

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Kate Šešelja

Raznolikost gena DRB i DQA/DQB/DRB haplotipova skupine II glavnog sustava
tkivne podudarnosti u čagljeva (*Canis aureus*) iz istočne Europe

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, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ani Galov na uloženom trudu i stručnim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada. Puno hvala i neposrednoj voditeljici dr. sc. Haidi Arbanasić na susretljivosti i pruženom znanju. Također, zahvaljujem Gordani Žakman na strpljenju i pomoći tijekom tehničke izvedbe ovog istraživanja.

Na kraju, veliko hvala mojim prijateljima, sestri i roditeljima na podršci i razumijevanju koje su mi pružili tijekom svih godina mog obrazovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

RAZNOLIKOST GENA DRB I DQA/DQB/DRB HAPLOTIPOVA SKUPINE II GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI U ČAGLJEVA (*Canis aureus*) IZ ISTOČNE EUROPE

Kate Šešelja

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC) ima ključnu imunoregulacijsku ulogu kod sisavaca. Raznolikost MHC gena omogućuje prepoznavanje širokog spektra patogena, a time i povećava izgled za preživljavanje vrste. Važan su molekularni marker za proučavanje adaptivne evolucije populacija i vrsta. Čagalj (*Canis aureus*) pripada porodici Canidae (psi), podred Caniformia, redu Carnivora (mesojedi). Unatoč svojoj širokoj rasprostranjenosti, čagalj je slabo istraživana vrsta i samo je nekoliko genetičkih istraživanja ove vrste objavljeno do danas. Cilj ovog rada je odrediti raznolikost gena DRB lokusa i DQA1/DQB1/DRB1 haplotipova skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti na uzorcima čagljeva istočne Europe. Iz 21 uzorka čaglja, postupcima izolacije DNA, PCR metodom, elektroforezom, sekvenciranjem i molekularnim kloniranjem pronašla sam pet alela na DRB lokusu. Svi aleli imaju jedinstveni aminokiselinski slijed, a dva alela su novoutvrđena te sam im dala radne nazive DRB*14aEst i DRB*15aEst. Alel DRB1*00901 je poznat iz prethodnih istraživanja na ostalim vrstama porodice pasa što potvrđuje postojanje trans-specijskog polimorfizma. dN/dS testom je potvrđena pretpostavka djelovanja pozitivne selekcije na DRB lokusu. Pronašla sam ukupno sedam jedinstvenih haplotipova u istraženom uzorku, a koristila sam alele dobivene za DQA i DQB lokuse na istom uzorku u ranijem istraživanju.

40 stranica, 7 slika, 7 tablica, 41 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Glavni sustav tkivne podudarnosti, *Canis aureus*, ravnotežna selekcija, haplotipovi

Voditelj: doc. dr. sc. Ana Galov

Neposredni voditelj: dr. sc. Haidi Arbanasić

Ocjenitelji: Dr.sc. Ana Galov, doc.

Dr.sc. Mirta Tkalec, izv. profesor

Dr.sc. Renata Matoničkin Kepčija, izv. profesor

Rad je prihvaćen: 18.2.2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

VARIABILITY OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX DRB CLASS II GENE AND DQA/DQB/DRB HAPLOTYPES IN THE GOLDEN JACKALS (*Canis aureus*) FROM EASTERN EUROPE

Kate Šešelja

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The genes of major histocompatibility (MHC) system are a key component of the immune system in mammals. The diversity of MHC genes enables the recognition of a wider range of pathogens, and thus increases the chances of survival. They are important molecular markers for studying adaptive genetic diversity in populations and species. Golden jackal (*Canis aureus*) belongs to the family Canidae (dogs), suborder Caniformia, order Carnivora (carnivores). So far there are only a few published genetic studies concerning golden jackal although it is a widespread species. The aim of this graduate thesis is to determine the diversity of the MHC DRB class II gene in golden jackals from Eastern Europe. Using the methods of DNA isolation, PCR method, electrophoresis, sequencing and molecular cloning, I have identified five alleles at DRB locus from 21 samples. All five alleles have unique amino acid sequence, and two alleles have been newly found and named DRB*14aEst and DRB*15aEst. The allele DRB*00901 is known from previous research of other species in the dog family, which confirms the existence of a trans-species polymorphism. The dN/dS (ratio of non-synonymous versus synonymous substitutions) test has confirmed the assumption that DRB loci are influenced by positive selection. In the examined sample, total of seven unique haplotypes have been identified. For inference of haplotypes I used alleles found at DQA and DQB loci of the same samples identified in previous research.

(40 pages, 7 figures, 7 tables, 41 references, the original language: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: Major histocompatibility complex, *Canis aureus*, balancing selection haplotypes

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. Renata Matonićkin Kepčija, Assoc. Prof.

Thesis accepted : 18th February 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Čagalj.....	1
1.2 Geni glavne tkivne podudarnosti.....	4
1.3 Dosadašnja genetička istraživanja čaglja.....	7
1.4 Cilj istraživanja.....	12
2. MATERIJALI I METODE.....	13
2.1 Uzorci.....	13
2.2 Izolacija DNA.....	13
2.3 Lančana reakcija polimerazom.....	13
2.4 Elektroforeza.....	14
2.5 Sekvenciranje.....	15
2.6 Molekularno kloniranje.....	15
2.7 RAČUNALNA OBRADA PODATAKA.....	18
2.7.1 BioEdit.....	18
2.7.2 SeqScape.....	18
2.7.3 MEGA.....	19
2.7.4 REL analiza.....	19
2.8 Izvod haplotipova.....	20
3. REZULTATI.....	21
3.1 Aleli čaglja DRB lokusa.....	21
3.2 Haplotipovi.....	24
3.3 Evolucijska udaljenost.....	27
3.4 Selekcija.....	28
4. RASPRAVA.....	30
5. ZAKLJUČAK.....	34
6. LITERATURA.....	35
7. ŽIVOTOPIS.....	39

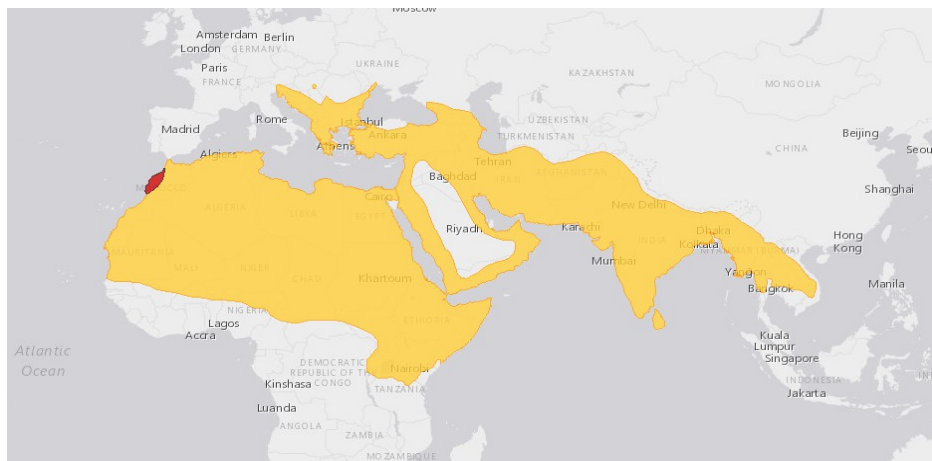
POPIS KRATICA

dN	- prosječna stopa nesinonimnih nukleotidnih supstitucija
DNA	- deoksiribonukleinska kiselina
dS	- prosječna stopa sinonimnih nukleotidnih supstitucija
EDTA	- etilendiamintetraoctena kiselina (eng. ethylenediaminetetraacetic acid)
g	- gram
HLA	- glavni sustav tkivne podudarnosti u čovjeka (eng. human leukocyte antigens)
IPTG	- izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid
IUCN	- međunarodni savez za očuvanje prirode (eng. International Union for Conservation of Nature)
kb	- kilobaza
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. polymerase chain reaction)
pH	- mjera kiselosti/lužnatosti ($\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$)
rpm	- okretaja po minuti (eng. rotations per minute)
UV	- ultraljubičasta (eng. ultraviolet)
V	- volt
μl	-mikrolitar

1. UVOD

1.1 Čagalj

Čagalj pripada redu Carnivora (zvijeri), podredu Caniformia (psolike zvijeri), porodici Canidae (psi) te je jedna od najmanje istraživanih vrsta iz porodice pasa u Europi (Arnold i sur. 2012). Na IUCN listi ugroženih životinja svrstan je u skupinu najmanje zabrinjavajuće, zbog velikog područja na kojem obitava, a koje sadrži optimalne uvjete za zaklon i hranu (Jhala i sur. 2008). Stanište čagljeva obuhvaća sjevernu i sjeverno-istočnu Afriku, od Senegala na zapadnoj obali Afrike do Egipta na Istoku, uključujući Maroko, Alžir i Libiju na sjeveru do Nigerije, Čada i Tanzanije na jugu. U Aziji nastanjuju Tursku, Siriju, Irak, Iran, centralnu Aziju, čitavi Indijski subkontinent, istok i jug Šri Lanke, Mianmar, Tajland i dijelove Indokine (Kryštufek i sur. 1997). U Europi je rasprostranjen u male i raspršene populacije, najčešće uz obale Sredozemnog i Crnog mora te Balkanskog poluotoka (Demeter i Spassov 1993, Kryštufek i sur. 1997) (Slika 1).



Slika 1. Geografska rasprostranjenost čaglja (preuzeto sa IUCN, 2014)

Čagalj izgledom podsjeća na vuka (*Canis lupus*). Morfološke razlike obuhvaćaju veličinu i težinu tijela, duljinu repa, trupa i nogu, oblik šapa, boju krzna i oblik lubanje. Čagalj ima manje tijelo, visok je oko 50 centimetara, trup mu je dug od 90 do 100 centimetara, a rep oko 25 centimetara. Tjelesna masa ovisi o podneblju i dostupnoj hrani, varira od 7 do 15 kilograma, iako odrasli primjerci često premašuju tu težinu (Bošković 2013). Lubanja mu je manja od vučje sa širom i šiljastijom njuškom. Boja krzna varira, od crvene, do zlatno smeđe i srebrnkaste te postoje individualne varijacije u boji krzna i raspodjeli pruga, posebno na glavi i vratu (Giannatos i sur. 2004) (Slika 2).



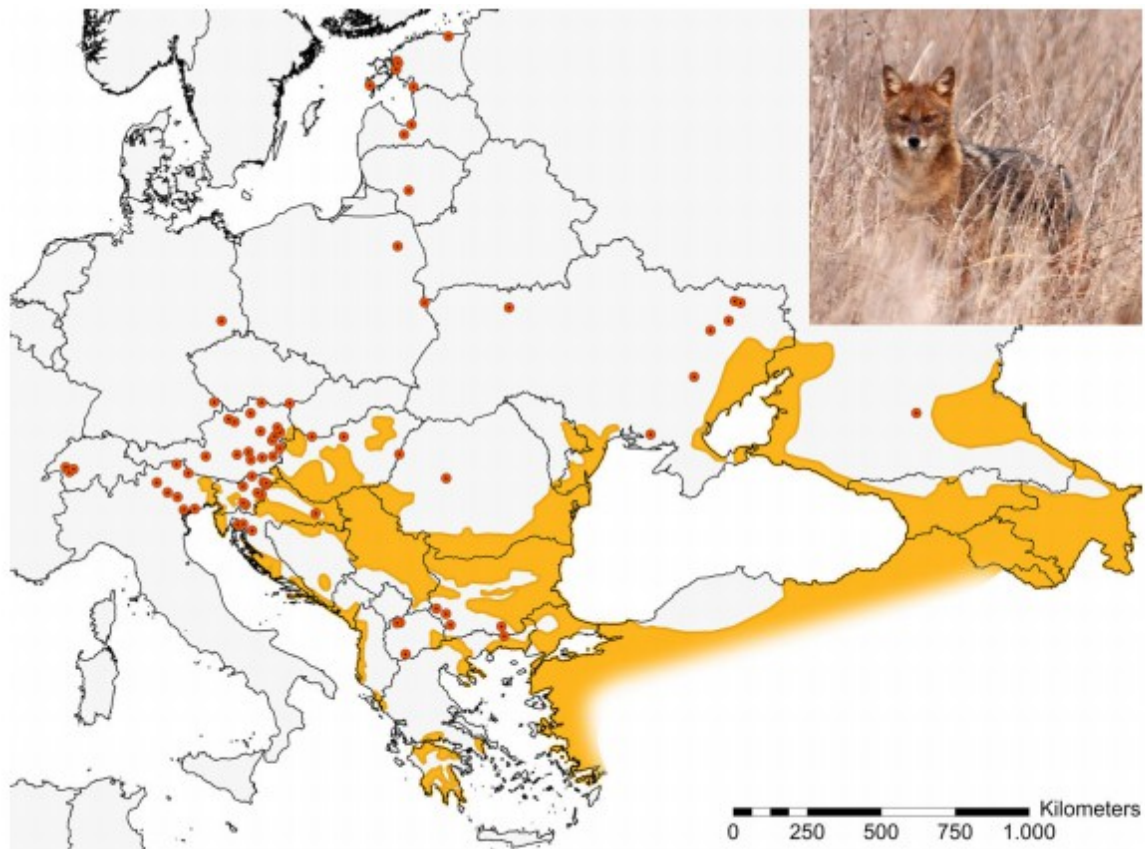
Slika 2. Čagalj (preuzeto iz Bošković, 2013)

Visoko je prilagodljiva vrsta i oportunist. Najveći dio godine živi u čoporu ili paru, a samo ponekad pojedinačno. Čopor čine roditelji i njihovo novo potomstvo. Čagljevi su aktivni uglavnom u sumrak i noću (Bošković, 2013).

Kroz prošlost populacije čagljeva u Europi prolaze kroz brojne promjene u gustoći, brojnosti i distribuciji. U mnogim područjima na Balkanu, tijekom 60-ih godina prošlog stoljeća, čagalj je gotovo istrijebljen uslijed smanjivanja staništa i uporabe otrovnih mamaca (Spasov 1989). Nakon što je zakonom zabranjena upotreba otrovnih mamaca 1962. godine, populacije čagljeva se postepeno oporavljaju i rekoloniziraju bivša staništa u Bugarskoj te nastanjuju nova u Rumunjskoj i Srbiji (Kryštufek i sur. 1997). Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju na ekspanziju čagljeva u Europi (Arnold i sur. 2012) (Trowborst i sur. 2015). Razlozi su sadnje crnogoričnih šuma koje su pogodno stanište za ovu vrstu, zakonodavna zaštita, smanjenje populacije vuka (*Canis lupus*) te obilje hrane s farmi u obliku animalnog otpada što im omogućuje dobre uvjete za život (Spasov, 1989, Genov i Vassilev 1991). Pretpostavlja se da je u Europu došao s Bliskog Istoka i širio se prema sjeverozapadu s Dunavom kao sjevernom granicom (Kryštufek i sur. 1997).

Trenutni podaci o distribuciji čagljeva u jugoistočnoj Europi i dijelovima istočne i središnje Europe uključuju sljedeće države: Albanija, Armenija, Austrija, Azerbejdžan, Bosna i Hercegovina, Bugarska, Hrvatska, Gruzija, Grčka, Mađarska, Italija, Kosovo, Makedonija, Moldavija, Crna Gora, Rumunjska, Rusija, Srbija, Slovenija, Turska i Ukrajina. Nadalje, zabilježena je povremena prisutnost, zasad većinom pojedinačnih jedinki u Bjelorusiji,

Češkoj, Estoniji, Njemačkoj, Latviji, Litvi, Poljskoj, Slovačkoj i Švicarskoj (Trowborst i sur. 2015) (Slika 3).



Slika 3. Trenutna distribucija čaglja u Europi. Obojena žuta područja predstavljaju područja stalne prisutnosti čaglja, a crveni krugovi zabilježene pojedinačne jedinice (preuzeto iz Trowborst i sur. 2015).

Prvi podaci o prisutnosti čaglja u Hrvatskoj potječu još iz 1491. godine s otoka Korčule (Jeričević 1952). U sjevernoj Dalmaciji i Istri zabilježen je početkom 20. stoljeća, no tek nakon 1950. godine se počinje i redovito bilježiti (Krystufek i sur. 1997). Uz višestoljetnu prisutnost čagljeva u Dalmaciji, postoje i sporadični zapisi o čagljevima u Slavoniji (Brusina 1982). Zadnjih 15 godina, brojnost čagljeva u Slavoniji je u porastu, a pretpostavlja se da su razlozi migracije iz Bugarske, Rumunjske i Srbije (Selanec i sur. 2011).

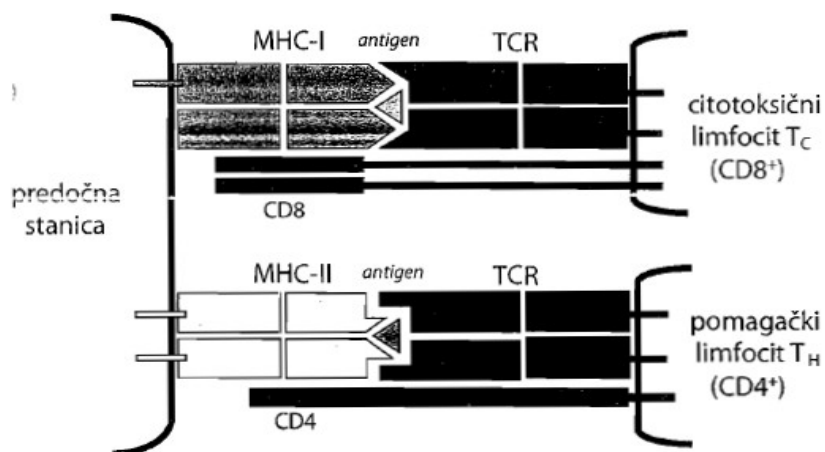
Nedostatak znanja o porijeklu i putevima širenja čagljeva u Europi može značajno utjecati na plan upravljanja i mjere zaštite vrste. Primjer su Baltičke republike, gdje je 2011. godine prvi put zabilježena prisutnost čaglja na prostoru Estonije. Usprkos mišljenju stručnjaka koji su smatrali kako je u pitanju prirodna ekspanzija te unatoč nedovoljnom broju pouzdanih

činjenica, vlade Estonije, Latvije i Litve su odlučile pretpostaviti kako je čagalj na tom području invazivna strana vrsta uvezena ljudskim djelovanjem, te su u skladu s tim počele provoditi neograničeni odstrel sa ciljem istrebljenja ove vrste na tim područjima (Trouwborst i sur 2015), (Rutkowski i sur 2015) .

Genetičke usporedbe autohtonih populacija i novopridošlih jedinki mogu pomoći u identifikaciji porijekla i puteva širenja čaglja u Europi, međutim dosadašnji rezultati su nedostatni da se donesu konačni zaključci o tom pitanju (Arnold i sur. 2012).

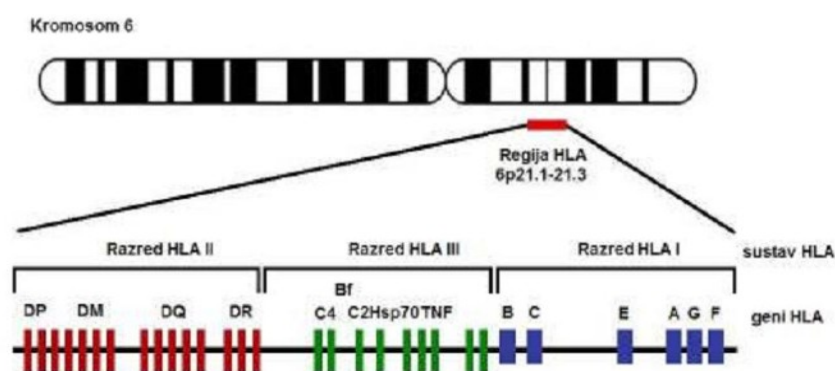
1.2 Glavni sustav tkivne podudarnosti

Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti, MHC (engl. major histocompatibility complex) kodiraju molekule MHC koje su membranski glikoproteinski receptori čija je primarna uloga prikazivanje proteinskih antigena T-limfocitima (Andreis i sur. 2010). I geni i njima pripadajući proteinski produkti dijele se iz funkcijskih razloga u tri skupine, I, II i III. Pritom skupine I i II određuju molekule koje imaju ključnu ulogu u preradbi i prikazivanju antigena limfocitima T, dok skupina III sadržava gene za molekule koje sudjeluju u imunoreakciji, ali nemaju središnju imunoregulacijsku ulogu kao molekule skupina I i II. Antigeni MHC I predočuju peptidne antigene limfocitima T CD8 +, a MHC II limfocitima T CD4+ (Slika 4). Molekule MHC I nalaze se konstitutivno izražene na svim tjelesnim stanicama s jezgrom, a MHC II molekule su izražene poglavito na limfocitima B, makrofagima, dendritičnim stanicama, aktiviranim limfocitima T i nekim endotelnim stanicama, odnosno stanicama koje prikazuju antigen limfocitima T. To je izravno povezano s razlikom u funkciji pojedinih populacija limfocita T. Pomagački limfociti komuniciraju samo sa stanicama limfnih tkiva, a citotoksični moraju biti sposobni prepoznati bilo koju tjelesnu stanicu da bi je uklonili ako nosi tuđi antigen.



Slika 4. Limfocit spregnuto prepoznaje prikazane antigene, tako da citotoksični limfocit T prepoznaje antigene u kontekstu molekule MHC-I, a pomagački limfocit T u kontekstu molekule MHC-II (preuzeto iz Andreis 2010)

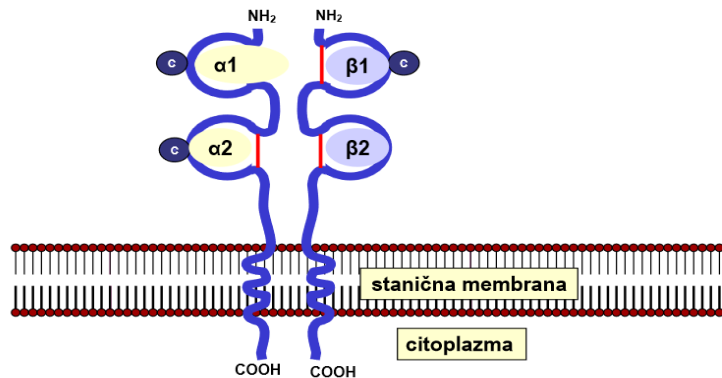
U čovjeka se taj sustav naziva HLA (prema engl. human leukocyte antigens), jer je najprije otkriven na leukocitima. Nalazi se na kraćem kraku 6. kromosoma, a obuhvaća oko 4000 kb. Unutar toga kompleksa ima mnogo gena, više od 200. Svaki se haplotip sastoji od više gena skupine I i II. Geni MHC skupine I jesu A, B i C, a geni MHC skupine II su DP, DQ i DR (Slika 5.). Pri tom su neki geni multiplicitirani, što znači da imaju više lokusa. Nasljeđuju se kodominantno što znači da heterozigotna jedinka na svojoj stanici može imati šest molekula MHC skupine I i više od deset molekula MHC skupine II. To pridonosi mogućnostima vezanja različitih antigenskih peptida i njihova predočivanja različitim klonovima limfocita T.



Slika 5. Smještaj regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6 kod čovjeka (preuzeto iz Mehra 2003)

MHC receptor skupine I se sastoji od tri izvanstanične domene ($\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$). Varijabilne domene $\alpha 1$ i $\alpha 2$ formiraju žlijeb zatvorenih krajeva koji služi za vezivanje antigenskih peptida

veličine 8 do 10 aminokiselina. Konstantna $\alpha 3$ domena se veže za CD8-molekule na citotoksičnim T limfocitima. $\beta 2$ mikroglobulin MHC receptora skupine I je kodiran nepolimorfnim genom koji ne pripada MHC kompleksu. Molekule MHC skupine II su građene od međusobno sličnih, nekovalentno vezanih lanaca α i β . koji se sastoje od dvije izvanstanične domene $\alpha 1$ i $\alpha 2$, odnosno $\beta 1$ i $\beta 2$. Varijabilne domene $\alpha 1$ i $\beta 1$ formiraju žlijeb otvorenih krajeva za vezivanje antigenskih peptida veličine 10 do 30 aminokiselina. Konstanta $\beta 2$ domena veže se za CD4- molekule na pomoćničkim T-limfocitima (Slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz građa molekule MHC II (preuzeto iz Janeway i sur. 2005)

MHC geni su među najpolimorfnijim genima u genomu sisavaca (Bernatchez i sur. 2003) što znači da za određeni genski lokus u populaciji postoji velik broj alela. Polimorfizam i poligenija zajedno pridonose raznolikosti molekula receptora izraženih na stanicama pojedine jedinke. Međutim, razina polimorfizma nije jednaka za sve gene. Naime, u pravilu su geni za β lance polimorfnije i mogu sadržavati i do više stotina alela. Ekson 2 MHC gena skupine II kodira domenu receptora koja prepoznaje i veže antigen te su istraživanja pokazala kako je on glavni nositelj funkcionalne raznolikosti receptora, i upravo je na tom području utvrđena najveća različitost među alelima i haplotipovima (Murray i sur. 1999). Raznolikost receptora omogućuje prepoznavanje šireg spektra patogena i parazita, samim time bolju obranu organizma, i dugoročno povećava izgled populacije za preživljavanjem (Klein 1986). Osim ključne imunoregulacijske uloge, MHC geni utječu i na razne druge biološke osobine, kao što su podložnost infekcijama i autoimunim bolestima, izbor partnera za parenje, izbjegavanje parenja u srodstvu, povezani su s određenim feromonima, utječu na ishod gravidnosti (Sommer 2005). Naime, geni za polimorfne olfaktorne receptore su locirani u MHC regiji, a miris je jedan od faktora koji utječe na odabir partnera. Istraživanja su pokazala kako su kod nekih sisavaca, uključujući i čovjeka, i ženke i mužjaci skloni biranju spolnih partnera sa različitim MHC molekulama. Smatra se kako izbor takvog genetički različitog partnera

umanjuje opasnost od parenja u srodstvu, a povećava genetičku raznovrsnost potomstva (Tregenza i sur. 2000). Nadalje, istraživanja ukazuju na veću stopu pobačaja kod parova koji dijele iste MHC haplotipove; kod ljudi (Ober 1999), drugih primata, a postoje i neki dokazi za manju uspješnost izlijevanja kod nekih vrsta gmazova (Tregenza i sur 2000).

Raznolikost MHC molekula odražava se kroz udio nesinonimnih nad sinonimnim nukleotidnim supstitucijama u funkcionalno važnim dijelovima receptora, odnosno antigen vezujućim mjestima. Smatra se da je visoka raznolikost nastala pod utjecajem ravnotežne selekcije te da su nesinonimne supstitucije pokretač procesa selekcije (Yang i sur. 2007). Ravnotežna selekcija održava varijaciju na MHC lokusima preko mehanizama heterozigotne prednosti, prednosti rijetkog alela i vremensko-prostornih varijacija u selekciji (Strand 2011). Mehanizam heterozigotne prednosti podrazumijeva da u populaciji koja je izložena djelovanju različitih patogenih mikroorganizama, heterozigotna jedinka za određeni MHC lokus, ima prednost u preživljavanju nad homozigotnom jedinkom. Ta prednost rezultat je njene sposobnosti prikazivanja većeg broja antigenih peptida T-limfocitima, u odnosu na homozigotnu jedinku. Prednost rijetkih gena se odnosi na hipotezu u kojoj jedinka s rijetkim alelom preživljava u slučaju pojave novog patogena. Pojavom novog patogenog mikroorganizma, rijetki MHC aleli u populaciji su ti koji će pokrenuti imunosni odgovor što će s vremenom dovesti do njegove veće zastupljenosti u populaciji (Clarke i sur. 1966). Rezultat ravnotežne selekcije je da tijekom evolucije zadrži alele među vrstama kroz duži vremenski period, čuva stare, ali i unosi nove mutacije (Takahata 1990). Zbog navedenih funkcija i karakteristika MHC geni služe kao molekularni biljezi prilikom istraživanja adaptivne evolucije populacija i vrsta (Sommer 2005).

1.3. Dosadašnja genetička istraživanja čaglja

Unatoč svojoj širokoj rasprostranjenosti, čagalj je slabo istraživana vrsta i samo je nekoliko genetičkih istraživanja ove vrste objavljeno do danas. Što se tiče istraživanja na MHC genima, na osnovu meni dostupnih izvora, do danas su objavljena samo dva rada. Jedan je rad o križancima psa i čaglja (Galov i sur. 2015), a drugi diplomski rad na nekoliko uzoraka izraelske populacije (Mešin 2015). Od ostalih vrsta iz porodice pasa, najviše se istraživalo na vuku (*Canis lupus*) i psu (*Canis familiaris*).

Zachos i sur. (2009) analiziraju 121 uzorak čaglja iz 6 različitih regija Srbije. Sekvencirali su dio kontrolne regije mitohondrijske deoksiribonukleinske kiseline (mtDNA CR1) i proveli genotipizaciju uzoraka korištenjem 8 mikrosatelitskih biljega. (STR). Mikrosatelitni biljezi još nazvani STR, (engl. short tandem repeat), predstavljaju kratki slijed od dva ili više nukleotida koji se ponavlja različiti broj puta redomice, a obično se nalazi u nekodirajućim regijama genoma. Ovi biljezi iznimno su nestabilni i imaju visoku stopu mutacije, pa u nekim slučajevima postoji čak do nekoliko tisuća mogućih varijanti za pojedini mikrosatelitni lokus. Broj ponavljanja može varirati od 5 – 5000, no najčešće je riječ o 20-50 ponavljanja (Hearne i sur. 1992). Rezultati pokazuju da nema varijacije u mitohondrijskoj DNA, odnosno pronalaze jedan haplotip kod svih analiziranih uzoraka. Mikrosatelitni lokusi pokazuju nisku razinu polimorfnosti (prosječna uočena i očekivana heterozigotnost je 0.29, odnosno 0.34) Ukupno je pronađen 31 različit alel. Zaključuju kako je niska raznolikost u skladu s relativno nedavnom ekspanzijom čaglja na Balkanu i ukazuju na mogućnost efekta uskog grla u tek nedavno uspostavljenim populacijama čaglja u Srbiji. Također analiziraju uzorak pojedinačne jedinke iz Austrije i pronalaze da je genetički identičan sa srpskim populacijama. Rezultat je zanimljiv jer se prije pretpostavljalo kako su se čagljevi pronađeni u Italiji, Sloveniji i Austriji širili iz Istre (Krystufek i sur. 1997). Može se pretpostaviti da analiziran uzorak nije u skladu s prethodnom pretpostavkom i najvjerojatnije je da je čagalj migrirao iz Srbije, moguće preko Mađarske. Druga pretpostavka je da rezultati ukazuju na visoku genetsku uniformiranost čaglja u cijeloj regiji sjevernog Balkana. U svakom slučaju autori su zaključili da su potrebna daljna genetska istraživanja populacija kako bi se odgovorilo na pitanja o putevima širenja čagljeva u Europi.

Fabbi i sur. (2013) istražuju genetičku raznolikost i populacijsku strukturu čagljeva iz Bugarske, Srbije, Hrvatske (Dalmacija i Slavonija) te pojedinačnih jedinki sa sjeveroistoka Italije. Također, koriste metode sekvenciranja mtDNACR1 i genotipizaciju uzoraka koristeći 15 mikrosatelitnih lokusa. Svi analizirani uzorci mtDNA CR1 pripadaju istom haplotipu koji je identičan sa haplotipom pronađenim kod analiziranih čagljeva iz Srbije (Zachos i sur. 2009). Potrebna su daljna istraživanja da se donese zaključak zašto mitohondrijska DNA ne pokazuje raznolikost. Za razliku od mtDNA CR1, analizirani mikrosatelitni lokusi su polimorfni, a broj alela je varirao od 2 do 14 ovisno o lokusu. Ipak, raznolikost je relativno niska (prosječna uočena heterozigotnost iznosi 0.46, a očekivana 0.54). Koristili su različite statističke metode za procjenu postojanja subpopulacija i utvrdili kako su čagljevi koji koloniziraju Italiju miješanog podrijetla, djelomično se poklapajući s uzorcima iz Dalmacije, a djelomično iz

Slavonije. Također, rezultati pokazuju jasno strukturiranje dalmatinskih čagljeva u zasebnu skupinu. Uzorci iz Slavonije i Srbije pripadaju istoj genetičkoj grupaciji. Genetičko odvajanje kontinentalnih od obalnih uzoraka u Hrvatskoj upućuje na različito geografsko i povijesno porijeklo tih populacija. Rezultati su u skladu sa dostupnim povijesnim podacima. Njegova stalna prisutnost je zabilježena na prostorima južne Dalmacije još u 15. stoljeću. Stalne populacije u sjevernoj Dalmaciji i Istri su ustanovljene dosta kasnije, tijekom 20. stoljeća (Kryštufek i sur. 1997). Pretpostavlja se kako je obalna populacija čagljeva preživjela u izolaciji više stotina generacija, a rezultati podupiru tu tezu.

Cohen i sur (2013) istražuju populaciju čaglja i crvene lisice (*Vulpes vulpes*) u Izraelu, 48 godina nakon što je proveden veliki program istrebljenja čaglja uporabom otrova, pod pokroviteljstvom Odjela za zaštitu bilja Ministarstva poljoprivrede. Naime, čagalj je smatran glavnim rezervoarom bjesnoće. To je rezultiralo gotovo potpunim istrebljenjem čaglja u Izraelu. The Israel Nature and Parks Authority donosi i provodi zakon koji štiti divlje vrste i tako brojnost čagljeva u Izraelu raste do prvotnih razina. Danas, čagalj u Izraelu obitava u velikoj brojnosti i još je zaštićen zakonom o očuvanju divljih vrsta. Njihova sposobnost prilagodbe antropogenim promjenama i staništima omogućila mu je proširenje na južne dijelove Izraela, iako nikada prethodno nisu obitavali u pustinjском okolišu (Nemtsov i King 2002). Cohen i sur. (2013) su izolirali DNA iz 88 uzoraka čaglja i 85 uzoraka crvene lisice iz pet različitih regija Izraela i analizirali 13 mikrosatelitnih lokusa s ciljem utvrđivanja genetičke raznolikosti populacija. Rezultati pokazuju visok stupanj raznolikosti kod obje vrste unatoč činjenici kako je čagalj na tom području bio gotovo istrebljen. Predložili su mogući put migracije kroz Jordan Rift Valley za obje vrste zbog genetičke sličnosti između populacija na sjeveru i jugu Izraela. Međutim, u obje vrste pronađene su razlike između životinja u središnjem Izraelu i onih sa juga i sjevera, što ukazuje na relativnu izolaciju središnjih populacija, uslijed fragmentacije staništa.

Rutkowski i sur (2015) analiziraju 97 jedinki čaglja iz 5 različitih geografskih regija: Južno-istočna Europa (SEE) sa uzorcima iz Rumunjske, Hrvatske, Slovenije, Ukrajine, Srbije, Mađarske i sjeverne Grčke; regija Kavkaz (CAU) koja uključuje uzorke iz Azerbejdžana, Armenije i Gruzije; Baltičke republike (BAL) sa uzorcima iz Litve i Estonije; južna Grčka (GRE-P) koja sadrži uzorke sa Peleponeza te uzorci sa grčkog otoka Samos koji se nalazi u sjevernom Egejskom moru (GRE-S). Sekvencirali su dio mtDNA CR1 i proveli genotipizaciju uzoraka korištenjem 15 mikrosatelitnih markera (STR) koji su se pokazali polimorfima u prethodnim istraživanjima (Fabbri i sur. 2013). Identificirali su ukupno 102 alela iz 15 STR,

(1.05 alela po jedinki). Sveukupni rezultati pokazuju nešto veći stupanj genetičke raznolikosti od rezultata prethodnih istraživanja na europskim populacijama čaglja, osim u slučajevima otočkih populacija (GRE-S) što može biti posljedica izolacije u kojoj je nizak genetički polimorfizam često posljedica učinka osnivača i/ili genetičkog drifta. Međutim, rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima i ukazuju na manju genetičku raznolikost čaglja u usporedbi sa ostalim divljim životinjama iz porodice pasa (*Canis lupus*, *Vulpes vulpes*) u Europi. Nadalje, genetička raznolikost europskih čagljeva je znatno niža nego kod analiziranih čagljeva iz Izraela (Cohen i sur 2013), usprkos činjenici da je čagalj na tom području bio gotovo istrijebljen 60-ih godina prošlog stoljeća. Dakle, niska genetička raznolikost europskih čagljeva nije odraz specifične karakteristike vrste već može biti povezana s jedinstvenom poviješću čagljeva na europskom kontinentu. Za razliku od prethodnih istraživanja u kojima je pronađen samo jedan jedini haplotip pri analiziranoj mtDNA, Rutkowski i sur. su pronašli 4 jedinstvena haplotipa. Međutim, smatraju kako je cjelokupna raznolikost također niska budući da je uzorkovano veliko područje. Rezultati pokazuju jasno strukturiranje populacije s Peleponeza, kao i dalmatinske populacije što se poklapa sa rezultatima Fabbri i sur. (2013). Isto tako, obje populacije pokazuju znakove veće genetičke raznolikosti, što je u skladu s hipotezom o njihovoj kontinuiranoj prisutnosti duž mediteranske obale još od srednjeg vijeka. Otočna populacija čagljeva sa Samosa je također jasno diferencirana od ostalih uzorkovanih regija. Nedavna kolonizacija Baltika je prema ovom istraživanju posljedica širenja sa Kavkaza (uzorci iz Estonije) te južno-istočne Europe (uzorci iz Litve). Dvojno podrijetlo baltičke populacije ne podupire teoriju kako je čagalj strana invazivna vrsta unešena ljudskom djelatnošću, već se priklanja teoriji o prirodnoj ekspanziji vrste. Rutkowski i sur. pozivaju na izmjenu zakona u vezi upravljanja i zaštite čaglja na Baltiku.

Galov i sur. 2015 opisuje prve slučajeve križanja između čaglja i domaćeg psa na tri jedinke (uzorci S21, S22 i 60c) za koje su na osnovu netipičnog fenotipa za čaglja posumnjali kako su to zapravo križanci. Koristili su različite genetičke markere i metode i dokazali kako je uzorak S21 zaista prva generacija križanja čaglja i psa, uzorak S22 još jedan križanac nastao povratnim križanjem sa psom te da je uzorak 60c povratni križanac sa čagljem. Uzorci S22 i 60c pokazuju kako su križanci čaglja i psa fertilni. Jedno istraživanje navodi kako su se pas i čagalj odvojili prije 400.000 godina (Freedman i sur. 2014), a prema drugom istraživanju smatra se da su se odvojili prije čak 1,7 milijuna godina (VonHoldt i sur. 2011). Nekada se za razvitak potpune reproduktivne izolacije vrsta mora izmijeniti stotine do milijun generacija.

Analizirali su ekson 2 skupine II MHC DQA1, DQB1, DRB1 gena i pokazali kako su MHC sekvence, iako rijetko korištene kao markeri hibridizacije, u nekim slučajevima pogodne za identifikaciju hibrida. Osim tri spomenuta uzorka za koja su dokazali da su križanci, analizirali su 50 jedinki čaglja iz područja Slavonije i Dalmacije. Identificirali su četiri DRB1 alela, dva DQA1 i dva DQB1 alela te četiri DQA1/DQB1/DRB1 haplotipa. Od ukupnog broja pronađenih alela, tri DRB1 alela (DRB1*13001, DRB1*13101 i DRB1*04503), jedan DQA1 alel (DQA1*03001) i oba pronađena DQB1 alela (DQB1*02305 i DQB1*06801) su tipični čagljevske aleli i nisu prethodno pronađeni kod drugih vrsta iz porodice pasa. Najčešći haplotip je također tipičan čagljevske, DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*00901 s frekvencijom 50% u istraživanom uzorku. Kod sva tri križanca pronađen je upravo taj haplotip, a drugi haplotipovi nisu nađeni kod čaglja, ali su zato česti kod psa. Haplotip uzorka S21 (DQA1*00301/DQB1*00401/DRB1*00803) je prethodno nađen kod hrvatskog ovčara i graničarskog terijera. Haplotipovi (DQA1*00401/DQB1*01301/DRB1*02001 i DQA1*00101/DQB1*00401/DRB1*00803) pronađeni kod uzoraka S22 i 60c su također identificirani kod brojnih vrsta pasmina.

1.4 Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je odrediti polimorfizam gena DRB lokusa, te raznolikost DQA1/DQB1/DRB1 haplotipova skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti na uzorcima čagljeva (*Canis aureus*) istočne Europe. Očekujem kako će dobiveni rezultati potvrditi pozitivnu selekciju na analiziranom MHC lokusu. Kako je do danas objavljen jako mali broj istraživanja MHC gena čagljeva, pridonijet ću općem znanju o raznolikosti gena ove vrste.

2.MATERIJALI I METODE

2.1 Uzorci tkiva

Za izradu ovog diplomskog rada koristila sam ukupno 21 uzorak mišićnog tkiva čaglja: devet iz Litve (uzorci 1cL, 2cL, 3cL, 4cL, 5cL, 6cL, 7cL, 8cL, 9cL) , šest iz Estonije (10cE, 11cE, 12cE, 13cE, 14cE, 15cE), dva iz Gruzije (19cG, 21cG) i četiri iz Rumunjske (22cR, 23cR, 24cR, 25cR).

2.2 Izolacija DNA

Izolirala sam DNA iz uzoraka koristeći komercijalni paket Wizard genomic DNA purification kit od Promega, prema prilagođenom protokolu. Prvo sam označila 1,5 ml eppendorf epruvetu oznakama uzorka i odpipetirala 60 µl 0.5 M EDTA (eng. ethylenediaminetetraacetic acid) otopine pH 8.0 i 250 µl otopine za lizu jezgre stanice (Nuclei lysis solution) u svaku epruvetu. Zatim sam usitnila komadiće uzorka skalpelom te ih dodala u epruvete. 10 sekundi sam vorteksirala i centrifugirala epruvetu. Nakon toga sam dodala 9 µl proteinaze K (20 mg/ml) i snažno vorteksirala jednu minutu. Inkubirala sam epruvetu na 55 °C preko noći. Sutradan sam pričekala da se uzorci ohlade na sobnu temperaturu i centrifugirala desetak sekundi. Dodala sam 100 µl Protein precipitation solution pa snažno vorteksirala 20 sekundi nakon čega sam uzorke stavljala na +4 °C 5 minuta. Zatim sam centrifugirala uzorke 4 minute na 14.000 rpm. U nove, prethodno označene 1,5 ml eppendorf epruvete odpipetirala sam 300 µl 100% etanola te dodala supernatant iz stare epruvete. Pažljivo sam promiješala sadržaj epruvete pa centrifugirala 1 minutu na 14.000 rpm. Nakon centrifugiranja sam dekantirala supernatant i dodala 300 µl 70% etanola te pažljivo miješala okretanjem. Ponovno sam centrifugirala 1 minutu na 14.000 rpm i odstranila supernatant pipetiranjem. Otvorila sam epruvete, preokrenula ih na čisti filter papir i sušila na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon sušenja sam dodala 100 µl otopine za rehidraciju DNA (DNA rehydration solution). U posljednjem koraku sam inkubirala uzorke na +4 °C preko noći i pohranila ih na istoj temperaturi u hladnjaku do daljnje obrade.

2.3 Lančana reakcija polimerazom

U ovom diplomskom radu koristila sam metodu lančane reakcije polimerazom ili PCR (eng. polymerase chain reaction) s ciljem umnažanja odsječka DNA čagljeva, i to eksona 2 DRB lokusa MHC sustava skupineII. Koristila sam komercijalni komplet HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) i HotStarTaq PLUS DNA Polymerase (Qiagen). Oba kompleta sadrže

vodu bez RNAze i Taq PCR *master mix* (sastoji se od Qiagen PCR pufera, dNTP-ova i Taq DNA polimeraze). Komplet HotStarTaq PLUS dolazi još i sa CoralLoad bojom koju sam dodavala u volumenu od 1/10 volumena konačne otopine za PCR, ali samo kod malih volumena koji su mi služili za provjeru (12 μ l), budući da kod velikih volumena koje sam radila za sekvenciranje (40 μ l) smeta pri daljnoj obradi (purifikaciji i sekvenciranju uzoraka). Kod umnažanja za svrhe molekularnog kloniranja radila sam PCR u ukupnom volumenu od 25 μ l. Pola volumena kod svih PCR reakcija zauzimao je *master mix*, a DNA je zauzimala od 2 μ l (mali volumen) do 5 μ l (veliki volumen). Koristila sam početnice:

GJDRBF2:5'GAGGAAACACGAACCGTGGGT3' i

GJDRBR2:5'TCCTCACTTGTACCGGCTCG3' (Mešin 2015).

Dodavala sam ih u volumenu da im konačna otopina za PCR bude 0,2 μ M, a preostali dio volumena reakcijske otopine zauzimala je voda bez RNAze.

Prvi stupanj PCR reakcije, aktivacije enzima, odvijao se pri 95 °C u vremenu trajanja od 5 minuta. Amplifikacija DNA se odvijala u 14 *touchdown* ciklusa s temperaturama denaturacije (engl. denaturation) 95 °C u trajanju 30 sekundi i nalijeganja početnica (engl. annealing) na početnoj temperaturi od 62 °C u trajanju od 1 minute koja se u svakom ciklusu smanjivala za 0.5 °C te elongacijom, tj. produživanjem DNA na temperaturi od 72 °C u trajanju od 1 minute. Onda je uslijedilo još 20 ciklusa amplifikacije, ali ovoga puta se nalijeganje početnica odvija 1 minutu na 55 °C. Nakon zadnjeg ciklusa slijedi završno produljenje lanaca u trajanju od 10 minuta pri 72 °C.

2.4 Elektroforeza

Za provjeru prisutnosti DNA u otopinama nakon PCR reakcije i molekularnog kloniranja koristila sam elektroforezu na 1% agaroznom gelu. Da bi se vizualizirali odsječci DNA, u gel sam prilikom izrade dodala boju Syber Safe (Invitrogen) u omjeru 1 μ l boje na 10 ml gela. Kada se gel ohladio, uzorak DNA sam miješala sa puferom za nanošenje uzoraka (engl. gel loading buffer, GLB) u omjeru 1:1 i dodala u jažice. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 100 V, 400 mA u trajanju od 20 minuta. Nakon elektroforeze gel sam promatrala pod UV transiluminatorom i bilježila rezultate.

2.5. Sekvenciranje

Za izradu ovog diplomskog rada sekvencirala sam PCR produkte svih jedinki dobiveni nakon gore opisanog PCR-a i elektroforeze (eksoni 2 DLA-DRB1). Za sve usluge sekvenciranja koristila sam MacroGen-ov servis za sekvenciranje (www.macrogen.com). Naručila sam uslugu "Standard-seq single Regular", a za početnice prilikom sekvenciranja sam koristila iste one kao i kod PCR-a. Većina uzoraka je sekvencirana samo iz jednog smjera, a neke su uzorke naknadno sekvencirali i iz drugog smjera radi točnog čitanja čitavog slijeda. U servisu sam koristila i dodatne usluge purifikacije.

2.6. Molekularno kloniranje

Za uzorke čije alele nisam pronašla u knjižnici (14cE i 15cE) pretpostavila sam da imaju nove, do tada nepoznate alele pa sam ih podvrgnula molekularnom kloniranju u svrhu razdvajanja gametnih faza, odnosno identifikacije pojedinih alela. Koristila sam komercijalni komplet pGEM® -T easy vector system (Promega). Metoda se zasniva na tome da odsječak DNA (insert) koji je predmet istraživanja ugradimo u bakterijski plazmid (vektor) koji se potom unosi u bakterijsku stanicu te se taj fragment umnaža prirodnom reprodukcijom bakterija i time umnažamo (kloniramo) svoj DNA odsječak od interesa. Odabir klonova koji nose ugrađenu DNA vrši se na dvije razine vezano uz dva specifična svojstva pGEM® -T plazmidnog vektora. Vektor sadrži gen koji omogućuje rast bakterijskih stanica na antibiotiku ampicilinu čime je omogućena selekcija bakterijskih stanica koje su primile plazmid budući da samo one rastu na podlozi s ampicilinom. Vektor također sadrži *lacZ* gen koji kodira za jednu podjedinicu enzima β -galaktozidaze čiji je supstrat X-Gal. Ako se u plazmide ugradio insert, *lacZ* gen je bio inaktiviran, dok ako se plazmid zatvorio bez ugradnje inserta, *lacZ* gen je postao aktivan. Dodavanjem X-Gal-a kao supstrata β -galaktozidaze, te IPTG-a kao induktora laktoznog operona u podlogu, kolonije bakterija koje sadrže insert su bile bijele boje, dok su kolonije koje sadrže plazmid bez inserta bile plave boje.

Prije molekularnog kloniranja PCR produkt sam pročistila pomoću komercijalnog paketa Wizard® SV Gel and PCR clean-up system (Promega). Nakon PCR reakcije u tubice s PCR produktom sam dodala isti volumen otopine za vezanje na membranu (membrane binding solution). Pripremila sam čiste tubice za skupljanje od 2 ml u koje sam stavila kolone za pročišćavanje (SV Minicolumn). U kolone sam odpipetirala otopinu s umnoženom DNA, pa sam sve inkubirala 1 minutu na sobnoj temperaturi te centrifugirala kolonu na 14.000 rpm, također 1 minutu. Nakon centrifugiranja odlila sam tekućinu i ispirala sa 700 μ l otopine za

ispiranje (membrane wash solution) u koju sam prethodno dodala etanol. Ponovno sam centrifugirala na 14.000 rpm 1 minutu i bacila tekućinu iz tubica za sakupljanje. Ponovno sam dodala 500 µl otopine za ispiranje i centrifugirala na 14.000 rpm 5 minuta. Bacila sam tekućinu i kolone centrifugirala 1 minutu s otklopljenom centrifugom da ispare ostaci etanola. Potom sam prebacila kolonu u novu, čistu 1.5 ml tubicu i dodala 20 µl vode bez nukleaze te inkubirala na sobnoj temperaturi 1 minutu. Sve sam centrifugirala na 14.000 rpm 1 minutu. Kolone sam bacila, a u tubicama je ostala pročišćena DNA koju sam pohranila na 4 °C do sljedećeg koraka.

Proces samog molekularnog kloniranja uključuje ligaciju, transformaciju bakterijskih stanica te umnažanje odabranih bakterijskih klonova. Prvi dan sam radila ligaciju, odnosno ugrađivanje željenog DNA odsječka u plazmid. Prvo sam insert (ekson 2 DRB lokusa) umnožila PCR-om. Zatim sam elektroforezom provjerila uspješnost PCR-a, a nakon toga sam purificirala produkt PCR reakcije. Kako bi ligacijska reakcija uspjela morala sam utvrditi količinu PCR produkta koju dodajem u reakcijsku smjesu. Dozvoljeni omjeri inserta i vektora su od 8:1 do 1:8. Približnu koncentraciju DNA u PCR proizvodu sam odredila preko elektroforeze PCR produkta i otopine DNA poznatih koncentracija na način da sam usporedila njihove jačine osvjetljenja pod UV svjetlom. Kako bi odredila koliko PCR proizvoda dodajemo u ligacijsku smjesu koristila sam sljedeću jednadžbu:

$$\frac{\text{masa vektora (ng)} \times \text{duljina odsječka (kb)}}{\text{duljina vektora (kb)}} \times \frac{\text{insert}}{\text{vektor}} \text{ molarni omjer} = \text{masa inserta (ng)}$$

Po protokolu preporučeni molarni omjer iznosi 3/1. pri čemu je koncentracija vektora 50 ng/µl, veličina vektora 3 kb, a odsječak kojeg namjeravamo klonirati dug je oko 500 parova baza (0.5 kb), te iz toga slijedi:

$$\frac{50 \text{ ng vektora} \times 0.5 \text{ kb odsječka}}{3 \text{ kb vektora}} \times \frac{3}{1} = 25 \text{ ng inserta}$$

Nakon što sam odredila potreban volumen PCR proizvoda za ligacijsku reakciju, pripremila sam ligacijsku smjesu. U epruvetu od 0,2 mL za standardnu reakciju odpipetirala sam 1 µl pGEM® -T plazmida, 1 µl T4 DNA ligaze, 5 µl pufera za brzu ligaciju, pročišćeni PCR proizvod i vode bez nukleaze do konačnog volumena (10 µl). Za negativnu kontrolu

pripremila sam istu smjesu samo bez PCR produkta, a za pozitivnu kontrolu sam dodala 2 μ l kontrolnog inserta umjesto PCR proizvoda. Ligacijske smjese sam ostavila preko noći na 4 °C

Drugog dana sam radila transformaciju bakterija ligacijskom smjesom. U tu svrhu sam koristila JM109 visoko kompetentne bakterije *Escherichia coli*. Pripremila sam po dvije petrijeve zdjelice za 30 ml hranjive podloge za svaku ligacijsku reakciju. Po uputama proizvođača napravila sam LB (eng. lysogeny broth) medij koji se koristi za hranjivu podlogu. Dakle, po litri medija dodali smo 5 g Bacto® -yeast extract-a, 5 g NaCl, 10 g Bacto® -trypton-a, 1 L vode i koliko je potrebno NaOH do pH vrijednosti od 7,0. Nakon toga sam dodala 15 g agara na 1 L medija i autoklavirala prije dodavanja u petrijeve zdjelice. Nakon autoklaviranja sam ohladila medij na 50 °C i dodala ampicilin do konačne koncentracije od 100 μ g/mL. Dodala sam 30-35 mL medija u petrijeve zdjelice i pustila da se medij skrutne. Onda sam dodala 100 μ l 100 mM IPTG-a i 20 μ l 50 mg/mL X-Gal-a i razmazala po površini LB krutog medija. Ostavila sam 30 minuta na 37°C kako bi se IPTG (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid) i X-gal apsorbirao u medij. Nakratko sam centrifugirala ligacijske tubice od prethodnog dana. Pipetirala sam 2 μ l svake ligacijske reakcije u nove sterilne 1.5 ml epruvete koje su na ledu. Potom sam vadila zamrznute JM109 *E.coli* bakterije i stavljala ih na ledenu kupelj na 5 minuta kako bi se odmrzule. Pažljivo sam miješala bakterije nakon odmrzavanja i dodala po 50 μ l stanica u svaku tubicu s 2 μ l ligacijske reakcije. Pažljivo sam miješala sve tubice i ostavljala ih na ledu 20 minuta, potom 45 sekundi u vodenu kupelj na 42°C, a zatim ponovno na led 2 minute. Taj temperaturni šok izaziva primanje plazmida u bakterije. U tubice sam dodala 950 μ l tekućeg LB medija, pa potom inkubirala 1.5 sati na 37°C uz stalno miješanje od 150 rpm. Tekući LB medij sam pripremila isto kao prethodno opisani kruti LB medij, samo bez dodavanja 15 g agara. Nakon 1.5 sati inkubacije iz svake reakcijske tubice sam pipetirala 100 μ l na po dvije prethodno pripremljene LB/X-Gal/ampicilin/IPTG petrijeve zdjelice, pa ih sve inkubirala 24 sata na 37°C.

Slijedeći dan sam za svaki uzorak označila po 10 epruveta od 15 ml, te sam u njih odpipetirala 5 ml tekućeg LB medija. Petrijeve zdjelice sam izvadila iz inkubatora i prenijela bijele kolonije bakterija u epruvete sa svježim medijem, jednu koloniju po epruveti. Epruvete sam zatim inkubirala preko noći na 37 °C uz trešnju od 200rpm. Na ovaj način sam dodatno umnožila bakterijske kolonije, a time i specifičan insert DNA kojeg istražujem.

Posljednji korak je izolacija plazmida iz bakterija i purifikacija. Koristila sam komercijalni komplet Wizard® plus SV minipreps DNA purification system (Promega) koji sadrži otopinu

za resuspenziju bakterijskih stanica, otopinu za lizu bakterijskih stanica, neutralizacijsku otopinu, otopinu za ispiranje kolonica te otopinu alkalne proteaze. U prvom koraku sam centrifugirala epruvete koje sadrže bakterije, 5 minuta na 2000 rpm. Odlila sam supernatant i posušila epruvetu na filter papiru. Potom sam pipetirala 250 μ l otopine za resuspenziju stanica (cell resuspension solution) u epruvete i cijeli sadržaj (280 μ l) ispipetirala u nove označene epruvete od 1,5 ml. Dodala sam 250 μ l otopine za lizu stanica (cell lysis solution) u svaku epruvetu te pažljivo miješala okretanjem tubica 4 puta. Ponavljala sam prethodni korak dodavajući 10 μ l otopine alkalne proteaze (alkaline protease solution), okretala 4 puta. Zatim sam pipetirala 350 μ l otopine za neutralizaciju (neutralization solution) i miješala 4 puta. Tada sam sve epruvete centrifugirala 10 minuta na 14.000 rpm i pripremila nove kolone i epruvetice od 1,5ml. Nakon centrifuge odlila sam supernatant u kolonu i centrifugirala 1 minutu na 14.000 rpm. Potom sam vadila kolonu, izlijevala otopinu iz epruvete i vraćala kolonu u epruvetu. Pipetirala sam 750 μ l otopine za ispiranje (column wash solution) u kolonu, centrifugirala 1 minutu na 14.000 rpm i ponavljala postupak izlijevanja otopine iz epruvete. Zatim sam ponovili prethodni korak s 250 μ l otopine za ispiranje i centrifugirala 2 minute na 14.000 rpm. Bacila sam epruveticu s otopinom i uzela novu 1,5 ml tubicu u koju sam stavila kolonu. Pipetirala sam 50 μ l vode bez nukleaze u kolonu i centrifugirala 1 minutu na 14.000 rpm, nakon čega sam bacila kolonu, a epruvetu s plazmidom spremila na 4 °C. Prisutnost DNA sam provjerila elektroforezom prije slanja na sekvenciranje. Sekvencira se dio plazmida koji sadrži klonirani DNA odsječak i koriste se početnice uobičajene za PCR DRB lokusa.

2.7 RAČUNALNA OBRADA PODATAKA

2.7.1. BioEdit

BioEdit (Hall, 1999) je programski paket koji sadrži opcije za obradu i manipuliranje nukleotidnim i aminokiselinskim sljedovima. U ovom radu BioEdit sam koristila za vizualiziranje, a ClustalW za višestruko poravnavanje i usporedbu dobivenih nukleotidnih sljedova DNA.

2.7.2. SeqScape

SeqScape (Applied biosystems) sam koristila za identifikaciju dobivenih alela. SeqScape je programski paket pomoću kojeg se detektiraju i analiziraju mutacije, otkrivaju polimorfna mjesta, identificiraju aleli te potvrđuju sljedovi. Elektroferogram svakog uzorka sam uspoređivala s alelima koji sačinjavaju referentnu knjižnicu za DRB lokus. Ako uzorak nema razlika, znači da su u referentnoj knjižnici pronađeni aleli koje jedinka nosi. Ako u referentnoj knjižnici program ne pronalazi alele za određeni uzorak, to upućuje na mogućnost novog, dosad nepoznatog alela u toj vrsti i lokus takve jedinke kloniramo.

2.7.3. MEGA

Programski paket MEGA (eng. Molecular evolutionary genetics analysis) (Tamura i sur. 2013) omogućuje analizu i usporedbu aminokiselinskih i nukleotidnih sljedova s ciljem istraživanja filogenetske povijesti i donošenja zaključaka o molekularnoj evoluciji određenih gena ili vrsta. Pomoću ovog programa prevela sam nukleotidne sljedove dobivenih alela u aminokiselinske, uočila varijabilna mjesta u pojedinim alelima te utvrdila sinonimne i nesinonimne mutacije. Omjer nesinonimnih (dN) i sinonimnih mutacija (dS), dN/dS test sam koristila da ustanovim je li genski lokus DRB populacije čagljeva istočne Europe pod utjecajem selekcijske sile. Pomoću MEGA programa odredila sam prosječnu nukleotidnu i aminokiselinsku evolucijsku udaljenost među alelima DRB lokusa. Evolucijska udaljenost je mjera koja omogućuje istraživanje divergencije te molekularne evolucije, a određuje se mjerenjem broja susptitucija nukleotida ili aminokiselina između alela u određenoj populaciji. Program odabire najpogodniji model supstitucije uzimajući u obzir da je idealan model onaj s najnižim Bayesovim informacijskim kriterijem.

2.7.4. REL analiza

U MEGA programu sam analizirala cijeli nukleotidni slijed pojedinog alela, međutim takva analiza je nepotpuna jer se smatra kako selekcija najvjerojatnije neće djelovati na cijeli ekson 2 već na specifična mjesta unutar gena te je stoga potrebno analizirati svaki kodon individualno. Identifikaciju kodona koji su pod djelovanjem pozitivne selekcije i procjenu razine vjerojatnosti djelovanja pozitivne selekcije na tim kodonima odredila sam pomoću Maximum likelihood metode koja kao osnovu koristi omjer dN/dS vrijednosti. Koristila sam REL metodu (eng. Random effects likelihood metodu) unutar paketa HyPhy na Datamonkey web serveru (Sergei i sur. 2005) (www.datamonkey.org).

2.8 Izvod haplotipova

Za izvođenje haplotipova koristila sam alele dobivene u diplomskom istraživanju rađenom na istim uzorcima čaglja (Svetličić 2016). Posložila sam alele redosljedom DQA1/DQB1/DRB1 svakog uzorka i gledala koje kombinacije dolaze uvijek u paru. Budući da ima puno homozigota, upravo koristeći homozigotne uzorke (na sva tri lokusa) sam mogla izvesti pojedine haplotipove, te pronaći takve kombinacije unutar heterozigotnih jedinki, tako da niti jedan uzorak nije ostao upitan i mogla sam izvući tro-lokusni haplotip za svaku jedinku za koju smo dobili sve alele.

3.REZULTATI

3.1 Aleli čaglja DRB lokusa

U ovom diplomskom radu izolirala sam ukupnu DNA iz 21 uzorka mišićnog tkiva čaglja: devet iz Litve, šest iz Estonije, dva iz Gruzije i četiri iz Rumunjske. Istražila sam ekson 2 DRB lokusa i uspjela odrediti alele 17 jedinki čaglja. U cjelokupnom uzorku sam pronašla pet DRB alela, od čega su dva bila nova alela (a od kojih niti jedan nije bio u homozigotne jedinke), te ih je bilo potrebno potvrditi molekularnim kloniranjem. Kloniranjem sam zaista potvrdila dva nova alela, kojima sam dala radne nazive DRB1*14aEst i DRB1*15aEst. U tablici 1 su prikazani pronađeni aleli DRB lokusa i njihove frekvencije u istraženom uzorku. Frekvencija alela se izračuna tako da se nađeni broj određenog alela u populaciji dijeli s ukupnim brojem alela (u ovom slučaju 34). Najveću učestalost pokazuje alel DRB1*00901, a najmanje novoutvrđeni aleli koje smo pronašli molekularnim kloniranjem DRB1*14aEst i DRB1*15aEst.

Tablica 1. Učestalost DRB alela čaglja (*Canis aureus*) istočne Europe

Ime alela	Učestalost (%)	Apsolutan broj	Broj homozigotnih jedinki
DRB1*00901	61,7	21	7
DRB1*13101	26,47	9	3
DRB1*13001	5,9	2	0
DRB1*14aEst	2,9	1	0
DRB1*15aEst	2,9	1	0

Ekson 2 DRB lokusa je dug 267 parova baza i kodira za ukupno 89 aminokiselina. Svih 5 alela ima jedinstvenu aminokiselinsku sekvencu, a pripadajući nukleotidni i aminokiselinski sljedovi pojedinih alela prikazani su u Tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Nukleotidni ispis DRB alela čagljeva (*Canis aureus*) iz istočne Europe. 15A označava alel DRB*15aEst, dok 14A označava alel DRB*14aEst.

Ime alela	Nukleotidni slijed											Položaj
15A	CAT	TTC	TTG	GAG	GTG	GCA	AAG	GCC	GAG	TGC	[30]	
DRB1*13101	[30]	
DRB1*00901	T..	[30]	
DRB1*13001	A..	A..	.T.	...	TT.	[30]	
14A	A..	.T.	...	TT.	[30]	
15A	CAT	TTC	ACC	AAC	GGG	ACG	GAG	CGG	GTG	CGG	[60]	
DRB1*13101	[60]	
DRB1*00901	T..	[60]	
DRB1*13001	[60]	
14A	[60]	
15A	TTC	GTG	GAA	AGA	CAC	ATC	TAT	AAC	CGG	GAG	[90]	
DRB1*13101	[90]	
DRB1*00901	T..	...	C..	[90]	
DRB1*13001	C.T	C..	ATG	...	G..	[90]	
14A	.AT	C..	ATG	...	G..	[90]	
15A	GAG	AAC	GTG	CGC	TTC	GAC	AGC	GAC	GTG	GGG	[120]	
DRB1*13101	[120]	
DRB1*00901	[120]	
DRB1*13001	...	TT.	[120]	
14A	...	C..	[120]	
15A	GAG	TAC	CGG	GCG	GTC	ACG	GAG	CTC	GGG	CGG	[150]	
DRB1*13101	[150]	
DRB1*00901	[150]	
DRB1*13001	[150]	
14A	[150]	
15A	CCC	GAC	GCT	GAG	TCC	TGG	AAC	GGG	CAG	AAG	[180]	
DRB1*13101	[180]	
DRB1*00901	C..	[180]	
DRB1*13001	C..	[180]	
14AA.	[180]	
15A	GAG	CTC	TTG	GAG	CAG	AGG	CGG	GCC	GCG	GTG	[210]	
DRB1*13101	[210]	
DRB1*00901	...	T..G.	.A.	[210]	
DRB1*13001G.A.	...	[210]	
14A	t..	GA.	[210]	
15A	GAC	ACC	TAC	TGC	AGA	CAC	AAC	TAC	GGG	GTG	[240]	
DRB1*13101	[240]	
DRB1*00901	[240]	

DRB1*13001G GTG C.. ...	[240]
14A	[240]
15A	ATT GAG AGC TTC ACG GTG CAG CGG CGA G	[268]
DRB1*13101	GGC	[268]
DRB1*00901	[268]
DRB1*13001	GGCt.g. g	[268]
14A	GGC	[268]

Tablica 3. Aminokiselinski ispis DRB alela čaglja (*Canis aureus*) iz istočne Europe. 15A označava alel DRB*15aEst, dok 14A označava alel DRB*14aEst. Alel DRB*15aEst je najbližnji alelu DRB*13101, od kojeg se razlikuje jedino u kodonu 81, gdje alel DRB*15aEst kodira za aminokiselinu izoleucin, a alel DRB*13101 za glicin (označene crvenom bojom)

Ime alela	Aminokiselinski slijed	Položaj
15A	HFLEVAKAEC HFTNGTERVR FVERHIYNRE	[30]
DRB1*13101	[30]
DRB1*00901S.. Y.....Y.H...	[30]
DRB1*13001	...KMV.F.. ...LLM.D....	[30]
14A	...MV.F.. ...YLM.D....	[30]
15A	ENVRFDSDBG EYRAVTELGR PDAESWNGQK	[60]
DRB1*13101	[60]
DRB1*00901R..	[60]
DRB1*13001	.F.....R..	[60]
14A	.H.....Y.....	[60]
15A	ELLEQRRAAV DTYCRHNYGV I ESFTVQRR	[89]
DRB1*13101 G	[89]
DRB1*00901	.F..RK.....	[89]
DRB1*13001R...E. ..V.....R. G.....	[89]
14AE..... G.....	[89]

3.2 Haplotipovi

U populaciji sam identificirala sedam potpunih tro-lokusnih DQA/DQB/DRB haplotipova među 16 jedinki (2cL, 3cL, 4cL, 5cL, 7cL, 8cL, 9cL, 10cE, 11cE, 12cE, 14cE, 15cE, 21cG, 22cR, 23cR, 24cR), dva dvo-lokusna DQA/DQB haplotipova za tri jedinke (1cL, 6cL, 13cE) i dva DQB/DRB haplotipa za jedinku 25cR (Tablica 4). Svi haplotipovi i njihove učestalosti u uzorku su prikazani u Tablici 5. Učestalost sam izračunala tako sam nađeni broj određenog haplotipa u populaciji podijelila sa ukupnim brojem haplotipova (u ovom slučaju 32).

DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*00901 (Tablica 4, označen žutom pozadinom) je najučestaliji haplotip; pojavljuje se 19 puta i prisutan je kod 13 jedinki, od kojih su čak šest homozigoti (uzorci 2cL, 3cL, 12cE, 21cG, 22cR i 23cR). Isti haplotip je nađen u populaciji hrvatskih čagljeva s frekvencijom 50% na 50 istraživanih jedinki (Tablica 5.) (Galov i sur. 2015). Najčešći je i kod izraelske populacije (Mešin, 2015) te je pronađen i kod analiziranih uzoraka iz Srbije i Bugarske (Tablica 5.) (Galov i sur. neobjavljeno). Haplotip DQA1*02401/DQB1*06801/DRB1*13101 (Tablica 4, označen zelenom pozadinom) se pojavljuje sedam puta i prisutan je kod šest jedinki, u ostalim do sada istraženim populacijama čagljeva se ne pojavljuje. Haplotip DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*13101 (Tablica 4, označen crvenom pozadinom) se pojavljuje dva puta i prisutan je kod dvije jedinke. Kod jedinke 10cE sam pronašla haplotip DQA1*02401/DQB1*06801/DRB1*00901 (Tablica 4, označen svjetlosmeđom pozadinom). Nadalje, kod jedinke 24cR sam pronašla haplotip DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*13001 (Tablica 4, označen tamnosmeđom pozadinom) koji je ujedno pronađen i kod čagljeva iz Hrvatske sa učestalošću 30% na 50 istraživanih jedinki (Galov i sur. 2015). Osim toga, pronađen je i kod jedinki iz Srbije i Bugarske sa učestalošću od 35,71% (Tablica 5.) (Galov i sur. neobjavljeno). Kod jedinki 14cE i 15cE koje smo podvrgnuli molekularnom kloniranju pronađeni su novi haplotipovi DQA1*02401/DQB1*06801/DRB1*14aEst i DQA1*02401/DQB1*06801/DRB1*15aEst (Tablica 4, označeni tamnoplavom i svjetloplavom pozadinom).

Dvo-lokusni DQA/DQB haplotip smo dobili kod tri jedinke. Haplotip DQA1*00402/DQB1*02305 se pojavljuje četiri puta, a haplotip DQA1*00402/DQB1*06801 se pojavljuje dva puta. Kod jedinke 25cR dobili smo DQB/DRB haplotip, jedan DQB*02305/DRB1*00901, a drugi DQB*02305/DRB1*13001.

Tablica 4. Distribucija dvo-lokusnih i tro-lokusnih haplotipova, te alela DQA, DQB i DRB lokusa po jedinkama. Svaka boja predstavlja određeni tro-lokusni haplotip. Aleli za DQA i DQB lokuse su preuzeti iz rada Svetličić (2016).

Oznaka jedinke	Aleli DQA	Aleli DQB	Aleli DRB
1cL	DQA1*00402	DQB1*02305	
	DQA1*00402	DQB1*02305	
2cL	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
3cL	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
4cL	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*02401	DQB1*06801	DRB1*13101
5cL	DQA1*02401	DQB1*06801	DRB1*13101
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13101
6cL	DQA1*00402	DQB1*02305	
	DQA1*02401	DQB1*06801	
7cL	DQA1*02401	DQB1*06801	DRB1*13101
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
8cL	DQA1*02401	DQB1*06801	DRB1*13101
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13101
9cL	DQA1*02401	DQB1*06801	DRB1*13101
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
10cE	DQA1*02401	DQB1*06801	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
11cE	DQA1*02401	DQB1*06801	DRB1*13101
	DQA1*02401	DQB1*06801	DRB1*13101
12cE	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
13cE	DQA1*02401	DQB1*06801	
	DQA1*00402	DQB1*02305	
14cE	DQA1*02401	DQB1*06801	DRB1*14aEst
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
15cE	DQA1*02401	DQB1*06801	DRB1*15aEst
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
19cG	DQA1*00101		
	DQA1*00402		
21cG	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
22cR	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
23cR	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
24cR	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
25cR		DQB1*02305	DRB1*00901
		DQB1*02305	DRB1*13001

Tablica 5. Učestalost DQA1/DQB1/DRB1 haplotipova utvrđenih kod 16 jedinki čaglja (*Canis aureus*) iz istočne Europe. Zbog usporedbe, dodala sam učestalost haplotipova dobivenih drugim istraživanjima MHC gena čagljeva, redom: Galov i sur. 2015, učestalost utvrđena na 50 jedinki čaglja iz Hrvatske; Galov i sur. 2015 (neobjavljeno), učestalost utvrđena na sedam jedinki čaglja iz Srbije i Bugarske i diplomski rad Mešin 2015 učestalost utvrđena na šest jedinki čaglja iz Izraela. Istim bojama kao u tablici 4 označeni su pojedini haplotipovi dobiveni u ovom istraživanju.

<u>DQA</u> <u>1</u>	<u>DQB</u> <u>1</u>	<u>DRB1</u>	<u>Ovo</u> <u>istraživanje</u> Učestalost haplotipa (%) Istočna Europa (broj homozigota)	<u>Galov i sur.</u> <u>(2015)</u> Učestalost haplotipa (%) Hrvatska (broj homozigota)	<u>Galov i sur.</u> <u>(neobjavljeno)</u> Učestalost haplotipa (%) Srbija/Bugarska (broj homozigota)	<u>Mešin</u> <u>(2015)</u> Učestalost haplotipa (%) Izrael (broj homozigota)
00402	02305	00901	59,38 (6)	50 (15)	21,43 (0)	66,67% (2)
02401	06801	13101	21,86 (1)	/	/	/
00402	02305	13101	6,25 (0)	/	/	/
02401	06801	00901	3,13 (0)	/	/	/
02401	06801	14aEst	3,13 (0)	/	/	/
02401	06801	15aEst	3,13 (0)	/	/	/
00402	02305	13001	3,13 (0)	30 (6)	35,71 (1)	/
03001	06801	13101	/	15 (2)	21,43 (1)	8,33 (0)
00402	02305	04503	/	5(1)	/	/
03001	06801	00901	/	/	21,43(0)	/
00101	00201	07901	/	/	/	8,33 (0)
00402	02301	04802var	/	/	/	16,67(0)

3.3 Evolucijska udaljenost

Za procjenu nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti koristila sam programski paket MEGA. Program sadrži više nukleotidnih i aminokiselinskih supstitucijskih modela od kojih predlaže najpogodniji i najefikasniji model statističkom analizom prema maksimalnoj sličnosti (maximum likelihood) u odnosu na naše nukleotidne i aminokiselinske sekvence. Za procjenu nukleotidne udaljenosti sam koristila model Tamura 3 parametar koji se korigira parametrom distribucije gama, T92+G model. Aminokiselinsku udaljenost alela je određena Jones-Taylor-Thornton modelom koji se korigira parametrom distribucije gama, JTT+G model. Procjene evolucijske udaljenosti za DRB lokus čaglja su prikazane u Tablici 6.

Tablica 6. Dužina sekvence, broj varijabilnih nukleotidnih mjesta, nukleotidna udaljenost, aminokiselinska udaljenost, broj pronađenih alela za DRB lokus čaglja (*Canis aureus*) iz istočne Europe

Lokus (broj pronađenih alela)	Dužina sekvence	Broj varijabilnih nukleotidnih mjesta	Nukleotidna udaljenost		Aminokiselinska udaljenost	
			Model nukleotidne supstitucije	d(%)	Model aminokiselinske susptitucije	d(%)
DRB (5)	267	40	T92+G	21,14	JTT+G	22,14

3.4 Selekcija

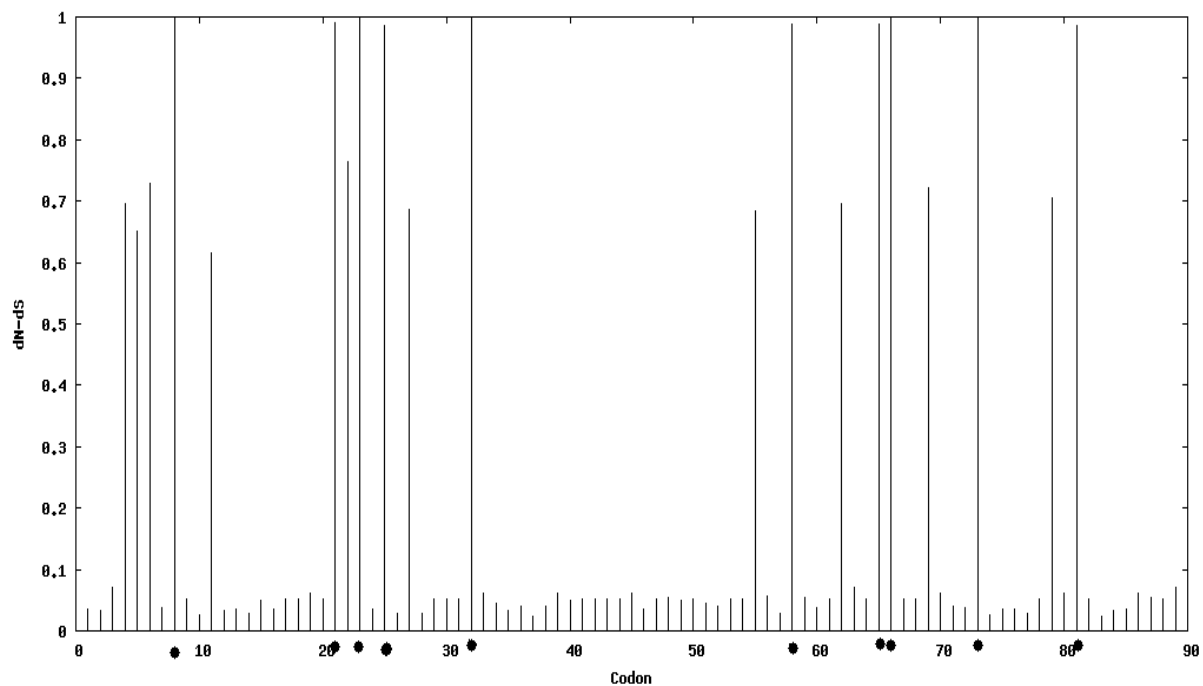
Prirodna selekcija snažan je evolucijski faktor koji može djelovati na frekvenciju alela unutar populacije. Procijenila sam stopu sinonimnih (dS) i nesinonimnih (dN) mutacija i njihov omjer u svrhu određivanja tipa selekcije na istraživanom lokusu. Koristila sam program MEGA i Nei-Gojobori metodu (Nei i Gojobori 1986), uz Jukes-Cantor korekciju. Također programski paket MEGA izračunava p vrijednost statističke značajnosti koristeći Z-test selekcije uz nultu hipotezu postojanja neutralne evolucije na lokusima (dN=dS). Naime, ukoliko je broj nesinonimnih i sinonimnih mutacija podjednak, riječ je o neutralnoj evoluciji. Slučaj kada prevladava broj nesinonimnih mutacija nad sinonimnim upućuje na pozitivnu (ravnotežnu) selekciju, a ako prevladava broj sinonimnih nad nesinonimnim mutacijama to upućuje na negativnu (purificirajuću) selekciju. Budući da omjer dN/dS iznosi 2,07 uz $p < 0,05$ (stopa nesinonimnih mutacija statistički je značajno veća od stope sinonimnih mutacija), odbacujem nultu hipotezu u korist alternativne hipoteze i zaključujem kako na istraživani lokus djeluje pozitivna selekcija (Tablica 7).

Tablica 7. Prosječna stopa sinonimnih (dS) i nesinonimnih (dN) supstitucija i tip selekcije kod čaglja (*Canis aureus*) iz istočne Europe

Lokus	dN	dS	Tip selekcije	P
DRB	0,0744	0,0359	Pozitivna, dN/dS=2,07	0,014*

* - statistički značajna p – vrijednost

REL analizom sam otkrila prisutnost deset kodona na DRB lokusu koji su pod djelovanjem pozitivne selekcije pri čemu je prag statističke vrijednosti veći od 90. Na grafu na slici 7. vidimo kako su to kodoni : 8, 21, 23, 25, 32, 58, 65, 66, 73, 81.



Slika 7. Rezultati REL analize. Deset kodona koji su pod djelovanjem pozitivne selekcije pri čemu je prag statističke vrijednosti veći od 90 su označeni kružićem. Metoda kao osnovu koristi omjer dN/dS vrijednosti, a. na osi apscisa su označeni brojevi kodona (eng. codon).

4. RASPRAVA

MHC geni su ključna komponenta imunološkog sustava sisavaca i najpolimorfiji kodirajući dijelovi DNA. Upravo zbog izrazite raznolikosti, nastale i održavane djelovanjem selekcije, služe kao dobar molekularni biljeg za proučavanje adaptivne evolucije populacija. Veća raznolikost MHC gena unutar populacije podrazumijeva veću mogućnost prepoznavanja različitih patogena od strane T limfocita te time povećava stopu preživljavanja, što doprinosi značaju istraživanja MHC gena. U ovom diplomskom radu sam opisala raznolikost gena DRB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti čagljeva istočne Europe te raznolikost DQA1/DQB1/DRB1 haplotipova za koje sam koristila rezultate diplomskog istraživanja rađenog na istim uzorcima čagljeva (Svetličić 2016). Koliko je meni poznato, zasad su objavljena samo dva imunogenetička istraživanja na MHC genima čaglja. Galov i sur. (2015) u svom radu o križancima čaglja i domaćeg psa analiziraju ekson 2 DQA, DQB i DRB lokusa na 50 uzoraka čaglja iz Hrvatske i tri uzorka za koje dokazuju da su križanci. U svom diplomskom istraživanju (Mešin 2015) također analizira iste lokuse na 20 jedinki čaglja iz Izraela.

Istraživanje sam radila na 21 uzorku čaglja istočne Europe, a dobila alele za 17 jedinki. Nisam uspjela dobiti rezultate za svih 21 uzoraka pa sam naposljetku odustala od uzoraka 1cL, 6cL, 13cE i 19cG. Smatram da PCR za te uzorke nije uspijevao jer je DNA bila loše kvalitete. U uzorku obuhvaćenom ovim istraživanjem pronašla sam pet alela DRB lokusa od kojih su dva novootkrivena. Aleli DRB*13101 i DRB*13001 su tipični čagljevske aleli, pronađeni u prethodnim istraživanjima čaglja u Hrvatskoj (Galov i sur. 2015) te kod sedam jedinki čagljeva iz Srbije i Bugarske (Galov i sur. neobjavljeno). Osim toga, alel DRB1*13101 je pronađen i kod izraelske populacije (Mešin 2015). Alel DRB*00901 koji je ujedno i najučestaliji sa frekvencijom od 61,7% u uzorku pronađen je kod brojnih pasmina pasa, ali i kod čaglja u Hrvatskoj (Galov i sur. 2015). Nakon što su sekvencirani svi uzorci, za nukleotidni slijed uzoraka 14cE i 15cE sam pretpostavila kako bi mogli predstavljati nove alele, pa sam ih podvrgnula molekularnom kloniranju. Nakon procedura, potvrdila sam dva nova alela i dala im radne nazive DRB*14aEst i DRB*15aEst. Svih pet pronađenih alela ima jedinstveni aminokiselinski slijed. Alel DRB*15aEst je varijanta alela DRB*13101. Usporedbom sa utvrđenim alelima u populaciji vidljivo je da se razlikuju jedino u kodonu 81 gdje je slijed baza GGC promijenjen u TTA, te novoutvrđeni alel nakon prepisivanja kodira za aminokiselinu izoleucin, a alel DRB*13101 za glicin. Takva nesinonimna mutacija dovodi do nastanka novoga slijeda u β lancu receptora, samim time nastanka novog veznog mjesta za

antigenski peptid (Brown i sur. 1993). Veća raznolikost receptora podrazumijeva i prepoznavanje većeg broja patogena od strane T-limfocita. Kako se tijekom evolucije nastoje zadržati promjene koje omogućuju preživljavanje populacije unutar promjenjivog okoliša pretpostavila sam da je kodon 81 pod pozitivnom selekcijom. REL analiza je to i potvrdila. Nadalje, drugi novoutvrđeni alel DRB*14aEst . se razlikuje od ostalih pronađenih alela na brojnim mjestima u nukleotidnom sljedu što onda dovodi i do promjene aminokiselinskog slijeda. Nađen je jedino kod uzorka 14cE koji potječe iz Estonije.

U ovom istraživanju na DRB lokusu je pronađeno 10 homozigotnih jedinki (uzorci 2cL, 3cL, 5cL, 8cL, 10cE, 11cE, 12cE, 21cG, 22cR, 23cR). Veliki broj homozigotnih jedinki na nekom lokusu ukazuje na nisku genetičku raznolikost. Još jedan pokazatelj niske genetičke raznolikosti je ukupno mali broj pronađenih alela. Na istim uzorcima čaglja pronađena su tri alela na DQA lokusu (DQA1*00402, DQA1*00101 i DQA1*02401) te dva alela na DQB lokusu (DQB1*02305 i DQB1*06801) (Svetličić 2016). Prosječna nukleotidna udaljenost na DRB lokusu iznosi 21,14%, dok prosječna aminokiselinska udaljenost iznosi 22,14%.

Ujedno, unutar 5 utvrđenih alela otkrila sam 40 varijabilnih mjesta duž analizirane sekvence od 267 pb. Kod istih uzoraka na DQA lokusu je broj varijabilnih mjesta 5, a kod DQB je 24. Nadalje, nukleotidna evolucijska udaljenost kod DQA lokusa je 2,06 %, a aminokiselinska 3,91%. Kod DQB lokusa, nukleotidna i aminokiselinska udaljenost iznose 9,60% i 19% (Svetličić 2016). Veći broj varijabilnih nukleotidnih mjesta te veće nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti između alela DRB lokusa pokazuju kako je upravo on najpolimorfiji. Nakon njega slijedi DQB, a najmanje polimorfan je DQA lokus. U prethodnim istraživanjima na vukovima (Arbanasić i sur. 2012) te u diplomskom istraživanju na izraelskoj populaciji čaglja (Mešin 2015) također je potvrđeno kako je varijabilnost manja na genima koji kodiraju za α lanac (DQA) nego na genima koji kodiraju za β lanac MHC molekula (DQB, DRB). Zašto je to tako ostaje nejasno. Općenito kod većine istraženih vrsta, uključujući i čovjeka, geni koji kodiraju za β lanac MHC molekula pokazuju veći polimorfizam. Iznimka za koju se zasad zna su vrste iz porodice konja (Arbanasić i sur. 2013). U ovom istraživanju uspjela sam dobiti potpuni tro-lokusni haplotip za 16 jedinki. Uz to, uspješno sam sekvencirala tri jedinke s dvo-lokusnim DQA/DQB haplotipom (uzorci 1cL, 6cL, 13cE) i jednu jedinku s DQB/DRB lokusom (uzorak 25cR). To su uzorci na kojima nisu pronađeni svi aleli uslijed neuspješnih PCR reakcija pa tako nisam mogla napraviti izvod potpunog tro-lokusnog haplotipa. Potrebno je provesti daljna istraživanja na istim uzorcima da se dobiju svi aleli i izvede potpuni haplotip. Pronašla sam sveukupno sedam jedinstvenih

tro-lokusnih haplotipova od kojih se dva pojavljuju i u populaciji hrvatskog čaglja (Galov i sur. 2015). Haplotip DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*13001 se pojavljuje s frekvencijom 3,1% u uzorku, a kod hrvatske populacije je drugi najčešći haplotip sa frekvencijom 30% (Galov i sur. 2015). U istom istraživanju analizirali su sedam jedinki čaglja iz Srbije i Bugarske te je tamo isti haplotip najčešći sa frekvencijom od 35,71% u uzorku (Galov i sur. neobjavljeno). Najčešći je haplotip DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*00901 s frekvencijom 59,38% u uzorku, a prisutan je kod 13 jedinki. Čak šest jedinki (uzorci 2cL, 3cL, 12cE, 21cG, 22cR i 23cR) su homozigoti za ovaj haplotip, što je posljedica malog broja i neravnomjerne učestalosti haplotipova. U analiziranim uzorcima iz Izraela, isti se haplotip pojavljuje sa frekvencijom od 66,67%, a prisutan je kod svih šest jedinki u populaciji za koje je dobiven tro-lokusni haplotip (Mešin 2015). Ujedno, kod hrvatskih čagljeva je također najučestaliji sa frekvencijom od 50% na 50 istraživanih jedinki. (Galov i sur, 2015). Kod sedam jedinki iz Srbije i Bugarske pojavljuje se sa frekvencijom 21,43%. (Tablica 5.) Najvjerojatnije je taj haplotip jako star jer je prisutan i u Europi i na Azijskom kontinentu, a opstaje i širi se jer je učinkovit u borbi protiv patogena i parazita.

dN/dS omjer iznosi 2,07 uz $p < 0,05$ pa stoga potvrđujem pretpostavku kako na DRB lokus čaglja djeluje pozitivna (ravnotežna selekcija). Statističkom metodom REL identificirala sam deset kodona koji su pod utjecajem pozitivne selekcije.

Smatra se da glavnu ulogu u nastanku nukleotidne raznolikosti MHC gena ima ravnotežna selekcija koja omogućuje opstanak velikog broja alela istog lokusa unutar populacije ili vrste, ali i zadržavanje raznolikosti alela dugo tijekom evolucije (Sommer 2005). Najčešći haplotip u našem uzorku DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*00901 je pronađen samo kod čagljeva, s time da je alel DQB*02305 specifičan za čaglja, dok su aleli DQA*00402 i DRB*00901 prethodno pronađeni kod brojnih vrsta pasmina, ali ne u istom haplotipu (Galov i sur. 2015). Preciznije, alel DRB1*00901 je prethodno pronađen kod čaglja, europskog vuka, sjevernoameričkog vuka i psa (Seddon i Ellegren 2002, Galov i sur. 2015). Ta pojava se naziva trans-specijski polimorfizam koji isto ukazuje na postojanje ravnotežne selekcije. Dakle, aleli se održavaju tijekom dugog evolucijskog perioda i čak često tijekom razdvajanja vrsta, što rezultira time da u različitim vrstama možemo naći slične ili čak identične alele. U ovom slučaju odvajanje vrsta dogodilo se prije 400 tisuća godina kada se čagalj odvojio od zajedničkog pretka vuka i psa (Freedman i sur. 2014). Drugi rad navodi da se divergencija dogodila prije 1,7 milijuna godina (VonHoldt i sur. 2011). Alternativno objašnjenje pronalasku identičnih ili sličnih alela među različitim vrstama je da oni nastaju

konvergentnom evolucijom gdje među bliskim vrstama može doći do genetskih sličnosti kao rezultat prilagodbe sličnim uvjetima u okolišu.

5. ZAKLJUČAK

U istraživanom uzorku od 17 jedinki čaglja istočne Europe pronašla sam pet alela DRB lokusa. Svaki alel daje svoj jedinstveni aminokiselinski slijed. Molekularnim kloniranjem sam pronašla dva nova alela i dala im radne nazive DRB*14aEst i DRB*15aEst. Alel DRB*14aEst se razlikuje od ostalih ponuđenih alela na brojnim mjestima u nukleotidnom sljedu što onda dovodi i do promjene aminokiselinskog sljeda. Alel DRB*15aEst je najbliži alelu DRB*13101, od kojeg se razlikuje jedino u kodonu 81, gdje alel DRB*15aEst kodira za aminokiselinu izoleucin, a alel DRB*13101 za glicin.

Iako je DRB lokus najpolimorfiji, ako uzmemo u obzir procjene evolucijske udaljenosti, broj varijabilnih mjesta, stope nesinonimnih i sinonimnih mutacije, te općenito mali broj pronađenih alela možemo zaključiti kako MHC geni čaglja nisu toliko genetički raznoliki. To nam potvrđuju i dosadašnja istraživanja MHC gena u čagljeva (Galov i sur. 2015, Mešin 2015) gdje je pronađen mali broj alela i haplotipova. Također istraživane populacije, u ovom slučaju, istočnoeuropska, hrvatska i izraelska posjeduju neke zajedničke alele i haplotipove.

dN/dS testom je potvrđena pretpostavka djelovanja pozitivne selekcije na DRB lokusu. Jedan DRB alel pronađen u čaglja u ovom istraživanju je ranije pronađen i kod vukova i pasa. Time smo utvrdili postojanje trans-specijskog polimorfizma, koji pak ukazuje na postojanje ravnotežne selekcije na istraživanim lokusima. Genetička raznolikost na MHC lokusima nije slučajna, nego je održavana pozitivnim selekcijskim pritiskom.

6. LITERATURA

- 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
- Arbanasić H., Galov A., Ambriović-Ristov A., Grizelj J., Arsenos G., Marković B., Dovenski T., Vince S., Čuri I. (2013): Extensive polymorphism of the major histocompatibility complex DRA gene in Balkan donkeys: perspectives on selection and genealogy. *Animal Genetics* **44**, Issue 6: 711-716.
- Arnold J., Humer A., Heltai M., Murariu D., Spassov N., Hacklander K. (2012): Current status and distribution of golden jackals *Canis aureus* in Europe. *Mammal Rev.* **42**: 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**: 363-377.
- Bošković I. (2013): Zvijer koja osvaja Hrvatsku, *Lovački vjesnik* 1-2: 28-31.
- Brown J. H., Jardetzky T. S., Gorga J. C., Stern L. J., Urban R. G., Strominger J. L., Wiley C.D. (1993): Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLADR1. *Nature* **364**: 33-39
- Brusina S. (1892): Čagalj balkanski (*Canis aureus balcanicus* BRUS. n. form.) iz Slavonije. *Glasnik Hrvatskog Naravoslovnog društva* **7**: 316-317.
- Clarke, B., Kirby D., (1966): Maintenance of histocompatibility polymorphisms. *Nature* **211**: 999-1000.
- Cohen M. T., King R., Dolev A., Boldo A., Lichter-Peled A., Bar-Gal K. G. (2012): Genetic characterization of populations of the golden jackal and the red fox in Israel. *Conservation Genetics*, Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Demeter A., N. Spassov. (1993): *Canis aureus* Linnatus. 1758 - Schakal, Goldschakal. U Stubbe M., Krapp F. (ur.): *Handbuch der Säugetiere Europas*. Raubsauger, I. AULA Verlag, Wiesbaden, 107-138.

- Fabbri E., Caniglia R., Galov A., Arbanasic H., Lapini L., Boskovic I., Florijancic T., Vlasseva A., Ahmed A., Mirchev RL & Randi E. (2014): Genetic structure and expansion of golden jackals (*Canis aureus*) in the north-western distribution range (Croatia and eastern Italian Alps). *Conservation Genetics* **15**: 187-199.
- Freedman A. H., Gronau I., Schweizer R. M., Ortega-del Vecchyo D., Han E. i sur. (2014): Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs. *Plos Genetics* **10**.
- 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. *Royal Society Open Science* **2**: 150450.
- Genov P., Vassilev S. (1989): Der Schakal (*Canis aureus* L.) in Bulgarien. Ein Beitrag zu seiner Verbreitung und Biologie. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* **35**: 145–150. 465.
- Giannatos G. (2004): Conservation Action Plan for the golden jackal *Canis aureus* L. in Greece. WWF Greece. pp. 47.
- Hall T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT
- Hearne C. M., Ghosh S., Todd J., A. (1992): Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genetics* **8** : 288-94.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. www.iucnredlist.org/details/3744/0.
- Janeway C. A., Travers P., Walport M.(2005): Immunobiology –The immune system in health and disease. Garland Publishing, New York 88-91, 183-214, 379-382
- Jeričević I. (1952): Čagalj (The jackal). Savez lovačkih društava N. R. Hrvatske, Zagreb 5-31.
- Jhala, Y. V., Moehlman, P. D. (2008.): *Canis aureus*. U: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species.. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Klein J., Figueroa I., (1986): Evolution of the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology* **4**: 295-386.

- Krystufek B., Murariu D., Kurtonur C. (1997): Present distribution of the golden jackal *Canis aureus* in the Balkans and adjacent regions. *Mammal Rev.* **24**: 109–114.
- 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
- Mehra N.K., Kaur G. (2003): MHC based vaccination approaches: progress and perspectives. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **5**(7): 1-17.
- Murray B., Michaud B., White B. (1999): Allelic and haplotype variation of major histocompatibility complex class II DRB1 and DQB loci in the St. Lawrence beluga (*Delphinapterus leucas*). *Molecular Ecology.* **8**: 1127-1139.
- Nemtsov S., King R. (2002): Management of wild canids (fox, jackal and wolf) in Israel, with respect to their damage to agriculture and to the spread of rabies. *Advances in vertebrate pest management II.* Filander, Furth
- Ober C. (1999): Studies of HLA, fertility and mate choice in a human isolate. *Human Reproduction Update*, **5**, 103–107.
- Rutkowski R., Krofel M., Giannatos G., Ćirović D., Männil P., Volokh A.M., Lanszki J., Heltai M., Szabó L., Banea O.C., Yavruyan E., Hayrapetyan V., Kopalani N., Miliou A., Tryfonopoulos G.A., Lymberakis P., Penezić A., Pakeltytė G., Suchecka E., Bogdanowicz W. (2015): A European Concern? Genetic Structure and Expansion of Golden Jackals (*Canis aureus*) in Europe and the Caucasus. *PLoS ONE* **10**(11):e0141236. doi:10.1371/journal.pone.0141236
- Seddon M. J., Ellegren H. (2002): MHC class II genes in European wolves: a comparison with dogs. *Immunogenetics* **54**: 490–500.
- Sergei L., Kosakovsky P., Frost D. W. S., and Spencer V. (2005) HyPhy:hypothesis testing using phylogenies *Bioinformatics* **21**(5): 676-679.
- Selanec I., Lauš B. (2011): Rasprostranjenost čaglja (*Canis aureus*) na području Republike Hrvatske. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Sommer S. (2005): The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology* **2**:16.

- Spassov N. (1989): The position of Jackals in the *Canis* genus and life-history of the Golden Jackal (*Canis aureus* L.) in Bulgaria and on the Balkans. *Historia Naturalis Bulgarica* **1**: 44–56.
- Strand T. (2011): European Black Grouse: MHC Genetic Diversity and Population Structure. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, Uppsala 869
- Svetličić I. (2016) :. Raznolikost gena DQA i DQB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u čagljeva (*Canis aureus*). Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Takahata N. (1990): Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* **124**: 967-978.
- 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.
- Tregenza T., Wedell N. (2000): Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage *Molecular Ecology* **9**: 1013–1027. Trouwborst A., Krofel M., Linnell JDC. (2015): Legal implications of range expansions in a terrestrial carnivore: the case of the golden jackal (*Canis aureus*) in Europe. *Biodiversity and Conservation* **24**: 2593–2610.
- VonHoldt M. B., Plöllinger P. J., Earl D. A. i sur. (2011): A genome-wide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolf-like canids. *Genome Research* **21**: 1294-1305.
- Yang W., Chou L., Hu J. (2007): Molecular characterization of major histocompatibility complex class II DQB and DRB genes in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus* and *T. aduncus*) from the western Pacific. *Zoological Studies* **46**: 664-679
- Zachos F.E., Cirovic D., Kirschning J., Otto M., Hartl G.B., Petersen B., Honnen A.C. (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**: 241–250.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 06. studenog 1991. u Zadru. Osnovnu školu Petar Lorini sam pohađala u Salima na Dugom otoku. 2010. godine maturirala sam na Prirodoslovno-matematičkoj gimnaziji Juraj Baraković u Zadru, a te iste godine upisujem prvu godinu preddiplomskog studija biologije na biološkom odsjeku. Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije stječem 2013. godine, a potom upisujem smjer eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologije na istom fakultetu.

Tijekom studija potvrdila sam i produbila svoju želju da se bavim znanstvenim istraživanjem u području populacijske genetike i molekularne biologije.