

# Raznolikost gena skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u čagljeva (*Canis aureus*) iz Izraela

---

Mešin, Mario

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:217:603485>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Mario Mešin

Raznolikost gena skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u čagljeva (*Canis aureus*)  
iz Izraela

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

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

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici doc. dr.sc. Ani Galov na ukazanom vremenu, savjetima, pomoći i povjerenju tijekom izvedbe i pisanja ovoga rada. Zahvaljujem i neposrednoj voditeljici dr.sc Haidi Arbanasić na pomoći oko izvođenja i planiranja pokusa te materijalima koje je ustupila iz vlastitih istraživanja. Puno hvala i Gordani Žakman na savjetima, strpljenju i pomoći tijekom tehničke izvedbe istraživanja.

Posebnu zahvalu upućujem svojim roditeljima, sestrama, bratu i ostatku obitelji na ukazanom povjerenju, moralnoj podršci, financijskoj pomoći i razumijevanju tijekom svih godina mojeg obrazovanja.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### RAZNOLIKOST GENA SKUPINE II GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOST U ČAGLJEVA (*Canis aureus*) IZ IZRAELA

Mario Mešin

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC) ključna su komponenta imunološkog sustava kod sisavaca te su i važan molekularni marker adaptivne genetičke raznolikosti u divljim populacijama životinja. Veća raznolikost MHC gena unutar populacije povećava izgled populacije za obranu od patogena i parazita, a time i izgled za dugoročno preživljavanje. Čagalj (*Canis aureus*) pripada porodici Canidae (psi), podred Caniformia, redu Carnivora (mesojedi). Do sada nema objavljenih istraživanja raznolikosti MHC gena ove vrste. Cilj ovog diplomskog rada je odrediti razinu raznolikosti DQA, DQB i DRB gena skupine II MHC sustava u čagljeva iz Izraela. Iz 30 uzoraka uške čaglja, postupcima izolacije DNA, PCR metodom, elektroforezom, sekvenciranjem i molekularnim kloniranjem, pronađena su tri alela na DQA lokusu, pet alela na DQB lokusu i četiri alela na DRB lokusu. Našli smo jedan novi jedinstveni alel na DRB lokusu (DRB1\*04802var). Ostali pronađeni aleli poznati su iz prethodnih istraživanja na ostalim vrstama porodice pasa, što potvrđuje postojanje trans-specijskog polimorfizma. DQB i DRB lokusi pokazuju veliku raznolikost alela i velike evolucijske udaljenosti te visok omjer nesinonimnih supstitucija naspram sinonimnih, što potvrđuje pretpostavku djelovanja pozitivne selekcije na te lokuse.

(45 stranica, 6 slika, 12 tablica, 41 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

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

Voditelj: doc. dr. sc. Ana Galov

Neposredni voditelj: dr. sc. Haidi Arbanasić

Ocjenitelji: Dr.sc. Ana Galov, doc.

Dr.sc. Petar Kružić, doc.

Dr.sc. Antun Alegro, izv. prof.

Rad je prihvaćen: 15. rujna 2015.

---

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### VARIABILITY OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II GENES IN THE GOLDEN JACKALS (*Canis aureus*) FROM ISRAEL

Mario Mešin

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The genes of major histocompatibility (MHC) system are a key component of the immune system in mammals and are important molecular markers of adaptive genetic diversity in wild animal populations. Greater diversity of MHC genes within the population increases the chances of defence against pathogens and parasites, and thus the prospects for long-term survival. Golden jackal (*Canis aureus*) belongs to the family Canidae (dogs), suborder Caniformia, order Carnivora (carnivores). So far there are no published studies of MHC gene diversity on this species. The aim of this graduate thesis is to determine the level of diversity of the MHC system class II DQA, DQB and DRB genes in golden jackals from Israel. Three alleles at DQA locus, five alleles at DQB locus and four alleles at the DRB locus were found in 30 samples of jackal's ear. Methods used were DNA isolation, PCR method, electrophoresis, sequencing and molecular cloning. We found one new unique allele on DRB locus (DRB1\*04802var). The rest of the alleles found are known from previous research on the other species of the dog family, which confirms the existence of a trans-species polymorphism. DQB and DRB loci show great diversity of alleles, large evolutionary distances, high ratio of non-synonymous versus synonymous substitutions, confirming the assumption that loci are influenced by positive selection.

(45 pages, 6 figures, 12 tables, 41 references, the original language: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: MHC, *Canis aureus*, DQA, DQB, DRB

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

Assistant supervisor: Dr. sc. Haidi Arbanasić

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

Dr.sc. Petar Kružić, Asst. Prof.

Dr.sc. Antun Alegro, Assoc. Prof.

Thesis accepted : 15<sup>th</sup> September 2015.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Čagalj ( <i>Canis aureus</i> ).....	1
1.1.1. Čagalj u Izraelu.....	3
1.2. Glavni sustav tkivne podudarnosti.....	5
1.3. Dosadašnja istraživanja MHC sustava porodice Canidae.....	8
1.4. Cilj istraživanja.....	10
<b>2. MATERIJAL I METODE</b> .....	11
2.1. Uzorci.....	11
2.2. Izolacija DNA.....	11
2.3. Lančana reakcija polimerazom.....	12
2.4. Elektroforeza.....	14
2.5. Sekvenciranje.....	16
2.6. Molekularno kloniranje.....	16
2.7. Računalna obrada podataka.....	21
2.7.1. BioEdit.....	21
2.7.2. SeqScape.....	21
2.7.3. MEGA.....	22
<b>3. REZULTATI</b> .....	23
3.1. Aleli čaglja.....	23
3.1.1. DQA lokus.....	23
3.1.2. DQB lokus.....	25
3.1.3. DRB lokus.....	28
3.1.4. Haplotipovi.....	30
3.2. Evolucijska udaljenost.....	34
3.3. Selekcija.....	35
<b>4. RASPRAVA</b> .....	36
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	40
<b>6. LITERATURA</b> .....	41
<b>7. ŽIVOTOPIS</b> .....	45

## POPIS KRATICA

cm	- centimetar
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)
Hsp	- protein toplinskog šoka (eng. heat shock proteins)
IPTG	- izopropil $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
IUCN	- međunarodni savez za očuvanje prirode (eng. International Union for Conservation of Nature)
kb	- kilobaza
kg	- kilogram
L	- litra
LB	- hranjivi medij za rast bakterija (eng. lysogeny broth)
M	- molarna
mA	- miliamper
mg	- milligram
MHC	- glavni sustav tkivne podudarnosti (eng. major histocompatibility complex)
ml	- mililitar
mM	- milimolarna
ng	- nanogram
pb	- parovi baza (kod DNA molekule)
PCR	- lančana reakcija polimerazom (eng. polymerase chain reaction)
pH	- mjera kiselosti/lužnatosti ( $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ )
rpm	- okretaja po minuti (eng. rotations per minute)
TNF	- tumorski faktor nekroze (eng. tumor necrosis factor)
UV	- ultraljubičasta (eng. ultraviolet)
V	- volt
$\mu\text{l}$	- mikrolitar



## 1. UVOD

### 1.1. Čagalj

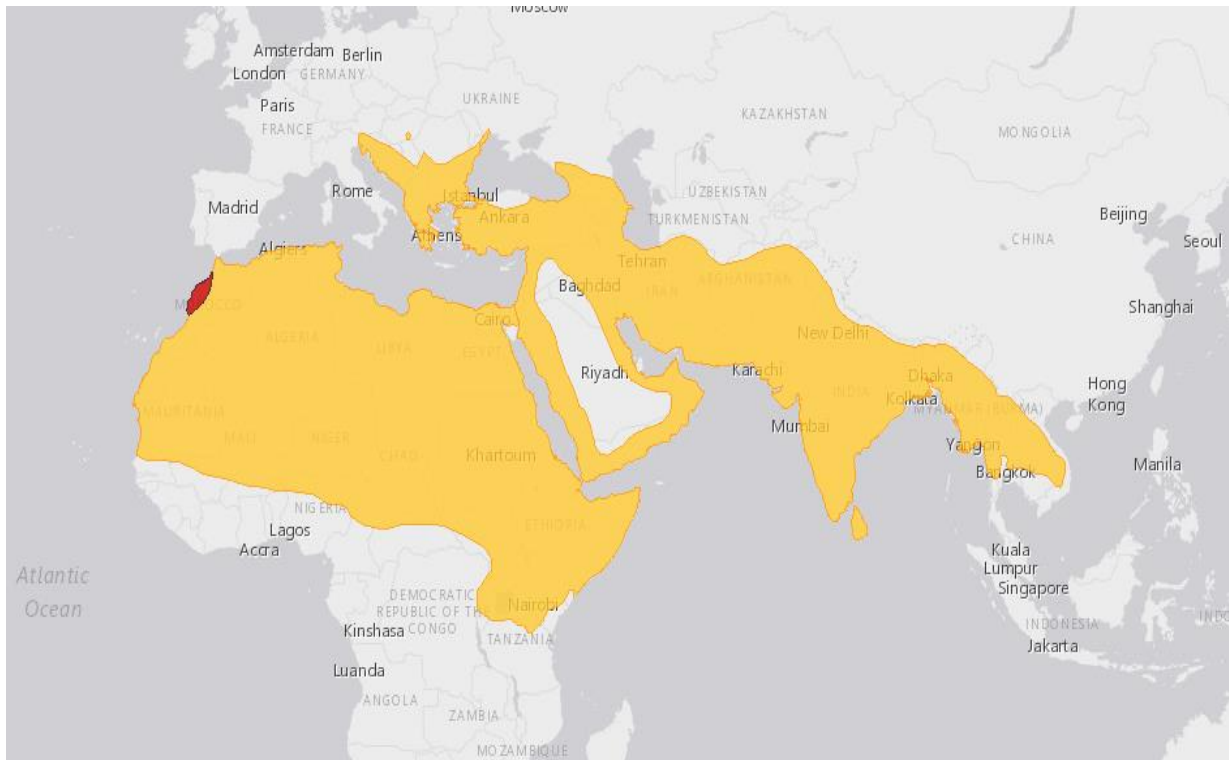
Čagalj (*Canis aureus*) pripada porodici Canidae (psi), podred Caniformia, redu Carnivora (mesojedi). Visoko je prilagodljiva vrsta i oportunist. Stanište mu se proteže od Afrike do južne Europe, Bliskog istoka i Azije (Moehlman 1983, Sillero-Zubiri i sur. 2004) (Slika 2). Jedna je od najmanje istraženih vrsta iz porodice pasa u Europi (Arnold i sur. 2012). Zlatni čagalj (*Canis aureus*), ili samo čagalj, najsjevernija je i najčešća od 3 vrste čaglja (*C. adustus*, *C. mesomelas*, *C. aureus*). Spada u mesojede srednje veličine. Životinje u jugoistočnoj Europi i maloj Aziji pripadaju podvrsti *C.a. moreoticus*, koja je jedna od najvećih podvrsta čaglja na svijetu s tijelom od 120-125 cm i kilažom od 10-13 kg kod oba spola. Jedino je sjevernoafrička podvrsta *C.a. lupaster* malo veća, ali podataka za tu regiju je malo (Ferguson 1981). Boja krzna varira, od crvene, do zlatno smeđe i srebrnkaste. Postoje individualne varijacije u boji krzna i raspodjeli pruga, posebno na glavi i vratu (Slika 1).



Slika 1. Čagalj ( preuzeto iz Giannatos G. 2004)

Rasprostranjenost čaglja u Europi dinamična je kroz prošlost i uključuje promjene u gustoći, brojnosti i distribuciji (Kryštufek i sur. 1997). Populacija čagljeva prolazi kroz tri razdoblja: razdoblje dramatičnih padova brojnosti (do 1960.), oporavak (1960. i 1970.) i

ekspanziju (od rane 1980. do danas). Uzrok brze ekspanzije čaglja (1980. do danas) su rapidne sječe prirodnih šuma i sadnja razbacanih crnogoričnih šuma, koje su guste i nepregledne, a pogodne kao sklonište ovoj vrsti. Također, smanjenje populacije vuka (*Canis lupus*) omogućuje čaglju zauzimanje i širenje na područja u kojima je vuk prirodno obitavao. Ujedno, izobilje hrane s farmi u obliku animalnog otpada pruža ovim oportunistima dobre uvjete za život kao i prestanak upotrebe otrovnih mamaca koji su se koristili u redukciji broja čagljeva (Spassov 1989, Genov i Vassilev 1991).



Slika 2. Geografska rasprostranjenost čaglja (preuzeto s IUCN 2014)

Čagalj se pojavljuje u sjevernoj i istočnoj Africi, jugoistočnoj Europi, Srednjem Istoku i južnoj Aziji sve do Burme i Tajlanda (Slika 2). U Europi je rasprostranjen u male i raspršene populacije, najčešće uz obale Sredozemnog i Crnog mora te Balkanskog poluotoka (Demeter i Spassov 1993, Krystufek i sur. 1997). Na tim područjima čagalj je gotovo istrijebljen tijekom šezdesetih godina prošloga stoljeća zbog smanjivanja staništa i korištenja otrovnih mamaca, jer je smatran štetočinom i prijenosnikom bjesnoće (Spassov 1989). Unatoč širokoj rasprostranjenosti, malo je kvantitativnih podataka o gustoći i distribuciji čagljeva (Sillero-Zubiri i sur. 2004). Procjene brojnosti i distribucije ove vrste nisu provedene. Izvješća često potječu iz lokalnih lovačkih časopisa, koja su većinom anegdota i nepotvrđena od strane

znanstvene zajednice (Kryštufek i sur. 1997). U takvim izvješćima, teško je razlikovati zalutale životinje i stvarne uspostavljene populacije na nekom području (Zachos i sur. 2009).

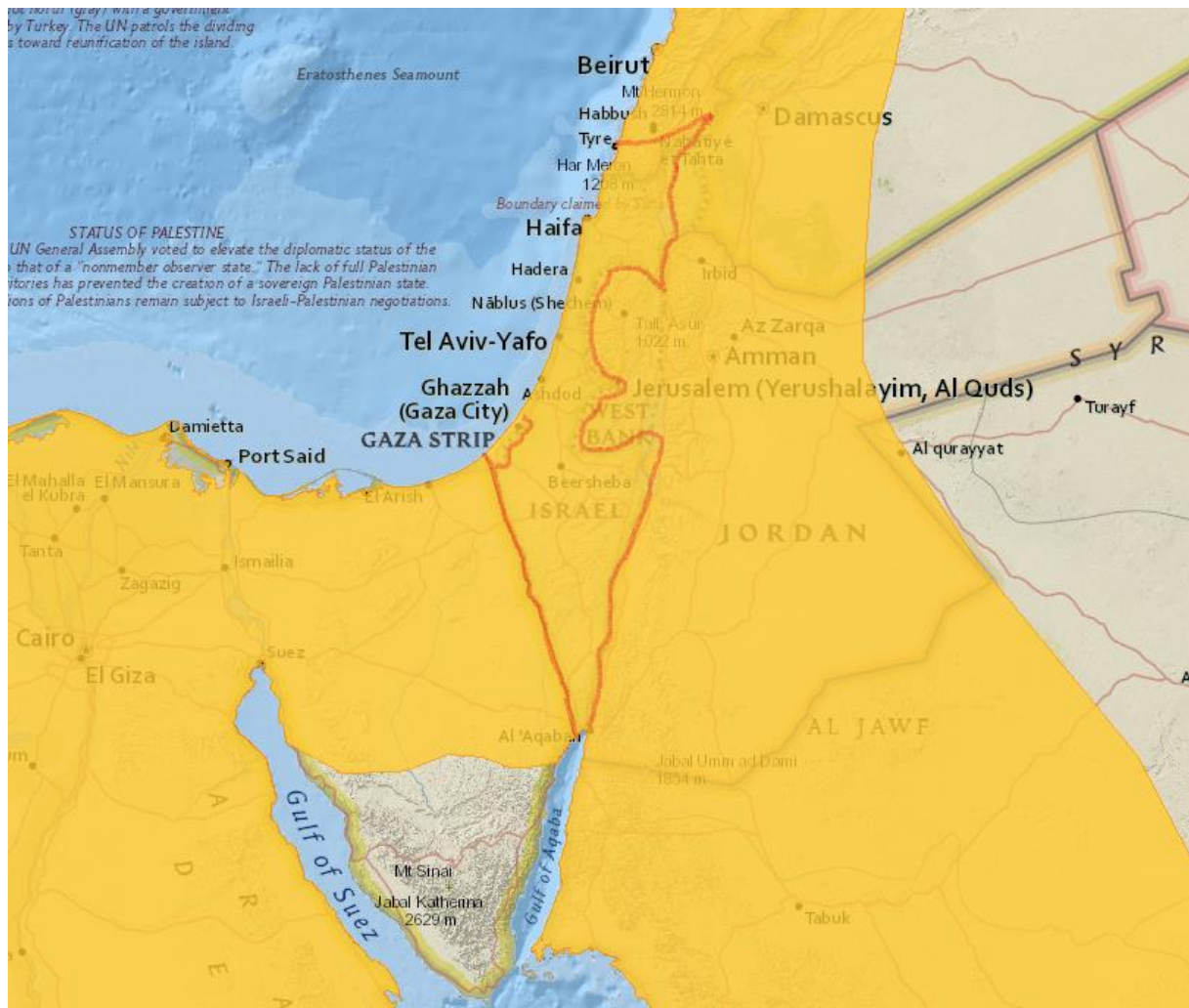
### 1.1.1. Čagalj u Izraelu

Pad biološke raznolikosti u Izraelu prije svega je posljedica ubrzanog razvoja, rasta broja stanovništva i uništavanja staništa, što sve doprinosi najvećem problemu u očuvanju ove vrste - fragmentiranje staništa (Gabbay 1997). Štoviše, brojne populacije divljih životinja žive izvan zaštićenih područja i onemogućeno im je prirodno kretanje preprekama kao što su ceste, naselja i umjetne barijere. Sukobi između ljudi i životinja nastaju zbog smanjenja staništa i završavaju trovanjima, žrtvama prometa i drugim čimbenicima koji predstavljaju dodatne prijetnje mnogim vrstama, uključujući divlje pse i čagljeve (Yom-Tov i Mendelsohn 1988).

U prošlosti se upravljanje divljim psima u Izraelu provodilo kroz uporabu otrova (Mendelsohn 1972). 1964. godine pokrenut je veliki program istrebljenja čaglja uporabom otrova, pod pokroviteljstvom Odjela za zaštitu bilja Ministarstva poljoprivrede, smatrajući ga glavnim rezervoarom bjesnoće. To je rezultiralo gotovo potpunim istrebljenjem čaglja u Izraelu. Velika redukcija veličine populacije se naziva još i prolazak kroz "usko grlo" (eng. bottleneck), što može rezultirati niskim razinama genetičke varijabilnosti (Leberg 1992). U velikim populacijama, frekvencija većine alela stabilna je kroz duži vremenski period (England i sur. 2003). Male, izolirane i fragmentirane populacije gube genetičku raznolikost tijekom vremena zbog genetičkog drifta i parenja životinja u bliskom srodstvu (Chevolot i sur. 2008).

The Israel Nature and Parks Authority donosi i provodi zakon koji štiti divlje vrste i tako brojnost čagljeva u Izraelu raste do prvotnih razina. Ipak, na poljoprivrednim površinama, čagljevi se smatraju štetočinama jer uništavaju opremu za navodnjavanje i ubijaju domaće životinje (Nemtzov i King 2002). To je, zajedno s ograničenim životnim prostorom, kao posljedicom rasta ljudske populacije, dovelo do sukoba čagljeva i ljudi. Danas, čagalj u Izraelu obitava u velikoj brojnosti i još je zaštićen zakonom o očuvanju divljih vrsta. Njihova sposobnost prilagodbe antropogenim promjenama omogućila im je proširenje na južne dijelove Izraela, iako nikada prethodno nisu obitavali u pustinjskom okolišu

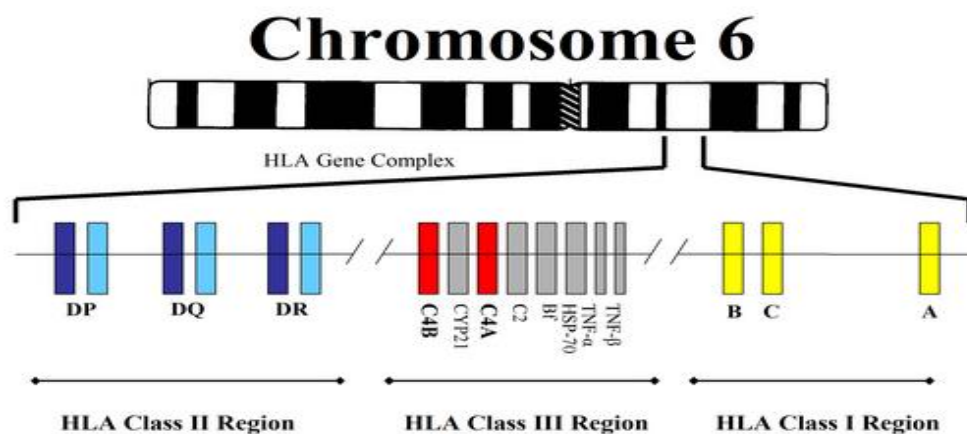
(Nemtzov i King 2002)(Slika 3). Raspršivanje neke vrste djeluje kao važno sredstvo za povećanje genetičke varijabilnosti među divljim populacijama životinja (Frankham i sur. 2002).



Slika 3. Geografska rasprostranjenost čaglja u Izraelu i okolnim državama (preuzeto s IUCN 2014)

### 1.3. Glavni sustav tkivne podudarnosti

Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC) je skup površinskih molekula čija je funkcija vezanje peptidnih fragmenata patogena i prikazivanje istih na površini stanice kako bi ih T stanice prepoznale. Time imaju središnju ulogu u razvoju humoralnog i odgovora posredovanog stanicama, određivanju histokompatibilnosti donora za presađivanje organa i podložnost jedinke autoimunim bolestima. Geni koji kodiraju MHC determinante locirani su na kratkoj ruci kromosoma 6 i izuzetno su polimorfni (Slika 4) (Kelley i sur. 2005). Zapanjujući primjer raznolikosti MHC sustava je čovjek, kod kojeg je do danas pronađeno gotovo tisuću jedinstvenih alela u skupinama HLA I i HLA II (Robinson i sur. 2011).

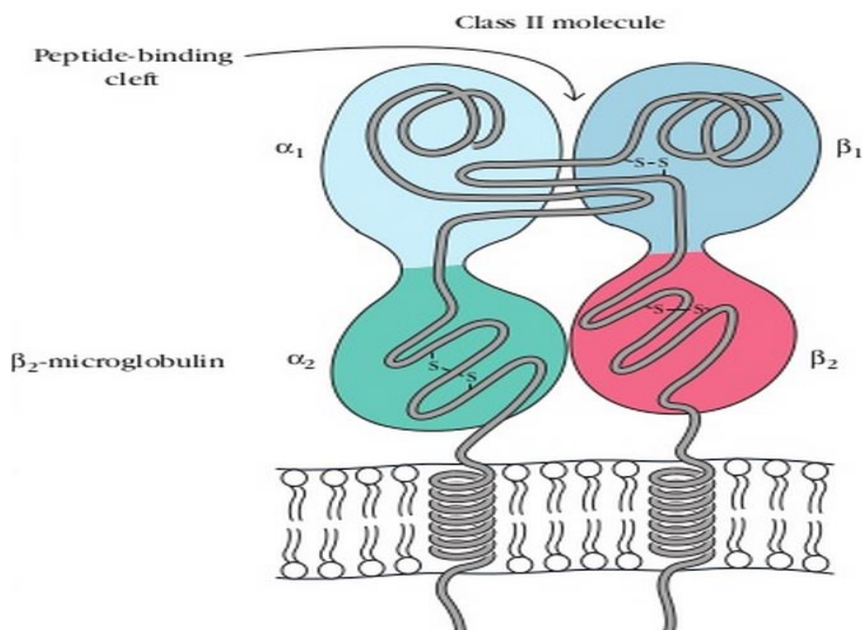


Slika 4. Genska mapa HLA regije (preuzeto iz Sweeten i Bray-Ward 2011)

MHC geni organizirani su u regije koje kodiraju tri skupine molekula. Skupine I MHC gena kodiraju glikoproteine koji se nalaze na površini gotovo svih stanica s jezgrom. Njihova glavna uloga je prikazivanje peptidnog antigena citotoksičnim T limfocitima (Tc stanice). Skupine II MHC gena kodiraju glikoproteine prisutne na stanicama koje prikazuju antigen (makrofagi, dendritičke stanice i B stanice), gdje obrađene peptide antigena prikazuju pomoćničkim T limfocitima (Th stanice). Skupine III MHC gena generalno kodiraju različite proteine koji imaju imunološku funkciju, uključujući proteine komplekta (C2, C4), tumorski faktor nekroze (TNF) i proteine toplinskog šoka (Hsp70) (Kuby 2000). Raznolikost

MHC-a bitna je za preživljavanje vrste jer omogućava prepoznavanje, a time i obranu od širokog spektra patogena. Ta raznolikost nastala je pod utjecajem selekcije, pa MHC geni služe kao biljezi za proučavanje adaptivne evolucije populacija i vrsta (Sommer 2005).

Kod ljudi postoje tri gena II skupine glavnog sustava tkivne podudarnosti; DP, DQ i DR te dva pomoćna gena; DM i DO, koji kodiraju za molekule koje pomažu pri spajanju MHC II molekule i antigenskog peptida. Prvi su heterodimeri koji se nalaze na površini stanica i prikazuju peptide antigena, a potonji su citoplazmatski oligomeri koji su uključeni u transport i vezanje peptida antigena. Skupine II MHC molekula sadrže dva različita polipeptidna lanca, 33-kDa  $\alpha$  lanac i 28-kDa  $\beta$  lanac, koji su povezani nekovalentnim vezama. Molekule se sastoje od vanjske domene, transmembranskog segmenta i citoplazmatskog sidra (Slika 5) (Kuby 2000). HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR i HLA-DM sastoje se od  $\alpha$  i  $\beta$  lanaca, a HLA-DO tvori heterotetramer koji se sastoji od dva  $\alpha$  i dva  $\beta$  lanca (Slika 5). Klasične MHC II determinante sastavljaju se u ER u kompleks s nepromijenjenim lancem (Ii), koji ih stabilizira i sprječava prerano vezanje peptida antigena (Kelley i sur. 2005). Skupine II MHC gena organizirane su u seriju egzona i introna koje zrcale strukturu domene  $\alpha$  i  $\beta$  lanaca. Oba gena,  $\alpha$  i  $\beta$ , koji kodiraju skupine II MHC molekula, imaju vodeći egzon,  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  egzon, transmembranski egzon te jedan ili više citoplazmatskih egzona (Kuby 2000).



Slika 5. Struktura skupine II MHC gena (preuzeto iz Kuby 2000)



Budući da prikazuju antigene CD4+ T stanicama, MHC II molekule izravno su uključene u regulaciju odgovora imunološkog sustava. Stoga ne iznenađuje da je za uravnoteženu funkciju imunološkog sustava potrebna precizna kontrola MHC II ekspresije gena, koja se održava na razini transkripcije (Kelley i sur. 2005).

#### 1.4. Dosadašnja istraživanja MHC sustava porodice Canidae

U centru pažnje dosadašnjih MHC istraživanja porodice pasa pretežito su bili vuk (*Canis lupus*) i pas (*Canis familiaris*). Koliko je meni poznato, nikakva istraživanja o raznolikosti MHC gena na čagljevima (*Canis aureus*) do danas nisu objavljena.

Arbanasić i sur. (2012) koristeći metodu kloniranja i sekvenciranja, istražuju genetičku raznolikost i evolucijski razvoj egzona 2 skupine II MHC DLA-DRB1, DQA1 i DQB1 gena u 77 jedinki hrvatskog vuka (*Canis lupus*). U radu identificiraju 13 DRB1, 7 DQA1 i 11 DQB1 izrazito različita alela, i 13 DLA-DRB1/DQA1/DQB1 haplotipa. Zaključuju da su DRB1 i DQB1 aleli pod većim selekcijskim pritiskom, dok DQA1 pokazuje znakove umjerene selekcije.

Seddon i Ellegren (2002) objavljuju rad u kojem istražuju utjecaj drifta i selekcije na MHC raznolikost europskog vuka (*Canis lupus*). Pronalaze 9 DQA, 10 DQB i 17 DRB1 sekvenci egzona 2 i uspoređuju rezultate sa sekvencama sjevernoameričkih vukova i pasa. Relativno velik broj skupine II alela eksprimirani su i kod europskih i sjevernoameričkih vukova, što ukazuje na povijesno veliku populaciju.

Seddon i Ellegreen (2004) istražuju razinu raznolikosti na tri lokusa MHC klase II skandinavske populacije vukova, koja je prirodno rekolonizirana genetičkim doprinosom četiri susjedne populacije vukova. U skandinavskoj populaciji vukova, dva alela su pronađena za svaki lokus i distribucija alela je kompatibilna s njihovom povezanosti u dva haplotipa. Promjene u razini heterozigotnosti tijekom vremena, pod utjecajem rekolonizacije, pokazuju efekt novih alela dolaskom imigrantskih vukova. 15 DRB1, sedam DQA i 10 DQB1 alela determinirani su kod četiri susjedne vučje populacije, sa znatnim udjelom u svim populacijama.

Lightner K. J. (2009) donosi izvještaj o kariotipskoj i alelnoj raznolikosti između 10 vrsta koje pripadaju porodici pasa. Donosi da je od 2006. tipizirano 90 alela za DLA-DRB1, 22 za DLA-DQA1 i 54 za DLA-DQB1. Zbog visoke razine polimorfizma, koji su znak zdrave populacije, predviđa otkrivanje još više alela.



Kennedy L. J. (2007) koristi metodu sekvenciranja kako bi karakterizirala DLA alele klase II 175 uzoraka vuka. Ujedno koristi podatke 1856 uzoraka pasa, pokrivajući 85 različitih pasmina europskog podrijetla. U radu identificira 28 novih haplotipa, od kojih su 2 haplotipi na tri lokusa i mnogi su DLA-DQA1/DQB1 haplotipi koji su identificirani i kod pasa. Tri DLA-DRB1, osam DLA-DQA1 i šest DLA-DQB1 alela prepoznatih kod pasa identificirani su i kod vukova. Prema podacima istraživanja zaključuje da su preci europskih i azijskih vukova imali drugačiju gensku zalihu koja se izravno očituje u DLA alelima prisutnim u pasminama pasa.

Kennedy L. J. i sur. (2011) identificiraju četiri DLA-DRB1, dva DLA-DQA1 i pet DQB1 alela kod ugroženog etiopskog vuka (*Canis simensis*). Jedna je od najrijeđih vrsta pasa, s manje od 500 jedinki. Bjesnoća je uzrok izumiranja populacije. Rad se bavi uspoređivanjem frekvencije haplotipova 18 jedinki i njihovog titra antitijela poslje cijepljenja, koji pokazuje da je samo jedan haplotip povezan sa smanjenim odgovorom na cjepivo. Znanstvenici zaključuju da etiopski vukovi imaju dovoljnu MHC varijabilnost kako bi osigurali opstanak vrste.

Galaverni M. i sur. (2013) proučavaju varijabilnost tri gena MHC klase II (DRB1, DQA1, DQB1) iz 94 uzorka talijanskog vuka. Unatoč efektu "uskog grla" (eng. bottleneck), izolaciji i redukciji populacije na manje od 100 jedinki, talijanski vuk pokazuje izuzetnu MHC varijabilnost od 6 do 9 alela po lokusu, uključujući dva nedavno opisana alela na DRB1 lokusu. MHC sekvence pokazuju znakove selekcijskog pritiska u prošlosti, ali bez dokaza o trenutnoj selekciji.

## 1.5. Cilj istraživanja

Osnovni cilj ovog diplomskog istraživanja je utvrditi razinu raznolikosti DQA, DQB i DRB gena skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u uzorku od 30 jedinki čaglja (*Canis aureus*) iz Izraela. Sekundarni cilj je dokazati djelovanje i prisutnosti prirodne selekcije na analizirane MHC lokuse.

Budući da je ovo prvo ovakvo istraživanje provedeno na čagljevima, opći cilj je proširivanje znanja o MHC raznolikosti unutar divljih vrsta iz porodice pasa (Canidae) i adaptivnoj evoluciji čagljeva na području Izraela.

## 2. MATERIJAL I METODE

### 2.1. Uzorci

Za izradu ovog diplomskog rada koristio sam 30 uzoraka čagljeva dobivenih od dr. sc. Kahila Bar-Gal iz Koret School of Veterinary Medicine u Izraelu. Uzorci su bili vrhovi uške čaglja (*Canis aureus*) s krznom. Uzorcima smo prije izolacije DNA skalpelom odstranili dlake.

### 2.2. Izolacija DNA

DNA iz uzoraka izolirali smo pomoću komercijalnog paketa Wizard Genomic DNA Purification Kit-a od Promega, prema protokolu proizvođača. Prvi korak u izolaciji DNA je da u svaku 1,5 ml epruvetu, prethodno označenu oznakom uzorka, odpipetiramo 60 µl 0.5 M EDTA otopine pH 8.0 i 250 µl Nuclei Lysis Solution. Komadić uzorka veličine otprilike zrna riže koji je prethodno očišćen od krzna i usitnjen skalpelom, stavljamo u ohlađenu otopinu. Potom epruvetu vorteksiramo i centrifugiramo 10 sekundi. Nakon centrifugiranja, u epruvetu dodajemo 9 µl proteinaze K (20mg/ml) i snažno vorteksiramo jednu minutu. Epruvetu inkubiramo na 55 °C preko noći uz povremeno miješanje. Sutradan, nakon što su se uzorci ohladili na sobnu temperaturu, centrifugiramo 10 sekundi i dodajemo 100 µl Protein Precipitation Solution. Potom snažno vorteksiramo 20 sekundi i uzorke stavljamo na +4 °C na 5 minuta. Nakon hlađenja uzorke centrifugiramo 4 minute na 14.000 rpm. Bijeli talog su proteini koji su se nataložili, a DNA je u supernatantu. Uzimamo novi set 1,5 ml epruvetice u koje pipetiramo 300 µl 100% etanola te dodajemo supernatant iz prethodnog koraka. Pažljivo miješamo sadržaj okretanjem epruvetice. Sadržaj potom centrifugiramo 1 minutu na 14.000 rpm i dekantiramo supernatant u otpad, dok DNA ostaje u talogu. Dodajemo 300 µl 70% etanola te epruvete pažljivo miješamo okretanjem. Centrifugiramo ponovno 1 minutu na 14.000 rpm i odstranjujemo supernatant pipetiranjem. Tubice potom otvaramo, preokrećemo

na čisti filter papir i sušimo na sobnoj temperaturi 15 minuta. Posljednji koraci su dodavanje 100  $\mu$ l DNA Rehydration Solution, inkubiranje uzoraka na +4  $^{\circ}$ C preko noći i pohranjivanje na istoj temperaturi u hladnjaku. Time je naša izolacija ukupne DNA iz uške čaglja dovršena.

### 2.3. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom ili PCR (eng. polymerase chain reaction) metoda je korištena pri izradi ovog diplomskog rada kako bi umnožili odsječke genomske DNA molekule čaglja koji sadrže egzon II DQA, DQB i DRB lokusa MHC sustava. Prije samog PCR-a uzorci su razrijeđivani 10x (9  $\mu$ l DNA Rehydration Solution i 1  $\mu$ l DNA) i 100x (99  $\mu$ l DNA Rehydration Solution i 1  $\mu$ l DNA). Za PCR su korištene specifične početnice iz literature koje su razvijene za istraživanje MHC lokusa u pasa i vukova. Za PCR koristimo i 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 dodajemo u volumenu od 1/10 volumena konačne otopine za PCR. Dodajemo ju samo kod malih volumena (8  $\mu$ l i 10  $\mu$ l), budući da kod velikih volumena koje radimo za sekvenciranje (40  $\mu$ l), boja smeta pri obradi (purifikaciji i sekvenciranju uzoraka). Za provjeru uspješnosti PCR amplifikacije i ugradnje inserta u plazmid nakon molekularnog kloniranja (poglavlje 2.6.) rađen je PCR u ukupnom volumenu od 8 ili 10  $\mu$ l. Nakon prvotne provjere, za umnažanje svakog lokusa određene jedinice u svrhu sekvenciranja rađen je PCR u ukupnom volumenu od 40  $\mu$ l. Kod umnažanja za svrhe molekularnog kloniranja rađen je PCR u ukupnom volumenu od 20  $\mu$ l. Pola volumena kod svih PCR reakcija zauzima je *master mix*, a uzorci (otopina DNA) su zauzimali od 1  $\mu$ l (mali volumeni) do 4  $\mu$ l (veliki volumen). Početnice su dodavane u volumenu da im konačna koncentracija u otopini za PCR bude 0,2  $\mu$ M, a preostali dio volumena reakcijske otopine zauzimala je voda bez RNAze. Koristili smo jedan set starih početnica iz rada doc. Arbanasić na vukovima (Arbanasić i sur. 2012). Također smo dizajnirali po dvije početnice za svaki lokus (predznak GJ) i DQBR3. Za izradu novih početnica koristili smo stranicu Ensembl Genome Browser-a (<http://www.ensembl.org/index.html>) i na temelju intronskih sekvenci

psećeg genoma konstruirali intronske početnice koje umnažaju egzonske regije koje sekvenciramo.

Početnice za umnažanje egzona II lokusa DLA-DQA1:

1. par početnica (Wagner i sur. 1996):

DQAIn1: TAAGGTTCTTTTCTCCCTCT

DQAIn2: GGACAGATTCAGTGAAGAGA

2. par početnica (ovaj rad):

GJDQAF1: GCCTAAAGACTGTGCCAAGGA

GJDQAR1: AGTTTTCAGATGGGGGAGGA

3. par početnica (ovaj rad):

GJDQAF2: TGCCCACAGTTTGTCTGTC

GJDQAR2: TCAAGGAACATGGTATGGGAGT

Početnice za umnažanje egzona II lokusa DLA-DQB1:

1. par početnica (Wagner i sur. 1996):

DQB1BT7: CTCACTGGCCCGGCTGTCTC

DQBR3: ACCTGGGTGGGGAGCCCG

2. par početnica (ovaj rad):

GJDQBF1: CCTTCCCTGGATGAAGGCAG

GJDQBR1: CTGCTGAGAAGGCAGAGGG

3. par početnica (ovaj rad):

GJDQBF2: GAGGCCTTCAGGTTTCTCGG

GJDQBR2: GGGCATGAGCCTCGGAAG

Početnice za umnažanje egzona II lokusa DLA-DRB1:

1. par početnica (Kennedy i sur. 2005, Wagner i sur. 1996):

DRBF: GATCCCCCGTCCCCACAG

DRB1R: TGTGTCACACACCTCAGCACCA

2. par početnica (ovaj rad):

GJDRBF1: CCAGCGGAGGAAACACGAAT

GJDRBR1: ACACTCCTGAAATCGGGCTCT

3. par početnica (ovaj rad):

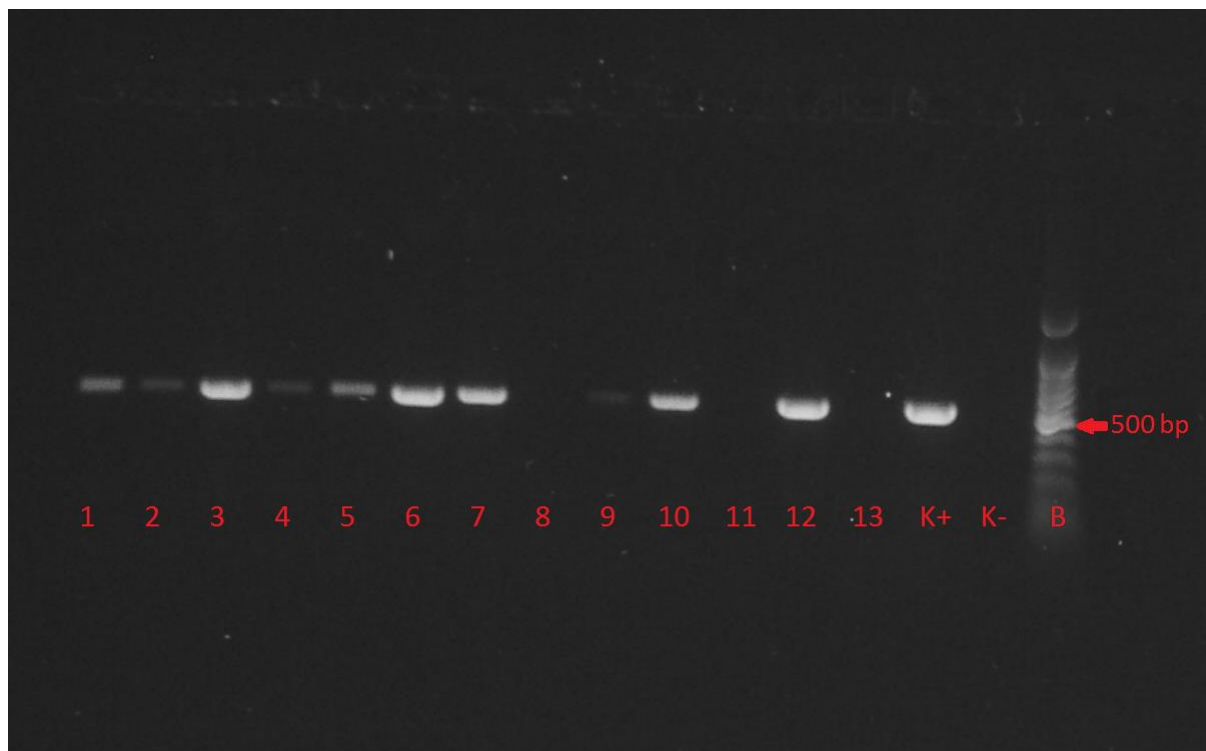
GJDRBF2: GAGGAAACACGAACCGTGGGT

GJDRBR2: TCCTCACTTGTACCGGCTCG

Početnice su bile u koncentraciji od 5  $\mu$ M kao radne otopine.

## 2.4. Elektroforeza

Za dokazivanje uspješnosti PCR reakcije i prisutnosti DNA molekula u otopinama malog (8 i 10  $\mu$ l) i velikog volumena (40  $\mu$ l) radimo elektroforezu na 1% agaroznom gelu. Kako bi odsječci DNA bili vidljivi, nakon otapanja agaroze, a prije izlijevanja u kalup, u gel stavljamo SYBR® Safe (Invitrogen) boju u omjeru 1  $\mu$ l boje na 10 ml gela. Kada se gel ohladi, uzorak DNA miješamo s puferom za nanošenje uzoraka u gelu u omjeru 1:1 i dodajemo u jažice. Naposljetku, elektroforeza se odvija pri stalnom naponu od 90 do 100 V, 400 mA u trajanju od 20 do 30 minuta. Nakon završetka elektroforeze gel stavljamo pod UV lampu, promatramo rezultate i bilježimo ih u laboratorijski dnevnik.



Slika 6. Izgled agaroznog gela nakon elektroforeze pod UV osvjetljenjem. Vrpce predstavljaju umnožene odsječke DQA lokusa duljine oko 500 pb za sljedeće uzorke: 13 uzoraka (Ca580, Ca591, Ca653, Ca705, Ca732, Ca733, Ca743, Ca748, Ca755, Ca756, Ca776, Ca779 i Ca781) redom u jažicama od broja 1 do 13, pozitivna kontrola (K+, uzorak Ca578), negativna kontrola (K-) i DNA ljestve (B). Uzorci u jažicama 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 i 12 uspješno su se amplificirali PCR metodom. Za uzorke u jažicama 8, 11 i 13 PCR amplifikacija nije uspjela.

## 2.5. Sekvenciranje

DNA uzorci svih jedinki sekvencirani su nakon uspješnog PCR-a i elektroforeze (egzoni 2 DLA-DQA1, DLA-DQB1, DLA-DRB1). Plazmidi su sekvencirani nakon uspješnog molekularnog kloniranja (poglavlje 2.6). Za izradu ovog diplomskog rada korišten je MacroGen-ov servis za uslugu sekvenciranja ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)), kojem se sjedište za Europu nalazi u Amsterdamu u Nizozemskoj. Svi su uzorci prvotno popisani i imenovani, te naručeni uslugom "Standard sequencing single Regular". Za sekvenciranje korištene su one iste specifične početnice kao i kod PCR-a (poglavlje 2.3.). Koristili smo i dodatne usluge pročišćavanja ili purifikacije DNA uzoraka te sinteze i pohrane na 3 mjeseca specifičnih početnica za svaki lokus. Uzorke smo većinom sekvencirali iz samo jednog smjera, a ako bi sekvenca bila neuredna ili za potpuniju sliku sekvence, dodatno bi sekvencirali iz drugog smjera.

## 2.6. Molekularno kloniranje

Pri izradi ovog diplomskog rada koristili smo metodu molekularnog kloniranja. Svrha ove metode je razdvajanje gametnih faza alela heterozigotnih jedinki za koje pretpostavljamo da imaju nove, do tada nepoznate alele, odnosno onih jedinki čije gametne faze ne možemo razdvojiti pomoću SeqScape programa i knjižnice poznatih alela. Prema rezultatima sekvenciranja DQB lokusa uzorka Ca578 pretpostavili smo da bi se moglo raditi o novim alelima, te smo taj uzorak podvrgnuli molekularnom kloniranju.

Molekularno kloniranje provedeno je komercijalnim kompletom pGEM®-T Easy Vector System (Promega). Metoda se zasniva na tome da odsječak DNA (insert) koji je predmet istraživanja ugrađujemo u bakterijski plazmid (vektor ili nosač) 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 zbog specifičnog svojstva pGEM® -T plazmida, koji sadrži gen



za rezistenciju na ampicilin i laktozni operon te dolazi već pocijepan na mjestu *lacZ* gena gdje bi se insert ili DNA odsječak trebao vezati:

1. razina odabira: U hranjivi gel na krutim hranjivim podlogama dodan je antibiotik ampicilin. Plazmid koji ugrađujemo u bakterije s DNA od interesa nosi otpornost bakterija na antibiotik ampicilin. Samo će bakterije koje su u potpunosti usvojile plazmid rasti na hranjivim podlogama.

2. razina odabira: Kako bi prepoznali u kojim kolonijama plazmid sadrži odsječak DNA od interesa, vršimo takozvanu "plavo-bijelu selekciju". Na podlogu dodajemo x-gal (modificirana galaktoza), kao supstrat  $\beta$ -galaktozidaze i IPTG kao induktor laktoznog operona. Plazmid sadrži *lacZ* gen koji kodira za jednu podjedinicu enzima  $\beta$ -galaktozidaze čiji je supstrat x-gal. Aktivnim djelovanjem enzima supstrat se razgrađuje i daje plavo obojeni produkt, odnosno plavo obojene kolonije. Mjesto prekida plazmida na koje se veže insertna DNA od interesa je unutar *lacZ* gena za galaktozidazu. Kako je plazmid pocijepan na jednom mjestu, on nije cirkularan već linearan, a DNA koja je predmet istraživanja spaja dva kraja plazmida u cirkularnu molekulu. Stoga, ukoliko je plazmid zatvoren bez ugrađenog DNA odsječka i gen za galaktozidazu je funkcionalan i cjelovit, enzim će djelovati na supstrat (x-gal) i uslijed te aktivnosti kolonije će se obojiti plavo. Nasuprot tome, ugrađivanjem DNA odsječka u plazmid, gen za enzim će biti nefunkcionalan, budući da je pocijepan na mjestu gdje se ugradio DNA odsječak. Slijedom toga, i enzim će biti nefunkcionalan, neće djelovati na supstrat iz podloge i kolonije će biti bijele. Prije molekularnog kloniranja PCR produkt smo pročistili pomoću komercijalnog paketa Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Nakon PCR postupka u reakcijske tubice s PCR produktom dodan je isti volumen otopine za vezanje na membranu (Membrane Binding Solution). Sastavljamo čiste tubice za skupljanje od 2 ml u koje stavljamo kolone za pročišćavanje (SV Minicolumn). Odpipetiramo otopinu PCR produkta u kolonu za pročišćavanje i inkubiramo na sobnoj temperaturi 1 minutu. Potom centrifugiramo kolonu na 14.000 rpm 1 minutu. Nakon centrifugiranja tekućina je odlivena i kolonu ispiramo sa 700  $\mu$ l otopine za ispiranje (Membrane Wash solution) u koju je prethodno dodan etanol. Ponovno centrifugiramo na 14.000 rpm 1 minutu i bacamo tekućinu iz tubica za sakupljanje. Korak ponavljamo dodajući 500  $\mu$ l otopine za ispiranje i centrifugiramo na 14.000 rpm 5 minuta. Bacamo tekućinu i kolone centrifugiramo 1 minutu s otklopljenom centrifugom kako bi ostaci etanola isparili. Kolonu prebacujemo u novu, čistu 1.5 ml tubicu i dodajemo 20  $\mu$ l vode bez nukleaze i inkubiramo na sobnoj

temperaturi 1 minutu. Potom centrifugiramo na 14.000 rpm 1 minutu. Kolone bacamo, a u tubicama je naša pročišćena DNA. Pohranjujemo je na 4<sup>0</sup>C do sljedećeg koraka.

Prvi dan rađen je postupak ligacije, odnosno ugrađivanja željenog DNA segmenta (inserta) u plazmid. Ugradnja je omogućena time što je plazmid prekinut i na krajevima ima dodan timin, dok većina termostabilnih polimeraza koje se koriste za PCR na kraj produkta dodaje adenin. Prvo je insert (egzon 2 DQB lokusa) umnožen PCR-om. Potom elektroforezom provjeravamo uspješnost PCR-a, a zatim produkt PCR reakcije pročišćavamo (purificiramo), kako je objašnjeno u prethodnom odlomku. Da bi ligacija bila optimalna, utvrđujemo količinu PCR produkta koju dodajemo u reakcijsku smjesu. Količina ovisi o veličini odsječka, a prihvatljivi su omjeri inserta i vektora (plazmida) od 8:1 do 1:8. Elektroforezom PCR produkta zajedno s nekom DNA poznate koncentracije i njihovom usporedbom pod UV svjetlom možemo pretpostaviti koncentraciju PCR produkta. Za računanje odgovarajuće količine PCR produkta u ligacijskoj reakciji, koristimo se jednadžbom:

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

Proizvođač komercijalnog paketa za molekularno kloniranje preporučuje molarni omjer 3 : 1, pri čemu je koncentracija vektora 50ng/μl, veličina vektora 3kb, a odsječak kojeg namjeravamo klonirati dug je oko 300 parova baza (0.3kb), te iz toga slijedi:

$$\frac{50 \text{ ng vektora} \times 0.3\text{kb odsječka}}{3 \text{ kb vektora}} \times \frac{3}{1} = 15\text{ng inserta}$$

Nakon određivanja potrebnog volumena PCR proizvoda za ligacijsku reakciju, pripremamo ligacijsku smjesu. Osnovne komponente su pGEM® -T plazmid, PCR produkt, T4 DNA ligaza i pufer za brzu ligaciju (Rapid Ligation Buffer). Uz standardnu reakciju, postavljamo pozitivnu i negativnu kontrolu ligacije. U epruvetu od 0,2 mL za standardnu reakciju pipetiramo 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 pozitivnu kontrolu uzimamo novu epruvetu od 0,2 ml i umjesto PCR proizvoda dodajemo 2 µl kontrolnog inserta, a kod negativne kontrole ne dodajemo ni PCR proizvod niti kontrolni insert. Ligacijske smjese spremamo u hladnjak preko noći na 4°C.

Drugog dana rađena je transformacija bakterija ligacijskom smjesom. Bakterije koje koristimo su JM109 *Escherichia coli* i nose naziv visoko kompetentne, što podrazumjeva da su obrađene s ciljem da mogu primiti plazmid (podložne transformaciji). Bakterije obrađene u tu svrhu kupujemo, zahtjevne su po pitanju čuvanja te se zbog osjetljivosti čuvaju na -70°C i funkcionalne su nekoliko mjeseci. Pripremamo po dvije petrijeve zdjelice za 30 ml hranjive podloge za svaku ligacijsku reakciju (ukupno 6 petrijevih zdjelica). LB medij koji smo koristili za hranjivu podlogu pravimo po uputama proizvođača: po litri medija dodajemo 5 g Bacto® -yeast extract-a, 5 g NaCl, 10 g Bacto® -trypton-a, 1L vode i koliko je potrebno NaOH do pH vrijednosti od 7,0. Nakon toga dodajemo 15g agara na 1L medija i autoklaviramo prije dodavanja u petrijeve zdjelice. Nakon autoklaviranja hladimo medij na 50°C i dodajemo ampicilin do konačne koncentracije od 100µg/mL. Dodajemo 30-35 mL medija u petrijeve zdjelice i puštamo da se medij skrutne. Na medij dodajemo 100 µl 100mM IPTG-a i 20µl 50mg/mL X-Gal-a i razmazujemo po površini LB krutog medija. Ostavljamo 30 minuta na 37°C kako bi se IPTG i x-gal apsorbirao u medij. Nakratko centrifugiramo ligacijske tubice od prethodnog dana. Pipetiramo 2µl svake ligacijske reakcije u nove sterilne 1.5 ml epruvete koje su na ledu. Potom vadimo zamrznute JM109 E.coli bakterije i stavljamo ih na ledenu kupelj na 5 minuta kako bi se odmrznule. Pažljivo miješamo bakterije nakon odmrzavanja i dodajemo po 50µl stanica u svaku tubicu sa 2µl ligacijske reakcije. Pažljivo miješamo sve reakcije i ostavljamo na ledu 20 minuta, a potom 45 sekundi u vodenu kupelj na 42°C, zatim ponovno na led 2 minute. Taj temperaturni šok izaziva primanje plazmida u bakterije. U tubice zatim dodajemo 950 µl tekućeg LB medija, pa potom inkubiramo 1.5 sati na 37°C uz stalno miješanje od 150 rpm. Tekući LB medij pripremamo isto kao prethodno opisani kruti LB medij, samo bez dodavanja 15g agra. Nakon 1.5 sati inkubacije iz svake reakcijske tubice pipetiramo 100 µl na po dvije prethodno pripremljene LB/X-Gal/ampicilin/IPTG petrijeve zdjelice, pa ih sve inkubiramo 24 sata na 37°C.

Sljedeći dan presađujemo bijele kolonije u tekući medij s ciljem dodatnog umnožavanja bakterijskih kolonija, a time i specifičnog inserta DNA kojeg istražujemo. Prethodno označavamo 10 epruveta od 15 ml za svaki uzorak, u koje pipetiramo 5 ml tekućeg LB medija. Potom s petrijevih zdjelica skupljamo bijele kolonije ezom i stavljamo jednu

koloniju po epruveti. Pri tome nastojimo ne zahvatiti više kolonija. Epruvete se inkubiraju uz trešnju od 200 rpm preko noći na 37°C.

Posljednji korak je izolacija plazmida iz bakterija i pročišćavanje. Postupak se zasniva na tome da razarimo bakterijsku stanicu kako bismo dobili plazmid izdvojen od ostatka bakterijske DNA. Drugi dio obuhvaća pročišćavanje izdvojenog plazmida i sličan je pročišćavanju PCR produkta. Postupak radimo s komercijalnim paketom Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). U prvom koraku epruvete iz prethodnog koraka koje sadrže bakterije centrifugiramo 5 minuta na 2000 rpm. Odljevamo supernatant i epruvetu sušimo na filter papiru. Potom u epruvete pipetiramo 250 µl otopine za resuspenziju stanica (Cell Resuspension Solution) i cijeli sadržaj (280 µl) pipetiramo u nove označene epruvete od 1,5ml. Dodajemo 250 µl otopine za lizu stanica (Cell Lysis Solution) u svaku epruvetu te pažljivo miješamo okretanjem tubica 4 puta. Ponavljamo prethodni korak dodavajući 10 µl otopine alkalne proteaze (Alkaline Protease Solution), okretanjem 4 puta. Nadalje, pipetiramo 350 µl otopine za neutralizaciju (Neutralization Solution) i miješamo 4 puta. Tada sve epruvete centrifugiramo 10 minuta na 14.000 rpm i pripremamo nove kolone i epruvetice od 1,5ml. Nakon centrifuge odlijevamo supernatant u kolonu i centrifugiramo 1 minutu na 14.000 rpm. Potom vadimo kolonu, izlijevamo otopinu iz epruvete i vraćamo kolonu u epruvetu. Pipetiramo u kolonu 750 µl otopine za ispiranje (Column Wash Solution), centrifugiramo 1 minutu na 14.000 rpm i ponavljamo postupak izlijevanja otopine iz epruvete. Zatim ponavljamo prethodni korak sa 250 µl otopine za ispiranje i centrifugiramo 2 minute na 14.000 rpm. Bacamo epruveticu s otopinom i uzimamo novu 1,5ml tubicu u koju stavljamo kolonu. Pipetiramo 50 µl vode bez nukleaze u kolonu i centrifugiramo 1 minutu na 14.000 rpm, nakon čega bacamo kolonu, a epruvetu s plazmidom spremamo na 4°C ako ide odmah na sekvenciranje ili -20°C ako spremamo na duže vrijeme.

Nakon toga slijedi sekvenciranje. Sekvencira se dio plazmida koji sadrži klonirani DNA odsječak. Koriste se početnice uobičajene za PCR dotičnog lokusa.

## **2.7. Računalna obrada podataka**

### **2.7.1. BioEdit**

Programski paket BioEdit (Hall 1999) sadrži opcije za obradu i manipuliranje nukleotidnim (DNA) i aminokiselinskim (proteini) slijedovima. U ovom radu BioEdit je korišten za vizualiziranje, a ClustalW za višestruko poravnavanje i usporedbu dobivenih nukleotidnih slijedova DNA.

### **2.7.2. SeqScape**

SeqScape (Applied Biosystems) je programski paket dizajniran za analizu i detekciju mutacija nukleinskih kiselina, tipizaciju i identifikaciju patogena i alela, potvrdu i analizu nukleotidnih slijedova te otkrivanje i potvrđivanje polimorfizma jedne baze (SNP). Uzorak se uspoređuje s referentnim nukleotidnim slijedom genske knjižnice tako da se pažljivo promatra elektroferogram svakog uzorka, svaki vršak i svaka baza se uspoređuje s referentnim slijedom kako bi se potvrdila valjanost sekvenciranja. Ako uzorak nema razlika, pripada ponuđenom alelu knjižnice i nije ga potrebno klonirati. Ako uzorak ima razlika u odnosu na najbliži referentni slijed ili ga nema u knjižnici, uzorak se podvrgava molekularnom kloniranju. Za osnivanje genske knjižnice u ovom diplomskom radu koristio sam alele pasa dobivene u ranijim istraživanjima (Lorna Kennedy, osobno priopćenje).

### 2.7.3. MEGA

MEGA (eng. Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura i sur. 2013) je programski paket koji omogućuje istraživanje filogenetske povijesti i provodi molekularne evolucijske analize. Ovaj program razvijen je u svrhu komparativnih analiza DNA i proteinskih sekvenci koje su usmjerene na ključne molekularne evolucijske obrasce gena, genoma i vrsta kroz vrijeme. U ovom diplomskom radu programski paket MEGA korišten je u svrhu određivanja broja varijabilnih nukleotidnih mjesta, prosječne nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti i broja jedinstvenih aminokiselinskih sekvenci DQA, DQB i DRB alela. Također određujemo nukleotidne i aminokiselinske supstitucije za svaki lokus, te broj sinonimnih i nesinonimnih nukleotidnih supstitucija za svaki lokus. Naposljetku provodimo Z-test selekcije na svakom lokusu.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Aleli čaglja

U ovom diplomskom radu izolirali smo ukupnu DNA iz 30 uzoraka uške čaglja iz Izraela. Na DQA lokusu uspjeli smo odrediti alele 20 jedinki čaglja, na DQB lokusu alele 18 jedinki te na DRB lokusu alele 8 jedinki (Tablica 10). U cjelokupnom rađenom uzorku našli smo jedan novi jedinstveni alel na DRB lokusu, pod nazivom DRB1\*04802var. Zbog lošeg stanja zaprimljenih uzoraka nismo uspjeli dobiti rezultate za sva tri lokusa za svih 30 uzoraka čak niti nakon ponovljenih PCR reakcija korištenjem promijenjenih temperaturnih profila ili novih početnica.

##### 3.1.1. DQA lokus

Istražio sam egzon 2 DQA lokusa koji je dug 246 parova baza. U uzorku sam pronašao tri DQA alela od kojih jedan pripada psećem haplotipu. Analizirao sam samo tipične alele čaglja, a pseći alel DQA1\*00101 nisam uvrstio u analize, nukleotidne i aminokiselinske ispise. Alel DQA1\*00402 utvrđen je ranije u populacijama etiopskog vuka i kod čaglja iz Hrvatske (Kennedy i sur. 2011, Galov i sur. neobjavljeno), a alel DQA1\*00101 kod više od 50 pasmina pasa, kojota, sjeverno-američkog vuka i europskog vuka (Seddon i Ellegren 2002, Arbanasić i sur 2012). Alel DQA1\*03001 je tipičan čagljevski alel (do sada nije nađen kod drugih vrsta iz porodice pasa). Prvi puta je utvrđen kod hrvatskih čagljeva (Galov i sur. neobjavljeno). Ukupan broj varijabilnih nukleotidnih mjesta je 5. Pripadajući nukleotidni i aminokiselinski sljedovi pojedinih alela prikazani su u Tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Nukleotidni ispis DQA alela čagljeva (*Canis aureus*) iz Izraela

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

Tablica 2. Aminokiselinski ispis DQA alela čagljeva (*Canis aureus*) iz Izraela

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



Pronađeni aleli DQA lokusa i njihove frekvencije u istraženom uzorku prikazani su u Tablici 3. Frekvencija alela izračuna se tako da se nađeni broj određenog alela u populaciji dijeli s ukupnim brojem alela (broj alela dvostruko je veći od broja jedinki). Aleli s najvećom frekvencijom su DQA1\*00402 (70%) i DQA1\*03001 (25%), a alel s najmanjom frekvencijom je DQA1\*00101 (5%).

Tablica 3. Učestalost DQA alela čaglja (*Canis aureus*) iz Izraela

Ime alela	Učestalost	Apsolutan broj	Broj homozigotnih jedinki
DQA1*00402	0,7	28	10
DQA1*03001	0,25	10	2
DQA1*00101 <sup>a</sup>	0,05	2	0

<sup>a</sup>-Naznačeni alel u tablici pronađen je do sada isključivo u pasa (Seddon i Ellegren 2002, Arbanasić i sur 2012)

### 3.1.2. DQB lokus

Istražio sam egzon 2 DQB lokusa koji je dug 267 parova baza. U uzorku sam pronašao 5 DQB alela od kojih jedan pripada psećem haplotipu. Aleli DQB1\*02305 i DQB1\*06801 tipični su čagljevski aleli te su prvi puta pronađeni u populaciji hrvatskih čagljeva (Galov i sur. neobjavljeno). Alel DQB1\*02301 utvrđen je u populacijama sjevernoameričkog vuka, etiopskog vuka i psa (Seddon i Ellegren 2002, Kennedy i sur. 2011). Alel DQB1\*3501 prethodno je determiniran kod europskog vuka, sjevernoameričkog vuka, hrvatskog vuka i psa (Seddon i Ellegren 2002, Arbanasić i sur. 2012). Alel DQB1\*00201 isključivo je pseći alel (Seddon i Ellegren 2002, Arbanasić i sur. 2012). Ukupan broj varijabilnih nukleotidnih mjesta je 29. Nukleotidni i aminokiselinski sljedovi pojedinih DQB alela prikazani su u Tablicama 4 i 5.

Tablica 4. Nukleotidni ispis DQB alela čaglja (*Canis aureus*) iz Izraela

Ime alela	Nukleotidni slijed											Položaj
DQB1*02305	GAT	TTC	GTG	TAC	CAG	TTT	AAG	GGC	GAG	TGC	TAT	[ 33]
DQB1*06801	...	...	...	...	...	...	...	TT.	...	...	...	[ 33]
DQB1*02301	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 33]
DQB1*03501	...	...	...	...	...	...	...	TT.	...	...	...	[ 33]
DQB1*02305	TTC	ACC	AAC	GGG	ACG	GAG	CGG	GTG	CGG	CTT	CTG	[ 66]
DQB1*06801	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 66]
DQB1*02301	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 66]
DQB1*03501	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 66]
DQB1*02305	ACT	AAA	TAC	ATC	TAT	AAC	CGG	GAG	GAG	TAC	GTG	[ 99]
DQB1*06801	G.G	.G.	AG.	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 99]
DQB1*02301	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 99]
DQB1*03501	G.G	.G.	G..	...	...	...	...	...	...	C..	...	[ 99]
DQB1*02305	CGC	TTC	GAC	AGC	GAC	GTG	GGG	GAG	TAC	CGG	GCG	[132]
DQB1*06801	...	...	.T	...	...	...	...	...	.T.	...	...	[132]
DQB1*02301	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[132]
DQB1*03501	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[132]
DQB1*02305	GTC	ACG	GAG	CTC	GGG	CGG	CCC	TCG	GCT	GAG	TAC	[165]
DQB1*06801	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[165]
DQB1*02301	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[165]
DQB1*03501	...	...	...	...	...	...	...	GAC	...	...	...	[165]
DQB1*02305	TGG	AAC	CCG	CAG	AAG	GAC	GAG	ATG	GAC	CGG	GTA	[198]
DQB1*06801	...	...	GG.	...	...	..G	ATC	T..	..G	...	AAG	[198]
DQB1*02301	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[198]
DQB1*03501	...	...	GG.	...	...	..G	CTC	T..	..G	.A.	AGG	[198]
DQB1*02305	CGG	GCC	GAG	CTG	GAC	ACG	GTG	TGC	AGA	CAC	AAC	[231]
DQB1*06801	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[231]
DQB1*02301	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[231]
DQB1*03501	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[231]
DQB1*02305	TAC	GGG	TTG	GAA	GAG	CTC	ACC	TCG	TTG	CAG	CGG	[264]
DQB1*06801	...	...	G..	...	...	...	TA.	A..	...	CA.	..G	[264]
DQB1*02301	...	...	...	...	...	...	...	A..	.TG	CA.	...	[264]
DQB1*03501	...	...	...	...	...	...	TA.	A..	.TG	CA.	...	[264]
DQB1*02305	CGA	[267]										
DQB1*06801	C..	[267]										
DQB1*02301	.GA	[267]										
DQB1*03501	.GA	[267]										

Tablica 5. Aminokiselinski ispis DQB alela čaglja (*Canis aureus*) iz Izraela

Ime alela	Aminokiselinski slijed	Položaj
DQB1*02305	DFVYQFKGEC YFTNGTERVR LLTKYIYNRE EYV	[33]
DQB1*06801	.....F.. ..ARS.....	[33]
DQB1*02301	.....	[33]
DQB1*03501	.....F.. ..ARD..... .H.	[33]
DQB1*02305	RFDSDVGEYR AVTELGRPSA EYWNPQKDEM DRV	[66]
DQB1*06801	.....F. ....G..EIL E.K	[66]
DQB1*02301	.....	[66]
DQB1*03501	.....D. ....G..ELL EQR	[66]
DQB1*02305	RAELDTVCRH NYGLEELTSL QRR	[89]
DQB1*06801	.....V...YT. ....	[89]
DQB1*02301	.....T. ....	[89]
DQB1*03501	.....YT. ....	[89]

Pronađeni aleli DQB lokusa i njihove frekvencije u istraženom uzorku prikazani su u Tablici 6. Aleli s najvećom frekvencijom su DQB1\*02305 (50%) i DQB1\*06801 (27,7%), a aleli s najmanjom DQB1\*02301 (16,6%), DQB1\*03501(2,8%) i DQB1\*00201(2,8%).

Tablica 6. Učestalost DQB alela čaglja (*Canis aureus*) iz Izraela

Ime alela	Učestalost	Apsolutan broj	Broj homozigotnih jedinki
DQB1*02305	0,5	18	4
DQB1*06801	0,277	10	3
DQB1*02301	0,166	6	0
DQB1*03501	0,028	1	0
DQB1*00201 <sup>a</sup>	0,028	1	0

<sup>a</sup>- Naznačeni alel u tablici pronađen je do sada isključivo u pasa (Kennedy i sur. 2007, Seddon i Ellegren 2002)

### 3.1.3. DRB lokus

Istražio sam egzon 2 DRB lokusa koji je dug 267 parova baza. Nukleotidni i aminokiselinski sljedovi pojedinih DRB alela prikazani su u Tablicama 7 i 8. Ukupni broj varijabilnih nukleotidnih mjesta je 17. U uzorku sam pronašao 4 DRB alela od kojih jedan pripada psećem haplotipu. Alel DRB1\*13101 prethodno je pronađen kod čagljeva u Hrvatskoj (Galov i sur. neobjavljeno) i tipičan je čagljevski alel. DRB1\*00901 pronađen je kod čaglja, europskog vuka, sjevernoameričkog vuka i psa (Seddon i Ellegren 2002, Galov i sur. neobjavljeno). DRB1\*04802var je pretpostavljeni novi alel. Pretpostavljamo ga na temelju toga što 2 puta dolazi u različitim kombinacijama alela (kod 2 jedinke). Dolazi u kombinaciji s alelom DRB1\*00901 koji je najučestaliji DRB alel (pa pretpostavljamo da nije on taj koji je promijenjen), već da je promijenjen alel DRB1\*04802 koji se kao takav ne pojavljuje u populaciji, već njegova varijanta koja se od izvornog alela razlikuje u jednoj bazi na 167 mjestu nukleotidnog slijeda. Izvorni alel na tom mjestu kodira za citozin, a varijanta toga alela na tom mjestu kodira za adenin. Alel DRB1\*07901 pripada pasmini psa Tibetski terijer (Kennedy i sur. 2007).

Tablica 7. Nukleotidni ispis DRB alela čaglja (*Canis aureus*) iz Izraela

Ime alela	Nukleotidni slijed											Položaj
DRB1*04802var	CAT	TTC	TTG	GAG	ATG	TTA	AAG	TCC	GAG	TGC	TAT	[33]
DRB1*13101	...	...	...	...	G..	GC.	...	GC.	...	...	C..	[33]
DRB1*00901	...	...	...	...	G..	GC.	...	.C.	...	...	T..	[33]
DRB1*04802var	TTC	ACC	AAC	GGG	ACG	GAG	CGG	GTG	CGG	TTC	GTG	[66]
DRB1*13101	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.TC	G..	[66]
DRB1*00901	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.TC	G..	[66]
DRB1*04802var	GAA	AGA	TAC	ATC	CAT	AAC	CGG	GAG	GAG	CAC	GTG	[99]
DRB1*13101	GAA	...	C..	...	T..	...	...	...	...	AA.	G..	[99]
DRB1*00901	GAA	...	T..	...	C..	...	...	...	...	AA.	G..	[99]
DRB1*04802var	CGC	TTC	GAC	AGC	GAC	GTG	GGG	GAG	TAC	CGG	GCG	[132]
DRB1*13101	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	...	[132]
DRB1*00901	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	...	[132]
DRB1*04802var	GTC	ACG	GAG	CTC	GGG	CGG	CCC	GAC	GCT	GAG	TAC	[165]
DRB1*13101	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.C.	[165]



Tablica 9. Učestalost DRB alela čaglja (*Canis aureus*) iz Izraela

Ime alela	Učestalost	Apsolutan broj	Broj homozigotnih jedinki
DRB1*04802var	0,1875	3	0
DRB1*13101	0,0625	1	0
DRB1*00901	0,6875	11	3
DRB1*07901a	0,0625	1	0

a - Naznačeni alel u tablici pronađen je do sada isključivo u pasa (Kennedy i sur. 2007)

#### 3.1.4. Haplotipovi

U populaciji sam našao potpuni tro-lokusni DQA/DQB/DRB haplotip za 6 jedinki (Ca160, Ca578, Ca654, Ca655, Ca697, Ca704) te dvo-lokusni DQA/DQB haplotip za 10 jedinki (Ca128, Ca147, Ca152, Ca580, Ca581, Ca653, Ca683, Ca733, Ca743, Ca756), DQA/DRB haplotip za jedinku Ca175 i DQB/DRB haplotip za također jednu jedinku (Ca736). Za 3 jedinke (Ca591, Ca732, Ca779) sam uspio sekvencirati alele samo na DQA lokusu, a za jedinku Ca694 samo na DQB lokusu.

Uzorak Ca578 ima jedan tro-lokusni haplotip koji je nađen u psa pasmine Tibetski terijer (DQA1\*00101/DQB1\*00201/DRB1\*07901) i drugi koji je nađen u čaglja DQA1\*00402/DQB1\*02305/DRB1\*00901 (Tablica 10). Nadalje, zanimljiva je jedinka Ca756 koja na DQA lokusu ima tipičan pseći alel DQA1\*00101 koji nikada prethodno nije nađen kod čaglja (Tablica 10). Nažalost, nismo uspjeli dobiti nukleotidni slijed za DRB lokus kod ove jedinke, jer bi sekvenciranje tog lokusa dalo potpunu sliku o tome li je i ta jedinka eventualni križanac između čaglja i psa.

Tro-lokusni haplotip DQA1\*00402/DQB1\*02305/DRB1\*00901 pojavljuje se 8 puta (66,67%) i prisutan je kod svih 6 jedinki u populaciji za koje smo uspjeli dobiti tro-lokusne haplotipove. Jedinke Ca697 i Ca704 su homozigoti za taj haplotip. Ujedno kod hrvatskih čagljeva to je jedan od najučestalijih haplotipova sa frekvencijom od 30% na 50 istraživanih jedinki (Galov i sur. neobjavljeno). Haplotip DQA1\*03001/DQB1\*06801/DRB1\*13101

pojavljuje se 1 puta (8,33%) i prisutan je kod jedinke Ca160. Ovaj haplotip prisutan je kod hrvatskih čagljeva sa frekvencijom od 5% na 50 istraživanih jedinki (Galov i sur. neobjavljeno).

Haplotip DQA1\*00101/DQB1\*00201/DRB1\*07901 pojavljuje se 1 puta (8,33%) i prisutan je kod jedinke Ca578. Ovaj haplotip pripada Tibetskom terijeru (Kennedy i sur. 2007). Tro-lokusni haplotip DQA1\*00402/DQB1\*02301/DRB1\*04802var pojavljuje se dva puta (16,67%) kod dvije različite jedinke. Ovaj haplotip mogao bi biti tipični izraelski, jer ima novi alel DRB1\*04802var.

Dvo-lokusni DQA/DQB haplotip smo dobili kod 10 jedinki. Haplotip DQA1\*03001/DQB1\*06801 pojavljuje se 7 puta (35%) i prisutan je kod 5 jedinki, a u populaciji hrvatskog čaglja pojavljuje se oko 5% (Galov i sur. neobjavljeno). DQA1\*00402/DQB1\*02301 pojavljuje se 2 puta (10%) kod 2 jedinke. DQA1\*00402/DQB1\*02305 pojavljuje se 9 puta (45%) i prisutan je kod 6 jedinki te u populaciji hrvatskog čaglja pojavljuje se oko 30% (Galov i sur. neobjavljeno). DQA1\*00402/03501 pojavljuje se 1 puta (5%), a DQA1\*00101/DQB1\*02301 također se pojavljuje 1 puta (5%).

Dvo-lokusne DQA/DRB haplotipove dobili smo kod jedne homozigotne jedinke (Ca175) koja je imala haplotip DQA1\*00402/DRB1\*00901 i taj haplotip zastupljen je i kod populacije hrvatskog čaglja (Galov i sur. neobjavljeno). Dvo-lokusni DQB/DRB haplotip dobili smo kod jedinke Ca736 (DQB1\*02301/DRB1\*00901 i DQB1\*02305/DRB1\*04802var) s haplotipovima koji nisu prisutni u populaciji hrvatskog čaglja. U četiri jedinke uspjeli smo dobiti alele za po jedan lokus (Tablica 10).

Tablica 10. Distribucija dvo-lokusnih, tro-lokusnih haplotipova te alela DQA, DQB i DRB lokusa po jedinkama. Svaka boja predstavlja određeni dvo-lokusni ili tro-lokusni haplotip. Crvenim slovima označeni su haplotipovi za koje pretpostavljam da su specifični za psa.

Oznaka jedinke	Aleli DQA	Aleli DQB	Aleli DRB
Ca128	DQA1*00402	DQB1*02301	
	DQA1*03001	DQB1*06801	
Ca147	DQA1*00402	DQB1*02301	
	DQA1*00402	DQB1*02305	
Ca152	DQA1*00402	DQB1*02305	
	DQA1*03001	DQB1*06801	
Ca160	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*03001	DQB1*06801	DRB1*13101
Ca175	DQA1*00402		DRB1*00901
	DQA1*00402		DRB1*00901
Ca578	DQA1*00101	DQB1*00201	DRB1*07901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
Ca580	DQA1*00402	DQB1*02305	
	DQA1*03001	DQB1*06801	
Ca581	DQA1*00402	DQB1*02305	
	DQA1*00402	DQB1*02305	
Ca591	DQA1*00402		
	DQA1*03001		
Ca653	DQA1*00402	DQB1*03501	
	DQA1*00402	DQB1*02305	
Ca654	DQA1*00402	DQB1*02301	DRB1*04802var
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
Ca655	DQA1*00402	DQB1*02301	DRB1*04802var
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
Ca683	DQA1*03001	DQB1*06801	
	DQA1*03001	DQB1*06801	
Ca694		DQB1*06801	
		DQB1*06801	
Ca697	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
Ca704	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901



	DQA1*00402	DQB1*02305	DRB1*00901
Ca732	DQA1*00402		
	DQA1*00402		
Ca733	DQA1*00402	DQB1*02305	
	DQA1*00402	DQB1*02305	
Ca736		DQB1*02301	DRB1*00901
		DQB1*02305	DRB1*04802var
Ca743	DQA1*03001	DQB1*06801	
	DQA1*03001	DQB1*06801	
Ca756	DQA1*00101	DQB1*02301	
	DQA1*00402	DQB1*02305	
Ca779	DQA1*00402		
	DQA1*03001		

### 3.2. Evolucijska udaljenost

U procjenjivanju evolucijskih udaljenosti koristio sam programski paket MEGA (Tamura i sur. 2013). Program sadrži obilje 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. Procjene evolucijske udaljenosti za DQA, DQB i DRB lokuse čaglja i najprikladniji supstitucijski modeli prikazani su u Tablici 11.

Tablica 11. Broj pronađenih alela, dužina nukleotidne sekvence, broj varijabilnih nukleotidnih mjesta, prosječne nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti i broj jedinstvenih aminokiselinskih sekvenci DQA, DQB i DRB alela čaglja (*Canis aureus*) iz Izraela

Lokus (broj pronađenih alela)	Dužina sekvence	Broj varijabilnih nukleotidnih mjesta	Nukleotidna udaljenost		Aminokiselinska udaljenost		Broj jedinstvenih aminokiselinskih sekvenci
			Model nukleotidne supstitucije	d	Model aminokiselinske supstitucije	d	
DQA(2)	246	5	JC	0,0206	JTT	0,0391	2
DQB(4)	267	29	JC	0,072	JTT	0,147	4
DRB(3)	267	17	T92	0,044	JTT	0,115	3

Kratice: d, prosječna vrijednost srednjih udaljenosti; JC, Jukes-Cantor model supstitucije; JTT, Jones-Taylor-Thornton model supstitucije, T92, Tamura 3 parametar

### 3.3. Selekcija

Prirodna selekcija snažan je evolucijski faktor koji može pozitivno ili negativno djelovati na frekvenciju alela unutar populacije. Stopa sinonimnih (dS) i nesinonimnih (dN) mutacija i njihov omjer izračunati su u svrhu određivanja selekcijskog pritiska unutar vrste i na istraživanim lokusima. Pri tome smo koristili program MEGA i Nei-Gojobori metodu (Nei i Gojobori 1986), uz Jukes-Cantor korekciju.

U slučaju neutralne evolucije nesinonimne i sinonimne supstitucije događaju se podjednako učestalošću i to je nulta hipoteza ovog testa ( $dN=dS$ ). Kod alternativne hipoteze, nesinonimne supstitucije prevladavaju nad sinonimnim ( $dN>dS$ ) i ako je vrijednost  $p$  statistički značajna ( $p<0,05$ ), nulta hipoteza se odbacuje u korist alternativne hipoteze postojanja pozitivne selekcije na lokus.

Na DQB lokusu  $dN/dS$  omjer iznosi 2,33 a za DRB lokus 5,1415, te je za oba lokusa  $p<0,05$  (stopa nesinonimnih mutacija statistički je značajno veća od stope sinonimnih mutacija). Stoga odbacujemo nultu hipotezu u korist alternativne hipoteze postojanja pozitivne selekcije (Tablica 12). Premda je na DQA lokusu  $dN/dS$  omjer beskonačan,  $p > 0,05$  te ne možemo odbaciti nultu hipotezu postojanja neutralne evolucije. Drugim riječima, za lokus DQA nismo dokazali djelovanje pozitivne selekcije.

Tablica 12. Prosječna stopa sinonimnih (dS) i nesinonimnih (dN) supstitucija i tip selekcije kod čaglja (*Canis aureus*) iz Izraela

Lokus	dN	dS	Tip selekcije	P
DQA	0,0271	0	Neutralna; $dN/dS = +\infty$	0,055
DQB	0,0844	0,0363	Pozitivna; $dN/dS = 2,33$	0,0148*
DRB	0,0545	0,0106	Pozitivna; $dN/dS = 5,1415$	0,0009*

\* - statistički značajna p - vrijednost

#### 4. RASPRAVA

Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC) ključna su komponenta imunološkog sustava kod sisavaca te su i važan molekularni marker za praćenje adaptivne evolucije i adaptivne genetičke raznolikosti u divljim populacijama životinja. Veća raznolikost MHC gena unutar populacije povećava izgleda za obranu od patogena i parazita te stopu preživljavanja, odnosno fitnes jedinki, što doprinosi značaju istraživanja MHC gena. U ovom diplomskom radu prvi puta se opisuje raznolikost gena DQA, DQB i DRB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u čagljeva iz Izraela. Ovo je prvo takvo imunogenetičko istraživanje na čagljevima, a prethodni radovi obuhvaćaju istraživanja populacijske genetike čagljeva iz Izraela (Cohen i sur. 2012).

Ovim diplomskim istraživanjem pronašao sam 3 alela na DQA lokusu, 5 alela na DQB lokusu i 4 alela na DRB lokusu, od kojih su neki aleli nađeni isključivo kod čaglja, a tri alela, po jedan na svakom lokusu do danas su otkriveni samo kod psa.

Od ukupno 30 uzoraka uške čaglja uspješno je izolirano i sekvencirano 20 jedinki na DQA lokusu, 18 jedinki na DQB lokusu i 8 jedinki na DRB lokusu, što čini ukupno 92 određena alela od mogućih 180, što znači da sam samo 51,11% uzoraka uspješno analizirao. Za ostalih 48,89% uzoraka nisam uspio dobiti PCR produkt. Nizak postotak uspješnosti pokusa pripisujem lošim uzorcima, u kojima se dogodila degradacija DNA uslijed previsoke temperature nastale prilikom neadekvatnog transporta. Također, koristili smo protokol za izolaciju DNA koja prethodno nikad nije bila testirana na takvim uzorcima. Mogući razlog za neuspješnost PCR amplifikacije mogao bi biti i postojanje nul-alela, odnosno postojanje mutacije u veznom mjestu početnica.

Za nukleotidni slijed uzorka Ca578 na DQB lokusu nakon sekvenciranja mislio sam da bi mogao predstavljati novi alel, s obzirom da sam našao 2 nukleotidne razlike od alela u knjižnici nakon obrade u SeqScape-u. Stoga sam odlučio taj uzorak podvrgnuti molekularnom kloniranju. Nakon procedure, spoznajemo da je uzorak potencijalni križanac, tj. da ima trolokusne haplotipove čaglja i psa (Tablica 10). Taj uzorak ima jedan tro-lokusni haplotip koji pripada Tibetskom terijeru DQA1\*00101/DQB1\*00201/DRB1\*07901 i drugi koji pripadaju čaglju DQA1\*00402/DQB1\*02305/DRB1\*00901. Mogućnost križanja između čagljeva i pasa možemo pripisati oportunističkoj prirodi ovih životinja. One vrlo često

obitavaju blizu ljudskim nastambana, hraneći se otpadom i time smanjuju svoju potrebu za lovom. Pri tome često dolaze u susret sa psima (Cohen i sur. 2012). Nadalje, za jedniku Ca756 pretpostavljamo također da bi mogla biti križanac između čaglja i psa, no ne možemo sa sigurnošću tvrditi jer nismo uspjeli dobiti nukleotidni slijed DRB alela (sekvenciranje nije bilo uspješno). Jedinka posjeduje tipičan pseći alel na DQA lokusu: DQA1\*00101, a ostale alele čaglja.

U ovom istraživanju uspio sam dobiti potpuni tro-lokusni haplotip za samo 6 jedinki, zbog nemogućnosti sekvenciranja DRB alela, koji spada među najpolimorfnije MHC lokuse, jer se vjerovatno dogodila mutacija na veznom mjestu početnica (postojanje nul-alela). Uz to, uspješno smo sekvencirali 10 jedinki s dvo-lokusnim DQA/DQB haplotipom. Preostale su tri jedinke koje smo uspjeli sekvencirati samo na DQA lokusu i jedna jedinka samo na DQB lokusu. Od tri pronađena tro-lokusna haplotipa specifična za čaglja dva se pojavljuju i u populaciji hrvatskog čaglja. To su haplotipovi DQA1\*00402/DQB1\*00901/DRB1\*02305 i DQA1\*03001/DQB1\*06801/DRB1\*13101 koji se u Izraelskoj populaciji pojavljuju s frekvencijom od 75%, a u hrvatskog čaglja oko 35% (Galov i sur. neobjavljeno). Najvjerojatnije su da ta dva haplotipa jako stara jer su prisutna i u Europi i na Azijskom kontinentu. Svaki predstavlja staru lozu alela, a opstaje i širi se jer je učinkovit u borbi protiv patogena i parazita, te prilagođen na područje u kojem vrsta obitava. Novi tro-lokusni haplotip DQA1\*00402/DQB1\*02301/DRB1\*04802var pojavljuje se sa frekvencijom od 16,67% i smatram da bi mogao biti specifičan za Izraelsku populaciju, odnosno za patogene i parazite specifične za to područje.

Od pronađena četiri dvo-lokusna DQA/DQB haplotipa tipična za čaglja, dva se pojavljuju i u populaciji hrvatskog čaglja. To su haplotip DQA1\*03001/DQB1\*06801 i haplotip DQA1\*00402/DQB1\*02305 koji su u uzorku iz Izraela zastupljeni s oko 80%, a u čagljeva iz Hrvatske oko 35%. To su isti aleli kao i u tro-lokusnim haplotipovima i pretpostavljamo da pripadaju starim alelima.

Aleli s najvećom frekvencijom prikazani su u Tablicama 3, 6 i 9. Za DQA lokus to je alel DQA1\*00402 s učestalošću od čak 70%, za DQB to je DQB1\*02305 s učestalošću od 50% i DRB1\*00901 s učestalošću od 69%. Alel DQB1\*02305 je do danas isključivo pronađen samo kod čaglja, a sva tri alela zabilježena su u populaciji čagljeva u Hrvatskoj (Galov i sur. neobjavljeno). Također je u istom istraživanju čagljeva u Hrvatskoj utvrđena visoka učestalost (oko 30%) alela DQA1\*00402, DQB1\*02305, DRB1\*00901.

Veliki broj homozigotnih jedinki na nekom lokusu ukazuje na nisku genetičku raznolikost. U ovom istraživanju DQA lokus pokazao se kao najmanje raznolik te je pronađeno 12 homozigotnih jedinki (60%); 10 jedinki za alel DQA1\*00402 i dvije jedinke za alel DQA1\*03001. DQB lokus sadrži sedam homozigotnih jedinki (38,89%); četiri jedinke za alel DQB1\*02305 i tri jedinke za alel DQB1\*06801. U DRB alelu pronađene su tri homozigotne jedinke (37,5%); sve tri jedinke su imale alel DRB1\*07901 (Tablica 10).

Najmanja polimorfnost nađena je na DQA lokusu (broj varijabilnih nukleotidnih mjesta, evolucijska udaljenost), te veća na DQB i DRB lokusima. Na DQA lokusu prosječna nukleotidna udaljenost iznosi 0,0206, a prosječna aminokiselinska udaljenost 0,0391. Za DQB i DRB lokus prosječna nukleotidna udaljenost iznosi 0,072 i 0,044, dok prosječna aminokiselinska udaljenost iznosi 0,147 i 0,115 (Tablica 11). Ujedno, broj varijabilnih nukleotidnih mjesta veći je na DQB i DRB lokusu u odnosu na DQA lokus. DQA lokus sadrži samo 5 varijabilnih mjesta, dok DQB sadrži 29 varijabilnih mjesta, a DRB lokus 17 varijabilnih nukleotidnih mjesta. Manju polimorfnost DRB lokusa naspram DQB lokusa možemo objasniti malim brojem uspješno analiziranih jedinki (8). Nadalje, svi rezultati ukazuju na veću polimorfnost DQB i DRB lokusa od DQA lokusa, što potvrđuje da je varijabilnost manja na genima koji kodiraju za  $\alpha$  lanac (DQA) nego na genima koji kodiraju za  $\beta$  lanac MHC molekula (DQB, DRB), što je otkriveno i u prijašnjim istraživanjima na vukovima (Arbanasić i sur. 2012). Visoke nukleotidne udaljenosti DQB i DRB alela u skladu su s mehanizmom prednosti divergentnih alela. To je mehanizam koji omogućava jedinki koja posjeduje što različitiije alele koji kodiraju MHC II molekule posjedovanje i veće selekcijske prednosti.

Analiziranjem selekcije, koja uspoređuje relativne stope nesinonimnih i sinonimnih mutacija (dN/dS test) pokazuje utjecaj selekcijskog pritiska na DQB i DRB lokus (Tablica 12). Na DQB lokusu dN/dS omjer iznosi 2,33 a za DRB lokus 5,1415; te je za oba lokusa  $p < 0,05$  (stopa nesinonimnih mutacija statistički je značajno veća od stope sinonimnih mutacija). Stoga odbacujemo nultu hipotezu u korist alternativne hipoteze postojanja pozitivne selekcije. Premda je na DQA lokusu dN/dS omjer beskonačan,  $p > 0,05$  te ne možemo odbaciti nultu hipotezu postojanja neutralne evolucije. Drugim riječima, za lokus DQA nismo dokazali djelovanje pozitivne selekcije.

Utvdili smo postojanje trans-specijskog polimorfizma, koji ukazuje na postojanje balansirajuće selekcije. Postojanje trans-specijskog polimorfizma utvdili smo zbog toga što

su neki od alela koji su pronađeni u ovom istraživanju u čagljeva također pronađeni i u drugih vrsta iz porodice pasa (u ranijim istraživanjima). Na DQA lokusu to su aleli DQA1\*00402, te aleli DQB1\*02301 i DQB1\*03501 na DQB lokusu, prijašnje nađeni kod vuka i psa (Arbanasić i sur. 2012). Na DRB lokusu to je alel DRB1\*00901 koji je prethodno pronađen kod čaglja, europskog vuka, sjevernoameričkog vuka i psa (Seddon i Ellegren 2002, Galov i sur. neobjavljeno). Premda se odvajanje vrsta dogodilo davno, neki aleli koji su nastali prije odvajanja vrsta održali su se do danas u obje vrste. U ovom slučaju odvajanje vrsta dogodilo se prije 400 tisuća godina kada se čagalj odvojio od zajedničkog pretka vuka i psa (Freedman A. H. i sur. 2014). Drugi rad navodi da se divergencija dogodila prije milijun godina (VonHoldt M. B i sur. 2011).

## 5. ZAKLJUČAK

U istraživanom uzorku od 30 jedinki čaglja iz Izraela pronašao sam tri alela DQA lokusa, pet alela DQB lokusa i četiri alela DRB lokusa. Od toga smatram da po jedan od alela svakog lokusa pripada vrsti pas, stoga nisu bili uključeni u daljnje analize. Svaki od ostalih alela tipičnih za čaglja (dva DQA, četiri DQB i tri DRB) daje svoj jedinstveni aminokiselinski slijed.

U istraživanoj populaciji pronašao sam jedan novi alel kojemu sam dao oznaku DRB1\*04802var. To je varijanta alela DRB1\*04802, koji se ne pojavljuje u populaciji, a koji se od novog alela razlikuje u jednoj bazi na 167. mjestu nukleotidnog slijeda. Izvorni alel na tom mjestu kodira za citozin, a varijanta toga alela na tom mjestu kodira za adenin.

Svi rezultati ukazuju na veću genetičku raznolikost DQB i DRB lokusa u odnosu na DQA lokus. To možemo vidjeti iz većeg broja varijabilnih nukleotidnih mjesta, veće prosječne nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti i veće stope nesinonimnih i sinonimnih mutacija na DQB i DRB lokusu u odnosu na DQA lokus.

Jedan DQA alel, dva DQB alela i jedan DRB alel pronađeni u čaglja u ovom istraživanju ranije su pronađeni kod vukova i pasa. Time smo utvrdili postojanje trans-specijskog polimorfizma, koji pak ukazuje na postojanje balansirajuće selekcije na istraživanim lokusima.

Na DQA lokusu nema dokaza o postojanju prirodne selekcije. Na DQB i DRB lokusu genetička raznolikost 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., Huber Đ., Kusak J., Gomerčić T. Hrenović J., Galov A. (2012): Extensive polymorphism and evidence of selection pressure on major histocompatibility complex DLA-DRB1, DQA1 and DQB1 class II genes in Croatian grey wolves. *Tissue Antigens* **81**:19-27.
- 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.
- Chevolut M., Ellis J., Rijnsdorp A., Stam W., Olsen J. (2008): Temporal changes in allele frequencies but stable genetic diversity over the past 40 years in the Irish Sea population of thornback ray, *Raja clavata*. *Heredity* **101**:120–126
- 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.
- Ferguson, W.W. (1981): The systematic of *Canis aureus lupaster* (Carnivora : Canidae) and the occurrence of *Canis lupus* in North Africa, Egypt and Sinai, *Mammalia* **4**: 459-465.
- Freedman A. H., Gronau I., Schweizer R. M., Ortega-del Vecchio D., Han E. i sur. (2014): Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs. *Plos Genetics* **10**.
- Gabbay S. (1997): Conservation of biological diversity in Israel. *Isr Environ Bull* **20**:2–10
- Galaverni M., Caniglia R., Fabbri E., Lapalombella S., Randi E. (2013): MHC variability in an isolated wolf population in Italy. *Journal of Heredity*.

- Galov A., Arbanasić H., Fabbri E., Caniglia R., Galaverni M., Randi E., Lapalombella S., Florijančić T. (neobjavljeno): First evidence of hybridisation between golden jackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis familiaris*) as revealed by genetic markers.
- 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.
- 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. Nucleic Acids Symposium Series **41**: 95-98.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2008. *Canis aureus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2 <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=3744>
- IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. [www.iucnredlist.org/details/3744/0](http://www.iucnredlist.org/details/3744/0).
- Janosch A., 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.
- Kelley J., Walter L., Trowsdale J. (2005): Comparative genomics of major histocompatibility complexes. Immunogenetics **56**: 683-695.
- Kennedy J. L., Angles M. J., Barnes A., Carmichael E. L., Radford D. A., Ollier R. E. W., Happ M. G. (2007): DLA-DRB1, DQA1, and DQB1 alleles and haplotypes in North American gray wolves. Journal of Heredity **98**:491–499.
- Kennedy J. L., Randall A. D., Knobel D., Brown J. J., Fooks R. A., Argaw K., Shiferaw F., Ollier R. E. W., Sillero-Zubiri C., Macdonald W. D., Laurenson K. M. (2010): Major histocompatibility complex diversity in the endangered Ethiopian wolf (*Canis simensis*). Tissue Antigens **77**:118-125.

- Kennedy J.L., Quarmby S., Fretwell N. i sur. (2005): High-resolution characterisation of the canine DLA-DRB1 locus using reference strand-mediated conformational analysis (RSCA). *Journal of Heredity* **96**: 836–842.
- Kindt T. K., Goldsby R. A., Osborne B. A., & Kuby J. (2000): *Kuby Immunology*. Macmillan.
- Kryštufek 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.
- Leberg P.L. (1992): Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution* **46**:477–494
- Markov G. (2012) : Golden jackal (*Canis aureus* L.) in Bulgaria: What is going on?. *Acta zoologica bulgarica* **4**: 67-71.
- Mendelssohn H. (1972): Ecological effects of chemical control of rodents and jackals in Israel. *The careless technology: ecology and International development*. Natural History, New York, 527–544
- Mendelssohn H., Yom-Tov Y. (1999): *Mammalia of Israel*. Israel Academy of Science and Humanities, Jerusalem
- Moehlman, P.D. (1983): Sociocology of silverbacked and golden jackals (*Canis mesomelas*, *C. aureus*). *Recent advances in the study of Mammalian Behaviour* **7**: 423-453
- Nei M., Gojobori T. (1986): Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* **3**: 418-426.
- 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
- Robinson J., Mistry K., McWilliam H., Lopez R., Parham P., Marsh S. G. E. (2011): The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research* 39 Database issue: D1171-D1176
- Seddon M. J., Ellegren H. (2002): MHC class II genes in European wolves: a comparison with dogs. *Immunogenetics* **54**:490–500.

- Seddon M. J., Ellegren H. (2004): A temporal analysis shows major histocompatibility complex loci in the Scandinavian wolf population are consistent with neutral evolution. *Proceedings of The Royal Society London B* **271**:2283-2291.
- Sillero-Zubiri C., Hoffmann M., Macdonald D.W. (2004): *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs: Status Survey and Conservation Action Plan*, 2nd ed. IUCN Canid Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Sommer S. (2005): The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology* **2**:16.
- Sompayrac L.M.(2011): *How the Immune System Works*. Wiley.
- 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.
- Spassov N. (1993): The jackal. *Ecocurrier* **3**: 40–41.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.
- VonHoldt M. B, Plollinger 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.
- Wagner L. J., Burnett C. R., DeRose A. S., Strob R. (1996): Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQA gene. *Tissue Antigens* **48**: 199–204
- Wagner L. J., Burnett C. R., Works D. J., Strob R. (1996): Molecular analysis of DLA-DRBB1 polymorphism. *Tissue Antigens* **48**: 554–561
- 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

Rođen sam 11. veljače 1991. u Vinkovicima. Osnovnu školu Matija Antun Reljković pohađao sam u Cerni. 2009. godine maturirao sam na Prirodoslovno-matematičkoj gimnaziji u Županji. Iste godine upisujem prvu godinu preddiplomskog studija odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, a 2013. godine stječem zvanje sveučilišni prvostupnik biologije. Potom upisujem smjer eksperimentalne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, modul fiziologije i imunobiologije.

Sudjelovao sam na manifestaciji Noći biologije 2014. godine. Dugogodišnji interes i fakultetsko obrazovanje omogućili su mi da radim ono što volim te me dodatno zaintrigirali za biologiju.