

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Anja ČIBEJ

**REGULACIJA GENSKEGA IZRAŽANJA TRANSFERINSKIH GENOV
PRI POSTRVEH (*SALMO SP.*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**REGULATION OF TRANSFERRIN GENE EXPRESSION OF *SALMO*
*SP.***

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija zootehniko. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete v Ljubljani, kjer so bile v genetskem laboratoriju opravljene analize.

Mentor diplomskega dela je izr. prof. dr. Simona Sušnik Bajec in somentor dr. Aleš Snoj.

Recezent: prof. dr. Peter DOVČ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Andrej LAVRENČIČ
Članica: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član: prof. dr. Simona SUŠNIK BAJEC
Član: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član: dr. Aleš SNOJ
Član: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član: prof. dr. Peter DOVČ
Član: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Anja ČIBEJ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 597.2/.5:575(043.2)=163.6
KG	ribe/salmonidi/postrvi/atlantski losos/molekularna genetika/izražanje genov/transferin
KK	AGRIS L10/8130
AV	ČIBEJ, Anja
SA	SUŠNIK BAJEC, Simona (mentor)/SNOJ, Aleš (somentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2015
IN	REGULACIJA GENSKEGA IZRAŽANJA TRANSFERINSKIH GENOV PRI POSTRVEH (<i>SALMO SP.</i>)
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XI, 58 str., 5 pregl., 28 sl., 4 pril., 107 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Družina salmonidov združuje sladkovodne in anadromne vrste rib, ki so bile podvržene tetraploidizaciji in imajo zato dvakrat večji genom kot druge rive. Eden izmed rodov te družine je rod <i>Salmo</i> , v katerega spadajo atlantski losos in naslednje postrvi: potočna, mehkoustna, ohridska belvica in soška ali marmorirana postrv. V nalogi smo preučevali gen za transferin pri atlantskem lososu, potočni in soški postrvi. Transferin je pomembna beljakovina plazme, ki služi prenosu železa. Povezan je tudi z odpornostjo proti okužbam in kontrolo razvoja bakterij. Pri rodu <i>Salmo</i> so dokazali podvojenost transferinskega gena in sicer pri atlantskem lososu, potočni in soški postrvi. V naši nalogi smo se osredotočili na promotorsko regijo obeh genov (TF1 in TF2) pri vseh treh vrstah in razliku v izražanju TF1 in TF2 pri atlantskem lososu. S qPCR smo dokazali, da se pri atlantskem lososu TF2 izraža, vendar šest krat šibkeje od TF1, pri drugi raziskavi na potočni in soški postrvi so prišli do ugotovitve, da je ta razlika še večja. Določili smo različno dolge promotorske regije in prišli do obeh različic gena pri teh treh vrstah. Našli smo mikrosatelit, ki se razlikuje v dolžini tako pri posamezni vrsti kot pri posameznem genu. V splošnem sta se TF1 in TF2, poleg dolžine mikrosatelite, razlikovala na štirih mestih. Pri atlantskem lososu smo prišli do daljšega odseka v promotorski regiji, kot nam je to uspelo pri obeh postrveh. V promotorju gena za TF1 atlantskega lososa se nahaja minisatelit, ki obsega 37 bp dolg motiv, ki se večkrat ponovi. Nam je uspelo priti do 24. ponovitve tega motiva, pri TF2 pa tega minisatelite ni. Pri analizi potencialnih vezavnih mest smo v regiji pred minisatelitem našli največ razlik med TF1 in TF2 atlantskega lososa. V tej regiji ima TF2 pet vezavnih mest več za transkripcijske faktorje, pri TF1 pa le ta najbolj verjetno ležijo pred minisatelitem, kjer zaporedja nismo uspeli določiti. Pri vseh promotorskih regijah smo našli pomembne regije za izražanje transferinskega gena, ki bi lahko vezale transkripcijska faktorja C/EBP in HNF-4.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 597.2/5:575(043.2)=163.6
CX fishes/salmonids/trout/atlantic salmon/molecular genetics/gene expression/transferrin
CC AGRIS L10/8130
AU ČIBEJ, Anja
AA SUŠNIK, BAJEC, Simona (supervisor) / SNOJ, Aleš (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2015
TI REGULATION OF TRANSFERRIN GENE EXPRESSION OF *SALMO SP.*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 58 p., 5 tab., 28 fig., 4 ann., 107 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Family of salmonids combines freshwater and anadromous fish species that have been subjected to tetraploidization and have twice as big genome than other fish species. One of the genera of this family is the genus *Salmo*, which includes atlantic salmon and the following trout species: brown, marble, ohrid and softmouth trout. In the frame of my thesis I studied the transferrin gene of atlantic salmon, brown and marbled trout. Transferrin is the major plasma protein, which is used for iron transport. It is also associated with the resistance to infection and control of bacterial growth. In the genus of *Salmo*, it has been demonstrated that the transferrin gene is duplicated in atlantic salmon, brown and marble trout. In our study we focused on the promoter region of both genes (TF1 and TF2) in all three species and on the difference in the expression of TF1 and TF2 in atlantic salmon. Applying qPCR we showed that TF2 is expressed in atlantic salmon, but approximately six times less than TF1. We determined different lengths of promoter region and came up with two versions of the gene in all three species. We found a microsatellite which differs in length in different gene variants or species analysed. In general, the TF1 and TF2, in addition to the length of the microsatellite, differed in four nucleotides. In atlantic salmon, we analysed a longer segment in the promoter region compared to both trout species and there we found significant differences between TF1 and TF2 (in the region between -350 and -550). After this point, the minisatellite comprising 37 bp long motif is present in TF1. We succeeded to sequence 24 repeats of this motif. In the analysis of potential binding sites we found significant differences between TF1 and TF2 in atlantic salmon in the region upstream from the minisatellite. Surprisingly, TF2 had five more binding sites for transcriptional factors, but unfortunately we were not able to reach the section of TF2 as long as we did for TF1. In all promoter regions we found important regulatory regions for the expression of transferrin gene, which can bind to the C/EBP and HNF-4 transcription factors.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 DRUŽINA SALMONIDOV	2
2.1.1 Vrsta <i>Salmo trutta</i> (postrvi)	3
2.1.2 Vrsta <i>Salmo marmoratus</i> (marmorirana postrv, soška postrv)	4
2.1.3 Vrsta <i>Salmo salar</i> (atlantski losos)	5
2.2 TRANSFERIN	6
2.2.1 Opis in funkcija transferina	6
2.2.2 Podvojevanje genov in evolucija transferina	7
2.2.3 Transferin	10
2.2.4 Mehanizem vezave železa na serotransferin	10
2.2.5 Izražanje transferinskega gena	11
2.3 GEN ZA TRANSFERIN PRI SALMONIDIH	12
2.3.1 Pozitivna selekcija	12
2.3.2 Podvojen transferinski lokus	13
2.4 REGULACIJA IZRAŽANJA TRANSFERINSKEGA GENA	15
2.4.1 Regulacija izražanja genov	15
2.4.2 Izražanje transferinskega gena in transferinski promotor	16
2.4.3 Transferinski promotor pri atlantskemu lososu	18
2.4.4 Razlike v izražanju TF1 in TF2	19
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 VZORCI	20
3.2 UGOTAVLJANJE POLIMORFIZMA OBEH TRANSFERINSKIH LOKUSOV NA RAVNI GENOMSKE DNK	20
3.2.1 Izolacija BAC klonov	20
3.2.2 Opis osnovnih metod	21
3.3 ANALIZA PROMOTORSKE REGIJE TRANSFERINSKEGA GENA	24
3.3.1 Kloniranje fragmentov promotorske regije	25
3.3.2 Iskanje vezavnih mest transkripcijskih faktorjev	26
3.4 ANALIZA IZRAŽANJA TRANSFERINSKEGA GENA PRI ATLANTSKEM LOSOSU	26
3.4.1 Izolacija RNK iz jetrnega tkiva in sinteza cDNAK	26
3.4.2 Sinteza cDNAK	26

3.4.3	PCR v realnem času	27
4	REZULTATI	29
4.1	ANALIZA PROMOTORSKE REGIJE TRANSFERINSKEGA GENA	29
4.1.1	Promotorska regija TF1 in TF2 pri <i>Salmo salar</i>	30
4.1.2	Promotorska regija TF1 in TF2 pri <i>Salmo trutta</i> in <i>Salmo marmoratus</i>	34
4.1.3	Vezavna mesta za transkripcijske faktorje	38
4.2	ANALIZA IZRAŽANJA TRANSFERINSKEGA GENA PRI <i>SALMO SALAR</i>	40
4.2.1	Oblikanje TaqMan sond za qPCR	40
4.2.2	Izražanje transferinskih genov	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	44
5.1	RAZPRAVA	44
5.1.1	PODVOJENOST TRANSFERINSKEGA LOKUSA PRI <i>SALMO SP.</i>	44
5.1.2	IZRAŽANJE TRANSFERINSKIH GENOV PRI <i>SALMO SP.</i>	45
5.1.3	Potencialna vezavna mesta za transkripcijske faktorje	Error! Bookmark not defined.
5.1.4	Ponavljanjoča zaporedja	Error! Bookmark not defined.
5.1.5	MikroRNK	Error! Bookmark not defined.
5.2	SKLEPI	48
6	POVZETEK	50
VIRI		
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Razlike med obema tipoma transferinov (TF1 in TF2) pri potočni in soški postrvi ter atlantskemu lososu (Rozman, 2008; Kvingedal in Rørvik, 1993)	14
Preglednica 2: Vzorci rodu <i>Salmo</i>	20
Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v reakcijah PCR	22
Preglednica 4: Primerjava dobljenih nukleotidnih zaporedij promotorske regije in skupnih razlik pri atlantskemu lososu (BAC-i, TF1 in TF2), soški postrvi (kloni 40, SS2, SS1 in 13) ter potočni postrvi (klon PS10 in vzorec DR5)	37
Preglednica 5: Rezultati PCR v realnem času: naklon krivulje, s pomočjo katerega smo izračunali učinkovitost pomnoževanja (e) ter logaritemsko število kopij produkrov TF1 in TF2	43

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Potočna postrv, <i>Salmo trutta</i> (Potočna postrv, 2015)	4
Slika 2: Soška postrv, <i>Salmo marmoratus</i> (Marble Trout, 2005)	5
Slika 3: Atlantski losos, <i>Salmo salar</i> (Salmon Atlantico, 2015).....	5
Slika 4: Shematski prikaz ene izmed domen humanega transferina (Anderson in sod., 1987). 6	
Slika 5: Dva pogosta načina podvojevanja genov: (a) Neenakomerno prekrižanje; (b) Retropozicija (Zhang, 2003)	8
Slika 6: Struktura človeškega serotransferina (Wally in sod., 2006)	10
Slika 7: Mehanizem vezave železa na humani laktoferin (Baker in sod. 2003)	11
Slika 8: Pomembnejša vezavna mesta za transkripcijske faktorje v promotorski regiji humanega transferina (Schaeffer in sod., 1993)	16
Slika 9: Poravnava humanega, mišjega in kunkčjega transferinskega promotorja (Ghareeb in sod., 1998).....	17
Slika 10: Vezavna mesta v promotorski regiji humanega transferina, ki so pomembna za njegovo aktivnost (Brunel in sod., 1988).....	18
Slika 11: Uspešno pomnoženi odseki promotorske regije pri genomski DNK potočne postrvi, atlantskega lososa, soške postrvi in BAC klona TF1 in TF2	29
Slika 12: Primer dvojnega nukleotidnega zaporedja transferinskega gena pri potočni postrvi	29
Slika 13: Nukleotidno zaporedje promotorske regije TF1 in TF2 atlantskega lososa pomnoženo s TFprom2R in TFprom2F začetniki.....	30
Slika 14: Nukleotidno zaporedje promotorske regije TF1 atlantskega lososa, dobljeno s pomočjo 'primer-walking' metode in krajskega zaporedja TF1 dobljenega z začetniki TFprom2R in F (Priloga 2)	31
Slika 15: Produkti pomnoževanja PCR pri TF1 in TF2 atlantskega lososa (BAC-i) s TFprom_repeatR in TFprom_repeatF začetniki	32
Slika 16: Produkti pomnoževanja PCR pri TF1 in TF2 atlantskega lososa (BAC-i) s TFprerepeatF in R začetniki.....	33
Slika 17: Mesta začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabljali v promotorski regiji transferinskega gena pri atlantskem lososu.....	33
Slika 18: Pomnoženi odseki promotorske regije pri potočni in soški postrvi, ki smo jih nato uporabili pri kloniranju (vzorci: potočna in dve soški postrvi).....	34
Slika 19: Določanje prisotnosti insertov klonov s pomočjo elektroforeze PCR produktov	
Slika 20: Nukleotidna zaporedja klonov promotorske regije transferinskega gena pri soški postrvi.....	35
Slika 21: Nukleotidno zaporedje dela promotorske regije transferinskega gena pri potočni postrvi.....	36

Slika 22: Primerjava nukleotidnih zaporedij dela promotorske regije (od mesta -334 do +77 soške, potočne postrvi in atlantskega lososa obeh različic transferinskega gena (TF1 in TF2).....	37
Slika 25: Krivulja pomnoževanja v PCR v realnem času	41
Slika 26: Logaritemske vrednosti absolutnih količin produktov v odvisnosti od Cq oz. standardni krivulji TF1 in TF2, pri katerih smo upoštevali povprečja treh vzorcev in štiri redčitve.....	42
Slika 27: Primerjava nukleotidnih sekvenc dela promotorske regije humanega transferinskega gena (Lucero in sod., 1986) in TF1 in TF2 rib iz rodu <i>Salmo</i> (atlantski losos, potočna in soška postrv) z označenimi regijami PRII in PRI, ki se nahajajo v regiji -118 in +2 (Kvingedal, 1994; Brunel in sod., 1988).....	46
Slika 28: Primerjava nukleotidnih sekvenc dela promotorske regije CR humanega transferinskega gena in TF1 in TF2 rib iz rodu <i>Salmo</i> (atlantski losos, potočna in soška postrv)	47

KAZALO PRILOG

Priloga A: Nukleotidna zaporedja promotorske regije pomnožena z začenima oligonukleotidoma TFprom2R in Tfprom2F

Priloga B: Nukleotidna zaporedja promotorske regije pomnožena z pomočjo 'primer-walking' metode in začenega oligonukleotida TFprom2F

Priloga C: Nukleotidna zaporedja promotorske regije pomnožena z začetnimi oligonukleotidi TFprom_prerepeatF in TFprom_prerepeatR

Priloga D: Nukleotidna zaporedja promotorske regije pridobljena s pomočjo kloniranja in pomnožena z začetnimi oligonukleotidi TFprom2R in TFprom2F pri soški in potočni postrvi

Priloga E: Nukleotidna zaporedja DNK regije med petim in sedmim eksonom transferinskega gena pri atlantskemu lososu

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A adenin

BAC bakterijski umetni kromosom (ang.: bacterial artificial chromosome)

bp bazni pari

C citozin

cDNK komplementarna DNK (ang.: complementary DNA)

CR centralna regija

Cq število ciklov (ang.: cycle threshold, Ct)

ddH₂O deionizirana voda

DNK deoksiribonukleinska kislina

DNaza deoksiribonukleaza

dNTP deoksinukleotidtrifosfat

DR *distal region*, distalna (oddaljena) regija

E.coli bakterija *Escherichia coli*

G gvanin

kb kilobazni pari

kDA kilo Dalton

LB Luria Bertani, 'Luria' gojišče

PCR verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo (ang.: polymerase chain reaction)

PRI promotorska regija I

PRII promotorska regija II

qPCR PCR v realnem času

RNK ribonukleinska kislina

mRNK'messenger RNK', prenašalna RNK

rRNK ribosomalna RNK

T timin

1 UVOD

Preučevanje podvojenih genov pri salmonidih predstavlja svojevrsten izziv, saj so bili salmonidi v preteklosti podvrženi tetraploidizaciji genoma in se zato v njihovem genomu približno polovica genov še vedno nahaja v podvojeni obliki. V literaturi sicer najdemo nekaj dokazov za podvojen transferinski lokus pri rodu *Salmo*, vendar pa je nekaj dokazov tudi proti. To lahko pripisemo tudi dejству, da se druga različica gena izraža šibkeje in zato pri prepisu prevladuje produkt osnovnega gena.

Transferin je fiziološko izredno pomembna beljakovina, ki veže železo in ga prenaša po krvi. Železo je velikokrat limitirajoče hranilo bakterij, zato je transferin povezan tudi z odpornostjo proti okužbam in kontrolo razvoja bakterij. Ima pomembno vlogo kot rastni faktor, ki je potreben za proliferacijo normalnih in malignih celic in tudi pri imunskem odzivu za pravilno delovanje limfocitov. Zaradi svoje funkcije je podvržen različnim selekcijskim pritiskom, dokazali so delovanje pozitivne selekcije, ki poteka na transferinskem lokusu pri salmonidih. Razlog za to bi lahko iskali v slabšem imunskem sistemu rib in anadromnem okolju.

Podvojen transferinski lokus so dokazali pri atlantskem lososu, potočni in soški postrvi ter pri atlantski trski. Ena izmed raziskav je ovrgla, da bi bil vzrok nastanka podvojenega gena tetraploidizacija, saj gena ležita na kromosому blizu skupaj. Vse raziskave poročajo o razlikovanju v nukleotidih in dodanem tripletu, kar vodi do sprememb dveh aminokislin in dodanega glicina pri drugem tipu transferina in sicer v regiji nekonzerviranih aminokislin. Ena izmed raziskav se je osredotočila tudi na promotorsko regijo in prav tako določila nekaj razlik med obema tipoma transferinov. Prav ta regija naj bi bila pomembna za različno izražanje, kar smo v tej nalogi žeeli bolje proučiti. Na primeru humanega transferina so namreč dokazali, da sta za uravnavanje izražanja transferina esencialni dve regiji, ki se nahajata do mesta -125 in se povežeta z dvema transkripcijskima faktorjem. V svoji nalogi sem žeela pri atlantskem lososu, potočni in soški postrvi določiti razlike v promotorski regiji ter razlike med potencialnimi vezavnimi mesti za transkripcijske faktorje med različicama transferina. Na podlagi tega bi lahko določili, zakaj se gena različno izražata, kar so dokazali pri soški in potočni postrvi v eni izmed raziskav ter atlantski trski v drugi raziskavi. V nasprotju s tem so pri atlantskem lososu dokazali enako izražanje obeh kopij transferinskega gena, zato smo žeeli s PCR v realnem času pri tej vrsti proučiti izražanje obeh genov oziroma razliko med njima.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DRUŽINA SALMONIDOV

Družina salmonidov (Salmonidae) združuje sladkovodne in anadromne vrste rib, ki živijo v vodah severne hemisfere in zajema veliko vrst, katerih predstavniki se razlikujejo po videzu in načinu življenja. Za družino je značilno, da imajo vsi njeni predstavniki tolsto plavut ali tolščenko, ki leži med hrbtno in repno plavutjo. Vse vrste te družine so plenilci in imajo velik gobec in močno razvite zobe, ki so tudi na jeziku, nebnicah in na ralniku (Povž in Sket, 1990). Družino salmonidov sestavljajo tri poddružine: *Coregoninae* (ozimnice), *Thymallinae* (lipani) in *Salmoninae* (postrvi). Ta družina je ena izmed najbolj proučevanih družin rib, kljub temu pa stopnja sorodnosti med rodovi, vrstami in podvrstami ter populacijami še ni dokončno pojasnjena. To je težavno zaradi več razlogov, eden od njih je tetraploidizacija, ki so ji bile te ribe podvržene pred 50-100 milijoni let (Phillips in Oakley, 1997).

Salmonidi imajo zaradi dvakrat večjega genoma dvakrat več kromosomskih ročic kot druge ribe, iz česar lahko sklepamo na njihov autotetraploiden izvor (Allendorf in Thorgaard, 1984). Do tetraploidne zigote pride z združitvijo dveh diploidnih gamet, ki imata zaradi napake v mitozi ali mejozi več kot en set kromosomov. Avtopoliploidi imajo pomnožen lastni osnovni set kromosomov v primerjavi z alopoliploidi, ki imajo povečan set kromosomov različnih vrst (Wolfe, 2001). Genom salmonidov je nastal z združitvijo dveh diploidnih gamet, katerih kromosomi so bili homologni. Poliploidni organizmi imajo zaradi učinka heterozis večje možnosti izrabe heterozigotnosti, kar lahko privede do boljših preživitvenih možnosti. Imajo tudi veliko manjšo možnost pojave letalnih, recessivnih homozigotov. Ob tetraploidizaciji salmonidov je prišlo do pomnoževanja lastnega seta kromosomov in tako naj bi imeli salmonidi po podvojitvi okoli 96 kromosomov s prav toliko kromosomskimi ročicami (Ohno, 1970). Po tetraploidizaciji pa je prišlo do različnih preureditev kromosomov, Robertsonovih translokacij, zaradi česar so se predstavniki poddružin družine Salmonidae tudi različno razvijali. Pri predstavnikih poddružine Salmoninae se je število kromosomov zmanjšalo, število ročic pa povečalo. Edinstven kariotip med vsemi salmonidi ima atlantski losos (*Salmo salar*), ki ima med 54 in 58 kromosomi z 72 do 74 kromosomskimi ročicami, večina drugih vrst ima namreč med 78 in 84 kromosomi ter 94 do 102 kromosomski ročic. Kompleksnost kariotipa ni povezana s taksonomsko razvrstitevjo organizmov, temveč je prej povezana z njihovim načinom življenja. Manj kromosomov imajo vrste, ki so prilagojene na točno določeno življenjsko okolje, kot je v primeru salmonidov morsko okolje in anadromen način življenja, medtem ko imajo več kromosomov vrste, ki živijo v spremenljivem okolju sladkovodnega habitata (Qumsiyeh, 1994). Ta pojav Phillips in Rab (2001) povezujeta z dejstvom, da obstaja pri manjšem številu kromosomov manjša verjetnost pojavljanja rekombinacij med določenimi aleli in zato manjša zmožnost prilagajanja spremembam v okolju. Večje prilagajanje pa ni potrebno osebkom, ki živijo v konstantnih življenjskih razmerah, kjer zato število kromosomov ni seleksijska prednost. Salmonidi so zaradi številčnosti vrst in relativno poznega podvojevanja genoma zelo primerni za analizo nedavnih sprememb v njihovem genomu, kar bi lahko imelo zelo pomembno vlogo pri odkrivanju osnov genske raznolikosti in raznolikosti vrst, ki jih najdemo med sodobnimi vretenčarji (Koop in Davidson, 2008).

Splošno priznana taksonomska razvrstitev poddružine *Salmoninae* temelji na morfoloških in molekularnih študijah in poddružino deli na sedem rodov (Crête-Lafrenière in sod., 2012; Shedko in sod., 2013): *Onchorhynchus* (pacifiški lososi in postrvi), *Salmo* (atlantski losos in postrvi), *Salvelinus* (zlatovčice), *Hucho* (sulci), *Parahucho*, *Salvethymus* in *Brachymystax* (lenoki).

V slovenskih vodah najdemo naslednje rodove: *Salmo*, *Hucho*, *Onchorhynchus* in *Salvelinus*. Prva dva sta avtohtonata, druga dva pa sta zanesena v naše kraje ob koncu devetnajstega stoletja (Povž in Sket, 1990).

Na osnovi molekularnih analiz so v rod *Salmo* zaradi podobnosti z vrstama *Salmo salar* in *S. trutta* uvrstili tudi mehkoustno postrv, *S. obtusirostris* (Snoj in sod., 2002; Sušnik in sod., 2007) in ohridsko belvico, *S. ohridanus* (Phillips in sod., 2000; Sušnik in sod., 2006). V ta rod uvrščamo tudi marmorirano ali soško postrv (*S. marmoratus*), pri kateri so nedavno z filogenetskimi analizami dokazali, da je samostojna vrsta (Pustovrh in sod., 2011; Pustovrh in sod., 2014; Pustovrh, 2013).

2.1.1 Vrsta *Salmo trutta* (postrvi)

Salmo trutta je izjemno zanimiva vrsta rib; lahko se prilagodi življenju v sladki in prav tako v slani vodi. Poleg tega med osebki določenega geografsko ločenega območja prihaja do izrazitih fenotipskih razlik.

Bernatchez (1992) na osnovi raznolikosti mitohondrijske DNK in analize alocimov navaja štiri razvojno enotne linije postrvi (*Salmo trutta*), ki so jih v grobem razdelili glede na porečja, od koder izhajajo: atlantsko, donavsko ali črnomorsko, sredozemsko-jadransko in marmorirane postrvi. Linije in forme potočne postrvi (potočna postrv *S. trutta f. fario*, jezerska postrv *S. trutta f. lacustris* in morska postrv *S. trutta f. trutta*) se med seboj uspešno križajo, prav tako se vsi tipi potočnih postrvi uspešno križajo s soško postrvjo (*S. marmoratus*). Razlike med vrstami se še dodatno povečujejo zaradi okolja, v katerem ribe živijo, saj le-to pomembno vpliva na barvni vzorec telesa (Povž in Sket, 1990).

Potočna postrv (*S. trutta f. fario*) je najštevilčnejša in najbolj razširjena avtohtona vrsta postrvi v Evropi. Živi v rekah do nadmorske višine 2500 m, izjemoma tudi više. Naseljuje vodotoke od hitro tekočih gorskih potokov do širokih nižinskih rečnih tokov. Odrasle ribe se hranijo pretežno z nevretenčarji in žuželkami, ki letajo nad vodo ter delno z ribami. Spolno dozori v drugem, običajno pa v tretjem letu starosti, drsti pa se od oktobra do februarja na prodnatih predelih potokov (Povž in Sket, 1990). Na sliki 1 je predstavnik potočne postrvi.



Slika 1: Potočna postrv, *Salmo trutta*. (Potočna postrv, 2015)

2.1.2 Vrsta *Salmo marmoratus* (marmorirana postrv, soška postrv)

Soška postrv je endemit jadranskega povodja, v Bosni in Hercegovini ter Črni gori jo imenujejo glavatica (zaradi njene velike glave) in ima značilen marmoriran vzorec. V Sloveniji jo imenujemo soška postrv in naseljuje reko Sočo, Idrijco, Vipavo, Rižano in njihove pritoke (Ocvirk, 1992). Soška postrv je zaradi vedno intenzivnejša športnega ribolova in turizma ter posledično vnosa in križanja s potočno postrvjo skoraj izumrla. Genetsko čiste populacije v Sloveniji obstajajo le v nekaterih izoliranih pritokih reke Soče (Povž in Sket, 1990).

Soška postrv dozori v 4. letu starosti, njen drstni čas je relativno kratek, najpogosteje od začetka decembra do začetka januarja. Odrasle živali so ribojede, medtem ko se mlade soške postrvi hranijo s talno favno. Za soško postrv je značilno, da se ne zadržuje v manjših potokih, ampak naseljuje srednje in spodnje dele rečnih strug, ponekod pa celo jezera (Povž in Sket, 1990). Na sliki 2 je soška postrv.



Slika 2: Soška postrv, *Salmo marmoratus* (Marble Trout, 2005)

2.1.3 Vrsta *Salmo salar* (atlantski losos)

Atlantski losos živi ob evropskih in ameriških obalah severnega Atlantika in v rekah, ki se izlivajo vanj. Je anadromna riba in preko svojega življenskega cikla potuje skozi več različnih faz, ki vplivajo na njegovo obnašanje, fiziologijo in potrebe. Drsti se v rekah Evrope in Severne Amerike pozimi ali zgodaj spomladi (pomladanske drstnice), oziroma od poletja do jeseni (poletne drstnice). Življenski ciklus lososov se začne v majhnih, plitkih, hitro tekočih potokih s čisto vodo in prodnatim dnom. Mladice se hranijo in odrščajo v rekah eno do treh let, nato pa migrirajo v morje, kjer preživijo večino življenja. V reko oziroma potok se nazaj odpravijo le drstit, po drsti pa mnoge ribe poginejo zaradi oslabljenosti (Tryckare in Cagner, 1994). Prestavnika atlantskega lososa sta na sliki 3.

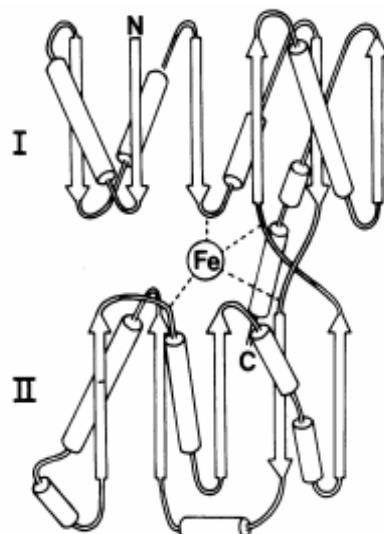


Slika 3: Atlantski losos, *Salmo salar* (Salmon Atlantico, 2015)

2.2 TRANSFERIN

2.2.1 Opis in funkcija transferina

Transferinska družina beljakovin vključuje serumski transferin (serotransferin ali krajše transferin), ovotransferin, lakoferin, melanotransferin, inhibitor dušikove anhidraze (ICA), saksifilin, MYP ('major yolk protein'), pacifastin (beljakovina rakov) in TTF-1 (beljakovina iz zelenih alg). Za večino teh beljakovin je značilna velika podobnost v nukleotidnem zaporedju (okoli 40 %, Macedo in De Sousa, 2008), dve zelo podobni domeni dolgi približno 340 aminokislinskih ostankov, ki sta se v preteklosti združili, ter podobna velikost beljakovine med 70 in 80 kDa. Serotransferin (transferin), ovotransferin in lakoferin vežejo po en atom železa na domeno in en karbonatni anion (Lambert in sod., 2005a). Vezava železa in obe domeni transferina sta predstavljeni na sliki 4.



Slika 4: Shematski prikaz ene izmed domen humanega transferina (Anderson in sod., 1987)

Vsaka domena je sestavljena iz dveh pod-domen med kateri se veže železov ion.

Transferin je član evolucijsko ohranjene družine genov, ki ležijo na istem kromosomu že več sto milijonov let (Bowman in sod., 1988). V človeškem genomu se člani te družine beljakovin nahajajo na tretjem kromosому: transferin in njegov receptor (Yang in sod., 1984; Miller in sod., 1983), lakoferin (Teng in sod., 1987) in melanotransferin (Bowman in sod., 1988).

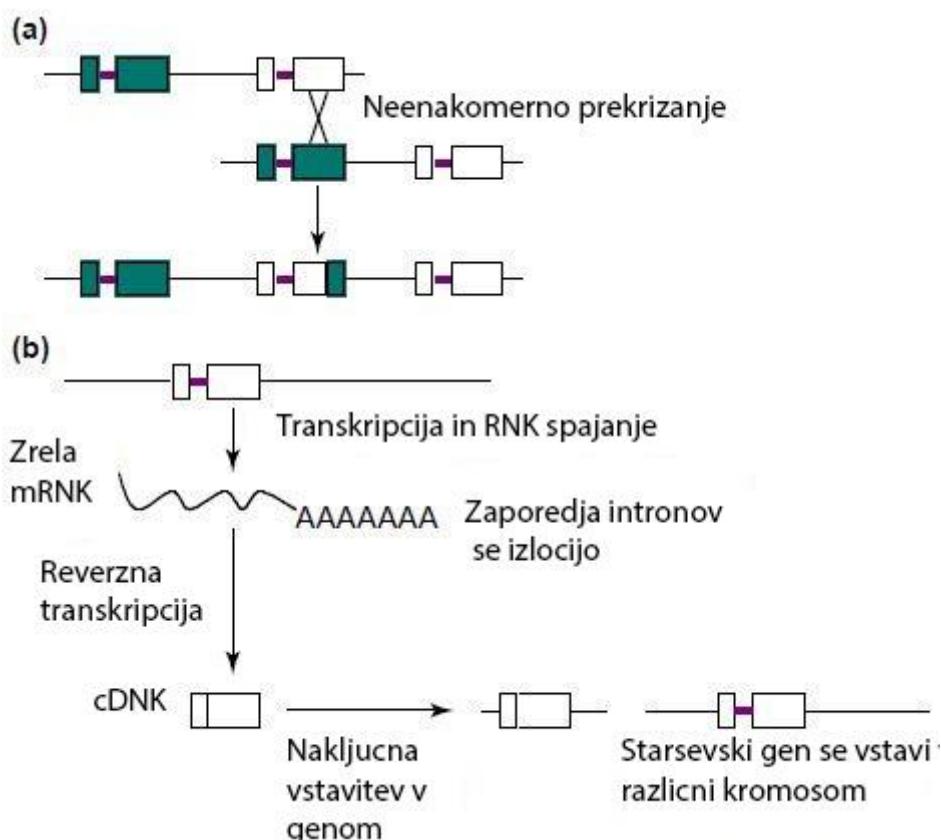
Transferin kot glikoprotein je dobil ime po svoji funkciji, ker prenaša železove ione, vendar pa v družini transferinov le serotransferin služi samemu prenosu, ostali člani družine namreč tudi kontrolirajo količino železovih ionov (Baker in sod. 2003). Beljakovina serotransferin je zadolžena za prenos železa, shranjevanje in uporabo v presnovnih procesih kot so: sinteza DNK, prenos kisika in elektronov, rast celic in regulacija imunskega sistema. Železo je velikokrat limitirajoč element presnove bakterij, zato je transferin najverjetneje povezan tudi z odpornostjo proti okužbam in kontrolo razvoja bakterij (Sun in sod., 2012; Bullen in sod., 2006). Transferin je biološko pomembna beljakovina plazme, ne le zaradi svoje evolucije, temveč tudi zaradi pomembne vloge kot rastni faktor, ki je potreben za proliferacijo

normalnih in malignih celic (Barnes in Sato, 1980), saj dovaja železo za celično rast in delitev (Brock in sod., 1986). Pomemben je tudi pri imunskem odzivu za pravilno delovanje limfocitov (Mainou-Fower in Brock, 1985) in diferenciacijo različnih tkiv med razvojem zarodka (Ekblom in sod., 1983; Ii in sod., 1982; Brock, 1981). Serotransferin povečini sintetizirajo celice v jetrih in s pomočjo endocitoze prehaja v kri in v celice prinaša železo. Izraža se tudi v drugih tkivih, kot so centralni živčni sistem, testisi, ovariji, hrbtenjača, mlečna žleza in ledvice (Bowman in sod. 1988).

2.2.2 Podvojevanje genov in evolucija transferina

Transferin, ki vsebuje dve vezavni mesti za železo, je nastal s podvojitvijo starodavnega gena, ki je imel le eno vezavno mesto ter približno 340 aminokislinskih ostankov (MacGillivray in sod., 1982). Glede časa podvojitenega dogodka raziskovalci niso enotni. Bowman in sod. (1988) so predvidevali, da je do podvojitev najverjetneje prišlo pred 200 do 500 milijoni let, sočasno s podvojitvijo drugih plazemskih beljakovin. Lambert in sod. (2005b) trdijo, da se je to zgodilo verjetneje pred okoli 850 milijoni let.

Podvojitev gena je lahko rezultat neenakomernega prekrižanja, retropozicije ali kromosomske (ali genomske) podvojitve (slika 5, Zhang, 2003), pri vsakem načinu pride do različno podvojenih genov. Neenakomerno prekrižanje običajno privede do genov, ki se nato nahajajo na istem kromosomu oziroma so tandemno razporejeni (slika 5). Lahko vsebujejo del gena, cel gen ali več genov in lokus podvojenega gena vsebuje tudi introne in regulatorna zaporedja. Pri retropoziciji se mRNA prepiše nazaj v cDNA in nato naključno vstavi nazaj v genom, zato pride pri takem načinu podvojevanja do lokusa brez intronov in običajno do psevdogenov. Kromosomska ali genomska podvojitev najverjetneje nastane zaradi premajhne razdalje med hčerinskimi kromosomi po podvojevanju DNK, ko bi se morali kromosomi oddaljiti eden od drugega. Mehanizem tega podvojevanja še ni jasen, ker pa ne vodi do tandemskih pomnožkov, je jasno, da ni posledica neenakomernega prekrižanja (Zhang, 2003).



Slika 5: Dva pogosta načina podvojevanja genov: (a) Neenakomerno prekrižanje; (b) Retropozicija (Zhang, 2003)

Kvadrati predstavljajo eksone, odebujene črte introne.

Podobno kot točkovna mutacija, se podvojitev gena pri posameznem organizmu lahko obdrži (fiksira) ali pa izgubi v populaciji (Kimura, 1983). Tudi po fiksaciji je evolucijska usoda gena na dolgi rok določena na podlagi njegove funkcije (Nei in sod., 2000). Mutacije, ki se v podvojenem genu akumulirajo, motijo strukturo in funkcionalnost enega od genov in se s selekcijo ne izločijo. Postopoma se gen, ki vsebuje mutacije, spremeni v psevdogen, ki se ne izraža ali pa nima funkcije, kar so dokazali z raznimi genetskimi študijami (Walsh, 1995; Lynch in sod., 2001; Lynch in Conery, 2000). Po dolgi evolucijski poti se ta psevdogen bodisi izloči iz populacije ali pa tako spremeni, da ga ne moremo več povezati z originalnim genom. Relativno 'mlade' (nedavno nastale) psevdogene lahko prepoznamo po njihovih nukleotidnih zaporedjih, ki se ne razlikujejo veliko od gena, iz katerega izvirajo (Zhang, 2003). Proses, pri katerem iz funkcionalnega gena nastane psevdogen, se običajno zgodi prvič nekaj milijonov let po podvojevanju, če podvojeni gen ni podvržen selekciji (Lynch in Conery, 2000). Nekaj podvojenih genov se obdrži v genomu tudi dlje časa, običajno imajo posebno funkcijo, ko pa te funkcije niso več potrebne, postanejo psevdogeni (npr. olfaktorična družina genov, Rouquier in sod., 2000). Prisotnost podvojenih genov je koristna zaradi dodatnih količin beljakovin ali RNK produktov. To velja še posebej za gene, ki se močno izražajo in katerih produkti so potrebni v večjih količinah (npr. rRNK in histoni, Zhang, 2003). Po podvojitvi se lahko funkcija genov ohrani s konverzijo genov ('gene conversion'), kar se pogosto nanaša na 'usklavljeno evolucijo', lahko pa tudi s pomočjo negativne selekcije proti mutacijam, ki spreminjajo funkcijo gena. Pri konverziji genov je nukleotidno zaporedje obeh genov zelo

podobno, prav tako njuna funkcija (Li, 1997). Negativno selekcijo proti mutacijam oz. t.i. 'očiščevalno selekcijo' lahko ločimo od konverzije genov z analizo sinonimnih (tihih) nukleotidnih razlik med podvojenimi geni. Na sinonimne razlike selekcija ne vpliva in se ne zmanjšajo z negativno selekcijo, lahko pa jih odstrani konverzija genov, ki vpliva na sinonimne in nesinonimne spremembe (Zhang, 2003). Dokazali so, da je pri ohranjanju funkcije podvojenih genov veliko pomembnejša negativna selekcija kot konverzija genov (Nei in sod., 2000).

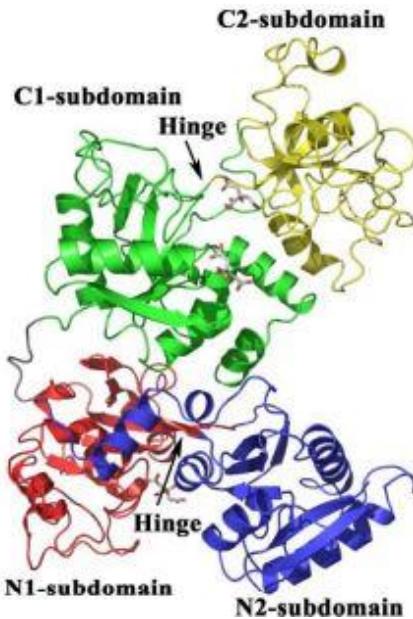
Podvojitev genov je pri evoluciji primitivnih organizmov prispevala k novim biokemijskim mehanizmom, ki so omogočili razvoj kompleksnejših organizmov. Podvojitev genetskega materiala, poleg nastanka več genov z isto funkcijo, lahko vodi tudi do ojačitve znotraj genske regije, ki poveča izražanje beljakovinskega produkta s povečanjem števila aktivnih mest. Z določitvijo in analizo nukleotidnega zaporedja, ki kodira obe domeni človeškega transferina, so lahko določili, da je med evolucijo selekcija delovala močneje na nekatere regije eksonov transferinskega gena kot na druge (Bowman in sod., 1988). Pridobivanje novih funkcij organizmov se najpogosteje opisuje s t.i. 'Ohnovim klasičnim modelom', ki temelji na načelu, da podvojitve genov omogočajo večji okvir, na katerega lahko deluje selekcija in tako nastanek novih funkcij (Koop in Davidson, 2008). Ta model predpostavlja, da en gen ostane podvržen konzervativni selekciji, medtem ko je drugi podvržen mutacijam in s časoma ni več funkcionalen. Na dotednih lokusih pa lahko pride tudi do redkih koristnih mutacij in s pozitivno naravno selekcijo pride do gena z novo funkcijo ('neo-functionalization') in tako se ohranita oba gena. Ta model predpostavlja ohranitev obeh genov kot redek dogodek, kar se je konec prejšnjega stoletja z določitvijo številnih nukleotidnih zaporedij genomov in njihovo analizo izkazalo kot napačna predpostavka. Dokazali so, da je večina genov nastala s podvojitvijo. Tako naj bi nastali tudi geni, ki sedaj z izhodiščnim genom nimajo skoraj nobene podobnosti v nukleotidnem zaporedju, saj so se močno oddaljili in spremenili (Zhang, 2003). Kakorkoli, če eden od podvojenih genov ni spremenil svoje funkcije, sledi, da se bo gen ali utišal zaradi mutacije, ki prepreči njegovo izražanje ali pa bosta obe kopiji še naprej izraženi in podvrženi selekciji (Hughes, 1994).

Transferinski prednik z desetimi eksoni se je pri človeku podvojil s prekrižanjem znotraj genov ('intragenic crossing-over', Park in sod., 1985), pri tem se je ob 'zlepljanju' izgubil deseti ekson osnovnega gena in prvi ekson podvojenega gena, kasneje pa še četrti ekson na koncu gena (Park in sod., 1985).

Podvojen gen za transferin se je različno razvijal, kar je privelo do velikih razlik v dolžini intronov pri različnih oblikah transferina. Tako je kodirajoča regija transferinskega gena pri ptičih in serotransferina pri sesalcih približno enake velikosti (2,3 kb), vendar pa je gen za transferin sesalcev dolg 33,5 kb medtem ko je kokošji transferin le 10,5 kb (Bowman in sod., 1988; Schaeffer in sod., 1985). Med evolucijo so se določeni deli transferinskega gena ohranili (so konzervirani) in sicer pomembna mesta za funkcijo vezave železa naj bi bile tri regije, ki vsebujejo kodone za tirozinske in histidinske ostanke (MacGillivray in sod. 1983, Bowman in sod. 1988).

2.2.3 Transferin

Polipeptidna veriga transferina je sestavljena iz dveh delov, ki vsebujejo 336 oziroma 341 aminokislinskih ostankov s 40 % homologijo. Glede na njuna konca so ju poimenovali amino terminalni (N-del) in karboksi terminalni del (C-del) in sta prikazana na sliki 6. Vsak del je sestavljen iz dveh različnih domen (pod-domen), med kateri se veže železo (Macedo in De Sousa, 2008).



Slika 6: Struktura človeškega serotransferina (Wally in sod., 2006)

Na spodnji strani je N domena, na zgornji pa C domena, vezava in sproščanje železa poteka ob spremembah oblike/strukture vsake domene na mestu, kjer se molekula odpre ali zapre ('hinge', Wally in sod., 2006).

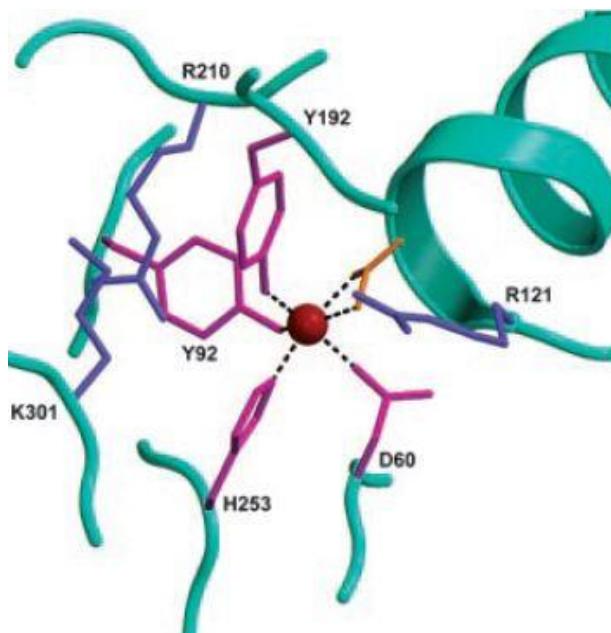
Del transferina, ki ga označujemo kot N-terminalni del, je po navedbah nekaterih avtorjev bolj pomemben pri vezavi železa, medtem ko C-terminalni del predstavlja primarno vezavno mesto v transferinskem receptorju (Sun in sod., 2012).

2.2.4 Mehanizem vezave železa na serotransferin

Vsek atom železa se veže na štiri konzervirane aminokislinske ostanke: aspartansko kislino, dva tirozina in histidin, medtem, ko se anion (običajno karbonatni) veže v bližini na arginin in treonin (Lambert in sod., 2005b). Na N-terminalni domeni največjo raznolikost v nukleotidnem zaporedju kaže histidinski ligand. Pri številnih organizmih, vključno z vsemi ribami, se anion ne veže na arginin temveč na lizin na N-terminalni domeni, kar kaže na selektivno prednost, ki bi se lahko odražala v boljši funkcionalnosti. Lambert in sod. (2005b) predpostavljajo, da je to prednost hladnokrvnih vrst, saj je na tem mestu nato šibkejša povezava med anionom in lizinom. Pri analiziranih nukleotidnih zaporedjih in aminokislinski sestavi transferina vretenčarjev se vezava vrši na mestih (glede na človeški gen): 63 (Asp), 95 in 188 (Tyr), 249 (His) pri N-terminalni domeni ter 392 (Asp), 426 in 517 (Tyr), 585 (His) na C-terminalni domeni. Anion se na N-terminalni domeni veže na mestu 120 (Thr) ter 124

(Arg) in na C-terminalni domeni na mestih 452 (Thr) ter 456 (Arg) (Lambert in sod. 2005b in Lambert in sod., 2005a, slika 7).

Ti aminokislinski ligandi so popolni za vezavo železa (Fe^{3+}), vsebujejo namreč tri anionske atome kisika in en nevtralen atom dušika. Prav tako se ujema naboj ligandov (${}^3-$) z železovim ionom (${}^3+$). Povezave med ligandi ter ionom so močne, medtem ko se domeni med seboj povezujeta s šibkimi vezmi, ki omogočajo lažjo odcepitev železovega iona iz molekule. Dražljaj, ki povzroči odcepitev železa, je vezava receptorja in protonacija karbonatnega iona in drugih ostankov na in okoli mesta vezave železa. Proses odcepiljanja se zaključi, ko postanejo vezi med domenama šibkejše in se domeni odmakneta ena od druge (Baker in sod., 2003).



Slika 7: Mehanizem vezave železa na humani lakoferin (Baker in sod. 2003).

Aminokisline, ki vežejo železov ion so pri človeškem lakoferinu enake za oba režnja: dva tirozinska ostanka, ena aspartamska kislina in en histidin, prav te aminokisline so značilne tudi za vezavo železovega iona pri transferinu. Vezava železa zahteva še anion, ki je običajno karbonat, CO_3^{2-} .

2.2.5 Izražanje transferinskega gena

S poskusi na miših so dokazali, da se izražanje transferina v jetrih s starostjo zmanjšuje. Prav tako je njegovo izražanje povečano pri ljudeh v otroštvu, nosečnosti in pri anemiji ter po prejemanju estrogena. Pri miših in podganah se izražanje poveča tudi ob pomanjkanju železa v prehrani (Bowman in sod. 1988).

Transferin ob vezavi železa le tega ščiti pred hidrolizo pri fiziološkem pH in tako onemogoča katalizo radikala superoksida in tudi rast mnogih patogenov (Lambert in sod., 2005a). Raziskave so pokazale, da se njegovo izražanje poveča tudi kot odgovor na bakterijsko ali glivično okužbo (Valles, 2005) ter pri raznih vnetjih (Macedo in deSousa 2008).

2.3 GEN ZA TRANSFERIN PRI SALMONIDIH

Lee in sod.(1998) so določili nukleotidna zaporedja transferinskega gena pri sedmih vrstah salmonidov, med njimi tudi potočne postrvi, in ugotovili, da je podobnost v nukleotidnem zaporedju cDNK med 85 in 99 %. Bralni okvir, ki kodira transferin pri salmonidih, naj bi vseboval zapis za 691 aminokislin in poly-A signal. cDNK vsebuje tudi signalno zaporedje osemnajstih aminokislinskih enot do tri glikozilacijska mesta in 32 cisteinskih ostankov. Izračunana molekulska masa zrele beljakovine naj bi bila približno 73,300 Da. Podobnost med potočno postrvjo in atlantskim lososom v aminokislinski sestavi je bila 94,8 % (Lee in sod., 1998).

2.3.1 Pozitivna selekcija

Pri nekaterih populacijah lososov so gen za transferin neposredno povezali z odpornostjo na bakterijske infekcije (Winter in sod. 1980). Bakterijske vrste se poslužujejo številnih mehanizmov za pridobivanje železa. To naredijo s pomočjo vezavne beljakovine transferina, metaloproteinaz, siderofornih sistemov in drugih mehanizmov. Med njimi so mehanizmi, pri katerih so bakterijske beljakovine v neposrednem stiku z gostiteljevim transferinom (Guerinot 1994 cit. po Ford, 2001), zato se zdi precej verjetno, da so predeli na površini transferinske molekule najbolj podvrženi selekciji zaradi bakterijskih patogenov. Tekmovanje za železo z bakterijskimi patogeni bi lahko bilo gibalo naravne selekcije transferina pri vretenčarjih (Ford, 2001), ki so jo dokazali s primerjavo števila nesinonimnih mest s številom sinonimnih mest. Nesinonimne mutacije povzročijo spremembe aminokislinskega zaporedja v beljakovini, sinonimne mutacije pa ne vplivajo na aminokislinsko zaporedje. Pri primerjavi nukleotidnih zaporedij različnih vrst so pri salmonidih odkrili več nesinonimnih zamenjav kot sinonimnih (razmerje je bilo ponekod večje od 7, Ford, 2001; Rozman in sod., 2008). Na podlagi velike verjetnosti, da se molekule transferina ter drugih beljakovin transferinske družine med vrstami ne razlikujejo v terciarni strukturi, je Ford (2001) določil mesta, ki so bila podvržena pozitivni selekciji. Določil je, da je 26 takih mest, ki se nahajajo na površini molekule transferina in v številnih primerih so to mesta, ki si v nukleotidnem zaporedju niso bila blizu ali fizično blizu v zgubani beljakovini. Približno polovica teh mest predstavlja predele, na katere se vežejo bakterijske transferinske-vezavne beljakovine. V nasprotju s salmonidi pa pri drugih vrstah niso našli dokazov za pozitivno selekcijo na sekvencah transferinskih genov (Ford, 2001).

Vzroke za pozitivno selekcijo, ki poteka na transferinskem lokusu pri salmonidih, bi lahko iskali v slabšem imunskejem sistemu rib in anadromnem okolju (Rozman, 2008). Vzrok bi lahko bila tudi tetraploidizacija, ki je povzročila podvojitev transferinskega gena, ki so ga dokazali pri atlantskem lososu (Kvingedal, 1994), potočni in soški postrvi (Rozman in sod., 2008). Podvojen transferinski lokus bi lahko bil rezultat tetraploidizacijskega dogodka prednikov ali pa podvojevanja samega gena oz. manjšega odseka okoli njega. Ker je Rozman (2008) s fluorescentno hibridizacijo in situ (FISH) dokazala, da ležita oba transferinska gena blizu skupaj na kromosому, lahko sklepamo, da je prišlo do podvojitve tega gena neodvisno od podvojitve celotnega genoma (Ford, 2001).

2.3.2 Podvojen transferinski lokus

Kvingedal in Rørvik (1993) sta določila nukleotidno zaporedje cDNK transferinskega gena pri atlantskem lososu, ki je obsegalo 690 aminokislin ter bralni okvir dolg 2070 bp. Signalna sekvenca je dolga 18 aminokislin in ima 49 % podobnost s humanim transferinom. Z določanjem nukleotidnega zaporedja so v tej raziskavi odkrili dva tipa zaporedij, ki sta se razlikovala v treh nukleotidih in dodanem tripletu, kar je vodilo do sprememb dveh aminokislin in dodanega glicina (preglednica 3). Razlike so odkrili okoli mesta 1500 bp in poimenovali prvi tip transferina tip I (TF1), tip z dodanim glicinom pa tip II (TF2). Mesto teh sprememb se je, ob primerjavi s transferinskimi geni drugih vretenčarjev ujemalo z regijo nekonzerviranih aminokislin. Da sta bila to različna gena, ne alelni različici, so dokazali z določanjem nukleotidnih zaporedij haploidnih embrijev, kjer sta bila v genomske DNK prisotna oba tipa transferina.

Dva transferinska lokusa so prav tako našli Antunes in sod. (2006) pri potočni postrvi in atlantskemu lososu, medtem, ko so iskali mikrosatelitne lokuse, ki bi lahko bili uporabni kot označevalci pri filogenetskih študijah. V transferinskem genu so prisotni širje mikrosatelitni lokusi in sicer v osmem, desetem, dvanajstem in šestnajstem intronu ter ponovitev (CA)_x v 5' regiji.

Do enakih zaključkov kot Kvingedal in Rørvik (1993) so prišli tudi Rozman in sod. (2008), ki so na osnovi nukleotidnega zaporedja od sredine prvega eksona do sredine 17. eksona določili dva tipa transferina pri potočni in soški postrvi. Prisotnost dveh genov za sintezo transferina so Rozman in sod. (2008) dokazovali tudi s pomočjo hibridizacije po Southernu. Ugotovili so štiri različna nukleotidna zaporedja, s čimer so dokazali, da nukleotidna zaporedja izvirajo iz dveh različnih lokusov. Določili so devetnajst skupnih aminokislinskih zamenjav med TF1 in TF2 pri obeh vrstah. Pri TF1 soške in potočne postrvi so vsa vezavna mesta za železo konzervirana in enaka v obeh delih beljakovine. Pri TF2 so mesta za vezavo železa enaka pri soški in potočni postrvi, se pa razlikujejo od vezavnih mest pri TF1 (Rozman, 2008). Na tretjem vezavnem mestu se nahaja histidin namesto tirozina, na osmem pa asparagin namesto histidina. Rozman (2008) je s pomočjo hibridizacije in situ dokazala tudi, da ležita v genomu postrvi oba transferinska gena blizu skupaj.

Preglednica 1: Razlike med obema tipoma transferinov (TF1 in TF2) pri potočni in soški postrvi (Rozman, 2008).

	Dolžina TF1 cDNK (bp)	Dolžina TF2 cDNK (bp)	Število amino- kislin TF1	Število amino- kislin TF2	Število razlik v nukleotidnem zaporedju cDNK	Število razlik v ak. zaporedju med TF1 in TF2
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	2354	2272	697	652	35 +insert GAG (glicin)	22
Soška postrv (<i>Salmo marmoratus</i>)	2317	2241	673	647	46 +insert GAG (glicin)	27

Rozman in sod. (2008) so določili pri soški postrvi nukleotidno zaporedje TF1 dolgo 2317 bp, pri potočni pa nukleotidno zaporedje dolgo 2354 bp; pri TF2 so določili pri potočni postrvi 2272 bp in pri soški postrvi 2241 bp dolgo nukleotidno zaporedje. Določena zaporedja so zajemala nukleotidno zaporedje cDNK od sredine prvega eksona do sredine 17. eksona, so se pa nekoliko razlikovala v dolžini. V tabeli so opisane razlike v nukleotidnem zaporedju cDNK, kjer so se nukleotidna zaporedja prilegala med TF1 in TF2 obeh vrst postrvi.

Obstoj dveh transferinskih genov so potrdili tudi Andersen in sod. (2011) pri atlantski trski (*Gadus morhua*) in sicer naj bi TF2 v genomu ležal 16,5 kb pred TF1. Gena s 17 eksoni sta se v 683 aminokislinskih kodonih razlikovala v 16 % nukleotidov. Pri obeh različicah gena so ohranjena vsa štiri vezavna mesta za železo. Domeni sta vsebovali po 12 in 14 konzerviranih Cys ostankov, ki so vpleteni pri oblikovanju disulfidnih mostičkov (Andersen in sod., 2011).

Študija nukleotidne sekvene transferina azijskega brancina (*Lates calcarifer*) je pokazala obstoj razreda 'novo odkritih transferinov', ki so nastali s podvojitvijo, ki ji je sledila spremembu funkcije in nenazadnje izguba funkcije podvojenega gena pri sesalcih (Mohd-Padil in sod., 2012). Najverjetnejše je takrat pri sesalcih prišlo do dvojne podvojitve serotransferina, kjer je poleg laktoferina nastal inhibitor karbonske anhidraze. Njihovi rezultati kažejo na visoko stopnjo sprememb v nukleotidnih sekvenah novo odkritih transferinov, ki se največkrat pojavijo neposredno po podvojitvi gena. Prav tako so našli spremembe na ključnih vezavnih mestih za železo in sicer zamenjavo drugega tirozina v fenilalanin v N režnju beljakovine; kar zelo verjetno vodi v nezmožnost vezanja železa (He in sod., 1997). Podobno trditev so Lambert in sod. (2005b) podprli z zamenjavo histidina v argnin v N-terminalnem režnju. Spremembo pomembnih aminokislin so pri postrvih pri TF2 našli Rozman in sod. (2008) in sicer namesto tirozina histidin na tretjem vezavnem mestu in namesto histidina asparagin na osmem vezavnem mestu.

Zaradi pomembne funkcije transferina bi pričakovali, da je gen evolucijsko zelo ohranjen, kar pa je že nekaj raziskovalcev ovrglo. Ford in sod. (1999) ter Rozman in sod. (2008) so pri transferinu dokazali delovanje pozitivne selekcije, ki bi lahko omogočalo lažje prilagajanje na okolje in na infekcije patogenov (Ellis, 2001; Lambert in sod., 2005b; Andersen in sod., 2011). Do pozitivne selekcije bi lahko prišlo zaradi selektivnega pritiska patogenih bakterij na transferin, ki imajo težnjo po vezavi železa, ki je že vezan na transferin. To je v skladu z dejstvom, da so beljakovine, ki so vpletene v obrambne mehanizme, velikokrat podvržene pozitivni selekciji, kot je na primer laktoferin pri sesalcih in transferin pri ribah (Liang in

Jiang, 2010). Višjo stopnjo evolucije nesinonimnih mest v primerjavi s sinonimnimi so odkrili tudi pri podvojenem genu TF2 (Rozman in sod., 2008), kar kaže na podoben vzorec selekcije kot pri TF1. Kljub izredno visoki polimorfnosti transferinskih genov je nekaj avtorjev odkrilo, da so pri transferinu (TF1) pri postrvih ohranjene vse aminokisline, ki sodelujejo pri vezavi železa (Rozman in sod., 2008; Kvingedal in Rørvik, 1993). Rozman in sod. (2008) so tudi ugotovili, da sta pri TF2 spremenjeni dve aminokislini, ki sodelujeta pri vezavi železa, kar bi po njihovem mnenju morda kazalo na njegovo spremenjeno ali zmanjšano funkcijo pri vezavi železa.

2.4 REGULACIJA IZRAŽANJA TRANSFERINSKEGA GENA

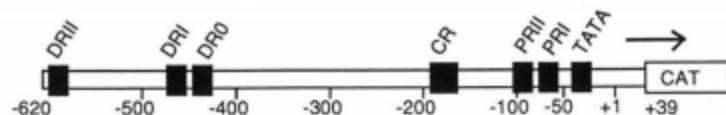
2.4.1 Regulacija izražanja genov

Izražanje genov pri evkariontih je v veliki meri nadzorovano ob samem začetku prepisovanja (transkripcija). Pred začetkom prepisovanja pride do sprememb kromatina v promotorski regiji, za sam začetek prepisovanja je potreben encim RNK polimeraza in transkripcijski faktorji. Beljakovine, ki so potrebne za začetek prepisa, vendar pa same niso del RNK polimeraze, imenujemo transkripcijski faktorji in ti se v evkariontskih promotorjih v velikem številu vežejo na številne cis-delujoče elemente. Cis-delujoča DNK nukleotidna zaporedja se nahajajo v treh večjih kontrolnih regijah: okoli mRNA iniciacijskega mesta (sodelujejo pri oblikovanju začetnega transkripcijskega kompleksa), v promotorski regiji (ki je odgovorna za stimulacijo začetka prepisa) in v regiji, kjer se nahajajo ojačevalna ('enhancer') in/ali zaviralna zaporedja ('supresor'). Vsa omenjena regulacijska zaporedja zunaj strukturnega dela gena, vključno s promotorjem, imenujemo cis-delujoči elementi nadzora, saj se nahajajo ob genu, za katerega odgovarjajo, medtem, ko so trans-delujoči elementi nadzora beljakovine, ki jih kodirajo drugi geni, ki se lahko nahajajo tudi na drugih kromosomih. Trans elementi prepoznajo cis področja določenega gena, se vežejo nanje in s tem sodelujejo pri uravnavanju izražanja tega gena (Lewin, 2004).

Večina promotorjev vsebuje nukleotidno zaporedje imenovano 'TATA element', običajno se nahaja približno 25 bp pred mestom začetka prepisa in vsebuje osnovno zaporedje TATAAA, ki mu običajno sledijo še trije nukleotidi A/T. TATA element je esencialen za prepis in običajno ga obkrožajo nukleotidna zaporedja bogata z G-ji in C-ji. Nekateri promotorji pa nimajo TATA elementa in se zato RNK polimeraza veže okoli mesta začetka prepisa, kjer je prva baza mRNA običajno A, ki ga običajno obdajata dva pirimidina. Ta regija se imenuje iniciator in se nahaja med mestom -3 in +5. V promotorski regiji najdemo zelo pogosto še CAAT box, ki se običajno nahaja okoli mesta -80, ter GC box (-90), ki ima zaporedje GGGCGG, vsi trije so zelo pomembni za pravilno delovanje promotorja. Zgodnejše študije, v katerih so proučevali specifičen fenotip, so se osredotočale večinoma na iskanje mutacij v kodirajoči regiji, novejše študije pa vključujejo tudi proučevanje mutacij na cis-delujočih regijah. Veliko primerov dokazuje, da so nekatere fenotipske razlike posledica mutacij na cis-delujočih regijah, ne mutacij na kodirajočih regijah (Wray, 2007; Pan in sod., 2010), zato smo se tudi v tem diplomskem delu osredotočili na razlike v promotorski regiji transferinskega gena.

2.4.2 Izražanje transferinskega gena in transferinski promotor

Ena izmed pomembnejših študij regulacije izražanja transferinskega gena je bila študija, ki so jo objavili Schaeffer in sod. (1989), v kateri so z mutacijami v nekodirajoči 5' in 3' regiji na človeškem transferinskem genu skušali ugotoviti, katere regije so pomembne za učinkovito izražanje gena oz. njegov prepis. Ti eksperimenti so pokazali, da so za uravnavanje prepisa transferinskega gena pomembne štiri regije, in sicer: regija med -125 in -45, ki je tkivno specifična (deluje samo v jetrnih celicah), regija med -620 in -125, ki uravnava bližnjo promotorsko aktivnost, regija -1000 do -620, ki deluje negativno in zavira prepis TF gena, ter regija, ki vsebuje element, ki prepis spodbuja (med -3600 in -3300; slika 8). Povezava med dvemi vezavnimi mesti imenovani PRI in PRII, ki se povežeta s transkripcijskima faktorjem HNF4 in C/EBP α v regiji od -125 do +1, omogoča izražanje te regije. Schaeffer in sod. (1993) trdijo, da naj bi bila ta regija edina esencialna za transkripcijsko aktivacijo transferinskega gena.



Slika 8: Pomembnejša vezavna mesta za transkripcijske faktorje v promotorski regiji humanega transferina (Schaeffer in sod., 1993)

Tkvno specifično regijo so potrdili tudi pri miših (Idzerda in sod., 1989) in sicer v regiji -139 do +50 ter elemente v regiji -581 in -139, ki uravnavajo promotorsko aktivnost. Prav tako so s študijo na miših (Ghareeb in sod., 1998) v promotorski regiji transferinskega gena našli več regij, ki so povezane s prepisom in sicer eno mesto pred začetkom prepisa (do -370) in eno bolj oddaljeno (-4,1 kb do -3,6 kb) (slika 9). Pri tej študiji so dokazali tudi prisotnost regije, ki negativno vpliva na prepis in sicer se nahaja med -3,6 kb in -1,2 kb. Osredotočili so se na regijo, ki pozitivno vpliva na transkripcijo ('enhancer') in ugotovili, da je v primerjavi s človeškim transferinom visoko konzervirana. V tej regiji so našli vezavno mesto za HNF3 α , ki ima pomembno vlogo pri transkripciji (Ghareeb in sod., 1998).

HUMAN -220 GCTTCATGTCCCTTCCCATCAACATTTCTGTGCT TGGACT CCCTTCCAC MOUSE -213 TGTGTGTGTGTGTGTGTGATTGTCGTGGTAGT GGAT CC----AT RABBIT -198 CCTTTGTCCCGTTCTCAG-AGCACCTTGTTGT TGGAT CCC----AC -----T---T-----T-----A-----GT-- TGGA --CC----A-	<u>CR</u> TCGCGGGTCTCTCCAGAGCTCAGAAAATGAGGTGATCAGTGGGACGAGTAAGGAAG-GG GCGCAGTTTC-TGTCCCACAGTCAGGAAATGAGGTGATCAGGGCAAGAAAGGAAG-GG GCTCCGG----TCCAG---CAGGAAATG---TACCAGGGGGCGAGGAAGGAAGAGT -C-C-G-----TCC-----CAG-AAATG---A-CA---GG-C-AG-AAGGAAG-G- <u>PRII</u> GGTTGGAGAGGGGC GATT GGCAACCCGGCTGCACAAACACGGGAGGT CAAAGAT TC GG---TGGATGCCGGT GATT GGCAATTGACTGCACAAACACAAGGGT CAAAGAT TC GGGACGGGCGAGGGCC GATT GGCAACCCGGCTGCACAAACACGGGAGGT CAAAGAT TC GG---GG---G-GGG--- GATT GGCAA---CTGC-CAAACAC--GAGGT CAAAGAT -GC <u>PRI</u> GCCAGCCGCCAGGCCGGGAATGGAATAAGGGACGCCGGGGGCC-GGAGGCT +1 GCCAGCCGCCCTCCCTCCGTG-CATAAAGGCAGCGGGCACGGGAGCGT GCA GCCTGGCCGCCAACGGC-----GATAAAGGGCGCGGGGCCAGGGT GCG GCC--GCC-GCC---C-----ATAAAGG---GCGG-GC-C--G-AG--T GC- CAGAAGCGACTCCGACTGTGCTCGCTGCTCAGGCCG-CACCC-----GGAAG ATG CAGAAGCGGGTCGGTCTGTACTCCCCGCTCTGCCA-CACAC-ACACCGAGAGG ATG CAGAAGCGGGTCGGTC AGCGCT CGCCGCTCTGCCACCACCCCTGAGCTACAAG ATG CAGAAGCG-GTC-G-C-G--CTC-C-GCTC--CGCC--CAC-C-----A-G ATG
--	---

Slika 9: Poravnavo humanega, mišjega in kunčjega transferinskega promotorja (Ghareeb in sod., 1998)

In vitro študija (Brunel in sod., 1988) je pokazala obstoj petih vezavnih mest za transkripcijske faktorje v začetnih 620 nukleotidih 5' regije transferinskega gena pri človeku (slika 10): PRI, PRII, CR, DRI in DRII. Schaeffer in sod. (1993) so s kasnejšo študijo potrdili, da mesta CR, DRI in DRII niso esencialna za aktivacijo prepisa TF gena, je pa esencialna regija med -125 in +39.

```

TGTAATTAAA CTGGTTAGGA GACTCATCGA CTAGAGGGGG ACATGGTGGC CCCAGGCTGT
-778 AAGAACAGGC CACACCGTCC ACTGGGCCGC TTGCTTGTG CTAAGATGAC ACTTTGTTCT
GAGCCTCACCA GTGCTTGAC CATGTTCTG GAACCTTCTT GTTGGAGGGAA GTTCATCTTC
CCCTATGACT CTGTCCTAG TCTAAGGTGT CCCACAGGAA GCTTGAGGGC GGGAAAGTTT
CCAGCCAGG AGCCTGAGCT CAGCAGGGCA GGAAGAGGGAA GCAGCTCCTC CGTGGGGGAC
-538 CTTTGAGAGC CCAGGAGCAG GATTTGAGG GACACCTGGT GGGGAGCAA AGGTGCTGAG
DRI
TCTGTCTTG ACCTTGAGCC CAGCTTGTCTT CTCCTGCATC CTCCCCAAA AGGGCTTTGC
CTGTCATTCT GCAGTTCTAG TGTGGGTCT GGGCGCAGTT CTCTTCCCTC TCCAGCCTCG
GAGTCTTCTT CTGTGGACTG CGCAGATAAG ACTGGTGGCA CGGACCAGCT CTGCAGCCTG
-298 GAGTCAGGAG CAGAGCCCCG GCTCCAGGG CGTAGCCGCT CTGGCACCGA GCGAGCCGGA
CR
TGACAATGGC TGCATTGTGC TTCATGTCCC TTCCCATCAA CATTTCCTGTG CTGGACTCCCT
TCCACTCGCG GGTCGTCTCC AGAGCTCAGA AAATGAGGTG ATCAGTGGGA CGAGTAAGGA
PRI
AGGGGGGTTG GGAGAGGGGC GATTGGCAA CCCGGCTGCA CAAACACGGG AGGTCAAAGA
-58 TTGCGCCAG CCCGCCAGG CGGGGAATGG AATAAAGGG A CGGGGGCGC CGGAGGCTGC
ACAGAAGCGA GTCCGACTGT GCTCGCTGCT CAGCGCCGCA CCCGGAAAGAT GAGGCTCGCC

```

Slika 10: Vezavna mesta v promotorski regiji humanega transferina, ki so pomembna za njegovo aktivnost
(Brunel in sod., 1988)

2.4.3 Transferinski promotor pri atlantskem lososu

Kvingedal (1994) je določila potencialna vezavna mesta za transkripcijske faktorje za gen za transferin pri atlantskem lososu. Nukleotidno zaporedje v regiji -118 do +1 je podobno kokošjemu, človeškemu in mišjemu transferinskemu promotorju in vsebuje TATA box, CCAAT box ter CAAAC motiv. Našla je vezavna mesta za naslednje transkripcijske faktorje: AP-2, AP-3, Sp1, CF1, NF-IL6, HNF-5, GCF in GATA-1. Za transferinski promotor pri atlantskemu lososu je značilno tudi spremenljivo nukleotidno zaporedje purinov in pirimidinov in sicer 24 bp ponovitev dinukleotidnega motiva CA (CA₁₂), ki se nahaja med pozicijama -187 in -164. V regiji med -1338 in -417 se nahaja minisatelit, ki obsega 25 tandemskih ponovitev 37 bp dolgega motiva. Nukleotidno zaporedje promotorja so določili tudi drugemu transferinskemu genu pri atlantskemu lososu (TF2) in ga primerjali s TF1 v regiji med -383 in +80. Našli so štiri razlike: na mestu -193 zamenjava G v T, delecija G na mestu -146 in insercija A po mestu -177 ter različno dolžino CA ponovitve (12 bp daljša pri TF2).

Ob primerjavi dela promotorske regije (-118 do +1) transferinskega gena med atlantskim lososom in kokošjo, mišjo in človekom je Kvingedal (1994) ugotovila, da so si nukleotidna zaporedja po vrstnem redu podobna v 41 %, 32 % in v 38 %. Vezavno mesto za beljakovine, ki se nahaja v humani promotorski regiji transferina PRII (-103 do -83, Schaeffer in sod., 1993) in veže C/EBP družino transkripcijskih faktorjev, je pri atlantskem lososu enako v 11 nukleotidih in vključuje tudi CCAAT element. To nakazuje, da tudi pri atlantskem lososu obstaja C/EBP faktor, ki se veže v regiji okoli -100 (Kvingedal, 1994). Regija PRI, ki je v primeru humanega, mišjega in kokošjega transferina visoko ohranjena, vsebuje motiv AGGTCA, ki je del vezavnega zaporedja za HNF-4. Pri atlantskem lososu je le-ta nekoliko spremenjena in sicer se nahaja na mestu -65 ter ima zaporedje AAGTCA, na mestu -81 pa se nahaja komplementarno zaporedje TGGCCT (Kvingedal, 1994).

Kot že omenjeno, vsebuje transferinski promotor v regiji -1338 in -417 minisatelit, ki obsega 25 tandemskih ponovitev 37 bp dolgega motiva, ter CA ponovitev med pozicijama -187 in -164, ki ima variabilno število ponovitev (Kvingedal, 1994). Tandemske ponovitve so genomski elementi, ki so podvrženi spremembam števila ponovitev in so zato pogosto polimorfne. Takšna nukleotidna zaporedja se pogosto in v velikem številu, nahajajo na začetku humanih genov, v promotorskih regijah. Vedno več študij dokazuje, da sprememba v dolžini teh ponavljalajočih zaporedij lahko vpliva na uravnavanje izražanja genov (Sawaya in sod., 2012). Mikrosateliti v promotorjih (tandemske ponovitve, ki vsebujejo od enega do šest nukleotidov v podenoti) imajo sposobnost tvorjenja različnih sekundarnih DNK struktur, za katere je znano, da sodelujejo pri uravnavanju izražanja genov. Mikrosatелit AC/GT lahko na primer tvori Z-DNK (levosučna dvojna vijačnica; Wang in Vasquez, 2007) in to je drugi najpogostejsi mikrosatelit, ki se nahaja v promotorskih regijah (Sawaya in sod., 2013).

2.4.4 Razlike v izražanju med TF1 in TF2

Rozman (2008) je na osnovi treh vzorcev soške in potočne postrvi s PCR v realnem času in s hibridizacijo po Southernu ugotovila, da naj bi bila raven izražanja TF2 izrazito nižja od TF1 in da sta oba gena v genomu prisotna v eni kopiji. Andersen in sod. (2011) so pri atlantski trski s pomočjo PCR v realnem času dokazali izražanje obeh genov v jetrih in možganih, vendar je bil TF1 v primerjavi s TF2 veliko manj izražen. Kvingedal in Rørvik (1993) za atlantskega lososa trdita, da je mRNA obeh genov podobne dolžine in da so bili kloni s cDNA enega in drugega gena enako pogosti.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

V analizo promotorske regije transferinskega gena smo vključili genomsko DNK potočne (*S. trutta*) in soške postrvi (*S. marmoratus*) ter atlantskega lososa (*S. salar*) (preglednica 2). Za analizo promotorske regije in izražanje obeh transferinskih genov pri atlantskem lososu smo poleg genomske DNK uporabili še bakterijske umetne kromosome z inserti transferinskega gena atlantskega lososa, ki so jih iz BAC knjižnice atlantskega lososa izolirali v laboratoriju BACPAC Resources (Children's Hospital Oakland Research Institute, ZDA) ter tri vzorce RNK, ki smo jih izolirali iz jeter.

Preglednica 2: Vzorci rodu *Salmo*

Vrsta	Vzorec	Vrsta genetskega materiala	Vsebovani lokus transferinskega gena
<i>Salmo salar</i>	RNK (L1, L2,L3)	RNK	TF1 in TF2
	60H12	Bakterijski umetni kromosom (BAC)	TF1 in TF2
	58I22		TF1
	175G20		TF2
	189N19		TF2
	239J4		TF1
	LOS1	Genomska DNK	
	LOS2		
<i>Salmo marmoratus</i>	Z26	Genomska DNK	TF1 in TF2
<i>Salmo trutta</i>	Dr4, Dr5 Res18	Genomska DNK	

V preglednici je vpisana posamezna oznaka vzorcev, vrsta genetskega materiala in kateri lokus transferinskega gena vsebuje.

Genomska DNK vzorcev je bila že izolirana in shranjena na -20 °C. RNK atlantskega lososa smo izolirali iz jeter treh predstavnikov vrste, ki smo jih dobili iz ribogojnice Alpenlachs v Gutensteinu pri Dunaju (Avstrija). Potočne in soške postrvi so izvirale iz Slovenije, vzorci potočne postrvi iz Drave in Resniškega potoka, vzorci soške postrvi pa iz Zadlaščice.

3.2 UGOTAVLJANJE POLIMORFIZMA OBEH TRANSFERINSKIH LOKUSOV NA RAVNI GENOMSKE DNK

3.2.1 Izolacija BAC klonov

Bakterijski umetni kromosom (BAC) vsebuje fragmente DNK izbranega organizma, ki se vgradijo v vektor. Vektor lahko vgradi fragmente dolge do 350 kb, razvit pa je bil iz F plazmida bakterije *E. coli*, ki sodeluje pri izmenjavi genetskega materiala med bakterijskimi celicami (Shizuya in sod., 1992 cit. po Rozman, 2008).

Za identifikacijo BAC klonov, ki so vsebovali transferin, so v BACPAC Resources pri pregledovanju BAC knjižnice lososa uporabili sondo, specifično za nukleotidno zaporedje dela petega introna in šestega eksona transferinskega gena pri lososu (Rozman, 2008). Na ta način so odkrili 13 klonov, ki so vsebovali gen za transferin. Na podlagi nukleotidnega zaporedja je Rozman (2008) ugotovila, da sedem BAC-ov vsebuje oba transferinska gena (TF1 in TF2), v štirih naj bi bil vključen fragment, ki vsebuje le TF1, v dveh pa le TF2 gen. Tako smo pri določanju nukleotidnega zaporedja za različico TF1 uporabljali BAC klena 58I22 in 239J4, za različico TF2 pa klen z oznako 175G20 in 189N19 (preglednica 2). Za določevanje zaporedja klonu, ki je vseboval oba lokusa gena, smo uporabili BAC 60H12.

Ker so bakterijski umetni kromosomi vstavljeni v celice DH10 *E. coli* smo namnožili v tekočem LB gojišču s kloramfenikolom, ki je vsebovalo še 0,5 % kvasnega ekstrakta (Becton Dickinson Microbiology Systems), 1 % NaCl ter 1 % triptona. Pripravili smo tudi trdno LB gojišče za petrijevke in vbodne kulture ('stab culture'). Trdno LB gojišče se je od tekočega razlikovalo po tem, da smo mu dodali 2 % bakterijskega agarja (Biolife).

BAC klone smo najprej en dan inkubirali na 37 °C s stresanjem v tekočem gojišču in jih nato sterilno prenesli na trdno gojišče v petrijevke. Te smo nato inkubirali prav tako 1 dan na 37 °C. Tako namnožene celice, ki so vsebovale bakterijski umetni kromosom z izbranim tarčnim genom, smo nato uporabljali v PCR reakcijah.

3.2.2 Opis osnovnih metod

Verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo (PCR)

V verižnih reakcijah pomnoževanja s polimerazo (PCR) smo uporabili različne pare začetnih oligonukleotidov, ki so nam omogočili pomnoževanje različnih fragmentov DNK (preglednica 3).

Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi uporabljeni v reakcijah PCR

Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Mesto prileganja	Uporabljena polimeraza
TF-prom2F	TTGCCTGAAC TACACATTGCT	Promotor	Taq, KOD
TF-prom2R	TCCATGCGTAATTATCTTG		Hot
TFprom_pre_repeatF	GATCTAACCACTAGGCTACCTGC	Promotor	
TFprom_repeatF	ACTAGGCTACCTGCCTTGTGG	Promotor	
TFprom_repeatR	CAAGTGTTCATAGTCATC		
TFprom_prerepeatF	CTTAGGAAACAGCGGGTTAAGT	Promotor	
TFprom_prerepeatR	GCCCATAGTTGTTAGGGTTTC		Taq
TFex5/7.2-F	CCATCTCTGAATAACTCCATGC	5 ekson	
TFex5/7.2-R	GTCCTTGC GGCTGACCAC	7 ekson	
TFex5/7A-F	CCAGTCTCCTTTACCCCTACT	TF1, 5 intron	
TFex5/7b-R	TCCAGTGAGTACCAGTCTCCTT		
TFex5/7-R	CTTGACGGCCACCAGTT	7 ekson	Taq
TFcDNAgen-F	CAAGGAGCCCTACTATGACCACGC	TF1, 5ekson	
TFcDNAPg-F	CCAGTCTCTCCTACCCCTCCT	TF2, 5 intron	

V preglednici so navedena imena in nukleotidna zaporedja različnih začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili v reakcijah PCR. Navedeno je tudi mesto v transferinskem genu, na katerega prilegajo in vrsta polimeraze, ki smo jo uporabili v reakcijah pomnoževanja.

Standardna 20 µL PCR reakcija je poleg vode (ddH₂O) vsebovala:

0,5 µL 10pmol/µL posameznega začetnega oligonukleotida;

0,5 µL dNTP (0,2 mM mešanico deoksinukleotidtrifosfatov);

1,2 µL 25 mM MgCl₂;

2 µL 10× Taq pufer;

1 µL genomske DNK ali BAC

0,5 enote *Taq* DNK polimeraze Fermentas.

Reakcije so potekale v cikličnem termostatu (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) in sicer so se začele z denaturacijo DNK (3 minute pri 94 °C), kateri je sledilo 35 ciklov z naslednjim profilom

45 sekund denaturacije pri 94 °C,

20 sekund prileganja pri 60 °C in

40 sekund podaljševanja pri 72 °C.

Reakcije smo zaključili z dvema minutama podaljševanja pri 72 °C ter ohladili na 4 °C.

KOD DNK Polimeraza omogoča hitrejše, bolj natančno pomnoževanje, kot ga je mogoče doseči z običajno polimerazo. Uporabili smo KOD Hot Start DNK polimerazo (Novagen), ki je namenjena visoki specifičnosti in daljšemu berljivemu odseku po sekvenčni analizi. V standardno 20µL zmes smo namešali:

0,33 µL posameznega začetnega oligonukleotida

2 µL dNTP (0,2 mM mešanico deoksinukleotidtrifosfatov);

1,2 µL 25 mM MgSO₄

2 µL 10× pufer za KOD Hot Start DNK polimerazo;

1,2 µL genomske DNK;
0,4 µL KOD Hot Start DNK polimeraza (1 U/µL)
ter ddH₂O do 10 µL.

Reakcije so potekale pod naslednjimi pogoji: denaturacija DNK (2 minuti pri 95 °C), sledilo je 40 ciklov z naslednjim profilom
20 sekund denaturacije pri 95 °C,
20 sekund prileganja pri 55 °C in
15 sekund podaljševanja pri 70 °C.

Reakcije smo zaključili z dvema minutama podaljševanja pri 70 °C ter ohladili na 4 °C.

Vse produkte pomnoževanja tako z običajno *Taq* (Fermentas) kot s KOD Hot start polimerazo smo preverili z gelsko elektroforezo.

Gelska elektroforeza

Produkte PCR smo preverili na agaroznem gelu, ki smo ga pripravili s segrevanjem agaroze (SeaKem LE, Lonza) v 0,5× TBE pufru (50 mM Tris baze, 50 mM borova kislina, 1 mM EDTA, pH 8,2). Koncentracijo agaroznega gela smo prilagodili glede na pričakovane dolžine fragmentov, običajno je bila le ta 1,5 %. V tekoč agarozni gel, ki smo ga nato ohladili na 50 °C, smo dodali 2 µl Sybr safe barvila (10 000× koncentriran v DMSO, Invitrogen). Elektroforeza je potekala v horizontalni elektroforetski enoti (Pharmacia Bioteh, Biometra Qhatman). Vzorcem smo pred nanosom na gel dodali aplikacijski pufer (barvilo ksilen cianol ali bromofenol modro). Velikost elektroforetskih frakcij (produktov PCR) smo ocenjevali primerjalno z velikostnim DNK-standardom (1 kb DNK ladder oz. 100 bp DNK ladder, Thermo Scientific). Elektroforeza je potekala pri 10 V/cm² na sobni temperaturi. Po končani elektroforezi smo frakcije DNK fragmentov pregledali pod transiluminatorjem (Biometra).

Fragmenti, pomnoženi s PCR, so se v agaroznem gelu ločili po velikosti in za potrebe nadaljnje analize smo posamezne fragmente izrezali iz gela in jih prečistili s kitom za ekstrakcijo iz gela (QIAquick, Quiagen) po navodilih proizvajalca.

Tako pripravljeni fragmenti, ki so se ločili po dolžini, smo hranili na -20 °C ter jih nato uporabili za določanje nukleotidnega zaporedja in za kloniranje.

Določanje nukleotidnega zaporedja po Sangerjevi metodi

Nukleotidno zaporedje smo določali prečiščenim produktom PCR. Prečistili smo jih s pomočjo ExoSAP (Affimetrix) encimske mešanice, s katero smo z encimsko razgradnjo odstranili nezaželene dNTP-je in začetne oligonukleotide iz PCR produktov.

Uporabili smo 15 µL produktov PCR in dodali 1 µL mešanice ExoSAP. Reakcije so potekale v cikličnem termostatu (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler) in sicer s 45 minutno razgradnjo začetnih oligonukleotidov in dNTPjev na 37 °C ter 15 minutno inaktivacijo encimov na 80 °C.

Prečiščene produkte PCR smo nato uporabili v reakciji za določanje nukleotidnega zaporedja ali sekvenčni reakciji po predlaganem protokolu (Applied Biosystems). Deset mikrolitrsk

sekvenčna reakcija je vsebovala 5 µL prečiščenega produkta PCR, 0,5 µL enega od specifičnih začetnih oligonukleotidov, 0,8 µL BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) ter ddH₂O do končnega volumna. Reakcija je potekala prav tako v cikličnem termostatu pod naslednjimi pogoji: začetna eno minutna denaturacija pri 96 °C ter 35 ciklov s profilom:

10 sekund denaturacije pri 96 °C

5 sekund prileganja pri 50 °C

4 minute sinteze pri 60 °C.

Reakcije smo ohladili na 4 °C.

Med sekvenčno reakcijo je prišlo do naključnega vgrajevanja fluorescentno označenih dideoksinukleotidov v nastajajočo verigo DNK. Ker DNK polimeraza ni mogla nadaljevati sinteze preko dideoksinukleotidov, so se produkti reakcije končali z označenimi dideoksinukleotidi in tako so nastale vse variante različno dolgih fragmentov.

Tako pripravljeni sekvenčni reakciji, v katerih so ostali tudi nevgrajeni, s fluorokromi označeni dideoksinukleotid-fosfati, smo ponovno očistili in sicer s pomočjo sephadex-a (GE Healthcare). Centrifugirke smo pripravili tako, da smo jim dodali 750 µL sephadex-a, ki smo ga centrifugirali pri 4000 rpm 2 minuti in odlili spodnjo tekočino. Nato smo dodali 10 µL posamezne sekvenčne reakcije (kateri smo dodali 20 µL ddH₂O) ter ponovno centrifugirali. Raztopino s prečiščenimi produkti sekvenčne reakcije smo posušili v vakuumski centrifugiji (60 °C, 15 minut).

Pred nanosom vzorcev na mikrotitrsko ploščo za kapilarno elektroforezo smo produktom dodali 10 µL formamida (Applied Biosystems), 2 minuti denaturirali pri 95 °C ter ohladili na ledu. Fluorescenčno označene fragmente smo analizirali na kapilarni elektroforezi Genetic analyzer 3130 (Applied Biosystems). Nukleotidno zaporedje vzorca BAC *Salmo salar* 239J4 so določili v podjetju Macrogen Inc, Seul, Koreja.

Sekvence smo uredili s programom Chromas, ki omogoča pregled kromatogramov in ročno urejanje sekvenc. Primerjavo med sekvencami smo izvedli s pomočjo programa Mega 4 (Tamura in sod. 2007).

3.3 ANALIZA PROMOTORSKE REGIJE TRANSFERINSKEGA GENA

Promotorsko regijo smo skušali pomnožiti s petimi pari začetnih oligonukleotidov (preglednica 3).

Prvi par začetnih oligonukleotidov (TF-prom2F, TF-prom2R) smo izbrali na osnovi znanega nukleotidnega zaporedja promotorske regije transferinskega gena pri atlantskem lososu (Kvingedal, 1994), dostopnega tudi v spletni genski banki (GenBank Acc.No. L26909). Z njima smo želeli pomnožiti del promotorja v obsegu približno 500 bp, ki sega do prvega eksona.

Za pomnoževanje dela v promotorski regiji smo uporabili dve različni polimerazi. *Taq* polimerazo smo uporabili za pomnožitev tega dela DNK pri vseh proučevanih vrstah (atlantski losos, potočna in soška postrv) in dveh različnih BAC-ih (58I22, 175G20). Produkte smo po preverjanju z elektroforezo prečistili in jim določili nukleotidno zaporedje.

S KOD Hot Start polimerazo smo želeli pomnožiti oba lokusa promotorske regije transferinskega gena pri potočni in soški postrvi ter poskusili določiti število tandemskih ponovitev v promotorski regiji pri atlantskemu lososu. Produkte smo preverili z elektroforezo, jih izrezali iz gela in prečistili. Produkte pomnoževanja pri soški in potočni postrvi smo nato uporabili za kloniranje.

Program PCR, ki smo ga pri tem uporabili, je sledeč: dve minuti denaturacije, kateri sledi 40 ciklov z začetno 20 sekundno denaturacijo pri isti temperaturi, 20 sekund prileganja pri 55 °C in 15 sekund podaljševanja pri 70 °C. Reakcija se zaključi s končnim podaljševanjem pri 70 °C in ohlajanjem na 4 °C.

Za določitev števila tandemskih ponovitev (minisatelitov) smo postavili začetnike na osnovi znanega nukleotidnega zaporedja promotorja *Salmo salar*. Začetniki so bili izbrani tako, da so prilegali na zadnji in prvi tandemski ponovitvi. V reakcijski zmesi smo povečali količino MgCl₂ na 1,8 µL na 20 µL reakcijo in program spremenili tako, da je prileganje potekalo 40 sekund pri 58 °C ter sinteza 20 sekund pri 70 °C. Po končani elektroforezi smo izrezali željene fragmente TF1 oz. TF2, jih prečistili in jih sekvencirali.

3.3.1 Kloniranje fragmentov promotorske regije

Iz gela izrezane in prečiščene produkte PCR smo klonirali. Domnevali smo, da bomo na ta način ločili DNK fragmente promotorske regije lokusov TF1 in TF2.

Ligacija

Prečiščenim fragmentom iz gela smo določili koncentracijo s pomočjo sprektofotometra NanoDrop (Nano Drop Technologies Inc, ZDA). Fragmente smo vstavili v vektor pJET1.2 po protokolu Clone JET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific).

Ligacijsko mešanico smo pripravili na ledu in v vsako reakcijo namešali ddH₂O, 10 µL pufra (2× Reaction Buffer), 1 µL T4 DNK ligaze ter 9 µL vektorja in PCR produkta (v razmerju 3:1, pri velikosti produkta približno 500 bp). Po mešanju in centrifugiraju smo mešanico inkubirali 5 minut na sobni temperaturi (22 °C) ter neposredno uporabili za transformacijo.

Transformacija in gojenje celic

Za transformacijo smo uporabili bakterijski sev kompetentnih celic *E. coli* DH5α (proizvajalca Invitrogen), ki je bil shranjen na -70 °C. Pred dodajanjem ligacijske mešanice oz. vektorja z našim insertom smo kompetentne celice počasi odtajali na ledu. Vsaki 50 µL celični suspenziji smo dodali 3 µL DNK (3 ng), v kontrolno centrifugirko pa smo nanesli 2,5 µL (250 pg) pUC19 kontrolne DNK. Centrifugirke z mešanicami smo inkubirali na ledu 30 minut in jih nato izpostavili temperturnemu šoku trajajočem 20 sekund pri 42 °C. Nato smo jih inkubirali na ledu 2 minuti, dodali 950 µL LB tekočega medija in inkubirali 1 uro na 37 °C. Iz vsake centrifugirke smo 20 µL gojišča s celicami prenesli na petrijevke s trdnim LB gojiščem (20 mL) z dodatkom 100 µg/ml ampicilina. Petrijevke z nanesenimi celicami smo inkubirali čez noč na 37 °C ter nato pozitivnim kolonijam določili prisotnost inserta s PCR po protokolu, priporočenem v klonirnem kitu (ThermoScientific).

PCR reakcijska zmes se je od standardne zmesi, opisane v poglavju 3.2.2, razlikovala po tem, da je vsebovala 0,4 µL 10 µM F in R začetnega oligonukleotida pJET1.2, ki sta priložena v kitu. PCR je potekal le v 25 ciklih in sicer pri denaturaciji 45 sekund in prileganju 30 sekund.

Produkte smo preverili z gelsko elektroforezo in tistim, ki so se pomnožili uspešno, smo določili nukleotidno zaporedje.

3.3.2 Iskanje vezavnih mest transkripcijskih faktorjev

Na osnovi nukleotidnih zaporedij fragmentov promotorske regije DNK TF1 in TF2 soške in potočne postrvi ter atlantskega lososa smo skušali s pomočjo programske opreme dostopne na spletnih straneh določiti možna vezavna mesta za transkripcijske faktorje (TR-F). Določali smo jih s programom Genomatix (Matinspector, 2013).

3.4 ANALIZA IZRAŽANJA TRANSFERINSKEGA GENA PRI ATLANTSKEM LOSOSU

3.4.1 Izolacija RNK iz jetrnega tkiva in sinteza cDNK

Za izolacijo RNK smo atlantskemu lososu odvzeli jetrno tkivo in ga takoj zamrznili v tekočem dušiku. Za dolgotrajnejše shranjevanje in kasnejšo uporabo smo tkivo shranili pri -80°C.

RNK smo izolirali po protokolu RNeasy lipid tissue mini kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca. Tako pridobljenim trem vzorcem RNK smo izmerili čistost in koncentracijo s spektrofotometrom NanoDrop in integriteto z Bioanalizatorjem 2100 (Agilent Technologies Inc., ZDA). Osnovni princip spektrofotometra je merjenje absorbance, medtem ko novejša metoda 'lab-on-chip' (bioanalizator) temelji na kapilarni elektroforezi. Analizator za vsak vzorec izriše elektroferogram, določi faktor, ki meri kvaliteto RNK, in izračuna delež molekul rRNK v vzorcih mRNK (Toplak, 2006). Z določitvijo 'integritetnega števila RNK' (RIN vrednost) smo izvedli primerjavo vzorcev in zagotovili ponovljivost poskusa.

Vzorce RNK smo za nadaljnje delo shranili na -80 °C.

3.4.2 Sinteza cDNK

Pred prepisom celokupne RNK, ki smo jo pridobili pri izolaciji iz jeter atlantskega lososa, v cDNK, smo RNK tretirali z encimom deoksiribonukleazo (DNaza). V reakcijski zmesi smo pripravili:

2 µg RNK

1 µL RQ1 RNase-Free DNase 10× Reaction Buffer

1 U/µg DNK RQ1 RNase-Free DNase

do 10 µl ddH₂O

Reakcijsko zmes smo inkubirali 30 min pri 37 °C ter ji nato dodali 1 µl RQ1 DNase stop raztopine ter inkubirali za 10 min na 65 °C. Uporabili smo reagente in protokol proizvajalca Promega.

RNK smo prepisali v cDNK po protokolu proizvajalca (Fermentas). Prepis smo izvedli z encimom reverzna transkriptaza (M-MuLV Reverse Transcriptase) in 'naključnimi' začetnimi oligonukleotidi (random hexamer). Vsakemu vzorcu (približno 2 µg RNK) smo dodali:

0,2 µg (100 pmol) random hexamer

4 µl 5× reaction buffer

0,5 µl (20 u) Ribolock RNase inhibitor

2 µl (1 m M končna koncentracija) dNTP mix, 10 mM vsak

2 µl (40 enot) M-MuLV reverse transcriptase

Reakcijsko zmes smo premešali in centrifugirali ter inkubirali 10 min na 25 °C ter nato 60 min na 37 °C. Reakcijo smo zaključili s segrevanjem na 70 °C (10 min).

Sintetizirano cDNK smo shranili na -20 °C. Pred uporabo v qPCR (kvantitativni PCR) smo cDNK uporabili v standardni PCR, s katero smo žeeli preveriti uspešnost izolacije in transkripcije. Uporabili smo začetne oligonukleotide za gene, za katere je znano, da se izražajo v vseh tkivih pri Salmonidih (geni EF1A, B-aktin in 18S RNK). Program, ki smo ga uporabili, se je od standardnega nekoliko razlikoval (denaturacija in prileganje sta potekala 30 sekund).

3.4.3 PCR v realnem času

qPCR ali PCR v realnem času nam omogoča merjenje količine nastajajočega PCR produkta v realnem času. Temelji na detekciji in merjenju količine fluorescenčnega signala, ki je sorazmeren količini PCR produkta. V qPCR nas v primerjavi z običajno PCR zanima predvsem naraščanje količine produkta med eksponencialno fazo pomnoževanja. Na osnovi izmerjenih podatkov med posameznimi cikli nam programska oprema nariše krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov (ViiA 7 Software 1.2, Applied Biosystems). PCR v realnem času smo uporabili za analizo izražanja transferinskega gena na obeh lokusih (TF1 in TF2) pri atlantskem lososu.

Na podlagi novih dobljenih nukleotidnih zaporedij za obe kopiji gena pri atlantskem lososu smo določili specifični sondi, ki sta prilegali v področju šestega in sedmega eksona, in se razlikovali na treh mestih, glede na to, ali ležita na TF1 ali TF2.

Uporabili smo Taq Man metodo (Applied Biosystems), ki temelji na hidrolizirajočih sondah, ki se specifično vežejo na tarčno zaporedje na DNK, in dveh neoznačenih začetnih oligonukleotidih na obeh koncih sonde. Sonda ima na enem koncu vezano fluorescenčno barvilo (5' konec, reporter), na drugem koncu pa dušilec, ki prestreza fluorescenčni signal. Aktivnost polimeraze povzroči v stopnji podaljševanja hidrolizo sonde. Takrat fluorescenza reporterskega barvila naraste, saj se razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem poveča, kar onemogoča prestrezanje fluorescence. Ker je fluorescenza reporterskega barvila sorazmerna s količino produkta, lahko količino nastalega produkta ocenimo s pomočjo približne ocene vstopne koncentracije cDNK (Holland in sod., 1991).

Kot matrico smo uporabili 3 vzorce cDNK atlantskega lososa, ki smo jih redčili 1/16, 1/64 in 1/256. Vzorce smo nanašali na optično ploščo formata 96 (Applied Biosystems) po v naprej pripravljenem načrtu. Najprej smo na ploščo nanesli v vse luknjice 2 µL cDNK atlantskega lososa. Nato smo nanesli reakcijske mešanice. Vse tri vzorce smo na ploščico nanesli v treh

ponovitvah in 4 redčitvah. V 10 µL reakcijo smo zmešali: 5 µL "Universal Master Mix" (Applied Biosystems); 0,5 µL mešanice začetnih oligonukleotidov in sonde, 2 µL vzorca in 2,5 µL ddH₂O. Redčene cDNK smo označili s specifičnimi sondami za TF1 ali TF2 in jih s qPCR pomnožili z izbranim parom začetnih oligonukleotidov.

Reakcije so potekale v aparatu "ViiA Real-Time PCR System" (Applied Biosystems) pod naslednjimi pogoji:

2 minuti inkubacije pri 50 °C;

10 minut začetne denaturacije DNK pri 94 °C;

40 ciklov s profilom:

denaturacija DNK 15 sekund pri 95 °C

Prileganje začetnih oligonukleotidov 1 minuto pri 60 °C

Podaljševanje 1 minuto pri 60 °C

S PCR v realnem času smo podvojili specifično tarčno sekvenco DNK, kopiranje DNK pa spremljali z merjenjem fluorescence. Ko fluorescenčni signal barvila doseže cikel praga detekcije (ang. threshold), to pomeni, da je intenziteta fluorescentnega sevanja barvil (ΔR_n) v tem ciklu presegla nastavljeni prag. Vrednost Ct (Cycle threshold; število ciklov, pri katerem signal fluorescence preseže linijo fluorescentnega praga) je obratno sorazmerna začetni količini tarčne cDNK in smo jo uporabili za izračun absolutne ali relativne količine cDNK določenega produkta pomnoževanja.

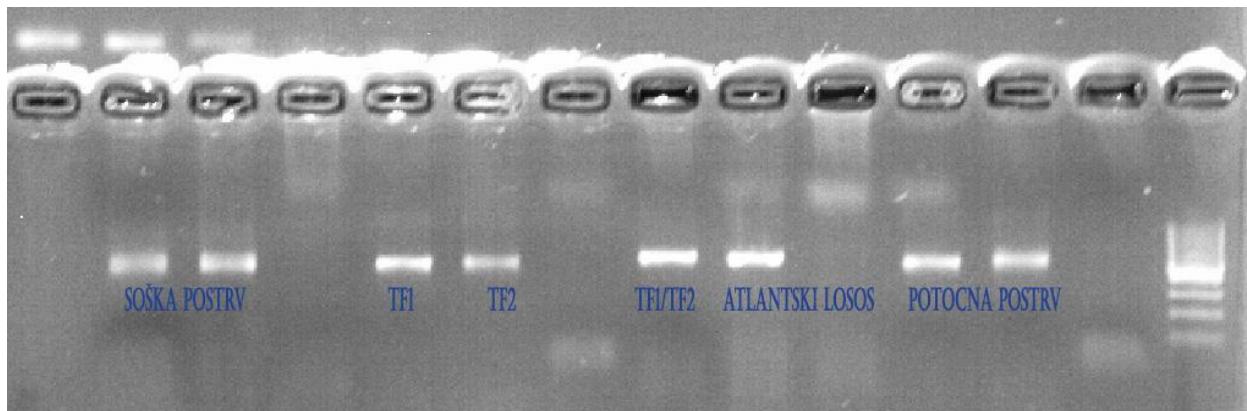
Podatke smo obdelali s programom ViiA 7 (Applied Biosystems). Program je fluorescenco reporterske molekule po reakciji normaliziral in podal kot ΔR_n (fluorescenco reporterskega barvila). Izrisal se je graf pomnoževanja produkta PCR v realnem času, ki je predstavljal vrednost delta R_n v odvisnosti od števila ciklov. Na eksponentnem delu krivulje smo določili linijo fluorescentnega praga, ki je določila število ciklov Ct za različne redčitve vsakega posamezenega vzorca v okviru vsake od obeh različic TF gena (TF1 in TF2). S programom Excel 2007 (Microsoft Office) smo izračunali povprečja Ct-povprečja triplikatov določenega vzorca ter izrisali graf, s katerim smo preverili učinkovitost pomnoževanja (E= efficiency). Učinkovitost pomnoževanja je zelo pomembna pri uporabi tako absolutne kot relativne kvantifikacije. V idealnih razmerah je 100%, kar pomeni, da z vsakim cikлом dobimo dvakrat več produkta.

Absolutna kvantifikacija je proces, ki določa absolutno količino tarčne DNK v vzorcu na osnovi standardne krivulje. Standardno krivuljo dobimo z redčitvami vzorcev. Ko je naklon te krivulje -3,32, je učinkovitost pomnoževanja 100 % (ABI PRISM, 2004). Absolutna kvantifikacija primerja PCR signal z vhodno koncentracijo v vzorcu s pomočjo standardne krivulje, medtem ko relativna kvantifikacija meri relativno spremembo v izražanju mRNK. Rezultate pri relativni kvantifikaciji podajamo kot razmerja med tarčnim in referenčnim amplifikonom v istem in v različnih vzorcih. Določili smo jih iz razlik v Ct vrednostih z metodo relativne standardne krivulje (Real Time PCR Handbook, 2003).

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA PROMOTORSKE REGIJE TRANSFERINSKEGA GENA

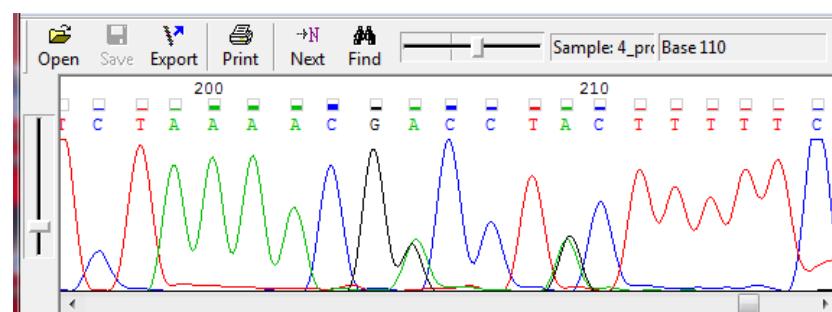
Na podlagi znanega zaporedja promotorske regije TF1 pri atlantskem lososu (Kvingedal, 1994) in z določitvijo začetnih oligonukleotidov smo uspešno pomnožili približno 500 baznih parov dolg odsek promotorske regije pri predstavnikih rodu *Salmo* (potočna in soška postrv ter atlantski losos, slika 11).



Slika 11: Uspešno pomnoženi odseki promotorske regije pri genomskej DNK potočne postrvi, atlantskega lososa, soške postrvi in BAC klona s TF1 in TF2

Skrajno desno je velikostni standard GeneRuler 100bp DNA.

Fragment je obsegal regijo med -348 v promotorski regiji ter +77 od start mesta (Priloga A). Začetni oligonukleotidi niso ločevali med TF1 in TF2, zato smo po določitvi nukleotidnih zaporedij kot rezultat dobili prekrivajoča se pomnožena genomska DNK zaporedja, ki vsa izvirajo od enega osebka (slika 12).



Slika 12: Primer dvojnega nukleotidnega zaporedja transferinskega gena pri potočni postrvi
Mesti 205 in 209 predstavljata točkovni mutaciji.

Vse promotorske regije transferinskega gena, ki smo jih pridobili, so vsebovale mikrosatelit s tandemskimi ponovitvami $(CA)_n$ približno 160 baznih parov pred startnim kodonom (slika 22).

Ta del promotorske regije smo uspešno pomnožili pri BAC klonih, ki so vsebovali bodisi TF1 ali TF2 ter tako pridobili obe nukleotidni zaporedji transferinskega gena pri atlantskem lososu. Pri soški in potočni postrvi pa smo do enakega rezultata prišli s pomočjo kloniranja PCR produktov.

4.1.1 Promotorska regija TF1 in TF2 pri *Salmo salar*

S pomočjo začetnikov TFprom2F in R smo pri atlantskemu lososu dobili 427 bp dolg fragment TF1 ter 438 bp dolg fragment TF2. Razlikovala sta se v šestih nukleotidnih zamenjavah. Pri TF1 je bilo v mikrosatelitu šest CA ponovitev, pri TF2 pa dvanajst (priloga A). Prav pred mikrosatelitom je TF1 vseboval delecijo (slika 13).

```
>TF1(58i22) CATTGCTAACATTTGATTAGTGATGACTATGCTGAAACACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTGAAA
>tf2(175g20)CATTGCTAACATTTGATTAGTGATGACTATGCTGAAACACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTGAAA
*****  

>TF1(58i22) TAACAGTTAAAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTTATTTGTGAATTTCATTATGTGAAATGTCT
>tf2(175g20)TAACAGTTAAAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTTATTTGTGAATTTCATTATGTGAAATGTCT
*****  

>TF1(58i22) GAAGCTGAGTACACACAAA-----CCACACACACAGGGAGTGGCCACGCACGCCACCCGCCT
>tf2(175g20)GAATTCTGAGTACACACAAAACCACACACACACACACAGGGAGTGGCCACGCACGCCACCCGCCT
*****  

>TF1(58i22) ATGAACAAATTAAACGCCATGTAACATATTGGAAACCTAACAAACACTATGCCCTCTTTCAAGCTAAGTCAGCC
>tf2(175g20)ATGAACAAATTAAACGCCATGTAACATATTGGAAACCTAACAAACACTATGCCCTCTTTCAAGCTAAGTCAGCC
*****  

>TF1(58i22) CACCATGGACCCCAGCCTATTATTGGTTTCTATAAAAGCCAGAGTTGCCCTCTAAACGGCTTACCTTTTCACTC
>tf2(175g20)CACCATGGACCCCAGCCTATTATTGGTTTCTATAAAAGCCAGAGTTGCCCTCTAAACGGCTTACCTTTTCACTC
*****  

>TF1(58i22) CGGGATTGTTGACTGGAGACTTCGAGAACATGAAACTGCTTCCTCTCAGCGCTGCT
>tf2(175g20)CGGGATTGTTGACTGGAGACTGGAGAACATGAAACTGCTTCCTCAGCGCTGCT
*****
```

Slika 13: Nukleotidno zaporedje promotorske regije TF1 in TF2 atlantskega lososa pomnoženo s TFprom2R in TFprom2F začetniki

Označena so mesta, kjer sta se zaporedji razlikovali.

Nukleotidno zaporedje repetitivne regije je bilo naslednje:

TF1 ACACAC AAA- CCA CACACACACA

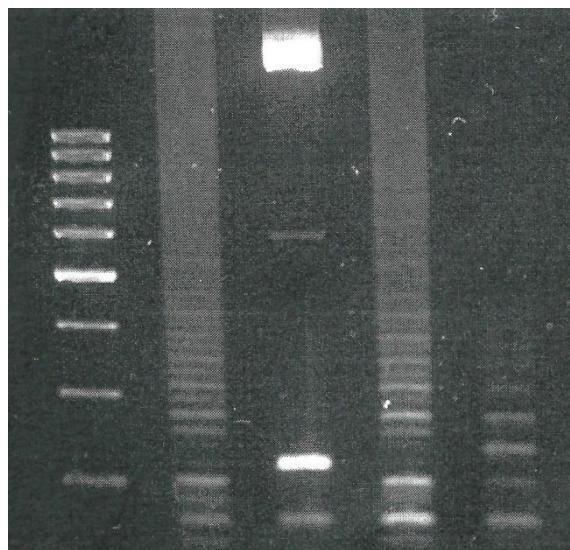
TF2 ACACAC AAAA CCA CACACACACACACACACA

BAC klonu s TF1 smo s 'primer-walking' metodo in TFprom2F kot prvim začetnim oligonukleotidom poskušali določiti daljše nukleotidno zaporedje promotorja, ki bi segalo preko dolge repetitivne regije oz. minisatelita (priloga B). Ta repetitivna regija se nahaja od startnega mesta -416 dalje in obsega 37 baznih parov dolg motiv. Zaradi ponavljanjajočih se nukleotidnih motivov določitev nukleotidnega zaporedja ni bila mogoča dlje od mesta -1298 in sicer le do štiriindvajsete ponovitve motiva (slika 14).

Slika 14: Nukleotidno zaporedje promotorske regije TF1 atlantskega lososa, dobljeno s pomočjo 'primer-walking' metode in krajšega zaporedja TF1 dobljenega z začetniki TFprom2R in F (priloga B)

Na zgornjem delu slike je razviden del z minisatelitom, kjer so označeni posamezni nukleotidi, ki se v posameznih tandemskih ponovitvah razlikujejo.

Dolžino repetitivne regije smo skušali določiti tudi s pomočjo dveh parov začetnih oligonukleotidov: TFprom_repeatR in F ter TFprom_repeatR in TFprom_pre_repeatF (slika 17). Prvi par je prilegal na posamezno tandemsko ponovitev in sicer 100 % v 18 motivih (TF1), drugi pa je imel F začetni oligonukleotid pred ponovitvami. S pomočjo KOD HOT Start polimeraze nam je uspelo pomnožiti različne dolžine tega fragmenta glede na število ponovitev (slika 15) s prvim parom začetnikov. Po izolaciji fragmentov iz elektroforetskega gela je pri sekvenčni reakciji prišlo do ponovnega prileganja začetnih oligonukleotidov na posamezni repetitivni motiv in zato določanje nukleotidnega zaporedja ni bilo mogoče.



Slika 15: Produkti pomnoževanja PCR pri TF1 in TF2 atlantskega lososa (BAC-i) s TFprom_repeatR in TFprom_repeatF začetniki

Vrstni red vzorcev je: BAC TF1, TF2, TF1/TF2 in vzorec genomske DNK potočne postrvi.

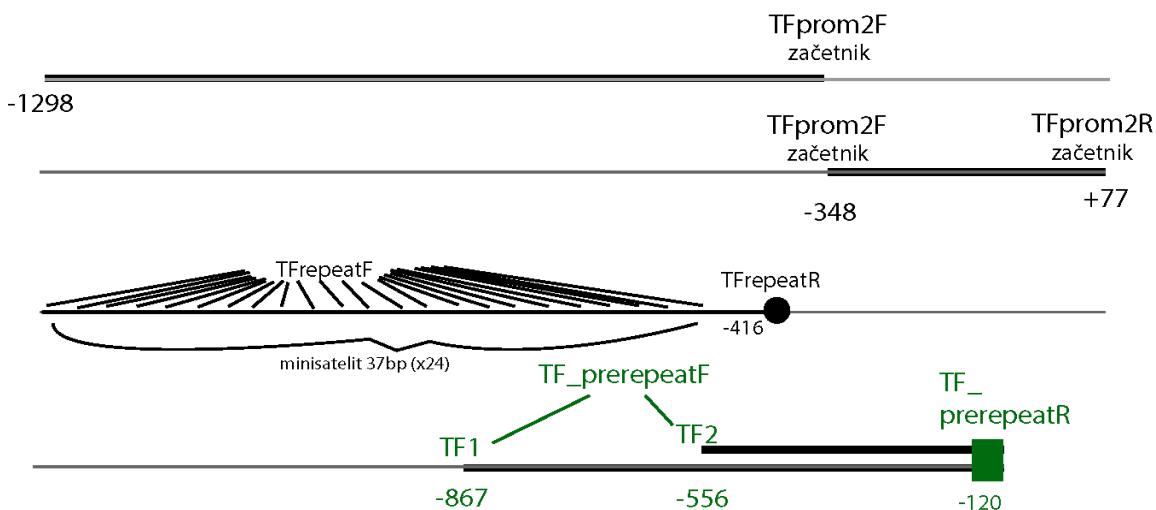
Z začetnimi oligonukleotidi TFprerepeatF in R smo prišli do daljšega odseka pri TF2 (priloga C), kot nam je to uspelo z TFprom2R in F in sicer je pomnožek segal približno dvesto baznih parov dlje kot pri začetnem oligonukleotidu TFprom2F (do -556 pred start mestom). Pri TF1 je ta par začetnikov pomnožil odsek do -867 baznih parov pred startnim mestom (slika 16). Na sliki (slika 17) so prikazani posamezni odseki, ki smo jih pomnoževali z uporabo različnih začetnih oligonukleotidov.

```

>salartf1_prerepeat          -867
>salartf2_prerepeat          ACACTAGGCTACCTGCCT
>
>salartf1_prerepeat          -849
>TGTGGAAGCTGAGAGGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTGGAGCTGAGAGGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGGAGGATATAACACTAG
>salartf2_prerepeat
>
>salartf1_prerepeat          -746
>CTACCTGCCTTGAGCTGAGAGGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGGAGCTGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGGAGGATA
>salartf2_prerepeat
>
>salartf1_prerepeat          -643
>TACACTAGGCTACATGCCTTGAGCTGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGGAGCTGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGGAGGATA
>salartf2_prerepeat
>
>salartf1_prerepeat          -540
>TCACTAGGCTACATGCCTTGAGCTGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGGAGCTGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGGAGCTGGAGGATA
>salartf2_prerepeat
>TGTTCAGGACAGAAAGAGATATTTACCTTCTCAGCTAGGGAAACCTTCGGTTACTAGTCACACGATCTAACACTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGGAGCTGGAGGATA
>
>salartf1_prerepeat          -437
>GGAGGATATAACTCAATTAAATCTATTTCCTTAATTCTCAAGAAAAGATAACACTGTGCCCTTTTGCTGAACTACACATTGCTAACATTGGATTA
>salartf2_prerepeat
>GGAGGATATAACTCAATTAAATCTATTTCCTTAATTCTCAAGAAAAGATAACACTGTGCCCTTTTGCTGAACTACACATTGCTAACATTGGATTA
>
>salartf1_prerepeat          -334
>GTGATGATGACTATGCTGCAAACACTTGTAGATTGGAGACTGCTTGAAATAACAGTTGAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTATTTGTG
>salartf2_prerepeat
>GTGATGATGACTATGCTGCAAACACTTGTAGATTGGAGACTGCTTGAAATAACAGTTGAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTATTTGTG
>
>salartf1_prerepeat          -231
>AATTTCCATTATGTGAAATGCTGAACTCTGAGTACACACAAA-----GGGAGTGAGCCACGCGGCCACCCGCCTATG
>salartf2_prerepeat
>AATTTCCATTATGTGAAATGCTGAACTCTGAGTACACACAAAACCACACACACACACACAGGGAGTGAGCCCGCGGCCACCCGCCTATG

```

Slika 16: Produkti pomnoževanja PCR pri TF1 in TF2 atlantskega lososa (BAC-i) s TFprerepeatF in R začetniki

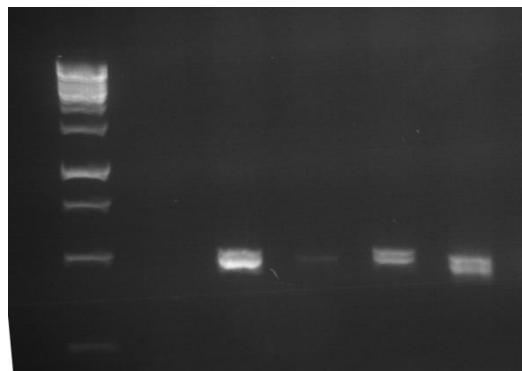


Slika 17: Mesta začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabljali v promotorski regiji transferinskega gena pri atlantskem losusu

Poudarjene črte so amplikoni, pri katerih nam je uspelo določiti nukleotidno zaporedje. Prva premica predstavlja nukleotidno zaporedje, ki smo ga dobili s pomočjo primer-walking metode in začetnika TFprom2F, drugo zaporedje smo z začetniki TFprom2R in F določili tudi pri potočni in soški postrvi ter zadnje s pomočjo TF_prerepeatF in TFprerepeatR začetniki. V tretjem primeru nam z začetniki, ki so prilegali na posamezno tandemsko ponovitev, ni uspelo priti do nukleotidnega zaporedja.

4.1.2 Promotorska regija TF1 in TF2 pri *Salmo trutta* in *Salmo marmoratus*

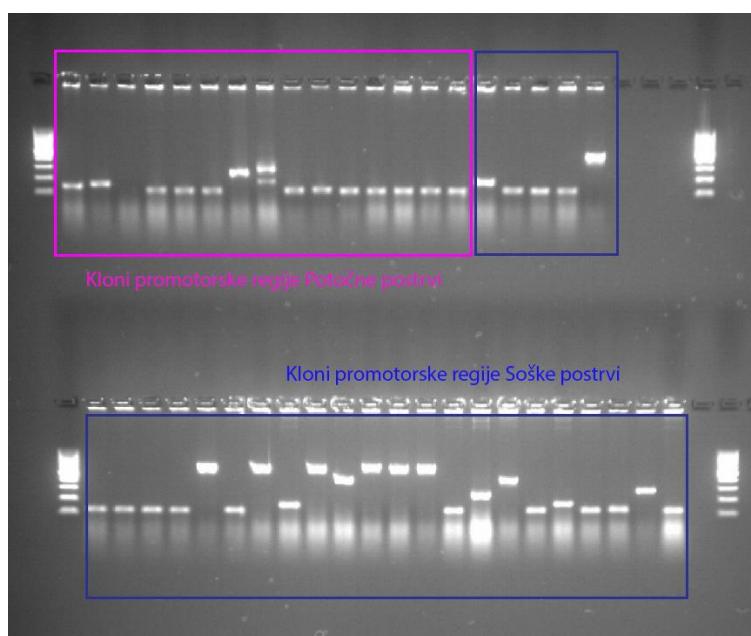
Ob PCR-pomnoževanju promotorske regije pri potočni in soški postrvi je prišlo do pojava dvojnih produktov PCR, pomnožila sta se namreč dva fragmenta nekoliko različne velikosti (slika 18). Te produkte PCR smo klonirali.



Slika 18: Pomnoženi odseki promotorske regije pri potočni in soški postrvi, ki smo jih nato uporabili pri kloniranju (vzorci: potočna in dve soški postrvi)

Podvojeni pomnožek nakazuje prisotnost dveh različnih nukleotidnih zaporedij, ki se nekoliko razlikujeta v dolžini.

Prisotnost insertov promotorske regije transferinskega gena smo preverili na 53 klonih soške postrvi in 21 klonih potočne postrvi (slika 19). Nukleotidno zaporedje smo določili 24 klonom in tako uspešno pridobili enajst uporabnih nukleotidnih zaporedij, od katerih se je pri potočni postrvi uspešno pomnožilo le eno. Dolžina fragmentov pri soški postrvi je bila od 430 do 456, pri potočni postrvi pa 497 baznih parov (Priloga D).



Slika 19: Določanje prisotnosti insertov klonov s pomočjo elektroforeze PCR produktov. Inserti so vsebovali odseke promotorske regije transferinskega gena pri potočni in soški postrvi in sicer TF1 in TF2

Pri vzorcih soške postrvi smo dobili dve različni nukleotidni zaporedji, ki sta se razlikovali na šestih točkovnih polimorfizmih (slika 20). Ob primerjavi teh dveh sekvenc s sekvencami

atlantskega lososa smo ugotovili, da ena pripada različici TF1 in druga različici TF2. Poleg točkovnih polimorfizmov so se te sekvene razlikovale tudi v številu CA ponovitev v mikrosatelitu, glede na to smo pri vsaki TF-različici opazili dve različni dolžini inserta (dva alela): pri TF1 8 ponovitev pri klonu 40 ter 16 pri klonu SS2; pri TF2 pa 8 ponovitev pri klonu 13 ter 21 ponovitev pri klonu SS1 (slika 20).

```

-378
>40 CTACACATTGCTCAACATTTGATTAGTAGTGTGACTATGCTGAAACACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTGAATAACAGTTGAAAAA
>SS2 CTACACATTGCTCAACATTTGATTAGTAGTGTGACTATGCTGAAACACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTGAATAACAGTTGAAAAA
>SS1 CTACACATTGCTCAACATTTGATTAGTAGTGTGACTATGCTGAAACACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTGAATAACAGTTGAAAAA
>13 CTACACATTGCTCAACATTTGATTAGTAGTGTGACTATGCTGAAACACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTGAATAACAGTTGAAAAA
*****-378

-287
>40 CATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTATTTGTAATTTCATTATGTGGAAATGCTGAAAGTCTGAGTACACACAAAACCACAC
>SS2 CATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTATTTGTAATTTCATTATGTGGAAATGCTGAAAGTCTGAGTACACACAAAACCACAC
>SS1 CATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTATTTGTAATTTCATTATGTGGAAATGCTGAAATTCTGAGTACACACAAAACCACAC
>13 CATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTATTTGTAATTTCATTATGTGGAAATGCTGAAATTCTGAGTACACACAAAACCACAC
*****-287

-196
>40 ACACACACA-----GGGAGTGAGCCCCGCGGCCACCCGCCTATGAACAAATTAAACGCGCCATGTAA
>SS2 ACACACACACACACACACACACACA-----GGGAGTGAGCCCCGCGGCCACCCGCCTATGAACAAATTAAACGCGCCATGTAA
>SS1 ACACACACACACACACACACACACACACAGGGAGTGAGCCCCGCGGCCACCCGCCTATGAACAAATTAAACGCGCCATGTAA
>13 ACACACACA-----GGGAGTGAGCCCCGCGGCCACCCGCCTATGAACAAATTAAACGCGCCATGTAA
*****-196

-105
>40 ATATTGGAAACTTCAAACAAACTATGGCTCTTTCAGCTAACGCCCACCATGGACCCAGCCTATTGGTTTCTATAAAAGCCAGA
>SS2 ATATTGGAAACTCTAAACAAACTATGGCTCTTTCAGCTAACGCCCACCATGGACCCAGCCTATTGGTTTCTATAAAAGCCAGA
>SS1 ATATTGGAAACCTAAACAAACTATGGCTCTTTCAGCTAACGCCCACCATGGACCCAGCCTATTGGTTTCTATAAAAGCCAGA
>13 ATATTGGAAACTTCAAACAAACTATGGCTCTTTCAGCTAACGCCCACCATGGACCCAGCCTATTGGTTTCTATAAAAGCCAGA
*****-105

-14 +1 +77
>40 GTTGCCTTCTAAAACGCCCTACTTTTCACTCCGGAAATTGTTGACTTGGAGACTTCGAGAACATGAAACTGCTTCTCTCAGCGCTGCT
>SS2 GTTGCCTTCTAAAACGCCCTACTTTTCACTCCGGAAATTGTTGACTTGGAGACTTCGAGAACATGAAACTGCTTCTCGTCTCAGCGCTGCT
>SS1 GTTGCCTTCTAAAACGCCCTACTTTTCACTCCGGAAATTGTTGACTTGGAGACTTCGAGAACATGAAACTGCTTCTCGTCTCAGCGCTGCT
>13 GTTGCCTTCTAAAACGCCCTACTTTTCACTCCGGAAATTGTTGACTTGGAGACTTCGAGAACATGAAACTGCTTCTCGTCTCAGCGCTGCT
*****-14 +1 +77

```

Slika 20: Nukleotidna zaporedja klonov promotorske regije transferinskega gena pri soški postrvi
Kloni po primerjavi nukleotidnega zaporedja z atlantskim lososom pripadajo TF1 (klona 40 in SS2) in TF2 (klona SS1 in 13) (priloga D).

Drugo različico (TF1 oz. TF2) pri potočni postrvi smo poskušali pridobiti z določanjem nukleotidnega zaporedja PCR produkta, pomnoženega iz genomske DNK pri dveh osebkih z nukleotidnima začetnikoma TFprom2F in TFprom2R. Dobljena zaporedja smo poravnali in primerjali z zaporedjem različice, do katere smo pršli s kloniranjem. Ugotovili smo, da je nukleotidno zaporedje dolgo 409 bp in se od sekvene klonu razlikuje v inserciji A na začetku fragmenta, štirih zamenjavah (slika 21) in v ponovitvi CA (insert CACA pri TF2).

```

>P510      -433
>P510      GAGAGCGGGCGCCAGATC
>potocna_dr5

>P510      -415
>P510      TTCCGGATGGCTCGAGTTTCAGCAAGATTGCCTGAACTACACATTGCTAACATTTGATTAGTGA
>potocna_dr5

>P510      -336 -332
>P510      TGATGACTATGCTGCAAACACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTGAAATAACAGTTGAAAAACATGAGAT
>potocna_dr5      GACTATGCTGCAA-CACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTGAAATAACAGTTGAAAAACATGAGAT
>potocna_dr5      ****
>P510      -267
>P510      ATTGCTTAATGTAGGACTATTTATTTGTGAATTTCATTATGTGAAATGTCTGAAGTCTGAGTACAC
>potocna_dr5      ATTGCTTAATGTAGGACTATTTATTTGTGAATTTCATTATGTGAAATGTCTGAATTCTGAGTACAC
>potocna_dr5      ****
>P510      -198
>P510      ACAAAACCACACACACACACACACACACACACA---GGGAGGTGAGCCCCGCGCGCCCACCCCGCTAT
>potocna_dr5      ACAAAACCACACACACACACACACACACACACACACACAGGGAGGTGAGCCCCGCGCGCCCACCCCGCTAT
>potocna_dr5      ****
>P510      -129
>P510      GAACAATTAAACGCGGCCATGTAAACATATTGGAAACTCTAAACAAACTATGGCTCTTTTCAGCTAAAGT
>potocna_dr5      GAACAATTAAACGCGGCCATGTAAACATATTGGAAACCTCTAAACAAACTATGGCTCTTTTCAGCTAAAGT
>potocna_dr5      ****
>P510      -60 +1
>P510      CAGCCCCACCATGGACCCCGCCTATTGGTTTCTATAAAAGCCAGAGTTGCCCTCTAAACCGCCCTACT
>potocna_dr5      CAGCCCCACCATGGACCCCGCCTATTGGTTTCTATAAAAGCCAGAGTTGCCCTCTAAACCGACCTGCT
>potocna_dr5      ****
>P510      +9 +77
>P510      TTTTCACTCCGGGAATTGGACTTGGAGACTTCGAGAACATGAAACTGCTTCTCGCTCAGCGCTGCT
>potocna_dr5      TTTTCACTCCGGGAATTGGACTTGGAGACTTGGAGAACATGAAACTGCTTCTCGCTCAGCGCTGCT
>potocna_dr5      ****

```

Slika 21: Nukleotidno zaporedje dela promotorske regije transferinskega gena pri potočni postrvi

Zaporedje pod imenom PS10 pripada klonu, zaporedje potocne_dr5 pa smo pridobili s pomočjo primerjave tega zaporedja z zaporedjem, ki smo ga pridobili s TFprom2F in TFprom2R začetniki. Zgolj po primerjavi nukleotidnega zaporedja z atlantskim lososom pripadajo nukleotidno zaporedje klena PS10 različici TF1, nukleotidno zaporedje potocna_dr5 pa TF2.

Preglednica 4: Primerjava dobljenih nukleotidnih zaporedij promotorske regije in skupnih razlik pri atlantskemu lososu (BAC-i; TF1 in TF2), soški postrvi (kloni 40, SS2, SS1, 13) ter potočni postrvi (klon PS10 ter vzorec Dr5)

	- 22 4	- 208	CA(od -160 dalje)	- 152	- 117	-95 do -91	-79	-42	+1	+4	+30	+40	+	62
TF1	G	/	6	A	G	CCCT	C	G	G	A	T	C	C	
TF2	T	A	12	C	A	CCCT	G	C	A	G	A	G	G	
Soška TF1, klon 40	G	A	8	C	G	CTTC	C	C	G	A	T	C	C	
Soška TF1, klon SS2	G	A	16	C	G	CTCT	C	C	G	A	T	C	G	
Potočna TF1, klon PS10	G	A	13	C	G	CTCT	C	C	G	A	T	C	G	
Potočna TF2, Dr5	T	A	15	C	G	CCCT	C	C	A	G	T	G	G	
Soška TF2, klon SS1	T	A	21	C	G	CCCT	C	C	A	G	T	C	G	
Soška TF2, klon 13	T	A	8	C	G	CTTC	C	C	A	G	T	C	G	

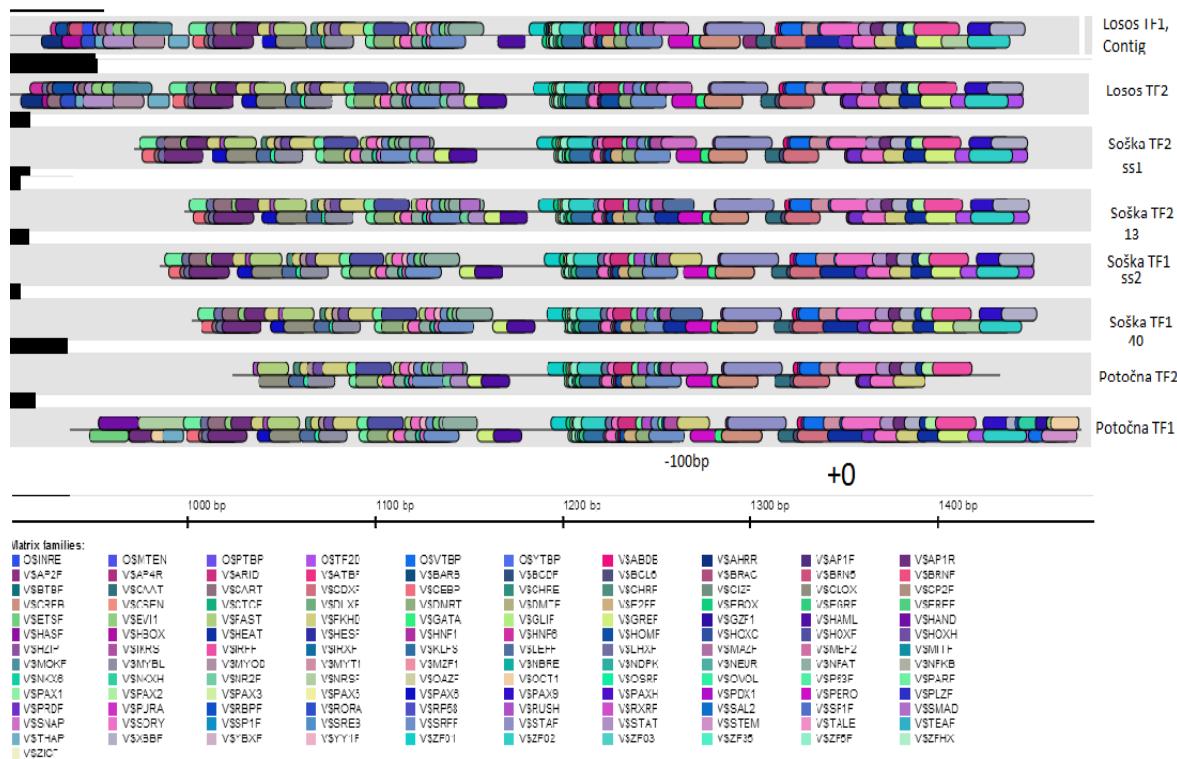
Slika 22: Primerjava nukleotidnih zaporedij dela promotorske regije (od mesta -334 do +77) soške in potočne postrvi ter atlantskega lososa oben različic transferinskega gena (TF1 in TF2).

Označene so skupne razlike in razlike, ki so značilne za posamezno vrsto.

4.1.3 Vezavna mesta za transkripcijske faktorje

Možna vezavna mesta za transkripcijske faktorje na promotorski regiji transferinskega gena smo iskali s pomočjo programa MatInspector (2013) ter jih primerjali in ročno določili potencialno pomembne transkripcijske faktorje ter določili razlike med različicama gena (TF1 in TF2).

V primeru atlantskega lososa smo opazili največ razlik v regiji -556 in -463, tukaj smo z omenjenim programom odkrili kar nekaj dodatnih potencialnih vezavnih mest pri TF2: IRFF (2×), GATA, MEF2, NR2F, SF1F in TALE ter okoli mesta -220 SMAD, STAT in NR2F. Zadnja tri vezavna mesta so bila prisotna tudi pri TF2 soške in potočne postrvi. Na tem mestu je v nukleotidnem zaporedju prisotna zamenjava in sicer gvanin pri TF1 nadomesti timin pri TF2. Okoli začetka prepisa sta prisotni dve zamenjavi nukleotidov pri TF2 vseh vrst in tam je program določil tri dodatna vezavna mesta pri TF1 in sicer HEAT, MYBL IN CIZF, pri TF2 pa naj bi se tam vezal AP1R. Pri potočni postrvi se v tej regiji dodatno veže še BARB pri TF2. V regiji okoli mesta -92 smo našli zaporedja, ki se razlikujejo v treh nukleotidih in sicer je pri večini zaporedje CCT, pri TF1 potočne postrvi in klonu z oznako SS2 (TF1, soška postrv) je TCT, pri drugem klonu soške postrvi TF1 in pri TF2 soške postrvi (klon 13) pa TTC. V tej regiji imata klona soške postrvi (po en primerek TF1 in en TF2) dodatno vezavno mesto za HEAT, ostali, torej atlantski losos in potočna postrv (oba TF1 in TF2) ter po en primerek TF1 in TF2 soške postrvi vezavno mesto za FKHD. Oba sta prepoznanata kot del večjega modela transkripcijskih faktorjev v povezavi z faktorjem CEBP, torej CEBP+FKHD ter CEBP+HEAT. Potencialna vezavna mesta za transkripcijske faktorje, ki jih je našel program MatInspector so grafično predstavljena (slika 23 in 24). Vse vrste pri obeh različicah gena v promotorski regiji vsebujejo vezavna mesta za transkripcijske faktorje CEBP, IRFF, NFKB in STAT.

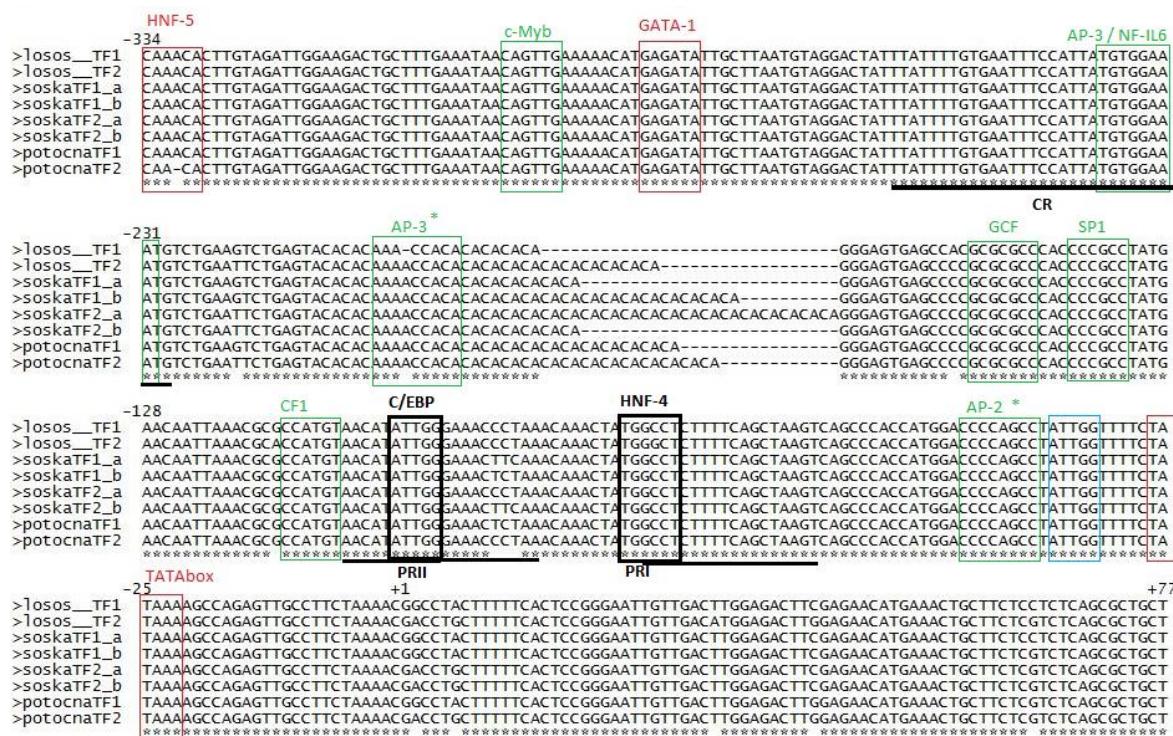


Slika 23: Potencialna vezavna mesta v promotorski regiji, ki smo jih določili s pomočjo programa MatInspector pri atlantskem lososu, soški in potočni postrvi (Matinspector, 2013)

Označeno je tudi mesto začetka prepisa, kjer se TF1 in TF2 razlikujeta v dveh nukleotidnih zamenjavah pri vseh vrstah, kar vodi do različnih vezavnih mest.

Na podlagi omenjenega programa in navedb na tem spletnem portalu so za gen za transferin pri zebričah (*Danio rerio*) pomembni naslednji transkripcijski faktorji: CEBP, IRFF, NFKB in STAT. Le-te smo našli s pomočjo programov pri vseh vrstah (potočni in soški postrvi ter atlantskemu lososu) pri obeh različicah transferinskega gena. V delu promotorske regije, za katero smo določili nukleotidno zaporedje, smo za faktor CEBP našli štiri potencialna vezavna mesta. Za faktorja NFKB in STAT smo našli po eno vezavno mesto pri vseh osebkih ter pri vseh TF2 še posebno vezavno mesto za STAT_NFKB; za faktor IRFF smo našli še dodatni dve vezavni mesti v promotorju za TF2. Vse to kaže na prisotnost dodatnih vezavnih mest za transkripcijske faktorje pri TF2 transferinskem genu pri potočni in soški postrvi ter pri atlantskemu lososu.

V okolici mest -65 in -81 smo pri vseh vrstah in obeh različicah gena poleg CEBP vezavnega zaporedja v regijah PRI in PRII našli tudi vezavno mesto za HNF-4. Obe regiji po mnenju Schaeffer in sod. (1993) igrata pomembno vlogo pri izražanju človeškega transferina. Regiji PRI in PRII sta označeni na slikah (slika 8 in 10: človeški promotor transferina).



Slika 24: Primerjava dobljenih nukleotidnih zaporedij potočne, soške postrvi in atlantskega lososa

Označene so regije, ki vežejo pomembnejše transkripcijske faktorje (črno, Brunel in sod., 1988) ter potencialna vezavna mesta zanje, ki jih je določila Kvingedal (1994). Pri slednji, kjer so ob imenih faktorjev zvezdice, so se naša dobljena zaporedja za TF1 pri atlantskem lososu razlikovala od njenih zaporedij.

4.2 ANALIZA IZRAŽANJA TRANSFERINSKEGA GENA PRI *Salmo Salar*

Vzorci RNK atlantskega lososa so imeli koncentracijo okoli 1000 ng/ μ L. Na podlagi grafov, ki nam jih je izrisal bioanalizator smo se prepričali, da v vzorcih ni veliko razgrajenih produktov, števila RIN pa nam programska oprema ni izračunala.

Uspešnost prepisa RNK v cDNA smo preverili s pomočjo treh parov začetnih oligonukleotidov, ki pomnožujejo fragmente na 'hišnih' (housekeeping) genih. To so geni, ki nosijo zapis za beljakovine, ki jih večina celic neprestano tvori. Pomnožili smo odseke genov EF1A, 18S ter β -aktina pri cDNA treh vzorcev atlantskega lososa. Na agaroznem gelu smo potrdili prisotnost cDNA oziroma odsotnost intronov ter pridobljeno cDNA uporabili za analizo izražanja transferinskih lokusov pri tej vrsti.

4.2.1 Oblikovanje TaqMan sond za qPCR

Med petim eksonom in sedmim intronom smo določili zaporedje TF1 in TF2 pri atlantskem losusu (priloga E). S pomočjo znane sekvene mRNA pri tej vrsti (Kvingedal, 1994) smo lahko natančno določili lego eksonov in intronov, ter določili kodirajočo regijo z največ razlikami. Sondo smo nato postavili na mejo med šestim in sedmim eksonom.

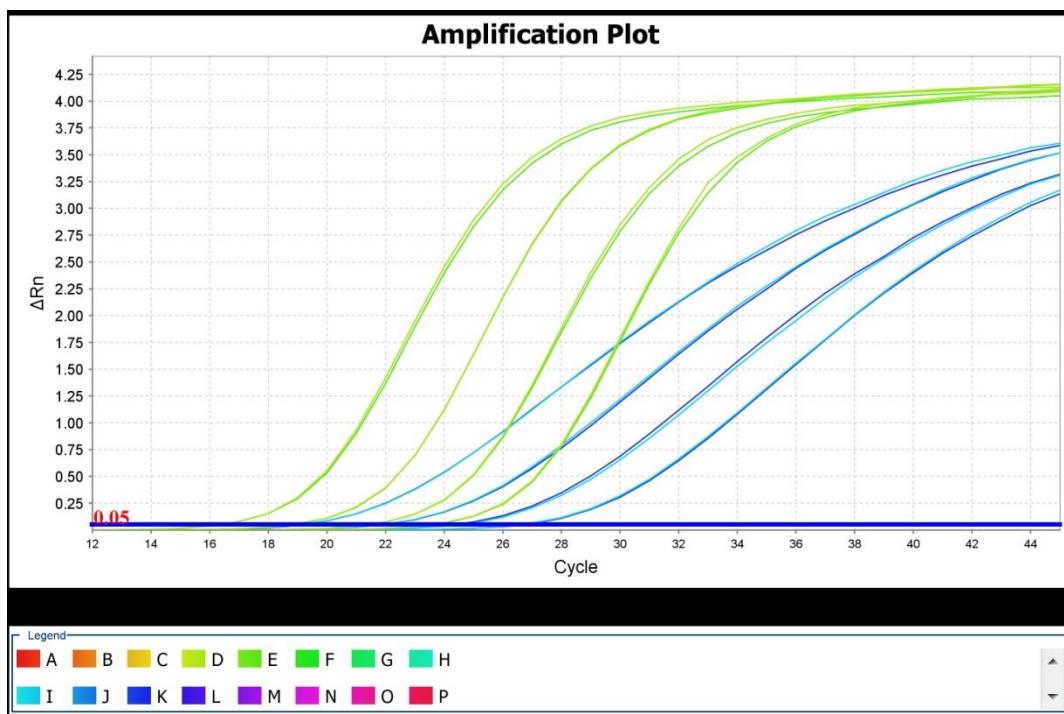
Začetna oligonukleotida se med razlicicama TF1 in TF2 nista razlikovala, sondi pa sta se razlikovali v treh nukleotidih (dva v šestem in eden v sedmem eksonu):

TF1 TaqMan sonda CAAGCCCCCTGGCTGTACCT-GCCGCAGA
ekson 6 ekson 7

TF2 TaqMan sonda CAATCCCCCTGGCTGTGCCT-GCCCCAGA

4.2.2 Izražanje transferinskih genov

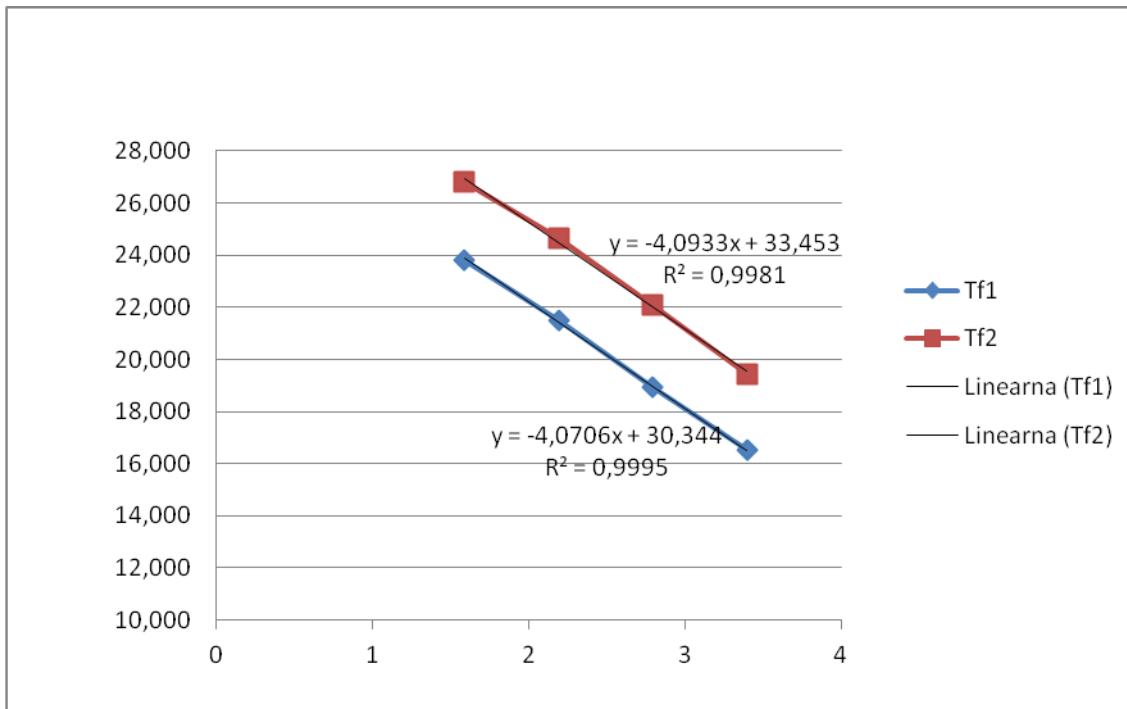
Pri vseh redčitvah vzorcev je PCR produkt gena TF1 dosegel linijo fluorescentnega praga pred PCR produkтом gena TF2 (slika 25). V programu smo nastavili avtomatsko bazno linijo, medtem ko smo prag nastavili ročno. Na podlagi tega je program za vsako reakcijo posebej izračunal, v katerem ciklu je ΔRn presegel nastavljen prag (Ct). Vrednost Ct je bila obratno sorazmerna začetni količini tarčne cDNK/RNK, zato smo jo lahko uporabili za izračun začetne količine cDNK oz. RNK določenega amplifikona v vzorcu. Vrednosti Ct smo prenesli v program Microsoft Excel (Microsoft), kjer smo izračunali povprečne vrednosti Ct vzorca iz dveh oz. treh ponovitev in razliko vrednosti Ct med dvema zaporednima redčitvama. Izračunali smo tudi razliko Ct med prvo in zadnjo redčitvijo ter s pomočjo logaritemsko teoretične koncentracije izračunali naklone premic in učinkovitost pomnoževanja.



Slika 25: Krivulja pomnoževanja v PCR v realnem času

Graf predstavlja spremembe Rn v odvisnosti od cikla. Programska oprema izriše Rn (normalizirano fluorescenco reporterskega barvila) kot funkcijo cikla in sicer z zeleno barvo povprečje različnih redčitev vzorcev pri genu TF1, z modro barvo pa TF2.

Vključili smo rezultate PCR v realnem času, dobljene z redčenjem cDNK v razmerju 1/16, 1/64 in 1/256 v treh ponovitvah za tri vzorce in dva gena (TF1 in TF2), ki smo ju primerjali. Rezultate neredčenega vzorca in vzorca redčenega $\frac{1}{4}$ smo izločili, saj so imeli velik standardni odklon (prisotnost zaviralcev). Z absolutnimi vrednostmi omenjenih redčitev (logaritemske vrednosti) smo narisali graf v odvisnosti Cq (slika 26).



Slika 26: Logaritemske vrednosti absolutnih količin produktov v odvisnosti od Cq oz. standardni krivulji TF1 in TF2, pri katerih smo upoštevali povprečja treh vzorcev in štiri redčitve

Na grafu smo lahko ocenili približno učinkovitost pomnoževanja, nato pa smo jo še izračunali s pomočjo naklona krivulje. Naklon premic ali 'slope' (k) smo izračunali po formuli:

$$\text{Slope} = \frac{Cq_1 - Cq_2}{\log 1 - \log 2}$$

Učinkovitost pomnoževanja (E) smo izračunali po formuli:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Presečišče premic (n) smo izračunali s pomočjo programa Excel in tako smo lahko izračunali logaritemsko število kopij (LŠK) po naslednji enačbi:

$$L\check{S}K = \frac{Cq - n}{k}$$

Teoretično absolutno količino produktov v vzorcih posameznih redčitev smo s pomočjo logaritemskoga števila kopij izračunali za oba gena in ju primerjali med sabo.

Z izračunom naklona premic smo potrdili pravilnost izvedbe PCR v realnem času in izračunali uspešnost pomnoževanja (preglednica 5). Pri vzorcih 1 in 3 sta bili uspešnosti pomnoževanja precej podobni, pri drugem vzorcu pa sta se razlikovali v približno 5 %.

Preglednica 5: Rezultati PCR v realnem času: naklon krivulje, s pomočjo katerega smo izračunali učinkovitost pomnoževanja (E) ter logaritemsko število kopij produktov TF1 in TF2

	Vzorec 1		Vzorec 2		Vzorec 3	
	TF1	TF2	TF1	TF2	TF1	TF2
Naklon krivulje (k)	-3,81	-3,9	-3,74	-3,88	-3,9	-3,95
Učinkovitost pomnoževanja (E, %)	82,85	79,89	85,17	80,54	80,59	79,22
Presečišče (n)	32,816	29,91	29,64	32,9	30,27	33,58

Izračunali smo razliko v izražanju genov z uporabo relativne kvantifikacije in metode standardne krivulje, kot je opisano v nadaljevanju. Za vsak vzorec smo izračunali logaritemsko število kopij, ki je predstavljalo oceno količine pomnoženih produktov. Pri izračunu števila kopij smo pri genu TF2 upoštevali standardno krivuljo gena TF1 ter oba gena primerjali med sabo. Pri prvem vzorcu je bilo pri genu TF1 6,33 krat več kopij, pri drugem 6,01 krat več ter pri tretjem vzorcu 6,61 več kopij. V povprečju je pri genu TF1 bilo $6,32 \pm 0,299$ več produktov pomnoževanja kot pri TF2.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Podvojenost transferinskega lokusa pri *Salmo Sp.*

Naši rezultati so v skladu z opažanji nekaterih raziskovalcev, ki so poročali o podvojenosti transferinskega lokusa pri lososu in postrvi. Pri določanju nukleotidnega zaporedja smo namreč prišli do dveh različnih zaporedij promotorske regije pri atlantskem lososu, potočni in soški postrvi. To je skladno z rezultati raziskav teh vrst rib (Rozman in sod., 2008; Kvingedal in Rørvik, 1993; Antunes in sod., 2006; Andersen in sod., 2011) pa tudi z rezultati pri atlantski trski (Andersen in sod., 2011). Vzrok nastanka podvojenega gena za transferin, ki je sestavljen iz dveh domen, je najverjetneje neenakomerno prekrižanje.

Prisotnost podvojenih genov je lahko za organizem koristna zaradi dodatnih količin beljakovin ali RNK produktov. Dodatne količine transferinske beljakovine so za organizem vsekakor prej korist kot slabost, saj je transferin zadolžen za prenos železa, shranjevanje in uporabo v presnovnih procesih, kot so sinteza DNK, prenos kisika in elektronov, rast celic in regulacija imunskega sistema. Pomembno je povezan z odpornostjo proti okužbam in kontrolo razvoja bakterij (Sun in sod., 2012; Bullen in sod., 2006; Woo in Ardelli, 2014). Teehan in sod. (2004) so naprimer dokazali, da velike količine prostega železa spodbujajo rast patogenih organizmov. Zato sposobnost transferina za vezavo železa in posledično onemogočanje širjenja patogenov, prikazuje to beljakovino kot antimikrobno sredstvo, ki ima pomembno vlogo v imunskem sistemu pri ribah (Farnaud in Evans, 2003). V raziskavah so dokazali povečano izražanje transferinskega gena pri infekciji kanalskega soma (Peatman in sod., 2008), atlantskega lososa (Easy in Ross, 2009) in pri vakcinaciji polenovke (Atlantic cod, Caipang in sod., 2008). Veliko študij poroča o povečanem izražanju transferina ob okužbi z različnimi patogeni (atlantski losos: Braceland in sod., 2013; brancin: Ercan in sod., 2011). Povečanje izražanja transferina kot tudi podvojenost gena, ki doprinaša dodatne količine tega produkta, pomeni za organizem torej dodatno imunološko zaščito, boljši imunski odziv ter s tem evolucijsko prednost.

Podvojen gen lahko postopoma preide v psevdogen, ki se ne izraža ali pa nima funkcije. Relativno mlade psevdogene prepoznamo po njihovem nukleotidnem zaporedju, ki se ne razlikuje veliko od gena iz katerega izhajajo (Zhang, 2003). Ob primerjavi nukleotidnih zaporedij TF1 in TF2 pri postrvih opazimo le malo razlik, zato je tudi možnost, da se pri TF2 od podvojitve dalje mutacije ne kopičijo prosto in so pod selekcijskim vplivom. To bi lahko razložilo tudi nekaj spremenjenih aminokislin pri TF2, ki so jih dokazali Rozman in sod. (2008) in Kvingedal in Rørvik (1993). Maloštevilne razlike lahko nakazujejo na to, da ima TF2 še vedno funkcijo in zato ni prišlo do velikih razlik v nukleotidnem zaporedju. Nekaj avtorjev pa navaja, da lahko le ena sprememba na vezavnem mestu za železo povzroči nezmožnost transferina za vezanje železa (He in sod., 1997; Lamber in sod., 2005b; Mohd-Padil in sod., 2012). Ali se TF2 gen spreminja v psevdogen ali ostaja fiksiran, zgolj na podlagi nukleotidnih zaporedij ni mogoče doreči. Lahko pa bi to sklepali na podlagi razlike v izražanju gena TF1 in TF2.

5.1.2 Izražanje transferinskih genov pri *Salmo Sp.*

Do sedaj sta bili znani le dve različni študiji, ki preučujeta izražanje genov TF1 in TF2 pri postrvih. Študija na atlantskem lososu (Kvingedal in Rørvik, 1993) je pokazala enako izražanje obeh genov, študija na soški in potočni postrvi (Rozman in sod., 2008) pa je pokazala, da se je TF1 pri vseh analiziranih vzorcih postrvi izražal močneje kot TF2. Prav tako smo do enakega rezultata prišli z našo raziskavo pri atlantskem lososu. S PCR v realnem času smo namreč pokazali, da je produkta pomnoževanja gena TF1 v povprečju šestkrat več kot produkta gena TF2. Ta rezultat lahko razloži tudi to, zakaj v predhodnih analizah cDNK pri salmonidih niso našli dvojnega transferinskega lokusa (Tange in sod., 1997; Lee in sod., 1998; Ford in sod., 1999). Zaradi slabšega izražanja TF2 v mRNA prevladuje TF1, zaradi česar pri pomnoževanju v reakcijah PCR dobimo produkte, med katerimi prevladuje TF1, in posledično pri določanju nukleotidnega zaporedja TF2 ne moremo zaznati. Pri raziskavi na potočni in soški postrvi so prišli do precej večje razlike v izražanju med TF1 in TF2 (Rozman in sod., 2008), večja pa so bila tudi odstopanja ob primerjavi vzorcev. To bi lahko razložili s tem, da so bili vzorci iz različnih okolij, saj lahko zunanji dejavniki vplivajo na različno ekspresijo, kot tudi sama starost ribe. Pri našem poskusu takih razlik ni bilo, saj smo imeli vzorce iz istega okolja, kar potrjuje domnevo, da zunanji dejavniki vplivajo na ekspresijo.

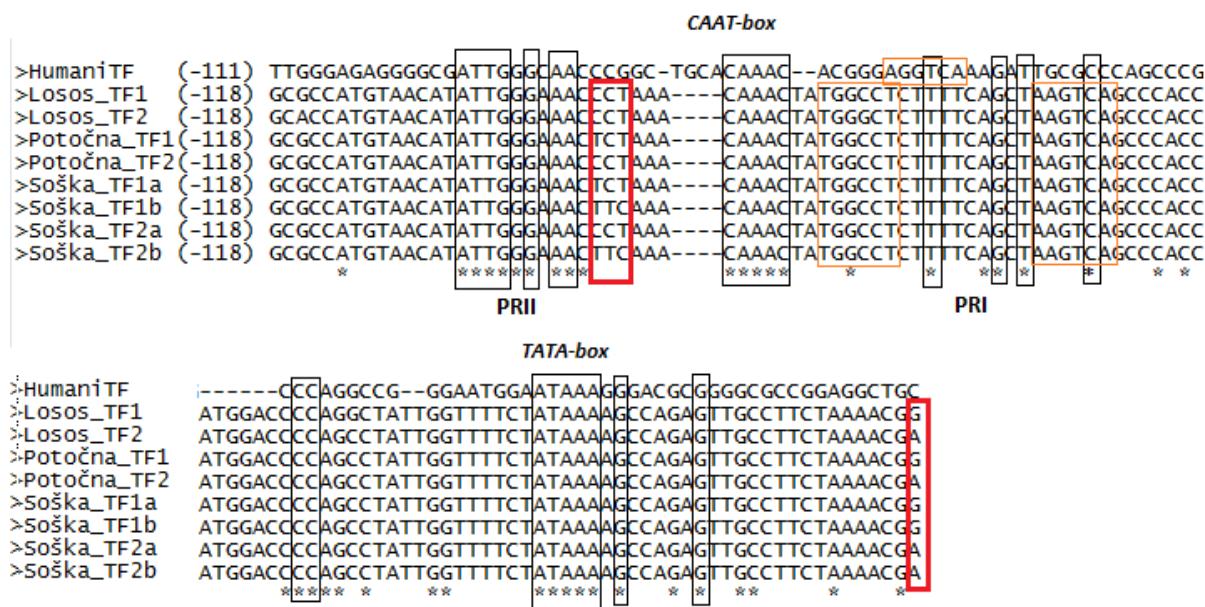
Rozman (2008) je dokazala, da sta pri TF2 spremenjeni dve aminokislini, ki sodelujeta pri vezavi železa, kar mogoče kaže na spremenjeno oz. zmanjšano vlogo te različice pri vezavi železa. Vendar pa hkrati poudarja, da se čitalni okvir do sedaj preučevanih transferinskih cDNK TF1 in TF2 pri postrvih in atlantskemu lososu ni bistveno spremenil (Rozman, 2008; Kvingedal in sod., 1993) in zato je moč sklepati, da je razlika v stopnji izražanja TF1 in TF2 odvisna predvsem od aktivnosti promotorjev obeh genov (Rozman, 2008). V raziskavi Kvingedal (1994), kjer so se osredotočili na promotorski regiji TF1 in TF2, so odkrili minimalne razlike v tej regiji. V naši raziskavi smo uspeli pomnožiti različno dolge dele promotorske regije pri soški in potočni postrvi ter atlantskem lososu in prišli do podobnih rezultatov. Pri vseh vrstah so se zaporedja med TF1 in TF2 razlikovala v 4 zamenjavah v regiji od -334 do +77. Pri atlantskem lososu je v enaki regiji prisotna dodatna delecija pred mikrosatelitom ter 6 zamenjav, pri postrvih pa dodatno 3 zamenjave. Dlje od mesta -334 nam je uspelo priti le pri atlantskem lososu in ob primerjavi TF1 in TF2 se na tem mestu pri TF1 začenjajo ponavljaljoča zaporedja 37 bp dolgega motiva. Pri TF2 ponavljaljočih zaporedij ni, pomnožen je bil del, ki se najbolj verjetno pri TF1 nahaja pred ponovitvami.

5.1.3 Potencialna vezavna mesta za transkripcijske faktorje

Ob primerjavi dobljenih zaporedij TF1 in TF2 promotorske regije opazimo nekaj razlik v nukleotidnem zaporedju pri soški in potočni postrvi. V regiji PRII ima soška postrv dve različni zaporedji, in sicer se pri TF1b in TF2b nahaja dodatno vezavno mesto za HEAT, pri TF1a in TF2a ter ostalih vrstah (atlantski losos in potočna postrv) pa vezavno mesto za FKHD. Oba, tako HEAT in FKHD, sta prepoznan kot del večjega modela transkripcijskih faktorjev v povezavi z faktorjem C/EBP (Matinspector, 2013). C/EBP transkripcijski faktorji so člani družine levcinskih zadrg (Lamb in McKnight, 1991), ki pomagajo pri organizaciji izražanja beljakovin, ki so potrebne v različnih tkivih (Schaeffer in sod., 1993). Povezava med dvema vezavnima mestoma imenovanima PRI in PRII, ki se povežeta s transkripcijskima

faktorjem HNF4 in C/EBP α v regiji od -125 do +1, omogoča izražanje gena in ta naj bi bila edino nujna za aktivacijo prepisa transferinskega gena (Schaeffer in sod., 1993).

Ob primerjavi dela promotorske regije transferinskega gena s človekom, je Kvingedal (1994) našla omenjeno zaporedje PRII pri atlantskem lososu, ki zelo verjetno veže C/EBP družino transkripcijskih faktorjev. Nukleotidna sekvenca te regije je pri atlantskem lososu v primerjavi s človekom enaka v 11 nukleotidih in vključuje tudi CCAAT zaporedje (slika 27). To ob dejstvu, da obstajajo homologi C/EBP transkripcijskih faktorjev pri daljno sorodnih vrstah, kot sta človek in kokoš (Faisst in Meyer, 1992), nakazuje, da tudi pri atlantskem lososu obstaja C/EBP faktor, ki se veže v regiji okoli -100 (Kvingedal, 1994).

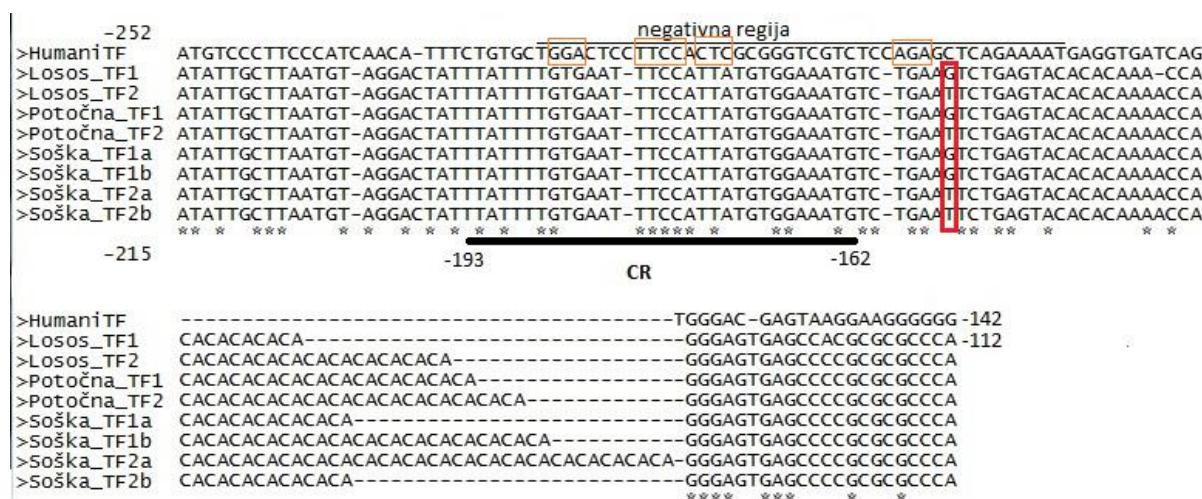


Slika 27: Primerjava nukleotidnih sekvenč del promotorjev gena za transferin pri človeku (Lucero in sod., 1986) in TF1 in TF2 rib iz rodu *Salmo* (atlantski losos, potočna in soška postri) z označenimi regijami PRII in PRI, ki se nahajajo v regiji -118 in +2 (Kvingedal, 1994; Brunel in sod., 1988)

Rdeče označene so razlike med TF1 in TF2, oranžno pa je označen motiv AGGTCA, ki pripada vezavnemu zaporedju HNF-4.

Regija PRI, ki vsebuje motiv AGGTCA, le-ta je del vezavnega zaporedja HNF-4 (Schaeffer in sod., 1993), je pri atlantskem lososu nekoliko spremenjena v primerjavi s človekom. Nahaja se na mestu -65 ter ima zaporedje AAGTCA, na mestu -81 se nahaja tudi komplementarno zaporedje TGGCCT in obe bi lahko vezali HNF-4 homologa (Kvingedal, 1994). V regiji PRI pri proučevanih vrstah rodu *Salmo* ni razlik v nukleotidnem zaporedju, le pri TF2 atlantskega lososa se prvi C zamenja v G. Zaradi teh opažanj bi lahko trdili, da ni bistvenih razlik v regijah PRI in PRII pri TF1 in TF2, zaradi katerih bi lahko prišlo do različnega izražanja gena pri postrveh.

Primerjali smo tudi CTF/NFI vezavno regijo (CR regijo), ki so jo našli v promotorski regiji transferinskega gena pri človeku (Brunel in sod., 1988). CTF/NFI faktor ima zaporedje 5' TCCA/CN₅GCCAAT 3', pri človeku pa so dokazali vezavo CTF/NFI tudi na 5' TGGAN₅TCCACT 3' zaporedje. Pri vrstah rodu *Salmo* se zaporedje razlikuje in sicer z insertom T pred drugim G in zamenjavo zadnjega C v T (slika 28). Na podlagi tega bi lahko sklepali, da se na CR regijo pri tem rodu rib veže tudi CTF/NFI transkripcijski faktor.



Slika 28: Primerjava nukleotidnih sekvenc dela promotorske regije CR humanega transferinskega gena in TF1 in TF2 rib iz rodu *Salmo* (atlantski losos, potočna in soška postrv)

CR regija pri človeku vsebuje vezavno mesto za CTF/NFI faktor (Brunel in sod., 1988) ter negativno regijo podobno genom c-myc in β -interferon (podobni nukleotidi so označeni z oranžno, Schaeffer in sod., 1989).

Schaeffer in sod. (1989) so v tej regiji opisali element, ki naj bi negativno vplival na prepis in je na sliki (slika 28) označen kot negativna regija (pri človeku -187 do -145), ki je zelo podobna negativnim regulatornim sekvencam genov c-myc in β -interferon (Hay in sod., 1987; Goodburn in sod., 1986). Nukleotidov, ki bi pri rodu *Salmo* bili podobni genom c-myc in β -interferon, v tej regiji nismo našli, razen zaporedja TTCC; se pa zaporedja TF1 in TF2 v tej regiji razlikujejo v zamenjavi enega nukleotida (slika 28, rdeče označeno).

Ob določanju nukleotidnega zaporedja dlje od te regije smo po -417 mestu pri TF1 atlantskega lososa našli tandemske ponovitve 37 bp dolgega motiva. Pri TF2 smo prišli dlje od ponavljačih motivov zato smo sklepali, da je pomnožen del tudi pri TF1. Tako smo v tem delu pri TF2 določili pet dodatnih potencialnih vezavnih mest (dva IRFF, GATA, MEF2, NR2F, SF1F in TALE), ki se najverjetneje nahajajo tudi pri TF1 in sicer pred ponavljačimi motivi. Ob poravnavi s humanim promotorjem smo v tej regiji, ki so jo Brunel in sod. (1988) poimenovali DRI, našli pri atlantskem losusu TF1 okoli mesta -521 zaporedji ACCTTG in AGC, ki se nahajata v regiji DRI pri humanem promotorju, ki predstavlja vezavno mesto za transkripcijske faktorje, vendar naj bi le-ta ne bila esencialna za izražanje transferinskega gena (Schaeffer in sod., 1993).

Zgolj ob primerjavi transkripcijskih faktorjev med TF1 in TF2 v proučevani promotorski regiji ni mogoče sklepati o aktivnosti promotorjev. Studije so dokazale, da se TF1 izraža v večji meri kot TF2. Ali je to zaradi ene zamenjave nukleotida v regiji CR, ali drugih manjših sprememb v promotorski regiji, ki pa so izven dokazanih pomembnih regij (PRI, PRII) in za katere smo s programom MatInspector pokazali, da so potencialna vezavna mesta za različne transkripcijske faktorje ob primerjavi TF1 in TF2, brez eksperimentalnih dokazov ni mogoče doreči. Če upoštevamo dokaze, da je za izražanje transferinskega gena esencialen le krajši del promotorske regije pred mestom prepisa (Brunel in sod., 1988; Schaeffer in sod., 1993), daljša regija pred začetkom prepisa na izražanje nima vpliva, vseeno pa bi bilo za potrditev potrebno določiti daljše nukleotidno zaporedje promotorske regije obeh genov.

5.1.4 Ponavlajoča zaporedja v promotorski regiji

Mikrosateliti v promotorjih (tandemske ponovitve, ki vsebujejo od enega do šest nukleotidov v podenoti) imajo sposobnost tvorjenja različnih sekundarnih DNK struktur, za katere je znano, da sodelujejo pri uravnavanju izražanja genov. Vedno več študij dokazuje, da sprememba v dolžini ponavlajočih zaporedij lahko vpliva na uravnavanje izražanja genov (Sawaya in sod., 2012).

V promotorski regiji transferinskega gena smo našli mikrosatelist AC (GT) po mestu -160, ki se je razlikoval v dolžini tako med različicama TF1 in TF2 kot med različnimi vrstami, in satelitno sekvenco 37 baznih parov dolgega motiva od -416 mesta dalje le pri TF1 transferinskega gena.

Mikrosatelist AC/GT lahko tvori Z-DNK (levosučen dvojni 'helix'; Wang in Vasquez, 2007) in to je drugi najpogosteji mikrosatelist, ki se nahaja v promotorskih regijah (Sawaya in sod., 2013). Motiv AC se pri atlantskem lososu v promotorski regiji na omenjenem mestu pri TF2 ponovi večkrat in med vrstami, kakor tudi med osebki znotraj vrste obstajajo razlike. Glede na to lahko potrdimo, da je ta odsek visoko polimorfen, če pa vpliva na izražanje transferinskega gena ni mogoče potrditi.

Pri atlantskem lososu se pri TF1 po -416 mestu ponavlja 37 bp dolg motiv, ki vsebuje TATA box in pri TF2 v znani regiji ni prisoten. Morda se pri TF2 nahaja dlje od regije -400 in opravlja isto funkcijo kot pri TF1, v nasprotnem primeru pa bi lahko ponavlajoči motiv vplival na povečano izražanje gena TF1.

5.1.5 MikroRNK

Kot možen vzrok različnega izražanja obeh transferinskih genov pri postrvih pa ne smemo prezreti potencialnega vpliva mikro RNK. MikroRNK ali miRNK je obširna skupina manjših endogenih RNK molekul. Regulirajo izražanje genov v sklopu miRNK induciranega utiševalnega mehanizma (miRISC), in sicer po prepisu/transkripciji, z vezavo na specifična nukleotidna zaporedja mRNK tarčnih genov. Vezava miRISC na mRNK zmanjšuje izražanje gena ali z zaviranjem prevajanja/translacija ali z razgradnjo tarčnega gena (Chekulaeva in Filipowicz, 2009; Bartel, 2004). Večina zrelih miRNK je dolgih 20 do 24 nukleotidov (nt), medtem ko so prekurzorji miRNK običajno dolgi med 60 in 80 nt in imajo sekundarno strukturo zanke (Winter in sod., 2009). Dokazali so jima pomembno vlogo pri raznih bioloških procesih, saj regulirajo izražanje genov, ki služijo časovni kontroli razvoja, rasti, delitvi izvornih celic in apoptozi (Bushati in Cohen, 2007; He in Hannon, 2004).

Literature o miRNK pri atlantskem lososu ni veliko, prav tako ne o njihovi regulatorni vlogi pri rasti in imunskejem sistemu (Andreassen in sod., 2013). Dokazali so ohranjenost heptamerov, identičnih zanim miRNK vezavnim mestom v 3' nekodirajoči regiji (UTR) genov (Andreassen in sod., 2009) in na podlagi homologije z '*in silico*' študijami navajajo obstoj številnih zapisov za miRNK v genomu lososa (Barozai, 2012). Zaradi teh dokazov lahko sklepamo, da je tudi pri atlantskem lososu miRNK pomemben regulator, ki nadzira izražanje velikega dela genov, ki kodirajo beljakovine (Andreassen in sod., 2013).

V raziskavi so Andreassen in sod. (2013) pri atlantskem lososu določili 180 različnih evolucijsko ohranjenih miRNK in 13 različnih še neznanih miRNK. Od novih miRNK, ki so jih odkrili, so našli tudi homologa (97 %) v sedmem intronu transferinskega gena pri kraljevem lososu (*Oncorhynchus tshawytscha*, Genbank: AH008271). Primerjave med TF1 in TF2 za omenjeno miRNK nismo mogli narediti, saj smo imeli dostopno le cDNK te regije pri atlantskem lososu, potočni in soški postrvi. Potrebno bi bilo določiti nukleotidno zaporedje obeh kopij gena v sedmem intronu in se prepričati ali miRNK sodelujejo pri regulaciji izražanja transferinskih lokusov.

5.2 SKLEPI

- Največ dokazov za podvojen transferinski lokus pri salmonidih je pri atlantskem lososu, dokazali so ga tudi pri soški in potočni postrvi
- Dodatne količine transferina so za organizem prednost, saj je transferin zadolžen za prenos, shranjevanje in uporabo železa v pomembnih presnovnih procesih, povezan je tudi z odpornostjo proti okužbam in kontrolo razvoja bakterij
- Podvojen gen za transferin (TF2) se na podlagi jakosti izražanja v primerjavi z TF1 postopoma spreminja v psevdogen
- Različna raven izražanja TF2 bi lahko bila posledica ali nekaj zamenjanih nukleotidov v promotorski regiji ali miRNK znotraj sedmega introna

6 POVZETEK

Družina salmonidov združuje sladkovodne in anadromne vrste rib, ki so bile podvržene tetraploidizaciji in tako imajo dvakrat večji genom kot druge rive. Eden izmed rodov te družine je rod *Salmo*, v katerega spadajo atlantski losos in naslednje postrvi: potočna, mehkoustna, ohridska belvica in soška ali marmorirana postrv. V nalogi smo preučevali gen za transferin pri atlantskem lososu, potočni in soški postrvi. Funkcija transferina je prenos železa, njegovo shranjevanje in uporaba v presnovnih procesih, kot so sinteza DNK, prenos kisika in elektronov, rast celic in regulacija imunskega sistema (Baker in sod., 2003). Povezan je z odpornostjo proti okužbam in kontrolo razvoja bakterij (Sun in sod., 2012). Gen za transferin se je razvil s podvojitvijo starodavnega gena, ki je imel le eno vezavno mesto za železo (MacGillivray in sod., 1982) z neenakim prekrižanjem kromosomov. Tako je nastal tudi drugi gen za transferin (TF2), ki so ga dokazali pri nekaterih salmonidnih ribah. Največ dokazov za podvojen transferinski lokus pri salmonidih je pri atlantskem lososu (Kvingedal in Rørvik, 1993; Kvingedal, 1994; Rozman in sod., 2008; Antunes in sod., 2006). Dokazi za podvojen lokus so tudi pri soški in potočni postrvi (Rozman in sod., 2008) ter drugih vrstah rib kot je atlantska trska (Andersen in sod., 2011).

Podvojitev genov je pri evoluciji primitivnih organizmov prispevala k novim biokemijskim mehanizmom, ki so omogočali razvoj kompleksnejših organizmov. Podvojitev genetskega materiala poleg nastanka več genov z isto funkcijo lahko vodi tudi do ojačitve znotraj regije gena, ki poveča izražanje beljakovinskega produkta s povečanjem števila aktivnih mest (Bowman in sod., 1988). Gen, ki nastane s podvojitvijo, se lahko v populaciji izgubi ali fiksira (Kimura, 1983). Tudi, ko se gen fiksira, je njegovo izražanje in nadaljnja usoda odvisna predvsem od njegove funkcije (Nei in Sod, 2000). Dodatne količine transferina bi bile za organizem prednost, saj je transferin zadolžen za prenos, shranjevanje in uporabo železa v pomembnih presnovnih procesih, povezan je tudi z odpornostjo proti okužbam in kontrolo razvoja bakterij (Sun in sod., 2012; Bullen in sod., 2006). Pri genu za sintezo transferina so odkrili precej višjo stopnjo evolucije na nesinonimnih mestih kot na sinonimnih, kar so Ford in sod. (1999) opisali kot pozitivno selekcijo. Do pozitivne selekcije bi lahko prišlo zaradi selektivnega pritiska patogenih bakterij na transferin. Tako so aminokisline na površini transferinske beljakovine, ki so izpostavljene stiku z bakterijskimi beljakovinami, bolj podvržene pozitivni selekciji kot aminokisline v notranjosti beljakovine (Ford in sod., 1999). Enako so odkrili tudi pri TF2 (Rozman in sod., 2008), kar kaže na podoben vzorec selekcije kot pri TF1. Kljub izredno visoki polimorfnosti genov za sintezo transferina je več avtorjev odkrilo, da so pri transferinu ohranjene vse aminokisline, ki sodelujejo pri vezavi železa (Rozman in sod., 2008; Kvingedal in Rørvik., 1993). Rozman in sod. (2008) pa so ugotovili še, da sta pri TF2 spremenjeni dve aminokislini, ki sodelujeta pri vezavi železa, kar bi po njihovem mnenju morda kazalo na njegovo spremenjeno ali zmanjšano funkcijo pri vezavi železa.

Gen lahko po podvojitvi postopoma preide v psevdogen, ki se ne izraža ali pa nima funkcije. Relativno mlade psevdogene prepoznamo po njihovem nukleotidnem zaporedju, ki se ne razlikuje veliko od gena iz katerega izhajajo (Zhang, 2003). Ob primerjavi nukleotidnih zaporedij dela promotorske regije TF1 in TF2 opazimo le malo razlik, zato je tudi možnost, da TF2 od podvojitev dalje ne izgublja svoje funkcije. Ali se gen spreminja v psevdogen ali

ostaja fiksiran, zgolj na podlagi nukleotidnih zaporedij ni mogoče doreči. Lahko pa bi to sklepali na podlagi razlike v izražanju genov TF1 in TF2.

Dokazali smo namreč, da se gen TF2 pri atlantskem lososu izraža kar 6× manj v primerjavi s TF1, kar je v nasprotju z raziskavo Kvingedal (1994) ter skladno z raziskavo na soški in potočni postrvi (Rozman, 2008) ter raziskavo na atlantski trski (Andersen in sod., 2011). Očitno se TF2 izraža šibkeje kot TF1. Če je to posledica le nekaj zamenjanjih nukleotidov v promotorski regiji ne moramo zagotovo trditi. Lahko bi bila tudi posledica miRNK, ki so jo dokazali znotraj sedmega introna gena TF2 pri kraljevem lososu. Le-ta bi namreč lahko zavirala izražanje tega gena ali pa so za različno raven izražanja odgovorne razlike v intronih, za katere nimamo znanega zaporedja.

7 VIRI

- ABI PRISM. 2004. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. Applied biosystems. 64 str.
http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/performing_rq_gene_exp_rtpcr.pdf
(1.8.2015)
- Allendorf F.W., Thorgaard G.H. 1984. Tetraploidy and the evolution of Salmonid fishes. V: Evolutionary Genetics of fishes. Turner B.J. (ed.). Virginia, Plenum Press: 1-53
- Andersen Ø., DeRosa M.C., Pirolli D., Tooming-Klunderud A., Petersen P.E., Andre C. 2011. Polymorphism, selection and tandem duplication of transferrin genes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) – Conserved synteny between fish monolobal and tetrapod bilobal transferrin loci. BMC Genetics, 12, 51: 14 str.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/12/5> (10. avg. 2015)
- Anderson F.B., Baker H.M., Dodson E.J., Norris G.E., Rumball S.V., Waters J.M., Baker E.N. 1987. Structure of human lactoferrin at 3.2-A resolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 84: 1769-1773
- Andreassen R., Lunner S., Hoyheim B. 2009. Characterization of full-length sequenced cDNA inserts (FLICs) from atlantic salmon (*Salmo salar*). BMC Genomics, 10, 502: 11 str.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/502> (15.6.2015)
- Andreassen R., Worren M.M., HØyheim B. 2013. Discovery and characterization of miRNA genes in atlantic salmon (*Salmo salar*) by use of a deep sequencing approach. BMC Genomics, 14: 11 str.
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2164-14-482.pdf> (10. avg. 2015)
- Antunes A., Gharbi K., Alexandrino P., Guyomard R. 2006. Characterization of transferrin-linked microsatellites in brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). Molecular ecology notes, 6, 2: 547-549
- Baker H.M., Anderson B.F., Baker E.N. 2003. Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100: 3579-3583
- Barnes D., Sato G. 1980. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. Analytical Biochemistry, 102: 255-270
- Barozai M.Y. 2012. Identification and characterization of the microRNAs and their targets in *Salmo salar*. Gene, 499: 163-168
- Bartel D.P. 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell, 116: 281-297
- Bernatchez L., Guyomard R., Bonhomme F. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. Molecular Ecology, 1: 161-173
- Braceland M., Bickerdike R., Tinsley J., Cockerill D., McLoughlin M.F., Graham D.A., Burchmore R.J., Weir W., Wallace C., Eckersall P.D. 2013. The serum proteome of

- Atlantic salmon, *Salmo salar*, during pancreas disease (PD) following infection with salmonid alphavirus subtype 3 (SAV3). *Journal of proteomics*, 94: 423-436
- Brock J.H. 1981. The effect of iron and transferrin on the response of serum-free cultures of mouse lymphocyte to concanavalin A and lipopolysaccharide. *Immunology*, 43: 387-392
- Brock J.H., Mainou-Fowler T., Webster L.M. 1986. Evidence that transferrin may function exclusively as an iron donor in promoting lymphocyte proliferation. *Immunology*, 57: 105-110
- Brunel F., Ochoa A., Schaeffer E., Boissier F., Guillou Y., Cereghini S., Cohen G.N., Zakin M.M. 1988. Interactions of DNA-binding proteins with 5' region of the human transferrin gene. *The journal of biological chemistry*, 263, 21: 10180-10186
- Bowman B.H., Yang F., Adrian G.S. 1988. Transferrin : evolution and genetic regulation of expression. *Advances in genetics*, 25: 1-38
- Bullen J.J., Rogers H.J., Spalding P.B., Ward C.G. 2006. Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine. *Journal of medical microbiology*, 55: 251-258
- Bushati N., Cohen S.M. 2007. MicroRNA functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23: 175-205
- Caipang C.M.A., Hynes N., Puangkaew J., Brinchmann M.F., Kiron V. 2008. Intraperitoneal vaccination of Atlantic cod, *Gadus morhua*, with heat-killed *Listonella anguillarum* enhances serum antibacterial activity and expression of immune response genes. *Fish shellfish immunology*, 24: 314-322
- Chekulaeva M., Filipowicz W. 2009. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current opinion in cell biology*, 21: 452-460
- Crête-Lafrenière A., Weir L.K., Bernatchez L. 2012. Framing the Salmonidae family phylogenetic portrait: A more complete picture from increased taxon sampling. *Plos One*. 7, 10: 11 str.
- Easy R.H., Ross N.W. 2009. Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) epidermal mucus protein composition profiles following infection with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *Comparative biochemistry and physiology*, D, 4: 159-167
- Ekblom P., Thesleff I., Saxen L., Miettinen A., Timpl R. 1983. Transferrin as a fetal growth factor: Acquisition of responsiveness related to embryonic induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 80: 2651-2655
- Ellis A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 827-839
- Ercan M.D., Karatas S., Turgay E., Kolukirik M., Ince O., Ince B. 2013. Changes in transferrin gene expression in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) challenged with *Vibrio anguillarum*. *Turkish journal of veterinary and animal science*, 37: 141-146
- Faisst S., Meyer S. 1992. Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 20: 3-26
- Farnaud S., Evans R.W. 2003. Lactoferrin- a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40: 395-405

- Ford M.J. 2001. Molecular evolution of transferrin: Evidence for positive selection in salmonoids. *Molecular biology and evolution*, 18, 4: 639-647
- Ford M.J., Thornton P.J., Park L.K. 1999. Natural selection promotes divergence of transferrin among salmonid species. *Molecular Ecology*, 8, 6: 1055-1061
- Ghareeb B.A.A., Thepot D., Delville-Giraud C., Houdebine L.-M. 1998. Cloning and functional expression of the rabbit transferrin gene promoter. *Gene*, 211: 301-310
- Goodbourn S., Burstein H., Maniatis T. 1986. The human b-interferon gene enhancer is under negative control. *Cell*, 45: 601-610
- Hay N., Bishop J.M., Levens D. 1987. Regulatory elements that modulate expression of human c-myc. *Genes & Development*, 1: 659-671
- He Q.Y., Mason A.B., Woodworth R.C., MacGillivray R.T., Grady J.K., Chasteen N.D. 1997. Inequivalence of the two tyrosine ligands in the N-lobe of human serum transferrin. *Biochemistry*, 36: 14853-14860
- He L., Hannon G.J. 2004. MicroRNAs: small RNAs with big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5: 522-531
- Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-> 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 7276-7280
- Hughes A.L. 1994. The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 256, 1346: 119-124
- Idzerda R.L., Behringer R.R., Theisen M., Huggenvik J.I., McKnight G.S., Brinster R.L. 1989. Expression from the transferrin gene promoter in transgenic mice. *Molecular and Cellular Biology*, 9, 11: 5154-62
- Ii I., Kimura I., Ozawa E. 1982. A myotrophic protein from chick embryo extract: Its purification, identity to transferrin, and indispensability for avian myogenesis. *Developmental Biology*, 94: 366-377
- Kimura M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge, Cambridge University Press: 367 str.
- Koop B.F., Davidson W.S. 2008. Genomics and the genome duplication in Salmonids. V: Fisheries for global welfare and environment. 5th World Fisheries Congress, Japan, 20-24 okt. 2008. Tsukamoto T., Kawamura T., Takeuchi T. D., Beard J., Kaiser M. J. (eds.). Victoria, University of Victoria, Department of Biology: 77-86
- Kvingedal A.M. 1994. Characterization of the 5' region of the Atlantic Salmon (*Salmo salar*) transferrin-encoding gene. *Gene*, 150: 335-339
- Kvingedal A.M., RØrvik K.A. 1993. Cloning and characterization of Atlantic salmon (*Salmo salar*) serum transferrin cDNA. *Molecular marine biology and biotechnology*, 2, 4: 233-238
- Lambert L.A., Perri H., Halbrooks P.J., Mason A.B. 2005a. Evolution of the transferrin family : Conservation of residues associated with iron and anion binding. *Comparative Biochemistry and Physiology*, B, 142: 129-141

- Lambert L.A., Perri H., Meehan, T.J. 2005b. Evolution of duplications of the transferrin family of proteins. Comparative Biochemistry and Physiology, B, 140: 11-25
- Lee J-Y, Tada T., Hirono I., Aoki T. 1998. Molecular cloning and evolution of transferrin cDNAs in Salmonoids. Molecular marine biology and biotechnology, 7, 4: 287-293
- Lewin B. 2004. Genes VIII. New Jersey, Pearson Prentice Hall: Pearson Education Inc.: 1004 str.
- Li W.H. 1997. Molecular evolution. Massachusetts, Sinauer Associates Incorporated: 487 str.
- Liang G.M., Jiang X.P. 2010. Positive selection drives lactoferrin evolution in mammals. Genetica, 138: 757-762
- Lynch M., Conery J.S. 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicated genes. Science, 290: 1151-1155
- Lynch M., O'Hely M., Walsh B., Force A. 2001. The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate. Genetics, 159: 1789-1804
- Lucero M.A., Schaeffer E., Cohen G.N., Zakin M.M. 1986. The 5' region of the human transferrin gene: structure and potential regulatory sites. Nucleic Acid Research, 14, 21: 8692-8701
- Macedo M.F., De Sousa M. 2008. Transferrin and the transferrin receptor: Of magic bullets and other concerns. Inflammation & Allergy – Drug targets, 7: 41- 52
- MacGillivray R.T.A., Mendez E., Shewale J.G., Sinha S.K., Lineback-Zins J., Brew K. 1982. The complete amino acid sequence of human serum transferrin. Biochemistry, 79: 2504-2508
- MacGillivray R.T.A., Mendez E., Sinha S.K., Sutton M.R., Lineback-Zins J., Brew K. 1983. The primary structure of human serum transferrin. The Journal of biological chemistry, 258, 6: 3543-3553
- Mainou-Fowler T., Brock J.H. 1985. Effect of iron deficiency on the response of mouse lymphocytes to concavalin A: The importance of transferrin-bound iron. Immunology 54: 325-332
- Marble trout. 2005. Balkan Trout Restoration Group.
http://www.balkan-trout.com/studied_taxa_7_marble_trout.htm (30.jul.2015)
- MatInspector. 2013. MatInspector: Search for transcription factor binding sites. Genomatix.
https://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html
(15.11.2013)
- Miller Y.E., Jones C., Scoggin C., Morse H., Seligman P. 1983. Chromosome 3q (22-ter) encodes the human transferrin receptor. American journal of Human genetics. 35: 573-583
- Mohd-Padil H., Mohd-Adnan A., Gabaldon T. 2012. Phylogenetic analyses uncover a novel clade of transferrin in nonmammalian vertebrates. Molecular Biology and Evolution, 30, 4: 894-905
- Nei M., Rogozin I.B., Piontkivska H. 2000. Purifying selection and birth-and death evolution in the ubiquitin gene family. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 97: 10866-10871

- Ocvirk J. 1992. Soška postrv (*Salmo marmoratus*) Značilnosti razvoja fenotipa ter njena umetna vzreja. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 168 str.
- Ohno, S. 1970. Evolution by gene duplication. New York, Springer-Verlag: 160 str.
- Pan Y., Phan S., Famili F., Jaramillo M.L., Lenferink A.E.G., Wang E. 2010. Differences in promoters of orthologous genes. The open bioinformatics journal, 4: 41-49
- Park I., Schaeffer E., Sidoli A., Baralle F.E., Cohen G.N., Zakin M.M. 1985. Organization of the human transferrin gene: Direct evidence that it originated by gene duplication. Biochemistry, 82: 3149-3153
- Peatman E., Terhune J., Baoprasertkul P., Xu P., Nandi S., Wang S., Somridhivej B., Kucukras H., Li P. Dunham R., Liu Z. 2008. Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with Edwardsiella ictaluri. Molecular Immunology, 45: 553-566
- Phillips R.B., Matsuoka M.P., Konon I., Reed K.M. 2000. Phylogenetic analysis of mitochondrial and nuclear sequences supports inclusion of *Acantholingga ohridana* in the genus *Salmo*. Copeia 2: 546-550
- Phillips R. B., Oakley T. H. 1997. Phylogenetic relationships among the Salmoninae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. New York, Academic Press, Molecular systematics of fishes: 145-162
- Phillips R., Rab P. 2001. Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society 76: 1-25.
- Potočna postrv. 2015. Ribiška družina Mozirje.
<http://rd-mozirje.si/page/potocna-postrv/> (30.jul.2015)
- Povž M., Sket B. 1990. Naše sladkovodne ribe. Ljubljana, Mladinska knjiga: 369 str.
- Pustovrh G. 2013. Molekularna filogenija in populacijsko genetska struktura marmorirane postrvi v Sloveniji, Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 106 str.
- Pustovrh G., Snoj A., Sušnik Bajec S. 2011. A set of SNPs enabling identification of trouts and their hybrids in *Salmo* genus. Conservation Genetics Resources, 3, 1: 147-150
- Pustovrh G., Snoj A., Sušnik Bajec S. 2014. Molecular phylogeny of *Salmo* of the western Balkans, based upon multiple nuclear loci. Genetics Selection Evolution, 46, 7: 12 str.
<http://www.gsejournal.org/content/pdf/1297-9686-46-7.pdf>
- Real Time PCR Handbook. 2003. RRC Core Genomics Facility, University of Illinois at Chicago
<http://www.uic.edu/depts/rrc/cgf/realtimetime.html> (14.10.2014)
- Rouquier S., Blancher A., Giorgi D. 2000. The olfactory receptor gene repertoire in primates and mouse: evidence for reduction of the functional fraction in primates. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 97: 2870-2874
- Rozman T. 2008. Opis transferinskega lokusa in njegova uporaba pri filogenetskih analizah rodu *Salmo*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 120 str.

- Rozman T., Dovč P., Marić S., Kokalj-Vokač N., Erjavec-Škerget A., Rab P., Snoj A. 2008. Evidence for two transferrin loci in the *Salmo trutta* genome. *Animal genetics*, 39: 577-585
- Qumsiyeh, M.B. 1994. Evolution of number and morphology of mammalian chromosomes. *Journal of heredity*, 85: 455-465
- Salmon Atlantico. Ciclo de vida y distribucion. Masmar.
<http://www.masmar.com/articulos/art/66,162,1.html> (30.jul.2015)
- Sawaya S., Bagshaw A., Buschiazza E., Kumar P., Chowdhury S., Black M.A., Gemmell N. 2013. Microsatellite tandem repeats are abundant in human promoters and are associated with regulatory elements. *Plos One*, 8, 2: 12 str.
<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0054710&representation=PDF> (30.jul.2015)
- Sawaya S.M., Lennon D., Buschiazza E., Gemmell N. 2012. Promoter microsatellites as modulators of human gene expression. *Tandem repeat polymorphism: Genetic plasticity, neutral diversity and disease*. Austin, Texas: Landes Biosciences, 4
- Schaeffer E., Boissier F., Py M-C., Cohen G.N., Zakin M.M. 1989. Cell type-specific expression of the human transferrin gene. Role of promoter, negative and enhancer elements. *The journal of biological chemistry*, 264, 13: 7153-7160
- Schaeffer E., Guillou F., Part D., Zakin M.M. 1993. A different combination of transcription factors modulates the expression of the human transferrin promoter in liver and Sertoli cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 23399-23408
- Schaeffer E., Park I., Cohen G.N., Zakin M.M. 1985. Organization of the human serum transferrin gene. V: Proteins of iron storage and transport. Montreuil G.J., Circhon R.R., Mazurier J. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 361-364
- Shedko S.V., Miroshnichenko I.L., Nemkova G.A. 2013. Phylogeny of Salmonids (Salmoniformes: Salmonidae) and its Molecular dating: Analysis of mtDNA data. *Russian Journal of Genetics*. 49, 6: 623-637
- Snoj A., Melkič E., Sušnik E., Muhamedagić S., Dovč P. 2002. DNA phylogeny supports revised classification of *Salmo thymus obtusirostris*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 77: 399-411
- Sun Y., Zhu Z., Wang R., Sun Y., Xu T. 2012. Miiuy croaker transferrin gene and evidence for positive selection events reveal different evolutionary patterns. *Plos one*, 7, 9: 9 str.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043936> (30.jul.2015)
- Sušnik S., Knizhin I., Snoj A., Weiss S. 2006. Genetic and morphological characterization of a Lake Ohrid endemic, *Salmo (Acantholingga) ohridanus* with a comparison to sympatric *Salmo trutta*. *Journal of Fish Biology*, 68: 2-23
- Sušnik S., Weiss S., Odak T., Delling B., Treer T., Snoj A. 2007. Reticulate evolution: ancient introgression of the Adriatic brown trout mtDNA in softmouth trout *Salmo obtusirostris* (Teleostei: Salmonidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 90: 139-152
- Tamura K., Dudley J., Nei M in Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599

- Tange N., Lee J.-Y., Mikawa N., Hirono I., Aoki. T. 1997. Cloning and characterization of transferrin cDNA and rapid detection of transferrin gene polymorphism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6: 354–359
- Teehan G.S., Bahdouch D., Ruthazer R., Balakrishnan V.S., Snydman D.R., Jaber B.L. 2004. Iron storage indices: novel predictors of bacteremia in hemodialysis patients initiating intravenous iron therapy. *Clinical Infectious Disease*, 38: 1090-1094
- Teng C.T., Pentecost B.T., Marshall A., Solomon A., Bowman B.H., Lalley P.A., Naylor S.L. 1987. Assignment of the lactotransferrin gene to human chromosome 3 and to mouse chromosome 9. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 13: 689-693
- Toplak N. 2006. Preučevanje molekularnih mehanizmov odpornosti proti virusu PVY NTN v gensko spremenjenih rastlinah krompirja (*Solanum tuberosum L.*) sorte 'Igor'. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 194 str.
- Tryckare T., Cagner E. 1994. Velika knjiga o ribolovu. Ljubljana, DZS: 414 str.
- Valles S.M., Pereira M. 2005. *Salenopsis invicta* transferrin: cDNA cloning, gene architecture, and up-regulation in response to *Beauveria bassiana* infection. *Gene*, 358: 60-66
- Wally J., Halbrooks P.J., Vonrhein C., Rould M.A., Everse S.J., Mason A.B., Buchanan S.K. 2006. The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding. *The Journal of biological chemistry*. 281: 24934-24944
- Walsh J.B. 1995. How often do duplicated genes evolve new functions? *Genetics* 139: 421-428
- Wang G., Vasquez K.M. 2007. Z-DNA, an active element in the genome. *Frontiers in Bioscience*, 12: 4424-4438
- Winter G.W., Schreck C.B., McIntyre J.D. 1980. Resistance of different stocks and transferrin genotypes of *Coho salmon*, *Oncorhynchus kisutch*, and *Steelhead trout*, *Salmo gairdneri*, to bacterial kidney disease and vibriosis. *Fishery bulletin*, 77: 795-802
- Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R.I., Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11: 228-235
- Wolfe K.H. 2001. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature reviews, Genetics*, 2: 333-341
- Woo P.T.K., Ardelli B.F. 2014. Immunity against selected piscine flagellates. *Developmental and comparative immunology*, 43: 268-279
- Wray G.A. 2007. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nature Genetics*, 8: 206-216
- Yang F., Lum J.B., McGill J.R., Moore C.M., Naylor S.L., VanBragt P.H., Baldwin W.D., Bowman B.H. 1984. Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 2752-2756
- Zhang J. 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends in ecology and evolution*, 18: 292-298

ZAHVALA

Zahvalila bi se svoji mentorici prof. dr. Simoni Sušnik Bajec za strpnost in razumevanje ter somentorju dr. Alešu Snoj za vso pomoč. Za pomoč pri izvajanju laboratorijskega dela in metodah bi se zahvalila Idi Djurdjevič in Gašperju Pustovrh. Posebna zahvala gre moji večni življenski popotnici, mami, Miri Belina.

PRILOGE

Priloga A

Nukleotidna zaporedja promotorske regije pomnožena z začenima oligo-nukleotidoma TFprom2R in TFprom2F

>TF1/TF2 Atlantski losos (genomska DNK, Los1)

```
AGCAGCGCTGAGAGGAGAACGAGTTCATGTTCTGAAGTCTCCAAGTCAAAATTCCGGAGTGA  
AAAAGTAGGCCGTTAGAAGGCAACTCTGGCTTTATAGAAAACCAATAGCCTGGGTCCATGGT  
GGGCTGACTTAGCTGAAAAGAGGCCATAGTTGTTAGGGTTCCAATATGTTACATGGCGCGTT  
AATTGTTCATAGGCCGGGTGGCGCGCTGACTCCCTGTGTGTGGTTGTGTACTCA  
GACTTCAGACATTTCCACATAATGAAATTACAAAATAAGTCTACATTAAGCAATATCTCA  
TGTTTTCACTGTTATTCAAAGCAGTCTCCAATCTACAAGTGTGCAGCATAGTCATCATCAC  
TAATCAAAATGTTGAGCAATGTGTAGTTCAGGAAA
```

>TF1/TF2 Potočna postrv (genomska DNK, PG13)

```
GCAGCGCTGAGACGAGAACGAGTTCATGTTCTGAAGTCTCCAAGTCACAAATTCCGGAGTGA  
AAAGCAGGTTGTTAGAAGGCAACTCTGGCTTTATAGAAAACCAATAGGCTGGGTCCATGGT  
GGCTGACTTAGCTGAAAAGAGGCCATAGTTGTTAGGGTTCCAATATGTTACATGGCGCGTT  
ATTGTTCATAGGCCGGGTGGCGCGCCGCTCACTCCCTGTGTGTGTGTGTGTGTGT  
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT  
TAAATACCCCTACATTAAGCTATATCTCATGTTTTCATCTGTTATTCAAAGCTGTCTCCTATCTA  
CGAGTGTGTTGCAACATAGTCCTCCTACTAATCAAAATGTTGAGCAAGTGTGTA
```

>TF1/TF2 Soška postrv (genomska DNK, Z26)

```
AGCAGCGCTGAGAGGAGAACGAGTTCATGTTCTGAAGTCTCCAAGTCAAAAACCCGGAGTG  
AAAAGTAGGCCGTTAGAAGGCAACTCTGGCTTTATAGAAAACCAATAGCCTGGGTCCATGG  
TGGGCTGACTTAGCTGAAAAGAGGCCATAGTTGTTAGGGTTCCAATATGTTACATGGCGCGTT  
TAATTGTTCATAGGCCGGGTGGCGCGCTGGCTCACTCCCTGTGTGTGTGGTTGTGTACTC  
AGACTTCAGACATTTCCACATAATGAAATTACAAAATAATAGTCTACATTAAGCAATATCTC  
ATGTTTTCACTGTTATTCAAAGCAGTCTCCAATCTACAAGTGTGCAGCATAGTCATCATCA  
CTAATCAAAATGTTGAGCAATGTGTAG
```

>TF1 atlantski losos (BAC klon 58I22)

```
AGCAGCGCTGAGAGGAGAACGAGTTCATGTTCTGAAGTCTCCAAGTCACAAATTCCGGAGTGA  
AAAAGTAGGCCGTTAGAAGGCAACTCTGGCTTTATAGAAAACCAATAAGGCTGGGTCCAT  
GGTGGGCTGACTTAGCTGAAAAGAGGCCATAGTTGTTAGGGTTCCAATATGTTACATGGCGC  
GTTAATTGTTCATAGGCCGGGTGGCGCGCTGGCTCACTCCCTGTGTGTGTGGTTGTGTGA  
CTCAGACTTCAGACATTTCCACATAATGAAATTACAAAATAATAGTCTACATTAAGCAATAT  
CTCATGTTTTCACTGTTATTCAAAGCAGTCTCCAATCTACAAGTGTGCAGCATAGTCATCA  
TCACTAATCAAAATGTTGAGCAATGTGTAG
```

>TF2 atlantski losos (BAC klon 175G20)

```
AGCAGCGCTGAGACGAGAACGAGTTCATGTTCTCCAAGTCTCCATGTCAACAAANNCCGGAGTGA  
AAAAGCAGGTCGTTAGAAGGCAACTCTGGCTTTATAGAAAACCAATAAGAGGCTGGGTCCAT  
GGTGGGCTGACTTAGCTGAAAAGAGGCCATAGTTGTTAGGGTTCCAATATGTTACATGGTGC  
GTTAATTGTTCATAGGCCGGGTGGCGCGCGGGCTCACTCCCTGTGTGTGTGTGTGTGT  
GGTTTGTGTGTACTCAGACATTTCCACATAATGAAATTACAAAATAATAGTCCTACATTAAGCAATAT
```

CATTAAGCAATATCTCATGTTTTCAACTGTTATTCAAAGCAGTCTCCAATCTACAAGTGTTGC
AGCATAGTCATCATCACTAATCAAAATGTTGAGCAATGGA

Priloga B

Nukleotidna zaporedja promotorske regije pomnožena z pomočjo 'primer-walking' metode in začenega oligonukleotida TFprom2F

>TF1 Atlantski losos (BAC klon 239J4)

```
CTTGTGGAGGTGGAGGAAATACTTAGGCTCCTGCCTGTGGAGGCCGGGGAGGATATAACACTAGGC  
TACCTTCTTGAGGCGGGAAAGAAAATCCAGTAGCCTACATGCCTGTGGAGCTGGAGGATATA  
CACTAGCCTCCCTGCGTTGGGGAGCTGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTGGAGCTGG  
AGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTGGAGCTGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTG  
GAGCTGGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTGGAGCTGGAGGATATAACACTAGGCTACAT  
GCCTTGAGCTGGAGGAAATACACTAGGCTACATGCCTGTGGAGCTGGAGGAAATACACT  
AGGCTACCTGCCTGTGGAGCTGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTGGAGCTGGAGGA  
TATACACTAGGCTACCTGCCTGTGGCGCTGGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTGGAGC  
TGGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTGGAGCTGAGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCT  
TGTGGAGCTGAGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTGGAGCTGGAGGATATAACACTAGGCT  
ACCTGCCTGTGGAGCTGAGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTGGAGCTGGAGGATATAAC  
ACTAGGCTACCTGCCTGTGGAGCTGGGAGGATATAACACTAGGCTACATGCCTGTGGAGCTGGGA  
GGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTGGAGCTGGAGGATATAACACTAGGCTACCTGCCTGTGG  
AGCTGGGAGGATATAACACTCAATTAACTCATTTGCCCTAATTCTCAAGAAAAGATACACCTGT  
GCCCTTTTGCCCTGAACACTACACATTGCTCAACATTGATTAGTGTGACTATGCTGCAAACAC  
TTGTAGATTGGAAGACTGCTTGAAATAACAGTTGAAAAACATGAGGATATTGCTTAATGTAGGACT  
ATTATTTGTGAATTCCATTATGTGAAATGTCTGAAGTCTGAGTACACACAAACCACACACA  
CAGGGAGTGAGCCACCGCGCCCACCCCGCTATGAACAAATTAAACCGGCCATGTAACATATTGG  
GAAACCCCTAAACAAACTATGCCCTTTTCAGCTAACAGTCAGCCCACCATGGACCCAGGCTATTGG  
TTTCTAAAAAAGCCAGAGTTGCCTCTAAACGGCCTACTTTCACTCCGGGATTGTTGACTTG  
GAGACTCGAGAACATGAAACTGCTTCTCCTCTCA
```

Priloga C

Nukleotidna zaporedja promotorske regije pomnožena z začetnimi oligonukleotidi TFprom_prerepeatF in TFprom_prerepeatR

>TF1 Atlantski losos (BAC klon, 239J4)

```
ACACTAGGCTACCTGCCTTGTGGAAGCTGAGAGGGATATACTAGGCTACCTGCCTTGTGGAGCTG  
AGAGGGATATACTAGGCTACCTGCCTTGTGGAGCTGGAGGATATACTAGGCTACCTGCCT  
TGTGGAGCTGAGAGGGATATACTAGGCTACCTGCCTTGTGGAGCTGGAGGATATACTAGGCT  
ACCTGCCTTGTGGAGCTGGAGGATATACTAGGCTACATGCCTTGTGGAGCTGGAGGATATACTAGGCT  
ACCTAGGCTACCTGCCTTGTGGAGCTGGAGGATATACTAGGCTACCTGCCTTGTGGAGCTGGAGGATATACTAGGCT  
GGATATACTCAATTAACTCATTTGCCCTAATTCTCAAGAAAAGATACACCTGTGCCTTT  
GCCTGAACATCACATTGCTAACATTGATTAGTGATGACTATGCTGCAAACACTTGTAGATT  
GGAAGACTGCTTGAAATAACAGTTGAAAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATT  
GTGAATTCCATTATGTGAAATGTGAAGTCTGAGTACACACAAACCACACACAGGGAGT  
GAGCCACCGCGCCCCACCCGCCTATGA
```

>TF2 Atlantski losos (BAC klon, 189N19)

```
CAGCGGGTTAAGTGTCTTGTTCAGGGACAGAAAGAGATATTTTACCTTGTCA  
GCTCAGGGAACCTTCCGGTTACTAGTCCAACGATCTAACCACTAGGCTACCTGCCTTGTGGAGCTGGAGGATATA  
CACACATTAACTCAATTTCGCCCTAATTCTCAAGAAAAGATACACCTGTGCCTTT  
CTTGAAATAACAGTTGAAAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATT  
ATTATGTGAAATGTCTGAATTCTGAGTACACACAAACCACACACACACACACACAGG  
GAGTGAGCCCCGCGCCCCACCCGCCTATGAACAATTAAACGCA
```

Priloga D

Nukleotidna zaporedja promotorske regije pridobljena s pomočjo kloniranja in pomnožena z začetnimi oligonukleotidi TFprom2R in TFprom2F pri soški in potočni postrvi

>TF1 Soška postrv (klon SS2)

```
CTACACATTGCTAACATTTGATTAGTAGTGTGACTATGCTGAAACACTTGTAGATTGGAAGA  
CTGCTTGAAATAACAGTTGAAAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTATTGTGAATT  
TCCATTATGTGGAAATGTCTGAAGTCTGAGTACACACAAAACCACACACACACACACA  
CACACACAGGGAGTGAGCCCCGCACCCCGCTATGAACAAATTAAACGCCATGTAACA  
TATTGGGAAACTCTAACAAACTATGCCCTTTCAGCTAAGTCAGCCCACCATGGACCCAGCC  
TATTGGTTTCTATAAAAGCCAGAGTGCCTCTAAACGGCCTACTTTTCACTCCGGGAATTGTT  
GACTTGGAGACTTCGAGAACATGAAACTGCTCTCGTCTAGCGCTGCT
```

>TF1 Soška postrv (klon 40)

```
CTACACATTGCTAACATTTGATTAGTAGTGTGACTATGCTGAAACACTTGTAGATTGGAAGA  
CTGCTTGAAATAACAGTTGAAAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTATTGTGAATT  
TCCATTATGTGGAAATGTCTGAAGTCTGAGTACACACAAAACCACACACACACACACAGGGAGT  
AGCCCCCGCGCCACCCCGCTATGAACAAATTAAACGCCATGTAACATATTGGGAAACTCTAA  
ACAAACTATGCCCTTTCAGCTAAGTCAGCCCACCATGGACCCAGCCTATTGGTTTCTATAAA  
AGCCAGAGTGCCTCTAAACGGCCTACTTTTCACTCCGGGAATTGTTGACTTGGAGACTTCGAG  
AACATGAAACTGCTCTCGTCTAGCGCTGCT
```

>TF1 Potočna postrv (klon PS10)

```
GAGAGCGGCCGCCAGATCTCCGGATGGCTCGAGTTTCAGCAAGATTGCCCTGAACACTACACATT  
GCTCAACATTTGATTAGTAGTGTGACTATGCTGAAACACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTG  
AATAACAGTTGAAAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTATTGTGAATTCCATTATG  
TGGAAATGTCTGAAGTCTGAGTACACACAAAACCACACACACACACACACACAGGGAGT  
GAGCCCCCGCGCCACCCCGCTATGAACAAATTAAACGCCATGTAACATATTGGGAAACTCTA  
ACAAACTATGCCCTTTCAGCTAAGTCAGCCCACCATGGACCCAGCCTATTGGTTTCTATAAA  
AAGCCAGAGTGCCTCTAAACGGCCTACTTTTCACTCCGGGAATTGTTGACTTGGAGACTTCGAG  
AACATGAAACTGCTCTCGTCTAGCGCTGCT
```

>TF2 Soška postrv (klon SS1)

```
CTACACATTGCTAACATTTGATTAGTAGTGTGACTATGCTGAAACACTTGTAGATTGGAAGA  
CTGCTTGAAATAACAGTTGAAAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTATTGTGAATT  
TCCATTATGTGGAAATGTCTGAATTCTGAGTACACACAAAACCACACACACACACACACA  
CACACACACACACAGGGAGTGAGCCCCGCACCCCGCTATGAACAAATTAAACGCC  
CCATGTAACATATTGGGAAACCCTAAACAAACTATGCCCTTTCAGCTAAGTCAGCCCACCATG  
GACCCAGCCTATTGGTTTCTATAAAAGCCAGAGTGCCTCTAAACGACCTGCTTTCACTCC  
GGGAATTGTTGACTTGGAGACTTCGAGAACATGAAACTGCTCTCGTCTAGCGCTGCT
```

>TF2 Soška postrv (klon 13)

```
CTACACATTGCTAACATTTGATTAGTAGTGTGACTATGCTGAAACACTTGTAGATTGGAAGA  
CTGCTTGAAATAACAGTTGAAAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTATTGTGAATT  
TCCATTATGTGGAAATGTCTGAATTCTGAGTACACACAAAACCACACACACACAGGGAGTGA  
GCCCGCGCCACCCCGCTATGAACAAATTAAACGCCATGTAACATATTGGGAAACTCTAA  
CAAACATGCCCTTTCAGCTAAGTCAGCCCACCATGGACCCAGCCTATTGGTTTCTATAAAA
```

GCCAGAGTTGCCTCTAAAACGACCTGCTTTCACTCCGGATTGTTGACTGGAGACTTCGAGA
ACATGAAACTGCTCTCGTCTAGCGCTGCT

>TF2 Potočna postrv (Dr5)

GAECTATGCTGCAACACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTGAAATAACAGTTGAAAAACATGAGATAT
TGCTTAATGTAGGACTATTATTTGTGAATTCCATTATGTGGAAATGTCTGAATTCTGAGTACAC
ACAAAACCACACACACACACACACACACACAGGGAGTGAGCCCCCGCGCCCCACCCCGC
CTATGAACAATTAAACGCGCCATGTAACATATTGGAAACCTAAACAAACTATGGCCTCTTCA
GCTAAGTCAGCCCACCATGGACCCCAGCCTATTGGTTCTATAAAAGCCAGAGTTGCCTTCTAAA
ACGACCTGCTTTCACTCCGGATTGTTGACTGGAGACTGGAGAACATGAAACTGCTCTCGT
CTCAGCGCTGCT

Priloga E
Nukleotidna zaporedja DNK regije med petim in sedmimi
eksonom transferinskega gena pri atlantskemu lososu

>TF1(274270)

CAGTCTCCTTCTACCCCTAGATACACCATTACCATCTCTGAATAAACTCCTGCTCTGTACACC
CATACCTCTCAATCTACCCATTGGATCGGCAGATATTGTATCCTTCCTCTATCAGTAGTC
TCTATCTCCCTCTACCTGCTCTGGATTGCCACTAAGTGTATTTCGCCTCACAGGTGCCTGAA
AGATGGAGCTGGAGATGTTGCCTCATCAAGCCCCCTGGCTGTACCTGGTGTGTTAAAGCATT
GCTAGCATACCGATATTGAATTACAACGTAAAATGCAAACACTCTAGAATTACAATTACGGAAA
ACTATGTTAATGCTTAGTGTAAATGTCAAACCACTCACACGTCACCTACTATACAACCTCCTATTACCT
GCTTGAGCCGCAGAGAAGGCAAGCTATGAGTTGCTGTGCAAGGATGGCACCAGAGCTTCCATCG
A CAGCTACAAGACCTGCCACCTGGCCAGAGTACCCGCCACGCTGTGGTCAGCCGAAGACCGA

>TF2(273259)

CTATATGACTATGCTGGGCCTCCAGTGAGTACCAAGTCTCTCCTACCCCTAGATACACCATT
ACCATCTCTGAATAACTCCATGCTCTGTACACCCATACCTCTCAATCTACCCATTGGATCGGCA
GATATTGTATCCTTCCTCTATCAGTACTCTCTATCCCTCACCTGCTCTGGATTGCCACT
AACTGTGTGTATTTCGCCTCACGAGGTGCCTGAAAGATGGAGCTGGAGATGTTGCCTCATCAAT
CCCTGGCTGTGCCTGGTGAGTTAAAGCATTAGCTAGCATACCGATATTGAATTACAACGTAA
AAATGCAAACACTGGATCTAGAATTACAATTATAATTGTGCAAACATGTTAATGCTTAGTGTAA
ATGTCCAACCAACTCACACGTCACCTACTATACAACCTCCTATTACCTGCTTGCAAGCCCCAGAGAA
GGCAAGCTATGAGTTGCTGTGCAAGGATGGCACCAGAGCTTCCATCGACAGCTACAAGACCTGCC
ACC TGGCCAGAGTACCCGCCACGCTGTGGTCAGCCGAAGACC