

Raznolikost haplotipova DQA/DQB/DRB glavnog sustava tkivne podudarnosti skupine II u populaciji čagljeva (*Canis aureus*) u Srbiji

Lončar, Veronika

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:476730>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Veronika Lončar

Raznolikost haplotipova DQA/DQB/DRB glavnog sustava tkivne podudarnosti
skupine II u populaciji čagljeva (*Canis aureus*) u Srbiji

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom mentorice izv. prof. 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.

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Galov na velikom trudu, strpljenju i stručnim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem i neposrednoj voditeljici dr. sc. Haidi Arbanasić na pomoći pri analizi uzoraka i razumijevanju rezultata. Također, zahvaljujem Gordani Žakman na strpljenju i pomoći tijekom tehničke izvedbe ovog istraživanja.

Na kraju želim zahvaliti svojoj obitelji i rodbini, dečku i prijateljicama što su mi dali moralnu podršku i kontinuirano pomagali prilikom mog fakultetskog obrazovanja.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

RAZNOLIKOST HAPLOTIPOVA DQA/DQB/DRB GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE
PODUDARNOSTI SKUPINE II U POPULACIJI ČAGLJEVA (*Canis aureus*) U SRBIJI

Veronika Lončar

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC) sudjeluje u adaptivnom imunosnom odgovoru sisavaca. Veća raznolikost gena MHC omogućuje limfocitima T da prepoznaju širi spektar antigena, što u konačnici daje jedinci, ali i populaciji veću šansu za preživljavanje napada patogenih. Dobar su molekularni marker za proučavanje genetičke raznolikosti vrsta i populacija zbog svoje poligenosti i polimorfnosti. Čaglj (*Canis aureus*) je zvijer (red Carnivora) koja pripada porodici pasa (Canidae). Istraživanja raznolikosti gena MHC kod čaglja tek su nedavno započela unatoč njegovoj širokoj rasprostranjenosti na euroazijskom i afričkom kontinentu. Cilj ovog istraživanja je određivanje raznolikosti tro-lokusnih haplotipova DQA/DQB/DRB te pojedinih lokusa skupine II sustava MHC u populaciji čagljeva iz Srbije. U ovom istraživanju na 29 uzoraka mišića čagljeva pronađeno je tri alela lokusa DQA i DQB, četiri alela lokusa DRB te šest haplotipova. Sedam je alela dosad pronađeno samo kod čaglja, a tri su trans-specijski polimorfizmi. Tri su haplotipa pronađena samo u srpskoj populaciji, a tri haplotipa su zajednička s istočnoeuropskom populacijom. Potvrđena je postavljena hipoteza djelovanja pozitivne selekcije na svim lokusima koristeći dN/dS test, odnosno omjer nesinonimnih i sinonsimnih supstitucija na nukleotidnom slijedu alela.

(37 stranica, 4 slike, 13 tablica, 60 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: MHC, *Canis aureus*, DQA, DQB, DRB, haplotip

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Ana Galov

Neposredni voditelj: dr. sc. Haidi Arbanasić

Ocjenitelji: Dr.sc. Ana Galov, izv. prof.

Dr. sc. Ivana Maguire, izv. prof.

Dr. sc. Sunčica Bosak, doc.

Rad je prihvaćen: 14.2.2018.

VARIABILITY OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II
DQA/DQB/DRB HAPLOTYPES IN THE GOLDEN JACKAL (*CANIS AUREUS*) FROM
SERBIA

Veronika Lončar

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The genes of the major histocompatibility (MHC) system take part in the adaptive immune response in mammals. Greater diversity of MHC genes enables T lymphocytes to recognise a wider spectrum of antigens, which in turn gives the individual a greater chance of surviving a pathogen attack. They are a good molecular marker for studying genetic diversity of both species and populations because they are polygenic and polymorphic. The golden jackal (*Canis aureus*) is a carnivore from the dog family (Canidae). Studies of MHC gene diversity of golden jackals have only recently emerged despite its wide distribution on the Eurasian and African continent. The aim of this graduate thesis is to determine variability of three-locus DQA/DQB/DRB haplotypes and individual Class II MHC loci in golden jackals from Serbia. In this study of 29 jackal muscle samples we have found three DQA and DQB alleles, four DRB alleles and six haplotypes. Seven alleles have only been found in jackals so far, while three alleles are trans-species polymorphisms. Three haplotypes are private to the Serbian populations, while three haplotypes are shared with the Eastern European population. We have confirmed the proposed hypothesis of existing positive selection on all loci using the dN/dS test, i.e. the ratio of non-synonymous and synonymous substitutions on the allelic nucleotide sequences.

(37 pages, 4 figures, 13 tables, 60 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, Assoc. Prof.

Assistant supervisor: Dr. sc. Haidi Arbanasić

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

Dr. sc. Ivana Maguire, Assoc. Prof.

Dr. sc. Sunčica Bosak, Asst. Prof.

Thesis accepted: 14.2.2018.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Čagalj.....	1
1.2 Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti	4
1.3. Dosadašnja populacijsko-genetička istraživanja čaglja.....	7
1.4. Dosadašnja genetička istraživanja čaglja na MHC lokusima	9
1.4. Cilj diplomskog rada	11
2. Materijali i metode	12
2.1 Uzorci tkiva čagljeva	12
2.2 Izolacija DNA.....	12
2.3 Lančana reakcija polimerazom	13
2.4 Elektroforeza na agaroznom gelu	14
2.5 Sekvenciranje.....	14
2.6 Računalna obrada podataka	14
2.7.1. BioEdit.....	14
2.6.2. SeqScape.....	14
2.6.3 MEGA	15
3. Rezultati	16
3.1 Aleli lokusa DQA	16
3.2 Aleli lokusa DQB	18
3.3 Aleli lokusa DRB.....	20

3.4 Haplotipovi DQA1/DQB1/DRB1.....	22
3.5 Evolucijska udaljenost.....	24
3.6 Test pozitivne selekcije	25
4. Rasprava	26
5. Zaključak	31
6. Literatura	32
7. Životopis.....	37

POPIS KRATICA

DLA – glavni sustav tkivne podudarnosti kod pasa (eng. *dog leukocyte antigens*)

dN - prosječna stopa nesinonimnih nukleotidnih supstitucija

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

dNTP – deoksinukleotidni trofosfat, „građevni blokovi“ za lančanu reakciju polimerazom

dS - prosječna stopa sinonimnih nukleotidnih supstitucija

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

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

kb - kilobaza

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

pb - parovi baza DNA molekule

PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*)

STR – kratka tandemska ponavljanja (eng. *short tandem repeats*)

UV - ultraljubičasta (eng. *ultraviolet*)

1. UVOD

1.1 Čagalj

Čagalj (*Canis aureus*) je sisavac iz reda zvijeri (Carnivora), podreda psolikih zvijeri (Caniformia) te porodice pasa (Canidae). Njegov areal obuhvaća područje sjeverne i sjeveroistočne Afrike, jugoistočne Europe te južne Azije do Burme (Markov 2012) te se smatra najraširenijim pripadnikom porodice pasa. Zahvaljujući svojoj toleranciji na različite ekološke uvjete, mogu se pronaći u afričkim polupustinjama i savanama, ali i šumovitim predjelima Indije i Bangladeša te ruralnim i rubnim urbanim područjima diljem cijelog areala te nastanjuje područja do 3800 m visine (Sillero-Zubiri 1996).

Tipičan je predstavnik svog roda sa svojom srednjom veličinom tijela od 70 do 85 cm te težinom od 12 do 14 kg (Markov 2012, Sillero-Zubiri i sur. 2004). Mužjaci su u prosjeku 12% teži od ženki (Moehlman i Hofer 1997). Vitkije je i sitnije građe od vuka (*C. lupus*) s kraćim nogama i duljim trupom te mu lubanja više nalikuje kojotu i vuku nego prugastom (*Canis adustus*) i crnoledem čaglju (*Canis mesomelas*). Osnovna boja krzna je zlatna, no može varirati od blijedo žute do žutosmeđe ovisno o dobu godine (Slika 1). Leđa su u pravilu prošarana crnom, smeđom i bijelom dlakom, a trbuh je svijetloriđe do krem boje (Sillero-Zubiri i sur. 2004). Svjetlije obojenja po vratu i prsima se mogu koristiti za razlikovanje jedinki unutar populacije (Macdonald 1979).



Slika 1. Čagalj (*Canis aureus*) (autor: Philip Perry, <https://www.arkive.org/golden-jackal/canis-aureus/image-G51664.html>)

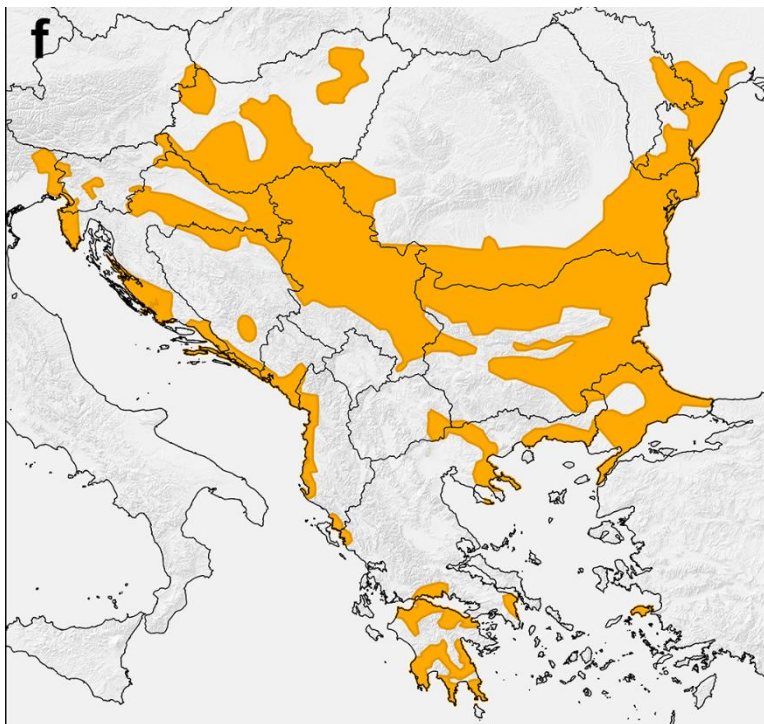
Čagalj kao oportunist ima raznovrsnu prehranu koja ovisi o dostupnosti hrane tijekom godine i samom staništu. U proljeće i ljeto konzumiraju kultivirane vrste biljaka i divlje plodove te male životinje poput glodavaca, zečeva, fazana, guštera i kukaca, a u hladnijim mjesecima se okreću ostacima stoke i lovnih vrsta poput divlje svinje, srne i običnog jelena te odlagalištima ljudskog otpada u blizini naselja (Bošković i sur. 2013, Sillero-Zubiri i sur. 2004). Područja s lošom regulacijom zbrinjavanja biološkog otpada vjerojatno su omogućila čaglju da se proširi na području Hrvatske i Srbije (Ćirović i sur. 2014).

Osnovni način života je u paru, no ovisno o raspoloživosti hrane, mogu živjeti sami ili u skupinama do 18 jedinki (Y. Jhala, neobjavljeni podaci). Čagljevi istraživani u Tanzaniji je su monogamni, obje jedinke brane teritorij te zajedno love i odgajaju mlade (Moehlman 1987). Krepuskularne su i nokturnalne životinje te u pravilu imaju legla od pet mladunaca, no broj može varirati između tri i osam (George 1890). Kada love u skupini, mogu svladati plijen nekoliko puta teži od sebe, poput afričkih antilopa (Rosevear 1974).

Čagalj je jedna od manje istraženih zvijeri te je njegova nedavna ekspanzija dublje u europski kontinent potaknula istraživanja na ekološkoj, taksonomskoj i genetičkoj razini. Pojavio se na području Europe u vrijeme grčkog neolitika, prije oko 9 000 godina (Sommer i Benecke 2005). Tijekom druge polovice 20. stoljeća, korištenjem otrova kao mjere suzbijanja predatora poput vukova, ali i čagljeva na području Srbije, brojnost im opada sve do 80-ih godina 20. stoljeća (Milenković 1987). Nakon zabrane trovanja grabežljivaca, čagalj se počeo oporavljati te se danas proširio Balkanom i prodire dalje u Europu u smjeru zapada i sjevera (Slika 2). U Bugarskoj se pad brojnosti vukova podudara s porastom brojnosti čagljeva, što ukazuje na to da vukovi kao vršni predatori odozgora reguliraju populacije čagljeva (tzv. *top-down* kontrola) te da čagljevi prosperiraju u područjima aktivnog lova na vukove (Markov 2014). Krofel i sur. (2017) su pokazali da je vuk prilikom rekolonizacije na teritorij čaglja u sedam od osam slučajeva istjerao čaglja na rubna područja ili ga potpuno eliminirao s teritorija. Sličan je uzorak primijećen u Sjevernoj Americi gdje je dokazano i da vukovi mogu ubijati kojote (Merkle i sur. 2009). Danas glavno područje rasprostranjenja u Srbiji čine sjeveroistočna granica s Bugarskom u blizini Negotina i Bele Palanke (Šalek i sur. 2014), otkud se šire u dolinu Morave te Južni (Donji) Srijem iz kojeg se šire uz obale Save do padina Fruške gore (Milenković i Paunović 2003).

S obzirom na široku rasprostranjenost po kontinentima Starog svijeta, svrstan je u kategoriju „najmanje zabrinjavajuće“ svoje prema IUCN-u. Međutim, izvan Europe njegova

brojnost opada zbog antropogenog utjecaja na ruralna staništa i prebacivanja s tradicionalne na industrijaliziranu poljoprivredu te se čagalj kratkotrajno može i dalje zadržati na takvom području, no u konačnici nestaje kao i većina drugih divljih vrsta (Sillero-Zubiri i sur. 2004). Makar čagalj ne izbjegava naselja u istoj mjeri kao vuk, ipak ne može opstati u velikim gradovima poput lisica, kuna i sličnih manjih predatora.

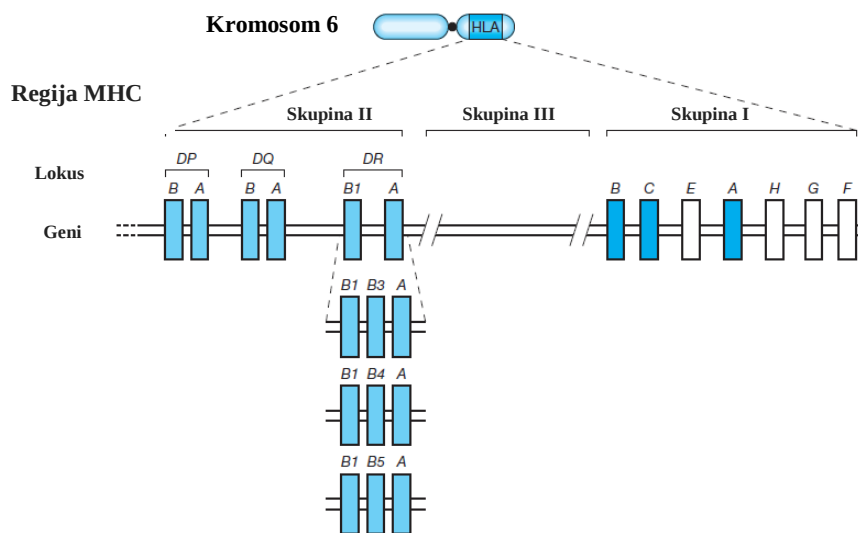


Slika 2. Rasprostranjenost čaglja na području Balkana (preuzeto iz Krofel i sur. 2017)

Neke su europske zemlje čaglja stavile na popis invazivnih vrsta, međutim postoje neslaganja oko tog postupka (Stratford 2015). S obzirom da čagalj zauzima sličnu ekološku nišu kao crvena lisica, postoji interspecijska kompeticija te je pitanje koliko širenje čaglja utječe na populacije lisica. Mendelsohn i Yom-Tov (1999) u svom radu navode da povećanje brojnosti čaglja u Izraelu dovodi do smanjenja brojnosti lisica, no potrebno je dodatno istražiti postoji li mogućnost simpatrije lisice i čaglja. Uz to, nije dovoljno poznato kolike su štete na stoci i lovnim vrstama, no smatra se da čagljevi najviše jedu strvine, a da ne love često divljač i stoku (Lanszki i sur. 2006). Također, ako je čagalj ušao prirodnim širenjem u pojedine države, bez ljudske intervencije, postavlja se pitanje treba li ga svrstati pod invazivnu vrstu ili samo vršiti praćenja ekosustava kako bi se utvrdio utjecaj čaglja kao predatora na autohtone vrste.

1.2 Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti

Glavni sustav tkivne podudarnosti je kompleks glikoproteinskih membranskih receptora koji imaju ulogu u imunom odgovoru stanica kralješnjaka na antigene. Kodira ih niz gena podijeljen u tri skupine: I, II i III. Skupina I i II kodiraju molekule MHC na površini stanične membrane koje prikazuju antigen receptorima limfocita T, dok skupina III kodira za proteine s različitim imunološkim ulogama koje nisu nužno povezane s molekulama skupine I i II.



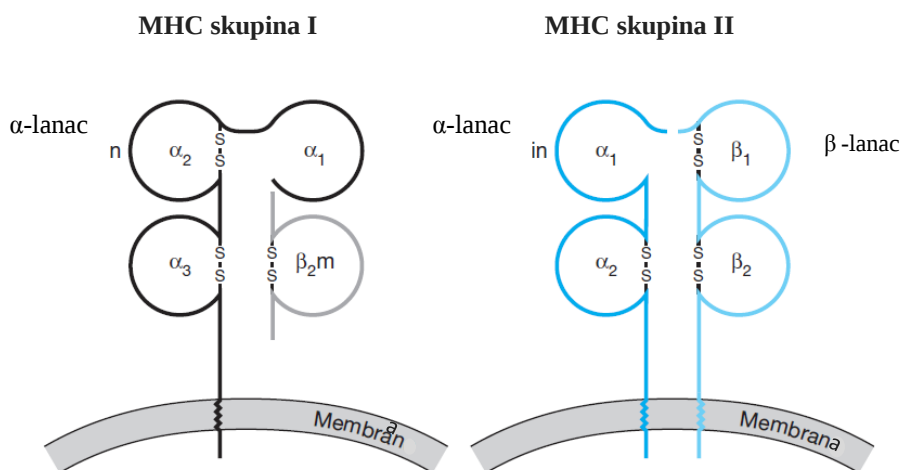
Slika 3. Organizacija HLA gena na kromosomu 6 kod čovjeka (preuzeto iz Wood 2006)

Kod čovjeka se kompleks MHC nalazi na kromosomu 6 te sadrži preko 200 gena na području od 4×10^6 pb (Slika 3). Nazivi za pojedine molekule MHC i gene koji ih kodiraju su specifični za vrstu, tako da se kod ljudi zovu „human leucocyte antigen“ (HLA), kod miševa H-2, a kod pasa i ostalih vrsta iz porodice pasa (Canidae) „dog leucocyte antigen“ (DLA). Ljudska DNA sadrži tri lokusa skupine I s po jednim genom za α -lanac: HLA-A, HLA-B i HLA-C te tri lokusa skupine II koji nose po jedan gen za α - i β -lanac : HLA-DR, HLA-DP, i HLA-DQ. Slovo A se dodaje imenu gena za α -lanac, a slovo B genima koji kodiraju β -lanac (npr. DRA, odnosno DRB). HLA-DR lokus može, uz DRB1, sadržavati dodatni gen za β -lanac (DRB3, DRB4 ili DRB5). Dakle, jedinka koja nosi varijantu s dva DRB gena na majčinom i očevom kromosomu može imati 4 različita β -lanca kodirana DRB genom.

Zahvaljujući poligenskoj prirodi kompleksa MHC, u pojedinom organizmu će se eksprimirati velik broj različitih molekula MHC skupine I i II koji mogu eliminirati širi

spektar različitih patogena. Ekspresija MHC alela je kodominantna, što znači da se proteini oba alela pojedinog gena mogu eksprimirati, čime jedinka koja je heterozigot, npr. za DRB gen, može imati MHC molekule s dva β -lanca kodirana tim genom. Bez svojstva kodominacije, samo bi jedan od β -lanaca kodiran DRB genom bio eksprimiran.

Molekule skupine I se nalaze na površini većine stanica s jezgrom te se sastoje od dva proteinska lanca: duljeg α -lanca s tri domene (α_1 , α_2 i α_3) i transmembranskim krajem i kovalentno vezanog kraćeg β_2 -mikroglobulina (Slika 4). Skupina I prikazuje peptide endogenih antigena, tj. onih koji nastaju unutar stanice, poput virusa te tumorskih stanica. MHC molekule se sintetiziraju u hrapavom endoplazmatskom retikulumu, TAP (transporter associated with antigen processing) proteini transportiraju antigenski peptid do MHC molekule te nastaje kompleks MHC-antigen koji putuje do Golgijevog aparata te konačno do površine stanične membrane. Razgrađeni antigenski peptidi vezani su za MHC molekulu u udubljenju između α_1 i α_2 domena. Receptor citotoksičnog limfocita T se veže na kompleks peptida i MHC molekule tako da se dio receptora veže za antigen, a dio za α -zavojnice MHC molekule. Limfociti T specifično prepoznaju pojedine MHC molekule, tj. citotoksični limfocit T koji prepoznaje molekulu HLA-A neće moći prepoznati molekulu HLA-B. Samo vezanje antigenskog peptida i MHC molekule nije specifično koliko vezanje antigena i protutijela.



Slika 4. Dijagram MHC molekula skupine I i II (preuzeto iz Wood 2006)

Molekule MHC skupine II također se sastoje od dva glikoproteinska lanca: α -lanca i β -lanca, a nalaze se na površini makrofaga i B-limfocita. Razlikuju se od molekula skupine I po tome što oba lanca imaju transmembranske regije i citoplazmatske repove. MHC molekule skupine II također su sintetizirane u hrapavom endoplazmatskom retikulumu, ali su transportirane u

CPL (*compartment for peptide loading*) vezikulama umjesto običnim transportnim vezikulama koje prenose MHC molekule skupine I. Molekule skupine II prikazuju peptide egzogenih antigena, npr. bakterija ili parazita koji se unesu endocitozom te razgrade. Potom se u endolizosomu transportiraju do CPL vezikule i spoje s njom te u konačnici nastane kompleks MHC molekula skupine II i antigena. Isto kao kod skupine I, kompleks se veže za receptore, ali pomoćničkih limfocita T (Wood 2006).

Sam kompleks gena glavne tkivne podudarnosti ima uz poligenost još jedno svojstvo koje omogućava prepoznavanje velikog broja patogena: polimorfnost, tj. postojanje većeg broja alela za svaki pojedini gen. Svaki alel ima relativno visoku frekvenciju u populaciji, što znači da će većina jedinki biti heterozigoti za svaki MHC lokus (Janeway i sur. 2001). Populacija koja ima veliku gensku zalihu, tj. velik broj različitih gena s više alela koji su i kodominantno eksprimirani, moći će opstati jer će bar dio jedinki biti otporan na patogene koji ih zahvate. Postoji stalna utrka u naoružanju između patogena i MHC molekula; patogeni su pod selektivnim pritiskom da izbjegnu prepoznavanje MHC molekula promjenom svojih strukturalnih gena, dok se MHC geni trebaju prilagoditi na mutirane patogene te njihove MHC molekule trebaju prepoznati promijenjene antigenske peptide. S obzirom da pojedini MHC aleli jedinci daju veću otpornost prema pojedinim patogenima, ti će se aleli razmnožavanjem takvih jedinki proširiti u populaciji. Međutim, patogeni će biti pod selektivnim pritiskom da izbjegnu MHC molekule tog alela jer je postao učestao u populaciji te u trenutku kad se pojavi mutacija koja im to omogućava, prethodni alel više nije toliko uspješan u borbi protiv patogena te mu frekvencija u populaciji opet opada. Taj se mehanizam naziva selekcijom ovisnom o frekvenciji, a smatra se da je to jedan od mehanizama kojima nastaje i održava se polimorfnost MHC gena (Clarke i Kirby 1966, Slade i McCallum 1992).

Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti trenutno su najpolimorfnije lokusi pronađeni kod kralješnjaka. Najveći dio istraživanja MHC lokusa kod sisavaca usmjeren je na egzon 2 DRB gena jer upravo ti egzoni kodiraju domene receptora odgovorne za vezanja antigena ($\alpha 1$ i $\beta 1$ domene). Varijabilnost MHC molekula usko je povezana s raznolikošću receptora limfocita T koji povećavaju mogućnost obrane jedinke i populacije od patogena (Hedrick i sur. 2001). Mnoga istraživanja su pokazala da raznolikost MHC gena utječe i na odabir partnera preko mirisa, odnosno feromona. Naime, ženke odabiru mužjake s genima koji će osigurati velik broj potomaka dobrog fitnesa, a mužjaci svoj fitnes mogu prezentirati vanjskim izgledom (npr. paunov rep) ili mirisom. Na miševima i štakorima je pokazano da ženke mogu

razlikovati mužjake s različitim MHC genima, makar su mužjaci međusobno genetički gotovo identični na ostatku genoma. (Yamazaki i sur. 1979). Pomoću mirisa mogu odabrati najboljeg kandidata za stvaranje potomstva, a postoji teorija da MHC geni utječu na mikrofloru (Singh i sur. 1990) koja mijenja miris jedinke te privuče ženku ako je nepoznat, tj. drugačiji od njezinog i mirisa njenih bliskih srodnika te sprječava parenje u srodstvu.

1.3. Dosadašnja populacijsko-genetička istraživanja čaglja

Do danas je samo mali broj radova koji su istraživali raznolikost MHC gena čagljeva objavljen, premda su zahvaljujući brojnim istraživanjima pasa, ali i vukova, dobro opisani DLA geni (geni glavne tkivne kompatibilnosti kod porodice pasa) koji se koriste u analizi genetičke raznolikosti čagljeva. Međutim, postoje druga populacijsko-genetička istraživanja rađena koja su koristila kontrolnu regiju mitohondrijske DNA i STR markere. Kontrolna regija mtDNA mutira 10 puta brže od jezgrene DNA te se koristi za analize genetičke raznolikosti, ali i za utvrđivanje hibridizacije. STR (kratka tandemska ponavljanja) su mikrosateliti, tj. uzastopno ponavljajući nekodirajući dijelovi DNA veličine od 3 do 7 pb u slijedu od 3 do 15 ponavljanja te se nalaze na svim kromosomima. Vrlo su polimorfni jer je broj ponavljanja pojedine sekvence varijabilan te se u forenzici koriste za utvrđivanje očinstva i rješavanje zločina, a svoju su primjenu našli i u populacijskoj genetici.

Zachos i suradnici su 2009. godine analizirali 121 uzorak čaglja sa šest lokaliteta u Srbiji koristeći kontrolnu regiju mtDNA i STR markere. Rezultati su pokazali da je varijabilnost na razini nukleotida i haplotipova nula, tj. da su sve jedinke imale istu sekvencu kontrolne regije te se poklapala s austrijskim čagljem. Svih osam analiziranih lokusa je bilo polimorfno gledajući cijelo područje, no lokusi na pojedinim lokalitetima su bili monomorfni. Očekivana heterozigotnost svih jedinki iznosila je 0,33, a dobivena 0,28, što je izrazito niska vrijednost. Uspoređujući rezultate s onima iz Kenije (Roy i sur. 1994), 121 srpskih uzoraka ima znatno manju raznolikost od 18 kenijskih uzoraka, čija je očekivana heterozigotnost 0,52, a dobivena 0,41. Pretpostavili su da je srpska populacija relativno nova, te da je uzrok niskoj genetičkoj raznolikosti efekt osnivača.

Fabbri i sur. (2013) godine odabrali 120 uzoraka iz nekoliko područja, tj. Srbije, Slavonije, Dalmacije, Bugarske i sjeveroistočne Italije. Također su koristili hipervarijabilni dio kontrolne regije mtDNA i 15 STR markera. Rezultati mtDNA analize su identični onima iz rada iz 2009. (Zachos i sur.), tj. jedini haplotip koji su pronašli podudara se s haplotipom

srpskih čagljeva. Međutim, STR markeri su bili polimorfni s 2-14 alela i srednjim vrijednostima heterozigotnosti. Procijenili su da je nekadašnji i trenutni protok gena između bugarskih, dalmatinskih i čagljeva iz slavonsko-srpske populacije vrlo nizak, osim između bugarske i slavonsko-srpske populacije koji dolaze u doticaj zbog povećanja bugarskih i rumunjskih populacija. Dalmatinska populacija se genetički najviše razlikuje od svih ostalih, što se pripisuje geografskoj izolaciji. Talijanske jedinice imaju genotipove podrijetlom iz Slavonije i Dalmacije, što može ukazivati na prethodno miješanje populacija na području gdje su se susrele prilikom migracije iz matičnih područja te njihov naknadni dolazak u Italiju. Monomorfnost kontrolne regije mtDNA i dalje nije potpuno razjašnjena, ali su autori ponudili dvije hipoteze: ili čagalj ima iznimno konzerviranu mtDNA na razini vrste (što je pronađeno kod vidre (*Lutra lutra*) (Mucci i sur. 2010)) ili su europske populacije vrlo kasno ušle na kontinent.

Cohen i suradnici su 2013. godine paraleleno analizirali 88 uzoraka izraelskih čagljeva i 89 crvenih lisica koristeći 14 STR markera. Izrael je 1964. godine pokrenuo program trovanja čagljeva, što je uzrokovalo efekt uskog grla na populaciji. Nakon prekida trovanja i stavljanja vrste pod zakonsku zaštitu, populacija se proširila na jug države zbog urbanizacije koja je pogodovala rastu populacije. Svi su STR lokusi bili polimorfni s 4 do 14 alela, a dobivena heterozigotnost je iznosila 0,67, što ukazuje na visoku genetičku raznolikost populacije. Lisica je korištena kao kontrola koja nije prošla kroz efekt uskog grla jer nije bila zahvaćena trovanjem, međutim nisu pronađena velika odstupanja u genetičkoj raznolikosti između dviju vrsta. S obzirom da vjerojatno postoji protok gena između populacija susjednih država, vjerojatno su imigranti obogatili genski fond i omogućili oporavak izraelskih čagljeva (Berthier i sur. 2006).

Rutkowski i suradnici su 2015. napravili prvo genetičko istraživanje na razini cijelog područja trajne rasprostranjenosti čaglja u Europi na 97 uzoraka iz pet geografskih regija: jugoistočne Europe, Kavkaza, baltičkih zemalja, južne Grčke i otoka Samosa. Kao i u prethodnim radovima, korištene su kontrolna regija mtDNA od 406 pb i 15 STR markera. Za razliku od prijašnjih rezultata, dobivena su četiri haplotipa kontrolne regije mtDNA te su sve regije osim Baltika imale dva haplotipa. Većina STR lokusa je bila srednje polimorfna s vrijednostima 5-11, a heterozigotnost je bila značajno viša nego u prijašnjim analizama: 0,60 kod većine lokusa te preko 0,70 kod 3 lokusa. Najviša heterozigotnost je bila u JI Europi, dok je najniža bila na Samosu. Uspoređujući rezultate s prethodno dobivenim rezultatima na

srpskoj populaciji (Zachos i sur. 2009), dobivena je puno veća genetička raznolikost nego u Srbiji, što je vjerojatno posljedica većeg područja uzorkovanja te veće starosti populacija korištene u ovom istraživanju. Dodatni haplotip na jugoistoku Europe koji Fabbri i sur. (2013) i Zachos i sur. (2009) nisu detektirali pronađen je kod jedinke iz Južne Ukrajine i s Peloponeza, što znači da se balkanska populacija i dalje treba tretirati kao genetički siromašna. Populacija na otoku Samosu je imala najnižu genetičku raznolikosti, usporedivo s dalmatinskom. To se može objasniti geografskom izolacijom, ali i imigracijom malog broja jedinki (efekt osnivača) i genetičkim driftom koji ima značajniji utjecaj na male populacije. Uspoređujući srednje vrijednosti heterozigotnosti populacija čagljeva sa svih pet analiziranih područja s izraelskim čagljevima (0,38-0,55 naspram 0,64-0,72), vidljivo je da je genetička raznolikost europskih populacija i dalje niža unatoč smanjenju izraelske populacije.

1.4. Dosadašnja genetička istraživanja čaglja na MHC lokusima

Galov i suradnici (2015) su prvi počeli koristiti gene MHC sustava za genetičke analize čagljeva, tj. detekciju hibrida čaglja i psa. Iako pripadnici porodice pasa mogu hibridizirati te su zabilježeni brojni slučajevi spontanog križanja, ali i komercijalnog uzgoja, dosad nije bio pronađen hibrid čaglja i psa. Tri jedinke koje su analizirane pokazivale su kombinaciju fenotipskih karakteristika čaglja i psa, npr. jedinka S1 je imala svijetlo krzno, jedinka S2 je morfološki nalikovala istarskom goniču, imale su depigmentirane jastučice na nogama i duge uši zaobljenih rubova, što su pseće karakteristike. Međutim, jastučici na srednjim prstima su bili djelomično spojeni kod sve tri jedinke, što je tipično za čaglja. Koristili su istovremeno biparentalne (MHC lokusi i STR markeri) i uniparentalne markere (kontrolna regija mtDNA i *Zfy* intron). Kontrolna mitohondrijska regija i *Zfy* intron su omogućili određivanje smjera hibridizacije za sve tri jedinke te da su S2 i S3 nastali povratnim križanjem sa psom, odnosno čagljem, što znači da su hibridi fertilni. Kao referentne uzorke koristili su 50 uzoraka hrvatskih čagljeva i 51 uzorak pasa mješanaca. Sve tri jedinke su potvrđene kao hibridi jer su posjedovale po jedan pseći i jedan čagljevski haplotip koji nije pronađen u pasa (DRB1*00901/DQA1*00402/DQB1*02305). Ova uspješna detekcija hibrida je pokazatelj da se tro-lokusni haplotipovi MHC gena mogu koristiti i u drugim istraživanjima hibrida.

Arbanasić i suradnici su u svom istraživanju 2017. godine koristili 50 uzoraka iz rada Galov i sur. (2015) te dodali još četiri jedinke za analizu raznolikosti i prirodne selekcije na DLA-DRB1, DLA-DQA1 i DLA-DQB1 lokusima te na tro-lokusnim haplotipovima. Pronašli

su četiri nova DLA-DRB1, dva DLA-DQA1 i tri DLA-DQB1 alela, od kojih su tri DLA-DRB1, jedan DLA-DQA1 i sva tri DLA-DQB1 alela bili specifični za čaglja. Uspoređujući čagljeve s vukovima (Arbanasić i sur. 2013), vidljivo je da čagljevi imaju niže alelno bogatstvo (4 DLA-DRB1, 2 DLA-DQA1 i 3 DLA-DQB1 kod čaglja naspram 11.9 DLA-DRB1, 6.6 DLA-DQA1 i 10.2 DLA-DQB1 kod vukova iz Hrvatske). Dapače, toliko niska raznolikost može se usporediti s etiopskim vukovima (*C. simensis*) koji su ugroženi (Kennedy i sur. 2010). Rezultati su slični onima za srpske čagljeve (Zachos i sur. 2009) i čagljeve jugoistočne Europe (Fabbri i sur. 2014) te upućuju na to da je moglo doći do pada brojnosti čagljeva koji je mogao biti posljedica genetičkog drifta i povlačenja u refugije, a zatim je moglo doći do naglog širenja populacije (Fabbri i sur. 2013). Unatoč malom broju alela, postoji visoka razina divergencije između pojedinih alela, tj. razdvojili su se i neovisno mutirali ranije u prošlosti. Wakeland i sur. (1990) su predložili mehanizam prema kojem se divergentni MHC aleli selektivno održavaju u populaciji kako bi populacija imala što veću raznolikost MHC molekula za različite patogene, što se uklapa u rezultate istraživanja hrvatskih čagljeva. Potvrđeno je da je pozitivna selekcija utjecala na polimorfizam sva tri lokusa istražena kod čaglja. Vukovi, psi, čagljevi i ostali pripadnici porodice pasa dijele neke alele te su neki aleli sličniji međusobno nego neki aleli unutar pojedinih vrsta, a ta pojava se naziva trans-specijski polimorfizam. Populacije pojedinih regija su imale različit stupanj raznolikosti MHC haplotipova, tj. dalmatinske su imale dva alela i tri haplotipa jedinstvena za to područje, što je više nego što su Fabbri i sur. naveli u svom radu 2014. godine. Hipoteza prednosti rijetkog alela predlaže da aleli niske frekvencije daju veću prednost jedinci jer patogeni napadaju MHC molekule koje kodiraju najučestaliji aleli u populaciji, stoga je moguće da alel koji je pronađen u Dalmaciji u jednoj kopiji produkt tog procesa, a ne izolacije, tj. efekta uskog grla. Potrebna su dodatna istraživanja na MHC lokusima čagljeva kako bi se točnije odredilo podrijetlo, genetička raznolikost i povezanost pojedinih europskih populacija.

1.4. Cilj diplomskog rada

Cilj diplomskog rada je analizirati raznolikost lokusa DQA, DQB i DRB u populaciji čagljeva iz Srbije, te tro-lokusne DQA1/DQB1/DRB1 haplotipove. Dobivene rezultate usporedit ću s onima dobivenim na populaciji čagljeva iz Hrvatske (Arbanasić i sur. 2017), istočne Europe (Šešelja 2016) i Izraela (Mešin 2015). Ovaj će rad pridonijeti saznanjima o imunogenetičkoj raznolikosti čagljeva na europskoj razini.

2. Materijali i metode

2.1 Uzorci tkiva čagljeva

Za istraživanje sam koristila 29 uzoraka mišićnog tkiva čagljeva iz Srbije dobivenih ljubaznošću dr. sc. Duška Ćirovića s Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, od kojih je 5 (174/2009, 127/2013, 151/2013, 153/2013, 166/2013) bilo iz Negotina, 2 (29/2010, 84/2010) iz Ćićevca, 4 (72/2010, 35/2013, 101/2013, 102/2013) iz Bele Palanke, 1 (189/2013) iz Boljevca, 5 (80/2016, 81/2016, 82/2016, 85/2016, 117/2016) iz Niša, 2 (125/2016, 133/2016) iz Svrljiga i 8 (83/2016, 90/2016, 91/2016, 97/2016, 122/2016, 123/2016A, 123/2016B, 131/2016) iz Brze Palanke. Uzorak 180/2013 nije imao označeno područje sakupljanja, a uzorak 34/2016 iz Brze Palanke je vjerojatno progrešno označen kao 34/2013. Dobila sam i 2 uzorka dlake iz Herceg Novog u Crnoj Gori, no dlake nisu sadržavale folikule pa ih nisam mogla analizirati.

2.2 Izolacija DNA

Za izolaciju DNA koristila sam komercijalni paket za purifikaciju DNA proizvođača Promega, prema prilagođenom protokolu. Označila sam Eppendorf epruvete od 1,5 ml skraćenim oznakama uzoraka (prva dva broja u godini su izbačena, npr. 131/16 umjesto 131/2016) i zatim u epruvetu odpipetirala 300 µl otopine za lizu stanične jezgre. Uzela sam mali komadić tkiva uzorka te ga usitnila skalpelom na petrijevoj posudi i prebacila u pripadajuću epruvetu koju sam kratko centrifugirala. Zatim sam dodala 1,5 µl proteinaze K koncentracije 20 mg/ml i vorteksirala epruvetu 1 minutu. Epruvetu sam inkubirala na 55°C preko noći. Uzorak sam ponovno ohladila na sobnu temperaturu, kratko centrifugirala i dodala mu 100 µl otopine za precipitaciju proteina, snažno vorteksirala 20 sekundi te stavila na led 5 minuta. Nakon centrifugiranja 3 minute na 13 000 okretaja po minuti, stvorio se talog u kojem su bili proteini, a DNA je bila u supernatantu. Odpipetirala sam 300 µl 100%-tnog etanola u nove epruvetice od 1,5 ml te dodala supernatant. Epruveticu sam pažljivo promiješala okretanjem gore-dolje te ju centrifugirala 1 minutu na 13 000 okretaja po minuti. DNA se istaložila na dnu, a supernatant sam dekantirala tako da DNA ostane u epruvetici. Zatim sam dodala 300 µl 70%-tnog etanola i ponovno pažljivo promiješala okretanjem epruvetice. Ponovno sam centrifugirala 1 minutu na 13 000 okretaja po minuti i odstranila supernatant. Epruveticu s talogom dehidrirane DNA preokrenula sam na filter papir da se 30

minuta suši na zraku. Na kraju sam dodala 100 µl otopine za rehidraciju DNA i inkubirala preko noći na 4 °C te ponovila postupak za preostalih 28 uzoraka. Nakon izolacije, uzorci su čuvani na 4 °C u hladnjaku do daljnje obrade.

2.3 Lančana reakcija polimerazom

Kako bih umnožila odsječke egzona 2 DRB, DQA i DQB lokusa čagljeva MHC sustava skupine II, koristila sam metodu lančane reakcije polimerazom (PCR, eng. *polymerase chain reaction*). Komercijalni kompleti HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) i HotStarTaq PLUS DNA Polymerase (Qiagen) sadrže vodu bez RNAze i Taq PCR mješavine otopina (*master mix*) koji se sastoji od Qiagen PCR pufera, dNTP-ova (deoksinukleotidnih trifosfata) i Taq DNA polimeraze. HotStarTaq PLUS sadrži i boju CoralLoad koju sam dodavala u male volumene otopine za optimizaciju PCR-a. Veliki volumen za sekvenciranje (40 µl) sastojao se od 20 µl PCR mješavine otopina, po 4 µl obje početnice, 8 µl vode i 4 µl DNA.

Početnice sam preuzela iz literature za sva 3 lokusa:

DLA-DRB1:

Uzvodna: DRBF 5'GATCCCCCGTCCCCACAG 3' (Kennedy i sur. 2005)

Nizvodna: DRB1R 5' TGTGTCACACACCTCAGCACCA 3' (Wagner i sur. 1996a)

DLA-DQA1:

Uzvodna: DQAI1 5' TAAGGTTCTTTTCTCCCTCT 3' (Wagner i sur. 1996b)

5' GGACAGATTCAGTGAAGAGA 3' (Wagner i sur. 1996b)

DLA-DQB1

Uzvodna: DQB1BT7 5' TAAGGTTCTTTTCTCCCTCT 3' (Wagner i sur. 1998)

Nizvodna: DQBR3 5' ACCTGGGTGGGGAGCCCG 3' (Galov i sur. 2015)

Početna temperatura za prvi korak PCR reakcije, tj. aktivaciju polimeraze bila je 95 °C i taj je korak trajao je 5 min. Nakon toga je slijedilo 14 ciklusa koji su se sastojali od razdvajanja komplementarnih DNA lanaca na 95 °C u trajanju od 30 s, prijanjanja početnica u trajanju od 1 min s početnim temperaturama 54 °C za DQA lokus, 73 °C za DQB lokus i 62 °C za DRB lokus, pri čemu se nakon svakog ciklusa temperatura spuštala za 0,5 °C, te sinteze komplementarnog lanca na 72 °C u trajanju od 1 min. Slijedilo je još 20 ciklusa amplifikacije na 95 °C koji su trajali po 30 s, no ovaj put se prijanjanje početnica odvijalo na 47 °C za DQA

lokus, 66 °C za DQB lokus te 55 °C za DRB lokus u trajanju od 1 min. Završno produljivanje nukleotidnih lanaca trajalo je 10 min na 72 °C.

2.4 Elektroforeza na agaroznom gelu

Nakon PCR reakcije provela sam elektroforezu na 1% agaroznom gelu za detekciju PCR proizvoda u uzorcima. Pripremila sam gel dodavanjem 1 g agaroze u 100 ml tris/borat/EDTA pufera koji se sastoji od tris(hidroksimetil)aminometana, borne kiseline i etilendiamintetraoctene kiseline te zagrijavanjem dok se agaroz potpuno ne otopi. Otopina se zatim malo ohladi te se doda 10 µL boje „Syber Safe DNA gel“ i izlije u kadu za elektroforezu s češljevima za jažice. Nakon 20 minuta se agaroz stvrdnula u gel te sam ju stavila u uređaj za elektroforezu koji sam napunila tris/borat/EDTA puferom. Parafilm sam koristila kao međukorak za nanošenje uzoraka, tj. na njemu sam nanosila 3 µL pufera za nanošenje uzoraka na gel i 3 µL uzorka te ih zatim prenosila u jažice. Elektroforeza je trajala 20 minuta pod naponom od 100 V i jačinom struje 400 mA. Gel sam promatrala na UV transiluminatoru te zabilježila pojavu vrpce.

2.5 Sekvenciranje

PCR produkti su poslani na sekvenciranje u MacroGen servis u Amsterdamu i purificiranje uzoraka (www.macrogen.com). Sekvenciranje je napravljeno u nizvodnom (reverznom) smjeru za sve uzorke s dodatnim sekvenciranjem uzvodnog smjera za uzorke koji su bili nejasni prilikom pregledavanja sekvenci. Sve početnice su iste onima prethodno navedenima iz literaturnih izvora.

2.6 Računalna obrada podataka

2.7.1. BioEdit

BioEdit (Hall 1999) je programski paket koji služi za pregledavanje, uređivanje i poravnavanje nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci. Koristila sam ga za provjeru elektroferograma, odnosno jesu li dobivene sekvence dovoljno dobre za daljnju analizu.

2.6.2. SeqScape

SeqScape je programski paket tvrtke Applied Biosystems koji se koristi za detekciju i analizu mutacija, traženje i provjeru SNP-ova (polimorfizama jednog nukleotida).

Uspoređivala sam elektroferograme svakog uzorka s alelima referentne knjižnice za svaki od tri lokusa. U slučaju da je postojala greška poput ispuštenog ili umetnutog nukleotida, prepravila sam ispis prema elektroferogramu.

2.6.3 MEGA

MEGA (eng. *Molecular evolutionary genetics analysis*) (Tamura i sur. 2013) je programski paket za analizu DNA i proteinskih sekvenca iz evolucijske perspektive. Njegova je upotreba višestruka, od rekonstrukcije filogenetskih stabala, određivanja starosti gena pomoću molekularnog sata sve do korištenja različitih testova selekcije. Programski paket sam koristila za nukleotidni i aminokiselinski ispis pojedinih alela za sva tri lokusa s označenim varijabilnim mjestima na sekvencama.

Pomoću programskog paketa izračunala sam nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti između alela pojedinog lokusa koji pokazuju divergenciju pojedinih alela kroz evolucijsku prošlost. Sinonimne supstitucije (tzv. tihe mutacije) su one kod kojih promjena nukleotida ne dovodi do promjene aminokiselinskog ostatka, dok se kod nesinonimnih supstitucija promijeni kodon tako da kodira za drugu aminokiselinu. S obzirom da promjena aminokiseline u peptidnom lancu utječe i na sam organizam, nesinonimne supstitucije su pod utjecajem prirodne selekcije. Također sam odredila omjer nesinonimnih (dN) i sinonimnih (dS) supstitucija, odnosno provela sam dN/dS test utjecaja prirodne selekcije na pojedini lokus tijekom molekularne evolucije. Najnovija verzija (MEGA7) automatski računa omjer (ω), dok su prijašnje davale pojedinačne vrijednosti sinonimnih (dS) i nesinonimnih (dN) supstitucija koje su se zatim trebale podijeliti (dN/dS).

3. Rezultati

3.1 Aleli lokusa DQA

Analizom lokusa DQA 29 uzoraka čagljeva pronašla sam tri različita alela (Tablica 1). Homozigoti su označeni crvenom bojom, a heterozigoti zelenom bojom u Tablici 1. Među analiziranim uzorcima najčešći DQA alel je DQA1*00402 s frekvencijom od 70,69%. Alel DQA1*00101 pronađen je u samo jednoj jedinci (jedinka 174/2009). Nukleotidni sljedovi pronađenih alela nalaze se u Tablici 2, a aminokiselinski sljedovi u Tablici 3 te su crvenom bojom označena varijabilna mjesta u sekvenci. Ukupno je pronađeno osam varijabilnih mjesta u nukleotidnom zapisu koji rezultiraju promjenom pet aminokiselina.

Tablica 1. Aleli lokusa DQA pronađeni u pojedinim jedinkama. Crvenom pozadinom su označene homozigotne jedinke, a zelenom heterozigotne.

Oznaka jedinke	DQA1*00402	DQA1 *02401	DQA1 *00101
174/2009			+
29/2010	+		
72/2010	+		
84/2010	+	+	
34/2013	+	+	
35/2013		+	
101/2013	+		
102/2013	+		
127/2013	+		
151/2013	+	+	
153/2013	+	+	
166/2013	+		
180/2013	+		
189/2013	+		
80/2016	+	+	
81/2016	+		
82/2016	+		
83/2016	+	+	
85/2016	+	+	
90/2016	+		
91/2016	+		
97/2016	+		
117/2016	+	+	
122/2016	+	+	
123/2016A	+	+	
123/2016B	+	+	
125/2016	+	+	
131/2016	+		
133/2016	+	+	
Ukupno	41	15	2
Broj homozigota	14	1	1
frekvencija	70,69 %	25,86 %	3,45 %

Tablica 2. Nukleotidni ispis alela lokusa DQA. Nukleotidne pozicije s jednakim nukleotidima označene su točkama, a one s različitim nukleotidima crvenim slovima.

ALEL	NUKLEOTIDNI SLIJED										POLOŽAJ
DQA1*00101	GAC	CAT	GTT	GCC	AAC	TAC	GGC	ATA	AAT	GTC	[30]
DQA1*00402	...	...	...	...	T ..	...	...	...	...	...	[30]
DQA1*02401	...	...	...	...	T ..	...	...	...	...	...	[30]
DQA1*00101	TAG	CAG	TCT	TAC	GGT	CCC	TCT	GGC	CAG	TAC	[60]
DQA1*00402	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[60]
DQA1*02401	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[60]
DQA1*00101	ACC	CAT	GAA	TTT	GAT	GGC	GAT	GAG	GAG	TTC	[90]
DQA1*00402	...	...	...	...	...	...	...	...	TT ..	...	[90]
DQA1*02401	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[90]
DQA1*00101	TAC	GTG	GAC	CRG	GAG	AAG	AAG	GAA	ACT	GTC	[120]
DQA1*00402	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
DQA1*02401	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
DQA1*00101	TGG	CGG	CTG	CCT	GTG	TTT	AGC	ACA	TTT	AGA	[150]
DQA1*00402	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.C ..	[150]
DQA1*02401	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.C ..	[150]
DQA1*00101	AGT	TTT	GAC	CCA	CAG	GGT	GCA	CTG	AGA	AAC	[180]
DQA1*02401	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[180]
DQA1*00402	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[180]
DQA1*00101	TTG	GCT	ATA	ATA	AAA	CAA	AAC	TTG	AAC	ATC	[210]
DQA1*02401	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[210]
DQA1*00402	...	...	...	.GC	...	...	...	...	...	...	[210]
DQA1*00101	ATG	ACT	AAA	AGG	TCC	AAC	CAA	ACT	GCT	GCT	[240]
DQA1*02401	C ..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
DQA1*00402	C ..	...	...	.G	...	...	...	...	...	...	[240]
DQA1*00101	ACC	AAT									[246]
DQA1*02401	...	...									[246]
DQA1*00402	...	...									[246]

Tablica 3. Aminokiselinski ispis alela lokusa DQA. Aminokiselinske pozicije s jednakim aminokiselinskim ostacima označene su točkama, a oni s različitim crvenim slovima.

ALEL	AMINOKISELINSKI SLIJED			POLOŽAJ
DQA1*00101	DHVANYGINV	YQSYGPSGQY	THEFDGDEEF	[30]
DQA1*00402	 Y		L ..	[30]
DQA1*02401	 Y			[30]
DQA1*00101	YVDLEKKETV	WRLPVFSTFR	SFDPQGALRN	[60]
dqa1*00402		 T		[60]
DQA1*02401		 T		[60]
DQA1*00101	LAIKQNLNI	MTKRSNQTA	TN	[82]
dqa1*00402		L	..	[82]
DQA1*02401	... A	L	..	[82]

3.2 Aleli lokusa DQB

Analizom lokusa DQB pronađena su opet tri alela (Tablica 4) te su svi tipični samo za čaglja, tj. ne dijele ih ni s jednom srodnom vrstom. Heterozigoti u Tablici 1 su ponovno označeni zelenom, a homozigoti crvenom bojom. Njihov nukleotidni ispis nalazi se u Tablici 5, a aminokiselinski ispis u Tablici 6. Crvenom bojom je označeno 38 varijabilnih mjesta u nukleotidnom zapisu te 16 promijenjenih aminokiselina. Alel DQB1*00806, nađen kod jedne jedinke u homozigotnom obliku te je najrjeđi unutar analizirane populacije (učestalost mu je 3,45%). Najučestaliji je alel DQB1*02305 s frekvencijom od 72,41%, a slijedi ga alel DQB1*06801 s frekvencijom od 24,14%.

Tablica 4. Aleli lokusa DQB pronađeni u pojedinim jedinkama. Crvenom pozadinom su označene homozigotne jedinke, a zelenom heterozigotne.

Oznaka jedinke	DQB1*02305	DQB1*06801	DQB1*00806
174/2009			+
29/2010	+		
72/2010	+		
84/2010	+	+	
34/2013	+	+	
35/2013		+	
101/2013	+		
102/2013	+		
127/2013	+		
151/2013	+	+	
153/2013	+	+	
166/2013	+		
180/2013	+		
189/2013	+		
80/2016	+	+	
81/2016	+		
82/2016	+		
83/2016	+	+	
85/2016	+	+	
90/2016	+		
91/2016	+		
97/2016	+		
117/2016	+	+	
122/2016	+	+	
123/2016A	+	+	
123/2016B	+	+	
125/2016	+	+	
131/2016	+		
133/2016	+		
Ukupno	42	14	2
Broj homozigota	15	1	1
Frekvencija (%)	72,41	24,14	3,45

Tablica 5. Nukleotidni ispis alela lokusa DQB. Nukleotidne pozicije s jednakim nukleotidima označene su točkama, a one s različitim nukleotidima crvenim slovima.

ALEL	NUKLEOTIDNI SLIJED										POLOŽAJ
DQB1*00806	GAT	TTC	GTG	TAC	CAG	TTT	AAG	GGC	GAG	TGC	[30]
DQB1*02305	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[30]
DQB1*06801	...	...	...	...	...	...	...	TT	...	...	[30]
DQB1*00806	TAT	TTC	ACC	AAC	GGG	ACG	GAG	CGG	GTG	CGG	[60]
DQB1*02305	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[60]
DQB1*06801	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[60]
DQB1*00806	CTT	CTG	ACT	AAA	TAC	ATC	TAT	AAC	CGG	GAG	[90]
DQB1*02305	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[90]
DQB1*06801	...	...	G.G	.G.	AG.	...	...	...	...	...	[90]
DQB1*00806	GAG	TTC	GTG	CGC	TTC	GAC	AGC	GAC	GTG	GGG	[120]
DQB1*02305	...	.A.	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
DQB1*06801	...	.A.	...	...	...	.T	...	...	...	...	[120]
DQB1*00806	GAG	TAC	CGG	GCG	GTC	ACG	GAG	CTC	GGG	CGG	[150]
DQB1*02305	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[150]
DQB1*06801	...	.T.	...	...	...	...	...	...	...	...	[150]
DQB1*00806	CCC	GAC	GCT	GAG	TAC	TGG	AAC	gGg	CAG	AAG	[180]
DQB1*02305	...	TCG	...	...	...	...	...	CCG	...	...	[180]
DQB1*06801	...	TCG	...	...	...	...	...	G.G	...	...	[180]
DQB1*00806	GAC	GAG	ATG	GAC	CGG	GTA	CGG	GCC	GAG	CTG	[210]
DQB1*02305	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[210]
DQB1*06801	.G	ATC	T..	.G	...	AAG	...	...	...	...	[210]
DQB1*00806	GAC	ACG	GTG	TGC	AGA	CAC	AAC	TAC	GGG	AGG	[240]
DQB1*02305	...	...	...	...	...	...	...	...	...	TT.	[240]
DQB1*06801	...	...	...	...	...	...	...	...	...	GT.	[240]
DQB1*00806	GAA	GAG	CTG	ACC	ACG	TTG	CAG	CGG	CGA	[267]	
DQB1*02305	...	...	...	...	T..	.tg	ca.	...	.ga	[267]	
DQB1*06801	...	...	...	TA.	...	.tg	...	.g	cga	[267]	

Tablica 6. Aminokiselinski ispis alela lokusa DQB. Aminokiselinske pozicije s jednakim aminokiselinskim ostacima označene su točkama, a oni s različitim crvenim slovima.

ALEL	AMINOKISELINSKI SLIJED			POLOŽAJ
DQB1*00806	DFVYQFKGEC	YFTNGTERVR	LLTKYIYNRE	[30]
DQB1*02305				[30]
DQB1*06801	F..		..ARS.....	[30]
DQB1*00806	EFVRFSDSVG	EYRAVTELGR	PDAEYWNGQK	[60]
DQB1*02305	.Y.....		.S.....P.	[60]
DQB1*06801	.Y.....	.F.....	.S.....	[60]
DQB1*00806	DEMDRVRAEL	DTVCRHNYGR	EELTTLQRR	[89]
DQB1*02305		L	S.....	[89]
DQB1*06801	EILE.K....	V	...Y.....	[89]

3.3 Aleli lokusa DRB

Lokus DRB je pokazao najveću polimorfnost s četiri različita alela (Tablica 7). Heterozigoti u Tablici 7 označeni su zelenom, a homozigoti crvenom bojom. Alel DRB1*04503 pronađen je samo kod jedne jedinke (174/2009). Od preostala tri alela, alel DRB1*00901 je trans-specijski (Kennedy i sur. 2007a, 2007b), dok su preostala dva karakteristična za čaglja (Arbanasić i sur. 2017). Tablica 8 prikazuje nukleotidni, a Tablica 9 aminokiselinski ispis pojedinih alela s crveno označenim varijabilnim mjestima. Lokus DRB ima najveći broj varijabilnih nukleotidnih mjesta (30) koji prevođenjem u aminokiselinski zapis daju 19 promijenjenih aminokiselina.

Tablica 7. Aleli lokusa DRB pronađeni u pojedinim jedinkama. Crvenom pozadinom su označene homozigotne jedinke, a zelenom heterozigotne.

Oznaka jedinke	DRB1*13001	DRB1*00901	DRB1*13101	DRB1*04503
174/2009				+
29/2010	+	+		
72/2010	+	+		
84/2010		+	+	
34/2013	+		+	
35/2013			+	
101/2013	+	+		
102/2013	+	+		
127/2013	+	+		
151/2013	+		+	
153/2013	+		+	
166/2013		+		
180/2013	+	+		
189/2013	+	+		
80/2016	+		+	
81/2016	+	+		
82/2016	+			
83/2016	+			
85/2016		+	+	
90/2016		+		
91/2016	+	+		
97/2016	+			
117/2016		+	+	
122/2016		+	+	
123/2016A	+		+	
123/2016B	+		+	
125/2016		+	+	
131/2016	+	+		
133/2016		+	+	
Ukupno	22	21	13	2
Broj homozigota	2	2	1	1
Frekvencija (%)	37,93	36,21	22,41	3,45

Tablica 8. Nukleotidni ispis alela lokusa DRB. Nukleotidne pozicije s jednakim nukleotidima označene su točkama, a one s različitim nukleotidima crvenim slovima.

ALEL	NUKLEOTIDNISLIJED										POLOŽAJ
DRB1*00901	CAT	TTC	TTG	GAG	GTG	GCA	AAG	TCC	GAG	TGC	[30]
DRB1*13101	...	...	...	...	...	...	...	G..	...	...	[30]
DRB1*13001	...	...	...	A..	A..	.T.	...	.T.	...	...	[30]
DRB1*04503	...	...	...	...	A..	TT.	...	...	...	...	[30]
DRB1*00901	TAT	TTC	ACC	AAC	GGG	ACG	GAG	CGG	GTG	CGG	[60]
DRB1*13101	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[60]
DRB1*13001	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[60]
DRB1*04503	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[60]
DRB1*00901	TTC	GTG	GAA	AGA	TAC	ATC	CAT	AAC	CGG	GAG	[90]
DRB1*13101	...	...	...	C..	...	T..	...	...	...	...	[90]
DRB1*13001	C.T	C..	ATG	G..	...	...	T..	...	...	...	[90]
DRB1*04503	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[90]
DRB1*00901	GAG	AAC	GTG	CGC	TTC	GAC	AGC	GAC	GTG	GGG	[120]
DRB1*13101	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
DRB1*13001	...	TT.	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
DRB1*04503	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
DRB1*00901	GAG	TAC	CGG	GCG	GTC	ACG	GAG	CTC	GGG	CGG	[150]
DRB1*13101	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[150]
DRB1*13001	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[150]
DRB1*04503	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[150]
DRB1*00901	CCC	GAC	GCT	GAG	TCC	TGG	AAC	CGG	CAG	AAG	[180]
DRB1*13101	...	...	...	...	...	...	...	G..	...	...	[180]
DRB1*13001	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[180]
DRB1*04503	...	...	...	...	...	...	...	G..	...	...	[180]
DRB1*00901	GAG	TTC	TTG	GAG	CGG	AAG	CGG	GCC	GCG	GTG	[210]
DRB1*13101	...	C..	...	...	.A.	.G.	...	...	...	...	[210]
DRB1*13001	...	C..	...	...	...	.G.	...	...	.A.	...	[210]
DRB1*04503	...	C..	...	...	...	...	...	...	.A.	...	[210]
DRB1*00901	GAC	ACC	TAC	TGC	AGA	CAC	AAC	TAC	GGG	GTG	[240]
DRB1*13101	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
DRB1*13001	...	.G	GTG	...	...	...	...	...	C..	...	[240]
DRB1*04503	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
DRB1*00901	ATT	GAG	AGC	TTC	ACG	GTG	CAG	CGG	CGA	G	[268]
DRB1*13101	GGC	...	...	...	...	...	...	...	...	.	[268]
DRB1*13001	GGC	...	.t.	...	...	...	...	...	...	.	[268]
DRB1*04503	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.	[268]

Tablica 9. Aminokiselinski ispis alela lokusa DRB. Aminokiselinske pozicije s jednakim aminokiselinskim ostacima označene su točkama, a oni s različitim crvenim slovima.

ALELI	AMINOKISELINSKI SLIJED			POLOŽAJ
DRB1*00901	HFLEVAKSEC	YFTNGTERVR	FVERYIHNRE	[30]
DRB1*13101	 A ..	H	 H.Y ...	[30]
DRB1*13001	... KMV.F ..	H	LLM.D.Y ...	[30]
DRB1*04503	 ML	H		[30]
DRB1*00901	ENVRFDSDVG	EYRAVTELGR	PDAESWNRQK	[60]
DRB1*13101			 G ..	[60]
DRB1*13001	.F			[60]
DRB1*04503			 G ..	[60]
DRB1*00901	EFLERKRAAV	DTYCRHNYGV	IESFTVQRR	[89]
DRB1*13101	.L..QR		G	[89]
DRB1*13001	.L...R..E .	..V.....R.	G	[89]
DRB1*04503	.L.....E .			[89]

3.4 Haplotipovi DQA1/DQB1/DRB1

Među 29 uzoraka, detektirala sam šest različitih haplotipova koji su prikazani u Tablici 10. Njihove pojedinačne učestalosti u populaciji prikazane su u Tablici 11 te uspoređene s podacima iz radova Arbanasić i sur. i diplomskog rada Šešelja (2016). Najčešći je haplotip DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*13001 (Tablica 10, pozadina zelene boje) koji se ukupno pojavio 21 put i prisutan je kod 19 jedinki, ali samo kod 2 jedinke u homozigotnom obliku (166/2013 i 90/2016). U istočno-europskoj populaciji čagljeva (Šešelja 2016) taj je haplotip izrazito niske učestalosti, dok je u hrvatskoj populaciji (Arbanasić i sur. 2017) nešto rjeđi nego u mojim rezultatima. Zatim je po učestalosti slijedio haplotip DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*00901 (Tablica 10, pozadina tamnoplave boje) koji je pronađen kod 18 jedinki te se ukupno pojavljuje 20 puta. Ponovno su samo dvije jedinke bile homozigoti (82/2016 i 97/2016), a taj haplotip je najčešći među čagljevima istočne Europe (Svetličić 2016) i hrvatskim čagljevima (Arbanasić i sur. 2017). Haplotip DQA1*02401/DBQ1*06801/DRB1*13101 (Tablica 10, pozadina svijetloplave boje) pojavljuje se 13 puta kod 12 jedinki te postoji samo jedan homozigot. Haplotipovi DQA1*00101/DQB1*00806/DRB1*04503 (Tablica 10, pozadina bež boje), DQA1*02401/DBQ1*06801/DRB1*13001 (Tablica 10, pozadina roze boje) i DQA1*02401/DQB1*02305/DRB1*13101 (Tablica 10, pozadina narančaste boje) su pronađeni kod samo jedne jedinke s time da je DQA1*00101/DQB1*00806/DRB1*04503 pronađen u homozigotnom obliku (jedinaka 174/2009). Taj haplotip predstavlja neobičnu kombinaciju alela jer je alel DQA1*00101 tipičan za pse i nije dosad potvrđen u čagljeva, dok su preostala dva alela specifični samo za čagljeve i ne dijele ih niti s jednom vrstom. Niti

jedan od tri prethodno navedena haplotipa nije pronađen u Istočnoj Europi i Hrvatskoj. Uspoređujući haplotipove iz radova navedenih u Tablici 11, vidljivo je da se haplotipovi samo djelomično preklapaju, tj. da čagljevi Istočne Europe dijele samo tri haplotipa sa srpskim čagljevima, dok hrvatski dijele samo dva od šest haplotipova sa srpskim čagljem, unatoč tome što su geografski bliže nego zemlje Istočne Europe, a izraelski čagljevi dijele samo jedan haplotip.

Tablica 10. Distribucija tro-lokusnih haplotipova DQA1/DQB1/DRB1 po jedinkama.

Pojedini haplotipovi su označeni određenim bojama pozadine.

Jedinka	DQA1	DQB1	DRB1
174/2009	DQA1*00101	DQB1*00806	DRB1*04503
	DQA1*00101	DQB1*00806	DRB1*04503
29/2010	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
72/2010	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
84/2010	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*002401	DQB1*06801	DRB1*13101
34/2013	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
	DQA1*02401	DBQ1*06801	DRB1*13101
35/2013	DQA1*02401	DBQ1*06801	DRB1*13101
	DQA1*02401	DBQ1*06801	DRB1*13101
101/2013	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
102/2013	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
127/2013	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
151/2013	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
	DQA1*002401	DBQ1*06801	DRB1*13101
153/2013	DQA1*002401	DBQ1*06801	DRB1*13101
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
166/2013	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
180/2013	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
189/2013	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
80/2016	DQA1*02401	DBQ1*06801	DRB1*13101
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
81/2016	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
82/2016	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001

83/2016	DQA1*02401	DBQ1*06801	DRB1*13001
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
85/2016	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*02401	DBQ1*06801	DRB1*13101
90/2016	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
91/2016	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
97/2016	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
117/2016	DQA1*02401	DBQ1*06801	DRB1*13101
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
122/2016	DQA1*02401	DBQ1*06801	DRB1*13101
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
123/2016A	DQA1*02401	DBQ1*06801	DRB1*13101
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
123/2016B	DQA1*02401	DBQ1*06801	DRB1*13101
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
125/2016	DQA1*02401	DBQ1*06801	DRB1*13101
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
131/2016	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*13001
133/2016	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*02401	DQB1*02305	DRB1*13101

Tablica 11. Usporedba učestalosti haplotipova DQA1/DQB1/DRB1 nađenih u ovom istraživanju s onima iz prijašnjih istraživanja. U zagradama je uz geografsko područje naveden broj analiziranih uzoraka.

DQA	DQB	DRB	Ovo istraživanje	Šešelja (2016)	Arbanasić i sur. (2017)	Mešin (2015)
			Srbija (29)	Istočna Europa (21)	Hrvatska (54)	Izrael (6)
			Učestalost haplotipova % (broj homozigota)	Učestalost haplotipova % (broj homozigota)	Učestalost haplotipova % (broj homozigota)	Učestalost haplotipova % (broj homozigota)
00402	02305	13001	36,21 (2)	3,13 (0)	28,7 (5)	/
00402	02305	00901	31,34 (2)	59,38 (6)	47,2 (15)	66,67 (2)
02401	06801	13101	22,41 (1)	21,86 (1)	/	/
00101	00806	04503	3,45 (1)	/	/	/
02401	06801	13001	1,72 (0)	/	/	/
02401	02305	13101	1,72 (0)	/	/	/
00402	02305	13101	/	6,25 (0)	1,8 (0)	/
02401	06801	00901	/	3,13 (0)	/	/
02401	06801	14aEst	/	3,13 (0)	/	/
02401	06801	15aEst	/	3,13 (0)	/	/
03001	06801	13101	/	/	13,9 (2)	/
00402	02305	04503	/	/	6,5 (1)	/
00402	00806	13001	/	/	0,9	/
03001	06801	13001	/	/	0,9	/
03001	06801	13101	/	/	/	8,33 (0)
00101	00201	07901	/	/	/	8,33 (0)
00402	02301	04802var	/	/	/	16,67 (0)

3.5 Evolucijska udaljenost

Pomoću programskog paketa MEGA dobila sam vrijednosti za nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti. Koristeći Maximum likelihood metodu (metodu najveće vjerojatnosti), program samostalno predlaže najprikladniji model po kojemu se računa evolucijska udaljenost. Za nukleotidnu udaljenost DQA i DQB lokusa predložio je Jukes-Cantor (JC) model, dok je za DRB predložio Tamura 3 parametar korigiran s Gama distribucijom (T92+G). Za računanje aminokiselinske udaljenosti DQA i DQB lokusa predložen je Jones-Taylor-Thornton model (JTT), a za DRB lokus dodaje istom modelu i korekciju s Gama distribucijom (JTT+G). U Tablici 12 navedene su dobivene udaljenosti za sva 3 alela.

Tablica 12. Broj alela, duljina sekvence, nukleotidna i aminokiselinska udaljenost, broj varijabilnih nukleotidnih mjesta i broj razlika između aminokiselinskih sljedova za DQA, DQB i DRB lokuse kod čagljeva iz Srbije

Lokus	Broj alela	Duljina sekvence	Nukleotidna udaljenost		Aminokiselinska udaljenost		Broj varijabilnih nukleotidnih mjesta	Broj razlika između aminokiselinskih sljedova
			Model	d(%)	Model	d(%)		
DQA	3	246	JC	1,9	JTT	4,3	7	5
DQB	3	267	JC	7,8	JTT	14,9	29	16
DRB	4	268	T92+G	7,0	JTT+G	16,8	30	19

3.6 Test pozitivne selekcije

Pozitivna selekcija koja djeluje na nekom lokusu potvrđuje se testom u programskom paketu MEGA koji računa omjer sinonimnih i nesinonimnih mutacija Nei-Gojobori metodom (Nei i Gojobori 1986) s Jukes-Cantor korekcijom. Nulta hipoteza mog istraživanja jest da postoji neutralna evolucija na lokusima DQA, DQB i DRB ($dN=dS$), odnosno da mena djelovanja prirodne selekcije. Ako je omjer dN/dS (ω) veći od 1, znači da je pozitivna selekcija prisutna, dok jednak omjer sinonimnih i nesinonimnih supstitucija označava neutralnu evoluciju, a prevladavanje sinonimnih supstitucija (vrijednost ispod 1) ukazuje na purificirajuću selekciju koja ne podržava polimorfizam. U Tablici 13 prikazane su dobivene vrijednosti testa pozitivne selekcije na sva tri lokusa. Iz rezultata je vidljivo da su sve vrijednosti iznad 1, što znači da je veći broj nesinonimnih od sinonimnih supstitucija. Dakle, postoji pozitivna selekcija na sva tri lokusa s vrijednošću $p < 0,05$, što ukazuje na statistički značajan rezultat, stoga odbacujem nultu hipotezu.

Tablica 13. Prosječne stope nesinonimnih (dN) i sinonimnih supstitucija (dS) na kodonima alela lokusa DQA, DQB i DRB

Lokus	dN/dS (ω)	Pozitivna selekcija	P
DQA	2,258	+	0,013
DQB	2,067	+	0,020
DRB	2,130	+	0,018

4. Rasprava

Istraživanja MHC gena su višestruko korisna u analizi populacijske genetike čagljeva. Trenutno i dalje ne postoji velik broj radova objavljenih na tu temu općenito, a još manje na samoj vrsti. Uz ovaj rad, postoje još tri diplomatska rada koji su analizirali pojedine alele ili haplotipove populacija čagljeva iz različitih zemalja (Mešin 2015, Svetličić 2016, Šešelja 2016), znanstveni rad na hibridima čaglja i psa (Galov i sur. 2015) te na čagljevima iz Hrvatske (Arbanasić i sur. 2017). Čagljevi u Srbiji su više puta istraživani na genetičkoj razini, no koristili su se STR markeri i kontrolna regija mtDNA (Zachos i sur. 2009, Rutkowski i sur. 2015) koji ipak ne daju potpunu sliku stanja populacije. Kombiniranjem njihovih rezultata s rezultatima mog istraživanja MHC lokusa može se dobiti cjelovitija slika genetičke raznolikosti i adaptivne selekcije na srpskim čagljevima.

Od 31 dobivenog uzorka, 29 ih je uspješno sekvencirano, a dva uzorka iz Crne Gore su morali biti odbačeni zbog manjka DNA u uzorcima. Ukupno sam pronašla 10 alela i šest haplotipova, dok je u populaciji čagljeva u Hrvatskoj (Arbanasić i sur. 2017) zabilježeno devet alela i haplotipova, kao i u istočnoj Europi (Šešelja 2016). Niti jedan od pronađenih alela nije novonadeni, odnosno svi aleli na sva tri lokusa koji su pronađeni u ovom istraživanju su poznati iz prethodnih istraživanja.

Alel DQA1*00101 je dosad pronađen među uzorcima čagljeva iz Gruzije (Svetličić 2016) i Izraela (Mešin 2015). Uz to, taj alel je relativno učestao i u pasa te je pronađen kod biglova, koker španijela i drugih pasmina (Kennedy i sur. 2002). Taj alel pronađen i kod vuka (Arbanasić i sur. 2013). S obzirom da je alel nađen samo u homozigotnom stanju u jednoj jedinki (174/2009), vjerojatno je alel češći u populaciji nego što je dosad. Preostala dva alela te jedinke (DQB1*00806 i DRB1*04503) su karakteristični samo za čagljeve. DQA lokus je pokazao visoku homozigotnost s čak 14 jedinki koje nose samo alel DQA1*00402, dok se aleli DQA1*02401 i DQA1*00101 pojavljuju u homozigotnom obliku. Učestalosti pojedinih alela lokusa DQA su različite od onih procijenjenih na drugim populacijama čagljeva. U populaciji iz istočne Europe (Šešelja 2016) najčešći je alel DQA1*00402 kao i u ovom radu, no slijedi ga alel DQA1*03001 koji uopće nije zabilježen među srpskim uzorcima. Alel DQA1*02401 specifičan je za čagljeve te nije pronađen niti kod hrvatskih čagljeva (Arbanasić i sur. 2017), niti kod izraelskih čagljeva (Mešin 2015), niti u istočnoeuropskim (Šešelja 2016), što bi se moglo objasniti slabim protokom gena između srpskih i tih ostalih

populacija čagljeva. Analiza MHC lokusa bugarskih čagljeva bi mogle razjasniti podrijetlo alela specifičnih za Srbiju s obzirom da je već dokazano da postoji protok gena između tih dviju populacija (Fabbri i sur. 2013).

Na DQB lokusu sam pronašla također tri alela, od kojih je alel DQB1*00806 zastupljen samo s jednim nalazom i to u homozigotnom obliku (jedinka 174/2009), što ukazuje na njegovu veću učestalost nego što je pronađeno u ovom istraživanju. Dosad je alel pronađen još samo u Dalmaciji (Arbanasić i sur. 2017), dok su preostala dva alela pronađena u mnogim populacijama čagljeva (u Hrvatskoj (Galov i sur. 2015), Gruziji, Estoniji, Latviji i Rumunjskoj (Svetličić 2016)). Kao i kod DQA lokusa, velik je broj homozigota na jednom alelu (DQB1*02305, 15 jedinki), a preostala dva alela (DQB1*06801 i DQB1*00806) broje samo po jednu jedinku homozigota. Aleli DQB1*02305 i DQB1*06801 su tipični za čagljeve te dosad nisu zabilježeni u drugih pripadnika porodice pasa.

DRB lokus je pokazao najveću raznolikost s 4 alela. To je bilo očekivano s obzirom da je u mnogim dosadašnjim istraživanjima na različitim vrstama DRB bio najpolimorfni MHC lokus (Arbanasić 2013, 2017, Wood 2006). Ima vrlo nizak broj homozigota za svaki pojedini alel (dva ili niže) i uravnoteženu učestalost, tj. nijedan alel ne dominira s preko 50% učestalosti u populaciji, za razliku od rezultata čagljeva Istočne Europe kod kojih je alel DRB1*00901 imao učestalost preko 60% te je pronađeno sedam homozigotnih jedinki s tim alelom. Ponovno se pojavio rijedak alel (DRB1*04503) koji je pronađen samo kod jedne jedinke u homozigotnom obliku, a pronađen je i kod dalmatinske populacije (Arbanasić i sur. 2017). Aleli DRB1*13001 i DRB1*13101 su dosad pronađeni samo kod čagljeva, dok je DRB1*00901 trans-specijski alel pronađen kod psa i vuka (Kennedy i sur. 2007a, 2007b).

Analizom tro-lokusnih haplotipova uočila sam homozigotnu jedinku koja ima neobičnu kombinaciju alela: DQA1*00101/DQB1*00806/DRB1*04503. Alel 00101 je tipičan pseći alel, a 00806 i 4503 su zabilježeni u Arbanasić i sur. (2017) samo kod jedne jedinke iz Dalmacije. Jedinka koja je homozigot za rijedak haplotip ukazuje na to da je taj haplotip vjerojatno češći u populaciji, no dosad nisu uzorkovane i analizirane druge jedinke koje ga nose. U populaciji bi morale postojati i heterozigotne jedinke za taj haplotip, a u ovom radu nisu pronađene. S obzirom da su DQB i DRB aleli u haplotipu te jedinke pronađeni samo kod čaglja, zaključila sam da alel DQA1*00101 nije ušao u populaciju hibridizacijom, već je primjer trans-specijskog polimorfizma. Uz to, preostala dva alela su dosad pronađeni samo u Dalmaciji, što može ukazivati na migratornu jedinku. Premda su mnogi aleli nađeni u srpskoj

populaciji već ranije nađeni u ostalim populacijama čagljeva, njihove tro-lokusne kombinacije, odnosno haplotipovi se manje preklapaju s onima nađenim u ostalim populacijama. Tako sve populacije imaju neke privatne haplotipove (haplotipove nađene samo u toj populaciji i niti jednoj drugoj): srpska populacija ima tri privatna haplotipa, istočno-europska također tri, hrvatska četiri, a izraelska tri (Tablica 11). To nije neobično za populacije koje su geografski više ili manje odvojene. Prisutnost drugih zvijeri također može utjecati na sastav alela i haplotipove u populaciji s obzirom da se neki patogeni prenose i između različitih vrsta. Za dodatna razjašnjenja potrebna su istraživanja raznolikosti MHC lokusa na većem broju uzoraka i sa šireg geografskog područja.

Jedinka 133/2016 sadrži haplotipove DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*00901 i DQA1*02401/DQB1*02305/DRB1*13101 (Tablica 10), što je neobično s obzirom da je na DRB i DQA lokusu, koji je najmanje polimorfan, heterozigot, dok je na DQB lokusu homozigot. Ovo bi mogla biti posljedica postojanja nul alela na DQB lokusu, odnosno alela koji se nije umnožio prilikom PCR reakcije, pa je jedinka detektirana kao homozigot za taj lokus. Unatoč tome što sam koristila nizvodnu početnicu DQBR3 koju su kreirali Galov i sur. (2015) u svom radu na hibridima nakon što im se polovica uzoraka nije umnažala s početnicama preuzetima iz rada Kennedyja i sur. (2002), vjerojatno se i dalje DQB lokus kod tog uzorka nije uspio umnožiti.

Uspoređujući alele srpskih čagljeva s alelima hrvatskih vukova, vidljiva je velika razlika u genetičku raznolikosti između vrsta. Dok se kod čagljeva našlo ukupno 10 alela na sva tri lokusa, vuk je imao preko 10 alela na DRB i DQB lokusima i sedam alela na DQA lokusu, iz čega se može pretpostaviti da čagljevi u Europi imaju nisku genetičku raznolikost koja je vjerojatno uzrokovana nedavnom ekspanzijom prema zapadu (Fabbri i sur. 2014). Ako pak usporedimo alele MHC lokusa čagljeva s dobrim dupinima (*Tursiops truncatus*) (Arbanasić i sur. 2014), možemo primijetiti još veću razliku. Naime, u 60 jedinki iz Jadranskog mora pronađeno je 10 DQA i 12 DQB alela te 16 haplotipova.

Rezultati analize MHC lokusa srpskih čagljeva u ovom istraživanju ukazuju na ravnotežnu selekciju kao glavni pokretač održavanja raznolikosti. Neki od pokazatelja genetičke raznolikosti su vrijednosti evolucijske udaljenosti i broj različitih aminokiselina koje kodiraju pojedini aleli. Uspoređujući genetičku raznolikost srpskih uzoraka s onima iz ostalih populacija (Sešelja 2016, Svetličić 2016, Mešin 2015) i znanstvenih radova na MHC lokusima čagljeva (Arbanasić 2017), postoje odstupanja u sastavu i učestalosti alela, ali i njihovim nukleotidnim i aminokiselinskim udaljenostima. Rezultati ovog istraživanja

pokazuju slične nukleotidne udaljenosti kao rezultati istraživanja izraelskih čagljeva kod sva tri lokusa s razlikom većom od 1% samo na DRB lokusu. Istočnoeuropski čagljevi (Svetličić 2016, Šešelja 2016) imaju veću nukleotidnu udaljenost od srpskih i izraelskih čagljeva na DQB i DRB lokusu (9,60% i 21,14%). Aminokiselinska udaljenost je također viša kod istočnoeuropskih čagljeva na DQB i DRB lokusu (19,0% i 22,14%), dok DQA lokus pokazuje slične vrijednosti kod svih triju populacija. Istočnoeuropski čagljevi također imaju veći broj varijabilnih nukleotidnih mjesta i razlika između aminokiselinskih slijedova nego srpske i izraelske populacije. DQA lokus ima najniže vrijednosti svih prethodno navedenih parametara, što je u suglasju s nižom polimorfnošću α lanaca MHC molekula naspram β lanaca koje kodiraju DQB i DRB geni. Unatoč neočekivano niskoj nukleotidnoj udaljenosti, DRB lokus i dalje navodim kao najpolimorfnijeg među analiziranim lokusima, a DQA kao najmanje polimorfni lokus.

Potvrdila sam djelovanje pozitivne selekcije dN/dS testom na sva tri lokusa. Svi su rezultati bili statistički značajni, odnosno p vrijednost je bila ispod 0,05. Prijašnja istraživanja su također potvrdila djelovanje pozitivne selekcije na MHC lokusima na čagljevima (Arbanasić i sur. 2017, Mešin 2015, Šešelja 2016, Svetličić 2016).

Osim prirodne selekcije, postoje i drugi mehanizmi koji utječu na frekvenciju alela u populaciji, a imaju jak učinak na male i izolirane populacije. Ravnotežna selekcija vjerojatno održava takve populacije „zdravima“ te unatoč monomorfnosti na drugim alelima, npr. neutralnim markerima (Aguilar i sur. 2004), populacije mogu i dalje održavati određenu genetičku raznolikost. Postoje dva predložena mehanizma ravnotežne selekcije. Prvi je heterozigotna prednost kod koje, kao što sam naziv kaže, heterozigoti imaju veći fitnes od homozigota. Naime, heterozigot ima dvostruko više alela, što znači da se može obraniti od dvostruko više patogena te ima veću šansu preživjeti i dati potomke. Drugi predloženi mehanizam je selekcija ovisna o frekvenciji, još zvana i „hipoteza crvene kraljice“, kod kojeg je određeni alel ili genotip povoljan i daje selektivnu prednost pri jednoj, a nepovoljan pri drugoj frekvenciji. Točnije, patogeni pokušavaju izbjeći prepoznavanje najčešćih MHC molekula jer će se s njima najviše i susretati. Ako postoji rijedak alel koji je rezistentniji na patogene, proširit će se u populaciji te postati dovoljno čest da vrši pritisak na patogene te u konačnici kad mutiraju, alel više ne daje toliku prednost te mu počinje opadati frekvencija u populaciji. Taj se krug ponavlja i s drugim alelima te održava dinamičnost u genskoj zalihi populacije (Sommer 2005).

Trans-specijski polimorfizam je pojam koji opisuje pojavu jednakih alela kod dvije ili više srodnih vrsta, a potvrđen je i u ovom istraživanju. Tako je npr. alel DRB1*00901 koji je pronađen kod čaglja u ovom istraživanju, nađen i kod psa (Kennedy i sur. 2007b) i vuka (Kennedy i sur. 2007a), alel DQA1*00402 je nađen kod čaglja, etiopskog vuka (Kennedy i sur. 2010) i psa (Kennedy i sur. 2007b), a alel DQA1*00101 je pronađen kod čaglja, psa (Kennedy i sur. 2002) i kojota (Seddon i Ellegren 2002),

5. Zaključak

U ovom istraživanju na 29 uzoraka čagljeva iz Srbije pronađena su tri DQA, tri DQB i četiri DRB alela te šest haplotipova. Ukupno je pronađeno šest alela specifičnih za čaglja (tri DQB i tri DRB alela). Lokus DQA značajno odstupa od lokusa DQB i DRB svojom niskom polimorfnošću.

Najčešći alel je DQA1*00402, a zatim slijedi DQA1*02401. Alel DQA1*00101 je pronađen samo kod jedne jedinke u homozigotnom obliku. Na tom lokusu je pronađen relativno veliki broj homozigotnih jedinki (14 od 29 analiziranih jedinki).

Najčešći alel lokusa DQB je DQB1*02305, zatim DQB1*06801 te DQB1*00806 pronađen samo kod jedne jedinke u homozigotnom obliku. Broj homozigota za lokus DQB je mali, a nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti su više nego kod lokusa DQA te sličnih vrijednosti kao kod lokusa DRB.

Lokus DRB se pokazao kao najpolimorfiji lokus od tri istražena. Ima najveći broj pronađenih alela te ima uravnotežene očestalosti triju od četiriju alela. DRB1*04503 je pronađen kod jedne jedinke u homozigotnom obliku. Broj homozigota je nizak, odnosno broj heterozigota je visok.

Od šest pronađenih tro-lokusnih haplotipova, tri su privatna, tj. srpska populacija ih ne dijeli niti s jednom od populacija korištenih za usporedbu rezultata (DQA1*00101/DQB1*00806/DRB1*04503, DQA1*02401/DQB1*06801/DRB1*13001 i DQA1*02401/DQB1*02305/DRB1*13101). Najveća sličnost je kod haplotipova istočnoeuropskih populacija s kojima dijeli preostala tri haplotipa (DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*13001, DQA1*00402/DQB1*02305/DRB1*00901 i DQA1*02401/DBQ1*06801/DRB1*13101), a ti su haplotipovi i najčešći u srpskoj populaciji.

Srpska populacija ima nižu genetičku raznolikost od istočnoeuropske i hrvatske populacije dok izraelski čagljevi ne odstupaju značajno od srpskih. Genetička raznolikost je niska i u usporedbi sa srodnim vrstama poput sivog vuka, ali i nesrodnih poput dobrog dupina. Pozitivna selekcija potvrđena je dN/dS testom na svim lokusima.

6. Literatura

- Aguilar A., Roemer G., Debenham S., Binns M., Garcelon D., Wayne R.K., (2004). High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101 (10) 3490-3494
- Arbanasić H., Đuras M., Martina P., Gomerčić T., Ćurković S., Galov A. (2014). Major histocompatibility complex class II variation in bottlenose dolphin from Adriatic Sea: inferences about the extent of balancing selection. *Marine Biology* 161, 10; 2407-2422
- Arbanasić H., Huber Đ., Kusak J., Gomerčić T., Hrenović, J., Galov A. (2013). Extensive polymorphism and evidence of selection pressure on major histocompatibility complex DLA-DRB1, DQA1 and DQB1 class II genes in Croatian grey wolves. *Tissue Antigens* 81, 19–27
- Arbanasić H., Florijančić T., Celinščak Ž., Bošković I., Galov A. (2017). Substantial functional diversity accompanies limited major histocompatibility complex class II variability in golden jackal (*Canis aureus*): A comparison between two wild *Canis* species in Croatia. *Mammalian Biology* 83 (2017) 27–33
- Berthier K., Charbonnel N., Galan M., Chaval Y., Cosson JF. (2006). Migration and recovery of the genetic diversity during the increasing density phase in cyclic vole populations. *Molecular Ecology* 15:2665–2676
- Bošković I., Šperanda M., Florijančić T., Šprem N., Ozimec S., Degmečić D., Jelkić D., 2013. Dietary habits of the golden jackal (*Canis aureus* L.) in the Eastern Croatia. *Agric. Conspec. Sci.* 78: 245–248
- Clarke B., Kirby D. R. S. (1966). Maintenance of histocompatibility polymorphisms. *Nature (London)* 211:999–1000
- Cohen T.M., King R., Dolev A., Boldo A., Lichter-Peled A., Bar-Gal G.K. (2013). Genetic characterization of populations of the golden jackal and the red fox in Israel. *Conservation Genetics* 14, 55–63
- Ćirović D., Penezić A, Milenković M., Paunović M. (2014). Winter diet composition of the golden jackal (*Canis aureus* L., 1758) in Serbia, *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* 79(2), 132-137
- Fabbri E., Caniglia R., Galov A., Arbanasić H., Lapini L., Bošković I., Florijančić T., Vlasheva A., Ahmed A. Mirchev., R.L., Randi E. (2013). Genetic structure and expansion of golden jackals (*Canis aureus*) in the north-western distribution range (Croatia and eastern Italian Alps) *Conservation Genetics* 15, 187

Galov A., Sindičić M., Andreanszky T., Čurković S., Deždek D., Slavica A., Hartl B.G., Krueger B. (2014). High genetic diversity and low population structure in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Croatia. *Mammalian Biology* 79: 77–80

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT, *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98

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

Hughes A.L., Nei M. (1989). Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: Evidence for overdominant selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 948-962

Hughes A.L., Yeager M. (1998). Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annual Review of Genetics* 32: 415-434

Janeway C.A. Jr, Travers P., Walport M. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th edition, New York: Garland Science

Jansson E., Ruokonen M., Kojola I., Aspi J. (2012). Rise and fall of a wolf population: Genetic diversity and structure during recovery, rapid expansion and drastic decline. *Molecular Ecology* 21, 5178–5193

Kennedy L.J., Barnes A., Happ G.M., Quinnell R.J., Bennett D., Angles J.M., Day M.J., Carmichael N., Innes J.F., Isherwood D., Carter S.D., Thomson W., Ollier W.E.R., (2002). Extensive interbreed, but minimal intrabreed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs. *Tissue Antigens* 59, 194–204

Kennedy L.J., Angles J.M., Barnes A., Carmichael L.E., Radford A.D., Ollier W.E.R., Happ G.M., (2007a). DLA-DRB1, DQA1, and DQB1 alleles and haplotypes in North American gray wolves. *Journal of Heredity* 98, 491–499

Kennedy L.J., Barnes A., Short A., Brown J.J., Lester S., Seddon J., Fleeman L., Francino O., Brkljacic M., Knyazev S., Happ G.M., Ollier W.E.R., (2007b). Canine DLA diversity: 1. New alleles and haplotypes. *Tissue Antigens* 69, 272–288

Kennedy L.J., Randall D.A., Knobel D., Brown J.J., Fooks A.R., Argaw K., Shiferaw F., Ollier W.E.R., Sillero-Zubiri C., Macdonald D.W., Laurenson M.K., (2010). Major histocompatibility complex diversity in the endangered Ethiopian wolf (*Canis simensis*). *Tissue Antigens* 77, 118–125

Krofel M., Giannatos G., Ćirović D., Stoyanov S., Newsome T.M. (2017). Golden jackal expansion in Europe: a case of mesopredator release triggered by continent-wide wolf persecution? *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 28(1)

- Lanszki J., Heltai M., Szabó L. (2006). Feeding Habits and Trophic Niche Overlap between Sympatric Golden Jackal (*Canis aureus*) and Red Fox (*Vulpes vulpes*) in the Pannonian Ecoregion (Hungary), Canadian Journal of Zoology 84 (11): 1647–1656. doi:10.1139/z06-147
- Macdonald D.W. (1979). The flexible social system of the golden jackal, *Canis aureus*. Behavioural Ecology and Sociobiology 5:17–38
- Markov G., (2014). Distribution and numbers of wolves (*Canis lupus*) in Bulgaria: what is going on? Buletinul AȘM, Științele vieții 322: 59–65
- Markov G. (2012). Golden Jackal (*Canis aureus* L.) in Bulgaria: What is Going on?, ACTA ZOOLOGICA BULGARICA, 67-71
- Mendelssohn H., Yom-Tov Y. (1999). Mammalia of Israel, Jerusalem: Israel Academy of Sciences and Humanities
- Merkle J., Stahler D.R., Smith D.W., (2009). Interference competition between gray wolves and coyotes in Yellowstone National Park. Canadian Journal of Zoology 87: 56–63
- Mešin M. (2015). Variability of major histocompatibility complex class II genes in the golden jackals (*Canis aureus*) from Israel. Diploma thesis, Faculty of Science, Department of Biology
- Milenković, M. (1987). Rasprostranjenje šakala *Canis aureus* Linnaeus, 1758 (Mammalia, Canidae) u Jugoslaviji. – Proceedings of Fauna of SR Serbia, Serbian Academy of Sciences and Arts 4: 233-248
- Milenković M., Paunović M. (2003). Phenomenon of golden jackal (*Canis aureus* Linnaeus, 1758), expansion in Serbia; in Carpathian workshop on large carnivores conservation, Council of Europe, Brasov, Romania, 12-14, 78-86
- Mivart G. (1890). Dogs, Jackals, Wolves, and Foxes: A Monograph of the Canidae, Taylor and Francis, London
- Moehlman P.D., Hofer H. (1997). Cooperative breeding, reproductive suppression and body size in canids, Cooperative breeding in mammals, Cambridge University Press, Cambridge pp.76-128
- Moehlman P.D. (1987). Social organization in jackals. American Scientist, 75, 366–375
- Mucci N., Arrendal J., Ansorge H., Bailey M., Bodner M., Delibes M., Ferrando A., Fournier P., Fournier C., Godoy J.A., Hajkova P., Hauer S., Heggberger T.M., Heidecke D., Kirjavainen H., Krueger H.H., Kvaloy K., Lafontaine L., Lanszki J., Lemarchand C., Liukko U.M., Loeschcke V., Ludwig G., Madsen A.B., Mercier L., Ozolins J., Paunovic M., Pertoldi C., Piriz A., Prigioni C., Santos-Reis M., Luis T.S., Stjernberg T., Schmid H., Suchentrunk F.,

- Teubner J., Tornberg R., Zinke O. & Randi E. (2010). Genetic diversity and landscape genetic structure of otter (*Lutra lutra*) populations in Europe. *Conservation Genetics* 11, 583–599
- Nei M., Gojobori T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 3(5), 418–426
- Rosevear D.R. (1974). The carnivores of West Africa. *Journal of Mammalogy* 58 (1),120–121
- Roy M.S., Geffen E., Smith D., Ostrander E.A., Wayne R.K. (1994). Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution* 11, 553–570
- Rutkowski R., Krofel M., Giannatos G., Ćirović D., Männil P., Volokh A.M., (2015) A European Concern? Genetic Structure and Expansion of Golden Jackals (*Canis aureus*) in Europe and the Caucasus. *PLoS ONE* 10(11)
- Schad, J., Sommer, S., Ganzhorn, J.U., (2004). MHC variability of a small lemur in the littoral forest fragments of southeastern Madagascar. *Conservation Genetics* 5, 299–309
- Seddon J.M., Ellegren H. (2002). MHC class II in European wolves: a comparison with dogs. *Immunogenetics* 54, 490–500.
- Sillero-Zubiri C. (1996). Senegal Project il Licaone 8, 9-10
- Sillero-Zubiri, C., Hoffmann, M. and Macdonald, D.W. (2004): Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge
- Singh P. B., Herbert J., Roser B., Arnott L.,Tucker D., Brown R. (1990). Rearing rats in a germ-free environment eliminates their odors of individuality. *Journal of Chemical Ecology* 16:1667–1682
- Slade R. W., H. McCallum. (1992). Overdominant vs. frequency-dependent selection at MHC loci. *Genetics* 132:861–862
- Sommer R., Benecke, N., (2005). Late-Pleistocene and early Holocene history of the canid fauna of Europe (Canidae). *Mammalian Biology*, 70(4), pp.227–241
- Stratford J. (2015). Golden jackal in Lithuania, a consideration of its arrival, impact and status, *Zoology and Ecology*, 26 (4), 277-287
- Svetličić I. (2016). Variability of major histocompatibility complex class DQA and DQB genes in the golden jackal (*Canis aureus*), Diploma thesis, Faculty of Science, Department of Biology

Šálek M., Červinka J., Banea O., Krofel M., Čirović D., Selanec I., Penezić A., Grill S., Riegert J. (2014). Population densities and habitat use of the golden jackal (*Canis aureus*) in farmlands across the Balkan Peninsula. *European Journal of Wildlife Reserves* 60: 193–200

Šešelja K. (2016). Variability of major histocompatibility complex DRB class II gene and DQA/DQB/DRB haplotypes in the golden jackals (*Canis aureus*) from eastern Europe, Diploma thesis, Faculty of Science, Department of Biology

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

Wagner J.L., Burnett R. C., Works J. D., Storb R. (1996a). Molecular analysis of DLA-DRBB1 polymorphism. *Tissue Antigens*, 48(5), pp.554–561

Wagner J.L. Burnett R. C, DeRose S.A., Storb R. (1996b). Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQA genes. *Tissue antigens*, 48(3), pp. 199-204

Wagner J.L. Hayes-Lattin B., Works J D., Storb R. (1998). Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQB genes. *Tissue antigens*, 52(7), pp.242–250

Wakeland E.K., Boehme S., She J.X., Lu C.-C., McIndoe R.A., Cheng I., Ye Y., Potts W.K., (1990). Ancestral polymorphisms of MHC class II genes: divergent allele advantage. *Immunol. Res.* 9, 115–122

Wood P. (2006). *Understanding Immunology* second edition, Prentice Hall, 59-80

Yamazaki K., Yamaguchi M., Baranoski L., Bard J., Boyse E.A., Thomas L. (1979). Recognition among mice: evidence from the use of Y-maze differentially scented by congenic mice of different major histocompatibility types. *Journal of Experimental Medicine* 150:755–760

Zachos F. E., Čirovic 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 (3-4), 241-250

<https://www.arkive.org/golden-jackal/canis-aureus/image-G51664.html>

7. Životopis

Rođena sam u Đakovu 23.03.1994. godine, no obrazovanje sam započela u Zagrebu. Nakon završetka osnovne škole, upisala sam jezični smjer Gimnazije Lucijana Vranjanina. Maturirala sam 2012. godine te iste godine upisujem prvu godinu preddiplomskog studija biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Godine 2015. dobivam titulu sveučilišnog prvostupnika biologije te zatim na istom fakultetu upisujem diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Zoologija.

Sudjelovala sam na tri Noći biologije na Animalnom zavodu Biološkog odsjeka te sam član Sekcije za šišmiše studentske udruge BIUS. Najviše me zanimaju zvijeri (Carnivora) te ekologija, evolucija i konzervacijska biologija pa sam prema tome odabrala temu završnog i diplomskog rada.