View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

provided by Repository of Faculty of Science, University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Lucija Perica

Karakterizacija i raznolikost gena DQB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u mrkog medvjeda (*Ursus arctos*)

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

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Galov na svim stručnim savjetima, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Veliko hvala i dr. sc .Haidi Arbanasić na pomoći, savjetima, prenesenom znanju te svakako na strpljenju, podršci i vremenu uloženom u ovaj rad.

Hvala i izv. prof. dr. sc. Martini Šeruga Musić na trudu i volji da me nauči nešto novo.

Uzorci tkiva medvjeda korišteni u ovom radu dobiveni su s Veterinarskog fakulteta u Zagrebu ljubaznošću prof. dr. sc. Đure Hubera i dr. vet. med. Slavena Reljića i ovim putem im se zahvaljujem na tome.

Na kraju, hvala mojim roditeljima, sestri, baki, didi i prijateljima na njihovoj bezuvjetnoj podršci, ljubavi i vjeri u mene, koji su mi omogućili da studentsko doba uspješno privedem kraju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

KARAKTERIZACIJA I RAZNOLIKOST GENA DQB SKUPINE II GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI U MRKOG MEDVJEDA (*Ursus arctos*)

Lucija Perica

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility complex, MHC) ključan je u pokretanju obrambenih mehanizama kralježnjaka, a smatra se da su neki od lokusa MHC među najpolimorfnijim u kralježnjaka. Raznolikost gena MHC utječe na sposobnost populacije da se obrani od različitih patogena. Varijabilnost lokusa MHC održava ravnotežna selekcija, koju karakterizira veći broj raznolikih alela u populaciji. Geni MHC pokazali su se kao dobar marker za proučavanje adaptivne evolucije vrsta i populacija. Mrki medvjed (*Ursus arctos*) pripada redu Carnivora (zvijeri), porodici Ursidae (medvjedi) i rodu Ursus. Ovo je prvo ovakvo istraživanje u Hrvatskoj. Kod 30 uzoraka tkiva medvjeda pronađeno je šest alela lokusa DQB. Od njih su tri alela bila nova: RH102_7_M13F, Urth DQB*0401var i Urth DQB*0401vv. Ostali pronađeni aleli poznati su iz prethodnih istraživanja mrkih medvjeda. U osam jedinki sam identificirala po tri alela DQB lokusa, dok sam u 22 jedinke identificirala po dva alela, što ukazuje na to da je lokus DQB dupliciran barem u dijelu jedinki populacije mrkog medvjeda iz Hrvatske.

37 stranica, 9 slika, 6 tablica, 44 literarna navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: MHC, *Ursus arctos*, DQB

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Ana Galov
Neposredni voditelj: dr. sc. Haidi Arbanasić
Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Ana Galov
izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić-Baće
izv. prof. dr. sc. Ivana Buj

Rad prihvaćen: 01.02.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

CHARACTERIZATION AND DIVERSITY OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II DQB GENE IN BROWN BEAR (*Ursus arctos*)

Lucija Perica

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Major histocompatibility complex (MHC) plays a major role in initiating defense mechanisms of vertebrates. It is believed that some of the MHC loci are the most polymorphic invertebrates. The variability of MHC genes affects population`s ability to defend itself fromvarious pathogens.The variability of the MHC loci is maintained by the balancing selection, which is characterized by a larger number of divergent alleles in the population. MHC genes proved to be a good marker for the study of adaptive evolution of the species and populations. Brown bear (*Ursus arctos*) belongs to the order Carnivora (carnivores), family Ursidae (bears) and gene Ursus. From 30 samples of bear tissue I found six aleles of the gene DQB. Three alele were new: RH102_7_M13F, Urth DQB*0401var and Urth DQB*0401vv. Other three were known from the previous research. In eight individuals I identified three alleles of DQB locus, while in 22 individuals I identified two alleles, indicating that the DQB locus was duplicated at least in the part of the brown bear populations from Croatia.

37 pages, 9 figures, 6 tables, 44 references, the original language: Croatian

Key words: MHC, Ursus arctos, DQB

Supervisior: Assoc. Prof. Ana Galov
According supervisior: dr. sc. Haidi Arbanasić
Reviewers: Assoc. Prof. Ana Galov
Assoc. Prof. Ivana Ivančić-Baće
Assoc. Prof. Ivana Buj

Thesis accepted: 01.02.2018.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Mrki medvjed 1
1.2. Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC) 6
1.2.1. Uloga MHC-a 6
1.2.2. Građa MHC-a 7
1.2.3. Značajke 8
1.3. Cilj istraživanja 10
2. MATERIJALI I METODE 11
2.1. Uzorci tkiva 11
2.2. Izolacija DNA 11
2.3. Lančana reakcija polimerazom 11
2.4. Agarozna gel elektroforeza 12
2.5. Sekvenciranje DNA 12
2.6. Kloniranje DNA 13
2.7. Analiza polimorfnih konformacija jednolančane DNA (SSCP) 16
2.8. Računalna obrada podataka 17
2.8.1. BioEdit 17
2.8.2. SeqScape 17
2.8.3. Uspostavljanje referentne knjižnice 17
2.8.4. MEGA 18
3. REZULTATI 19
3.1. Aleli mrkog medvjeda 19
3.2. Evolucijska udaljenost 25
3.3. Procjena postojanja selekcije određivanjem omjera dN/dS 26
4. RASPRAVA 27
4. ZAKLJUČAK 31
5.LITERATURA 32
8. ŽIVOTOPIS 36

KRATICE

AA – akrilamid

APS – amonijev persulfat

dN - prosječna stopa nesinonimnih nukleotidnih supstitucija

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

dS - prosječna stopa sinonimnih nukleotidnih supstitucija

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (eng. ethylenediaminetetraacetic acid)

HLA - glavni sustav leukocitnih antigena u čovjeka (eng. human leukocyte antigens)

IPTG - izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid

kb - kilobaza

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

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

pb - parovi baza (kod DNA molekule)

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

rpm - okretaja po minuti (eng. rotations per minute)

SSCP – analiza polimorfnih jednolančanih konformacija (engl. Single-strand Conformation Polymorphism)

TEMED - tetrametiletilendiamin

UV - ultraljubičasta (eng. ultraviolet)

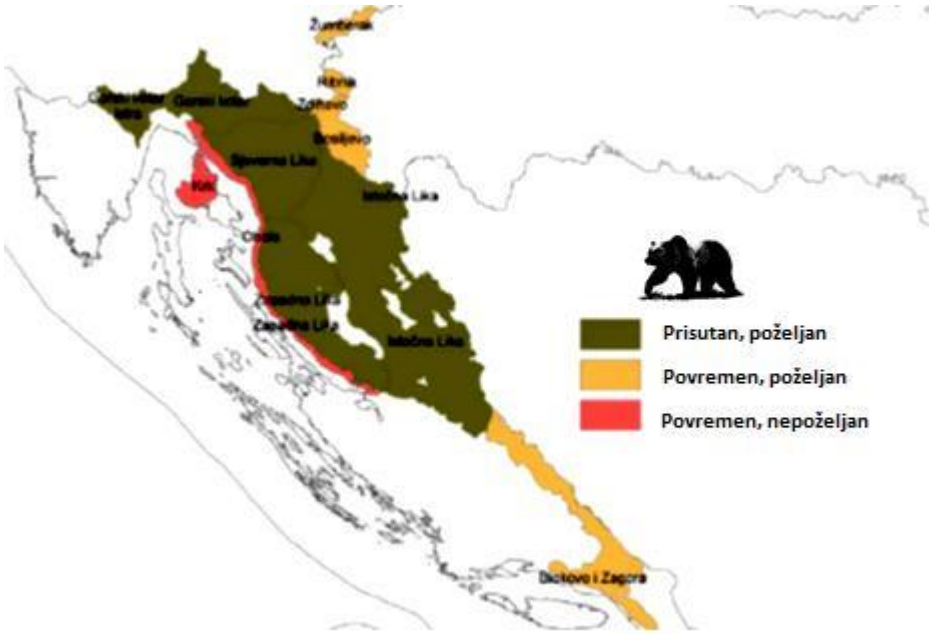
1.UVOD

1.1. Mrki medvjed

Mrki (smeđi) medvjed (*Ursus arctos* - Linnaeus, 1758) pripada redu Carnivora (zvijeri), porodici Ursidae (medvjedi) i rodu Ursus. Osam vrsta porodice Ursidae trenutno živi u svijetu. To su: mrki medvjed (*Ursus arctos*) u Euroaziji i Sjevernoj Americi, bijeli polarni medvjed (*Ursus maritimus* – Phipps, 1774) u Arktičkom području, američki crni medvjed (*Ursus americanus* – Pallas, 1780) u Sjevernoj Americi, azijski crni medvjed (*Ursus thibetanus* – Cuvier, 1823) u Aziji, sunčev medvjed (*Helarctos malayanus* – Raffles, 1821) u Jugoistočnoj Aziji, medvjed naočar (*Tremarctos ornatus* – Cuvier, 1825) u Južnoj Aziji, usnati medvjed (*Melursus ursinus* – Shaw, 1791) u Aziji i veliki panda (*Ailuropoda melanoleuca* – David, 1869) također u Aziji. Predator Miacid koji je živio prije 25 milijuna godina zajednički je predak svim navedenim medvjedima. Mrki medvjedi nastanjuju cijelu Euroaziju i Sjevernu Ameriku. Jedino mjesto u Europi gdje nikada nisu obitavali su Island i otoci Sardinija, Korzika i Cipar (Huber i sur., 2008). Danas, velika i stabilna populacija nastanjuje sjeveroistočnu Europu, Skandinaviju, Karpate i Dinarsko-Pindsku regiju. U zapadnoj Europi broj medvjeda je vrlo mali, ostalo je samo nekoliko jedinki i pod prijetnjom su od izumiranja. Dinarsko-Pindska populacija mrkih medvjeda obuhvaća teritorije Slovenije, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne Gore, Srbije, Kosova, Makedonije i Grčke, a procjenjuje se da ima oko 2100-2500 medvjeda. Dinarski medvjedi su dobili ime upravo po Dinaridima, planinskom masivu koji se proteže od sjeverozapadne Slovenije do jugoistočne Albanije (Linnell i sur., 2007). Razina genetičke raznolikosti dinarskih medvjeda u usporedbi s drugim populacijama mrkih medvjeda je relativno visoka (Kocijan i sur., 2011).

U Hrvatskoj 600 - 1000 jedinki živi na području Like i Gorskog Kotara (slika 1), gdje gustoća medvjeda može dosegnuti 1 medvjed/km^2 (Huber i sur., 2008), te također pripadaju populaciji Dinarskog masiva.

Ukupna površina rasprostranjenosti medvjeda u Hrvatskoj iznosi 12.372,17 km². Od toga je površina stalnog staništa 9.573,37 km², a obuhvaća prostor unutar kojeg medvjed zadovoljava sve svoje potrebe za hranom, vodom, prostorom, mirom, zaklonom, razmnožavanjem i brloženjem, te je stalno prisutan kroz četiri godišnja doba. Povremeno stanište medvjeda iznosi 2.798,80 km². (www.dzzp.hr)



Slika 1. Rasprostranjenost mrkog medvjeda (*Ursus arctos*) u Hrvatskoj

(izvor: www.savjetodavna.hr)

Nekontrolirani lov i progon medvjeda trajao je do uvođenja prvog Zakona o lovu sredinom 1940-ih godina. Tada je populacija ostala na manje od 100 jedinki. Danas se ta brojka povećala i populacija se oporavila (Huber i sur., 2008). Kao najstabilnija zapadna populacija mrkog medvjeda u Europi, dinarski medvjedi prepoznati su kao potencijalni izvor životinja za rekolonizaciju ili pojačanje u zapadno-europskim područjima gdje su medvjedi izumrli ili su populacije premale da bi preživjele samostalno (Taberlet i Bouvet, 1994). Zapravo, na nekoliko mjesta tijekom posljednja dva desetljeća dinarski su medvjedi bili translocirani s ciljem ponovnog uvođenja vrste u Austriju (Rauer 1997, Kruckenhauser i sur., 2009) i na srednje Pireneje Francuske (Quenette i sur., 2001, Chapron i sur., 2003), te da bi povećali ostatak divlje populacije u zapadnim Pirinejima Francuske (Chapron i sur., 2003) i talijanskim Alpama (Clark i sur., 2002). Ženka mrkog medvjeda preseljena je 1989. godine iz Gorskog kotara u Austriju, te je to bio prvi mrki medvjed ikad zarobljen u divljini i pušten u svrhu ponovnog uvođenja vrste (Clark i sur., 2002).

Medvjedi su jedni od najvećih kopnenih sisavaca i među kopnenim mesožderima najveći. Svojim izgledom odaju krupnu i snažnu životinju. Boja dlake je u osnovi smeđa, po hrptu često tamnija pa i crna, a vršci dugih dlaka mogu biti svijetlosivi. Neke su jedinke ravnomjerno smeđe (slika 2). Ispod guste dlake nalazi se gusta poddlaka koja je ljeti rjeđa nego zimi.

Karakteristika mrkih medvjeda je velika glava s malim očima i ušima, te izdužen nos. Tijelo im je snažno, s izraženom grbom i repom koji je u prosjeku veličine 8 cm.

U Hrvatskoj zbog mlade populacije medvjeda odrasle ženske imaju prosječno 100 kg, mužjaci 150 kg, no neki primjerci premaše i 300 kg. Dužina tijela doseže 2 – 3.3 m, a dužina u uspravnom položaju 2.2 – 3.8 m. Visina medvjeda u ramenima je od 100 – 120 cm.

Slika 2. Mrki medvjed (izvor: www.lovac.info)

Na kratkim nogama nalazi se pet prstiju koji svi dodiruju tlo, a na prstima su snažne pandže koje se ne mogu uvući i koje su na prednjim nogama osobito dugačke (od 5 – 6 cm) i snažne. Zubalo ima sva obilježja zvijeri, s karakterističnim sjekutićima, očnjacima i deračima i sadrži ukupno 42 zuba. Žvačne površine kutnjaka nešto su ravnije nego u ostalih zvijeri kao prilagodba za drobljenje biljne hrane. Od osjetila najbolje mu je razvijen njuh, zatim sluh dok mu je vid znatno slabiji. U hodu medvjedi dodiruju tlo cijelim tabanom, dakle slično kao i ljudi, stoga mu je trag specifičan, velik i ne može se zamijeniti za trag druge životinje (slika 3). Na prstima ima kandže koje su duge pet do šest cm i kojima kopa zemlju, trula stabla i mravinjake, ubija i kida plijen. Otisak prednje šape je okruglog oblika, gotovo upola kraći od stražnje šape, ali širi dok se u tragu jasno vide otisci 5 prstiju. Nekoliko centimetara ispred prstiju naziru se tragovi pandži, dok je jastučić grebenom odijeljen od prstiju. Zanimljiva je činjenica da se medvjed može popeti na stražnje noge i u takvome položaju ostati neko vrijeme. Izvrsni su plivači i dobri u penjanju, a unatoč veličini u mogućnosti su brzo trčati (Huber i sur., 2008).

Slika 3. Prednja medvjeđa šapa i otisak šape u blatu (izvor: www.dzzp.hr, autori: Đ. Huber i P. Otković)

Iako su prema sistematici zvijeri, medvjedi su zapravo pravi svejedi. Gotovo 95% svojih prehrambenih potreba zadovoljavaju hranom biljnog podrijetla. U jesen za prikupljanje potkožne masti glavna hrana su im plodovi bukve, divlje jabuke i kruške. Vole jesti i žitarice poput zobi i kukuruza, a u voćnjacima šljive, jabuke, breskve, trešnje i drugo razno voće. Ličinke, mravi, ose te ostaci leševa vukova i risa glavi su im izvor bjelančevina životinjskog porijekla. Također omiljen im je i šumski med pa često znaju provaljivati u pčelinjake i jesti ličinke pčela. Na taj način uzrokuju štete u poljoprivredi i smatraju se nepoželjnim gostima u bilo kojem domaćinstvu (Huber i sur., 2008).

Medvjedi su reproduktivno aktivni u razdoblju od kraja svibnja do kraja srpnja. Spolnu zrelost dostižu u dobi od 3 do 4 godine, a životni vijek u prirodi je od 10 – 20 godina. Poligamne su životinje i u sezoni parenja mužjaci nastoje oploditi što više ženki. Moguća je i situacija da mladunčad iz istog legla bude potomak više od jednog medvjeda. Graviditet traje 7 mjeseci, a medvjedići se rađaju u sredini zime slijepi i bez dlake (Bartol i sur., 2016). Vrlo su ovisni o kontaktu s tijelom majke koja ih grije i hrani mlijekom. (Huber i sur., 2008).

Zimu provode u svojim brlozima hibernirajući, odnosno bez da išta jedu i piju. Kao podloga za ležaj na kojima provode vrijeme brloženja im je suha trava, lišće ili razne grančice. Brlozi su najčešće šupljine u stijenama koje prilagode svojim potrebama kako bi osigurali pogodne uvjete za sebe i svoje potomke (Huber i sur. 2008). Mladunčad je ovisna o svojim majkama u toj mjeri da ukoliko se ugrozi njihovo stanište za vrijeme zime, neizbježno ugibaju jer nisu sposobni sami preživjeti. U Hrvatskoj gotovo svake zime na taj način stradava određeni broj medvjeđih legala (Huber i sur. 2008). Medvjed se glasa specifičnim režanjem samo kad je izazvan i time želi upozoriti i otjerati uljeza. (www.dzzp.hr).

Od 2005. medvjedom se u Hrvatskoj gospodari na temelju ″Plana gospodarenja″ koji su zajednički donijeli Ministarstvo regionalnog razvitka, šumarstva i vodnog gospodarstva i Ministarstvo kulture - Uprava za zaštitu okoliša. To je jedinstveni i sveobuhvatni dokument koji određuje osnovne odrednice obitavanja i gospodarenja medvjedom u našoj zemlji. Utemeljen je na znanstvenim i ekološkim ishodištima, ali unutar zakonskih, upravnih, gospodarskih i sociooloških okvira naše zemlje, te na temelju prihvaćenih međunarodnih propisa i preporuka vezanih uz zaštitu mrkog medvjeda u svijetu i Europi. Usklađen je s odgovarajućim planovima susjednih zemalja koje također gospodare očuvanim medvjeđim populacijama, te s akcijskim planovima međunarodnih institucija. Svake godine izrađuje se i ″Akcijski plan gospodarenja″ kojim se definiraju najznačajnije smjernice gospodarenja u tekućoj godini (www.min-kulture.hr).

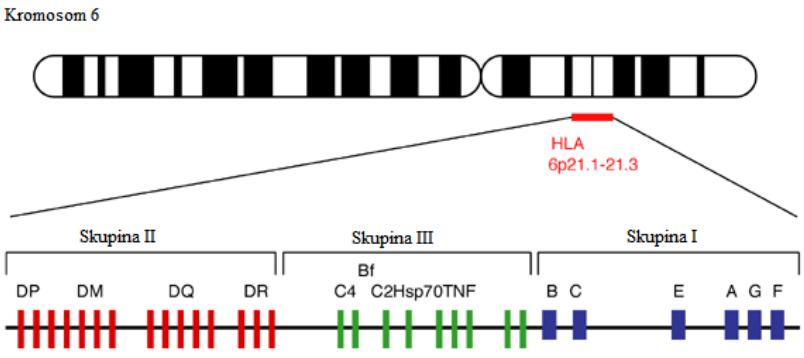
Zakon o lovstvu („Narodne novine“, broj: 140/05., 75/09. i 14/14.) govori da mrki medvjed predstavlja vrstu krupne divljači zaštićenu lovostajom. Ulaskom Republike Hrvatske u punopravno članstvo Europske Unije status mrkog medvjeda se promijenio iz zaštićene u strogo zaštićenu životinjsku vrstu, no unatoč ovoj promijeni medvjed je i dalje zadržao i status divljači sukladno Zakonu o lovstvu (Akcijski plan gospodarenja smeđim medvjedom, 2017).

1.2. Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC)

1.2.1. Uloga MHC-a

Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC) je sustav membranskih glikoproteinskih receptora izraženih na stanicama kralježnjaka. Ovaj sustav kodiran je genima koji čine glavni sustav gena tkivne podudarnosti (Andreis i sur., 2010). Ti geni su uključeni u pokretanje adaptivnog imunosnog odgovora i predstavljaju najvažniju komponentu imunosnog sustava kralježnjaka. Njihova glavna uloga je prikazivanje proteinskih antigena limfocitima T (Klein, 1986).

Receptori na limfocitima T prepoznaju jedino antigene na MHC molekulama. Otkriveni su zahvaljujući njihovoj ulozi u prihvaćanju ili odbacivanju presatka kod transplatacija, zbog čega i nose naziv antigeni tkivne podudarnosti. Prvo su pronađeni na leukocitima, i kod ljudi se zbog toga sustav zove sustav leukocitnih antigena (eng. HLA - *human leukocyte antigens*), te se nalazi na kraćem kraku 6. kromosomu. Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti najraznovrsnija su skupina gena u kralježnjaka i imaju brojne uloge. Kodiraju stanične površinske receptore koji imaju ključnu ulogu u prepoznavanju vlastitih od stranih molekula, u autoimunosnim reakcijama i imunosnom odgovoru kod zaraznih bolesti. Da bi se organizam uspješno obranio od patogenih mikroorganizama, mora imati sposobnost razlikovanja vlastitih molekula od stranih. To prepoznavanje velikim je dijelom pod kontrolom gena MHC. Oni zauzimaju veliki dio genoma, u ljudi oko 4 milijuna parova baza, odnosno 0,1% genoma. Genska regija MHC u ljudi ima oko 200 kodirajućih lokusa. Svaki se haplotip sastoji od više gena skupine I i II. Geni MHC skupine I su A, B i C, a geni MHC skupine II su DP, DQ i DR (slika 4). Pri tom su neki geni multiplicirani, tj. imaju više lokusa. Eksprimiraju se kodominantno, što znači da heterozigotna jedinka na svojoj stanici može imati šest molekula MHC skupine I i više od deset molekula MHC skupine II (Andreis i sur., 2010).



Slika 4. Smještaj regije HLA na kraćem kraku 6 kromosoma kod čovjeka (Mehra i Kaur, 2003)

1.2.2. Građa MHC-a

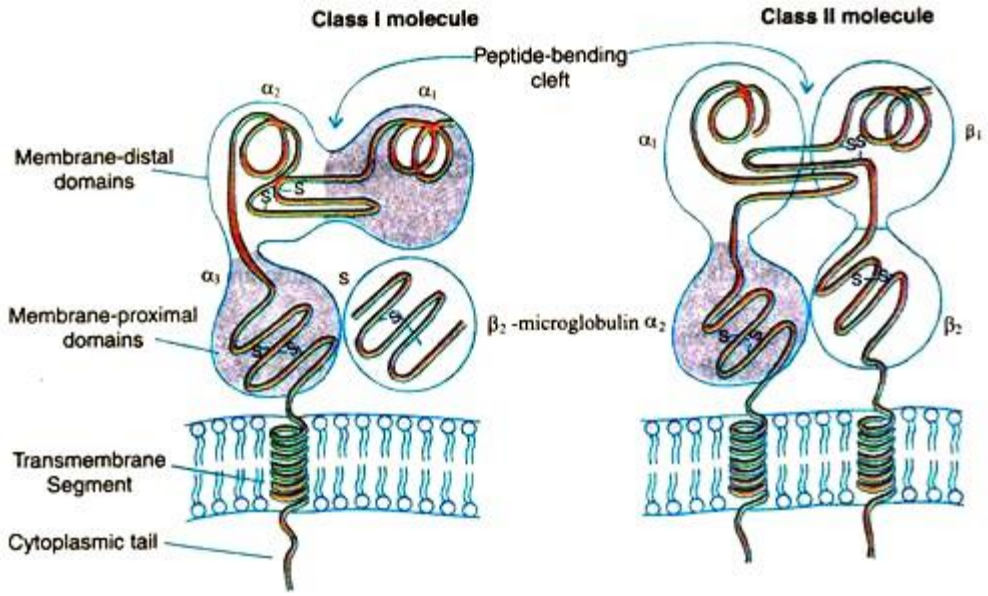
Kompleks MHC sastoji se od niza gena, a produkti tih gena nalaze se na različitim stanicama organizma. Antigen predočne stanice (engl. *antigen presenting cell*; APC) imaju zadaću na svojim membranama predočiti tuđe antigene zajedno s vlastitim antigenima MHC, što omogućuje prepoznavanje antigena i aktivaciju limfocita. Pritom predočne stanice endocitozom unose vanjske antigene, razgrađuju ih u svojim endosomima na male peptide, koji se vežu za molekule MHC II i potom prenose na površinu stanice. Predočne stanice nalaze se uglavnom u koži, limfnim čvorovima, slezeni i timusu te u krvi i limfi. Tri su glavne skupine predočnih stanica: dendritične predočne stanice, makrofagi i limfociti B. Stanice APC u koži i sluznici nazivaju se Langerhansovim stanicama i iz kože i sluznice limfnim sustavom dospijevaju u limfne čvorove, gdje u parakorteksu stupaju u dodir s limfocitima T, predočavajući im antigene. Drugu vrstu APC čine dendritične stanice u krvi, limfi, i nekim limfatičkim organima koje imaju izražene antigene sustava MHC, ali nemaju receptore za fragment Fc i C3 komponentu komplementa. Folikularne dendritičke stanice nalaze se u sekundarnim folikulima limfnih čvorova i slezene, predočavajući antigene limfocitima B; imaju izražene antigene sustava MHC, ali i receptore za fragment Fc i C3 komponentu komplementa. Stanice APC osobito su brojne u timusu i bogate su vlastitim antigenima. Obnašajući ulogu stanica APC, limfociti B i makrofagi prerađuju antigene i prikazuju ih limfocitima T, te započinju staničnu i humoralnu imunosnu reakciju. Limfociti T posredstvom T-staničnog receptora (engl. *T cell receptor;* TCR) prepoznaju antigen prikazan na površini profesionalnih APC zajedno s molekulama MHC sustava te posljedično vodi aktivaciji limfocita T i izlučivanju citokina koji pojačavaju imunoreakciju (Abbas i sur., 2010).

Geni, kao i molekule MHC dijele se na tri funkcionalne skupine: I, II i III. Molekule skupine I i II imaju središnju imunoregulacijsku ulogu jer omogućavaju preradbu i prikazivanje antigena limfocitima T. Limfocit T prepoznaje antigensku molekulu spregnuto, tako da jednim dijelom prepoznaje antigen, a drugim molekulu MHC domaćina. Skupina MHC III ima ulogu u imunoreakciji, ali nije strukturno vezana za skupine I i II, te nema ulogu u predočavanju antigena.

Funkcionalni oblik molekule MHC skupine I je heterotrimer sastavljen od α-lanca, β2-mikroglobulina i vezanog antigenskog ulomka. Dijelovi molekule su: citoplazmatski dio, transmembranski dio, dio sličan imunoglobulinu i dio α lanca koji veže peptid. Molekule MHC skupine II također su građene od polimorfnih α i β lanaca koji su međusobno nekovalentno vezani. Izvanstanični dijelovi lanca α i β mogu se podijeliti u funkcionalne podjedinice (domene) α1, α2, β1 i β2. Dio receptora koji veže antigen, za razliku od molekula MHC skupine I, ovdje zajedno

tvore α i β lanci sa svojim α1 i β1 domenama (slika 5). Preostale funkcionalne podjedinice (α2 i β2) imaju ulogu u nekovalentnom vezanju lanaca α i β (Andreis i sur., 2010).

Antigeni MHC I predočuju peptidne antigene limfocitima T $CD8^+$, a MHC II limfocitima T $CD4^+$. Molekule MHC I izražene su na svim tjelesnim stanicama s jezgrom, dok su molekule MHC II izražene na limfocitima B, makrofagima, dendritičnim stanicama, aktiviranim limfocitima T i nekim endotelnim stanicama, odnosno stanicama koje prikazuju antigen limfocitima T. To je izravno povezano s razlikom u funkciji pojedinih populacija limfocita T. Pomagački limfociti komuniciraju samo sa stanicama limfnih tkiva, a citotoksični moraju biti sposobni prepoznati bilo koju tjelesnu stanicu da bi je uklonili ako nosi tuđi antigen (Andreis i sur., 2010).



Slika 5. Struktura MHC molekula skupine I (lijevo) i skupine II (desno) (izvor:www.biologydiscussion.com)

1.2.3. Značajke

Geni MHC su među najpolimorfnijim genima u genomu sisavca, što znači da za određeni lokus u populaciji postoji veliki broj alela. To je bitno zbog velikog broja antigena koji moraju biti prepoznati kako bi se organizam obranio od patogena, pa je stoga varijabilnost tih lokusa u izravnoj korelaciji s uspješnim preživljavanjem jedinke (Bernatchez i sur. 2003). Raznolikost molekula MHC ne proizlazi samo iz posjedovanja različitih alela određenog gena već i zbog prisutnosti dupliciranih gena sa sličnim ili preklapajućim funkcijama. Zbog toga što uključuje

gene sa sličnim, ali ne identičnim strukturama i funkcijama sustav MHC nazivamo poligeničnim. Neravnoteža vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*) je stanje gdje se određena kombinacija alela različitih lokusa pronalazi češće populaciji od predviđene nasumične kombinacije. Postoje mnogobrojne teorije koje objašnjavaju uzrok nastanka takve neravnoteže, jedna od njih je i da određena kombinacija alela može pridonijeti otpornosti na određenu bolest. Polimorfizam MHC sustava nastaje zahvaljujući rekombinacijama, točkastim mutacijama i genskoj konverziji. Svaki od tih procesa doprinosi raznolikosti MHC gena unutar populacije (Kindt i sur., 2006).

Kako bi mogli bolje razumjeti značajke MHC polimorfizma potrebno je istražiti mehanizme odgovorne za održavanje raznolikosti MHC gena kroz generacije, kao i selektivne mehanizme koji održavaju i oblikuju raznolikost gena.

Kao i ostali geni eukariota, i geni MHC su građeni od introna i eksona. Eksoni su neprekinuti kodirajući dijelovi deoksiribonukleinske kiseline (DNA) dok introni predstavljaju nekodirajuća područja umetnuta između eksona. Ekson 2 se sastoji od gena za lanac α i gena za lanac β i upravo je on glavni nositelj funkcionalne raznolikosti receptora gena MHC skupine II i na tom području je utvrđena najveća raznolikost među alelima (Murray i sur., 1999). Upravo se iz toga razloga polimorfizam eksona 2 uzima kao mjerilo funkcionalne raznolikosti receptora. Raznolikost regije MHC koristi se kao pokazatelj sposobnosti populacije da se prilagodi različitim izazovima i promjenama u okolišu (Bernatchez i sur., 2003). Osim ključne imunoregulacijske uloge, MHC geni mogu utjecati i na izbor partnera za parenje, izbjegavanje partnera u srodstvu. Povezani su s određenim feromonima i utječu na ishod gravidnosti (Sommer, 2005). Geni za polimorfne olfaktorne receptore su locirani u regiji MHC, a miris je jedan od faktora koji utječe na odabir partnera. Istraživanja su pokazala kako su kod nekih sisavaca, uključujući i čovjeka, i ženke i mužjaci skloni biranju spolnih partnera s različitim molekulama MHC. Smatra se kako izbor takvog genetički različitog partnera umanjuje opasnost od parenja u srodstvu (Sommer, 2005).

Brojna istraživanja provedena su na lokusima DR i DQ gena MHC skupine II. Najviše je istraživanja provedeno na ljudima i domaćim životinjama, dok su divlje životinje kao što je medvjed tek u proučavanju (Goda, 2010). Do sada, najviše je bio proučavan lokus DRB i njegova polimorfnost u mrkog medvjeda, a slabije DQA i DQB (Goda, 2010; Kuduk, 2012). Istraživanja su od posebnog značaja za ugrožene vrste i populacije jer daju uvid u imunosnu kompetentnost i donose nova saznanja o populaciji i vrsti.

1.3. Cilj istraživanja

Cilj mog istraživanja bio je okarakterizirati lokus DQB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u mrkog medvjeda, odnosno otkriti postoji li kod jedinki medvjeda u Hrvatskoj duplicirani lokus DQB, te ako postoji odrediti koje jedinke imaju tu duplikaciju. Nadalje, ovim diplomskim radom će se utvrditi i raznolikost na lokusu DQB u populaciji mrkih medvjeda u Hrvatskoj, što će predstavljati prvo takvo istraživanje u Hrvatskoj. Zbog utjecaja genskog sustava MHC na prilagodljivost i preživljavanje populacije, rezultati dobiveni i ovom istraživanju će postaviti temelj za daljnja istraživanja te će se u konačnici koristiti i za davanje smjernica za upravljanje ovom vrstom.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorci tkiva

Za izradu ovog diplomskog rada koristila sam 50 uzoraka tkiva medvjeda. Uzorci tkiva medvjeda dopremljeni su s Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Od 50 uzoraka njih 30 je uspješno analizirano, dvije jedinke nisu analizirane do kraja, dok za 18 preostalih uzoraka nisam uspjela dobiti PCR produkte. Svi uzorci su iz Hrvatske i imaju oznaku RH, i sakupljeni su 2016. godine.

2.2. Izolacija DNA

Izolirala sam DNA iz uzoraka koristeći komercijalni paket "Wizard genomic DNA purification kit" (Promega), prema prilagođenom protokolu. Prvo sam označila epruvete od 1,5 mL oznakama uzoraka i odpipetirala 60 μL 0.5 M otopine EDTA pH 8.0 i 250 μL otopine za lizu jezgre stanice (*nuclei lysis solution*). Zatim sam usitnila komadiće uzorka skalpelom te ih dodala u epruvete. Uzorke sam protresla na miješalici i centrifugirala 10 sekundi na 14 000 okretaja u minuti (rpm). Nakon toga sam dodala 9 μL proteinaze K (20 mg/mL) i snažno vorteksirala jednu minutu. Inkubirala sam uzorke na 55 °C preko noći. Idući dan sam pričekala da se uzorci ohlade na sobnu temperaturu i centrifugirala desetak sekundi brzinom od 14 000 okretaja u minuti. Dodala sam 100 μL otopine za precipitaciju proteina (eng. *protein precipitation solution*) Zatim sam centrifugirala uzorke 4 minute na 14 000 rpm. U nove, prethodno označene epruvete od 1,5 mL odpipetirala sam 300 μL otopine 100% etanola te dodala supernatant iz prethodne epruvete. Pažljivo sam promiješala sadržaj epruvete pa centrifugirala 1 minutu na 14 000 rpm. Dekantirala sam supernatant i dodala 300 μL otopine 70% etanola te pažljivo miješala okretanjem. Ponovno sam centrifugirala 1 minutu na 14 000 rpm i odstranila supernatant pipetiranjem. Otvorene epruvete sam preokrenula na čisti filter papir i sušila na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon sušenja dodala sam 100 μL otopine za rehidraciju DNA (DNA *rehidration solution*). U posljednjem koraku sam inkubirala uzorke na +4 °C preko noći i pohranila ih na istoj temperaturi u hladnjaku do daljnje obrade.

2.3. Lančana reakcija polimerazom

Koristila sam metodu lančane reakcije polimerazom ili PCR (eng. *polymerase chain reaction*) s ciljem umnažanja eksona 2 lokusa DQB MHC sustava skupine II mrkog medvjeda. Koristila sam komercijalni komplet HotStarTaq PLUS DNA Polymerase (Qiagen). Ovaj komplet sadrži vodu bez RNA-ze i Taq PCR *master mix* (sastoji se od Qiagen PCR pufera, dNTP-ova i Taq DNA polimeraze). Komplet HotStar Taq PLUS dolazi i sa bojom Coral Load koju nisam koristila.

Početnice koje sam koristila su:

URS_DQB_F 5' AGGATTTCGTGCTCCAGYTTAAG 3'

URS_DQB_R 5' CTCGCCGCTGCRGGATGARSCTG 3' (Kuduk, 2012).

Od početnica sam napravila ″radnu otopinu″ tako da sam pomiješala 2 µL uzvodnog primera, 2 µL nizvodnog primera i 96 µL vode. Za provjeru PCR reakcija koristila sam male volumene od 8µL. Reakcijska otopina za PCR sadržavala je 4 µL *master mixa* (Quiagen), 0,8 µL radne otopine početnica, 1 µL DNA i ostatak je bila voda. Za potrebe sekvenciranja volumen sam povećala na 40 µL i tome prilagodila dodane komponente; 20 µL m*aster mixa* (Quiagen), 4 µL radne otopine početnica, 4 µL DNA i ostatak je bila voda.

Prvi stupanj PCR reakcije, aktivacije enzima, odvijao se pri 95 °C u vremenu trajanja od 5 minuta. Amplifikacija DNA se odvijala u 28 ciklusa s temperaturama denaturacije (engl. *denaturation*) na 95˚C u trajanju 30 sekundi, nalijeganja početnica (engl. *annealing*) pri temperaturi 55˚C u trajanju od 30 sekundi te elongacijom, tj. produživanjem DNA na temperaturi od 72 ˚C u trajanju od 1 minute. Nakon zadnjeg ciklusa slijedi završno produljenje lanaca u trajanju od 10 minuta pri 72 ˚C.

2.4. Agarozna gel elektroforeza

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

2.5. Sekvenciranje DNA

Za izradu ovog diplomskog rada sekvencirala sam produkte PCR svih jedinki dobivenih nakon PCR-a i elektroforeze (eksoni 2 DQB). Za usluge sekvenciranja koristila sam Macrogen-ov servis za sekvenciranje (www.macrogen.com). Koristila sam uslugu "Standard-seq single Regular". Ovom uslugom šalju se uzorci s uspješnim PCR produktom i vrši se sekvenciranje početnicama koje su korištene kao i kod PCR-a. Uzorci su sekvencirani u oba smjera (forward i reverse). U servisu sam koristila i dodatne usluge pročišćavanja PCR produkta.

2.6. Kloniranje DNA

Uzorke koji imaju tri alela podvrgnula sam kloniranju u svrhu razdvajanja gametnih faza, odnosno za identifikaciju pojedinih alela. Koristila sam komercijalni komplet "pGEMR -T easy Vector System" (Promega). Metoda se zasniva na tome da odsječak DNA (insert) koji je predmet istraživanja ugradimo u bakterijski plazmid (vektor) koji se potom unosi u bakterijsku stanicu te se taj fragment umnaža prirodnom reprodukcijom bakterija i time umnažamo (kloniramo) svoj DNA odsječak od interesa. Vektor sadrži gen koji omogućuje rast bakterijskih stanica na antibiotiku ampicilinu čime je omogućena selekcija bakterijskih stanica koje su primile plazmid budući da samo one rastu na podlozi. Vektor također sadrži *lacZ* gen koji kodira jednu podjedinicu enzima β-galaktozidaze čiji je supstrat X-Gal. Ako se u plazmide ugradio insert, *lacZ* gen je bio inaktiviran, dok ako se plazmid zatvorio bez ugradnje inserta, *lacZ* gen je ostao aktivan. Dodavanjem X-Gal-a kao supstrata β-galaktozidaze, te IPTG-a (izopropil β-D-1- tiogalakto piranozid) kao induktora laktoznog operona u podlogu, kolonije bakterija koje sadrže insert su bile bijele boje, dok su kolonije koje sadrže plazmid bez inserta bile plave boje.

Prije kloniranja, produkt PCR sam pročistila pomoću komercijalnog paketa "Wizard SV Gel and PCR clean-up system" (Promega). Nakon reakcije PCR u tubice s PCR produktom sam dodala 700 μL otopine za vezanje na membranu *(membrane binding solution*). Pripremila sam čiste tubice za skupljanje od 2 mL u koje sam stavila kolone za pročišćavanje (*SV Mini column*). U kolone sam odpipetirala otopinu s umnoženom DNA, pa sve inkubirala 1 minutu na sobnoj temperaturi te centrifugirala kolonu na 14 000 rpm, također 1 minutu. Nakon centrifugiranja odlila sam tekućinu i ispirala sa 700 μL otopine za ispiranje (*membrane wash solution*) u koju sam prethodno dodala etanol. Ponovno sam centrifugirala na 14 000 rpm 1 minutu i bacila tekućinu iz tubica za sakupljanje. Ponovno sam dodala 500 μL otopine za ispiranje i centrifugirala na 14 000 rpm 5 minuta. Bacila sam tekućinu i kolone centrigurala 1 minutu s otklopljenom centrifugom da ispare ostaci etanola. Potom sam prebacila kolonu u novu, čistu 1.5 mL tubicu i dodala 20 μL vode bez nukleaza te inkubirala na sobnoj temperaturi 1 minutu. Sve sam centrifugirala na 14 000 rpm 1 minutu. Kolone sam bacila, a u tubicama je ostala pročišćena DNA koju sam pohranila na 4 °C do sljedećeg koraka.

Proces samog kloniranja uključuje ligaciju, transformaciju bakterijskih stanica te umnažanje odabranih bakterijskih klonova. Prvi dan radila sam ligaciju, odnosno ugrađivanje željenog DNA odsječka u plazmid. Kako bi ligacijska reakcija uspjela morala sam utvrditi količinu PCR produkta koju dodajem u reakcijsku smjesu. Približnu koncentraciju DNA u PCR proizvodu sam odredila

preko elektroforeze PCR produkta i otopine DNA poznatih koncentracija tako da sam usporedila njihove jačine osvjetljenja pod UV svjetlom. Kako bi odredila koliko PCR proizvoda dodajemo u ligacijsku smjesu koristila sam sljedeću jednadžbu:

$$\frac{\text{ng vektora x kb odsječka}}{\text{kb vektora}} \times \text{insert: vektor molarni omjer} = \text{ng inserta}$$

Po protokolu proizvođač reagensa za kloniranje preporuča omjer 3:1. Koncentracija vektora je 50 ng/µl, veličina vektora je 3 kb, a odsječak koji sam klonirala je dug oko 250 parova baza (0.25 kb). Iz toga slijedi:

$$\frac{\text{50 ng vektora x 0,25 kb odsječka}}{\text{3 kb vektora}} \times \frac{3}{1} = \text{12,5 ng inserta}$$

Nakon što sam odredila potreban volumen PCR proizvoda za ligacijsku reakciju, pripremila sam ligacijsku smjesu. U epruvetu od 0,2 mL za standardnu reakciju odpipetirala sam 1 µL pGEMR-T plazmida, 1 µL T4 DNA ligaze, 5 µL pufera za brzu ligaciju, pročišćeni PCR proizvod i vode bez nukleaza do konačnog volumena (10 µL). Za negativnu kontrolu pripremila sam istu smjesu samo bez PCR produkta, a za pozitivnu kontrolu sam dodala 2 µL kontrolnog inserta umjesto PCR proizvoda. Ligacijske smjese sam ostavila preko noći na 4 °C.

Drugog dana sam radila transformaciju bakterija ligacijskom smjesom. U tu svrhu sam koristila visoko kompetentne bakterije *Escherichia coli*. Pripremila sam po dvije petrijeve zdjelice s 30 mL hranjive podloge za svaku ligacijsku reakciju. Po uputama proizvođača napravila sam LB medij koji se koristi za hranjivu podlogu. Rasporedila sam medij u petrijeve zdjelice koje sam prethodno autoklavirala i pustila da se medij skrutne.

Zatim sam dodala 100 µL 100 mM otopine IPTG-a i 20 µL 50 mg/mL otopine X-Gal-a i razmazala po površini LB krutog medija. Ostavila sam 30 minuta na 37 °C kako bi se IPTG i X-gal apsorbirao u medij. Nakratko sam centrifugirala ligacijske tubice od prethodnog dana. Pipetirala sam po 2 µL svake ligacijske reakcije u nove sterilne 1.5 mL epruvete koje su na ledu. Pažljivo sam miješala sve tubice i ostavila na ledu 20 minuta, potom 45 sekundi u vodenu kupelj na 42 °C, a zatim ponovno na led 2 minute. Taj temperaturni šok izaziva primanje plazmida u bakterije. U tubice sam dodala 950 µL tekućeg LB medija, pa potom inkubirala 1.5 sati na 37 °C uz stalno miješanje od 150 rpm. Tekući LB medij sam pripremila isto kao prethodno opisani kruti

LB medij, samo bez dodavanja 15 g agara. Nakon 1.5 sata inkubacije iz svaketubice sam pipetirala 100 μL na po dvije prethodno pripremljene LB/XGal/ampicilin/IPTG petrijeve zdjelice, pa ih sve inkubirala 24 sata na 37 °C.

Sljedeći dan pripremila sam 12 do 15 epruveta po kloniranom uzorku te sam u njih odpipetirala po 5 mL tekućeg LB medija i u svaku prenijela jednu bijelu koloniju bakterija. Epruvete sam zatim inkubirala preko noći na 37 °C uz trešnju od 200 rpm. Na ovaj način sam dodatno umnožila bakterijske kolonije, a time i specifičan insert DNA kojeg istražujem.

Posljednji korak je izolacija plazmida iz bakterija. Koristila sam komercijalni komplet "WizardR plus SV minipreps DNA purification system" (Promega) koji sadrži otopinu za resuspenziju bakterijskih stanica, otopinu za lizu bakterijskih stanica, neutralizacijsku otopinu, otopinu za ispiranje kolonica te otopinu alkalne proteaze. U prvom koraku sam centrifugirala epruvete koje sadrže bakterije, 5 minuta na 2000 rpm. Odlila sam supernatant i potom dodala 250 μL otopine za resuspenziju stanica (*cell resuspension solution*) i cijeli sadržaj (280 μL) prebacila u nove označene epruvete od 1,5 mL. Dodala sam 250 μL otopine za lizu stanica (*cell lysis solution*) te pažljivo miješala okretanjem tubica 4 puta. Dodala sam 10 μL otopine alkalne proteaze (*alkaline protease solution*). Zatim sam dodala 350 μL otopine za neutralizaciju (*neutralization solution*) i miješala okretanjem 4 puta. Sve epruvete sam centrifugirala 10 minuta na 14 000 rpm i pripremila nove kolone i epruvetice od 1,5 mL. Nakon centrifuge odlila sam supernatant u kolonu i centrifugirala 1 minutu na 14 000 rpm. Potom sam vadila kolonu, izlijevala otopinu iz epruvete i vraćala kolonu u epruvetu. Pipetirala sam 750 μL otopine za ispiranje (*column wash solution*) u kolonu, centrifugirala 1 minutu na 14 000 rpm i ponavljala postupak izlijevanja otopine iz epruvete. Zatim sam ponovila prethodni korak s 250 μL otopine za ispiranje i centrifugirala 2 minute na 14 000 rpm. Bacila sam epruveticu s otopinom i uzela novu 1,5 mL tubicu u koju sam stavila kolonu. Pipetirala sam 50 μL vode bez nukleaza u kolonu i centrifugirala 1 minutu na 14 000 rpm, nakon čega sam bacila kolonu, a epruvetu s plazmidom spremila na 4 °C. Prisutnost inserta sam provjerila PCR-om i elektroforezom prije slanja na sekvenciranje. Sekvencira se dio plazmida koji sadrži klonirani DNA odsječak a koriste se početnice uobičajene za PCR lokusa DQB.

2.7. Analiza polimorfnih konformacija jednolančane DNA (SSCP)

SSCP (*Single-strand Conformation Polymorphism*) je metoda analize polimorfnih konformacija jednolančane DNA. Ovom metodom moguće je razdvojiti alelne varijante (npr. produkte PCR jednake dužine) na temelju razlika u sekvenci. Koristi se za brzu detekciju poznatih i nepoznatih polimorfizama fragmenta DNA i jako je jednostavna metoda (Šeruga Musić 2007). Temelji se na različitoj elektroforetskoj pokretljivosti jednolančanih fragmenata DNA primarnih struktura. Prvi dan napravila sam 8%-tni PA-gel (29:1) s 2,5% glicerola, što znači da na 29 molekula akrilamida (AA) dolazi 1 molekula N,N'-metilen-*bis*-akrilamida (BIS). Zatim sam priremila kadicu u koju ću uliti poliakrilamidni gel. Prvo sam otopila 200 mg amonijevog persulfata (APS) u 2 mL vode i dobila 10%-tnu otopinu. Zatim sam u dvije čaše razdvojila sastojke za gel. U prvu čašu ulila sam vodu, 10x TBE (tris-borat-etilendiamin tetraoctena kiselina)-SSCP (pufer), glicerol i 10%-tni amonijev persulfat (APS). U drugu čašu sam stavila 40%-tni AA, TEMED (tetrametiletilendiamin) i 2%-tni BIS. Zatim sam te dvije čaše pomiješala i brzo ulila u kadicu za gel i ostavila da se stisne. Nisam smjela sve miješati u jednoj čaši jer ako odmah pomiješam APS (inicijator) i TEMED (katalizator) doći će do brze polimerizacije. Drugi dan sam provela elektroforezu svih uzoraka za koje sam pretpostavila da imaju tri alela (RH005-16, RH0044-16, RH093-16, RH102-16, RH169-16, RH171-16). Uzela sam po 1 µL svakog uzorka. Prvi korak je denaturacija uzorka u obojenom puferu za denaturaciju. Stavila sam 1 µL uzorka i 9 µL boje BFB (*bromphenol blue)* i zagrijavala 10 min pri 99 ˚C u termobloku. Time sam osigurala denaturaciju DNA-fragmenata. Denaturirane uzorke sam stavila na led do nanošenja na gel jer DNA lanci moraju ostati odvojeni. Nakon nanošenja uzoraka u gel slijedi vertikalna elektroforeza u TBE-puferu 3 h na 200 V pri 4˚C. Po završetku elektroforeze slijedi bojanje srebrom. Protokol za bojanje srebrom sastoji se od nekoliko koraka:

1) Inkubacija u otopini za fiksaciju (etanol 50% i ledena octena kiselina 10%) – 1h na tresilici
2) Ispiranje deioniziranom vodom – 3x ponoviti postupak
3) Inkubacija u otopini srebrovog nitrara – 1 h
4) Ispiranje deioniziranom vodom – 3x ponoviti postupak
5) Razvijanje do pojave vidljivih pruga

Da bi rezultati, odnosno vrpce jednolančane DNA na gelu bile vidljive, provela sam razvijanje do pojave vidljivih pruga u otopini za razvijanje (KOH 0.75M, formaldehid 0.28% - 10,525 g + 2 mL, te ostatak do 250 mL deionizirana voda). Rezultate sam pogledala na VIS transiluminatoru i dokumentirala fotografiranjem digitalnom kamerom.

2.8. Računalna obrada podataka

2.8.1. BioEdit

BioEdit je programski paket koji sadrži opcije za obradu i manipuliranje nukleotidnim i aminokiselinskim sljedovima. U svome radu BioEdit sam koristila za pregled sekvenci , a na onim uzorcima koji su uspjeli koristila sam implementirani ClustalW za višestruko poravnavanje i usporedbu dobivenih nukleotidnih sljedova DNA (Hall, 1999).

2.8.2. SeqScape

Za identifikaciju dobivenih alela koristila sam SeqScape program (Applied Biosystems SeqScape® software). SeqScape je programski paket pomoću kojega se može raditi detekcija i analiza mutacija nukleinskih kiselina, tipizacija i podtipizacija patogena, identifikacija alela, otkrivanje i potvrđivanje polimorfizama jedne baze (SNP), te potvrda i usporedba sljedova. Razdvaja alele naslijeđene od svakog roditelja (gametne faze) i uspoređuje ih s referentnom knjižnicom u kojoj su pohranjeni svi poznati aleli za određeni lokus određene životinjske vrste. U slučaju da program ne pronađe alel koji se u potpunosti podudara s pohranjenim podacima, prikazuju se aleli s najmanjim brojem nepodudarnih nukleotidnih mjesta, a ako se ne pronađe podudarna kombinacija, za pretpostaviti je da je otkriven novi alel. U slučaju alela koje je SeqScape proglasio "novima" pristupilo se kloniranju produkata PCR u plazmidnom vektoru.

2.8.3. Uspostavljanje referentne knjižnice

Referentna knjižnica za alele lokusa DQB izrađena je pomoću alela spremljenih u gensku bazu GenBank (NCBI - National Center for Biotechology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov/). Računalna baza podataka GenBank, pretraživana je korištenjem alata BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Za lokus DQB u GenBank pronađena su 53 alela koji su korišteni u svrhu izrade referentne knjižnice alela. Knjižnica je proširena alelima pronađenim u ovom istraživanju.

2.8.4. MEGA

Programski paket MEGA (eng. *molecular evolutionary genetics analysis*) (Tamura i sur. 2013) omogućuje analizu i usporedbu aminokiselinskih i nukleotidnih sljedova s ciljem istraživanja filogenetske povijesti i donošenja zaključaka o molekularnoj evoluciji određenih gena ili vrsta. Omogućava nukleotidni i aminokiselinski ispis, prevođenje nukleotidnih sljedova u aminokiselinske, izračunavanje nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti među alelima istog lokusa, te određivanje broja varijabilnih mjesta u svakom alelu. Modeli nukleotidne, odnosno aminokiselinske supstitucije su odabrani na temelju preporuke istog programskog paketa nakon odabira modela (*model selection)'* analize statističkom metodom *"maximum likelihood*". Program bira najbolji model supstitucije prema Bayesovom informacijskom kriteriju (*Bayesian Information Criterion*). Za analizu nukleotidnih slijedova koristila sam JC+G model, a za aminokiselinske sljedove JTT model. JC (Jukes – Cantor) model uzima u obzir nejednak udio različitih nukleotida u sekvenci. Gama (G) parametar pretpostavlja da varijacije u učestalosti supstitucija među različitim nukleotidnim mjestima imaju oblik gama distribucije (Tamura i sur., 2011). Model JTT (Jones-Taylor-Thornton) aminokiselinske supstitucije uzima u obzir višestruke aminokiselinske supstitucije opisane supstitucijskim matricama (Tamura i sur., 2011).

Osim toga, vrlo je važan i omjer sinonimnih i nesinonimnih mutacija. Sinonimne supstitucije su one kod kojih je došlo do promjene u samom kodonu, ali taj novi kodon nosi šifru za istu aminokiselinu kao i prethodni. Kod nesinonimnih supstitucija promijenjeni kodon nosi šifru za drugačiju aminokiselinu, pa je tako proteinski produkt izmijenjen.

Omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija koristi se za dN/dS test kojim se procjenjuje dugotrajni učinak prirodne selekcije na određeni genski lokus kroz evolucijsku povijest. Ovaj test temelji se na pretpostavci da se radi o neutralnoj evoluciji ukoliko je broj sinonimnih i nesinonimnih mutacija podjednak; ukoliko prevladavaju sinonimne mutacije radi se o negativnoj selekciji, a ukoliko prevladavaju nesinonimne mutacije genski lokus je pod utjecajem pozitivne selekcije koja podržava prisutnost novih genskih produkata (proteina) u populaciji. Test dN/dS također utvrđuje vjerojatnost odbacivanja nulte hipoteze, to jest pretpostavke da se radi o neutralnoj evoluciji (dN=dS) (Kryazhimskiy i sur., 2005). Test dN/dS provodi se pomoću Nei-Gojobori metode (Nei i Gojobori, 1986). Za utvrđivanje selekcije, tj.statističke vjerojatnosti da postoji pozitivna selekcija (da se na lokusu kroz duži evolucijski period odvijala pozitivna selekcija) koristila sam Codon Based Z-test of Selection.

3.REZULTATI

3.1. Aleli mrkog medvjeda

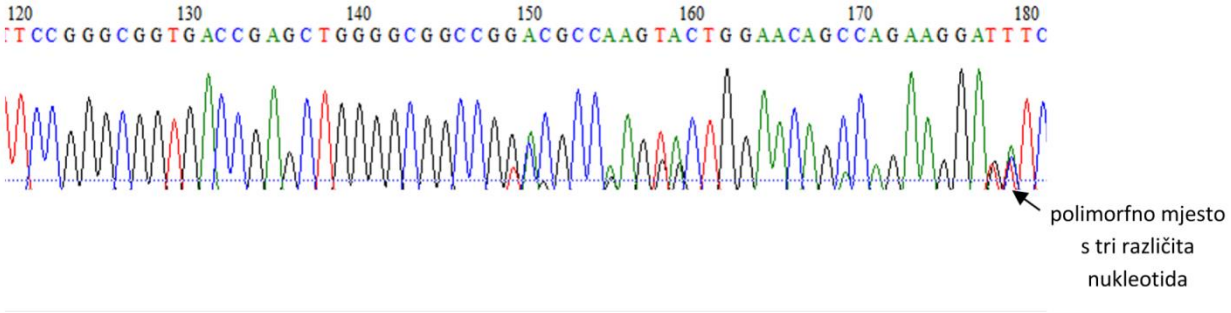
Za izradu ovog diplomskog rada istraživala sam ukupno 50 uzoraka tkiva mrkog medvjeda. Od 50 uzoraka uspješno je analizirano njih 30, dvije nisu do kraja analizirane (RH097-16 i RH098-16), dok za 18 preostalih uzoraka nisam uspjela dobiti produkte PCR. Istraživanje je provedeno na eksonu 2 DQB lokusa. Dobivni PCR produkt dugačak je 224 pb i nije obuhvatio cijeli ekson čija je duljina 267 pb što daje produkt od 89 aminokiselina. Početnica URS_DQB_F (Fv) sjeda na 20. nukleotidnom mjestu, dok reverzna URS_DQB_R (Rv) sjeda na 224. nukleotidnom mjestu.. U istraživanom uzorku pronađeno je ukupno šest alela lokusa DQB od kojih su tri nova (tablica 1).

Tablica 1.Pronađeni DQB aleli, njihova učestalost, apsolutni broj i homozigoti utvrđeni kod 30 jedinki mrkog medvjeda (*Ursus arctos*).

ALELI		UČESTALOST	APSOLUTNI BROJ	HOMOZIGOTI
RH102_7_M13F	dvoalelne jedinke	22	15	6
	troalelne jedinke	8,9	6	
	ukupno	**30,9**	**21**	
Urar DQB*03	dvoalelne jedinke	16,2	11	0
	troalelne jedinke	11,8	8	
	ukupno	**27,9**	**19**	
Urar DQB*04	dvoalelne jedinke	16,2	11	0
	troalelne jedinke	11,8	8	
	ukupno	**27,9**	**19**	
Urar DQB*01	dvoalelne jedinke	5,9	4	2
	troalelne jedinke	3	2	
	ukupno	**8,8**	**6**	
Urth DQB*0401var	dvoalelne jedinke	3	2	1
	troalelne jedinke	/	/	
	ukupno	**3**	**2**	
Urth DQB*0401vv	dvoalelne jedinke	1,5	1	0
	troalelne jedinke	/	/	
	ukupno	**1,5**	**1**	

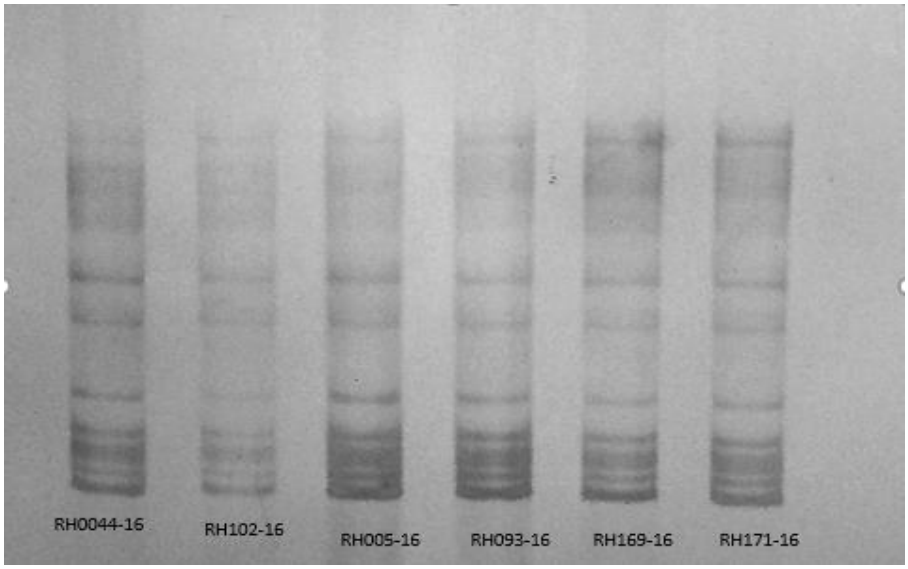
Od 30 jedinki kojima sam uspješno odredila genotip, njih osam je imalo tri alela (tablica 2). Prve naznake triju alela našla sam pregledom sekvenci u BioEditu na temelju trostrukih vršKova (slika 6) na određenim nukleotidnim pozicijama koje sam uočila kod šest jedinki. Te jedinke nisu mogle biti analizirane programom SeqScape. Dvije od tih jedinki (RH0044-16 i RH102-16) su klonirane i kod njih je utvrđeni novi alel koji je dobio radno ime RH102_7_M13F.

Obje klonirane jedinke imale su isti genotip: Urar DQB*03/Urar DQB*04/RH102_7_M13F. Elektroferogrami ostale četiri troalelne jedinke ukazivali su da bi njihovi genotipovi mogli biti identični ovim dvjema kloniranim.



Slika 6. Primjer elektroferograma jedinke s tri vrška. Slikano u programu BioEdit (izvor: Radović T., 2018)

Provela sam metodu SSCP da istražim mogućnost identičnih genotipova. Rezultati su pokazali da i preostale uočene troalelne jedinke imaju SSCP profil identičan jedinkama RH0044-16 i RH102-16, što ukazuje na to da imaju i identične genotipove (slika 7).



Slika 7. Uzorci s tri alela mrkog medvjeda (*Ursus arctos*) analizirani metodom SSCP

Produkt PCR iz jedinke RH0031-16 je kloniran jer analiza programom SeqScape nije mogla definirati genotip. Sumnjala sam na novi alel. Kloniranje je međutim pokazalo, da jedinka nosi tri poznata alela. Uz to, uzorak iz jedinke RH002-16 je pokazivao identični elektroferogram, te je njen troalelni genotip pretpostavljen na temelju jedinke RH0031-16. Genotip ovih dviju jedinki je Urar DQB*03/Urar DQB*04/Urar DQB*01, međutim prvotno nisu identificirane kao troalelne jedinke jer nukleotidne pozicije s trostrukim vršcima nisu bile prisutne.

Preostale 22 jedinke kojima sam uspješno odredila genotip imale su po dva alela. One su analizirane programom SeqScape i unutar njih su utvrđena tri alela poznata iz ranijih istraživanja o medvjedima, i to: Urar DQB*01, Urar DQB*03 i DQB*04 s pristupnim brojevima genske banke (GenBank): JX469892, JX469894 i JX469895 (Kuduk, 2012). Nadalje, kod devet jedinki je pronađen i naš novootkriveni alel RH102_7_M13F. Osim RH102_7_M13F, na istraženom uzorku pronašli smo još dva nova alela. Alel radnog naziva Urth DQB*0401var utvrđen je kod homozigotne jedinke i potvrđen sekvenciranjem dva neovisna uzorka PCR-a, pa nije bilo potrebe za kloniranjem. Alel radnog naziva Urth DQB*0401vv pronađen je kod jedne heterozigotne jedinke i njegov nukleotidni slijed je utvrđen nakon kloniranja. Alel Urth DQB*0401vv u odnosu na Urth DQB*0401var ima razliku na 109. nukleotidnom mjestu.

Genotipovi 24 dvoalelne jedinke prikazani su u tablici 3. Genotip dviju jedinki nije definiran jer pokazuju nove polimorfizme na 166. i 167. nukleotidnom mjestu, a molekularnim kloniranjem za sada nisam uspjela definirati njihov genotip.

Prema zastupljenosti najučestaliji alel je RH 102_7_M13F, koji se nalazi s učestalošću od 30,9% (tablica 1). Odmah iza njega slijede Urar DQB*03 i Urar DQB*04 čija je učestalost jednaka i iznosi 27,9%.Urar DQB*01 ima učestalost 8,8%. Alel Urth DQB*0401var utvrđen je kod jedinke RH133-16 u homozigotnom stanju i njegova učestalost iznosi 3%. Urth DQB*0401vv je utvrđen samo kod heterozigotne jedinke RH0045-16 i njegova učestalost iznosi 1,5% (tablica 1). Učestalost alela za svaki pojedini alel izračunata je kao apsolutni broj pojavljivanja tog alela u istraživanom uzorku podijeljen s ukupnim brojem alela (68) u uzorku.

Tablica 2. Genotipovi osam troalelnih jedinki mrkog medvjeda (*Ursus arctos*). Masno otisnute jedinke su klonirane. Istom bojom pozadine su označeni identični genotipovi.

JEDINKA	**ALELI DQB LOKUSA**		
RH002-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04	Urar DQB*01
RH005-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04	RH102_7_M13F
RH0031-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04	Urar DQB*01
RH0044-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04	RH102_7_M13F
RH093-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04	RH102_7_M13F
RH102-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04	RH102_7_M13F
RH169-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04	RH102_7_M13F
RH171-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04	RH102_7_M13F

Tablica 3. Genotipovi 24 dvoalelne jedinke mrkog medvjeda (*Ursus arctos*). Masno otisnute jedinke su klonirane.

JEDINKA	**ALELI DQB LOKUSA**	
RH004-16	Urar DQB*01	RH102_7_M13F
RH0012-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04
RH0015-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04
RH0042-16	RH102_7_M13F	RH102_7_M13F
RH0043-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04
RH0045-16	RH102_7_M13F	Urth DQB*0401vv
RH0085-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04
RH0086-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04
RH0087-16	RH102_7_M13F	RH102_7_M13F
RH089-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04
RH096-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04
RH097-16*	/	/
RH098-16*	/	/
RH103-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04
RH105-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04
RH117-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04
RH118-16	Urar DQB*01	Urar DQB*01
RH133-16	Urth DQB*0401var	Urth DQB*0401var
RH142-16	RH102_7_M13F	RH102_7_M13F
RH144-16	Urar DQB*03	Urar DQB*04
RH152-16	RH102_7_M13F	RH102_7_M13F
RH153-16	RH102_7_M13F	RH102_7_M13F
RH160-16	RH102_7_M13F	RH102_7_M13F
RH168-16	Urar DQB*01	RH102_7_M13F

*jedinke koje nisu mogle biti analizirane programom SeqScape

Nukleotidni ispis pronađenih alela lokusa DQB prikazan je na slici 8., a aminokiselinski ispis na slici 9. Broj varijabilnih mjesta na nukleotidnim sekvencama je 29, dok je aminokiselinskih varijabilnih mjesta 18.

```
Urar-DQB*01_1       GGC   GAG   TGC   TAC   TTC   ACC   AAC   GGG   ACG   GAG [30]
Urar-DQB*03_1       ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ..A   ... [30]
Urar-DQB*04_1       T..   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ... [30]
RH102_7_M13F        ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ..A   ... [30]
Urth-DQB*0401var    ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ..A   ... [30]
Urth-DQB*0401vv     ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ..A   ... [30]

Urar-DQB*01_1       CGG   GTA   CGG   GGT   GTG   GAC   AGA   TAC   ATC   TAT[ 60]
Urar-DQB*03_1       ...   ..G   ...   ...   ...   AC.   ...   C..   ...   ... [60]
Urar-DQB*04_1       ...   ..G   ...   TAC   C..   A..   ...   ...   ...   ... [60]
RH102_7_M13F        ...   ..G   ...   ...   ...   AC.   ...   ...   ...   ... [60]
Urth-DQB*0401var    ...   ..G   ...   CTC   C..   AC.   ...   ...   ...   ... [60]
Urth-DQB*0401vv     ...   ..G   ...   CTC   C..   AC.   ...   ...   ...   ... [60]

Urar-DQB*01_1       AAC   CGG   GAG   GAG   TAC   GTG   CGC   TAC   GAC   GAC [90]
Urar-DQB*03_1       ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   .T.   ...   AG. [90]
Urar-DQB*04_1       ...   ...   ...   ...   ...   ...   .A.   ...   ...   ... [90]
RH102_7_M13F        ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   .T.   ...   AG. [90]
Urth-DQB*0401var    ...   ...   ...   ...   .T.   ...   .A.   ...   ...   AG. [90]
Urth-DQB*0401vv     ...   ...   ...   ...   .T.   ...   .A.   ...   ...   AG. [90]

Urar-DQB*01_1       GAC   GTG   GGG   GAG   CAC   CGG   GCG   GTG   ACG   GAG [120]
Urar-DQB*03_1       ...   ...   ...   ...   ...   ..A   ...   ...   ...   ... [120]
Urar-DQB*04_1       ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ... [120]
RH102_7_M13F        ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ... [120]
Urth-DQB*0401var    ...   ...   ...   ...   T..   ...   C..   ...   ...   ... [120]
Urth-DQB*0401vv     ...   ...   ...   ...   T..   ...   g..   ...   ...   ... [120]

Urar-DQB*01_1       CTG   GGG   CGT   CAC   TCC   GCT   GAG   TAC   TTC   AAC [150]
Urar-DQB*03_1       ...   ...   ..G   .CG   GA.   ...   ...   ...   .GG   ... [150]
Urar-DQB*04_1       ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ... [150]
RH102_7_M13F        ...   ...   ..G   .C.   AT.   ...   ...   ...   ...   ... [150]
Urth-DQB*0401var    ...   ...   ..G   .CG   GA.   ...   ...   ...   ...   ... [150]
Urth-DQB*0401vv     ...   ...   ..G   .CG   GA.   ...   ...   ...   ...   ... [150]

Urar-DQB*01_1       CAG   CAG   AAG   GAC   TTC   ATG   GAG   CGG   AAG   CGG [180]
Urar-DQB*03_1       ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   .A.   .C.   ... [180]
Urar-DQB*04_1       ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ... [180]
RH102_7_M13F        ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   .A.   .C.   ... [180]
Urth-DQB*0401var    ...   ...   ...   ...   A..   ...   ...   .A.   .C.   ... [180]
Urth-DQB*0401vv     ...   ...   ...   ...   A..   ...   ...   .A.   .C.   ... [180]

Urar-DQB*01_1       GCC   GAG   GTG   GAC   ACG   GTG   TGC   AGA   CAC   AAC [210]
Urar-DQB*03_1       ...   .C.   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ... [210]
Urar-DQB*04_1       ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ... [210]
RH102_7_M13F        ...   .C.   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ... [210]
Urth-DQB*0401var    ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ... [210]
Urth-DQB*0401vv     ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ...   ... [210]
```

```
Urar-DQB*01_1       TAC    CAG    ATT    GAG    GA     [224]
Urar-DQB*03_1       ...    ...    ...    ...    ..     [224]
Urar-DQB*04_1       ...    ...    ...    ...    ..     [224]
RH102_7_M13F        ...    ...    ...    ...    ..     [224]
Urth-DQB*0401var    ...    ...    ...    ...    ..     [224]
Urth-DQB*0401vv     ...    ...    ...    ...    ..     [224]
```

Slika 8. Nukleotidni ispis DQB alela utvrđenih u 30 jedinki mrkog medvjeda (*Ursus arctos*)

```
Urar-DQB*01_1           GECYFTNGTE RVRGVDRYIY NREEYVRYDD  [30]
Urar-DQB*03_1           .......... .....T.H.. .......F.S  [30]
Urar-DQB*04_1           C......... ...YLN.... ......H...  [30]
RH102_7_M13F            .......... .....T.... .......F.S  [30]
Urth-DQB*0401var        .......... ...LLT.... ....F.H..S  [30]
Urth-DQB*0401vv         .......... ...LLT.... ....F.H..S  [30]

Urar-DQB*01_1           DVGEHRAVTE LGRHSAEYFN QQKDFMERKR  [60]
Urar-DQB*03_1           .......... ...PD...W. .......QT.  [60]
Urar-DQB*04_1           .......... .......... ..........  [60]
RH102_7_M13F            .......... ...PI..... .......QT.  [60]
Urth-DQB*0401var        ....Y.P... ...PD..... ....I..QT.  [60]
Urth-DQB*0401vv         ....Y..... ...PD..... ....I..QT.  [60]

Urar-DQB*01_1           AEVDTVCRHN YQIE [74]
Urar-DQB*03_1           .A........ .... [74]
Urar-DQB*04_1           .......... .... [74]
RH102_7_M13F            .A........ .... [74]
Urth-DQB*0401var        .......... .... [74]
Urth-DQB*0401vv         .......... .... [74]
```

Slika 9. Aminokiselinski ispis DQB alela utvrđen u 30 jedinki mrkog medvjeda (*Ursus arctos*)

3.2. Evolucijska udaljenost

Parametre evolucijske udaljenosti odredila sam pomoću ponuđenih modela u programu MEGA. Statističkom analizom program predlaže najprikladniji model nukleotidne i aminokiselinske supstitucije koristeći "m*aximum likelihood"* metodu za određene sekvence. Koristeći JC (*Jukes – Cantor*) + G model odredila sam nukleotidnu udaljenost koja iznosi 15,4%. Za izračunavanje aminokiselinske udaljenosti u programu MEGA je predložen JTT (*Jones-Taylor-Thornton)* model kojim sam izračunala da je aminokiselinska udaljenost 19%. Procjene evolucijske udaljenosti za lokus DQB mrkog medvjeda su prikazane u tablici 5.

Tablica 5. Dužina sekvence, nukleotidna udaljenost d, aminokiselinska udaljenost, broj varijabilnih nukleotidnih i aminokiselinskih mjesta, broj jedinstvenih aminokiselinskih sekvenci za lokus DQB mrkog medvjeda (*Ursus arctos*) u Hrvatskoj.

LOKUS	Dužina sekvence	Nukleotidna udaljenost		Aminokiselinska udaljenost		Broj varijabilnih mjesta nukleotida	Broj varijabilnih mjesta aminokis.	Broj jedinstvenih aminokis. sekvenci
		MODEL	d	MODEL	d			
DQB	224pb	JC+G	0,154	JTT	0,190	29	18	6

3.3. Procjena postojanja selekcije određivanjem omjera dN/dS

Prirodna selekcija snažan je evolucijski faktor koji može djelovati na frekvenciju alela unutar populacije. Procijenila sam stopu sinonimnih (dS) i nesinonimnih (dN) mutacija i njihov omjer u svrhu određivanja tipa selekcije na istraživanom lokusu. Omjer dN/dS iznosi 1,4 što je rezultat veće učestalosti nesinonimnih mutacija u odnosu na sinonimne. Međutim, Z-test je pokazao da djelovanje pozitivne selekcije na istraženom lokusu nije vjerojatna jer p vrijednost iznosi 0,19 što je veće od 0,05 koliko treba iznositi da bi bio dokaz pozitivne selekcije (stopa nesinonimnih mutacija statistički je neznačajno veća od stope sinonimnih mutacija), te mogu zaključiti da ova vrijednost dN/dS nije dovoljni pokazatelj, odnosno nije pravi dokaz pozitivne selekcije (Tablica 6).

Tablica 6. Prosječna stopa sinonimnih (dS) i nesinonimnih (dN) mutacija, p vrijednost i tip selekcije

LOKUS	**dN**	**dS**	**dN/dS**	**p**	**Tip selekcije**
DQB	0,076	0,054	1,4 (dN>dS)	0,19	pozitivna

4. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je okarakterizirati lokus DQB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti mrkog medvjeda iz Hrvatske, i ovo je prvo takvo istraživanje. Geni MHC su ključna komponenta imunološkog sustava sisavaca i najpolimorfniji kodirajući dijelovi DNA, te upravo zbog izrazite raznolikosti, nastale i održavane djelovanjem selekcije, služe kao dobar molekularni biljeg za proučavanje adaptivne evolucije. Budući da je raznolikost MHC gena direktno povezana sa sposobnošću prepoznavanja i obrane od različitih patogena, vrlo je bitno raditi istraživanja raznolikosti gena MHC u nekoj populaciji u svrhu procjene mogućnosti preživljavanja te populacije ili vrste (Sommer, 2005). Raznolikost molekula MHC ne proizlazi samo iz posjedovanja različitih alela određenog gena već i zbog prisutnosti dupliciranih gena sa sličnim ili preklapajućim funkcijama (Kindt i sur., 2006).

Istraživanje sam radila na 50 uzoraka mrkog medvjeda iz Hrvatske, a identificirala sam alele (genotipove) za 30 jedinke. Nisam uspjela dobiti rezultate za 18 jedinki (za njih nisam uspijevala uopće dobiti produkte PCR) od kojih sam naposljetku i odustala, dok dvije jedinke nisu analizirane do kraja. Nemogućnost dobivanja PCR produkta pripisujem u prvom redu neodgovarajućim početnicama URS_DQB_F i URS_DQB_R (Kuduk, 2012). Naime, pregledom genotipova uočila sam da je prisutan značajan broj homozigotnih jedinki, tim više što je u dijelu uzorka prisutna je duplikacija lokusa. Stoga pretpostavljam da se radi o početnicama koje ne umnažaju sve alele prisutne u populaciji. S tim su u skladu činjenice da je rijedak alel Urar DQB*0401var nađen kod homozigotne jedinke. Vrlo je teško konstruirati dobre početnice kad su lokusi jako polimorfni, kao što je slučaj DQB lokusa (Babik, 2010). Osim toga, postoji mala mogućnost da DNA, iako izolirana iz svježeg tkiva nije bila dobre kvalitete. Većina uzoraka tkiva za moje istraživanje je od medvjeda koji su ubijeni od strane lovaca, jer godišnje postoji određena kvota koju moraju ispuniti, dok je vrlo mali broj iz medvjeda stradalih u prometu. Tim uzorcima bi mogla pripisati lošu kvalitetu DNA.

U uzorcima obuhvaćenim ovim istraživanjem pronašla sam šest alela lokusa DQB od kojih su tri novootkrivena. Aleli Urar DQB*01, Urar DQB*03 i Urar DQB*04 su tipični aleli za mrke medvjede, pronađeni u ranijim istraživanjima skandinavskih mrkih medvjeda (Goda 2010, Kuduk, 2012). Alel s najvećom frekvencijom unutar populacije bio je novootkriveni RH 102_7_M13F s učestalošću od 30,9%. Na temelju dosadašnjih rezultata možemo pretpostavit da je ovaj alel karakterističan za naše područje ili za južnu Europu s obzirom da nije nađen u skandinavskoj populaciji. Takvo tumačenje rezultata u skladu je s diverzificirajućom selekcijijom koja

podrazumijeva geografske varijacije polimorfizma MHC. Naime, različiti selekcijski pritisak u različitim okolišima ima za posljedicu prostorne varijacije u polimorfizmu MHC. Isto tako postojanje geografske varijacije bi se moglo objasniti kao posljedica djelovanja genetičkog drifta. Relativne udjele genetičkog drifta i selekcije na nastanak raznolikosti MHC je teško razlučiti, posebno kada selekcija i prolaz populacije kroz usko grlo djeluju istovremeno (Alcaide, 2010). Nekoliko studija je pokazalo da genetički drift može nadvladati selekciju (Radwan i sur., 2007, Babik sur., 2008, Miller i sur., 2010, Sutton i sur., 2011).

Aleli Urar DQB*03 i Urar DQB*04 pojavljuju se jednakom učestalošću od 27,9%, te ova dva alela dolaze uvijek skupa. Pronađeni su u 11 dvoalelnih i 8 troalelnih jedinki. S obzirom da su aleli DQB*03 i Urar DQB*04 prisutni u svakoj od troalelnih jedinki, mogu pretpostaviti da pripadaju dupliciranim lokusima i da se nasljeđuju zajedno, kao dvolokusni haplotip, te su oba alela naslijeđena od majke ili od oca. Tijekom evolucije je kod mrkog medvjeda došlo do duplikacije gena DQB, a duplikacija je prisutna kod određenog broja jedinki. U našem uzorku su tri alela, koja nesumnjivo ukazuju na duplikaciju lokusa, utvrđena kod 25% jedinki. Međutim, dvolokusni haplotip Urar DQB*03/ Urar DQB*04 prisutan je kod još 10 jedinki, pa možemo pretpostaviti da je udio troalelnih jedinki u uzorku znatno veći. MHC je poznat po visokoj neravnotežnoj vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*), što rezultira nasljeđivanjem alelnih kombinacija ili haplotipova (Garrigan i Hedrick, 2003). To je stanje gdje se određena kombinacija alela različitih lokusa pronalazi češće u populaciji od predviđene nasumične kombinacije, a pretpostavlja se da su uobičajene kombinacije alela favorizirane prirodnom selekcijom. Ne mogu pretpostaviti pripadnost alela pojedinom od dupliciranih lokusa. Duplikacija lokusa DQB utvrđena je i u skandinavskoj populaciji, gdje je pronađeno da četiri alela u istraživanju 26 jedinki pripadaju dvama lokusima (Kuduk, 2012). Duplikacija lokusa MHC karakteristična je za gene MHC i predstavlja jedan od mehanizama za povećanje genskog polimorfizma. Utvrđena je u sustavu HLA kod ljudi, kao i u brojnom divljim vrstama (Axtner i Sommer 2007, Bollmer i sur., 2010).

Jedinke RH005-16, RH0044-16, RH093-16, RH102-16, RH169-16 i RH171-16 imaju tri alela (tablica 3, označene svijetlo ljubičastom bojom pozadine), te sve imaju iste alele i to: Urar DQB*03, Urar DQB*04 i RH 102_7_M13F. Za ovih šest jedinki provela sam metodu SSCP. Na temelju pretpostavke (nakon kloniranja jedinki RH0044-16 I RH102-16) da ostale četiri jedinke (RH005-16, RH093-16, RH169-16 i RH171-16) imaju identične genotipove provela sam i metodu SSCP. Uspostava metode SSCP i napravljenog referentnog profila za analizu gena DQB medvjeda u Hrvatskoj trebala bi rezultirati bržom, jednostavnijom i jeftinijom analizom genske raznolikosti,

budući da bi smanjila potrebu za molekularnim kloniranjem, a samim time i dodatnim sekvenciranjem, te tako uštedjela i vrijeme i novac.

Neke troalelne jedinke nisam odmah uočila nakon heterozigotnog ispisa, tek nakon daljnjeg istraživanja i provođenja molekularnog kloniranja. Kod jedinki RH002-16 i RH031-16 (tablica 3, označene tamno ljubičastom bojom pozadine) pronašla sam treći alel tek nakon izvršenog molekularnog kloniranja. Na heterozigotnom ispisu tih jedinki u programu SeqScape niti jedna nukleotidna pozicija nije imala tri vrška. Kod njih su sva tri prisutna alela poznata, Urar DQB*03, UrarDQB*04 i Urar DQB*01.

Pronašla sam i dva vrlo rijetka alela koji su po nukleotidnom sastavu najbliži alelu Urth DQB*0401 (Yasukochi, 2012). Imenovala sam ih sa Urth DQB*0401var koji ima razlike na šest nukleotidnih mjesta u odnosu na Urth DQB*0401, te Urth DQB*0401vv koji se u odnosu na Urth DQB*0401var razlikuje na samo jednom mjestu.

Ukupno je ustanovljeno 29 varijabilnih nukleotidnih mjesta od 224, te 18 varijabilna aminokiselinska od 74 mjesta. Jedanaest nukleotidnih supstitucija nije rezultiralo promjenom aminokiseline. Nukleotidne udaljenosti (d) i aminokiselinske udaljenosti (d) u ovom istraživanju iznosile su 15,4% i 19%. Aminokiselinske udaljenosti na utvrđenim alelima lokusa DQB pokazale su se većima od nukleotidnih udaljenosti. Evolucijske udaljenosti među alelima rezultat su nukleotidnih ili aminokiselinskih razlika među njima, te su tako ujedno i izravan pokazatelj njihove raznolikosti. Nukleotidne udaljenosti su u skladu s udaljenostima β-lokusa na drugim vrstama, jer je lokus DQB izrazito polimorfan. Broj jedinstvenih aminokiselinskih sekvenci je 6. To ukazuje na to da selektivno u populaciji opstaju novi proteinski oblici. Novi aminokiselinski sljedovi daju nove proteinske receptore.

Postojanje selekcije na određenim lokusima utvrđuje se različitim testovima koji istražuju djelovanje selekcije na tri vremenske razine: u sadašnjoj generaciji, kroz povijest populacije i tijekom evolucije vrste (Sommer, 2005; Bernatchez i sur., 2003). Najdublji trag ostavlja selekcija koja se događala na nekom lokusu kroz evoluciju vrste (Bernatchez i sur., 2003). Pretpostavlja se da je genska regija MHC pod utjecajem ravnotežne selekcije. Ravnotežna selekcija dovodi do toga da se aleli održavaju tijekom dugog evolucijskog perioda i čak često opstaju tijekom razdvajanja vrsta, što rezultira time da u različitim vrstama možemo naći slične ili čak identične alele. Jedan od najčešćih testova koji se koristi za dokazivanje selekcije kroz evoluciju vrste na nekom lokusu je test dN/dS (Hughes i Nei, 1988.). Tim se testom utvrđuje omjer između nesinonimnih nukleotidnih supstitucija (dN) i sinonimnih ili ‘’tihih’’ mutacija (dS) koje ne rezultiraju

proteinskom promjenomStopa nesinonimnih nukleotidnih supstitucija (dN) i sinonimnih smutacija (dS) u našem istraživanju su iznosile su dN = 0.076 i dS = 0.054. Dobiven rezulat omjera nesinonimnih i sinonimnih mutacija je 1.4 što ukazuje na to da je lokus pod utjecajem pozitivne selekcije. Međutim, p vrijednost hipoteze testiranja neutralne evolucije je 0,19. Takva statistička značajnost ne ukazuje da se može odbaciti nul-hipoteza (neutralna evolucija) u korist alternativne hipoteza (djelovanje pozitivne selekcije). Mogu zaključiti da dobiveni omjer dN/dS, čija je vrijednost veća od 1, daje naznake pozitivne selekcije. Isto tako, u istraživanju dviju populacija skandinavskih smeđih medvjeda (Kuduk, 2012) dN/dS omjer je bio nešto veći od 1, dok je p vrijednost je iznosila 0,472 što nije uvjerljivi dokaz pozitivne selekcije, kao i kod mog istraživanja. Za temeljitije istraživanje selekcije potrebno je upotrijebiti testove koji analiziraju pojedinačne kodone, jer pozitivna selekcija ne djeluje na čitavom genu, s obzirom na to de su neki od kodona konzervirani.

4. ZAKLJUČAK

U istraživanom uzorku od 30 jedinki mrkog medvjeda (*Ursus arctos*) iz Hrvatske pronašla sam šest alela lokusa DQB genotipizacijom.

U osam jedinki sam identificirala po tri alela lokusa DQB, dok sam u 22 jedinke identificirala po dva alela, što ukazuje na to da je lokus DQB dupliciran barem u dijelu jedinki populacije mrkog medvjeda iz Hrvatske.

Svaki alel pronađen u ovom istraživanju daje svoj jedinstveni aminokiselinski slijed. Molekularnim kloniranjem sam pronašla tri nova alela, i dala im radna imena RH_102_M13F, Urth DQB*0401var i Urth DQB*0401vv. Aleli Urar DQB*01, Urar DQB*03 i Urar DQB*04 otprije su poznati.

Istraživani dio eksona 2 lokusa DQB duljine 224 pb sadrži 29 varijabilnih nukleotidnih mjesta, te 18 varijabilnih aminokiselinska mjesta. Aminokiselinske evolucijske udaljenosti za istraživani lokus veće su od nukleotidnih udaljenosti.

Omjer dN/dS procijenjen na cijelom nukleotidnom slijedu je pokazao vrijednost od 1.4, ali zbog male p vrijednosti nije uvjerljivi dokaz djelovanja pozitivne selekcije.

Kako je ovo prvo ovakvo istraživanje u Hrvatskoj, moji rezultati će doprinjeti za daljnja istraživanja regija MHC kod mrkih medvjeda (*Ursus arctos*) i porodice Ursidae.

5.LITERATURA

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. (2010): Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders/Elsevier.

Alcaide M. (2010): On the relative roles of selection and genetic drift in shaping MHC variation. Molecular Ecology **19**:3842–3844.

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

Axtner J, Sommer S (2007): Gene duplication, allelic diversity, selection processes and adaptive value of MHC class II DRB genes of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. Immunogenetics **59**:417-426

Babik W., Pabijan M., Radwan J. (2008): Contrasting patterns of variation in MHC loci in the Alpine newt. Mol Ecol **17**:2339–2355.

Babik W. (2010): Methods for MHC genotyping in non-model vertebrates. Molecular Ecology **10**, 237–251

Bartol M., Černe R., Krofel M., Wilson S.M., Stergar M., Huber Đ., Berce T., Jerina K., Majić Skrbinšek A., Knauer F., Rauer G., Kavčič I., Mohorović M., Marinko U., Groff C., Luštrik R., Reljić S. (2016): Smeđi medvjed u Dinaridima i Alpama. Brošura izrađena u okviru LIFE DINALP BEAR. Veterinarski fakultet, Zavod za biologiju, Zagreb

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

Bišćan A., Budor I., Domazetović Z., Gospočić S., Grubešić M., Huber Đ., Jeremić J., Križaj D., Sindičić M., Šprem N., Šurbat T., Tomljanović M. (2017): Akcijski plan gospodarenja smeđim medvjedom u Republici Hrvatskoj u 2017.godini

Bollmer J.L., Dunn P.O., Whittingham L.A., Wimpee C. (2010): Extensive MHC Class II B Gene Duplication in a Passerine, the Common Yellowthroat (*Geothlypis trichas*). Journal of Heredity **101**(4):448-460

Chapron, G., Quenette, P.-Y., Legendre, S., Clobert, J. (2003): Which future for theFrench Pyrenean brown bear (*Ursus arctos*) population? An approach usingstage-structured deterministic and stochastic models. C. R. Biol. **326** (Suppl. 1),174–182.

Clark, J.D., Huber D., Servheen, C. (2002): Bear reintroductions: lessons and challenges. Ursus **13**, 335–346.

Garrigan D., Hedrick PW (2003): Perspective: detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. Evolution **57**(8):1707–1722

Goda N., Mano T., Kosintsev P., Vorobiev A., Masuda R. (2010): Allelic diversity of the MHC class II DRB genes in brown bears (Ursus arctos) and a comparison of DRB sequences within the family Ursidae. Tissue Antigens 2010, **76**(5):404–410.

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

Huber Đ., Jakšić Z., Frković,A., Štahan Ž., Kusak J., Majnarić D., Grubešić M., Kulić B., Sindičić M., Majić Skrbinšek A., Lay V., Ljuština M., Zec D., Laginja R., Francetić I. (2008): Plan gospodarenja smeđim medvjedom u Republici Hrvatskoj. Ministarstvo regionalnog razvoja, šumarstva i vodnoga gospodarstva, Uprava za lovstvo

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

Kindt T. J., Osborne B. A., Goldsby R. A. (2006): Kuby Immunology Sixth Edition. Freeman, W. H. & Company, New York

Klein J., Figueroa I., (1986): Evolution of the major histocompatibility complex. Critical Rewiews in Immunology **4**: 295-386.

Kocijan I., Galov A., Ćetković H., Kusak J., Gomerčić T., Huber Đ. (2011): Genetic diversity of Dinaric brown bears (Ursus arctos) in Croatia withimplications for bear conservation in Europe. Mammalian biology, **76**: 615-621

Kryazhimskiy S., Plotkin J. B. (2008): The Population Genetics of dN/dS. PLoS Genetics **4**, 1-10.

Kruckenhauser, L., Rauer, G., Daubl, B., Haring, E. (2009): Genetic monitoring of afounder population of brown bears (Ursus arctos) in central Austria. Conserv.Genet. **10**, 1223–1233.

Kuduk K., Babik W., Bojarska K., Śliwińska E.B., Kindberg J., Taberlet P., Swenson J.E., Radwan J. (2012): Evolution of major histocompatibility complex class I and class II genes in the brown bear. Evolutionary Biology, **12**: 1471-2148

Mehra N. K., Kaur G. (2003): MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. Expert Reviews in Molecular Medicine **5**: 1-17.

Miller HC, Allendorf F, Daugherty CH (2010) Genetic diversity and differentiation at MHC genes in island populations of tuatara (*Sphenodon spp*.). Mol Ecol **19**:3894–3908.

Murray B., Michaud B., White B. (1999): Allelic and haplotype variation of major histocompatibility complex class II DRB1 and DQB loci in the St.Lawrence beluga (Delphinapterus leucas). Molecular Ecology **8**: 1127-1139.

Penn D. J. (2002): Major Histocompatibility Complex (MHC). Encyclopedia of life sciences : 1-7.

Radović T. (2018): Uspostava referentnog panela SSCP profila za analizu gena DRB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti jelena (*Cervus elaphus*)

Radwan J, Kawalko A, Wojcik JM, Babik W (2007): MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. Mol Ecol 16:531–540.

Rauer, G., 1997. First experiences with the release of 2 female brown bears in theAlps of Eastern Austria. Int. Conf. Bear Res. Manage. 9 (2), 91–95.

SeqScape Software v2.5 Quick Reference Guide (2004): Applied Biosystems, https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041493.pdf (stranica posjećena 21.12.2017.)

Sommer S., Schwab D., Ganzhorn J.U. (2002): MHC diversity of endemic Malagasy rodents in relation to range contraction and social system. Behavioral Ecology and Sociobiology **51**, 214-221.

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

Sutton JT, Nakagawa S, Robertson BC, Jamieson IG (2011): Disentangling the roles of natural selection and genetic drift in shaping variation at MHC immunity genes. Molecular Ecology **20**:4408–4420.

Šeruga Musić M., Krajačić M., Škorić D. (2007): Evaluation of SSCP analysis as a tool for detection of phytoplasma molecular variability. Bulletin of Insectology **60**, 245-246

Taberlet, P., Mattock, H., Dubois-Pagnon, C., Bouvet, J. (1993): Sexing free-rangingbrown bears Ursus arctos using hairs found in the field. Molecular Ecology **2**, 399–403.

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.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution **28**, 2731-2739.

Quenette, P.Y., Alonso, M., Chayron, L., Cluzel, P., Dubarry, E., Dubreuil, D., Palazon,S., Pomarol, M. (2001): Preliminary results of the first transplantation of brownbears in the French Pyrenees. Ursus **12**, 115–120.

www.dzzp.hr (stranica posjećena 30.11.2017.)

www.ministarstvo-gospodarstva.hr (stranica posjećena 21.12.2017.)

www.biologydiscussion.com (stranica posjećena 21.12.2017.)

www.lovac.info (stranica posjećena 30.11.2017.)

www.savjetodavna.hr/savjeti/14/487/zastita-stoke-od-zvijeri/ (stranica posjećena 30.01.2018.)

8. ŽIVOTOPIS

Osnovni osobni podatci

Lucija Perica

Datum rođenja: 19.05.1992., Split

mail: lucija.perica10@gmail.com

Obrazovanje

- 1998. – 2005. - OŠ Stobreč
- 2005. - 2010. - Nadbiskupijska klasična gimnazija "Don Frane Bulić", Split
- 2011. – 2015. - Preddiplomski studij Biologija i Kemija, Prirodoslovno - matematički fakultet Split
- 2015. – 2018. - Diplomski studij Fiziologija i imunobiologija, Prirodoslovno - matematički fakultet Zagreb

Profesionalno iskustvo

Sudjelovanje na Festivalu znanosti, tema "Sunce" 2015. godine u Splitu

Ostale vještine

Engleski jezik (razumijem i govorim), Francuski jezik (slabo)

Spretna sam u radu s računalom i novim tehnologijama, te posjedujem iskustvo u radu s Microsoft Word-om, Excel-om i Power Point-om

Vozačka dozvola B-kategorije

Aktivno bavljenje sportom