Raznolikost gena DQA i DQB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u čagljeva (Canis aureus)

Svetličić, Ida

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:217:187581

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-30**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ida Svetličić

Raznolikost gena DQA i DQB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u čagljeva (*Canis aureus*)

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom mentorice doc.dr.sc. Ane Galov i neposrednog voditelja dr.sc. Haidi Arbanasić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr.sc. Ani Galov za izdvojeno vrijeme i trud. Veliko hvala i dr.sc. Haidi Arbanasić na strpljenju, savjetima i pomoći oko laboratorijskog rada, računalne analize i pisanja. Također, zahvaljujem i Gordani Žakman na tehničkoj pomoći.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

RAZNOLIKOST GENA DQA I DQB SKUPINE II GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI U ČAGLJEVA (*Canis aureus*)

Ida Svetličić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Geni unutar glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC) kodiraju receptore koji su odgovorni za preradu i prikazivanje antigena limfocitima T, čime se pokreće adaptivni imunosni odgovor organizma. Veća varijabilnost genskih lokusa MHC omogućuje prepoznavanje šireg spektra antigena, pa posljedično i bolju obranu od patogena. Varijabilnost lokusa MHC održava ravnotežna selekcija, koju karakterizira veći broj raznolikih alela u populaciji. Geni MHC pokazali su se kao dobar marker za proučavanje adaptivne evolucije vrsta i populacija. Čagalj (*Canis aureus*) široko je rasprostranjen ali jedan od dosad najmanje istraženih pripadnika porodice pasa (Canidae). U ovom istraživanju utvrdila sam i opisala alele na lokusima DLA-DQA i DQB gena MHC skupine II u uzorku od 27 čagljeva iz istočne Europe. Pronašla sam 2 alela po lokusu, a svi su poznati iz prethodnih istraživanja. Unatoč malom broju pronađenih alela, evolucijske udaljenosti ukazuju na veliku raznolikost među njima. Potvrdila sam djelovanje ravnotežne selekcije na održavanje varijabilnosti oba istražena lokusa koristeći omjer stopa nesinonimnih i sinonimnih mutacija na čitavom nukleotidnom slijedu, kao i na pojedinim kodonima.

42 stranice, 5 slika, 14 tablica, 42 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: MHC, *Canis aureus*, DQA, DQB, ravnotežna selekcija
Voditelj: doc. dr. sc. Ana Galov
Neposredni voditelj: dr. sc. Haidi Arbanasić
Ocjenitelji: Dr.sc. Ana Galov, doc.
Dr.sc. Mirta Tkalec, izv.prof.
Dr.sc. Ivančica Ternjej, izv.prof.

Rad je prihvaćen: 18.02.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

VARIABILITY OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS DQA AND DQB GENES IN THE GOLDEN JACKAL (*Canis aureus*)

Ida Svetličić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Genes within the major histocompatibility complex (MHC) encode receptors that are responsible for processing and presentation of antigens to T lymphocytes, which initiates the adaptive immune response of the organism. Increased variability of MHC gene loci enables identification of a broader range of antigens, and consequently a better defense against pathogens. The variability of the MHC loci is maintained by the balancing selection, which is characterized by a larger number of divergent alleles in the population. MHC genes proved to be a good marker for the study of adaptive evolution of the species and populations. Golden jackal (*Canis aureus*) is widespread, but so far one of the least studied members of the dog family (Canidae). In this research, I found and described the alleles of the DLA-DQA and DQB MHC class II loci in a sample of 27 jackals from Eastern Europe. I found two alleles per locus, all of which are known from previous research. Despite the small number of alleles found, evolutionary distances indicate a considerable diversity among them. I confirmed the role of balancing selection on maintaining variability of the investigated loci, using the ratio of synonymous and nonsynonymous mutations both on the entire nucleotide sequence, and the particular codons.

(42 pages, 5 figures, 14 tables, 42 references, the original language: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: MHC, *Canis aureus*, DRQB, DQA, balancing selection
Supervisor: Dr. sc. Ana Galov, Asst. Prof.
Assistant supervisor: Dr. sc. Haidi Arbanasić
Reviewers: Dr.sc. Ana Galov, Asst. Prof.
Dr.sc. Mirta Tkalec, Assoc. Prof
Dr.sc Ivančica Ternjej, Assoc. Prof.

Thesis accepted : 18.02. 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

1.1 Čagalj.....1

1.2 Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti.....4

1.3 Važnost istraživanja imunogenetičke varijabilnosti (gena MHC)..... 7

1.3.1. Dosadašnja istraživanja lokusa MHC na porodici Canidae.....7

1.3.2. Dosadašnja istraživanja genetičke raznolikosti kod čagljeva.....9

1.4 Cilj diplomskog rada.....11

2. MATERIJALI I METODE.....12

2.1 Uzorci tkiva čaglja.....12

2.2 Izolacija DNA.....12

2.3 Lančana reakcija polimerazom.....13

2.4 Elektroforeza u agaroznom gelu.....15

2.5 Sekvenciranje.....16

2.6. Analiza nukleotidnih slijedova.....16

2.6.1 BioEdit.....16

2.6.2 SeqScape.....16

2.6.3 MEGA.....17

2.6.4 OmegaMap.....18

2.6.5 FSTAT.....19

3. REZULTATI.....20

3.1 Lokus DQA.....20

3.2 Lokus DQB 23

3.3 Evolucijska udaljenost.....25

3.4 Test pozitivne selekcije.....26

3.4.1. Test pozitivne selekcije na čitavom lokusu.....26

3.4.2. Test pozitivne selekcije na pojedinačnim kodonima.....27

3.5. Usporedba bogatstva alela u programu FSTAT.....30

4. RASPRAVA.....31

5. ZAKLJUČAK.....36

6. LITERATURA.....37

7. ŽIVOTOPIS.....42

POPIS KRATICA

cm - centimetar

dN - prosječna stopa nesinonimnih nukleotidnih supstitucija

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

dS - prosječna stopa sinonimnih nukleotidnih supstitucija

g - gram

HLA - glavni sustav tkivne podudarnosti u čovjeka (eng. human leukocyte antigens)

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

kb - kilobaza

kg - kilogram

L - litra

LB - hranjivi medij za rast bakterija (eng. lysogeny broth)

M - molarna

mA - miliamper

mg - milligram

MHC - glavni sustav tkivne podudarnosti (eng. major histocompatibility complex)

ml - mililitar

mM - milimolarna

ng - nanogram

pb - parovi baza (kod DNA molekule)

PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. polymeraze chain reaction)

UV - ultraljubičasta (eng. ultraviolet)

V - volt

µl - mikrolitar

1. UVOD

1.1. Čagalj (*Canis aureus)*

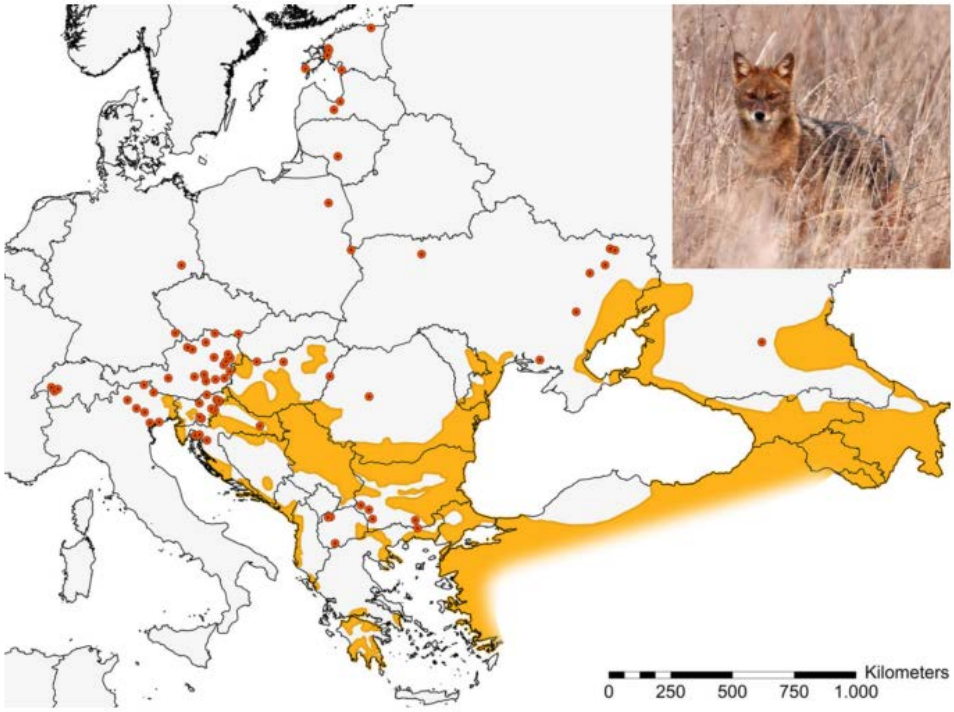
Čagalj *Canis aureus* (Linnaeus 1758) je zvijer iz porodice pasa (lat. Canidae), a genetička istraživanja su pokazala da je filogenijski čagalj najsrodniji vuku (*Canis lupus*) i kojotu (*Canis latrans*) (Wayne i Ostrander, 2007). Krzno čaglja je sivožute, crvenkaste ili zlatne boje s bijelim (posebice na donjoj strani tijela) i crnim dijelovima na leđima, gornjoj strani vrata i bokova. Izgledom podsjeća na vuka, lisicu i psa (Slika 1). Viši je od lisice, no slabije je građe nego vuk. Visina mu je oko 50 cm, dužina uglavnom 90-100 cm uz rep duljine 25-30 cm (Bošković, 2013). Težina i gustoća krzna ovise o dostupnosti hrane i podneblju. Čagljevi iz sjevernijih područja imaju gušće krzno od onih iz južnih, mediteranskih predjela.



Slika 1. Čagalj (*Canis aureus)* (preuzeto s www.spatiawildlife.com)

Stanište ove vrste pokriva južni dio sjeverne hemisfere, uključujući sjevernu Afriku, jugoistočnu i sjeveroistočnu Europu (Slika 2), Bliski istok, te središnju i južnu Aziju. Prisutni su u raznolikim klimatskim zonama; od pustinja, polupustinjskih područja, savana, močvara, šuma, šikara, ljudskih naselja i područja intenzivne kultivacije (Lanszki i sur.,2010).

Paleontološki dokazi ukazuju na to da su čagljevi kolonizirali Europu u ranom holocenu (Sommer i Benecke, 2005). Jedini zapisi o čagljevima u Europi koji datiraju otprije 16. stoljeća su oni o populaciji na jadranskoj obali Hrvatske (Malez, 1984) i mediteranskoj i Crnomorskoj regiji Grčke i Bugarske (Sommer i Benecke, 2005). Istraživanja (Arnold i sur.,2012) utvrđuju naglo širenje ove vrste u proteklih nekoliko desetljeća. Brojnost im se povećava na područje Bugarske, Rumunjske, Srbije i središnje Europe (Mađarska, Češka). Bilježi se i pojava čagljeva na mnogo geografskih lokacija na kojima ih prije nije bilo, sjeverno čak do Estonije. Širenju populacije čaglja prethodio je nagli pad populacije 1960.-ih godina uglavnom zbog fragmentacije staništa i namjernog istrebljenja.



Slika 2. Trenutna rasprostranjenost čaglja u Europi. Žutom bojom označene su lokacije na kojima je vrsta trajno prisutna, a crvenim točkama individualno pojavljivanje. (Preuzeto iz Trouwborst i sur. 2015)

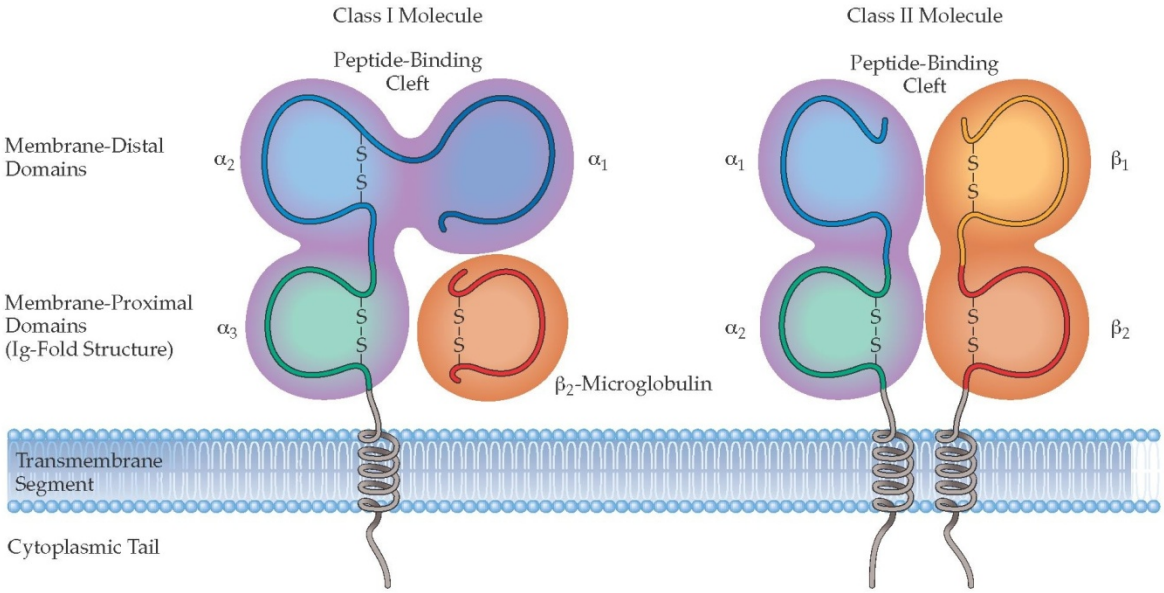
Zbog prehrane su čagljevi izrazito vezani za ljudsku populaciju, ponajviše u predjelima ljudskih naselja. Jedan od razloga rasta populacije ovih zvijeri je i povećanje ljudskog životnog standarda – otvorena smetlišta i nepropisno odlaganje otpada omogućuju čagljevima uvjete za nagli oporavak populacije. U današnje vrijeme je značajno smanjenje brojnosti čagljeva zabilježeno samo u Grčkoj, gdje su postali najrjeđa vrsta porodice Canidae (Lanszki i sur. 2010). Prirodni predator im je vuk (*Canis lupus)*, a u njegovom odsustvu često predstavljaju dominantnog karnivora u ekološkom sustavu.

Čagalj je oportunistička vrsta i generalist u odnosu na prehranu. Na sastav prehrane veliki utjecaj ima tip staništa, pa je razlika između vrste plijena na Mediteranu i sjevernijim područjima značajna. Primjećeno je da su vrlo fleksibilni i u interspecijalnim kao i u intraspecijalnim socijalnim interakcijama vezanim uz prehranu (Macdonald, 1979). Čagljevi su aktivni u lovu uglavnom u sumrak i po noći i to u čoporu, paru, te ponekad i pojedinačno (Bošković, 2013). Glavni izvor hrane predstavljaju im mali sisavci (posebno glodavci), divlji papkari (vepar) i stoka. U sezoni lova na divljač često se hrane animalnim otpadom, no i inače su vrlo često strvinari. Napadaju i domaće životinje, ponajviše perad i preživače. To je razlog što ih ljudi nerijetko istrebljuju, smatrajući ih štetočinama. Ponekad jedu i ptice, te neke beskralješnjake kao što su ličinke kukaca i gujavice. U uvjetima nedostatka animalne prehrane, čagljevi će se bez poteškoća orjentirati na biljke ovisno o flori staništa (bobice i drugo voće, sjemenje, kukuruz) (Bošković, 2013).

S obzirom na naglo širenje teritorija čagljeva, postavlja se pitanje jesu li oni invazivna vrsta na novim staništima koje okupiraju, te hoće li narušiti ekosustav tih područja (Trouworst i sur. 2015). Također je upitan ljudski čimbenik, odnosno hoće li ih pojedine države nastaviti istrebljivati ili će ih staviti pod određeni stupanj zaštite. Trenutno su prema listi IUCN-a (eng. International Union for Conservation of Nature, Međunarodni savez za zaštitu prirode) na popisu najmanje ugroženih životinja. Kako bi se dobio odgovor na ranije postavljena pitanja, potrebno je istražiti mehanizme adaptacije zlatnog čaglja, te ustvrditi kako na ovu vrstu djeluje prirodna selekcija. Pokazalo se da jedan od najboljih alata za istraživanje adaptacije i prirodne selekcije predstavljaju geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (eng. Major histocompatibility complex, MHC) (Bernatchez i Landry, 2003).

1.2. Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti

Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC) je sustav membranskih glikoproteinskih receptora izraženih na stanicama kralježnjaka. Ovaj sustav kodiran je genima koji čine glavni kompleks gena tkivne podudarnosti. Kompleks gena MHC sastoji se od niza gena, a produkti tih gena nalaze se u različitim količinama na različitim stanicama organizma (Andreis i sur, 2010). Geni, kao i molekule MHC dijele se na tri funkcionalne skupine: I, II i III. Molekule skupine I i II (Slika 3) imaju središnju imunoregulacijsku ulogu jer omogućavaju preradbu i prikazivanje antigena limfocitima T. Limfocit T prepoznaje antigensku molekulu spregnuto, tako da jednim dijelom prepoznaje antigen, a drugim molekulu MHC domaćina. Skupina MHC III ima ulogu u imunoreakciji ali nije strukturno vezana za skupine I i II, te nema ulogu u prikazivanju antigena.

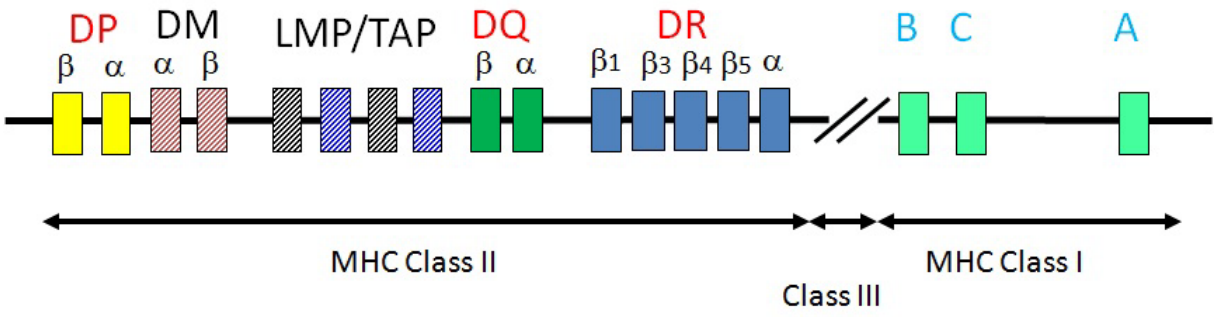


Slika 3. Struktura MHC molekula skupine I i II (Preuzeto s ww.microbiologybook.org)

Molekule MHC skupine I nalaze se na površini svih tjelesnih stanica s jezgrom, te imaju ključnu ulogu u obrani organizma od virusa i ostalih unutarstaničnih patogena. Vezanjem endogenih peptida u citoplazmi, MHC skupine I omogućava njihovu prezentaciju i prepoznavanje od strane limfocita T. Funkcionalni oblik molekule MHC skupine I je heterotrimer sastavljen od α-lanca, β2-mikroglobulina i vezanog antigenskog ulomka. Dijelovi molekule su: citoplazmatski dio, transmembranski dio, dio sličan imunoglobulinu i dio α lanca koji veže peptid (Andreis i sur, 2010) (Slika 3).

Molekule MHC skupine II imaju puno ograničeniji obrazac ekspresije jer se nalaze samo na stanicama imunološkog sustava koje prikazuju antigen (limfociti B i makrofagi). Njihova uloga je prezentacija ekstracelularnih peptida pomagačkim T-limfocitima, pa na taj način najbolje služe u obrani od bakterija i parazita. Ove molekule također su građene od polimorfnih α i β lanaca koji su međusobno nekovalentno vezani. Izvanstanični dijelovi lanca α i β mogu se podijeliti u funkcionalne podjedinice (domene) α1, α2, β1 i β2. . Dio receptora koji veže antigen, za razliku od molekula MHC skupine I, ovdje zajedno tvore α i β lanci sa svojim α1 i β1 domenama (slika 3). Preostale funkcionalne podjedinice (α2 i β2) imaju ulogu u nekovalentnom vezanju lanaca α i β (Andreis i sur, 2010).

Geni unutar sustava MHC (Slika 4) koji su zaduženi za kodiranje dijela receptora koji prepoznaje i veže antigene predstavljaju najpolimorfnije lokuse u genima kralježnjaka. Ti lokusi pokazuju veliku varijabilnost ne samo u broju alela, već i u opsegu razlika između pojedinih nukleotidnih sekvenca tih alela. Velika polimorfnost ovih lokusa bitna je zbog velikog broja antigena koji moraju biti pepoznati kako bi se organizam obranio od patogena, pa je stoga varijabilnost tih lokusa u izravnoj korelaciji s uspješnim preživljavanjem jedinke. Ostali lokusi MHC pokazuju relativnu konzerviranost među pojedinim jedinkama i vrstama.



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz HLA (eng. Human Leukocyte Antigen) lokusa (preuzeto s periobasics.com)

MHC molekule imaju ulogu i razmnožavanju, odnosno seksualnoj selekciji. Smatra se da se mehanizam kojim to postižu temelji na ispuštanju kompleksa MHC molekule i peptida u izvanstanični okoliš pa posljedično u ekstracelularne tekućine kao što su urin i drugi sekreti. Osjetom njuha, odnosno vomeronazalnim organom, sisavci mogu detektirati feromone i druge kemijske signale koji prenose informacije o spolu i drugim individualnostima, kao što je

genotip MHC. S obzirom da je za reproduktivni uspjeh ključno zadržati varijabilnost (na razini MHC i drugih gena), te izbjegavati razmnožavanje među bliskim rodom, na ranije opisan način sisavci mogu izabrati odgovarajućeg spolnog partera (Sommer, 2005).

Smatra se da je ključni faktor u održavanju varijabilnosti lokusa MHC ravnotežna selekcija (eng. balancing selection). Ovu vrstu selekcije karakterizira održavanje velikog broja alela u populaciji i to kroz dugi vremenski period (Sommer, 2005). Djelovanjem genetičkog drifta, fiksacije alela, razmnožavanjem između srodnika ili smanjenjem toka gena zbog geografske dislociranosti između populacija, kroz duži vremenski period obično dolazi do općenitog smanjenja genetičke raznolikosti. Ovaj fenomen najteže pogađa male i izolirane populacije. Stoga je zadržavanje genetičke varijabilnosti, posebice na lokusima MHC veliki izazov za populaciju. Predložena su dva glavna mehanizma ravnotežne selekcije kojima se varijabilnost gena MHC uspostavlja i održava: "hipoteza heterozigotne prednosti" i "hipoteza selekcije ovisne o negativnoj frekvenciji" (Sommer, 2005).

Termin heterozigotna prednost u kontekstu gena MHC označava nadmoć genotipova s većim brojem alela u obrani od patogena. Pretpostavka je da veći broj alela znači mogućnost obrane od šireg spektra patogena zbog većeg broja različitih MHC molekula 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 frekvenciji pretpostavlja usmjerenost selekcije na održavanje rijetkih alela u populaciji, odnosno prednost alela koji imaju smanjenu frekvenciju. Obično su u većoj frekvenciji prisutni aleli koji posreduju u vezanju i predočavanju uobičajenih patogena (tipičnih za određeni prostor i vremenski priod). 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 frekvenciji posreduje u obrani od novog patogena. MHC aleli koji su otporniji na patogene omogućit će veći fitnes jediniki 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).

1.3. Važnost istraživanja imunogenetičke varijabilnosti (gena MHC)

Brojni dokazi upućuju na to da genetičku raznolikost treba proučavati na adaptivnim lokusima kao što su geni MHC. Neutralni markeri kao što su sekvence kontrolne regije mitohondrija, mikrosateliti i pojedinačni nukleotidni polimorfizmi ne mogu objasniti evolucijski bitne i adaptivne procese između i unutar populacija. Geni MHC sustava utječu na brojne biološke osobine, kao što je imunološko prepoznavanje, podložnost infekcijama i autoimunim bolestima, seksualna selekcija i ishod trudnoće. Istraživanja su najčešće usredotočena na 3 lokusa MHC skupine II: DLA-DQA1, DQB1 i DRB1. Egzoni 2 navedenih lokusa kodiraju vršni receptor za vezanje antigena, koji predstavlja najpolimorfniji dio gena. Pogodni su za imunogenetička istraživanja i jer su lokusi u fizički čvrstoj vezi, te se nasljeđuju kao haplotip (Marsden i sur., 2009). Imunogenetička istraživanja na genima MHC najčešće su fokusirana na čovjeka i eksperimentalne organizme, a u malom broju i tek odnedavno na divlje populacije.

1.3.1. Dosadašnja istraživanja lokusa MHC na porodici Canidae

Porodica Canidae kao predmet istraživanja gentičke varijabilnosti adaptivnih lokusa vrlo je zanimljiva jer unutar porodice postoje divlje vrste (vukovi, kojoti, čagljevi) ali i domestificirane (domaći pas). Najveći opseg istraživanja usredotočen je na domaćeg psa (*Canis lupus familiaris*). DLA (engl. dog leukocyte antigen) vrlo je dobro opisan i pronađen je velik broj alela (Kennedy i sur, 2002a). Visoka varijabilnost kod pasa objašnjena je velikim brojem pasmina koje su stvorene umjetnom selekcijom, odnosno ljudskim faktorom (Seddon i Ellegren, 2002). Unutar pasmina zabilježena je smanjena varijabilnost. Nije sigurno kad se točno dogodila domestifikacija pasa; prema procjenama temeljenim na molekularnim istraživanjima najranije prije 135 000 godina, iako najstariji fosilni dokazi datiraju otprije 14 000 godina (Seddon i Ellegren, 2002). Vrlo dobro istražena je raznolikost adaptivnih lokusa kod vuka. Populacije vuka *C. lupus* (od kojeg podrijetlo vuku svi psi) u prošlosti su bile vrlo velike i rasprostranjene po čitavom holartkisu, te su vrlo vjerojatno imale velik broj divergentnih alela na lokusi MHCma jer je to karakteristika velikih populacija (Seddon i Ellegren, 2004).

U svom istraživanju na velikim populacijama vukova u istočnoj Europi Seddon i Ellegren (2002) utvrdili su veći broj divergentnih alela na lokusima MHC (9 na DQA, 10 na

DQB i 17 na DRB lokusu). Zaključili su da je velik broj alela posljedica postojanja velikih populacija u prošlosti, iako su današnje populacije vukova iskusile biogeografsku podjelu, fragmentaciju, te gubitak staništa zbog ljudskog utjecaja. U istraživanju je primjećeno da psi i vukovi dijele mnogo alela. Svi aleli koje dijele psi i sivi vukovi Seddon i Ellegren pronašli su na lokusu DQA, dok na lokusima DQB i DRB nisu pronašli zajedničke alele.

Seddon i Ellegren (2004) istražili su i varijabilnost lokusa MHC kod izrazito male populacije skandinavskih vukova. U skandinavskoj populaciji pronašli su manji broj alela (2 po lokusu), ali nukleotidna varijabilnost bila je visoka, te nisu odbacili djelovanje balansirajuće selekcije.

Varijabilnost adaptivnih lokusa izrazito ugrožene populacije meksičkog vuka *C. lupus bailey* istražili su Hedrick i sur. (2000). Očekivana je smanjena razina genetičke varijabilnosti zbog male populacije kojoj prijeti izumiranje. Ipak, u navedenom istraživanju pronađeno je čak 5 alela lokusa DRB na vrlo malom uzorku od 7 jedinki.

Galaverni i sur. (2013) također su utvrdili visoku varijabilnost lokusa MHC kod male populacije - talijanske populacije vukova koja je dugo bila u izolaciji. Istražili su varijabilnost DLA-DQA, DQB i DRB, te su pronašli 6-9 alela po lokusu na 94 jedinke, te visoki omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija. Najsnažnije djelovanje prirodne selekcije odredili su na lokusu DQB.

Kennedy i sur (2011) istražili su polimorfnost lokusa MHC kod najrijeđe vrste iz porodice Canidae - etiopskog vuka (*Canis simensis*). Lokusi su pokazivali diverzitet, pronađeno je ukupno 9 alela na tri lokusa, ali aminokiselinska razlika među alelima bila je vrlo mala. Ipak, zaključili su da je diverzitet MHC dovoljno velik da zasad osigura opstanak vrste.

Hedrick i sur. (2004) utvrdili su razinu varijabilnosti DRB lokusa kod crvenih vukova *Canis rufus*. Cilj istraživanja bili je i utvrđivanje filogenetskog porijekla *C. rufus*, odnosno njegove veze sa sivim vukom i kojotom. Pronašli su 4 vrlo divergentna alela na uzorku od 48 jedinki, visoku stopu heterozignotnosti, te su potvrdili prisutnost balansirajuće selekcije. Rezultati istraživanja na DRB lokusu smjestili su crvenog vuka filogenijski bliže kojotu nego vuku. Od pronađena 4 alela kod crvenih vukova, samo dijele s vukom, a čak 3 s kojotom.

Arbanasić i sur (2013) ispitali su raznolikost alela DLA-DQA, DQB i DRB, te su odredili haplotipove za navedene lokuse u populaciji hrvatskih vukova. Istražili su i djelovanje selekcije na analiziranim lokusima. Broj jedinstvenih nukleotidnih slijedova bio je 13 na DRB, 7 na DQA i 11 na lokusu DQB. Uzorak se sastojao od 75 jedinki. Odredili su 13 haplotipova za pronađene alele. Izvijestili su da DRB lokus pokazuje najveću varijabilnost sa najvećim brojem varijabilnih mjesta i visokim vrijednostima aminokiselinskih udaljenosti, dok je DQA lokus pokazivao najmanju varijabilnost i najmanje vrijednosti evolucijskih udaljenosti.

Jedino istraživanje koje je zabilježilo značajno smanjenu varijabilnost lokusa MHC kod porodice Canidae, je ono na afričkom divljem psu (*Lycaon pictus*) (Marsden i sur., 2009). Pronađeni broj alela bio je vrlo malen čak i s obzirom na to da je afrički pas ugrožena vrsta. Niska varijabilnost bila je posebno izražena na DQA i DQB lokusu, gdje su pronađena samo 1-2 alela. DRB lokus pokazivao je polimorfnost sa 17 pronađenih alela, ali aminokiselinske udaljenosti bile su znatno manje nego kod ostalih dosad istraženih pripadnika porodice Canidae.

1.3.2. Dosadašnja istraživanja genetičke raznolikosti kod čagljeva

Čagalj je jedna od najmanje istraženih zvijeri. Istraživanja genetičke strukture europske populacije zasad su malobrojna, a tek odnedavno je čagalj uopće postao predmet ozbiljnijih radova.

Zachos i sur. (2009) pronašli su vrlo nisku genetičku varijabilnost kod 121 jedinke čagljeva iz Srbije, koristeći autosomalne mikrosatelitne markere (STR, engl. short tandem repeat). Nasuprot tomu, Cohen i sur. (2013) utvrdili su visoku varijabilnost analizom 88 jedinki iz izraelske populacije. Iako je populacija bila gotovo istrebljena u 20-om stoljeću, nisu našli dokaze koji bi potvrdili djelovanje efekta uskog grla u prošlosti.

Fabbri i sur. (2014) istražili su genetičku strukturu i ekspanziju čagljeva u Hrvatskoj (Dalmacija i Slavonija), sjevernim talijanskim Alpama, Bugarskoj i Srbiji. Koristili su neutralne markere: hipervarijabilnu mitohondrijsku DNA kontrolnu regiju i STR. Dokumentirali su monomorfnost mitohondrijske DNA nakon pronalaska samo jednog haplotipa. Utvrdili su da STR lokusi pokazuju varijabilnost od 2-14 alela po lokusu. Primjetili su da se dalmatinska populacija genetički najviše razlikuje od ostalih. Zaključili su također da

talijanska populacija čagljeva ima mješano porijeklo iz populacija Dalmacije i Slavonije, što talijanskim čagljevima može osigurati genetičku varijabilnost i pridonjeti daljnjem rastu populacije.

Rutkowski i sur. (2015) analizirali su mitohondrijsku DNA i mikrosatelitne markere na uzorcima čagljeva iz Rumunjske, Hrvatske, Slovenije, Ukrajine, Srbije, Mađarske, Grčke, Baltičkih zemalja i s Kavkaza. Dokumentirali su nešto višu genetičku varijabilnost nego u prethodnim istraživanjima nakon pronalaska 4 mitohondrijska haplotipa. Pokušali su dobiti i uvid u genetičko porijeklo europske populacije. Zaključili su da dalmatinska i grčka populacija genetički značajno odstupaju od ostatka europske populacije, što je vjerojatno posljedica višestoljetne izolacije ovih starih Mediteranskih populacija. Rezultati istraživanja sugeriraju da postoji neprekidni protok gena između populacija jugoistočne Europe i Kavkaza, te da obje populacije pridonose novonastaloj Baltičkoj. Autori navode i da se nove populacije čagljeva mogu osnivati na velikoj geografskoj udaljenosti od matičnih populacija (engl. Long distance dispersal), zbog čega ih se na novim staništima ne bi trebalo tretirati kao invazivne vrste. Predlažu legalnu zaštitu čaglja u svim zemljama članicama Europske Unije.

Zbog nedavnog širenja čagljeva, kao i zbog njihove povezanosti s ljudskim naseljima putem prehrane, dolazi do hibridizacije s domaćim psima. Inače su među vrstama porodice Canidae često zabilježene hibridizacije (VonHoldt i sur., 2011; Stronen i sur., 2012; Randi i sur.,2014). Slučajevi hibridizacije pod antropogenim utjecajem mogu predstavljati opasnost za ugrožene vrste (Gottelli sur.,1994) te mogu promijeniti genetičku strukturu divljih populacija (VonHoldt i sur., 2011).

Galov i sur. (2015) potvrdili su postojanje fertilnih hibrida domaćih pasa i čagljeva. U istraživanju su koristili biparentalne (autosomalni mikrosatelitni lokusi, trolokusni DRB/DQA/DQB haplotip) i uniparentalne genetičke markere (mitohondrijska kontrolna regija i *Zfy* intron). Identificirali su 3 hibrida od kojih je svaki imao jedan pseći i jedan čagljevski MHC trolokusni haplotip (DRB1*00901/DQA1*00402/DQB1*02305). Analizom 50 jedinki čaglja koji su predstavljali referentne uzorke pronašli su 4 čagljevska haplotipa. Preporučili su MHC kao molekularne markere za utvrđivanje hibridizacije, prilikom čega je potrebno uzeti u obzir sva 3 lokusa, odnosno trolokusne haplotipove. Pojedinačni aleli mogu biti zajednički kod srodnih vrsta (transspecijski polimorfizam), dok su haplotipovi zbog svog mlađeg evolucijskog postanka specifični za vrstu (Garrigan i Hedrick, 2003) .

1.4. Cilj diplomskog rada

Cilj ovog istraživanja je odrediti i opisati prisutne alele i stupanj divergentnosti među alelima drugog egzona gena DLA-DQA i DQB u uzorku čagljeva iz istočne Europe, te njihovu distribuciju po geografskim lokacijama uzoraka. Usporedit će se varijabilnost lokusa MHC s drugim vrstama porodice Canidae. Također je cilj istraživanja i utvrditi djelovanje selekcije u evolucijskoj povijesti na navedne lokuse. Rezultati ovog istraživanja će pridonijeti poznavanju adaptivne raznolikosti čagljeva, ali i općenito divljih vrsta iz porodice pasa (Canidae).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorci tkiva čagljeva

Istraživanje sam započela s 27 uzoraka čaglja iz populacija Litve (9), Estonije (6), Gruzije (6) i Rumunjske (6). Korištene oznake za jedinke su broj i populacija iz koje dolaze (cL – Litva, cE – Estonija, cG – Gruzija, cR – Rumunjska). Uzorke sam pribavila uz pomoć dr. sc. Urmasa Saarme, Department of Zoology University of Tartu, Tartu, Estonija. Uglavnom se radilo o uzorcima mišićnog tkiva, iako su uzorci gruzijske populacije bili i epitelni, te su sadržavali kožu i dlake. Promjer dobivenih uzoraka bio je otprilike 5mm, a pohranjeni su u 96%-tnom etanolu.

2.2. Izolacija DNA

Izolaciju DNA provodila sam prema protokolu komercijalno dostupnog paketa "Wizard Genomic DNA Purification Kit" čiji je proizvođač Promega. U tubice volumena 1,5 mL dodala sam 300 μL otopine "Nuclei Lysis Solution". Zatim sam skalpelom prepolovila uzorak i usitnila ga na satnom stakalcu, pa prebacila u tubicu. Tubicu koja sadrži usitnjeni uzorak i Nuclei Lysis Solution potom sam vorteksirala i centrifugirala 10 sekundi. U tubicu sam nakon toga dodala 9 μL proteinaze K koncentracije 20 mg/mL. Sljedeći korak bila je inkubacija preko noći na 55°C.

Nakon inkubacije ostavila sam tubicu na sobnoj temperaturi, a potom ju centrifugirala 10 sekundi. Slijedio je dodatak 100 μL "Protein Precipitation Solution" i vorteksiranje u trajanju od 20 sekundi. Tubicu sam potom stavila na 5 minuta u led. Kako bi se DNA i proteini razdvojili, tubicu sam nakon toga centrifugirala 5 minuta. U talogu su tada bili proteini, dok se DNA nalazila u supernatantu. Supernatant sam prebacila u novu tubicu od 1,5 mL u koju sam prethodno dodala 300 μL etanola te sam pažljivo promiješala sadržaj okretanjem tubice. Tubicu sam ponovno centrifugirala 1 min i dekantirala supernatant jer se DNA tada nalazila u talogu. U tubicu s talogom dodala sam 300μL 70 % etanola i pažljivo promiješala sadržaj okretanjem tubice. Uslijedilo je centrifugiranje od 1 min i odstranjivanje supernatanta. Tubicu s talogom u kojem je dehidrirana DNA ostavila sam preokrenutu na filter papiru na 15 min kako bi se osušila na zraku. Posljednji korak bio je dodavanje 50 μL

"DNA Rehydration Solution" i inkubacija na 4°C. Postupak sam ponovila za preostalih 29 uzoraka. DNA je čuvana u ledištu.

2.3. Lančana reakcija polimerazom

Željene odsječke DNA (egzon 2) umnožila sam lančanom reakcijom polimeraze (PCR – eng. Polymerase Chain Reaction). Volumen reakcijske smjese bio je 40 µL dok sam za optimizaciju koristila manji volumen (8–12 µL). Komercijalni paketi koji sam koristila bili su "HotStarTaq DNA Polymerase" (Qiagen) i "HotStarTaq PLUS DNA Polymerase" (Qiagen). Komercijalni paket sadržavao je smjesu "Taq PCR mastermix" (Qiagen PCR pufer, dNTP i Taq DNA polimeraza) i vodu bez RNAze, a PLUS paket uključivao je i "CoralLoad" boju koju sam koristila kod optimizacijskog PCR-a malog volumena.

"Taq PCR mastermix" u reakcijskoj smjesi nalazio se u polovici volumena, odnosno bio je 1x koncentriran. Koncentracija radnih otopina početnica bila je 5 µM, a njihova konačna koncentracija u reakcijskoj smjesi iznosila je 0,2 µM. Prvotno sam stavljala po 4 µL DNA, ali primjetila sam da su bolji rezultati, odnosno, vidljivost tokom vizualizacije elektroforeze, ako stavljam po 5 µL DNA. Voda bez RNAze je dodana do konačnog volumena od 40 µL.

Početnice sam prilagođavala rezultatima elektroforeze. U početku sam sve uzorke pokušala umnožiti uz pomoć početnica koje su dizajnirali Wagner i sur. (1996) za pse. Radi se o početnicama DQAIn1 (TAAGGTTCTTTTCTCCCTCT) i DQAIn2 (GGACAGATTCAGTGAAGAGA) za egzon II lokusa DLA-DQA, te o DQB1BT7 (CTCACTGGCCCGGCTGTCTC) i DQBR3 (ACCTGGGTGGGGAGCCCG) za egzon 2 lokusa DQB. Za uzorke koji nisu uspješno umnoženi korištenjem ovih početnica, upotrijebila sam početnice koje smo konstruirali na temelju intronskih nukleotidnih slijedova koji su dostupni u genskoj bazi Ensembl (www.ensembl.org):

za lokus DQA

GJDQAF1 (GCCTAAAGACTGTGCCAAGGA)

GJDQAR1 (AGTTTTCAGATGGGGGAGGA)

GJDQAF2 (TGCCCACAGTTTGTTCTGTC)

GJDQAR2 (TCAAGGAACATGGTATGGGAGT)

za lokus DQB

GJDQBF1 (CCTTCCCTGGATGAAGGCAG)

GJDQBR1 (CTGCTGAGAAGGCAGAGGG)

GJDQBF2 (GAGGCCTTCAGGTTTCTCGG)

GJDQBR2 (GGGCATGAGCCTCGGAAG)

Trakice s pojedinim reakcijskim smjesama ukupnog volumena 40 µL poslagala sam u uređaj za PCR GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosytsem) koji je umnožio ciljane dijelove DNA – egozon 2 lokusa DLA-DQA i DLA-DQB. Temperaturni profil preuzeli smo iz literature (Kennedy i sur, 2007). Koristili smo *touchdown* protokol - temperatura prijanjanja se postepeno spuštala za svaki sljedeći ciklus:

Početna temperatura potrebna za aktivaciju polimeraze bila je 95℃ i taj korak trajao je 15 min. Nakon toga je slijedilo 14 *touchdown* ciklusa koji su se sastojali od 30s na 95℃ za razdvajanja komplementarnih DNA lanaca, prijanjanje početnica u trajanju od 1 min s početnim temperaturama 54℃ za DQA lokus i 73℃ za DQB lokus pri čemu se sa svakim ciklusom temperatura spuštala za 0,5℃ i sinteza komplementarnog lanca na 72℃ u trajanju od 1 min. Slijedilo je 20 ciklusa koji su sadržavali 30 s na 95℃, zatim 47℃ za DQA lokus i 66℃ za DQB lokus u trajanju od 1 min. Završno produljivanje nukleotidnih lanaca trajalo je 10 min na 72℃.

Nakon umnažanja uzorci su ohlađeni na 4° C, te sam ih potom spremila u hladnjak ili odmah pripremila za elektroforezu.

2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforezom sam provjerila uspješnost DNA izolacije i PCR reakcija. Agarozni gel pripremila sam otapanjem 1g agaroze u 50mL PBE pufera. Nakon što se otopina malo ohladila, dodala sam 50 µL Invitrogen Syber Safe DNA gel boje. Otopinu sam izlila u kadicu za elektroforezu i umetnula češalj za jažice, te pričekala 20 minuta kako bi se gel stvrdnuo, odnosno agaroza polimerizirala. Uređaj za elektroforezu napunila sam PBE puferom i u njega smjestila stvrdnuti gel.

Uzorke sam prvotno nanosila na parafilm a tek onda u jažice; pomiješala sam 3 µL pufera za nanošenje (eng. Gel loading buffer) i 3 µL PCR produkta. U jažice sam unosila oko 4,5 µL navedene smjese.

Trajanje elektroforeze iznosilo je 20 min pod naponom od 100V, jakosti struje od 400 mA na sobnoj temperaturi. Potom sam pod UV svjetlom provjerila rezultate.

2.6. Sekvenciranje

Sekvenciranje sam obavila u Macrogen servisu (www.macrogen.com), gdje su uzorci prethodno pročišćeni. Uzorci su slani u Europsku podružnicu Macrogen-a koja se nalazi u Amsterdamu. Sekvenciranje je izvršeno u reverznom smjeru, ali neke uzorke bilo je potrebno sekvencirati u oba smjera jer ispis nije bio dovoljno jasan. Korištena početnice bile su iste kao za PCR reakcije, za nizvodni (eng. reverse) smjer upotrijebljene su početnice iz literature, a za uzvodni (eng. forward) smjer novokonstruirane početnice jer su prijanjale dublje u intron.

2.7. Analiza nukleotidnih sljedova

2.7.1. Bioedit

Bioedit (Hall, 1999) je programski paket za uređivanje, poravnavanje i analizu sekvenci. Nudi razne mogućnosti kao što su poravnavanje sljedova prema referentnoj sekvenci, organizacija sekvenci u grupe, sortiranje prema nazivu, pretraživanje određenog djela sekvence, formiranje knjižnice.

Za svaki lokus formirala sam knjižnicu prema ranijim istraživanjima Lorne J. Kennedy na alelima psa, te sam koristila službenu nomenklaturu prema DLA Nomenclature Committee (LJ Kennedy, osobno priopćenje). Knjižnicu sam koristila za kasniju analizu u programu SeqScape.

2.7.2. SeqScape

Programski paket SeqScape (Applied Biosytems) je alat za analizu nukleotidnih sljedova i utvrđivanje alela kod istraženih jedinki. Promatranjem elektroferograma utvrdila sam valjanost sljedova te ručno prepravila pogreške. Usporedbom s referentnim sljedovima pojedinog alela u knjižnici, utvrdila sam koje alele ima pojedini uzorak. Svi uzorci za oba lokusa imali su otprije poznate alele, odnosno alelni sljedovi bili su identični sljedovima u knjižnici, pa nije bilo potrebno molekularnim kloniranjem potvrditi prisutnost novog alela.

2.7.3. MEGA

MEGA (eng. Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura i sur. 2013) je integrirani programski paket koji omogućuje testiranje evolucionarnih hipoteza. U širokoj je upotrebi i za određivanje selekcijskih evolucijskih sila koje djeluju na gene i vrste, pa stoga pomaže u rekonstruiranju evolucijske povijesti.

Nakon identifikacije alela, upotrijebila sam programski paket MEGA za nukleotidni ispis sljedova identificiranih alela, te sam potom prevela nukleotidni slijed u aminokiselinski. Odredila sam također i broj varijabilnih mjesta u svakom alelu.

Kako bih dobila informacije o evolucijskoj udaljenosti s kojima je moguće izvesti zaključke o evolucijskoj povijesti, u programu MEGA odredila sam nukleotidnu i aminokiselinsku udaljenost. Evolucijska udaljenost između sljedova najčešće se mjeri brojem nukleotidnih i amninokiselinskih supstitucija koje nastaju među njima. Vrlo je važan i omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija. Sinonimne supstitucije su one kod kojih je došlo do promjene u samom kodonu ali taj novi kodon nosi šifru za istu aminokiselinu kao i prethodni. Kod nesinonimnih supstitucija promjenjeni kodon nosi šifru za drugačiju aminokiselinu, pa je tako proteinski produkt izmijenjen. Program predlaže najpogodniji model za izračun pojedinih parametara.

Omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija koristi se za dN/dS test kojim se procjenju dugotrajni učinak prirodne selekcije na određeni genski lokus kroz evolucijsku povijest. Ovaj test temelji se na pretpostavci da se radi o neutralnoj evoluciji ukoliko je broj sinonnimnih i nesinonimnih mutacije podjednak; ukoliko prevladavaju sinonimne mutacije radi se o purificirajućoj selekciji; nasuprot tome, ukoliko prevladavaju nesinonimne mutacije genski lokus je pod utjecajem pozitivne selekcije koja podržava prisutnost novih genskih produkata (proteina) u populaciji. Nulta hipoteza testa pozitivne selekcije (H_0) pretpostavlja da dN = dS, te da su sinonimne i nesinonimne udaljenosti jednake. Alternativna hipoteza (HA) postavlja da je dN>dS. Pri tom važno de je rezultat dN/dS statistički podržan.

2.7.4. OmegaMap

Za razliku od programskog paketa MEGA koji provjerava prisutnost selekcije na čitavom lokusu, pomoću programskog paketa OmegaMap (Wilson and McVean, 2006) provjerava se prisutnost pozitivne selekcije na pojednačnim kodonima. Pozitivna selekcija uglavnom ne djeluje na konzervirana mjesta MHC gena već na visoko varijabilne djelove nukleotidnog slijeda koji kodiraju vezna mjesta za antigene. Stoga je za određivanje prirodne selekcije značajniji pristup u kojem se analizira pojedinačni kodon, a ne čitav nukleotidni slijed (Arbanasić, 2011). OmegaMap uzima u obzir i rekombinacije unutar lokusa MHC koje mogu utjecati na testove selekcije, procjenjujući učestalost rekombinacije i detektirajući selekciju u prisutnosti rekombinacije. Kao parametar selekcije, kao i programskom paketu MEGA, također se koristi omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija ($\omega=dN/dS$).

Postavke korištene tokom analize, prema preporuci autora (Wilson and McVean, 2006) , bile su sljedeće: pomoću programa Order, uključenog u paket OmegaMap stvorena je lista nasumičnog poretka; stopa mutacije (μ) i stopa tranzicije/transverzije (κ) prilagođene su da slijede inverznu distribuciju s početnim vrijednostima 0.1 i 3.0; stopa rekombinacije (ρ) i parametar selekcije (ω) prilagođeni su da slijede inverznu distribuciju u opsegu od 0.01 do 100 i od 0.01 do 20; ω je podešen zasebno za svaki kodon a ρ je prilagođen modelu s po 10 naznačenih kodona. Svaki lokus podvrgnut je analizi s 500,000 ponavljanja. Program odbacuje prvih 10% rezultata zbog nevjerodostojnosti. Završni korak je sabiranje dobivenih podataka pomoću programa Summerize.

2.7.5. FSTAT

Programski paket FSTAT (Goudet, 1995) koristi se za analizu genetičkog diverziteta i statističke diferencijacije na kodominantnim genetičkim markerima. U ovom istraživanju FSTAT je upotrebljen za usporedbu bogatstva alela (engl. Allelic richness) pronađenih na lokusima DLA-DQA i DQB na uzorku čagljeva iz ovog istraživanja i populacije vukova iz Hrvatske (Arbanasić i sur, 2013) jer se radi o različitim, ali srodnim vrstama. Nadalje, bogastvo alela utvrđeno je i za populaciju čagljeva iz Izraela (Mešin, 2016) radi usporedbe prema broju pronađenih alela lokusa MHC s istraženim populacijama iste vrste .

Ukoliko želimo usporediti broj pronađenih alela na određenom lokusu između populacija koje se sastoje od različitog broja jedinki, radi vjerodostojnosti je potrebno odrediti bogatstvo alela na istom broju jedinki, odnosno na jednako velikom uzorku. U istraživanju na vukovima analizirano je 77 jedinki, u onom na izraelskim čagljevima 30 jedinki, a u ovom istraživanju pronađeni su aleli DQA i DQB lokusa za 20 jedinki. Program FSTAT stoga je procjenio koliki bi bio broj alela u istraživanju na vukovima i izraelskim čagljevima da je veličina uzorka jednaka veličini uzorka iz ovog istraživanja. S obzirom da je jedna jedinka imala pseći alel, ona je izuzeta iz analize FSTAT.

3. REZULTATI

Izolirala sam DNA čaglja iz 27 uzoraka, no zbog vrlo male količine uzoraka, kao i zbog lošeg stanja u kojem su uzorci stigli, od 5 uzoraka morala sam odustati. Naima, u dva uzorka iz Rumunjske i tri iz Gruzije nisam uspjela umnožiti PCR reakcijima pa su izuzeti iz daljnje analize. Preostalim uzorcima identificirala sam alele barem jednog lokusa (DQA ili DQB). Svi aleli otprije su poznati, a izuzev alela DQA1*00101 i DQA1*00402 radi se o alelima koji su tipični za čaglja, što znači da do danas nisu utvrđeni u niti jednoj drugoj vrsti iz porodice pasa.

3.1. Lokus DQA

Analizom sekvenci egzona 2 lokusa DQA lokusa 246 pb pronašla sam tri različita alela (Tablica 2.). Alel DQA1*03001 prvi put je utvrđen kod čagljeva iz Hrvatske, te je alel tipičan za čagljeve koji dosad nije pronađen kod drugih vrsta iz porodice pasa. Alel DQA1*00402 pronađen je kod mnogih pasmina pasa. Alel DQA1*00101 je također česti pseći alel, no pronađen je i kod sivog vuka, meksičkog vuka i kojota (IPD-MHC Database na www.ebi.ac.uk).

Tablica 2. Pronađeni aleli lokusa DQA i jedinke kod kojih su prisutni u istraženom uzorku. Različitom bojom pozadine označeni su pojedini aleli.

oznaka jedinke	**Rezultati SeqScape analize**	
1cL	DQA1*00402	DQA1*00402
2cL	DQA1*00402	DQA1*00402
3cL	DQA1*00402	DQA1*00402
4cL	DQA1*00402	DQA1*03001
5cL	DQA1*00402	DQA1*03001
6cL	DQA1*00402	DQA1*03001
7cL	DQA1*00402	DQA1*03001
8cL	DQA1*00402	DQA1*03001
9cL	DQA1*00402	DQA1*03001
10cE	DQA1*00402	DQA1*03001
11cE	DQA1*03001	DQA1*03001

12cE	DQA1*00402	DQA1*00402
13cE	DQA1*00402	DQA1*03001
14cE	DQA1*00402	DQA1*03001
15cE	DQA1*00402	DQA1*03001
19cG	DQA1*00101	DQA1*00402
21cG	DQA1*00402	DQA1*00402
22cR	DQA1*00402	DQA1*00402
23cR	DQA1*00402	DQA1*00402
24cR	DQA1*00402	DQA1*00402

S obzirom da se najvjerojatnije radi o psećem alelu, iz računalne analize izuzet je DQA1*00101. Nukleotidni sljedovi dvaju preostalih alela navedeni su u Tablici 3., a aminokiselinski sljedovi kodirani nukleotidnim sekvencama u Tablici 4. Uspjela sam odrediti alele lokusa DQA za ukupno 20 jedinki. U programu MEGA odredila sam broj varijabilnih nukleotidnih mjesta koji iznosi 5. Pronađeni nukleotidni sljedovi kodiraju dva različita aminokiselinska slijeda, među kojima je razlika u tri aminokiselinska mjesta.

Tablica 3. Nukleotidni sljedovi alela DQA lokusa istraženog uzorka

Ime alela	Nukleotidni slijed											Položaj
DQA1*00402	GAC	CAT	GTT	GCC	TAC	TAC	GGC	ATA	AAT	GTC	TAC	[33]
DQA1*03001	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
DQA1*00402	CAG	TCT	TAC	GGT	CCC	TCT	GGC	CAG	TAC	ACC	CAT	[66]
DQA1*03001	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[66]
DQA1*00402	GAA	TTT	GAT	GGC	GAT	GAG	TTG	TTC	TAC	GTG	GAC	[99]
DQA1*03001	...	...	...	...	...	...	GA.	...	...	...	...	[99]
DQA1*00402	CTG	GAG	AAG	AAG	GAA	ACT	GTC	TGG	CGG	CTG	CCT	[132]
DQA1*03001	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[132]
DQA1*00402	GTG	TTT	AGC	ACA	TTT	ACA	AGT	TTT	GAC	CCA	CAG	[165]
DQA1*03001	...	...	...	...	...	G..	...	...	...	...	...	[165]
DQA1*00402	GGT	GCA	CTG	AGA	AAC	TTG	GCT	ATA	ATA	AAA	CAA	[198]
DQA1*03001	...	...	...	...	...	...	...	...	GC.	...	...	[198]
DQA1*00402	AAC	TTG	AAC	ATC	CTG	ACT	AAA	AGG	TCC	AAC	CAA	[231]
DQA1*03001	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[231]
DQA1*00402	ACT	GCT	GCT	ACC	AAT	[246]						
DQA1*03001	...	...	...	...	...	[246]						

Tablica 4. Aminokiselinski slijed alela DQA lokusa kod istraženog uzorka

Ime alela	Aminokiselinski slijed	Položaj
DQA1*00402	DHVAYYGINV YQSYGPSGQY THEFDGDELF YVD	[33]
DQA1*03001	....E. ...	[33]
DQA1*00402	LEKKETVWRL PVFSTFTSFD PQGALRNLAI IKQ	[66]
DQA1*03001	....A... .... A..	[66]
DQA1*00402	NLNILTKRSN QTAATN	[82]
DQA1*03001	....	[82]

Učestalost alela DQA odnosno njihove frekvencije prikazani su u Tablici 5. Računaju se prema formuli: broj određenog alela u svim uzorcima / ukupni broj svih alela. Najčešći alel u promatranoj populaciji je DQA1*00402 s frekvencijom 0,68.

Tablica 5. Učestalost alela lokusa DQA u istraženom uzorku i broj homozigota

naziv alela	broj alela u svim uzorcima	Učestalost	broj homozigota
DQA1*00402	27	0,675	8
DQA1*03001	12	0,300	1

3.1. Lokus DQB

Identificirala sam alele egzona 2 lokusa DQB duljine 267 pb za 20 jedinki, U istraživanoj populaciji nalaze se dva različita alela: DQB1*02305 i DQB1*06801 (Tablica 6). Oba su najvjerojatnije tipični čagljevski aleli, a prvi put su identificirani kod populacije hrvatskih čagljeva (Galov i sur, 2015).

Tablica 6. Pronađeni aleli lokusa DQB i jedinke u istraženom uzorku kod kojih su prisutni

Oznaka jedinke	**Rezultat SeqScape analize**	
1Cl	DQB1*02305	DQB1*02305
2cL	DQB1*02305	DQB1*02305
3cL	DQB1*02305	DQB1*02305
4cL	DQB1*02305	DQB1*06801
5cL	DQB1*06801	DBB1*02305
6cL	DQB1*06801	DQB1*02305
7cL	DQB1*06801	DQB1*02305
8cL	DQB1*06801	DQB1*02305
9cL	DQB1*06801	DQB1*02305
10cE	DQB1*06801	DQB1*02305
11cE	DQB1*06801	DQB1*06801
12cE	DQB1*02305	DQB1*02305
13cE	DQB1*06801	DQB1*02305
14cE	DQB1*06801	DQB1*02305
15cE	DQB1*02305	DQB1*06801
21cG	DQB1*02305	DQB1*02305
22cR	DQB1*02305	DQB1*02305
23cR	DQB1*02305	DQB1*02305
24cR	DQB1*02305	DQB1*02305
25cR	DQB1*02305	DQB1*02305

Nukleotidni ispis pronađenih alela lokusa DQB naveden je u Tablici 7., a aminokiselinski ispis u Tablici 8. Broj varijabilnih mjesta na nukleotidnim sekvencama je 24. Aminokiselinski slijedovi se u velikoj mjeri razlikuju – na 14 mjesta.

Tablica 7. Nukleotidni ispis alela lokusa DQB u istraženom uzorku

Ime alela	Nukleotidni slijed	Položaj
DQB1*02305	GAT TTC GTG TAC CAG TTT AAG GGC GAG TGC	[30]
DQB1*06801	... ... TT.	[33]
DQB1*02305	TAT TCC AAC AAC GGG ACG GAG CGG GTG CGG	[60]
DQB1*06801	... ...	[60]
DQB1*02305	CTT CTG ACT AAA TAC ATC TAT AAC CGG GAC	[90]
DQB1*06801	... ... G.G .G. AG.	[90]
DQB1*02305	GAG TAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG	[120]
DQB1*06801	... ...	[120]
DQB1*02305	GAG TAC CGG GCG ACG GAG CTC GGG GCT CGG	[150]
DQB1*06801	... .T.	[150]
DQB1*02305	CCG TCG GCT GAG TAC TGG AAC CCG CAG AAG	[180]
DQB1*06801	... ... GG.	[180]
DQB1*02305	GAC GAG ATG GAC CGG GTA CGG GCC GAG CTG	[210]
DQB1*06801	..G ATC T.. ..G ... AAG	[210]
DQB1*02305	GAC ACG GTG TGC AGA CAC AAC TAC GGG TTG	[240]
DQB1*06801	... ... G..	[240]
DQB1*02305	GAA GAG CTC ACC TCG TTG CAG CGG CGA	[267]
DQB1*06801	... ... TA. A.. ... CA. ..G C..	[267]

Tablica 8. Aminokiselinski ispis alela lokusa DQB u istraženom uzorku

Ime alela	**Aminokiselinski slijed**	**Položaj**
DQB1*02305	DFVYQFKGEC YFTNGTERVR LLTKYIYNRE	[30]
DQB1*06801	.......F.. ....ARS.....	[30]
DQB1*02305	EYVRFDSDVG EYRAVTELGR PSAEYWNPQK	[60]
DQB1*06801	.... .F........ ....G..	[60]
DQB1*02305	DEMDRVRAEL DTVCRHNYGL EELTSLQRR	[89]
DQB1*06801	EILE.K.... ....V ...YT....	[89]

Tablica 9. Učestalost identificiranih alela lokusa DQB u istraženom uzorku i broj homozigota

Naziv alela	Broj alela u svim uzorcima	Učestalost	Broj homozigota
DQB1*02305	28	0,700	9
DQB1*06801	12	0,300	1

3.2. Evolucijska udaljenost

Parametre evolucijske udaljenosti odredila sam pomoću ponuđenih modela u programu MEGA. Statističkom analizom program predlaže najprikladniji model nukleotidne i aminokiselinske supstitucije koristeći Maximum likelihood metodu za određene sekvence. Koristeći Jukes – Cantor (JC) model odredila sam nukleotidnu udaljenost na DQA lokusu koja iznosi d=2,06%. Nukleotidnu evolucijsku udaljenost na DQB lokusu izračunala sam pomoću metode Kimura 2 parametar i iznosi d=9,6 %. Za izračunavanje aminokiselinske udaljenosti u programu MEGA je predložen Jones-Taylor-Thornton (JTT) model kojim sam izračunala da je aminokiselinska udaljenost na lokusu DQA d=3,91%. Iako sam na lokusu DQB identificirala samo dva alela, njihovi aminokiselinski produkti su izrazito divergentni te je njihova aminokiselinska udaljenost d=19,1% (Tablica 10).

Tablica 10. Broj pronađenih alela, nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti i supstitucijski modeli koji su korišteni za njihov izračun, broj varijabilnih mjesta, broj jedinistvenih aminokiselinskih slijedova i broj razlika među njima na lokusima DQA i DQB istraživane populacije

Lokus	broj pronađenih alela	Nukleotidna udaljenost		Aminokiselinska udaljenost		Broj varijabilnih nukleotidnih mjesta	Broj jedinstvenih aminokiselinskih sljedova	Broj razlika između aminokiselinskih sljedova
		MODEL	d (%)	MODEL	d (%)			
DQA	2	JC	2,06	JTT	3,91	5	2	3
DQB	2	K2P	9,60	JTT	19,0	24	2	14

Kratice: d, prosječna vrijednost srednjih udaljenosti; JC, Jukes-Cantor model; JTT, Jones-Taylor-Thornton model supstitucije, K2P, Kimura 2 parametar

3.3. Test pozitivne selekcije

3.3.1. Test pozitivne selekcije na čitavom lokusu

Nulta hipoteza (H0: dN=dS) odbacuje se u korist alternativne hipoteze (HA) ukoliko je dN>dS što implicira da je pozitivna selekcija prisutna ili ukoliko je dN<dS što znači da se radi o purificirajućoj selekciji. Pritom vrijednost p mora biti manja od 0,05 zbog statističkog značaja. Potrebno je prvo odrediti prosječnu stopu nesinonimnih i sinonimnih supstitucija, a nakon toga provesti Z test (www. megasoftware.net).

U ovom istraživanju rezultati Z testa na alelima lokusa DQA i DQB pokazali su da su navedeni lokusi pod pozitivnim selekcijskim pritiskom, te da na njih djeluje balansirajuća selekcija. Sve vrijednosti, za oba lokusa dobivene su uz računanje standardne pogreške bootstrap metodom uz 10000 ponavljanja.

Vrijednosti prosječnih stopa sinonimnih i nesinonimnih supstitucija, kao i statistički bitne p vrijednosti navedene su u Tablici 11.

Tablica 11. Prosječne stope nesinonimnih (dN) i sinonimnih supstitucija (dS) na kodonima alela lokusa DQA i DQB

Lokus	dN	dS	Tip selekcije	dN/dS	p
DQA	0,0271	0,0000	Pozitivna (dN>dS)	+∞	0,048
DQB	0,1130	0,0470	Pozitivna (dN>dS)	0,24	0,034

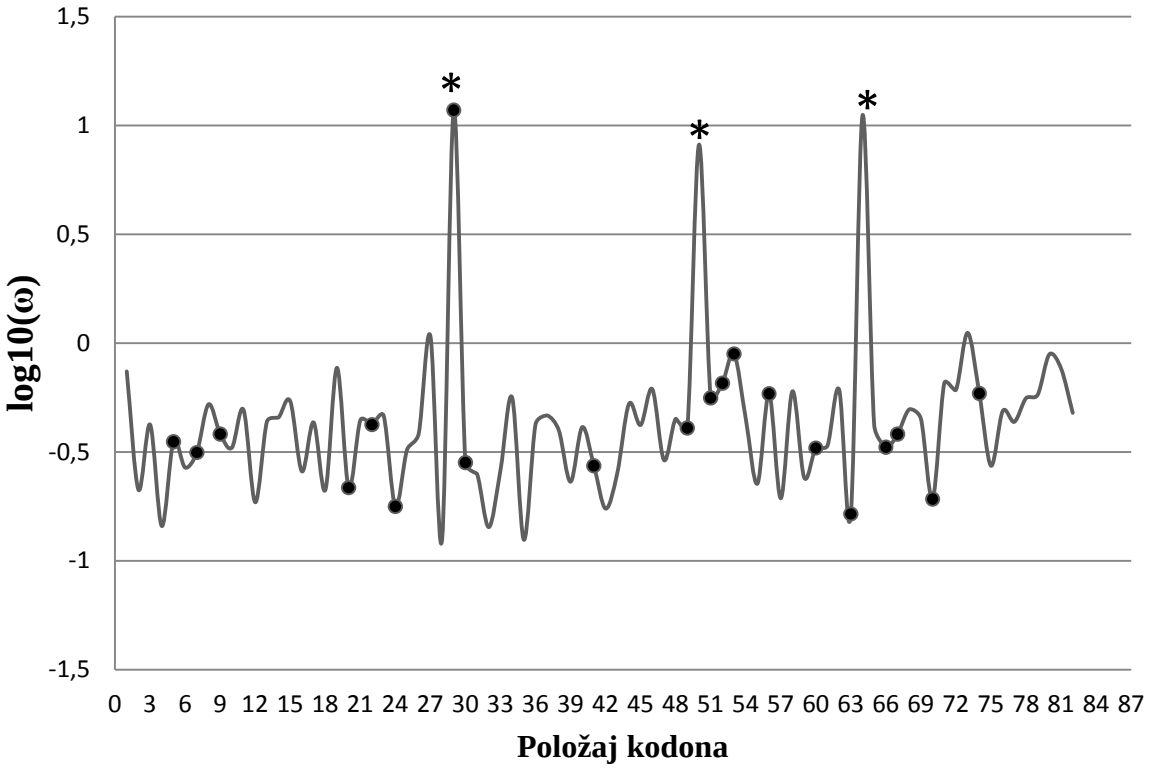
3.3.2. Test pozitivne selekcije na pojedinačnim kodonima

Pomoću programskog paketa OmegaMap provjerila sam prisutnost pozitivne selekcije na pojedinačnim kodonima. Rezultati su prikazani u tablicama i na slikama. Brojevi kodona odgovaraju aminokiselinskom slijedu dobivenom translacijom egzona 2 lokusa DLA-DQA i DQB. Očekivanje je da će pod djelovanjem pozitivne selekcije biti oni kodoni koji kodiraju vezna mjesta za antigen ili susjedni kodoni (Hughes i Nei, 1988). Vezna mjesta odabrana su prema analogiji s ljudskim α i β lancem (Brown i sur. 1993), a prikazana su na slikama. Međutim, odabrana vezna mjesta koja su prepostavljena prema kristalografskoj strukturi ljudskih α i β lanaca ne moraju nužno odražavati točan položaj veznih mjesta na lokusima čaglja jer njihov položaj i struktura često variraju među različitim vrstama (Bryja i sur, 2006) .

Pozitivna selekcija je prisutna na kodonu ukoliko je omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija (ω) veći od 1. Statistička podržanost u ovom programu utvrđuje se a posteriori metodom (engl. Posterior probability of selection). U obzir sam uzela prvenstveno kodone kod kojih je statistička vjerojatnost veća od 0,95. Uz to, u tablicama su prikazani i ostali kodoni koji imaju ω >1, ali njihova statistička podržanost manja od 0.95. Vrijednosti ω >1 utvrđeni su na 5 kodona na lokusu DQA, ali na 3 kodona (29, 50 i 64) a posteriori vjerojatnosti za selekciju bile su veće od 0,95 (Tablica 12). Na lokusu DQB utvrđeno je 13 kodona kod kojih je ω >1, od kojih je 6 bilo statistički značajno (Tablica 13).

Tablica 12. Položaj kodona na kojima je ω (dN/dS) veći od 1, iznos ω, a posteriori vjerojatnost za selekciju (pp) na lokusu DQA. Podebljani su statistički značajni iznosi pp (veći od 0,95).

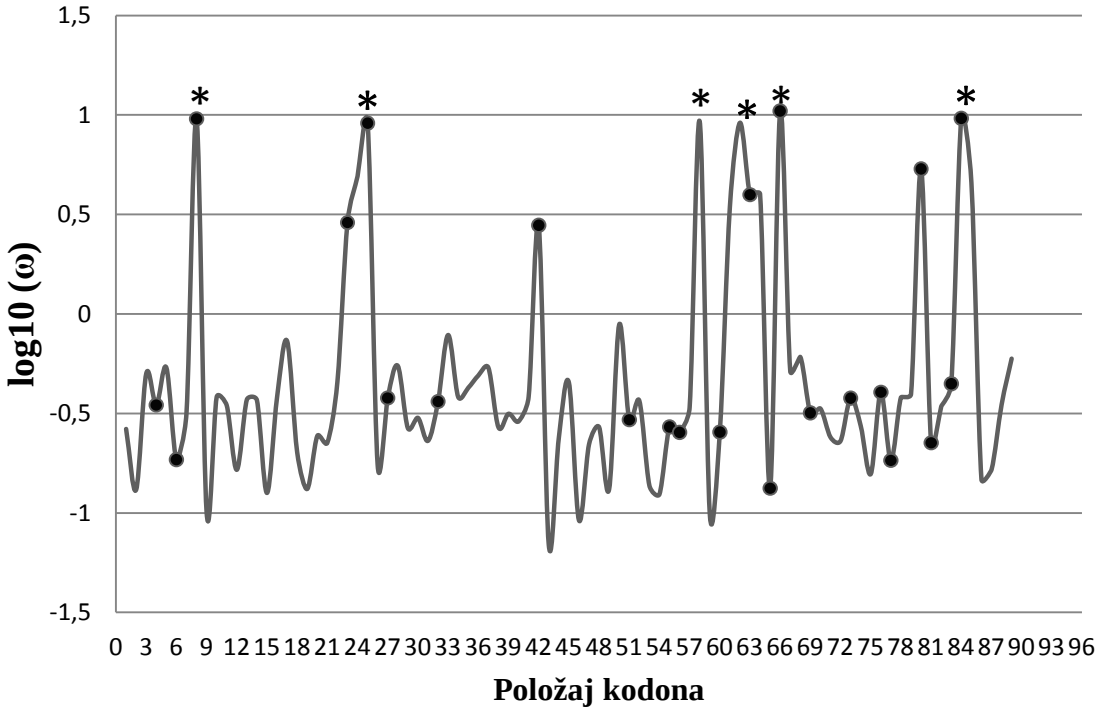
Položaj kodona	**ω (dN/dS)**	**pp**
27	1,07577	0,552766
29	11,75	**1**
50	8,15479	**0,972673**
64	11,1062	**0,996445**
73	1,11395	0,53677



Slika 4. Logaritmirane vrijednosti ω (dN/dS) po pojedinačanim kodonima na lokusu DQA. Točkama su označena pretpostavljena vezna mjesta prema ljudskom α lancu (Brown, 1993). Zvjezdice označavaju statistički podržane vrijednosti ω > 1.

Tablica 13. Položaj kodona na kojima je ω (dN/dS) veći od 1, iznos ω, a posteriori vjerojatnost za selekciju (pp) na lokusu DQB. Podebljani su statistički značajni iznosi pp.

Položaj kodona	ω (dN/dS)	Pp
8	9,56108	**1**
23	2,87775	0,775828
25	9,10166	**0,991113**
42	2,79331	0,756943
58	9,27086	**0,995334**
61	3,45312	0,832926
62	9,13785	**0,999111**
63	3,97416	0,84359
64	3,99676	0,889802
66	10,4699	**0,982671**
80	5,35494	0,937569
84	9,62422	**0,978449**
85	4,57042	0,898245



Slika 5. Logaritmirane vrijednosti ω (dN/dS) po pojediničanim kodonima na lokusu DQB. Točkama su označena pretpostavljena vezna mjesta prema ljudskom β lancu (Brown, 1993). Zvjezdice označavaju statistički podržane vrijednosti ω > 1.

3.4. Usporedba bogatstva alela u programu FSTAT

Usporedila sam broj pronađenih alela kod populacije čagljeva iz ovog istraživanja, kod vukova iz Hrvatske, te čagljeva iz Izraela, koristeći parametar bogatstvo alela koji sam odredila u programu FSTAT. Populacija vukova čiji su lokusi MHC analizirani u istraživanju Arbanasić i sur. (2013) sastojala se od 77 jedinki, a pronađeno je 7 alela na lokusu DQA i 11 na lokusu DQB. Broj jedinki u uzorku izraelske populacije čagljeva (Mešin, 2016) bio je 30, a utvrđena su 2 alela na DQA i 4 alela na DQB lokusu. Rezultati analize u programu FSTAT navedeni su u Tablici 14.

Tablica 14. Bogatstvo alela (AR) na lokusima DQA i DQB čagljeva iz istočne Europe, populacije vukova iz Hrvatske i čagljeva iz Izraela

Lokus	**AR čagljevi istočna Europa (ovo istraživanje)**	**AR vukovi iz Hrvatske (Arbanasić i sur. 2013)**	**AR čagljevi Izrael (Mešin 2016)**
DQA	2,00	5,511	2,00
DQB	2,00	8,115	4,00

4. RASPRAVA

Uzorak jedinki *C. aureus* obuhvaćen ovim istraživanjem pokriva veliko geografsko područje, a poprilično je malen te stoga nedovoljno reprezentativan za konačne zaključke o varijabilnosti lokusa DLA-DQA i DLA-DQB 2 egzona glavnog sustava tkivne podudarnosti kod čagljeva pronađenih u Litvi, Estoniji, Gruziji i Rumunjskoj. Uzorke sam primila u relativno lošem stanju najvjerojatnije zbog neprimjerenog transporta i pohrane. Ipak, uspjela sam umnožiti i identificirati alele 20 jedinki za DQA lokus, kao i alele 20 jedinki za DQB lokus.

Na lokusu DQA identificirala sam alel DQA1*03001 koji dosad nije pronađen niti na jednoj vrsti osim čaglja (Arbanasić i sur, neobjavljeno), alel DQA1*00402 koji je prvi put pronađen kod haskija (Kennedy i sur, 2002a), te alel DQA1*00101 karakterističan za preko 50 pasmina pasa, a pronađen je i kod europskog i američkog sivog vuka i kojota (Galaverni i sur, 2013). Pronalazak alela zajedničkih psu i čaglju karakteristika je transspecijskog polimorfizma, jednog od najboljih pokazatelja djelovanja balansirajuće selekcije (Garrigan i Hedrick, 2007). Međutim može se raditi i o hibridizaciji. Alel DQA1*00402 pronađen je kod mnogih čagljeva u ovom i drugim istraživanjima (Arbanasić i sur, neobjavljeno; Galov i sur, 2015). Nasuprot tomu, pseći alel DQA1*00101 pronađen je samo kod jedne jedinke u ovom istraživanju, što nam ukazuje da je jedinka koja ga posjeduje vjerojatno hibrid. Na DQB lokusu pronašla sam alele DQB1*02305 i DQB1*06801, a dosad su pronađeni samo kod čagljeva hrvatske populacije (Galov i sur, 2015; Arbanasić i sur, neobjavljeno), stoga možemo govoriti o alelima tipičnima za čagljeve.

U dosadašnjim istraživanjima na porodici Canidae (Seddon i Ellegren,2002; Marsden i sur, 2009; Kennedy i sur, 2011; Arbanasić i sur, 2013), kao i u jedinom objavljenom znanstvenom radu koji spominje varijabilnost lokusa MHC čagljeva (Galov i sur, 2015) lokus DQB se pokazao kao varijabilniji u odnosu na DQA. Broj varijabilnih mjesta na nukleotidnim sljedovima alela lokusa DQA je 5, dok je na alelima lokusa DQB čak 24. Usprkos jednakom broju pronađenih alela (dva za DQA lokus i dva za DQB lokus), aminokiselinski sljedovi lokusa DQB su mnogo divergentniji od onih lokusa DQA, što pokazuje aminokiselinska udaljenost koja iznosi 19,1% na lokusu DQB i 3,91% na lokusu DQA. Navedeni rezultati su u skladu s time da geni koji kodiraju za β lanac MHC molekula (DQB i DRB) obično pokazuju veću polimorfnost od gena koji kodiraju za α lanac (DQA)

(Seddon i Ellegren, 2002; Seddon i Ellegren, 2004; Kennedy i sur, 2007; Kennedy i sur, 2010; Arbanasić i sur, 2013).

U nekoliko prijašnjih istraživanja na vukovima (*C. lupus)* (Seddon i Ellegren, 2002; Arbanasić i sur, 2013) zabilježen je relativno visok polimorfizam gena MHC. Nakon određivanja bogatstva alela populacije vukova iz Hrvatske (Arbanasić i sur, 2013) u odnosu na veličinu uzorka analiziranog u ovom istraživanju, bila sam u mogućnosti usporediti bogatstvo pronađenih alela. Preduvjet je bio poznavanje genotipa MHC kod svake istražene jedinke. Uzorak iz istraživanja o vukovima u programu FSTAT sveden je na uzorak veličine kao u ovom istraživanju. Rezultati su pokazali kako je bogatstvo alela kod vukova iz Hrvatske veće nego kod čagljeva iz Istočne Europe. Na lokusu DQA kod vukova bogatstvo alela iznosilo je 5,511, dok je na lokusu DQB bilo više i iznosilo je 8,115. Bogatstvo alela kod čagljeva iz ovog istraživanja je 2,00 na oba lokusa.

Istraživanja na neutralnim markerima (Rutkowski i sur, 2015, Fabbri i sur, 2014) bilježe nisku razinu genetičke varijabilnosti kod europskih populacija čaglja. Populacije čagljeva iz Bugarske, Srbije, Italije i Hrvatske imale su znatno nižu varijabilnost i slabije naglašenu genetičku strukturu nego populacije drugih pripadnika porodice Canidae kao primjerice vuk i lisica (*Vulpes vulpes*) (Rutkowski i sur, 2015). Mali broj pronađenih alela u ovom istraživanju odražava nisku varijabilnost lokusa MHC. Na oba lokusa ukupno sam pronašla samo četiri čagljevska alela. Niska genetička varijabilnost MHC i neutralnih lokusa možda je rezultat nagle ekspanzije čaglja – fragmentacija izvornih populacija na male, disperzirane na širokom geografskom području, vjerojatno će u početku dovesti do i smanjenja varijabilnosti. Za to je najvjerojatnije zaslužan efekt osnivača (engl. founder effect) (Fabbri i sur, 2007), odnosno pojava smanjenja genetičke raznolikosti uslijed zasnivanja nove populacije čiji su utemeljitelji manji broj jedinki iz veće populacije.

Za kvalitetnu usporedbu varijabilnosti lokusa MHC s drugim populacijama čagljeva, potrebno je analizirati genetičku varijabilnost dugotrajnih i stabilnih populacija kao što je primjerice ona iz Grčke (Rutkowski i sur, 2015). Najbliže stabilnoj populaciji za koju postoje ikakvi podaci o varijabilnosti lokusa MHC je izraelska populacija (Mešin, 2015). Iako je ta populacija vjerojatno prošla kroz usko grlo zbog velikog istrebljenja 1960-ih godina, u zadnjih nekoliko godina je narasla i stabilizirala se. U istraživanju na lokusi MHCma čagljeva iz Izraela identificirani su većinom identični aleli kao i u ovom istraživanju (DQA1*00402, DQA1*00101, DQA1*03001, DQB1*02305, DQB1*6801) ali i dodatni aleli

na DQB lokusu: DQB1*02301, DQB1*03501 i pseći alel DQB1*00201. Analizom u programu FSTAT pokazalo se kako je bogastvo alela lokusa MHC kod jedinki iz ovog istraživanja i onog na Izraelskoj populaciji, jednako na DQA lokusu (2,00), dok je na DQB lokusu utvrđeno veće bogatstvo alela kod izraelskih čagljeva (4,00) (Tablica 14).

I u neobjavljenom radu Arbanasić i sur. na polimorfnosti lokusa MHC kod 71 jedinke čaglja iz Hrvatske (južna Dalmacija, Pelješac, Slavonija), Bugarske i Srbije, aleli DQA1*00402, DQA1*003001, DQB1*02305 i DQB1*6801 zastupljeni su u najvećoj frekvenciji što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Broj varijabilnih mjesta na nukleotidima lokusa DQA kod izraelskih čagljeva isti je kao i u ovom istraživanju (5), dok je nešto veći na nukleotidima lokusa DQB (29) nego u ovom istraživanju (24). Nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti za lokus DQA su identične u oba istraživanja (2,06% i 3,91%) zbog istih pronađenih alela. Iznosi evolucijskih udaljenosti za lokus DQB su također vrlo slične – nukleotidna je ista (3,91%), a aminokiselinska je 14,7%, dakle neznatno manja nego u ovom istraživanju (19,1%). U Mešinovom istraživanju prisutnost balansirajuće selekcije nije dokazana na DQA lokusu, ali djeluje na lokuse DQB i DRB.

U diplomskom radu Šešelja (2016) analiziran je lokus DRB istih jedinki kao u ovom istraživanju. Pronađena su tri otprije poznata alela i dva nova . Broj varijabilnih nukleotidnih mjesta na lokusu DRB iznosi 40, što je značajno više nego na lokusima DQA i DQB. Nukleotidna udaljenost (21,4%) i aminokiselinska udaljenost (22,14%) također su veće. Potvrđeno je i djelovanje ravnotežne selekcije primjenom dN/dS testa. Vrijednosti nukleotidne i aminokiselinske supstitucije iznosile su dN=0,0744 i dN=0,0359, a u ovom istraživanju dN=0,0271 i dS=0,000 za lokus DQA, te dN=0,1130 i dS=0,0470 iz čega je vidljivo da je omjer dN/dS najveći na lokusu DQB (2,4).

Smatra se da je visoki diverzitet alela MHC gena posljedica ravnotežne selekcije. Ovaj tip selekcije održava veliki broj alela u populaciji kroz dugi evolucijski period (milijuni godina). Diverzitet MHC gena ima adaptivni značaj zbog važnosti otpornosti na patogene (Marsden i sur.,2009). Stoga je identifikacija gena na koje djeluje ravnotežna selekcija vrlo bitno, te može dati odgovor na pitanje imaju li molekularne promjene adaptivni značaj. Utvrdila sam djelovanje ravnotežne selekcije na oba lokusa korištenjem omjera stopa nesinonimnih naspram sinonimnih mutacija. Sa statističkim značajem, omjer sinonimnih i nesinonimnih mutacija bio je veći od 1. Zbog činjenice da se omjerom nesinonimnih i sinonimnih mutacija detektira dugotrajno djelovanje ravnotežne selekcije, kroz tako dugi vremenski period na

djelovima gena često dolazi do nakupljanja sinonimnih mutacija koje maskiraju prisutnost pozitivne selekcije smanjenjem omjera dN/dS (Garrigan i Hedrick, 2003). Ravnotežna selekcija češće će djelovati na nukleotidne slijedove koji kodiraju za vezna mjesta za peptidni antigen, nego na druge djelove MHC gena koji pokazuju konzerviranost, pa sam stoga analizirala djelovanje ravnotežne selekcije i na pojedinačnim kodonima. Na lokusu DQA utvrđeno je djelovanje ravnotežne selekcije na tri kodona. Usporedbom s položajima veznih mjesta koja su utvrđena na α lancu kod čovjeka (Brown, 1993) vidljivo je da su kodoni za koje je prisutnost ravnotežne selekcije potvrđena sa statističkom značajnošću, na položaju veznog mjesta ili neposredno pored. Na lokusu DQB utvrđeno je čak 13 kodona na kojima je omjer dN/dS veći od 1 uz statistički bitnu vrijednost pp veću od 50%. Ipak, statistički značaj prema preporuci drugih autora (Smith i sur, 2011; Alcaide i sur, 2008) određen je na vrijednost veću od 95%. Stoga je na lokusu DQB za 6 kodona potvrđeno djelovanje ravnotežne selekcije uz statistički značaj. Svih 13 kodona kod kojih je omjer dN/dS >1 imaju položaj na veznim mjestima ili u neposrednoj blizini, prema analogiji s ljudskim β lancem.

Ostali pokazatelji ravnotežne selekcije su veliki broj heterozigota u odnosu na homozigote, transspecijski polimorfizam i veći broj alela u populaciji (Garrigan i Hedrick, 2003). Da bi se selekcijski pritisak odrazio na omjer stopa sinonimnih i nesinonimnih mutacija potreban je dulji vremenski period, stoga se taj test koristi za utvrđivanje djelovanja selekcije kroz dugu evolucijsku povijest. Povećani broj heterozigota, odnosno odstupanje od Hardy-Weiberg ravnoteže koristi se za utvrđivanje djelovanja selekcije u sadašnjoj generaciji. Postojanje većeg broja heterozigota nego što se očekuje pod Hardy-Weiberg ravnotežom posljedica je heterozigotne prednosti, jednog od mehanizama ravnotežne selekcije (Sommer, 2005). Nisam računala postoji li povećani broj heterozigota u ovom istraživanju jer se smatra da je otklon od Hardy-Weiberg ravnoteže uočljiv u onim uzorcima koji imaju više od 100 jedinki (Apanius i sur. 1997). Potvrdila sam ravnotežnu selekciju i postojanjem transspecijskog polimorfizma: alel DQA1*00402 zajednički je mnogim pasminama pasa i drugim pripadnicima porodice Canidae (kojot, vuk). Jednaki aleli prisutni su u različitih, ali filogenetski srodnih vrsta što ukazuje da su aleli stariji od vrste i imaju porijeklo u zajedničkom pretku. Prosječna aminokiselinska udaljenost među alelima DQB lokusa bila je veća nego odgovarajuća nukleotidna udaljenost na istom lokusu, što također sugerira da se varijabilnost ovog lokusa selektivno održava.

Općenito, usprkos malom broju pronađenih alela oni su vrlo divergentni. Ovi rezultati su sukladni s teorijom prednosti divergentnijih alela koja kaže da su jedinke koje imaju različite MHC II molekule u prednosti jer mogu potaknuti imunološki odgovor na širi spektar patogena (Sommer, 2005; Radwan i sur, 2007). S obzirom da su infektivne bolesti česti uzrok smanjenja i izumiranja populacija, imunološka kompetentnost je vrlo bitna za konzervacijsku biologiju, odnosno preživljavanje vrsta. Vrste porodice Canidae su izrazito podložne patogenima. Smatra se da je razlog tomu njihova filogenetska bliskost s domaćim psom, koji je zbog ljudskog čimbenika široko rasprostranjen i održavan u velikom broju, zbog čega dolazi do povećanog rizika od prijenosa patogena između srodnih vrsta, odnosno interspecijske transmisije (Pedersen i sur, 2007).

5. ZAKLJUČAK

Analizom alela egzona 2 gena DLA-DQA i DQB na uzorku čagljeva iz Istočne Europe utvrdila sam nisku varijabilnost pronašavši samo po dva čagljevska alela na svakom lokusu. Pronađeni aleli su: DQA1*00402, DQA1*03001, DQB1*02305 i DQB1*06801. Svi aleli otprije su poznati, te izuzev DQA1*00402 nisu nađeni niti na jednoj drugoj vrsti osim čaglja. Translacijom svakog od pronađenih alela nastaju jedinstveni aminokiselinski slijedovi. Samo jedna jedinka na DQA lokusu imala je pseći alel DQA1*00101, što ukazuje na mogućnost da se radi o hibridu.

Nukleotidne i aminokiselinske evolucijske razlike ukazuju na značajnu divergentnost među alelima. Aminokiselinske razlike veće su od nukleotidnih, što je posljedica selektivnog nakupljanja nesinonimnih mutacija.

Usprkos istom broju pronađenih alela, DQB lokus pokazuje veću divergentnost s većim brojem varijabilnih nukleotidnih mjesta, te iznosima nukleotidne i aminokiselinske razlike.

Potvrdila sam djelovanje ravnotežne selekcije ne oba lokusa. Statistički značajan višak stopa nesinonimnih mutacija u odnosnu na sinonimne, utvrđen je testovima na čitavom nukleotidnom slijedu, kao i na pojedinačnim kodonima. Utvrdila sam i postojanje transspecijskog polimorfizma na DQA lokusu što je također je dokaz ravnotežne selekcije.

Kako bih usporedila varijabilnost lokusa MHC kod čagljeva i drugih pripadnika porodice Canidae, analizirala sam bogatstvo alela na uzorku čagljeva iz ovog istraživanja i populacije vukova iz Hrvatske. Utvrdila sam da nižu varijabilnost lokusa MHC imaju čagljevi.

6. LITERATURA

Alcaide, M., Edwards, S., Negro, J., Serrano, D., Tella, J. (2008). Extensive polymorphism and geographical variation at a positively selected MHC class II B gene of the lesser kestrel (*Falco naumanni*). *Molecular Ecology*, 17(11), 2652-2665.

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.

Apanius, V., Penn, D., Slev, P., Ruff, L. and Potts, W. (1997). The Nature of Selection on the Major Histocompatibility Complex. *Critical Reviews™ in Immunology*, 17(2), 179-224.

Arbanasić, H., Huber, Đ., Kusak, J., Gomerčić, T., Hrenović, J., Galov, A. (2012). Extensive polymorphism and evidence of selection pressure on major histocompatibility complex DLA-DRB1, DQA1 and DQB1 class II genes in Croatian grey wolves. *Tissue Antigens*, 81(1), 19-27.

Arnold, J. Humer, A. Heltai, M. Murariu, D. Spassov, N., Hacklander, K. (2011). Current status and distribution of golden jackals *Canis aureus* in Europe. *Mammal Review*, 42(1), 1-11.

Bernatchez, L., Landry, C. (2003). MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years?. *Journal of Evolutionary Biology*, 16(3), 363-377.

Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley CD (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibilitiy antigen HLA-DR1. *Nature*, 364, 33-39

Bryja, J., Galan, M., Charbonnel, N., Cosson, J. (2006). Duplication, balancing selection and trans-species evolution explain the high levels of polymorphism of the DQA MHC class II gene in voles (Arvicolinae). *Immunogenetics*, 58(2-3), 191-202.

Fabbri, E., Caniglia, R., Galov, A., Arbanasić, H., Lapini, L., Bošković, I., Florijančić, T., Vlasseva, A., Ahmed, A., Mirchev, R. and Randi, E. (2013). Genetic structure and

expansion of golden jackals (Canis aureus) in the north-western distribution range (Croatia and eastern Italian Alps). *Conservation Genetics*, 15(1), pp.187-199.

Fabbri, E., Miquel, C., Lucchini, V., Santini, A., Caniglia, R., Duchamp, C., Weber, J., Lequette, B., Marucco, F., Boitani, L., Fumagalli, L., Taberlet, P., Randi, E. (2007). From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology*, 16(8), 1661-1671.

Galaverni, M., Caniglia, R., Fabbri, E., Lapalombella, S. Randi, E. (2013). MHC Variability in an Isolated Wolf Population in Italy. *Journal of Heredity*, 104(5), 601-612.

Galov, A., Fabbri, E., Caniglia, R., Arbanasić, H., Lapalombella, S., Florijančić, T., Bošković, I., Galaverni, M. Randi, E. (2015). First evidence of hybridization between golden jackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis familiaris*) as revealed by genetic markers. *R. Soc. open sci.*, 2(12), 150450.

Garrigan, D., Hedrick, P. (2003). Perspective: Detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. *Evolution*, 57(8), 1707.

Gottelli, D., Sillero-Zubiri, C., Applebaum, G., Roy, M., Girman, D., Garcia-Moreno, J., Ostrander, E., Wayne, R. (1994). Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology*, 3(4), 301-312.

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, pp. 95-98.

Hedrick, P., Lee, R., Garrigan, D. (2002). Major histocompatibility complex variation in red wolves: evidence for common ancestry with coyotes and balancing selection. *Molecular Ecology*, 11(10), 1905-1913.

Hedrick, P., Lee, R.,Parker, K. (2000). Major histocompatibility complex (MHC) variation in the endangered Mexican wolf and related canids. *Heredity*, 85(6), 617.

Hughes, A., Nei, M. (1988). Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*, 335(6186), 167-170.

IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2008. Canis aureus. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2
http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=3744

Kennedy, L., Angles, J., Barnes, A., Carmichael, L., Radford, A., Ollier, W., Happ, G. (2007). DLA-DRB1, DQA1, and DQB1 Alleles and Haplotypes in North American Gray Wolves. *Journal of Heredity*, 98(5), 491-499.

Kennedy, L., Randall, D., Knobel, D., Brown, J., Fooks, A., Argaw, K., Shiferaw, F., Ollier, W., Sillero-Zubiri, C., Macdonald, D., Laurenson, M. (2011). Major histocompatibility complex diversity in the endangered Ethiopian wolf (*Canis simensis*). *Tissue Antigens*, 77(2), 118-125.

Lanszki, J., Giannatos, G., Dolev, A., Bino, G., Heltai, M. (2010). Late autumn trophic flexibility of the golden jackal *Canis aureus*. *Acta Theriol*, 55(4), 361-370.

Macdonald, D. (1979). The flexible social system of the golden jackal, *Canis aureus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 5(1), 17-38.

Magory Cohen, T., King, R., Dolev, A., Boldo, A., Lichter-Peled, A., Kahila Bar-Gal, G. (2012). Genetic characterization of populations of the golden jackal and the red fox in Israel. *Conservation Genetics*, 14(1), 55-63.

Marsden, C., Mable, B., Woodroffe, R., Rasmussen, G., Cleaveland, S., McNutt, J., Emmanuel, M., Thomas, R., Kennedy, L. (2009). Highly Endangered African Wild Dogs (*Lycaon pictus*) Lack Variation at the Major Histocompatibility Complex. *Journal of Heredity*, 100(Supplement 1), S54-S65.

Mešin M. (2015). Raznolikost gena skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u čagljeva (Canis aureus) iz Izraela. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb

Pedersen, A., Jones, K., Nunn, C., Altizer, S. (2007). Infectious Diseases and Extinction Risk in Wild Mammals. *Conservation Biology*, 21(5), 1269-1279.

Radwan, J., Kawałko, A., Wójcik, J., Babik, W. (2006). MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. *Molecular Ecology*, 16(3), 53540.

Randi E, Hulva P, Fabbri E, Galaverni M, Galov A, Kusak J, et al. (2014) Multilocus Detection of Wolf *x* Dog Hybridization in Italy, and Guidelines for Marker Selection. PLoS ONE 9(1): e86409. doi:10.1371/journal.pone.0086409

Rutkowski, R., Krofel, M., Giannatos, G., Ćirović, D., Mannil, P., Volokh, A., Lanszki, J., Heltai, M., Szabo, L., Banea, O., Yavruyan, E., Hayrapetyan, V., Kopaliani, N., Millou, A., Tryfonopoulos, G., Lymberakis, P., Penezić, A., Pekeltyte, G., Suchecka, E, Bogdanowicz, W. (2015). A European Concern? Genetic Structure and Expansion of Golden Jackal (Canis aureus) in Europe and the Caucasus. *PLoS ONE*, [online] 10 (11). Available at: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0141236

Seddon, J., Ellegren, H. (2002). MHC class II genes in European wolves: a comparison with dogs. *Immunogenetics*, 54(7), 490-500.

Seddon, J., Ellegren, H. (2004). A temporal analysis shows major histocompatibility complex loci in the Scandinavian wolf population are consistent with neutral evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1554), 2283-2291.

Smith, S., Goüy de Bellocq, J., Suchentrunk, F., Schaschl, H. (2011). Evolutionary genetics of MHC class II beta genes in the brown hare, *Lepus europaeus*. *Immunogenetics*, 63(11), 743-751.

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

Stronen, A., Tessier, N., Jolicoeur, H., Paquet, P., Hénault, M., Villemure, M., Patterson, B., Sallows, T., Goulet, G., Lapointe, F. (2012). Canid hybridization: contemporary evolution in human-modified landscapes. *Ecol Evol*, 2(9), 2128-2140.

Šešelja K. (2016). Raznolikost gena DRB i DQA/DQB/DRB haplotipova skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u čagljeva (*Canis aureus*) iz istočne Europe. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.

Trouwborst, A., Krofel, M., Linnell, J. (2015). Legal implications of range expansions in a terrestrial carnivore: the case of the golden jackal (*Canis aureus*) in Europe. *Biodiversity and Conservation*, 24(10), 2593-2610.

vonHoldt, B., Pollinger, J., Earl, D., Knowles, J., Boyko, A., Parker, H., Geffen, E., Pilot, M.,

Jedrzejewski, W., Jedrzejewska, B., Sidorovich, V., Greco, C., Randi, E., Musiani, M., Kays, R., Bustamante, C., Ostrander, E., Novembre, J., Wayne, R. (2011). A genome-wide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolf-like canids. *Genome Research*, 21(8), 1294-1305.

Wayne, R., Ostrander, E. (2007). Lessons learned from the dog genome. *Trends in Genetics*, 23(11), 557-567

Wilson, D. J. And G. McVean (2006) Estimating diversifying selection and functional constraint in the presence of recombination. *Genetics* doi:10.1534/genetics.105.044917.

Zachos, F., Ćirović, D., Kirschning, J., Otto, M., Hartl, G., Petersen, B. and Honnen, A. (2009). Genetic Variability, Differentiation, and Founder Effect in Golden Jackals (*Canis aureus*) from Serbia as Revealed by Mitochondrial DNA and Nuclear Microsatellite Loci. *Biochemical Genetics*, 47 (3-4), 241-250.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 07. Prosinca 1991. u Zagrebu, gdje sam i započela svoje obrazovanje. Nakon osnovne škole upisala sam XV. gimnaziju. Maturirala sam 2010. godine, a potom sam odlučila upisati prvu godinu preddiplomskog studija na Odsjeku za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. 2013. godine stekla sam zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije, nakon čega sam na istom fakultetu upisala diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija. Tokom studija dobila sam dodatni poticaj za radom i usavršavanjem u području prirodnih znanosti, posebice genetike i imunologije.