Uspostava referentnog panela SSCP profila za analizu gena DRB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti jelena (Cervus elaphus)

Radović, Tihana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:785888

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Tihana Radović

Uspostava referentnog panela SSCP profila za analizu gena DRB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti jelena (*Cervus elaphus*)

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu ekologiju na Zavodu za animalnu fiziologiju i Laboratoriju za molekularnu mikrobiologiju na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc Ane Galov i izv. prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

Zahvaljujem svojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Ani Galov i izv. prof. dr. sc. Martini Šerugi Musić za izdvojeno vrijeme i trud. Veliko hvala i dr. sc. Haidi Arbanasić na strpljenju, savjetima i pomoći oko laboratorijskog rada i računalne analize. Također, zahvaljujem se i dragoj Gordani Žakman na tehničkoj pomoći.

Veliko hvala mojoj braći i dečku za strpljenje, razumijevanje i podršku koju su mi pružali tijekom studija.

Hvala i svim ostalim članovima obitelji koji su vjerovali u mene i pružali mi potporu.

I na kraju, najveće hvala mojim roditeljima, koji su uvijek bili uz mene i bez kojih sve ovo što sam postigla ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

USPOSTAVA REFERENTNOG PANELA SSCP PROFILA ZA ANALIZU GENA DRB SKUPINE II GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI JELENA (*Cervus elaphus*)

Tihana Radović
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Imunološko prepoznavanje vlastitog od stranog djelomično je kontrolirano setom gena unutar glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC). Ti geni kodiraju sustav membranskih glikoproteinskih receptora čija je glavna uloga prepoznati strane proteine, prezentirati ih specijaliziranim imunosnim stanicama, te pokrenuti imunološki odgovor. Veća varijabilnost genskih lokusa MHC omogućuje prepoznavanje šireg spektra antigena, pa posljedično i bolju obranu od patogena. Istraživanja varijabilnosti lokusa MHC analizom sekvenci fragmenata DNA umnoženih PCR reakcijom, obično uključuju i molekularno kloniranje. Uvođenjem metode analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP) postupak utvrđivanja genske varijabilnosti bio bi jednostavniji, brži i jeftiniji smanjujući potrebu za molekularnim kloniranjem i dodatnim sekvenciranjem. U ovom istraživanju, po prvi puta u Hrvatskoj, uvela sam metodu SSCP u istraživanje raznolikosti alela lokusa DRB, te uspostavila referentni panel SSCP profila spomenutih alela u jelena (*Cervus elaphus*). U ispitivanim uzorcima utvrdila sam postojanje ukupno sedam različitih alela, te postojanje dupliciranog lokusa DRB. Na referentnom panelu, svaki od pojedinačnih alela pokazuje jedinstven SSCP profil, ali utvrđeno je i preklapanje pojedinih vrpci različitih alela. Kod nekoliko odabranih uzoraka, analiza SSCP izravno umnoženih fragmenata alela potvrdila je rezultate dobivene molekularnim kloniranjem i sekvenciranjem. No, za rutinsku uporabu SSCP panela u procjeni imunogenetičke varijabilnosti jelena u Hrvatskoj, trebalo bi metodu dodatno optimizirati i unaprijediti.

(42 stranice, 12 slika, 1 tablica, 70 literaturnih navodnika, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: jelen, MHC, polimorfizam, DRB, SSCP, Hrvatska
Voditelji: izv. prof. dr. sc. Ana Galov
izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić
Neposredni voditelj: dr.sc. Haidi Arbanasić
Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Ana Galov
izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić
izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Rad prihvaćen: 01. veljače 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

ESTABILISHMENT OF SSCP PROFILE REFERENCE PANEL FOR ANALYSIS OF THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II DRB GENE IN THE RED DEER (*Cervus elaphus*)

Tihana Radović
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Immunological self/nonself recognition is partly controlled by a set of genes in the major histocompatbility complex (MHC). These genes encode complex of membrane glicoproteine receptors which primary role is to recognize foreign proteins, present them to specialist immune cells and initiate an immune response. Increased variability of MHC gene loci enables identification of a broader range of antigens, and consequently a better defense against pathogens. Investigation of MHC variability by analyses of sequence fragments multiplied by PCR reaction, usually includes molecular cloning. By introducing SSCP (single strand conformation polymorphism) method, the process of determining gene variability would be simpler, faster and cheaper and reduce the need for molecular cloning and additional sequencing step. In this experment, for the first time in Croatia, I introduced the SSCP method to explore the diversity of alleles of the DRB locus and estabilished a reference panel of the SSCP profile of the mentioned alleles in the red deer (*Cervus elaphus*). In analyzed samples, I determined the presence of seven unique alleles in total and a duplication of DRB locus. On the reference panel, each of the alleles showed a unique SSCP profile; however, the overlapping of some indivudual bands of different alleles was found. In chosen representative samples, SSCP analysis of directly amplified allele fragments confirmed the results obtained by molecular cloning and sequencing. Nonetheless, the use of SSCP panel in routine determination of immunigenetic variability of deer in Croatia should be further optimized and improved.

(42 pages, 12 figures, 1 table, 70 references, the original language: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library
Keywords: red deer, MHC, polymorphism, DRB, SSCP, Croatia
Supervisors: dr. Ana Galov, Assoc. Prof.
dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.
Assistant supervisor: dr. Haidi Arbanasić
Reviewers: dr. Ana Galov, Assoc. Prof.
dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.
dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 1st February 2018

Sadržaj

1. Uvod ... 1
1.1. Jelen ... 1
1.2. Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC; *major histocompatibility complex*) ... 4
1.3. Metoda analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP; *single strand conformaton polymorphism*) ... 9
1.3.1. Metoda SSCP u istraživanjima ... 11
1.3.2. Istraživanje raznolikosti MHC uporabom metode SSCP ... 12
1.4. Ciljevi istraživanja ... 13
2. Materijali i metode ... 14
2.1. Uzorci tkiva ... 14
2.2. Izolacija DNA ... 14
2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR; *polymerase chain reaction*) ... 15
2.4. Elektroforeza ... 16
2.5. Sekvenciranje ... 16
2.6. Molekularno kloniranje ... 17
2.7. Računalna obrada podataka ... 20
2.8. Metoda analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP; eng. *single strand conformation polymorphism*) ... 21
2.8.1. Priprema gela za poliakrilamidnu elektroforezu ... 21
2.8.2. Denaturacija uzoraka ... 22
2.8.3. Elektroforeza ... 22
2.8.4. Bojanje gela srebrom ... 22
3. Rezultati ... 23
3.1. Uspješnost umnažanja ciljnih fragmenata ... 23
3.2. Identifikacija alela ... 23
3.3. Referentni panel izoliranih aela ... 28
4. Rasprava ... 30
5. Zaključak ... 33
6. Literatura ... 34
7. Životopis ... 42

POPIS KRATICA

IUCN - međunarodni savez za očuvanje prirode (eng. *International Union for Conservation of Nature*)

MHC - glavni sustav tkivne podudarnosti (eng. *Major Histocompatibility Complex*)

HLA - glavni sustav tkivne podudarnosti u čovjeka (eng. *Human Leukocyte Antigens*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

SSCP - metoda analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA (eng. *Single Strand Conformation Polymorphism*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

UV - ultraljubičasta (eng. *Ultraviolet*)

TBE - tris-borat-etilendiamintetraoctnena kiselina (eng. *Tris-Borate Ethylenediaminetetraacetic acid*)

dNTP - deoksiribonukleotid-trifosfat

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

1. UVOD

1.1. Jelen

Jelen (*Cervus elaphus* L.) (Sl. 1) je pripadnik naše autohtone divljači. Prema zoološkoj klasifikaciji svrstava se u koljeno svitkovci (*Chordata*), potkoljeno kralješnjaci (*Vertebrata*), razred sisavci (*Mammalia*), podrazred plodvaši (*Placentalia*), red parnoprstaši (*Artiodactyla*), podred preživači (*Ruminantia*), porodicu jeleni (*Cervidae*), te rod jelen (*Cervus*) (Janicki i sur. 2007).



Slika 1. Jelen (*Cervus elaphus*) (preuzeto s http://www.bio-foto.com/displayimage-1120.html)

Karakterizira ga snažan oblik tijela i noge namijenjene dugom trčanju. Boja dlake od proljeća do jeseni je rđasto crvena, a po trbuhu bjelkasta, dok je zimi dlaka dulja i gušća, te tamno smeđe do smeđe-sive boje. Mužjak, u odnosu na ženke, ima grivu koju karakteriziraju duge dlake. Također, jelen nosi rogove, a košuta samo iznimno (Janicki i sur. 2007).

Prema ponašanju pripadaju u životinje sumraka, no ukoliko nema uznemiravanja u staništu, znaju biti aktivni i u vrijeme sunčeve svjetlosti. Košute gotovo cijele godine žive u krdima. S druge strane, mužjaci unutar krda pažljivo održavaju međusobni razmak, a kada su

stariji izbjegavaju život u većim krdima. Jeleni su općenito vrlo prilagodljivi uvjetima staništa, te nastanjuju i razmjerno male prostore (Janicki i sur 2007).

Uslijed potrebe za hranom i parenjem usađen im je nagon sezonskog seljenja. Ljeti odlaze u više predjele, a zimi u niže. Sezona parenja je tijekom 8. i 9. mjeseca u nizinskim, odnosno 9. i 10. mjeseca u planinskim područjima. Tada jeleni odlaze na tzv. "rikališta" i ondje se nadmeću u borbi kako bi stekli pravo na parenje. Spolni omjer u prirodi je 1:1. Košuta nosi 33-34 tjedna, te se neposredno pred porod izdvaja iz krda na mirno i sigurno mjesto. Tele se krdu pridružuje tek kada ojača. Životni vijek im je 15-20 godina, iznimno 25 (Janicki i sur. 2007).

Njihova staništa rasprostiru se od razine mora sve do gornje granice stabala u Alpama (na oko 2 500 m). Naseljavaju otvorene listopadne, mješovite i crnogorične šume, vrijesišta, otvorena planinska područja, mediteransku makiju, prirodne travnjake, pašnjake i livade (Koubek i Zima 1999). Ukoliko im je stanište šuma, njihova prehrana uglavnom se zasniva na grmovima i izdancima stabala, no na drugim staništima također jedu i travu, šaš i grmlje, dok su voće i sjemenke važni u jesen (Lovari i sur. 2016).

Geografski, prisutnost jelena zabilježena je na čitavom području Europe (Corbet 1978, Koubek i Zima 1999, Wilson i Ruff 1999, Wilson i Mittermeier 2011), izuzev sjevera Skandinavije i velikog dijela europske Rusije (Lovari i sur. 2016) (Sl. 2). U nekim dijelovima svijeta vrsta je unesena u svrhu lova i uzgoja (Argentina, Australija, Čile, Novi Zeland), te su te populacije uvrštene među 100 najgorih invazivnih vrsta od strane Međunarodnog saveza za očuvanje populacija (IUCN, eng. *International Union for Conservation of Nature*) (Lowe i sur. 2004). Na tlu Afrike pronađeni su na području gorja Atlas (sjeveroistoka Ažira i Tunisu), a njihova prisutnost zabilježena je i na bliskom i srednjem istoku i to na području Turske, sjevera Irana i Iraka. Usprkos vrlo širokoj i bogatoj rasprostranjenosti, postoji sve veća fragmentacija populacija u sjevernoj Africi i srednjoj Europi, a njihov nestanak zabilježen je s područja Albanije, Izraela, Jordana, Libanona i Sirije (Lovari i sur. 2016). U Hrvatskoj su vrlo brojni na području Baranje i Slavonije, te Gorskog kotara (Janicki i sur. 2007). Kao što je već spomenuto, tijekom povijesti je na nekim područjima došlo je do izumiranja populacija, međutim na drugim mjestima provedena je njihova reintrodukcija (Grčka, Maroko) tako da nikada nije došlo do njihova potpunog nestanka. Danas se također pojavljuje problem smanjenja brojnosti određenih populacija, no usprkos tome vjeruje se kako ne bi trebalo doći do njihova nestanka (Lovari i sur. 2016).



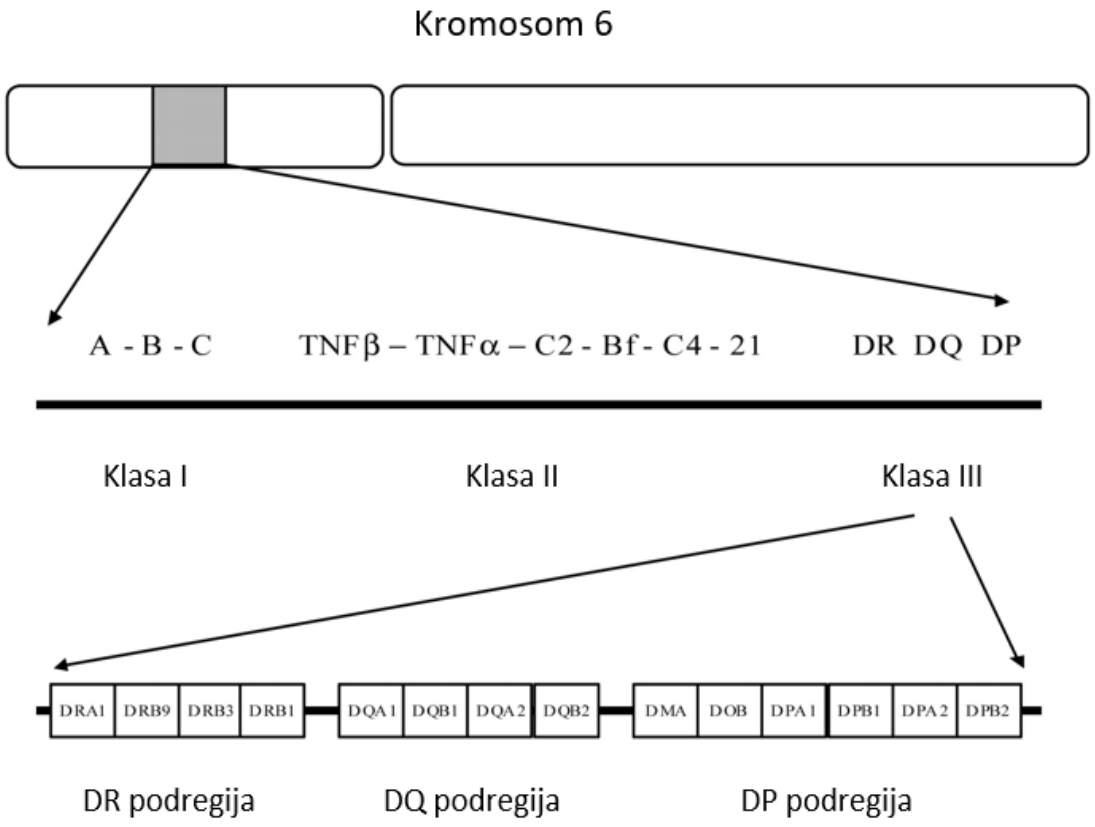
Slika 2. Geografska rasprostranjenost jelena (*Cervus elaphus*) (preuzeto s IUCN 2017)

Zbog široke rasprostranjenosti i velikih populacija IUCN ovu vrstu klasificira kao "najmanje zabrinjavajuću" (Lovari i sur. 2016). 2005. godine brojnost vrste bila je 2.4 miliona, gustoća populacije 1-5 jedinki po km^2 ili ponegdje čak i 15 jedinki po km^2 (Wilson i Mittermeier 2011). Ono što uistinu predstavlja problem je genetička izmjena među populacijama s različitih područja, odnosno miješanje različitih podvrsta, te širenje parazita i bolesti. U mnogim područjima lov je strogo kontroliran, a povremene žetve koriste se kako bi se kontrolirao rast populacije u odsutnosti velikih grabežljivaca. Prekomjerni lov, gubitak i fragmentacija staništa, kao rezultat intenziviranja poljoprivrede i urbanizacije, također predstavljaju glavne prijetnje danas (Lovari i sur. 2016).

1.2. Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC; eng. *major histocompatibility complex*)

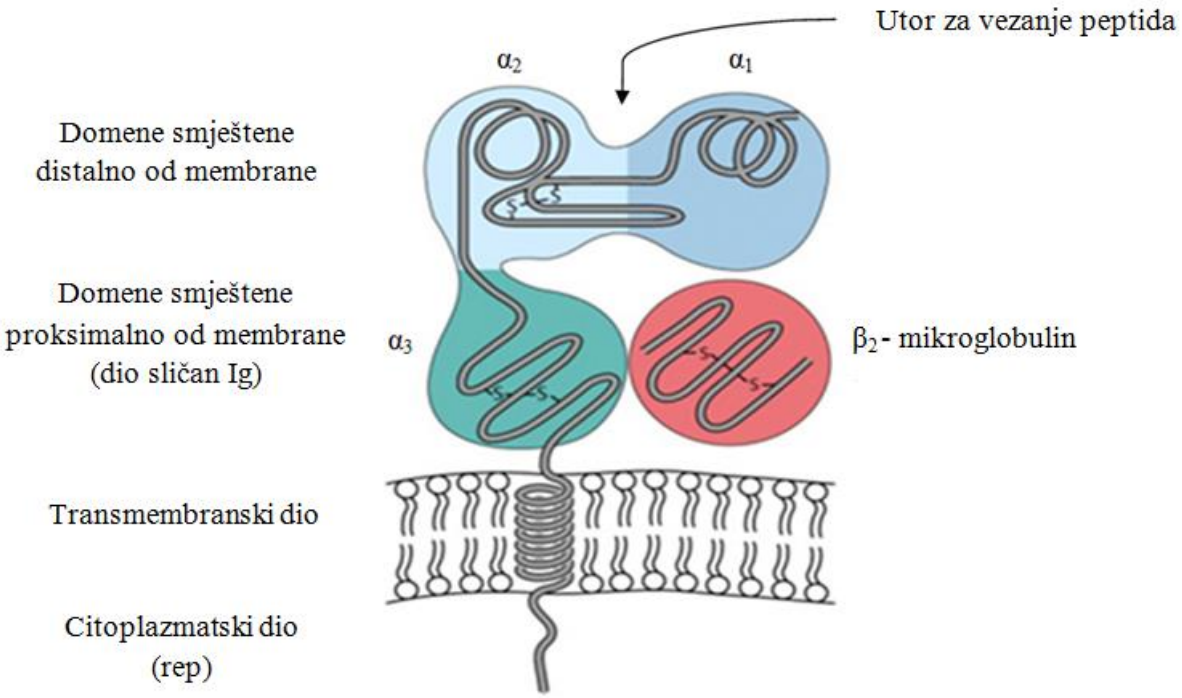
Pojedinci iz prirodnih populacije neprestano se susreću sa širokim rasponom patogena. Polimorfizam lokusa MHC je upravo ono što određuje raznolikost patogena koje imunološki sustav domaćina može prepoznati i posljedično tome pokrenuti specifičan imunosni odgovor (de Mera i sur. 2009). Nedavna istraživanja dokazala su da specifični genotipovi MHC doprinose rezistenciji na različite patogene (Hendrick, Kim i Parker 2001). Također, velikim brojem istraživanja dokazana je povezanost između genetske varijabilnosti lokusa MHC i učinka prirodne selekcije (Finch i Rose 1995, Lochmiller 1996, Von Schantz i sur. 1996), te ponašanja pojedinaca unutar prirodnih populacija (Penn i Potts 1999). Sukladno tome, proučavanje polimorfizma gena MHC postalo je vrlo bitno u ekologiji i očuvanju populacija, odnosno vrste (de Mera i sur. 2009).

Kao što je prethodno spomenuto, imunološko prepoznavanje pod kontrolom je gena pripadnika glavnog sustava tkivne podudarnosti ili MHC, multigenske porodice imunološkog sustava, koja sadrži najpolimorfnije gene opisane u kralježnjaka (Sl. 3) (Piertney i Oliver 2006). Većina drugih gena koji se smatraju polimorfnima imaju svega nekoliko alela, dok lokus MHC ima čak 560 alela po lokusu u čovjeka i više od 100 alela po lokusu u miša (Penn i Ilmonen 2005). Ti geni kodiraju mnoge proteine uključene u prezentaciju antigena T stanicama imunološkog sustava. Kao i proteini koje kodiraju, dijele se u tri funkcionalne skupine: I, II i III. Najčešće govorimo o klasi I i klasi II MHC, budući da oni imaju glavnu imunoregulacijsku ulogu (Andreis i sur. 2010). To su glikoproteini čija je glavna funkcija vezanje peptidnih fragmenata izvedenih iz patogena, te njihovo predočavanje T staničnim receptorima. Dvije osobitosti molekula MHC otežavaju izbjegavanje imunološkog odgovora. Prva je ta da je MHC poligen, tj. da sadrži nekoliko različitih gena klase I i klase II MHC. Sukladno tome, svaki pojedinac posjeduje skup molekula MHC s različitim rasponima specifičnosti vezanja peptida. Druga značajka molekula MHC je njihov, već spomenut, visok stupanj polimorfizma, što znači da postoji više varijanti svakog gena unutar populacije (Bujanić i Konjević 2015).



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz regije glavnog sustava tkivne podudarnosti u čovjeka (HLA; eng. *human leukocyte antigen*) (preuzeto od Mehers i Gillespie 2008)

Glikoproteini skupine I MHC (Sl. 4), koje kodiraju geni skupine I MHC, nalaze se na svim tjelesnim stanicama koje imaju jezgru (Bujanić i Konjević 2015). Njihova funkcija je prezentacija antigena unutarstaničnog podrijetla (endogenih antigena) citotoksičnim T-limfocitma (Penn 2001). Građeni su od dvaju polipeptidnih lanaca, duljeg α-lanca koji se sastoji od tri domene (α_1, α_2 i α_3) i kraćeg β_2-mikroglobulina (Andreis i sur. 2010; Day i Schultz, 2013). Cijela se molekula može podijeliti u četiri dijela: dio koji veže peptid, dio sličan imunoglobulinu, transmembranski dio (sačinjen od hidrofobnih aminokiselina) i citoplazmatski dio (slijed bazičnih aminokiselina koje, međudjelovanjem se fosfolipidima unutrašnjeg membranskog lipidnog dvosloja, sidre molekulu MHC u membrani) (Andreis i sur. 2010).



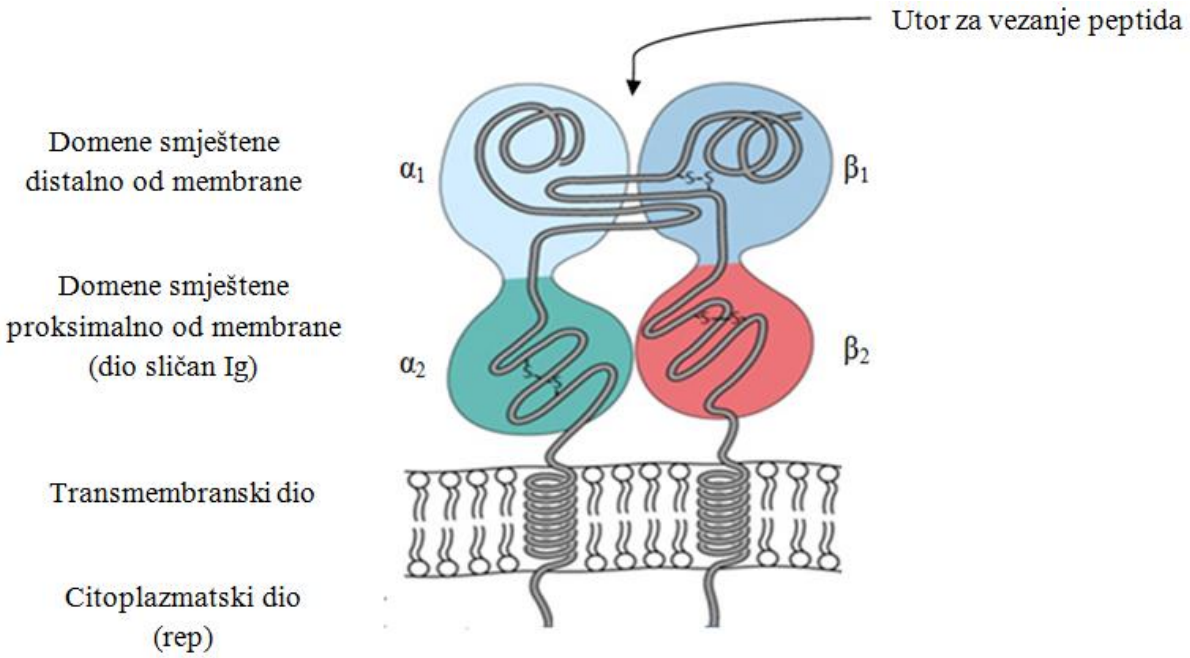
Slika 4. Shematski prikaz molekule klase I glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC) (preuzeto i prilagođeno prema Kindt i sur. 2013)

Glavni dio molekule jest onaj koji veže peptid, čime tvore komplekse koje prepoznaju limfociti T (Andreis i sur. 2010) pomoću svojih jedinstvenih, visoko specifičnih T-staničnih receptora (Penn 2001). Taj dio sastoji se od oko 180 aminokiselina stereokemijski podijeljenih u dijelove α_1 i α_2 (Andreis i sur. 2010), varijabilne dijelove molekule koji stvaraju žlijeb sa zatvorenim krajevima, čija je funkcija vezanje antigenih peptida veličine od 8 do 10 aminokiselina (Bujanić i Konjević 2015). Tu pukotinu okružuju upravo one aminokiseline

koje se razlikuju u molekulama MHC I (Andreis i sur. 2010). Domena α_3 je nevarijabilna i veže se za molekulu CD8+ na citotoksičnim limfocitima T (Bujanić i Konjević 2015), koja sudjeluje u stabilizaciji interakcije između stanica koje prikazuju antigen i T-stanica (Penn 2001). β-lanac jednak je u svim molekulama MHC u ljudi, a nužan je za izražavanje molekula MHC I na staničnoj površini (Andreis i sur. 2010). Jednom kada T-stanični receptor bude aktiviran, dolazi do proliferacije T-stanica, te svi klonovi traže i eliminiraju inficirane stanice koje prikazuju strane peptide (Penn 2001).

Glikoproteini skupine II MHC (Sl. 5) nalaze se na površini nekih imunosnih stanica (makrofagi, dendritičke stanice, B-limfociti) (Bujanić i Konjević 2015). Njihova je funkcija prikazivanje izvanstaničnih (egzogenih) antigena pomoćničkim T-limfocitima. Makrofagi, dendritične stanice i B-limfociti ih fagocitiraju, prerađuju i prikazuju na svojoj površini u okviru receptora skupine II MHC (Bujanić i Konjević 2015).

Te molekule također su građene od dvaju međusobno sličnih, nekovalentno vezanih lanaca, α i β. Kao molekule skupine I MHC, i ove molekule sadrže dio koji veže peptid, dio koji sliči konstantnom dijelu imunoglobulina, transmembranski i citoplazmatski dio. Izvanstanični dijelovi lanaca α i β mogu se podijeliti u podjedinice od 90 aminokiselina, α1 i α2, odnosno β1 i β2 (Andreis i sur. 2010).



Slika 5. Shematski prikaz molekule klase II glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC) (preuzeto i prilagođeno prema Kindt i sur. 2013)

Domene α1 i β1 tvore pukotinu otvorenih krajeva, koja molekuli MHC II omogućuje vezanje većih peptida (od 10 do 30 aminokiselina ili čak i više). Domene α2 i β2 čine dio sličan konstantnom dijelu imunoglobulina važan za nekovalentno povezivanje lanaca α i β. Molekula CD4+ na pomagačkom limfocitu T veže se na podjedinicu β2 (Andreis i sur. 2010), te na taj način stabilizira međusobnu interakciju. Nakon što makrofagi razgrade plijen (strani antigen) do peptida, prezentiraju ih T-pomagačkim limfocitima, koji ih povratno aktiviraju. S druge strane, kada imunoglobulin na površini B-stanica veže strani antigen i prezentira ga pomagačkim T-stanicama, dolazi do proliferacije B-stanica pri čemu klonovi postaju plazma stanice koje izlučuju antitijela. Ona obilježavaju antigene i tako ih čine lakše uočljivima od strane imunološkog sustava koji ih prepoznaje i eliminira (Penn 2001).

Smatra se da je ključni faktor u održavanju varijabilnosti lokusa MHC tzv. ravnotežna selekcija (eng. *balancing selection*), koju karakterizira održavanje velikog broja alela u populaciji kroz dugi vremenski period (Sommer 2005). Ravnotežna selekcija zapravo je širok pojam koji se odnosi na sve oblike prirodne selekcije u kojima niti jedan alel nema najveći fitnes (Yang i sur. 2007). Predložena su dva glavna mehanizma ravnotežne selekcije kojima se varijabilnost gena MHC uspostavlja i održava, a to su: "hipoteza heterozigotne prednosti“ i "hipoteza selekcije ovisne o negativnoj učestalosti" (Sommer 2005).

Heterozigotna prednost označava nadmoć genotipova s većim brojem alela u obrani od patogena. Pretpostavka je da veći broj alela daje mogućnost obrane od šireg spektra patogena zbog većeg broja različitih molekula MHC, koje će moći prepoznati i prezentirati antigen. Heterozigotne jedinke imat će veći relativni fitnes od homozigota, pa tako i veći broj preživjelih potomaka (Sommer 2005).

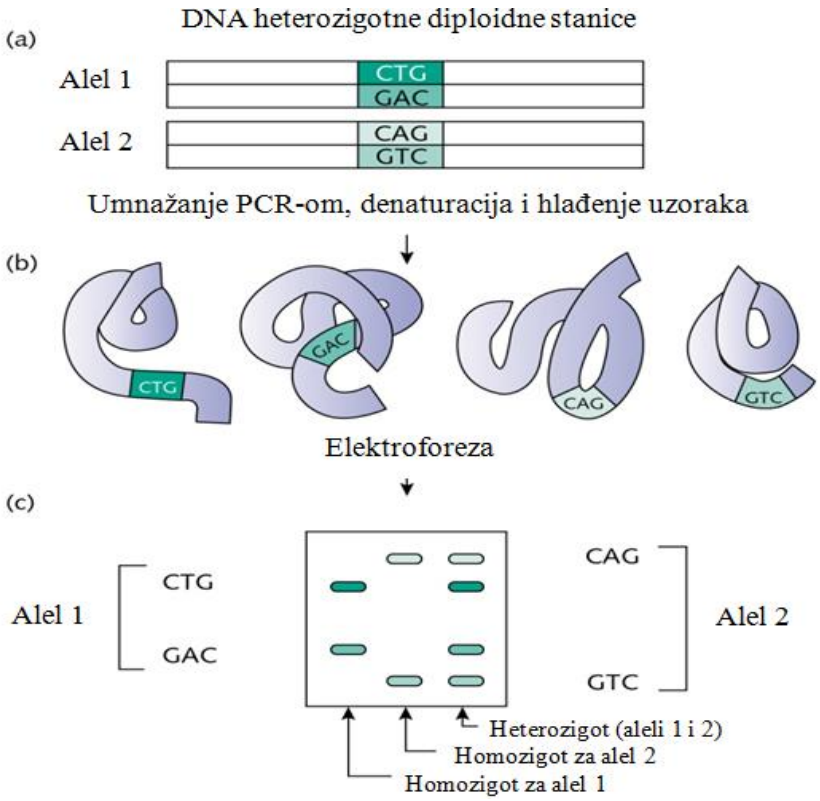
Hipoteza selekcije ovisne o negativnoj učestalosti pretpostavlja usmjerenost selekcije na održavanje rijetkih alela u populaciji, odnosno prednost alela koji imaju nisku učestalost. Obično su u većoj učestalosti prisutni aleli koji posreduju u vezanju i predočavanju uobičajenih patogena (tipičnih za određeni prostor i vremenski period). Međutim, kad se pojavi novi ili promijenjeni patogen uobičajeni aleli neće biti prikladni, ali postoji mogućnost da neki od alela koji se nalazi u niskoj učestalosti posreduje u obrani od novog patogena. Aleli MHC koji su otporniji na patogene omogućit će veći fitnes jedinki koje ih nose, te će se brzo proširiti kroz populaciju i postati uobičajeni. Ova pojava opisuje se kao koevolucija patogena i domaćina ili svojevrsna utrka među njima. (Sommer 2005).

Većina istraživanja gena klase II MHC kod sisavaca usmjerena je na drugi ekson podregije DRB, koji kodira dio molekule bitan za vezivanje antigena. Taj je lokus pokazatelj genske varijacije, odnosno nositelj funkcionalne raznolikosti receptora, te je na tom području dokazana najveća različitost među alelima i haplotipovima (Sommer 2005, Murray i sur. 1999). Također, u ranijim istraživanjima na nekim drugim populacijama i vrstama unutar porodice *Cervidae:* jelena (Swarbick i sur. 1995), iberijskog jelena (de Mera i sur. 2009) i sika jelena (Li i sur. 2013), uočena je prisutnost više od dva alela po lokusu, što ukazuje na činjenicu da je lokus dupliciran, odnosno da se s istim parom početnica umnažaju dva lokusa.

1.3. Metoda analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP; eng. *single strand conformation polymorphism*)

U evolucijskoj biologiji, populacijskoj genetici, ekologiji i brojnim drugim područjima često je potrebno istražiti gene mnogih vrsta, odnosno populacija. To je vrlo jednostavno ukoliko se radi o homozigotnim jedinkama, budući da se sekvence gena mogu doznati putem direktnog sekvenciranja. Međutim, sekvenciranje može postati prilično komplicirano, skupo i može iziskivati puno vremena ukoliko se radi o heterozigotima. U takvim slučajevima, na elektroferogramu, na određenoj nukleotidnoj poziciji unutar nukleotidnog slijeda može se naići na više različitih nukleotida, što otežava identifikaciju pojedinih alela ili ju čak čini nemogućom. Kako bi se zaobišao ovaj problem, često se koristi molekularno kloniranje, budući da omogućava razdvajanje pojedinih alela (razdvajanje gametnih faza). Međutim, rijetki aleli imaju manju šansu biti uhvaćeni tijekom kloniranja, što sam proces čini dugotrajnim i skupim (Gasser 1998).

Alternativni pristup podrazumijeva uporabu metode analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA, SSCP (eng. *single strand conformation polymorphism*) (Ullah i sur. 2015, Saha i sur. 2015) (Sl. 6). Ova metoda jedna je od tehnički najjednostavnijih metoda za brzu detekciju poznatih i nepoznatih polimorfizama fragmenata DNA (Šeruga Musić 2007). Sama mobilnost molekula DNA u gelu određena je njezinom veličinom i oblikom. Naime, jednolančana DNA u nedenaturirajućim uvjetima poprima savinutu strukturu koja je određena intramolekularnim interakcijama, odnosno njenim samim nukleotidnim slijedom (Hayashi 1991).



Slika 6. Princip razdvajanja jednolančanih molekula DNA metodom analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP) (preuzeto i prilagođeno prema Beebee i Rowe 2008)

Zahvaljujući visokoj moći razlučivanja poliakrilamidnog gela, koji se koristi pri izvedbi ove metode, moguće je razlučiti većinu konformacijskih promjena (Hayashi 1991). To znači da čak i samo jedna točkasta mutacija može promijeniti konformaciju jednolančane DNA tako da promijenjena konformacija utječe na njezinu migraciju, što se može detektirati kao abnormalna vrpca na gelu (Xu i sur. 2010). Jedna od najvećih ograničenja ove metode je ograničena veličina duljine fragmenta koja se može razdvojiti. Budući da je osjetljivost metode SSCP obrnuto proporcionalna dužini fragmenta, promjena u samo jednoj bazi može se detektirati u 99% slučajeva ukoliko se radi o fragmentu veličine 100-300 pb, odnosno više od 80% za fragmente duljine 400 pb (Sunnucks i sur. 2000).

Osim već spomenute ovisnosti putovanja DNA kroz gel o vlastitoj konformaciji i duljini samog fragmenta, postoji još nekoliko parametara koji određuju osjetljivost ove metode: tip mutacije, sadržaj gvanina i citozina, sastav poliakrilamidnog gela, njegova veličina i temperatura tijekom elektroforeze, koncentracija DNA, duljina trajanja elektroforeze, sastav pufera (ionska jakost i pH), te dodaci puferu kao što su glicerol ili sukroza. Također, poznato je da do boljeg razdvajanja komplementarnih lanaca dolazi pri

nižem stupnju unakrsnog povezivanja, odnosno ovisi o omjeru koncentracije N,N'-metilen-*bis*-akrilamida i akrilamida. Gel s manjim postotkom unakrsnog povezivanja tako ima veće pore i zahvaljujući tome osjetljiviji je na različite konformacije. Također, uočeno je da prisutnost manje koncentracije glicerola (5-10%) poboljšava razdvajanje lanaca. Naime, smatra se kako glicerol, zbog svog slabog denaturirajućeg učinka, otvara zavinute lance, te njihova površina tako postaje izloženija. Također, glicerol, zahvaljujući svom viskozitetu, reducira mobilnost. Ipak, ponekad se mutacije bolje otkrivaju bez dodatka glicerola što ovisi o samoj prirodi istraživanja (Teschauer i sur. 1996).

1.3.1. Metoda analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP; *single strand conformation polymorphism*) u istraživanjima

U dosadašnjim istraživanjima, metoda SSCP pokazala je izniman značaj prvenstveno u medicinskim istraživanjima, odnosno kliničkoj dijagnostici različitih genskih bolesti, osobito raka (Orita i sur. 1989, Hongyo i sur. 1993, Eshaque i Dixon 2006, Papp i sur. 2007), te kliničkim i terapeutskim studijama ljudskih virusa (Abba i Golijow 2004, Mackiewicz i sur. 2005). Osim toga, njezina uporaba pokazala se uspješnom pri detekciji i genotipizaciji gljiva (Dassanayake i Samaranayake 2003), te za istraživanja raznolikosti gljiva u prirodnom okolišu (Pang i Mitchell 2005). Osobita prednost ove metode pri analizama bakterijskih zajednica iz različitih prirodnih okoliša (Schwieger i Tebbe 1998, Fracchia i sur. 2006) jest ta da je iz skupnog uzorka moguće uspješno detektirati čak i one bakterijske vrste koje nije moguće kultivirati na hranjivim podlogama (Oto i sur. 2006). U istraživanjima biljnih virusa, osim za genotipizaciju sojeva i varijanti (Rubio i sur. 1996, Nolasco i sur. 2006), metoda SSCP koristi se i za dokazivanje postojanja rekombinacijskih događaja, odnosno genetičke raznolikosti (Turturo i sur. 2005). Ova metoda našla je svoju primjenu i u istraživanjima varijabilnosti i raznolikosti viroida (Palacio i Duran-Vila 1999, Schnell i sur. 2001, Xu i sur. 2006). Također, spominje se i kao jedna od metoda pri istraživanju fitoplanktona (de Bruin i sur. 2003).

1.3.2. Istraživanje raznolikosti glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC; eng. *major histocompatibility complex*) uporabom metode SSCP

Zahvaljujući jednostavnoj izvedivosti i vrlo visokoj osjetljivosti (potreba male količine PCR produkta), ova metoda vrlo je široko i uspješno korištena u istraživanjima gena različitih organizama (Ullah i sur. 2015, Saha i sur. 2015). Ono što je ovdje najvažnije jest činjenica da se metoda SSCP koristila diljem svijeta i u svrhu istraživanja polimorfizma životinjskih gena, uključujući i porodicu *Cervidae*. Ipak, valjda napomenuti kako su saznanja o genetičkoj varijabilnosti divljih životinja još uvijek veoma ograničena (Quéméré i sur. 2015).

Mikko i Andersson (1995) proveli su istraživanje polimorfizma MHC na vrsti *Alces alces americanus*, budući da je u to vrijeme zabilježen veliki mortalitet uslijed pojave parazita *Elaphostrongylus sp*. i bolesti uzrokovane retrovirusom. Također je korištena metoda SSCP, kojoj je prethodilo umnažanje ciljnog fragmenata. Za utvrđene homozigote, uzet je dio prethodnog PCR produkta u svrhu sekvenciranja, dok je za heterozigote prethodno proveden postupak pročišćavanja DNA iz poliakrilamidnog gela i provedeno novo umnažanje. Nakon sekvenciranja utvrđeno je postojanje deset alela u uzorku od 21 jedinke.

Bussche i sur. (1999) istražili su varijabilnost alela lokusa DRB vrste *Odocoiles virginianus*. DNA sekvenciranjem i uporabom metode SSCP utvrđeno je 15 jedinstvenih sekvenci u 150 jedinki. Svaka od sekvenci potvrđena je sekvenciranjem istog alela kod različitih jedinki ili usporedbom obrasca SSCP profila između kloniranih PCR produkata i PCR produkata jedinki kod kojih je identificiran pojedini alel. Također, na poliakrilamidnom gelu nikada nije bilo više od četiri vrpce što je dovelo do pretpostavke da se radi o jedinom genu DRB.

Fernandz de Mera i sur. (2009) proveli su istraživanje na populaciji podvrste *Cervus elaphus hispanicus* nastanjenoj na području Pirenejskog poluotoka. Posljednjih desetljeća populacija je bile izložena lovu što je utjecalo na veličinu, a time i genetičku varijabilnost populacije. Čovjek je na taj način utjecao na odnos iberijskog jelena i patogena (Altizer i sur. 2003), odnosno varijabilnost gena koji posreduju u otpornosti na bolesti, što je kao posljedicu moglo imati loš utjecaj na očuvanje i održivost populacije. Jedan od načina kojim su se služili pri istraživanju genetske varijabilnosti bila je metoda SSCP, koja je uspješno poslužila za detekciju alela lokusa DRB, koji su prethodno bili umnoženi PCR-om. Na elektroforetskom gelu za svaki uzorak dobili su dvije vrpce, što je dovelo do saznanja da se radi o

homozigotnim jedinkama. U kombinaciji s analizom sekvenci otkrili su 18 jedinstvenih alela u 94 jedinke. Sekvencu svakog od alela potom su potvrdili sekvenciranjem istog alela kod neke druge jedinke, te nekoliko klonova iz istog PCR-a. Ovo otkriće, odnosno uporaba metode SSCP. poslužilo im je za daljnja genetska istraživanja.

Fernandez de Mera i sur. (2009) ponovno su izvršili istraživanje raznolikosti alela DRB, no ovoga puta kako bi istražili utjecaj polimorfizma na podložnost jedinke krpeljima i infekciji tuberkulozom. Također je korištena metoda SSCP. Na uzorku od 94 jedinke dokazano je 18 jedinstvenih sekvenci, te je ustanovljena velika prisutnost homozigota.

Li i sur. (2013) proveli su istraživanje na vrsti *Cervus nippon hortulorum*. Uporabom PCR-a a u svrhu umnožavanja lokusa DRB dužine 249 pb, SSCP-a i direktnog sekvenciranja utvrdili su postojanje 15 jedinstvenih alela u 43 jedinke. Analizu SSCP proveli su dva puta kako bi potvrdili ispravnost poprimljene konformacije molekule DNA, a postojanje novih alela utvrdili su samo ukoliko je alel bio identificiran u dva odvojena PCR-a iste jedinke ili PCR-u najmanje dvije različite jedinke.

1.4. Ciljevi istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je (1) po prvi puta uvesti metodu SSCP u istraživanje raznolikosti glavnog sustava tkivne podudarnosti, te (2) uspostaviti referentni panel za alele lokusa DRB jelena u Hrvatskoj.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorci tkiva

Za potrebe ovog istraživanja korišteno je ukupno 23 uzorka tkiva vrste jelen (*Cervus elaphus*), koji su dopremljeni s Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorke su prikupili doc. dr. sc Dean Konjević i dr. vet. med. Miljenko Bujanić u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost "Molekularna epidemiologija nekih invazijskih oboljenja divljih životinja" (šifre 3421). Međutim, nakon analize svakog uzorka pojedinačno, za konačni cilj istraživanja (uspostavu referentnog panela SSCP profila) odabrano je njih četiri (J16B, J20B, J29B i J30B), za koje se, pomoću obrade u programu BioEdit, pokazalo da imaju najčitljivije sekvence.

2.2. Izolacija DNA

Izolaciju DNA iz uzoraka tkiva izvršila sam prema protokolu proizvođača, pomoću komercijalnog kita za izolaciju DNA, "Wizard Genomic DNA Purification Kita-a", (Promega). Najprije sam dodala 300 µL otopine za lizu stanica (eng. *nuclei lysis solution*) u svaku od tubica volumena 1.5 mL, koje sam prethodno označila oznakom uzorka. Pet do deset mg tkiva (veličina zrna riže) usitnila sam skalpelom i prebacili u odgovarajuću tubicu. Kako bi se eventualni dijelovi uzorka na stjenkama tubica istaložili, centrifugirala sam ih na 14,000 okretaja u minuti kraće vrijeme. Nakon završene centrifuge, u tubice sam dodala 1.5 µL proteinaze K (20 mg/ml) pazeći pri tome da ju dodam uz stijenku, snažno ručno protresla, a potom i vorteksirala 5 minuta. Tubice su inkubirane tijekom noći na 55 °C uz povremeno miješanje na tresilici pri 600 okretaja u minuti. Sljedeći dan, nakon što su se ohladili na sobnoj temperaturi, uzorke sam centrifugirala kako bi se iskondenzirane kapljice spustile sa stijenke na dno tubice. Dodala sam 100 µL otopine za taloženje proteina (eng. *protein precipitation solution*) i snažno vorteksirala 20 sekundi, a potom stavila na led (+4 °C) 5 minuta. Nakon hlađenja, uzorke sam centrifugirala 3 minute na 13,000 okretaja u minuti. Bijeli talog koji je nakon toga zaostao na dnu tubice su proteini, a DNA se nalazila u nadtalogu (supernatantu). U nove 1.5 mL tubice potom sam otpipetirala 300 µL 100% etanola, te im dodala supernatant. Sadržaj sam promiješala laganim okretanjem tubica u

rukama i centrifugirala 1 minutu na 13,000 okretaja u minuti. Supernatant koji je nastao kao rezultat toga sam dekantirala i odbacila, dok je DNA ostala u talogu. U preostali sadržaj dodala sam 300 µL 70% etanola i ponovno laganim okretanjem izmiješala. Nakon novog centrifugiranja u trajanju od 1 minute na 13,000 okretaja ponovno se odvojio supernatant, koji sam odstranila pomoću pipete. Nakon njegova odstranjivanja, tubice je bilo potrebno otvoriti, preokrenuti naopačke na čisti filter papir i tako sušiti 60 minuta na sobnoj temperaturi. U posljednjem koraku izolacije DNA dodala sam 100 µL DNA otopine za rehidrataciju (eng. *rehidration solution*), te sadržaj inkubirala preko noći na +4 °C. Izolirana DNA bila je pohranjena u hladnjaku na +4 °C sve do sljedećeg koraka.

2.3. Lančana reakcije polimerazom (PCR; eng. *polymerase chain reaction*)

Lančana reakcija polimerazom ili skraćeno PCR (eng. *polymerase chain reaction*) izvedena je u svrhu umnažanja dijela DNA, točnije eksona 2 lokusa DRB skupine II MHC, duljine oko 300 pb. Koristila sam komercijalni paket "HotStarTaq Master Mix Kit" (Qiagen), koji sadrži HotStar Taq Master Mix (PCR pufer s dodatkom $MgCl_2$, dNTP i HotStar Taq DNA polimeraze) i vodu bez RNaze (eng. *RNase-free water*). Pufer HotStar Taq Master Mix je 2x koncentriran, te je njegov volumen iznosio polovinu ukupnog reakcijskog volumena. Izvorna koncentracija radnih otopina početnica bila je 100 µM, te sam ih razrijedila do radne koncentracije od 2 µM. Kako su početnice 10x koncentrirane, njihov volumen, kao i volumen uzoraka DNA, iznosio je desetinu ukupnog volumena reakcijske smjese, odnosno njihova konačna koncentracija u reakcijskoj smjesi bila je 0.2 µM. Ostatak reakcijskog volumena sačinjavala je voda. Lokus DRB umnožila sam pomoću početnica koje su dizajnirali Sigurdardottir i suradnici (1991). Radi se o početnicama LA31 (5'-GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT-3') i LA32 (5'-TTCGCGTCACCTCGCCGCTG-3'). Kako bih utvrdila da li navedene početnice dovoljno dobro umnažaju željeni odsječak, radila sam PCR u ukupnom volumenu od 8 µL (7 µL Master Mix + 1 µL DNA), a kasnije, u svrhu sekvenciranja, u volumenu od 40 µL, odnosno 20 µL za potrebe molekularnog kloniranja i 10 µL za potrebe izvođenja metode SSCP. Tijekom izvođenja PCR reakcije najprije je provedeno inicijalno zagrijavanje pri 95 °C u trajanju od 5 minuta u svrhu aktivacije HotStarTaq DNA polimeraze. Kako bi se umnožio dovoljan broj željenih fragmenata ponovljeno je 35 ciklusa. Prvi korak, koji je trajao 1 minutu pri 95 °C, doveo je do denaturacije DNA. U drugom koraku, koji je trajao 30 sekundi, došlo je do sniženja

temperature na 50 °C kako bi došlo do vezivanja početnica (eng. *annealing*) na komplementarne dijelove DNA. U trećem koraku, fazi elongacije (eng. *extension*), koji je trajao 1 minutu pri 72 °C, polimeraza je ugrađivala nukleotide pri čemu su se sintetizirali novi lanci. U posljednjem koraku, tzv. finalnoj elongaciji u trajanju od 10 minuta pri 72 °C, došlo je do konačnog produljenja produkata, odnosno konačne sinteze DNA.

2.4. Elektroforeza

Za provjeru uspješnosti PCR reakcije (prisutnosti DNA molekula i njihove duljine) i molekularnog kloniranja provodila sam elektroforezu na 1% agaroznom gelu. Agarozu u prahu otopila sam na plameniku u 0.5x puferu tris-borat-etilendiamintetraoctene kiseline (TBE). Za mali gel otapala sam 0.5 g agaroze u 50 mL pufera, a za veliki gel 1 g agaroze u 100 mL pufera. Kako bih vizualizirala odsječke DNA, nakon kratkotrajnog hlađenja otopine agaroze, dodala sam boju SYBR Safe (Invitrogen) u omjeru 1 μL na 10 ml gela. Pripremljenu otopinu izlila sam u kalup i stavila češljić kako bi se formirale jažice. Nakon 30-ak minuta agaroza je polimerizirala, te sam uklonila češljić i gel premjestila u kadicu za elektroforezu ispunjenu 0.5x puferom TBE. Uzorke (i biljeg veličine DNA odsječka) pomiješala sam s puferom za nanošenje uzoraka (GLB, eng. *gel loading buffer*) u omjeru 1:1 i dodala u jažice. Elektroforeza je provedena pri naponu od 100 V i 400 mA u trajanju od 20 do 30 minuta. Prisutnost PCR proizvoda i njegovu duljinu provjerila sam pod UV svjetlom, te ga po potrebi izrezala iz gela i pročistila.

2.5. Sekvenciranje

Sekvenciranje sam provela kako bih identificirala alele lokusa DRB, te utvrdila koje jedinke su heterozigotne. Sekvenciranje je provedeno na svim prethodno PCR-om umnoženim uzorcima DNA jedinki, te kasnije i na DNA uzorcima dobivenim molekularnim kloniranjem (poglavlje 2.6.). Uzorke za sekvenciranje slala sam u Macrogen servis (www.macrogen.com), sa sjedištem u Amsterdamu, Nizozemska. Koristila sam uslugu standardnog sekvenciranja pojedinačnih uzoraka (eng. *standard-seq single regular*), te uslugu pročišćavanja DNA. U svrhu sekvenciranja DNA jedinki koristila sam iste one početnice upotrijebljene za potrebe PCR-a (poglavlje 2.3.), dok sam za sekvenciranje DNA uzoraka dobivenih molekularnim

kloniranjem koristila početnicu koja obuhvaća cijeli naš insert i smještena je na plazmidu, M13F-pUC. Većinu uzoraka sekvencirala sam samo iz jednog smjera, no za neke sam radi potvrđivanja sekvence zatražila i drugi smjer.

2.6. Molekularno kloniranje

Cilj molekularnog kloniranja bio je dobivanje i identifikacija pojedinog alela kod heterozigota. Kloniranje je izvedeno korištenjem komercijalnog kompleta "pGEM®-T Easy Vector System" (Promega). Sama metoda zasniva se na tome da se odsječak DNA od interesa (ekson 2 lokusa DRB dobiven umnažanjem pomoću PCR reakcije) ugradi u plazmid (vektor), koji se zatim unosi u bakterijsku stanicu, te se umnaža uslijed reprodukcije bakterija.

Odabir klonova koji nose ugrađenu DNA izvršila sam na dvije razine. Prva razina podrazumijeva dodatak antibiotika ampicilina u podlogu. Budući da plazmid nosi otpornost bakterija na ampicilin, na njoj izrastaju samo kolonije bakterija koje su ga usvojile. Druga razina odabira klonova s ugrađenom DNA zasniva se na činjenici da plazmid sadrži gen za jednu podjedinicu enzima galaktozidaze čiji supstrat X-gal (modificirana galaktoza) djelovanjem enzima daje plavo obojen produkt. Plazmid se prije unosa željenog odsječka pocijepa unutar gena za galaktozidazu i postaje linearan. Umetanjem DNA od interesa on ponovno postaje cirkularan. Međutim, ponekad se dogodi da se plazmid zatvori bez ugradnje DNA odsječka. Na taj način gen za galaktozidazu ostaje cjelovit i funkcionalan, enzim djeluje na supstrat i kolonije postaju plave. Nasuprot tome, ukoliko je došlo do ugradnje DNA odsječka u plazmid, gen za enzim bit će nefunkcionalan i enzim neće moći djelovati na supstrat, te će kolonije biti bijele. Budući da su mi bile potrebne one kolonije koje imaju ugrađenu DNA od interesa s podloge sam pokupila samo bijele kolonije, a takav princip odabira klonova naziva se plavo-bijela selekcija.

Prije molekularnog kloniranja PCR produkte pročistila sam pomoću komercijalnog paketa "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega). Prvi korak u postupku pročišćavanja bio je vezanje DNA. U reakcijske tubice dodala sam jednak volumen otopine za vezanje na membranu (eng. *membrane binding solution*). U nove tubice od 2 mL stavila sam kolonu za pročišćavanje (eng. *SV microcolumn*), te na nju prenijela otopinu PCR produkta, inkubirala 1 minutu na sobnoj temperaturi, te centrifugirala na 14,000 okretaja u minuti 1 minutu. Nakon centrifugiranja, odlila sam odijeljenu tekućinu, te vratila kolonu u istu tubicu.

Drugi korak podrazumijeva pranje. Nanijela sam 700 µL otopine za ispiranje (eng. *membrane wash solution*) s dodatkom etanola, centrifugirala na 14,000 okretaja u minuti 1 minutu, bacila višak tekućine i kolonu ponovno vratila u tubicu. Ponovila sam ispiranje još jednom, no ovoga puta s 500 µL , te centrifugirala na 14,000 okretaja u minuti 5 minuta. Višak odijeljene tekućine sam bacila, kolonu ponovno vratila, te još jednom centrifugirala, ali ovaj put s otvorenim poklopcem centrifuge kako bi ostaci etanola isparili. U trećem koraku, ispiranju, prebacila sam kolonu u čistu tubicu od 1.5 mL, dodala 20 µL vode bez nukleaze (eng. *nuclease-free water*), inkubirala na sobnoj temperaturi 1 minutu, te centrifugirala na 14,000 okretaja u minuti 1 minutu. Na posljetku sam kolone bacila, a u tubicama je ostala pročišćena DNA koja je pohranjena na +4 °C do sljedećeg koraka.

Prvi dan radila sam postupak ligacije, koji podrazumijeva ugradnju željenog odsječka DNA u plazmid. Ugradnja je omogućena time što je plazmid prekinut i na krajevima mu je dodan timin, dok većina termostabilnih polimeraza, koje se koriste za PCR, na kraj dodaje adenin. Da bi rezultat ligacijske reakcije bio optimalan utvrdila sam količinu PCR produkta koju dodajemo u reakcijsku smjesu. Količinu PCR produkta odredila sam mjerenjem apsorbancije uzoraka spektrofotometrom. Za one uzorke u kojima sam imala malo DNA dodala sam maksimalnu količinu ligacijske smjese, dok sam kod uzoraka s puno DNA dodala minimalnu količinu ligacijske smjese. Osnovne komponente ligacijske smjese bile su plazmid pGEM® - T, PCR produkt, T4 DNA ligaza i ligacijski pufer, te kontrolni insert i voda. Uz pokusne reakcije, postavila sam pozitivnu i negativnu kontrolu ligacije. Pozitivna kontrola poslužila je za procjenu uspješnosti procesa ligacije. Zbog ugradnje kontrolnog inserta u plazmid očekivala sam pojavu većinom bijelih kolonija. U negativnoj kontroli nalazio se samo plazmid bez ugrađenog željenog odsječka DNA, te sam tu očekivala pojavu plavih kolonija kao rezultat nepocijepanog plazmida ili nedostatka timina na njegovim krajevima. U tubicu od 0.2 mL otpipetirala sam 1 µL plazmida pGEM® - T, 1 µL T4 DNA ligaze, 5 µL ligacijskog pufera, pročišćeni PCR proizvod i vodu bez nukleaze do konačnog volumena od 10 µL. U pozitivnu kontrolu otpipetirala sam 1 µL plazmida pGEM®- T, 1 µL T4 DNA ligaze, 5 µL ligacijskog pufera, 2 µL kontrolnog inserta i vodu bez nukleaze do konačnog volumena od 10 µL, a u negativnu kontrolu 1 µL plazmida pGEM®- T, 1 µL T4 DNA ligaze, 5 µL ligacijskog pufera i vodu bez nukleaze do konačnog volumena od 10 µL. Ligacijske smjese spremila sam u hladnjak na +4 °C preko noći.

Drugi dan radila sam transformaciju bakterija ligacijskom smjesom. Koristila sam kompetentni soj bakterije *Escherichia coli*, JM109, genotipa *end*A1, *rec*A1, *gyr*A96, *thi*,

*hsd*R17 (r_k^-, m_k^+), *rel*A1, *sup*E44, Δ(*lac-pro*AB), [F′ *tra*D36, *pro*AB, *laq*I^qZΔM15]. (obrađene su s ciljem usvajanja plazmida pGEM®- T). Takve bakterije zahtjevne su po pitanju čuvanja (njihova iznimna osjetljivost zahtjeva čuvanje na -70 °C). Za svaku ligacijsku smjesu pripremila sam dvije petrijeve zdjelice s 30 mL hranjive podloge. Za hranjivu podlogu korišten je medij LB (eng. *lysogen broth*) sljedećeg sastava: 1 L vode, 10 g Bacto®-trypton-a, 5 g Bacto® ekstrakta stanica kvasca (eng. *yeast extract*), 5 g NaCl, 15 g agara i NaOH do konačne pH vrijednosti od 7.0. Prije izlijevanja medij je autoklaviran, te mu je dodan ampicilin do konačne koncentracije 100 µL/mL. U svaku petrijevu zdjelicu s medijem dodala sam smjesu 100 µL 100 mM izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG) i 20 µL X-Gal-a (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) koncentracije 50 mg/mL, te ostavila 30 minuta na 37 °C kako bi se smjesa upila u podlogu. Tubice s ligacijskom smjesom od prethodnog dana sam iscentrifugirala, te ispipetirala 2 µL u nove sterilne tubice od 1.5 mL. Tubice s bakterijskim stanicama, koje su bile skladištene na -20 °C, stavila sam 5 minuta na ledenu kupelj kako bi se otopile. Bakterije sam lagano promiješala, te ispipetirala 50 µL u tubice s ligacijskom smjesom. Kako bi bakterije usvojile plazmid, tako pripremljene tubice lagano sam pomiješala, stavila 20 minuta na led, potom 45 sekundi u vodenu kupelj na 42 °C, te ponovno na led 2 minute. U tubice sam zatim dodala 800 µL tekućeg LB medija, načinjenog na isti način kao i kruti medij, ali bez dodatka agara, i inkubirala 1.5 sat na 37 °C uz miješanje pri 300 okretaja u minuti. Nakon inkubacije otpipetirala sam po 100 µL na po dvije petrijeve zdjelice s krutom hranjivom podlogom i inkubirala 24 sata na 37 °C.

Treći dan, s ciljem dodatnog umnažanja DNA od interesa, s podloga su skupljene bijele kolonije i prebačene u epruvete s 5 mL tekuće hranjive podloge. U svaku epruvetu dodana je po jedna kolonija, a ukupno sam od svakog uzorka imala 13 poduzoraka. Epruvete su potom inkubirane preko noći uz laganu trešnju pri 37 °C.

Četvrti dan provela sam izolaciju plazmida iz bakterija i njihovo pročišćavanje pomoću komercijalnog paketa "PureYield™ Plasmid Miniprep System". U prvom koraku provedena je liza bakterijskih stanica. Najprije sam centrifugirala bakterijske kulture pri 2,000 okretaja u minuti 2 minute. Supernatant sam odlila, a na talog ispipetirala 600 µL vode i resuspendirala. Suspenziju stanica prebacila sam u tubice od 1.5 mL. U njih sam najprije dodala 100 µL otopine za lizu stanica (eng. *cell lysis buffer*) i promiješala okretanjem tubice 6x. Zatim sam dodala i 350 µL hladne (4-6 °C) otopine za neutralizaciju (eng. *neutralisation solution*), temeljito promiješala sadržaj okretanjem tubice i centrifugirala na maksimalnoj brzini 3 minute. U čiste tubice (eng. *collection tube*) stavila sam kolonice za vezanje i

ispiranje plazmida (eng. *PureYield microcolumn*), prenijela supernatant na njih i centrifugirala 15 sekundi. Tekućinu sakupljenu nakon centrifugiranja sam bacila, a kolone vratila nazad. U drugom koraku provedeno je pročišćavanje plazmida. Prvo sam u kolonicu otpipetirala 200 μL otopine za uklanjanje endotoksina (ERB; eng. *endotoxin removal wash*) i centrifugirala na maksimalnoj brzini 15 sekundi. Zatim sam otpipetirala i 400 μL otopine za ispiranje kolone (eng. *column wash solution*) i centrifugirala na maksimalnoj brzini 30 sekundi. U trećem koraku uslijedilo je ispiranje plazmida. Kolonu sam prebacila u čistu 1.5 mL tubicu, na nju otpipetirala 30 μL otopine vode (eng. *nuclease-free water*) i inkubirala 1 minutu. Na kraju sam centrifugirala 15 sekundi kako bi se plazmid oborio u tubicu. Pohranila sam ga na -20 °C.

2.7. Računalna obrada podataka

Genom jelena je diploidan, što znači da se svaki lokus u njegovom genomu pojavljuje dva puta. Ukoliko su dva alela potpuno ista, radi se o homozigotnim jedinkama i tada je vrlo lako identificirati nukleotidni slijed alela. Ipak, u većini slučajeva lokus se razlikuje u alelima, pa govorimo o heterozigotnosti. Tada na elektroferogramu vidimo minimalno dva vrška na određenoj poziciji u nukleotidnom slijedu, a u nekim slučajevima čak tri ili četiri, što ukazuje na to da je lokus dupliciran. U takvim slučajevima, iz samog elektroferograma nemoguće je sa sigurnošću utvrditi koja kombinacija nukleotida pripada kojem alelu.

Za obradu nukleotidnih sljedova koje su stigle iz servisa (poglavlje 2.5.) koristila sam programski paket BioEdit (Hall 1999). Ovaj program prvenstveno je poslužio za identifikaciju polimorfnih nukleotidnih mjesta. Također, pomoću njega sam "ugrubo" identificirala alele kod poduzoraka koji su prethodno klonirani (poglavlje 2.6.). To sam izvela na taj način da sam sekvence svih poduzoraka poravnala pomoću automatskog ClustaIW višestrukog poravnavanja, te usporedila njihove nukleotidne sljedove. Također, koristila sam i SeqScape programski paket budući da mi on daje elektroferogramski ispis iz suprotnog smjera, odnosno prebacuje elektroferogram u reverzni komplement, što BioEdit ne radi.

2.8. Metoda analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP; *single strand conformation polymorphism*)

2.8.1. Priprema gela za poliakrilamidnu elektroforezu (PAGE; eng. *polyacryilamide gel electrophoresis*)

Za izvođenje poliakrilamidne elektroforeze (PAGE) u svrhu analize SSCP korišten je vertikalni sustav za elektroforezu (eng. *miniVE vertical elektrophoresis system*; Hofer, SAD) s dimenzijama gela 10x10.5 cm.

Stakalca između kojih se izlijeva gel dobro sam obrisala etanolom kako bih spriječila da eventualna zaostala masnoća na njima ne bi dovela do nepravilne polimerizacije gela. Silikonskom mašću sam premazala razmaknice koje služe za priljubljivanje stakalaca, te ih potom uz njih priljubila, poravnala i dobro pritisnula kako ne bi došlo do curenja gela. Tako pripremljena stakla umetnula sam u tzv. "kasete" i dobro pričvrstila pomoću vijaka s bočne strane, te stavila na prethodno niveliran stolić.

Zatim sam pripremila 8%-tni poliakrilamidni (PA) gel (37.5 : 1) s 2.5% glicerola, što znači da na 37.5 molekula akrilamida (AA) dolazi 1 molekula N,N'-metilen-*bis*-akrilamida (BIS). Pripremila sam dvije manje laboratorijske čaše. U jednu sam dodala 5.34 ml deionizirane autoklavirane vode i 1 ml 10x pufera tris-borat-etilendiamintetraoctene kiseline (TBE)-SSCP. Dio te otopine dodala sam u tubicu s 250 μL glicerola kako bih ga otopila, a nakon toga sadržaj tubice ponovno sam vratila u tu istu čašu i dodala 20 μL otopine tetrametiletilendiamina (TEMED). U drugu čašu ispipetirala sam 1.95 ml 40%-tne otopine AA, 1.32 ml 2%-tne otopine BIS-a i 120 μL 10%-tne otopine amonijeva persulfata (APS). Važno je da spomenuti APS svakoga puta bude svježe napravljen. Sukladno tome, 10%-tni APS napravljen je otapanjem 200 mg APS-a u 2 ml autoklavirane vode. Također, APS je nestabilan pod utjecajem svjetlosti i vlage, te sam stoga tubicu s otopinom omotala aluminijskom folijom. Nakon toga pomiješala sam sadržaje obiju čaša i pažljivo, bez zaustavljanja, izlila između stakalaca i potom umetnula češljiće. Sama polimerizacija traje oko 45 minuta, no ja sam ostavila gel preko noći tako da sam ga omotala vlažnim ručnicima i smjestila u hladnjak kako se ne bi posušio.

2.8.2. Denaturacija uzoraka

Sljedeći dan provela sam denaturaciju uzoraka u puferu za denaturaciju napravljenom od 90%-tnog formamida, 25 mM etilendiamintetraoctene kisleine (EDTA), te boje bromfenol plavo (BFB; eng. *bromphenol blue*). Od 1 do 3 μL uzorka pomiješala sam s 9-24 μL pufera, te inkubirala 10 minuta pri 99 °C. Nakon što je isteklo tih 10 minuta uzorke sam brzo prebacila na led, te potom nanijela u jažice koje sam prethodno isprala puferom za elektroforezu napravljenim od 100 ml 10x TBE (tris-borat-etilendiamintetraoctena kiselina) i 900 ml autoklavirane vode. Spomenutim puferom također sam napunila kadicu za elektroforezu.

2.8.3. Elektroforeza

Eektroforeza je provedena unutar hladnjaka na +4 °C, pri 200 V i 70 mA u trajanju od oko 3 sata.

2.8.4. Bojanje gela srebrom

Za vizualizaciju vrpci jednolančanih konformacija DNA korištena je metoda bojanja srebrom. Nakon elektroforeze, gel sam najprije skinula sa stakalca u petrijevu zdjelicu, te inkubirala 1 sat na treskalici u otopini za fiksaciju (apsolutni etanol 50% + ledena octena kiselina 10%) kako DNA ne bi difundirala iz gela. Nakon inkubacije gel sam isprala 3x deioniziranom vodom, te potom inkubirala 1 sat u otopini srebrovog nitrata (12 mM; 2,04 g/L), koje se specifično veže za DNA. Po završetku inkubacije gel sam ponovno 3x isprala deioniziranom vodom kako bih uklonila nespecifično vezano srebro. Da bi rezultati, odnosno vrpce jednolančane DNA na gelu bile vidljive, provela sam razvijanje do pojave vidljivih pruga u otopini za razvijanje (KOH 0.75 M, formaldehid 0.28% - 10,525 g + 2 mL, te ostatak do 250 mL deionizirana voda). Rezultate sam pogledala na VIS transiluminatoru i dokumentirala fotografiranjem digitalnom kamerom.

3. REZULTATI

3.1. Uspješnost umnažanja ciljnih fragmenata

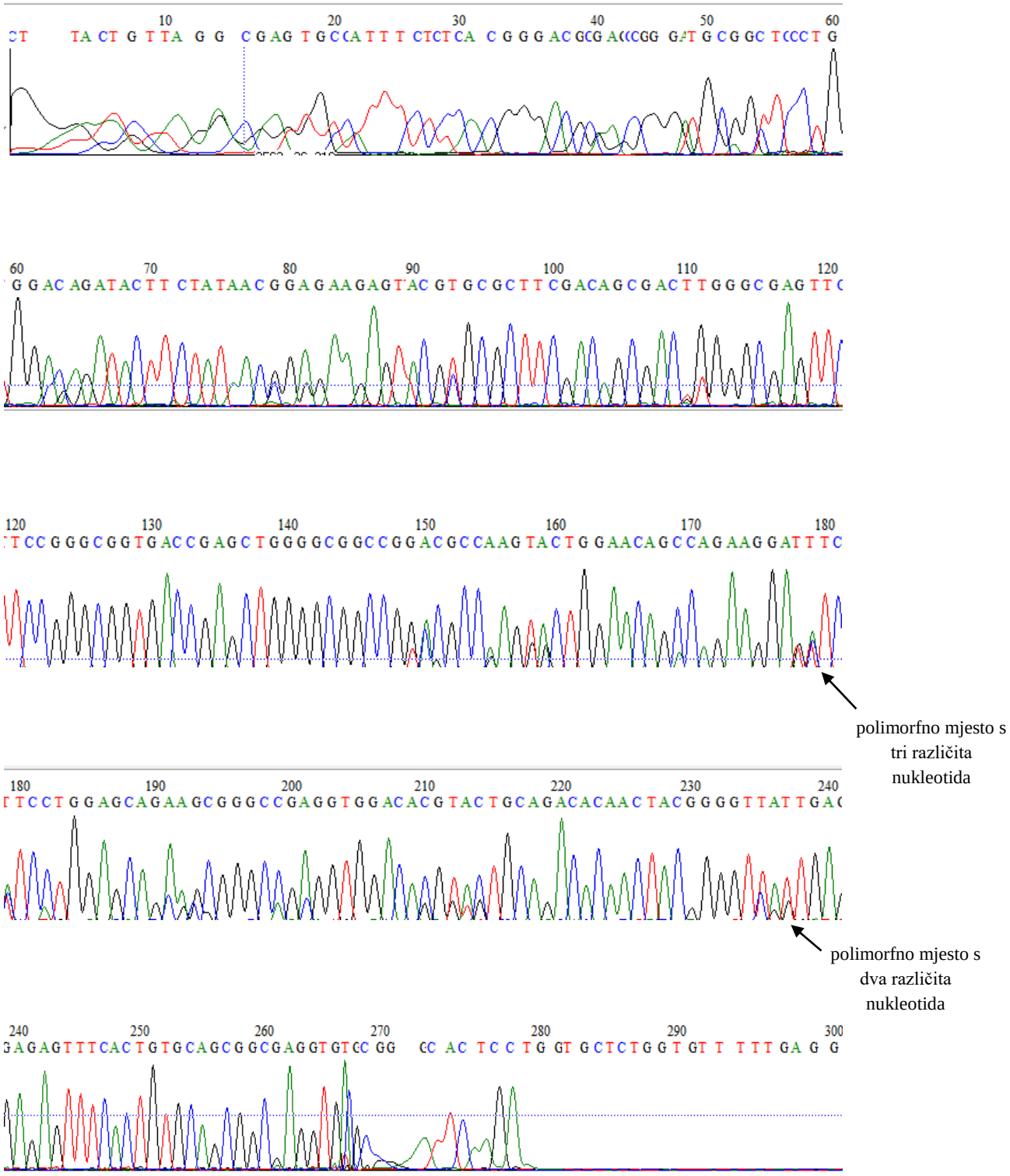
Korištenjem početnica LA31 i LA32 (Sigurdardottir i sur. 1991) tijekom lančane reakcije polimerazom, i kasnijom provjerom na u 1%-tnom agaroznom gelu (Sl. 7), ustanovljena je uspješnost umnažanja eksona 2 lokusa DRB duljine oko 300 pb u 23 jedinke jelena s područja Baranje, Hrvatska.



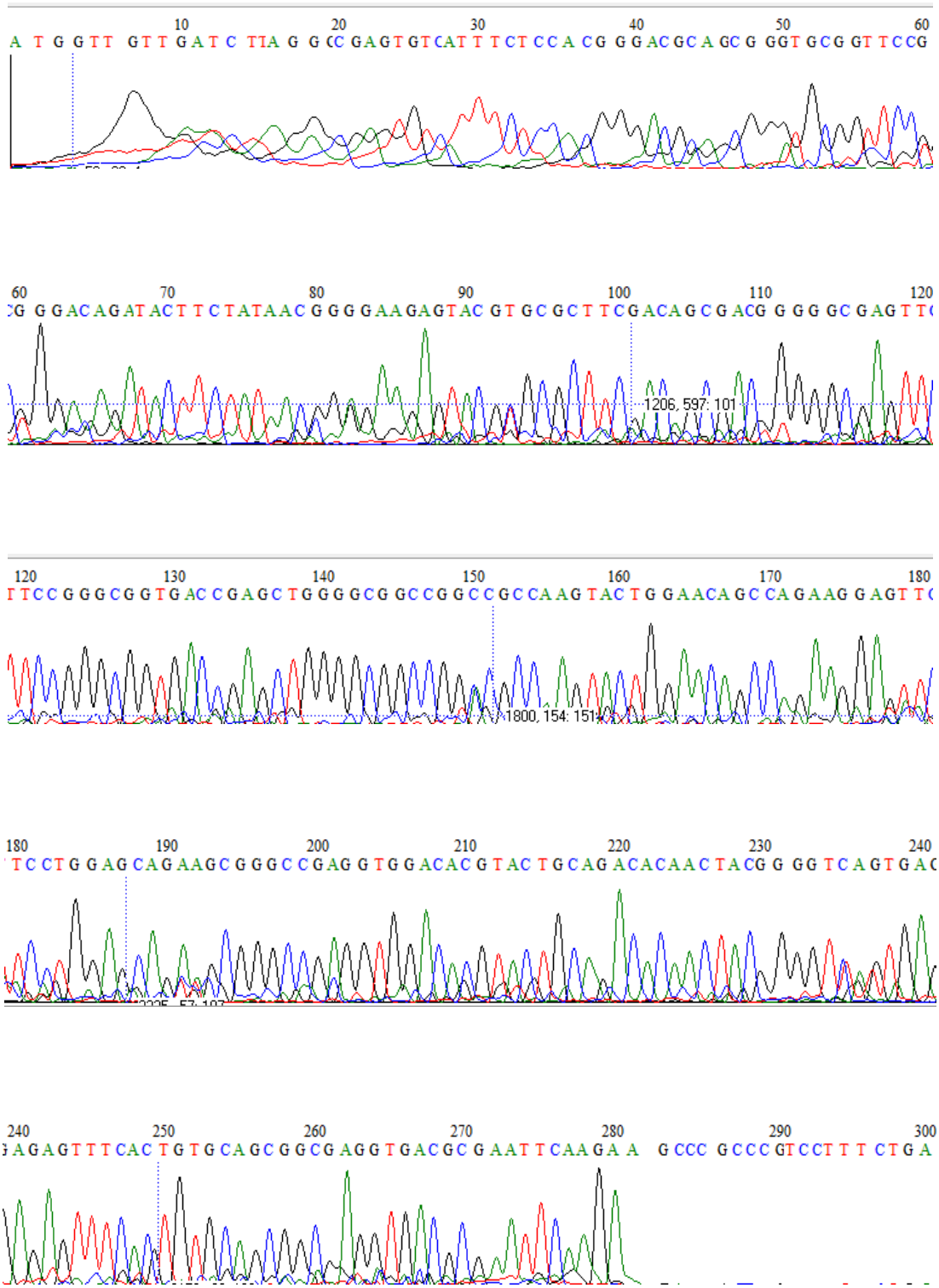
Slika 7. Elektroforeza u 1%-tnom agaroznom gelu (dobivene vrpce pokazuju uspješno umnožene lokuse DRB duljine oko 300 pb za neke od uzoraka)

3.2. Identifikacija alela

Analizom nukleotidnih sljedova (Sl. 8 i 9) računalnim programima BioEdit i SeqScape®, utvrđeno je da je kod svake jedinke lokus DRB dupliciran. Ono što upućuje na tu činjenicu jest prisutnost više od dva vrška (tri ili čak četiri) na nekim nukleotidnim pozicijama u ispisu nukleotidnog slijeda (elektroferogramu) Među navedenim jedinkama, odabrala sam one s najčitljivijim sekvencama (njih četiri: J16B, J20B, J29B, J30B), te provela postupak molekularnog kloniranja. U uzorku od 42 poduzoraka dobivenih molekularnim kloniranjem, sekvenciranjem i usporedbom nukleotidnih sljedova u računalnom programu BioEdit, pomoću ClustaIW višestrukog poravnanja, te usporedbom s elektroferogramom jedinki nad kojima je provedeno molekularno kloniranje, utvrdila sam postojanje sedam različitih alela lokusa DRB (Tab. 1; Sl. 10). U svakoj od kloniranih jedinki pronađeno je bar tri alela, što potvrđuje činjenicu da je lokus DRB u tih jedinki dupliciran. Alelima sam dala radne nazive prema nazivu jedinke kod koje su utvrđeni i broju izoliranog klona (J20B-13, J30B-10, J20B-10, J20B-8, J29B-7, J29B-11, J29B-3) (Sl. 10.).



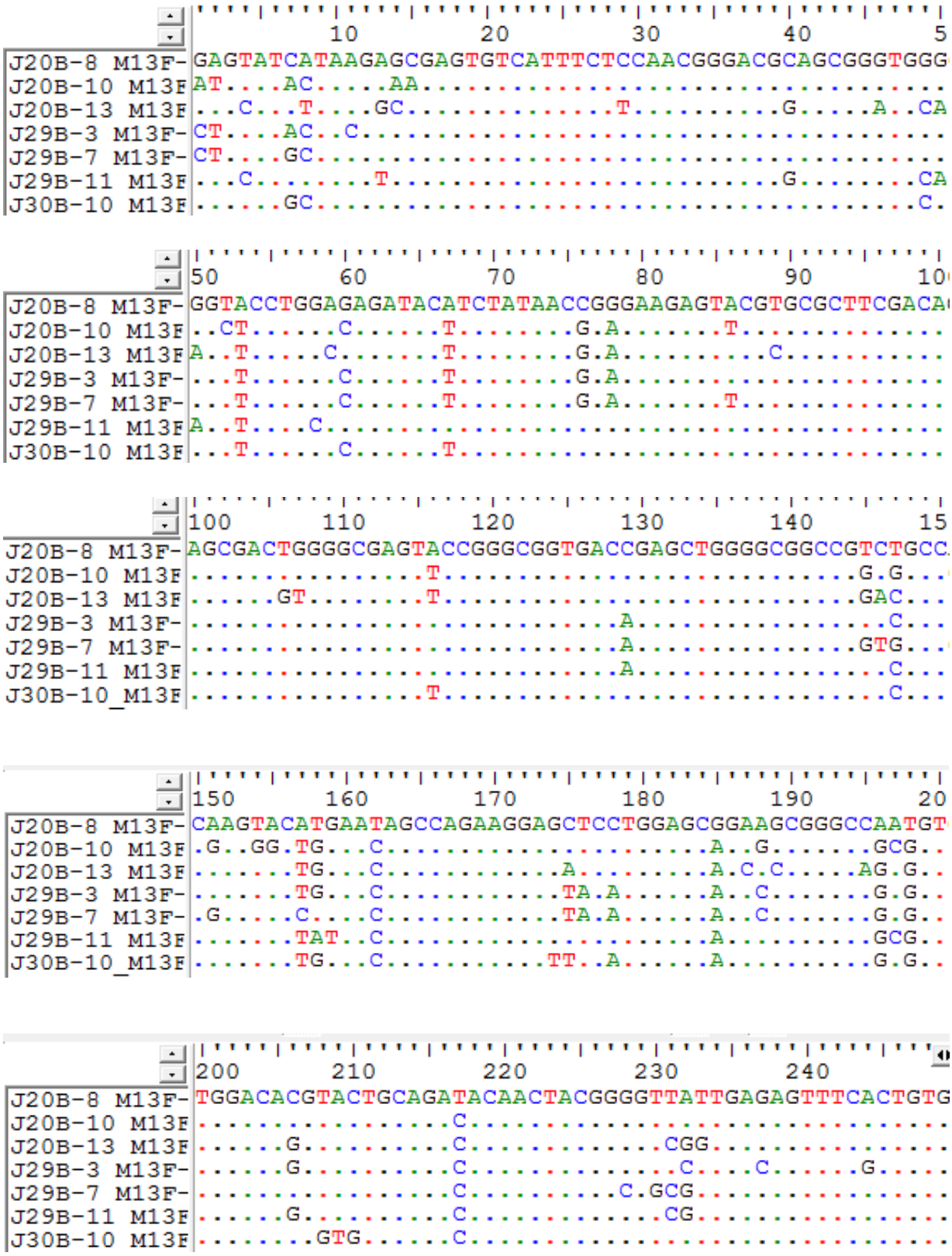
Slika 8. Elektroferogram uzorka s jasno čitljivom sekvencom, uključenim u daljnju analizu (kopirano iz računalnog programa BioEdit)



Slika 9. Elektroferogram uzorka s nejasnom sekvencom, izuzetom iz daljnjem istraživanja (kopirano iz računalnog programa BioEdit)

Tablica 1. Tablica klonova i radnih naziva alela izoliranih iz njih (sekvence klonova označenih s * pokazale su mutaciju u odnosu na originalnu sekvencu, dok su sekvence označene s # artefakti nastali u procesu kloniranja, a predstavljaju razne sekvence koje uopće nisu sličile originalnim alelima); sedam različitih alela označeno je različitim bojama

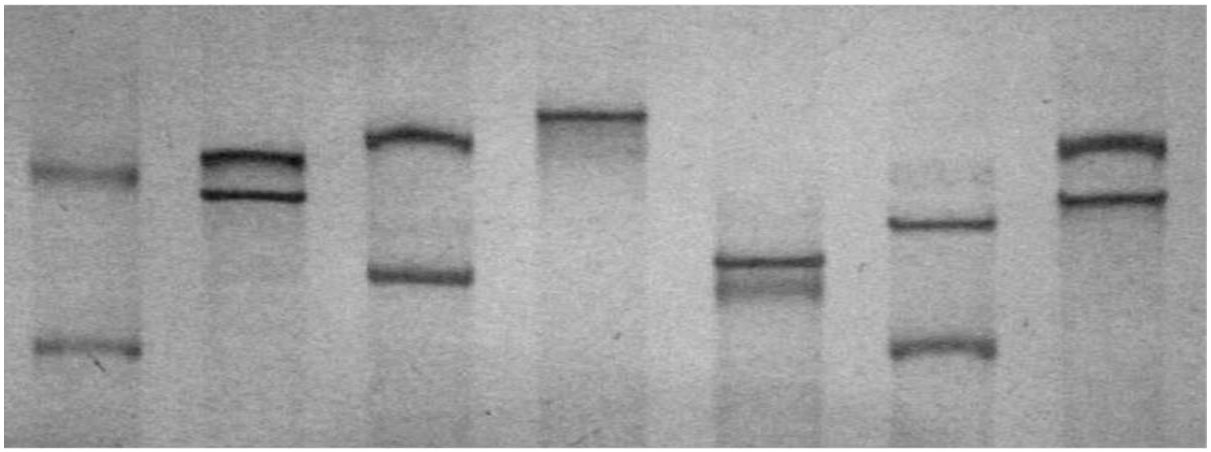
JEDINKA	KLON	RADNI NAZIV ALELA
J16B	J16B-1	J30B-10
	J16B-2	J20B-13
	J16B-3	J20B-10
	J16B-4	J20B-13
	J16B-5#	-
J20B	J20B-1	J20B-10
	J20B-2*	-
	J20B-3	J20B-8
	J20B-4	J20B-8
	J20B-5	J20B-10
	J20B-6	J20B-8
	J20B-7*	-
	J20B-8	J20B-8
	J20B-9	J20B-8
	J20B-10	J20B-10
	J20B-11	J20B-10
	J20B-12	J20B-8
	J20B-13	J20B-13
J29B	J29B-1	J29B-7
	J29B-2	J29B-7
	J29B-3	J29B-3
	J29B-4#	-
	J29B-5	J29B-3
	J29B-6	J29B-11
	J29B-7	J29B-7
	J29B-8	J29B-7
	J29B-9#	-
	J29B-10	J29B-7
	J29B-11	J29B-11
J30B	J30B-1#	-
	J30B-2#	-
	J30B-3#	-
	J30B-4#	-
	J30B-5#	-
	J30B-6#	-
	J30B-7#	-
	J30B-8	J20B-10
	J30B-9#	-
	J30B-10	J30B-10
	J30B-11	J20B-13
	J30B-12#	-
	J30B-13	J20B-13



Slika 10. Nukleotidni sljedovi alela lokusa DRB u istraživanoj populaciji jelena (*Cervus elaphus*) u Hrvatskoj (preuzeto iz računalnog programa BioEdit)

3.3. Referentni panel izoliranih alela

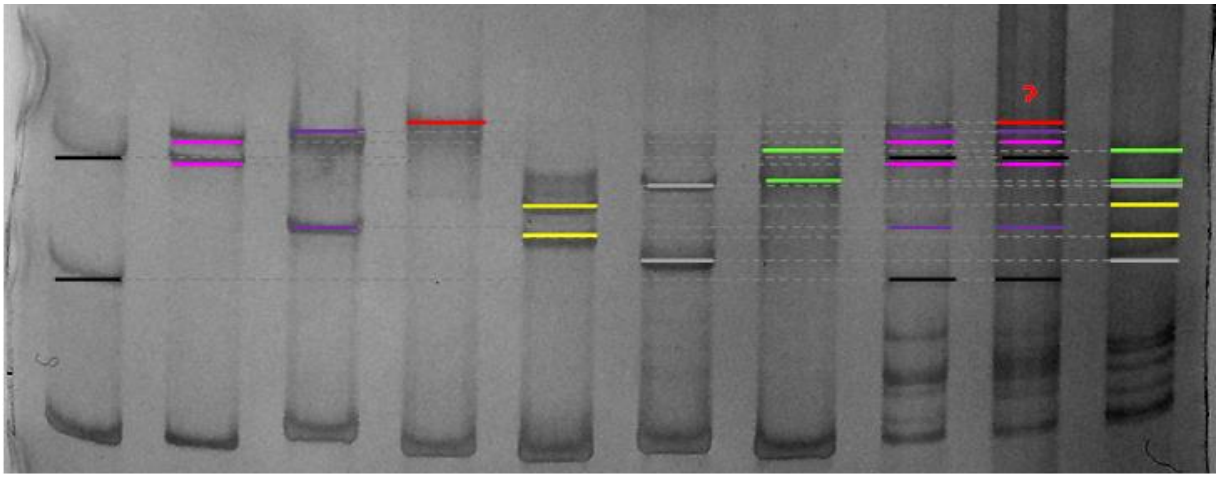
Alele identificirane i izolirane molekularnim kloniranjem razdvojila sam metodom SSCP. Nakon elektroforeze i bojanja srebrom, na slici gela (Sl. 11) vide se po dvije vrpce za svaki alel izuzev alela uzorka J20B-8 gdje vidimo jednu vrpcu i to relativno difuznu. Uz to, vidi se da svaki od alela ima različit SSCP profil, što ovisi o poprimljenoj konformaciji jednolančanih DNA.



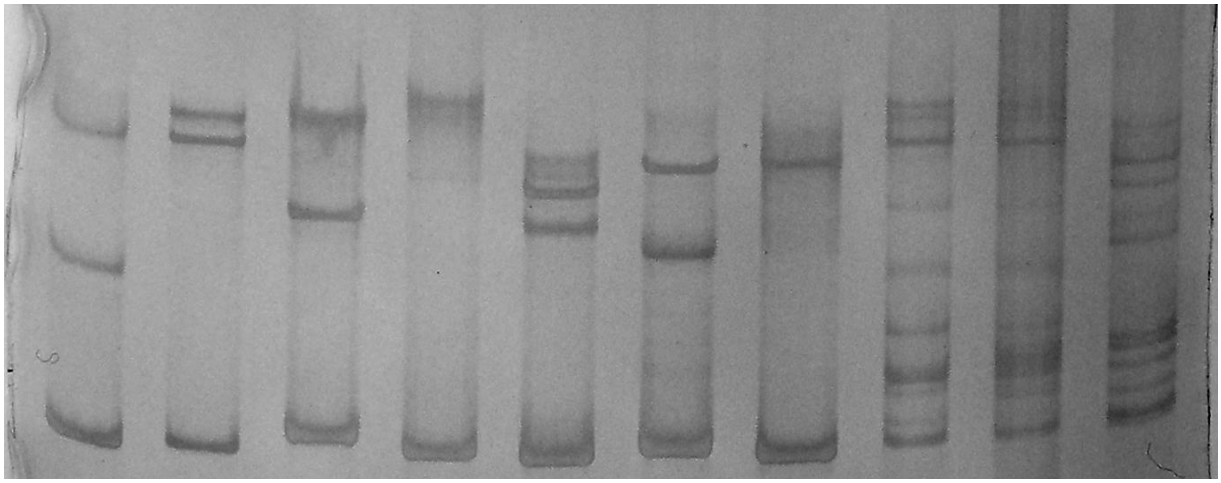
J20B-13 J30B-10 J20B-10 J20B-8 J29B-7 J29B-11 J29B-3

Slika 11. Rezultati analize SSCP nakon elektroforeze u 8%-tnom poliakrilamidnom gelu; slika prikazuje referentni panel SSCP profila alela identificiranih nakon molekularnog kloniranja

Na SSCP profilima (Sl. 12a i b) dvaju uzoraka (J16B i J29B) vide se vrpce svih alela pretpostavljenih molekularnim kloniranjem. Kod uzorka J16B to su aleli J20B-13, J30B-10 i J20B-10), a kod uzorka J29B aleli J29B-7, J29B-11 i J29B-3, te su time u potpunosti potvrdila rezultate dobivene molekularnim kloniranjem. Za uzorak J20B na SSCP profilu nedostaje vrpca koja bi pripadala alelu J20B-8. Također, kod svih uzoraka čini se kako se neke vrpce preklapaju (kod jedinki J16B i J20B to su gornja vrpca alela J20B-13 i donja vrpca alela J30B-10, dok su kod jedinke J29B to gornja vrpca alela J29B-11 i donja alela J29B-3).



a) J20B-13 J30B-10 J20B-10 J20B-8 J29B-7 J29B-11 J29B-3 J16B J20B J29B



b) J20B-13 J30B-10 J20B-10 J20B-8 J29B-7 J29B-11 J29B-3 J16B J20B J29B

Slika 12. Rezultati analize SSCP nakon elektroforeze u 8%-tnom poliakrilamidnom gelu: **a)** prikaz položaja vrpci pojedinih alela kod različitih jedinki (vrpce različitih alela obojane različitim bojama) **b)** originalna slika SSCP profila alela i dodatnih uzoraka

4. RASPRAVA

Varijacije u sekvencama DNA temeljna su razlika među pripadnicima različite, ali i iste vrste. Ukoliko je najčešći alel prisutan manje od 99% unutar populacije, tada su te varijacije poznate kao polimorfizmi (Klein i sur. 1987, Walker i Rapley 2008). Prisutnost polimorfizma ne mora, ali i može dovesti do promjene fenotipa na razini proteina ili cjelokupnog organizma (Walker i Rapley 2008).

Sustav MHC sadrži najvarijabilnije funkcionalne gene opisane u kralježnjaka. Polimorfizam lokusa MHC određuje raznolikost stranih antigena, koje imunološki sustav domaćina može prepoznati i time se obraniti od patogena. Ti geni kodiraju stanične površinske glikoproteine, odnosno receptore, koji vežu antigene i prikazuju ih pomagačkim T-limfocitima. Građa receptora tako izravno utječe na pokretanje i učinkovitost imunosnog odgovora domaćina na patogeni mikroorganizam, odnosno njegovu podložnost ili otpornost na infekcije (Kindt i sur. 2013). Iz tog razloga vrlo je bitno istraživati raznolikost gena MHC unutar neke populacije kako bi se procijenio njezin opstanak, ali i opstanak same vrste općenito.

Dosadašnja istraživanja gena MHC unutar porodice *Cervidae* utvrdila su postojanje polimorfizma lokusa DRB u nekih populacija i vrsta iz porodice jelena, primjerice u europskog i sjevernoameričkog losa (Mikko i Andersson 1995), bjelorepog jelena (Van Den Bussche 1999), iberijskog jelena (Fernandez de Mera 2009) i sika jelena (Li 2013). Ovo je prvo istraživanje polimorfizma gena skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti jelena (*Cervus elaphus*) u Hrvatskoj. Također, ovim diplomskim se po prvi puta u Hrvatskoj, za potrebe istraživanja polimorfizma lokusa MHC uvodi metoda analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA ili SSCP.

Već ranije potvrđeno je kako se metoda SSCP, u kombinaciji s lančanom reakcijom polimerazom, u svrhu umnažanja ciljnog fragmenta, može uspješno koristiti u identifikaciji različitih alela, te time u kombinaciji s nekim drugim analizama doprinijeti spoznajama o genskoj raznolikosti, odnosno povijesnim prilikama koje su imale utjecaj na nju. Uspostava referentnog panela SSCP profila za analizu gena DRB jelena u Hrvatskoj tako bi trebala rezultirati bržom, jednostavnijom i jeftinijom analizom genske raznolikosti, budući da bi smanjila potrebu za molekularnim kloniranjem, a samim time i dodatnim sekvenciranjem.

Također, nadamo se kako će uvođenjem ove metode ukloniti česta pogrešna identifikacija alela uslijed prisutnosti artefakata nastalih PCR-om ili molekularnim kloniranjem kao u slučaju Bryja i sur. 2005.

U ovom istraživanju, provedenom na jedinkama iz populacija s području Baranje, uspostavljen je referentni panel SSCP profila sedam alela gena DRB jelena (*Cervus elaphus*), koji obitava na području Hrvatske. Na referentnom panelu vide se vrpce prethodno denaturiranih jednolančanih molekula DNA za sedam različitih alela identificiranih u uzorku od 42 poduzorka dobivenih molekularnim kloniranjem, porijeklom od četiri jedinke. Rezultat vidljiv nakon elektroforeze i bojanja srebrom proizlazi iz činjenice da se dvolančana DNA u denaturirajućim uvjetima razdvaja u dva lanca tako da svaki od njih poprima svoju konformaciju i putuje različito u odnosu na ostale. Time je, između ostalog, dokazana uspješnost razdvajanja alela korištenjem 8%-tnog poliakrilamidnog gela, uz dodatak glicerola, pri temperaturi od +4 °C. Da je takav omjer akrilamida i N,N'-metilen-*bis*-akrilamida efikasan u razdvajanju fragmenata veličine 300 pb, utvrđeno je već ranijim istraživanjima na jednakoj duljini fragmenta, uključujući prvo istraživanje genetske raznolikosti na porodici *Cervidae* (Mikko i Andersson 1995). Kasnija istraživanja (Van Den Bussche i sur. 1999) pokazala su efikasnost 5%-tnog poliakrilamidnog gela, uz dodatak glicerola, s jednako dobrim razdvajanjem fragmenata. Osim toga, uspješno je korišten i 10%-tni gel (Li 2013) na fragmentu duljine 249 pb. Time je potvrđena teza Yip i sur. (1999) o boljoj efikasnosti razdvajanja većih fragmenata, a samim time i različitih konformacija, u gelovima s manjim unakrsnim povezivanjem monomernih jedinica akrilamida, i obrnuto.

Kao što je navedeno u istraživanju Li (2013), a učinjeno je i u ovom istraživanju, vrlo je važno dobivene rezultate provjeriti, odnosno isti postupak provođenja metode SSCP ponoviti minimalno dva puta ne bi li se dokazala dosljednost dobivenih rezultata. Osim toga, ono što se svakako ne smije zanemariti, jesu kriteriji za konačno dokazivanje pretpostavljenih alela prema Kennedy i sur. (2002), a koji kažu da se prisutnost alela mora dokazati u dva odvojena PCR-a iste jedinke ili u PCR-u najmanje dviju različitih jedinki da bi on bio realan u populaciji.

Kao i u spomenutim ranijim istraživanjima, cilj uvođenja ove metode bio je uspostaviti referentni panel SSCP profila i time doprinijeti bržoj identifikaciji alela u pojedinim jedinkama nakon usporedbe SSCP profila PCR produkata jedinki s profilom referentnog panela alela. Nadalje, istraživanje većeg broja uzoraka na taj način dovelo bi do

identifikacije nekih novih alela lokusa DRB u populaciji, te bi se ti novoidentificirani aleli također izolirali molekularnim kloniranjem, te dodali postojećem referentnom panelu. Također, pretpostavljam da će daljnja istraživanja potvrditi da je lokus DRB kod jelena iz Hrvatske dupliciran u svih jedinki, kao što je potvrđeno i u nekim drugim populacijama: jelena (Swarbick 1995), iberijskog jelena (de Mera 2009) i sika jelena (Li 2013).

Nakon uspješne uspostave referentnog panela SSCP profila pojedinačnih alela (Sl. 11), u svrhu provjere preciznosti i uspješnosti metode SSCP, odabrana su tri uzorka s prethodno, molekularnim kloniranjem i sekvenciranjem, određenim alelnim profilima. PCR fragmenti dobiveni umnažanjem izravno iz uzoraka jedinki, bez koraka molekularnog kloniranja, podvrgnuti su analizi SSCP. Rezultati analize SSCP ova tri odabrana uzorka potvrdili su očekivane rezultate dobivene nakon molekularnog kloniranja i sekvenciranja kod dva od tri odabrana uzorka (Sl. 12a i b). No, unatoč uspješnom razdvajanju jednolančanih molekula DNA, odnosno uspostavi referentnog panela za svaki od alela, u konačnici se može primijetiti kako se pojedine vrpce, kod različitih alela, međusobno preklapaju. Osim toga, kod jednog uzorka (Sl. 12a i b) uočen je nedostatak vrpce, koja bi odgovarala alelu za koji je molekularnim kloniranjem utvrđeno da postoji.

Otežano tumačenje rezultata posljedica je difuznog izgleda pojedinih vrpci i nemogućnosti određivanja njihova točnog položaja na SSCP profilu. U takvim slučajevima, prilikom identifikacije pojedinih alela kod različitih jedinki, problem bi bilo utvrditi koja vrpca bi pripadala kojem alelu, odnosno koji alel je prisutan kod pojedinih jedinki. Ipak, nadamo se kako bi se takav problem mogao izbjeći ukoliko u obzir uzmemo samo one vrpce pojedinih alela, koje se ne preklapaju s niti jednom drugom vrpcom. Premda bi ovakav pristup potencijalno mogao biti uspješan, to još uvijek nije sasvim dokazano u praksi. Također, valja uzeti u obzir i činjenicu da je ovim istraživanjem upotrijebljen manji broj uzoraka, te bi povećanje broja uzoraka svakako dovelo i do veće kompleksnosti SSCP profila te dodatno otežalo interpretaciju rezultata. Iz navedenih razloga, za rutinsku uporabu ove metode u identifikaciji alela jelena u Hrvatskoj, potrebna je dodatna optimizacija, te unaprjeđenje.

5.ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju uspostavljen je referentni panel SSCP profila za analizu gena DRB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti jelena (*Cervus elaphus*). Na uzorku od četiri jedinke, odnosno 42 molekularnim kloniranjem dobivenih uzoraka, identificirano je sedam jedinstvenih alela. U svakoj od kloniranih jedinki pronađeno je bar njih tri, što potvrđuje činjenicu da je lokus DRB dupliciran (barem u tih jedinki).

Svaki od pojedinačnih alela, na referentnom panelu, pokazuje jedinstven SSCP profil. Ipak, difuzni izgled pojedinih vrpci, te njihovo preklapanje kod pojedinih uzoraka, ukazuju na potrebe dodatne optimizacije metode, te ispitivanja na većem broju uzoraka. Nadalje, kod dva od tri odabrana uzorka, analiza SSCP izravno umnoženih fragmenata alela potvrdila je rezultate dobivene molekularnim kloniranjem i sekvenciranjem.

Rezultati ovog diplomskog rada prvi su korak prema uporabi ove metode u svrhu rutinske procjene imunogenetičke varijabilnosti jelena u Hrvatskoj, u kombinaciji s prethodno provedenim PCR-om, ali je metodu potrebno dodatno unaprijediti.

6. LITERATURA

Abba M. C. i Golijow C. D. (2004). Herpes simplex virus genotyping: multiple optional PCR-based RFLP systems and a non-isotopic single-strand conformation polymorphism method. *Journal of Virological Methods* **118**(1), 73-76.

Altizer S., Harvell D., Friedle E. (2003). Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 589-596.

Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. (2010). Imunologija, sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.

Beebee T. i Rowe G. (2008). An Introduction to Molecular Ecology Second Edition. Oxford University Press, Oxford.

Bryja J., Galan M., Charbonnel N., Cosson J. F. (2005). Analysis of majos histocompatibility complex class II gene in water voles using capillary electrophoresis-single stranded conformation polymorphism. *Molecular Ecology Notes* **5**(1), 173-176.

Bujanić M. i Konjević D. (2015). MHC geni skupine II-raznolikost i primjena u istraživanju divljih životinja. *Hrvatski veterinarski vjesnik* **23**, 5-6.

Corbet G. B. (1978). The Mammals of the Palaearctic Region: a Taxonomic Review. British Museum (Natural History) and Cornell University Press, London, UK and Ithaca, NY, USA.

Dassanayake R. S. i Samaranayake L. P. (2003). Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in Candida. *Critical Reviews in Microbiology* **29**(1), 1-24.

Day M. J. i Schultz R. D. (2013): Veterinarska imunologija, načela i primjena. Medicinska naklada, Zagreb, str. 65-71.

De Bruin A., Ibelings B. W., Van Donk E. (2003). Molecular techniques in phytoplankton research: from allozyme electrophoresis to genomics: Recent Developments in Fundamental and Applied Plankton Research. *Hydrobiologia*. **491**, 47-63.

Eshaque B. i Dixon B. (2006). Technology platforms for molecular diagnosis of cystic fibrosis. *Biotechnology Adv*ances **24**(1), 86-93.

Fernandez de Mera I. G., Vicente J., Naranjo V., Fierro Y., Garde J. J., de la Fuente J., Gortazar C. (2009). Impact of major histocompatibility class II polymorphisms on Iberian red deer parasitism and life history traits. *Infection, Genetics and Evolution* **9**, 1232-1239.

Fernandez de Mera I. G., Vicente J., Perez de la Lastra J. M., Mangold A. J., Naranjo V., Fierro Y., de la Fuente J., Gortázar C. (2009). Reduced major histocompatibility complex class II polymorphism in a hunter-managed isolated Iberian red deer population. *Journal of Zoology* **277**, 157-150.

Finch C. E. i Rose M. R. (1995). Hormones and the physiological architecture of life history evolution. The *Quarterly Review of Biol*ogy **70**(1), 1–70.

Fracchia L., Dohrmann A. B., Martinotti M. G., Tebbe C. C. (2006). Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Microbiology and Biotechnol*ogy **71**(6), 942-952.

Gasser R. B. (1998). What's in that band? *International Journal for Parasitology* **28**(6), 989–996.

Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.

Hayashi K. (1991). PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA. *PCR Methods and Applications* **1**, 34-8.

Hedrick P. W., Kim T. J., Parker K. M. (2001). Parasite resistance and genetic variation in the endangered Gila topminnow. *Animal Conservation* **4**(2), 103–109.

Hongyo T., Buzard G. S., Calvert R. J., Weghorst C. M. (1993). "Cold SSCP": a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Research, **21***(16), 3637–3642.

IUCN (2016). Cervus elaphus. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=55997072

Janicki Z., Slavica A., Konjević, D., Severin K. (2007). Sisavci. Zoologija divljači. Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači, Sveučilište u Zagrebu Veterinarski fakultet, str. 24-29.

Kennedy L. J, Ryvar R., Gaskell R. M., Addie D., Willoughby K., Carter S., Thomskon W., Ollier W., Radford A. (2002). Sequence analysis of MHC DRB alleles in domestic cats from the United Kingdom. *Immunogenetics* **54,** 348–352.

Kindt J. T., Goldsby R. A., Osborne B. A. (2007). Kuby Immunology. 6th edition, W. H. Freeman and Company, New York

Klein J. (1986). Natural History of the Major Histocompatibility Complex. Wiley, New York.

Koubek P. , Zima J. (1999). Cervus elaphus. U: Mitchell-Jones A. J., Amori G., Bogdanowicz W., Kryštufek B., Reijnders P. J. H., Spitzenberger F., Stubbe M., Thissen J. B. M., Vohralík V., Zima J. (ur.) The Atlas of European Mammals. Academic Press, London, UK, str. 388-389.

Leung K. H. i Yip S. P. (2008). Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis. U: Walker J. M., Rapley R. (ur.) Molecular Biomethods Handbook Second Editon. Humana Press, Totowa, NY, str. 117-127.

Li B., Xu J., Ma J. (2013). Allelic characterization of the second DRB locus of major histocompatibility complex class II in Ussuri sika deer (Cervus nippon hortulorum): highlighting the trans-species evolution of DRB alleles within Cervidae. *Animal Cells and Systems* **17**, 269-276.

Lochmiller R. L. (1996). Immunocompetence and animal population regulation. *Oikos* **76**, 594–602.

Longeri M., Zanotti M., Damiani G. (2002). Recombinant DRB sequences produced by mismatch repair of heteroduplexes during cloning in Escherichia coli. *European Journal of Immunogenetics* **29**, 517–523.

Lovari S., Lorenzini R., Masseti M., Pereladova O., Carden R. F., Brook S. M. (2016). *Cervus elaphus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T55997072A22155320.http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T55997072A22155320.en

Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2004). 100 of the world's Worst Invasive Alien Species. A selection from the global invasive species database, str. 6

Mackiewicz V., Roque-Afonso A. M., Marchadier E., Nicand E., Fki-Berrajah L., Dussaix E. (2005). Rapid investigation of hepatitis A virus outbreak by single strand conformation polymorphism analysis. *Journal of Medical Virology* **76**(2), 271-278.

Marušić M. i Grčević D. (2010). Gavni kompleks molekula tkivne podudarnosti. U: Andreis I., Batinić D.,Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. (ur.) Imunologija, sedmo i dopunjeno izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, str. 98-113.

Mehers K. L. i Gillespie K. M. (2008). The genetic basisi for type 1 diabetes. *British Medical Bulletin* **88**(1), 115-129.

Mikko S. i Andersson L. (1995). Low major histocompatibility complex class II diversity in European and North American moose. *Genetics* **92**(10), 4259-4263.

Murray B., Michaud R., White B. (1999). Allelic and haplotype variation of major histocompatibility complex class II DRB1 and DQB loci in the St. Lawrence beluga (*Delphinapterus leucas*). *Molecular Ecol*ogy **8**, 1127-1193.

Nolasco G., Santos C., Petrovic N., Teixeira Santos M., Cortez I., Fonseca F., Boben J., Nazaré Pereira A. M., Sequeira O. (2006). Rupestris stem pitting associated virus isolates are composed by mixtures of genomic variants which share a highly conserved coat protein. *Archives of Virol*ogy **151**(1), 83-96.

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. (1989). Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strang conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**(8), 2766-2770.

Oto M., Suda W., Shinoyama H. (2006). 16S rRNA gene-based analysis of microbial community by whole-genome amplification and minigel-single-strand conformation polymorphism technique. *Journal of Bioscience and Bioeng*ineering **102**(5), 482-484.

Owen J. A., Punt J., Stranford S. A., Jones P. P. (2013). Kuby Immunology, 7th edition. W. H. Freemand and Company, New York.

Palacio A. i Duran-Vila N. (1999). Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for viroid characterisation. *Journal of Virological Methods* **77**(1), 27-36.

Pang K. L. i Mitchell J. I. (2005). Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. *Botanica Marina* **48**, 332-347.

Papp T., Schipper H., Kumar K., Schiffmann D., Zimmermann R. (2005). Mutational analysis of the BRAF gene in human congenital and dysplastic melanocytic naevi. *Melanoma Research* **15**(5), 401-407.

Penn D. J. i Potts, W. K. (1999). The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes identifiers. The *American Naturalist* **153**, 145–164.

Penn D.J. (2001). Major Histocompatibility Complex (MHC). Encyclopedia of life sciences. 10.1038/npg.els.0000919.

Penn D. J. i Ilmonen P. (2005). Major Histocompatibility Complex (MHC). Encyclopedia of life sciences. DOI: 10.1038/NPG.ELS.0003986

Piertney S. B. i Oliver M. K. (2006). The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* **96**(1), 7–21.

Quéméré E., Cosson J. F., Klein F., Charbonnel N., Gallan M., Aulagnier S., Gilot-Fromont E., Merlet J., Bonhomme M., Hewison A. J. M. (2015). Immunogenetic heterogeneity in a widespread ungulate: The European roe deer (*Capreolus capreolus*). Molecular ecology **24**, 3873-3887.

Rubio L., Ayllo´n M. A., Guerri J., Pappu H., Niblett C., Moreno P. (1996). Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Annals of Applied Biology* **129**(3), 479-489.

Saha R., Sood P. B., Sandhu M., Diwaker A., Upadhyaye S. (2015). Association of amelogenin with high caries experience in Indian childeren. J*ournal of Clinical Pediatric Dentistry* **39**(5), 458-461.

Schnell R. J., Olano C. T., Kuhn D. N. (2001). Detection of avocado sunblotch viroid variants using fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis* **22**(3), 427-432.

Schwieger F. i Tebbe C. C. (1998). A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiol*ogy **64**(12), 4870-4876.

Sigurdardottir S., Borsch C., Gustavsson K., Andersson L. (1991). Cloning and sequence analysis of DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. *Animal Genet*ics **22**(3), 199–209.

Sommer S. (2005). The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionaryecology and conservation. *Frontiers in Zoology* **2**(1), 16.

Sunnucks P., Wilson A. C. C., Beheregaray L. B., Zenger K.., French J., Taylor A. C. (2000). SSCP is not so difficult: The application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* **9**, 1699–1710.

Swarbrick P. A., Schwaiger F. W., Epplen J. T., Buchan G. S., Griffin J. F. T., Crawford A. M. (1995). Cloning and sequencing of expressed DRB genes of the red deer (*Cervus elaphus*) Mhc. *Immunogenetics* **42**(1), 1-9.

Šeruga Musić M., Krajačić M., Škorić D. (2007). Evaluation of SSCP analysis as a tool for detection of phytoplasma molecular variability. *Bulletin of Insectology* **60**, 245-246.

Teschauer W., Mussack T., Braun A., Waldner H., Fink E. (1996). Conditions for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis with broad applicability: a study on the effects of acrylamide, buffer and glycerol concentrations in SSCP analysis of exons of the p53 gene. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* **34**, 125-131.

Turturo C., Saldarelli P., Yafeng D., Digiaro M., Minafra A., Savino V., Martelli G. P. (2005). Genetic variability and population structure of Grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *Journal of General Virol*ogy **86**(1), 217-224.

Ullah Shah A., Mahjabeen I., Kayani, M.A. (2015). Genetic polymorphisms in cell regulatory genes CCND1 and CDK4 are associated with susceptibility to breast cancer. *Journal of Buon* **20**(4), 985-993.

Van Den Bussche R. A., Hoofer S. R., Lochmiller R. L. (1999). Characterization of Mhc DRB allelic diversity in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) provides insight into Mhc DRB allelic evolution within *Cervidae*. *Immunogenetics* **49**(5), 429-437

Von Schantz, T., Wittzell, H., Go Ransson, G., Grahn, M. & Persson, K. (1996). MHC genotype and male ornamentation: genetic evidence for the Hamilton-Zuk model. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B* **263**, 265–271.

Wilson D. E. i Ruff S. (1999). The Smithsonian Book of North American Mammals Smithsonian Institution Press, Washington, DC, USA.

Wilson D. E. i Mittermeier R. A. (2011). Handbook of the mammals of the world. Vol. 2. Hoofed mammals. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.

Xu W., Hong N., Zhang J. K., Ping-Wang G. (2006). Improving the sensitivity of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to study the variability of PLMVd. *Journal of Virological Methods* **135**, 276-80.

Xu H. B., Jiang R. H., Sha W., Li L., Xiao H. P. (2010). PCR-Single-Strand Conformational Polymorphism Method for Rapid Detection of Rifampin-Resistant Mycobacterium tuberculosis: Systematic Review and Meta Analysis. *Journal of Clinical Microbiol*ogy **48**(10), 3635-3640.

Yang W., Chou L., Hu J. (2007). Molecular characterization of major histocompatibility complex class II DQB and DRB genes in bottlenose dolphins (Tursiops truncatus and T. aduncus) from the western Pacific. *Zoological Studies* **46**(6), 664-679.

Yip S. P. (1999). Improvement of SSCP analysis by use of denaturants. *BioTechniques* **27**, 20-24.

http://www.bio-foto.com/displayimage-1120.html (Pristupljeno 18. prosinca 2017.)

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 17. rujna 1993. u Zagrebu. Školovanje sam započela 2000. godine u osnovnoj školi "Josip Zorić" u Dugom Selu. 2008. godine upisala sam II. opću gimnaziju u Križanićevoj ulici, u Zagrebu. Na preddiplomski studij biologije, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, upisala sam se 2012. godine, te njegovim završtekom 2015. godine stekla zvanje sveučilišna prvostupnica biologije. Iste godine upisala sam diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija. Tijekom studija osobito sam se zainteresirala za područje imunologije i mikrobiologije. Zahvaljujući obavljanju laboratorijske stručne prakse na Zavodu za animalnu fiziologiju, Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, i Klinici za infektivne bolesti "dr. Fran Mihaljević", dodatno sam unaprijedila svoje vještine potrebne za rad u laboratoriju. Također, sudjelovala sam na manifestaciji "Noć biologije".