

МИТОХОНДРИЈАЛНИ ГЕНОМИ КЛАСЕ DEMOSPONGIAE SOLLAS 1885

Николина Елез-Бурњаковић¹, Ајла Смајловић², Милан Кулић¹

¹Медицински факултет Универзитета у Источном Сарајеву

Студентска 5, 73300 Фоча, Босна и Херцеговина

²Музичка академија Универзитета у Сарајеву

Јосипа Стадлера ½, 71000 Сарајево, Босна и Херцеговина

Abstract

ELEZ-BURNJAKOVIĆ, Nikolina, Ajla SMAJLOVIĆ, M. KULIĆ: MITOCHONDRIAL GENOMES OF THE CLASS DEMOSPONGIAE SOLLAS 1885. [¹Faculty of Medicine, University of East Sarajevo, Studentska 5, 73300 Foča, Bosnia and Herzegovina, ²Academy of Music, University Sarajevo, Josipa Stadlera ½, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina]

Mitochondria, the energy-producing organelles of the eukaryotic cell, originate from an endosymbiotic α -proteobacterium. Genome architecture and gene content of mitochondrial DNA (mtDNA) vary extensively throughout eukaryotes. New insights into early mitochondrial genome evolution come from the investigation of the most primitive mitochondriate eukaryotes, as well as from the comparison between mitochondria and intracellular bacterial symbionts. Determining the primary structure of the circular mitochondrial (mt) genome from phylum Demospongiae Sollas 1885, representative of the oldest and most simple metazoan phylum, their approximate size and gene content were defined. The genetic code is minimally derived and only the UGA termination codon is used to code for triptophan, as from the all analyzed poriferan mtDNA. In this paper, sequenced mitochondrial genomes from phylum Demospongiae, their size, rRNA, tRNA and coding genes are presented. Data of variable metazoan G+C content are also described. In this work, unuploaded mitochondrial genome of *Spongilla lacustris* Linnaeus 1758 is included. It has shown some ancestral but also typical animal-like characteristics which classify the phylum Demospongiae at the basal position of multicellular animals. Demosponge mitochondrial genomes contain set of 2-27 tRNA genes. tRNA genes, among all species, are conserved in their size, primary and secondary structure. Small and large rRNA genes (*rns* and *rnl*), arranged near each other (separate with 1-3 tRNA) in the most analysed genomes are highly conserved. A lot of Demosponge species have set of 13 protein genes.

Key words: Demospongiae, Metazoa, mtDNA, tRNA, rRNA, protein genes

Сажетак

Митохондрије су органеле специјализоване за производњу енергије у еукариотским ћелијама, а воде поријекло од ендосимбиотских α -протеобактерија. Постоје значајне разлике у архитектури митохондријалних генома и саставу гена међу различитим групама Metazoa. Истраживањем митохондријалне ДНК (мтДНК, енгл. *mtDNA*) најједноставнијих вишећелијских организама стичу се нове спознаје о раним фазама еволуције митохондријалних генома. Одређивањем примарне структуре циркуларне митохондријалне ДНК служви класе Demospongiae Sollas, 1885 процијењена је њихова приближна величина и састав гена. Генетички код је минимално измијењен, само се терминацијски кодон UGA препознаје као кодон за триптофан,

што је одлика до сада анализираних мтДНК из филума Porifera. У овом раду су дати прегледи до сада анализираних митохондријалних генома класе Demospongiae, њихова величина, те гени за малу (*rns*) и велику (*rnl*) подјединицу рибозомалне РНК (рРНК), транспортне РНК (тРНК) и кодирајуће гене. Дат је и процентуални приказ G+C базног састава који значајно варира између различитих група Metazoa. Митохондријални геном *Spongilla lacustris* Linnaeus 1758 који није објављен, убачен је у преглед, а посједује својства и анцестралних, али и за животиње специфичних особина које сврставају класу Demospongiae у базалну групу вишећелијских животиња. Митохондријални геноми Demospongiae садрже сетове гена за тРНК, најчешће од 2 до 27 тРНК гена. Гени за тРНК су конзервирани код свих врста, у односу на величину, примарну структуру и секундарну структуру. Гени за малу и велику подјединицу рРНК (*rns* и *rnl*) који се налазе непосредно један уз други (раздвојени 1-3 тРНК) у већини анализираних генома су такође високо конзервирани. Већина врста класе Demospongiae има сет са 13 протеинских гена.

Кључне ријечи: Demospongiae, Metazoa, мтДНК, тРНК, рРНК, протеински гени

УВОД

Спужве су, са изузетком једне слатководне породице (Spongillidae Gray, 1867), морске сесилне животиње. Најчешће су асиметричне и радијално-симетричне, различитог облика, величине и боје. Њихова организација је на ниском ћелијском нивоу и оне су вишећелијске животиње без органских система и правих ткива какви се срећу код Eumetazoa. На тијелу им се налазе ситни улазни отвори - поре и крупни излази - оскулуми. Између отвора се налазе системи шупљина и канала. Кроз њих протиче вода у једном смјеру која доноси храњиве честице и кисеоник. Величина спужви се креће од неколико милиметара (*Cliona celata* Grant, 1826 висина 2 мм) па све до три метра. Тај рекорд припада врсти из поткласе Hexactinellida *Monorhaphis chuni* Schulze, 1904, чије спикуне могу нарасти до 3 м дужине.

Класификација спужви је извршена на основу грађе скелета. Разред Porifera припада царству Animalia, потцарству Parazoa. Разред је подијељен на три класе: Demospongiae (кременорожњаче), Calcarea (вапњењаче) и Hexactinellida (стаклаче). Раније је постојала и четврта класа Sclerospongia Hartman, 1969 (коралне спужве), али морфолошки (Van Soest, 1984; Vacelet, 1985; Reitner, 1992) и молекуларни (Chombard et al., 1997) подаци су указали на њихову припадност класи Demospongiae.

Класа Demospongiae је најмногобројнија, обухвата преко 90% рецентних врста спужви, односно око 5 000 врста. Нешто мање од половине изумрлих родова или фамилија је спадало у ову класу, међутим већина рецентних Demospongiae не посједује скелет који може лако да фосилизира, тако да је њихов фосилни диверзитет, који је достигао свој врхунац у креди (прије око 150 милиона година), вјероватно лоше процијењен и недоступан.

У класу спадају врсте које настањују различите водене екосистеме и адаптивне зоне, а у ову класу спадају и једине слатководне спужве, фамилија Spongillidae. Имају скелет од силицијум-диоксида или спонгина, а код неких су присутне обје врсте скелета. Има и оних без скелета (род *Oscarella* Muricy и Pearse, 2004), али се сматра да су настале од спужви које су имале спикуне. Тијело им је леуконоидне грађе.

Систематика класе Demospongiae се још увијек активно истражује и много тога се још треба спознати о овој класи, али нека основна начела класификације су установљена. Базална клада класе Demospongiae је поткласа Homoscleromorpha Bergquist, 1978, која

посједује ларву сличнију класи *Calcarea*, него осталим припадницима класе *Demospongiae*. Остале двије групе, поткласе *Tetractinomorpha* Lévi, 1953 и *Ceractinomorpha* Lévi, 1973 дијеле особине које упућују на заједничко поријекло као што су ларва и присуство спонгина. Међутим, наведене двије групе се разликују по различитим типовима микросклера, за које се не зна како су се развиле у појединачним групама. Фосили ових група, нађени у камбрију, указују на рано раздвајање класе *Demospongiae*. Многи фосилни припадници класе *Demospongiae* су уврштене у *Lithistida*-e, са полифилетским члановима који се могу уврстити у рецентне припаднике поткласа *Tetractinomorpha* и *Ceractinomorpha*. Набројани таксони спадају у несестринске класе, о чему ће се расправљати накнадно у раду.

Класа *Demospongiae* се дијели на три поткласе: *Ceractinomorpha*, *Homoscleromorpha* и *Tetractinomorpha*. Поткласа *Ceractinomorpha* обухвата 9 редова: *Agelasida*, *Cryptocoeliidae*, *Dendroceratida*, *Dictyoceratida*, *Halichondrida*, *Haplosclerida*, *Poecilosclerida*, *Verongida* и *Choristida*.

Поткласа *Homoscleromorpha* обухвата ред *Homosclerophorida* Dendy, 1905 са једном породицом *Plakinidae* Dendy, 1905, која обухвата шест родова.

Поткласа *Tetractinomorpha* обухвата четири реда: *Lithisida* Schmidt, 1870, *Astrosporida* Sollas, *Nadromerida* Topsent, 1898 и *Spirosporida* Bergquist i Hogg, 1969. У ред *Lithisida* спадају чланови различитих редова који посједују спикеле од силиката, те је ово ред настао из потребе сврставања наведених врста у вишу таксономску категорију. Насељавају морске дубине испод зоне свјетлости. Најстарији фосилни остаци потичу из камбријума.

Традиционално се систематика разреда *Porifera* заснивала на спикелама, чија се морфологија и еволуција исцрпно истраживала (Dendy, 1921; Jones, 1997; Uriz et al., 2003), али информације које оне пружају су ограничене да би се могла ријешити проблематика класификације спужви. Друге морфолошке особине попут облика, грађе и боје, зависе од услова средине, па се не могу узети као таксономски карактер. Показало се да су бројне морфолошке особине резултат хомоплазије, па самим тим нису погодне за филогенетичке анализе (Manuel et al., 2003).

Цитолошка истраживања (Boury-Esnault et al., 1994) су помогла у класификацији неких такса, али нису била довољна за бројна филогенетска питања. У класификацијско разрјешавање спужви су накнадно укључене и биохемијске компоненте (Van Soest и Braekman, 1999; Egrebeck и Van Soest, 2007), али се од тог покушаја одустало због двоумице о поријеклу датих компоненти (да ли их продукује спужва или симбионт). Посљедња истраживања систематике и филогеније спужви су заснована на анализи нуклеарног и митохондријалног генома (гени за рРНК и подјединицу 1 цитохром ц оксидазе) која су контрадикторна традиционалној морфолошкој класификацији (Egrebeck и Wörheide, 2007). На крају се може закључити да не постоји јединствен систем маркера који би омогућио вјеродостојну и јединствену класификацију разреда *Porifera*, тако да је горе наведена класификација дискутабилна.

Дистрибуција комплетно и парцијално секвенционираних митохондријалних генома главних група *Metazoa*, број гена и архитектура генома су доступни у референтним базама података. Као што је и за очекивати, највећи број анализираних генома је у оквиру *Vertebrata* Cuvier, 1812 (највише анализирани коштани рибе и сисари),

а потом и *Arthropoda Latreille, 1829* (Gissi et al., 2008). Органеларна база података GOBASE из децембра 2010. године даје расположиве цјеловите секвенце за 1283 митохондријска генома, но укупно је до сада секвенцирано 1898 митохондријских генома, те 21 цјеловита секвенца митохондријских плазида. Ова база података такође има похрањених чак 177 000 парцијалних секвенци митохондријске ДНК. Нажалост, ова база података због недостатка финансијских средстава је престала са уносом података августа 2010. године. Према MitoZoa бази података, из децембра 2011. године секвенцирано је 3075 митохондријских генома Metazoa, а од тог броја 474 генома је парцијално.

Број гена мтДНК варира од 14 до 53, варијација је најчешћа за тРНК гене, а рјеђе за протеин кодирајуће и гене за рРНК. Варијација броја гена и величине генома не зависи од групе посматраних организама. Највећи геноми су присутни код биљака из породице Cucurbitaceae Juss. (преко 2000 кб), а најмањи код представника царства Protista *Plasmodium falciparum* Welch, 1897 (свега 6 кб и 5 гена), а с друге стране највећи број гена је пронађен код протисте *Reclinomonas americana*, која има 97 гена и величину од 64 кб и најсличнија је бактеријским геномима. Број тРНК гена варира од два до 27, као посљедица учесталих дупликација и губитака ових гена што је карактеристично за кољена Porifera и Cnidaria Hatschek, 1888. У вишим таксономским категоријама број ових гена је релативно константан, те код Vertebrata износи 22, док је код Bivalvia Linnaeus, 1758, Nematoda Rudolphi, 1808 и Porifera немогуће утврдити стандардни садржај гена за тРНК (Gissi et al., 2008).

Мали број тРНК кодираних геномом митохондрија је одраз чињенице да митохондрије користе генетички код који се разликује од универзалног (уз изузетке). Постоје 64 могућа кодона, од којих 61 кодира 20 различитих аминокиселина уграђених у протеин. Захваљујући феномену колебања (енгл. *wobble*), многе тРНК прокариота и еукариота могу препознати више од једног кодона у мРНК. Колебање допушта могућност погрешког спаривања између антикодона тРНК и нуклеотида на трећем положају неких комплементарних кодона. Према правилима колебања потребно је најмање 30 различитих тРНК за превођење универзалног кода.

Поред тога ДНК митохондрија кодира 20-ак тРНК. То је могуће због изразитог колебања у којем се урацил у антикодону тРНК може спарити са било којом од четири базе на трећем мјесту у кодону иРНК, па тако једна тРНК може препознати четири различита кодона.

Врло интересантан примјер губитка/стицања тРНК гена је у случају двије копије гена за тРНК^{MetCAUe} који је забиљежен само код Demospongiae, гдје је једна иницијаторска, а друга елонгаторска тРНК^{MetCAUf} (Dellaporta et al., 2006; Signorovich et al., 2007). Сматра се да је сличан случај код шкољки и плашташа с тим што елонгаторска користи UAU антикодон, а иницијаторска CAU (Hoffmann et al., 1992; Beagley et al., 1999; Yokobori et al., 2005; Gissi et al., 2004). Митохондријална ДНК увијек кодира два рРНК гена, њихова дупликација је врло ријетка и забиљежена код свега четири врсте (*rns* је дуплицирана код шкољке *Crassostrea gigas* Thunberg, 1793 и нематоде *Thaumatermis cosgrovei* Poinar, 1981) (Milbury и Gaffney, 2005; Tang и Hyman, 2007), а *rnl* код крпеља *Leptotrombidium pallidum* (непознат аутор и година) (Shao et al., 2005), а оба гена су дуплицирана код нематоде *Strelkovimermis spiculatus* (непознат аутор и година).

За протеин кодирајуће гене је карактеристично да су релативно константног броја. Гени који кодирају подјединице за аденозин трифосфат синтазу (АТФ) показују сигнификантну тенденцију губитка/стицања код Metazoa. Већина Porifera кодира *atp9*, *atp6* је одсутан код Chaetognatha Leuckart, 1854, *atp8* је одсутан или високо модификован код Chaetognatha, Rotifera Cuvier, 1798, 13 од 19 мтДНК Bivalvia, Nematoda и Platyhelminthes Gegenbaur, 1859. Додатни протеин кодирајући гени су присутни код Porifera, *atp9* и *tatC* које кодирају и Protista што говори о примитивним особинама ових животиња које нису присутне код осталих Metazoa. Код *Amphimedon queenslandica* Hooper и Van Soest, 2006 *atp9* је прешао у нуклеарни геном. Интрони групе I су уочени код Cnidaria и Porifera, а интрони групе II су уочени код Annelida-e Lamarck, 1809 врсте *Nephtys sp.* (непознат аутор и година), вјероватно као резултат хоризонталног трансфера гена са бактеријског или виралног вектора (Gissi et al., 2008). Архитектура митохондријског генома подразумева редослијед и састав комплетног сета кодирајућих, необичних и дуплицираних гена. Већина митохондријских генома је циркуларна са линеарним изузетцима као код узрочника маларије *Plasmodium falciparum* који има свега 5 гена (величина генома око 6 кб), *Clathria clathrus* Schmidt, 1864, из класе Calcarea која има 6 хромозома, те несродних врста неких Cnidaria и гљива. Друга необичност је уочена код *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 чија се мтДНК састоји од хиљада спојених миникругова и неколико максикругова.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

У раду су кориштене референтне базе података слободно доступне на Интернету. Подаци о броју секвенираних генома добијене су из MitoZoa и GOBASE. Подаци о величини генома, броју гена и G+C саставу су преузети са NCBI-a (Таб. 1).

Табела 1. Приказ пописа базе података кориштених у изради рада

Име базе	Опис базе	Литературни наводи
NCBI	база података молекуларне биологије	Pepper, 1988
GOBASE	база података за органеле	Korab-Laskowska et al., 1998; Shimko et al., 2001; O'Brien et al., 2003
MitoZoa	база података о митохондријалним геномима Metazoa	D'Onorio de Meo P et al., 2011; Lupi R, et al., 2010
Porifera on Tree of Life web project	база података о биодиверзитету, основним карактеристикама и еволуцији спужви	Lavrov, D., 2009
Palaeos.org	база о историји живота на Земљи	Kazlev et al., 1999
Introduction to Porifera	база о разреду Porifera	University of California, 1994
World Porifera Database	база о разреду Porifera	Van Soest et al., 2008
Sponge Barcoding Project	база за идентификацију врста	Menke, 2007

Porifera Web Page	база о свим аспектима биологије разреда Porifera	Picton, 1995
The Taxonomicon	таксономска база података	McKenna и Bell, 1997

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Према MitoZoa бази података, из децембра 2011. године, од укупно 3075 секвенционираних је 31 геном Porifera. Од тог укупног броја секвенционираних је укупно 30 мтДНК Demospongiae, циркуларних молекула са конзервираним сетом 13 протеинских и 2 рРНК гена идентична мтДНК билатералних животиња (Booge, 1999). Све Demospongiae, изузев *Amphimedon queenslandica* (Erpenbeck et al., 2007) имају додатни *atp9* ген, подјединицу 9 АТП синтазе, а *tatC* ген (енгл. *twin arginine translocase C*) само врста *Oscarella carmela* (Wang и Lavrov, 2007). Број гена за тРНК варира од 2 до 27, а код већине врста је присутно 24-25 гена за тРНК.

Секвенца са потенцијалом да гради тРНК - сличну структуру, названа *trnX* је уочена низводно од *cox1* гена код врста *Xestospongia muta* Schmidt, 1870 и *Ephydatia muelleri* Lieberkühn, 1856. Транспортна РНК(Х) молекула има конзервирану примарну (65.3% нуклеотида идентично) и секундарну структуру, изузев антикодонске петље која се разликује по дужини и секвенци код обје врсте. Величина генома такођер варира (16-28,9 кб, средња вриједност је 19,7 кб) (Таб. 2) што се може преписати експанзији некодирајућих регија, изазваној репетативним елементима.

У односу на величину генома нису уочени филогенетски односи, као ни сличност секвенце репетативних елемената. Demospongiae имају веће мтДНК у односу на билатералне животиње, а истовремено и патуљасте у односу на хоанофлагелату *Monosiga brevicollis* (непознат аутор и година) (76,6 кб) и плактозоу *Trichoplax adherens* von Schultze, 1883 (више од 43 кб), које имају много већи проценат некодирајуће ДНК и у случају *Monosiga brevicollis* већи сет гена (55 гена).

Гени за малу и велику подјединицу рРНК (*rns* и *rnl*) се налазе непосредно један уз други (раздвојени 1-3 тРНК) у већини анализираних генома који почињу генским редослиједом *+rns+trnG+trnV+rnl*. Уз изузетке пронађене у *Igernella notabilis* Duchassaing и Michelotti, 1864, гдје су *rns* и *rnl* раздвојени *atp9* и *Oscarella carmela* у којој су раздвојени великим сетом гена са супротним орјентацијама транскрипције.

Величина *rns* гена има обим од 828 (*Hippospongia lachne* de Laubenfels, 1936) до 1831 бп (*Suberites domuncula* (Olivi, 1792)), са просјечном величином 1224 бп. Величина *rnl* гена варира између 2166 (*Hippospongia lachne*) и 3487 бп (*Axinella corrugata* George и Wilson, 1919), са просјечном величином око 2589 бп. Разлике у величини рРНК гена потичу од два фактора. Прво, дио вањског региона оба рРНК гена је скраћен или изгубљен у појединим линијама. Друго, ријетки репетативни елементи су уметнути у рРНК гене код неколико врста, прије свега у *Axinella corrugata*, *Ephydatia muelleri*, *Igernella notabilis* и *Vacelatia sp.*

Митохондријални геноми Demospongiae садрже сетове гена за тРНК, најчешће од 2 до 27 тРНК гена. Варијација у броју је проузрокована губитком свих изузев 2 митохондријална гена за тРНК (*trnM(cau)* и *trnW(uca)*) код *Igernella notabilis*, *Hippospongia lachne* и *Vacelatia sp.*, дјелимичним губитком тРНК гена у *Agelas schmidti* Wilson, 1902 (најмање један ген), *Amphimedon queenslandica* (најмање 7 гена) и *Plakortis*

angulospiculatus Carter, 1882 (најмање 18 гена), спорадично присуство *trnM(cau)e* унутар свих врста и дупликација *trnT(ugu)* и *trnV(uac)* у мтДНК *Oscarella carmela*. С обзиром да је потребно најмање 24 врсте тРНК за митохондријалну транслацију, сматра се да је губитак истих надокнађен уносом потребних тРНК из цитоплазме (Lavrov et al., 2005).

Гени за тРНК су конзервирани код свих врста у односу на величину, примарну секвенцу и секундарну структуру. Све мт-тРНК структуре имају сачуване Д- и Т-омче (7-11 нуклеотида) са потенцијалом формирања стандардних терцијарних интеракција Г18-У55. Конзервирани су и варијабилне или семи-инваријабилне нуклеотидне позиције, секундарне и терцијарне интеракције присутне код прокариотских и нуклеарних тРНК. Ријетки А11-Т24 пар у тРНК^{ProUGG} и Г11-Ц24 пар тРНК^{TrpUCA} су присутни код свих Demospongiae. Први пар је карактеристичан за Demospongiae, Hexactinellida и Placozoa (Lavrov et al., 2005; Wang и Lavrov, 2007), а други за билатералне животиње (Wolstenholme, 1992). Пуринска база на положају 11 и пиримидинска на положају 24 (R11-У24 пар) карактеристичне за бактеријску, археалну и органеларну иницијаторску тРНК^{MetCAUf} су примјећене код већине врста (Marck и Grosjean, 2002).

Од свих тРНК гена *trnW(uca)* има најочуванију примарну структуру (84.9% pairwise секвенце идентично), док *trnS(uga)* најмање (66.7% секвенце идентично). Елонгаторска тРНК^{MetCAUe} (*trnM(cau)e*) је високо конзервирана (79.6%), док је други ген за иницијаторску тРНК^{MetCAUf} (*trnM(cau)f*) више очуван у случају када се у геному налази и *trnM(cau)e* него у његовом одсуству (78.1% vs. 67.8%).

Већина досад анализираних генома посједује гене за елонгаторску тРНК^{MetCAUe} и иницијаторску тРНК^{MetCAUf}. Дата иницијаторска тРНК^{MetCAUf} је карактеристична прокариотска иницијаторска тРНК која на Н-терминалном крају има везану формил групу. Ово је анцестрално својство спужви. Елонгаторска тРНК додаје интерне метионине у полипептидни ланац.

Табела 2. Величине генома за 30 врста из разреда Demospongiae. (MitoZoa, <http://srv00.ibbe.cnr.it/mitozoa/statistics.php>; GOBASE, http://amoebidia.bcm.umontreal.ca/pggobase/complete_genome/ogmp.html)

Датум ажурирања	Врста	Дужина генома (бп)	Бр. тРНК гена	Бр. рРНК гена	Протеински гени	GC%
2009-01-12	<i>Agelas schmidti</i>	20 360	24	2	14	38,3
2008-02-20	<i>Amphimedon compressa</i>	18 564	24	2	14	40,8
2007-02-01	<i>Amphimedon queenslandica</i>	19 960	17	2	13	44
2008-02-20	<i>Aplysina fulva</i>	19 620	25	2	14	32,8
2005-03-05	<i>Axinella corrugata</i>	25 610	25	2	14	42,8
2008-02-20	<i>Callyspongia plicifera</i>	18 846	24	2	14	35,6
2008-02-20	<i>Chondrilla aff. nucula</i> CHOND	19 282	25	2	14	33,6
2009-01-12	<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	18 089	24	2	14	36
2009-01-12	<i>Ectyoplasia ferox</i>	18 312	25	2	14	30,5
2008-02-20	<i>Ephydatia muelleri</i>	23 929	25	2	14	40,4
2012-08-10	<i>Eunapius subterraneus</i>	24 850	25	2	14	40,8
2006-01-31	<i>Geodia neptuni</i>	18 020	24	2	14	33,5

2008-02-20	<i>Halisarca dujardini</i>	19 277	25	2	14	37,8
2011-01-13	<i>Halisarca sp. DVL-2010</i>	20 591	25	2	14	34,6
2008-02-20	<i>Hippospongia lachne</i>	16 755	2	2	14	37
2008-02-20	<i>Igernella notabilis</i>	20 310	2	2	14	28
2008-02-20	<i>Iotrochota birotulata</i>	19 112	24	2	14	35,6
2010-02-18	<i>Ircinia strobilina</i>	16 414	2	2	14	36,9
2010-03-18	<i>Lubomirskia baicalensis</i>	28 958	25	2	14	41,5
2008-06-02	<i>Negombata magnifica</i>	20 088	25	2	14	32,8
2007-02-05	<i>Oscarella carmela</i>	20 327	27	2	15	33,6
2011-06-10	<i>Plakinastrella ch. onkodes DVL-2011</i>	19 790	6	2	15	33,1
2009-06-11	<i>Plakortis angulospiculatus</i>	19 790	6	/	/	/
2011-01-04	<i>Plakortis halichondrioides</i>	18 385	5	2	14	33,3
2009-01-12	<i>Ptilocaulis walpersi</i>	18 865	25	2	14	28,6
2008-03-24	<i>Suberites domuncula</i>	26 300	25	2	14	35,5
2006-01-31	<i>Tethya actinia</i>	19 565	25	2	14	29,3
2008-02-20	<i>Topsentia ophiraphidites</i>	19 763	25	2	14	33,7
2008-02-20	<i>Vaceletia sp. GW948</i>	20 658	2	2	14	29,4
2008-02-20	<i>Xestospongia muta</i>	18 990	25	2	14	33,8

Претходне студије су показале да се митохондријална ДНК Demospongiae одликује компактном организацијом, непостојањем интрона и конзервираним редослиједом гена, али и да садржи додатне гене *atp9*, *trnI(cau)*, *trnR(ucu)*, посједују рибозомалне (2 рРНК) и транспортне РНК (2-27 тРНК) сличне бактеријама и користе минимално изведен генетички код у протеинској синтези (13-15 протеина кодирају). Поред тога, необичне особине пронађене у митохондријалним геномима *Oscarella carmela* (Wang и Lavrov, 2007) и *Amphimedon queenslandica* (Erpenbeck et al., 2007), показују да Demospongiae имају знатно већи митохондријални геномски диверзитет.

Састав база у митохондријским геномима вишћелијских животиња показује необична обиљежја. G+C састав мтДНК генерално је нижи од A+T% састава, али се врло разликује код различитих представника Metazoa. Постотак G+C креће од екстремно ниског у мтДНК инсеката (Arthropoda генерално $\sim 23.21 \pm 5.84$) и ваљкастих црва (26.17 ± 2.15), нешто вишег код кичмењака, до врло високог код птица ($\sim 45.87 \pm 3.08$), коштаних риба и сисара (40.27 ± 3.08). Особито висок G+C састав мтДНА имају примати, чак $44.33 \pm 0.42\%$ (Saccone et al., 1999). Код Demospongiae је релативно висок и варира од 28% код *Igernella notabilis* до 44% код врсте *Amphimedon queenslandica*.

Анализом примарне структуре мтДНК опажено је да постоји асиметрична дистрибуција комплементарних база између два ланца, што се особито односи на G+C састав. Надаље, постоји тенденција ка избјегавању гванина (G) у кодирајућем («sense») ланцу, те је стога заступљеност G на трећој позицији кодона врло ниска (Saccone et al., 1981). Но, како се број комплетно секвенцираних митохондријских генома значајно повећао у задњој деценији, ово правило се апсолутно не може примијенити на све припаднике Metazoa, али и даље генерално вриједи за кичмењаке.

Класа се на основу репродуктивних особина традиционално дијелила на три поткласе. Информације из митохондријалних генома не упућују на монофилетско

поријекло поткласа Ceractinomorpha и Tetractinomorpha у односу на Homoscleromorpha. Наиме, посљедња поткласа дијели неке особине са Eumetazoa, као што су присуство колагена типа IV, код ларве базалну мембрану испод хоанодерма и пинакодерма и акрозома (Boury-Esnault et al., 2003). Сматра се да су ове особине биле присутне код заједничког претка спужви и других животиња и да су секундарно изгубљене код осталих Demospongiae. Због овога се сматра да су Homoscleromorpha најстарија клада унутар класе. На сличан начин се може објаснити и присуство хомолога пост-синаптичких протеина у геному Demospongiae, а у одсуству синапси (Sakarya et al., 2007).

Обимне молекуларне анализе сугеришу напуштање традиционалне класификације и одбацивање поткласа (Egrenbeck и Wörheide, 2007). Уз помоћу филогенетских анализа митохондријалних генома 21 врсте унутар класе. Резултати студије су упутили на постојање пет клада (Lavrov et al., 2008):

1. Homoscleromorpha = (G0) (ред Homosclerophorida);
2. Keratosa = (G1) (редови Dictyoceratida, Dendroceratida и Verticillitida);
3. Muxospongiae = (G2) (редови Chondrosida, Halisarcida и Verongida);
4. Морске Harposclerida = (G3);
5. Остале групе = (G4) (редови Agelasida, Astrophorida, Hadromerida, Halichondrida, Poecilosclerida, Spirophorida и слатководне Harposcerida).

ЗАКЉУЧАК

Секвенционирано је укупно 30 мтДНК Demospongiae, циркуларних молекула са конзервираним сетом 13 протеинских и 2 рНК гена идентична мтДНК билатералних животиња. Величина генома такођер варира (16-28,9 кб, средња вриједност је 19,7 кб).

Број гена за тРНК варира, од 2 до 27, а код већине врста је присутно 24-25 гена за тРНК. Гени за тРНК су конзервирани код свих врста, у односу на величину, примарну секвенцу и секундарну структуру.

Распоред гена за малу и велику подјединицу рНК (*rns* и *rnl*) је конзервиран код већине врста.

Величина *rns* гена има обим од 828 (*Hippospongia lachne* de Laubenfels, 1936) до 1831 бп (*Suberites domuncula* (Olivi, 1792)), са просјечном величином 1224 бп. Величина *rnl* гена варира између 2166 (*Hippospongia lachne*) и 3487 бп (*Axinella corrugata* George и Wilson, 1919), са просјечном величином око 2589 бп.

Код Demospongiae G+C састав мтДНА је релативно висок и варира од 28% код *Igernella notabilis* до 44% код врсте *Amphimedon queenslandica*.

Митохондријална ДНК Demospongiae се одликује компактном организацијом, непостојањем интрона и конзервираним редосљедом гена, садржи анцестрална својства, а истовремено показују и значајан митохондријални геномски диверзитет.

Обимне молекуларне анализе сугеришу напуштање традиционалне класификације и одбацивање поткласа и подјелу на пет клада.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beagley, C. T., Okimoto, R., & Wolstenholme, D. R. (1999). Mytilus mitochondrial DNA contains a functional gene for a tRNASer(UCN) with a dihydrouridine arm-replacement loop and a pseudo-tRNASer(UCN) gene. *Genetics*, 152, 641-652.
2. Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27, 1767-1780.
3. Boury-Esnault, N., Ereskovsky, A., Bezac, C., & Tokina, D. (2003). Larval development in the Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae). *Invertebrate Biology*, 122, 187-202.
4. Boury-Esnault, N., Hajdu, E., Klautau, M., Custodio, M., & Borojevic, R. (1994). The value of cytological criteria in distinguishing sponges at the species level: the example of the genus *Polymastia*. *Canadian Journal of Zoology*, 72, 795-804.
5. Chombard, C., Boury-Esnault, N., Tillier, A., & Vacelet, J. (1997). Polyphyly of "sclerosponges" (Porifera, Demospongiae) supported by 28S ribosomal sequences. *Biological Bulletin*, 193, 359-367.
6. Dellaporta, S. L., Xu, A., Sagasser, S., Jakob, W., Moreno, M. A., & Buss, L. W. (2006). Mitochondrial genome of *Trichoplax adhaerens* supports placozoa as the basal lower metazoan phylum. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 8751-8756.
7. Dendy, A. (1921). The tetraxonid sponge-spicule: a study in evolution. *Acta Zoologica*, 95-152.
8. Erpenbeck, D., & Van Soest, R. W. M. (2007). Status and perspective of sponge chemosystematics. *Marine Biotechnology*, 9, 2-19.
9. Erpenbeck, D., Voigt, O., Adamski, M., Adamska, M., Hooper, J., Wörheide, G., & Degnan, B. M. (2007). Mitochondrial Diversity of Early-Branching Metazoa is Revealed by the Complete mt Genome of a Haplosclerid Demosponge. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 19-22.
10. Erpenbeck, D., & Wörheide, G. (2007). On the molecular phylogeny of sponges (Porifera). *Zootaxa* 1668, 107-126.
11. Gissi, C., Iannelli, F., & Pesole, G. (2004). Complete mtDNA of *Ciona intestinalis* reveals extensive gene rearrangement and the presence of an atp8 and an extra trnM gene in ascidians. *Journal of Molecular Evolution*, 58, 376-389.
12. Gissi, C., Iannelli, F., & Pesole, G. (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101, 301-320.
13. Hoffmann, R. J., Boore, J. L., & Brown, W. M. (1992). A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics*, 131, 397-412.
14. Jones, W. C. (1997). Spicule form and morphogenesis in the calcereous sponge *Leuconia fistulosa* (Johnston). In: Watanabe, Y., & Fusetani, N. (Ed.), *Sponge Sciences: multidisciplinary perspectives*. (pp. 55-67). Tokyo, Springer.
15. Korab-Laskowska, M., Rioux, P., Brossard, N., Littlejohn, T. G., Gray, M. W., Lang, B. F., & Burger, G. (1998). The Organelle Genome Database Project (GOBASE). *Nucleic Acids Research*, 26(1), 138-144.
16. Lavrov, D. V., Forget, L., Kelly, M., & Lang, B. F. (2005). Mitochondrial Genomes of Two Demosponges Provide Insights into an Early Stage of Animal Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1231-1239.

17. Lavrov, D. V., Wang, X., & Kelly, M. (2008). Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49, 111–124.
18. Manuel, M., Borchiellini, C., Alivon, E., Le Parco, Y., Vacelet, J., & Boury-Esnault, N. (2003). Phylogeny and evolution of calcareous sponges: Monophyly of Calcinea and Calcaronea, high level of morphological homoplasy, and the primitive nature of axial symmetry. *Systematic Biology*, 52, 311-333.
19. Marck, C., & Grosjean, H. (2002). tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *RNA*, 8, 1189-1232.
20. Milbury, C. A., & Gaffney, P. M. (2005). Complete mitochondrial DNA sequence of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology*, 7, 697-712.
21. Perna, N. T., & Kocher, T. D. (1995). Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 353-358.
22. Reyes, A., Gissi, C., Pesole, G., & Saccone, C. (1998). Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 15(8), 957-966.
23. Reitner, J. (1992). „Coralline Spongien“. Der Versuch einer phylogenetisch–taxonomischen Analyse. *Berliner Geowissenschaftliche Abhandlungen Reihe E (Paläo-biologie)*, 1, 1-352.
24. Saccone, C., Cantatore, P., Gadaleta, G., Gallerani, R., Lanave, C., & Pepe, G. (1981). The nucleotide sequence of the large ribosomal RNA gene and the adjacent tRNA genes from rat mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 9, 4139-4148.
25. Saccone, C., Di Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., & Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238, 195-209.
26. Sakarya, O., Armstrong, K. A., Adamska, M., Adamski, M., Wang, I. F., Tidor, B., Degnan, B. M., Oakley, T. H., & Kosik, K. S. (2007). A post-synaptic scaffold at the origin of the animal kingdom. *PLoS One*, 2, e506.
27. Shao, R., Barker, S. C., Mitani, H., Aoki, Y., & Fukunaga, M. (2005). Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial genomes of metazoa: a case study with Australasian Ixodes ticks. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 620-629.
28. Shimko, N., Liu, L., Lang B. F., & Burger, G. (2001). GOBASE: the organelle genome database. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 128-132.
29. Taggart, J. B., Haynes, R. A., Prodoh, P. A., & Frerguson, A. (1992). A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*, 40, 963-965.
30. Tang, S., & Hyman, B. C. (2007). Mitochondrial genome haplotype hypervariation within the isopod parasitic nematode *Thaumamermis cosgrovei*. *Genetics*, 176, 1139-1150.
31. Uriz, M. J., Turon, X., Becerro, M. A., & Agell, G. (2003). Siliceous spicules and skeleton frameworks in sponges: Origin, diversity, ultrastructural patterns, and biological functions. *Microscopy Research and Technique*, 62, 279-299.
32. Vacelet, J. (1985). Coralline sponges and the evolution of Porifera. In: Morris, S. C., George, J. D., Gibson, R., & Platt, H. M. (Ed.), *The Origins and Relationships of Lower Invertebrates*. 28. (pp. 1-13). Oxford, The Systematics Association, Clarendon Press.

33. Van Soest, R. W. M. (1984). Deficient *Merlia normani* Kirkpatrick, 1908, from the Curacao Reefs with a discussion on the phylogenetic interpretation of sclerosponges. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 54, 211-219.
34. Van Soest, R. W. M., & Braekman, J. C. (1999). Chemosystematics of Porifera: A review. *Memoirs of the Queensland Museum*, 44, 569-589.
35. Wang, X., & Lavrov, D.V. (2007). Mitochondrial Genome of the Homoscleromorph *Oscarella carmela* (Porifera, Demospongiae) Reveals Unexpected Complexity in the Common Ancestor of Sponges and Other Animals. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 363-373.
36. Wang, X., & Lavrov, D. V. (2008). Seventeen New Complete mtDNA Sequences Reveal Extensive Mitochondrial Genome Evolution within the Demospongiae. *Plos ONE*, 3(7), e2723.
37. Wolstenholme, D. R. (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology*, 141, 173-216.
38. Yokobori, S., Oshima, T., & Wada, H. (2005). Complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *Doliolum nationalis* with implications for evolution of urochordates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34, 273-283.
39. Lupi, R., de Meo, P.D., Picardi, E., D'Antonio, M., Paoletti, D., Castrignano, T., Pesole, G., & Gissi C. (2010). MitoZoa: a curated mitochondrial genome database of metazoans for comparative genomics studies. *Mitochondrion*, 10(2), 192-9.

Примљено: 14. 10. 2015.
Одобрено: 28. 04. 2016.