

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Maja Balažin

Raznolikost gena DRB1 skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u divljih svinja (*Sus scrofa*) s područja Medvednice

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

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

Najljepše zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ani Galov na svim stručnim savjetima, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Veliko hvala dr. sc. Haidi Arbanasić na pomoći oko planiranja izvedbe rada, na susretljivosti i na ustupljenim materijalima. Također zahvaljujem Gordani Žakman na savjetima i pomoći prilikom tehničke izvedbe istraživanja.

Ovaj diplomski rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (projekt Molekularna epidemiologija nekih invazijskih oboljenja divljih životinja, 3421)

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek  
Diplomski rad

### RAZNOLIKOST GENA DRB1 SKUPINE II GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI U DIVLJIH SVINJA (*Sus scrofa*) S PODRUČJA MEDVEDNICE

Maja Balažin

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility complex, MHC) ključan je u pokretanju obrambenih mehanizama kralježnjaka, a smatra se da su neki od MHC lokusa među najpolimorfnijim u kralježnjaka. Raznolikost MHC gena utječe na sposobnost populacije da se obrani od različitih patogena. Glavni sustav tkivne podudarnosti kod svinja naziva se SLA (engl. swine leukocyte antigen). Divlja svinja (*Sus scrofa*) je jedna od najprilagođenijih vrsta kralježnjaka, te kao domadar mnogim parazitima pogodna je vrsta za istraživanje korelacije između MHC haplotipa i podložnosti bolestima. Cilj istraživanja bio je otkriti imunogenetičku raznolikost u populaciji divlje svinje s područja Medvednice analizom lokusa DRB1. U istraživanom uzorku od 49 jedinki, pronađeno je sedam alela, od čega je jedan novi alel. Prema omjeru nesinonimnih i sinonimnih supstitucija potvrdili smo da na DRB1 lokus ne djeluje pozitivna selekcija. Dodatnom analizom djelovanja selekcije na pojedinačnim kodonima, utvrdili smo da je jedino kodon 48 pod utjecajem pozitivne selekcije. Rezultati ovog istraživanja će poslužiti za daljna istraživanja korelacija između MHC haplotipova i specifičnih parazitskih bolesti divljih svinja, što će u konačnici pridonijeti razumijevanju koevolucije domaćina i patogena i održavanja genetičke raznolikosti u populacijama životinja.

( 44 stranica, 4 slika, 6 tablica, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: divlje svinje, MHC, genetička raznolikost, parazitske bolesti

Voditelji: Dr. sc. Ana Galov, doc.

Neposredni voditelj: Dr. sc. Haidi Arbanasić

Ocjenitelji: Dr. sc. Ana Galov, doc.

Dr.sc. Gordana Lacković-Venturin, red. prof.

Dr.sc. Božena Mitić, red. prof.

Rad je prihvaćen: 7. listopada 2015.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology  
Graduation Thesis

### VARIABILITY OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX DRB1 CLASS II GENES IN THE WILD BOARS (*Sus scrofa*) IN THE AREA OF MEDVEDNICA

Maja Balažin

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Major histocompatibility complex (MHC) plays a major role in initiating defense mechanisms of vertebrates. It is believed that some of the MHC loci are the most polymorphic in vertebrates. The variability of MHC genes affects population's ability to defend itself from various pathogens. Major histocompatibility complex (MHC) of pigs is known as swine leukocyte antigen (SLA). Wild boar is considered one of the most widespread species. As host of many parasites it is suitable species for testing correlation between MHC haplotypes and susceptibility to diseases. The goal of the research was to discover immunogenetic diversity in the population of wild boars from Medvednica by analysis of DRB1 loci. In the examined sample of 49 individuals, seven alleles were found, one of them was new. According to the ratio of nonsynonymous and synonymous substitutions we have confirmed that the DRB1 locus isn't under positive selection. An additional analysis of the effects of selection on individual codons showed us that only codon 48 is under the effect of positive selection. Results of this study will be used in further study of correlation between the MHC haplotypes and specific parasitic diseases of wild boars that will contribute to understanding of coevolution of the host and pathogen and maintenance of genetic diversity in animal populations.

( 44 pages, 4 figures, 6 tables, 38 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Suidae, MHC, genetic variability, parasitic diseases

Supervisors: Dr. sc. Ana Galov, Asst. Prof.

Assistant Supervisor: Dr. sc. Haidi Arbanasić

Reviewers: Dr. sc. Ana Galov, Asst. Prof.

Dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, Prof.

Dr.sc. Božena Mitić, Prof.

Thesis accepted: 7th October 2015

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Divlja svinja .....	1
1.2 Glavni sustav tkivne podudarnosti .....	3
1.3 Dosadašnja istraživanja raznolikosti MHC sustava porodice Suidae.....	7
1.4 Uključenost MHC sustava u parazitološka istraživanja .....	9
1.5 Cilj istraživanja.....	11
2. MATERIJALI I METODE.....	12
2.1 Uzorci tkiva .....	12
2.2 Izolacija DNA.....	13
2.3 Lančana reakcija polimerazom.....	14
2.4 Elektroforeza .....	15
2.5 Sekvenciranje .....	15
2.6 Molekularno kloniranje .....	15
2.7 Računalna obrada .....	19
2.7.1 BioEdit.....	19
2.7.2 SeqScape® .....	19
2.7.3 MEGA .....	20
2.7.4 Vezna mjesta .....	20
3. REZULTATI.....	21
3.1 Aleli divljih svinja .....	21
3.2 Evolucijska udaljenost.....	26
3.3 Selekcija .....	27
4. RASPRAVA.....	30
5. ZAKLJUČAK .....	33
6. LITERATURA.....	34

## **POPIS KRATICA:**

ADW- web životinjske raznovrsnosti (Animal Diversity Web)

dN - prosječna stopa nesinonimnih nukleotidnih supstitucija

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

dS - prosječna stopa sinonimnih nukleotidnih supstitucija

g – gram

IFN- interferon

IPTG - izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid

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

kb - kilobaza (kod DNA molekule)

kg - kilogram

L - litra

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

m - metar

mg - milligram

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

ml – mililitar

$\mu$ l – mikrolitar

$\mu$ M - mikromolarna

ng - nanogram

PBR - regija koja veže peptide (engl. peptide-binding region)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction)

PMF - prirodoslovno matematički fakultet

RNA- ribonukleinska kiselina

rpm - okretaja po minuti

TAP- transporter povezan s obradom antigena (engl. transporter associated with antigen processing)

TNF - tumorski faktor nekroze (engl. tumor necrosis factor)

UV - ultraljubičasta (engl. ultraviolet)

V - volt

## 1. UVOD

### 1.1 Divlja svinja

Divlja svinja (*Sus scrofa*) spada u red Arctiodactyla, porodicu Suidae, te rod *Sus*. Potječe iz Europe i Azije. Danas se njezina rasprostranjenost proteže na mnoge oceanske otoke i sve kontinente, osim Antarktike. Groves i Grubb (1993) su grupirali četiri podvrste divlje svinje, na temelju zemljopisnih i morfoloških razlika: zapadna, indijska, istočna i indonezijska podvrsta. Divlja svinja je izumrla na području Njemačke, Egipta, Irske, Libije i Norveške, dok je ponovo uvedena u Švedsku i Ujedinjeno Kraljevstvo. Euroazijska divlja svinja nastanjuje različita umjerena i tropska staništa, od polupustinja do tropskih kišnih šuma, umjerenih šuma, travnjaka i džungla (IUCN 2015).

Divlje svinje mogu težiti između 66 i 272 kg, dok im duljina tijela varira između 153 i 240 cm. Maksimalna dob divlje svinje je 12 godina, dok joj je srednji životni vijek 1 do 2 godine. Na životni vijek divljih svinja uvelike utječe lov (Wicklina 2014). Dlačni pokrov divlje svinje čini gusta poddlaka ili malje, preko kojih dolazi sloj krute dlake ili čekinja (Slika 1). Vrh čekinja se grana u dva ili tri dijela što im daje specifičan oblik. Stalna boja dlačnog pokrova divljih svinja je gotovo crna zimi, odnosno sivkasta ljeti (Konjević 2005). Posljednjih nekoliko desetljeća broj divljih svinja se povećao zbog brojnih čimbenika, poput depopulacije ruralnih područja, promjena u agrokulturi, nedostatka predatora, smanjenja izlova i klimatskih promjena. Posjeduju veliku reprodukcijску stopu čime im se brojnost može udvostručiti u samo jednoj godini (Massei i Genov 2004). U lovačkoj terminologiji mužjaka se naziva vepar, ženku krmača, mladunčad prasad, a godišnjake, do druge godine života, nazimad. Približna brojnost im se na teritoriju Hrvatske nakon Drugog svjetskog rata procjenjivala na svega 300 komada (Darabuš i Jakelić 1996, cit. u Konjević 2005).





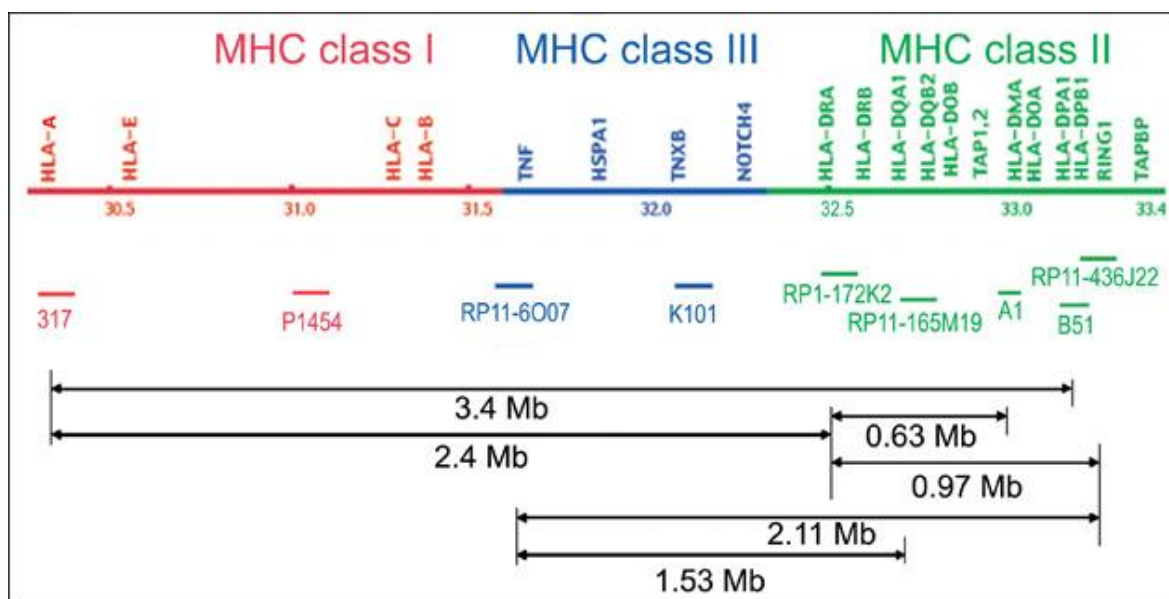
Slika 1. Divlja svinja (preuzeto s UniProt 2015)

Prema trenutno važećem Zakonu o lovu (1994) i Pravilniku o lovostaji (1999), divlje svinje pripadaju u skupinu lovostajem zaštićene divljači. Za vepove i nazimad nema ograničenja lova tijekom godine, dok je za krmače i prasad propisana lovostaja u razdoblju od 5. siječnja do 1. lipnja (Konjević 2005). Divlja svinja je vrlo prilagodljiva i otporna vrsta, te se smatra da upravo zbog te karakteristike uspjela zadržati veliku brojnost i rasprostranjenost. Može napredovati u uvjetima promijenjenog staništa i lova, što nije slučaj za većinu druge divljači (IUCN 2015).

## 1.2 Glavni sustav tkivne podudarnosti

Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility complex, MHC) posjeduje glavnu regulacijsku i obrambenu ulogu u kralježnjaka. Glavna značajka MHC gena je njihova polimorfnost, što im daje sposobnost prepoznavanja velikog spektra patogena i uspješnu obranu organizma, odnosno populacije. Mehanizmi prirodne selekcije održavaju polimorfizam MHC gena kroz dugi niz generacija. MHC sustav obuhvaća velik dio genoma (oko 0,1 % ljudskog genoma), gotovo 4 milijuna parova baza u ljudi, a sadržava oko 200 kodirajućih lokusa (Penn 2002). Postoje tri skupine MHC gena, koje su u ljudi nazivaju HLA geni (engl. human leukocyte antigen) (Slika 2). Skupina I MHC molekula prikazuje antigen na svim stanicama sa jezgrom, čija je glavna uloga prikaz antigena citotoksičnim CD8<sup>+</sup> limfocitima. Skupina II MHC molekula eksprimira glikoproteine samo na stanicama koje prikazuju antigen, poput makrofaga, dendritičnih stanica i B limfocita, pomoćničkim CD4<sup>+</sup> limfocitima. Skupina III MHC gena kodira za mnoštvo različitih izlučenih proteina, koji također imaju imunosnu funkciju, uključujući komponente komplemenata i molekule uključene u upalnu reakciju. MHC molekule skupine I i II su membranski glikoproteini, koji posjeduju sličnu strukturu i funkciju. Takvi membranski glikoproteini čine stabilni kompleks s peptidnim ligandima, prikazujući ih na površini stanice kako bi bili prepoznati od strane T limfocita. Skupina III MHC molekula ne posjeduje strukturne ni funkcionalne sličnosti sa skupinom I i II MHC molekula, već uključuje proteine komplemenata (Kindt i sur. 2006; Sompayrac 1999).

Iako su strukturno veoma slične ipak nalazimo razlike između skupine I i II MHC molekula. MHC I molekule građene su od dvaju lanaca,  $\alpha$ - lanca i  $\beta$ 2- mikroglobulina, dok su MHC II molekule građene od  $\alpha$  i  $\beta$  lanca. Vezno mjesto antigena, pukotina koja sadrži zatvorene krajeve, kod MHC molekula skupine I čine  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 dijelovi lanca, te vežu dijelove antigena veličine 8 do 10 aminokiselina. MHC molekula skupine II sadrži vezno mjesto antigena s otvorenim krajevima, kojeg čine dijelovi  $\alpha$ 1 i  $\beta$ 1 lanca te vežu dijelove antigena veličine od 13 do 18 aminokiselina (Kindt i sur. 2006).



Slika 2. Genska mapa HLA regija ( preuzeto i prilagođeno iz Christova i sur. 2007 )

MHC I molekule su specijalizirane za prikazivanje fragmenta antigena prerađenog od strane stanica, nazvanog endogeni protein. Glavne reakcije uključene u prikazivanje proteina pomoću MHC I molekula su: prerada proteina pomoću proteosoma, transport proteina na endoplazmatski retikulum pomoću TAP transportera i vezanje peptida u pukotinu MHC I molekule. MHC II molekule su zaslužne za prikazivanje egzogenih proteina. Glavne reakcije uključene u prikazivanje proteina pomoću MHC II molekula: spajanje  $\alpha$  i  $\beta$  lanca, vezanje invarijantnog lanca, transport od Golgijevog aparata do endosoma, ulazak egzogenog proteina u stanicu pomoću endocitoze u vezikulu zvanu fagosom, vezanje fagosoma i endosoma, endosomalni enzimi prerađuju protein na manje dijelove, odvajanje invarijantnog lanca i vezanje fragmenta proteina u pukotinu MHC II molekule. Takvo djelovanje imunološkog sustava omogućuje provjeru svake stanice u tijelu uz pomoću citotoksičnih T limfocita (Sompayrac 1999).

Raznolikost MHC molekula ne proizlazi samo iz posjedovanja različitih alela određenog gena već i zbog prisutnosti dupliciranih gena sa sličnim ili preklapajućim funkcijama. Zbog toga što uključuje gene sa sličnim, ali ne identičnim strukturama i funkcijama MHC sustav nazivamo poligeničnim. Neravnoteža vezanosti gena (engl. linkage disequilibrium) je stanje gdje se određena kombinacija alela različitih lokusa pronalazi češće

u populaciji od predviđene nasumične kombinacije. Postoje mnogobrojne teorije koje objašnjavaju uzrok nastanka takve neravnoteže, jedna od njih je i da određena kombinacija alela može pridonijeti otpornosti na određenu bolest. Polimorfizam MHC sustava nastaje zahvaljujući rekombinacijama, točkastim mutacijama i genskoj konverziji. Svaki od tih procesa doprinosi raznolikosti MHC gena unutar populacije (Kindt i sur. 2006). Kako bi mogli bolje razumjeti značajke MHC polimorfizma potrebno je istražiti mehanizme odgovorne za održavanje raznolikosti MHC gena kroz generacije, kao i selektivne mehanizme koji održavaju i oblikuju raznolikost gena. MHC polimorfizam je moguće objasniti uz pomoć triju mehanizama: 1) sinonimnih i nesinonimnih promjena nukleotida 2) karakterističanog uzorka kombinacija novog kodona koji rezultira segmentalnim promjenama na kraćem DNA kraku, pomoću genske konverzije ili dvostrukog *crossing overa*, 3) egzona koji se miješaju putem rekombinacije, pomoću jednostrukog *crossing overa*. Takve genetičke izmjene događaju se unutar i između lokusa (Meyer i Mack 2003).

Razlika u sljedovima duž MHC alela unutar vrsta je velika. Takve razlike nisu nasumično raspoređene kroz čitav polipeptidni lanac već su grupirane u kratkim dijelovima lanca. Kod MHC molekula skupine I su to domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ , dok su kod MHC molekula skupine II to domene  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  (Kindt i sur. 2006).

Postoje brojni regulatorni mehanizmi koji reguliraju aktivnost MHC sustava. Skupina I i II MHC molekula regulirana je 5' slijedom promotora, koja veže slijed specifičnog transkripcijskog faktora. Takva transkripcijska regulacija MHC-a posjeduje i pozitivnu i negativnu ulogu. Ekspresija MHC molekula također je regulirana različitim citokinima Interferoni,  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , te TNF povećavaju ekspresiju MHC molekula skupine I na stanicama. IFN  $\gamma$  potiče stvaranje specifičnog transkripcijskog faktora koji se veže na slijed promotora te na taj način regulira aktivnost MHC gena skupine I, dok pojačava ekspresiju MHC molekula skupine II na različitim stanicama povećavajući djelovanje transkripcijskog aktivatora (CIITA) (Kindt i sur. 2006).

Postoje mnogobrojni dokazi koji potkrijepljuju teoriju da se MHC polimorfizam održava uz pomoć prirodne selekcije. Prije svega to je veliki broj različitih alela, jer neutralni aleli na koje ne djeluje prirodna selekcija teže mogu opstati u populaciji, odnosno dolazi do njihovog gubitka kroz djelovanje slučajnog genetičkog drifta. U prilog tome govore i podjednake frekvencije alela, jer MHC aleli često pokazuju ujednačenost u raspodjeli alela

unutar populacija, što se ne bi očekivalo da su prepušteni isključivo slučajnim događajima. Smanjena učestalost homozigota proizlazi iz činjenice da heterozigoti imaju mogućnost prikazivanja većeg spektra različitih patogena. Također nalazimo neravnotežu vezanosti gena uzduž lokusa gdje se određene kombinacije alela pojavljuje češće zajedno u odnosu na druge kombinacije alela. Omjer nesinonimnih i sinonimnih supstitucija na MHC genskim regijama koje kodiraju za receptorska mjesta koja vežu antigen ukazuje na to da selekcija održava MHC raznolikost (Penn 2002).

### 1.3 Dosadašnja istraživanja raznolikosti MHC sustava porodice Suidae

Moutou i sur. (2013) uspoređivali su genetsku raznolikost dva MHC lokusa, oligomorfni DQA i polimorfni DRB1, kod domaćih svinja i modernih predstavnika njihovih predaka, divljih svinja. Također su nukleotidni polimorfizam MHC uspoređivali sa stvarnim funkcionalnim polimorfizmom u peptid vezajućim regijama i vezajućim pukotinama P1, P4, P6, P7 i P9. Funkcionalni polimorfizam, koji uključuje broj i distribuciju različitih varijanti džepova unutar i između populacija, bio je značajno niži od genskog polimorfizma. Analiza od oko 200 divljih svinja prikupljenih u Europi i 120 domaćih svinja četiriju pasmina (tri čistokrvne, Pietran, Leicoma i Landrace, i jedana mješovita Danbred) otkrila je da divlje svinje i domaće svinje dijele jednake razine nukleotidnih i aminokiselinskih polimorfizama, alelnu raznolikost i heterozigotnost. Analizom polimorfizma konformacije jednolančanih molekula DNA (engl. single-strand conformation polymorphism, SSCP) i molekularnim kloniranjem potvrdili su 14 SLA-DRB1 i devet SLA-DQA alela. Identificirali su četiri nova alela za DQA, (GenBank pristupni brojevi: HM008962-HM008965), i sedam novih alela za DRB1, (GenBank pristupni brojevi: HM008966-HM008972). DRB1 lokus pokazao je veću nukleotidnu i aminokiselinsku varijabilnosti od DQA. Raznolikost nukleinskih i aminokiselinskih sljedova u peptid vezajućoj regiji su bile manje izraženije u DQA. Na DQA lokusu su pronašli 11 varijabilnih mjesta na nukleinskim i 7 varijabilnih mjesta na aminokiselinskim sljedovima. Kod DRB1 lokusa su pronašli 27 varijabilnih mjesta na nukleotidnim sljedovima i 12 varijabilnih mjesta na aminokiselinskim sljedovima. Procjena vrijednosti heterozigotnosti pokazala je da su sve populacije, osim domaće Danbred pasmine, pokazale niže razine heterozigotnosti od očekivanog. Razlika između alela DRB1 lokusa grčke i europske populacije divljih svinja bila je veća od one promatrane između divljih svinja i domaćih populacija svinja.

Barbisan i sur. (2009) su istraživali četiri populacije divljih svinja, dvije porijeklom iz Italije, jednu iz Mađarske i jednu iz Poljske. Populacije su bile izabrane na temelju geografske lokacije, različitog stupnja izolacije i na temelju činjenice da je umjetna introgresija zabilježena u grupi divljih svinja iz Italije. Poznato je da je populacija divljih svinja iz Italije (prethodno klasificirana, *Sus scrofa majori*) križana s divljim populacijama uvezenim iz središnje Europe (prethodno klasificirana, *Sus scrofa scrofa*), te je puštena u svrhu lova (Vernesi i sur. 2003). Analizirali su vrlo polimorfan odsječak gena DRB1 svinjskog leukocitnog antigena (SLA) skupine II, koji je uključivao intron 1 i egzon 2, pomoću izravnog

sekvenciranja i molekularnog kloniranja. Dobiveno je ukupno 18 različitih sljedova u 57 jedinki. Visoki omjer nesinonimnih supstitucija naspram sinonimnih pronađen u peptid vezajućoj regiji je potkrijepio hipotezu o postojanju balansirajuće selekcije na istraživanom lokusu. Duplikacija DRB1 gena je zabilježena samo u jednoj populaciji iz Italije. Također je zabilježena visoka in vitro rekombinacijska stopa kod DRB1 eksona 2, čije moguće objašnjenje se povezuje s prisutnošću "chi-like" regije. "Chi-like" sljedovi su tako nazvani zbog homologije s "chi" slijedom (ACCGAGCTGGGGCGG), koji je poznati kao mogući rekombinacijski signal u bakterijama i vjerojatno igra ulogu kao „hotspot“ homologne rekombinacije u bakterije *Escherichia coli* (Longeri i sur. 2002). "Chi-like" slijed je prisutan u svim DRB genima kralježnjaka. Analiza cjelokupnog odsječka DNA, uključujući i djelomičnu regiju introna, otkrila je 88 promjenjivih mjesta koja definiraju 18 alela. Dva alela su bila zabilježena u rezervatu Castelporziano, 11 u Firenci, deset u Mađarskoj i devet u Poljskoj. Regija egzona pokazivala je 63 polimorfni mjesta, uključujući 30 tranzicija i 41 transverziju. U peptid vezajućoj regiji, stopa nesinonimnih supstitucija (dN) bila je 1,44 puta veći od stope sinonimnih supstitucija (dS). Takav rezultat ukazuje da je lokus DRB1 bio pod djelovanjem balansirajuće selekcije, koja favorizira nove varijante alela i povećava alelni polimorfizam.

## 1.4 Uključenost MHC sustava u parazitološka istraživanja

Postoje mnoga istraživanja odnosa između parazitskih bolesti i raznolikosti MHC sustava njihovih domaćina. Takav odnos može doprinjeti razumijevanju širenja određene parazitske bolesti i u konačnici pridonjeti sprječavanju njezinog daljnjeg širenja, što je od velikog značaja i za ljude.

Paraziti svojom prisutnošću u populacija divljih životinja utječu na fitnes i njihovo preživljavanje. Prirodne populacije se moraju konstantno boriti sa nepredvidljivošću uvjeta njihovog prirodnog okruženja. Stoga su zarazne bolesti glavni demografski i evolucijski pokretač unutar prirodnih populacija. Rezistencija domaćina na određenog parazita ovisi i o određenim genskim komponentama. Jednu od takvih komponenta čini i MHC sustav kralježnjaka.

Radwan i sur. (2009) u svom radu opisuju način na koji MHC raznolikost utječe na otpornost prema parazitskim bolestima, te na uspješnost imunološkog sustava da se obrani od određene bolesti. Navode kako gubitak genetičke varijacije dovodi do povećanja osjetljivosti populacije na patogene i do smanjenja varijacija gena odgovornih za pokretanje imunskog odgovora. MHC molekule su odgovorne za prikazivanje antigena patogena efektornim stanicama i za aktiviranje imunskog sustava, dok se MHC geni smatraju najvarijabilnijim funkcionalnim genima u genomu kralježnjaka. Njihova raznolikost omogućuje adaptacije, dok njezino održavanje uglavnom proizlazi iz balansirajuće selekcije. Dokazi da gubitak raznolikosti MHC gena negativno utječe na opstanak vrste često su dvosmisleni te ih je teško odvojiti od posljedica parenja bliskih srodnika. Neke vrste sa smanjenom raznolikošću MHC molekula pokazuju povećanu osjetljivost na bolesti, dok druge vrste napreduju i šire se unatoč teškim efektima „uskog grla“ koji su drastično ograničili njihovu MHC raznolikost. Takve vrste pokazuju primjer preživljavanja unatoč gubitku MHC raznolikosti te da ona nije uvijek presudna za preživljavanje populacije.

O'Brien i Evermann (1988) su zabilježili visoku osjetljivost na bolesti kod geparda (*Acinonyx jubatus*) i drugih vrsta zbog toga što su te vrste pretrpile veliko smanjenje brojnosti svojih populacija, prošle su kroz „usko grlo“. Smatraju da je efekt uskog grla mogući razlog



gubitka raznolikosti MHC gena. Kod populacija koje su prošle kroz usko grlo rijetki aleli mogu biti izgubljeni zbog utjecaja jakog genetičkog drifta. Također dokazano je da neki aleli ne mogu stvoriti potreban imunološki odgovor na određene genotipove parazita u svrhu obrane organizma. Ako preostali aleli, populacije domadara koja je prošla kroz „usko grlo“, još uvijek posjeduju sposobnost vezanja antigena širokog spektra patogena njihova osjetljivost na različite parazitske bolesti nije povećana (Hedrick 2003).

Kao jedan od domaćina parazitima, divlja svinja predstavlja dobar model za proučavanje parazitskih bolesti. Neke od bolesti koje nalazimo u svinja su: giardijaza, kriptosporidioza, toksoplazmoza, sarkocistoza, blastocistoza, trihinelozna, askarijaza (Olson i Guselle 2000).

## **1.5 Cilj istraživanja**

Cilj ovog istraživanja je otkriti imunogenetičku raznolikost u populacija divlje svinje s područja Medvednice analizom lokusa DRB1 glavnog sustava tkivne podudarnosti. Rezultati ovog istraživanja će poslužiti za daljna istraživanja korelacija između MHC haplotipova i specifičnih parazitskih bolesti divljih svinja, što će u konačnici pridonijeti razumijevanju koevolucije domaćina i patogena i održavanja genetičke raznolikosti u populacijama životinja.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1 Uzorci tkiva

U svrhu istraživanja u ovom radu korišteni su uzorci tkiva divljih svinja, stradalih izlovom, s područja Medvednice. Uzorci su dobiveni od Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Korišteno je ukupno 60 uzoraka mišićnog tkiva. Drugi broj u oznaci jedinke predstavlja broj lovišta. Od ukupno 60 uzoraka, uspješano je sekvencionirano 49 uzoraka. Kod 11 uzoraka ponavljanjem postupka PCR nismo uspjeli umnožiti DNA, te samim time nismo mogli odrediti alele DRB1 lokusa. Najvjerojatniji uzrok neuspjelog PCR-a je prevelika ili premalena koncentracija DNA u uzorcima, te moguće postojanje mutacija na veznim mjestima početnica (nul-aleli).

Tablica 1. Uzorci tkiva divlje svinje (*Sus scrofa*) s područja Medvednice

Oznaka jedinke	Datum pronalaska	Dob	Spol	Masa/kg
M1/1DS	22.10.2012.	zrelo	Ž	115
M2/1DS	24.10.2012.	mlado	M	52
M5/1DS	20.12.2012.	zrelo	Ž	122
M7/1DS	22.02.2013.	zrelo	M	90
M13/1DS	17.01.2014.	mlado	Ž	62
M1/2DS	17.10.2012.	mlado	M	45
M2/2DS	22.10.2012.	mlado	M	24
M3/2DS	26.10.2012.	zrelo	Ž	
M4/2 DS	19.12.2012.	zrelo	Ž	138
M5/2 DS	19.12.2012.	pomladak	M	28
M6/2 DS	09.01.2013.	mlado	Ž	54
M7/2DS	30.01.2013.	pomladak		54
M10/2DS	04.09.2013.	srednjodobno	M	105
M12/2DS	09.01.2014.	srednjodobno	Ž	110
M13/2DS	09.01.2014.	mlado	Ž	70
M2/3DS	16.10.2012.	pomladak	M	38
M3/3DS	26.11.2012.	zrelo	Ž	115
M4/3DS	28.11.2012.	mlado	M	60
M6/3DS	22.02.2013.	pomladak	Ž	60
M7/3DS	29.08.2013.	mladunčad	Ž	42
M9/3DS	11.09.2013.	mlado	M	47
M10/3DS	12.12.2013.	zrelo	Ž	110
M12/3DS	13.02.2014.	mladunčad	M	33
M1/4DS	16.10.2012.	mlado	M	35
M2/4 DS	21.12.2012.	mlado	Ž	58

<b>M3/4DS</b>	28.01.2013.			
<b>M4/4DS</b>	19.02.2013.	pomladak	M	47
<b>M5/4DS</b>	19.02.2013.	zrelo	M	121
<b>M6/4DS</b>	02.09.2013.	zrelo	M	75
<b>M7/4DS</b>	10.01.2014.			
<b>M8/4DS</b>	24.02.2014.	mlado	Ž	70
<b>M9/4DS</b>	10.03.2014.	mlado	M	70
<b>M10/4DS</b>	19.03.2014.	pomladak	Ž	43
<b>M1/5DS</b>	22.10.2012.	mladunčad	M	24
<b>M2/5DS</b>	23.10.2012.	zrelo	Ž	85
<b>M4/5DS</b>	04.12.2012.	mlado	Ž	
<b>M5/5DS</b>	22.01.2013.	mlado	M	57
<b>M6/5DS</b>	28.01.2013.	mlado	M	38
<b>M7/5DS</b>	30.01.2013.	zrelo	M	120
<b>M8/5DS</b>	19.02.2013.	pomladak	M	22
<b>M10/5DS</b>	17.09.2013.	zrelo	M	107
<b>M11/5DS</b>	17.09.2013.	srednjodobno	M	79
<b>M12/5DS</b>	09.10.2013.	zrelo	Ž	95
<b>M13/5DS</b>	10.10.2013.	zrelo	M	107
<b>M14/5DS</b>	06.12.2013.	zrelo	Ž	96
<b>M1/6DS</b>	24.01.2013.	mlado	Ž	60
<b>M2/6DS</b>	24.01.2013.	mlado	M	65
<b>M3/6DS</b>	30.01.2013.	zrelo	Ž	120
<b>M4/6DS</b>	03.04.2013.	zrelo	M	160
<b>M1/7DS</b>	10.10.2012.	mlado	M	71.5
<b>M2/7DS</b>	04.12.2012.	mlado	M	48
<b>M5/7DS</b>	28.03.2013.	zrelo	M	139
<b>M6/7DS</b>	28.03.2013.	pomladak	M	66
<b>M7/7DS</b>	28.03.2013.	mladunčad	Ž	25
<b>M8/7DS</b>	18.09.2013.	mlado	M	40
<b>M9/7DS</b>	23.09.2013.	mlado	Ž	81
<b>M11/7DS</b>	09.01.2013.	zrelo	M	127
<b>M12/7DS</b>	09.01.2013.	pomladak	Ž	45
<b>M14/7DS</b>	14.01.2014.	srednjodobno	M	117
<b>M15/7DS</b>	27.01.2014.	srednjodobno	M	112

## 2.2 Izolacija DNA

Korištenjem komercijalnog paketa *Wizard Genomic DNA Purification Kit*, tvrtke Promega, napravljena je izolacija. Najprije smo u 1,5 ml Eppendorf epruvetu odpipetirali 300  $\mu$ l *Nuclei Lysis Solution* otopine. Komadić mišićog tkiva, usitnjen na Petrijevoj posudi, smo dodali u epruvetu, prethodno napunjenu otopinom. Zatim smo dodali 1,5  $\mu$ l proteinaze K (20mg/ml) te se epruveta vorteksira jednu minutu. Nadalje smo ostavili epruvetu da se inkubira na 55 °C preko noći. Sljedeći dan epruvetu, vorteksirana jednu minutu, smo stavili

na hlađenje na sobnu temperaturu te smo u nju dodali 100  $\mu$ l *Protein Precipitation Solution*. Nakon što je epruveta snažno vorteksirana 20 sekundi, stavili smo je na led pet minuta. Potom smo sadržaj epruvete centrifugirali tri minute na 13.000 rpm, čime je nastao talog proteina dok se DNA nalazila u supernatantu. U nove 1,5 ml označene epruvete odpipetirali smo 300  $\mu$ l 100% etanola, te smo potom u nju dodali supernatant u kojemu se nalazi DNA. Okretanjem tubica pažljivo smo promiješali sadržaj tubice, koji smo zatim stavili na centrifugiranje jednu minutu na 13.000 rpm. Nakon centrifugiranja supernatant smo dekantirali, a u epruvetu smo zatim dodali 300  $\mu$ l 70% etanola, te smo epruvetu pažljivo promiješali. Potom je epruveta centrifugirana jednu minutu na 13.000 rpm, nakon čega smo odlijali supernatant. Zatim smo epruvetu preokrenuli i stavili jedan sat na sušenje na čisti filter papir. U prethodno osušenu epruvetu dodali smo 100  $\mu$ l *DNA Rehydration Solution*. Potom smo ostavili epruvetu na inkubaciju jedan sat na sobnoj temperaturi. DNA dobivenu izolacijom smo spremili u hladnjak na 4 °C.

### 2.3 Lančana reakcija polimerazom

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) umnožili smo odsječak genomske DNA, točnije egzon 2 DRB1 lokusa. U svrhu umnožavanja korištene su nizvodna 5' GACGAGTGTCATTTCTTCAACG 3' i uzvodna 5' GGCACCAGGAATGTATCCAA 3' početnica (Moutou i sur. 2013) u koncentraciji od 0,5  $\mu$ M. Koristili smo komercijalni komplet *HotStarTaq Plus DNA Polymerase od Qiagena*, koji sadrži *Taq Plus PCR*, *Master Mix* i vodu. Za svaku PCR reakciju koristili smo ukupni volumen od 40  $\mu$ l. Reakcijska otopina za PCR sadržavala je 20  $\mu$ l *Master Mix*a, 4  $\mu$ l uzvodne početnice, 4  $\mu$ l nizvodne početnice, 4  $\mu$ l uzorka, dok je ostatak volumena zauzimala voda. Početnice su sintetizirane na temelju rada Moutoue i sur. (2013). PCR rađen u svrhu potvrde uspješnosti molekularnog kloniranja također smo radili uz pomoć komercijalnog kompleta *HotStarTaq Plus DNA Polymerase* tvrtke Qiagena. Radili smo u ukupnom volumenu od 8  $\mu$ l. Reakcijska otopina za PCR sadržavala je 4  $\mu$ l *MasterMix*a, 0,8  $\mu$ l nizvodne početnice, 0,8  $\mu$ l uzvodne početnice, 0,8  $\mu$ l boje (*CoralLoad PCR Buffer*), 0,5  $\mu$ l uzorka, dok je preostali dio volumena zauzimala voda.

## 2.4 Elektroforeza

Proces elektroforeze korišten je u svrhu potvrde prisutnosti PCR produkta. Nanosili smo PCR produkt na 1% agarozni gel. 1%-tni agarozni gel dobili smo otapanjem prethodno izvaganog 1 g agaroze u 100 mL 0,5 X TBE pufera. Smjesu smo zagrijavali na Bunsenovom plameniku sve do vrenja, dok nismo dobili čistu otopinu bez vidljivih zrnaca agaroze. U otopinu agara dodali smo 10 µL SYBR@Safe boje. Otopinu smo izlili u kalup za veliki gel, potom smo provjerili da nisu nastali mjehurići prilikom izlijevanja, te smo postavili češalj za jažice. Ostavili smo gel da se ohladi 20 minuta na sobnoj temperaturi. Proces elektroforeze odvijao se na naponu od 200V u vremenskom periodu od 30 minuta. Nakon elektroforeze promatrali smo gel pod UV svjetlom.

## 2.5 Sekvenciranje

Uspješno umnožene PCR uzorke slali smo na sekvenciranje u Macrogen servis putem pošte. Korištena je njihova usluga "Standard-seq single Regular", dok su početnice također sintetizirane u servisu i korištene su iste početnice tijekom cijele izrade diplomskog rada. Sekvenciranje se provodilo iz oba smjera, korištenjem nizvodne i uzvodne početnice.

## 2.6 Molekularno kloniranje

Prvi dan molekularnog kloniranja radili smo pročišćivanje te ligaciju. Prije toga smo umnožili egzon 2 DRB1 lokusa uz pomoć PCR-a. Zatim je rađena elektroforezom kako bismo provjerili uspješnost PCR reakcije. Označili smo kolone s tubicama iz kita Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System od Promega. Odpipetirali smo 37 µl otopine *Membrane Binding Solution* u PCR produkt, čiji volumen je također iznosio 37 µl.

U prethodno označene kolone s tubicama, odpipetirali smo sadržaj otopine *Membrane Binding Solution* i PCR produkta u kolonu, pazeći da pritom ne oštetimo membranu kolone. Zatim smo pustili da se kolone s tubicama inkubiraju jednu minutu na sobnoj temperaturi, pa smo potom centrifugirali sadržaj tubice 14.000 rpm jednu minutu. Odpipetirali smo u kolonu 700 µL otopine *Membrane Wash Solution*, te stavili kolonu s tubicom ponovno centrifugirati

na jednu minutu na 14.000 rpm. Potom smo izvadili kolonu, odlili tekućinu iz tubice i vratili kolonu u tubu. Odpipetirali smo u kolonu 500  $\mu\text{L}$  *Membrane Wash Solution*, te centrifugirali pet minuta na 14.000 rpm. Izvadili smo kolonu, pazeći da pritom tekućina ne ispere sadržaj staložen na membrani kolone, te izlili tekućinu iz tube i vratili kolonu u tubu. Potom smo centrifugirali kolonu s tubom jednu minutu na 14.000 rpm bez metalnog poklopca. Označili smo tubice od 1,5 ml oznakom jedinice, u koje smo prebacili kolonu. Odpipetirali smo 20  $\mu\text{L}$  *Nuclease-Free Water*, pazeći pritom da tekućina prekrije čitavu membranu kolone. Potom smo sadržaj inkubirali jednu minutu pri sobnoj temperaturi. Zatim smo provjerili prisutnost DNA u otopini elektroforezom.

Također prvog dana molekularnog kloniranja radili smo ligacijsku reakciju. Kako bi mogli provesti uspješno spajanje (ligaciju) PCR proizvoda sa plazmidom, morali smo naprije izračunati količinu PCR proizvoda koju ćemo dodati u reakcijsku smjesu. Dozvoljeni omjer inserta i vektora su od 8/1 do 1/8. Takav omjer utvrdili smo nakon provedenog pročišćavanja PCR produkta, kojeg smo zatim zajedno s DNA poznate koncentracije podvrgnuli elektroforezi. Prema jednadžbi dobivenoj u protokolu:

$$[(\text{masa vektora (ng)} * \text{duljina odsječka (kb) inserta})] \div \text{duljina vektora(kb)} * \text{molarni omjer (insert} \div \text{vektor)} = \text{masa inserta(ng)}$$

odredili smo koliko PCR produkta moramo dodati u ligacijsku smjesu.

Molarni omjer prema preporuci proizvođača iznosi 3:1, pri čemu je koncentracija vektora 50 ng/ $\mu\text{L}$ , veličina vektora 3 kb, a duljina inserta oko 200 parova baza (0.2 kb).

$$[(50 \text{ ng vektora} * 0,2 \text{ kb inserta})] \div 3 \text{ kb vektora} * (3 \div 1) = 10 \text{ ng inserta}$$

Pomoću gore navedene jednadžbe izračunali smo masu inserta. Kako bi odredili volumen koji trebamo umješati u ligacijsku reakciju, pomoću intenziteta vrpce u gelu pod UV svjetlom odredili smo približnu koncentraciju DNA u PCR produktu. Zatim smo preko jednadžbe  $c = m/V$  izračunali potreban volumen za reakcijsku smjesu. Volumen inserta je iznosio 1,5  $\mu\text{L}$ . Nakon toga smo započeli s ligacijskom reakcijom. U epruvetu od 0,2 mL odpipetirali smo 5  $\mu\text{L}$  pufera za brzu ligaciju (*Rapid Ligation Buffer*), 1  $\mu\text{L}$  pGEM®-T

plazmida, 1  $\mu$ l T4 DNA ligaze, pročišćeni PCR proizvod i dok je ostatak volumena do 10  $\mu$ l zauzimala voda. Zatim smo ligacijsku smjesu ostavili na 4 °C preko noći.

Drugi dan molekularnog kloniranja radili smo transformaciju bakterija, točnije soj JM109 bakterije *Escherichia coli*. Epruvete s ligacijskom smjesom pripremljene prvog dana molekularnog kloniranja kratko smo centrifugirali. Zatim smo po 2  $\mu$ l ligacijske smjese odpipetirali u 1,5 ml epruvete. Potom smo epruvete sa bakterijskim stanicama stavili 5 minuta na led te ih lagano protresli. Otpipetirali smo po 50  $\mu$ l bakterijskih stanica u epruvete s ligacijskom smjesom. Nakon toga smo lagano pomješali epruvete te ih stavili 20 minuta na led, potom 45 sekundi u vodenu kupelj na 42 °C, te ponovno 2 minute na led. Zatim smo u epruvete dodali 950  $\mu$ l tekućeg LB medija na sobnoj temperaturi. Zatim je uslijedila inkubacija od 1,5 sati na 37°C uz miješanje. Tekući LB medij, kojeg smo koristili sljedeći dan kod prijenosa kolonija, je pripremljen sa istim sastavom kao i kruti medij, samo što u njega nismo dodavali agar. Sadržaj epruveta volumena od 100  $\mu$ l odpipetirali smo na prethodno pripremljene Petrijeve zdjelice sa 30 mL krute hranjive podloge, te je uslijedila inkubacija 24 sata na 37°C. Za svaku reakciju potrebno je pripremiti po dvije Petrijeve zdjelice, te po jedna Petrijeva zdjelica za pozitivnu i negativnu kontrolu. Hranjivu podlogu, za rast bakterija, sastojala se od: 10 g tryptona, 5 g yeast extracta, 5 g NaCl, 15 g agara, dok je konačna pH vrijednost bila podešena na 7,0. Zatim je medij autoklaviran 20 minuta, nakon čega smo pričekali da se ohladi te se u njega dodali 100  $\mu$ l/ml ampicilina. Zatim smo u steriliziranim uvjetima, ispod plamenika, na Petrijeve zdjelice dodali 100  $\mu$ l IPTG-a koncentracije 100 mM i 20  $\mu$ l X-Gal-a koncentracije 50 mg/ml, te smo zdjelice ostavili 30 minuta na 37°C da se smjesa upije u podlogu.

Treći dan molekularnog kloniranja rađen je postupak prijenosa bijelih kolonija bakterija u označene epruvete. Odabir bakterija radi se na temelju dviju razina selekcije: otpornosti na ampicilin i plavo-bijele selekcije. U hranjivu podlogu za rast bakterija dodajemo antibiotik ampicilin. pGEM®-T plazmid nosi dio *lacZ* gena i sadrži gen za rezistenciju na ampicilin. Ukoliko se plazmid ugradi u bakterijsku stanicu, steći će otpornost na ampicilin te će moći rasti na hranjivoj podlozi. Odabir kolonija bakterija koje sadrže plazmid s ugrađenim DNA odsječkom temelji se na plavo-bijeloj selekciji. Odsječak DNA se ugrađuje u plazmid unutar gena za enzim  $\beta$ -galaktozidazu, čiji je supstrat X-Gal. Bakterije na podlozi s IPTG-om i X-Gal-om uz  $\beta$ -galaktozidazu mogu razgrađivati X-Gal, te se takva reakcija očituje plavim obojenjem. Nakon ugradnje DNA odsječka u plazmid unutar kodirajuće regije za  $\beta$ -



galaktozidazu, bakterija neće imati funkcionalni gen za  $\beta$ -galaktozidazu te neće razgrađivati X-Gal u podlozi, i nastati će bijelo obojenje. Prethodno se u 10 označenih epruveta odpipetira 5 ml tekućeg LB medija. Bakterije smo uzimali iz Petrijevih zdjelica. Po jednu koloniju bijelih bakterija smo prenosili u jednu epruvetu, pazeći pritom da ezom ne zahvatimo više kolonija zajedno. Također je pritom potrebno pažljivo spaliti ezu na plameniku kako dio kolonije bakterija ne bi ostao na njoj. Zatim smo stavili epruvete na inkubaciju preko noći na 37°C uz lagano miješanje. Takvim postupkom smo umnožili broj bakterija koje sadrže plazmide sa istraživanim insertom, egzonom 2 DRB1 lokusa. Sljedeće je provedena izolacija plazmida iz bakterija i njihovo pročišćavanje.

Kako bi proveli postupak uklanjanja bakterija, najprije smo centrifugirali epruvete 5 minuta na 2.000 rpm. Potom smo odlili supernatant te epruvetu lagano prislonili na filter papir kako bi se upio ostatak supernatanta. Pripremili smo i označiti 10 tubica od 1.5 ml. Odpipetirali smo 250 $\mu$ L *Cell Resuspension Solution* u velike epruvete te dobro resuspendirali suspenziju pazeći da pritom ne stvaramo mjehuriće. Sadržaj velike epruvete, čiji je volumen iznosio oko 280 $\mu$ L, smo odpipetirali u prethodno označene eppendorf tubice od 1.5ml. Namjestili smo štopericu na 5 minuta, te smo započeli sa pipetiranjem 250  $\mu$ l otopine Cell Lysis Solution. Nakon što smo završili s pipetiranjem pažljivo smo promiješali sadržaj tubice okretanjem tubice četiri puta i pričekali smo da vremenski period od 5 minuta prođe. Zatim smo ponovo namjestili štopericu na 5 min te smo odpipetirali u svaku tubicu po 10 $\mu$ l otopine *Alkaline Protease Solution*. Sadržaj tubice smo pažljivo promiješali okretanjem tubice 4 puta te smo pričekali da prođe vremenski period od 5 minuta. Potom smo odpipetirali 350 $\mu$ L otopine *Neutralization Solution* u tubicu te ponovo promiješali sadržaj okretanjem tubice četiri puta. Tubice smo stavili na centrifugiranje 10 minuta na 14.000 rpm. Pripremili smo i označili kolone i nove tubice od 1.5 ml sa oznakama uzoraka. Zatim je uslijedio postupak purifikacije. Najprije smo supernatant odlili u kolonu, te bacili tubicu od 1.5 ml. Kolonu s tubom smo centrifugiraj 1 minutu na 14.000 rpm. Ostatak tekućine spušten nakon centrifugiranja u tubu smo odlili te smo vratili kolonu u tubu. Odpipetirali smo u 750 $\mu$ L *Column Wash Solution* stavili kolonu s tubom na centrifugiranje 1 minutu na 14.000 rpm. Izvadili smo kolonu te odlili tekućinu iz tube i vratili kolonu u tubu. Potom smo odpipetirali 250 $\mu$ L otopine *Column Wash Solution*, te stavili na centrifugiranje 2 minute. Ostatak tekućine u tubi smo dekantirali dok smo kolonu prebaci u novu tubicu od 1.5 ml. U zadnjem koraku odpipetirali smo 50 $\mu$ L *Nuclease Free Water* te smo centrifugirali 1 minutu na 14.000 rpm. Bacili smo kolonu dok

smo tubicu s plazmidom spremili u hladnjak na 4 °C. Uspješnost postupka molekularnog kloniranja provjerili smo elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

## **2.7 Računalna obrada**

### **2.7.1 *BioEdit***

*BioEdit* (Hall 2004) je računalni program korišten za uređivanje i poravnanje nukleinskih i aminokiselinskih sljedova. Posjeduje osnovne funkcije za uređivanje, poravnanje, manipulaciju i analizu sljedova proteina i nukleinskih kiselina. Nakon što smo preuzeli nazive alela iz *GenBanka*, te ih spremili u zajednički word dokument, unijeli smo sljedove u *BioEdit*. Koristili smo opciju programa za poravnanje sljedova. Na taj način smo izradili knjižnicu za DRB1 alele, korištenu kod daljnje analize.

### **2.7.2 *SeqScape*®**

*SeqScape* (*Applied Biosystems* 2004) je program napravljen za otkrivanje mutacija, analize polimorfizama jedne baze, analiza, subtipizaciju patogena, identifikaciju alela i potvrđivanje sljedova. Najprije smo u programu stvorili novi projekt, nazvavši ga SusDRB1, gdje smo unijeli knjižnicu poznatih alela DRB1 lokusa. Nakon dobivenih rezultata sekvenciranja 49 uzoraka koje smo unijeli u *SeqScape*, analizirali smo i određivali koje alele nosi pojedina jedinka. Za jedan uzorak smo pretpostavili da nosi jedinstveni alel (alel koji se pojavio samo u te jedinke, koja je uz to bila heterozigot). Uz to elektroferogram tog alela nije bio dobro čitljiv, te smo ga odabrali za kloniranje (uzorak: M2/3DS).

### 2.7.3 MEGA

MEGA (Tamura i sur. 2013) je program korišten u svrhu komparativne analize DNA i proteinskih sljedova, čiji cilj je otkrivanje molekularno-evolucijskih obrazaca gena, genoma i vrste kroz vrijeme. Također program omogućuje stvaranje molekularno evolucijskih stabala kroz određeni vremenski period, što olakšava otkrivanje divergencijskog vremena vrste, soja i dupliciranih gena. Program MEGA koristili smo u svrhu određivanja ukupnog broja varijabilnih mjesta na svim nukleotidnim sljedovima sekvenciranih MHC alela, najpogodnijeg modela za nukleotidne i aminokiselinske supstitucije za istraživani lokus DRB1, procjenu nukleotidnih i aminokiselinskih evolucijskih udaljenosti, te za izračun broja nesinonimnih i sinonimnih nukleotidnih supstitucija. Primjenom Z-testa selekcije odredili smo tip selekcije na istraživanom DRB1 lokusu.

### 2.7.4 Vezna mjesta

Svaka jedinka posjeduje određeni broj različitih MHC molekula. Kako bi se stvorio imunološki odgovor na različite vrste patogena, svaka MHC molekula mora biti u mogućnosti vezati i prikazati velik broj različitih antigena. Posljedica polimorfnosti gena, posebice aminokiselinskih ostataka koje sudjeluju u stvaranju receptora antigena, je mogućnost prepoznavanja različitih patogena, a time i pokretanja adaptivnih imunskih odgovora na njih.

Vezno mjesto MHC molekule skupine II čine domene  $\alpha 1$  i  $\beta 1$ , koji vežu dijelove antigena veličine od 13 do 18 aminokiselina. Kod DRB1 lokusa aminokiseline  $\beta 1$  domene sudjeluju u stvaranju veznih mjesta za antigen (PBR). Moutou i sur. (2013) u svom radu navode da postoji ukupno šest aminokiselinskih ostataka koji sudjeluju u stvaranju džepa P4, pet aminokiselinskih ostataka koji sudjeluju u stvaranju džepa P7, jedan aminokiselinski ostatak koji sudjeluje u stvaranju džepa P6, dva aminokiselinska ostatka koji sudjeluju u stvaranju džepa P9 i jedan aminokiselinski ostatak koji sudjeluje u stvaranju džepa P1 (Slika 3). Svaki alel kodira za određenu kombinaciju veznih džepova.

### 3. REZULTATI

#### 3.1 Aleli divljih svinja

Za izradu ovog diplomskog rada istraživala sam ukupno 60 uzoraka mišićnog tkiva divljih svinja. Od 60 uzoraka uspješno je analizirano njih 49, dok za 11 preostalih uzoraka nisam uspjela dobiti PCR produkte. U istraživanom uzorku pronađeno je sedam Susc-DRB1 alela od kojih je šest alela poznato otprije, iz ranijih istraživanja na divljim svinjama, dok je jedan alel novootkriveni Susc-DRB\*02 (Tablica 2). Najučestaliji je alel Susc-DRB\*01, koji se u uzorku nalazi s učestalošću od 39,79%. Iza njega slijedi alel Susc-DRB\*02 s učestalošću od 21,42%. Ostali aleli se nalaze s učestalošću manjom od 20%. Najmanje učestali alel je Susc-DRB\*07 s učestalošću od 1%, koji sam pronašla u samo jedne jedinke DS M2/3 koja je heterozigot (Tablica 2). Kod populacije pronađeno je ukupno 11 heterozigotnih jedinki (22,4%), dok je ukupno bilo 38 homozigotnih jedinki (77,5%).

Među pronađenim alelima utvrdila sam 40 varijabilnih nukleotidnih mjesta od 198 (20,2%), te 20 varijabilnih amonikiselinskih mjesta od 66 (30,3%). U tablici 3 i slici 3 prikazala sam nukleotidni i aminokiselinski slijed pronađenih alela eksona 2 DRB1 lokusa. Aminoiseline  $\beta$ 1 domene sudjeluju u stvaranju veznih mjesta za antigen (PBR) i tvore džepove u koje se smjeste dijelovi antigenskog peptida (Moutou i sur. 2013). Aleli Susc-DRB1\*06 i Susc-DRB\*07 kodiraju za jednaki aminokiselinski slijed, dok ostali aleli kodiraju za jedinstvene aminokiselinske slijedove (Slika 3). U tablici 4 su prikazane sve jedinke s pripadajućim genotipovima DRB lokusa.

Tablica 2. Učestalost pojedinih alela egzona 2 DRB1 u divlje svinje (*Sus scrofa*) s područja Medvednice; novootkriveni alel označeni je sivom pozadinom

Ime alela	Učestalost	Apsolutni broj	Broj homozigotnih jedinki	Naziv alela iz rada Moutou i sur.	GenBank pristupni brojevi	Naziv alela iz IPD-MHC Database
Susc-DRB*01	0,3979	39	18		BE232509	DRB1*0101
Susc-DRB*02	0,2142	21	8		AF272729*	DRB1*05sp06
Susc-DRB*03	0,1836	18	7	SLA-DRB1*02	Z26641	DRB1*0201
Susc-DRB*04	0,0816	8	3		CJ030292	DRB1*1001
Susc-DRB*05	0,0612	6	1	SLA-DRB1*08	HM008966	
Susc-DRB*06	0,0510	5	1		CB286464	DRB1*0603Q
Susc-DRB*07	0,0102	1	0		BE232674	DRB1*0603Q

\*najbližiji slijed, razlikuje se u četiri nukleotida od alela Susc-DRB\*02

Tablica 3. Nukleotidni slijed egzona 2 DRB1 alela divlje svinje (*Sus scrofa*) s područja Medvednice; novootkriveni alel označeni je sivom pozadinom

Ime alela	Nukleotidni slijed											Položaj																
Susc-DRB*01	G	G	G	A	C	C	G	A	G	C	G	G	T	T	A	T	T	G	C	A	G	A	A	G	C	A	G	[ 33]
Susc-DRB*02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	[ 33]
Susc-DRB*03	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	[ 33]
Susc-DRB*04	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	[ 33]
Susc-DRB*05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	[ 33]
Susc-DRB*06	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	[ 33]
Susc-DRB*07	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	[ 33]
Susc-DRB*01	T	A	C	T	A	T	A	A	C	G	G	A	G	A	G	C	A	C	G	T	G	C	G	C	T	T	C	[ 66]
Susc-DRB*02	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	[ 66]

Susc-DRB*03	... .. TT. C.. ..	[ 66]
Susc-DRB*04	... .. AT. T.. ..T	[ 66]
Susc-DRB*05	... .. TT. C.. ..	[ 66]
Susc-DRB*06	.TG ... .. TT. ... ..	[ 66]
Susc-DRB*07	.TG ... .. TT. ... ..	[ 66]
Susc-DRB*01	AGC GAC GTG GGC GAG TAC CGG GCG GTG ACC GAG	[ 99]
Susc-DRB*02	... .. .T. ... ..	[ 99]
Susc-DRB*03	... ..	[ 99]
Susc-DRB*04	... .. .T ...	[ 99]
Susc-DRB*05	... ..	[ 99]
Susc-DRB*06	... .. T.. ... .. .T. ... ..	[ 99]
Susc-DRB*07	... .. T.. ... .. .T. ... ..	[ 99]
Susc-DRB*01	CTG GGG CGG CCA GAC GCC AAG TAC TGG AAC AGC	[132]
Susc-DRB*02	... .. .T TT. ... .. G..	[132]
Susc-DRB*03	... .. G.. ... ..	[132]
Susc-DRB*04	... .. .A ... .. G.. ... ..	[132]
Susc-DRB*05	... .. G.. ... ..	[132]
Susc-DRB*06	... ..	[132]
Susc-DRB*07	... ..	[132]
Susc-DRB*01	CAG AAG GAC CTC CTG GAG CAG ATG CGG GCG GCG	[165]
Susc-DRB*02	... .. T.. ... .. G.C TCA ... ..C T.A	[165]
Susc-DRB*03	... .. .G. ... .. .A.	[165]
Susc-DRB*04	.G. ... .. A.. ... .. .G. ... .. .A.	[165]
Susc-DRB*05	... .. T.. ... .. .GA ... ..	[165]
Susc-DRB*06	... .. A.. ... .. .A. ... .. .T.	[165]
Susc-DRB*07	... .. A.. ... .. .A .A. ... .. .T.	[165]
Susc-DRB*01	GTG GAC ACG TAC TGC AGA CAC AAC TAC AGG ATC	[198]
Susc-DRB*02	... .. .T. ... .. .C.	[198]
Susc-DRB*03	... .. C.. ...	[198]
Susc-DRB*04	... ..	[198]
Susc-DRB*05	... ..	[198]
Susc-DRB*06	... ..	[198]
Susc-DRB*07	... ..	[198]



6	DS M3/6	Susc-DRB*04	Susc-DRB*02
3	DS M4/3	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
4	DS M4/4	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
5	DS M4/5	Susc-DRB*03	Susc-DRB*03
6	DS M4/6	Susc-DRB*05	Susc-DRB*01
2	DS M5/2	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
4	DS M5/4	Susc-DRB*02	Susc-DRB*02
7	DS M5/7	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
4	DS M6/4	Susc-DRB*02	Susc-DRB*02
7	DS M6/7	Susc-DRB*06	Susc-DRB*06
1	DS M7/1	Susc-DRB*02	Susc-DRB*02
2	DS M7/2	Susc-DRB*04	Susc-DRB*04
3	DS M7/3	Susc-DRB*02	Susc-DRB*05
4	DS M7/4	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
5	DS M7/5	Susc-DRB*03	Susc-DRB*03
7	DS M7/7	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
4	DS M8/4	Susc-DRB*03	Susc-DRB*01
5	DS M8/5	Susc-DRB*05	Susc-DRB*06
7	DS M8/7	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
3	DS M9/3	Susc-DRB*02	Susc-DRB*02
4	DS M9/4	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
2	DS M10/2	Susc-DRB*03	Susc-DRB*03
3	DS M10/3	Susc-DRB*02	Susc-DRB*02
4	DS M10/4	Susc-DRB*03	Susc-DRB*03
5	DS M10/5	Susc-DRB*06	Susc-DRB*02



5	DS M11/5	Susc-DRB*03	Susc-DRB*03
	DS M11/7	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
5	DS M12/5	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
7	DS M12/7	Susc-DRB*05	Susc-DRB*06
1	DS M13/1	Susc-DRB*03	Susc-DRB*04
2	DS M13/2	Susc-DRB*02	Susc-DRB*02
5	DS M13/5	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
5	DS M14/5	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01
7	DS M14/7	Susc-DRB*04	Susc-DRB*04
	DS M18/5	Susc-DRB*01	Susc-DRB*01

### 3.2 Evolucijska udaljenost

Kako bi procijenila evolucijsku udaljenost među pronađenim alelima koristila sam program MEGA (Tamura i sur. 2013). Usporedbom svih nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova program nam je ponudio 24 različita nukleotidna supstitucijska modela. Odabrala sam preporučeni supstitucijski model i izračunala prema zadanim parametrima. Program odabire najprikladniji model određen prema Bayesovom informatičkom kriteriju. Prosječna nukleotidna evolucijska udaljenost iznosila je 0,1486, dok je prosječna aminokiselinska evolucijska udaljenost iznosila 0,2815 (Tablica 5).

Tablica 5. Broj varijabilnih nukleotidnih mjesta, prosječne nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti i broj jedinstvenih aminokiselinskih sljedova DRB1 alela divlje svinje (*Sus scrofa*) s područja Medvednice. U zagradi je prikazan broj pronađenih alela.

Lokus	Dužina sekvence	Broj varijabilnih mjesta nukleotida	Nukleotidna udaljenost		Aminokiselinska udaljenost		Broj varijabilnih mjesta aminokiselina	Broj jedinstvenih aminokiselinskih sekvenci
			Model nukleotidne supstitucije	d	Model aminokiselinske supstitucije	d		
DRB1 (7)	198	40	JC + G	0,1486	JTT + G	0,2815	20	6

Kratice: d, prosječna vrijednost evolucijskih udaljenosti među alelima; JC, Jukes-Cantor model supstitucije; G, parameter gama distribucije; JTT, Jones-Taylor-Thornton model supstitucije;

### 3.3 Selekcija

Prosječnu stopu nesinonimnih i sinonimnih supstitucija izračunala sam uz pomoć programa MEGA (Tamura i sur. 2013). Takvim izračunom mogli smo odrediti kakav tip selekcije prevladava na analiziranom genskom lokusu kod populacije divljih svinja s područja Medvednice. Nukleotidne supstitucije u kodirajućim regijama klasificirane su kao nesinonimne i sinonimne supstitucije. Dok nesinonimne supstitucije rezultiraju promjenom aminokiseline, kod sinonimne supstitucije aminokiselina se ne mijenja. dN/dS test služi za procjenu selekcijskog pritiska pomoću usporedbe omjera stopa nesinonimnih (dN) i sinonimnih (dS) supstitucija. Omjer dN/dS biti će veći od 1 u slučaju ako je prirodna selekcija usmjerena na promjene u proteinskom slijedu (Kryazhimskiy i Plotkin 2008). U programskom paketu MEGA uz pomoć dN/dS testa utvrđujemo vjerojatnost odbacivanja nulte hipoteze, čija je pretpostavka da je omjer nesinonimnih supstitucija jednak omjeru sinonimnih supstitucija, u korist alternativne hipoteze, čija je pretpostavka da je omjer nesinonimnih supstitucija veći od sinonimnih. Omjer dN/dS u ovom istraživanju je iznosio 0,9859 čime se prihvaća nulta hipoteza (neutralna evolucija), a odbacuje alternativna hipoteza, koja pretpostavlja da na istraživani lokus djeluje pozitivna selekcija (Tablica 6). Nedostatak MEGA-e je da izračunava prosječan dN/dS omjer cijelog slijeda, iako je djelovanje selekcije na cijeli gen malo vjerojatno. Prirodna selekcija djeluje na pojedina mjesta unutar gena ovisna o njihovoj funkciji. dN/dS testom rađenim izdvojeno samo za vezna mjesta dodatno sam provjerila djelovanje selekcije na kodone peptid vezajućih mjesta

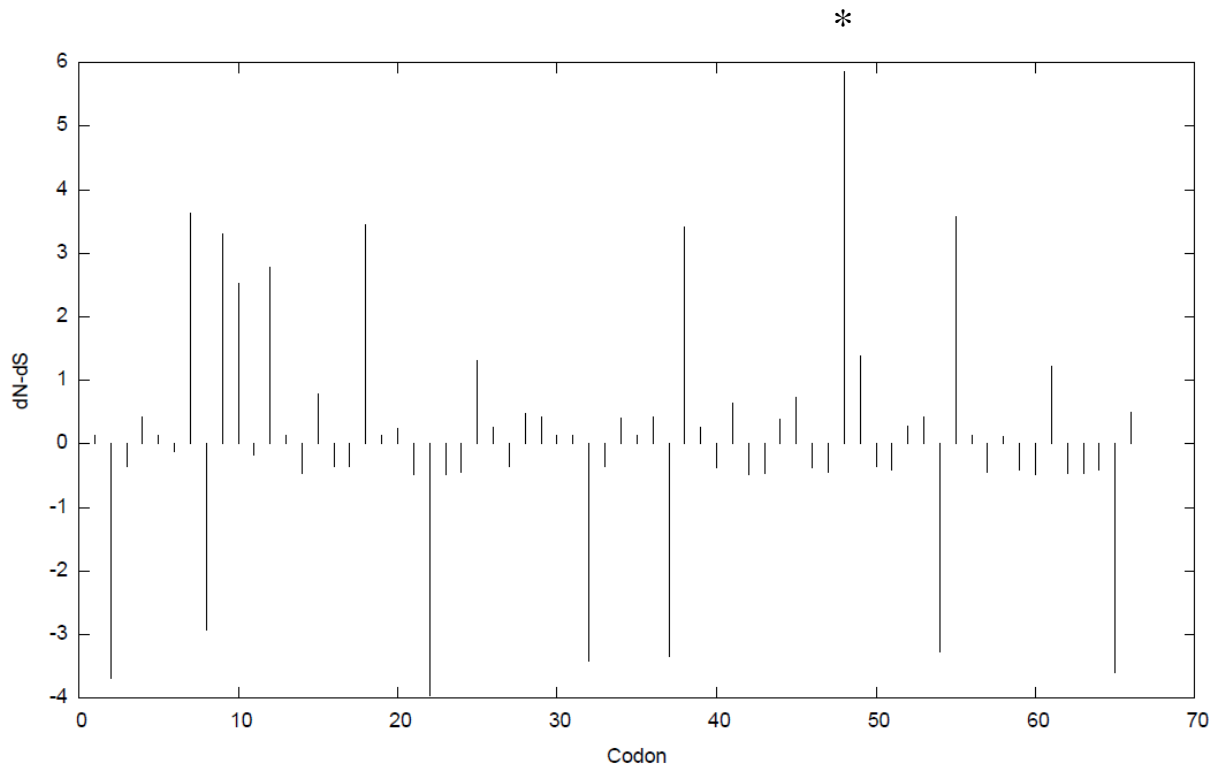
(PBR) , gdje je vrijednost omjera iznosila 1,7. Vezna mjesta odredili smo prema radu Moutou i sur. (2013). P vrijednost omjera dN/dS egzona 2 DRB1 lokusa iznosila je 1, dok je p vrijednost omjera dN/dS samo veznih mjesta iznosila 0,12. Da bi p vrijednost bila statistički značajna mora iznositi <0,05, kako bi mogli odbaciti nul hipotezu u korist alternativne hipoteze, što nije slučaj kod naše populacije.

Dodatno sam testirala djelovanje selekcije na pojedinačnim kodonima, koristeći Datamonkey web server (Kosakovsky Pond i Frost 2005a). REL metodom provjerila sam koji tip selekcije vlada na svakom pojedinom kodonu, što se utvrđuje uz pomoć empirijskog Bayes pristupa. Za svaki pojedinačni kodon izračunavaju se dva Bayesova faktora, jedan u slučaju da na tom mjestu djeluje negativna selekcija ( $dN < dS$ ), te drugi da na tom mjestu djeluje pozitivna selekcija ( $dN > dS$ ). Kada Bayesovi faktori pokazuju vrijednost veću od 50, tada takva mjesta nazivamo odabranim kodonima. Utvrđeno je da je jedino kodon 48 pod utjecajem pozitivne selekcije (Slika 4) (Kosakovsky Pond i Frost 2005b).

Tablica 6. Prosječna stopa nesinonimnih supstitucija (dN) i sinonimnih supstitucija (dS) kod istraživanog uzorka divlje svinje; prosječna stopa nesinonimnih supstitucija (dN) i sinonimnih supstitucija (dS) kodona peptid vezajućih mjesta (PBR), kako bi dodatno utvrdili djelovanje selekcije na pojedinačnim kodonima

Lokus	Djelovi sljedova obuhvaćeni analizom	Broj jedinstvenih alela	dN	dS	dN/dS	P vrijednost
DRB1	Egzon 2 DRB1	7	0,0981	0,0995	0,9859	1
DRB1	Vezna mjesta (PBR)	7	0.3873	0.2318	1.7	0.12

Kratice: dN, nesinonimna supstitucija; dS, sinonimna supstitucija



Slika 4. Prikaz omjera nesinonimnih (dN) i sinonimnih (dS) supstitucija svakog pojedinačnog kodona kod ukupno 7 alela egzona 2 DRB1 lokusa u istraživanom uzorku divljih svinja korištenjem REL metode (engl. random effects likelihood) HyPhy programskog paketa. \* označava kodon 48 koji je pod djelovanjem pozitivne selekcije

#### 4. RASPRAVA

Proučavanjem MHC sustava u kralješnjaka možemo pretpostaviti kakva je sposobnost organizma ili populacije da se obrani od raznovrsnih patogena. Polimorfnost gena je ono što MHC sustav razlikuje od ostalih genskih sustava. Dok ostali sustavi pokušavaju zadržati primarni i konzervirani oblik gena, MHC sustav posjeduje polimorfnost gena čime populacija dobiva sposobnost prilagodbe na nove okolišne uvjete. Zasad nema velikog broja istraživanja koja uključuju analiziranje raznolikosti gena glavnog sustava tkivne podudarnosti u divljih svinja. Takva istraživanja bi dovela do boljeg razumijevanja povezanosti određenih parazitoloških bolesti s određenim genotipom pojedinog lokusa. Divlje svinje su najčešći rezervoari različitim parazitima, a paraziti vrše selekcijski pritisak koji je pak odgovoran za preživljavanje divljih svinja. Primjer takvih istraživanja povezanosti MHC lokusa i bolesti kod drugih divljih vrsta nalazimo kod jelena (*Cervus elaphus*), glodavaca (*Ctenomys talarum*), lemura i vodene voluharice (*Arvicola amphibius*) (Fernandez-de-Mera i sur. 2009; Cutrera i sur. 2011; Schwensow i sur. 2010; Oliver i sur. 2009). Time se dobiva uvid u korelaciju između MHC haplotipova i specifičnih parazitoloških bolesti.

Ovim istraživanjem utvrdili smo ukupno sedam različitih alela u populacija divljih svinja s područja Medvednice. Od ukupno 60 uzoraka mišićnog tkiva uspješno je izolirano i sekvencirano 49 uzoraka, što daje ukupnu uspješnost ovog istraživanja od 81,7%. Kod preostalih 11 uzoraka nisam uspijevala dobiti PCR produkte niti nakon trećeg pokušaja. Najvjerojatniji uzrok tome je premala ili prevelika koncentracija DNA u dobivenim tkivima, te eventualno postojanje mutacija na mjestima vezanja uzvodnih i/ili nizvodnih početnica (nul-aleli). Alele pronađene u ukupno 49 jedinki nazvali smo redom Susc-DRB\*01 do Susc-DRB\*07. Pronađen je jedan novi, do sad neotkriveni alel, Susc-DRB\*02, dok su ostali aleli pronađeni u različitim populacijama divljih i domaćih svinja istraženih u prethodnim istraživanjima (Fahrenkrug i sur. 2002; Våge i sur. 1994; Uenishi i sur. 2004; Dvorak i sur. 2005). Između alela DRB1 lokusa pronađena je nukelotidna udaljenost od 0,1486, izračunate uz pomoć modela Jukes-Cantor model supstitucije, dok je vrijednost aminokiselinske udaljenosti iznosila 0,2815 izračunata uz pomoć Jones-Taylor-Thornton modela supstitucije. Frekvencije alela su se razlikovale unutar populacije (Tablica 2). Alel s najvećom frekvencijom unutar populacije bio je Susc-DRB\*01 (GenBank: BE232509). Alel Susc-DRB\*01 (GenBank: BE232509) posjedovalo je 18 homozigotnih jedinka (36,7%). Omjer

nesinonimnih i sinonimnih supstitucija je gotovo jednak, što nije uobičajeno na MHC polimorfim lokusima.

Aleli Susc-DRB\*06 i Sus- DRB\*07 kodiraju za jednaki aminokiselinski slijed jer se razlikuju sinonimnom mutacijom. Svi ostali aleli kodiraju za jedinstvene aminokiselinske sljedove.

Alel Sus-DRB\*07 (GenBank: BE232674) pronađen u samo jednoj jedinci u populaciji divljih svinja s područja Medvednice, na lovištu broj 3 na području revira „Šestine“.

U prethodnom istraživanju (Moutou i sur. 2013) omjer nesinonimnih i sinonimnih stopa supstitucije na cijelom slijedu iznosio je 1,23, što ukazuje na djelovanje pozitivne selekcije, dok je kod našeg istraživanja taj omjer bio manji od 1, točnije 0,9859. Nadalje, Moutou i sur. (2013) u svom su istraživanju zasebno izračunali omjer nesinonimnih i sinonimnih supstitucija kod peptid vezajućih regija čija vrijednost je iznosila 2,18. Izračunom takvog omjera na našem istraživanom uzorku dobili smo omjer 1,7; no statistička značajnost ( $p=0,12$ ) nije ukazivala da se može odbaciti nul-hipoteza (neutralna evolucija) u korist alternativne hipoteze (djelovanje pozitivne selekcije). No, možemo zaključiti da dobiveni omjer dN/dS na veznim mjestima, čija vrijednosti je veća od 1 daje naznaku djelovanja pozitivne selekcije. Kod istraživanja Barbisana i sur. (2009) na populacijama divljih svinja omjer nesinonimnih i sinonimnih stopa iznosio je 0.55, dok je on u peptid vezajućim mjestima iznosi 1.44, a u peptid nevezajućim mjestima 0.33.

Uspoređujući rezultate našeg istraživanja s rezultatima rada Moutou i sur. (2013) utvrdili smo da postoje dva podudarna alela Susc-DRB\*03 i Susc-DRB\*05 (GenBank: Z26641 i HM008966). Kod istraživanja Moutou i sur. (2013) alel Z26641 pronađen je kod populacija divljih svinja s području zapadne Grčke, središnje Grčke, sjeverne Grčke, Poljske, Francuske, Luksemburga te kod populacija domaćih svinja pasmina Leicoma, Landrace i Danbred. Kod našeg istraživanja alel Z26641 pronađen je na području revira „Ponikva“, „Vrapče“, „Gračani“, „Prigorje“ i „Planina“. Alel HM008966 u radu Moutou i sur. (2013) pronađen je kod populacija divljih svinja s području zapadne Grčke, središnje Grčke, sjeverne Grčke, Poljske i kod populacije domaćih svinja pasmine Danbred, dok je kod našeg istraživanja pojava alela zabilježena je na području revira „Šestine“, „Prigorje“, „Čučerje“ i „Planina“.

Održavanje polimorfizma unutar populacije ovisi o intenzitetu selekcije, stopi mutacija i veličini efektivne populacije. Pod određenim okolnostima djelovanje selekcije nije dovoljno da održi varijaciju unutar MHC lokusa u malim ili fragmentiranim populacijama kroz dulji vremenski period. Učinak uskog grla i učinak osnivača te ograničenja u parenju mogu znatno pridonijeti smanjenom broju MHC alela. Takva pojava je zabilježena kod azijske populacije lava (*Panthera leo persica*), geparda (*Acinonyx jubatus*), malgaškog štakora (*Hypgeomys antimena*), malgaškog šumskog miša (*Macrotarsomys bastardi*) i mnogih drugih vrsta (Yuhki i O'Brien 1990; O'Brien i sur. 1985; Sommer i Tichy 1999; Sommer i sur. 2002). Pod takvim okolnostima genetički drift je prevladao učinak prirodne selekcije.

## 5. ZAKLJUČAK

U istraživanom uzorku od ukupno 49 jedinki divljih svinja (*Sus scrofa*) stradalih izlovom s područja Medvednice pronađeno je ukupno 7 različitih alela DRB1 lokusa, od kojih je samo jedan novootkriveni Susc-DRB\*02. Aleli Susc-DRB\*06 i Susc-DRB\*07 kodiraju za jednaki aminokiselinski slijed, dok ostali aleli kodiraju za jedinstvene aminokiselinske slijedove.

Istraživani dio egzona 2 DRB1 lokusa duljine 198 pb sadrži 40 varijabilnih nukleotidnih mjesta i 20 varijabilnih aminokiselinskih mjesta. Aminokiselinske evolucijske udaljenosti za istraživani lokus veće su od nukleotidnih udaljenosti.

Omjer dN/dS procijenjen na cijelom nukleotidnom slijedu je pokazao vrijednost od 0,9859, što ukazuje da istraživani lokus u analiziranoj populaciji nije pod djelovanjem pozitivne selekcije. Omjer dN/dS procijenjen samo na kodonima koji sudjeluju u vezanju peptida je iznosio 1,7, ali testiranje statističke značajnosti nije ukazalo da se nulta hipoteza može odbaciti ( $p=0,12$ ), tako da niti na tim dijelovima nismo utvrdili djelovanje pozitivne selekcije. Dodatnom analizom djelovanja selekcije na pojedinačnim kodonima, utvrdili smo da je jedino kodon 48 pod utjecajem pozitivne selekcije.

Rezultati ovog istraživanja će poslužiti za daljna istraživanja korelacija između MHC haplotipova i specifičnih parazitskih bolesti divljih svinja, što će u konačnici pridonijeti razumijevanju koevolucije domaćina i patogena i održavanja genetičke raznolikosti u populacijama životinja.



## 6. LITERATURA

- Barbisan F., Savio C., Bertorelle G., Patarnello T., Congiu L. (2009): Duplication polymorphism at MHC class II DRB1 locus in the wild boar (*Sus scrofa*). *Immunogenetics* 61:145–151.
- Christova R., Jones T., Wu P. J., Bolzer A., Costa-Pereira A. P., Watling D., Kerr I. M., Sheer D. (2007): P-STAT1 mediates higher-order chromatin remodelling of the human MHC in response to IFN $\gamma$ . *Journal of Cell Science* 12: 3262-3270.
- Cutrera A. P., Zenuto R. R., Lacey E. A. (2011): MHC variation, multiple simultaneous infections and physiological condition in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 1023-1036.
- Darabuš S., Jakelić I. Z. (1996): *Osnove lovstva I izdanje*. Hrvatski lovački savez, Zagreb, 97-100
- Dvorak C.M., Hyland K.A., Machado J.G., Zhang Y., Fahrenkrug S.C., Murtaugh M.P. (2005): Gene discovery and expression profiling in porcine Peyer's patch. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 105: 301-315.
- Fahrenkrug S.C., Smith T.P., Freking B.A., Cho J., White J., Vallet J., Wise T., Rohrer G., Perteu G., Sultana R., Quackenbush J., Keele J.W. (2002): Porcine gene discovery by normalized cDNA-library sequencing and EST cluster assembly. *Mammalian Genome* 13: 475-478.
- Fernandez-De-Mera I.G., Vicente J., Hofle U., Fons F.R., Ortiz J.A., Gortazar C. (2009): Factors affecting red deer skin test responsiveness to bovine and avian tuberculin and to phytohaemagglutinin. *Preventive Veterinary Medicine* 90: 119-126.
- Groves C. P., Grubb P. (1993): *The Eurasian suids, Sus and Babyrousa - Taxonomy and Description*. U: *Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Action Plan*. Oliver W.L.R., Gland, Switzerland, IUCN, pp. 126-134.
- 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.

- Hedrick P.W. (2003): The major histocompatibility complex (MHC) in declining populations: an example of adaptive variation. U: *Reproduction Science and Integrated Conservation*. Holt W.V., Pickard A.R., Rodger J.C., Wildt D.E., Cambridge Press University, Cambridge, UK, pp. 97–113.
- IUCN 2015. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
- Kindt T. J., Osborne B. A., Goldsby R. A. (2006): *Kuby Immunology Sixth Edition*. Freeman, W. H. & Company, New York
- Konjević, D. (2005): Divlja svinja (*Sus scrofa L.*) – Od biologije do kuhinje. *Meso*, 7 (6): 49-52.
- Kosakovsky Pond S. L., Frost S. D. W. (2005a): Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21: 2531-2533.
- Kosakovsky Pond S. L., Frost S. D. W. (2005b): Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1208-1222.
- Kryazhimskiy S., Plotkin J. B. (2008): The Population Genetics of dN/dS. *PLoS Genetics* 4: 1-10.
- 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.
- Massei G., Genov P. V. (2004): The environmental impact of wild boar. *Galemys* 16: 135-145.
- Meyer D., Mack S. J. (2003): Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes: Polimorphism. *Nature encyclopedia of the human genome* : 789-791.
- Moutou K. A., Koutsogiannouli E. A., Stamatis C., Billinis C., Kalbe C., Scandura M., Mamuris Z. (2013): Domestication does not narrow MHC diversity in *Sus scrofa*. *Immunogenetics* 65: 195-209.
- O'Brien S.J., Evermann F.F. (1988): Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* 3: 254–259.

- O'Brien S.J., Wildt D.E., Goldman D., Merrill C.R., Bush M. (1985): The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science* 221: 459-462.
- Oliver M.K., Lambin X., Cornulier T., Pieltney S.B. (2009): Spatio-temporal variation in the strength and mode of selection acting on major histocompatibility complex diversity in water vole (*Arvicola terrestris*) metapopulations. *Molecular Ecology* 18: 80-92.
- Olson M. E., Guselle N. (2000): Are Pig Parasites a Human Health Risk? *Advances in Pork Production* 11: 153-160.
- Penn D. J. (2002): Major Histocompatibility Complex (MHC). *Encyclopedia of life sciences* : 1-7.
- Radwan J., Biedrzycka A., Babik W. (2009): Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? *Biological Conservation* 143: 537-544.
- Schwensow N., Eberle M., Sommer S. (2010): Are there ubiquitous parasite-driven MHC selection mechanisms in gray mouse lemurs? *International Journal of Primatology* 31: 519-537.
- SeqScape Software v2.5 Quick Reference Guide (2004): Applied Biosystems, [https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041493.pdf](https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041493.pdf) (stranica posjećena: 3.kolovoza 2015.)
- Sommer S., Schwab D., Ganzhorn J.U. (2002): MHC diversity of endemic Malagasy rodents in relation to range contraction and social system. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51: 214-221.
- Sommer S., Tichy H. (1999): Major histocompatibility complex (MHC) class II polymorphism and paternity in the monogamous *Hypogeomys antinema*, the endangered, largest endemic Malagasy rodent. *Molecular Ecology* 8: 1259-1272.
- Sompayrac L. (1999): *How the Immune System Works*. Blackwell Science, United Kingdom
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

- Uenishi H., Eguchi T., Suzuki K., Sawazaki T., Toki D., Shinkai H., Okumura N., Hamasima N., Awata T. (2004): PEDE (Pig EST Data Explorer): construction of a database for ESTs derived from porcine full-length cDNA libraries. *Nucleic Acids Research* 32: 484-488.
- Våge D.I., Olsaker I., Lingaas F., Lie O. (1994): Isolation and sequence determination of porcine class II DRB alleles amplified by PCR. *Animal Genetics* 25: 73-75.
- Vernesi C., Crestanello B., Pecchioli E., Tartari D., Caramelli D., Hauffe H., Bertorelle G. (2003): The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): a microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 12: 585-595.
- Wickliffe, K. (2014): *Sus scrofa*. Animal Diversity Web. Version 2015  
[www.animaldiversity.org](http://www.animaldiversity.org)
- Yuhki N., O'Brien S.J. (1990): DNA variation at the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 836-840.

## 7. ŽIVOTOPIS

### Maja Balažin

---

Glavna 54, Sveta Marija 40326

099/673-8567

#### OBRAZOVANJE

- **2013.-** Upisala sam diplomski studij Eksperimentalna biologija, smjer Fiziologija i imunobiologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu
- **2013.** Završila sam preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu i stekla titulu Sveučilišnog prvostupnika (baccalaurea) biologije
- **2010.** Završila sam Gimnaziju Čakovec, smjer Opća gimnazija

#### PROFESIONALNO ISKUSTVO

- sudjelovanje na šestom međunarodnom kongresu „Veterinarska znanost i struka“ održanog 1. i 2.10.2015. godine u prostorima Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### RADNO ISKUSTVO I PRAKSA

- **2015.** Radila sam u tvrtki FLEET rent a car koja se bavi pružanjem usluga najma vozila
  - radila sam administrativne poslove vezane uz unos podataka u programe
- **2015.** Radila sam u tvrtki VM2 d.o.o. koja se bavi uvozom i distribucijom prehrambenih proizvoda i proizvoda široke potrošnje, proizvodnjom i logističkim uslugama
  - radila sam u skladištu gdje sam obavljala poslove vezane uz deklariranje robe
- **2014. -2015.** Radila sam u tvrtki Dedal komunikacije d.o.o. koja se bavi kreativnim marketingom
  - radila sam u odjelu za telemarketing kao agent u medicinskom kontakt centru (komuniciranje sa zdravstvenim djelatnicima putem telefona ili maila)
  - rad je zahtjevao poznavanje rada na PC-u (MS Office), edukaciju vezanu uz nuspojave i prijavu nuspojave voditelju call centra, komunikativnu, elokventnu i odgovornu osobu, želju za učenjem i napredovanjem, unos podataka u bazu podataka

- **2014. -2015.** U sklopu tvrtke Dedal komunikacije d.o.o. pisala sam stručne članke za portal e-medikus.com, portal za trajnu izobrazbu zdravstvenih djelatnika
  - posao je zahtjevao poznavanje engleskog jezika, stručne medicinske terminologije, pismenost
  - rad se odvijao od kuće i potrebno je bilo vlastito računalo, internet, pretraživanje stranih medicinskih portala
  
- **2010. -2013.** obavljala sam praksu u sklopu fakulteta
  - Terenska nastava (Pula)- istraživanje mora, determinacija beskralješnjaka, alga i bakterija
  - Terenska nastava (Vrlika)- determinacija kralješnjaka i sistematika bilja
  - Laboratorijska praksa (PMF, Zoologijski zavod, predmet: Biološka evolucija , Prof: prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić)
  - Veterinarski institut
  - Klinički-bolnički centar “Sestre milosrdnice”

## **OSTALA ZNANJA**

- Aktivno govorim engleski jezik
  - učila sam ga 8 godina ( u srednjoj školi i 4 godine u školi stranih jezika)
- Pasivno govorim njemački jezik
- Služim se internetom u svakodnevnoj komunikaciji (Facebook, google+, blog)
- Koristim se Microsoft Officeom (Word, Excel, PowerPoint)
- Komunikativna sam, organizirana, pouzdana, uporna, uredna, pedantna, spremna za rad u novim situacijama i imam želju za učenjem

## **PREPORUKE**

Kata Križić: [kata.krizic@gmail.com](mailto:kata.krizic@gmail.com), 095/522-1589