



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Mr. Snježana Ćurković

**POLIMORFIZAM I SELEKCIJA GENA SKUPINE II
GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI U
POPULACIJI DOBROGA DUPINA (*TURSIOPS
TRUNCATUS*) IZ JADRANSKOGA MORA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Mr. Snježana Ćurković

**POLYMORPHISM AND SELECTION IN THE
MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II
IN BOTTLENOSE DOLPHIN (*TURSIOPS
TRUNCATUS*) FROM THE ADRIATIC SEA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Mr. SNJEŽANA ĆURKOVIĆ

**POLIMORFIZAM I SELEKCIJA GENA SKUPINE II
GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI U
POPULACIJI DOBROGA DUPINA (*TURSIOPS
TRUNCATUS*) IZ JADRANSKOGA MORA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Doc. dr. sc. Martina Đuras
Doc. dr. sc. Ana Galov

Zagreb, 2014.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Mr. Snježana Ćurković

**POLYMORPHISM AND SELECTION IN THE
MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II
IN BOTTLENOSE DOLPHIN (*TURSIOPS
TRUNCATUS*) FROM THE ADRIATIC SEA**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Assist. Prof. Martina Đuras
Assist. Prof. Ana Galov

Zagreb, 2014

Zahvaljujem mentoricama doc. dr. sc. Martini Đuras i doc. dr. sc. Ani Galov koje su me svojim izuzetno velikim znanjem i stručnim savjetima vodile tijekom izrade doktorskog rada. Dr. sc. Haidi Arbanasić zahvaljujem na stručnoj pomoći prilikom kloniranja i statističke obrade podataka. Za stručnu pomoć kod obrade filogenetskih podataka zahvaljujem dr. sc. Martini Podnar Lešić. Doc. dr. sc. Tomislavu Gomerčiću zahvaljujem na stručnoj i tehničkoj pomoći pri obradi slika. Doc. dr. sc. Hrvoju Luciću i dr. sc. Darinki Škrtić zahvaljujem na stručnoj pomoći prilikom prikupljanja i obrade materijala te velikoj podršci u radu. Prof. dr. sc. Damiru Miheliću zahvaljujem na pruženoj pomoći pri upisu na doktorski studij. Predstojnici Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, prof. dr. sc. Snježani Vuković, zahvaljujem na stručnim savjetima i velikom razumijevanju tijekom izrade i pisanja doktorskog rada. Djelatnicima Zavoda i dragim prijateljima hvala na podršci i dobrim željama za uspjeh. Suprugu Romanu i sinu Tinu veliko hvala što su uz mene u svakom trenutku i što su mi podrška u svemu onome što radim.

SAŽETAK

POLIMORFIZAM I SELEKCIJA GENA SKUPINE II GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI U POPULACIJI DOBROGA DUPINA (*TURSIOPS TRUNCATUS*) IZ JADRANSKOGA MORA

Dobri dupin (*Tursiops truncatus*) jedini je morski sisavac koja stalno nastanjuje Jadransko more, a zbog malog broja životinja u populaciji i jakog antropogenog utjecaja u njegovom staništu proglašen je zaštićenom vrstom. Važan čimbenik za prilagodbu i dugoročno preživljavanje ovakvih ugroženih i izoliranih populacija je genetička raznolikost. Smatra se da stupanj raznolikosti gena glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC gena) odražava sposobnost populacije da se odupre određenom broju patogena. Naime, MHC geni uključeni su u prepoznavanje patogena i pokretanje imunskog odgovora, jer kodiraju membranske glikoproteinske receptore čija je uloga prikazivanje antigena T-limfocitima. U 50 dobrih dupina iz Jadranskoga mora i 12 dobrih dupina iz drugih područja Sredozemnog mora istražen je ekson 2 DRA, DQA i DQB lokusa MHC gena skupine II primjenom molekularnih metoda (izolacija DNA, PCR, kloniranje, sekvenciranje) i računalnih programa. Identificirani su aleli za navedene lokuse i tro-lokusni haplotipovi, određena je njihova učestalost, analizirano je djelovanje selekcije i izrađena je filogenetska analiza. Najmanje je polimorfan DRA lokus (3 alela), znatno veći polimorfizam pokazuje DQA lokus (10 alela), a najpolimorfniji je DQB lokus (12 alela). Od ukupnog broja utvrđenih alela, 13 je novoutvrđenih alela. U populaciji dobroga dupina iz Jadranskoga mora utvrđeno je 12 DRA/DQA/DQB haplotipova, a u dobrih dupina iz ostalih područja Sredozemnog mora 11. Pet DRA/DQA/DQB haplotipova dolazi samo u dobrih dupina Jadranskoga mora, jedan haplotip je specifičan za istočni dio Sredozemnog mora, a tri za zapadni dio što ukazuje na moguće strukturiranje populacija unutar Sredozemnog mora uslijed raznih selekcijskih pritisaka. Značajno veći broj nesinonimnih u odnosu na sinonimne supstitucije unutar DQA i DQB lokusa podupire pretpostavku o djelovanju pozitivne selekcije na navedenim lokusima, koja je viša od one prikazane u prethodnim istraživanjima kitova, te odgovara razini pozitivne selekcije utvrđene u kopnenih sisavaca. Nalaz trans-specijskog polimorfizma na DQA i DQB lokusima upućuje na to da se neki aleli ili alelne linije održavaju tijekom dugog evolucijskog perioda, što je dokaz balansirajuće selekcije.

Ključne riječi: MHC geni, dobri dupin, *Tursiops truncatus*, Jadransko more, DRA lokus, DQA lokus, DQB lokus, pozitivna selekcija, polimorfizam

EXTENDED ABSTRACT

POLYMORPHISM AND SELECTION IN THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II IN BOTTLENOSE DOLPHIN (*TURSIOPS TRUNCATUS*) FROM THE ADRIATIC SEA

INTRODUCTION

The bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) is the only marine mammal species resident in the Adriatic Sea. It is considered endangered and its small population is protected under Croatian law. Genetic diversity is essential for adaptability and long-term persistence of small and isolated populations, so adaptively important genes relevant to conservation were analyzed. Major histocompatibility complex (MHC) is thought to be crucial for pathogen presentation to immune cells and initiation of the immune response. The extreme polymorphism of these genes is believed to be maintained by balancing selection. The aims of this study were to examine the genetic diversity and evolutionary history at MHC class II DRA, DQA and DQB loci from the bottlenose dolphin population from the Adriatic Sea.

MATERIALS AND METHODS

Tissue samples from 50 bottlenose dolphins from the Adriatic Sea were collected from 1997 until 2011 and 12 specimens from other Mediterranean locations. Total genomic DNA was extracted from muscle tissue and skin. Regions of exon 2 in the MHC II genes DRA, DQA and DQB were amplified using appropriate primers. PCR products were sequenced. New alleles were confirmed by sequencing in both directions and DNA cloning. Sequence processing, allele and haplotype identification, balancing selection testing and phylogenetic analysis were performed with appropriate computer programs.

RESULTS

A total of 25 alleles were found at exon 2 in the MHC II genes DRA, DQA and DQB. Thirteen identified alleles were new, while 12 alleles were previously described. DRA locus showed negligible variability (3 alleles) compared to considerable sequence variation of the DQA (10 alleles) and DQB locus (12 alleles). The alleles combined to form 12 DRA/DQA/DQB haplotypes in the bottlenose dolphin population from the Adriatic Sea and 11 haplotypes in bottlenose dolphins from other areas of the Mediterranean Sea. Five haplotypes, two DQA alleles and four DQB alleles appeared to be specific for Adriatic Sea

samples, as they were absent in individuals from other locations. Three DQA alleles and three DQB alleles found in other Mediterranean locations and not present in the Adriatic Sea gave rise to three unique haplotypes. Significantly higher non-synonymous substitution rates than synonymous was found in DQA and DQB sequences indicating balancing selection at both loci. Phylogenetic analysis of DQB sequences confirmed trans-species polymorphism among the ordo Cetacea.

CONCLUSION

The low variability at the DRA bottlenose dolphin locus is comparable to the low variability of the DRA locus in other vertebrate species. In contrast, DQA and DQB loci displayed considerable sequence variation. The highest diversity determined in the DQB locus is consistent with the finding that most class II MHC polymorphism is concentrated in the beta genes. Unique haplotypes suggest population structuring among different locations of the Mediterranean Sea. Positive selection acts at both highly variable loci. Trans-species polymorphism at the DQB locus indicates the influence of balancing selection in the long term. The balancing selection observed in the bottlenose dolphins is higher than that reported from most other cetaceans and comparable to that seen in terrestrial mammals.

Key words: MHC genes, bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, Adriatic Sea, DRA locus, DQA locus, DQB locus, positive selection, polymorphism

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	4
2.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC)	5
2.2. MHC geni divljih životinja	8
2.3. Dobri dupin (<i>Tursiops truncatus</i>).....	10
3. OBRAZLOŽENJE TEME	14
4. MATERIJAL I METODE	17
4.1. Uzorci tkiva dobrog dupina.....	18
4.2. Molekularna analiza	22
4.2.1. Izolacija DNA	22
4.2.2. Lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> , PCR).....	23
4.2.3. Elektroforeza na agaroznom gelu i pročišćavanje PCR produkata	25
4.2.4. Sekvenciranje PCR produkata.....	26
4.3. Računalna obrada nukleotidnih sljedova i identifikacija alela.....	26
4.4. Molekularno kloniranje	27
4.5. Genetičke analize računalnim programima.....	30
5. REZULTATI	34
5.1. Značajke odabranih lokusa MHC skupine II dobroga dupina.....	35
5.1.1. DRA lokus.....	35
5.1.2. DQA lokus.....	38
5.1.3. DQB lokus.....	42
5.2. Tro-lokusni haplotipovi DRA/DQA/DQB	47
5.2.1. Haplotipovi DRA/DQA/DQB u populaciji dobroga dupina iz Jadranskoga mora.....	47
5.2.2. Haplotipovi DRA/DQA/DQB u dobrim dupina iz ostalih područja Sredozemnoga mora.....	49
5.3. Testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže.....	50
5.4. Evolucijske udaljenosti među alelima DRA, DQA i DQB lokusa dobroga dupina.....	50
5.5. Selekcija na DQA i DQB lokusima dobroga dupina.....	51

5.6. Filogenetska analiza DQA i DQB alela dobroga dupina.....	56
5.7. Rekombinacije.....	60
6. RASPRAVA.....	61
7. ZAKLJUČCI.....	71
8. POPIS LITERATURE.....	74
9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA.....	91

1. UVOD

Dobri dupin (*Tursiops truncatus*) jedina je vrsta morskih sisavaca koja stalno nastanjuje Jadransko more (GOMERČIĆ i HUBER, 1989.; NOTARBARTOLO DI SCIARA i BEARZI, 1992.; GOMERČIĆ i sur., 1994.; NOTARBARTOLO DI SCIARA i sur., 1994.; BEARZI i NOTARBARTOLO DI SCIARA, 1995.; BEARZI i sur., 1997.; GOMERČIĆ i sur., 1998.; BEARZI i sur., 2000.). Pripada redu kitova (Cetacea), podredu kitova zubana (Odontoceti) te porodici šiljatozubih dupina (Delphinidae). Široko je rasprostranjena vrsta i nastanjuje sva svjetska mora i oceane (JEFFERSON i sur., 1993, RICE 1998.), a jedino ne živi u morima polarnog područja (LEATHERWOD i REEVES, 1983.).

U Republici Hrvatskoj dobri dupin je ugrožena vrsta i zbog svoje male brojnosti je strogo zaštićen Pravilnikom o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (Narodne novine 99/09), te Zakonom o zaštiti prirode (Narodne novine 70/05, 139/08, 57/11). Ujedno, dobri dupin podliježe i međunarodnim ugovorima i to Sporazumu o zaštiti kitova (Cetacea) u Crnom moru, Sredozemnom moru i susjednom atlantskom području (ACCOBAMS) (Narodne novine - Međunarodni ugovori, 6/2000), Konvenciji o zaštiti migratornih vrsta divljih životinja (CMS) (Narodne novine - Međunarodni ugovori 6/2000) i Međunarodnoj konvenciji za regulaciju kitolova (IWC) (Narodne novine - Međunarodni ugovori 6/2006). Zbog smanjenja brojnosti i potencijalne geografske izoliranosti, populaciji dobrog dupina u Jadranskom moru prijete izumiranje.

Genetička raznolikost smatra se nužnim čimbenikom za mogućnost prilagodbe i dugoročno preživljavanje populacije (CONNER i HARTL, 2004.). Dosadašnja istraživanja genetičke raznolikosti dobrih dupina iz Jadranskog mora koristila su neutralne biljege za koje se smatra da nisu pod utjecajem prirodne selekcije, a to su mikrosatelitski lokusi i dio kontrolne regije mitohondrijske deoksiribonukleinske kiseline (mt DNA) (GALOV, 2007.; GALOV i sur., 2011; DIVAC BRNIĆ, 2012.). Provedena istraživanja dala su početnu procjenu genetičke raznolikosti populacije dobrog dupina iz Jadranskog mora. Osim neutralnih biljega postoje i adaptivni genski biljezi, kao što su geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC, engl. major histocompatibility complex) za koje se smatra da su pod utjecajem prirodne selekcije, te su odgovorni za imunosnu kompetentnost jedinke i populacije.

Iako su prvobitno otkriveni kao čimbenik o kojem ovisi uspješnost transplantacije organa, MHC geni imaju ključnu ulogu u imunosnom sustavu kralježnjaka. Pokazali su se izrazito raznolikima u većini do sada istraživanih vrsta i prema dosadašnjim istraživanjima smatra se da raznolikost MHC alela odražava spremnost populacije da prepozna i odupre se velikom broju različitih patogena (SOMMER, 2005.). Raznolikost je posebno izražena u dijelu lokusa koji se naziva 2. radna jedinica, ekson 2. Ekson 2 MHC gena skupine II je

hipervarijabilan i kodira domenu receptora koja prepoznaje i veže antigen. Upravo se iz toga razloga polimorfizam eksona 2 uzima kao mjerilo funkcionalne raznolikosti receptora. Raznolikost MHC regije koristi se kao pokazatelj sposobnosti populacije da se prilagodi različitim izazovima i promjenama u okolišu. Smatra se da u ovom trenutku najbolji sustav za procjenu mogućnosti prilagodbe vrste na promjene u okolišu predstavlja baš MHC regija, zbog svojih važnih i jedinstvenih funkcija u pokretanju imunosnog odgovora (BERNATCHEZ i LANDRY, 2003., SOMMER, 2005.). Istraživanja su od posebnog značaja za ugrožene vrste i populacije (GARRIGAN i HEDRICK, 2003.) jer daju uvid u imunosnu kompetentnost i donose nova saznanja o populaciji i vrsti.

Na temelju dosadašnjih istraživanja smatra se da na MHC lokuse djeluje ravnotežna selekcija koja pretpostavlja postojanje većeg broja alela za određeni lokus u populaciji (HEDRICK, 1999.; YANG i sur., 2005.). Jednaki aleli mogu biti prisutni u različitim, ali bliskim vrstama što ukazuje da su aleli stariji od vrste i imaju porijeklo u zajedničkom pretku. Zaključci o srodnosti alela i njihovom porijeklu donose se utvrđivanjem filogenetskih odnosa.

U posljednjih nekoliko godina provedena su istraživanja vezana uz raznolikost MHC regije u raznim vrstama dupina diljem svijeta (YANG i sur. 2005; XU i sur., 2007.; YANG i sur., 2007.; YANG i sur., 2008.; VASSILAKOS i sur., 2009.; HEIMEIER i sur., 2009.; XU i sur., 2009.). Međutim, u dobroj dupina raznolikost MHC lokusa istražena je jedino u populaciji koja naseljava vode Tajvana (YANG i sur., 2007.; YANG i sur., 2008.).

Ova disertacija predstavlja prvo istraživanje raznolikosti MHC gena dobrih dupina Jadranskoga mora, ali i općenito dobrih dupina ostalih europskih mora uključujući i cijelo Sredozemno more. Istraživanjem će se utvrditi početna procjena imunosne kompetentnosti što je od izuzetnog značaja s obzirom na činjenicu da je veliki postotak populacije dobrih dupina zaražen patogenima (DURAS GOMERCIC i sur., 2008.). S obzirom na to da se MHC trenutno smatra najboljim adaptivnim genskim sustavom koji daje objašnjenje kako prirodna selekcija promiče lokalnu adaptaciju na genskoj razini, nasuprot migracijama i genskom driftu, (BERNATCHEZ i LANDRY, 2003) omogućiti će nam da dođemo do novih saznanja o populaciji i vrsti. Rezultati istraživanja pomoći će nam da dođemo do konačnog cilja, a to je bolja zaštita brojnih ugroženih i zaštićenih životinjskih vrsta kao što je i dobri dupin u Jadranskom moru.

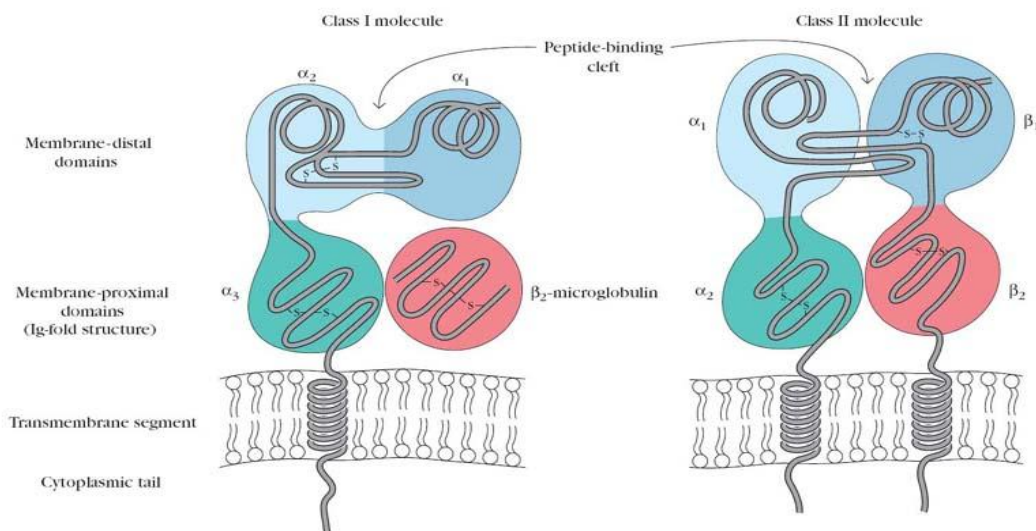
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC)

Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti ili MHC geni (engl. major histocompatibility complex) su geni koji su uključeni u pokretanje adaptivnog imunskog odgovora i predstavljaju najvažniju gensku komponentu imunskog sustava kralježnjaka (KLEIN, 1986.; KLEIN i FIGUEROA, 1986.). Kao sustav, MHC se pojavio prije otprilike 528 do 766 milijuna godina i javlja se samo u čeljustoustih kralježnjaka (DANCHIN i sur., 2004.). MHC genska porodica uključuje visoko polimorfne kodirajuće gene za transmembranske glikoproteine koji imaju ključnu ulogu u pokretanju imunskog odgovora (KENNEDY i sur., 2002.). Osnovna svojstva MHC genskog kompleksa su poligenost (sastoji se od velikog broja gena) i polimorfnost (geni u populaciji postoje u više alternativnih oblika, alela), odnosno njihova izrazito velika genetička raznolikost. MHC geni kodiraju membranske glikoproteinske receptore koji su izraženi na stanicama kralježnjaka. Primarna uloga receptora je prikazivanje proteinskih antigena T-limfocitima (MATSUMURA i sur., 1992.). MHC geni koji sudjeluju u prikazivanju antigena su najpolimorfnije lokusi koji kodiraju proteine do danas poznate u kralježnjaka (HEDRICK, 1994.; HUGHES i HUGHES, 1995.). Među vrstama, ali isto tako i unutar vrsta, postoji visok stupanj polimorfizma na MHC lokusima tako da u nekoj populaciji za pojedini lokus može biti prisutan veliki broj alela. U ljudi je utvrđeno da je nukleotidna raznolikost među alelima, za dva reda veličine, veća od genomskog prosjeka (GAUDIERI i sur., 2000.; GARIGAN i HEDRICK, 2003.). Značajno svojstvo MHC gena je njihova kodominantna ekspresija, odnosno od oba roditeljska alela nastaju proteinski produkti (glikoproteinski receptori) izraženi na površini stanica. Polimorfna nukleotidna mjesta po kojima se aleli razlikuju su koncentrirana unutar hipervarijabilnih regija. Hipervarijabilne regije kodiraju dio receptora u obliku žlijeba u koji naliže antigenski peptid i taj dio receptora naziva se vezno mjesto (engl. peptid-binding region, PBR). Utvrđeno je da vezna mjesta receptora pokazuju visok stupanj različitosti kako u broju alela koji ih kodiraju tako i u aminokiselinskim sljedovima koji ih grade (HUGHES i YEAGER, 1998.).

S obzirom da postoje razlike u građi i načinu djelovanja receptora, geni koji ih kodiraju su podijeljeni u dvije potporodice, MHC geni skupine I i MHC geni skupine II (KLEIN i sur., 1986.). MHC geni skupine I u organizmu se izražuju (ekspimiraju) u svim stanicama s jezgrom. Njihova funkcija je kodiranje receptora koji prikazuju unutarstanične antigene (npr. nekih virusa i tumorskih antigena) citotoksičnim T-limfocitima. Proteinski antigeni unutarstaničnog porijekla razgrađuju se pomoću enzima do peptida i u endoplazmatskoj mrežici nastaje kompleks peptid/MHC receptor skupine I kojeg nakon

izlaganja na površini stanice prepoznaju citotoksični T-limfociti. MHC receptor skupine I sastoji se od tri izvanstanične domene (α_1 , α_2 i α_3). Varijabilne domene α_1 i α_2 formiraju žlijeb zatvorenih krajeva koji služi za vezivanje antigenskih peptida veličine 8 do 10 aminokiselina. Konstantna α_3 domena veže se za CD8⁺ molekule na citotoksičnim T limfocitima. β_2 mikroglobulin MHC receptora skupine I je kodiran nepolimorfnim genom koji ne pripada MHC kompleksu. MHC geni skupine II u organizmu su eksprimirani u specijaliziranim stanicama koje prikazuju antigen, a to su dendritične stanice, makrofagi i B-limfociti. Njihova funkcija je prikazivanje izvanstaničnih antigena (npr. bakterija i različitih parazita) pomoćničkim T-limfocitima. Ove stanice fagocitiraju izvanstanične patogene, prerađuju ih i izlažu na svojoj površini u okviru MHC receptora skupine II (KLEIN i sur., 1997.; DENGJEL i sur., 2005.). Receptori MHC skupine II sastoje se od dvije izvanstanične domene α_1 i α_2 , odnosno β_1 i β_2 . Varijabilne domene α_1 i β_1 formiraju žlijeb otvorenih krajeva za vezivanje antigenskih peptida veličine 10 do 30 aminokiselina. Konstantna β_2 domena veže se za CD4⁺ molekule na pomoćničkim T limfocitima. Slika 1 prikazuje građu MHC receptora skupine I i skupine II.



Slika 1. Prikaz građe MHC receptora skupine I (lijevo) i skupine II (desno) (preuzeto s www.immuneweb.com)

Iako su MHC geni i njihovi produkti (aleli i haplotipovi) izrazito polimorfni, njihova genetička raznolikost nije prisutna u svim MHC genima. Opsežna i brojna istraživanja razine raznolikosti MHC gena skupine II provedena su na DQ i DR lokusima. To su najčešće

istraživani lokusi u ljudi (CHU i sur., 1994.; BONTROP i sur., 1999.), u raznih vrsta kopnenih sisavaca (YUHKY i O'BRIEN, 1997.; WAGNER i sur., 1999.; MIKKO i sur., 1999.), ali isto tako u morskih sisavaca (MURRAY i sur., 1999.; BOWEN i sur., 2002.; BAKER i sur., 2006.; YANG i sur., 2007.; XU i sur., 2007.).

MHC geni skupine II, kao i ostali geni eukariota, građeni su od eksona i introna. Eksoni su neprekinuti kodirajući dijelovi deoksiribonukleinske kiseline (DNK) dok introni predstavljaju nekodirajuća područja umetnuta između eksona. Istraživanja su pokazala kako je upravo ekson 2 svakog lokusa koji se sastoji od gena za α i gena za β lanac glavni nositelj funkcionalne raznolikosti receptora, te kako je upravo na tom području utvrđena najveća različitost među alelima i haplotipovima (MURRAY i sur., 1999.).

Lokusi MHC gena skupine II nazivaju se DP, DQ i DR. Svaki od tih lokusa sastoji od gena za α i gena za β lanac koji se nazivaju DPA i DPB, DQA i DQB, DRA i DRB. Razina polimorfizma nije jednaka za sve gene. Naime, u pravilu su geni za β lance polimorfni i mogu sadržavati i do stotinu alela. Za razliku od njih oni za α lance su manje polimorfni. Gen za α lanac DR lokusa je u pravilu monomorfan ili neznatno polimorfan. Istraživanja su pokazala da DRB lokus, za razliku od drugih lokusa, ima gene za dodatni β lanac u čovjeka. Istraživanjem je utvrđeno da je HLA-DRB1 najpolimorfniiji gen u odnosu na preostalih osam koliko ih je otkriveno u čovjeka (DOXIADIS i sur., 2012.), ali je i u nekih drugih vrsta također multipliciran. Tako je polimorfizam DRB lokusa dobro istražen u porodici Bovidae, te u mačaka i pasa (AMMER i sur., 1992.; YUHKY i O'BRIEN, 1997.; WAGNER i sur., 1999.).

Tijekom evolucije održana je visoka razina polimorfizma MHC lokusa, tj. veliki broj alela postoji u populaciji kroz dugi vremenski period. Ovakva pozitivna selekcija naziva se ravnotežnom ili balansirajućom selekcijom (RICHTMAN, 2000.), a tumače ju dvije hipoteze. Prva je hipoteza heterozigotne prednosti (engl. overdominance hypothesis) koja pretpostavlja da heterozigotne jedinke u nekoj populaciji imaju mogućnost prikazati veći broj antigena (DOHERTY i ZINKERNAGEL, 1975.), odnosno oduprijeti se većem broju patogena za razliku od homozigotnih jedinki (HUGHES i NEI, 1988.). Druga je hipoteza negativne selekcije ovisne o frekvenciji ili prednosti rijetkih alela (engl. negative frequency dependent selection hypothesis) koja je usmjerena na održavanje rijetkih alela, a temelji se na pretpostavci da rijetki aleli imaju prednost u obrani od potencijalnih novih patogena (CLARKE i KIRBY, 1966.). Dokaz postojanja pozitivne selekcije u suvremenoj populaciji je nalaz odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže, pri čemu je učestalost heterozigotnih jedinki statistički veća od

učestalosti koja se očekuje pod Hardy-Weinbergovom ravnotežom, a istovremeno učestalost homozigotnih jedinki je statistički manja od očekivane učestalosti (GARRIGAN i HEDRICK, 2003.). Cilj ravnotežne selekcije je da tijekom evolucije zadrži alele među vrstama kroz duži vremenski period, čuva stare ali i unosi nove mutacije (TAKAHATA, 1990.; TAKAHATA i NEI, 1990.). Aleli koji su nastali tijekom evolucije prije razdvajanja vrsta pojavljuju se i u novonastalim vrstama nakon njihovog razdvajanja iz čega možemo zaključiti da su stariji od vrste.

2.2. MHC geni divljih životinja

Procjena genetičke raznolikosti MHC gena u brojnih životinjskih vrsta, posebno sisavaca, postala je važan dio istraživanja u ekologiji, populacijskoj biologiji i zaštiti vrsta (PIERTNEY i OLIVER, 2006.). Promjene u okolišu koje nastaju pod utjecajem čovjeka (primjerice fragmentacija, izolacija postojećih staništa i lov) smanjuju mogućnost prilagodbe i neminovno utječu na opstanak brojnih životinjskih populacija. Na taj način se smanjuje mogućnost razmjene genetičkog materijala što dovodi do smanjenja genetičke raznolikosti. Pojava novih patogena, u tom slučaju, biti će pogubna za takve male i izolirane populacije (SOMMER, 2005.)

Prvobitna istraživanja provedena su na ljudima i laboratorijskim životinjama koje su držane u strogo kontroliranim uvjetima. Otkrila su izuzeno važnu ulogu i značajnost MHC-a u imunom sustavu kralježnjaka, te njihovu raznolikost u brojnih životinjskih vrsta. Međutim, povezanost homozigotnog statusa MHC alela za otpornost jedinki na određene bolesti nisu uspjele objasniti utjecaj prirodne selekcije. Zbog toga je bilo potrebno istražiti divlje i izolirane populacije koje žive u prirodnim uvjetima i koje unatoč tome što imaju manji broj MHC alela, imaju znatno veću raznolikost među njima, u odnosu na neutralne biljege (SOMMER, 2003.; HEDRICK i sur., 2001.; HEDRICK i sur., 2000.). Istraživanje koje je provedeno na otočnoj lisici (*Urocyon littoralis dickeyi*) s otoka San Nicolas, interesantan je primjer koji to dokazuje. Iako u njih nije utvrđena raznolikost na mikrosatelitima, kao neutralnim biljezima, zapažena je vrlo visoka razina raznolikosti na MHC lokusima (AGUILAR i sur., 2004.). Značajna su istraživanja MHC raznolikosti u populacijama koje su prošle kroz usko grlo kao što su npr. gepard (*Acinonyx jubatus*), europski bizon (*Bison bonasus*), te arabijska bijela antilopa (*Oryx leucoryx*). U uzorku od 172 jedinke europskog bizona nađena su samo četiri DRB alela koja su izrazito divergentna (RADWAN i sur., 2007.), dok su u uzorku od 76 jedinki bijele antilope

nađena svega tri vrlo divergentna DRB alela (HEDRICK i sur., 2000.). Pretpostavlja se da je gubitak genetičke varijabilnosti na MHC genima glavni razlog povećane osjetljivosti na učestale bolesti. Niska genetička varijabilnost u geparda koja je nastala kao posljedica parenja u srodstvu, uzrokovala je smanjenje imunodne prilagodbe tako da je ta populacija danas izuzetno izložena bolestima (O'BRIEN i sur., 1985, O'BRIEN i EVERMANN, 1988.).

Tijekom posljednja dva desetljeća istraživanja MHC gena u kitova posljedično su se razvila iz istraživanja koevolucije patogena i domaćina (YANG i sur., 2012.). Ujedno, prethodne studije bavile su se procjenom razine raznolikosti MHC gena kitova i evolucijom ovih gena provođenjem filogenetskih analiza (NIGENDA-MORALES i sur., 2008.; HEIMEIER i sur., 2009.; YANG i sur., 2010.; YANG i sur., 2013.). Utvrđeno je da je istraživanje razine polimorfizma MHC gena i njihovih produkata od velike važnosti za razumijevanje zaraznih bolesti na razini populacija, a posebno morskih jer je njihovo stanište pod velikim utjecajem čovjeka koji svojim djelovanjem povećava rizik od izloženosti novim patogenima (HARVELL i sur., 1999.). Nedostatak raznolikosti MHC gena povećava podložnost izoliranih populacija infekcijama koje potencijalno mogu imati katastrofalne posljedice (BOWEN i sur., 2002.). U literaturi su dostupna brojna istraživanja DQB i DRB gena koji imaju ključnu ulogu u stvaranju imunodnog odgovora u različitim vrsta kopnenih i morskih sisavaca. U morskih sisavaca brojna i opsežna istraživanja provedena su upravo na DQB i DRB lokusu. Dosadašnja istraživanja (MURREY i sur., 1995.) pokazala su da je polimorfizam DQB alela znatno manji u morskih sisavaca u usporedbi s kopnenim sisavcima što je objašnjeno mogućim prolaskom malih populacija kroz usko grlo te utjecajem genetičkog drifta (SLADE, 1992.; MURRAY i WHITE, 1998.) Nedavna istraživanja koja su provedena na populacijama kitova otkrila su relativno visoku raznolikost DQB alela u nekih vrsta kitova usana i zubana te utvrdila postojanje pozitivne selekcije koja se očituje relativno visokim stupnjem nesinonimnih nukleotidnih supstitucija na mjestima vezanja gena (HAYASHI i sur., 2003.; YANG i sur., 2005; 2007; 2008; 2010.; XU i sur., 2007; 2008; 2009.; HEIMEIER i sur., 2009.; VASSILAKOS i sur., 2009.). Umjereno visok stupanj polimorfizma DRB gena ali ne i DQB gena, pronađen je u bijelog dupina (*Delphinapterus leucas*, engl. beluga) (MURRAY i WHITE, 1998.) i kalifornijskog morskog lava (*Zalophus californianus*) (BOWEN i sur., 2004.) dok je u kitova usana (Mysticeti) situacija potpuno suprotna, tj. pronađen je niski stupanj polimorfizma na DRB genu i visok stupanj polimorfizma na DQB genu (BAKER i sur., 2006.). I u morskih sisavaca utvrđena je duplikacija DRB lokusa te je tako u kitova usana i zubana utvrđen DRB3, dok je DRB2 utvrđen samo u grenlandskog kita (*Balaena mysticetus*) i pravih

kitova (rod *Eubalaena*) (BAKER i sur., 2006.). Postoje brojni primjeri međusobnih odnosa MHC alela i otpornosti ili osjetljivosti na bolesti (SOMMER, 2005.). Interakcija između pojedinih gena i okoliša opisana je i u morskih sisavaca. Tako se određeni DRB alel povezuje sa urogenitalnim karcinomom u kalifornijskog morskog lava (BOWEN i sur., 2005.), dok se za jedan od DQB alela dobrog dupina pretpostavlja da je u uskoj vezi s nasukavanjem (YANG i sur., 2008.).

Molekularna istraživanja morskih sisavaca istražuju i evoluciju MHC gena skupine I i II. Tako je utvrđeno da MHC geni skupine II u raznih sisavaca imaju brojne homologne lokuse i znatno sporiju evoluciju za razliku od MHC gene skupine I (TAKAHASHI i sur., 2000.). Koristeći se komplementarnim DNA sekvencama (cDNA), YANG i sur., (2010.) formirali su filogenetsko stablo DQB i DRB alela i procijenili vrijeme razdvajanja između dviju vrsta roda *Tursiops* (*Tursiops truncatus* i *Tursiops aduncus*) i parnoprstaša (svinje, vodenkonja i preživača). Razne filogenetske analize sekvenci DQB i DRA lokusa u kitova opisuju primjere međuvrstnog polimorfizma (HAYASHI i sur., 2003.; BAKER i sur., 2006; XU i sur., 2008.; 2009.; HEIMEIER i sur., 2009.). Među pojedinim vrstama utvrđeno je i postojanje polimorfizma specifičnog za vrstu koje je nastalo kao posljedica razlika u prilagodbi na uvjete iz okoliša, a objašnjava se postojanjem selektivnog pritiska patogena na određenu vrstu (YANG i sur., 2007.; VASILLAKOS i sur., 2009.).

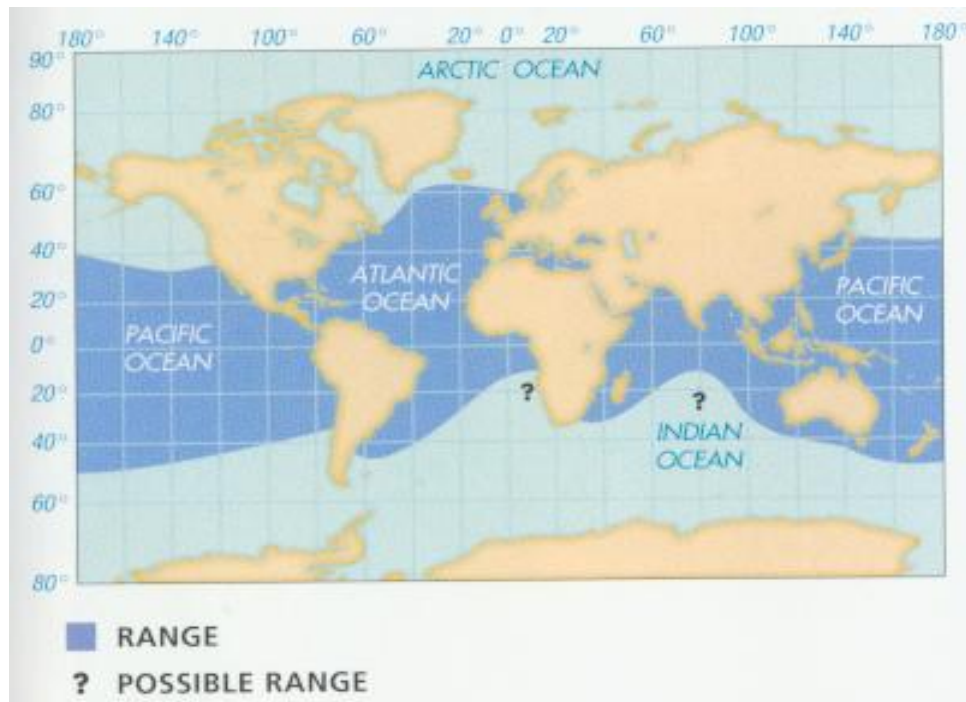
2.3. Dobri dupin (*Tursiops truncatus*)

Dobri dupin (*Tursiops truncatus*) je morski sisavac iz reda kitova (Cetacea). Pripada podredu kitova zubana (Odontoceti), porodici šiljatozubih dupina (Delphinidae) i rodu *Tursiops*. Prvi ga je opisao Montagu 1821. godine (slika 2).



Slika 2. Dobri dupin (*Tursiops truncatus*) (preuzeto iz LEATHERWOOD i REEVES, 1983.).

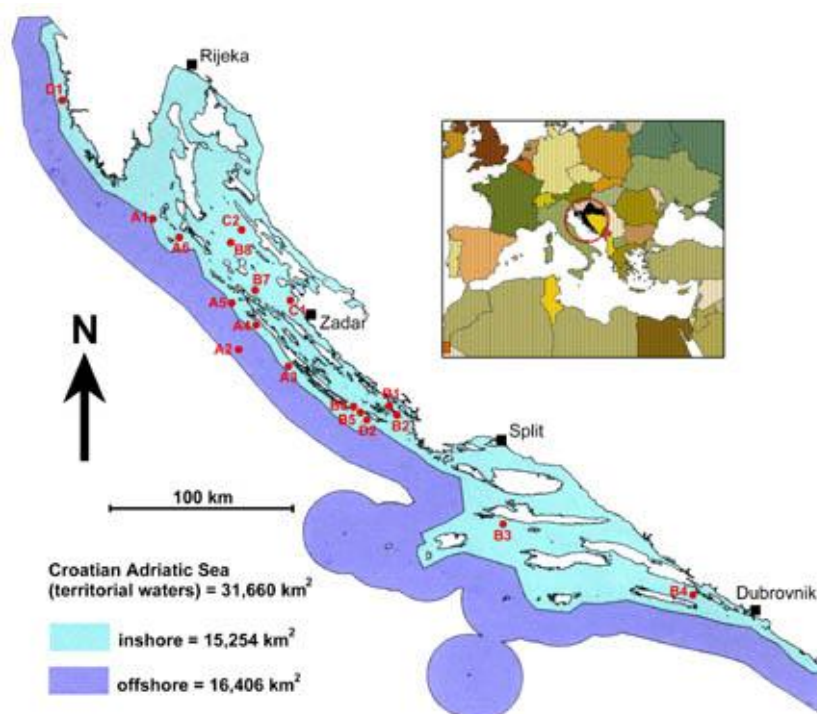
To je životinja izrazito robusnog izgleda tijela, glave s kratkim kljunom koji je oštro ograničen od melona. Tijelo je vretenasto s izraženom leđnom perajom koja je visoka, srpastog izgleda i smještena u središnjem dijelu tijela. Prsne peraje su šiljate i srednje veličine, a repna peraja ima duboki medijani usjek i sinusoidni kaudalni rub (LEATHERWOOD i REEVES, 1983.). Leđa su tamnosiva, lateralni dijelovi trupa nešto svjetliji, a trbuh je gotovo bijele boje. Najveću dužinu dobrog dupina od 3,9 m i tjelesnu masu od 275 kg zabilježili su LEATHERWOOD i REEVES (1983.). Zabilježene su zemljopisne varijacije u veličini, obliku i boji tijela (PERRIN, 1984.), a pretpostavlja se da i temperatura pojedinih mora ima utjecaj na veličinu tijela (BLOCH i MIKKELSEN, 2000.; WELLS i SCOTT, 2009.). Osteometrijske i genetske razlike (WANG i sur., 1999.; WANG i sur., 2000.) upućuju na postojanje dva morfološka tipa dobrog dupina; manji tip koji naseljava obalna mora i veći tip koji živi u otvorenim morima i oceanima (CARWARDINE, 1995.). Dobri dupin je široko rasprostranjena vrsta koja dolazi u svim morima svijeta (slika 3) i uglavnom ne prelazi 45. paralelu prema polovima, osim oko Velike Britanije i sjeverne Europe (JEFFERSON i sur., 1993.; RICE, 1998.).



Slika 3. Prikaz rasprostranjenosti dobroga dupina (*Tursiops truncatus*) (preuzeto iz REEVES i sur., 2002.).

Veličina svjetske populacije dobroga dupina procijenjena je na temelju istraživanja pojedinih područja i iznosi minimalno 600 000 jedinki (HAMMOND i sur., 2008.; WELLS i SCOTT, 2009.).

U hrvatskom dijelu Jadranskog mora postoji samo jedan morfološki tip dobroga dupina (ĐURAS GOMERČIĆ, 2006.). Na temelju dosadašnjih istraživanja veličina populacije je procijenjena na 218 jedinki (202 adultne i 16 juvenilnih) koje su u zimskom razdoblju razvrstane u približno 40 jata (slika 4). Zastupljenost dobrih dupina u priobalnom moru hrvatskoga dijela Jadranskoga mora je 10-11 jedinki/1000 km², a u otvorenom moru 3-4 jedinke/1000 km² (GOMERČIĆ i sur., 1998.). Veličina jata za cijeli hrvatski dio Jadranskog mora je u prosjeku 5-6 jedinki (GOMERČIĆ i sur., 1998.). U Kvarneriću su jata nešto veća i čine ih u prosjeku 6 jedinki (BEARZI i sur., 1993.), dok su u zadarskom području manja s prosječno 4-5 jedinki (ĐURAS GOMERČIĆ i sur., 2003.). Zadnja procjena veličine populacije dobrih dupina iznosila je oko 250 životinja (GOMERČIĆ i sur., 2004.). Novija istraživanja brojnosti i pojavnosti dobrog dupina u Jadranskom moru nisu objavljena.



Slika 4. Karta obalnih (15.254 km²) i otvorenih (16.406 km²) voda hrvatskog dijela Jadranskoga mora (hrvatske teritorijalne vode =31.660 km²). Mala karta: položaj Hrvatske (crno) u Europi. Crvene točke označavaju lokacije jata dobrih dupina u hrvatskom dijelu Jadranskog mora (preuzeto iz GOMERČIĆ i sur., 1998.).

Dosadašnja istraživanja genetičke raznolikosti koja su provedena na dobrim dupinima iz Jadranskog mora koristila su mikrosatelitske lokuse i mt DNA. Provedenim istraživanjem nisu nađeni sigurni dokazi o mogućem prolasku jadranske populacije dobrih dupina kroz usko grlo (engl. bottleneck) sredinom prošlog stoljeća. Utvrđena je relativno visoka genska raznolikost na mikrosatelitskim lokusima pri čemu su svi istraženi lokusi polimorfni. Analizom mikrosatelitskih lokusa nisu nađeni dokazi koji bi ukazivali na strukturiranje jadranske populacije. Haplotipska raznolikost jadranske populacije bila je dosta niska u odnosu na populacije iz Crnog mora i zapadnog Sredozemlja. Nukleotidna raznolikost jadranske populacije slična je nukleotidnoj raznolikosti pučinske populacije dobrih dupina istočne obale Sjeverne Amerike (GALOV, 2007.; GALOV i sur., 2011.). Analizom kontrolne regije mt DNA u 108 jedinki dobrog dupina iz jadranskog mora utvrđeno je 11 različitih haplotipova. Uspoređivanjem jadranskih haplotipova s haplotipovima iz drugih svjetskih mora utvrđeno je da se podudaraju s populacijama iz Crnog mora, istočnog i zapadnog Sredozemlja, te populacijama iz Atlantskog oceana uz irsku obalu (DIVAC BRNIĆ, 2012.).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

U sklopu ovog doktorskog rada utvrđena je genetička raznolikost populacije dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskog mora analizom adaptivnih biljega i to gena glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC gena). Zbog svojih jedinstvenih i važnih funkcija MHC geni trenutno predstavljaju najbolji sustav za procjenu mogućnosti prilagodbe vrste na promjene u okolišu. MHC geni ključni su za prepoznavanje patogena i pokretanje imunskog odgovora. Smatra se da je raznolikost MHC alela razmjerna spremnosti populacije da se uspješno suoči s većim brojem različitih patogena, što doprinosi preživljavanju populacije. Očekuje se da će rezultati istraživanja pridonijeti boljem poznavanju populacije dobrog dupina iz Jadranskog mora i utvrđivanju njezine imunodne kompetentnosti. Isto tako rezultati će predstavljati doprinos poznavanju raznolikosti i evolucije MHC gena u morskih sisavaca i divljih životinja općenito.

Opći cilj istraživanja je procijeniti razinu raznolikosti MHC gena u dobrog dupina na adaptivnim genskim lokusima DRA, DQA i DQB skupine II MHC gena koji su na razini ekologije okoliša, populacijske i konzervacijske genetike najčešće istraživani MHC lokusi u raznih vrsta kopnenih i morskih sisavaca. Ujedno, namjera istraživanja je usporediti populaciju dobrog dupina iz Jadranskoga mora s ostalim istraženim populacijama kitova uz procjenu djelovanja prirodne selekcije na istraženim lokusima.

Specifični ciljevi istraživanja su slijedeći:

1. Istražiti prisustvo alela na genskim lokusima DRA, DQA i DQB iz MHC skupine II u populaciji dobrog dupina iz Jadranskog mora i utvrditi njihovu učestalost.
2. Istražiti postojanje haplotipova prisutnih alela.
3. Usporediti haplotipove i alele populacije dobrog dupina iz Jadranskog mora s populacijama dobrih dupina iz drugih mora kao i sa srodnim vrstama kitova (Cetacea).
4. Analizirati nukleotidne i aminokiselinske sljedove pojedinih alela
5. Istražiti djelovanje pozitivne selekcije na istraženim lokusima.
6. Istražiti postojanje rekombinacije među alelima.
7. Istražiti filogenetske odnose među alelima.

Istraživanje je provedeno na ukupno 62 uzorka tkiva dobrog dupina. Od ukupnog broja, 46 uzoraka porijeklom je od mrtvih dupina pronađenih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora, dok su dva uzorka biopsati kože s potkožjem porijeklom od živih dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora. Uzorkovanje dobrih dupina provedeno je u skladu s godišnjim

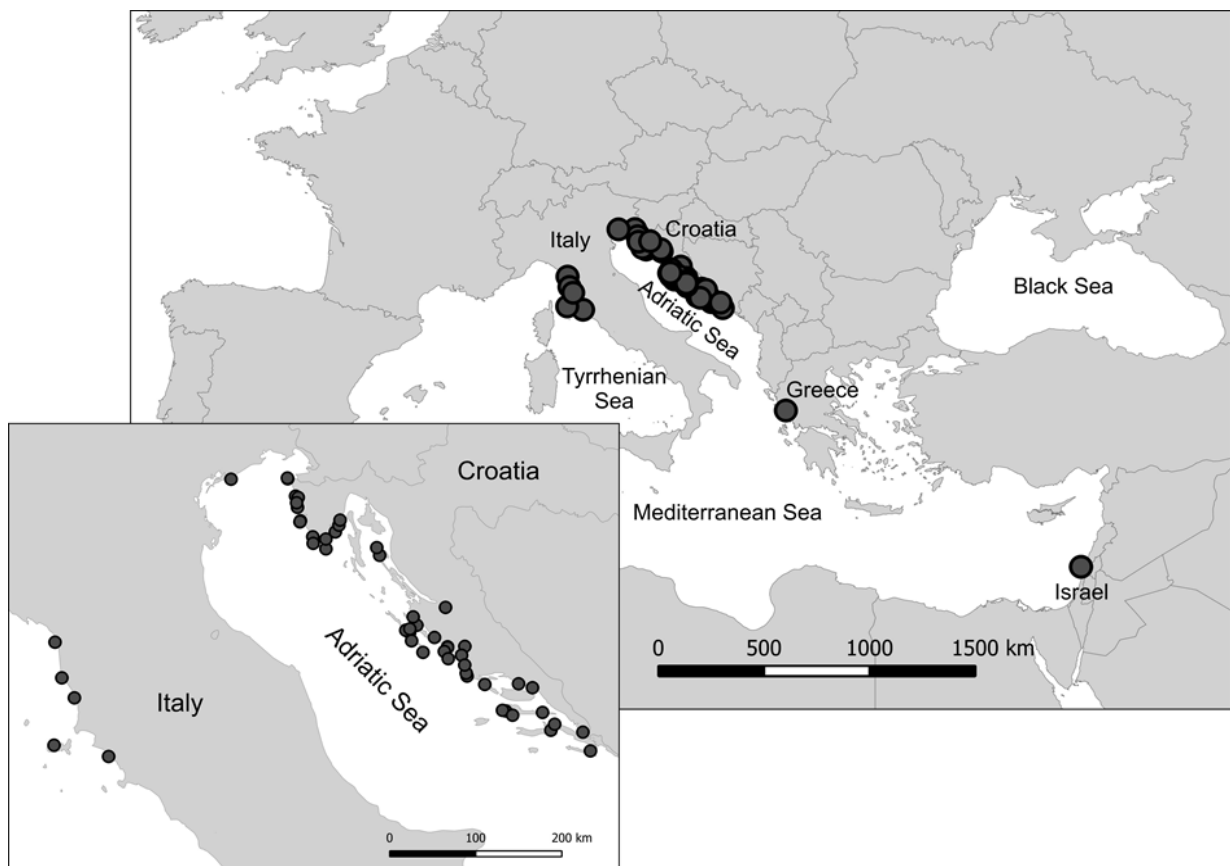
dopuštjenjima nadležnih institucija. U svrhu usporedbe s okolnim populacijama istraženo je i 14 uzorka iz drugih područja Sredozemnog mora.

MHC geni skupine II dobrog dupina istraženi su analizom eksona 2 i to DRA, DQA i DQB lokusa. Ekson 2 je hipervarijabilan, nositelj je polimorfizma među alelima i kodira domenu receptora koja prepoznaje i veže antigen. Upravo se iz toga razloga polimorfizam eksona 2 uzima kao mjerilo funkcionalne raznolikosti receptora. U radu su korištene slijedeće laboratorijske molekularne tehnike: izolacija DNA, lančana reakcija polimerazom, elektroforeza, sekvenciranje i kloniranje odsječka DNA pomoću plazmidnog vektora. Za analizu dobivenih rezultata korišteni su slijedeći računalni programi: BioEdit program (HALL, 1999.), SeqScape 2.5 (Applied Biosystems), Arlequin 3.11. (EXCOFFIER i sur., 2005.), MEGA 5 (TAMURA i sur., 2011.), PAML (YANG, 2007.) i RDP3 Alpha 44 (MARTIN i sur., 2010.).

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Uzorci tkiva dobrog dupina

U ovom doktorskom radu korišteni su uzorci tkiva dobrog dupina porijeklom od mrtvih životinja iz Jadranskoga i drugih sredozemnih mora, te od živih životinja. Uzorci iz hrvatskog dijela Jadranskoga mora potječu od dobrih dupina koji su pronađeni mrtvi u prirodi u razdoblju od 1997. do 2011. godine, a obrađeni su u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta (053-0533406-3640) "Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu" Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske. Od svake lešine uzorkovano je mišićno tkivo koje je pohranjeno u tubice s 96%-tnim etilnim alkoholom. Uzorci su upisani u istraživački obrazac za dupine i pohranjeni na -20° C.



Slika 5. Mjesta nalaza uzorkovanih dobrih dupina (sive točke) u Jadranskome i drugim morima Sredozemlja.

Od ukupnog broja uzoraka korišteni su samo uzorci porijeklom od lešina koje su bile svježije ili umjereno raspadnute zbog pretpostavke da je u uzorcima porijeklom od jako raspadnutih i mumificiranih lešina već došlo do degradacije DNA. Nakon provedenog odabira izdvojeno je 46 uzorka mrtvih dobrih dupina iz hrvatskog dijela Jadranskoga mora.

U sklopu gore navedenog projekta provedeno je i uzorkovanje dva živa dobra dupina, te su njihovi biopsati kože s potkožjem, koji su također konzervirani 96%-tnim etilnim alkoholom, uključeni u ovo istraživanje. U svrhu usporedbe hrvatskih uzoraka s uzorcima iz drugih dijelova Jadranskoga i susjednih mora nabavljeni su uzorci iz dvije inozemne banke tkiva morskih sisavaca. Dva uzorka dobrog dupina iz talijanskog dijela Jadranskog mora (Venecija), pet uzoraka iz Ligurskog mora i jedan iz Tirenskog mora potječu iz „Mediterranean Marine Mammal Tissue Bank“ Sveučilišta u Padovi, Italija. Pet uzoraka iz Izraela i jedan iz Grčke potječu iz „The Israel Marine Mammal Research and Assistance Center“, Haifa, Izrael. U svrhu ovog istraživanja ukupno su obrađena 62 uzorka dobrog dupina. Podaci o uzorcima dobroga dupina iz hrvatskog dijela Jadranskoga mora prikazani su u tablici 1, dok se podaci o mjestima nalaza dobrih dupina iz susjednih mora nalaze u tablici 2. Slika 5 prikazuje zemljopisnu kartu s označenim mjestima nalaza uzorkovanih dobrih dupina koji su korišteni u istraživanju.

Tablica 1. Osnovni podaci o uzorkovanim dobrim dupinima iz hrvatskog dijela Jadranskoga mora

Oznaka dupina	Datum nalaza	Mjesto nalaza Zemljopisna širina	Mjesto nalaza Zemljopisna duljina	Spol	Dob (godina)	Masa (kg)	Dužna tijela (cm)
20	08.10. 1997.	43,8144	15,6788	Ž	21	241	288
32	01.11. 1999.	45,0662	13,6243	M	3	128	208
38	12.01. 2000.	44,2119	15,65	Ž	21	261	286
41	27.04. 2000.	43,1612	16,4842	Ž	12	224	261
55	23.03. 2001.	43,1669	16,4427	Ž	2	62	165
64	09.10. 2001.	45,3214	13,5633	M	17	305	312
80	01.03. 2002.	44,0321	15,2516	M	17	324	294
87	16.06. 2002.	42,9625	17,1165	Ž	5	79	188
93	05.08. 2002.	43,9826	15,0984	Ž	<1	65	154
95	13.08. 2002.	43,9570	15,1503	Ž	<1	40	136
102	24.12. 2002.	45,3083	13,6000	Ž	20	216	262
108	06.10. 2003.	43,8072	15,6782	Ž	17	209	277
112	20.12. 2003.	43,0246	17,1688	M	20	268	303
113	16.01. 2004.	45,0766	13,6310	M	6	144	215
120	28.05. 2004.	42,75	17,6666	Ž	15	206	284
131	14.12.2004.	43,9808	15,0973	M	3	77	175
136	15.06. 2005.	43,5166	15,95	M	7	161	260
141	19.10. 2005.	43,7666	15,6333	Ž	18	197	282
143	25.10. 2005.	43,4382	16,6664	Ž	20	163,5	263
150	17.05. 2006.	45,2108	13,5899	Ž	4	87	186
161*	14. 05.2007.	43,8188	15,9188	Ž	odrasla		261
167	04. 08.2007.	44,7333	14,7336	Ž	10		

168	05. 08.2007.	43,4313	16,1965	M	3	89	199
169	20. 08.2007.	45,4921	13,4539	M	24	314	298
170	24. 08.2007.	43,1454	17,0001	M	17	222	288
173	21. 09.2007.	44,7980	13,9857	Ž	21	167	291
174	30. 09.2007.	43,3982	16,86	Ž		38	146
177	06. 12.2007.	43,5458	15,9381	Ž	19	234	322
194	09. 08.2008.	43,1166	16,5833	M	20	206	285
197	31. 10.2008.	44,9666	14,1166	M	1	197	
203	24. 01.2009.	42,9430	17,5616	Ž	25	218	280
204	07. 04.2009.	45,0333	14,1666	M		80	193
205	07. 04.2009.	44,1166	15,20	M	<1	72	171
206	08. 05.2009.	43,7577	15,3366	Ž		119	210
210	11. 10.2009.	42,6963	18,00	Ž	1	33	154
211	21. 10.2009.	43,7286	15,8733	M		232	302
212	09. 01.2010.	43,9088	15,4963	M	20	245	299
214	06. 04.2010.	43,6938	15,6877	M		161	250
215	28. 04.2010.	43,8746	15,1778	M	19	304	278
216	04. 06.2010.	44,9186	13,8025	Ž	3	53	176
219	07. 08.2010.	43,6293	15,9167	M	<1	50	148
221	21. 08.2010.	44,8959	13,9849	M	21	194	276
227	28. 10.2010.	45,2557	13,5777	M	4	90	212
232	04. 12.2010.	44,8108	14,6933	Ž	19	247	273
247	19. 03.2011.	44,8534	13,8080	M	3	105	214
248	09. 04.2011.	45,0690	13,6260	Ž	15	155	260
255	15. 09.2011.	45,0844	14,1827	M	1	46	158
B1*	26. 06.2003.	43,9846	15,1846	--	--	--	--

* biopsat žive životinje

Tablica 2. Podaci o mjestima nalaza uzorkovanih dobrih dupina iz drugih područja Sredozemnog mora

Oznaka dupina	Mjesto nalaza
T95	Jesolo (VE), Jadransko more
T118	Groseto, Tirensko more
T130	Marciana marina (LI), Ligursko more
T131	Viarregio (LI), Ligursko more
T142	Jesolo (VE), Jadransko more.
T151	Antignano (LI), Ligursko more
T152	Antignano (LI), Ligursko more
T155	Cecina (LI), Ligursko more
DO98	Haifa, Izrael
PA98	Haifa, Izrael
A502	Haifa, Izrael
Mio1a	Haifa, Izrael
Mio1b	Haifa, Izrael
T125	Mytikas, Grčka

4.2. Molekularna analiza

4.2.1. Izolacija DNA

Ukupna DNA izolirana je iz uzoraka pomoću komercijalnog kita JETQUICK Tissue DNA Spin Kit, GENOMED GmbH, Löhne, Germany. Za izolaciju je uzeto po 30 mg homogeniziranog uzorka i stavljeno u tubice od 2 ml. U svaku tubicu odpipetirano je 200 µl T1 pufera te dodano 20 µl proteinaze K. Nekoliko puta su promiješani okretanjem tubice i nakon toga inkubirani na 56°C preko noći. Nakon inkubacije u tubice je odpipetirano 200 µl T2 pufera i miješano dok se otopina nije homogenizirala. Otopina je ponovo inkubirana 10 min na 70°C, a nakon toga ohlađena na sobnoj temperaturi. U ohlađenu otopinu dodano je 200 µl apsolutnog etanola i potom snažno izmješano. Ukupni volumen otopine premješten je u JETQUICK

mikrospin kolone i centrifugiran 1 min na 10.600 rpm (okretaja u minuti). Odstranjena je tekućina, a u kolone je odpipetirano 500 µl TX pufera te centrifugirano 1 min na 10.600 rpm. Ponovno je odstranjena tekućina i u kolonu odpipetirano 500 µl T3 pufera i centrifugirano 1 min na 13.000 rpm. Nakon uklanjanja tekućine centrifugiranje je ponovljeno kako bi se uklonio preostali pufer. U završnoj fazi su pripremljene nove tubice u koje su premještene kolone u koje je dodano po 200 µl deionizirane vode zagrijane na 70 °C. Tubice s otopljenom DNA pohranjene su na -20 °C.

4.2.2. Lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR)

Za određivanje nukleotidnih sljedova eksona 2, odnosno alela provedena je za svaki lokus (DRA, DQA i DQB) zasebna PCR reakcija, te su korištene početnice koje su bile specifične za svaki pojedini lokus. PCR reakcija je korištena kako bi se uspješno umnožili istraživani MHC lokusi. Početnice za umnažanje MHC lokusa sintetizirane su u Sigma Aldrich, SAD.

Za PCR reakciju u kojoj je umnažan ekson 2 DRA lokusa korištena je početnica DRA1 i početnica DRA2 (XU i sur., 2007.). Sljedovi početnica bili su slijedeći:

DRA1: 5' - AATCATGTGATCATCCAAGCTGAGTTC - 3'

DRA2: 5' - TGTTTGGGGTGTGTGGAGCG - 3'

Za PCR reakciju u kojoj je umnažan ekson 2 DQA lokusa korištena je početnica DQAex2F (HEIMEIER i sur. 2009.) i početnica DQAR smišljenu u ovom istraživanju. Sljedovi početnica bili su slijedeći:

DQAex2F: 5' - GCTGACCATGTTGGCTCCTATG - 3'

DQAR: 5' - AAGAGGGAGGATGAGGGTCC - 3'

Za PCR reakciju u kojoj je umnažan ekson 2 DQB lokusa korištena je početnica DQB1 i početnica DQB2 (MURRAY i sur. 1995.). Sljedovi početnica bili su slijedeći:

DQB1: 5'-CATGTGCTACTTCACCAACGG - 3'

DQB2: 5' - CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC - 3'

Početnice za svaki MHC lokus prethodno su otopljene u deioniziranoj vodi i dobivena je „stock“ otopina u koncentraciji od 100 µM koja je pohranjena na temperaturi od -20° C. Iz

njih je nakon otapanja načinjena „radna“ otopina, za svaku početnicu pojedinačno, u koncentraciji od 2 μ M. Za PCR reakcije korišten je komercijalni kit GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, SAD) koji sadrži slijedeće optimizirane reagense: Go Taq polimerazu, $MgCl_2$, dNTP-e i PCR pufer. Za svaku PCR reakciju upotrijebljeno je: 7,5 μ l pufera, 4,5 μ l $MgCl_2$, 0,75 μ l dNTP-a, 0,75 μ l otopine svake početnice (2 μ M), 0,185 μ l Go Taq Polymerase, 19,565 μ l destilirane vode i 4 μ l DNA

PCR reakcija za svaki uzorak izvedena je u tubicama od 200 μ l, a ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 38 μ l. Za izvođenje PCR reakcije korišten je uređaj GenAmp System 9700 (Applied Biosystems). Uspješnost PCR reakcije ovisi o uvjetima njezina izvođenja. Svaki korak sastoji se od odgovarajuće temperature i dužine trajanja, te odgovarajućeg broja ciklusa. Stoga se PCR reakcija za svaki lokus izvodila u slijedećim uvjetima:

DRA lokus:

94° C, 5 min (početna aktivacija polimeraze)

35 ciklusa: 94° C, 30 s (denaturacija)

55° C, 30 s (spajanje početnica)

72° C, 30 s (produljenje početnica)

72° C, 10 min (konačno produljenje umnoženih sljedova DNA)

DQA lokus:

95° C, 2 min (početna aktivacija polimeraze)

30 ciklusa: 95° C, 30 s (denaturacija)

56° C, 90 s (spajanje početnica)

72° C, 90 s (produljenje početnica)

72° C, 10 min (konačno produljenje umnoženih sljedova DNA)

DQB lokus:

95° C, 2 min (početna aktivacija polimeraze)

35 ciklusa: 95° C, 30 s (denaturacija)

58° C, 30 s (spajanje početnica)

72° C, 50 s (produljenje početnica)

72° C, 7 min (konačno produljenje umnoženih sljedova DNA)

Do razdvajanja PCR produkata elektroforezom, tubice s PCR produktima bile su pohranjene na 4°C.

4.2.3. Elektroforeza na agaroznom gelu i pročišćavanje PCR produkata

Elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu provjereni su dobiveni PCR produkti. Agarozni gel je napravljen otapanjem 1 g agaroze (Certified™ PCR Agarose, Bio-Rad, SAD) u 50 ml 1X TBE pufera. Otopina je zagrijana do vrenja, sve dok se agarozna nije u potpunosti otopila. U otopinu agaroze dodan je SYBR® Safe DNA gel stain, (Invitrogen). Nakon hlađenja otopina je premještena u kalup u koji je postavljen češalj za jažice. Gel se kroz kratko vrijeme na sobnoj temperaturi polimerizirao. Nakon polimerizacije iz gela je uklonjen češalj, a gel je stavljen u kadicu za elektroforezu koja je sadržavala 1X TBE pufer. Na parafilm je nanoseno po 6 µl svakog PCR produkta te 2 µl pufera (LB pufer, engl. loading buffer) koji su dobro izmiješani. Tako pripremljeni uzorci nanoseni su u jažice na gelu. Uz PCR produkte u jednu od jažica nanosen je biljeg veličine DNA fragmenata koji se sastoji od 10 dvolančanih DNA molekula veličina 100 pb, 200 pb, 300 pb itd., do 1500 pb (Promega). Osim biljega nanosene su pozitivna i negativna kontrola. U kasnijim elektroforezama to više nije bilo potrebno zbog toga što su u početnim elektroforezama određene dužine fragmenata za PCR produkte u svakom od istraživanih lokusa. Elektroforeza je korištena kako bi provjerali da li se istraživani fragment umnožio i da li su se pojavili dodatni, nespecifični fragmenti. Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi, pri naponu od 90 V, a trajala je oko 40 minuta. Nakon završene elektroforeze gelovi sam promatrani pod uređajem s UV svjetlom (Safe Imager, Invitrogen).

Prije sekvenciranja pročišćeni su uspješno umnoženi odsječci (PCR produkti) od neiskorištenih nukleotida i početnica iz PCR smjese pomoću komercijalnog kita Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, SAD. U tu svrhu otpipetirano je u svaki PCR produkt jednaki volumen Membrane Binding Solution. Ukupni volumen je prebačen u kolonu, inkubiran 1 minutu na sobnoj temperaturi i centrifugiran na 14.000 rpm. Na membrani kolone došlo je do vezanja DNA. Iz tubice je uklonjena tekućina i odpipetirano 700 µl Membrane Wash Solution te centrifugirano na 1.400 rpm 1 minutu. Ponovno je odstranjena tekućina, a cijeli postupak je ponovljen još jednom kako bi se što bolje isprala DNA. Odpipetirano je 500 µl Membrane Wash Solution, centrifugirano na 14.000 rpm 5 minuta te potom odstranjena tekućina iz tubice. Ponovljen je postupak centrifugiranja na 14.000 rpm 1 minutu, a kolona je prebačena u novu tubicu. U kolonu je dodano 50 µl Nuclease-Free Water, inkubirano 1 minutu

i centrifugirano na 14.000 rpm 1 minutu, pri čemu je došlo do eluiranja DNA s membrane, te je kolona bačena. Prije slanja pročišćenih PCR produkata na sekvenciranje, tubice u kojima se nalazila pročišćena DNA pohranjene su na 4°C.

4.2.4. Sekvenciranje PCR produkata

Za potrebe sekvenciranja pročišćenih PCR produkata korišten je servis "Macrogen" u Nizozemskoj koji za potrebe sekvenciranja koristi 96-kapilarni genski analizator "ABI3730xl DNA Analyzer", Applied Biosystems. Prilikom sekvenciranja korištene su iste početnice kao i za PCR reakcije provedene u ovom radu. Budući da je većina lokusa heterozigotna i svaki se alel umnožio u PCR reakciji, za jedan lokus sekvencirana su po dva alela.

4.3. Računalna obrada nukleotidnih sljedova i identifikacija alela

Za provjeru dobivenih nukleotidnih sljedova korišten je program BioEdit (HALL, 1999.). Sljedovi su pregledani, a na onima koji su uspjeli provedeno je višestruko sravnjenje sljedova DNA korištenjem implementiranog ClustalW programa (THOMPSON i sur., 1994.), te identificirana polimorfna nukleotidna mjesta.

Za identifikaciju dobivenih alela korišten je SeqScape program (Applied Biosystems SeqScape® software). SeqScape 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 pronade alel koji se u potpunosti podudara s pohranjenim podacima, prikazuju se aleli s najmanjim brojem nepodudarnih nukleotidnih mjesta, a ako se ne pronade podudarna kombinacija niti nakon ponovljenog PCR-a, za pretpostaviti je da je otkriven novi alel. Do sada je objavljen određeni broj alela MHC lokusa dobrih dupina, no budući da se aleli MHC gena skupine II često podudaraju među različitim vrstama, u ovom radu korišteni su do sada svi utvrđeni aleli u redu kitova (Cetacea). Referentna knjižnica za alele DRA, DQA i DQB lokusa izrađena je pomoću alela spremljenih u gensku bazu GenBank (NCBI - National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Računalna baza podataka GenBank, pretraživana je korištenjem alata BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). U slučaju alela koje je SeqScape proglasio "novima" pristupilo se kloniranju PCR produkata u plazmidnom vektoru, a u svrhu razdvajanja gametnih faza. Za DQB lokus u GenBank pronađeno je 37 alela koji su

korišteni u svrhu izrade referentne knjižnice alela. Za DQA lokus pronađen je jedan alel EU024798 (HEIMEIER i sur., 2009), a referentna knjižnica se povećavala sa svakim iskloniranim alelom.

4.4. Molekularno kloniranje

Za razdvajanje gametnih faza uzoraka u kojima to nije uspješno učinjeno korištenjem SeqScape programa, provedeno je molekularno kloniranje, odnosno kloniranje PCR produkata pomoću plazmidnog vektora. U tu svrhu upotrijebljen je komercijalni kit pGEM[®] - T Vector System II, Promega kojeg čine plazmidni vektor (pGEM[®] - T Vector), kontrolni insert, T4 DNA ligaza, ligacijski pufer i JM 109 kompetentne stanice. Plazmidni vektor u sebi nosi gen za otpornost na antibiotik ampicilin što osigurava da bakterijske stanice koje nisu usvojile plazmid ne rastu na bakterijskoj podlozi koja sadrži ampicilin. Postupak kloniranja PCR produkata načinjen je prema protokolu i uputama proizvođača. Osnova kloniranja je vezanje PCR produkta na plazmidni vektor koji je otvoren na oba kraja s timinom na 3' krajevima. Na timin plazmidnog vektora veže se adenin PCR produkta kojeg termostabilna polimeraza dodaje tijekom PCR reakcije na kraj sintetiziranog nukleotidnog slijeda. PCR produkt ugrađi se unutar gena koji kodira enzim galaktozidazu. Ako odsječak nije ugrađen, nastaje funkcionalan enzim koji preradom supstrata (X-gal) dodanog u bakterijsku podlogu daje kolonije plave boje. Suprotno tome, kada dođe do ugradnje PCR produkta u plazmid, gen za galaktozidazu nije funkcionalan i te su kolonije bijele boje. Neposredno prije ligacije postavljen je optimalni molarni omjer inserta (PCR produkta) i vektora, koji se treba kretati u rasponu od 8:1 do 1:8. Za utvrđivanje optimalne količine PCR produkta napravljena je elektroforeza s nekoliko razrijeđenja PCR produkata i uzoraka poznate koncentracije. Na temelju praćenja intenziteta fluorescencije u uređaju s UV svjetlom uspoređeni su uzorci s poznatim količinama i procijenjena je količina kloniranog PCR produkta. Ligacijska reakcija treba sadržavati pozitivnu i negativnu kontrolu. Pozitivna kontrola je kontrolni insert koji je sadržan u kitu i veže se u plazmid, a u negativnu kontrolu se ne dodaju ni PCR produkt niti kontrolni insert, već samo DNA plazmidni vektor. Sastav ligacijske reakcije prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Sastav ligacijske reakcije (prema protokolu iz komercijalnog kita pGEM[®] - T Vector System II, Promega)

Reagens	Uzorak	Pozitivna kontrola	Negativna kontrola
ligacijski pufer	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Vektor	1 μ l	1 μ l	1 μ l
PCR produkt	X* μ l	-	-
kontrolni insert	-	2 μ l	-
T4 DNA ligaza	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Voda	do 10 μ l	do 10 μ l	do 10 μ l

* dodaje se ona količina koja zadovoljava potrebni molarni omjer inserta i vektora (od 8:1 do 1:8).

S obzirom da dulje vrijeme inkubacije povećava broj transformacija, ligacijska reakcija inkubirana je preko noći na 4°C. Nakon ligacije slijedi transformacija. Za ovaj korak pripremljene su Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom za uzgoj bakterija i to LB (lysogen broth) hranjiva podloga koja sadrži: 10g triptona, 5g ekstrakta kvasca, 5g NaCl i 15g agara (po litri podloge), a pH vrijednost je podešena na 7,0 pomoću NaOH. Pripremljena podloga je autoklavirana i nakon hlađenja na 50°C dodano je 100 μ g/ml ampicilina. Podloga je izlivena u Petrijeve zdjelice i namijenjena za uzorke, pozitivnu i negativnu kontrolu ligacije i za određivanje efikasnosti transformacije. Na svaku pojedinačno pripremljenu krutu podlogu dodano je 20 μ l (koncentracije 100 μ M) promotora gena za galaktozidazu IPTG (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid) i 20 μ l (koncentracije 50mg/ml) supstrata galaktozidaze X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid). Centrifugirane su tubice sa ligacijskom smjesom. Iz svake pojedinačne reakcije izdvojeno je 2 μ l ligacijske smjese u nove, sterilne 1,5 ml tubice. Kako bi procijenili efikasnost transformacije u jednu tubicu je dodano 0,1 ng nepocijepanog plazmida. Bakterijske stanice ostavljene su u ledu 5 min. Promiješane su stanice laganim potresanjem i 50 μ l bakterijskih stanica stavljeno u tubice s ligacijskom smjesom, a 100 μ l u tubice sa nepocijepanim plazmidom. Tubice su ostavljene 20 minuta na ledu. Nakon toga prenesene su u vodenu kupelj na 42°C i držane 45 – 50 sekundi, a nakon toga ponovo vraćene na led 2 minute. U tubice je dodano 950 μ l tekućeg LB medija s ampicilinom, a u

tubicu za efikasnost transformacije 900 μ l i inkubirano na temperaturi 37°C tijekom 90 minuta uz lagano potresanje. Na kraju je sadržaj tubice nasaden na pripremljene Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom i inkubiran u inkubatoru preko noći.

Odabrane kolonije umnožene su na način da je iz Petrijeve zdjelice svakog uzorka odabrano nasumično pet do osam bijelih kolonija od kojih je svaka prenešena u posebnu epruvetu koja je sadržavala 5 ml tekućeg LB medija s ampicilinom. Inkubacija na temperaturi od 37°C uz lagano potresanje odvijala se preko noći. Za pročišćavanje plazmida korišten je Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega. Prvo su izdvojeni plazmidi iz bakterijske stanice centrifugiranjem 5 ml bakterijske kulture i odlijevanjem nadtaloga. Dodano je 250 μ l otopine *Cell Resuspension Solution* i izmješano treskalicom. Nakon toga dodano je 250 μ l otopine *Cell Lysis Solution* i promiješan sadržaj tubice laganim prevrtanjem četiri puta te inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 10 μ l otopine *Alkaline Protease Solution*, promiješan sadržaj tubice laganim prevrtanjem četiri puta i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Na kraju je dodano 350 μ l otopine *Neutralisation Solution* i promiješan sadržaj tubice laganim prevrtanjem četiri puta te centrifugiran 10 minuta. Zatim je slijedilo pročišćavanje izdvojenih plazmida za sekvenciranje tako što je nadtalog prebačen u kolonu i centrifugiran na 14.000 rpm 1 minutu. Odstranjena je kolona i tekućina iz tubice te vraćena kolona u tubicu. Tim postupkom DNA se vezala na membranu kolone. U kolonu je odpipetirano 700 μ l *Membrane Wash Solution* te je centrifugirana na 14.000 rpm 1 minutu i ponovno odstranjena tekućina iz tubice u koju se vratila kolona. Odpipetirano je 250 μ l *Membrane Wash Solution*, centrifugirano na 14.000 rpm 2 minute i odstranjena tekućina iz tubice. Kolona je prebačena u novu tubicu i dodano 50 μ l *Nuclease-Free Water* te centrifugirano na 14.000 rpm 1 minutu. Kolona je bačena jer je došlo do otapanja DNA s membrane. Tubice s pročišćenom DNA pohranjene su na 4°C do slanja na sekvenciranje u servis "MacroGen" u Nizozemsku. Sekvenciranje kloniranih produkata (plazmida s ugrađenim odsječcima DNA) obavljeno je na isti način kao i sekvenciranje PCR produkata, koji nisu bili klonirani, s istim početnicama i u oba smjera. Za provjeru dobivenih rezultata sekvenciranja korišten je program BioEdit (HALL, 1999.). Dobiveni sljedovi predstavljali su pojedinačne alele heterozigotnih jedinki, te su dalje korišteni u analizama u SeqScape programu.

4.5. Genetičke analize računalnim programima

U svrhu utvrđivanja tro-lokusnih haplotipova korišten je sekvencijalni analitički proces (KENNEDY i sur., 2002.) koji izlučivanje obavlja pomoću homozigotnih jedinki, a nakon toga se izlučene haplotipove dodatno provjerava programom Arlequin 3.11 (EXCOFFIER i sur., 2005.). Isti program korišten je i za utvrđivanje odstupanja učestalosti genotipova na svakom pojedinom lokusu od onih učestalosti koje se očekuju pod Hardy-Weinbergovom ravnotežom, pomoću egzaktnog testa (GUO i THOMPSON, 1992.).

Evolucijske analize nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova načinjene su pomoću programa MEGA 5 (TAMURA i sur., 2011.) koji omogućava prevođenje nukleotidnih sljedova u aminokiselinske i izračunavanje nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti među alelima istog lokusa. Nadalje, on omogućava odabir najprikladnijeg nukleotidnog ili aminokiselinskog supstitucijskog modela za određenu skupinu podataka koristeći se Bayesovim informacijskim kriterijem (*Bayesian Information Criterion*). Osim ovih mogućnosti program je pogodan i za računanje omjera nesinonimnih i sinonimnih promjena (dN/dS test), te za filogenetske analize. Pomoću programa za odabir *Model Selection* odabran je najbolji model nukleotidne i aminokiselinske supstitucije za alele i njima pripadajuće aminokiselinske sljedove za pojedini istražen lokus, a na temelju Bayesovog informacijskog kriterija statistički je ustanovljen model supstitucije koji je najprikladniji za određenu skupinu podataka. Pomoću odabranih modela izračunate su evolucijske udaljenosti među alelima i aminokiselinskim sljedovima na sva tri istraživana lokusa. Evolucijske udaljenosti važne su za utvrđivanje filogenijskih odnosa među alelima. One se izražavaju brojem nukleotidnih, odnosno aminokiselinskih supstitucija među sljedovima (alelima). Na DRA lokusu analizirana su tri pronađena alela na kojima se evolucijska udaljenost računala prema JC modelu nukleotidne supstitucije. Na DQA lokusu analizirana je evolucijska udaljenost na 10 pronađenih alela prema JC+G modelu. Na DQB lokusu analizirana je evolucijska udaljenost na 12 pronađenih alela prema T92+G modelu nukleotidne supstitucije. Na DRA lokusu aminokiselinska evolucijska udaljenost izračunata je prema JTT modelu dok se na DQA i DQB lokusu računala prema JTT+G modelu aminokiselinske supstitucije.

Omjer nesinonimnih i sinonimnih nukleotidnih supstitucija među nukleotidnim sljedovima izražava se kao dN/dS, a procjenjuje se dN/dS testom unutar programskog paketa MEGA 5. Nesinonimne supstitucije dovode do promjena na aminokiselinama dok kod sinonimnih ili tzv. tihih supstitucija tih promjena nema, zbog degeneriranosti genetičkog koda, tj. činjenice da za jednu aminokiselinu može kodirati više od jednog kodona. Vrijednost dN

predstavlja broj nesinonimnih supstitucija po nesinonimnom nukleotidnom mjesu (poziciji), dok vrijednost dS predstavlja broj sinonimnih supstitucija po sinonimnom nukleotidnom mjestu (poziciji). Ovisno o dobivenom dN/dS omjeru, možemo utvrditi da li na pojedinom lokusu djeluje prirodna selekcija i o kojoj vrsti selekcije se radi. Kod neutralne evolucije broj nesinonimnih i sinonimnih nukleotidnih supstitucija je podjednak. Nasuprot tome, ako prevladavaju sinonimne supstitucije na lokusu ($dN/dS < 1$) tada se radi o negativnoj (purificirajućoj) selekciji na lokusu. No, ako prevladavaju nesinonimne mutacije nad sinonimnima ($dN/dS > 1$) to nam ukazuje da je lokus pod djelovanjem pozitivne selekcije koja održava nesinonimne mutacije. Stoga je ovaj test korišten da ustanovimo da li na istraženim lokusima djeluje pozitivna selekcija, odnosno kolika je vjerojatnost odbacivanja nulte hipoteze (postojanje neutralne evolucije) u korist alternativne hipoteze (pozitivne selekcije, odnosno $dN > dS$).

DRA sekvence su isključene iz daljnjih analiza zbog vrlo niskog polimorfizma na tom lokusu (pronađena su samo tri alela). Stoga je test dN/dS primijenjen na alelima koji su utvrđeni na DQA i DQB lokusima. Za izvođenje testa korištena je NEI-GOJOBORI (1986.) metoda. Standardne pogreške su dobivene *Bootstrap* metodom s 1000 ponavljanja, a statistička značajnost uočene pozitivne selekcije ($dN > dS$) procijenjena je korištenjem jednostranog Z-testa.

U svrhu filogenetske analize nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova korišten je paket računalnih programa PAML 4.3b (Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood) (YANG, 2007.). Unutar programskog paketa PAML nalazi se CODEML program koji pronalazi dokaze pozitivne selekcije na nukleotidnim sljedovima na razini pojedinačnih kodona. Testiranje omjera nesinonimnih i sinonimnih mutacija ($\omega = dN/dS$) unutar slijeda napravljeno je pomoću *Maximum Likelihood* metode. Smatra se da pozitivna selekcija ne djeluje na čitavi slijed već na pojedine dijelove slijeda, odnosno kodone. Uloga CODEML programa je da procjeni vrijednosti ω za pojedinačne kodone. Vrijednosti su različite s obzirom o kojoj se vrsti evolucije radi. Ako je $\omega = 1$ to ukazuje na neutralnu evoluciju na kodonu. Kod djelovanja purificirajuće selekcije na kodone očekuje se $\omega < 1$. U slučaju da se radi o pozitivnoj selekciji tada se očekuje $\omega > 1$. Koristeći se Bayes empirical Bayes (BEB) pristupom omogućeno je praćenje omjera ω te standardnih pogrešaka na pojedinačnim kodonima. U programu se nalaze slijedeći modeli supstitucije: M0, M1a, M2a, M3, M7 i M8. Model M0, M1a i M7 ne dozvoljavaju pozitivnu selekciju, te stoga služe kao nul modeli za M3, M2a i M8. Model M1a (*Nearly Neutral*) predviđa konzervirane kodone tj. one koji su pod usmjerenom selekcijom ($0 < \omega < 1$) i neutralne kodone ($\omega = 1$). Model M2a (*Positive Selection*) u odnosu na

M1a predviđa klasu kodona kod kojih je ω slobodni parametar i može biti $\omega > 1$. Model M3 (*Discrete model*) podrazumijeva diskretnu distribuciju gore navedenih triju klasa kodona. Na β distribuciji temelji se model M7 i podrazumijeva ω vrijednosti od 0 do 1. Model M8 u odnosu na prethodni model M7 dozvoljava mogućnost $\omega > 1$. Modeli M0, M1a i M7 ne uključuju parametre za djelovanje pozitivne selekcije i služe kao nul model za uspoređivanje s alternativnim modelima M3, M2a i M8 koji uključuju parametre za djelovanje pozitivne selekcije u skupini kodirajućih sekvenci. Statistička procjena za uspoređivanje modela izvodi se pomoću testa za omjer vjerojatnosti, *Likelihood ratio testa* (LRT) koji vjerojatnost računa na način da se udvostručena razlika u *log-likelihood* vrijednostima uspoređivanih modela ($2(L_b - L_a)$) uspoređuje s razlikom u stupnjevima slobode pojedinih modela ($P_b - P_a$) hi kvadrat testom distribucije. Ovim testom međusobno se uspoređuju M0 i M3, M1a i M2a, te M7 i M8.

Analiza selekcije načinjena je pomoću paketa HyPhy i tri *Maximum likelihood* metode za utvrđivanje kodona na koje djeluje pozitivna selekcija: *Fixed effects likelihood* (FEL), *Random effects likelihood* (REL) i *Fast unconstrained Bayesian approximation* (FUBAR). Metode se međusobno razlikuju u matematičkom pristupu analizi pojedinih kodona i statističkoj obradi.

Za utvrđivanje filogenetskih odnosa i istraživanje prisutnosti trans-specijskog polimorfizma među alelima na DQA i DQB lokusima korišten je program MrBayes 3.2.1. (RONQUIST i HUELSENBECK, 2003.). Najbolji evolucijski model za svaki skup podataka odabran je prema Bayesovom informacijskom kriteriju pomoću MODELTEST 0.1.1. softverskog programa (POSADA, 2008.). Korišteni su modeli K80+G za DQA alele i TVM+G za DQB alele. Stabla su uzorkovana svakih 100 generacija i prvih 20% stabala je odbačeno kao burn-in. Statistička obrada obavljena je *Bootstrap* metodom sa 1000 ponavljanja. Filogenetska mreža za DQA alele izrađena je pomoću TCS v. 1.21 programa (CLEMENT i sur., 2000.). Filogenetska analiza provedena je na alelima koji su ustanovljeni na DQA i DQB lokusima u ovom istraživanju. Uz to su za izradu filogenetskih stabala DQA i DQB alela korišteni svi aleli koji su do sada pronađeni kod različitih vrsta kitova (Cetacea), a dostupni su u genskoj bazi GenBank. U slučaju DQA alela u GenBank bazi je pronađeno 10 sekvenci za dobrog dupina (Tutr; GenBank pristupni brojevi EU024798, KF751585-KF751593), te 10 sekvenci za grenlandskog kita (Bamy; GenBank pristupni brojevi EU024796, EU024797, EU024799-EU024806), dok je za izradu filogenetskog stabla DQB lokusa pronađeno ukupno 47 sekvenci za alele koji tvore filogenetsko stablo. Filogenetska stabla su konstruirana metodom *Maximum Likelihood*. Ljudski HLA aleli pripadajućih lokusa korišteni su kao vanjska grupa kod izrade filogenetskih stabala obaju lokusa.

Za analizu rekombinacija među alelima na DQA i DQB lokusu korišten je programski paket RDP3 Alpha 44 (MARTIN i sur., 2010). RDP3 istovremeno koristi široki opseg raznovrsnih metoda za detekciju rekombinacija, a za potvrdu postojanja rekombinacijskog fragmenta služi se višestrukim statističkom i filogenetskim metodama. Rezultat je konsenzus svih upotrijebljenih metoda gdje je utvrđen rekombinantni slijed potvrđen višestrukim analizama.

5. REZULTATI

5.1. Značajke odabranih lokusa MHC gena skupine II dobroga dupina

U ovom istraživanju obrađena su tkiva porijeklom od 62 dobra dupina (*Tursiops truncatus*). Iz hrvatskog dijela Jadranskoga mora potječe 48 uzoraka, a dva uzorka su iz talijanskog dijela Jadranskoga mora (Venecija). U daljnjem istraživanju ovih 50 uzoraka predstavljati će populaciju dobroga dupina iz Jadranskoga mora. Iz ostalih mora Sredozemlja korišteno je šest uzoraka dobroga dupina iz zapadne Italije (Ligursko more i Tirensko more), pet uzoraka iz Izraela (područje Haifa) i jedan uzorak iz Grčke (područje Mytikas). U daljnjem istraživanju ovih 12 uzoraka predstavljati će jedinke iz ostalih područja Sredozemnog mora. U svim uzorcima istraženi su aleli DRA, DQA i DQB lokusa iz skupine II MHC regije pomoću fragmenata njihovih 2. eksona. Dužina istraženog fragmenta eksona 2 različita je za pojedine lokuse, pa je za DRA lokus iznosila 189 parova baza (pb), za DQA lokus 246 pb, a za DQB lokus 172 pb. Niti jedan dobiveni slijed nije sadržavao stop kodone. Po pojedinom lokusu nije utvrđeno više od dva alela po jedinki, što potvrđuje činjenicu da ti lokusi u dobroga dupina nisu duplicirani. PCR produkti heterozigotnih jedinki, u kojima nije bilo moguće razdvojiti gametne faze za pojedine lokuse pomoću SeqScape programa, klonirani su u plazmidnom vektoru. Na DQA lokusu uspješno je klonirano 10 uzoraka pri čemu je za sekvenciranje plazmida korištena DQA početnica. Na DQB lokusu uspješno su klonirana tri uzorka, a za sekvenciranje plazmida korištena je DQB1 i DQB2 početnica. U ukupnom uzorku, tj. u populaciji dobroga dupina iz Jadranskoga mora kao i u istraženim populacijama iz ostalih područja Sredozemnog mora ustanovljeno je ukupno 25 alela na sva tri lokusa. Od utvrđenih alela 12 je bilo prethodno opisanih, dok je 13 alela bilo novih (jedan na DRA lokusu, devet na DQA lokusu te tri na DQB lokusu). Uzorak dobrih dupina iz Jadranskoga mora čini 50 životinja i svaka životinja nosi po dva alela za pojedini lokus. S obzirom da su aleli za sve lokuse u svih životinja uspješno određeni, ukupni broj alela za svaki lokus u jadranskoj populaciji iznosi 100. Iz tog razloga frekvencija određenog alela odgovara apsolutnom broju alela utvrđenom u Jadranskoj populaciji (tablica 4, 6 i 8).

5.1.1. DRA lokus

Na DRA lokusu istražen je fragment 2. eksona dužine 189 pb i ukupno su određena tri DRA alela. Alel Deca-DRA*01 (EF375603) (XU i sur., 2009.) utvrđen je ranije u pripadnika roda *Delphinus* (*Delphinus capensis*) i roda *Stenella* (u plavobijelog dupina, *Stenella coeruleoalba*). U našim je uzorcima označen kao Tutr-DRA*02. Alel Deca-DRA*0101

(FM986350) (BALLINGALL i sur., 2010.) utvrđen je ranije u pripadnika roda *Delphinus* (*Delphinus capensis*), roda *Grampus* (u glavatog dupina, *Grampus griseus*) i u rodu *Stenella* (u plavobijelog dupina). U našim je uzorcima označen kao Tutr-DRA*03. Ovim istraživanjem utvrđen je jedan novi alel na DRA lokusu koji je u našim uzorcima označen kao Tutr-DRA*01. U tablici 4 prikazani su pronađeni aleli na DRA lokusu, broj pojedinih alela u populaciji, njihove frekvencije i broj homozigotnih jedinki u istraženom uzorku populacije dobrog dupina iz Jadranskoga mora.

Tablica 4. DRA aleli utvrđeni u 50 dobra dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskoga mora, njihova frekvencija (%) i broj homozigotnih jedinki za određeni alel (h)

Ime alela	Broj alela u populaciji	%	h
Tutr-DRA*02	50	50	8
Tutr-DRA*01	47	47	7
Tutr-DRA*03	3	3	0

Masno je otisnut novi alel.

Alel Tutr-DRA*02 najčešći je u populaciji dobrog dupina iz Jadranskoga mora. Frekvencija alela u populaciji iznosi 50%, a pronađen je u osam jedinki u homozigotnom stanju. Drugi po učestalosti je alel Tutr-DRA*01 čija frekvencija u populaciji iznosi 47%. Pronađen je u sedam jedinki u homozigotnom stanju. Najmanje je zastupljen Alel Tutr-DRA*03 s najnižom frekvencijom od 3% i nije utvrđen u homozigotnom stanju.

U tablici 5. prikazani su aleli DRA lokusa pronađeni u dobrim dupina iz ostalih područja Sredozemnoga mora. Izražen je broj jedinki u kojima je alel pronađen i broj homozigotnih životinja. Frekvencija alela nije prikazana s obzirom da istraženi uzorak ne sadrži dovoljan broj životinja za takvo prikazivanje podataka.

Tablica 5. DRA aleli utvrđeni u 12 dobra dupina (*Tursiops truncatus*) iz ostalih područja Sredozemnog mora, ukupni broj alela i broj homozigotnih jedinki za određeni alel (h)

Ime alela	Broj nađenih alela	h
Tutr-DRA*02	16	5
Tutr-DRA*01	6	0
Tutr-DRA*03	2	0

Masno je otisnut novi alel.

Alel Tutr-DRA*02 utvrđen je u najvećem broju dobrih dupina iz ostalih područja Sredozemnog mora. Pronađen je u pet jedinki u homozigotnom stanju. Sljedeći po pojavnosti je Tutr-DRA*01 koji je pronadjen u šest jedinki, dok je alel Tutr-DRA*03 najmanje zastupljen i dolazi u samo dvije jedinke. Oba alela dolaze samo u heterozigotnom stanju.

U alelima DRA lokusa utvrđena su tri promjenjiva nukleotidna mjesta. Od toga su dvije sinonimne mutacije, i to u alela Tutr-DRA*03 na 18. nukleotidnom mjestu došlo je do promjene adenina u guanin, a u novo utvrđenog alela Tutr-DRA*01 na 69. nukleotidnom mjestu došlo je do promjene baze timin u citozin.

Tutr-DRA*02	TCT CTG TCC CCT TAT CAA TCA AAC GAG TTT ATG TTT GAC TTT GAT GGT	[48]
Tutr-DRA*03G	[48]
Tutr-DRA*01	...	[48]
Tutr-DRA*02	GAT GAG ATT TTC CAC GTG GAT ATG GAA AAG AAG GAG ACA GTG TGG CGG	[96]
Tutr-DRA*03	...	[96]
Tutr-DRA*01C	[96]
Tutr-DRA*02	CTT AAA GAA TTT GGA AAT TTT GCC AGC TTT CAG GCT CAG GGT GCA TTG	[144]
Tutr-DRA*03	...	[144]
Tutr-DRA*01	...	[144]
*		
Tutr-DRA*02	GCC AAT ATG GCT GTG GGA AGA GCC AAC CTG GAC ATC TTG ATA AAG	[189]
Tutr-DRA*03A..	[189]
Tutr-DRA*01	...	[189]

Slika 6. Nukleotidni sljedovi alela DRA lokusa dobroga dupina (*Tursiops truncatus*). Točka označava nukleotid identičan onom u prvoj liniji, a zvjezdica (*) nesinonimno promijenjeno nukleotidno mjesto.

Nadalje, ustanovljena je jedna nesinonimna promjena nukleotida koja uzrokuje i promjenu aminokiseline. Aleli Tutr-DRA*01 i Tutr-DRA*02 daju jednake proteinske produkte, dok se Tutr-DRA*03 od njih razlikuje u jednoj aminokiselini. Na 61. aminokiselinskom mjestu ima aminokiselinu metionin (M), dok prva dva alela imaju aminokiselinu leucin (L). Aminokiselinski sljedovi koje kodiraju utvrđeni DRA aleli prikazani su na slici 7.

Tutr-DRA*02 SLSPYQSNEF MFDFDGDEIF HVDMEKKETV WRLKEFGNFA SFQAQGAN [50]
Tutr-DRA*03 [50]
Tutr-DRA*01 [50]

Tutr-DRA*02 MAVGRANLDI LIK [63]
Tutr-DRA*03 M.. [63]
Tutr-DRA*01 [63]

Slika 7. Aminokiselinski sljedovi kodirani alelima DRA lokusa dobroga dupina (*Tursiops truncatus*). Točka označava aminokiselinu identičnu onoj u prvoj liniji.

5.1.2. DQA lokus

U ovom istraživanju analiziran je cijeli ekson 2 DQA lokusa dužine 246 pb i pronađeno je ukupno deset alela. Samo je jedan DQA alel već ranije utvrđen u dobrog dupina i označen kao EU024798 (HEIMEIER i sur., 2009.), a u ovom istraživanju označen je kao Tutr-DQA*01(D38). Preostalih devet alela su novi aleli.

Tablica 6. DQA aleli utvrđeni u 50 dobroga dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskoga mora, njihova frekvencija (%) i broj homozigotnih jedinki za određeni alel (h)

Ime alela	Broj alela u populaciji	%	h
Tutr-DQA*02	45	45	6
Tutr-DQA*01	31	31	3
Tutr-DQA*03	15	15	0
Tutr-DQA*04	5	5	0
Tutr-DQA*06	2	2	0
Tutr-DQA*07	1	1	0
Tutr-DQA*05	1	1	0

Masno su otisnuti novi aleli.

U populaciji dobroga dupina iz Jadranskoga mora utvrđena je prisutnost sedam DQA alela (tablica 6). Alel Tutr-DQA*02 je najučestaliji, s frekvencijom od 45%. U šest jedinki javlja se u homozigotnom stanju. Frekvencija alela Tutr-DQA*01 nešto je manja i iznosi 31% a ovaj alel je utvđen u tri jedinke u homozigotnom stanju. Najniža frekvecija od 1% utvrđena je za alele Tutr-DQA*07 i Tutr-DQA*05. Aleli Tutr-DQA*08, Tutr-DQA*09 i Tutr-DQA*10 nisu utvrđeni u populaciji dobroga dupina iz Jadranskoga mora, ali su pronađeni u jedinkama iz drugih područja Sredozemnoga mora (tablica 7). Frekvencija alela u tablici 7 nije prikazana s obzirom da istraženi uzorak ne sadrži dovoljan broj životinja za takav prikaz podataka, već je prikazan samo nađeni broj alela u tom uzorku.

Tablica 7. DQA aleli utvrđeni u 12 dobrih dupina (*Tursiops truncatus*) iz ostalih područja Sredozemnoga mora, ukupni broj alela i broj homozigotnih jedinki za određeni alel (h)

Ime alela	Broj nađenih alela	h
Tutr-DQA*01	8	2
Tutr-DQA*02	6	1
Tutr-DQA*04	3	0
Tutr-DQA*09	3	1
Tutr-DQA*03	1	0
Tutr-DQA*07	1	0
Tutr-DQA*08	1	0
Tutr-DQA*10	1	0

Masno otisnuti aleli prisutni su i u jedinki iz Jadranskog mora.

U dobrih dupina iz ostalih područja Sredozemnoga mora utvrđena je prisutnost osam DQA alela. Najučestaliji je alel Tutr-DQA*01, koji je utvrđena u šest jedinki od toga u dvije jedinke u homozigotnom stanju. Drugi po učestalosti je alel Tutr-DQA*02 kojeg ima pet jedinki, ali samo jedna u homozigotnom stanju. Aleli Tutr-DQA*04 i Tutr-DQA*09 jednako su zastupljeni, no samo Tutr-DQA*09 dolazi u jedne jedinke u homozigotnom stanju. Aleli Tutr-DQA*03, Tutr-DQA*07, Tutr-DQA*08 i Tutr-DQA*10 javljaju se svaki u samo jedne jedinke. Aleli Tutr-DQA*05 i Tutr-DQA*06 koji su nađeni u jedinkama iz Jadranskoga mora nisu utvrđeni u dobrih dupina iz ostalih područja Sredozemnoga mora.

Među alelima DQA lokusa nađeno je ukupno 21 promjenjivo nukleotidno mjesto, od toga je 20 nesinonimnih promjena. Jedina sinonimna mutacija se nalazi u alelu Tutr-DQA*10, na 27. nukleotidnom mjesu (tranzicija timina u citozin). Zanimljivo je da alel Tutr-DQA*04 ima deleciju od tri nukleotida (26.-28. nukleotidnog mjesta), koja ne mijenja okvir čitanja kod translacije. Nukleotidni sljedovi pojedinih alela DQA lokusa prikazani su na slici 8.

															*			
Tutr-DQA*01	GAC	CAT	GTT	GGC	TCC	TAT	GGC	ACA	ACT	ATC	TAC	CAG	TCT	TTT	GGG	CCC	[48]	
Tutr-DQA*02	[48]	
Tutr-DQA*06	[48]	
Tutr-DQA*10C	[48]	
Tutr-DQA*07	[48]	
Tutr-DQA*08	[48]	
Tutr-DQA*04-	-.	T..	[48]	
Tutr-DQA*03	[48]	
Tutr-DQA*09	[48]	
Tutr-DQA*05	[48]	
				*		***						**						
Tutr-DQA*01	TCT	GGC	CAG	TAC	ACC	CAA	GAA	TTT	GAT	GGA	GAT	GAG	CTG	TTT	TAT	GTG	[96]	
Tutr-DQA*02	[96]	
Tutr-DQA*06	[96]	
Tutr-DQA*10	[96]	
Tutr-DQA*07	[96]	
Tutr-DQA*08T.	...	G..	[96]	
Tutr-DQA*4T.	...	GC.	[96]	
Tutr-DQA*03C	AA.	[96]	
Tutr-DQA*09CA.	[96]	
Tutr-DQA*05T.	...	AC.	[96]	
Tutr-DQA*01	GAC	CTG	GAG	AAG	AAG	GAG	ACT	GTC	TGG	CGG	CTG	CCT	GTG	TTT	AGC	GAA	[144]	
Tutr-DQA*02	[144]	
Tutr-DQA*06	[144]	
Tutr-DQA*10	[144]	
Tutr-DQA*07	[144]	
Tutr-DQA*08	[144]	
Tutr-DQA*04	[144]	
Tutr-DQA*03	[144]	
Tutr-DQA*09	[144]	
Tutr-DQA*05	[144]	

		*	*					*			*	*			*		
Tutr-DQA*01	TTC	GCA	GGT	TTT	GAC	CCA	CAG	GGT	GCC	CTG	AGA	AAC	ATA	GCT	GTG	GTG	[192]
Tutr-DQA*02C.C.	[192]
Tutr-DQA*06	...	A..C.	[192]
Tutr-DQA*10	...	A..	A..C.	[192]
Tutr-DQA*07	...	A..	A..	[192]
Tutr-DQA*08	...	A..	A..	[192]
Tutr-DQA*04	...	T..	A..C.	[192]
Tutr-DQA*03	A..	C..	[192]
Tutr-DQA*09	A..G.C.	[192]
Tutr-DQA*05	...	A..	A..C.	[192]
		**	**				*			*							
Tutr-DQA*01	AAA	CAT	AAC	TTG	GAT	ATC	CTG	ATT	AAA	TGC	TCC	AAC	TTT	ACC	CCT	GTT	[240]
Tutr-DQA*02A	C..	[240]
Tutr-DQA*06	C..	[240]
Tutr-DQA*10	C..	[240]
Tutr-DQA*07	C..	[240]
Tutr-DQA*08	C..	[240]
Tutr-DQA*04	[240]
Tutr-DQA*03	C..	[240]
Tutr-DQA*09G.	T..	A..	C..	[240]
Tutr-DQA*05GC	.C.	A..	C..	[240]
		*															
Tutr-DQA*01	ACC	AAT															[246]
Tutr-DQA*02															[246]
Tutr-DQA*06															[246]
Tutr-DQA*10															[246]
Tutr-DQA*07															[246]
Tutr-DQA*08															[246]
Tutr-DQA*04															[246]
Tutr-DQA*03															[246]
Tutr-DQA*09															[246]
Tutr-DQA*05	G..	...															[246]

Slika 8. Nukleotidni sljedovi alela DQA lokusa dobrog dupina (*Tursiops truncatus*). Točka označava nukleotid identičan onom u prvoj liniji, a zvjezdica (*) nesinonimno promijenjeno nukleotidno mjesto.

Ukupno je ustanovljeno 15 promjenjivih aminokiselinskih ostataka, a uslijed nesinonimnih promjena nukleotida nastaju jedinstveni aminokiselinski sljedovi od svakog od 10 utvrđenih DQA alela. Aminokiselinski sljedovi koje kodiraju utvrđeni DQA aleli prikazani su na slici 9.

Tutr-DQA*01	DHVGSYGTTI	YQSFGPSGQY	TQEFDGDEL	F	YVDLEKKE	TV	WRLPVFSEFA	[50]
Tutr-DQA*02	[50]
Tutr-DQA*06T	[50]
Tutr-DQA*10T	[50]
Tutr-DQA*07T	[50]
Tutr-DQA*08	F	ET	[50]
Tutr-DQA*04	-	S	F	A.....S	[50]
Tutr-DQA*03	H	K.....	[50]
Tutr-DQA*09	H	Q.....	[50]
Tutr-DQA*05	F	T.....T	[50]
Tutr-DQA*01	GFDPQALRN	IAVVKHNLDI	LIKCSNFTP	V	TN	[82]		
Tutr-DQA*02	T	A	Q	R.....
Tutr-DQA*06	A	R
Tutr-DQA*10	S	A	R.....
Tutr-DQA*07	S	R.....
Tutr-DQA*08	S	R.....
Tutr-DQA*04	S	A
Tutr-DQA*03	S	R	R.....
Tutr-DQA*09	S	S	A	RY
Tutr-DQA*05	S	A	RT	M.....
								R.....
								A

Slika 9. Aminokiselinski sljedovi kodirani alelima DQA lokusa dobroga dupina (*Tursiops truncatus*). Točka označava aminokiselinu identičnu onoj u prvoj liniji.

5.1.3. DQB lokus

U ovom istraživanju je istražen dio eksona 2 DQB lokusa dužine 172 pb. Ukupno je pronađeno 12 DQB alela. Devet od njih je već pronađeno u ranijim istraživanjima dobroga dupina (neobjavljeni podaci), a pohranjeni su u genskoj bazi GenBank pod pristupnim brojevima: AB302044.1, AB302048.1, AB302049.1, AB302050.1, AB302051.1, AB302053.1, AB302054.1, AB302063.1, AB302065.1. Ovi aleli korišteni su za oblikovanje knjižnice alela za DQB lokus dobroga dupina. Preostala tri alela su novi aleli. Utvrđeni aleli na DQB lokusu, broj pojedinih alela u populaciji dobroga dupina iz Jadranskoga mora, njihove frekvencije i broj pronađenih homozigotnih životinja za pojedini alel prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. DQB aleli utvrđeni u 50 dobrih dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskoga mora, njihova frekvencija (%) i broj homozigotnih jedinki za određeni alel (h)

Ime alela	Broj alela u populaciji	%	h
Tutr-DQB*07	35	35	3
Tutr-DQB*22	31	31	3
Tutr-DQB*25	15	15	0
Tutr-DQB*08	9	9	0
Tutr-DQB*01	5	5	0
Tutr-DQB*27	2	2	0
Tutr-DQB*06	1	1	0
Tutr-DQB*26	1	1	0
Tutr-DQB*05	1	1	0

Masno su otisnuti novi aleli.

U populaciji dobroga dupina iz Jadranskoga mora utvrđena je prisutnost devet DQB alela. Alel Tutr-DQB*07 je najučestaliji i dolazi u 35% jedinki ove populacije, te se javlja u tri jedinke u homozigotnom stanju. Alel Tutr-DQB*22 je drugi po učestalosti i prisutan je u 31% jedinki ove populacije. U tri jedinke javlja se u homozigotnom stanju. Najmanje su zastupljeni aleli Tutr-DQB*06, Tutr-DQB*26 i Tutr-DQB*05, jer su pronađeni u samo jedne jedinke svaki i imaju alelnu frekvenciju od 1% . Aleli Tutr-DQB*20, Tutr-DQB*10 i Tutr-DQB*11 nisu utvrđeni u populaciji iz Jadranskog mora, ali su utvrđeni u uzorcima iz ostalih područja Sredozemnog mora (tablica 9). Aleli tvrđeni u uzorcima iz ostalih područja Sredozemnog mora prikazani su uz njihov broj i broj homozigotnih životinja u istraženom uzorku u tablici 9. Frekvencija alela nije prikazana s obzirom da istraženi uzorak ne sadrži dovoljan broj životinja za takav prikaz podataka.

Tablica 9. DQB aleli utvrđeni u 12 dobrih dupina (*Tursiops truncatus*) iz ostalih područja Sredozemnoga mora, ukupni broj alela i broj homozigotnih jedinki za određeni alel (h)

Ime alela	Broj nađenih alela	h
Tutr-DQB*22	8	2
Tutr-DQB*07	5	0
Tutr-DQB*01	3	0
Tutr-DQB*10	3	1
Tutr-DQB*06	2	0
Tutr-DQB*11	1	0
Tutr-DQB*20	1	0
Tutr-DQB*25	1	0

Masno otisnuti aleli pronađeni su i u jedinkama iz Jadranskoga mora.

U dobrih dupina iz drugih područja Sredozemnoga mora utvrđena je prisutnost osam DQB alela. Najučestaliji je Tutr-DQB*22 koji se javlja u šest jedinki od toga u dvije jedinke u homozigotnom stanju. Drugi po učestalosti je Tutr-DQB*07 koji se javlja u pet jedinki. Alel Tutr DQB*10 je utvrđen u jedne jedinke u homozigotnom stanju. Aleli Tutr-DQB*25, Tutr-DQB*20, Tutr-DQB*11 javljaju se u samo jedne jedinke. Aleli Tutr-DQB*08, Tutr-DQB*27, Tutr-DQB*26 i Tutr-DQB*05 koji su nađeni u populaciji dobroga dupina iz Jadranskoga mora nisu utvrđeni u životinja iz ostalih područja Sredozemnoga mora.

Među alelima DQB lokusa u ukupnom istraženom uzorku nađeno je ukupno 40 promjenjivih nukleotidnih mjesta, a od toga je 38 nesinonimnih promjena. Jedine sinonimne mutacije nalaze se na 39. nukleotidnom mjestu (promjena citozina u timin) u tri alela (Tutr-DQB*11, Tutr-DQB*26 i Tutr-DQB*27), te na 79. nukleotidnom mjestu (promjena timina u citozin) također u tri alela (Tutr-DQB*08, Tutr-DQB*26 i Tutr-DQB*27). Nukleotidni sljedovi pojedinih alela DQA lokusa prikazani su na slici 10.

```

** * *** ***
Tutr-DQB*25 ACG GAG CGG GTG CGG GCC ATG AGC AGA TAC ATC TAT AAC [ 39]
Tutr-DQB*05 ... .. CA. G.. .. [ 39]
Tutr-DQB*10 ... .. CA. G.. ..TG ... [ 39]
Tutr-DQB*20 ... .. CT. G.. GAA ... [ 39]
Tutr-DQB*22 ... .. CT. G.. ..A.. ... [ 39]
Tutr-DQB*07 ... .. TT. G.. GA. ... [ 39]
Tutr-DQB*11 ... .. TT. G.. .A. ...A.. ..T [ 39]
Tutr-DQB*01 ... .. TT. G.. GA. ...C. ... [ 39]
Tutr-DQB*06 ... .. .T. G.. GA. ...C. ... [ 39]
Tutr-DQB*08 ... .. TT. G.. GA. ... [ 39]
Tutr-DQB*26 ... .. TT. G.. GA. ... ..T [ 39]
Tutr-DQB*27 ... .. TT. G.. GA. ... ..T [ 39]

```

```

**
Tutr-DQB*25 CGG GAG GAG TAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGC GAG [ 78]
Tutr-DQB*05 ... .. [ 78]
Tutr-DQB*10 ... .. .T. ... [ 78]
Tutr-DQB*20 ... .. .T. ... [ 78]
Tutr-DQB*22 ... .. .TG ... [ 78]
Tutr-DQB*07 ... .. .T. ... [ 78]
Tutr-DQB*11 ... .. [ 78]
Tutr-DQB*01 ... .. .TG ... [ 78]
Tutr-DQB*06 ... .. .TA ... [ 78]
Tutr-DQB*08 ... .. [ 78]
Tutr-DQB*26 ... .. .T. ... [ 78]
Tutr-DQB*27 ... .. .T. ... [ 78]

```

```

* ** ** **
Tutr-DQB*25 TTC CGG GCG GTG ACC GAG CTG GGC CGG CGT ACC GCC GAG [117]
Tutr-DQB*05 ... .. .CG GA. ...A.. [117]
Tutr-DQB*10 ... .. .CG GA. ... [117]
Tutr-DQB*20 ... .. .CG GA. ...AC. [117]
Tutr-DQB*22 ... .. .G G.. ... [117]
Tutr-DQB*07 ... .. .CG GA. ... [117]
Tutr-DQB*11 ... .. .G ... [117]
Tutr-DQB*01 ... .. .G .T. ... [117]
Tutr-DQB*06 ... .. .CG GA. ... [117]
Tutr-DQB*08 CA. ... .CG GA. ... [117]
Tutr-DQB*26 CA. ... .CG GA. ... [117]
Tutr-DQB*27 CA. ... .CG GA. ... [117]

```

	*	**		*	*	*		**	*		**	**	*
Tutr-DQB*25	TAC	TGG	AAC	AGC	CAG	GAG	GAC	ATC	CTG	GAG	GAG	GAA	CGG
Tutr-DQB*05	CG.	A..	...
Tutr-DQB*10TC	A..	CG.
Tutr-DQB*20	G..	C..	C..	AG.	...
Tutr-DQB*22G.	A..	...	TA.	CT.	AG.	...
Tutr-DQB*07	C..	A..	CG.	...	T..
Tutr-DQB*11	A..	CG.	A..	...
Tutr-DQB*01	A..	G..	...	CG.	A..	...
Tutr-DQB*06	A..	CG.	A..	...
Tutr-DQB*08	A..	...	T..	CG.	A..	...
Tutr-DQB*26	A..	CG.	A..	...
Tutr-DQB*27	A..	...	T..	CG.	A..	...

		***	**		*	
Tutr-DQB*25	GCC	GCG	GTG	GAC	ACG	[171]
Tutr-DQB*05ACG.	[171]
Tutr-DQB*10	...	CAC	[171]
Tutr-DQB*20	C..	[171]
Tutr-DQB*22A.	[171]
Tutr-DQB*07AC	.G.	[171]
Tutr-DQB*11A.	C..	[171]
Tutr-DQB*01A.	C..	[171]
Tutr-DQB*06A.	C..	[171]
Tutr-DQB*08A.	C..	[171]
Tutr-DQB*26A.	C..	[171]
Tutr-DQB*27A.	C..	[171]

Slika 10. Nukleotidni sljedovi alela DQB lokusa dobroga dupina (*Tursiops truncatus*). Točka označava nukleotid identičan onom u prvoj liniji, a zvjezdica (*) nesinonimno promijenjeno nukleotidno mjesto.

Ukupno su ustanovljena 22 promjenjiva aminokiselinska ostatka, a uslijed nesinonimnih promjena nukleotida nastaju jedinstveni aminokiselinski sljedovi od svakog od 12 utvrđenih DQB alela. Aminokiselinski sljedovi koje kodiraju utvrđeni DQB aleli prikazani su na slici 11.

Tutr-DQB*25	TERVRAMSRY IYNREEYVRF DSDVGEFRAV TELGRRTAEY	[40]		
Tutr-DQB*05HV...	PD.K. [40]		
Tutr-DQB*10HV..L	F...	PD... [40]	
Tutr-DQB*20LVE..	F...	PD.T. [40]	
Tutr-DQB*22LV..N	L...	A... [40]	
Tutr-DQB*07FVD..	F...	PD..H [40]	
Tutr-DQB*11FVN.N		[40]	
Tutr-DQB*01FVD.S	L...	I... [40]	
Tutr-DQB*06VVD.S	L...	PD... [40]	
Tutr-DQB*08FVD..	H...	PD... [40]	
Tutr-DQB*26FVD..	F...	H...	PD... [40]
Tutr-DQB*27FVD..	F...	H...	PD... [40]
Tutr-DQB*25	WNSQEDILEE ERAAVDT	[57]		
Tutr-DQB*05R K..D..R	[57]		
Tutr-DQB*10	F...K...R ...H...	[57]		
Tutr-DQB*20	..G...L..Q R...L..	[57]		
Tutr-DQB*22	...RK.Y..L R..E...	[57]		
Tutr-DQB*07	...K...R .W.DG..	[57]		
Tutr-DQB*11	...K...R K..EL..	[57]		
Tutr-DQB*01	...K..V.R K..EL..	[57]		
Tutr-DQB*06	...K...R K..EL..	[57]		
Tutr-DQB*08	...K.F..R K..EL..	[57]		
Tutr-DQB*26	...K...R K..EL..	[57]		
Tutr-DQB*27	...K.F..R K..EL..	[57]		

Slika 11. Aminokiselinski sljedovi kodirani alelima DQB lokusa dobrog dupina (*Tursiops truncatus*). Točka označava aminokiselinu identičnu onoj u prvoj liniji.

5.2. Tro-lokusni DRA/DQA/DQB haplotipovi

5.2.1. Haplotipovi DRA/DQA/DQB u populaciji dobrog dupina iz Jadranskoga mora

U 49 dobrih dupina iz Jadranskoga mora ustanovljeni su haplotipovi, a za jednu jedinku (B1) haplotipovi nisu određeni, jer nakon izlučivanja haplotipova nije se mogla dobiti jednoznačna jedinstvena kombinacija haplotipova za tu jedinku. Ukupno je utvrđeno 12 haplotipova, a njih pet pronađeno je samo u jadranskim uzorcima i nema ih u dobrim dupinima iz ostalih područja Sredozemnoga mora (masno otisnuti u tablici 10), što ukazuje na to da bi ti haplotipovi mogli biti specifični za dobre dupine iz Jadranskog mora.

Tablica 10. Dvanaest DRA/DQA/DQB haplotipova utvrđenih u 49 dobrih dupina iz Jadranskoga mora, njihova frekvencija (%) i broj homozigotnih jedinki za određeni haplotip (h)

DRA	DQA	DQB	%	H
DRA*01	DQA*02	DQB*07	34,69	3
DRA*02	DQA*01	DQB*22	29,59	1
DRA*02	DQA*03	DQB*25	14,28	0
DRA*01	DQA*02	<u>DQB*08</u>	9,18	0
DRA*01	DQA*01	DQB*22	2,04	0
DRA*02	<u>DQA*06</u>	<u>DQB*27</u>	2,04	0
DRA*02	DQA*04	DQB*01	2,04	0
DRA*03	DQA*04	DQB*01	2,04	0
DRA*01	<u>DQA*05</u>	<u>DQB*05</u>	1,02	0
DRA*02	DQA*02	<u>DQB*26</u>	1,02	0
DRA*02	DQA*07	DQB*06	1,02	0
DRA*01	DQA*03	DQB*25	1,02	0

Masno otisnuti haplotipovi i podvučeni aleli pronađeni su samo u dobrih dupina iz Jadranskoga mora.

Haplotip DRA*01/DQA*02/DQB*07 najbrojniji je u populaciji dobrih dupina iz Jadranskoga mora i ima učestalost od 34,69%. Utvrđen je u tri jedinke u homozigotnom stanju. Sljedeći po učestalosti je haplotip DRA*02/DQA*01/DQB*22 i dolazi u 29,59% jedinki, a u jedne jedinke je utvrđen u homozigotnom stanju. Najrjeđi su haplotipovi DRA*01/DQA*05/DQB*05, DRA*02/DQA*02/DQB*26, DRA*02/DQA*07/DQB*06 i DRA*01/DQA*03/DQB*25 koji su utvrđeni u samo jedne jedinke.

5.2.2. Haplotipovi DRA/DQA/DQB u dobrim dupina iz ostalih područja Sredozemnog mora

Od 12 uzoraka dobrih dupina iz ostalih područja Sredozemnog mora bilo je moguće utvrditi haplotipove za njih 11. U jedinke oznake T152 nije utvrđen haplotip. Ukupno je pronađeno 11 različitih haplotipova (tablica 11). Frekvencija haplotipova nije prikazana s obzirom da se istražen uzorak sastoji od nedovoljnog broja životinja za takvu obradu podataka. Sedam haplotipova se poklapalo s haplotipovima nađenim u populaciji iz Jadranskoga mora. Zanimljivo je da je haplotip nađen u jedinci iz Izraela (DRA*02/DQA*09/DQB*10) bio u homozigotnom stanju, a takav haplotip nije nađen u Jadranskom moru, što ukazuje da bi taj haplotip mogao biti specifičan za istočni dio Sredozemnog mora.

Tablica 11. DRA/DQA/DQB haplotipovi utvrđeni u 11 dobrim dupina iz ostalih područja Sredozemnog mora

DRA	DQA	DQB	Lokacija uzoraka
<i>DRA*02</i>	<i>DQA*01</i>	<i>DQB*22</i>	Izrael, Grčka, Tirensko more
DRA*01	DQA*02	DQB*07	Tirensko more, Ligursko more
DRA*02	DQA*04	DQB*01	Ligursko more
DRA*02	DQA*02	DQB*06	Ligursko more
DRA*02	<u>DQA*08</u>	<u>DQB*20</u>	Ligursko more
DRA*03	DQA*04	DQB*01	Ligursko more
DRA*02	DQA*03	DQB*25	Izrael
<i>DRA*02</i>	<u><i>DQA*09</i></u>	<u><i>DQB*10</i></u>	Izrael
DRA*02	DQA*07	DQB*06	Izrael
DRA*01	DQA*01	DQB*22	Izrael
DRA*02	<u>DQA*10</u>	<u>DQB*11</u>	Ligursko more

Masno otisnuti haplotipovi i podvučeni aleli nisu pronađeni u jedinki iz Jadranskoga mora.

Koso su otisnuti haplotipovi utvrđeni u homozigotnom stanju.

5.3. Testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže

U populaciji dobroga dupina iz Jadranskoga mora koju čini uzorak od 50 jedinki provedeno je testiranje podudarnosti učestalosti heterozigota na sva tri lokusa s onom koja se očekuje pod uvjetima Hardy-Weinbergove ravnoteže. Rezultati analize pokazali su da nema statistički značajnog odstupanja učestalosti heterozigotnosti od očekivane, odnosno da je ona u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom ($p_{HWE} > 0,05$ za sva tri lokusa).

Tablica 12. Odstupanja heterozigotnosti na DRA, DQA i DQB lokusu dobroga dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskoga mora u odnosu na Hardy-Weinbergovu ravnotežu

Lokus	Broj analiziranih genotipova	Ho	He	p_{HWE}
DQA	50	0,800	0,667	0,405
DQB	50	0,880	0,755	0,374
DRA	50	0,700	0,534	0,061

Ho – uočena heterozigotnost

He – očekivana heterozigotnost

5.4. Evolucijske udaljenosti među alelima DRA, DQA i DQB lokusa dobroga dupina

Evolucijske udaljenosti između alela DRA, DQA i DQB lokusa određeni su analizom njihovih nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova u MEGA računalnom programu. Ovaj program izračunao je i odabrao najprikladniji model nukleotidne i aminokiselinske supstitucije za svaki pojedini lokus. Za pojedine lokuse određeni su sljedeći modeli nukleotidne supstitucije: za DRA lokus odabran je model JC, za DQA lokus JC+G, a za DQB lokus T92+G. Najprikladniji modeli za aminokiselinske supstitucije su sljedeći: za DRA lokus JTT, a za lokuse DQA i DQB JTT+G. Iz tablice 17 vidljivo je da je srednja nukleotidna evolucijska udaljenost najmanja između alela DRA lokusa (0,011), a najveća za alele DQB lokusa (0,114). Za alele DQA lokusa ona iznosi 0,047. Za DRA lokus nađena je i najmanja srednja aminokiselinska udaljenost (0,011), a najveća je za DQB lokus (0,255). Za DQA lokus ona iznosi 0,093. Vrijednost za srednju aminokiselinsku udaljenost alela DRA lokusa jednaka je vrijednosti srednje nukleotidne udaljenosti. Na DQA i DQB lokusu vrijednosti za aminokiselinske udaljenosti veće su od vrijednosti nukleotidnih udaljenosti.

Tablica 13. Broj polimorfnih nukleotidnih mjesta, srednje vrijednosti evolucijskih nukleotidnih i aminokiselinskih udaljenosti među alelima pojedinog lokusa (d), MEGA modeli nukleotidne i aminokiselinske supstitucije, te broj jedinstvenih aminokiselinskih sljedova za DRA, DQA i DQB lokus dobroga dupina

Lokus (broj alela)	Duljina sekvence	Broj polimorfnih nukleotidnih mjesta	Nukleotidna udaljenost		Aminokiselinska udaljenost		Broj jedinstvenih aminokiselinskih sljedova
			Model nukleotidne supstitucije	d	Model aminokiselinske supstitucije	d	
DRA (3)	189	3	JC	0,011	JTT	0,011	2
DQA (10)	246*	21	JC+G	0,047	JTT+G	0,093	10
DQB (12)	172	40	T92+G	0,114	JTT+G	0,255	12
			JC	0,080			

JC - Jukes-Cantor model nukleotidne supstitucije; T92 - Tamura 3-parametar distribucije; G - gamma parameter distribucije; JTT - Jones-Taylor-Thornton model aminokiselinske supstitucije; * - cijeli ekson 2

5.5. Selekcija na DQA i DQB lokusima dobroga dupina

Na temelju omjera nesinonimnih i sinonimnih mutacija u sljedovima DQA i DQB lokusa dobroga dupina analizirano je da li postoji djelovanje pozitivne i negativne selekcije ili je selekcija izostala. Selekcija na DRA lokusu nije analizirana, zbog niskog polimorfizma tog lokusa, odnosno zbog postojanja samo tri alela na lokusu. Kod pozitivne selekcije nesinonimnih mutacija (supstitucija) je više od sinonimnih. Kada se radi o neutralnoj evoluciji (izostanku selekcije na lokusima) učestalost nesinonimnih i sinonimnih promjena je podjednaka. U svrhu analize selekcije na lokusima korištena su dva testa: dN/dS test računalnog programa MEGA 5 i analiza PAML programom.

Program MEGA 5 korišten je za analizu omjera nesinonimnih i sinonimnih supstitucija (dN/dS) na DRA, DQA i DQB lokusima dobroga dupina primjenom NEI-GOJOBORI (1986.) metode uz JUKES-CANTOR (1969.) korekciju. U tablici 14 prikazani su dN/dS omjeri za istraživane lokuse. U zagradama su prikazane standardne pogreške koje su dobivene bootstrap metodom uz 1000 ponavljanja. Vidljivo je da je omjer dN/dS veći od 1 na oba istražena lokusa.

Za DQA lokus on iznosi 9,0, a za DQB lokus 6,44, što je posljedica više nesinonimnih nego sinonimnih supstitucija na oba lokusa. Rezultati testa ($dN > dS$ za oba lokusa) odbacuju ($p < 0,05$) nultu hipotezu, tj. postojanje neutralne evolucije u korist alternativne hipoteze, tj. pozitivne selekcije (za DQA lokus $p = 0,001$, za DQB lokus $p = 0,001$).

Tablica 14. Broj utvrđenih alela (N) na DQA i DQB lokusu dobroga dupina, prosječne stope sinonimnih (dS) i nesinonimnih (dN) supstitucija na svakom lokusu, vrsta selekcije s omjerima dN/dS i p vrijednosti testiranja neutralne evolucije (nulta hipoteza)

Lokus	N	dN	dS	Vrsta selekcije	P
DQA	10	0,036 (0,011)	0,004 (0,004)	Pozitivna $dN/dS = 9,0$	0,001*
DQB	12	0,103 (0,023)	0,016 (0,011)	Pozitivna $dN/dS = 6,44$	0,001*

* - statistički značajne p-vrijednosti ($p < 0,05$).

Analiza u PAML programu izrađena je u svrhu dokazivanja pozitivne selekcije na kodonima. Unutar programa postoje tri para modela. Modeli M3, M2a i M8 uključuju parametre za djelovanje pozitivne selekcije dok modeli M0, M1a i M7 ne uključuju parametre za djelovanje pozitivne selekcije. Na istraženim lokusima testirano je da li bolje odgovaraju modeli koji uključuju parametre za pozitivnu selekciju od onih koji ne uključuju parametre za djelovanje pozitivne selekcije. U tablici 15 prikazana je usporedba modela M3, M2a i M8 s modelima M0, M1a i M7 za DQA i DQB lokus. Za oba lokusa i za sva tri para modela određen je $p < 0,05$, što pokazuje da promjene na lokusu bolje opisuje model koji sadrži parametre za pozitivnu selekciju. Pozitivna selekcija utvrđena je za DQA i DQB lokus za sve tri usporedbe modela. Na DQA lokusu model M3 statistički bolje odgovara od modela M0 ($< 0,0001$), model M2a statistički bolje odgovara od modela M1a (0,0006), te model M8 statistički bolje odgovara od modela M7 (0,0005). Vidljivo je da i na DQB lokusu modeli M3, M2a i M8 statistički bolje odgovaraju od modela M0 ($< 0,0001$), M1a (0,002), te M7 (0,002).

Tablica 15. Usporedba modela M3, M2a i M8 s modelima M0, M1a i M7 za alele DQA i DQB lokusa dobrog dupina. Broj nađenih alela naveden je u zagradi iza naziva lokusa.

Modeli usporedbe	Supnjevi slobode	DQA (10)	DQB (12)
		p	p
M3 prema M0	4	<0,0001	<0,0001
M2a prema M1a	2	0,0006	0,002
M8 prema M7	2	0,0005	0,002

Za pronalaženje kodona koji su pod djelovanjem pozitivne selekcije korišten je program PAML i HyPhy paket. PAML program analizira pojedinačne kodone te pronalazi one koji su pod djelovanjem pozitivne selekcije. Identifikacija kodona koji su pod djelovanjem pozitivne selekcije i procjena razine vjerojatnosti djelovanja pozitivne selekcije na tim kodonima određuje se pomoću *Maximum likelihood* metode koja kao osnovu koristi omjer dN/dS vrijednosti. Modelima M2 i M8 koji se provodi unutar PAML programa utvrđuje se djelovanje pozitivne selekcije kao i statistička vjerojatnost da je pojedini kodon pod pozitivnom selekcijom. Osim ovih modela u analizi su korišteni FEL, REL i FUBAR metode koje se provode unutar HyPhy paketa. U tablici 16 prikazani su DQA i DQB lokusi s pripadajućim kodonima. Brojevi kodona odgovaraju eksonu 2 istraživanog lokusa koji se prevodi u aminokiseline na način da prva tri nukleotida eksona kodiraju prvu aminokiselinu. Na DQA lokusu primjenom M2 i M8 modela otkrivena je prisutnost devet kodona s razinom vjerojatnosti većom od 95%. Primjenom modela M8 na kodonima koji su masno otisnuti utvrđena je razina vjerojatnosti pozitivne selekcije koja je veća od 99%. REL metodom (Bayes faktor >100) utvrđeni su na DQA lokusu kodoni pod djelovanjem pozitivne selekcije (podvučeni su u tablici, a posteriorna vjerojatnost je >0,9). Na DQB lokusu otkrivena je prisutnost 11 kodona na identičan način kao na prethodnom lokusu. Za razliku od DQA lokusa na DQB lokusu su FUBAR metodom utvrđeni kodoni koji su pod djelovanjem pozitivne selekcije (podvučeni su u tablici) (posteriorna vjerojatnost je >0,9). Kodoni koji su označeni zvjezdicom identificirani su na oba lokusa pomoću FEL metode ($p < 0,1$).

Tablica 16. Kodoni na DQA i DQB lokusima dobroga dupina na koje djeluje pozitivna selekcija, utvrđeni korištenjem maximum likelihood metoda na osnovi dN/dS vrijednosti: M2 i M8 (modeli unutar PAML programa) i FEL, REL i FUBAR (metode unutar HyPhy programa).

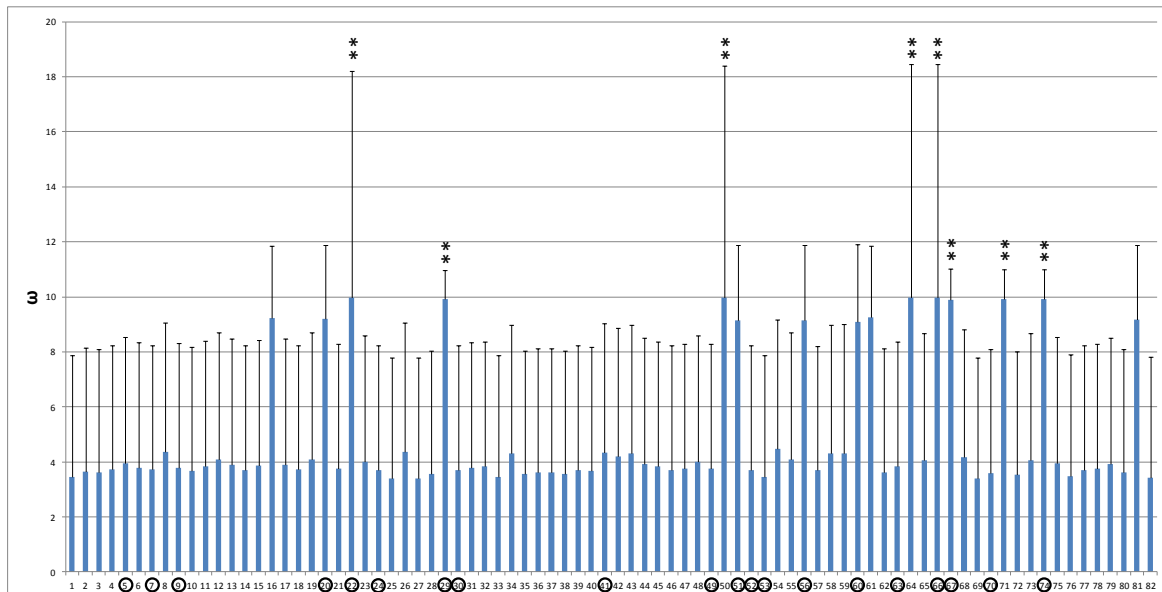
Lokus	Utvrđeni kodoni
DQA	<u>22</u> ^{*b} , <u>29</u> ^b , <u>50</u> ^{*n} , 51 ^b , <u>64</u> ^{*n} , <u>66</u> ^b , <u>67</u> ^b , <u>71</u> ⁿ , <u>74</u> ^b
DQB ^a	<u>6</u> , 8 ^b , 10 ^b , 17 ^b , 36 ^b , <u>37</u> ⁿ , 47 ⁿ , <u>50</u> ^b , <u>51</u> ^{*b} , <u>54</u> ^b , <u>55</u> ⁿ

^a - prvi kodon DQB lokusa u tablici odgovara 16. kodonu eksona 2

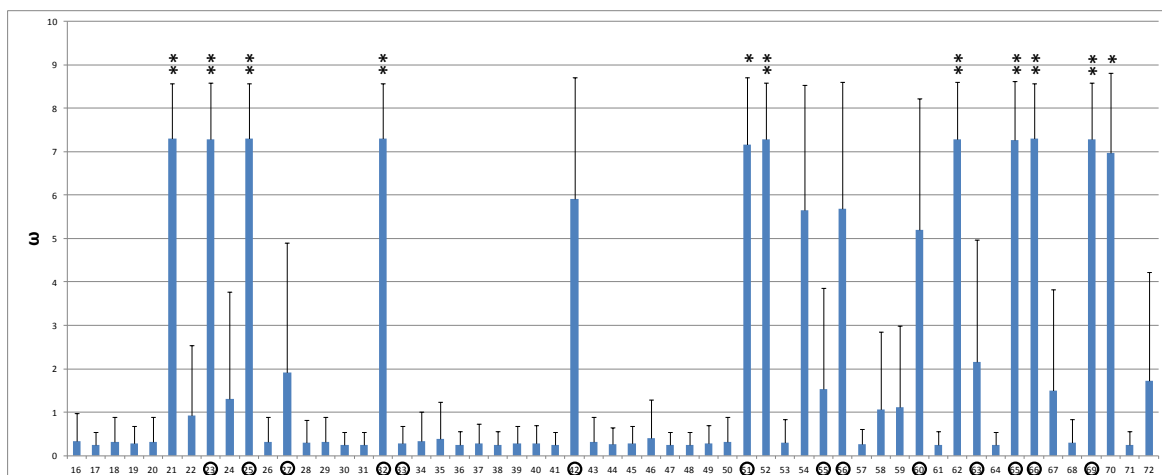
^b - predviđena mjesta za vezanje antigena

ⁿ - mjesta koja se nalaze u neposrednoj blizini predviđenim mjestima za vezanje antigena

Svaka od metoda koja se zasniva na analizi kodona je identificirala kodone pod djelovanjem pozitivne selekcije, te se pokazalo da se kodoni identificirani različitim metodama dosta preklapaju. Primjerice kodoni 22, 50 i 64 DQA lokusa, te kodon 51 DQB lokusa su identificirani i s PAML i s REL (za DQA), odnosno FUBAR (za DQB), ali i s FEL metodom. Nadalje, broj identificiranih kodona odgovara samoj prirodi statističke analize koja se koristi u pojedinoj metodi. Primjerice, najkonzervativnija FEL metoda je identificirala najmanji broj kodona. Konačno, većina kodona koji su identificirani kao oni koji su pod djelovanjem pozitivne selekcije su kodoni koji kodiraju za aminokisene uključene u vezanje antigenskih peptida ili se nalaze u blizini mjesta vezanja antigenskih peptida, prema trodimenzionalnim strukturalnim modelima ljudskog ortologa (BROWN i sur., 1993.) (slika 12).



a)



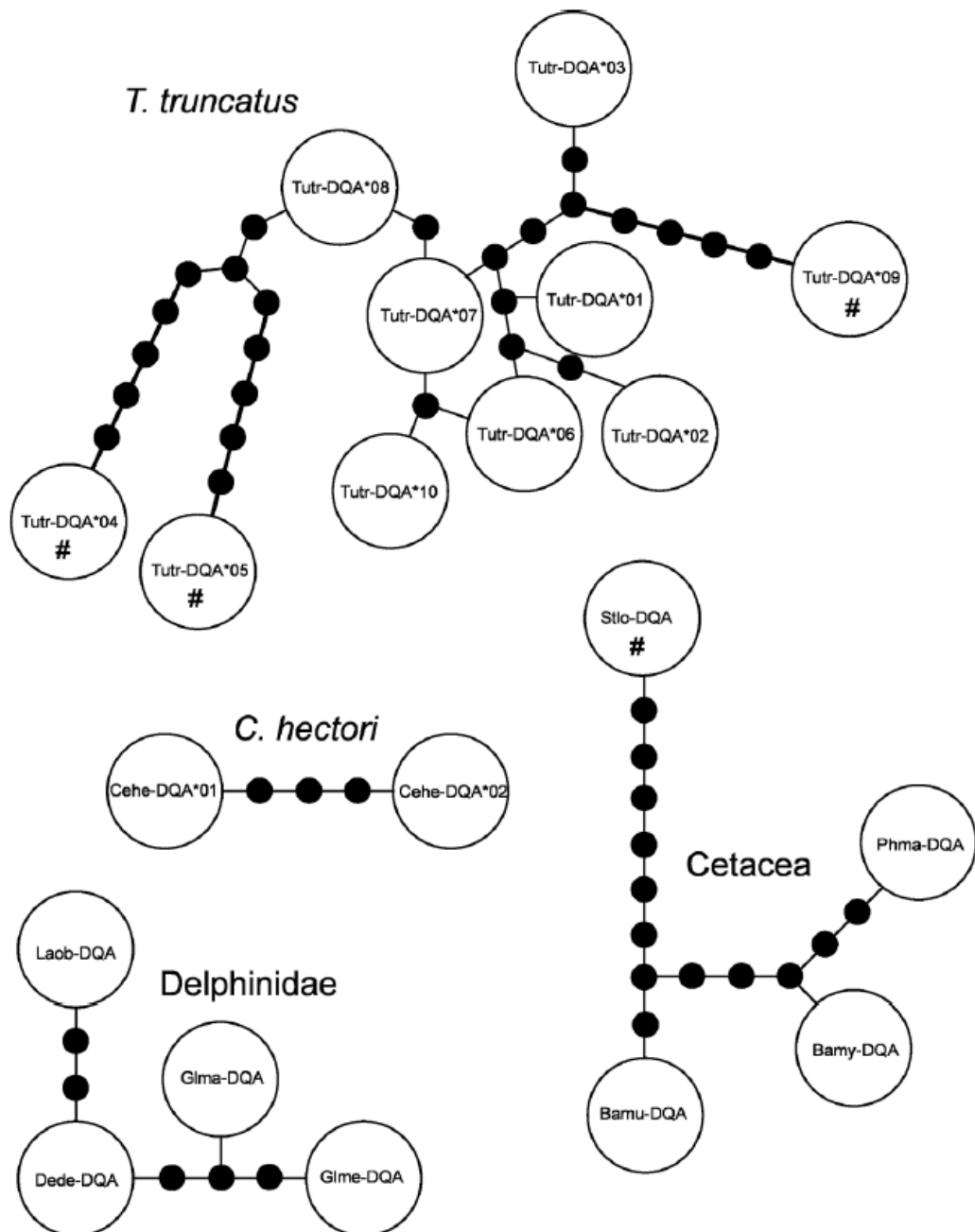
b)

Slika 12. Posteriorne prosječne vrijednosti ω za kodonska mjesta eksona 2 DQA (a) i DQB (b) lokusa dobivene Bayes empirical Bayes (BEB) postupkom. * označava mjesta za koje je vjerojatnost pozitivne selekcije veća od 95%; ** označavaju mjesta za koje je vjerojatnost pozitivne selekcije veća od 99%. Zaokruženi brojevi kodona pokazuju aminokiselinska mjesta za koja se pretpostavlja da vežu antigenske peptide, a utvrđena su prema analognim ljudskim α i β lancima (BROWN i sur., 1993.). Brojevi kodona odgovaraju aminokiselinskom slijedu dobivenom translacijom egzona 2 za DQA lokus, dok za DQB lokus prvi kodon analiziranog slijeda predstavlja 16. kodon eksona 2.

5.6. Filogenetska analiza DQA i DQB alela dobrog dupina

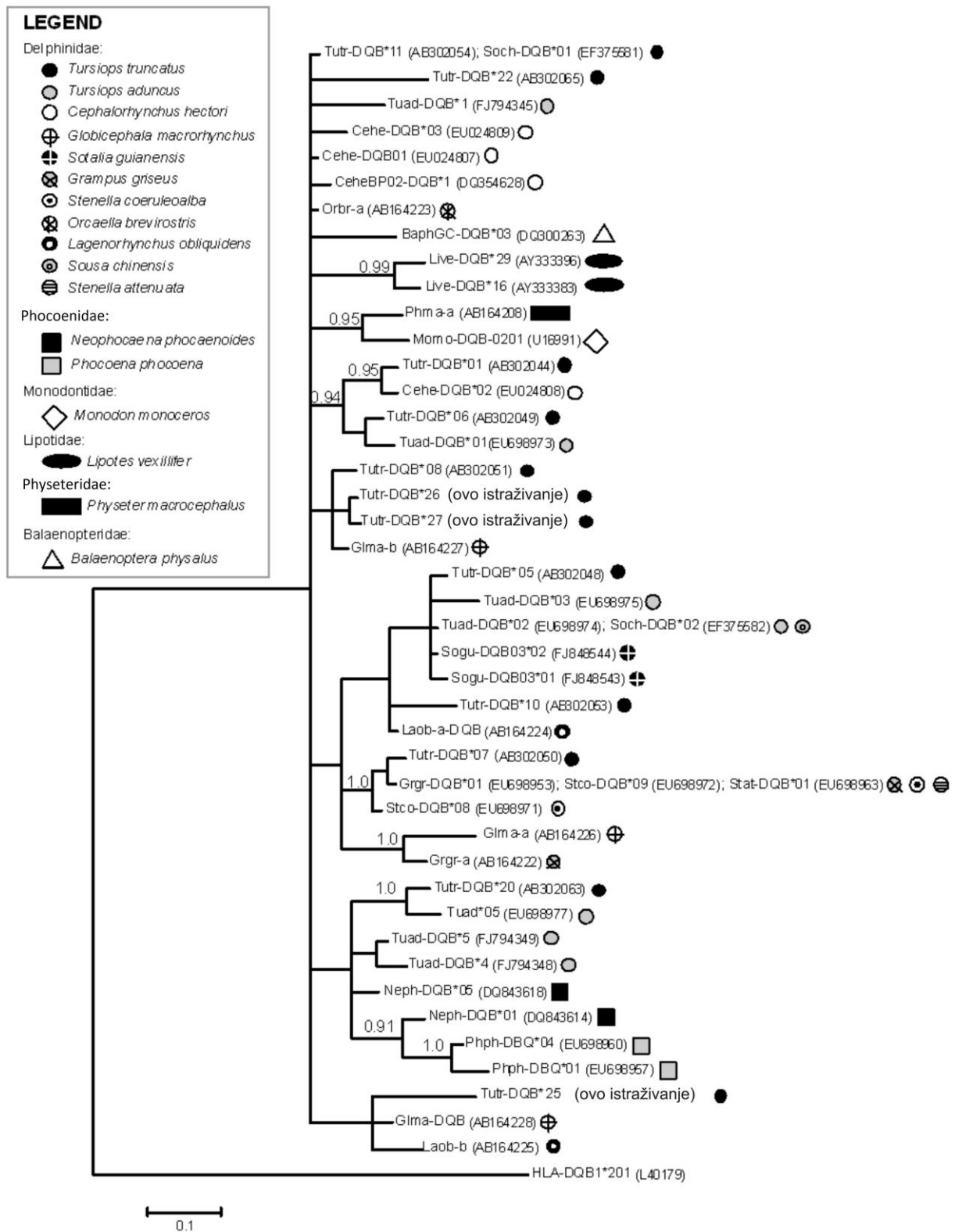
Filogenetska analiza načinjena je pomoću sekvenci DQA i DQB alela koji su utvrđeni u provedenom istraživanju i onih koji su već ranije utvrđeni u različitim vrsta kitova. Za odabir najprikladnijeg modela evolucije na temelju Bayesovog informacijskog kriterija korišten je MODELTEST 0.1.1.program (POSADA, 2008.). Za utvrđivanje filogenetskih odnosa među alelima korišten je program MrBayes 3.2.1. (RONQUIST i HUELSENBECK, 2003.). Na temelju filogenetskih stabala istraživala sam postojanje trans-specijskog polimorfizma.

Zbog nedovoljne različitosti među DQA sekvencama Bayesova analiza za DQA alele rezultirala je potpuno neriješenim filogenetskim stablom. Za takav skup podataka u svrhu analize filogenetskih odnosa prikladnija je izrada filogenetske mreže (POSADA i CRANDALL, 2001.). Filogenetska mreža DQA alela prikazana je na slici 13. U mreži su aleli uglavnom grupirani u skladu s pripadnosti vrstama (*Tursiops truncatus* i *Cephalochyrchus hectori*) ili porodicama (Delphinidae). Međutim, unutar iste skupine nalaze se aleli koji pripadaju filogenetski udaljenim skupinama kitova; glavatoj ulješuri (*Physter macrocephalus*) koja pripada podredu kitova zubana (Odontoceti) i članovima podreda kitova usana (Mysticeti) koji su zastupljeni u alelima grenlandskog kita (*Balaena mysticetus*) i plavetnog kita (*Balaenopter musculus*). Budući da smo imali relativno mali broj DQA alela iz reda Cetacea dostupnih za analizu, filogenetske odnose na ovom lokusu za sad nije moguće točnije utvrditi.



Slika 13. Filogenetska mreža sekvenci eksona 2 DQA lokusa MHC skupine II u kitova. Crni krugovi prikazuju pretpostavljene alele koji nedostaju. Znakom # su označeni aleli koji nisu povezani niti u jednu od podmreža s 95%-tnim parsimonijskim ograničenjem. Skraćenice označavaju sekvence koje pripadaju sljedećim vrstama: *Tursiops truncatus* (Tutr, GenBank pristupni brojevi EU024798, KF751585-KF751593), *Cephalorhynchus hectori* (Cehe), *Stenella longirostris* (Stlo), *Globicephala melas* (Glme), *Globiocephala macrorhynchus* (Glma), *Lagenorhynchus obscurus* (Laob), *Delphinus delphis* (Dede), *Physeter macrocephalus* (Phma), *Balaenoptera musculus* (Bamu), *Balaena mysticetus* (Bamy); GenBank pristupni brojevi EU024796, EU024797, EU024799-EU024806.

Rezultati filogenetske analize DQB sekvenci većinom su u skladu s činjenicom da je trans-specijski polimorfizam prisutan prvenstveno među blisko srodnim vrstama (slika 14). Od ukupno 47 alela koji tvore filogenetsko stablo DQB alela, tri alela su zajednička vrstama koje pripadaju različitim rodovima (*Tursiops*, *Sousa*, *Grampus* i *Stenella*) ali istoj porodici Delphinidae (slika 14). Iako aleli nisu grupirani po vrstama, grupiranje je uglavnom prisutno unutar porodice. Naime, DQB aleli koji su na slici 14 označeni punim crnim krugom, a utvrđeni su u dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) na stablu se uglavnom grupiraju s drugim vrstama ili rodovima koji pripadaju porodici šiljatozubiha dupina (Delphinidae). Pronalazak dobro podržanih grana (>0,99) na kojima su grupirani aleli koji su prisutni u različitim vrstama i rodovima (i to: *Tursiops*, *Grampus* i *Stenella*; *Globicephala* i *Grampus*; *Tursiops truncatus* i *Tursiops aduncus*) snažan su dokaz postojanja trans-specijskog polimorfizma na ovom lokusu. Aleli riječnog dupina baiji (*Lipotes vexillifer*) koji je obitavao u rijeci Yangtze tvori zasebnu i dobro podržanu granu što je očekivano budući da vrsta pripada drugoj porodici (Lipotoidea) i superporodici (Lipotoidea). Zanimljivo je da jedna grana s relativno značajnom podržanošću od 0,95 uključuje alele koji pripadaju različitim porodicama i superporodicama; glavata ulješura (*Physter macrocephalus*, superporodica Physteroidea, porodica Phisteridae) i jednorogi narval (*Monodon monoceros*, superporodica Delphinoidea, porodica Monodontidae). Znatan broj DQB alela na filogenetskom stablu ostaje nerazriješen (bazalna politomija). Politomijom su obuhvaćeni aleli Hektorovog dupina (*Cephalorhynchus hectori*, Cehe) što je pokazatelj značajne različitosti među alelima. Veća evolucijska udaljenost među alelima koji pripadaju istoj vrsti od alela koji pripadaju različitim vrstama, nije neuobičajena pojava za MHC alele i zabilježena je u prethodnim istraživanjima (npr. SURRIDGE i sur., 2008.).



Slika 14. Prikaz filogenetskog stabla za nukleotidne sljedove eksona 2 DQB alela MHC skupine II u kitova. Analiza je provedena Bayesian metodom, a na granama su prikazane Bayesian posteriorne vjerojatnosti (BPP) veće od 0,9. Ljudski HLA-DQB1*201 alel korišten je kao vanjska grupa. U zagradama je naveden pristupni broj u bazi podataka Gen Bank. Različiti znakovi označavaju taksonomsku pripadnost pojedine vrste kao što je navedeno u legendi.

5.7. Rekombinacije

Analiza postojanja intralokusnih rekombinacija između DQA i DQB alela dobroga dupina iz Jadranskog mora provedena je RDP3 Alpha 44 (MARTIN i sur., 2010.) programom. Provedenom analizom niti na jednom od lokusa nisu pronađeni dokazi za postojanje rekombinacija.

6. RASPRAVA

Istraživanje koje je provedeno u sklopu ovog doktorskog rada je prvo istraživanje gena glavnog sustava tkivne podudarnosti u populaciji dobrog dupina iz Jadranskoga mora. Prema našim spoznajama to je ujedno i prvo istraživanje raznolikosti MHC gena skupine II koje je provedeno na dobrim dupinima iz Sredozemnoga mora, a i općenito iz Europe. Određivanje MHC regije ugroženih i izoliranih vrsta, kao što je dobri dupin, je izrazito važno, jer se smatra da otpornost neke jedinke, ali i čitave populacije, ovisi o alelima koji se nalaze na lokusima MHC regije, a njihova genetička raznolikost značajno utječe na preživljavanje i sposobnost reprodukcije cijele populacije (BERNATCHEZ i LANDRY, 2003.; SOMMER, 2005.; PIERTNEY i OLIVER, 2006.).

U svrhu izučavanja MHC gena dobrog dupina obrađeni su lokusi DRA, DQA i DQB koji pripadaju skupini II MHC regije. Dosadašnja istraživanja MHC regije dobrog dupina na razini populacije obuhvaćala su samo DQB lokus (YANG i sur., 2007.; 2008.; 2010.; 2013.; VASSILAKOS i sur., 2009.), a u sklopu ovog rada napravljena su prva istraživanja raznolikosti DRA i DQA lokusa na razini populacije dobrog dupina uopće. Utvrđena raznolikost (varijabilnost) DRA lokusa bila je niska, za razliku od DQA i DQB lokusa koji su pokazali znatno višu razinu raznolikosti. Tako je najmanji broj alela određen na DRA lokusu. Od tri alela DRA lokusa određena ovim istraživanjem, dva su objavljena u GenBank (XU i sur., 2009.; BALLINGALL i sur., 2010.), za razliku od alela Tutr-DRA*01 koji je novi alel na DRA lokusu utvrđen ovim istraživanjem. Sva tri alela pronađena su i u populaciji Jadranskog mora i u jedinkama iz ostalih područja Sredozemnoga mora. Nadalje, u alelima DRA lokusa utvrđena su tri promjenjiva nukleotidna mjesta koja uključuju dvije sinonimne promjene i jednu nesinonimnu koja uzrokuje promjenu aminokiseline. Ostale do sada istražene vrste kitova (XU i sur.; 2007.; 2008.) kao i druge vrste sisavaca, npr. psi (WAGNER i sur., 1999.), mačke (YUHKI i O'BRIEN, 1997.) i ljudi (CHU i sur., 1994.) pokazali su također izuzetno niske razine raznolikosti DRA lokusa (u usporedbi s ostalim lokusima MHC sustava II), tako da je nalaz niske raznolikosti DRA lokusa u dobrog dupina u skladu s dosadašnjim istraživanjima i bio je očekivan.

Za razliku od DRA lokusa, DQA i DQB lokusi su pokazali značajne razine raznolikosti. Na DQA lokusu je pronađeno 10 alela. Samo je jedan alel ranije utvrđen u dobrog dupina (HEIMEIER i sur., 2009.), dok su preostalih devet alela novo utvrđeni aleli. Od ukupnog broja DQA alela utvrđenih u populaciji dobrog dupina iz Jadranskoga mora utvrđena je prisutnost sedam DQA alela. U dobrim dupina iz ostalih područja Sredozemnoga mora utvrđeno je osam DQA alela, što znači da je pet alela bilo zajedničko, dok je Jadranska

populacija imala dva privatna (jedinствена za tu populaciju) alela (Tutr-DQA*05 i Tutr-DQA*06), a jedinke s ostalih lokacija su imale tri privatna alela (Tutr-DQA*08, Tutr-DQA*09 i Tutr-DQA*10). Među alelima DQA lokusa nađeno je ukupno 21 promjenjivo nukleotidno mjesto, od toga je 20 nesinonimnih promjena. Aleli se međusobno razlikuju u barem po jednoj nesinonimnoj nukleotidnoj supstituciji, što za posljedicu ima to da 10 nukleotidnih sljedova kodira čak 10 aminokiselinskih sljedova, odnosno da svaki nukleotidni slijed daje jedinstven aminokiselinski proizvod.

Na DQB lokusu pronađeno je 12 alela. Devet alela je ranije utvrđeno u dobrog dupina i njihovi sljedovi preuzeti su iz Genbank baze, dok su preostala tri alela novo utvrđeni aleli. U populaciji dobroga dupina iz Jadranskog mora utvrđena je prisutnost devet DQB alela. U dobrih dupina iz ostalih područja Sredozemnog mora utvrdila sam prisutnost osam DQB alela. Iz toga slijedi da se Jadranska populacija preklapa s drugim populacijama Sredozemnog mora u pet alela (Tutr-DQB*01, Tutr-DQB*06, Tutr-DQB*07, Tutr-DQB*22 i Tutr-DQB*25), dok su četiri alela nađena samo u Jadranskoj populaciji, a nisu nađeni među jedinkama s ostalih lokacija Sredozemlja (Tutr-DQB*05, Tutr-DQB*08, Tutr-DQB*26 i Tutr-DQB*27). Tri alela bi mogla biti specifična za jedinke iz ostalih lokacija Sredozemlja (aleli Tutr-DQB*10, Tutr-DQB*11 i Tutr-DQB*20), jer nisu nađeni u jedinkama iz Jadranskoga mora. Među alelima DQB lokusa nađeno je ukupno 40 promjenjivih nukleotidnih mjesta, od toga je 38 nesinonimnih promjena. Kao i kod DQA lokusa, tako se i na ovom lokusu aleli međusobno razlikuju u barem jednoj nesinonimnoj nukleotidnoj supstituciji, što za posljedicu ima to da 12 nukleotidnih sljedova kodira čak 12 aminokiselinskih sljedova, odnosno da svaki nukleotidni slijed daje jedinstven aminokiselinski proizvod.

Unatoč pretpostavci o smanjenju veličine populacije jadranskih dobrih dupina kroz povijest, odnosno mogućem prolasku populacije kroz usko grlo (engl. bottleneck) sredinom prošlog stoljeća, rezultati ovog istraživanja pokazuju da je populacija dobroga dupina iz Jadranskog mora zadržala značajnu genetičku raznolikost MHC gena. To potvrđuje prisutnost velikog broja DQA (7) i DQB (9) alela kao i visoku razinu različitosti među sljedovima. Pokazatelji raznolikosti kao što su broj promjenjivih nukleotidnih mjesta te nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti veći su za DQB nego za DQA lokus. Ti rezultati su u skladu s rezultatima ostalih do sada istraženih vrsta koji pokazuju da je većina polimorfizma MHC sustava II smještena upravo na β genima (RECHE i REINHERZ, 2003., BONDINAS i sur., 2007.). Štoviše, u ovom istraživanju je polimorfizam β gena najvjerojatnije i podcijenjen, jer

nije istražen čitav ekson 2 DQB gena, već samo njegov dio duljine 172 pb, te možemo pretpostaviti da bi pokazatelji raznolikosti za DQB lokus bili veći da je analiziran cijeli ekson.

U populaciji dobrog dupina iz Jadranskoga mora utvrđena je relativno visoka razina genetičke raznolikosti na neutralnim biljezima poput mikrosatelitskih lokusa (GALOV i sur., 2011), koja je ovim istraživanjem utvrđena i na MHC genima (adaptivnim biljezima) i to na DQA i DQB lokusu. Nadalje, ovo istraživanje potvrđuje postojanje takozvanih „privatnih alela“. Na DQA lokusu dobrih dupina iz Jadranskog mora utvrđena su dva privatna alela jedinstvena za populaciju, a na DQB lokusu četiri privatna alela, dok su u jedinke iz ostalih područja Sredozemnog mora tri alela specifična. Ovim istraživanjem utvrđeno je postojanje pet privatnih haplotipova u populaciji dobrih dupina iz Jadranskog mora, tri privatna haplotipa u uzorcima iz Italije, te jedan privatni haplotip u uzorcima iz Izraela. Istraživanja mikrosatelitskih lokusa također su pokazala pet alela specifičnih za izraelske dobre dupine (GALOV i sur., 2011). Analiza mikrosatelitskih lokusa i mtDNA, a sada i istraživanja MHC gena, upućuju na moguće postojanje diferencijacije između regionalnih populacija.

Nedostatak rekombinacija među MHC genskim lokusima dovodi do očuvanja haplotipova tj. do očuvanja pojedinih kombinacija alela koje se zajednički nasljeđuju (DEGLI-ESPOSTI i sur., 1992.). Postojanje tih alelnih kombinacija koje se uspješno nose s patogenima, odnosno uspješno razvijaju imunosne odgovore, opstaju tijekom povijesti populacije zbog selekcije (HEDRICK, 2000., GARRIGAN i HEDRICK, 2003.). Stoga su informacije koje nam daju haplotipovi dragocjenije od informacija dobivenih analizama pojedinačnih lokusa budući da postojanje pojedinih MHC alela u populaciji znatno ovisi o funkcionalnoj važnosti određenog haplotipa kojeg dotični alel tvori. Zato su haplotipovi pogodni genski biljezi za otkrivanje strukturiranosti populacije prema geografskom porijeklu. Premda je ovo prvo istraživanje haplotipova u porodici šiljatozubih dupina (Delphinidae) uopće do sada, te nismo imali za usporedbu haplotipove iz ostalih populacija dobrog dupina, neki zaključci doneseni su usporedbom haplotipova pronađenih ovim istraživanjem u populaciji dobrog dupina iz Jadranskoga mora i onih iz susjednih populacija.

Ovim istraživanjem utvrđeno je postojanje ukupno 16 različitih haplotipova u dobrog dupina iz raznih područja Sredozemnog mora. Od toga je u populaciji dobrog dupina iz Jadranskog mora utvrđeno 12 jedinstvenih haplotipova. Dva haplotipa javljaju se u homozigotnom obliku dok se ostalih 10 javlja samo u heterozigotnom obliku. Pet haplotipova i šest alela (DRA*01/DQA*02/DQB*08; DRA/*02/DQA*06/DQB*027;

DRA*01/DQA*05/DQB*05; DRA*02/DQA*02/DQB*26; DRA*01/DQA*03/DQB*25) nađeni su isključivo u jedinkama iz Jadranskog mora (prikazani masnim slovima), a nema ih u dobrim dupinima iz ostalih područja Sredozemnog mora. Navedeni haplotipovi mogli bi biti specifični za populaciju dobrog dupina iz Jadranskog mora. U 12 dobrim dupina iz ostalih područja Sredozemnog mora ukupno je pronađeno 11 različitih haplotipova. Sedam haplotipova identično je haplotipovima nađenim u populaciji iz Jadranskog mora. Učestalost haplotipova u susjednim populacijama nije određena zbog malog uzorka. Nadalje, haplotip DRA*02/DQA*09/DQB*10 koji je pronađen u homozigotnom stanju u jednom uzorku iz Izraela, nije nađen u Jadranskom moru, a s obzirom na njegov homozigotni oblik pretpostavljamo da je najvjerojatnije učestao u istočnom dijelu Sredozemnog mora. Ovaj haplotip bi mogao biti specifičan za populaciju dobrog dupina iz istočnog dijela Sredozemnog mora. Premda je u dosadašnjim istraživanjima identificirana samo jedna populacija dobrog dupina na području istočnog Sredozemlja (NATOLI i sur., 2005.), rezultati ovog istraživanja (pronalazak jedinstvenog haplotipa u homozigotnom stanju kod Izraela) ukazuju da bi u dobrog dupina iz Sredozemnog mora moglo biti prisutno strukturiranje populacija zbog okolišnih uvjeta. Takav zaključak bi bio u skladu s rezultatima drugih autora (SHARIR i sur., 2011.) koji su pronašli morfološke specifičnosti karakteristične za subpopulaciju dobrog dupina iz Levanta (najistočnog dijela Sredozemlja), a što su objasnili postojanjem hidrografskih specifičnosti kao što su viša temperatura i slanost vode te vrlo niska razina hranjivih tvari (DUGDALE i WILKERSON, 1988.; YACOBI i sur., 1995.; HERUT i sur., 2000.). Nadalje, tri haplotipa koja su nađena u jedinkama dobrih dupina iz Ligurskog mora (DRA*02/DQA*02/DQB*06, DRA*02/DQA*08/DQB*20 i DRA*02/DQA*10/DQB*11), a koji nisu nađeni u populaciji iz Jadrana ukazuju da bi ovi haplotipovi mogli biti specifični za Ligursko more, ili zapadno Sredozemlje, što je u skladu s činjenicom da je populacija dobrog dupina zapadnog Sredozemlja genetički diferencirana od one u istočnom Sredozemlju (NATOLI i sur., 2005.).

Ovim istraživanjem analizirana su i utvrđena tri najučestalija haplotipa u populaciji dobrog dupina iz Jadranskog mora (tablica 10). Haplotip DRA*01/DQA*02/DQB*07 pojavljuje se u 34,69% jedinki i pronađen je u homozigotnom stanju u tri uzorka. Haplotip DRA*02/DQA*01/DQB*22 dolazi u 29,59% životinja i pronađen je u homozigotnom stanju u jedne jedinke. Haplotip DRA*02/DQA*03/DQB*25 nađen je u 14,28% jadranskih dobrih dupina i javlja se u heterozigotnom stanju. S obzirom da su sva tri haplotipa utvrđena i u dobrim dupina iz drugih područja Sredozemnog mora, pretpostavljamo da su navedeni haplotipovi specifični za dobre dupine cijelog Sredozemlja. Isto tako, istraženi dobri dupini iz

Sredozemnog mora ne dijele niti jedan od DQB alela dobrih dupina iz voda Tajvana (YANG i sur., 2008.), što također upućuje na pretpostavku da bi ti aleli mogli biti specifični za Sredozemno more.

Eventualno postojanje zemljopisnih varijacija MHC gena dobrog dupina moglo bi se objasniti razlikama u pojedinim staništima i različitom pritisku patogena koji bi mogli dovesti do lokalne adaptacije na MHC lokusima. Takve geografske varijacije i diferencijacije populacija na osnovu MHC lokusa su do sada već opisane u različitim vrstama divljih životinja, npr. voluharica (*Arvicola terrestris*) (BRYJA i sur., 2007.), šljuke livadarke (*Galinago media*) (EKBLÖM i sur., 2007.) vrapca pokućara (*Passer domesticus*) (LOISEAU i sur., 2009.) i čunjastog tuljana (*Halichoerus grypus*) (CAMMEN i sur., 2011.). Geografska varijacija MHC polimorfizma je u skladu s djelovanjem diverzificirajuće selekcije. Međutim, rezultati ovog istraživanja koji ukazuju na postojanje geografske varijacije bi se također mogli objasniti da su nastali kao posljedica genetičkog drifta. Relativne udjele genetičkog drifta i selekcije na nastanak MHC raznolikosti je teško razlučiti, posebno kada selekcija i prolaz populacije kroz usko grlo djeluju istovremeno (ALCAIDE, 2010.). Nekoliko studija je pokazalo da genetički drift može prevladati selekciju (RADWAN i sur., 2007.; BABIK i sur.; 2008.; MILLER i sur.; 2010.; SUTTON i sur., 2011.). Premda ne postoje konačni dokazi o tome da je populacija dobrog dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora prošla kroz genetičko usko grlo (GALOV i sur., 2011.), smatra se da su dupini uz istočnu obalu Jadranskoga mora bili ubijani sredinom prošlog stoljeća (BEARZI i sur., 2004.) što bi moglo biti uzrok gubitka pojedinih MHC alela i pojedinih haplotipova zbog genetičkog drifta.

Mjerenje odstupanja od Hardy-Weinberg ravnoteže korišteno je za utvrđivanje djelovanja selekcije u sadašnjoj generaciji (GARRIGAN i HEDRICK, 2003.). Ako selekcija postoji, očekuje se da će se otkriti značajno povećanje udjela heterozigota (u odnosu na udio heterozigota koji se očekuje pod Hardy-Weinbergovom ravnotežom), a koje nastaje kao posljedica prednosti heterozigota, što je jedan od mehanizama selekcije koji djeluje na MHC gene (SOMMER, 2005.). U ovom istraživanju jadranske populacije dobroga dupina nije utvrđeno značajno povećanje udjela heterozigota, što bi moglo ukazivati na nedostatak trenutnog selektivnog pritiska. Međutim, i inače se u istraživanjima MHC lokusa divljih populacija rijetko uspije utvrditi povećanje udjela heterozigota na MHC lokusima (PIERTNEY i OLIVER, 2006.). Umjesto toga, djelovanje ravnotežne selekcije na DQA i DQB lokuse dobrih dupina kroz dugi evolucijski period potvrđuje visoka vrijednosti dN/dS omjera za oba

lokusa, a različitim statističkim testovima identificirani su pojedini kodoni koji su pod utjecajem selekcije.

U nekoliko prijašnjih istraživanja koja su provedena na kitovim pronađena je niska razina MHC polimorfizma (TROWSDALE i sur., 1989., MURRAY i sur., 1995., HAYASHI i sur., 2003., NIGENDA-MORALES i sur., 2008.) što je dovelo do pretpostavke da ravnotežna selekcija na genima glavnog sustava tkivne podudarnosti slabije djeluje u morskih nego u kopnenih sisavaca. Moguće objašnjenje se pripisuje činjenici da je u morskom okolišu smanjena izloženost utjecaju određenih patogena u odnosu na kopneni okoliš, odnosno da bi u morskom okolišu mogla biti niža prevalencija infektivnih bolesti (SLADE, 1992.). Istraživanje VILANUEVA-NORIEGA i sur. (2013.) pokazalo je da je utjecaj ravnotežne selekcije na DQB lokusu znatno slabiji u kitova nego u nekih kopnenih sisavaca kao što su parnoprstaši i primati, što je bilo u skladu s postavljenom hipotezom. No, u istoj studiji utvrđeno je da postoje odstupanja u jačini djelovanja ravnotežne selekcije čak i među pojedinim vrstama kitova, te su tako u dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) i novozelandskog Hektorovog dupina (*Cephalorhynchus hectori*) nađene niske razine DQB raznolikosti dok su u bijeloleđog dupina (*Globicephala macrorhynchus*) i tihooceanskog bjelobokog dupina (*Lagenorhynchus obliquidens*) pronađene visoke razine DQB raznolikosti. U ovom radu istražen je isti odsječak duljine 172 pb eksona 2 DQB lokusa što omogućava pouzdano uspoređivanje naših rezultata s rezultatima VILANUEVA-NORIEGA i sur. (2013.). Jedan od pristupa za utvrđivanje razine ravnotežne selekcije je računanje nukleotidnih udaljenosti između sljedova, odnosno stopa nukleotidnih supstitucija. Stopa nukleotidnih supstitucija (d) i stopa nesinonimnih nukleotidnih supstitucija (dN) u našem istraživanju su iznosile su $d = 0,080$ i $dN = 0,103$ (tablice 13 i 14), što je više od vrijednosti $d = 0,041$ odnosno $dN = 0,048$ koje su za kitove odredili VILANUEVA-NORIEGA i sur. (2013.). Vrijednosti dobivene u našem istraživanju većinom se nalaze u rasponu vrijednosti koje su utvrđene za isti lokus u različitim kopnenih sisavaca. Tako je d udaljenost koja je utvrđena u svinje iznosila 0,062 (LUETKEMEIER i sur., 2009), za smeđeg medvjeda 0,064 (KUDUK i sur., 2012.), za zeca 0,096 (SMITH i sur., 2011.) i za štakora 0,154 (GOUY DE BELLOCQ i LEIRS, 2010.) Vrijednosti dN za smeđeg medvjeda iznosile su 0,065 (KUDUK i sur., 2012.), za sivog vuka 0,084 (ARBANASIĆ i sur., 2013.) i za lemure 0,12 (HUCHARD i sur., 2012.). Vrijednost dN dobivena u ovom istraživanju (0,103) je slična onima u kopnenih sisavaca. Samo se vrijednosti za aminokiselinske udaljenosti (dS) koje su dobivene u ovom istraživanju (0,016) podudaraju s vrijednostima koje su dobivene za ostale vrste kitova (0,015) i niže su nego u kopnenih sisavaca (VILLANUEVA-NORIEGA i sur., 2013.). Jedan od

razloga za nisku dS mogla bi biti niska stopa supstitucija u kitova što je do sada već opisano u kitova usana (JACKSON i sur., 2009.). Budući da se sinonimne supstitucije nakupljaju s vremenom, alternativno objašnjenje za niske DQB dS vrijednosti moglo bi biti to da je DQB polimorfizam relativno nov, odnosno da je relativno nedavno nastao. Drugi pristup za utvrđivanje razine ravnotežne selekcije je mjerenje ukupnog broja varijabilnih (polimorfnih) mjesta. DQB aleli dobrog dupina koji su utvrđeni u ovom istraživanju pokazali su veliki udio varijabilnih mjesta (40 od 171 ili 23,4%), dok su VILLANUEVA-NORIEGA i sur. (2013.) utvrdili prosječno svega 8% varijabilnih mjesta. Nadalje, vrijednost nukleotidne udaljenosti koja je dobivena za DQA alele u ovom istraživanju (0,047) također se nalazi u rasponu d vrijednosti za različite kopnene vrste. U štakora one iznose 0,061-0,88 (GOUY DE BELLOCQ i sur., 2005., 2009.) u zečeva 0,083 (SURREIDGE i sur., 2008.) u vuka 0,018 (ARBANASIĆ i sur., 2013.) i u slona 0,039 (ARCHIE i sur., 2010.). Rezultati svih tih usporedbi (d, dN, dS i udio varijabilnih nukleotidnih mjesta) ukazuju da ne podržavaju hipotezu da je ravnotežna selekcija na MHC slabija u morskih sisavaca nego u kopnenih sisavaca.

Ravnotežna selekcija dovodi do toga da se aleli održavaju tijekom dugog evolucijskog perioda i čak često tijekom razdvajanja vrsta, što rezultira time da u različitim vrstama možemo naći slične ili čak identične alele. Ta pojava se naziva trans-specijskim polimorfizmom. Prisutnost trans-specijskog polimorfizma smatra se pokazateljem djelovanja ravnotežne selekcije kroz duži vremenski period (GARRIGAN i HEDRICK, 2003.). Ona je za MHC gene utvrđena u brojnim vrstama (LANDRY i SUR., 2001.), prvenstveno među vrstama istog roda ali isto tako i među vrstama koje su taksonomski udaljnije, npr. zečevi i štakori (MUSOLF i sur., 2004., GOUY DE BELLOCQ i sur., 2009.).

Svrha filogenetske analize koja je provedena u ovom istraživanju bila je utvrditi prisutnost trans-specijskog polimorfizma na DQA i DQB lokusima pojedinih vrsta kitova. Prvenstveno su korišteni nukleotidni sljedovi vrsta iz roda *Tursiops* i porodice *Delphinidae*. Ako trans-specijski polimorfizam postoji, tada se očekuje da se sljedovi na filogenetskom stablu ne grupiraju prema vrsti. Postojanje trans-specijskog polimorfizma na DQB lokusu između vrsti dvaju rodova prvobitno su utvrdili VILLANUEVA-NORIEGA i sur. (2013.) usporedivši vrste *Tursiops truncatus* i *Globiocephala macrorhynchus* (porodica *Delphinidae*). U ovom istraživanju su dodatno proširena ta istraživanja i filogenetskom analizom provedenom na DQB lokusu potvrđeno je postojanje trans-specijskog polimorfizma. Naime, iz filogenetskog stabla (slika 14) su vidljiva tri slučaja u kojima pojedine različite vrste imaju potpuno jednake alele, a to su: dobri dupin i indo-pacifički grbavi dupin (*Sousa chinensis*); indo-pacifički dobri

dupin (*Tursiops aduncus*); te glavati dupin (*Grampus griseus*), plavobijeli dupin (*Stenella coeruleoalba*) i tropski pjegavi dupin (*Stenella attenuata*). Nadalje, aleli uglavnom nisu grupirani po vrstama, pa tako alele nađene u vrsti dobri dupin možemo vidjeti raspoređene po cijelom filogenetskom stablu. Konačno, grupe s velikom podržanošću sadrže alele pronađene u različitim vrstama (primjerice grupa koja sadrži alele nađene u vrstama *Globicephala macrorhynchus* i *Grampus griseus*, BPP = 1,0; slika 14). Nalaz trans-specijskog polimorfizma na DQB lokusu kitova upućuje na to da se neki aleli ili alelne linije održavaju tijekom dugog evolucijskog perioda, te da nastanak alela ponekad prethodi događajima divergencije vrsta ili čak rodova. Ove pretpostavke su u skladu s brzom radijacije nadporodice Delphinoidea za koju se smatra da se dogodila prije otprilike 12-16 milijuna godina (ROSEL i sur., 1995.). Nakon toga je slijedila divergencija unutar porodica, rodova i vrsta koja su se vjerovatno pojavila u relativno novije vrijeme (OHLAND i sur., 1995.). Stoga bi aleli koji su zajednički među vrstama natporodice Delphinoidea mogli biti stariji od vremena njezine diverzifikacije. To potvrđuju i ranija istraživanja koja govore da su MHC aleli stari desetke milijuna godina (MG). Procijenjeno je da bi nastarije pronađene HLA linije na DRB1 lokusu mogle biti stare 55 MG (KLEIN i sur., 1998.) dok su neki DQA aleli u afričke krtice procijenjeni na najmanje 48 MG (KUNDU i FAULKES 2007.). Postojanje trans-specijskog polimorfizma također se može zaključiti iz mreže DQA alela, pri čemu dvije podmreže obuhvaćaju razne vrste (podmreža Delphinidae i podmreža Cetacea) (slika 14). Drugo moguće objašnjenje za takav obrazac alela u filogenetskom stablu i mreži (umjesto trans-specijskog polimorfizma) bi bio taj da je došlo do konvergentne evolucije. Naime, konvergentna evolucija među bliskim vrstama može dovesti do genetskih sličnosti kao rezultat prilagodbe sličnim uvjetima u okolišu. Primjerice, konvergentna evolucija je predložena kao objašnjenje činjenice da južnoazijski glatkoledi obalni dupin (*Neophocena phocaenoides*) i čangajski riječni dupin (engl. baiji, *Lipotes vexillifer*) imaju neke jednake MHC alele, budući da su te dosta različite vrste nastanjene u istom okolišu rijeke Yangtze (XU i sur., 2008.). No, takvo objašnjenje nije primjenjivo za objašnjenje rezultata ovog istraživanja, gdje primjerice jednu grupu na filogenetskom stablu tvore glavata ulješura (*Physeter macrocephalus*) i jednorogi narval (*Monodon monoceros*) premda su porodice *Physeteridae* i *Monodontidae* divergirale prije više od 30 MG (SLATER i sur., 2010.). Naime, konvergentna evolucija nastala uslijed sličnih utjecaja iz okoliša je malo vjerojatna budući da je glavata ulješura (*Physeter macrocephalus*) geografski široko rasprostranjena dok jednorogi narval (*Monodon monoceros*) nastanjuje isključivo vode Arktika. Treće moguće objašnjenje za postojanje trans-specijskog polimorfizma bi mogla biti hibridizacija različitih vrsta kitova. Neke vrste kitova imaju sposobnost da na život donesu

viabilno križano (hibridno) potomstvo (AMARAL i sur., 2007.). Zabilježeno je nekoliko slučajeva križanja kojima su obuhvaćeni i dobri dupini u zatočenišvu (ZORNETZER i DUFFIELD, 2003.). Ipak, postoji zasigurno mala vjerojatnost da se dobri dupini iz Jadranskoga mora križaju s drugim vrstama jer postojanje potencijalnih križanaca nije do sada zabilježeno tijekom ova gotova dva desetljeća praćenja dobrih dupina u Jadranskom moru.

7. ZAKLJUČCI

1. U dobrim dupina Jadranskog i susjednih mora postoji različita razina polimorfizma DRA, DQA i DQB lokusa koji pripadaju sustavu II MHC regije. Ukupno je utvrđeno 25 alela za navedene lokuse, a od ukupnog broja utvrđenih alela 12 je bilo prethodno opisanih, dok je 13 novoutvrđenih alela. Najmanje je polimorfan DRA lokus na kojem su utvrđena tri alela od toga je jedan novi. Znatno veći polimorfizam pokazuje DQA lokus s 10 utvrđenih alela, od čega devet novih. Najpolimorfiji je DQB lokus s utvrđenih 12 alela, od toga tri nova.
2. U populaciji dobrog dupina iz Jadranskog mora utvrđeno je 12 tro-lokusnih haplotipova, a u dobrim dupina iz ostalih područja Sredozemnog mora 11 različitih haplotipova. Tri najučestalija haplotipa u ukupnom uzorku vjerojatno su specifični haplotipovi za dobre dupine Sredozemnog mora.
3. Unutar Sredozemnoga mora nađene su naznake strukturiranja populacija, što bi pak mogla biti posljedica različitih selekcijskih pritisaka u različitim dijelovima Sredozemnog mora. Naime, pet DRA/DQA/DQB haplotipova su specifični za dobre dupine iz Jadranskog mora jer nisu pronađeni u uzorcima dupina iz ostalih područja Sredozemnog mora, a jedan haplotip pronađen je u homozigotnom stanju samo u jedne životinje iz Izraela i vjerojatno je specifičan za istočni dio Sredozemnog mora.
4. Broj utvrđenih alela, broj polimorfni mjesta te vrijednosti za nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti najmanji su na DRA lokusu, srednje vrijednosti utvrđene su na DQA lokusu, a najveće su na DQB lokusu, što je u skladu s razinom raznolikosti za te iste lokuse nađene za većinu drugih do sada istraženih vrsta.
5. Djelovanje pozitivne selekcije tijekom evolucije dobrog dupina prisutno je na DQA i DQB lokusu što dokazuje značajno više nesinonimnih nego sinonimnih supstitucija. Ujedno, svaki alel DQA i DQB lokusa kodira svoj jedinstven aminokiselinski produkt, odnosno broj jedinstvenih nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova je jednak.
6. Većina kodona je identificirana da pod djelovanjem pozitivne selekcije kodira za aminokiseline uključene u vezanje antigenskih peptida ili se nalaze u blizini mjesta vezanja antigenskih peptida, što potvrđuje njihovu funkcionalnu važnost (unutar žlijeba u koji naliježe strani antigenski peptid).
7. Razina balansirajuće selekcije utvrđena ovim istraživanjem viša je od one prikazane u prethodnim istraživanjima dobrog dupin i kitova općenito, te odgovara razini balansirajuće selekcije utvrđene u kopnenih sisavaca. Time rezultati ovog istraživanja ne podržavaju hipotezu

da je razina balansirajuće selekcije na MHC lokusima viša u kopnenih nego u morskih sisavaca.

8. Balansirajuća selekcija održala je pojedine alelne linije tijekom dugog evolucijskog perioda, a alelna raznolikost nastala je prije divergencije vrsta ili rodova što je dokazano nalazom trans-specijskog polimorfizma DQA i DQB lokusa unutar reda kitova (Cetacea).

8. POPIS LITERATURE

ANONIMNO (2013): www.immuneweb.com. Pristupljeno 23.09. 2013.

ANONIMNO: GENBANK (NCBI - National Center for Biotechnology Information;
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

ANONIMNO: SEQSCAPE V 2.5 <http://www3.appliedbiosystems.com>

AGUILAR, A., G. ROEMER, S. DEBENHAM, M. BINNS, D. GARCELON, R. K. WAYNE (2004): High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10, 3490–3494.

ALCAIDE, M. (2010): On the relative roles of selection and genetic drift in shaping MHC variation. *Mol. Ecol.* 19, 3842-3844.

AMARAL, A. R., M. SEQUEIRA, J. MARTÍNEZ-CEDEIRA, M. M. COELHO (2007): New insights on population genetic structure of *Delphinus delphis* from the northeast Atlantic and phylogenetic relationships within the genus inferred from two mitochondrial markers. *Mar. Biol.* 151, 1967-1976.

AMMER, H., F. W. SCHWAIGER, C. KAMMBERBAUER, M. GOMOLKA, A. ARRIENS, S. LAZARY, J. T. EPPLER (1992): Exonic polymorphism vs intronic simple repeat hypervariability in MHC-DRB genes. *Immunogenetics* 35, 332-340.

ARBANASIĆ, H., Đ. HUBER, J. KUSAK, T. GOMERČIĆ, J. HRENOVIĆ, A. GALOV (2013): Extensive polymorphism and evidence of selection pressure on major histocompatibility complex DLA-RB1, DQB1 class II genes in Croatian grey wolves. *Tissue Antigens* 81, 19-27.

ARCHIE, E. A., T. HENRY, J. E. MALDONADO, C. J. MOSS, J. H. POOLE, V. R. PEARSON, S. MURRAY, S. C. ALBERTS, R. C. FLEISCHER (2010): Major histocompatibility complex variation and evolution at a single, expressed DQA locus in two genera of elephants. *Immunogenetics* 62, 85-100.

BABIĆ, W., M. PABIJAN, J. RADWAN (2008): Contrasting patterns of variation in MHC loci in the Alpine newt. *Mol. Ecol.* 17, 2339-2355.

- BAKER, C.S., M. D. VANT, M. L. DALEBOUT, G. M. LENTO, S. J. O'BRIEN, N. YUHKI (2006): Diversity and duplication of DQB and DRB-like genes of the MHC in baleen whales (suborder: *Mysticeti*). *Immunogenetics* 58, 283–296.
- BALLINGALL, K. T., M. S. ROCCHI, D. J. MCKEEVER, F. WRIGHT (2010): Trans-species polymorphism and selection in the MHC class II DRA genes of domestic sheep. *PloS ONE* 5, E11402.
- BEARZI, G., G. NOTARBARTOLO DI SCIARA, E. POLITI, G. LAURIANO (1993): Social ecology and behavior of bottlenose dolphins in the waters adjacent to the island of Lošinj (Croatia). Poster presented at the 10th Biennial Conference of the Society for Marine Mammalogy. Galveston, TX, November, 12-15.
- BEARZI, G., G. NOTARBARTOLO DI SCIARA (1995): A comparison of the present occurrence of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, and common dolphins, *Delphinus delphis*, in the Kvarnerić (northern Adriatic Sea). *Annales, series historia naturalis* 2, 61-68.
- BEARZI, G., G. NOTARBARTOLO DI SCIARA, E. POLITI (1997): Social ecology of bottlenose dolphin in the Kvarneric (northern adriatic Sea). *Mar. Mammal Sci.* 13, 650-668.
- BEARZI, G., E. POLITI, C. M. FORTUNA, L. MEL, G. NOTARBARTOLO DI SCIARA (2000): An overview of cetacean sighting data from the Northern Adriatic Sea: 1987-1999. *European Research on Cetaceans* 14, 356-361.
- BEARZI, G., D. HOLCER, G. NOTARBARTOLO DI SCIARA (2004): The role of historical dolphin takes and habitat degradation in shaping the present status of northern Adriatic cetaceans. *Aquat. Conserv. -Marine Freshwater Ecosystems* 14, 363-379.
- BERNATCHEZ L., C. LANDRY (2003): MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J. Evolution. Biol.* 16, 363-377.
- BLOCH, D., B. MIKKELSEN (2000): Preliminary estimates on seasonal abundance and food consumption of marine mammals in Faroese Waters. NAMMCO WG on Marine mammal and fisheries interactions. Copenhagen 17-18 February. 8, 1-16.

- BONDINAS, G., A. MOUSTAKAS, G. PAPADOPOULOS (2007): The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function. *Immunogenetics* 59, 539–553.
- BONTROP, R. E., N. OTTING , N. G. DE GROOT , G. G. DOXIADIS (1999): Major histocompatibility complex class II polymorphisms in primates. *Immunol. Rev.* 167, 339–350.
- BOWEN, L., B. M. ALDRIDGE, F. GULLAND, J. WOO, W. VAN BONN, R. DELONG, J. L. STOTT, M. L. JOHNSON (2002): Molecular characterization of expressed DQA and DQB genes in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics* 5, 332-347.
- BOWEN, L., B. M. ALDRIDGE, F. GULLAND, W. VAN BONN, R. DELONG, S. MELIN, L. J. LOWENSTINE, J. L. STOTT, M. L. JOHNSON (2004): Class II multiformity generated by variable MHC- DRB region configurations in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics* 1, 12-27.
- BOWEN, L., B. M. ALDRIDGE, R. DELONG, S. MELIN, E. L. BUCKLES, F. GULLAND, L. J. LOWENSTINE, J. L. STOTT, M. L. JOHNSON (2005): An immunogenetic basis for the highprevalence of urogenital cancer in a free-ranging population of California sea lions (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics* 11, 846-848.
- BROWN, J.H., T. S. JARDETZKY, J. C. GORGA, L.J. STERN, R. G. URBAN, J. L. STROMINGER, C. D. WILEY (1993): Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33-39.
- BRYJA, J.C., N. CHARBONNEL, K. BERTHIER, M. GALAN, J F. COSSON (2007): Density-related changes in selection pattern for major histocompatibility complex genes in fluctuating populations of voles. *Mol. Ecol.* 16, 5084–5097.
- CAMMEN, K., J. I. HOFFMAN, L. A. KNAPP, J. HARWOOD, W. AMOS (2011): Geographic variation of the major histocompatibility complex in Eastern Atlantic grey seals (*Halichoerus grypus*). *Mol. Ecol.* 20, 740–752.
- CARWARDINE, M. (1995): Whales, Dolphins, and Porpoises. Dorling Kindersley, London.

- CHU, Z. T. E., C. CARSWELL, CRUMPTON, B. C. COLE, P. P. JONES (1994): The minimal polymorphism of class-II E-alpha chains is not due to the functional neutrality of mutations. *Immunogenetics* 40, 9-20.
- CLARKE, B., D. R. S. KIRBY (1966): Maintenance of histocompatibility polymorphisms. *Nature* 211, 999-1000.
- CLEMENT, M., D. POSADA, K. A. CRANDALL (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9, 1657–1660.
- CONNER, J. K., D. L. HARTL (2004): *A Primer of Ecological Genetics*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- DANCHIN, E. G. J., V. VITIELLO, A. VIENNE, O. RICHARD, P. GOURET, M. F. MCDERMOTT, P. PONTAROTTI (2004): The major histocompatibility complex origin. *Immunol. Rev.* 198, 216–232.
- DEGLI-ESPOSTI, M. A., A. L. LEAVER, F.T. CHRISTIANSEN, C. S. WITT, J. ABRAHAM, R. L. DAWKINS (1992): Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes. *Immunol.* 34, 242-52.
- DENGJEL, J., O. SCHOOR, R. FISCHER, M. REICH, M. KRAUS., M. MÜLLER (2005): Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7922-7927.
- DIVAC BRNIĆ, D. (2012.): Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA i kranimetrijske osobitosti dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskog mora. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
- DOHERTY, P. C., R. M. ZINKERNAGEL (1975): Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 256, 50-52.
- DOXIADIS, G. G. M., I. HOOF, N. DE GROOT, R. E. BONTROP (2012): Evolution of HLA-DRB Genes. *Mol. Biol. Evol.* 29, 3843-3853.
- DUGDALE, R. C., F. P. WILKERSON (1988): Nutrient sources and primary production in the Eastern Mediterranean. *Oceanol. Acta* 9, 179–184.

- DURAS GOMERCIC, M., A. GALOV, T. GOMERCIC, H. LUCIC, S. VUKOVIC, D. SKRTIC, S. CURKOVIC, H. GOMERCIC (2008): Cetacean mortality along the Croatian coastline. U: Book of abstract of the 8th conference of the European wildlife disease association. Rovinj. 2-5 October 2008. 24 Plenary talk.
- ĐURAS GOMERČIĆ, M., T. GOMERČIĆ, H. LUCIĆ, H. GOMERČIĆ, D. ŠKRTIĆ, S. ĆURKOVIĆ, S. VUKOVIĆ (2003.): Prisutnost i rasprostranjenost vrsta iz reda kitova (Cetacea) u zadarskom akvatoriju. Abundance and distribution of whale species (Order: Cetacea) in the area of Zadar. U: Zbornik sažetaka Osmog hrvatskog biološkog kongresa - Proceedings of Abstracts of Eighth Croatian Biological Congress (V. Besendorfer i N. Kopjar, uredice). Hrvatsko biološko društvo 1885. Zagreb. 254-255.
- ĐURAS GOMERČIĆ, M. (2006.): Rast, spolni dimorfizam i morfometrijske značajke dobrog dupina (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) iz Jadranskoga mora. Disertacija. Veterinarski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
- EKBLOM, R., S. A. SAETHER, P. JACOBSSON, P. FISKE, T. SAHLMAN, M. GRAHN, J. A. KALAS, J. HOGLUND (2007): Spatial pattern of MHC class II variation in the great snipe (*Galinago media*). Mol. Ecol. 16, 1439-1451.
- EXCOFFIER L, G. LAVAL, S. SCHNEIDER (2005): Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform. Online 1, 47-50.
- GALOV, A. (2007.): Genetička raznolikost populacije dobrog dupina *Tursiops truncatus* s osvrtom na druge vrste kitova (Cetacea) Jadranskog mora. Disertacija. Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Biološki odsjek. Zagreb.
- GALOV, A., I. KOCIJAN, G. LAUC, M. ĐURAS GOMERČIĆ, T. GOMERČIĆ, H. ARBANASIĆ, Z. ŠATOVIĆ, B. ŠEOL, S. VUKOVIĆ, H. GOMERČIĆ (2011): High diversity and possible evidence of a recent bottleneck in Adriatic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Mamm. Biol. 76, 339-344.
- GARRIGAN, D., P. W. HEDRICK (2003): Perspective: detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. Evolution 57, 1707-1722.

- GAUDIERI, S., R. L. DAWKINS, K. HABARA, J. K. KULSKI, T. GOJOBORI (2000): SNP profile within the human major histocompatibility complex reveals an extreme and interrupted level of nucleotide diversity. *Genome Res.* 10, 1579–1586.
- GOMERCIC, H., D. HUBER, A. GOMERCIC, T. GOMERCIC (1998): Geographical and historical distribution of the cetaceans in Croatian part of the Adriatic Sea. *Rapport du 35e . Gouy de Bellocq, J. G., C. Delarbre, G. Gachelin, S. Morand Congrès de la CIESM. 35th CIESM Congress Proceedings. Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la mer Méditerranée* 35, 440-441.
- GOMERČIĆ, H., D. HUBER (1989.): Istraživanja i zaštita morskih sisavaca Jadrana. U: Četvrta konferencija o zaštiti Jadrana. Plenarni referati i izvodi saopštenja. (P. Grgić, urednik). Neum, 19. i 20. oktobar 1989. godine. Program rada.
- GOMERČIĆ, H., Đ. HUBER, T. GOMERČIĆ (1994.): Dupini Jadranskog mora: današnje stanje i prijedlog za njihovu zaštitu. Zagreb.
- GOMERČIĆ, H., Đ. HUBER, T. GOMERČIĆ, H. LUCIĆ, D. MIHELIĆ, M. ĐURAS (1998): Estimation of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) population in the Croatian part of the Adriatic Sea. Report conducted for the Regional Activity Centre for Specially Protected Areas. (UNEP- Mediterranean Action Plan) and The Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Zagreb. 48 pp.
- GOMERČIĆ, T., M. ĐURAS GOMERČIĆ, H. GOMERCIC, D. ŠKRTIĆ, S. ČURKOVIĆ, H. LUCIC, A. GALOV, S. VUKOVIC, Đ. HUBER (2004): Vrste, brojnost i rasprostranjenost morskih sisavaca u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. Abundance, population size and distribution of marine mammals in the Croatian part of the Adriatic Sea. *Zbornik radova 1. Hrvatsko-slovenskog simpozija o egzotičnim životinjama-Zbornik radova hrvaško-slovenskog simpozija o ljubiteljskih in prosto živećih vrsta živali* (K., Vlahović, A., Marinculić, urednici). Hrvatsko veterinarsko društvo 1893. Zagreb.16.
- GOUY DE BELLOCQ, J. G., C. DELARBRE, G. GACHELIN, S. MORAND (2005): Allelic diversity at the MHC-DQA locus of woodmouse populations (*Apodemus sylvaticus*) present in the islands and mainland of the northern Mediterranean. *Global Ecol. Biogeogr.* 14,115-122.

- GOUY DE BELLOCQ, J. G., F. SUCHENTRUNK, S. J. E. BAIRD, H. SCHASCHL (2009): Evolutionary history of an MHC gene in two leporid species: characterisation of Mhc-DQA in the European brown hare and comparison with the European rabbit. *Immunogenetics* 61, 131-144.
- GOUY DE BELLOCQ, J. G., H. LEIRS (2010): Polymorphism and signatures of selection in the multimammate rat DQB gene. *Immunogenetics* 62, 59-64.
- GUO S., E. THOMPSON (1992): Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.
- HALL T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.
- HAMMOND, P. S., G. BEARZI, A. BJØRGE, K. FORNEY, L. KARCZMARSKI, T. KASUYA, W. F. PERRIN, M. D. SCOTT, J. Y. WANG, R. S. WELLS, B. WILSON (2008): *Tursiops truncatus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4.
- HARVELL, C. D., K. KIM, J. M. BURKHOLDER, R. R. COLWELL, P. R. EPSTEIN, D. J. GRIMES, E. E. HOFMANN, E. K. LIPP, A. D. OSTERHAUS, R. M. OVERSTREET, J. W. PORTER, G. W. SMITH, G. R. VASTA (1999): Emerging marine diseases--climate links and anthropogenic factors. *Science* 283, 1505-1510.
- HAYASHI, K., S. NISHIDA, H. YOSHIDA, M. GOTO, L. A. PASTENE, H. KOIKE (2003): Sequence variation of the DQB allele in the cetacean MHC. *Mammal Study* 28, 89-96.
- HEDRICK, P. W. (1994): Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *Am. Nat.* 143, 945-964.
- HEDRICK, P. W. (1999): Balancing selection and the MHC. *Genetica* 104, 207-214.
- HEDRICK, P. W. (2000): *Genetics of populations*. 2nd ed. Jones and Bartlett, Boston, MA.
- HEDRICK, P. W., K. M. PARKER, G. A. GUTIÉRREZ-ESPELETA, A. RATTINK, K. LIEVERS (2000): Major Histocompatibility Complex variation in the Arabian Oryx. *Evolution* 54, 2145-2151.

- HEDRICK, P. W., K. M. PARKER, E. L. MILLER, P. S. MILLER (2001): Major Histocompatibility complex variation in the endangered Przewalski's horse. *Genetics* 152, 1701-1710.
- HEIMEIER, D., S. C. BAKER, K. RUSSELL, J. P. DUIGNAN, A. HUTT, G. S. STONE (2009): Confirmed expression of MHC class I and class II genes in the New Zealand endemic Hector's dolphin (*Cephalorhynchus hectori*). *Mar. Mammal Sci.* 25, 68-90.
- HERUT, B., A. ALMOGI-LABIN, N. T. JANNINK, I. GERTMAN (2000): The seasonal dynamics of nutrient and chlorophyll a concentrations on the SE Mediterranean shelf-slope. *Oceanol. Acta* 23, 771-782.
- HUCHARD, E., C. ALBRECHT, S. SCHLIEHE-DIECKS, A. BANIEL, C. ROOS, P. M. KAPPELER, M. BRAMEIER (2012): Large-scale MHC class II genotyping of a wild lemur population by next generation sequencing. *Immunogenetics* 64, 895-913.
- HUGHES, A. L., M. NEI (1988): Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 335, 167-170.
- HUGHES, A. L., M. K. HUGHES (1995): Natural selection on the peptide-binding regions of major histocompatibility complex molecules. *Immunogenetics* 42, 233-243.
- HUGHES, A. L., M. YEAGER (1998): Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annu. Rev. Genet.* 32, 415-434.
- JACKSON, J. A., C. S. BAKER, M. VANT, D. J. STEEL, L. MEDRANO-GONZÁLEZ, S. R. PALUMBI (2009): Big and slow: phylogenetic estimates of molecular evolution in baleen whales (Suborder Mysticeti). *Mol. Biol. Evol.* 26, 2427-2440.
- JUKES, T. H., C. R. CANTOR (1969): Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed). *Mammalian protein metabolism*. Academic Press. New York. 21-132.
- JEFFERSON, T. A., S. LEATHERWOOD, M. A. WEBBER (1993): *Marine Mammals of the World, FAO Species Identification Guide*, United Nations Environment Programme. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

- KENNEDY, L. J., R. RYVAR, R. M. GASKELL, D. D. ADDIE, K. WILLOUGHBY, S. D. CARTER, W. THOMSON, W. E. OLLIER, A. D. RADFORD (2002): Sequence analysis of MHC DRB alleles in domestic cats from the United Kingdom. *Immunogenetics* 54, 348-52.
- KLEIN, J. (1986): *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*. New York, Wiley&Son.
- KLEIN, J., F. FIGUEROA (1986): Evolution of the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology* 4, 295-386.
- KLEIN, J., D. KLEIN, F. FIGUEROA, C. O'HUIGÍN (1997): Major histocompatibility genes in the study of fish phylogeny. In *Molecular Systematics of Fishes*, edited by T. D. Kocher and C. A. Stepien. Academic Press, San Diego. pp 271-283.
- KLEIN, J., A. SATO, S. NAGL, C. O'HUIGÍN (1998): Molecular trans-species polymorphism. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 1-21.
- KUDUK, K., W. BABIK, K. BOJARSKA, E. B. SLIWINSKA, J. KINDBERG, P. TABERLET, J. E. SWENSON, J. RADWAN (2012): Evolution of major histocompatibility complex class I and class II genes in the brown bear. *BMC Evol. Biol.* 12, 197.
- KUNDU, S., C. G. FAULKES (2007): A tangled history: patterns of major histocompatibility complex evolution in the African mole-rats (Family: Bathyergidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 91, 493-503.
- LANDRY, C., D. GARANT, P. DUCHESNE, L. BERNATCHEZ (2001): Good genes as heterozygosity: the major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Proceedings of the Royal Society of London B.* 268, 1279–1285.
- LEATHERWOOD, S., R. R. REEVES (1983): *The Sierra Club handbook of whales and dolphins*, Sierra Club Books, San Francisco.
- LOISEAU, C., M. RICHARD, S. GARNIER, O. CHASTEL, R. JULLIARD, R. ZOOROB, G. SORCI (2009): Diversifying selection on MHC class I in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Mol. Ecol.* 18, 1331–1340.

- LUETKEMEIER, E. S., R. S. MALHI, J. E. BEEVER, L. B. SCHOOK (2009): Diversification of porcine MHC class II genes: evidence for selective advantage. *Immunogenetics* 61, 119-129.
- MARTIN, D. P., P. LEMEY, M. LOTT, V. MOULTON, D. POSADA, P. LEFEUVRE (2010): RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26, 2462-2463.
- MATSUMURA, M., D. H. FREMONT, P. A. PETERSON, I. A. WILSON (1992): Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257, 927-934.
- MEĐUNARODNI UGOVORI (2000): Sporazum o zaštiti kitova (Cetacea) u Crnom moru, Sredozemnom moru i susjednom atlantskom području (ACCOBAMS). Narodne novine 6/2000.
- MEĐUNARODNI UGOVORI (2000): Konvencija o zaštiti migratornih vrsta divljih životinja (CMS). Narodne novine 6/2000.
- MEĐUNARODNI UGOVORI (2006): Međunarodna konvencija za regulaciju kitolova (IWC). Narodne novine 6/2006.
- MIKKO, S., K. ROED, S. SCHMUTZ, L. ANDERSSON (1999): Monomorphism and polymorphism at Mhc DRB loci in domestic and wild ruminants. *Immunol. Rev.* 167, 169-178.
- MILLER, H. C., F. ALLENDORF, C. H. DAUGHERTY (2010) Genetic diversity and differentiation at MHC genes in island populations of tuatara (*Sphenodon* spp.). *Mol. Ecol.* 19, 3894–3908.
- MURRAY, B. W., S. MALIK, B. N. WHITE (1995): Sequence variation at the major histocompatibility complex locus DQ β in beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Mol. Biol. Evol.* 12, 582–593.
- MURRAY, B. W., B. N. WHITE (1998): Sequence variation at the major histocompatibility complex DRB loci in beluga (*Delphinapterus leucas*) and narwhal (*Monodon monoceros*). *Immunogenetics* 48, 242-252.

- MURRAY, B., R. MICHAUD, B. WHITE (1999): Allelic and haplotype variation of major histocompatibility complex class II DRB1 and DQB loci in the St. Lawrence beluga (*Delphinapterus leucas*). *Mol. Ecol.* 8, 1127-1139.
- MUSOLF, K., Y. MEYER-LUCHT, S. SOMMER (2004): Evolution of MHC-DRB class II polymorphism in the genus *Apodemus* and a comparison of DRB sequences within the family Muridae (Mammalia: Rodentia). *Immunogenetics* 56, 420–426.
- NARODNE NOVINE (2005): Zakon o zaštiti prirode. Narodne novine 70/2005.
- NARODNE NOVINE (2008): Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti prirode. Narodne novine 139/2008.
- NARODNE NOVINE (2009): Pravilnik o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i dobro zaštićenim. Narodne novine 99/2009.
- NARODNE NOVINE (2011): Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti prirode. Narodne novine 57/2011.
- NATOLI, A., A. BIRKUN, A. AGUILAR, A. LOPEZ, A. R. HOELZEL (2005): Habitat structure and dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Proc. R. Soc. B.* 272, 1217–1226.
- NEI, M., T. GOJOBORI (1986): Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3, 418-426.
- NIGENDA-MORALES, S., S. FLORES-RAMÍREZ, R. JORGE URBÁN, R. VÁZQUEZ-JUÁREZ (2008): MHC DQB-1 polymorphism in the Gulf of California fin whale (*Balaenoptera physalus*) population. *J. Hered.* 99, 14–21.
- NOTARBARTOLO DI SCIARA, G., G. BEARZI (1992): Cetaceans in the Northern Adriatic Sea: past, present and future. Rapport du 33e Congrès de la CIESM. 33th CIESM Congress Proceedings. Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la mer Méditerranée. 33, 303.
- NOTARBARTOLO DI SCIARA, G. D. HOLCER, G. BEARZI (1994.): Kitovi (Cetacea) sjevernog i srednjeg Jadrana te njihovo prijašnje i sadašnje stanje. Past and present status of cetaceans in the Northern and Central Adriatic Sea. U: Zbornik sažetaka priopćenja Petog

- kongresa biologa Hrvatske- Proceedings of Abstracts of the Papers Presented at the Fifth Congress of Croatian Biologists (H. Gomerčić, urednik). Hrvatsko biološko društvo. Zagreb. 401-402.
- O'BRIEN, S. J., M. E. ROELKE, L. MARKER, A. NEWMAN, C. A. WINKLER, D. MELTZER, L. COLLY, J. F. EVERMANN, M. BUSH, D. E. WILDT (1985): Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* 227, 1428-1434.
- O'BRIEN, S. J., J. F. EVERMANN (1988): Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends Ecol. Evol.* 3, 254-259.
- OHLAND, D.P., E. H. HARLEY, P. B. BEST (1995): Systematics of cetaceans using restriction site mapping of mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4, 10–19.
- PERRIN, W. F. (1984): Patterns of geographical variation in small cetaceans. *Acta Zool. Fennica* 172, 137-140.
- PIERTNEY, S. B., M. K. OLIVER (2006): The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* 96, 7-21.
- POSADA, D., K. A. CRANDALL (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.* 16, 37–45.
- POSADA, D. (2008): jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253-1256.
- RADWAN, J., A. KAWALKO, J. M. WOJCIK, W. BABIK (2007): MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. *Mol. Ecol.* 16, 531–540.
- RECHE, P., E. REINHERZ (2003): Sequence variability analysis of human class I and class II MHC molecules: functional and structural correlates of amino acid polymorphisms. *J. Mol. Biol.* 331, 623–641.
- REEVES, R. R., B. S. STEWART, P. J. CLAPHAM, J. A. POWELL (2002): Guide to Marine mammals of the World. National Audubon Society, A.A. Knopf, New York.
- RICE, D. W. (1998): Marine mammals of the world. Systematics and distribution. Special publication number 4. The Society for Marine Mammalogy.

- RICHMAN, A. (2000): Evolution of balanced genetic polymorphism. *Mol. Ecol.* 9, 1953-1963.
- RONQUIST, F., J. P. HUELSENBECK (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- ROSEL, P.E., M. G. HAYGOOD, W. F. PERRIN (1995): Phylogenetic relationship among the true porpoises (*Cetacea: Phocoenidae*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 4, 463–474.
- SHARIR, Y., D. KEREM, P. GOL'DIN, E. SPANIER (2011): Small size in the common bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* in the eastern Mediterranean: a possible case of Levantine nanism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 438, 241-251.
- SLADE, R. W. (1992): Limited MHC polymorphism in the southern elephant seal: implications for MHC evolution marine mammal population biology. *Proc. R. Soc. Lond. B* 249, 163–171.
- SLATER, G. J., S. A. PRICE, F. SANTINI, M. E. ALFARO (2010): Diversity versus disparity and the radiation of modern cetaceans. *Proc. R. Soc. B* 277, 3097-3104.
- SMITH, S., J. G. DE BELLOCQ, F. SUSHENTRUNK, H. SCHACSHL (2011): Evolutionary genetics of MHC class II beta genes in the brown hare, *Lepus europaeus*. *Immunogenetics* 63, 743-751.
- SOMMER, S. (2003): Effects of habitat fragmentation and changes of dispersal behaviour after a recent population decline on the genetic variability of non-coding and coding DNA of a monogamous Malagasy rodent. *Mol. Ecol.* 12, 2845-2851.
- SOMMER, S. (2005): The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front. Zool.* 2, 16.
- SURRIDGE, A. K., W. LOO, J. ABRANTES, M. CARNEIRO, G. M. HEWITT, P. J. ESTEVEZ (2008): Diversity and evolutionary history of the MHC DQA gene in leporids. *Immunogenetics* 60, 515-525.
- SUTTON, J. T., S. NAKAGAWA, B. C. ROBERTSON, I. G. JAMIESON (2011): Disentangling the roles of natural selection and genetic drift in shaping variation at MHC immunity genes. *Mol. Ecol.* 20, 4408–20.

- TAKAHATA, N. (1990): A simple genealogical structure of strongly balanced allelic lines and trans-species evolution of polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 2419–2423.
- TAKAHATA, N., M. NEI (1990): Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* 124, 967-978.
- TAKAHASHI, K., A. P. ROONEY, M. NEI (2000): Origins and divergence times of mammalian class II MHC gene clusters. *J. Hered.* 91, 198–204.
- TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI, S. KUMAR (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- TROWSDALE, J., V. GROVES, A. ARNASON (1989): Limited MHC polymorphism in whales. *Immunogenetics* 29, 19–24.
- VASSILAKOS, D., A. NATOLI, M. DAHLHEIM, A. R. HOELZEL (2009): Balancing Directional Selection at Exon-2 of the MHC DQB1 Locus among Populations of Odontocete Cetaceans. *Mol. Biol. Evol.* 3, 681-689.
- VILLANUEVA-NORIEGA, M.J., C. S. BAKER, L. MEDRANO-GONZÁLEZ (2013): Evolution of the MHC-DQB exon 2 in marine and terrestrial mammals. *Immunogenetics* 65, 47–61.
- WAGNER, J. L., R. C. BURNETT, R. STORB (1999): Organization of the canine major histocompatibility complex: Current perspectives. *J. Hered.* 90, 35-38.
- WANG, J. Y., L. S. CHOU, B. N. WHITE (2000): Osteological differences between two sympatric forms of bottlenose dolphins (genus *Tursiops*) in Chinese waters. *Journal of Zoology, London* 252, 147-162.

- WANG, J.Y., L. S. CHOU, B. N. WHITE (1999): Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Mol. Ecol.* 8, 1603-1612.
- WELLS, R. S., M. D. SCOOT (2009): Common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). In: W. F Perrin, B. Würsing and J. G. M. Thewissen (eds.), *Encyclopedia of Marine Mammals*. Second Edition. Elsevier, Inc., San Diego, CA. pp 249-255.
- XU, S., P. SUN, K. ZHOU, G. YANG (2007): Sequence variability at three MHC loci of finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides*). *Immunogenetics* 59, 581-592.
- XU, S., B. CHEN, K. ZHOU, G. YANG (2008): High similarity at three MHC loci between the baiji and finless porpoise: Trans-species or convergent evolution? *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 36-44.
- XU, S. X., W. H. REN, S. Z. LI, F. W. WEI, K. Y. ZHOU, G. YANG (2009): Sequence polymorphism and evolution of three cetacean MHC genes. *J. Mol. Evol.* 69, 260-275.
- YACOBI, Y. Z., T. ZOHARY, N. KRESS, A. HECHT (1995): Chlorophyll distribution throughout the southeastern Mediterranean in relation to the physical structure of the water mass. *J. Mar. Syst.* 6, 179–190.
- YANG, G., J. YAN, K. ZHOU, F. WEI (2005): Sequence variation and gene duplication at MHC DQB Loci of Baiji (*Lipotes vexillifer*), a Chinese river dolphin. *J. Hered.* 96, 310-317.
- YANG, Z. (2007): PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1586-1591.
- YANG, W. C., L. S. CHOU, J. M. HU (2007): Molecular characterisation of major histocompatibility complex class II DQB and DRB genes in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus* and *T. aduncus*) from the Western Pacific. *Zool. Stud.* 46, 664-679.
- YANG, W. C., J. M. HU, L. S. CHOU (2008): Sequence variation of MHC class II DQB gene in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from Taiwanese Waters. *Taiwania* 53, 42-50.
- YANG, W. C., J. M. HU, L. S. CHOU (2010): Phylogenetic analyses of MHC class II genes in bottlenose dolphins and their terrestrial relatives reveal pathogen-driven directional selection. *Zool. Stud.* 49, 132-151.

- YANG, W. C., L. S. CHOU, J. M. HU (2012): Sequence analysis of MHC Class II genes in cetaceans. In Histocompatibility.(Abdel-Salam B. Eds.). InTech, China pp. 117-132.
- YANG, W. C., J. M. HU, L. S. CHOU (2013): Sequence analyses of MHC Class II DQB gene in bottlenose dolphins (*Tursiops* spp.) and the other delphinid species from the Western Pacific. Taiwan Vet. J. 39, 100-109.
- YUHKI, N., S. J. O'BRIEN (1997): Nature and origin of polymorphism in feline MHC class II DRA and DRB genes. J. Immunol. 158, 2822-2833.
- ZORNETZER, H. R., D. A. DUFFIELD (2003): Captive-born bottlenose dolphin x common dolphin (*Tursiops truncatus* x *Delphinus capensis*) intergeneric hybrids. Can. J. Zool. 81, 1755-1762.

**9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH
RADOVA**

ŽIVOTOPIS

Snježana Ćurković

Datum i mjesto rođenja

15. 08. 1964., Nova Gradiška, Republika Hrvatska

Bračni status

udana, majka jednog djeteta

Zaposlenje

1991. zaposlila se kao znanstveni novak u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu

1995. zaposlila se na radno mjesto tehničkog suradnika u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu

2002. izabrana na mjesto stručnog savjetnika I vrste u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu

2007. imenovana za voditelja histološko histokemijskog laboratorija u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu

2009. imenovana za voditelja ustrojbene jedinice u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu

Obrazovanje

Srednjoškolsko: 1979.-1983. Medicinski radnik općeg smjera, Nova Gradiška

Dodiplomsko: 1983. upisala Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu

Diplomski rad pod naslovom "Morfometrijske osobitosti nekih mišića kralježnice u konja" obranila 1990. i stekla zvanje diplomirani veterinar

Poslijediplomsko: 1991. upisala poslijediplomski studij iz područja Sanitacije.

Magistarski raspravu pod naslovom "Utjecaj hipervitaminoze D₃ na histokemijske osobitosti nekih organa štakora" obranila 1995. i

stekla zvanje magistar iz oblasti medicinskih znanosti područja veterine

2009. upisala doktorski studij iz Veterinarskih znanosti

Završeni tečajevi

2004. "Primjena molekularne dijagnostike-od kliničkog nalaza do sigurne dijagnoze". Mjesto održavanja: Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska (21.lipnja-04. srpnja).

2007. "Primjena molekularne biologije u Veterinarskoj medicini", radionica Priprema i izolacija DNK, u suradnji sa Gorea-plus d.o.o. Voditelj radionice: Relja Beck dr. vet. med. Mjesto održavanja: Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska (5. srpnja).

Sudjelovanje na domaćim i međunarodnim projektima

"Istraživanje i zaštita sisavaca Jadranskog mora", Ministarstvo znanosti RH 3-03-289.

"Istraživanje sisavaca Jadranskog mora", Ministarstvo znanosti RH 053016.

"Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu", Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa RH 053-0533406-3640.

"Zdravstvene i ostale biološke osobitosti morskih sisavaca Jadranskoga mora", Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa RH (0053317).

"Rettung der letzten Adria-delfine", Društvo za spas dupina (Gesellschaft zur Rettung der Delphine) iz Münchena.

Suautor i autor na:

Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima (7)

Znanstveni radovi u drugim časopisima (3)

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom (1)

Drugi radovi u zbornicima skupova s recenzijom (4)

Sažeci u zbornicima skupova (49)

POPIS RADOVA

Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima

GALOV, A., M. SINDIČIĆ, T. ANDREANSZKY, S. CURKOVIC, D. DEZDEK, A. SLAVICA, G. B. HARTL, B. KRUEGER (2013): High genetic diversity and low population structure in red fox (*Vulpes vulpes*) from Croatia. *Mammalian Biology* 79, 77-80.

BECK, R., L. VOJTA, S. ĆURKOVIĆ, V. MRLJAK, J. MARGALETIĆ, B. HABRUN (2011): Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in central Croatia. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 11, 81-83.

DEŽDEK, D., L. VOJTA, S. ĆURKOVIĆ, Z. LIPEJ, Ž. MIHALJEVIĆ, Ž. CVETNIĆ, R. BECK (2010): Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. *Veterinary Parasitology* 172, 333-336.

ĐURAS GOMERČIĆ, M., A. GALOV, T. GOMERČIĆ, D. ŠKRTIĆ, S. ĆURKOVIĆ, H. LUCIĆ, S. VUKOVIĆ, H. ARBANASIĆ, H. GOMERČIĆ (2009): Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) depredation resulting in larynx strangulation with gill-net parts. *Marine Mammal Science* 25, 392-401.

VOJTA, L., V. MRLJAK, S. ĆURKOVIĆ, T. ŽIVIČNJAK, A. MARINCULIĆ, R. BECK (2009): Molecular epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia. *International Journal for Parasitology* 39, 1129-1136.

GOMERČIĆ, H., M. ĐURAS GOMERČIĆ, T. GOMERČIĆ, H. LUCIĆ, M. DALEBOUT, A. GALOV D. ŠKRTIĆ, S. ĆURKOVIĆ, S. VUKOVIĆ, Đ. HUBER (2006): Biological aspects of Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) recorded in the Croatian part of the Adriatic Sea. *European Journal of Wildlife Research* 52, 182-187.

VUKOVIĆ, S., H. LUCIĆ, H. GOMERČIĆ, M. ĐURAS GOMERČIĆ, T. GOMERČIĆ, D. ŠKRTIĆ, S. ĆURKOVIĆ (2005): Morphology of the lymph nodes in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the Adriatic Sea. *Acta Veterinaria Hungarica* 53, 1-11.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

VUKOVIĆ, S., H. LUCIĆ, M. ĐURAS GOMERČIĆ, A. GALOV, T. GOMERČIĆ, S. ĆURKOVIĆ, D. ŠKRTIĆ, G. DOMITRAN, H. GOMERČIĆ (2011): Anatomical and

histological characteristics of the pituitary gland in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Adriatic Sea. Veterinarski arhiv 81, 143-151.

LUCIĆ, H., S. VUKOVIĆ, V. POSAVAC, M. ĐURAS GOMERČIĆ, T. GOMERČIĆ, A. GALOV, D. ŠKRTIĆ, S. ČURKOVIĆ, H. GOMERČIĆ (2010): Application of dual energy X-ray absorptiometry method for small animals in measuring bone mineral density of the humerus of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Adriatic Sea. Veterinarski arhiv 80, 299-310.

GOMERČIĆ, H., Đ. HUBER, V. GOMERČIĆ, S. VUKOVIĆ, D. ŠKRTIĆ, T. GOMERČIĆ, V. DOBRANIĆ, H. LUCIĆ, M. ĐURAS, S. ČURKOVIĆ, A. GOMERČIĆ, LJ. KARDOŠ (2000): Fatty liver and subcutaneous edema in the wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*, Montagu 1821) from the Adriatic Sea; histochemical and elektronmicroscopical study. Veterinarski arhiv 70, 259-277.

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

ŠKRTIĆ, D., M. ĐURAS GOMERČIĆ, T. GOMERČIĆ, A. GALOV, H. LUCIĆ, S. ČURKOVIĆ, S. VUKOVIĆ, H. GOMERČIĆ (2010): Uzrok smrtnosti kitova (Ordo: Cetacea) od 1990. do 2010. na otoku Mljetu i u okolnom moru. Zbornik radova simpozija 2. dani Branimira Gušića. Durbešić, Paula; Benović, Adam (ur.). Zagreb: NP Mljet, Hrvatsko ekološko društvo, Hrvatsko geografsko društvo, Institut za more i priobalje Sveučilišta u Dubrovniku, 2010. 251-257.

Drugi radovi u zbornicima skupova s recenzijom

LUCIĆ, H., S. VUKOVIĆ, M. ĐURAS GOMERČIĆ, T. GOMERČIĆ, A. GALOV, D. ŠKRTIĆ, S. ČURKOVIĆ, H. GOMERČIĆ (2009): Osteodensitometric differences of the flipper as indicators of muscles activity in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the Adriatic sea. Proceedings of the International Scientific Meeting of Anatomy and Physiology Fundamentals of Medicine. Mihelić, Damir; Šimpraga, Miljenko; Tkalcic, Suzana (ur.). Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2009. 94-104.

ĐURAS GOMERČIĆ, M., T. GOMERČIĆ, H. LUCIĆ, D. ŠKRTIĆ, S. ČURKOVIĆ, S. VUKOVIĆ, A. BABAČIĆ, H. GOMERČIĆ (2007): Osteometrijske značajke plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) iz Nacionalnog parka "Krka". Zbornik radova: Simpozij Rijeka

Krka i Nacionalni park Krka: prirodna i kulturna baština, zaštita i održivi razvitak. Marguš, Drago (ur.). Šibenik: Javna ustanova Nacionalni park "Krka", 2007. 507-508.

GOMERČIĆ, T., M. ĐURAS GOMERČIĆ, H. LUCIĆ, D. ŠKRTIĆ, S. ČURKOVIĆ, S. VUKOVIĆ, A. BABAČIĆ, H. GOMERČIĆ (2007): Prvi nalaz plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) i trakavica iz roda *Phyllobotrium* i *Monorygma* u Nacionalnom parku "Krka". Knjiga sažetaka: Simpozij Rijeka Krka i Nacionalni park Krka: prirodna i kulturna baština, zaštita i održivi razvitak. Marguš, Drago (ur.). Šibenik: Javna ustanova Nacionalni park "Krka", 2007. 519-524.

LUCIĆ, H., S. VUKOVIĆ, M. ĐURAS GOMERČIĆ, T. GOMERČIĆ, S. ČURKOVIĆ, D. ŠKRTIĆ, A. BABAČIĆ, H. GOMERČIĆ (2007): Aktivnost oksidativnih enzima sluznice žljezdanog dijela želuca i dvanaesnika plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) iz Nacionalnog parka "Krka". Simpozij Rijeka Krka i Nacionalni park "Krka", prirodna i kulturna baština, zaštita i održivi razvitak, zbornik radova. Marguš, Drago (ur.). Šibenik: Javna ustanova Nacionalni park "Krka", 2007. 525-533.