije.

Treba primijetiti kako svi nalazi koje je PIA dobila pretraživanjem ne prikazuju potpuni otvoreni okvir čitanja (ORF): nekim sekvencama nedostaje početak (nema start kodona) i/ili kraj (nema stop kodona) (Prilog 1.). Neke potpune sekvence koje imaju start kodon nemaju, prema analizi korištenjem alata SignalP4.1, signalni peptid.



Slika 4.1. Aktivno mjesto tirozinaze školjkaša porodice Dreissenidae prikazano poravnanjem proteinskih sekvenci dobivenih korištenjem alata PIA. **(A)** Cu(A) regija; **(B)** Cu(B) regija. Mjesta konzerviranih aminokiselinskih ostataka (H, F, G, D) bakrovih proteina tipa tri, kojima pripada i tirozinaza, označena su istim ključem boja kao u Prilogu 1. G-ostatak u Cu(B) mjestu konzervirana je oznaka α -podrazreda navedene skupine proteina kojemu pripadaju tirozinaze mekušaca (na tom mjestu G-ostatak nemaju sekvence *Dre* 1 i *Dre* 2). Sivim pravokutnicima označene su pozicije aminokiselina na kojima aminokiselinski ostatak imaju samo neke svojte.

Na poravnanju je dana samo sekvenca *C. k.* 1, no s njom je *C. k.* 2 gotovo identična (vidi Prilog 1 – F i G). Sekvenca *C. k.* 1 dobivena korištenjem alata PIA nije „uhvatila“ dio iza Cu(A), a na sličan način završava u području Cu(B) i sekvenca *Myt* 1. Treba primijetiti da sekvence *C. k.* 1 (i 2) (Prilog 1F i G) i *Myt* 1 (Prilog 1Q) ne sadrže stop kodon, dakle nisu potpune. Za izradu poravnanja korišten je alat T-Coffee, a poravnanje je analizirano u programu BioEdit.

4.2. Rezultati filogenetičke analize

Filogenetička analiza provedena je metodama maksimalne vjerodostojnosti (engl. *maximum likelihood* (ML); 1000 *bootstrap* replika) i maksimalne štedljivosti (engl. *maximum parsimony* (MP); 1000 *bootstrap* replika) na 111 proteinskih sekvenci (kako je opisano u prethodnom poglavlju) u području aktivnog mjesta tirozinaze. Među 111 sekvenci sve su sekvence iz Tablice 4.1. koje su pokrivale cijelo odabrano područje od 213 aminokiselinskih mjesta u i oko aktivnog mjesta tirozinaze (17 sekvenci). Isključene su sekvence *C. k.* 1 i 2 (gotovo identične) i *Myt* 1 koje ne pokrivaju cijelo područje od 213 aminokiselinskih mjesta na poravnanju.

S istim parametrima napravljene su dvije neovisne analize metodom maksimalne vjerodostojnosti. Rezultat jedne od njih prikazan je filogenetičkim stablom na Sl. 4.2. Na stablu se mogu zamijetiti dvije monofiletske skupine (*sensu* Hennig; holofiletske *sensu* ASHLOCK, 1971) koje obuhvaćaju svojte porodice Dreissenidae različitih rodova. Ove dvije skupine nazvane su TYRA i TYRB, a podržane su mjerom stalnosti (*bootstrap*) 100, odnosno 95. U skupinu TYRA uključene su sekvence *C. mul.* 1, *Dre* 4 i 5 te *Myt* 2, a u skupinu TYRB uključene su sekvence *C. jal.* 2 – 6, *C. mul.* 2 i 3 te *Dre* 1 i 2. Skupini TYRA blisko je srodna skupina koja sadrži tri sekvence – *Dre* 3, 6 i 7, a podržana je *bootstrap* vrijednosti 100. Skupina koja obuhvaća skupinu TYRA i njoj blisko srodan klaster sekvenci svojte *Dreissena* nazvana je TYRA' (*bootstrap*: 52) (Sl. 4.2.). Filogenetičkom analizom dobivena su dva velika monofiletska klastera (*sensu* Hennig; holofiletska *sensu* ASHLOCK, 1971) koja odgovaraju evolucijskim skupinama tirozinaze koje su AGUILERA, MCDOUGALL i DEGNAN (2014) nazvali TYRA i TYRB. Kako bi se izbjegla zabuna, imena ovih velikih skupina tirozinaze preimenovana su u TYR1 i TYR2 i tako označena na filogenetičkom stablu na Sl. 4.2. Pod tim imenima te će se skupine tirozinaze mekušaca navoditi u nastavku rada.

Filogenetičko stablo na Sl. 4.2. prikazuje rezultat jedne od dviju analiza napravljenih s istim parametrima metodom maksimalne vjerodostojnosti. Stablo dobiveno drugom analizom dalo je također skupine TYRA, TRRB i skupinu koju čine *Dre* 3, 6 i 7, a koja je blisko srodna skupini TYRA. Skupine su podržane *bootstrap* vrijednostima 100 (TYRA i njoj srodan klaster s *Dre* sekvencama), 92 (TYRB) i 62 (TYRA'). Skupine TYR1 i TYR2 također su dobivene, tako da je TYR2 skupina ugniježđena u parafiletsku skupinu TYR1.

Filogenetičko stablo dobiveno korištenjem metode maksimalne štedljivosti prikazano je na Sl. 4.3. Skupine od interesa podržane su *bootstrap* vrijednostima 100 (TYRA i njoj srodan klaster s *Dre* sekvencama), 75 (TYRB) i 39 (TYRA'). Skupine TYR1 i TYR2 dobivene su tako da je TYR2 ugniježđena u parafiletsku skupinu TYR1 (Sl. 4.3.).

Na svim je stablima sekvenca *C. jal.* 1 dobivena izdvojeno, izvan ovdje imenovanih klastera TYRA, TYRB i TYRA' (Sl. 4.2. i 4.3.).

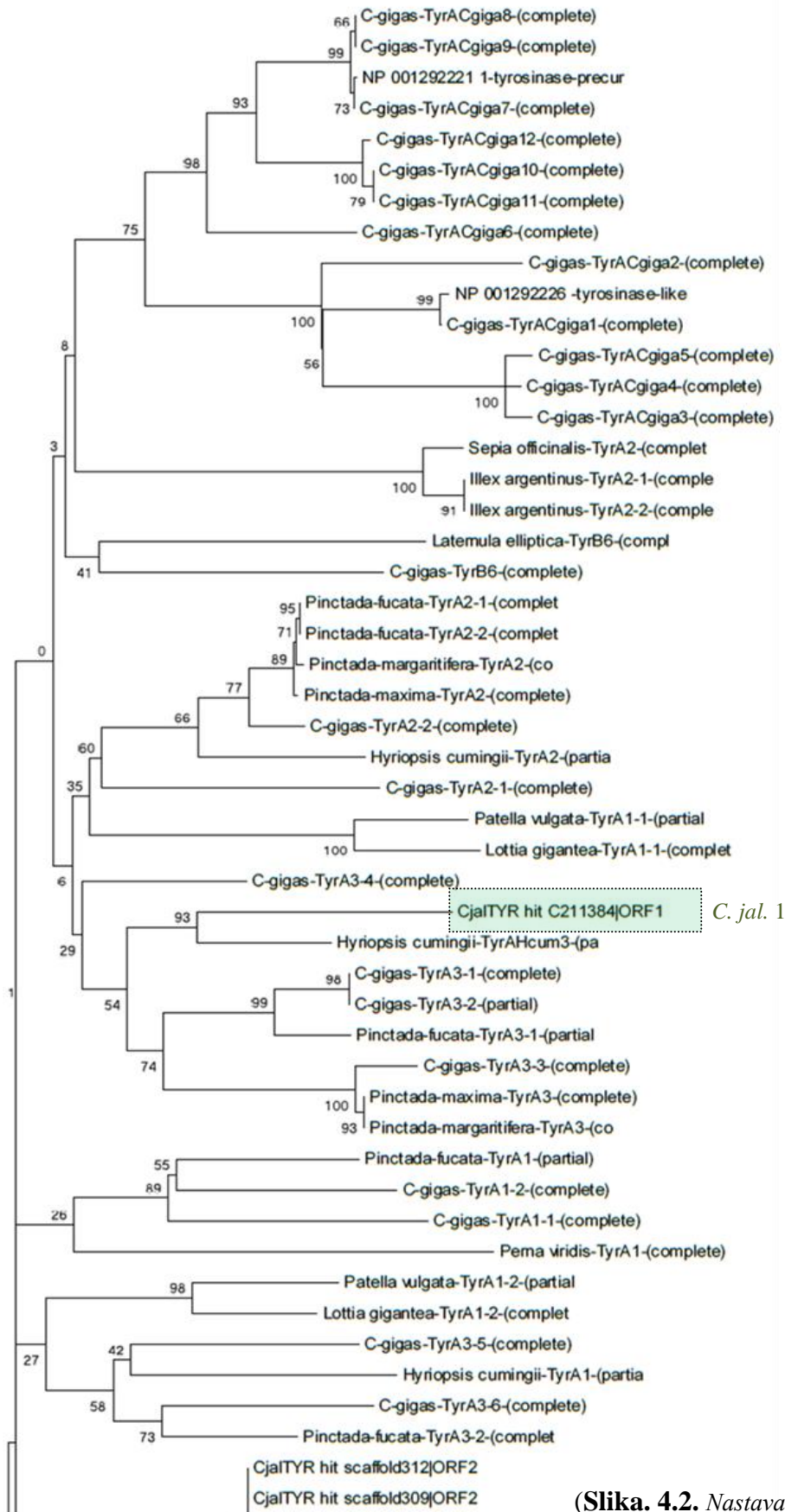
Sekvence *C. k.* 1 i 2 (gotovo identične) te *Myt* 1, koje nisu obuhvaćene filogenetičkom analizom zato što pripadajuće proteinske sekvence ne pokrivaju cijelo odabrano područje od 213 aminokiselina, poravnate su sa sekvencama skupine TYRB radi ustanovljenja njihove sličnosti s ovom skupinom. Premda nisu bile uključene u filogenetičku analizu, ove sekvence pokazuju pripadnost skupini TYRB: na Sl. 4.4. prikazan je fragment nukleotidnog poravnanja ovih triju sekvenci i svih sekvenci skupine TYRB.

Na temelju skupina TYRA i TYRB te ustanovljenog afiniteta sekvenci *C. k.* 1 i 2 te *Myt* 1 skupini TYRB dizajnirana su za potrebe umnožavanja homologa tirozinaze PCR-om dva seta početnica, kako je navedeno u prethodnom poglavlju (vidi Sl. 3.6. i 3.7.).

Poravnanje od 111 aminokiselinskih sekvenci napravljeno za potrebe filogenetičke analize potvrđuje da se svi konzervirani aminokiselinski ostaci Cu(A) i Cu(B) područja označeni na Sl. 4.1. nalaze na istim mjestima u svim sekvencama dobivenim pretragom transkriptoma.

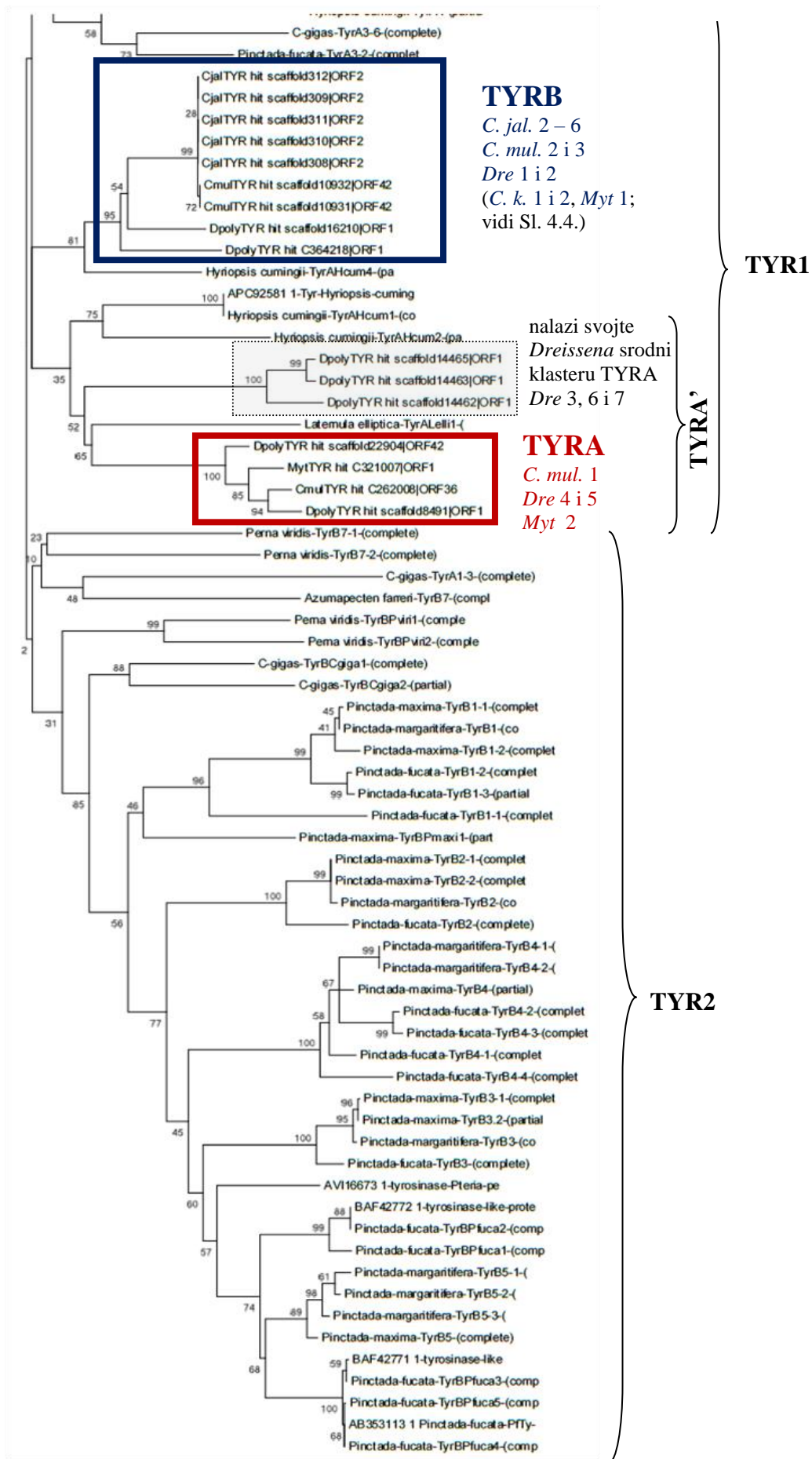
Filogenetičkom analizom skupini TYRA nisu pridružene sekvence svojti *C. jalzici* i *C. kusceri* dobivene pretragom transkriptoma (Sl. 4.2. i Sl. 4.3.). Pripadnost ovih dviju svojti skupini TYRA potvrđena je sekvenciranjem produkata – fragmenata homologa tirozinaze, umnoženih lančanom reakcijom polimerazom uz korištenje početnica dizajniranih prema osobitostima nukleotidnih sekvenci tirozinaze skupine TYRA. Riječ je o fragmentima F3 + O (Sl. 4._. i 4._.). Također, sekvenciranjem PCR produkta dobivena je i sekvenca *C. mulaomerovici* koja pripada skupini TYRA (Sl. 4._.), a razlikuje se od skupini TYRA pripadajuće sekvence dobivene pretragom transkriptoma (*C. mul.* 1).

Na Sl. 4.5. dan je kladogram koji predstavlja izvadak iz filogenetičkog stabla prikazanog na Sl. 4.2. (metoda maksimalne vjerodostojnosti) na kojoj su navedene samo sekvence tirozinaze porodice Dreissenidae. Na kladogramu je naznačena i gore objašnjena pripadnost sekvenci *C. k.* 1 i 2 te *Myt* 1 skupini TYRB, kao i potvrda pripadnosti sekvenci dobivenih sekvenciranjem fragmenata tirozinaze svojti *C. jalzici* i *C. kusceri* skupini TYRA. Na kladogramu je naznačeno i postojanje sekvence svojte *C. mulaomerovici* dobivene sekvenciranjem fragmenta tirozinaze koja pripada skupini TYRA, a razlikuje se od one dobivene pretragom transkriptoma (*C. mul.* 1). Na kladogramu na Sl. 4.5. gotovo identične ili vrlo slične sekvence navedene su kao jedan homolog (npr. sekvence *C. jal.* 2 – 6, *C. mul.* 2 ~ *C. mul.* 3 itd.). Na temelju prikazanog kladograma i skupinama TYRA i TYRB dodatno pridruženih sekvenci pretpostavljen je broj paraloga tirozinaze za svojte porodice Dreissenidae uključene u istraživanje. Pretpostavljeni broj paraloga naveden je u lijevom dijelu Sl. 4.5.

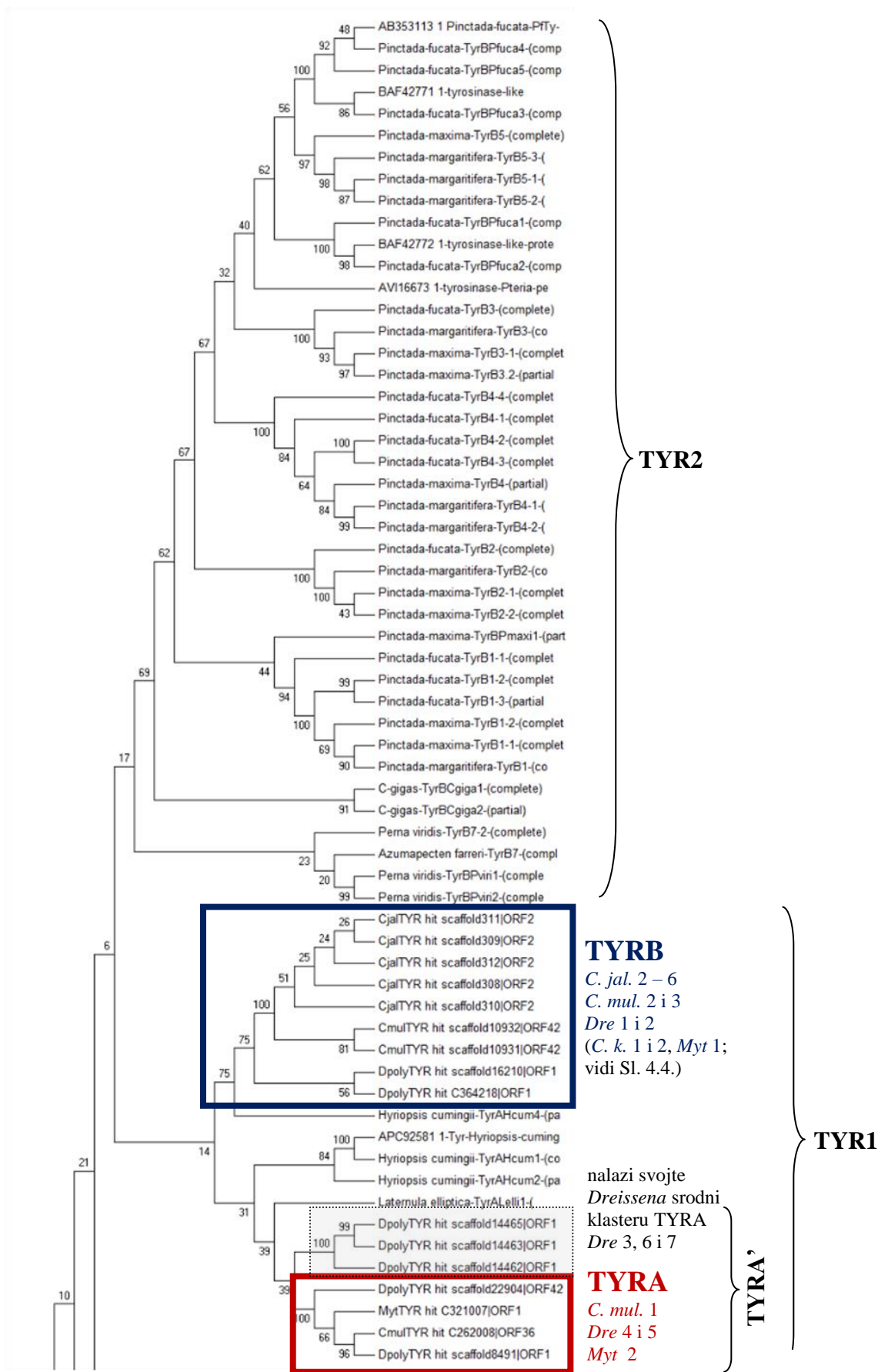


TYR1

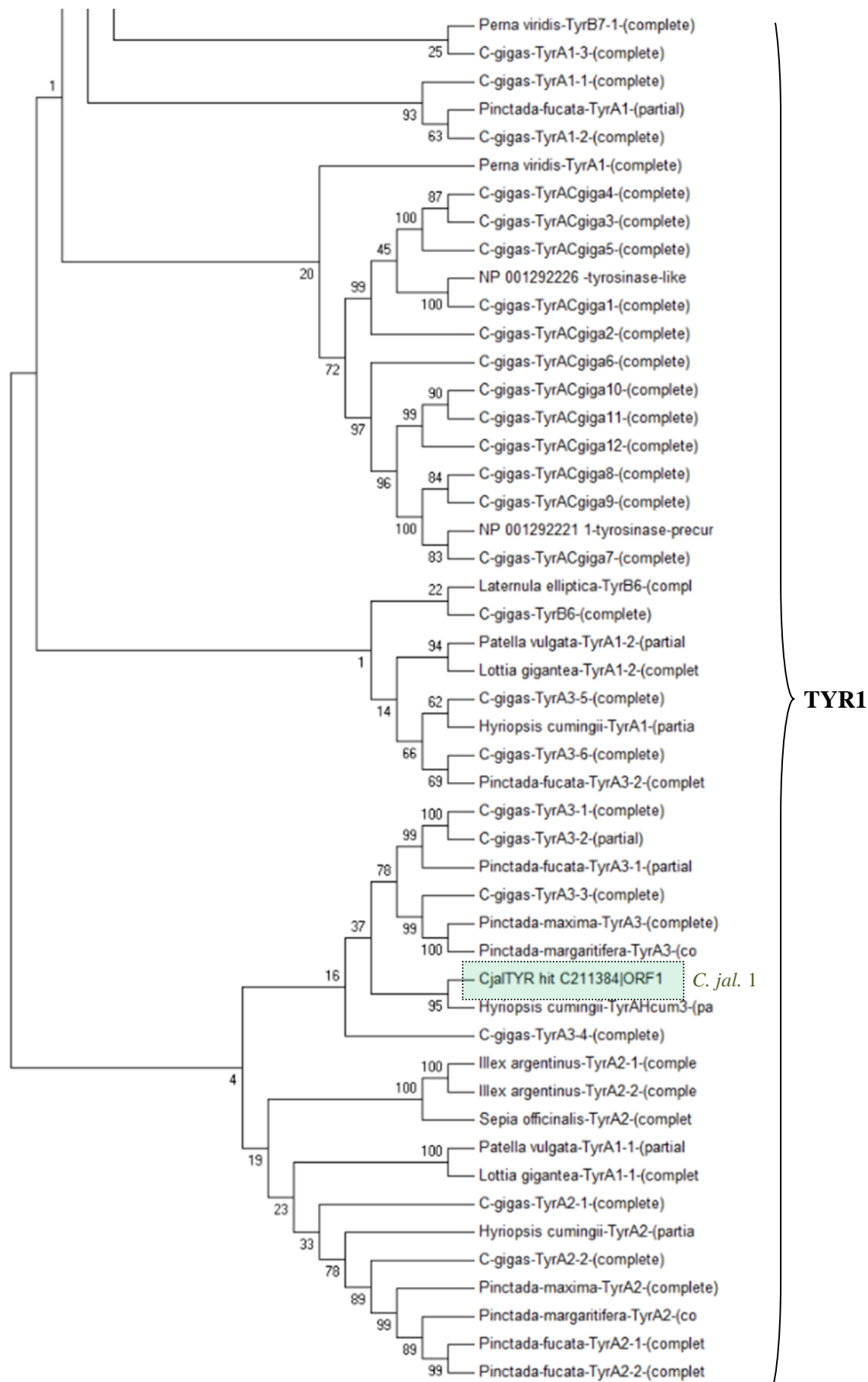
(Slika. 4.2. Nastavak na sljedećoj stranici.)



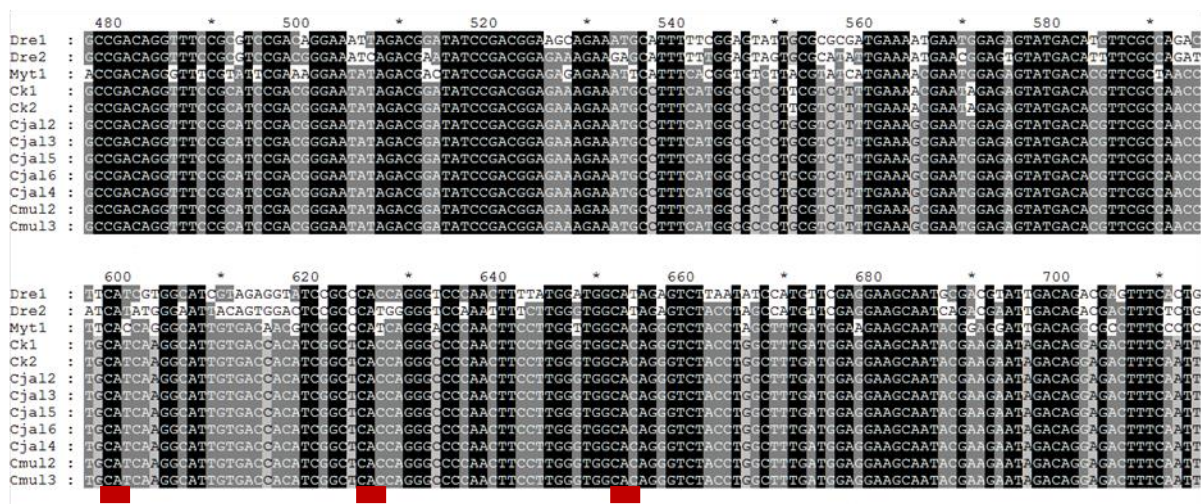
Slika 4.2. Filogenetičko stablo (ML; 1000 *bootstrap* replika) prikazuje srodstvene odnose 111 sekvenci tirozinaze mekušaca: 17 sekvenci (pet svojiti porodice Dreissenidae) dobiveno je u ovome radu korištenjem alata PIA, 7 sekvenci funkcionalno potvrđenih u nekoliko vrsta školjkaša navedeno je u Tablici 3.4., a ostale sekvence su one na temelju kojih su filogeniju tirozinaze u mekušaca istraživali AGUILERA, MCDUGALLiDEGNAN (2014), a ustupljene su ljubaznošću prof. Degnana. Brojke uz nodije na stablu predstavljaju *bootstrap* vrijednosti. Dvije skupine koje sadrže predstavnike različitih rodova porodice Dreissenidae nazvane su TYRA i TYRB. Skupini TYRA blisko je srodna skupina koja sadrži tri sekvence tirozinaze svoje *Dreissena polymorpha*. Provedena je još jedna neovisna analiza s istim parametrima (ML; 1000 *bootstrap* replika) koja je također dala skupine TYRA (*bootstrap*: 100), TYRB (92) i skupinu *Dre* 3+6+7 (100). Sekvenca *C. jal.* 1 jedina ne ulazi u sastav neke od imenovanih skupina (TYRA, TYRB, TYRA') (obje neovisne analize). Skupine TYR1 i TYR2 predstavljaju dvije velike evolucijske skupine tirozinaze mekušaca koje su AGUILERA, MCDUGALLiDEGNAN (2014) imenovali kao TYRA, odnosno TYRB. Na jednoj od dvije neovisne analize TYR1 i TYR2 dobivene su kao sestrinske skupine (prikazano stablo), a na drugoj je TYR2 ugniježđena u parafiletsku skupinu TYR1.



(Slika. 4.3. Nastavak na sljedećoj stranici.)

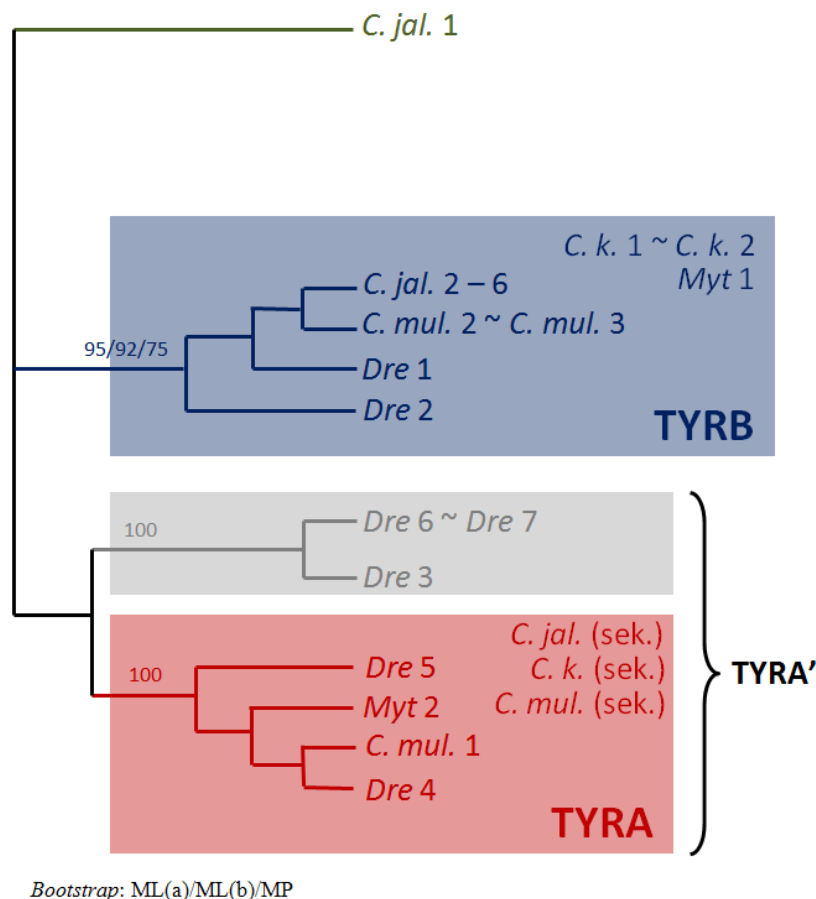


Slika 4.3. Filogenetičko stablo (MP; 1000 *bootstrap* replika) prikazuje srodstvene odnose 111 sekvenci tirozinaze mekušaca. Brojke uz nodije na stablu predstavljaju *bootstrap* vrijednosti. Sekvenca *C. jal.* 1 jedina ne ulazi u sastav neke od imenovanih skupina (TYRA, TYRB, TYRA'). Skupina TYR2 dobivena je kao ugniježđena u parafiletsku skupinu TYR1.



Slika 4.4. Fragment poravnjanja nukleotidnih sekvenci koje pripadaju skupini TYRB te sekvenci *C. k.* 1 i 2 te *Myt* 1 koje nisu bile obuhvaćene filogenetičkom analizom. Poravnanje je napravljeno korištenjem alata Clustal Omega i analizirano u programu GeneDoc. Crna područja – identičnost nukleotidnih pozicija između svih sekvenci, tamnosivo – visoka sličnost, svijetosivo – nešto manja sličnost. Sekvence *C. k.* 1 i 2 (gotovo identične) te *Myt* 1 pokazuju visoki afinitet prema skupini TYRB. Crveno su označena mjesta CAT/CAC kodona koji kodiraju za tri histidinska ostatka Cu(A) područja aktivnog mjesta tirozinaze.

BROJ PARALOGA TIROZINAZE



Slika 4.5. Prikazani kladogram predstavlja izvadak iz filogenetičkog stabla dobivenog korištenjem metode maksimalna vjerodostojnost, prikazanog na Sl. 4.2. Međusobno gotovo identične ili vrlo slične sekvence dobivene pretragom transkriptoma navedene su kao jedan homolog tirozinaze (npr. sekvence *C. jal. 2 – 6*). Na kladogramu je naznačena podržanost skupina TYRA, skupine sa sekvencama svojte *D. polymorpha* i TYRB *bootstrap* vrijednošću (ML, jedna analiza/ML, druga analiza/MP analiza). Navedene su i sekvence koje pripadaju skupini TYRB koje nisu bile uključene u filogenetičku analizu, kao i sekvence dobivene sekvenciranjem fragmenata homologa tirozinaze koje pripadaju skupini TYRA: sekvenciranjem je pokazano postojanje sekvenci svojti *C. jalzici* i *C. kusceri* koje pripadaju skupini TYRA, a dobivena je i sekvenca koja se razlikuje od sekvence *C. mul. 1*. Raspored sekvenci na kladogramu omogućuje pretpostavljanje broja paraloga tirozinaze za pet svojti porodice Dreissenidae, što je navedeno u lijevom dijelu slike.

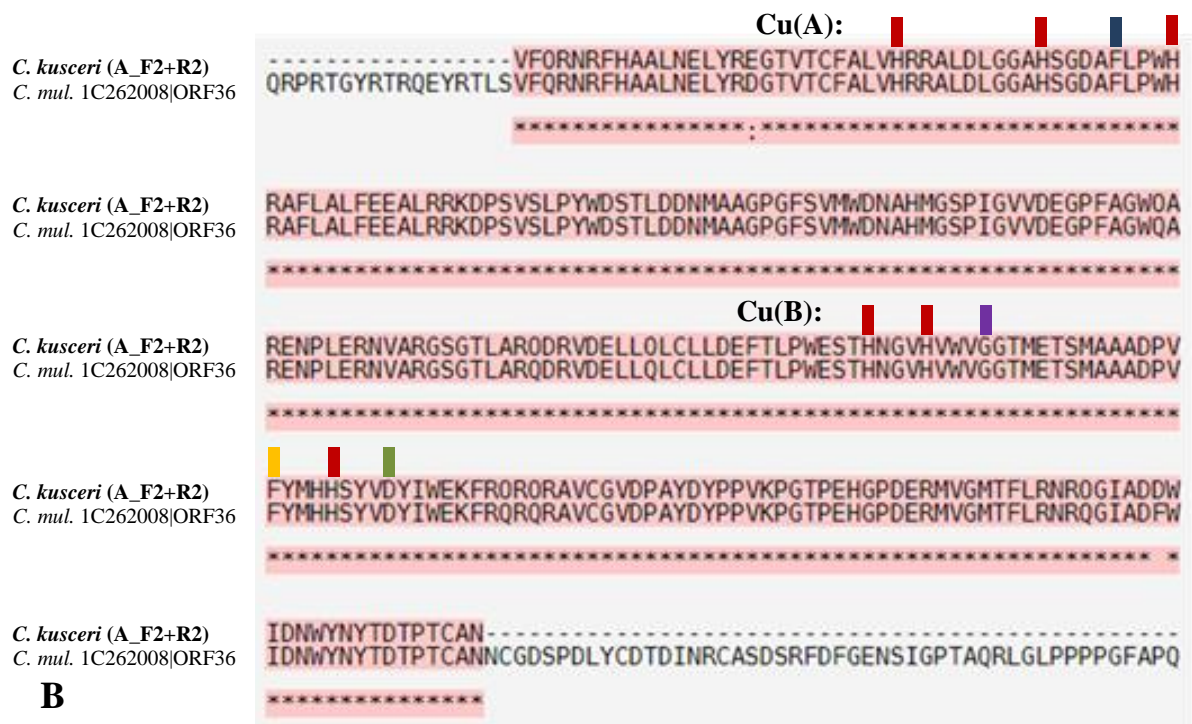
4.3. Rezultati sekvenciranja i analiza dobivenih sekvenci

Sekvenciranjem su dobivene nukleotidne sekvence koje su prevedene u proteinske korištenjem bioinformatičkog portala ExPASy (pomoću alata *Translate tool*). U nastavku su navedene dobivene sekvence u usporednom prikazu nukleotidne i proteinske sekvence, a svaka je proteinska sekvenca poravnata s pretpostavljeno najsirodnijom sekvencom iz odgovarajuće skupine (TYRA ili TYRB). Poravnanja proteinskih sekvenci dobivena su korištenjem alata T-Coffee. Dobivene su sljedeće sekvence:

1) *Conger* *kusceri* – TYRA_Drei_F2 + TYRA_Drei_R2 (Sl. 4.6.)

```
gtcttccagaggaaccgggtccatgctgcattgaacgagctctatagggaggggacggtg
V F Q R N R F H A A L N E L Y R E G T V
acgtgtttcgctctgggtgcacagggcggcggttagatttgggcggggcacacagtggcgac
T C F A L V H R R A L D L G G A H S G D
gcgtttctaccctggcatagagcatttctagctctatttgaggaggcgcttcgaagggaaa
A E L P W H R A F L A L F E E A L R R K
gaccgctctgtttccctgcccactgaggacagcaccctggatgacaatatggcggctggg
D P S V S L P Y W D S T L D D N M A A G
ccgggttctctgtcatgtgggacaacggcgacatggggcgccaataggcgtgggtcgac
P G F S V M W D N A H M G S P I G V V D
gagggccctttgcccggctggcagggcccgagaaaaccctcttgagcgaaacgtcgctcgg
E G P F A G W Q A R E N P L E R N V A R
gggtcaggcagcgttgcccggcaggacagggtagacgagctgttacagctctgtcttctg
G S G T L A R Q D R V D E L L Q L C L L
gatgaattcacgctaccctgggagagcaccacacaatggcgtgcatgtctgggtgggtgga
D E F T L P W E S T H N G V H V W V G G
accatggaaaccagtatggcggcagcggatcccgtgttctacatgcatcactcctatggt
T M E T S M A A A D P V F Y M H H S Y V
gactacatctgggagaagtccggcagcggcagcggcggcgtctgtggagtggatccggcg
D Y I W E K F R Q R Q R A V C G V D P A
tacgactaccgcccgtcaaaccgggcaccccggagcatgggtccggatgagcgtatggtc
Y D Y P P V K P G T P E H G P D E R M V
ggaatgacgttccctgcgaaacaggcaaggcatcgctgatgattggatcgacaactgggat
G M T F L R N R Q G I A D D W I D N W Y
aactatactgacacgcccacgtgtgccaat
N Y T D T P T C A N
```

A



Slika 4.6. (A) Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence fragmenta tirozinaze *C. kusceri* dobivenog korištenjem početnica TYRA_Drei_F2 i TYRA_Drei_R2; (B) Poravnanje proteinske sekvence sa sekvencom *C. mul.* 1 (*C. mulaomerovici*). Označeni su konzervirani aminokiselinski ostaci Cu(A) i Cu(B) mjesta.

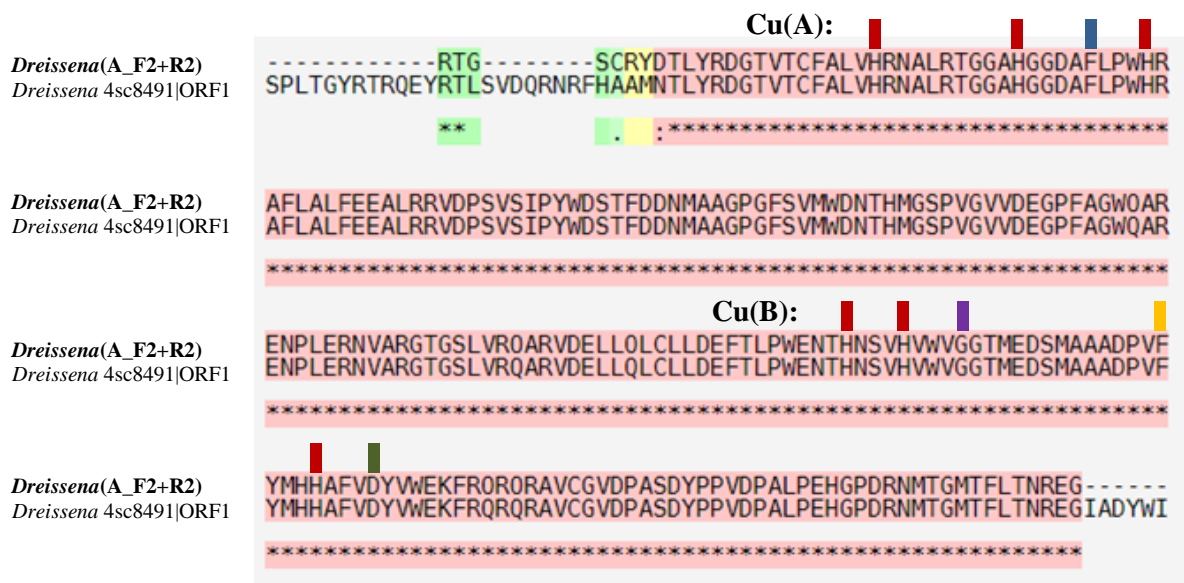
2) *Dreissena polymorpha* – TYRA_Drei_F2 + TYRA_Drei_R2 (Sl. 4.7.)

```

agaggaccggttcatgcccgtatgatagcgtttatcgggatggtacagtcacatgttttgct
  R T G S C R Y D T L Y R D G T V T C F A
ctggtacacagaaaacgcgcttcgaaccgggtggggcccacgggtggtgacgcctttctgccc
  L V [R] R N A L R T G G A [R] G G D A [E] L P
tggcatcgagcattcttagcgctggttgagaagcgcctgagaagagttgatccatctggt
  W [R] R A F L A L F E E A L R R V D P S V
tcaattccttactgggacagtagcctttgacgacaatatggcggctggaccggattttcc
  S I P Y W D S T F D D N M A A G P G F S
gtaatggtgggataaacacgcacatgggctctccgggtggcgttggtagcagggaccttc
  V M W D N T H M G S P V G V V D E G P F
gcggtggtgcaagctcgggagaaaccctctagagcggaaacgtggcccaggaacgggatcg
  A G W Q A R E N P L E R N V A R G T G S
ctggtccgctcaggcccgagtagatgagttggtacaactgtgtctgctagatgagttcagc
  L V R Q A A R V D E L L Q L C L L D E F T
ttgccctgggaaaaaccccacaattctgtgcatgtctgggttgaggtaccatggaggac
  L P W E N T [R] N S V [R] V W V [G] G T M E D
agtatggcggcggcggaccagcagcattctacatgcaccatgccttcggtgattacgatgg
  S M A A A D P V [E] Y M H [R] A F V [D] Y V W
gagaagtttcggcagcagacaacgcgctctgtggagtgatccggcgtccgactaccgg
  E K F R Q R Q R A V C G V D P A S D Y P
ccagtagatccggccctcccagagcatggtccggataggaatatgactggaatgacgttc
  P V D P A L P E H G P D R N M T G M T F
ttaacaaacagagaagggat
  L T N R E G

```

A



B

Slika 4.7. (A) Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence fragmenta tirozinaze svojte *D. polymorpha* dobivenog korištenjem početnica TYRA_Drei_F2 i TYRA_Drei_R2; (B) Poravnanje proteinske sekvence sa sekvencom *Dre* 4 (*D. polymorpha*). Označeni su konzervirani aminokiselinski ostaci Cu(A) i Cu(B) mjesta.

3) *Conger* *mulaomerovici* – TYRA_Drei_F3 + Overhang (Sl. 4.8.)

Na poravnanju dobivene sekvence sa sekvencom *C. mul.* 1 mjesto slabe podudarnosti označeno je sa *m* (Sl. 4.8B).

```

tgcggaacagtcgccgatctttattgcgacaccgatataaatcgttgctgtcagcttcgaat
  R N S P D L Y C D T D I N R C V S A S N
tttagttttggcgaggcaacgatagggccaacggcacaaggccttggtttggctccctcct
  F S F G E A T I G P T A Q G L G L V P P
cctggcactgcgccgcaacgcgctactgcgcgccagtttcaccgcttccaccaccct
  P G T A P Q R A T A R P V S P A S T T P
aaagcagctacgtacgcgactctgtcaaaacaggcggtaaaccatacgaaggatcctgc
  K A A T Y A D S V K T G G K P Y E G S C
tccaaggatccatgatgctcgatcatgctgtaagcgtcctcagccgtccacaccggcagag
  S K D P Y A R S C V K R P Q P S T P A E
ttagttaatgccatgtctctgaacaaggataccgaaacccaaacccttagatgacgtgtat
  L V N A M S L N K V P K P K P L D D V Y
gagagaatcaaggcgttactgaagaaaggcgaaggatccacctggaagtgaggcgaag
  E R I K A L L K K G E R Y P P G S E A K
tttttcaagatgaaaccggatgaggagaacgactgccgctgcctcgacaagtatatccgc
  F F K M K P D E E N D C R C L D K Y I R
gatcccttggtcgcctacgtagagaaaggacgggaa
  D P L V A Y V E K G R E

```

A



B

Slika 4.8. (A) Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence fragmenta tirozinaze svojte *C. mulaomerovici* dobivenog korištenjem početnica TYRA_Drei_F3 i Overhang; (B) Poravnanje proteinske sekvence sa sekvencom *C. mul. 1* (*C. mulaomerovici*). Mjesto slabe podudarnosti označeno je sa *m*.

4) *Dreissena polymorpha* – TYRA_Drei_F3 + Overhang (Sl. 4.9.)

```

gtttcaccgcgcttccaccaccctaaagcagctacgtacgcggactctgtcaaacagggc
V S P A S T T P K A A T Y A D S V K T G
ggtaaaccatacgaaggatcctgctccaaggatccatgatgctcgatcatgcgtaagcgt
G K P Y E G S C S K D P Y A R S C V K R
cctcagccggtccacaccggcagagttagttaatgccatgtctctgaacaaggtagcggaaa
P Q P S T P A E L V N A M S L N K V P K
cccaaaccttagatgacgtgtatgagagaatcaaggcgttactgaagaaaggcgaagg
P K P L D D V Y E R I K A L L K K G E R
tatccacctggaagtgaggcgaagtttttcaagatgaaaccggatgaggagaacgactgc
Y P P G S E A K F F K M K P D E E N D C
cgctgcctcgacaagtatatccgcgatcccttggtcgcctacgtagagaaaggacggaag
R C L D K Y I R D P L V A Y V E K G R K
ctcagcaagagcgggtcctaaactgtacgacacttcacgcgcgtgcattatgccagtttt
L S K S G P K L Y D T S R A C I M P S F
atcagaacaagacacataaaaagtacatgcgctgtatatgcataatatatatatatacat
I R T R H I K V T C A V Y A * Y I Y I H
aaactaaagaaaaatacaggttttcttacacaaaaaaaaaaaaa
K L K K N T G F L H K K K K

```

A

Dreissena(A_F3+Overh.)
Dreissena 4sc8491|ORF1

```
---PVSPASTTPKAATYADSVKTGGKPYEGSCSKDPYARSCVKRPOPSTPAELVNAMSLNKVP  
TARVPVSPASTTPKAATYADSVKTGGKPYEGSCSKDPYARSCVKRQPSTPAELVNAMSLNKVP
```

Dreissena(A_F3+Overh.)
Dreissena 4sc8491|ORF1

```
KPKPLDDVYERIKALLKKGERYPPGSEAKFFKMKPDEENDCRCLDKYIRDPLVAYVEKGRKLS  
KPKPLDDVYERIKALLKKGERYPPGSEAKFFKMKPDEENDCRCLDKYIRDPLVAYVEKGRKLS
```

Dreissena(A_F3+Overh.)
Dreissena 4sc8491|ORF1

```
KSGPKLYDTSRACIMPSFIRTRHIKVTCAVYA  
KSGPKLYDTY-----T
```

:

B

Slika 4.9. (A) Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence fragmenta tirozinaze svojte *D. polymorpha* dobivenog korištenjem početnica TYRA_Drei_F3 i Overhang. Zvezdicom (*) je označen stop kodon. **(B)** Poravnanje proteinske sekvence sa sekvencom *Dre 4* (*D. polymorpha*).

5) *Congerina kusceri* – TYRA_Drei_F3 + Overhang (Sl. 4.10.)

```
aaattccatagggccaacagcacaacggctcggactgcccccgccgccttgctttgcacc;  
N S I G P T A Q R L G L P P P P G F A P  
cagggcagaatggccgactccccctcaaatggcaaaagccagctacgtacgtgattctgtc  
Q G R M A D S P Q M A K P A T Y A D S V  
caaatgggagggagaccatacgaaggggcatgcgccaaggatccttacgttaggtcgtgc  
Q M G G R P Y E G A C A K D P Y A R S C  
gttaagcgtccggatccgctcgacgcccgaagaggtggtaaacgccatggcgctggacaag  
V K R P D P S T P E E V V N A M A L D K  
gtaccgagatccaagccgctggaggacgtgtacgaaaagggttaaatacctgctgaagaag  
V P R S K P L E D V Y E K V K Y L L K K  
ggggagcggatccgccccgaaatgagggtcaagggtttcaagatgctaacggatgaggag  
G E R Y P P G N E V K V F K M L T D E E  
aacgactgccgctctctcgacaagttcatccgggacccgctggtcgcctacgtacagaaa  
N D C R S L D K F I R D P L V A Y V Q K  
tggacggaaactc  
W T E T
```

A

C. kusceri (A_F3+Overh.)
C. mul. 1 C262008|ORF36

```
-----NSIGPTAORLGLPPPPGFAPQ  
IDNWYNYTDPTCANNCGDSPDLYCDTDINRCASDSRFDGGENSIGPTAORLGLPPPPGFAPQ
```

C. kusceri (A_F3+Overh.)
C. mul. 1 C262008|ORF36

```
GRMADSPOMAKPATYADSVOMGGRPYEGACAKDPYARSCVKRPDPSTPEEVVNAMALDKVPRS  
GRMAASPQMAKPATYADSVQRGGRPYEGACAKDPYARSCVKRPDPSTPEEVVNAMALDKVPRP
```

**** *****

C. kusceri (A_F3+Overh.)
C. mul. 1 C262008|ORF36

```
KPLEDVYEKVKYLLKKGERYPPGNEVKVFKMLTDEENDCRSLDKFIRDPLVAYVQKWTET---  
KPLEDVYEKVKYLLKKGERYPPGNEVKVFKMLTDEENDCRSLDKFIRDPLVAYVQNGRKLKSKK
```

***** : :

C. kusceri (A_F3+Overh.)
C. mul. 1 C262008|ORF36

```
-----  
GPKLYDTYK
```

B

Slika 4.10. (A) Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence fragmenta tirozinaze svojte *C. kusceri* dobivenog korištenjem početnica TYRA_Drei_F3 i Overhang; **(B)** Poravnanje proteinske sekvence sa sekvencom *C. mul* 1 (*C. mulaomerovici*).

6) *Conger* *jalzici* – TYRA_Drei_F3 + Overhang

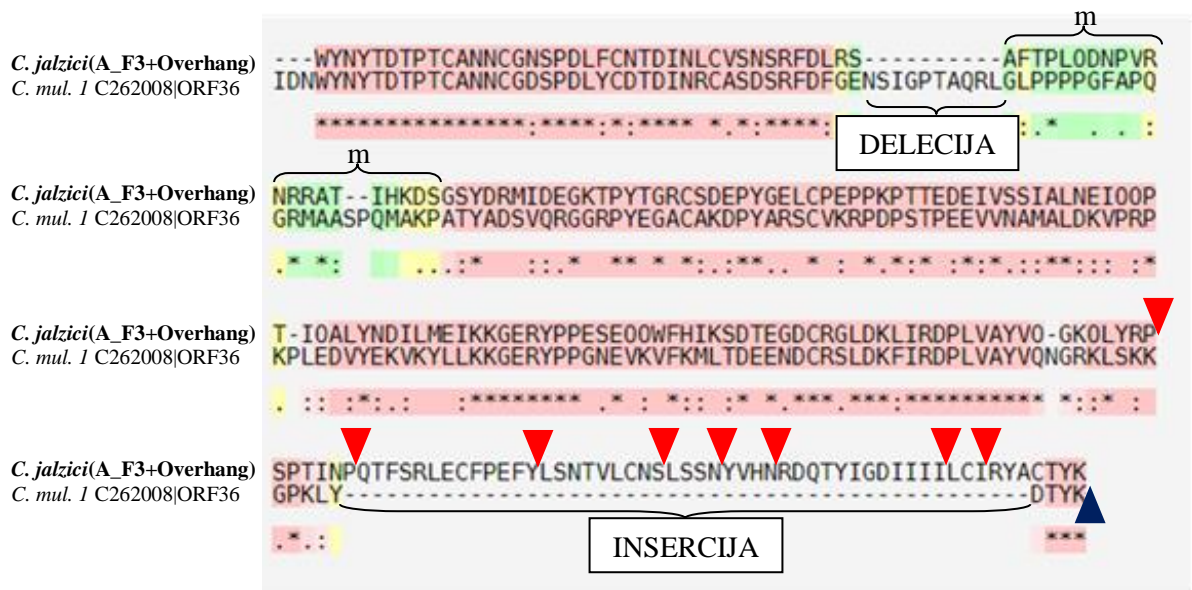
Na Sl. 4.11A dan je usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence fragmenta tirozinaze svojte *C. jalzici* dobivenog korištenjem početnica TYRA_Drei_F3 i Overhang. Na Sl. 4.11B prikazano je poravnanje ove sekvence s *C. mul*. 1. U usporedbi s *C. mul*. 1, sekvenca *C. jalzici* dobivena sekvenciranjem pokazuje mjesta delecije, osobito slabe podudarnosti (označeno sa *m*) i insercije. Mjesto insercije prožeto je stop kodonima čiji je smještaj naznačen crvenim trokutima.

```

actggataactataactgacacacactacttgtgctaataattgcggtaatagcccggatctg
  W Y N Y T D T P T C A N N C G N S P D L
ttttgcaacacggatattaatgtgctgtcgaattcccgctttgatttaagaagcgcg
  F C N T D I N L C V S N S R F D L R S A
tttaccgccgctgcaagacaaccctgttaggaatagacgtgctactatacataaggacagc
  F T P L Q D N P V R N R R A T I H K D S
ggaagttatgatagaatgatcgacgaaggaaaaacacatatacgggcaggtgttctgat
  G S Y D R M I D E G K T P Y T G R C S D
gaaccatacggcgcaattgtgcccctgagccgcccaagccgacaacggaagacgaaattgtg
  E P Y G E L C P E P P K P T T E D E I V
agttccattgcgctcaatgagatacaacaaccgaccatacaagcattgtacaatgacatc
  S S I A L N E I Q Q P T I Q A L Y N D I
ttgatggaaataaaaaaagggtgagcggatccacctgagagcgagcagcagtggttccac
  L M E I K K G E R Y P P E S E Q Q W F H
ataaagtcagatacgggaaggtgactgtcgtggactggacaagctcattcgagaccgctg
  I K S D T E G D C R G L D K L I R D P L
gtagcctatgtgcaaggcaacaactctacaggccttagtcaccgacaattaacccttga
  V A Y V Q G K Q L Y R P * S P T I N P *
cagacgttctccagattggaatgttttcctgaattttattagcttagcaataactgtatta
  Q T F S R L E C F P E F Y * L S N T V L
tgcaattcttagctgtcatctaattgatatgtccacaattgaagagaccaaacttatata
  C N S * L S S N * Y V H N * R D Q T Y I
ggcgacattattattatgatgactgtgtatttgaagatatgcatgtacatataagc
  G D I I I I * L C I * R Y A C T Y K

```

A



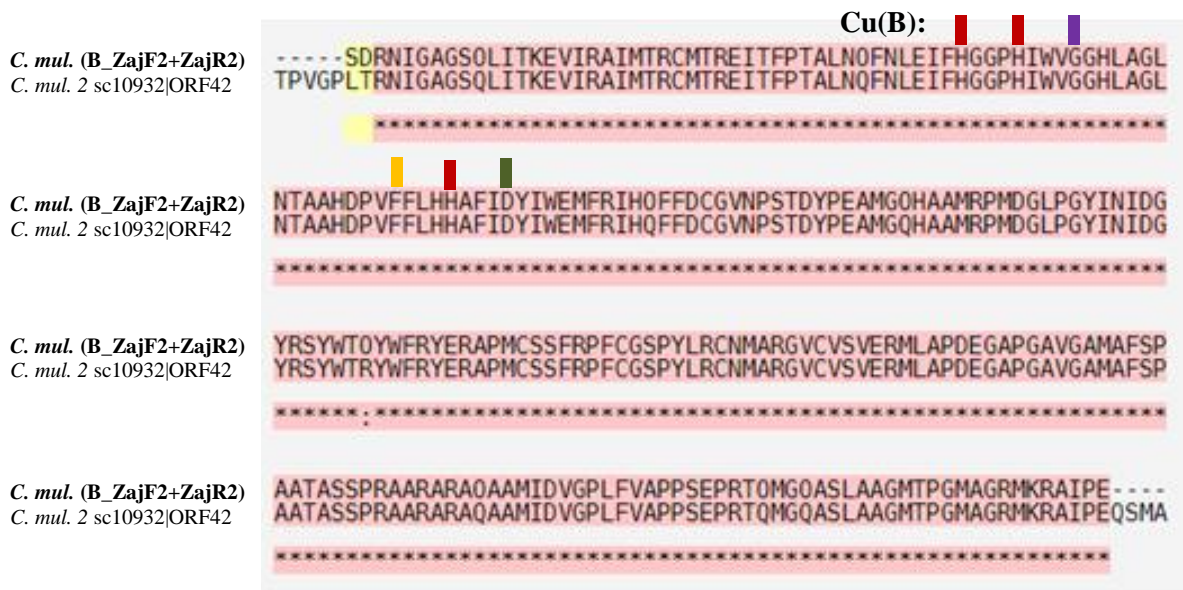
B

Slika 4.11. (A) Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence fragmenta tirozinaze svojte *C. jalzici* dobivenog korištenjem početnica TYRA_Drei_F3 i Overhang; (B) Poravnanje proteinske sekvence sa sekvencom *C. mul. 1* (*C. mulaomerovici*). Na slici su označena mjesta delecije, osobito slabe podudarnosti (*m*) i insercije u odnosu na sekvencu *C. mul. 1*. Vrhom crvenog trokuta označena su mjesta između dvaju aminokiselinskih ostataka na kojima dolaze stop kodoni u *C. jalzici*. Vrhom plavog trokuta označeno je mjesto stop kodona u *C. mul. 1*.

7) *Congerina mulaomerovici* – TYRB_Drei_ZajF2 + TYRB_Drei_ZajR2 (Sl. 4.12.)

```
tctgacagaaatatacggcgctgggagtcagttgattactaaagaggttatccgagcgcgac
S D R N I G A G S Q L I T K E V I R A I
atgaccgggtgatgactcggcagatcacctttccaactgcattaaatcagttcaacctt
M T R C M T R E I T F P T A L N Q F N L
gaaatttccacgggtggccacatatctggggtggaggacacttggctggtcttaataca
E I F G G P I W V G H L A G L N T
gccgcacacgatcctgtatctttccaccacgcatttattgactatattggaaatg
A A H D P V F L H A F I D Y I W E M
ttccgcacatcaattctttgactgtggagttaatcccagcactgactatccggaagca
F R I H Q F F D C G V N P S T D Y P E A
atgggacaacatgcagccatgaggccaatggacggtttaccgggatacatcaacattgat
M G Q H A A M R P M D G L P G Y I N I D
ggttatcgaagctactggacgcagctactggtttagatatgaacgcgcgcctatgtgttct
G Y R S Y W T Q Y W F R Y E R A P M C S
tcgtttagaccggtttgcggttcaccatatttaagatgcaacatggcccgggagtggtgc
S F R P F C G S P Y L R C N M A R G V C
gtgtcagtggaacgtatgctggcccccgatgaaggagcacctggggcggttggcgctatg
V S V E R M L A P D E G A P G A V G A M
gctttctcccctgcagcaacggcctcatccccgcgggcagccagagcaagagctcaagct
A F S P A A T A S S P R A A R A R A Q A
gcaatgatcgacgtcggctcctctatgtggctcctccgtctgaacccaggacgcagatg
A M I D V G P L F V A P P S E P R T Q M
ggacaggcaagcttggcggcaggcatgactcccggcatggctggacgtatgaagagggtc
G Q A S L A A G M T P G M A G R M K R A
ataccggag
I P E
```

A



B

Slika 4.12. (A) Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence fragmenta tirozinaze svojte *C. mulaomerovici* dobivenog korištenjem početnica TYRB_Drei_ZajF2 i TYRB_Drei_ZajR2; (B) Poravnanje proteinske sekvence sa sekvencom *C. mul. 2* (*C. mulaomerovici*). Označeni su konzervirani aminokiselinski ostaci Cu(B) mjesta.

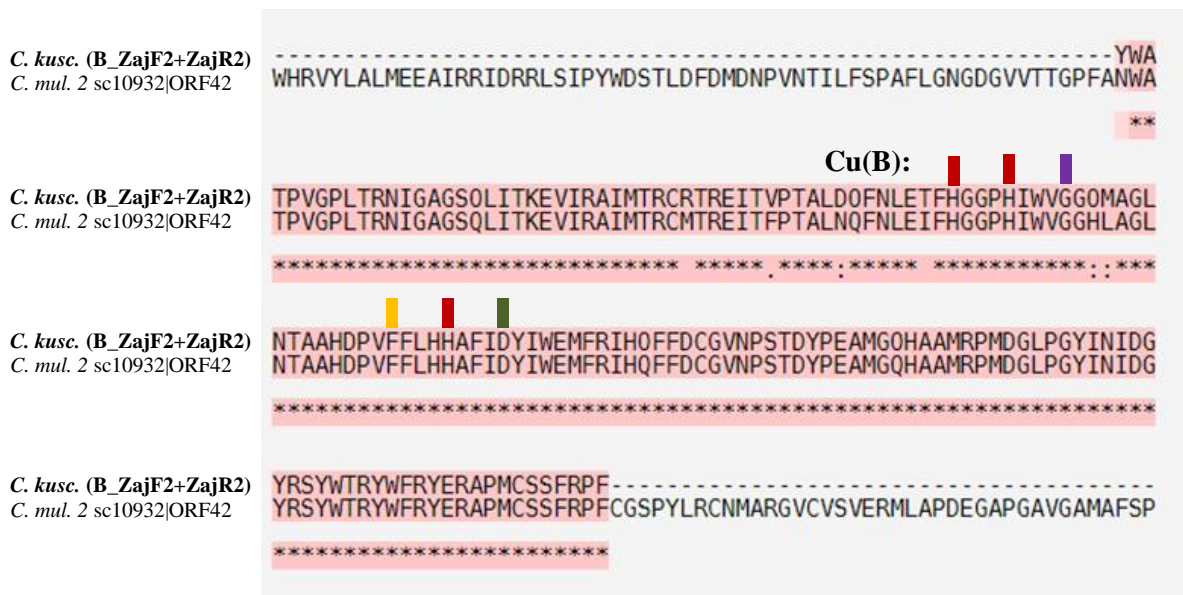
8) *Congerina kusceri* – TYRB_Drei_ZajF2 + TYRB_Drei_ZajR2 (Sl. 4.13.)

```

ctactgggccacgcccgtaggtcctctgacaagaaatcggcgctgggagtcagttgatt
Y W A T P V G P L T R N I G A G S Q L I
actaaagaggttatccgagcgatcatgacccgggtgctgactcgcgagatcacggttcca
T K E V I R A I M T R C R T R E I T V P
actgcattagatcagttcaaccttgaaactttccacgggtggtccacatatctgggttggg
T A L D Q F N L E T F H G G P H I W V G
ggacagatggctggtccttaatacagccgcacacgatcctgtatcttccaccacgca
G Q M A G L N T A A H D P V F F L H H A
tttattgactacatttgggaaatggtccgcatccatcaattctttgactgtggagttaat
F I D Y I W E M F R I H Q F F D C G V N
cccagcactgactatccggaagcaatgggacaacatgcagctatgaggccaatggacggt
P S T D Y P E A M G Q H A A M R P M D G
ttaccgggatacatcaacattgatggttatcgaagctactggacgcggtactggtttaga
L P G Y I N I D G Y R S Y W T R Y W F R
tatgaacgcgcgcctatgtgttcttcttagaccgtttg
Y E R A P M C S S F R P F

```

A



B

Slika 4.13. (A) Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence fragmenta tirozinaze svojte *C. kusceri* dobivenog korištenjem početnica TYRB_Drei_ZajF2 i TYRB_Drei_ZajR2; **(B)** Poravnanje proteinske sekvence sa sekvencom *C. mul. 2* (*C. mulaomerovici*). Označeni su konzervirani aminokiselinski ostaci Cu(B) mjesta.

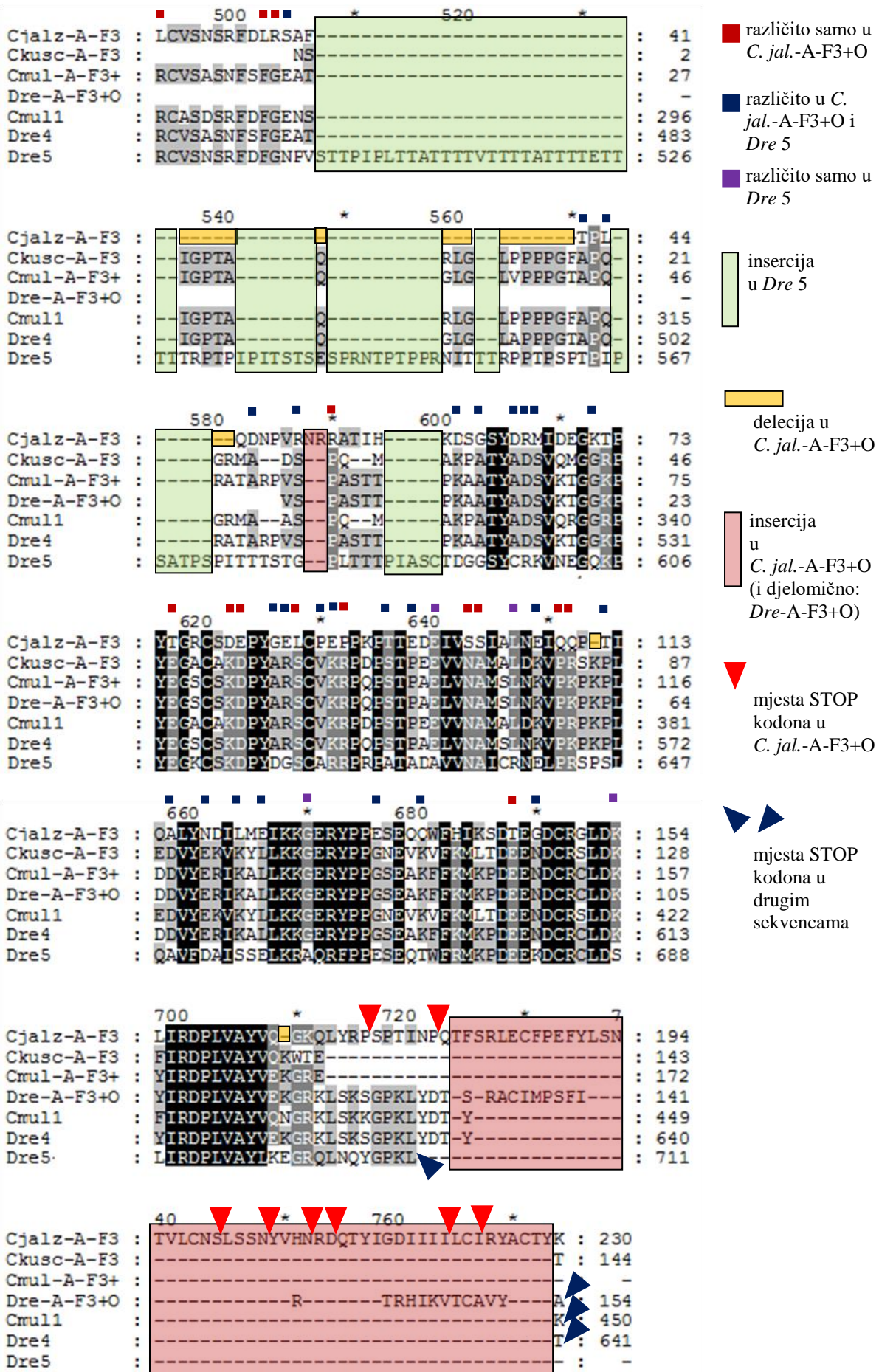
Budući da su PCR reakcijama korištenjem početnica TYA_Drei_F3 i Overhang dobiveni fragmenti za više svojti školjkaša, odnosno za sve izuzev svojte *Mytilopsis* sp., a fragmenti su naposljetku uspješno sekvencirani, moguće je usporediti četiri dobivena fragmenta (F3 + Overhang; *C. jalzici*, *C. kusceri*, *C. mulaomerovici*, *D. polymorpha*) s njima pretpostavljeno najrodnijim sekvencama iz skupine TYRA: *C. mul 1* te *Dre 4* i *5*. Četiri sekvence dobivene sekvenciranjem i tri sekvence dobivene pretragom transkriptoma korištenjem alata PIA poravnate su korištenjem alata T-Coffee i otvorene u programu GeneDoc. Na Sl. 4.14. prikazan je dio poravnanja na kojemu je prisutno svih sedam sekvenci. Obrazac koji čine područje delecije, područje slabe podudarnosti i područje insercije sa stop kodonima primijećen u svojte *C. jalzici* poravnanjem sekvence TYRA_F3 + O sa sekvencom *C. mul. 1* (Sl. 4.11B) vidi se i na poravnanju na Sl. 4.14. Iznad aminokiselinskog slijeda na slici su crvenim kvadratićima u sekvenci *C. jalzici* označena mjesta u kojima ostalih šest sekvenci imaju konzerviranu aminokiselinu, a ona *C. jalzici* jedina se razlikuje. Plavim kvadratićem označena su mjesta u kojima se od konzerviranog obrasca razlikuju *C. jalzici* i još jedna sekvenca – *Dre 5*.

Sekvence *C. jalzici* i *Dre 5* najviše se razlikuju od ostalih sekvenci. Ljubičastim kvadratićima označena su mjesta na kojima sve sekvence osim *Dre 5* imaju konzerviranu aminokiselinu, a takvih mjesta je manje nego onih označenih crvenim kvadratićem (mjesta na kojima se razlikuje samo sekvenca *C. jalzici*). Sekvenca *Dre 5* pokazuje obrazac insercije koji je na slici označen zelenim pravokutnicima.

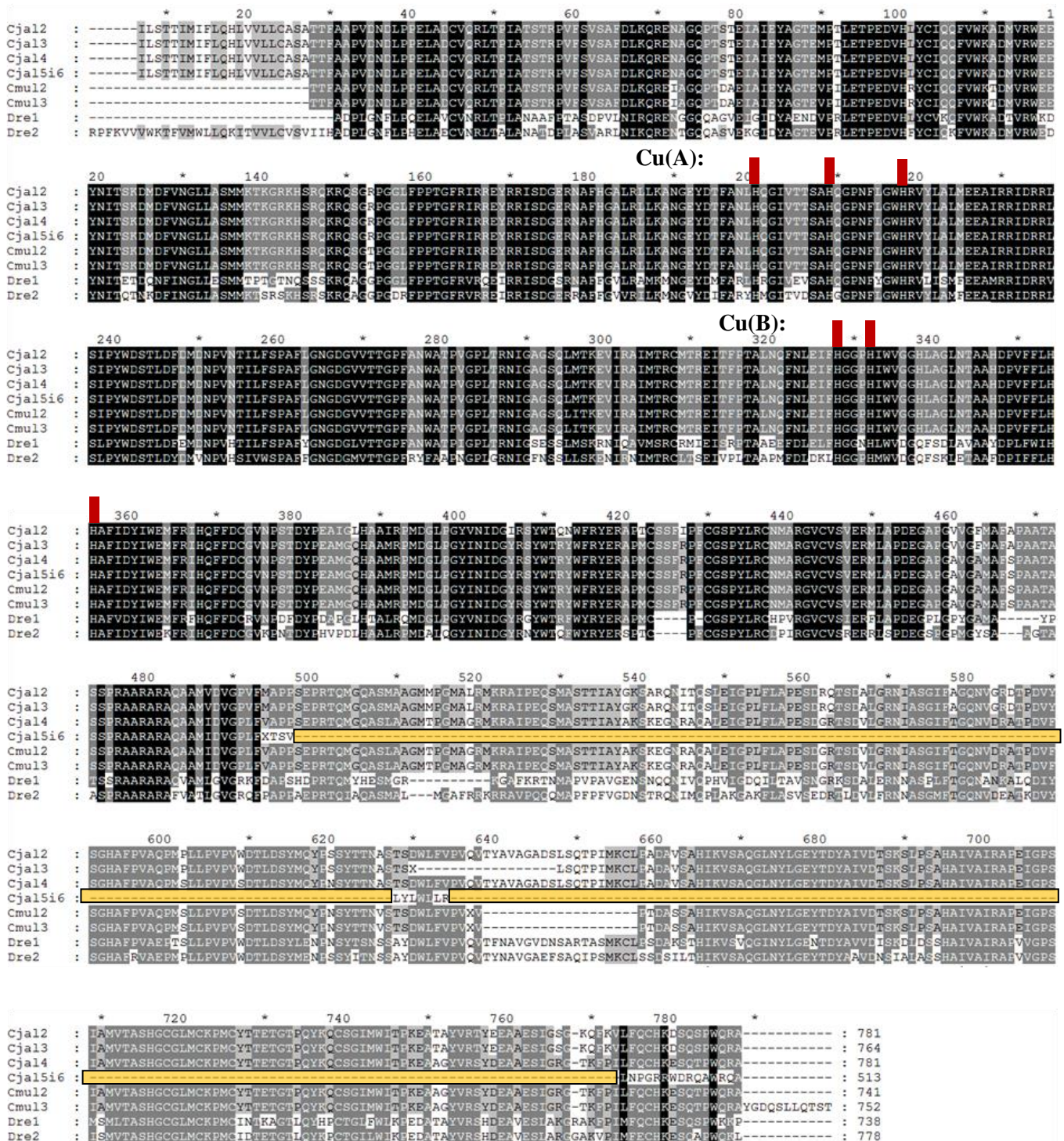
Na Sl. 4.15. prikazano je poravnanje proteinskih sekvenci tirozinaze skupine TYRB. Sve sekvence osim *C. mul* 1, 2 i 3 te *Dre 1* obuhvaćaju cijeli otvoreni okvir čitanja (ORF), dok navedenim sekvencama nedostaje 5' početak. (vidi Prilog1H–J). Sekvence tirozinaze *C. jalzici* iz skupine TYRB označene kao *C. jal.* 5 i 6 (zapravo identična sekvenca) pokazuju deleciju u odnosu na sve ostale sekvence skupine TYRB što je na slici označeno žutim pravokutnicima. Na poravnanju su označena mjesta konzerviranih histidinskih ostataka Cu(A) i Cu(B) mjesta.

	460	*	480	*	
<i>Cjalz</i> -A-F3 :		<u>WYNYTDTPTCANNCGNSPDLFCNTDIN</u>			: 27
<i>Ckusc</i> -A-F3 :					: -
<i>Cmul</i> -A-F3+ :			<u>RNSPDLYCDDIN</u>		: 13
<i>Dre</i> -A-F3+O :					: -
<i>Cmul1</i> :		<u>LRNRQGIADFWIDNWYNYTDTPTCANNCGDSPDLYCDDIN</u>			: 282
<i>Dre4</i> :		<u>LTNREGIADYWIANWFNYTDTPTCP-SCGNSPDLYCDDIN</u>			: 469
<i>Dre5</i> :		<u>LRNRDGIADYWINWFWNYTDSPTCANNCGNSPDLYCDSAIN</u>			: 485

(Slika. 4.14. Nastavak na sljedećoj stranici.)



Slika 4.14. Dio poravnanja četiriju sekvenci dobivenih nakon sekvenciranja PCR produkata umnoženih korištenjem početnica TYRA_Drei_F3 i Overhang (gornje četiri) te triju njima pretpostavljeno najrodnijih sekvenci iz skupine TYRA (*C. mul.* 1, *Dre* 4 i 5). Legenda ukazuje na osobitosti sekvenci *C. jal.-A-F3+O* (dobivena sekvenciranjem) i *Dre* 5 koje se najviše razlikuju od ostalih sekvenci. Sekvenca *C. jalzici* pokazuje delecije na mjestima na kojima sve ostale sekvence imaju aminokiselinske ostatke. Prvi stop kodon u sekvenci *C. jalzici* dobivenoj sekvenciranjem nalazi se prije mjesta stop kodona u drugim sekvencama. Poravnanje dobiveno korištenjem alata T-Coffee analizirano je u programu GeneDoc.



Slika 4.15. Poravnanje proteinskih sekvenci skupine TYRB. Sekvence dobivene korištenjem alata PIA i nazvane *C. jal 5* i *C. jal 6* zapravo su identične: ta sekvenca pokazuje delecije (označeno žutim pravokutnicima) u odnosu na sve ostale sekvence skupine TYRB. Poravnanje je dobiveno korištenjem alata T-Coffee te je analizirano u programu GeneDoc.

4.4. Rezultati spektrofotometrijske analize aktivnosti fenoloksidaza

Spektrofotometrijskom analizom aktivnost fenoloksidaza mjerena je praćenjem promjene optičke gustoće (ΔOD) pri 490 nm u ovisnosti o vremenu. Za sve pokuse iste serije u kojima se reakcije međusobno uspoređuju pripremljeni su lizati školjkaša iste koncentracije.

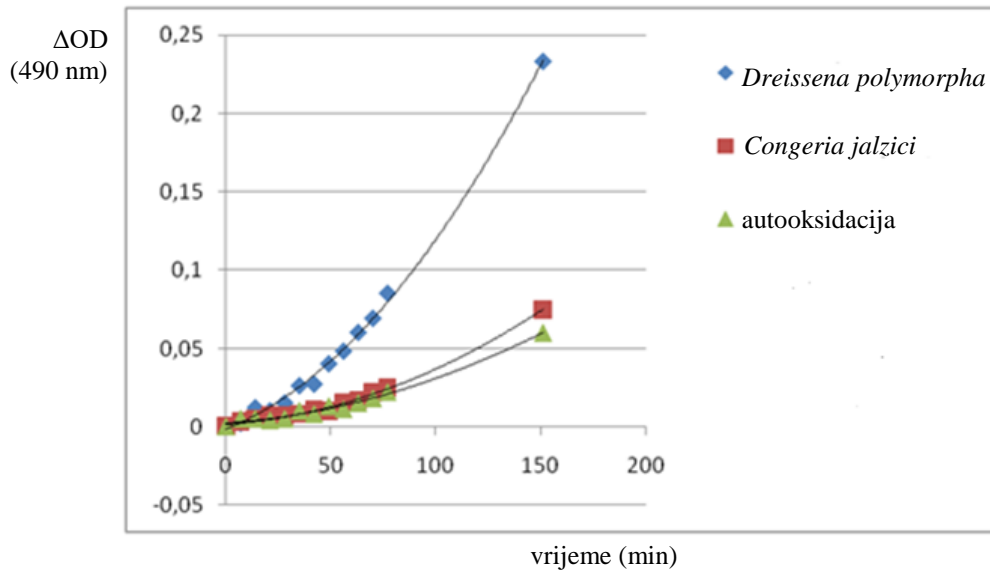
Dva neovisna mjerenja pokazuju kako je aktivnost fenoloksidaza veća u svojje *Dreissena polymorpha* nego u *C. jalzici* (Sl. 4.16. i 4.17. Usporedba aktivnosti fenoloksidaza između svojti *C. kusceri* i *D. polymorpha* u dva neovisna pokusa pokazuje vrlo malu razliku u promjeni optičke gustoće u korist veće aktivnosti svojje *D. polymorpha* (Sl. 4.18.), odnosno potpuno jednaku aktivnost između tih dviju svojti (Sl. 4.19.).

Da se ovako postavljenim pokusom zaista mjeri aktivnost fenoloksidaza, pokazuje utjecaj inhibitora (feniltiouree, PTU) koji smanjuje aktivnost enzima (Sl. 4.17. i 4.18.). Reakcije autooksidacije, s kivetama u koje nije dodan lizat školjkaša, pokazuju da zabilježena promjena optičke gustoće nije rezultat autooksidacije supstrata, već specifične enzimatske reakcije (Sl. 4.16. – 4.21.).

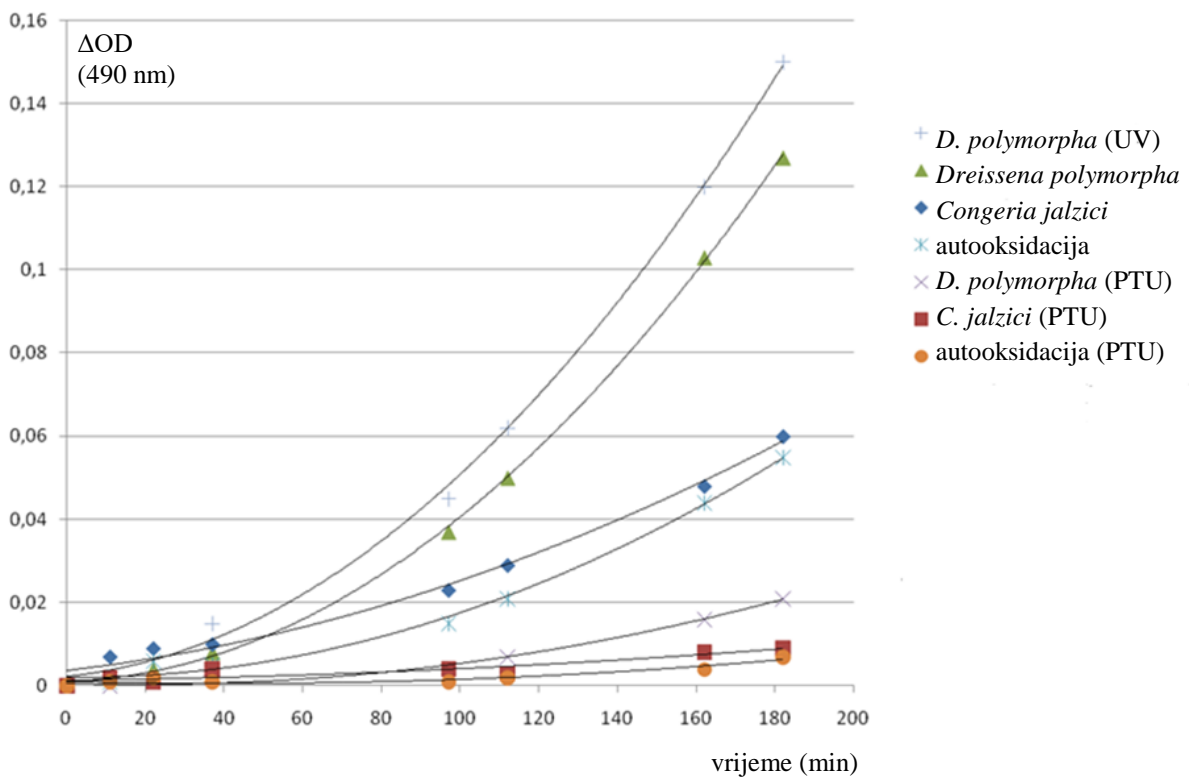
Dok jedno mjerenje pokazuje malenu razliku u promjeni optičke gustoće između kontrolnih i UV-svjetlom zračenih životinja (*D. polymorpha*, Sl. 4.17.), drugo mjerenje pokazuje jednaku aktivnost fenoloksidaza između zračenih i nezračenih životinja (*C. kusceri*, Sl. 4.19.) ili vrlo malu razliku u aktivnosti (*D. polymorpha*, Sl. 4.19.).

Pokus u kojemu je mjerena aktivnost fenoloksidaza u različitim tkivima svojje *D. polymorpha* pokazuje da u uzorkovanim mišićima aduktorima nema aktivnosti fenoloksidaza, dok je aktivnost prisutna u ostalim tkivima (plašt, njegov posebno pigmentirani dio – sifon, škrge) (Sl. 4.20.), s najvećom aktivnosti u tkivu sifona (tulajice).

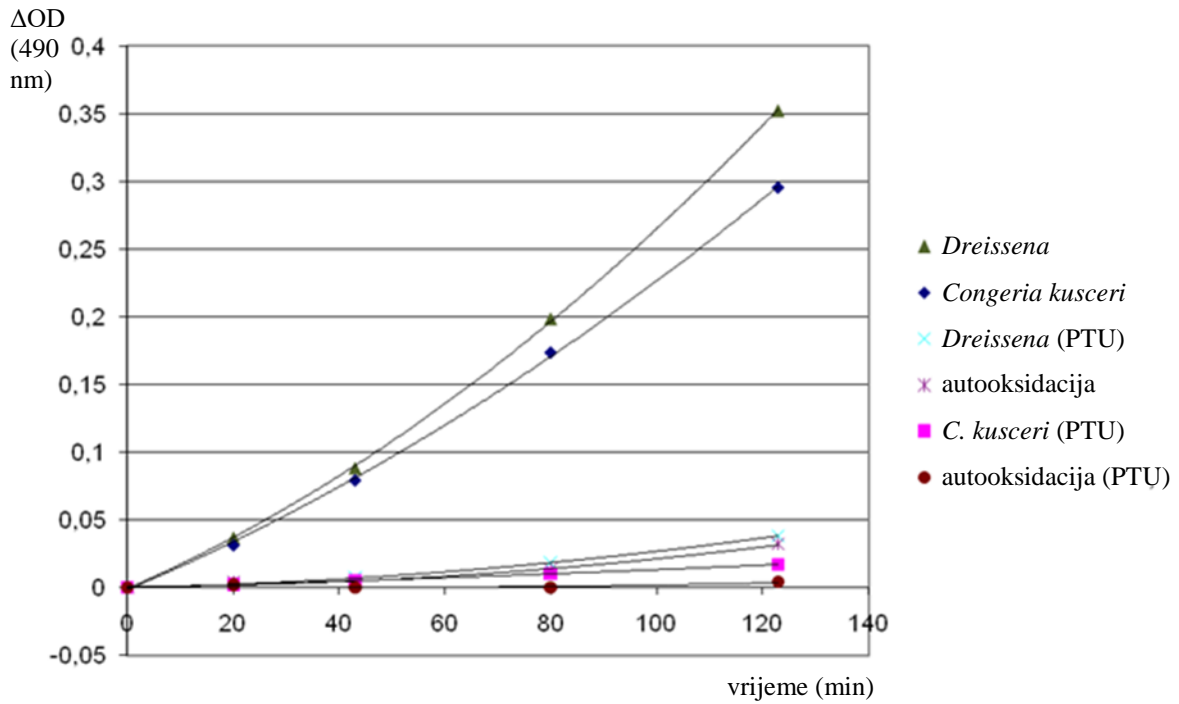
Školjkaši *D. polymorpha* s ozlijeđenim i neozlijeđenim škragama ne pokazuju razliku u aktivnosti fenoloksidaze (Sl. 4.21.).



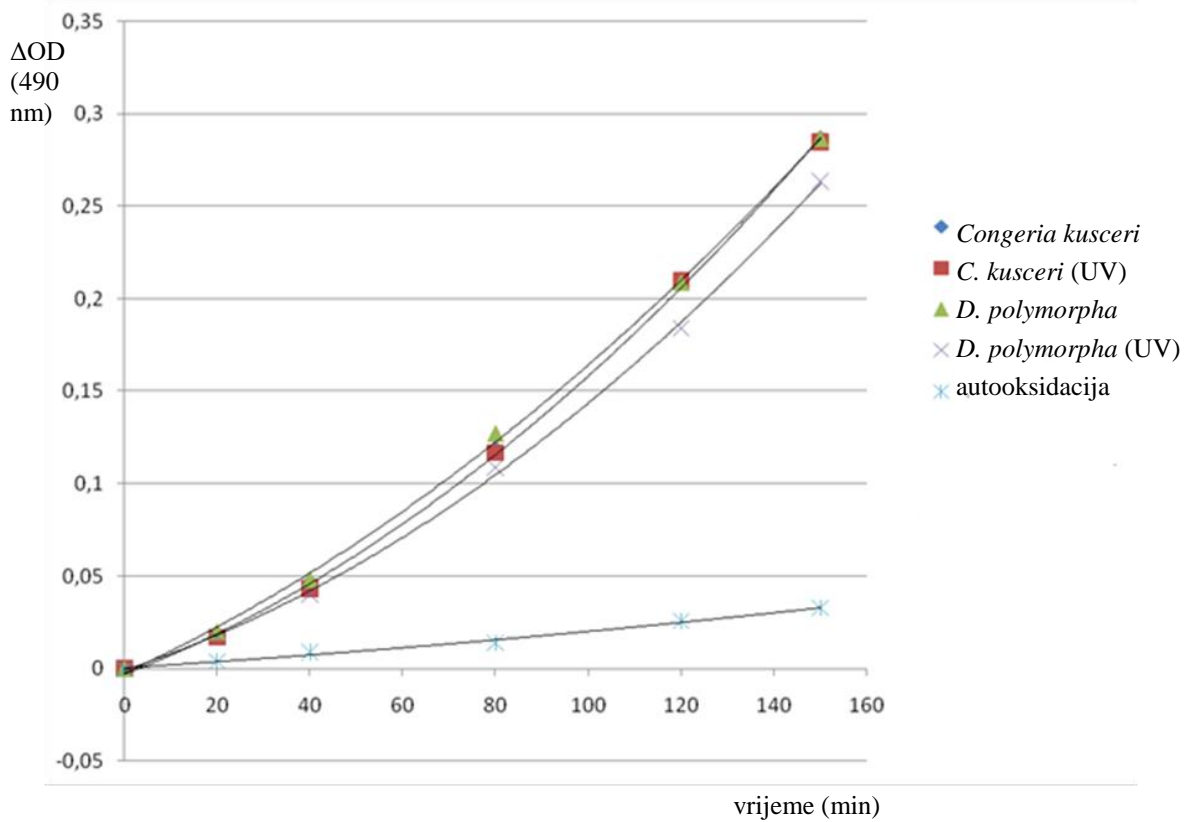
Slika 4.16. Usporedba aktivnosti fenoloksidaza u svojti *C. jalzici* i *D. polymorpha* (prvi pokus). Za analizu je korišten lizat ukupnog tkiva školjkaša.



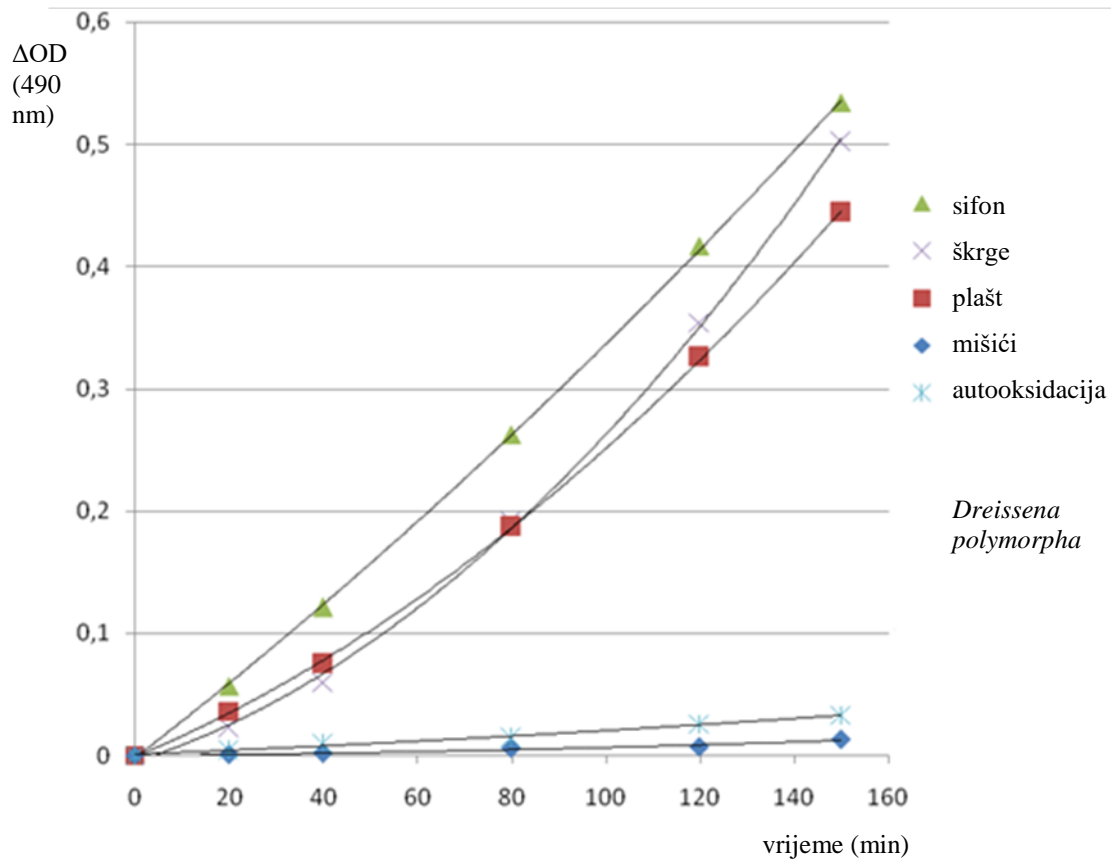
Slika 4.17. Usporedba aktivnosti fenoloksidaza u svojti *C. jalzici* i *D. polymorpha* (drugi pokus); usporedba aktivnosti fenoloksidaza bez i s prisustvom inhibitora (feniltiourea, PTU); usporedba aktivnosti fenoloksidaza zračenih i nezračenih školjkaša (*D. polymorpha*). Za analizu je korišten lizat ukupnog tkiva školjkaša.



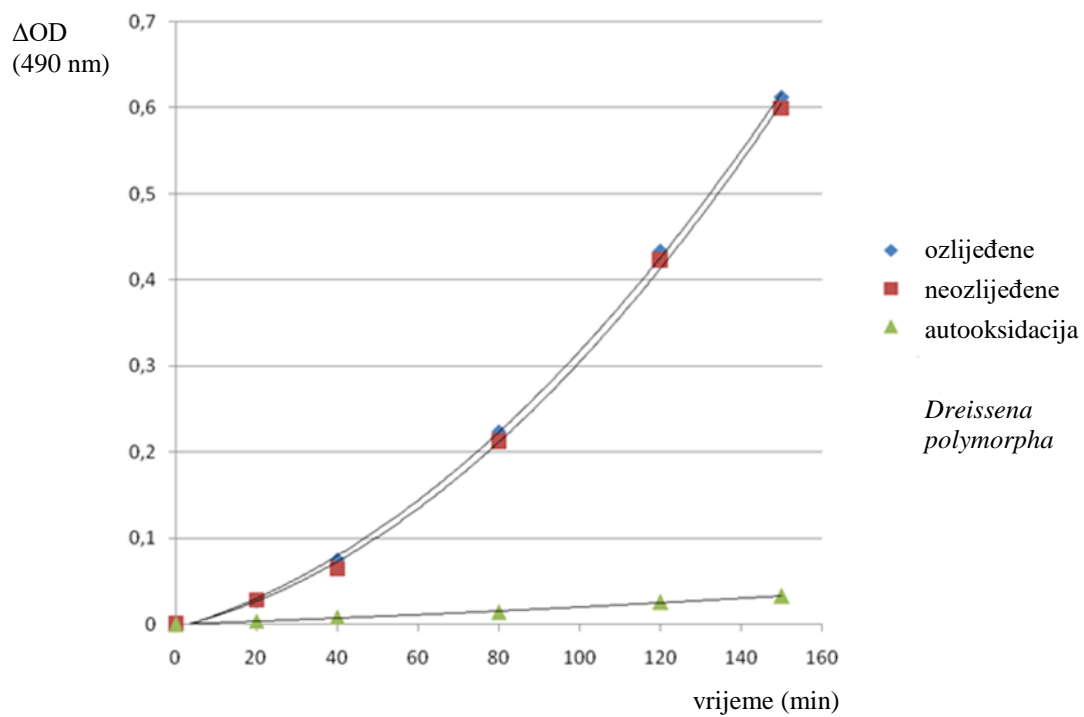
Slika 4.18. Usporedba aktivnosti fenoloksidaza u svojoj *C. kusceri* i *D. polymorpha* (prvi pokus); usporedba aktivnosti fenoloksidaza bez i s prisustvom inhibitora (feniltiourea, PTU). Za analizu je korišten lizat ukupnog tkiva školjkaša.



Slika 4.19. Usporedba aktivnosti fenoloksidaza u nezračenih i zračenih jedinki svojiti *C. kusceri* i *D. polymorpha* (drugi pokus). Za analizu je korišten lizat ukupnog tkiva školjkaša.



Slika 4.20. Usporedba aktivnosti fenoloksidaza u različitim tkivima izoliranim iz jedinki svojite *D. polymorpha*.



Slika 4.21. Usporedba aktivnosti fenoloksidaza između jedinki ozlijeđenih i neozlijeđenih škrga svojte *D. polymorpha*. Za analizu je korišten lizat ukupnog tkiva školjkaša.

5. RASPRAVA

U ovom radu prvi su put dobivene sekvence homologa tirozinaze školjkaša porodice Dreissenidae za sve svojte uključene u istraživanje (*Congerina jalcici*, *C. kusceri*, *C. mulaomerovici*, *Dreissena polymorpha*, *Mytilopsis* sp.). Dosadašnja istraživanja tirozinaze školjkaša bila su usmjerena na vrste komercijalno važne u stvaranju bisera. Sekvence su dobivene pretragom transkriptoma korištenjem alata PIA te sekvenciranjem PCR produkata – fragmenata homologa tirozinaze. Neke sekvence otvorenih okvira čitanja (ORF-ova) homologa tirozinaze dobivene pretragom transkriptoma nepotpune su, odnosno nedostaje im početak i/ili kraj što je mogući artefakt dobiven slaganjem transkriptoma. Sekvence dobivene sekvenciranjem PCR produkata nakon TA kloniranja, koji su umnoženi korištenjem početnica TYRA_Drei_F1 i TYRA_Drei_R1, ni u jednoj svojti nisu potvrđene kao tirozinazne pretragom korištenjem algoritma BLAST niti poravnanjem dobivenih sekvenci s onima dobivenim pretragom transkriptoma. Moguće je da je tijekom TA kloniranja došlo do kontaminacije ligacijske smjese.

Filogenetičkom analizom pokazano je da se sekvence tirozinaze školjkaša porodice Dreissenidae grupiraju u dvije paralogne skupine koje su nazvane TYRA i TYRB. Ove skupine dobro su podržane mjerom pouzdanosti *bootstrap*, s vrijednostima 100 (ML, MP) za TYRA i 95 (ML, jedna analiza), 92 (ML, druga analiza), odnosno 75 (MP) za TYRB. Ipak, mnoge grane na dobivenim stablima nisu dobro podržane, u skladu s rezultatom koji su dobili AGUILERA, MCDUGALL i DEGNAN (2014) u filogenetičkoj analizi tirozinaze mekušaca. Sekvencama korištenim u navedenoj publikaciji za potrebe filogenetičke analize u ovom radu dodano je 17 sekvenci tirozinaze porodice Dreissenidae dobivenih pretragom transkriptoma pomoću alata PIA te 7 sekvenci tirozinaze školjkaša funkcionalno opisanih iz literature. Slaba podržanost mnogih grana na filogenetičkim stablima vjerojatno je posljedica konzerviranosti aminokiselinskih ostataka bakar-vezujućih mjesta, Cu(A) i Cu(B) u aktivnom mjestu enzima (AGUILERA, MCDUGALL i DEGNAN, 2014) koje je za filogenetičku analizu korišteno u ovom radu. Obje skupine, TYRA i TYRB, sadrže homologe tirozinaze za svih pet svojti školjkaša što implicira da je zajednički predak skupine *Dreissena* + (*Mytilopsis* + *Congerina*), a vjerojatno i zajednički predak porodice Dreissenidae (uključujući novoopisanu svojtu *Rheodreissena* u koje nije istražena tirozinaza) posjedovao dva parologa tirozinaze. Budući da

se na dobivenim filogenetičkim stablima svojta *Hyriopsis cumingii* (porodica Unionidae) grupira i uz skupinu TYRB i uz skupine TYRA/TYRA', duplikacija gena za tirozinazu koja je rezultirala pojavom dviju paralognih skupina mogla je biti prisutna u zajedničkog pretka porodice Dreissenidae i svojte *Hyriopsis* (Unionidae). Budući da ne postoji konsenzus o filogenetičkim odnosima školjkaša, o položaju tog zajedničkog pretka u filogeniji školjkaša ne može se pouzdano govoriti. Filogenetički odnosi školjkaša dobiveni na temelju molekularnih podataka (COMBOSCHN *et al.*, 2017) te molekularnih i morfoloških podataka (BIELER *et al.*, 2014) impliciraju da su svojte *Crassostrea* i *Pinctada*, čije su sekvence najbrojnije na filogenetičkim stablima dobivenim u ovome radu, vanjske skupine u odnosu na veliku skupinu kojoj pripadaju porodice Dreissenidae i Unionidae.

Pripadnost sekvenci svojti *C. kusceri* i *C. jalzici* skupini TYRA, za koju je alat PIA pronašao sekvence u transkriptomu samo za ostale svojte, potvrđena je nakon sekvenciranja fragmenata tirozinaze dobivenih nakon PCR reakcija s korištenjem početnica dizajniranih prema osobitostima nukleotidnog slijeda tirozinaze u skupini TYRA. Pripadnost sekvenci svojti *C. kusceri* i *Mytilopsis* sp. skupini TYRB potvrđena je poravnanjem odabranih nukleotidnih sekvenci ovih svojti s onima dobivenim korištenjem alata PIA koje je filogenetička analiza pridružila skupini TYRB. Navedene sekvence svojti *C. kusceri* (*C. k.* 1 i 2) i *Mytilopsis* sp. (*Myt* 1) nisu bile uključene u filogenetičku analizu jer, kao nepotpune, nisu pokrivala odabrano područje od 213 aminokiselinskih mjesta. Za svojtu *D. polymorpha* pretragom transkriptoma dobivene su i sekvence izvan skupine nazvane TYRA, a unutar skupine nazvane TYRA' što svjedoči o dodatnoj diverzifikaciji tirozinaze u ovoj svojti. Na svim filogenetičkim stablima kao jedina sekvenca izvan skupina TYRA, TYRB i skupine koju čine *Dre* sekvence srodne skupini TYRA dobivena je jedna sekvenca tirozinaze svojte *C. jalzici* (*C. jal.* 1). Ova sekvenca sadrži potpuni otvoreni okvir čitanja (ORF): posjeduje start kodon i stop kodon, a odgovarajuća proteinska sekvenca i N-terminalni signalni peptid. Ta sekvenca jedina ima inserciju od pet aminokiselina počevši od 12. pozicije uzvodno od H₁ ostatka u Cu(A) mjestu u odnosu na konzervirano stanje porodice Dreissenidae na tom mjestu. Općenito se ova sekvenca razlikuje od drugih sekvenci dobivenih pretragom transkriptoma. Ne može se isključiti mogućnost da su srodne sekvence prisutne i u drugim svojti porodice Dreissenidae, ali nisu pronađene u transkriptomu korištenjem alata PIA. Također, postoji mogućnost da je nakon izolacije vrste *Congerina jalzici* u podzemlju od ostalih vrsta roda *Congerina* došlo do specifične diverzifikacije tirozinaze u ovoj svojti. Sekvenca *C. jal.* 1 na filogenetičkim stablima grupira se sa sekvencom školjkaša *Hyriopsis cumingii* s visokom podržanosti (ML stablo, *bootstrap*: 93/96 (dvije analize); MP stablo,

bootstrap: 95). Na dobivenim stablima sekvence vrste *H. cumingii* grupiraju se i sa skupinama TYRA/TYRA' i TYRB, kako je gore navedeno.

Procijenjeni broj paraloga tirozinaze u svojoj porodice Dreissenidae (Sl. 4.5.) pokazuje kako svojta *D. polymorpha* sadrži najviše paraloga u odnosu na ostale svoje obuhvaćene ovim radom. Za svaku od tri skupine prikazane na kladogramu na Sl. 4.5. – TYRA, TYRB i skupinu koja zajedno s TYRA čini TYRA', *D. polymorpha* sadrži, prema rezultatima ovoga rada, po dva paraloga tirozinaze. To implicira da je u svakoj od navedenih skupina došlo do duplikacije ancestralnog homologa tirozinaze te svjedoči o značajnoj diverzifikaciji tirozinaze u ovoj vrsti školjkaša. Pretragom transkriptoma pronađena su dva paraloga tirozinaze svoje *Mytilopsis* sp. od kojih jedan pripada skupini TYRA, a drugi skupini TYRB. Broj od dva paraloga za ovu svojtu minimalan je: PCR reakcijama nije uspjelo umnožavanje fragmenata tirozinaze za ovu svojtu, a dvije sekvence dobivene pretragom transkriptoma nepoptune su. Postoji, dakle, mogućnost da je raznolikost paraloga tirozinaze u ovoj svojoj veća od dva ustanovljena homologa. Postoji mogućnost da je broj paraloga tirozinaze koji se eksprimiraju veći u nadzemnih svojoj (*D. polymorpha* i *Mytilopsis* sp.) nego u stigobiontskih školjkaša roda *Conger* što bi impliciralo važnost tirozinaze u pigmentaciji nadzemnih školjkaša porodice Dreissenidae.

Za potrebe filogenetičke analize korištene su sekvence tirozinaze porodice Dreissenidae dobivene pretraživanjem transkriptoma koje pokrivaju aktivno mjesto enzima. Od osam sekvenci dobivenih sekvenciranjem PCR produkata u ovom radu, četiri pokrivaju aktivno mjesto enzima. To su F2 + R2 fragmenti za: *C. kusceri* (TYRA) (poravnato sa: *C. mul.* 1); *Dreissena* (TYRA) (poravnato sa: *Dre* 4), *C. mulaomerovici* (TYRB) (poravnato sa: *C. mul.* 2) i *C. kusceri* (TYRB) (poravnato sa: *C. mul.* 2). U svim slučajevima poklapanje sa sekvencama izabranim za poravnanje je potpuno ili s jednom – dvije različite aminokiseline tako da te četiri sekvence dobivene sekvenciranjem ne bi bile informativne u filogenetičkoj analizi, odnosno u filogenetičku analizu bile bi uključene identične sekvence.

Filogenetičkom analizom potvrđeno je postojanje dviju velikih skupina tirozinaze u mekušaca koje AGUILERA, MCDUGALL i DEGNAN (2014) nazivaju TYRA i TYRB, a koje su za potrebe jasnoće ovdje preimenovane u TYR1 i TYR2. Obrazac dobiven na jednom od dva ML stabla te na MP stablu pokazuje da je skupina TYR2 ugniježđena u parafiletsku skupinu TYR1. Prema tome, skupina TYR1 je ancestralna i unutar nje je evoluirala skupina TYR2 (o ancestralnosti i evolucijskoj realnosti parafiletskih skupina vidi, npr., HÖRANDL i STUESSY, 2010; za primjere evolucijski realnih ancestralnih parafiletskih skupina u životinja vidi osvrt u: RADEČIĆ, 2017). Ancestralnost skupine TYR1 u odnosu na TYR2 u skladu je s prisutnošću

tirozinaza TYR1 u zajedničkog pretka školjkaša, puževa i glavonožaca i pojavi tirozinaza TYR2 u zajedničkog pretka školjkaša (AGUILERA, MCDUGALL i DEGNAN, 2014). Svi homolozi tirozinaze porodice Dreissenidae dobiveni ovim istraživanjem na filogenetičkim se stablima grupiraju u skupinu TYR1. To implicira da su tirozinaze TYR2 sekundarno izgubljene tijekom diverzifikacije školjkaša koja je dovela do pojave porodice Dreissenidae.

Analizom proteinskih sekvenci tirozinaze dobivenih u ovome radu pokazana je u svim sekvencama očuvanost konzerviranih aminokiselinskih ostataka Cu(A) i Cu(B) područja aktivnog mjesta enzima, uključujući prisutnost karakterističnog ostatka glicina u Cu(B) mjestu (izuzev u sekvencama *Dre 1* i *Dre 2*) koji je oznaka α -podrazreda bakrovih proteina tipa tri kojima tirozinaze mekušaca pripadaju. Proteini α -podrazreda odlikuju se i signalnim peptidom koji je u ovom radu pronađen u većini sekvenci dobivenih korištenjem alata PIA koje imaju cjeloviti 5' kraj ORF-a. Očuvanost konzerviranih aminokiselinskih mjesta aktivnog mjesta enzima u svih svojti u skladu je u s podacima iz literature koji pokazuju da je tirozinaza uključena u izgradnju i pigmentaciju ljuštore školjkaša. Izgradnja ljuštore nužan je proces za školjkaše, stigobionske (*Congerina*) i nadzemne.

Svojta *C. jalzici* pokazuje nekoliko osobitosti sekvenci tirozinaze u odnosu na ostale svojte. Za ovu je svojtu jedinu nađena sekvenca tirozinaze koja nije u sastavu skupina TYRA' (TYRA + skupina *Dre* sekvenci) i TYRB. Osobitost te sekvence objašnjena je ranije. U skupini tirozinaza TYRA, na temelju poravnanja sekvenci dobivenih pretraživanjem transkriptoma korištenjem alata PIA te sekvenci dobivenih sekvenciranjem PCR produkata umnoženih uz korištenje početnica TYRA_Drei_F3 + Overhang na F3 + O fragmentu tirozinaze, utvrđene su osobitosti sekvence *C. jalzici* dobivene sekvenciranjem. Sekvenca svojte *Mytilopsis* (*Myt 2*) nije potpuna i ne pokriva cijelo odabrano mjesto za poravnanje prikazano na Sl. 4.14. Poravnanje proteinskih sekvenci pokazuje da su najslabije sekvence *C. kusceri* (dobiveno sekvenciranjem), *C. mulaomerovici* (dobiveno korištenjem alata PIA i sekvenciranjem) i *Dreissena* (dobiveno korištenjem alata PIA i sekvenciranjem). Riječ je o pet unutarnjih sekvenci na poravnanju na Sl. 4.14. Ova konzerviranost u filogenetičkom kontekstu (vidi kladogram na Sl. 1.4.) ukazuje na vjerojatno ancestralno stanje u zajedničkom pretku skupine *Dreissena* + (*Mytilopsis* + *Congerina*). Taj se predak, prema analizama molekuskog sata, pojavio prije barem 30 milijuna godina (GEDA *et al.*, 2018). Jedina svojta za koju u skupini TYRA nije dobivena nijedna sekvenca koja odgovara tom pretpostavljeno ancestralnom stanju je ona svojte *C. jalzici* koja pokazuje obrazac delecije koji ne nalazimo u ostalim sekvencama. PCR produkt upotrebljen za određivanje primarne strukture te sekvence duljine je oko 800 pb i najveći je od nekoliko fragmenata dobivenih PCR reakcijom (Sl.

3.11A). PCR produkti upotrebljeni za određivanje primarne strukture sekvenci *C. kusceri* i *Dreissena* također su duljine oko 800 pb, dok je onaj *C. mulaomerovici* duljine oko 500 pb. Ako su fragmenti različite duljine PCR produkata – umnožene cDNA (TYRA: F3 + O) za *C. jalzici* posljedica alternativnog prekrajanja (engl. *alternative splicing*), tada su ostale varijante kraće (najmanje su kraće od 300 pb) (Sl. 3.11A). Ako najdulja varijanta sadrži delecije, tada delecije, u usporedbi s konzerviranim stanjem, sadrže i kraće varijante. Na više aminokiselinskih mjesta sekvenca *C. jalzici* jedina ima različitu aminokiselinu. Među potpunim sekvencama, jedina je koja ima stop kodon prije ostalih (Sl. 4.14.). Također, nakon stop kodona, cDNA pokazuje inserciju prožetu stop kodonima.

Jedna od sekvenci svojte *Dreissena* iz skupine TYRA dobivenih pretragom transkriptoma (*Dre 5*) također se razlikuje od pretpostavljeno ancestralnog stanja. Osim nekoliko jedinstvenih promjena aminokiselina u odnosu na sve ostale sekvence i više mjesta na kojima ova sekvenca i ona *C. jalzici* imaju istu aminokiselinu nasuprot pretpostavljeno ancestralnom stanju koje pokazuju druge svojte, sekvenca *Dre 5* pokazuje i specifične insercije (Sl. 4.14.). One mogu biti posljedica alternativnog prekrajanja i upućivati na specifičnu funkciju ovog homologa tirozinaze u svojte *Dreissena* (vidi, npr., RODET *et al.* (2008) za pretpostavljene razlike u funkciji dvaju tipova homologa receptora za gonadotropin-oslobađajući hormon koji nastaju alternativnim prekrajanjem u školjkaša *Crassostrea gigas*; RUPPERT *et al.* (1988) nalaze različite mRNA tirozinaze u miša koje su posljedica alternativnog prekrajanja pre-mRNA). Ipak, za razliku od *C. jalzici* za koju ovim istraživanjem nije potvrđeno postojanje homologa tirozinaze nalik konzerviranom stanju u skupini TYRA, *Dreissena* ima takav homolog (sekvenca *Dre 4*). Osobitost sekvence *Dre 5* trebalo bi potvrditi sekvenciranjem; ovako nije isključeno da je riječ o artefaktu nastalom slaganjem transkriptoma.

U skupini TYRB jedna sekvenca *C. jalzici* (*C. jal. 5* = *C. jal. 6*) razlikuje se od ostalih obrascem delecije (Sl. 4.15.), premda u toj skupini sadrži i homolog bez delecije. Kako je gore navedeno, moguće je da je riječ o artefaktu.

Premda ne znamo specifičnu funkciju paraloga tirozinaze iz skupina TYRA i TYRB kao ni funkciju paraloga tirozinaze predstavljenog sekvencom *C. jal. 1*, osobitosti sekvenci *C. jalzici* u korelaciji su s rezultatom spektrofotometrijske analize koja pokazuje značajno veću aktivnost fenoloksidaza, kojima pripada tirozinaza, u svojte *Dreissena* u odnosu na *C. jalzici*. S druge strane, *C. kusceri* koja u ovom radu dobivenim sekvencama tirozinaze ne pokazuje značajne razlike u odnosu na pretpostavljeno ancestralno stanje, ne pokazuje značajnu razliku u aktivnosti fenoloksidaza u odnosu na svojtu *Dreissena*. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da su mutacijske promjene u tirozinazi odgovorne za gubitak pigmentacije u tkivima

stigobiontskog školjkaša *C. jalzici*. Ova mogućnost važan je doprinos razumijevanju molekularne pozadine troglomorfničkih obilježja. Iako je depigmentacija tkiva obilježje zajedničko mnogim podzemnim životinjama, molekularni mehanizmi koji je uzrokuju slabo su poznati. Točan molekularni uzrok gubitka pigmentacije poznat je iz literature samo u modelnom organizmu – meksičkoj tetri (*Astyanax mexicanus*), u čijim je albino populacijama gubitak pigmenta posljedica mutacije u genu *oca2*.

Usporedba aktivnosti fenoloksidaza između svojiti *Dreissena* i *C. jalzici*, odnosno *C. kusceri* nije specifična usporedba aktivnosti tirozinaze budući da oksidaciju molekule L-DOPA, koja je korištena kao supstrat u spektrofotometrijskoj analizi, mogu katalizirati i hidrosilaze i lakaze. Budući da ozljeđivanje škrgi u svojiti *Dreissena* nije dovelo do povećanja aktivnosti fenoloksidaza, a lakaze su inducibilni enzimi važni u imunološkom odgovoru školjkaša (LUNA-ACOSTA *et al.*, 2017), moguće je da je spektrofotometrijskom analizom mjerena poglavito aktivnost tirozinaza ili aktivnost fenoloksidaza važna za pigmentaciju.

Ako je gubitak pigmentacije u svojiti *C. jalzici* posljedica promjena u tirozinazi na razini primarne strukture proteina, a u *C. kusceri* i *C. mulaomerovici* nije, u ove dvije svojite moglo je doći do gubitka pigmentacije na druge načine. U meksičkoj tetri (*Astyanax mexicanus*) tri od 27 špiljskih populacija jesu albino, a u svih je došlo do promjene u prvom koraku biosinteze melanina. No, mutacija se nije dogodila u enzimu koji katalizira taj proces (tirozinazi), nego, kako je već navedeno, u genu *oca2* koji je možda važan za omogućavanje pristupa supstrata (L-tirozin) enzimu (BILANDŽIJA *et al.*, 2013b). U špiljskih crvčaka također je došlo do promjene u prvom koraku biosinteze melanina, no enzim koji katalizira taj korak, hidrosilaza, prisutan je (BILANDŽIJA, ČETKOVIĆ i JEFFEREY, 2012). Postoji mogućnost da je u *C. kusceri* i *C. mulaomerovici* gubitak pigmentacije posljedica molekularne promjene u nekom predkoraku koji onemogućuje tirozinazi pristup supstratu.

Rezultati spektrofotometrijske analize ne pokazuju konzistentnu razliku u aktivnosti fenoloksidaza između UV-svjetlom zračenih i nezračenih školjkaša. Moguće je da ovako dizajniranim pokusom te razlike nije moguće detektirati. U literaturi dosad nisam pronašao podatak o dizajnu pokusa za mjerenje razlike u aktivnosti fenoloksidaza ili tirozinaze između zračenih i nezračenih školjkaša.

Spektrofotometrijskom analizom aktivnosti fenoloksidaza različitih tkiva svojiti *Dreissena* dobivena je najveća aktivnost u vidno pigmentiranom tkivu – području sifona (tulajica) što je u skladu s pretpostavljeno važnom ulogom fenoloksidaza u biosintezi melanina. Tkivo mišića zatvarača pokazalo je odsutnost aktivnosti ovih enzima. Visoka aktivnost fenoloksidaza

dobivena je i u škragama. U škragama je važna aktivnost ovih enzima budući da se enzimatskim reakcijama koje kataliziraju troši dopamin koji je potencijalni inhibitor djelovanja trepetljivikavih vlakana u škragama (LUNA-ACOSTA *et al.*, 2017).

Provođenje PCR reakcija i sekvenciranje dobivenih PCR produkata pokazalo se korisnim za potvrđivanje sekvenci tirozinaze školjkaša porodice Dreissenidae dobivenih ranije sekvenciranjem transkriptoma te za dobivanje fragmenata tirozinaze skupine TYRA koji nisu dobiveni korištenjem alata PIA (za svojte *C. kusceri* i *C. jalzici*). Manje nepodudarnosti (Sl. 4.7B, 4.10B, 4.12B) vjerojatno su posljedica loše sekvenciranih krajeva. Dobivanje sekvence za fragment tirozinaze TYRA_F3+O pokazalo se važnim za detektiranje moguće molekularne pozadine gubitka pigmentacije u *C. jalzici* što je važan doprinos razumijevanju molekularne pozadine gubitka pigmentacije koja je točno poznata samo u modelnom organizmu – mekičkoj tetri. Ipak, za neke PCR reakcije nisu dobiveni produkti. Jedan od mogućih razloga, osim nepovoljno postavljenih uvjeta PCR reakcije jest i korištenje degenerativnih početnica koje nisu dovoljno specifične. Svojta *Mytilopsis* sp. jedina je za koju nisam sekvenciranjem uspio dobiti tirozinaznu sekvencu i za koju u najvećem broju PCR reakcija nije dobiven PCR produkt. Moguće je da uzorci ove svojte, skupljeni u SAD-u, nisu bili adekvatno zbrinuti pri transportu zbog čega je moglo doći do degradacije RNA, a zbog toga i slabo upotrebljive cDNA sintetizirane prema tome kalupu. U prilog tome govori podatak da elektroforezom RNA u agaroznom gelu jedino za ovu svojtu nije dobivena pruga za 18S rRNA. Ni za jednu od korištenih svojti porodice Dreissenidae na gelu se nije vidjela pruga za 28S rRNA. Moguće je da je ona u školjkaša ove porodice dovoljno osjetljiva da se u danim uvjetima elektroforeze kao veća od dviju rRNA molekula raspala.

Istraživanjima koja bi valjalo nadovezati na rezultate dobivene u ovom radu trebalo bi provjeriti aktivnost fenoloksidaza u svojte *C. mulaomerovici* te ponovnim dizajniranjem početnica i/ili izmijenjenim uvjetima PCR reakcija pokušati dobiti cjelovitu sekvencu svih homologa tirozinaze školjkaša porodice Dreissenidae. Također, trebalo bi pokušati usporediti specifičnu enzimatsku aktivnost tirozinaza između svojti ove porodice (u ovome radu mjerena je enzimatska aktivnost fenoloksidaza kojima pripadaju i kateholaze i lakaze). Novi kontekst sastava porodice Dreissenidae, koja obuhvaća i svojtu *Rheodreissena* (GEDA *et al.*, 2018), ukazuje na potrebu karakterizacije tirozinaze i u ovog južnoameričkog školjkaša.

6. ZAKLJUČAK

1. U svim svojcima školjkaša porodice Dreissenide uključenim u pokus (tri vrste stigobiontskog roda *Congeria*, nadzemne svojte *Dreissena polymorpha* i *Mytilopsis* sp.) tirozinaza se eksprimira. Ovim radom prvi su put identificirane sekvence tirozinaze školjkaša porodice Dreissenidae.
2. Tirozinaze školjkaša porodice Dreissenidae grupirane su uglavnom u dvije paralogue skupine, TYRA i TYRB, dobro podržane mjerom pouzdanosti (*bootstrap*) u filogenetičkoj analizi. Ove tirozinaze pripadaju starijoj od dvije velike skupine tirozinaza mekušaca (TYR1), koja je bila prisutna u zajedničkom pretku školjkaša, puževa i glavonožaca. To implicira da su tirozinaze TYR2 tijekom evolucijske diverzifikacije školjkaša koja je dovela do pojave porodice Dreissenidae sekundarno izgubljene.
3. Osobitosti proteinskih sekvenci tirozinaze stigobiontskog školjkaša *Congeria jalzici* u odnosu na pretpostavljeno ancestralno stanje i vrlo mala aktivnost fenoloksidaza u ove svojte (u usporedbi s aktivnosti nadzemne svojte *D. polymorpha*) upućuju na mogućnost da je gubitak pigmenta u ove vrste posljedica promjena u tirozinaznim proteinima. Ta je mogućnost važan doprinos razumijevanju molekularne pozadine depigmentacije podzemnih životinja izvan modelnog organizma – meksičke tetre. Neki drugi uzork mogao je dovesti do gubitka pigmentacije u stigobiontskih školjkaša *C. kusceri* i *C. mulaomerovici*.
4. Spektrofotometrijskom analizom funkcionalno je dokazana aktivnost fenoloksidaza – kojima tirozinaze pripadaju – u porodici Dreissenidae (*C. kusceri*, *D. polymorpha*).

7. LITERATURA

AGUILERA, F., MCDOUGALL, C., & DEGNAN, B. M. (2014). Evolution of the tyrosinase gene family in bivalve molluscs: independent expansion of the mantle gene repertoire. *Acta biomaterialia*, 10(9), 3855-3865.

AGUILERA, F., MCDOUGALL, C., & DEGNAN, B. M. (2013). Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. *BMC evolutionary biology*, 13(1), 96.

ASHLOCK, P. D. (1971). Monophyly and associated terms. *Systematic Biology*, 20(1), 63-69.

BARTON, N. H., BRIGGS, D. E. G., EISEN, J. A., GOLDSTEIN, D. B., & PATEL, N. H. (2007). *Evolution*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

BERNARD, P., GABARIT, P., BAHASSI, E. M., & COUTURIER, M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene*, 148(1), 71-74.

BIELER, R. *et al.* (2014). Investigating the Bivalve Tree of Life—an exemplar-based approach combining molecular and novel morphological characters. *Invertebrate Systematics*, 28(1), 32-115.

BILANDŽIJA, H., ABRAHAM, L., MA, L., RENNER, K. J., & JEFFERY, W. R. (2018). Behavioural changes controlled by catecholaminergic systems explain recurrent loss of pigmentation in cavefish. *Proc. R. Soc. B*, 285(1878), 20180243.

BILANDŽIJA, H., LASLO, M., PORTER, M. L., & FONG, D. W. (2017). Melanization in response to wounding is ancestral in arthropods and conserved in albino cave species. *Scientific reports*, 7(1), 17148.

BILANDŽIJA, H., MORTON, B., PODNAR, M., & ČETKOVIĆ, H. (2013a). Evolutionary history of relict *Congerina* (Bivalvia: Dreissenidae): unearthing the subterranean biodiversity of the Dinaric Karst. *Frontiers in zoology*, 10(1), 5.

BILANDŽIJA, H., MA, L., PARKHURST, A., & JEFFERY, W. R. (2013b). A potential benefit of albinism in *Astyanax* cavefish: downregulation of the *oca2* gene increases tyrosine and catecholamine levels as an alternative to melanin synthesis. *PLoS One*, 8(11), e80823.

- BILANDŽIJA, H., ČETKOVIĆ, H., & JEFFERY, W. R. (2012). Evolution of albinism in cave planthoppers by a convergent defect in the first step of melanin biosynthesis. *Evolution & development*, 14(2), 196-203.
- BORDUKALO NIKŠIĆ, T. (2007a). Reverzna transkriptaza. U: Ambriović Ristov (ur.), *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2007
- BORDUKALO NIKŠIĆ, T. (2007b), Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR), u: Ambriović Ristov (ur.), *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2007
- BRUSCA, R. C., MOORE, W., I SCHUSTER, M. (2016). *Invertebrates*. Massachusetts, Sinauer Associated. Inc, Publishers.
- CALDERONI, L., ROTA-STABELLI, O., FRIGATO, E., PANZIERA, A., KIRCHNER, S., FOULKES, N. S., KRUCKENHAUSER, L., BERTOLUCCI, C. i FUSELLI, S. (2016). Relaxed selective constraints drove functional modifications in peripheral photoreception of the cavefish *P. andruzzii* and provide insight into the time of cave colonization. *Heredity*, 117(5), 383.
- CHEN, X., LIU, X., BAI, Z., ZHAO, L., & LI, J. (2017). HcTyr and HcTyp-1 of Hyriopsis cumingii, novel tyrosinase and tyrosinase-related protein genes involved in nacre color formation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 204, 1-8.
- COMBOSCH, D. J. *et al.* (2017). A family-level tree of life for bivalves based on a Sanger-sequencing approach. *Molecular phylogenetics and evolution*, 107, 191-208.
- CULVER, D. C., & PIPAN, T. (2009). *The biology of caves and other subterranean habitats*. OUP Oxford.
- DARWIN, C. (2008). *Postanak vrsta prirodnim odabirom ili očuvanje povlaštenih rasa u borbi za život*. Šesto izdanje u prijevodu Josipa Balabanića. Školska knjiga
- GEDA, S. R., LUJAN, N. K., PERKINS, M., ABERNETHY, E., SABAJ, M. H., & GANGLOFF, M. (2018). Multilocus phylogeny of the zebra mussel family Dreissenidae (Mollusca: Bivalvia) reveals a fourth Neotropical genus sister to all other genera. *Molecular phylogenetics and evolution*, 127, 1020-1033.

- GOULD, S. J., & LEWONTIN, R. C. (1979). The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 205(1161), 581-598.
- HABDIJA, I., PRIMC-HABDIJA, B., RADANOVIĆ, I., ŠPOLJAR, M., MATONIČKIN KEPČIJA, R., VUJČIĆ KARLO, S., MILIŠA, M., OSTOJIĆ, A. & SERTIĆ PERIĆ, M. (2011). *Protista–Protozoa i Metazoa–Invertebrata: Strukture i funkcije*. Alfa d.d., Zagreb
- HALL, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- HÖRANDL, E., & STUESSY, T. F. (2010). Paraphyletic groups as natural units of biological classification. *Taxon*, 59(6), 1641-1653.
- JEFFERY, W. R., MA, L., PARKHURST, A., BILANDŽIJA, H. (2015) Pigment regression and albinism in *Astyanax* cavefish. U: Keene, A. C., Yoshizawa, M., McGaugh, S. E. (ur.): *Biology and Evolution of the Mexican cavefish*. Elsevier, Amsterdam, str. 155 – 171
- JOVANOVIĆ GLAVAŠ, O., JALZIC, B., & BILANDZIJA, H. (2017). Population density, habitat dynamic and aerial survival of relict cave bivalves from genus *Congerina* in the Dinaric karst. *International Journal of Speleology*, 46(1), 13.
- KATUŠIĆ HEĆIMOVIĆ, S. (2007a). Lančana reakcija polimerazom (PCR), u: Ambriović Ristov (ur.), *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2007
- KATUŠIĆ HEĆIMOVIĆ, S. (2007a), Termostabilne DNA polimeraze. U: Ambriović Ristov (ur.), *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2007
- KOCOT, K. M., AGUILERA, F., MCDOUGALL, C., JACKSON, D. J., & DEGNAN, B. M. (2016). Sea shell diversity and rapidly evolving secretomes: insights into the evolution of biomineralization. *Frontiers in zoology*, 13(1), 23.
- KUMAR, S., STECHER, G., & TAMURA, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874
- LUNA-ACOSTA, A., BREITWIESER, M., RENAULT, T., & THOMAS-GUYON, H. (2017). Recent findings on phenoloxidases in bivalves. *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 5-16.

- LUNA-ACOSTA, A., THOMAS-GUYON, H., AMARI, M., ROSENFELD, E., BUSTAMANTE, P., & FRUITIER-ARNAUDIN, I. (2011). Differential tissue distribution and specificity of phenoloxidases from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 159(4), 220–226
- MATONIČKIN, I., HABDIJA, I. I PRIMC, B. (1998). *Beskralješnjaci: biologija nižih avvertebrata*. Školska knjiga.
- MORAN, D., SOFTLEY, R., i WARRANT, E. J. (2015). The energetic cost of vision and the evolution of eyeless Mexican cavefish. *Science advances*, 1(8), e1500363.
- MORTON, B., VELKOVHR, F., & SKET, B. (1998). Biology and anatomy of the ‘living fossil’ *Congerius kusceri* (Bivalvia: Dreissenidae) from subterranean rivers and caves in the Dinaric karst of the former Yugoslavia. *Journal of Zoology*, 245(2), 147-174.
- NAGAI, K., YANO, M., MORIMOTO, K., & MIYAMOTO, H. (2007). Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146(2), 207-214
- NIEMILLER, M. L., FITZPATRICK, B. M., SHAH, P., SCHMITZ, L., i NEAR, T. J. (2012). Evidence for repeated loss of selective constraint in rhodopsin of amblyopsid cavefishes (Teleostei: Amblyopsidae). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 67(3), 732-748.
- NIELSEN, C. (2012). *Animal evolution: interrelationships of the living phyla*. Oxford University Press
- PETERSEN, T. N., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G., & NIELSEN, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10), 785.
- RADEČIĆ, K. (2017). *Građevni planovi i funkcionalno ustrojstvo Metazoa s nekm evolucijskim i filogenetskim implikacijama*. 2. izdanje. Interna skripta, PMF u Zagrebu
- RODET, F., LELONG, C., DUBOS, M. P., & FAVREL, P. (2008). Alternative splicing of a single precursor mRNA generates two subtypes of Gonadotropin-Releasing Hormone receptor orthologues and their variants in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene*, 414(1), 1-9.
- ROHNER, N., JAROSZ, D. F., KOWALKO, J. E., YOSHIKAWA, M., JEFFERY, W. R., BOROWSKY, R. L., LINDQUIST, S. i TABIN, C. J. (2013). Cryptic variation in morphological evolution: HSP90 as a capacitor for loss of eyes in cavefish. *Science*, 342(6164), 1372-1375.

- RUPPERT, S *et al.* (1988). Multiple transcripts of the mouse tyrosinase gene are generated by alternative splicing. *The EMBO Journal*, 7(9), 2715-2722.
- SANGER, F., NICKLEN, S., & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- SCHMIDT H. A. I VON HAESLER, A. (2009): Phylogenetic inference using maximum likelihood methods. U: *The Phylogenetic Handbook*, 2nd ed.
- SCHMIDT-RHAESA, A. (2007). *The evolution of organ systems*. Oxford University Press.
- SKET, B. (2004). Dinaric karst: Biospeleology. U: Gunn, J.: *Encyclopedia of caves and karst science*. Taylor & Francis.
- SCHÜTT, H. (1991). Eine neue, nearktische Congeria (Bivalvia: Dreissenidae). *Archiv für Molluskenkunde*, 183-185.
- SPEISER, D. I *et al.* (2014). Using phylogenetically-informed annotation (PIA) to search for light-interacting genes in transcriptomes from non-model organisms. *BMC bioinformatics*, 15(1), 350.
- TAKGI, R., & MIYASHITA, T. (2014). A cDNA cloning of a novel alpha-class tyrosinase of *Pinctada fucata*: its expression analysis and characterization of the expressed protein. *Enzyme research*, 2014.
- WADDINGTON, C. H. (1953). Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution*, 7(2), 118-126.
- WILLIAMS, S. T. (2017). Molluscan shell colour. *Biological Reviews*, 92(2), 1039-1058.
- WILKENS, H. I STRECKER, U. (2017). *Evolution in the Dark: Darwin's Loss Without Selection*. Springer.
- YAMAMOTO, Y., BYERLY, M. S., JACKMAN, W. R., iJEFFERY, W. R. (2009). Pleiotropic functions of embryonic sonic hedgehog expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Developmental biology*, 330(1), 200-211.
- YU, F., PAN, Z., QU, B., YU, X., XU, K., DENG, Y., & LIANG, F. (2018). Identification of a tyrosinase gene and its functional analysis in melanin synthesis of *Pteridomys penguin*. *Gene*, 656, 1-8.

YU, X., YU, H., KONG, L., GUO, F., ZHU, G., & LI, Q. (2014). Molecular cloning and differential expression in tissues of a tyrosinase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular biology reports*, *41*(8), 5403-5411.

8. PRILOZI

Prilog 1. Usporedni prikaz nukleotidnih i proteinskih sekvenci tirozinaze u pet svojti školjkaša porodice Dreissenidae. Sekvence su dobivene pretragom transkriptoma korištenjem alata PIA (filogenetički obaviještena anotacija). Oznake na usporednom prikazu objašnjene su legendom na kraju priloga.

Šifre svojti dane su prema Tablici 4.1. Za sekvencu *C. mul.* 3 dan je samo završni dio usporednog prikaza koji se razlikuje od onoga sekvence *C. mul.* 2 jer je nekoliko aminokiselinskih mjesta dulji, a u završnom dijelu zajedničke duljine sadrži dva različita nukleotida u odnosu na *C. mul.* 2. Sekvence *C. k.* 1 i *C. k.* 2 gotovo su identične, a *C. jal* 5 i *C. jal* 6 identične su. Za konzervirana aminokiselinska mjesta vidi i Sl. 4.1.

catggagttttaagaanaacgcoag
 cataacaacatgttggctccgggtgatacaccgtctctgcatttccgggtgacagcgca
 L V R W I P V L L C I S G A R A
 ctcatagagcagatacaccgttaccggcgacatacagacgtgtttagatgagcaacagcat
 L I E Q I P L P A D I Q T C F D E Q Q H
 ccaacgaaatccgtcggcgagggtcattgttccacgctgcgtgcagcgggacccctgtggaag
 P T K S V G E V M F T R C V Q R T L W K
 cgtcaggccttaaaggaggcagcgccttgccggaggatgacgcagaaagtggatttccggc
 R Q A L K E A A P L G E D A Q K W I S G
 ctggcgaatgaaccatttgaatgaatcccaaaaaacgtccoctactcgtcgtgacc
 L V E M N H L N E S T K N V P Y S S L T
 gacgcggatcacgaagcgtaccctagggcagcgccgtcgccggctcggcgtatccggcgg
 D A D T K R Y P R Q A P S P A A D L R R
 cagccgcgctgcgcaaggaataccggatgttgacggacagggagcgggacccctgttccac
 Q P R V R K E Y R M L T D R E R T L F H
 aggtcgtgaaacatgctcaaaaggatgaagtgggtggcccccaaaaacatcagatgcccgt
 R A V N M L K A D K S V A P N K Y D A L
 gggcggctgcatcacatgctcggtagccgggtcccaattcggaccaccaacttcttccctc
 G R L Y M S V A R S F G P N F P F
 caccgccttttctcgtatcattggagaaacgctgcgagagaaatccaccagcgtgacg
 R L F L V M E N A L R E K I P S V T
 atccccctcgggacacgacggatcacagagctccgggatccccctcctcctcgttctg
 I P Y W D T T L D H E L R D P R S S V L
 tggactcgggattcctgggaggacaaaccggttccatcagaccggccgctgcccac
 W T P E F L G Q A N G F I I D G P F A N
 tgggacacggcaccgccccctcgtcgtgatattcggggcagcgggaaacatgtagaac
 W D T P T G P L L R Y F G A A G T M M N
 tggacctacattcacaacgcttccggcaggactaccgtgaaaacatcagcagcggctt
 W T Y I H N A F R Q D Y L E N I S T P F
 gcacttccggaaaacacacattggaggagcagcacaaccaggtgcacagtggtggcgggt
 A L P E N N I E E Q N Q V Q W V G
 cagatgctccggcgcagcgtggcggttccgaccgggttctacttggcctcctac
 Q M S P P T L C A A F D P V Y L L S Y
 gggacccgtctatggagatcttccgggactacagaaaacggcgggggagtcgatccacc
 A D L L W E I F R G L Q K R R G I D P T
 acagattacccaatggacaacagggacatccctccaggctcaggagtacaacgctcctct
 T D Y P M D N T D I P P G Q E Y N A S S
 ggggtccggctcgtcgtcgtcagcagcagcccttagcgagcgttccaccgacaacataac
 G F G S L L V R H G L S D V F T D N I Y
 cagtacgaaacgccccgacctgctccctagatcttccggactcgggactccccgacatc
 Q Y E R P P T C S L D L P D C G S P H I
 cgggtccgactcagggtccggaacggaagtcgctcggcgtcagttttagacatccga
 R C D T S G P E P K C V S A S I F D I R
 cctttgttcttggccaacggtcttccatgaaacgggggtcgggtatccggcacaatgctg
 P L F L A N G L P M N G G S G I R H M R
 agtgctcaagaaaatacaaaacgaggtaagtcatgaaacgcttagatcagggtggcagaa
 S V Q E N Q N E A K F M K A L D Q V A E
 gtggcgtgctcaggacagcaatggaatgagaggttctgtaaacggttctttagatcagggtg
 V A C Q D S N V N E R F V N A F V I D G
 aaagctgataaatcgagtggaatgtaacccaatgaaatgcttccatgaaatacaaaa
 K A D K S Q W S Y I P I E I V H R N T Q
 agtaataccacagtgctgtagatgtagtgccaataaagaataacggaaaagca
 S N T T T V S V Y D M C A K K R I T E K A
 aaccgtgtttcgtgaaatcaaacgagcactaaactataacgcatggttcaagcaagtggca
 N R V F V E S N G L N Y N G M F K Q V A
 cactttagaaaagcgtccccaccgattcgcactacgtagcgttaggaataaaagaacca
 H F R K D V P T D S T I T Y V G I K K P
 agcaacggaactctcggagggtttgggttctgcttaccagcgtatgaggagcagcgtgtg
 S N G T L S E V L V S A Y D V C G R M C
 cagccatattgcccagtgtaacagggaaacagatgcccccttggcggcagcaataaaagtc
 Q P Y C P V Y T G T S R P C A G A I K V
 tcacgagatttggcggcagtttagtgctgacgtcacttccgttataaaactcggcgg
 S R D L P A M F S A D V T S V I N S A W
 cgcgaagatgctcaggaatgctcgtgtgtagcagatgaaatatttataaggttgggt
 R E D A Y G M P R V H D E I F I R F V
 tgtgatacaaaatagtcatttggccatgggggacatgtag
 C D T N K S Y W P W G T L *

A *C. jal.* 1

atacta
 tccacaacatcatgatatttctacaacacttagtgggttggctatgtgcatcggcgaca
 I F L Q H L V V L L C A S A T
 acatttggctgcccgggtcgtatgacttggcccggaaactcggcagctgtgtacagaga
 T F A A P V D N D L P P E L A D C V Q R
 ctaacacccatcagactagcagcgtccagtttttccggatctcggactcagactcaaa
 L T P I A T S T R P V F S V S A F D L K
 caacgggaaaatgctggtcaacggactagcagaaaatagctatttgatcagcgtggcact
 Q R E N A G Q P T S T E I A I E Y A G T
 gaaatgctcaccctggagacaccagaagcgtgacactgtattgtatccagcagttcgtg
 E M P T L E T P E D V H L Y C I Q Q F V
 tggaaagcggacatgggtcgttgggaggaatacaacatcagcagcaaaacatggacttc
 W K A D M V R W E E Y N I T S K D M D G
 gtaacggcctcttgcactcatgatgaaaacaaaaggagaagcactcggcagacaag
 V N G L L A S M M K T K G R K H S R Q K
 cgtcagctcaggtagaccaggggtctatttccggcagcagtttccgcaatcggcagggaa
 R Q S G R P G G L F P P T G F R I R R E
 tatagcggatccgacggagaaagaaatgcttccatggcggcctcgtccttttgaa
 Y R R I S D G E R N A F H G A R L L K
 cggatggagatgacacgcttcccaacctcagcaatggttgaccacacggt
 A N G E Y D T F A N L Q G I V T S A
 caccagggcccccaactccttgggtggcacagggtctaccctggctttagtgaggaaagca
 H Q G P N L G W R V Y L A L M E E A
 atacgagaatagacaggagacttcaattccatcactggtcactcaactcagactcagat
 I R R I D R R L S I P Y W D S T L D F D
 atggacaacccggtaaacacacacttcttctccggcttcttggaaaatggagatgga
 M D N P V N T I L F S P A F L G N D G
 gttgttaccactggcggcttccgtaactgggcccacggccttaggtctctgacaagaaat
 V V T T G P F A N W A T P V G P L T R N
 atcggcgtgggagctcagttgatgactaaagaggttaaccgagcagcagcagcagcagctg
 I G A G S Q L M T K E V I R A I M T R C
 atgactcggagatcaccttccaactgcattaaatcagttcaacactgaaatttccac
 M T R E I T F P T A L N Q F N L E I F
 ggtgtccacatctcgggtggaggacatttgcgttcttaacacagcggcagcagcagcag
 G G P H I W V G H L A G L N T A A H D
 cctgtatttctccaccagcatttattgactatatttgggaaatgttccgcatccat
 P V F F L H A F I D Y I W E M F R I H
 caattcttgcagctggagtttaaccocagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 Q F F D C G V N P S T D Y P E A I G L H
 gcccgtatccgcaatggaacgggttaccgggactcagcacaacttgatggtatccgaagc
 A A I R P M D G L P G Y V N I D G I R S
 taccggaacgagaactggttagatagaaacggcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 Y W T Q N W F R Y E R A P T C S S F I P
 ttttggcttaccatatttaagatgtaaacgcccggagctcagcgtgctcagtgga
 F C G S P Y L R C N M A R G V C V S V E
 cgtatgctggcccccgatgaaggagcaccaggggtggtgctttagcttccgcccct
 R M L A P D E G A P G V V G F M A F A P
 ggggtcagcagcctccccggcggcagcagcaagagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 A A T A S P R A A R A A R A Q A A M V D
 gtcggtcgtgattttaggtcctcgtctgacccaaggacacagatgggacaggaagc
 V G P V F M A P P S E P R T Q M G Q A S
 atggcggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 M A A G M M P G M A L R M K R A I P E Q
 tcaatggcgtcactacatagctttaggaaaatcggcagcggcaaaatatacaacaatca
 S M A S T I A Y G K S A R Q N I T Q S
 ctgaaataggaccactgttcttgcaccagaatccgataggcaaacatcagatgcttla
 L E I G P L F L A P E S D R Q T S D A L
 ggtaggaatattggcagtggtatatttgcagggcaaaatggttggtaggatacggcagat
 G R N I A S G I F A G Q N V G R D T P D
 gttactcagggactgacttccggcgcacaaacggatgctttagctttagctttagctttag
 V Y S G H A F P V A Q P M P L L P V P V
 tgggacacactgattcattatgcaaatatcctgatttctacactcaaatgcatcgaca
 W D T L D S Y M Q Y P S S Y T T N A S T
 tccgattggctattttagctttagctttagctttagctttagctttagctttagctttagctt
 S D W L F V P V Q V T Y A V A G A D S L
 tcccaactccgattatgaaatgctcccgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 S Q T P I M K C L P A D A V S A H I K V
 tccgcacaaggcctcaattctgggtgaatccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 S A Q G L N Y L G E Y T D Y A I V D T S
 aaactcgtgccatccggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 K S L S P A H A I V A I R A P E I G P S
 attgcatggtaactcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 I A M V T A S H G C G L M C K P M C Y T
 accgagaccggacaccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 T E T G T P Q Y K Q C S G I M W I T P K
 gaagcagccgctacgtccgaactcagaaagcggcagaaagcattggaagcggggaag
 E A T A Y V R T Y E E A A E S I G S G K
 cagttcaaggtcctgttccagctcacaagacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 Q F K V L F Q C H K D S Q S P W Q R A *

B *C. jal.* 2

(Prilog 1. Nastavak na sljedećoj stranici.)

atacta

tccacaaccatcatgatatttctacaacacttagtgggtgtgctatgtgcatcggcgaca
M I F L Q H L V V L L C A S A T
 acatttgcgcgcccgtcgataatgacttggccaccggaactcggcactgtgtacagaga
T F A A P V D N D L P P E L A D C V Q R
 ctaaacaccatagcaactagcacacgtccagtttttgcgatatctgcattcgacctcaaa
 L T P I A T S T R P V F S V S A F D L K
 caacgggaaaaatgctgggcaaccgactagcacagaatagctattgagtacgctggcact
 Q R E N A G Q P T S T E I A I E Y A G T
 gaaatgctaccctgggagacaccgagacgtgcaacctgtattgtatccagcagttcgtg
 E M P T L E T P E D V H L Y C I Q Q F V
 tggaaagcggacatggttcgttggggaggaatacaacatcacgagcaaaagacatggacttc
 W K A D M V R W E E Y N I T S K D M D F
 gtcaacggccttcttgcacccatgatgaaaacaaaaggagaagcactcggcagcagaag
 V N G L L A S M M K T K G R K H S R Q K
 cgtcagctcaggttagaccagggcttattcccgccagcaggttccgcaatccgagggaa
 R Q S G R P G G L F P P T G F R I R R E
 tatagacggtatccgacggagaagaatgctttcattggcgccctcgtctttgaaa
 Y R R I S D G E R N A F H G A L R L L K
 gcgaatggagagtatgacacgttcccaacctgcatcaaggcattgtgaccacatcgct
 A N G E Y D T F A N L **H** Q G I V T T S A
 caccagggccccaacttcttgggtggcagagggtctacctggctttagtgaggagaagca
H Q G P N **S** L G W **H** R V Y L A L M E E A
 atacgaagaatagacagggacttcaattccatactggcactcaactcgcattcgat
 I R R I D R R L S I P Y W D S T L D F D
 atggacaaccggtaaacacaactctgttttcccgcgcttctgggaaatggagatgga
 M D N P V N T I L F S P A F L G N G D G
 gttgttaccactggcggcttccctcaactggccacccgctaggtcctcgtcacaagaat
 V V T T G P F A N W A T P W G T C P L T R N
 atcggcgctgggagtcagttgatgactaaagaggttaccgagcagatcatgaccgggtg
 I G A G S Q L M T K E V I R A I M T R C
 atgacggagatcacctttcccaactgcttaatactgcttcaacctggaattttccac
 M T R E I T F P T A L N Q F N L E I F **H**
 ggtgtccacatctgggttggagcaatttggctggttataacagccacacagat
 G G P **H** I W V **G** G H L A G L N T A A H D
 cctgtattttccaccacagcatttattgactatattgggaaatgttccgcacatccat
 P V **F** F L H **H** A F I **D** Y I W E M F R I H
 caattctttagctgtggagttaatccagcactgactatccggaagcaatgggacaacat
 Q F F D C G V N P S T D Y P E A M G Q H
 gcagccatgagcccaatggacgggttaccgggatacatcaacattgatggttatcgaaagc
 A A M R P M D G L P G Y I N I D G Y R S
 tactggcgggtactgttttagatatagaacgcccactgtgttctcgttttagaccg
 Y W T R Y W F R Y E R A P M C S S F R P
 ttttgcggttaccatatttaagatgcaacatggcccggaggtgtgctgtcagtgga
 F C G S P Y L R C N M A R G V C V S V E
 cgtatgctggccccgatgaagggacccaggggtgttggctttagctttcccccct
 R M L A P D E G A P G V V G F M A F A P
 gggcctacagcctcatccccggcgcagcaagagcaagactcaagctgcaatggtcgac
 A A T A S S P R A A R A R A Q A A M V D
 gtccgtctctgtattttagctccctcgttgaaccaaggacagatgggacagcaagc
 V G P V F M A P P S E P R T Q M G Q A S
 atggcggcagcagatgactcctggcctttagctgtaagagggctataccggagca
 M A A G M M P G M A L R M K R A I P E Q
 tcaatggcgtccactacatagcttattgaaaatcggcagcgaataataacacaatca
 S M A S T T I A Y G K S A R Q N I T Q S
 cttgaaataggaccatgtttcttgcaccagaatccgataggcaaacatcagatgcttta
 L E I G P L F L A P E S D R Q T S D A L
 ggtaggaatattgcccagtggtatatttgcaggcgaataatgttggtaggagacccagat
 G R N I A S G I F A G Q N V G R D T P D
 gtttactcagggoatgcatctccggtgcacaaaccgattgcttctgctgtaocgggtg
 V Y S G H A F P V A Q C P M P L L P V P V
 tgggacacacttgattcatatagcaaatctcagttcttactacactcaaatcagatcgaca
 W D T L D S Y M Q Y P S S Y T T N A S T
 tccganctttccaaaactccgattatgaaatgctccagcggatgctgctatctgctcat
 S X L S Q T P I M K C L P A D A V S A H
 attaaagtttccgcacaaggcctcaattatctgggtgaatacacagcactacgcctatgta
 I K V S A Q G L N Y L G E Y T D Y A I V
 gacacagcaaatcgtgccaatccggcagcgcattgtcgccattcgtgctccggagata
 D T S K S L P S A H A I V A I R A P E I
 ggaccttccattgcatgtaactgcaagtcacggatgcgagctgattgtgcaaacggatg
 G P S I A M V T A S H G C G L M C K P M
 tgctacaccacggagaccgggacaccagctacaacagtgctcaggaataatgtggatc
 C Y T T E T G T P Q Y K Q C S G I M W I
 acacaaaagaagcggaccgctacgtccgaacttacgaagggcagagaagcattgga
 T P K E A T A Y V R T Y E E A A E S I G
 agcgggaagcagttcaagttcctgttccagtgcaacaagcagccagctccccatggcaca
 S G K Q F K V L F Q C H K D S Q S P W Q
 agggcttaa
 R A *

C *C. jal.* 3

atacta

tccacaaccatcatgatatttctacaacacttagtgggtgtgctatgtgcatcggcgaca
M I F L Q H L V V L L C A S A T
 acatttgcgcgcccgtcgataatgacttggccaccggaactcggcactgtgtacagaga
T F A A P V D N D L P P E L A D C V Q R
 ctaaacaccatagcaactagcacacgtccagtttttgcgatatctgcattcgacctcaaa
 L T P I A T S T R P V F S V S A F D L K
 caacgggaaaaatgctgggcaaccgactagcacagaatagctattgagtacgctggcact
 Q R E N A G Q P T S T E I A I E Y A G T
 gaaatgctaccctgggagacaccgagacgtgcaacctgtattgtatccagcagttcgtg
 E M P T L E T P E D V H L Y C I Q Q F V
 tggaaagcggacatggttcgttggggaggaatacaacatcacgagcaaaagacatggacttc
 W K A D M V R W E E Y N I T S K D M D F
 gtcaacggccttcttgcacccatgatgaaaacaaaaggagaagcactcggcagcagaag
 V N G L L A S M M K T K G R K H S R Q K
 cgtcagctcaggttagaccagggcttattcccgccagcaggttccgcaatccgagggaa
 R Q S G R P G G L F P P T G F R I R R E
 tatagacggtatccgacggagaagaatgctttcattggcgccctcgtctttgaaa
 Y R R I S D G E R N A F H G A L R L L K
 gcgaatggagagtatgacacgttcccaacctgcatcaaggcattgtgaccacatcgct
 A N G E Y D T F A N L **H** Q G I V T T S A
 caccagggccccaacttcttgggtggcagagggtctacctggctttagtgaggagaagca
H Q G P N **S** L G W **H** R V Y L A L M E E A
 atacgaagaatagacagggacttcaattccatactggcactcaactcgcattcgat
 I R R I D R R L S I P Y W D S T L D F D
 atggacaaccggtaaacacaactctgttttcccgcgcttctgggaaatggagatgga
 M D N P V N T I L F S P A F L G N G D G
 gttgttaccactggcggcttccctcaactggccacccgctaggtcctcgtcacaagaat
 V V T T G P F A N W A T P W G T C P L T R N
 atcggcgctgggagtcagttgatgactaaagaggttaccgagcagatcatgaccgggtg
 I G A G S Q L M T K E V I R A I M T R C
 atgacggagatcacctttcccaactgcttaatactgcttcaacctggaattttccac
 M T R E I T F P T A L N Q F N L E I F **H**
 ggtgtccacatctgggttggagcaatttggctggttataacagccacacagat
 G G P **H** I W V **G** G H L A G L N T A A H D
 cctgtattttccaccacagcatttattgactatattgggaaatgttccgcacatccat
 P V **F** F L H **H** A F I **D** Y I W E M F R I H
 caattctttagctgtggagttaatccagcactgactatccggaagcaatgggacaacat
 Q F F D C G V N P S T D Y P E A M G Q H
 gcagccatgagcccaatggacgggttaccgggatacatcaacattgatggttatcgaaagc
 A A M R P M D G L P G Y I N I D G Y R S
 tactggcgggtactgttttagatatagaacgcccactgtgttctcgttttagaccg
 Y W T R Y W F R Y E R A P M C S S F R P
 ttttgcggttaccatatttaagatgcaacatggcccggaggtgtgctgtcagtgga
 F C G S P Y L R C N M A R G V C V S V E
 cgtatgctggccccgatgaagggacccctggggcgggttggcgtatggctttcccccct
 R M L A P D E G A P G A V G A M A F S P
 gcagcaacggcctcatccccggcgcagcagagcaagactcaagctgcaatgattgac
 A A T A S S P R A A R A R A Q A A M I D
 gtccgtctctgtattttagctcctcgttgaaccaaggacagatgggacagcaagc
 V G P L F V A P P S E P R T Q M G Q A S
 ttggcggcagcagatgactccggcagctggcagcgtatgaagagggctataccggagca
 L A A G M T P G M A A R M K R A I P E Q
 tcaatggcgtccactacatagcttattgaaaatcggcagcgaataataacacaagca
 S M A S T T I A Y A K S K E G N R A Q A
 cttgaaataggaccactgtttcttgcaccggaatccgatgggcaaacatcagatgcttta
 L E I G P L F L A P E S D G R T S D V L
 ggtaggaatattgcccagtggtatatttaccggcaaacggtgataggctacggcagat
 G R N I A S G I F T G Q N V D R A T P D
 gtttctcaggcagtcattcccggtgcacaaccagatgctattgttgcctgaccgggtg
 V F S G H A F P V A Q P M S L L P V P V
 tcggacaacttgattcatatagcaatctcaattcttactacataaatgcatcgaca
 S D T L D S Y M Q Y P N S Y T T N A S T
 tccgatggctatttgcactgttcaagtgacatcagcagttgctgtgctggcagcagctt
 S D W L F V P V Q V T Y A V A G A D S L
 tccaaaactccgattatgaaatgctccagcggatgctgctatctgctcatattaaagt
 S Q T P I M K C L P A D A V S A H I K V
 tccgcaaacggcctcaattatctgggtgaatacacagcactacgcctatgtagacagcagc
 S A Q G L N Y L G E Y T D Y A I V D T S
 aaatcgtgcatccggcagcgcattgtcgccattcgtgctccggagataggaccttcc
 K S L P S A H A I V A I R A P E I G P S
 attgcatggttaactgcccactcaggtcggactgatgtgcaaacggatgctacacc
 I A M V T A S H G C G L M C K P M C Y T
 accgagaccgggacaccagctacaacagtgctcaggaataatgtggatcacacccaaa
 T E T G T P Q Y K Q C S G I M W I T P K
 gaagcggcgtcagctcaggtcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 E A A G T Y V R S Y D E A A E S I G R G T
 aagtttccaatctgttccagtgctcacaaggaagtcagacacccatggcaaggcaca
 K F P I L F Q C H K E S Q T P W Q R A *

D *C. jal.* 4

(Prilog 1. Nastavak na sljedećoj stranici.)

atacta

tccacaaccatcatgatatttctacaacacttagtgggtgtgctatgtgcatcgcgagaca
M I F L Q H L V V L L C A S A T
 acatttctgctgccccggtcgataatgacttggccaccggaactcgccgactgtgtacagaga
T F A A P V D N D L P P E L A D C V Q R
 ctaacacccatagcaactagcacagctccagtttttccggtatctgcatctcgacctcaaaa
 L T P I A T S T R P V F S V S A F D L K
 caacgggaaaatgctggtaaccgactagcacagaaaatgctattgagtagcctggcact
 Q R E N A G Q P T S T E I A I E Y A G T
 gaaatgctaccctggagacaccagaagcgtgcacctgtattgtatccagcagttcgtg
 E M P T L E T P E D V H L Y C I Q Q F V
 tggaaagcggacatggttctgtgggaggaatacaacatcacgagcaaaagacatggacttc
 W K A D M V R W E E Y N I T S K D M D F
 gtcaacggccttctgcatccatgatgaaaaaaaaggagaaagcactcgcgacagaag
 V N G L L A S M M K T K G R K H S R Q K
 cgtcagtcagtagaccagaggtctatttccgccaaggtttccgcatccgacgggaa
 R Q S G R P G G L F P P T G F R I R R E
 tatacgcgatccgacgggaaagaaatgcctttcatgggccccctgctgttttgaaa
 Y R R I S D G E R N A F H G A L R L L K
 gcgaatggagatgacacgttccgcaacctgcatcaaggcattgtgaccacatcggtc
 A N G E Y D T F A N L **H** Q G I V T T S A
 accagggcccaactccttgggtggcacagggctacctgcttggatggaggaagca
H Q G P N **F** L G W **H** R V Y L A L M E E A
 atacgagaatagacagagacttcaattccatactgggactcaactctcgactcgat
 I R R I D R R L S I P Y W D S T L D F D
 atggacaacccggtaaacacaactctgttttctccccgcttcttgggaaatggagatgga
 M D N P V N T I L F S P A F L G N G D G
 gttgttaccactgggctgcttaactgggcccagccgtagtctccttgacaagaaat
 V V T T G P F A N W A T P V G P L T R N
 atcggcgtgggagtcagttgatgactaaagaggtatccgagcgcacatgacccggtgt
 I G A G S Q L M T K E V I R A I M T R C
 atgactcggagatcaccttccaactgcataaatcagttcaaccttgaattttccac
 M T R E I T F P T A L N Q F N L E I F **H**
 ggtggtccacatatctgggttggaggacatttggctgtcttaatacagccgacacagat
 G G P **H** I W V **G** G H L A G L N T A A H D
 cctgtatttttccctccaccagcattttatgactataattgggaaatgttccgcatccat
 P V **F** F L H **H** A F I **C** Y I W E M F R I H
 caattcttggactgtggagtttaattccagcactgactatccggaagcaatgggacaacat
 Q F F D C G V N P S T D Y P E A M G Q H
 gcagccatgagggcaatggagcgtttaccgggatacatcaacattgatgggttaccgaagc
 A A M R P M D G L P G Y I N I D G Y R S
 tactggacgctgactggttagatgaaacgcccctatgtgtctcctgcttagacccg
 Y W T R Y W F R Y E R A P M C S S F R P
 ttttgggttaccatatttaagatgcaacatggcccggagtggtgctgctcagtgga
 F C G S P Y L R C N M A R G V C V S V E
 cgtatgctggcccccgatgaaggagcaactggggcgttggcgctatggtcttccct
 R M L A P D E G A P G A V G A M A F S P
 gcagcaacggcctcatccccggggcagccagagcagagctcaagctcaatgatcgac
 A A T A S S P R A A R A R A Q A A M I D
 gtogtctctatttgnacgtcgtctctatttgggtcctcctcgtctgaaccagga
 V G P L F X T S V L Y L W L L R L N P G
 cgcagatgggacaggcaagcttggcggcagcagatga
 R R W D R Q A W R Q A *

E *C. jal. 5 = C. jal. 6*

acacccatagcaaat
 T P I A N

agcacagctccactttttcgttatctgcatcttgacatcaaacacgggaaatactggt
 S T R P L F S L S A F D I K Q R G N T G
 caaccgacagacgcagaaaatagcagtagcagctgacactgaagtgcctatttctggag
 Q P T D A E I A I E Y A G T E V P I L E
 acaccagaagacgtgcacctgtattgtattcagcagttcgttggaaagcggacatggtt
 T P E D V H L Y C I Q Q F V W K A D M V
 cgttgggaggactacaacatcacgagcaaggacatttacttctgcaacggccttcttgc
 R W E D Y N I T S K D I Y F V N G L L A
 tccatgatgaaaaaaaaggagaaagcactcgcgacagaagcgtcagtcaggtggacca
 S M M K T K G R K H S R Q K R Q S G G P
 ggaggtatatttccgccaaggtttccgcatccgacgggaatagacggatattccgac
 G G I F P P T G F R I R R E Y R R I S D
 ggagaaagaaatgcctttcatgggcccccttctgcttttgaaaaagcaatagagagtatgac
 G E R N A F H G A L R L L K T N R E Y D
 acgttcccaacctgcatcaaggcattgtgacacatcggctcaccagggcccccaacttc
 T F A N L **H** Q G I V T T S A **H** Q G P N **F**
 cttgggtggcacagggctacctggttttgatggaggaagcaatcagaagaatagacagg
 L G W **H** R V Y L A L M E E A I R R I D R
 agactttcaattccatactgggactcaactctcgacttcgatattggacaacccggtaaac
 R L S I P Y W D S T L D F D M D N P V N
 acaattgtgttttctccccgcttcttccgaaacggagatggagttggt
 T I V F S P A F F G N G D G V V

F *C. k.1*

acacccatagcaaat
 T P I A N

agcacagctccactttttcgttatctgcatcttgacatcaaacacgggaaatactggt
 S T R P L F S L S A F D I K Q R G N T G
 caaccgacagacgcagaaaatagcagtagcagctgacactgaagtgcctatttctggag
 Q P T D A E I A I E Y A G T E V P I L E
 acaccagaagatgtgcacccgtattgtattcagcagttcgttggaaacgggataggtt
 T P E D V H R Y C I Q Q F V W K T D M V
 cgttgggaggactacaacatcacgagcaaggacatggacttctgcaacggccttcttgc
 R W E D Y N I T S K D M D F V N G L L A
 tccatgatgaaaaaaaaggagaaagcactcgcgacagaagcgtcagtcaggtggacca
 S M M K T K G R K H S R Q K R Q S G G P
 ggaggtatatttccgccaaggtttccgcatccgacgggaatagacggatattccgac
 G G I F P P T G F R I R R E Y R R I S D
 ggagaaagaaatgcctttcatgggcccccttctgcttttgaaaaagcaatagagagtatgac
 G E R N A F H G A L R L L K T N R E Y D
 acgttcccaacctgcatcaaggcattgtgacacatcggctcaccagggcccccaacttc
 T F A N L **H** Q G I V T T S A **H** Q G P N **F**
 cttgggtggcacagggctacctggttttgatggaggaagcaatcagaagaatagacagg
 L G W **H** R V Y L A L M E E A I R R I D R
 agactttcaattccatactgggactcaactctcgacttcgatattggacaacccggtaaac
 R L S I P Y W D S T L D F D M D N P V N
 acaattgtgttttctccccgcttcttccgaaacggagatggagttggt
 T I V F S P A F F G N G D G V V

G *C. k.2*

(Prilog 1. Nastavak na sljedećoj stranici.)

cagagcgccgcacc
Q R P R T

ggatataggactcgccaggagtaccgcaccctgtctgtcttccagagaaacgggtccat
G Y R T R Q E Y R T L S V F Q R N R F H
gctgcatgaaagagctctataggacgggacgggtgacgtgtttcgtctcgttacacagg
A A L N E L Y R D G T V T C F A L V H R
cggcgcttagatttggggggggcacacagtgccgacgctttctaccctggcatagacc
R A L D L G G A H S G D A F L P W H R A
ttctagctctatttggaggcgcttcgaaagaaagaccctgtgtttccctggccctac
F L A L F E E A L R R K D P S V S L P Y
tgggacagcaccctgtagacaataatggcgctgggcccggcttctctgcatgtgggac
W D S T L D D N M A A G P G F S V M W D
aacggccacatggggtcgcaataggcgtggtcgacgagggccccttggccgctggcag
N A H M G S P I G V V D E G P F A G W Q
gcccagagaaaaccccttgagcgaacvtcgtctgggggtcagcagcgttggcccggcag
A R E N P L E R N V A R G S G T L A R Q
gacaggttagacgagctgttacagctctgtcttctggatgaatcacgctaccctgggag
D R V D E L L Q L C L L D E F T L P W E
agcaccacaatggcgctgcatgtctgggtgggaaacccatggaaaccagtatggcgca
S T H N G V H V W V G G T M E T S M A A
gggagctccggttctacatgcatcactcctatgttgactacatctgggagaagtccgg
A D P V F Y M H H S Y V E Y I W E K F R
cagcggcagcgccgctctgtggagtcgatccggcgtacgactaccgcctcaaacgg
Q R Q R A V C G V D P A Y D Y P P V K P
ggcaccgggagcatggctcggatgacgta tggcggatgacgcttctcggaaacagg
G T P E H G P D E R M V G M T F L R N R
caaggcatcgctgattttggatcgacaactggtataactatactgacagcccaactgtg
Q G I A D F W I D N W Y N Y T D T P T C
gccaataactcgggagacagcccggacctgtattcggacaccgatattaactcgttggcc
A N N C G D S P D L Y C D T D I N R C A
tccgattcgcgcttggattttggataactccatagggcacaacagcagcagcgtcgg
S D S R F D F G E N S I G P T A Q R L G
ctgccccggcggcttggcaccgcaagcgagaaatggcggcctcccctcaaatggca
L P P P P G F A P Q G R M A A S P Q M A
aagccagctacgtacgtgattctgttccaaaggggagggagaccatacgaagggcatgc
K P A T Y A D S V Q R G G R P Y E G A C
gccaagatccttacgctaggtcgtgcttaagcgtccggatccgtcgaagcgggaagag
A K D P Y A R S C V K R P D P S T P E E
gtgtaaacgcaatggcgtggacaaggtacagagaccgaagcggctggaggacgtgtac
V V N A M A L D K V P R P K P L E D V Y
gaaaagttaaatcactgctgaagaaggggagcggatccggcccggaaatgaggtcaag
E K V K Y L L K K G E R Y P P G N E V K
gtgtcaagatgctaagcggatgaggagaacgactgcccctcgacaagttcatccgg
V F K M L T D E E N D C R S L D K F I R
gaccctcgtgctcctacgtacagaatggcggaaactcagcaagaaggtcctaaactg
D P L V A Y V Q N G R K L S K K G P K L
tacgacacatacaaaat^{taa}
Y D T Y K *

H *C. mul.1*

aaccccaaaagacggcgtgctacgtcaggtcatacagcagggcagcagaagcattggg
T P K E A A G Y V R S Y D E A A E S I G
cgtggaacaaagtttccaatctgttccaggtgcacaggaagccagacacatggcaa
R G T K F P I L F Q C H K E S Q T P W Q
cgggcatatgggatcaagctcgtcgaacacatcaact^{taa}
R A Y G D Q S L L Q T S T *

C. mul.3 (završetak prikaza; uzvodno je jednako kao *C. mul. 2*)

acaacattgtgctgcccggctcgataatgacttgcaccggaaactcggcactgtgta
[T T F A] A P V D N D L P P E L A D C V
cagagactaacaccatagcaactagcacacgtccagtttttccggtatctgcatcggac
Q R L T P I A T S T R P V F S V S A F D
ctcaaaacagggaaattgctggtcaaccgactgacgcagaaaatggcatcgagtacgt
L K Q R E I A G Q P T D A E I A I E Y A
ggcactgaagtgcctattctggagacaccagaagcgtgaccggtattgtatccagcag
G T E V P I L E T P E D V H R Y C I Q Q
ttcgtgtggaaaacggata tgggtcgttgggaggaatacaatacagagcaaggacatg
F V W K T D M V R W E E Y N I T S K D M
gactctgcaacggccttcttgcacatgatgaaaaaaaagggagaaagcactcgca
D F V N G L L A S M M K T K G R K H S R
cagaagcgtcagtcaggtacaccaggaggtctatttccggcagaggttccgcacccga
Q K R Q S S G T P G G L F P P T G F R I R
cgggaatagacgggatccgacgggaaagaaatgcctttcggcggcctcgtgctt
R E Y R R I S D G E R N A F H G A L R L
ttgaaagcaatggagagtatgacacgttcgcaacctgcatcaaggcaattgtgaccaca
L K A N G E Y D T F A N L H Q G I V T T
tcggctcaccagggcccaacttcttgggtggcagaggtctacctgcttggaggag
S A H Q G P N B L G W H R V Y L A L M E
gaagcaatcagaagaatagacagggacttcaattccatactgggactcaactcctgcac
E A I R R I D R R L S I P Y W D S T L D
tctgataggcaacccggtaaacacaacttcttctcccggcttctgggaaatgga
F D M D N P V N T I L F S P A F L G N G
gatggagtgttaccactggcgtctcgttaactgggccaagcggcctgactctgcaca
D G V V T T G P F A N W A T P V G G P L T
agaaatctcggcgtgggagtcagttgattactaaaggttatccragcagatgacc
R N I G A G S Q L I T A K E V I C R A I M T
cgggtatgactcggagatcaccttccaaactgcatataactcagttcaactgaaat
R C M T R E I T F P A T G F N L E I
ttccaggtggtccacatctcgggttggaggacactggctggtcttaatacagccga
F H G G P H I W V G H L A G L N T A A
cacgatcctgtatttttccaccacgcatttatgactataatttgggaaatgtccgc
H D P V F F L H H A F I G Y I W E M F R
atccataacttctgactgtggagttaatccagcactgactatccggagcaatggga
I H Q F F D C G V N P S T D Y P E A M G
caactcagccatgaggccaatggcggttaccgggatacaactcaactgattggtat
Q H A A M R P M D G L P G Y I N I D G Y
cgaagctactggacgggtactggtttagatagaaacggcctatgtgtctcgttt
R S Y W T R Y W F R Y E R A R P M C S S F
agaccgttttgggttaccatatttaagatgaaatagggcggaggtggtggtcga
R P F C G S P Y L R C N M A R G V C V S
gtggaacgtatgctggcccggatgaaaggacacctggggcgttggcgtatggcttcc
V E R M L A P D E G A P G A V G A M A T
tcccctgacaaacggcctcatcccggggcagcagagcaagagctcaactgcaatg
S P A A T A S S P R A A R A R A Q A A M
atcgactcgttctctatttgggtcctcctcgtctgaaccaggacgcaatgggacag
I D V G P L F V A P P S E P R T Q M G Q
gcaagcttggcggcagggatgactcccggcaggtggcagctatgaaagggctatccg
A S L A A G M T P G M A G R M K R A I P
gagcaatcaatggcgtccactaccatagcttatgcaaaatcgaaggggaaatagagca
E Q S M A S T T I A Y A K S K E G N R A
caagcactgaaataggaccactgtttcttgcaccagaatccgatggggcaacatcagat
Q A L E I G P L F L A P E S D G R T S D
gttttagttagaataattgccaagtgatatttaccggcgaatatttggatagggtcag
V L G R N I A S G I F T G Q N V D R A T
ccagatgtttctcagggcagcattcccggctcgcacaaccgatgtcattgttgcctgta
P D V F S G H A F P V A Q P M S L L P V
cgggtgctggacacactgattcattatgcaatctcctaatcttcaactacaaatgta
P V S D T L D S Y M Q Y P N S Y T T N V
tcgacatccgattggctattgtacctgtcangtcccacggatgctcctcatctgctcat
S T S D W L F V P V X V P T D A S S A H
atataagtttccgcaaaaggtctcaattatctgggtgaaatacaccgactacggcattgta
I K V S A Q G L N Y L G E Y T D Y A I V
gacacagcaaatcgtgcatccggcagcagcattgtcgccattctgctcctggagata
D T S K S L P S A H A I V A I R A P E I
ggacttccattgcatgtaactgccaagtcaggatcgggactgattgcaaacccgag
G P S I A M V T A S H G C G L M C K P M
tgctacaccaccgagaccgggacaccagatcaaacagtgctcaggaaatagtggatc
C Y T T E T G T P Q Y K Q C S G I M W I
aaccccaaaagacggcgtgctacgtcaggtcatacagcagggcagcagaagcattggg
T P K E A A G Y V R S Y D E A A E S I G
cgtggaacaaagtttccaatctgttccaggtgcacaggaagccagacacatggcaa
R G T K F P I L F Q C H K E S Q T P W Q
cgggcatatgggatcaagctcgtcgaacacatcaact^{taa}
R A Y G D Q S L L Q T S T *

I *C. mul.2*

(Prilog 1. Nastavak na sljedećoj stranici.)

gctgac
A D

ccgctagaaatttcttgctcaagagctcgcgctctgtgtgaacagacttacacctta
P L G N F L P Q E L A V C V N R L T P L
gcaaacgcgctttccaacggcttcagatccggttccaatcagacaacgggaaat
A N A A F P T A S D P V L N I R Q R E N
gggtgacagcaggctggttagagataggaacgactacgctgaaaacgagtccccaga
G G Q Q A G V E I G I D Y A E N D V P R
ctggagcggcggatggtgacctttatgtvkaqcgatctgtggaagctgac
L E T P E D V H L Y C V K Q F V W K A D
acggtgctggaaggactacaacacacgagagaccacaaactttatcaatggactt
T V R W K D Y N I T E T D Q N F I N G L
ctggaatctatgactccgacagggcaaacagctcaagtagcaagcggcgggt
L E S M M T P T G T N Q S S S K R Q A G
ggtccaggtggtttgcttcgcgcaaggtttccgctcgcacaggaatagacggata
G P G G L F P P T G F R V R Q E I R R I
tccgagcgaagcagaatgcattttccggagtatgcgctgcaaaaatgaatggagag
S D G S R N A F F G V L T R A M K M N G E
tatgacatgttgcagacttcatcggtgcatcgtagaggtatccgccaccagggtccc
Y D M F A R L R G I V E V S A Q G P
aacttttggatggcagatgcttaatatccatgttcgaggaacaaatgcgactt
N Y G W R V L I S M F E E A M R R I
gacagagcagtttctgcttactggactcaacgcttacttcgaaatggacaaccg
I S R P T A A E E F D L E L F G G N
gtacacaatattgcttccacggcttttgcgaacggcaggggtgggtaccag
V H T I L F S P A F Y G N G D G L V T T
ggacccttggcaactggcaacacactatggtccgctgacaagaatatlagaagcag
G P F A N W A A T P I G P L T R N I G S E
agtctgctgagtcaaaaagaatccaagcggctcagtcctcggatgctggagatgaa
S S L M S K R N I Q A V M S R C R M I E
atttccccttactgcgcaaggaattccagctgaacttttccatgggtggcaatcc
I S R P T A A E E F D L E L F G G N
cttgggtgtagggcagttctctgactgagcagcatatgacccctattttg
L W V D G Q F S D L A V A A Y D P L E W
atccaccagcattttagactatattggaaaatgctccgcttccacagttctttgac
I H A F V Y I W E M F R F H Q F F D
tgtagartvaaccggacttgcagatccagcagcctgtctacatacagcactaagg
C A R V N P D F D Y P D A P G L H T A L R
caaatggcagataccaggttacgtaaatatgacggttatcgaggtactgcaagcga
Q M A M L G V G R K F D A P S H D P R T
tctggtatagatagagcgtgacccatgtgcccagtggtctccatattaaagtcg
F W Y R Y E R A P M C P C G S P Y L R C
caccocgctcgggtgctgctgcaattgaaacttcttctgctcccgatgaagacca
H P V R G V C V S I E R F L A P D E G A P
ttaggctcatatggtgcaatggccttccaactctcagcagcagctcggcgaagatg
L G P Y G A M A Y P T S S R A A R A R A
caggttgcaatgctcggctgtgctgcaaaaatgctgagccttccatgcatccaaagcag
Q V A M L G V G R K F D A P S H D P R T
cagatgatcatgaaagtatggggcgaaggagctttaaactgacaaaatagcgct
Q M Y H E S M G R K G A F K R T N M A P
gtcccagctgtgggtaaaaatcacaactcagcaaaatcgtaacccaactgtaatagga
V P A V G E N S N Q Q N I V Q P H V I G
gatcagattcttccagcagatccaacgctgcaaaatcagacgctgtgaaaggaacaat
D Q I L T A V S N G R K S D A L E R N N
gccagcccttggttacagggcaaaacgcaaaatgagcttgcagatatttaccagga
A S P L F T G Q N A N K A L Q D I Y S G
catgcatttccagctcagaaacgacgctcactgctcccgctacgggtgtgggacacta
H A F P V A E P T S L L P V P V W D T L
gattcatatttagaaaacccaactcttacaactccaactcagccttatgactggctt
D S Y L E N P N S Y T S N S S A Y D W L
ttgttctctgcaagtgcattcaacgctgttggagtcgacaactctgcacgacggc
F V P V Q V T F N A V G V D N S A R T A
agatgagagctcgcctcggatgcaaaaatcgactcatataaagtatccgtgcaaggc
S M K C L P S D A K S T H I K V S V Q G
ataaattatctgggagaaaacaccgactcagcggtagtggaatagcaaaagatcttgac
I N Y L G E N T D Y A V V D I S K D L D
tctcccacgcaatcgctgccaatcggcggcagctgtcgacagctctatgctcactgta
S S H A I V A I R A P V V G P S M S M L
actgcaagtacggatgcggtcttagtcgaaaaccaaactgtaacaacaaaacgggca
T A S H G C G L M C K P M C I N T K A G
acgtttcagatccttgcaaggactttttgctcaaacagaagatgcaactcggc
T L Q Y H P C T G L F W L K P E D A T A
tacgtccgatcccacgacgaggtgtggaagccttgcacaaaggtcggccaaagtcccc
Y V R S H D E A V E S L A K G R A K F P
ataatgtccaatgtaacagggaagctcgtctccttggaaagccctaa
I M F Q C H K E S Q S P W K K P *

J Dre1

agaccgttcaaggtcgtcgtcgg

aaaacttttgcctggtggttacagaaaatcacgggtggttttgggtgtatcggtata
M W L L Q K I T V V L C V S V I A
atcatgctgacccgcttagaaaatcttgcctcagtagctcggcggatgtgtaaacaga
I H A D P L G N F L P H E L A E C V N R
cttactgcttttagcaaacgccacagatccattggcctcagtagcccgctctaaatcaaa
L T A L A N A T D P L A S V A R L N I K
caacgggaaaatctggacaacaggtgtagagaaaaggatcgactacgctggcacc
Q R E N T G Q Q A S V E K G I D Y A G T
gaagtgccagacttagagcgcagagagatgtgacttctattgtatccaaagtctgtg
E V P R L E T P E D V H F Y C I Q K F V
tggaagcgggacatggtgctgggagactacaacatcactcagacgacaacaaagctt
W K A D M V R W E D Y N I T Q T N K D F
atcaatggccttctagatccatgatgaaaacatcagcgtcaaagcactcaagaagca
I N G L L A S M M K T S R S K H S R S K
cgccagcgggtggtccaggtgtagagtttccgcaaggtttccgctcggcgggaa
R Q A G G P G D R F P P T G F R V R R E
atcagacgaatccgacggagaagaagagcatttttggagtagtgccatattgaa
I R R I S D G E R R A F F G V V R I L K
atgaacggagtagatgacatttccgacagatcattggaaattacagtgagcctcggc
M N G V Y D I F A R Y M G I T V D S A
catgggggtccaaatcttctggtggcagtagagctacactgaccatgctcaggaagca
H G G P N L G W R V Y L A M F E E A
atcagacgaattgacagacgacttctcggcagcagcttccgactcggcactcagcagc
I R R I D R R L S L P Y W D S T L D Y D
atggtcaatcgggtactcaattgtggtcaccggcttcttggaaacggtgtaggg
M V N P V H S I V W S P A F F G N G D G
atggtaaacagcaccctccgatacttgcaacacctaatggccccctaggaagaa
M V T T G P F R Y F A A P N G P L G R N
ataggttttaacagttcgtgcttccaaagagaatatacgaatataatgacggtgt
I G F N S S L L S K E N I R N I M T R C
ctgactagcgaatcgctccctcactcagcagcacttctcggcagcacttctgtaagttgat
L T S E I V P L T A A P M F D L D K L H
gggtgcccctcacatggtggtcagtaggactttagtaagcttgaacagcggcctcag
G G P M W V D G Q F S K L E T A A F D
ccaatttttctccaccagcacttctgactatattgggaaaaatccgcatcacc
P I F L H A F I D Y I W E K F R I H
caattctttagctgtggagttaagcaaacactgactatccacatgactcagctacac
Q F F D C G V K P N T D Y P H V P D L H
gcgcagctcagacaagggcttctgtaacactcagcagcagcagcagcagcagcagc
A A L R P M D A L Q G Y I N I D G Y R N
tactggacacaattctggtatagatacgaacttctccacagctgctcgttttggcct
Y W T Q F W Y R Y E R S T P C P F C G S
ccatattttagacagcaccgctcggctgctatgctatcagcagcagcagcagcagcttca
P Y L R C D P I R G V C V S R E R R L S
cccgatgaaggatctccaggtccgagtggttactctgctgcaggaaacggcagatcccc
P D E G S P G P M G Y S A A G T A A S P
cgagcagctcagacaagggcttctgtaacactcggcctcggcagcagcagcagcagc
R A A R A R A F V A T L G V G R Q F P A
cctcccctgaaccaggcagatgctcaggcaagcttctcagcagcagcagcagcagc
P P A E P R T Q I A Q A S M A L M G A F
agacgtaaaagggggcgtaccgcaagcaaatggcagccttcccatttgggtgtag
R R K R R A V P Q Q M A P F P F V G D
aattcaactcggcaaaatcatgcaaccactgcaaaaggagcaaaagtcttctgctca
N S T R Q N I M Q P L A K G A K F L A S
gtatctgaagatcgaacattagacgttttggtaggaacaatgcaagcggatggttaca
V S E D R T L D V L F R N N A S G M F T
gggcaaacgctgtagaactcagaagatgtttactcaggacatgcatctcagactcgca
G Q N V D E A T K D V Y S G H A F R V A
gaaccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
E P M P L L P V P V W D T L D S Y M E N
cctgctcttaccatccaactcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
P S S Y I T N S S A Y D W L F V P V Q V
acatacaacgctgttggcgcaatctcctcggcagatcagcagatgaaatgctgctca
T Y N A V G A E F S A Q I P S M K C L S
tccgattcaatattgactcatataaagtgtccgcagaagcctaataatcttgagaa
S D S I L T H I K V S A Q G L N Y L G E
tatccgactcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
Y T D Y A A V D N S I A L A S S H A I V
gccatacgggtcagtggtcggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
A I R A P V V G P S I S M V T A S H G C
ggattaatgtaacaaatgtgcatagacaccgagaccggcagctgtcagtaacaacca
G L M C K P M C I D T E T G T L Q Y K P
tgcaagggaactctggtgcaacccaagatgcaacagcagcagcagcagcagcagcagc
C T G I L W I K P E D A T A Y V R S H D
gaggtgtgaaagccttgcagaggtggggcaaaagtccaataatgctcaggtgctcac
E A V E S L A R G A K V P I M F E C H
aaggaaagcagcccttggcagaagctccta
K E S Q A P W Q K L *

K Dre2

(Prilog 1. Nastavak na sljedećoj stranici.)

ctgtac
L Y

```

aatgctttcaacgccccttaccgtaatggcactttggccaggttcggtagactccatgcc
N A F N A L Y R N G T L A R F G R L A
actgaggtataccggaagcaccacggcgcgcttccctccctggcatcgtgttccata
T E V Y R K H H G A A F L P W H R V F I
gcgccgtttgaggagcagctcagagaggtcgaccocgatgtgctgcctatattgggac
A A F E E Q L R E V D P D V S L P Y W D
tattcgatggactactacatgccacttccgtctgactcaatcgtctggagcaagtcttc
Y S M D Y Y M P L P S D S I V W S K C F
tccggcaacggaaacggtaacgttggctccctcagtttcatgtacggcggtat
F G N G N G T V N V G P F S F M Y G G Y
aacatgccgataagccgacatcgcaacagccgcaacatgtcccctaagctgacgac
N M P I S R D I A Q A A T C P P K L I S
aaggagacattgcaactcatgaatttggcgtatatacgaccgggaag
K E D I D E L M K F C N F A D I T T G K
aatttgcacaaagataatcctcgcataaactagaaaaactacacgactggtgtacacgac
N L Y Q D N S S H N L E K L H D G V H D
tgggtggcggtgatattggcgcttctggtagcggcggtacgacctgtattctacatg
W V C G D M G V L V T A A Y D P V E Y M
caccacgcttccatcactacatctgggagcagttcagggcgcacagaccaaagtgatgc
H A F I D Y I W E Q F R R R Q T N E C
caagtgcgtagcagaagactcggcgaactcggcgcactactcggctcgcgacaatgga
Q V D V E K D Y R K L G D Y S V A D N G
caacaaggcccaaatgacccatgcaagggttgagtatcttaataacagcagcgggctc
Q G P N D P M Q G F E Y L K Y S D G L
tggaaaaactggaaccacgacttttaccgactacgaaaggcggcgaggttccaaactgc
W K N W T T D F Y D Y E K A P E C P N C
ggctattcggactttctatactgcgacatgatatacaaccgaaacggacccaatggcgctc
G Y S D F L Y C D M S I N P N R P N G V
tgcgtgccaagaacgaatgactcctcgtcgaacacgctccttatggcatttaaggagac
C V P K T N D S C V N T L L M A F N R D
gaaccgcatgagaagccgcaaggtggagggcgaaatgtcactgggcccctgcacacatt
E P H E K P Q G G G A K L S L G P R H I
gggtaccaggggacggtcgaactagattcatgtcggcgggaagaggactcgcctctctt
G L P G D G R T R F M S R E E G L A L L
aaacagcagcttgcactcggatcgaagacaagcctacaacatcacgaccggaaccgct
K Q Q L A L G I E D K P T T S R P E T R
gcactccttgataaccactaacaccattattatatacaacattatcgggtggtctctggact
A S L D T T N T I I I S T L S V V L G L
ctgctgattggtgggttaacttggctgtttatattcgcaactcacaagaagaactgcaa
L L I V V V T L V V Y I R K L T K K L Q
tcgacctcaatgaacggcgtacagaagccctgacacagcagagacaagtgtgaccaa
S P L N E R R R T E A P D T A E T S A D Q
ggcggggaaactcgggtcgcacgctgatgtaataatggaactacgcccagcgtgtgtaa
G A G N F G S T R D V N I E L R Q R V *

```

L *Dre3*

tacaaa

```

gtaaattgggtggcggtacattcgcatgaaataaaacaattgatttcagcaatgttgaca
M L T
acacagggcgtggtactgtttgtagtggttccaggagtcgtgagcagccaggatgcgaca
T Q A L V L F V V V S G V V S S Q D A T
acggcgcaatgaacgaccacgtggacaagatgaaggtaccattgataaacgtctataga
T R R M N D H V D K M K A T I D N V Y R
atgatctccgaggtgtacgaagtaaggacaaggtttcaatggcagcggcggtgac
M I S E V Y E V R D K C F N G S A G G Y
aaaaacaaagcaagatatacagctcgttagacatttatgccatcgcgtaaacgagaaaa
K N K S K D T S P V D I Y A M R K D E K
ggcgaaattacgtcaacgtggaggtgccatccacgtactacgattgtctgaaggggctc
G G N Y V N V E V P S T Y Y D C L K G L
gatccgaaagtggtgccaccggaagggcgccatcctggtgattcgcgctgctggtgg
D P K V V P P E K A R I W C I R V V L W
cagtaccacaatgacctcgaagggcgactatgacgacgactgaaggaagcctatctc
Q Y H N D L E K G D Y D D D L K E A Y L
ctgcagtatggtgacgacaagccgaaagaaacaaagggggaaccagaccattcggcag
L Q Y G D D K P K R N K R G T T T I R Q
atagcggccggccaatcactagccgctgacccggatcgcgactcgcagcaggatccga
I A P R P I T S P L T G Y R T R Q E Y R
acgctgctggtcgcaccaggaacaccggttccatcccgctatgaatcgcctttatcggg
T L S V D Q R N R F H A A M N T L Y R D
ggtacagtcacatggttctgctggtacacagaaaccgcttcgcagccggggccca
C T V T C F A L V H R N A L R T G G A H
ggtggtgacgcttctgcctggcatcgagcattcttagcgtgtttgaagaagcgtc
G G D A F L P W H R A F L A L F E E A L
agaagttgatccatctgtttcaattccttactggacagtagcctttgacgacaatg
R R V D P S V S I P Y W D S T F D D N M
gcggtggaccgggattttccgtaatgtgggataaacgcacatgggctcctcgggtggc
A A G P G F S V M W D N T H M G S P V G
gttgtgacgagggaccttctcgggctggcaagctcggggagaaccctctagagcggac
V V D E G P F A G W Q A R E N P L E R N
gtggccggaagcgggctcgtggtccgctcagggcccgagtagatgattgttacaactg
V A R G T G S L V R Q A R V D E L L Q L
tgtctgtagatgagtttacgttgccctgggaaacaccacaattctgtgcatgtctgg
C L L D E F T L P W E N T H N S V H V W
gttggaggtaccatggagacagatggtccgcccggcagccagattctacatgaccat
V C G T M E D S M A A A D P V E Y M H H
gcctcgttgattacgtatgggagaagtttcggcagcgacaacgcgctcgtggtgagtg
A F V D Y V W E K F R Q R Q R A V C G V
gatccggctcgcactaccggcagtagatccggccctcccagagcagtggtccggatagg
D P A S D Y P P V D P A L P E H G P D R
aatatgactggaatgacgttcttaacaaacagagaagggatggtgattactggattgcc
N M T G M T F L T N R E G I A D Y W I A
aactggttcaactatacggacacaccacgtgtcctagctgcggaacagtcgccatctt
N W F N Y T D T P T C P S C G N S P D L
tattgcgacaccgatataaatcgttgcgtgacgttccgaattttagtttggcgagca
Y C D T D I N R C V S A S N F S F G E A
acgatagggccaacggcacaagcccttgggttggccctcctcctggcactgcgcccga
T I G P T A Q G L G L A P P P G T A P Q
cgcgctactgcggccagtttaccggcttccaccaccctaaagcagctacgtacgc
R A T A R P V S P A S T T P K A A T Y A
gactctgcaaaaacggcggtaaacatcacgaagatcctgctccaaggtaccatgct
D S V K T G G K P Y E G S C S K D P Y A
cgatcagcgttaagcgtcctcagccgtccacaccggcagaggttagttaatgccatgct
R S C V K R P Q P S T P A E L V N A M S
ctgaacaaggtaccgaaacccaacccttagatgacgtgtatgagagaatcaaggcgtta
L N K V P K P K P L D D V Y E R I K A L
ctgaagaagggcaaggtatccacctggaagtgaggcgaagttttcaagatgaaccg
L K K G E R Y P P G S E A K F F K M K P
gatgaggagaacgactcgcctgcacagatataccgcatcccttggctgcctac
D E N D C R C L D K Y I R D P L V A Y
gtagagaaagcaggaagctcagcaagcggctcctaaactgacgacagctacagctaa
V E K G R K L S K S G P K L Y D T Y T *

```

M *Dre4*

(Prilog 1. Nastavak na sljedećoj stranici.)

cagataaagtgtgtgatagaggatttctcaagacaaaaggctattgtcttaca
caaatgcataatcagcaatagcttattgtttgtgcaagcaagcttctgtgcttggg
M H I S A I A Y V F V A S T F L V L G
ataaatggacagcgccgattacgaaaaagcactgaaaaggatccatggtcaagtgaagcac
I N G Q A D Y E K A L K R I H G Q V K H
atcgggaaaaacgatggtcgccttgaataagatgtttaaagaggtttacagcgttaaggac
I G K T M V A L N K M L K E V Y D V K D
aagtgttactacagaccggaaaaaatcgtacaaaagccagcagacatctacgcagttccg
K C Y Y R P G K N R T K P A D I Y A V P
aagagcggaaaaagcgggtggaatagttaaagtgaagttaccaagttatagcgaatgc
K S G K S G G I V K V E V T K L Y D E C
ttgaagggtctaaaccagacatcttccctcctgtgaaggcaaatcctggtctcgcgt
L K G L N P D I F P P V K A K I W C L R
gtgacactctggcgcaaacagaaacagcctgaaggcagggactttgaaaaaggacttga
V A L W R K Q N D L K A G D F E K G L E
gagcgaaatgcttcagaaggagcgcgaacccctgaccccgagataacaatcaa
E A K L L Q K G G A T T R D P R D N N Q
ccgtggatgataactaagcagaaaaagcagggcgacttgacgtaagcagatgtgca
P W D D T K Q R K R G A L D V R Q I A
cctgcgacatcagcgcctccctgactgggttcaggaacacggcagggatcaggaacgctc
P A D I T R P L T G F R T R Q E Y R T L
tctctgtacaaaagaaacggctccatgacgctaaatcaagtttaccaggaacgggacg
S L D Q R N R L H A A L N Q V Y Q D G T
atgacctctcgtctcgtgcacaggaacgcattgaatgatggggggcccatcagagg
M T C F A L V R R N A L N D G G A R G
catgctctcgtccctggcacagggctcttctatctctgttgaagaagccttgagacag
H A L P W R V F L S L F E E A L R Q
aaggacccaagtgtatccctgccatattgggacagtaaccttagatgacaatattggcggc
K D P S V S L P Y W D S T L D D D N M A A
ggacctgggtctctattatgtgggacaacgcacatttagtcccggtgtaggtaacgtg
G P G F S I M W D N A H L G P G V G N V
aacgcagggccttfcgcaactggacgactcgcaggggtcccttgcagaggaacgtggct
N A G G P F A N W T T A E G P L Q R N V A
cgggaaacgggaacctcgtgctcagaccagggatcaaaccttgcctaatgtgtctc
R G N G N L V R Q T R I N T L L N L C L
ctggatgagttcacagaccctggagagtaacacagcactcgggtgcatgtggttaggt
L D E F T D P W E S T D S V V W V G
ggcacaatggaaacgactgttgcgacgtatcccggttttacatgcaccatgccttc
G T M E R S F A A D P V Y M H A F
gtagattatgtgggagaggttccggcagcgcagggcagcctgtggagtgatcccg
V D Y V W E R F R Q R A A C G V D P
ggcgcagactaccgcccagcagatgagatgaccggagcagatgctgctcagcccgatg
A A D Y P P D D A D A P E H S A V S P M
gtggcagatggacttttggagaaacagggacagcctgattactggatcaacaactgg
V A M D F L R N R D G I A D Y W I N N W
ttaaactatagcactgcctcacttgcgcaataattgcggtaacagtcaggactgttac
F N Y T D S P T C A N N C G N S P D L Y
tgcgacagtgcaatataatcgttgcgtgcaactcgcgatttgactttggcaactcctgt
C D S A I N R C V S N S R F D F G N P V
agcactactcctatcccattaacgacagctacaactcaactgttacacaacaactgca
S T T P I P L T T A T T T T V T T T A
actacgacaactgaaactacaacaacacagcgtccgacacctatacaataaacctcaaca
T T T T E T T T T T R P T P I P I T S T
tccgaatcgctagaacaacacacacacactaggaacataaccactacagctccacca
S E S P R N T P T P P R N I T T T R P P
acaccagcccaacgcccataccaagtcgcaacacctagcccaatcagcaacaactctaca
T P S P T P I P S A T P S P I T T T S T
ggcccccttacgacaacacgattgcatcactgactgagggggactattgtagaag
G P L T T T P I A S C T D G G S Y C R K
gtcaatgaggtcagaagccatacgaaggcaaatgctcacaagaccatagcaggtacc
V N E G Q K P Y E G K C S K D P Y D G S
tgtgccagggcacaagggcagctactcggcagcagtggtgaatgcaatattgctgcaac
C A R R P R P A T A D A V V N A I C R N
gagcttccaaggtcgccatcgctcacaagcagtggttgcgcaatctcgtcaggttaaag
E L P R S P S L Q A V F D A I S S E L K
agagcgaacggttcccgccgagagcagcagacatggttccgcatgaagccggatgag
R A Q R F P P E S E Q T W F R M K P D E
gaaaagactgctgctggacagcttataccgagaccgcttgcgctacttgaag
E K D C R C L D S L I R D P L V A Y L K
gaaggcagacaacttaatacagatgggccaagctttaa
E G R Q L N Q Y G P K L *

N Dre5

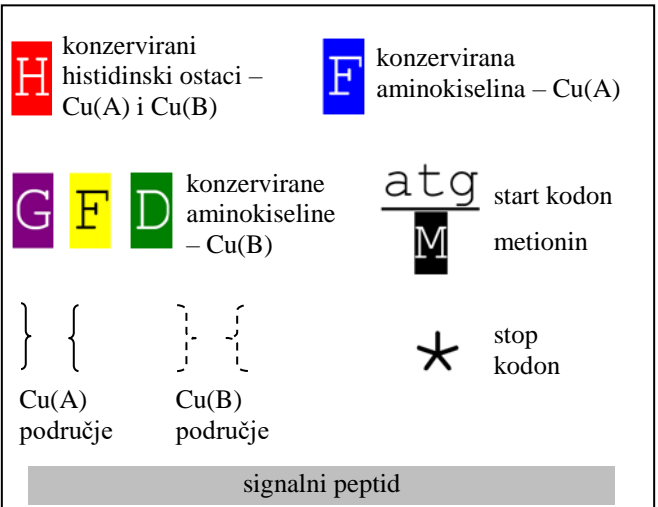
gtgtca
gctggagagaaggcttcaagcagatgttgaacagcagatgttggttcacagctcgtcgtgt
M F E N V I L F T V V W C
cggttctcgttgcgttaccgcaagggcagggaggtttatataaccggttagagata
A V L V A V T S Q G Q E V F I K P L E I
atcacagtgtgagaaacgcgcaagggcagcgtgttaaccagaccctggcggctgaggct
I Q C E E R A K D E P V N Q T L A A E A
tgcattgctgacttctgacagcactcaactaacgtcagcagcagcagcagcagcagcagc
C M R S Y F V D R L S T N V M D L N D H
gagttttcgaacgagaatcgcgcaacaacagtttggaaagaaacggccccctagcgg
E F F E R E F A N K Q F G K K P P P S G
ttcagagtgacgggacatcaggggttctcaacatcagcagcagcagcagcagcagcagc
F R V R R D I R V L N I T E R Q K V F R
gcatttgacgatcacaagcaggggtgtagggcaggttcggcgggttcagcagcagcagc
A F D D L Y K T G V M A R F G R V G S
gaaatataccggaagcacaacggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
E I Y R K N G A G L P W R V F T T
gcgctcagggagagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
A L E E K L R E V D P E V T S L P Y W D Y
tcaatggactactacatgccactgccaatgattccaatcgtctggagcaaggtttcttc
S M D Y Y M P L P N D S I V W S K C F F
ggcaacggttaacaacacggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
G N G N N T V S D G P F R F M Y G G Y N
atgcccgtacacgcgacatattgcccgaagaaacggtcccccctagacttatcagtaag
M P I Q R D I M P E E T C P P R L I S K
ggcagacttgacggactcagtaagtttgccttttgcgaacatcagcagcagcagcagcagc
A D I D G L M K F C H F A N I T S G K Q
cggtaacaacaaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
R Y N Q D R S H N L E S L N N V N W
gttggcggagatagcggcctccttggggcggcggcagcagcagcagcagcagcagcagc
V G G D M A V L G A A A Y D P I F M H
cagcctctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
A F I Y I W E Q F R R R R Q S S N E C
aacgtagacggcagagaagattaccgtgaaccagggcagcagcagcagcagcagcagcagc
N V D A E K D Y R E P G D Y S V E D D K
atcgccctcaacgctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
I A L Q R L T D E M H V F N H L Q I R D
gggcttggacaactggaacaacacgggtgacggcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
G L W N N W T T T V Y G Y E L L A P K C P
gaatggcgaactcgggagacactcactgcaataataacttc
E C G N S E N L Y C N I T F

O Dre 6

(Prilog 1. Nastavak na sljedećoj stranici.)

gctggagagaaaagccttcacgatgtttgaaaacgtgattttgttcacagtcgtctggtgt
 M F E N V I L F T V V W C
 gcggttctcgttctggttacctcgcaagggcaggaggtgtttattaaccggttagagata
 A V L V A V T S Q G Q E V F I K P L E I
 atacagtgtaggaacgcgcaaaagcagcgtgttaaccagaccctggcggctgagct
 I Q C E E R A K D E P V N Q T L A A E A
 tgcattgacgatctatacaagcgggtgtgatggccaggttcggccgctgcatggctc
 A F D D L Y K T G V M A R F G R V H G S
 gaaatataccggaagcacaacgggagcgggttctcgtccctggcaccgctttttactacc
 E I Y R K H N G A G L P W H R V F T T
 ggcctcaggaggaagctccgagaactcgaccagaagtgtcgctgcctactgggactat
 A L E E K L R A E V E S L P Y W D Y
 tcaatggactactacatgccactcggcaatgattccatcgctggagcaagtgtttcttc
 S M D Y Y M P L P N D S I V W S K C F F
 ggcaacggttaacaacacgcgtcagcagtggtccctccggttcatgtacggcgttataac
 G N G N N T V S D G P F R F M Y G G Y N
 atgccgatacaacgcgacattatgccggaagaacgtgcccccttagacttatcagtaag
 M P I Q R D I M P E E T C P P R L I S K
 gggcagcttagcggactcatgaagtgttgcattttgcgaacatcagctcgggaaagcag
 A D I D G L M K F C H F A N I T S G K Q
 cggtaacaacagatcggtaacaacatagaaagttaacaataatgtacacaactgg
 R Y N Q D R S H N L E S L H N N V H N W
 gttggcggagatagccgctccttggggcggcggcagcagctccatcttctttatgcac
 V G G D M A V L G A A A Y D P I F F M H
 cagccttcatcgactacatcgggagcagttcaggcgcgacagcaaatgagtgccaa
 H A F I D Y I W E Q F R R R R Q T N E C Q
 gtacagctcgagaagactaccggaacttggcagactactcggtcgacgaatggacaa
 V D N V E K D Y R K L G D Y S V A D N G E Q
 caagggcccaaatgacccatgcaaggggtttgagttcttaataacagcagcggcctctgg
 Q G P N D P M Q G F E Y L K Y S D G L W
 aaaaactggaccaccgactttacgactacgaaaaggcggcggagtgtccaaactcggc
 K N W T T D F Y D Y E K A P E C P N C G
 tattcggactttctatactcggacatgagatcaaccggaacccgacccaatggcgtctgc
 Y S D F L Y C D M S I N P N R P N G V C
 gtgcaagacgaatgactcctcgctcaacacgcgtgcttatggcatttaatagggcga
 V P K T N D S C A C V N T L L M A F N R D E
 ccgcatgagaagccgcaaggtggagggcgaatgtcactggcctcgacacattggg
 P H E K P Q G G K A K L S L G P R H I G
 ctaccaggggacggtcgaactagattcatgtcgcggaagagggactcgcctctcttaa
 L P G D G R T R F M S R E E G L A L L K
 cagcagcttgcactcggatcgaagacaagcctacaacatcagcagccggaacccgctca
 Q Q L A L G I E D K P T T S R P E T R A
 tctcttgatacactaaccattatatacaacattatcgggtgtcttggactctg
 S L D T T N T I I I S T L S V V L L G L L
 ctgattgtgggttacctgtgttataatcgcaactcacaagaactgcaatcg
 L I V V V T L V V V Y I R K L T K K L Q S
 ccaactcaatgaacccgtagacaagccctgacacagcagagacaagtgtgaccaagcc
 P L N E R R T E A P D T A E T S A D Q G
 ggggaaactcgggttcgacacgtgatgtaaatatgaaactacgacagcgtgtgtaa
 A G N F G S T R D V N I E L R Q R V *

P *Dre7*



ccacgtggcggaccacgtggtcgg
 P R G G P R G R
 ttcccaccgacaggggttctgattcgaagaatatagacgactatccgacggagagaga
 F P P T G F R I R K E Y R R L S D G E R
 aattcatttcacgggtcttacgtatcatgaaacgaatggagagatgacacgtctcgt
 N S F H G V L R I M K T N G E Y D T F A
 aaacctcaccagggcattgtgacaacgtcgccctcagggacccaacttctctggttg
 N L H Q G I V T T S A H Q G P N L G W
 cacagggctcactagctttgatggaagaagcaatcggaggatgacagggcctttcc
 H R V Y L A L M E E A I R R I D R R L S
 ctcccatactgggactcgacgatggattttgatatggaaaatccgggtaacacaactctg
 L P Y W D S T M D F D M E N P V N T I L
 tttccccggcttcttgggaaacgggtgatggatagtgaccaaggctccttttgaaac
 F S P A F L G N G D G I V T T G P F A N
 tggacgacaccggttggcctcgcaagaacacatcgggggcgggaagtcaagtttctt
 W T T P V G P L T R N I G G S Q L F S
 aaagaagtcacagggcaatcatgacaggtgtaggaagagagataaacaatccaacg
 K E V I R A I M T R C R T R E I T N P T
 gcaatggctcagttcaacctggaacgt
 A M A Q F N L E R

Q *Myr1*

attaaaaacaaatgtgcactgtg
 M C T V
 gtaatttctcgtgattttgtataagcatatcttccatcccccgttccccaggagtgat
 V I F L V F C I S I F S Y P G S H G V D
 caccatacgcagcgtggcttatgtggacaaccacgtcaaagatagccacaaccatcgct
 H H T T L A Y V D N H V K D M A Q T I A
 tcattgcagaacatgttaaaagatgctatgaaagtaaggacaagtggttctatagcaac
 S L Q N M L K D V Y E V R D K C F Y S N
 gccactagaccacccagatctatgtagctccaaagaaagaggtggggaaagt
 A T R P T D I Y V V P N E E K S W G K V
 gacgtgcaagttcgtatataatgaagagtgccctaaagtgataaaggagacttagtc
 D V Q V P Y T Y E E C L K V I K E D L V
 cctcctgcaaacgctcggattttggtgcctcgggttatattgtggaagctcacaatgac
 P P A N A R I W C L R V I L W K L Q N D
 ccatacggcggagactttgataaagtcgagaggagctagaataagcaaaaagctcatca
 P Y A G D F D K G R E E A R I K Q K S S
 acccctctcctagcgaatgataatgcaagaanaaacgcgctgctggcagacatattg
 T P S P S A S D N A S D N A R K K R G A A D I L
 caaatcgcgcctcggataaaggcgcctctgacgggctataggaccgacaggagtagc
 Q I A P S D I R R P L T G Y R T R Q E Y
 agaactctctatgaaacaaaggaacggcctacacgcagcctcaatcagctgacag
 R T L S I E Q R N R L H A A L N Q L Y Q
 gatggaaacgatcagcttctcggcctcgtgcaacaggaacggcctaaatagacggagggc
 D G T I T S F A L V H R N A L I D G G A
 cacagggggagcgcctcctgcctggcaccgggcttctgagcactgtcagaggagct
 H R G D A L P W H R A F L A L F E E A
 ctggcgaagaagaccgacgtgttccctgcctcggcactgggacacacatcagcagcaac
 L R Q K D P T V S L P Y W D S T F D D N
 atggcggctgggcccggctctcctgtaatgtgggacaacgcacacatgggttctccact
 M A A G P G F S V M W D N A H M G S P T
 gggacggttgatgaggccgcttcgcccggctggaccactgatgaggaccatgacgagc
 G T V D E G P F A G W T T D E G P M Q R
 aacgtggctcggcagggcagcctcgtgacagggcaggaatgactcctcctcgga
 N V G R G T G S L V R Q A R I D S L L G
 ctctgtcgttgacgagttcacggatccctgggaaagcactcacaactcgggtgacgtg
 L C L L D E F T D P W E S T H N S V H V
 tggtagggagcaaatggagcggacgttctgctgacgagcagcctcctctcatatgac
 W V G T M E R T F A A A D P I F Y M H
 cacgcctcgtcgactcgtctgggagaaatccggcagcgcagcgggaacgctcgtcggc
 H A F V G Y V W E K F R Q R Q R T V C G
 gttggaccggcgtcagactatccggcggacgaaccggctcctcggagcacaacggcgtc
 V D P A S D Y P P D E P G S P E H N A V
 agtcagatggttgcagtgaggtttttgaggaacagggacggatgctgactactggata
 S Q M V A M E F L R N R D G I A D Y W I
 gacaactggtataattatacagacacaccaactgtgctaataattggggaatagtcg
 D N W Y N Y T D T P T C A N N C G N S P
 gacctatattgtgataccgatataaatggctcgtatcggagtcggagctgattgattcgga
 D L Y C D T D I N G C V S E S R F D F G
 ggtgatccaattgacacaacaccttccaccaacaacgaccaccactacaccagcaacg
 G D P I S T T P L P P T T T T T P R T
 actgcaccacagctacgactacaaca
 T R T T R T T T T

R *Myr2*