

IZRAŽANJE TRANSFERINSKIH GENOV PRI POSTRVIH (*Salmo* sp.)

Anja ČIBEJ¹, Simona SUŠNIK BAJEC^{1,2}

Delo je prispelo 08. novembra 2017, sprejeto 30. novembra 2018.
Received November 08, 2017; accepted November 30, 2018.

Izražanje transferinskih genov pri postrvih (Salmo sp.)

Družina salmonidov združuje sladkovodne in anadromne vrste rib. Za salmonide je značilno, da imajo podvojene mnoge lokuse v genomski DNA, nekatere kot posledica tetraploidizacije genoma, druge kot posledica neodvisne podvojitve posameznih regij DNA. Pri rodu *Salmo* so dokazali podvojenost transferinskega gena pri atlantskem lososu, potočni in soški postrvi. Namen dela je bila karakterizacija promotorske regije obeh genov (TF1, TF2) pri vseh treh vrstah in določitev razmerja v izražanju TF1 in TF2 pri atlantskem lososu. S qPCR smo dokazali, da se pri atlantskem lososu TF2 izraža šestkrat šibkeje od TF1; predhodno je bilo dokazano, da je razlika v izražanju obeh genov pri potočni in soški postrvi še večja. Določili smo nukleotidno zaporedje različno dolgim promotorskim regijam obeh različic gena pri treh vrstah. V promotorski regiji smo našli mikrosatelit, ki se razlikuje v dolžini tako med vrstami kot med genoma, in štiri SNP, ki so opredeljevale TF1 in TF2. Pri atlantskem lososu smo določili zaporedje daljšega odseka promotorske regije. V promotorju gena za TF1 atlantskega lososa se nahaja minisatelit, ki obsega 37 bp dolg motiv s preko 20 ponovitvami, medtem ko pri TF2 minisatelita ni. Pri analizi potencialnih vezavnih mest smo pri vseh promotorskih regijah našli pomembne regije za izražanje transferinskega gena.

Ključne besede: ribe; atlantski losos; potočna postrv; soška postrv; genetika; transferinski geni; izražanje genov; promotorske regije

Transferrin gene expression in Salmo sp.

Salmonidae family combines freshwater and anadromous fish species. Duplicates of numerous genomic DNA loci are characteristic for this family, some as a consequence of tetraploidisation, and others as independent doubling of discrete DNA regions. In the genus *Salmo*, duplication of transferrin gene in Atlantic salmon, brown and marble trout has been demonstrated. The aim of the study was to characterize the promoter region of both genes (TF1 and TF2) in all three species and to determine the ratio of expression of TF1 and TF2 in Atlantic salmon. Applying qPCR we showed that TF2 is expressed in Atlantic salmon six times weaker than TF1. It has been previously shown that the difference in the expression of both genes in brown and marble trout is even higher. The nucleotide sequence was determined for promoter regions of both genes in all species. In promoter region, microsatellite was found, which differs in length as well within species as between TF1 and TF2 locus, and four SNPs that differentiate TF1 and TF2. For Atlantic salmon, longer sequence of promoter region was determined. In TF1 gene, promoter contains a minisatellite, comprised of 37 bp long motif with over 20 replicates, while in TF2 minisatellite is not present. Analyzing potential binding sites in promoter region, functional elements for regulation of transferrin gene expression were found.

Key words: fish; Atlantic salmon; brown trout; marble trout; genetics; transferrin genes; gene expression; promoter

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Domžale, Slovenija

² Korespondenčna avtorica, e-naslov: simona.susnik@bf.uni-lj.si

1 UVOD

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 predstavnike družine Salmonidae je značilna tetraploidizacija, ki so ji bile te ribe podvržene pred 50–100 milijoni let (Phillips & Oakley, 1997). Salmonidi imajo zaradi dvakrat večjega genoma dvakrat več kromosomskih ročic kot druge ribe, iz česar lahko sklepamo na njihov avtotetraploiden izvor (Allendorf & Thorgaard, 1984). 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. V genomu salmonidnih rib se približno polovica genov še vedno nahaja v podvojenih obliki. Med podvojenimi je tudi transferinski lokus pri rodu *Salmo*; podvojen transferinski lokus so dokazali pri atlantskem lososu (*Salmo salar*) (Kvingedal & Rørvik, 1993), potočni (*S. trutta*) in soški postrvi (*S. marmoratus*) (Rozman in sod., 2008). Ker je Rozman (2008) s fluorescentno *in situ* hibridizacijo (FISH) dokazala, da ležita oba transferinska gena blizu na istem kromosomu, lahko sklepamo, da je prišlo do podvojitve tega gena neodvisno od podvojitve celotnega genoma (Ford, 2001).

Transferin je fiziološko izredno pomembna beljakovina, ki veže železo in ga prenaša po krvi (Baker in sod. 2003). Železo je velikokrat limitirajoče hranilo bakterij, zato je transferin povezan tudi z odpornostjo proti okužbam in kontrolo razvoja bakterij (Sun in sod., 2012; Bullen in sod., 2006). Ima pomembno vlogo kot rastni faktor, ki je potreben za proliferacijo normalnih in malignih celic (Barnes & Sato, 1980), in tudi pri imunskem odzivu za pravilno delovanje limfocitov (Mainou-Fower & Brock, 1985). Zaradi svoje funkcije je podvržen različnim selekcijskim pritiskom. 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 potencialne infekcije s patogenimi organizmi (Ellis, 2001; Lambert in sod., 2005b; Andersen in sod., 2011). Do pozitivne selekcije bi lahko prišlo zaradi selekcijskega pritiska, ki ga povzročajo patogene bakterije, ki preferenčno vežejo železo, vezano na transferin. To je v skladu z dejstvom, da so beljakovine, vpletene v obrambne mehanizme, pogosto podvržene pozitivni selekciji, npr. laktoferin pri sesalcih (Liang & Jiang, 2010). V nasprotju s salmonidi pa pri drugih vrstah niso našli dokazov za delovanje pozitivne selekcije na transferin-

skih genih (Ford, 2001). Vzroke za pozitivno selekcijo, ki poteka na transferinskem lokusu pri salmonidih, bi lahko iskali v slabšem imunskem sistemu rib in anadromnem okolju (Rozman, 2008).

Nukleotidno zaporedje cDNA transferinskega gena je bilo pri salmonidih prvič določeno pri atlantskem lososu (Kvingedal & Rørvik, 1993). 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. Varianti so poimenovali: transferin tip 1 (TF1), varianto z dodanim glicinom pa transferin tip 2 (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 genomski DNA prisotna oba tipa transferina. Do enakih zaključkov kot Kvingedal & Rørvik (1993) so prišli tudi Rozman in sod. (2008); pri F1 medvrstnih križancih so ugotovili 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. Pri TF2 so mesta za vezavo železa enaka pri soški in potočni postrvi, se pa razlikujejo od vezavnih mest pri TF1 (Rozman, 2008). Rozman in sod. (2008) so ugotovili, da sta pri TF2 spremenjeni dve aminokislini, ki sodelujeta pri vezavi železa, kar bi po mnenju avtorjev lahko kazalo na njegovo spremenjeno ali zmanjšano funkcijo pri vezavi železa.

Poleg potencialno različne vloge pri vezavi železa so Rozman in sod. (2008) na osnovi treh vzorcev soške in potočne postrvi s PCR v realnem času in s hibridizacijo po Southernu ugotovili, da naj bi bila raven izražanja TF2 izrazito nižja od TF1 in da sta oba gena v genomu prisotna v eni kopiji. Kvingedal & Rørvik (1993) za atlantskega lososa nasprotno trdita, da je mRNA obeh genov podobne dolžine in da se obe varianti izražata v enaki količini.

Kvingedal (1994) je določila potencialna vezavna mesta za transkripcijske faktorje za gen za transferin pri atlantskem lososu, ki bi lahko vplivala na stopnjo izražanja. Nukleotidno zaporedje v regiji –118 do +1 je podobno kokošnjemu, človeškemu in mišjemu transferinskemu promotorju in vsebuje zaporedja TATA, CCAAT in ter CAAAC. Prisotna so vezavna mesta za naslednje transkripcijske faktorje: AP-2, AP-3, Sp1, CF1, NF-IL6, HNF-5, GCF in GATA-1. Za transferinski promotor pri atlantskem lososu je značilna 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 naj bi obsegal 25 tandemskih ponovitev 37 bp

dolgega motiva pri atlantskem lososu. Nukleotidno zaporedje promotora so določili tudi drugemu transferinskega genu pri atlantskem lososu (TF2) in ga primerjali s TF1 v regiji med -383 in +80. Našli so štiri razlike: dve substituciji, eno insercijo in različno dolžino CA ponovitve.

Namen naše študije je bil proučiti izražanje obeh transferinskih genov (TF1 in TF2) pri atlantskem lososu z metodo PCR v realnem času in določiti razlike v promotorski regiji ter razlike med potencialnimi vezavnimi mesti za transkripcijske faktorje med različnima transferina pri atlantskem lososu, potočni in soški postrvi in s tem dopolniti manjkajoče znanje glede razlik v izražanju obeh genov in potencialnih vezavnih mest za transkripcijske faktorje v promotorski regiji obeh transferinskih genov pri treh vrstah salmonidnih rib iz rodu *Salmo*.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 VZORCI IN IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISLIN

V analizo promotorske regije transferinskega gena smo vključili genomsko DNA potočne in soške postrvi ter atlantskega lososa. Za analizo promotorske regije in izražanje obeh transferinskih genov pri atlantskem lososu smo poleg genomske DNA 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 RNA, ki smo jih izolirali iz jeter atlantskega lososa.

Genomsko DNA smo izolirali z metodo izsoljevanja (Miller in sod., 1988). Potočne in soške postrvi so izvirale iz Slovenije, vzorci potočne postrvi iz Drave in Resniškega potoka, vzorci soške postrvi pa iz Zadlaščice. RNA smo izolirali po protokolu RNeasy lipid tissue mini kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca iz jeter treh predstavnikov vrste atlantskega lososa, ki smo jih dobili iz ribogojnice Alpenlachs v Gutensteinu pri Dunaju (Avstrija). Tako pridobljenim trem vzorcem RNA smo izmerili čistost in koncentracijo s spektrofotometrom NanoDrop in integriteto z Bioanalizatorjem 2100 (Agilent Technologies Inc., ZDA). Vzorce RNA smo za nadaljnje delo shranili na -80 °C. Za izolacijo bakterijskih umetnih kromosomov (BAC) z izbranim tarčnim genom smo uporabili standardne protokole za gojenje DH10 *E. coli* celic in Qiagen Large Construct kit.

2.2 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 DNA (preglednica 1).

Standardna 20 µL PCR reakcija je poleg vode (ddH₂O) vsebovala 0,5 µM posameznega začetnega oligonukleotida, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1X PCR pufer, 0,5 enote *Taq* DNA polimeraze (Fermentas) in

Preglednica 1: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov, uporabljenih v reakcijah PCR

Table 1: Nucleotide sequences of primers used in PCRs

Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Mesto prileganja
TF-prom2F	TTGCCTGAACTACACATTGCT	Promotor
TF-prom2R	TCCATGCGTAATTATCTTTGC	
TFprom_pre_repeatF	GATCTAACCCTAGGCTACCTGC	Promotor
TFprom_repeatF	ACTAGGCTACCTGCCTTGTGG	
TFprom_repeatR	CAAGTGTTCATAGTCATC	
TFprom_prerepeatF	CTTAGGAACAGCGGGTTAAGT	Promotor
TFprom_prerepeatR	GCCCATAGTTTGTTCCTAGGGTTTC	
TFex5/7.2-F	CCATCTCTGAATAACTCCATGC	5 ekson
TFex5/7.2-R	GTCCTTGCGGCTGACCAC	7 ekson
TFex5/7A-F	CCAGTCTCCTTTTACCCCTACT	TF1, 5 intron
TFex5/7b-R	TCCAGTGAGTACCAGTCTCCTTT	7 ekson
TFex5/7-R	CTTGACGGCCACCAGTTT	
TFcDNAgen-F	CAAGGAGCCCTACTATGACCACGC	TF1, 5 ekson
TFcDNApg-F	CCAGTCTCTCCTACCCCTCCT	TF2, 5 intron

50 ng genomske oz. BAC DNA. Reakcije so potekale v cikličnem termostatu (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) z naslednjim profilom: začetni denaturaciji DNA (3 minute pri 94 °C) je sledilo 35 ciklov s profilom 45 s denaturacije pri 94 °C, 20 s prileganja pri 60 °C in 40 s podaljševanja pri 72 °C. Reakcije smo zaključili z dvema minutama podaljševanja pri 72 °C ter ohladili na 4 °C.

2.3 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA PO SANGERJEVI METODI

Produkte PCR smo prečistili s pomočjo ExoSAP (Affimetrix) encimske mešanice, s katero smo z encimsko razgradnjo odstranili nezaželene dNTP-je in začetne oligonukleotide iz PCR produktov. Očiščenim produktom PCR smo nukleotidno zaporedje določili z uporabo BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) po navodilih proizvajalca. Fluorescenčno označene fragmente smo analizirali na kapilarni elektroforezi Genetic analyzer 3130 (Applied Biosystems). Nukleotidno zaporedje promotora vzorca BAC *Salmo salar* 239J4 so določili v podjetju Macrogen Inc, Seul, Koreja.

Nukleotidna zaporedja smo uredili s programom Chromas, primerjavo med sekvencami pa izvedli s pomočjo programa Mega 4 (Tamura in sod. 2007).

2.4 ANALIZA PROMOTORSKE REGIJE TRANSFERINSKEGA GENA

Promotorsko regijo transferinskih lokusov pri vseh proučevanih vrstah (atlantski losos, potočna in soška postrv) in dveh različnih BAC klonih, za katere je bilo znano, da vključujeta le po en transferinski lokus (Rozman in sod., 2008), smo pomnožili s petimi pari začetnih oligonukleotidov (preglednica 1). Prečiščenim produktom PCR dveh BAC klonov smo določili nukleotidno zaporedje, produkte iz genomske DNA pa smo klonirali po standardnem protokolu z uporabo Clone JET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), da bi pridobili zaporedja posameznih promotorskih regij genov za TF1 in TF2.

2.5 ISKANJE VEZAVNIH MEST TRANSKRIPCISKIH FAKTORJEV

Na osnovi nukleotidnih zaporedij fragmentov promotorske regije DNA TF1 in TF2 soške in potočne postrvi ter atlantskega lososa smo s pomočjo programske opreme Genomatix (Matinspector, 2013), ki je prosto dostopna na spletu, določili možna vezavna mesta za transkripcijske faktorje (TR-F).

2.6 ANALIZA IZRAŽANJA TRANSFERINSKEGA GENA PRI ATLANTSKEM LOSOSU

Celokupno RNA, izolirano iz jeter atlantskega lososa, smo tretirali z encimom deoksiribonukleazo (DNaza, DNA RQ1 RNase-Free DNase, Promega) po navodilih proizvajalca. RNA smo nato prepisali v cDNA z encimom M-MuLV reverzno transkriptazo po protokolu proizvajalca (Fermentas).

Na podlagi novih nukleotidnih zaporedij za obe kopiji gena pri atlantskem lososu smo določili specifični Taq Man sonde, ki sta prilegali v področju šestega in sedmega eksona, in se razlikovali na treh mestih, glede na to, ali ležita na TF1 ali TF2. Kot matrico smo uporabili tri vzorce cDNA atlantskega lososa, ki smo jih redčili 1/16, 1/64 in 1/256. Vse tri vzorce smo analizirali v treh ponovitvah in štirih redčitvah. Reakcijska mešanica 10 µL je vsebovala 5 µL "Universal Master Mix" (Applied Biosystems); 0,5 µL mešanice začetnih oligonukleotidov in sonde, 2 µL vzorca in 2,5 µL ddH₂O. Reakcije so potekale v cikličnem termostatu, ki omogoča detekcijo fluorescenca, ViiA Real-Time PCR System (Applied Biosystems) pod standardnimi pogoji.

Podatke smo obdelali s programom Applied Biosystems ViiA 7 Software. S programom Excel 2007 (Microsoft Office) smo izračunali povprečja Ct-povprečja triplikatov določenega vzorca in preverili učinkovitost pomnoževanja (E = efficiency). Rezultate relativne kvantifikacije podajamo kot razmerja med tarčnim in referenčnim pomnožkom v istem in v različnih vzorcih. Določili smo jih iz razlik v Ct vrednostih z metodo relativne standardne krivulje (Real Time PCR Handbook, 2003).

3 REZULTATI

3.1 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). Ta del promotorske regije smo uspešno pomnožili tudi 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. Fragment je obsegal regijo med -348 v promotorski regiji ter +77 od start mesta. Vse promotorske regije transferinskega gena, ki smo jih pridobili, so vsebovale mikrosatelit s tandemski-

```

>TF1(58i22) CATTGCTCAACATTTTATTAGTATGATGACTATGCTGCAAAACACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTTGAAA
>TF2(175g20)CATTGCTCAACATTTTATTAGTATGATGACTATGCTGCAAAACACTTGTAGATTGGAAGACTGCTTTGAAA
*****

>TF1(58i22) TAACAGTTGAAAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTTATTTTGTGAATTTCCATTATGTGGAATGTCT
>TF2(175g20)TAACAGTTGAAAAACATGAGATATTGCTTAATGTAGGACTATTTATTTTGTGAATTTCCATTATGTGGAATGTCT
*****

>TF1(58i22) GAA[ ]GCTGAGTACACACAAA-----CCACACACACACAGGGAGTGAGCC[ ]CGCGCGCCACCCCGCCT
>TF2(175g20)GAA[ ]TCTGAGTACACACAAAACCACACACACACACACACAGGGAGTGAGCC[ ]CGCGCGCCACCCCGCCT
*****

>TF1(58i22) ATGAACAATTAACGC[ ]CCATGTAACATATTGGGAAACCTAAACAACATGGC[ ]CTTTTCAGCTAAGTCAGCC
>TF2(175g20)ATGAACAATTAACGC[ ]CCATGTAACATATTGGGAAACCTAAACAACATGGC[ ]CTTTTCAGCTAAGTCAGCC
*****

>TF1(58i22) CCCATGGACCCAGCCTATTATTGGTTTTCTATAAAAAGCCAGAGTTGCC[ ]TCTAAAACGGCCT[ ]CTTTTTCAGCT
>TF2(175g20)CCCATGGACCCAGCCTATTATTGGTTTTCTATAAAAAGCCAGAGTTGCC[ ]TCTAAAACGGCCT[ ]CTTTTTCAGCT
*****

>TF1(58i22) CGGGAATTGTTGAC[ ]TGGAGACTT[ ]GAGAACATGAAACTGCTTCTCCTCTCAGCGCTGCT
>TF2(175g20)CGGGAATTGTTGAC[ ]TGGAGACTT[ ]GAGAACATGAAACTGCTTCTCCTCTCAGCGCTGCT
*****

```

Slika 1: Nukleotidno zaporedje promotorske regije TF1 in TF2 atlantskega lososa, pomnoženo s TFprom2R in TFprom2F začetniki. Označena so mesta, kjer sta se zaporedji razlikovali.

Figure 1: The promotor region nucleotide sequence of the Atlantic salmon TF1 and TF2, amplified with primers TFprom2R and TFprom2F. Polymorphic positions are marked.

mi ponovitvami (CA)_n približno 160 baznih parov pred startnim kodonom.

Pri atlantskem lososu (BAC) smo uspeli določiti nukleotidno zaporedje fragmentu dolgemu 427 bp pri TF1 in 438 bp pri TF2. Zaporedji sta se razlikovali v šestih nukleotidnih zamenjavah. Pri TF1 je bilo v mikrosatelitu šest CA ponovitev, pri TF2 pa dvanajst (slika 1).

BAC klonu s TF1 smo s 'primer-walking' metodo in TFprom2F kot prvim začetnim oligonukleotidom poskušali določiti daljše nukleotidno zaporedje promotora, ki bi segalo preko dolge repetitivne regije oz. minisatelita. Ta repetitivna regija se nahaja od startnega mesta -416 dalje in obsega 37 baznih parov dolg motiv. Zaradi ponavljajočih se nukleotidnih motivov določitev nukleotidnega zaporedja ni bila mogoča dlje od mesta -1298, in sicer le do štiriindvajsete ponovitve motiva (slika 2).

Za določitev nukleotidnega zaporedja promotorske regije smo klonirali produkte PCR pomnožitev. Prisotnost insertov promotorske regije transferinskega gena smo preverili na 53 klonih soške postrvi in 21 klonih potočne postrvi. Nukleotidno zaporedje smo določili 24 klonom.

Pri vzorcih soške postrvi smo dobili dve različni nukleotidni zaporedji, ki sta se razlikovali v šestih točkovnih polimorfizmih. 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 sekvence razlikovale tudi v številu CA ponovitev v mikrosatelitu, glede na to smo pri vsaki TF-različici opazili dve različni dolžini inserta (dva ale-

la): pri TF1 8 oz. 16 ponovitev; pri TF2 pa 8 ponovitev oz. 21 ponovitev (preglednica 2).

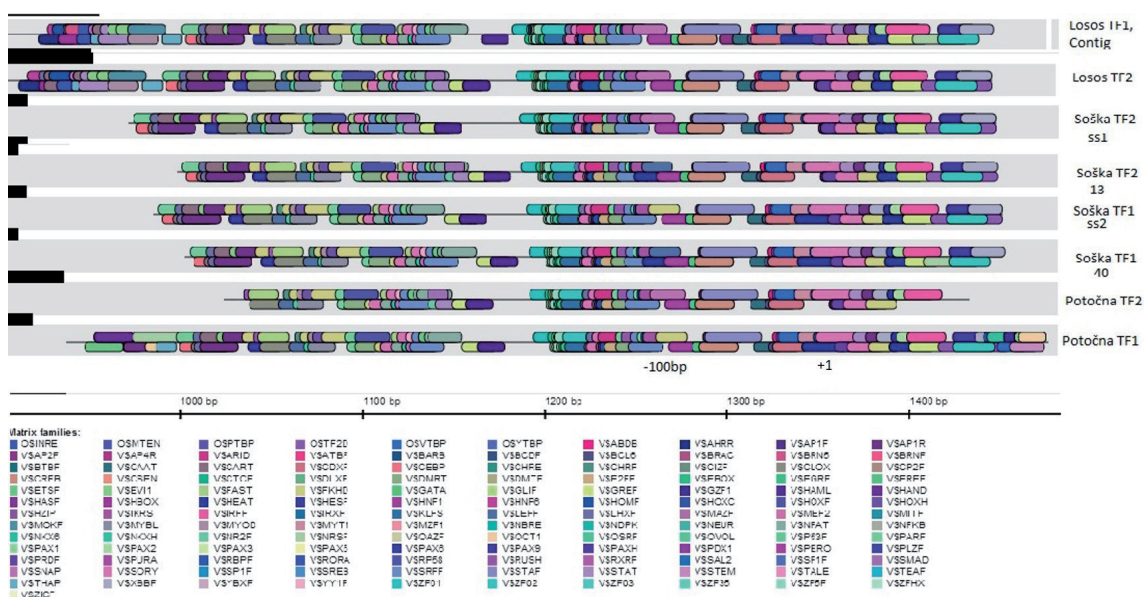
Pri potočni postrvi se različici TF1 in TF2 razlikujeta v inserciji A na začetku fragmenta, štirih nukleotidnih zamenjavah in v ponovitvi CA.

Možna vezavna mesta za transkripcijske faktorje na promotorski regiji transferinskega gena smo iskali s pomočjo programa MatInspector (2013) in ročno določili potencialno pomembne transkripcijske faktorje ter določili razlike med različicama genov TF1 in TF2. V primeru atlantskega lososa smo opazili največ razlik v regiji -556 in -463, tu so prisotna dodatna potencialna vezavna mesta 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. Okoli začetka prepisa sta prisotni dve zamenjavi nukleotidov pri TF2 vseh vrst in tam je program identificiral tri dodatna potencialna vezavna mesta pri TF1 in sicer za HEAT, MYBL IN CIZF, pri TF2 pa naj bi se tam vezal AP1R. Pri potočni postrvi je v tej regiji še eno potencialno vezavno mesto za 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 enemu klonu TF1 soške postrvi je TCT, pri drugem klonu soške postrvi TF1 in pri TF2 soške postrvi pa TTC. V tej regiji imata klona soške postrvi (po en primerok TF1 in en TF2) dodatno vezavno mesto za HEAT, ostali, torej atlantski losos in potočna postrv (oba TF1 in TF2) ter po en primerok TF1 in TF2 soške postrvi vezavno mesto za FKHD. Oba sta znana kot elementa večjega kompleksa

Preglednica 2: Primerjava dobljenih nukleotidnih zaporedij promotorske regije in skupnih razlik pri atlantskemu lososu (BAC-i; TF1 in TF2), soški postrvi ter potočni postrvi

Table 2: Comparison of promoter region nucleotide sequences and total differences in Atlantic salmon (BACs, TF1 and TF2), marble trout and brown trout

	-224	-208	CA (od -160 dalje)		-152	-117	-95 do		-42	+1	+4	+30	+40	+62
Losos TF1	G	/	6	A	G	CCCT	C	G	G	A	T	C	C	
Losos TF2	T	A	12	C	A	CCCT	G	C	A	G	A	G	G	
Soška TF1, alel 1	G	A	8	C	G	CTTC	C	C	G	A	T	C	C	
Soška TF1, alel 2	G	A	16	C	G	CTCT	C	C	G	A	T	C	G	
Soška TF2, alel 1	T	A	21	C	G	CCCT	C	C	A	G	T	C	G	
Soška TF2, alel 2	T	A	8	C	G	CTTC	C	C	A	G	T	C	G	
Potočna TF1	G	A	13	C	G	CTCT	C	C	G	A	T	C	G	
Potočna TF2	T	A	15	C	G	CCCT	C	C	A	G	T	G	G	



Slika 3: Potencialna vezavna mesta transkripcijskih faktorjev v promotorski regiji, ki smo jih določili s pomočjo programa MatInspector pri atlantskem lososu, soški in potočni postrvi. 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. Barvna slika je dosegljiva na <http://ojs.aas.bf.uni-lj.si/index.php/AAS/article/view/588/308>.

Figure 3: Potential transcription factor binding sites in the promoter region, determined using the MatInspector program for Atlantic salmon, marble trout and brown trout. Transcription initiation site where two nucleotide differences between TF1 and TF2 were detected, is marked. The colour figure is available at <http://ojs.aas.bf.uni-lj.si/index.php/AAS/article/view/588/308>.

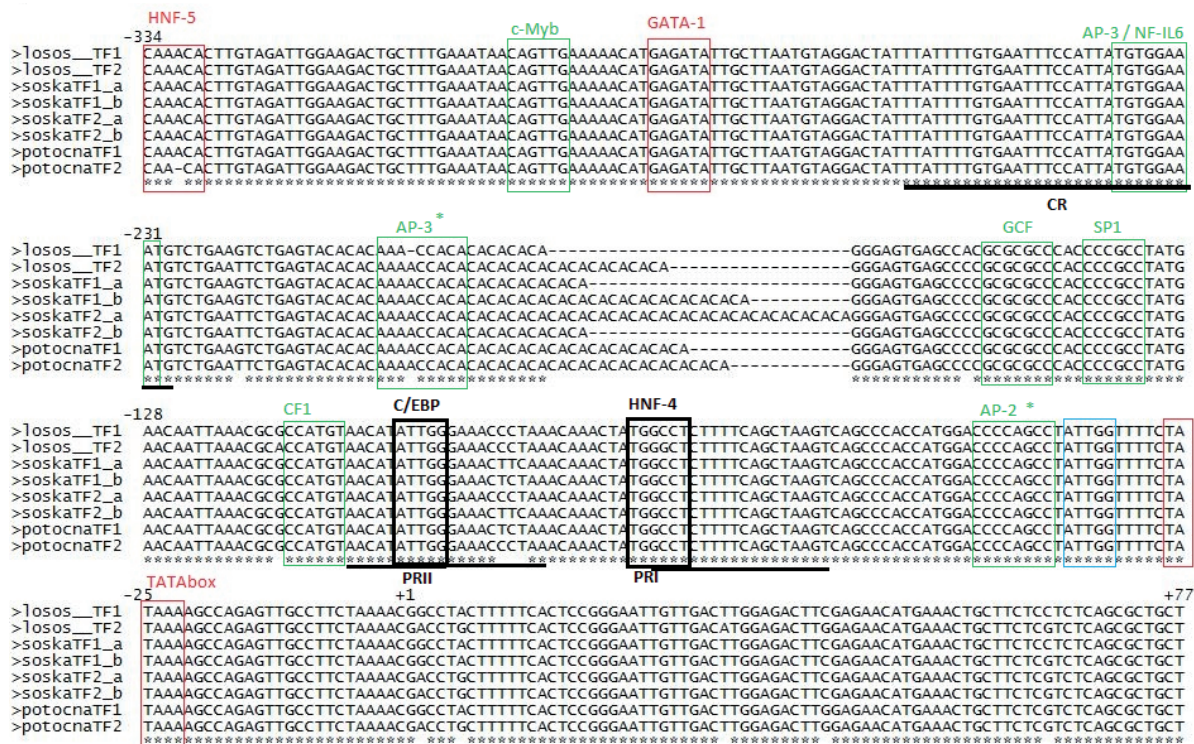
3.2 ANALIZA IZRAŽANJA TRANSFERINSKEGA GENA PRI *Salmo salar*

Med petim eksonom in sedmim intronom smo določili zaporedje TF1 in TF2 pri atlantskem lososu. S pomočjo znane sekvence 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:

TF1 TaqMan sonda CAAGCCCCTGGCTGTACCT-GCCGCAGA
ekson 6 ekson 7
TF2 TaqMan sonda CAATCCCCCTGGCTGTGCT-GCCCCAGA

Izračunali smo razliko v izražanju genov z uporabo relativne kvantifikacije in metode standardne krivulje. Za



Slika 4: 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. Barvna slika je dosegljiva na <http://ojs.aas.bf.uni-lj.si/index.php/AAS/article/view/588/308>.

Figure 4: Comparison of the promoter region nucleotide sequences in brown trout, marble trout and Atlantic salmon. The regions that bind major transcription factors (black, Brunel et al., 1988) and their potential binding sites determined by Kvingedal (1994) are indicated. In the latter, region marked with star denotes newly obtained sequences for TF1 in Atlantic salmon differing from nucleotide sequences described in Kvingedal (1994). The colour figure is available at <http://ojs.aas.bf.uni-lj.si/index.php/AAS/article/view/588/308>.

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 bilo pri genu TF1 $6,32 \pm 0,299$ več produktov pomnoževanja kot pri genu TF2.

4 RAZPRAVA

4.1 PODVOJENOST TRANSFERINSKEGA LOKUSA PRI *Salmo* sp.

Naši rezultati so v skladu z opažanji drugih raziskovalcev (Rozman in sod., 2008; Kvingedal & Rørvik, 1993; Antunes in sod., 2006; Andersen in sod., 2011), ki so poročali o podvojenosti transferinskega lokusa pri lososu in

postrvi. Transferin je zadolžen za prenos železa, shranjevanje in uporabo v presnovnih procesih, kot so sinteza DNA, prenos kisika in elektronov, rast celic in uravnavanje delovanja imunskega sistema. Pomembno je povezan z odpornostjo proti okužbam in kontrolo razvoja bakterij (Sun in sod., 2012; Bullen in sod., 2006; Woo & Ardelli, 2014). 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 že takoj po podvojitvi postane transkripcijsko neaktiven ali 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 postrvi opazimo le malo razlik, zato predpostavljamo, da se zaradi selekcijskega pritiska od podvojitve dalje pri TF2 mutacije ne kopičijo prosto in ga zato ne moremo tretirati kot psevdogen.

4.2 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 & 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. Pri raziskavi na potočni in soški postrvi so ugotovili precej večje razlike v izražanju med TF1 in TF2 (preko 100 krat; Rozman in sod., 2008), večja pa so bila tudi odstopanja ob primerjavi vzorcev. Odstopanja so lahko posledica različnih okolij, iz katerih so izhajali vzorci, in različne starosti, saj lahko zunanji dejavniki vplivajo na različno ekspresijo. Pri našem poskusu takih razlik ni bilo; vsi vzorci so bili iz istega okolja, odvzeti hkrati enako starim osebkom.

Rozman in sod. (2008) so dokazali, da sta pri TF2 spremenjeni dve aminokislini, ki sodelujeta pri vezavi železa, kar potencialno nakazuje spremenjeno oz. zmanjšano vlogo te različice pri vezavi železa. Vendar pa hkrati poudarja, da se bralni okvir do sedaj preučevanih transferinskih cDNA TF1 in TF2 pri postrvih in atlantskemu lososu ni bistveno spremenil (Rozman in sod., 2008; Kvingedal in sod., 1993). Kvingedal (1994) je odkrila le minimalne razlike v promotorski regiji med TF1 in TF2. V naši raziskavi smo prišli do podobnih rezultatov na osnovi različno dolgih delov promotorske regije pri soški in potočni postrvi ter atlantskem lososu. Pri vseh vrstah so se zaporedja med TF1 in TF2 razlikovala v štirih zamenjavah v regiji od -334 do +77. Pri atlantskem lososu je v enaki regiji prisotna dodatna delecija pred mikrosatelitom ter šest zamenjav, pri postrvih pa dodatno tri 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 začinjajo ponavljajoča se zaporedja 37 bp dolgega motiva. Pri TF2 ponavljajočih se zaporedij ni; pomnožen pa je bil del, ki se najverjetneje pri TF1 nahaja pred ponovitvami.

Ob primerjavi dobljenih zaporedij TF1 in TF2 promotorske regije opazimo nekaj razlik v nukleotidnem zaporedju pri soški in potočni postrvi, kar ima za posledico nastanek novih potencialnih vezavnih mest za transkripcijske faktorje. 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 prepoznana kot del večjega sklopa transkripcijskih faktorjev v povezavi s faktorjem C/EBP (Matinspector, 2013). C/EBP transkripcijski faktorji so člani družine levcinskih zadrž (Lamb & 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 faktorjema 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. Nukleotidno zaporedje te regije je pri atlantskem lososu v primerjavi s človekom enaka v 11 nukleotidih in vključuje tudi CCAAT zaporedje. To ob dejstvu, da obstajajo homologi C/EBP transkripcijskih faktorjev pri evlucijsko bolj oddaljenih vrstah, kot sta človek in kokoš (Faisst & Meyer, 1992), nakazuje, da tudi pri atlantskem lososu obstaja C/EBP faktor, ki se veže v regiji okoli -100 (Kvingedal, 1994).

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 postrvih.

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 ponavljajočih 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 ponavljajočimi se motivi. Ob poravnavi s humanim promotorjem smo v tej regiji, ki so jo Brunel in sod. (1988) poimenovali DRI, našli pri atlantskem lososu 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 na osnovi primerjav potencialnih vezavnih

mest za transkripcijske faktorje v promotorjih genov za TF1 in TF2 ni mogoče sklepati o aktivnosti promotorjev. Študije so dokazale, da se TF1 izraža v večji meri kot TF2. Ali je to zaradi zamenjave enega 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.

Mikrosateliti v promotorjih imajo sposobnost tvorjenja različnih sekundarnih DNA struktur, za katere je znano, da sodelujejo pri uravnavanju izražanja genov. Vedno več študij dokazuje, da sprememba v dolžini ponavljajočih se zaporedij lahko vpliva na uravnavanje izražanja genov (Sawaya in sod., 2012). V promotorski regiji transferinskega gena smo našli mikrosatelit 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. Mikrosatelit AC/GT lahko tvori Z-DNA (levosučna dvojna vijačnica; Wang & Vasquez, 2007) in to je drugi najpogostejši mikrosatelit, 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, razlike pa obstajajo tudi med osebki znotraj vrste. Glede na to lahko potrdimo, da je ta odsek visoko polimorfen, ni pa znano, če vpliva na izražanje transferinskega gena.

Pri atlantskem lososu se pri TF1 po -416 mestu ponavlja 37 bp dolg motiv, ki vsebuje TATA zaporedje in pri TF2 v znani regiji ni prisoten. Morda se pri TF2 nahaja dlje od regije -400 in opravlja isto funkcijo kot pri TF1. Če temu ni tako in torej pri TF2 te regije ni, bi lahko ponavljajoči motiv vplival na povečano izražanje gena TF1 v primerjavi s TF2.

5 ZAHVALA

Zahvaljujeva se dr. Alešu Snoju za pomoč pri zbiranju vzorcev in konstruktivno razpravo tekom raziskovalnega dela. Raziskava je bila podprta preko Raziskovalnega programa št. P4-0220, ki ga je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.

6 VIRI

- Allendorf, F. W., & Thorgaard, G. H. (1984). Tetraploidy and the evolution of Salmonid fishes. V: B. J. Turner (ur.), *Evolutionary Genetics of fishes* (str. 1–53). Virginia: Plenum Press.
- 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. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-51>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01253.x>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0637295100>
- Barnes, D., & Sato, G. (1980). Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Analytical Biochemistry*, 102, 255–270. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90151-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90151-7)
- Brunel, F., Ochoa, A., Schaeffer, E., Boissier, F., Guillou, Y., Cereghini, S., ... 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.
- 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. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46386-0>
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25, 827–839. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00038-6)
- Faisst, S., & Meyer, S. (1992). Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 20, 3–26. <https://doi.org/10.1093/nar/20.1.3>
- Ford, M. J. (2001). Molecular evolution of transferrin: Evidence for positive selection in salmonids. *Molecular biology and evolution*, 18(4), 639–647. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003844>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00651.x>
- Kvingedal, A. M. (1994). Characterization of the 5' region of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) transferrin-encoding gene. *Gene*, 150, 335–339. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90448-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90448-0)
- 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.
- Lamb, P., & McKnight, S. L. (1991). Diversity and specificity in transcriptional regulation: The benefits of heterotypic

- dimerization. *Trends in Biochemical Sciences*, 16, 417–422. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90167-T](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90167-T)
- Lambert, L. A., Perri, H., & Meehan, T. J. (2005). Evolution of duplications of the transferrin family of proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology, B*, 140, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.012>
- Liang, G. M., & Jiang, X. P. (2010). Positive selection drives lactoferrin evolution in mammals. *Genetica*, 138, 757–762. <https://doi.org/10.1007/s10709-010-9456-x>
- Lynch, M., & Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicated genes. *Science*, 290(5494), 1151–5. <https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1151>
- 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.
- MatInspector. (2013). *MatInspector: Search for transcription factor binding sites*. Genomatix. Pridobljeno s https://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
- Ohno, S. (1970). *Evolution by gene duplication*. New York: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-86659-3>
- Phillips, R. B., & Oakley, T. H. (1997). Phylogenetic relationships among the Salmoninae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. V T. D. Kocher & C. A. Stepien (ur.), *Molecular systematics of fishes* (str. 145–162), New York: Academic Press.
- Real Time PCR Handbook. (2003). *RRC Core Genomics Facility, University of Illinois at Chicago*. Pridobljeno s <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
- Rozman, T. (2008). *Opis transferinskega lokusa in njegova uporaba pri filogenetskih analizah rodu Salmo* (doktorska disertacija). Ljubljana: Medicinska fakulteta.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01768.x>
- Sawaya, S. M., Lennon, D., Buschiazzi, E., & Gemmell, N. (2012). Promoter microsatellites as modulators of human gene expression. V A. J. Hannan (ur.), *Tandem repeat polymorphism: Genetic plasticity, neutral diversity and disease*. Austin, Texas: Landes Biosciences, Springer Science+Business Media.
- 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.
- Sun, Y., Zhu, Z., Wang, R., Sun, Y., & Xu, T. (2012). Miuiy croaker transferrin gene and evidence for positive selection events reveal different evolutionary patterns. *Plos one*, 7(9), 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043936>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Wang, G., & Vasquez, K. M. (2007). Z-DNA, an active element in the genome. *Frontiers in Bioscience*, 12, 4424–4438. <https://doi.org/10.2741/2399>
- Woo, P. T. K., & Ardelli, B. F. (2014). Immunity against selected piscine flagellates. *Developmental and comparative immunology*, 43, 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.006>
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends in ecology and evolution*, 18, 292–298. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00033-8)