Raznolikost gena DQA i DQB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u plavobijelog dupina (Stenella coeruleoalba) i glavatog dupina (Grampus griseus)

Pavlinec, Željko

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:821696

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Željko Pavlinec

Raznolikost gena DQA i DQB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) i glavatog dupina (*Grampus griseus*)

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ane Galov i doc. dr. sc. Martine Đuras, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Najljepše zahvaljujem mentoricama doc. dr. sc. Ani Galov i doc. dr. sc. Martini Đuras na svim savjetima i pomoći, a ponajviše na ukazanom povjerenju za vrijeme izrade ovog rada. Također veliko hvala dr. sc. Haidi Arbanasić na pomoći oko planiranja izvedbe rada i na ustupljenim materijalima iz vlastitog istraživanja. Posebno zahvaljujem Gordani Žakman na savjetima i pomoći prilikom tehničke izvedbe istraživanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

RAZNOLIKOST GENA DQA I DQB SKUPINE II GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI U PLAVOBIJELOG DUPINA (*Stenella coeruleoalba*) I GLAVATOG DUPINA (*Grampus griseus*)

Željko Pavlinec
Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC) ima središnju imunoregulacijsku ulogu. Raznolikost MHC-a je bitna za preživljavanje vrste jer omogućava prepoznavanje širokog spektra patogena. Ta raznolikost je nastala pod utjecajem selekcije, pa MHC geni služe kao biljezi za proučavanje adaptivne evolucije populacija i vrsta. Plavobijeli dupin (*Stenella coeruleoalba*) i glavati dupin (*Grampus griseus*) pripadaju porodici Delphinidae, podred Odontoceti, red Cetacea. Obje vrste nastanjuju topla i umjereno topla mora i to uglavnom pučinske dijelove. Cilj istraživanja bio je odrediti razinu raznolikosti gena DQA i DQB skupine II MHC sustava plavobijelog i glavatog dupina. U uzorcima tkiva 24 jedinke plavobijelog i osam jedinki glavatog dupina iz Sredozemnog mora pronađen je ukupno 21 alel na DQA lokusu i 21 alel na DQB lokusu, od kojih su samo tri DQA alela poznata iz prethodnih istraživanja. Broj jedinstvenih alela, kao i evolucijske udaljenosti ukazuju na visok stupanj raznolikosti u obje vrste, dok omjer stopa nesinonimnih i sinonimnih supstitucija potvrđuje pretpostavku da je raznolikost na istraživanim lokusima održavana pozitivnom selekcijom.

(44 stranice, 5 slika, 20 tablica, 33 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: kitovi, MHC, pozitivna selekcija, genetička raznolikost, Sredozemno more
Voditelji: Dr. sc. Ana Galov, doc.
Dr. sc. Martina Đuras, doc.
Neposredni voditelj: Dr. sc. Haidi Arbanasić
Ocjenitelji: Dr. sc. Ana Galov, doc.
Dr. sc. Damjan Franjević, doc.
Dr.sc. Zlatko Liber, izv. prof.
Rad je prihvaćen: 10. srpnja 2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

VARIABILITY OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX DQA AND DQB CLASS II GENES IN THE STRIPED DOLPHIN (*Stenella coeruleoalba*) AND RISSO'S DOLPHIN (*Grampus griseus*)

Željko Pavlinec
Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Major histocompatibility system (MHC) has a central role in the regulation of immune response. MHC diversity is essential for the survival of the species because it allows for the recognition of a wide spectrum of pathogens. That diversity evolved under selective pressure, so MHC genes can be used as markers for the study of adaptive evolution in populations or species. Striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) and Risso's dolphin (*Grampus griseus*) are a part of the family Delphinidae, suborder Odontoceti, order Cetacea. Both species inhabit pelagic warm and temperate waters. The goal of this study was to determine the variability of MHC class II DQA and DQB genes in the striped dolphin and Risso's dolphin. In tissue samples from 21 striped and eight Risso's dolphins a total of 21 DQA and 21 DQB alleles were found, of which only three DQA alleles were known from previous studies. The number of unique alleles, as well as the calculated evolutionary distances show a high level of diversity in both species, while the rates of non-synonymous and synonymous substitutions indicate the maintenance of the diversity on both loci by positive selection.

(44 pages, 5 figures, 20 tables, 33 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: Cetacea, MHC, positive selection, genetic variability, Mediterranean sea
Supervisors: Dr. sc. Ana Galov, Asst. Prof.
Dr. sc. Martina Đuras, Asst. Prof.
Assistant Supervisor: Dr. sc. Haidi Arbanasić
Reviewers: Dr. sc. Ana Galov, Asst. Prof.
Dr. sc. Damjan Franjević, Asst. Prof.
Dr.sc. Zlatko Liber, Assoc. Prof.
Thesis accepted: 10th July 2014.

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

1.1. Plavobijeli dupin.....1

1.2. Glavati dupin.....4

1.3. Glavni sustav tkivne podudarnosti.....6

1.4. Dosadašnja istraživanja raznolikosti MHC sustava porodice Delphinidae.....8

1.5. Cilj istraživanja.....10

2. MATERIJAL I METODE.....11

2.1. Uzorci tkiva.....11

2.2. Izolacija DNA.....12

2.3. Lančana reakcija polimerazom.....13

2.4. Elektroforeza.....14

2.5. Sekvenciranje.....14

2.6. Molekularno kloniranje.....14

2.7. Računalna obrada podataka.....17

2.7.1. BioEdit.....17

2.7.2. SeqScape®.....18

2.7.3. MEGA.....18

3. REZULTATI.....20

3.1. Plavobijeli dupin – aleli.....20

3.2. Glavati dupin – aleli.....30

3.3. Evolucijske udaljenosti.....33

3.4. Selekcija.....34

4. RASPRAVA.....36

5. ZAKLJUČAK.....40

6. LITERATURA.....41

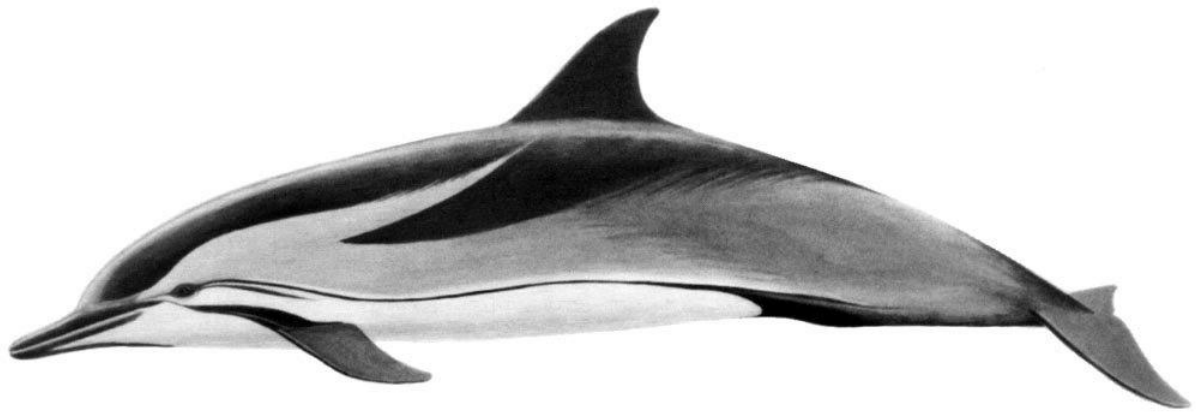
POPIS KRATICA

dN - prosječna stopa nesinonimnih nukloetidnih supstitucija
DNA - deoksiribonukleinska kiselina
dS - prosječna stopa sinonimnih nukleotidnih supstitucija
g - gram
HLA - glavni sustav tkivne podudarnosti u čovjeka (eng. human leukocyte antigens)
Hsp - protein toplinskog šoka (eng. heat shock proteins)
IPTG - izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid
IUCN - međunarodni savez za očuvanje prirode (International Union for Conservation of Nature)
kb - kilobaza
kg - kilogram
L - litra
LB - hranjivi medij za rast bakterija (eng. lysogeny broth)
m - metar
mg - milligram
MHC - glavni sustav tkivne podudarnosti (eng. major histocompatibility complex)
ml - mililitar
mM - milimolarna
ng - nanogram
pb - parovi baza (kod DNA molekule)
PBR - regija koja veže peptide (eng. peptide-binding region)
PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. polymeraze chain reaction)
PMF - prirodoslovno matematički fakultet
rpm - okretaja po minuti
SAD - Sjedinjene Američke Države
TNF - tumorski faktor nekroze (eng. tumor necrosis factor)
UV - ultraljubičasta (eng. ultraviolet)
V - volt
µl - mikrolitar

1. UVOD

1.1. Plavobijeli dupin

Plavobijeli dupin (*Stenella coeruleoalba*) pripada porodici Delphinidae (šiljatozubi dupini), podred Odontoceti (kitovi zubani), red Cetacea (kitovi). Glavna morfološka obilježja po kojima se razlikuje od ostalih vrsta dupina su zakrivljena leđna peraja, izduženi rostralni dio glave („kljun“) i karakteristično obojenje (slika 1). S trbušne strane tijelo mu je bijele ili svijetlo ružičaste boje, leđna strana mu je tamno siva, a između, s bočnih strana tijela je svijetlo siv. Na prednjem dijelu tijela se iz bočnog područja proteže svijetlo siva pruga varijabilne širine do malo ispod leđne peraje. „Kljun“ je crne boje, te se iz njega pruža crna pruga, koja okružuje oči i proteže se sve do analnog otvora. Druga crna pruga se proteže od očiju do prsne peraje, a između tih dviju se nalazi kratka treća crna pruga. Zubalo mu se sastoji od 40 do 55 malih, oštrih zuba s gornje i donje strane usta. Mužjaci su u prosjeku nešto veći od ženki, te narastu do 2,6 m i 156 kg (Jefferson i sur. 1993).

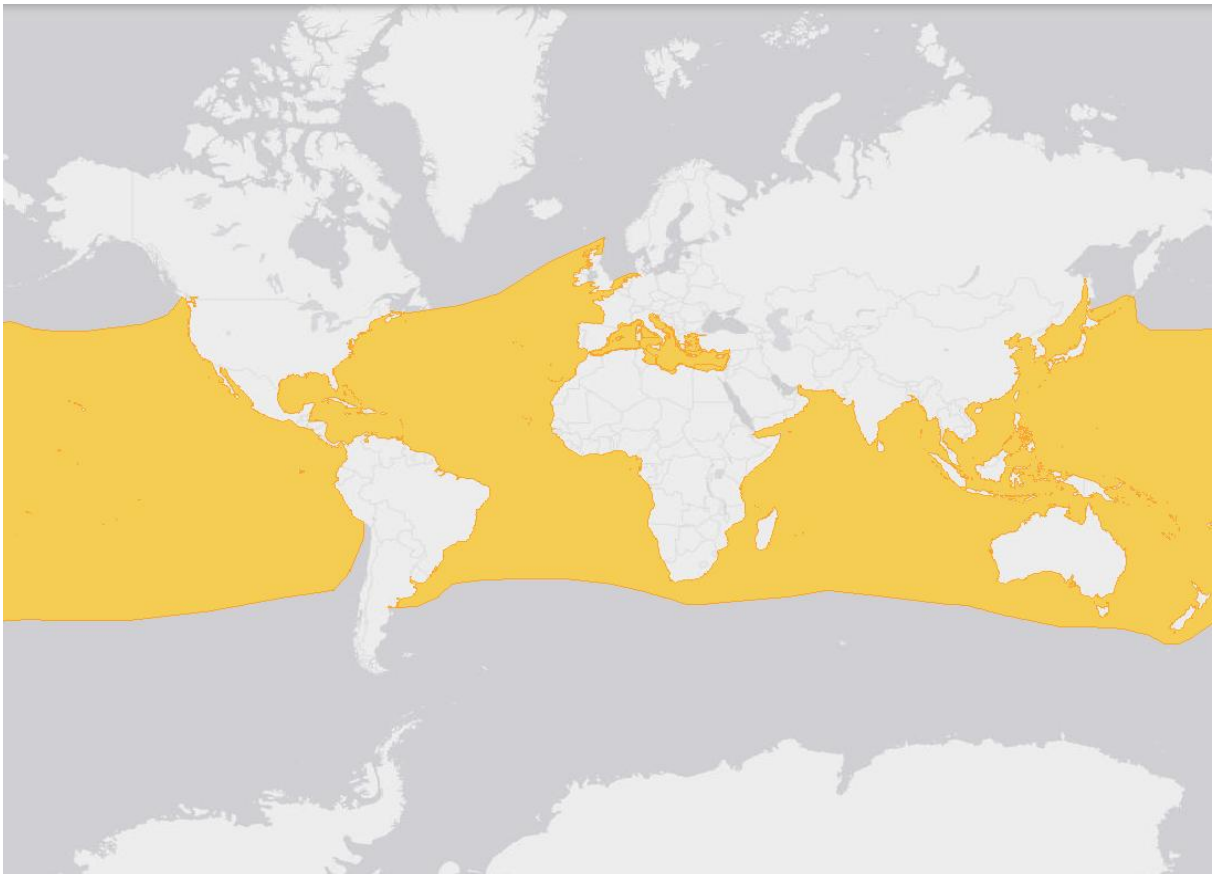


Slika 1. Plavobijeli dupin (preuzeto iz Jefferson i sur. 1993)

Spolnu zrelost ženke plavobijelog dupina dosegnu s prosječno 12 godina, a mužjaci s 11 godina i četiri mjeseca. Životni vijek je, u prosjeku, ženkama 32 godine, a mužjacima 28 godina. Gestacijski period im je malo duži od 12 mjeseci, te u mediteranskoj populaciji prosječna starost roditelja iznosi 22 godine za ženke i 20 godina za mužjake (Aguilar i Gaspari 2012).

Uglavnom nastanjuje topla i umjereno topla mora, te su mu staništa ograničena na oceane i pučinske dijelove mora, a uz kopno obitava samo u područjima gdje se duboka voda

nalazi blizu obale (Jefferson i sur. 1993). Plavobijelog dupina možemo naći u prostoru od 60º sjeverne do 40º južne zemljopisne širine (slika 2).



Slika 2. Geografska rasprostranjenost plavobijelog dupina (preuzeto s IUCN 2008)

U Sredozemnom moru je plavobijeli dupin najbrojnija vrsta kitova, te je 1991. godine njegova brojnost u zapadnom Sredozemlju procijenjena na 117.880 jedinki (Forcada i Hammond 1997.). Nažalost, u periodu od 1990. do 1992. godine, ovu populaciju je zahvatila infekcija morbilivirusom što je, u kombinaciji s poliklorinirani bifenilima i drugim zagađivalima iz skupine organskih klorida koji imaju imunosupresivni učinak, dovelo do ugibanja velikog broja jedinki, te smanjenja prosječne veličine jata za više od 66% (Aguilar i Gaspari 2012).

U Jadranskom moru, smatra se da plavobijeli dupini žive uglavnom u južnom dijelu, te da često zalaze u središnji, a rijetko u sjeverni Jadran, što je i u skladu s preferencijom ove vrste prema dubokim vodama. To potvrđuje i podatak da je od 1986. do 1996. godine, duž talijanske obale, pronađeno 148 nasukanih jedinki na južnom Jadranu, 21 nasukana jedinka na središnjem Jadranu, a samo sedam jedniki na sjevernom Jadranu (Bearzi i sur. 2004).

Dosadašnja istraživanja snažno upućuju na to da su populacije plavobijelog dupina iz Sredozemnog mora strogo izolirane od populacija iz Atlantskog oceana, odnosno da između njih nema izmjene genetičkog materijala (Aguilar i Gaspari 2012). Maksimalna dužina tijela plavobijelih dupina iz Sredozemnog mora je pet do osam centimetara kraća od dupina iz sjevernog Atlantika (Calzada i Aguilar 1995), te je veličina lubanje također manja kod dupina iz Sredozemnog mora (Archer 1997). Također, analiza mitohondrijske DNA koju su proveli Gaspari i sur. (2007) na plavobijelim dupinima od Grčke do Gibraltara pokazuje 59 haplotipova, koji se ne pojavljuju kod jedinki iz Atlantskog oceana.

Galov i sur. (2009) utvrđuju manjak genetičke raznolikosti na kontrolnoj regiji mtDNA između plavobijelih dupina pronađenih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora i onih pronađenih u drugim dijelovima Sredozemnog mora, te to, kao i činjenicu da je u periodu od 1996. do 2006. godine duž hrvatske obale pronađeno samo 15 lešina plavobijelog dupina, a 99 lešina dobrog dupina, navode kao dokaze za pretpostavku da plavobijeli dupin nije rezidentna vrsta u hrvatskom dijelu Jadranskog mora, već u njega samo povremeno zalazi.

Osim patogena i zagađivala glavni razlog smanjenja brojnosti plavobijelog dupina u Sredozemnom moru je smanjenje kvalitete staništa. Na ovo prvenstveno utječe velik izlov komercijalnih vrsta riba i glavonožaca, koje čine glavni udio prehrane plavobijelog dupina. Također, u periodu od 1980. do 2000. godine, stradavale su na tisuće jedinki godišnje kao slučajne žrtve ribolova (Aguilar i Gaspari 2012). Iz navedenih razloga, te zbog slabog porasta brojnosti nakon 1992. godine, danas se plavobijeli dupin u Sredozemnom moru smatra ranjivom (VU) vrstom prema IUCN-ovoj crvenoj listi ugroženih vrsta (IUCN 2014).

Zabrinutost oko očuvanja plavobijelog dupina u zapadnom Sredozemnom moru je navela organizacije poput IUCN-a da predlože zaštitu područja od posebne važnosti za očuvanje kitova. Njihovo zalaganje je 1992. godine rezultiralo zaštitom velikog područja Ligurskog mora oko Korzike, te je pojačana ideja da kitovi u ostalim djelovima zapadnog Mediterana zaslužuju zaštitu (Forcada i Hammond 1997). Budući da status plavobijelog dupina i drugih kitova u tim područjima nije toliko istražen, nužne su procjene populacije na lokalnoj geografskoj razini da bi se mogle poduzeti daljnje mjere zaštite.

1.2. Glavati dupin

Glavati dupin (*Grampus griseus*) također pripada porodici Delphinidae (šiljatozubi dupini), podred Odontoceti (kitovi zubani), red Cetacea (kitovi). Imaju robusnu glavu, s tupim vrhom bez izraženog rostralnog dijela, te ustima s nagibom prema gore (slika 3). Leđna peraja im je visoka i kukasta, a prsne duge i zakrivljene s oštrim vrhom. Najlakše ih je prepoznati po karakterističnom obojenju. Kod odraslih jedinki tijelo je od tamno sive do gotovo bijele boje, ali je gotovo čitavo išarano bijelim mrljama nalik ožiljcima, a na prsima imaju bijelo područje nalik sidru. Također imaju jedinstveno zubalo, s dva do sedam parova zuba u prednjem dijelu donje čeljusti, dok im je gornja čeljust bez zuba. Mogu narasti do 3,8 m, a najveća težina im je procijenjena na oko 500 kg (Jefferson i sur. 1993).

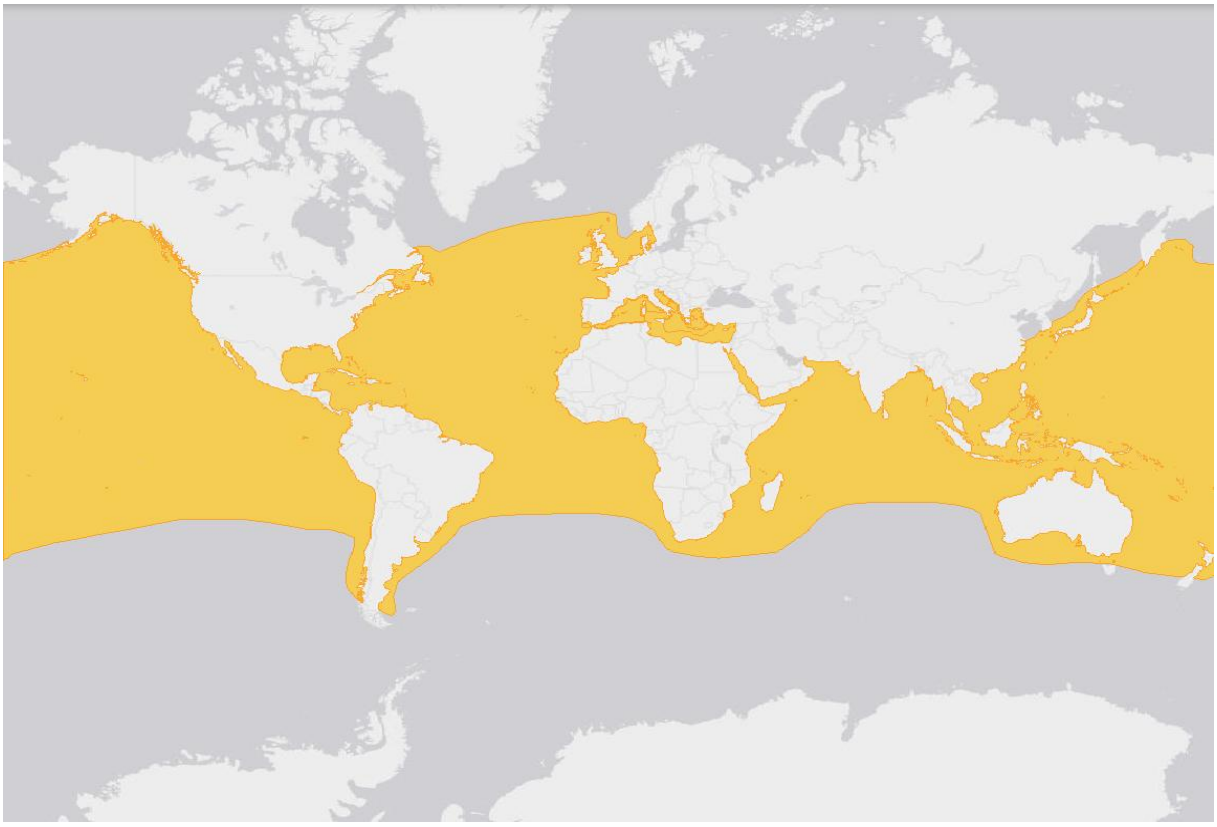


Slika 3. Glavati dupin (preuzeto iz Jefferson i sur. 1993)

Glavati dupin ima vrlo širok raspon staništa pa ga možemo naći od obale Norveške i Aljaškog zaljeva na sjeveru do krajnjeg juga Južne Amerike i Novog Zelanda na jugu (slika 4). Nastanjuje uglavnom duboka mora i oceane tropske i umjerene klime. Jata su obično male do umjerene veličine od nekoliko stotina jedinki, ali opažena su i velika jata do 4000 jedinki. Prehrana im se sastoji uglavnom od rakova i glavonožaca. Vrlo često se druže s drugim vrstama kitova, te su hibridi glavatog i dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) opaženi i u zatočeništvu i divljini (Jefferson i sur. 1993).

Iako ne postoji globalna procjena brojnosti, postoji nekoliko lokalnih, pa su tako populacije uz zapadnu obalu SAD-a procijenjene na 16.066 jedinki, uz istočnu obalu SAD-a 20.479 jedniki, u vodama oko Havaja 2.351 jedinki, oko Šri Lanke između 5.500 i 13.000 jedinki, u Suluskom moru 1.514 jedniki, u sjevernom Meksičkom zaljevu 2.169 jedinki, u

morima oko Japana 83.300 jedinki i u tropskom području istočnog Pacifika 175.000 jedinki (Taylor i sur. 2012).



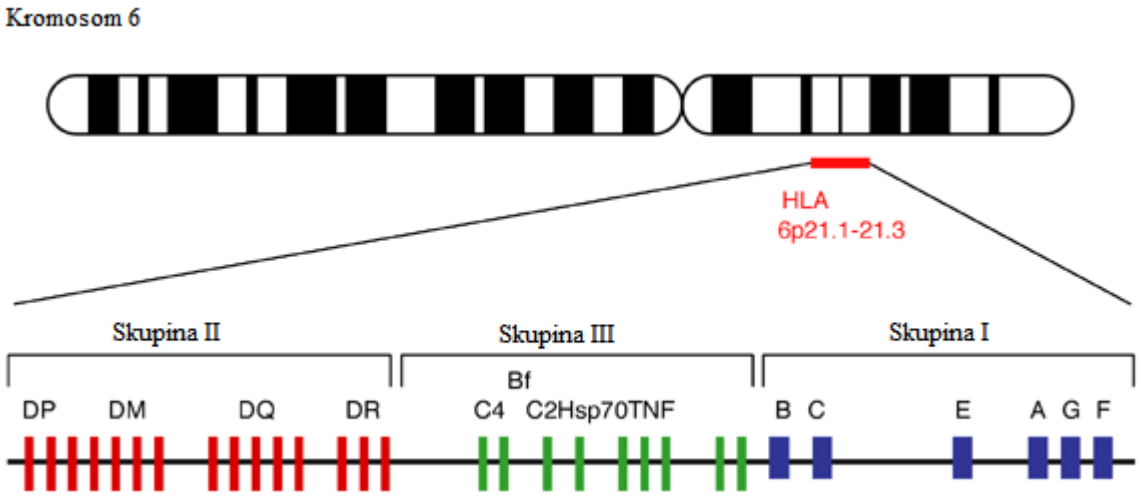
Slika 4. Geografska rasprostranjenost glavatog dupina (preuzeto s IUCN 2012)

U sjevernom Jadranu glavati dupin je prvi puta opažen oko 1860. godine, te su u periodu od 1860. do 1900. godine zabilježeni ulovi četiri glavata dupina u blizini Venecije, jednog blizu obale Istre, te četiri blizu Zadra. U novije vrijeme na istom području se glavati dupini češće pojavljuju, te su zabilježena povremena nasukavanja, no ipak sva opažanja se odnose na usamljene jedinke, osim jednog slučaja iz 1993. godine kada je u blizini Trsta uočena skupina od tri jedinke (Bearzi i sur. 2004). Iz tih razloga smatra se da glavati dupini ne žive u Jadranskom moru, već samo u njega zalaze.

Prijetnje koje bi mogle uzrokovati smanjenje brojnosti ove vrste su povećana razina zvuka uzrokovana ljudskim djelovanjem, posebice vojnim sonarima i seizmičkom opremom, zatim slučajan ulov u ribarskim mrežama, te smanjenje hrane, posebice komercijalnih vrsta glavonožaca poput lignje. Ipak, zbog velike raširenosti staništa i visoke globalne brojnosti, smatra se da glavatom dupinu ne prijeti smanjenje sveukupne brojnosti od 30% kroz iduće tri generacije (60 godina) (Taylor i sur. 2012).

1.3. Glavni sustav tkivne podudarnosti

Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti kodiraju za membranske molekule kojima je glavna funkcija prikazivanje peptidnih antigena limfocitima T. Budući da limfociti T prepoznaju strane antigene isključivo u sklopu molekula MHC, sustav MHC određuje odabir klonova limfocita T i zbog toga ima središnju imunoregulacijsku ulogu (Andreis i sur. 2010). Kod ljudi, molekule skupine HLA I reguliraju funkciju $CD8^+$ citotoksičnih T limfocita i tako posreduju u imunosnom odgovoru protiv endogenih antigena, dok su molekule skupine HLA II uključene u prezentiranje egzogenih antigena pomočnićkim T limfocitima (Mehra i Kaur 2003). HLA III regija sadrži brojne gene koji kodiraju za proteine koji nisu direktno povezani sa staničnom imunošću već posredno reguliraju imunološki odgovor, poput proteina komplementa (C2, C4), tumorskog faktora nekroze (TNF) i proteina toplinskog šoka (Hsp70)(slika 5).



Slika 5. Genska mapa HLA regije. (preuzeto i prilagođeno iz Mehra i Kaur 2003)

Organizacija MHC gena (slika 5), njihov broj i razina ekspresije su vrlo varijabilni između različitih skupina kralješnjaka, ali često i između taksonomski bliskih vrsta (Kelley i sur. 2005). Skupine MHC I i II su ujedno i najpolimorfniji kodirajući dijelovi DNA, a taj visok stupanj polimorfizma MHC gena omogućava prepoznavanje šireg spektra patogena, pa je MHC raznolikost bitna za preživljavanje vrste (Heimeier 2009). Koliko je točno MHC raznolikosti potrebno da se osigura opstanak neke populacije je još uvijek jedno od temeljnih pitanja konzervacijske genetike, ali smatra se da manjak raznolikosti može povećati

podložnost populacije na infektivne bolesti, s potencijalno katastrofalnim posljedicama (Yang i sur. 2007).

Zapanjujući primjer raznolikosti MHC sustava je čovjek, kod kojeg je do danas pronađeno preko 11 tisuća jedinstvenih alela u skupinama HLA I i HLA II (Robinson i sur. 2011). Ipak, nisu svi MHC geni jednako polimorfni, pa su se tako DQB i DRB geni pokazali najraznolikijima, te su ujedno i najviše proučavani (Yang i sur. 2007). Raznolikost DQB i DRB gena je proučavana u brojnim vrstama sisavaca poput primata, miševa i domaćih životinja.

Smatra se da se ovako visoka raznolikost održava balansirajućom selekcijom, što je zapravo širok pojam koji se odnosi na sve oblike prirodne selekcije u kojima niti jedan alel nema najveći fitnes (Yang i sur. 2007). Prirodna selekcija djeluje na fenotip svake jedinke, ali njeno djelovanje mijenja genotip, odnosno alele koji utječu na fitnes te jedinke. Balansirajuća selekcija održava varijaciju na MHC lokusima preko mehanizama heterozigotne prednosti, prednosti rijetkog alela i vremensko-prostornih varijacija u selekciji (Strand 2011). Heterozigotna prednost se odnosi na situacije u kojoj jedinke heterozigotne na određenom lokusu imaju veći fitnes od homozigota, dok se selekcija ovisna o frekvenciji alela odnosi na situacije u kojima utjecaj alela na fitness jedinke ovisi o njegovoj frekvenciji u populaciji. Kada se selektivna prednost MHC alela razlikuje između dva ili više okoliša, koji variraju u broju i raznovrsnosti patogena, usmjerena selekcija vođena patogenima može djelovati različito na jedinke iste vrste iz različitih populacija (Bernatchez i Landry 2003).

Evolucija sustava MHC se odlikuje ponavljanim genskim duplikacijama i gubitcima gena, te nam filogenetski obrasci mogu otkriti da li su duplikacije nedavne ili rane, odnosno da li su se dogodile u recentnim vrstama ili u vrstama precima (Strand 2011). Jedinstveni MHC aleli se mogu očuvati kroz dugi evolucijski period, te njihovo porijeklo može biti starije od specijacije vrste u kojoj ih nalazimo, što dovodi do sličnosti između alela blisko srodnih, ali različitih vrsta (Klein i sur. 1998). Ta pojava se naziva trans-specijski polimorfizam, te se smatra još jednim dokazom balansirajuće selekcije (Xu i sur. 2009), a do danas je dokumentirana kod primata (Huchard i sur. 2006), kopitara (Radwan i sur. 2007), glodavaca (Cutrera i Lacey 2007) i kitova (Xu i sur., 2009). Iz svih gore navedenih razloga MHC geni nam mogu poslužiti kao odličan molekularni biljeg prilikom proučavanja adaptivne evolucije populacija i vrsta.

1.4. Dosadašnja istraživanja raznolikosti MHC sustava porodice Delphinidae

Yang i sur (2007) radili su istraživanje na dijelovima DRB i DQB lokusa MHC regije kod dvije vrste roda Tursiops (*T. truncatus* i *T. aduncus*). Istraživanje je provedeno na ukupno četiri jedinke, po dvije jednike svake vrste, te pronalaze šest jedinstvenih DQB alela, po tri kod svake vrste, što ukazuje na postojanje samo jednog DQB lokusa u genomu, te 14 jedinstvenih DRB alela, po sedam kod svake vrste, što ukazuje na duplicirani DRB lokus u obje vrste. Filogenetska analiza koju su proveli pokazuje da nije bilo miješanja alela između dviju vrsta, a visok udio nesinonimnih nukleotidnih supstitucija u PBR regiji DQB i DRB lokusa ukazuje na pozitivnu selekciju na tim lokusima.

Ekspresija i raznolikost MHC gena kod dvije jedinke Hektorovog dupina (*Cephalorhynchus hectori*) je opisana u radu Heimeier i sur. (2009). Oni su otkrili dva nova DQA alela i tri nova DQB alela, ali ni ovdje lokusi nisu proučavani u cjelini, već samo njihovi dijelovi. Većina aminokiselinskih supstitucija koje su detektirali se nalazila u PBR regiji, te su i oni dobili omjer nesinonimnih i sinonimnih supstitucija veći od jedan.

Xu i sur. (2009) napravili su dotad najopsežnije istraživanje MHC raznolikosti kitova na 10 različitih vrsta uključujući i plavobijelog i glavatog dupina. Kod 15 jedinki plavobijelog dupina iz Južnog Kineskog mora našli su šest novih DRA alela, devet novih DQB alela i osam novih MHC-I alela, dok su kod jedne jedinke glavatog dupina iz istog mora pronašli dva nova DRA alela, jedan novi DQB alel i dva nova MHC-I alela. Ovo istraživanje je također provedeno na samo dijelovima gena, konkretno na egzonu 2 DQB lokusa je umnožen odsječak dužine 171 pb. Ukupno, na svim istraživanim vrstama, pronašli su 20 parova identičnih alela, koji su pronađeni u više od jedne vrste, pet na DRA lokusu, sedam na DQB lokusu i osam na MHC-I lokusu, te su utvrdili da niti kod jedne istraživane vrste nije došlo do duplikacije DQB lokusa. Njihovi rezultati su se također poklapali s pretpostavkom da su istraživani dijelovi MHC gena pod balansirajućom selekcijom, te da je najveća varijabilnost na mjestima koja se nalaze unutar PBR regije.

Arbanasić i sur. (neobjavljeno) su proveli istraživanje MHC raznolikosti na 48 jedinki dobrog dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora i 14 jedinki dobrog dupina s drugih lokacija u Sredozemnom moru, gdje su umnožili čitavi egzon 2 lokusa DQA, te dijelove egzona 2 lokusa DQB i DRA. Niti u jednoj jedinki nisu uočili duplicirane lokuse, te su ukupno pronašli 10 DQA, 12 DBQ i tri DRA alela, od čega su devet DQA, tri DQB i jedan DRA alel bili prethodno nepoznati. Omjer nesinonimnih i sinonimnih aminokiselinskih

supstitucija na DQA i DQB lokusima je i u njihovom istraživanju bio veći od jedan, ukazujući na pozitivnu selekciju, a kodoni za koje je pretpostavljeno da su pod selekcijom su se nalazili unutar PBR regije. U istom istraživanju su napravili i filogenetsku analizu DQA i DQB alela, te potvrdili dosadašnje rezultate o trans-specijskom polimorfizmu.

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je odrediti razinu raznolikosti gena DQA i DQB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u plavobijelog dupina i glavatog dupina, te istražiti djelovanje selekcije na lokusima. Usporedit će se rezultati dobiveni u dvije istražene vrste i u srodnim vrstama, poput dobrog dupina. Dobiveni rezultati pridonijet će boljem razumijevanju djelovanja prirodne selekcije u evoluciji MHC gena u dupina. Također, budući da je ovo prvo ovakvo istraživanje provedeno na plavobijelom i glavatom dupinu, očekivanja su da će se pronaći i opisati nekoliko novih alela na istraživanim lokusima, što će pridonijeti općem znanju MHC raznolikosti u kitova.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Uzorci tkiva

Uzorci tkiva korišteni prilikom izrade ovog diplomskog rada su izolirani iz lešina dupina, koje su pronađene nasukane na obalama Jadranskog mora i Ligurskog mora. Korišteno je ukupno 24 uzoraka plavobijelog dupina (tablica 1) i osam glavatog dupina (tablica 2). Dio uzoraka porijeklom su od dupina pronađenih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora (17 uzoraka plavobijelog dupina i četiri uzorka glavatog dupina), a koji su pohranjeni u zbirci Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ostali uzorci (sedam uzoraka plavobijelih dupina i četiri uzorka glavatog dupina) su od dupina pronađenih u talijanskom dijelu Jadranskog mora i Ligurskog mora, a ti su uzorci pohranjeni u Banci tkiva sredozemnih morskih sisavaca u Zavodu za eksperimentalnu veterinarsku znanost Fakulteta veterinarske medicine Sveučilišta u Padovi. Izuzev jedinke pod oznakom 70, kod koje je za izolaciju DNA korišteno tkivo jetre, kod svih ostalih jedinki korišteno je tkivo skeletnog mišića.

Tablica 1. Uzorci tkiva plavobijelog dupina korišteni prilikom izrade diplomskog rada

oznaka jedinke	datum pronalaska	lokalitet		spol	dužina tijela
27	23.06.1999.	Skradin	Jadransko more	mužjak	198 cm
73	05.02.2002.	otok Korčula	Jadransko more	ženka	207 cm
78	21.02.2002.	Orebić	Jadransko more	ženka	202 cm
79	25.02.2002.	Poreč	Jadransko more	ženka	198 cm
81	30.03.2002.	otok Vis	Jadransko more	mužjak	188 cm
115	16.04.2004.	ušće Neretve	Jadransko more	ženka	197 cm
146	12.12.2005.	otok Korčula	Jadransko more	ženka	179 cm
213	06.04.2010.	otok Korčula	Jadransko more	ženka	15 cm
244	24.01.2011.	Hvar	Jadransko more	mužjak	213 cm
246	11.03.2011.	Pelješac	Jadransko more	mužjak	206 cm
249	22.04.2011.	otok Lastovo	Jadransko more	mužjak	214 cm
257	17.01.2012.	Susak	Jadransko more	mužjak	201 cm
258	25.01.2012.	Korčula	Jadransko more	mužjak	208 cm
259	27.01.2012.	Zaton, Dubrovnik	Jadransko more	ženka	210 cm
261	09.02.2012.	Čiovo	Jadransko more	mužjak	213 cm
263	16.02.2012.	Privlaka, Zadar	Jadransko more	mužjak	210 cm
265	01.04.2012.	Ždrelac, Pašman	Jadransko more	mužjak	198 cm

T153	16.4.2008.	Livorno	Ligursko more	ženka	250 cm
T157	27.03.2008.	Viareggio	Ligursko more	mužjak	260 cm
T167	21.09.2009.	Collesalvetti	Ligursko more	mužjak	209 cm
T170	26.11.2009.	Livorno	Ligursko more	ženka	292 cm
T218	20.01.2012.	Lido di classe	Jadransko more	mužjak	284 cm
T221	23.03.2012.	Cattolica	Jadransko more	mužjak	198 cm
T222	15.02.2012.	Tirrenia	Ligursko more	ženka	208 cm

Tablica 2. Uzorci tkiva glavatog dupina korišteni prilikom izrade diplomskog rada

oznaka jedinke	datum pronalaska	lokalitet		spol	dužina tijela
68	31.12.2001.	otok Karantunić	Jadransko more	mužjak	318 cm
69	10.01.2002.	otok Mljet	Jadransko more	mužjak	302 cm
70	18.01.2002.	otok Vis	Jadransko more	mužjak	295 cm
84	30.04.2002.	otok Korčula	Jadransko more	mužjak	286 cm
T116	30.06.2007.	Cattolica	Jadransko more	mužjak	200 cm
T215	11.01.2012.	Bibione	Jadransko more	ženka	300 cm
T225	15.04.2012.	Viareggio	Ligursko more	ženka	305 cm
T226	15.04.2012.	Viareggio	Ligursko more	ženka	320 cm

2.2. Izolacija DNA

Izolacija ukupne DNA napravljena je korištenjem komecijalnog paketa Wizard Genomic DNA Purification Kit od Promege, prema prilagođenom protokolu. Prvo je u 1,5 ml eppendorf epruvetu, prethodno označenu oznakom uzorka, odpipetirano 300 µl Nuclei Lysis Solution, a zatim je komadić od 5 do 10 mg tkiva usitnjen skalpelom i prebačen u epruvetu. Epruveta je zatim kratko vorteksirana. Nakon toga u epruvetu je dodano 1,5 µl proteinaze K (20mg/ml), pa je epruveta snažno vorteksirana jednu minutu. Potom je epruveta inkubirana na 55 ^{0}C preko noći. Sutradan je epruveta vorteksirana jednu minutu, a nakon što se ohladila na sobnu temperaturu u nju je dodano 100 µl Protein Precipitation Solution. Zatim je epruveta snažno vorteksirana 20 sekundi, te nakon toga je ostavljena na ledu pet minuta. Poslije toga epruveta je centrifugirana tri minute na 13.000 rpm. U novu 1,5 ml eppendorf epruvetu, prethodno označenu oznakom uzorka, odpipetirano je 300 µl 100% etanola, pa je u nju dodan supernatant iz stare epruvete. Nakon dodavanja supernatanta sadržaj epruvete je pažljivo promiješan, pa je epruveta centrifugirana jednu minutu na 13.000 rpm. Nakon centrifugiranja supernatant je dekantiran, u epruvetu je dodano 300 µl 70% etanola, te je epruveta pažljivo promiješana. Potom je epruveta ponovno centrifugirana jednu minutu na 13.000 rpm, nakon

čega je odstranjen supernatant. Otvorena epruveta je zatim preokrenuta na čisti filter papir i ostavljena jedan sat da se suši na zraku. Nakon sušenja u epruvetu je dodano 100 µl DNA Rehidration Solution, pa je epruveta inkubirana jedan sat na sobnoj temperaturi. Time je postupak izolacije ukupne DNA završen, a izolirana DNA je spremljena u hladnjak na 4 ^{0}C do daljnje obrade.

2.3. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (PCR, od eng. polymerase chain reaction) je u ovom diplomskom radu korištena kako bi se specifično umnožili fragmenti genomske DNA molekule dupina koji sadrže egzon 2 DQA i DQB lokusa MHC sustava. Za PCR korištene su specifične početnice i komercijalni komplet HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen), koji sadrži vodu i Taq PCR Master Mix (koji se sastoji od *Taq* DNA polimeraze, dNTP-ova i Qiagen PCR pufera). Za umnažanje svakog lokusa u svrhu sekvenciranja, rađen je PCR u ukupnom volumenu od 40 µl, a za umnažanje u svrhu molekularnog kloniranja (poglavlje 2.6.) PCR u ukupnom volumenu od 20 µl. Za provjeru izolacije DNA i za provjeru ugradnje inserta u plazmidima nakon molekularnog kloniranja rađen je PCR u ukupnom volumenu od 10 µl. Kod svih reakcija pola ukupnog volumena zauzimao je master mix, a otopina DNA (uzorci nakon izolacije DNA) je stavljana u omjeru 1/10 ukupnog volumena reakcije. Za umnažanje egzona 2 lokusa DQA u svim uzorcima upotrebljene su početnice DQAex2F 5'GCTGACCATGTTGGCTCCTATG3' (Heimeier i sur. 2009) i DQAR 5'AAGA GGGAGGATGAGGGTCC3' (Arbanasić i sur., neobjavljeno) u koncentraciji 0,2 µM. Za umnažanje egzona 2 lokusa DQB, kod uzoraka plavobijelog dupina korištene su početnice DupDQBF1 5'GGCGGGTTTCAGGTTTTTCC3' i DupDQBR1 5'AACCTCCGTCTCC CTGCT3' u koncentraciji 0,5 µM, a kod uzoraka glavatog dupina početnice DupDQBF3 5'CCTCGCACGAAGGTCATTCT3' i DupDQBR3 5'CTCTGCGCGAGACGCC3' u koncentraciji 0,5 µM. Sve početnice korištene za umnažanje egzona 2 lokusa DQB su dizajnirane prvi puta za izradu ovog diplomskog rada na temelju sljedova DQB gena kod dobrog dupina dostupnih u Ensembl genomskoj bazi (Flicek i sur. 2014). Ostatak volumena svih reakcija otpadao je na vodu.

2.4. Elektroforeza

Za provjeru prisutnosti DNA molekula u otopinama nakon PCR reakcije i molekularnog kloniranja (poglavlje 2.6.) korištena je elektroforeza na 1% agaroznom gelu. Da bi se vizualizirali odsječci DNA, u gel je prilikom izrade dodana boja Syber Safe (Invitrogen) u omjeru 1 µl boje na 10 ml gela. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 100 V u trajanju od 30 minuta. Nakon elektroforeze gel je promatran pod UV lampom.

2.5. Sekvenciranje

Za izradu ovog diplomskog rada sekvencirani su DNA uzorci svih jedinki dobiveni nakon gore opisanog PCR-a (egzoni 2 DQA i DQB lokusa MHC-a), te svi DNA uzorci (plazmidi) dobiveni molekularnim kloniranjem (opisano u poglavlju 2.6.). Za sve usluge sekvenciranja korišten je Macrogen-ov servis za sekvenciranje (www.macrogen.com) koji se nalazi u Amsterdamu, Nizozemska, te su svi uzorci slani u Nizozemsku poštom. Korištena je njihova usluga "Standard-seq single Regular", a za početnice prilikom sekvenciranja su korištene iste one kao i kod PCR-a (poglavlje 2.3.). Većina uzoraka je sekvencirana samo iz jednog smjera, korištenjem uzvodne početnice, a neki su uzorci naknadno sekvencirani i iz drugog smjera radi točnog čitanja čitavog slijeda. Također, budući da PCR proizvodi nisu pročišćavani prije sekvenciranja na PMF-u, za te uzorke korištena je dodatno usluga pročišćavanja DNA.

2.6. Molekularno kloniranje

U svrhu razdvajanja gametnih faza, odnosno dobivanja pojedinih alela, kod heterozigotnih jedinki koje nisu imale alele koji su već bili nađeni u ranijim istraživanjima, provedeno je molekularno kloniranje pomoću komercijalnog kompleta pGEM®-T Easy Vector System (Promega). pGEM®-T je plazmid koji sadrži gen za rezistenciju na ampicilin i laktozni operon, te u kompletu dolazi već pocijepan na mjestu unutar *lac*Z gena gdje bi se trebao ugraditi odsječak DNA koji se želi klonirati (insert). Ove osobine su korištene za kontrolu ulaska plazmida u bakterijske stanice, odnosno za kontrolu ugradnje inserta u plazmid. Ako su bakterijske stanice primile plaznid onda su mogle rasti na LB podlozi s ampicilinom. Nadalje, ako se u plazmide ugradio insert, *lac*Z gen je bio inaktiviran, dok ako

se plazmid zatvorio bez ugradnje inserta, *lac*Z gen je postao aktivan. Dodavanjem X-Gal-a kao supstrata β-galaktozidaze, te IPTG-a kao induktora laktoznog operona u podlogu, kolonije bakterija koje sadrže insert su bile bijele boje, dok su kolonije koje sadrže plazmid bez inserta bile plave boje. Za potrebe izrade ovog diplomskog rada klonirano je ukupno 12 različith uzoraka na lokusu DQA i 14 različitih uzoraka na lokusu DQB.

Prije samog postupka molekularnog kloniranja provedeno je pročišćavanje PCR proizvoda pomoću komercijalnog kompleta Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Nakon PCR reakcije u epruvete sa umnoženom DNA odpipetiran je jednaki volumen otopine za vezanje na membranu (Membrane Binding Solution). Pripremljene su čiste epruvete za sakupljanje od 2 mL i u njih su stavljene kolone za pročišćavanje (Spin Column). U kolone je odpipetirana otopina sa umnoženom DNA, pa je sve inkubirano 1 min na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirano 1 min na 14.000 rpm. Nakon centrifugiranja tekućina je odlivena, u kolone je dodano 750 µl otopine za ispiranje (Wash Solution), te je sve centrifugirano 1 min na 14.000 rpm. Tekućina je ponovno odlivena, u kolone je dodano 500 µl otopine za ispiranje, pa je sve centrifugirano 5 min na 14.000 rpm. Zatim je ponovno izbačena tekućina, pa su epruvete sa kolonama centrifugirane 1 min na 14.000 rpm sa otklopljenom centrifugom da ispari zaostale tekućina. Kolone su tada prebačene u čiste epruvete od 1,5 ml, u njih je dodano 20 µl vode bez nukleaza (Nuclease-Free Water) i sve je centrifugirano 1 min na 14.000 rpm. Elektroforezom je provjerena prisutnost DNA u završnoj otopini.

Prvi dan postupka molekularnog kloniranja je rađena ligacijska reakcija. Prvo je insert (egzon 2 DQA ili DQB lokusa MHC) umnožen pomoću PCR-a. Zatim je elektroforezom provjereno je li dobiven PCR proizvod, a nakon toga je rađeno pročišćavanje PCR proizvoda (poglavlje 2.6.1.). Da bi ligacijska reakcija uspjela potrebno je utvrditi koliko se PCR proizvoda dodaje u reakcijsku smjesu. Dozvoljeni omjeri inserta i vektora su od 8/1 do 1/8. Zbog toga, nakon pročišćavanja, elektroforezom PCR proizvoda i otopine DNA poznatih koncentracija, te njihovom usporedbom jačine osvjetljenja pod UV svjetlom određena je približna koncentracija DNA u PCR proizvodu. Da bi se odredilo koliko se PCR proizvoda dodaje u ligacijsku smjesu korištena je jednadžba:

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

Po protokolu preporučeni molarni omjer iznosi 3/1. Nakon određivanja potrebnog volumena PCR proizvoda za ligacijsku reackiju, pripremljena je ligacijska smjesa. U epruvetu od 0,2 mL odpipetirano je 5 µl pufera za brzu ligaciju (Rapid Ligation Buffer), 1 µl pGEM®-T plazmida, 1 µl T4 DNA ligaze, pročišćeni PCR proizvod i vode do ukupnog volumena smjese od 10 µl. Za negativnu kontrolu je u zasebnoj epruveti pripremljena ista smjesa, ali bez PCR proizvoda, a za pozitivnu kontrolu se u smjesu umjesto PCR proizvoda dodaje 2 µl kontrolnog inserta. Tako pripremljene ligacijske smjese ostavljene su preko noći na 4 ^{0}C.

Drugog dana rađena je transformacija bakterija ligacijskom smjesom. U tu svrhu korištene su JM109 visoko kompetentne bakterije *Escherichia coli*. Za svaku ligacijsku reakciju pripremljene su po dvije petrijeve zdjelice sa 30 mL krute hranjive podloge za rast bakterija. Za hranjivu podlogu korišten je LB medij sljedećeg sastava: 1 L vode, 10 g Bacto®-trypton-a, 5 g Bacto®-yeast extract-a, 5 g NaCl, 15 g agara i NaOH do konačne pH vrijednosti od 7,0. Prije izlijevanja u petrijeve zdjelice medij je autoklaviran, te je u njega dodan ampicilin do konačne koncentracije 100 µl/ml. U svaku tako pripremljenu petrijevu zdjelicu, povrh hranjivog medija dodana je smjesa 100 µl 100 mM IPTG-a i 20 µl X-Gal-a koncentracije 50 mg/ml, te su zdjelice ostavljene 30 minuta na 37^{0}C da se smjesa upije u podlogu. Epruvete s ligacijskom smjesom od prethodnog dana su kratko centrifugirane, te je po 2 µl ligacijske smjese prebačeno u nove sterilne 1,5 ml eppendorf epruvete. Epruvete sa bakterijskim stanicama, koje su prethodno skladištene u ledištu na -20^{0}C, su stavljene 5 min u ledenu kupelj da se otope. Nakon laganog miješanja bakterija, otpipetirano je po 50 µl u epruvete s ligacijskom smjesom. Da bi bakterije primile plazmide, epruvete sa smjesom su lagano promiješane, stavljene 20 min na led, zatim 45 sekundi u vodenu kupelj na 42^{0}C, te ponovno na led 2 min. Zatim je u epruvete dodano 800 µl tekućeg LB medija, pa su inkubirane 1,5 sati na 37^{0}C uz miješanje od 300 rpm. Tekući LB medij je pripremljen na isti način kao i prethodno opisani kruti, samo bez agara. Nakon inkubacije iz svake reakcije je otpipetirano 100 µl na po dvije prethodno pripremljene LB/ampicilin/IPTG/X-Gal petrijeve zdjelice, pa su sve zdjelice inkubirane 24 sata na 37^{0}C.

Sljedeći dan za svaki je uzorak označeno po 10 epruveta od 15 ml, te je u njih odpipetirano 5 ml tekućeg LB medija. Petrijeve zdjelice su izvađene iz inkubatora, te su u epruvete sa svježim medijem prenešene bijele kolonije bakterija, jedna kolonija po epruveti. Epruvete su zatim inkubirane preko noći na 37^{0}C uz lagano miješanje. Na ovaj način je višestruko umnožen broj bakterija koje sadrže plazmide sa specifičnim insertima. Sutradan je provedena izolacija plazmida iz bakterija i njihovo pročišćavanje (poglavlje 2.6.2.).

Izolacija plazmida iz bakterija i njihovo pročišćavanje je rađeno pomoću komercijalnog kompleta Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System. U prvom koraku epruvete koje sadrže bakterije su centrifugirane 5 min na 2.000 rpm. Supernatant je odliven, a talog je resuspendiran u 250 µl otopine za resuspendiranje stanica (Cell Resuspension Solution). Nakon toga suspenzija stanica je pipetom prebačena iz velikih epruveta u male epruvete od 1,5 ml. Potom je u svaku epruvetu dodano 250 µl otopine za lizu stanica (Cell Lysis Solution), te je sadržaj epruveta promiješan preokretanjem četiri puta. Zatim je u epruvete dodano 10 µl otopine alkalne proteaze (Alkaline Protease Solution), ponovno su preokrenute četiri puta i ostavljene 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga im je dodano 350 µl otopine za neutralizaciju (Neutralization Solution), pa su preokrenute četiri puta i centrifugirane 10 minuta na 14.000 rpm. Za vrijeme centrifugiranja pripremljene su čiste epruvete za sakupljanje od 2 mL i u njih su stavljene kolone za pročišćavanje (Spin Column). Nakon centrifugiranja supernatant je preliven u kolone za pročišćavanje, a talog odbačen. Epruvete s kolonama su tada ponovo centrifugirane 1 min na 14.000 rpm. Tekućina iz epruveta je odlivena, kolone vraćene, pa je u njih dodano 750 µl otopine za ispiranje (Wash Solution). Sve je cetrifugirano 1 min na 14.000 rpm. Opet je izbačena tekućina iz epruveta, kolone vraćene i u njih dodano 250 µl otopine za ispiranje, te je sve ponovno centrifugirano 2 min na 14.000 rpm. Nakon toga su epruvete s tekućinom bačene, a kolone prebačene u čiste epruvete od 1,5 ml. U kolone je dodano 50 µl vode bez nukleaza (Nuclease-Free Water), pa je sve centrifugirano 1 min na 14.000 rpm. Kolone su potom bačene, a otopina pročišćene DNA spremljena u hladnjak na 4 ^{0}C. Nakon pročišćavanja, prisutnost DNA molekula u konačnoj otopini provjerena je elektroforezom.

2.7. Računalna obrada podataka

2.7.1. BioEdit

BioEdit (Hall 1999) je programski paket koji sadrži brojne opcije za manipuliranje i obradu nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova. U ovom diplomskom radu BioEdit je korišten za poravnavanje i usporedbu svih dobivenih sljedova DNA. U to svrhu je korišteno automatsko ClustalW višestruko poravnavanje. Također, program je korišten za izradu knjižnica DQA i DQB alela koje su potom korištene u programu SeqScape.

2.7.2. SeqScape®

SeqScape® (Applied Biosystems) je programski paket pomoću kojega se može raditi detekcija i analiza mutacija nukleinskih kiselina, tipizacija i podtipizacija patogena, identifikacija alela, otkrivanje i potvrđivanje polimorfizama jedne baze (SNP), te potvrda i usporedba sljedova. Kod izrade ovog diplomskog rada SeqScape je korišten kako bi se za svaku jedinku odredilo koje točno DQA i DQB alele sadrži. U tu svrhu korištene su za početak knjižnice poznatih alela i to za DQA lokus 10 alela nađenih u prethodnom istraživanju kod dobrog dupina (Arbanasić i sur., neobjavljeno**)** i tri nova alela koja su bila očita bez kloniranja (dobivena iz sekvenci homozigota i heterozigota samo jedne baze), a za DQB lokus četiri nova alela dobivena bez kloniranja. Nakon usporedbe sljedova dobivenih PCR-om sa postojećim knjižnicama, odabrani su uzorci za kloniranje koji su sadržavali alele koji nisu bili prisutni u knjižnici, a razlike su im bile prevelike da se nukleotidni slijed alela ispiše bez kloniranja. Također su se prilikom odabira uzoraka za kloniranje u obzir uzimale međusobne sličnosti uzoraka koji nisu riješeni, da se izbjegne nepotrebno kloniranje uzoraka sa istim alelima. Odabir uzoraka i kloniranje je rađeno postepeno, po četiri ili šest uzoraka. Nakon dobivanja novih alela kloniranjem, proširene su postojeće knjižnice alela, te je proces ponavljan dok nisu određeni svi aleli u svim uzorcima.

2.7.3. MEGA

Programski paket MEGA (eng. Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura i sur. 2013) sadrži sve potrebne alate za analizu i usporedbu aminokiselinskih i nukleotidnih sljedova u svrhu donošenja zaključaka o molekularnim evolucijskim obrascima određenih gena ili vrsta. U svojoj posljednjoj inačici, MEGA 6.0.5 objedinjuje programe za izradu i poravnavanje sljedova DNA molekula i proteina, filogenetičku obradu molekularnih podataka i za izračun i analizu parametara molekularne evolucije. U ovom istraživanju programski paket MEGA je korišten za:

1. određivanje ukupnog broja varijabilnih mjesta u svim nukleotidnim sljedovima sekvenciranih MHC alela na pojedinom lokusu kod obje istraživane vrste
2. odabir modela nukleotidne i aminokiselinske supstitucije za svaki istraživani lokus kod obje istraživane vrste
3. procjenu nukleotidnih i aminokiselinskih evolucijskih udaljenosti na istraživanim lokusima kod obje istraživane vrste

4. izračun broja nesinonimnih i sinonimnih nukleotidnih supstitucija za svaki istraživani lokus kod obje istraživane vrste

5. provođenje Z-testa selekcije za svaki istraživani lokus kod obje istraživane vrste u svrhu određivanja tipa selekcije na lokusima

3. REZULTATI

3.1. Plavobijeli dupin - aleli

U istraživanom uzorku 24 jedinke plavobijelog dupina pronađeno je ukupno 17 jedinstvenih DQA alela (tablice 3 i 4) i 16 jedinstvenih DQB alela (tablice 5 i 6). Učestalost pojedinih alela je prikazana u tablicama 7 i 8, a njihova distribucija u istraživanim jedinkama u tablici 9. Učestalost alela je za svaki pojedini alel izračunata kao apsolutni broj pojavljivanja tog alela u istraživanom uzorku podjeljen s ukupnim brojem alela u uzorku (dvostruki od broja jedinki).

Tablica 3. Nukleotidni ispis DQA alela plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) iz Sredozemnog mora

Ime alela	Nukleotidni slijed											Položaj
Stco-DQA*01	GAC	CAT	GTT	GGC	TCC	TAT	GGC	ACA	ACT	ATC	TAC	[33]
Stco-DQA*02	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*03	...	...	...	...	...	...	...	...	.--	-..	...	[33]
Stco-DQA*04	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*05	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*06	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*07	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*08	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*09	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*13	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*14	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQA*15	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Tutr-DQA*02	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Tutr-DQA*06	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[33]

Stco-DQA*01	CAG	TCT	TTT	GGG	CCC	TCT	GGC	CAG	TTC	ACC	ACA	[66]
Stco-DQA*02	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[66]
Stco-DQA*03	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	G..	[66]
Stco-DQA*04	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	CA.	[66]
Stco-DQA*05	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	CA.	[66]
Stco-DQA*06	...	...	..C	...	...	...	...	...	.A.	...	CA.	[66]
Stco-DQA*07	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	CAC	[66]
Stco-DQA*08	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	CAC	[66]
Stco-DQA*09	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	CA.	[66]
Stco-DQA*10	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	CA.	[66]
Stco-DQA*11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[66]
Stco-DQA*12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[66]
Stco-DQA*13	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	CAC	[66]

```
Stco-DQA*14    ... ... ... ... ... ... ... ... .A. ... CA.  [ 66]
Stco-DQA*15    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... CA.  [ 66]
Tutr-DQA*02    ... ... ... ... ... ... ... ... .A. ... CA.  [ 66]
Tutr-DQA*06    ... ... ... ... ... ... ... ... .A. ... CA.  [ 66]

Stco-DQA*01    GAA TTT GAT GGA GAT GAG CGG TTT TAT GTG GAC  [ 99]
Stco-DQA*02    ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*03    ... ... ... ... ... ... T.. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*04    ... ... ... ... ... ... .A. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*05    ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*06    ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*07    ... ... ... ... ... ... AA. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*08    ... ... ... ... ... ... AA. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*09    ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*10    ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*11    ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*12    ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*13    ... ... ... ... ... ... .A. ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*14    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [ 99]
Stco-DQA*15    ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ...  [ 99]
Tutr-DQA*02    ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ...  [ 99]
Tutr-DQA*06    ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ...  [ 99]

Stco-DQA*01    CTG GAG AAG AAG GAG ACT GTC TGG CGG CTG CCT  [132]
Stco-DQA*02    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*03    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*04    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*05    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*06    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*07    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*08    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*09    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*10    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*11    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*12    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*13    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*14    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQA*15    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Tutr-DQA*02    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Tutr-DQA*06    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]

Stco-DQA*01    GTG TTT AGC GAA TTC GCA AGT TTT GAC CCA CAG  [165]
Stco-DQA*02    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*03    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*04    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*05    ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*06    ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*07    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*08    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*09    ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*10    ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*11    ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*12    ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ...  [165]
```

```
Stco-DQA*13    ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*14    ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ...  [165]
Stco-DQA*15    ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ...  [165]
Tutr-DQA*02    ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ...  [165]
Tutr-DQA*06    ... ... ... ... ... A.. G.. ... ... ... ...  [165]

Stco-DQA*01    GGT GCC CTG AGA AAC ATA GCT GTG GCG AAA CAT  [198]
Stco-DQA*02    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .GC  [198]
Stco-DQA*03    ... ... ... ... ... ... ... ... .T. ... T..  [198]
Stco-DQA*04    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [198]
Stco-DQA*05    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G.  [198]
Stco-DQA*06    ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ..A  [198]
Stco-DQA*07    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .GC  [198]
Stco-DQA*08    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .GC  [198]
Stco-DQA*09    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .GC  [198]
Stco-DQA*10    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .GC  [198]
Stco-DQA*11    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .GC  [198]
Stco-DQA*12    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .GC  [198]
Stco-DQA*13    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [198]
Stco-DQA*14    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... T..  [198]
Stco-DQA*15    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .GC  [198]
Tutr-DQA*02    ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ..A  [198]
Tutr-DQA*06    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [198]

Stco-DQA*01    AAC TTG GAT ATC CTG ATT AAA CGC TCC AAC TTT  [231]
Stco-DQA*02    .C. ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*03    ... ... ... ... ... ... ... T.. .G. ... ...  [231]
Stco-DQA*04    ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*05    T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*06    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*07    .C. ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*08    .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*09    .C. ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*10    .C. ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*11    .C. ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*12    .C. ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*13    ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*14    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQA*15    .C. ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ...  [231]
Tutr-DQA*02    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [231]
Tutr-DQA*06    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [231]

Stco-DQA*01    ACC CCT GTT ACC AAT  [246]
Stco-DQA*02    ... ... ... ... ...  [246]
Stco-DQA*03    ... ... ... ... ...  [246]
Stco-DQA*04    ... ... ... ... ...  [246]
Stco-DQA*05    ... ... ... ... ...  [246]
Stco-DQA*06    ... ... ... ... ...  [246]
Stco-DQA*07    ... ... ... ... ...  [246]
Stco-DQA*08    ... ... ... ... ...  [246]
Stco-DQA*09    ... ... ... ... ...  [246]
Stco-DQA*10    ... ... ... ... ...  [246]
Stco-DQA*11    ... ... ... ... ...  [246]
```

Stco-DQA*12	... ...	[246]
Stco-DQA*13	... ...	[246]
Stco-DQA*14	... ...	[246]
Stco-DQA*15	... ...	[246]
Tutr-DQA*02	... ...	[246]
Tutr-DQA*06	... ...	[246]

Tablica 4. Aminokiselinski ispis DQA alela plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) iz Sredozemnog mora

Ime alela	Aminokiselinski slijed					Položaj
Stco-DQA*01	DHVGSYGTTI	YQSFGPSGQF	TTEFDGDERF	YVDLEKKETV	W	[41]
Stco-DQA*02	....	....	........L.	....	.	[41]
Stco-DQA*03	........-.	....	.A......W.	....	.	[41]
Stco-DQA*04	....	.........Y	.Q......Q.	....	.	[41]
Stco-DQA*05	....	.........Y	.Q......L.	....	.	[41]
Stco-DQA*06	....	.........Y	.Q......L.	....	.	[41]
Stco-DQA*07	....	.........Y	.H......K.	....	.	[41]
Stco-DQA*08	....	.........Y	.H......K.	....	.	[41]
Stco-DQA*09	....	....	.Q......L.	....	.	[41]
Stco-DQA*10	....	.........Y	.Q......L.	....	.	[41]
Stco-DQA*11	....	....	........L.	....	.	[41]
Stco-DQA*12	....	....	........L.	....	.	[41]
Stco-DQA*13	....	.........Y	.H......Q.	....	.	[41]
Stco-DQA*14	....	.........Y	.Q........	....	.	[41]
Stco-DQA*15	....	....	.Q......L.	....	.	[41]
Tutr-DQA*02	....	.........Y	.Q......L.	....	.	[41]
Tutr-DQA*06	....	.........Y	.Q......L.	....	.	[41]

Stco-DQA*01	RLPVFSEFAS	FDPQGALRNI	AVAKHNLDIL	IKRSNFTPVT	N	[82]
Stco-DQA*02	....	....	....RT...M	....	.	[82]
Stco-DQA*03	....	....	..V.Y.....	..CC......	.	[82]
Stco-DQA*04	....	....	.........M	....	.	[82]
Stco-DQA*05	.........G	....	....RY....	....	.	[82]
Stco-DQA*06	.........G	.........T	....Q.....	....	.	[82]
Stco-DQA*07	....	....	....RT...M	....	.	[82]
Stco-DQA*08	....	....	....RT....	....	.	[82]
Stco-DQA*09	........T.	....	....RT...M	....	.	[82]
Stco-DQA*10	.........G	....	....RT...M	....	.	[82]
Stco-DQA*11	........T.	....	....RT...M	....	.	[82]
Stco-DQA*12	.........G	....	....RT...M	....	.	[82]
Stco-DQA*13	.........G	....	.........M	....	.	[82]
Stco-DQA*14	........T.	....	....Y.....	....	.	[82]
Stco-DQA*15	.........G	....	....RT...M	....	.	[82]
Tutr-DQA*02	.........G	.........T	....Q.....	....	.	[82]
Tutr-DQA*06	........TG	....	....	....	.	[82]

Tablica 5. Nukleotidni ispis DQB alela plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) iz Sredozemnog mora

Ime alela	Nukleotidni slijed											Položaj
Stco-DQB*10	GAT	TTC	TTG	ATA	CAT	CAT	ATG	GGC	ATG	TGT	TAC	[33]
Stco-DQB*11	...	...	...	T.C	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQB*12	...	...	...	T.C	.G.	...	...	TT.	...	...	...	[33]
Stco-DQB*13	...	...	...	T.C	.G.	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQB*14	...	...	...	T.C	.G.	...	...	TT.	...	...	...	[33]
Stco-DQB*15	...	...	...	T.C	.G.	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQB*16	...	...	...	..C	.G.	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQB*17	...	...	...	TGC	.G.	...	...	TT.	...	...	...	[33]
Stco-DQB*18	...	...	...	..C	.G.	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQB*19	...	...	...	..C	.G.	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQB*20	...	...	...	T.C	.G.	...	...	TT.	...	...	...	[33]
Stco-DQB*21	...	...	...	T.C	.G.	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQB*22	...	...	...	..C	.G.	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQB*23	...	...	...	T.C	...	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQB*24	...	...	...	TAC	.G.	...	...	...	...	...	...	[33]
Stco-DQB*25	...	...	...	T.C	.G.	...	...	...	...	...	...	[33]

Stco-DQB*10	TTC	ACC	AAC	GGC	ACG	GAG	CGG	GTG	CGG	CAC	GTG	[66]
Stco-DQB*11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[66]
Stco-DQB*12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	GC.	A..	[66]
Stco-DQB*13	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[66]
Stco-DQB*14	...	...	...	...	...	...	...	...	...	TT.	...	[66]
Stco-DQB*15	...	...	...	...	...	...	...	...	...	GG.	A..	[66]
Stco-DQB*16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	GG.	A..	[66]
Stco-DQB*17	...	...	...	...	...	...	...	...	...	TT.	...	[66]
Stco-DQB*18	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[66]
Stco-DQB*19	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[66]
Stco-DQB*20	...	...	...	...	...	...	...	...	...	TT.	...	[66]
Stco-DQB*21	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[66]
Stco-DQB*22	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[66]
Stco-DQB*23	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[66]
Stco-DQB*24	...	...	...	...	...	...	...	...	...	TT.	...	[66]
Stco-DQB*25	...	...	...	...	...	...	...	...	...	TT.	...	[66]

Stco-DQB*10	AGC	AGA	TAC	ATC	TAT	AAC	CGG	GAG	GAG	TAC	GTG	[99]
Stco-DQB*11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[99]
Stco-DQB*12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.T.	...	[99]
Stco-DQB*13	...	...	.TG	...	...	...	...	...	...	.T.	...	[99]
Stco-DQB*14	GA.	...	...	...	...	...	...	...	...	.T.	...	[99]
Stco-DQB*15	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	[99]
Stco-DQB*16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	[99]
Stco-DQB*17	GA.	...	.C.	...	...	...	...	...	...	.TG	...	[99]
Stco-DQB*18	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[99]
Stco-DQB*19	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[99]
Stco-DQB*20	GA.	...	...	...	...	...	...	...	...	.T.	...	[99]
Stco-DQB*21	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.T.	...	[99]
Stco-DQB*22	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[99]
Stco-DQB*23	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[99]
Stco-DQB*24	.A.	...	A..	...	...	..T	...	...	...	...	...	[99]
Stco-DQB*25	GA.	...	...	...	...	..T	...	...	...	.T.	...	[99]

```
Stco-DQB*10    CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGC GAG TTC CGG GCG  [132]
Stco-DQB*11    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*12    ... ... ... ... ... ... ... ... .A. ... ...  [132]
Stco-DQB*13    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*14    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*15    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*16    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*17    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*18    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*19    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*20    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*21    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*22    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*23    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*24    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [132]
Stco-DQB*25    ... ... ... ... ... ... ... ... CA. ... ...  [132]

Stco-DQB*10    GTG ACC GAG CTG GGC CGG CCG GAC GCC AAG TAC  [165]
Stco-DQB*11    ... ... ... ... ... ... ... .C. ... ... ...  [165]
Stco-DQB*12    ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...  [165]
Stco-DQB*13    ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...  [165]
Stco-DQB*14    ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. C..  [165]
Stco-DQB*15    ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...  [165]
Stco-DQB*16    ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...  [165]
Stco-DQB*17    ... ... ... ... ... ... .G. AT. ... G.. G..  [165]
Stco-DQB*18    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [165]
Stco-DQB*19    ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...  [165]
Stco-DQB*20    ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...  [165]
Stco-DQB*21    ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...  [165]
Stco-DQB*22    A.. ... ... ... ... ... .G. AC. ... G.. ...  [165]
Stco-DQB*23    A.. ... ... ... ... ... .G. AC. ... G.. ...  [165]
Stco-DQB*24    ... ... ... ... ... ... .G. AC. ... G.. ...  [165]
Stco-DQB*25    ... ... ... ... ... ... .G. AT. ... G.. G..  [165]

Stco-DQB*10    TGG AAC AGC CAG GAG GAC ATC CTG GAG CGG AAA  [198]
Stco-DQB*11    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [198]
Stco-DQB*12    ... ... ... ... ... ... ... ... ... GA. G..  [198]
Stco-DQB*13    .TC ... ... ... A.. ... ... ... ... ... G..  [198]
Stco-DQB*14    ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... G..  [198]
Stco-DQB*15    .TC ... ... ... A.. ... ... ... ... .A. G..  [198]
Stco-DQB*16    .TC ... ... ... A.. ... ... ... ... .A. G..  [198]
Stco-DQB*17    ... ... ... ... A.. ... ... G.. ... ... ...  [198]
Stco-DQB*18    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [198]
Stco-DQB*19    .TC ... ... ... A.. ... ... ... ... GA. G..  [198]
Stco-DQB*20    ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... G..  [198]
Stco-DQB*21    ... ... ... ... A.. ... T.. ... ... .A. G..  [198]
Stco-DQB*22    .TC ... ... ... A.. ... ... ... ... .A. G..  [198]
Stco-DQB*23    .TC ... ... ... A.. ... ... ... ... .A. G..  [198]
Stco-DQB*24    ... ... ... ... A.. ... T.. ... ... ... ...  [198]
Stco-DQB*25    ... ... ... ... A.. ... ... G.. ... ... ...  [198]
```

```
Stco-DQB*10    CGG GCC GAC GTG GAC AGG GTG TGC AGA CAC AAC  [231]
Stco-DQB*11    ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*12    ... ... .CG C.. ... .C. ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*13    ... ... ... ... ... .C. ... ... ... T.. ...  [231]
Stco-DQB*14    T.. ... ... .G. ... .C. ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*15    ... ... .CG ... ... .C. ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*16    ... ... .CG ... ... .C. ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*17    ... ... ..G C.. ... .C. ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*18    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*19    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*20    T.. ... ... .G. ... .C. ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*21    ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...  [231]
Stco-DQB*22    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*23    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*24    ... ... ..G C.. ... .C. ... ... ... ... ...  [231]
Stco-DQB*25    ... ... ..G C.. ... .C. ... ... ... ... ...  [231]

Stco-DQB*10    TAC AGG ATT CAT AAG ACC TTC ACG GTG CAG CGG  [264]
Stco-DQB*11    ... ... .C. G.. G.. ... ..A G.. ... ... ...  [264]
Stco-DQB*12    ... ... ... G.. G.. ... ..A G.. ... ... ...  [264]
Stco-DQB*13    ... ... ... G.. G.. ... ..A G.. ... ... ...  [264]
Stco-DQB*14    ... ... .C. G.. G.. ... ... ... ... ... ...  [264]
Stco-DQB*15    ... ... ... G.. G.. ... ..A G.. ... ... ...  [264]
Stco-DQB*16    ... ... ... G.. G.. ... ..A G.. ... ... ...  [264]
Stco-DQB*17    ... ... G.. GG. G.. ... ... ... ... ... ...  [264]
Stco-DQB*18    ... ... ... ... G.. ... ... ... ... ... ...  [264]
Stco-DQB*19    ... ... ... G.. G.. ... ..A G.. ... ... ...  [264]
Stco-DQB*20    ... ... .C. G.. G.. ... ... ... ... ... ...  [264]
Stco-DQB*21    ... ... .C. G.. G.. ... ..A G.. ... ... ...  [264]
Stco-DQB*22    ... ... G.. T.. ... ... ... ... ... ... ...  [264]
Stco-DQB*23    ... ... G.. T.. ... ... ... ... ... ... ...  [264]
Stco-DQB*24    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [264]
Stco-DQB*25    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [264]

Stco-DQB*10    CGA  [267]
Stco-DQB*11    ...  [267]
Stco-DQB*12    ...  [267]
Stco-DQB*13    ...  [267]
Stco-DQB*14    ...  [267]
Stco-DQB*15    ...  [267]
Stco-DQB*16    ...  [267]
Stco-DQB*17    ...  [267]
Stco-DQB*18    ...  [267]
Stco-DQB*19    ...  [267]
Stco-DQB*20    ...  [267]
Stco-DQB*21    ...  [267]
Stco-DQB*22    ...  [267]
Stco-DQB*23    ...  [267]
Stco-DQB*24    ...  [267]
Stco-DQB*25    ...  [267]
```

Tablica 6. Aminokiselinski ispis DQB alela plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) iz Sredozemnog mora

Ime alela	Aminokiselinski slijed			Položaj
Stco-DQB*10	DFLIHHMGMC	YFTNGTERVR	HVSRYIYNRE	[30]
Stco-DQB*11	...F.....	.....	.....	[30]
Stco-DQB*12	...FR..F..	.....	AM.....	[30]
Stco-DQB*13	...FR.....	.....	....L.....	[30]
Stco-DQB*14	...FR..F..	.....	F.D.....	[30]
Stco-DQB*15	...FR.....	.....	GM.....	[30]
Stco-DQB*16	....R.....	.....	GM.....	[30]
Stco-DQB*17	...CR..F..	.....	F.D.S.....	[30]
Stco-DQB*18	....R.....	.....	.....	[30]
Stco-DQB*19	....R.....	.....	.....	[30]
Stco-DQB*20	...FR..F..	.....	F.D.....	[30]
Stco-DQB*21	...FR.....	.....	.....	[30]
Stco-DQB*22	....R.....	.....	.....	[30]
Stco-DQB*23	...F.....	.....	.....	[30]
Stco-DQB*24	...YR.....	.....	F.N.N.....	[30]
Stco-DQB*25	...FR.....	.....	F.D.....	[30]
Stco-DQB*10	EYVRFDSDVG	EFRAVTELGR	PDAKYWNSQE	[60]
Stco-DQB*11	.....	.....	.A.....	[60]
Stco-DQB*12	.F.....	.Y.....	...E.....	[60]
Stco-DQB*13	.F.....	.....	...E.F...K	[60]
Stco-DQB*14	.F.....	.....	...EH....K	[60]
Stco-DQB*15	..M.....	.....	...E.F...K	[60]
Stco-DQB*16	..M.....	.....	...E.F...K	[60]
Stco-DQB*17	.L.....	.....	RI.ED....K	[60]
Stco-DQB*18	.....	.....	.....	[60]
Stco-DQB*19	.....	.....	...E.F...K	[60]
Stco-DQB*20	.F.....	.....	...E.....K	[60]
Stco-DQB*21	.F.....	.....	...E.....K	[60]
Stco-DQB*22	.....	....M.....	RT.E.F...K	[60]
Stco-DQB*23	.....	....M.....	RT.E.F...K	[60]
Stco-DQB*24	.....	.....	RT.E.....K	[60]
Stco-DQB*25	.F.....	.H.....	RI.ED....K	[60]
Stco-DQB*10	DILERKRADV	DRVCRHNYRI	HKTFTVQRR	[89]
Stco-DQB*11	.....	.T.....T	DE.LA....	[89]
Stco-DQB*12	....EE..AL	.T.....	DE.LA....	[89]
Stco-DQB*13	.....E....	.T...Y....	DE.LA....	[89]
Stco-DQB*14	.....EW..G	.T.....T	DE.....	[89]
Stco-DQB*15	....QE..A.	.T.....	DE.LA....	[89]
Stco-DQB*16	....QE..A.	.T.....	DE.LA....	[89]
Stco-DQB*17	..V.....EL	.T.....V	GE.....	[89]
Stco-DQB*18	.....	.....	.E.....	[89]
Stco-DQB*19	....EE....	.....	DE.LA....	[89]
Stco-DQB*20	.....EW..G	.T.....T	DE.....	[89]
Stco-DQB*21	.F..QE....	.....D...T	DE.LA....	[89]
Stco-DQB*22	....QE....	V	Y.....	[89]
Stco-DQB*23	....QE....	V	Y.....	[89]
Stco-DQB*24	.F.....EL	.T.....	.....	[89]
Stco-DQB*25	..V.....EL	.T.....	.....	[89]

Tablica 7. Učestalost DQA alela plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) iz Sredozemnog mora

Ime alela	Učestalost	Apsolutan broj	Broj homozigotnih jedinki
Stco-DQA*01	0,0833	4	0
Stco-DQA*02	0,0208	1	0
Stco-DQA*03	0,1250	6	1
Stco-DQA*04	0,0208	1	0
Stco-DQA*05	0,0208	1	0
Stco-DQA*06	0,0625	3	0
Stco-DQA*07	0,0625	3	0
Stco-DQA*08	0,0625	3	1
Stco-DQA*09	0,0833	4	0
Stco-DQA*10	0,1042	5	0
Stco-DQA*11	0,1042	5	0
Stco-DQA*12	0,0417	2	0
Stco-DQA*13	0,0208	1	0
Stco-DQA*14	0,0417	2	0
Stco-DQA*15	0,0208	1	0
Tutr-DQA*02	0,0833	4	0
Tutr-DQA*06	0,0417	2	1

Tablica 8. Učestalost DQB alela plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) iz Sredozemnog mora

Ime alela	Učestalost	Apsolutan broj	Broj homozigotnih jedinki
Stco-DQB*10	0,0417	2	0
Stco-DQB*11	0,0833	4	0
Stco-DQB*12	0,0625	3	0
Stco-DQB*13	0,0208	1	0
Stco-DQB*14	0,0208	1	0
Stco-DQB*15	0,0208	1	0
Stco-DQB*16	0,1250	6	2
Stco-DQB*17	0,1250	6	1
Stco-DQB*18	0,0208	1	0
Stco-DQB*19	0,2083	10	1
Stco-DQB*20	0,0417	2	0
Stco-DQB*21	0,0208	1	0
Stco-DQB*22	0,0625	3	0
Stco-DQB*23	0,1042	5	0
Stco-DQB*24	0,0208	1	0
Stco-DQB*25	0,0208	1	0

Tablica 9. Distribucija alela plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) iz Sredozemnog mora

Oznaka jedinke	Aleli DQA		Aleli DQB	
27	Stco-DQA*01	Tutr-DQA*02	Stco-DQB*10	Stco-DQB*11
73	Stco-DQA*06	Stco-DQA*10	Stco-DQB*12	Stco-DQB*23
78	Stco-DQA*02	Stco-DQA*03	Stco-DQB*17	Stco-DQB*22
79	Stco-DQA*03	Stco-DQA*03	Stco-DQB*17	Stco-DQB*17
81	Stco-DQA*11	Stco-DQA*12	Stco-DQB*10	Stco-DQB*19
115	Stco-DQA*01	Stco-DQA*04	Stco-DQB*11	Stco-DQB*19
146	Stco-DQA*05	Stco-DQA*06	Stco-DQB*12	Stco-DQB*13
213	Stco-DQA*07	Stco-DQA*08	Stco-DQB*16	Stco-DQB*19
244	Stco-DQA*09	Tutr-DQA*02	Stco-DQB*14	Stco-DQB*19
246	Stco-DQA*01	Stco-DQA*03	Stco-DQB*11	Stco-DQB*17
249	Stco-DQA*07	Stco-DQA*09	Stco-DQB*15	Stco-DQB*16
257	Stco-DQA*07	Stco-DQA*10	Stco-DQB*16	Stco-DQB*16
258	Stco-DQA*03	Stco-DQA*10	Stco-DQB*17	Stco-DQB*23
259	Stco-DQA*03	Stco-DQA*06	Stco-DQB*12	Stco-DQB*17
261	Stco-DQA*11	Stco-DQA*12	Stco-DQB*18	Stco-DQB*19
263	Stco-DQA*13	Stco-DQA*14	Stco-DQB*16	Stco-DQB*16
265	Stco-DQA*11	Stco-DQA*15	Stco-DQB*19	Stco-DQB*19
T153	Stco-DQA*09	Tutr-DQA*02	Stco-DQB*19	Stco-DQB*20
T157	Stco-DQA*11	Tutr-DQA*02	Stco-DQB*20	Stco-DQB*22
T167	Stco-DQA*11	Stco-DQA*14	Stco-DQB*21	Stco-DQB*22
T170	Stco-DQA*08	Stco-DQA*08	Stco-DQB*19	Stco-DQB*23
T218	Stco-DQA*01	Stco-DQA*10	Stco-DQB*11	Stco-DQB*23
T221	Stco-DQA*09	Stco-DQA*10	Stco-DQB*19	Stco-DQB*23
T222	Tutr-DQA*06	Tutr-DQA*06	Stco-DQB*24	Stco-DQB*25

3.2. Glavati dupin - aleli

U istraživanom uzorku osam jedinki glavatog dupina pronađena su ukupno četiri jedinstvena DQA alela (tablice 10 i 11) i pet jedinstvenih DQB alela (tablice 12 i 13). Učestalost pojedinih alela je prikazana u tablicama 14 i 15, a njihova distribucija u istraživanim jedinkama u tablici 16.

Tablica 10. Nukleotidni ispis DQA alela glavatog dupina (*Grampus griseus*) iz Sredozemnog mora

Ime alela	Nukleotidni slijed	Položaj
Grgr-DQA*01	GAC CAT GTT GGC TCC TAT GGC ACA ACT ATC TAC	[33]
Grgr-DQA*02	... ...	[33]
Grgr-DQA*03	... ...	[33]
Tutr-DQA*08	... ...	[33]
Grgr-DQA*01	CAG TCT TTT GGG CCC TCT GGC CAG TAC ACC CAA	[66]
Grgr-DQA*02	... ...	[66]
Grgr-DQA*03	... ...	[66]
Tutr-DQA*08	... ... .T. ... G..	[66]
Grgr-DQA*01	GAA TTT GAT GGA GAT GAG CAG TTT TAT GTG GAC	[99]
Grgr-DQA*02	... ... .T.	[99]
Grgr-DQA*03	... ... A..	[99]
Tutr-DQA*08	... ... .T.	[99]
Grgr-DQA*01	CTG GAG AAG AAG GAG ACT GTC TGG CGG CTG CCT	[132]
Grgr-DQA*02	... ...	[132]
Grgr-DQA*03	... ...	[132]
Tutr-DQA*08	... ...	[132]
Grgr-DQA*01	GTG TTT AGC GAA TTC GCA AGT TTT GAC CCA CAG	[165]
Grgr-DQA*02	... ... A..	[165]
Grgr-DQA*03	... ...	[165]
Tutr-DQA*08	... ... A..	[165]
Grgr-DQA*01	GGT GCC CTG AGA AAC ATA GCT GTG GCG AAA CAT	[198]
Grgr-DQA*02	... ...	[198]
Grgr-DQA*03	C.. ... ... .T. ..G ...	[198]
Tutr-DQA*08	... ... .T.	[198]
Grgr-DQA*01	AAC TTG GAT ATC CTG ATT AAA CGC TCC AAC TTT	[231]
Grgr-DQA*02	... ...	[231]
Grgr-DQA*03	... ... A..	[231]
Tutr-DQA*08	... ...	[231]
Grgr-DQA*01	ACC CCT GTT ACC AAT [246]	
Grgr-DQA*02	... ... [246]	
Grgr-DQA*03	... ... [246]	
Tutr-DQA*08	... ... [246]	

Tablica 11. Aminokiselinski ispis DQA alela glavatog dupina (*Grampus griseus*) iz Sredozemnog mora

Ime alela	Aminokiselinski slijed	Položaj
Grgr-DQA*01	DHVGSYGTTI YQSFGPSGQY TQEFDGDEQF YVDLEKKETV W	[41]
Grgr-DQA*02	....L.	[41]
Grgr-DQA*03	....K.	[41]
Tutr-DQA*08	....F .E......L.	[41]
Grgr-DQA*01	RLPVFSEFAS FDPQGALRNI AVAKHNLDIL IKRSNFTPVT N	[82]
Grgr-DQA*02	........T.	[82]
Grgr-DQA*03	....R..... ..V......M	[82]
Tutr-DQA*08	........T. ....V.......	[82]

Tablica 12. Nukleotidni ispis DQB alela glavatog dupina (*Grampus griseus*) iz Sredozemnog mora

Ime alela	Nukleotidni slijed	Položaj
Grgr-DQB*02	GAT TTC TTG TTC CGT CAT ATG GGC ATG TGT TAC	[33]
Grgr-DQB*03	... ... .A. ... ... TT.	[33]
Grgr-DQB*04	... ... .A. ... ... TT.	[33]
Grgr-DQB*05	... ... .A.	[33]
Grgr-DQB*06	... ...	[33]
Grgr-DQB*02	TTC ACC AAC GGC ACG GAG CGG GTG CGG TCC GTG	[66]
Grgr-DQB*03	... ... .T. ...	[66]
Grgr-DQB*04	... ... .T. ...	[66]
Grgr-DQB*05	... ... CT. ...	[66]
Grgr-DQB*06	... ...	[66]
Grgr-DQB*02	GAC AGA TAC ATC TAT AAT CGG GAG GAG TTC GTG	[99]
Grgr-DQB*03	... ...C	[99]
Grgr-DQB*04	... ...C	[99]
Grgr-DQB*05	AC. ... CG. ... .C ... ... T..	[99]
Grgr-DQB*06	... ...C	[99]
Grgr-DQB*02	CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGC GAG TTC CGG GCG	[132]
Grgr-DQB*03	... ... .A.	[132]
Grgr-DQB*04	... ... .A.	[132]
Grgr-DQB*05	... ...	[132]
Grgr-DQB*06	... ...	[132]
Grgr-DQB*02	GTG ACC GAG CTG GGC CGG CGG ACC GCC GAG TAC	[165]
Grgr-DQB*03	... ... .C. GA.	[165]
Grgr-DQB*04	... ... .C. GA.	[165]
Grgr-DQB*05	... ... G.. .T. ... ... A..	[165]
Grgr-DQB*06	... ... .T. ... ... A..	[165]
Grgr-DQB*02	TGG AAC AGC CAG AAG GAC ATC CTG GAG GAG GAA	[198]
Grgr-DQB*03	... ... CG. A..	[198]
Grgr-DQB*04	... ... CG. A..	[198]
Grgr-DQB*05	... ... C.. ...	[198]
Grgr-DQB*06	... ... C.. ...	[198]

```
Grgr-DQB*02    CGG GCC GCG CTG GAC ACG GTG TGC AGA CAC AAC  [231]
Grgr-DQB*03    ... ... .A. ... ... ... ... ... ... GG. ...  [231]
Grgr-DQB*04    ... ... .A. ... ... ... ... ... ... ... ...  [231]
Grgr-DQB*05    ... ... TAC G.. ... ... ... ... ... ... ...  [231]
Grgr-DQB*06    ... ... TAC G.. ... ... ... ... ... ... ...  [231]

Grgr-DQB*02    TAC AGG ATT CAT AAG ACC TTC ACG GTG CAG CGG  [264]
Grgr-DQB*03    ... ... ... G.. G.. ... ..A G.. ... ... ...  [264]
Grgr-DQB*04    ... ... ... .T. G.. ... ..A G.. ... ... ...  [264]
Grgr-DQB*05    ... ... ... G.. G.. ... ... ... ... ... ...  [264]
Grgr-DQB*06    ... ... ... G.. G.. ... ..A G.. ... ... ...  [264]

Grgr-DQB*02    CGA  [267]
Grgr-DQB*03    ...  [267]
Grgr-DQB*04    ...  [267]
Grgr-DQB*05    ...  [267]
Grgr-DQB*06    ...  [267]
```

Tablica 13. Aminokiselinski ispis DQB alela glavatog dupina (*Grampus griseus*) iz Sredozemnog mora

```
Ime alela          Aminokiselinski slijed                  Položaj
Grgr-DQB*02    DFLFRHMGMC YFTNGTERVR SVDRYIYNRE  [30]
Grgr-DQB*03    ...Y...F.. .......... F.........  [30]
Grgr-DQB*04    ...Y...F.. .......... F.........  [30]
Grgr-DQB*05    ...Y...... .......... L.T.R.....  [30]
Grgr-DQB*06    .......... .......... ..........  [30]

Grgr-DQB*02    EFVRFDSDVG EFRAVTELGR RTAEYWNSQK  [60]
Grgr-DQB*03    .......... .Y........ PD........  [60]
Grgr-DQB*04    .......... .Y........ PD........  [60]
Grgr-DQB*05    ..L....... .......... GI..N.....  [60]
Grgr-DQB*06    .......... .......... .I..N.....  [60]

Grgr-DQB*02    DILEEERAAL DTVCRHNYRI HKTFTVQRR   [89]
Grgr-DQB*03    ....RK..E. .....G.... DE.LA....   [89]
Grgr-DQB*04    ....RK..E. .......... LE.LA....   [89]
Grgr-DQB*05    ....Q...YV .......... DE.......   [89]
Grgr-DQB*06    ....Q...YV .......... DE.LA....   [89]
```

Tablica 14. Učestalost DQA alela glavatog dupina (*Grampus griseus*) iz Sredozemnog mora

Ime alela	Učestalost	Apsolutan broj	Broj homozigotnih jedinki
Grgr-DQA*01	0,3750	6	0
Grgr-DQA*02	0,2500	4	0
Grgr-DQA*03	0,0625	1	0
Tutr-DQA*08	0,3125	5	2

Tablica 15. Učestalost DQB alela glavatog dupina (*Grampus griseus*) iz Sredozemnog mora

Ime alela	Učestalost	Apsolutan broj	Broj homozigotnih jedinki
Grgr-DQB*02	0,0625	1	0
Grgr-DQB*03	0,1250	2	0
Grgr-DQB*04	0,1875	3	1
Grgr-DQB*05	0,0625	1	0
Grgr-DQB*06	0,5625	9	3

Tablica 16. Distribucija alela glavatog dupina (*Grampus griseus*) iz Sredozemnog mora

Oznaka jedinke	Aleli DQA		Aleli DQB	
68	Grgr-DQA*01	Grgr-DQA*02	Grgr-DQB*02	Grgr-DQB*06
69	Tutr-DQA*08	Tutr-DQA*08	Grgr-DQB*04	Grgr-DQB*04
70	Tutr-DQA*08	Tutr-DQA*08	Grgr-DQB*03	Grgr-DQB*04
84	Grgr-DQA*01	Grgr-DQA*03	Grgr-DQB*05	Grgr-DQB*06
T116	Grgr-DQA*01	Grgr-DQA*02	Grgr-DQB*06	Grgr-DQB*06
T215	Grgr-DQA*01	Tutr-DQA*08	Grgr-DQB*03	Grgr-DQB*06
T225	Grgr-DQA*01	Grgr-DQA*02	Grgr-DQB*06	Grgr-DQB*06
T226	Grgr-DQA*01	Grgr-DQA*02	Grgr-DQB*06	Grgr-DQB*06

3.3. Evolucijske udaljenosti

Za procjenu evolucijskih udaljenosti u programskom paketu MEGA (Tamura i sur. 2013) uspoređivani su međusobno svi nukleotidni sljedovi pojedinog lokusa i svi aminokiselinski sljedovi pojedinog lokusa kod svake istraživane vrste. Modeli nukleotidne, odnosno aminokiselinske supstitucije su odabrani na temelju preporuke istog programskog paketa nakon "Model Selection" analize "Maximum Likelihood" statističkom metodom. Sve udaljenosti izražene su kao prosječna vrijednost srednjih udaljenosti nakon 500 ponavljanja. Procjenjene evolucijske udaljenosti za DQA i DQB lokuse za plavobijelog dupina prikazane su u tablici 17, a za glavatog dupina u tablici 18.

Tablica 17. Broj varijabilnih nukleotidnih mjesta, prosječne nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti i broj jedinstvenih aminokiselinskih sljedova DQA i DQB alela plavobijelog dupina (*Stenella ceruleoalba*) iz Sredozemnog mora

Lokus	Dužina sekvence	Broj varijabilnih mjesta	Nukleotidna udaljenost		Aminokiselinska udaljenost		Broj jedinstvenih amino-kiselinskih sekvenci
			Model nukleotidne supstitucije	d	Model amino-kiselinske supstitucije	d	
DQA	246	19	JC+G	0,048	JTT+G	0,104	16
DQB	267	48	JC+G	0,238	JTT+G	0,235	16

Kratice: d, prosječna vrijednost srednjih udaljenosti; JC, Jukes-Cantor model supstitucije; G, parameter gama distribucije; JTT, Jones-Taylor-Thornton model supstitucije;

Tablica 18. Broj varijabilnih nukleotidnih mjesta, prosječne nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti i broj jedinstvenih aminokiselinskih sljedova DQA i DQB alela glavatog dupina (*Grampus griseus*) iz Sredozemnog mora

Lokus	Dužina sekvence	Broj varijabilnih mjesta	Nukleotidna udaljenost		Aminokiselinska udaljenost		Broj jedinstvenih amino-kiselinskih sekvenci
			Model nukleotidne supstitucije	d	Model amino-kiselinske supstitucije	d	
DQA	246	9	JC	0,021	JTT	0,052	4
DQB	267	31	JC+G	0,086	JTT	0,150	5

Kratice: d, prosječna vrijednost srednjih udaljenosti; JC, Jukes-Cantor model supstitucije; JTT, Jones-Taylor-Thornton model supstitucije; G, parameter gama distribucije

3. 4. Selekcija

Omjer stopa nesinonimnih (dN) i sinonimnih (dS) mutacija je izračunat u svrhu utvrđivanja selekcije na istraživanim lokusima. Naime, veći broj nesinonimnih mutacija na nekom lokusu u odnosu na sinonimne, snažan je pokazatelj djelovanja pozitivne selekcije na tom lokusu na molekularnoj razini (Yang 1998). Prosječne stope nesinonimnih i sinonimnih mutacija izračunate su u programskom paketu MEGA (Tamura i sur. 2013) radeći 500

ponavljanja Nei-Gojobori metode (Nei i Gojobori 1986), uz Jukes-Cantor korekciju koja dopušta mogućnost višestrukih supstitucija na istom položaju u slijedu. P vrijednosti su izračunate također u programskom paketu MEGA koristeći 500 ponavljanja Z-testa selekcije uz nultu pretpostavku postojanja neutralne evolucije na lokusu (dN = dS). U slučaju $p<0.05$, nulta hipoteza se odbacuje u korist alternativne hipoteze postojanja pozitivne selekcije. U plavobijelog dupina su oba istražena lokusa pod pozitivnom selekcijom, jer dN/dS omjer iznosi 2,74 za DQA i 12,38 za DQB lokus uz $p<0,05$ (tablica 19). Kod glavatog dupina dN/dS omjer iznosi 2,73 za DQA i 9,17 za DQB lokus s time da je p vrijednost značajna ($p<0,05$) samo za DQB lokus (tablica 20).

Tablica 19. Prosječna stopa nesinonimnih supstitucija (dN) i sinonimnih supstitucija (dS) i tip selekcije kod istraživanog uzorka plavobijelog dupina

Lokus	Broj jedinstvenih alela	dN	dS	Tip selekcije	P
DQA	17	0,0343	0,0125	Pozitivna dN/dS = 2,7440	0,0206
DQB	16	0,0879	0,0071	Pozitivna dN/dS = 12,3803	0,0000

P - p vrijednost hipoteze neutralne evolucije lokusa

Tablica 20. Prosječna stopa nesinonimnih supstitucija (dN) i sinonimnih supstitucija (dS) i tip selekcije kod istraživanog uzorka glavatog dupina

Lokus	Broj jedinstvenih alela	dN	dS	Tip selekcije	P
DQA	4	0,0243	0,0089	Pozitivna dN/dS = 2,7303	0,1285
DQB	5	0,0807	0,0088	Pozitivna dN/dS = 9,1705	0,0002

P - p vrijednost hipoteze neutralne evolucije lokusa

4. RASPRAVA

Ovo je prvo istraživanje raznolikosti gena skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u plavobijelog i glavatog dupina u Sredozemnom moru. MHC geni su najpolimorfniji kodirajući dijelovi DNA, te upravo zbog izrazite raznolikosti, nastale i održavane djelovanjem selekcije, služe kao dobar molekularni biljeg za proučavanje adaptivne evolucije. Budući da je raznolikost MHC gena direktno povezana sa sposobnošću prepoznavanja i obrane od različitih patogena, vrlo je bitno raditi istraživanja raznolikosti MHC gena u nekoj populaciji u svrhu procjene mogućnosti preživljavanja te populacije ili vrste. Dosadašnja istraživanja plavobijelog dupina su utvrdila bitne razlike između populacija u Sredozemlju od onih u Atlantskom oceanu i to kako u morfologiji (Calzada i Aguilar 1995, Archer 1997), tako i u mikrosatelitnoj DNA (Gaspari i sur. 2007). Što se tiče gena MHC sustava dosada je provedeno istraživanje ovih dvaju vrsti na jedinkama pronađenim u Južnom Kineskom moru i to ukupno 15 jedinki plavobijelog dupina i jednoj jedinci glavatog dupina (Xu i sur. 2009).

U uzorku obuhvaćenom ovim istraživanjem utvrđeno je 17 jedinstvenih DQA alela u plavobijelog dupina, te četiri jedinstvena DQA alela u glavatog dupina, od kojih su samo aleli: Tutr-DQA*02, Tutr-DQA*06 i Tutr-DQA*08 poznati iz prethodnih istraživanja (Arbanasić i sur. neobjavljeno). Svi ostali DQA aleli po prvi puta su pronađeni i okarakterizirani. Što se tiče DQB alela, u ovom istraživanju su dizajnirani parovi početnica DupDQBF1 i DupDQBR1, te DupDQBF3 i DupDQBR3 pomoću kojih se po prvi puta umnožio čitav egzon 2 DQB lokusa MHC sustava u plavobijelog i glavatog dupina, te koliko je autoru poznato prvi puta je umnožen i sekvenciran čitavi egzon 2 DQB lokusa u pripadnika reda Cetacea. Iz tog razloga svi DQB aleli pronađeni i opisani u ovom radu, ukupno 16 alela u plavobijelog i pet alela u glavatog dupina, su novootkriveni aleli. Na istraženim lokusima nije nađeno niti u jedne jedinke više od dva alela, što upućuje da lokusi nisu duplicirani, već u genomu svake jedinke postoji samo jedan DQA i jedan DQB lokus.

Iznenađujuće velik broj jedinstvenih alela pronađenih u istraživanom uzorku plavobijelog dupina (17 DQA alela i 16 DQB alela u uzorku od 24 jedinke) ukazuje na veliku genetičku raznolikost MHC sustava te vrste, koja je ostala očuvana unatoč naglom smanjenju mediteranske populacije devedesetih godina prošlog stoljeća. U glavatog dupina broj novootkrivenih alela je manji (četiri DQA alela i pet DQB alela), no ako uzmemo u obzir veličinu uzorka (osam jedinki) on još uvijek ukazuje na veliku raznolikost na MHC lokusima

i u ove vrste. Tome u prilog idu i izračunate evolucijske udaljenosti (tablice 17 i 18) koje pokazuju veliku raznolikost u sljedovima alela istih lokusa. Također, mali broj jedinki homozigotnih na nekom od istraživanih lokusa je još jedan pokazatelj visoke genetičke raznolikosti. Naime, u plavobijelog dupina su nađene samo tri jedinke (12,5%) koje su homozigoti na DQA lokusu, i to po jedna jedinka je bila homozigot za alele: Stco-DQA*03, Stco-DQA*08 i Tutr-DQA*06; te samo četiri jedinke (16,7%) koje su homozigoti na DQB lokusu, od kojih su dvije bile homozigotne za alel Stco-DQB*16, a po jedna za alele Stco-DQB*17 i Stco-DQB*19. U glavatog dupina, na DQA lokusu nađene su dvije jedinke (25%) homozigoti za alel Tutr-DQA*08, a na DQB lokusu četiri jedinke (50%) homozigota i to jedna za alel Grgr-DQB*04, te tri za alel Grgr-DQB*06.

Od pronađenih alela na oba lokusa u obje jedinke samo aleli Tutr-DQA*02 i Stco-DQA*06 daju isti aminokiselinski slijed budući da se jedino razlikuju na 42. poziciji u nukleotidnom slijedu, gdje se u alelu dogodila sinonimna tranzicija timina u citozin, odnosno 14. kodon TTT je promijenjen u TTC, no oba nakon prepisivanja kodiraju za aminokiselinu fenilalanin. Svi ostali aleli pronađeni u istraživanom uzorku daju jedinstvene aminokiselinske sljedove. Alel Stco-DQA*03 je jedinstven u istraživanom uzorku, po tome što jedini sadrži deleciju od tri uzastopna nukleotida, koja nije uzrokovala pomak okvira čitanja.

Ako usporedimo lokuse DQA i DQB, vidljivo je u obje istraživane vrste da su, unatoč približno jednakim dužinama lokusa (246 nukleotida lokus DQA, 267 nukleotida lokus DQB), na DQB lokusu značajno veće evolucijske udaljenosti. U plavobijelog dupina na DQB lokusu prosječna nukleotidna udaljenost iznosi 0,238, a prosječna aminokiselinska udaljenost 0,235, dok na DQA lokusu iznose redom 0,048 i 0,104 (tablica 17). U glavatog dupina vrijedi isto, pa nukleotidne, odnosno aminokiselinske udaljenosti iznose za DQB lokus 0,086 i 0,150, a za DQA lokus 0,021 i 0,052 (tablica 18). Također i broj varijabilnih nukleotidnih mjesta je veći na DQB lokusu u odnosu na lokus DQA, pa tako svi pronađeni aleli istraživanog uzorka plavobijelog dupina na DQB lokusu sadrže 48, a na DQA lokusu 19 varijabilnih mjesta, dok u glavatog dupina na DQB lokusu imaju 31, a na DQA lokusu devet varijabilnih mjesta. Sve to ukazuje na mnogo veću raznolikost DQB lokusa, što je u skladu sa prijašnjim nalazima koja ukazuju na najveću raznolikost upravo na genima koji kodiraju β lance što je potvrđeno u većine do sada istraženih vrsta (Reche i Reinherz 2003). Dosadašnja istraživanja raznolikosti MHC gena dobroga dupina također načelno potvrđuju tu tvrdnju (Arbanasić i sur. neobjavljeno), premda je u dobrog dupina utvrđeno da DQA lokus pokazuje relativno visoku razinu nukleotidne raznolikosti, za razliku od DRA lokusa koji pokazuje izuzetno malu

raznolikost. Do sada poznata iznimka tome su vrste porodice Equidae, koji pokazuju veliku raznolikosti i na genima koji kodiraju α lance (Arbanasić i sur. 2013).

U istraživanju MHC raznolikosti dobrog dupina u populaciji iz Jadranskog mora (Arbanasić i sur. neobjavljeno), nukleotidna evolucijska udaljenost na DQA lokusu iznosila je 0,047, a aminokiselinska evolucijska udaljenost 0,093. Ako te rezultate usporedimo sa rezultatima ovog istraživanja, vidimo da je, po ovim parametrima, raznolikost plavobijelog i dobrog dupina vrlo slična, što je i očekivano s obzirom na slične ekološke čimbenike tih vrsta, dok je u glavatog dupina raznolikost manja, ali to je vjerojatno posljedica malog uzorka. Isti parametri na DQB lokusu nisu usporedivi budući da je istraživanje Arbanasić i sur. (neobjavljeno) provedeno samo na dijelu egzona 2 dugom 172 nukleotida, dok je ovdje istražen čitavi egzon 2 od 246 nukleotida.

Kao u prethodnim istraživanjima MHC lokusa na drugim vrstama dupina (Yang i sur. 2007, Heimeier i sur. 2009, Xu i sur. 2009, Arbanasić i sur. neobjavljeno) i u ovom istraživanju se pokazalo da je omjer stopa nesinonimnih (dN) i sinonimnih (dS) mutacija na određenom lokusu u obje vrste veći od jedan. U plavobijelog dupina iznosi 2,7440 na DQA lokusu, a na DQB lokusu 12,3803. U glavatog dupina iznosi 2,7303 na DQA lokusu, a na DQB lokusu 9,1705. Ovakvi omjeri stope nesinonimnih u odnosu na sinonimne mutacije potvrđuju pretpostavku o pozitivnoj selekciji nad ovim lokusima. Jedini slučaj gdje je ta pretpostavka upitna je DQA lokus glavatog dupina. Naime, premda je $dN/dS > 1$, p vrijednost hipoteze testiranja neutralne evolucije iznosi 0,1285. Razlog tome mogla bi biti velika međusobna sličnost DQA alela u istraživanim jedinkama glavatog dupina s aminokiselinskom evolucijskom udaljenosti od samo 5,2% između četiri pronađena alela. Mali broj jedinstvenih alela u populaciji ne podazumijeva njihovu međusobno veliku sličnost, naime Radwan i sur. (2007) su prilikom istraživanja MHC raznolikosti europskog bizona (*Bison bonasus*) opisali četiri jedinstvena DRB3 alela s aminokiselinskim evolucijskim udaljenostima između parova alela u rasponu od 15,2% do 21,7%.

Bolji pokazatelj pozitivne selekcije bio bi prikaz omjera nesinonimnih i sinonimnih supstitucija samo na onim dijelovima gena koji su odgovorni za vezanje peptida (PBR), jer pretpostavljam da su upravo ti dijelovi, a ne čitav gen, pod pozitivnom selekcijom. Međutim, zasada su MHC geni nemodelnih kralježnjaka vrlo slabo istraženi i jasno definirane PBR regije reda Cetacea nisu objavljene.

Alel Tutr-DQA*08, pronađen u istraživanom uzorku glavatog dupina, te aleli Tutr-DQA*02 i Tutr-DQA*06, pronađeni u istraživanom uzorku plavobijelog dupina, prethodno su pronađeni u Jadranskoj populaciji dobrog dupina (Arbanasić i sur. neobjavljeno). Ta pojava potvrđuje postojanje trans-specijskog polimorfizma na DQA lokusu između plavobijelog i dobrog dupina, te između glavatog i dobrog dupina, što pak ukazuje da su ova tri alela nastala prije specijacije ovih vrsta u nekom njihovom zajedničkom pretku. Ujedno, ukazuju na održavanje ovih alela kroz relativno dugo evolucijsko razdoblje. Budući da je istraživanje na DQB lokusu prvi puta provedeno sekvenciranjem čitavog egzona 2, nemoguće je direktno usporediti DQB alele pronađene u istraživanom uzorku s onima iz prethodnih istraživanja, a u svrhu provjere trans-specijskog polimorfizma i na tom lokusu. Naredna istraživanja trebala bi uključiti izradu komparativne filogenije ove tri vrste u svrhu utvrđivanja njihove međusobne evolucijske udaljenosti.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na veliku genetičku raznolikost na istraživanim lokusima MHC sustava u obje istraživane vrste, posebice ako se u obzir uzme veličina uzorka. U 24 jedinke plavobijelog dupina pronađeno je 17 jedinstvenih alela na DQA lokusu i 16 jedinstvenih alela na DQB lokusu, a u osam jedinki glavatog dupina pronađena su četiri jedinstvena alela na DQA lokusu i pet jedinstvenih alela na DQB lokusu.

Od svih pronađenih alela na DQA lokusu samo dva alela u plavobijelog dupina i jedan alel u glavatog dupina su poznati iz prethodnih istraživanja, dok su svi ostali novootkriveni aleli. Također, budući da je u ovome istraživanju po prvi puta proučavana čitava sekvenca egzona 2 lokusa DQB, svi aleli pronađeni u istraživanom uzorku obje vrste na DQB lokusu su novootkriveni aleli. Samo dva alela DQA lokusa, pronađena u plavobijelog dupina, kodiraju za isti aminokiselinski slijed, dok svi ostali pronađeni aleli kodiraju za jedinstvene aminokiselinske sljedove.

Tri alela koja su poznata iz prethodnih istraživanja su pronađena u jedinkama populacije dobrog dupina iz Jadranskog mora što ukazuje na postojanje trans-specijskog polimorfizma između dobrog dupina i istraživanih vrsta.

Kod istraživanih lokusa, u obje istraživane vrste, genetička raznolikost je mnogo veća na DQB lokusu nego na DQA lokusu. To potvrđuje veći broj varijabilnih nukleotidnih mjesta u sljedovima DQB lokusa, veće prosječne nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti između alela DQB lokusa te veći omjer prosječnih stopa nesinonimnih i sinonimnih supstitucija na DQB lokusu u odnosu na DQA lokus.

Omjer prosječnih stopa nesinonimnih i sinonimnih supstitucija u obje vrste, na oba lokusa, iznosi više od jedan što ukazuje da genetička raznolikost na MHC lokusima nije slučajna, već je posljedica selektivnog pritiska, odnosno da je ta raznolikost održavana pozitivnom selekcijom.

6. LITERATURA

Aguilar A., Gaspari S. (2012): *Stenella coeruleoalba (Mediterranean subpopulation)*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>

Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. (2010): Imunologija, sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.

Arbanasić H., Đuras M., Podnar M., Gomerčić T., Ćurković S., Galov A.: Major histocompatibility complex class II variation in bottlenose dolphin from Adriatic Sea: inferences about the extent of balancing selection. Neobjavljeno

Arbanasić H., Galov A., Ambriović-Ristov A., Grizelj J., Arsenos G., Marković B., Dovenski T., Vince S., Čurik I. (2013): Extensive polymorphism of the major histocompatibility complex DRA gene in Balkan donkeys: perspectives on selection and genealogy. Animal Genetics 44: 711-716.

Archer F. I. (1997): Osteological variation in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). International Whaling Commission Scientific Committee SC/49/SM28: 30.

Bearzi G., Holcer D., Notarbartolo di Sciara G. (2004): The role of historical dolphin takes and habitat degradation in shaping the present status of northern Adriatic cetaceans. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 14: 363-379.

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

Calzada N., Aguilar A. (1995): Geographical variation in body size in western Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). Zeitschrift für Säugetierkunde 60: 257-264.

Cutrera A. P., Lacey E. A. (2007): Trans-species polymorphism and evidence of selection on class II MHC loci in tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). Immunogenetics 59: 937-948.

Flicek P., Amode M. R., Barrell D., Beal K., Billis K., Brent S., Carvalho-Silva D., Clapham P., Coates G., Fitzgerald S., Gil L., Girón C. G., Gordon L., Hourlier T., Hunt S., Johnson N., Juettemann T., Kähäri A. K., Keenan S., Kulesha E., Martin F. J., Maurel T., McLaren W. M., Murphy D. N., Nag R., Overduin B., Pignatelli M., Pritchard B., Pritchard E., Riat H. S., Ruffier M., Sheppard D., Taylor K., Thormann A., Trevanion S. J., Vullo A., Wilder S. P., Wilson M., Zadissa A., Aken B. L., Birney E., Cunningham F., Harrow J., Herrero J., Hubbard T. J. P., Kinsella R., Muffato M., Parker A., Spudich G., Yates A., Zerbino D. R., Searle S. M. J. (2014): Ensembl 2014. Nucleic Acids Research 42 Database issue: D749-D755.

Forcada J., Hammond P. (1997): Geographical variation in abundance of striped and common dolphins of the western Mediterranean. Journal of Sea Research 39: 313-325.

Galov A., Lauc G., Nikolić N., Šatović Z., Gomerćić T., Đuras Gomerčić M., Kocijan I., Šeol B., Gomerčić H. (2009): Records and genetic diversity of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Croatian coast of the Adriatic Sea. Marine Biodiversity Records 2: 1-5.

Gaspari S., Azzellino A., Airoldi S., Hoelzel A. R. (2007): Social kin associations dna genetic structuring of striped dolphin populations (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean Sea. Molecular Ecology 16: 2922-2933.

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

Heimeier D., Baker C. S., Russell K., Duignan P. J., Hutt A., Stone G. S. (2009): Confirmed expression of MHC class I and class II genes in the New Zeland endemic Hector's dolphin (*Cephalorhynchus hectori*). Marine Mammal Science 25: 68-90.

Huchard E., Cowlishaw G., Raymond M., Weill M., Knapp L. A. (2006): Molecular study of *Mhc-DRB* in wild chacma baboons reveals high variability and evidence for trans-species inheritance. Immunogenetics 58: 805-816.

IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. www.iucnredlist.org

IUCN 2012. Grampus griseus. In: IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=9461

IUCN 2008. Stenella coeruleoalba. In: IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=20731

Jefferson T. A., Leatherwood S., Webber M. A. (1993): Marine mammals of the world. United Nations Environment Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Kelley J., Walter L., Trowsdale J. (2005): Comparative genomics of major histocompatibility complexes. Immunogenetics 56: 683-695.

Klein J., Sato A., Nagl S., O'Huigin C. (1998): Molecular trans-species polymorphism. Annual Review of Ecology and Systematics 29: 1-21.

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

Nei M., Gojobori T. (1986): Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. Molecular Biology and Evolution 3: 418-426.

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

Reche P. A., Reinherz E. L. (2003): Sequence variability analysis of human class I and class II MHC molecules: functional and structural correlates of amino acid polymorphisms. Journal of Molecular Biology 331: 623-641.

Robinson J., Mistry K., Mcwilliam H., Lopez R., Parham P., Marsh S. G. E. (2011): The IMGT/HLA database. Nucleic Acids Research 39 Database issue: D1171-D1176

Strand T. (2011): European Black Grouse: MHC Genetic Diversity and Population Structure. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 869.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Taylor B. L., Baird R., Barlow J., Dawson S. M., Ford J. K. B., Mead J. G., Notarbartolo di Sciara G., Wade P., Pitman R. L. (2012): *Grampus griseus*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>.

Xu S. X., Ren W. H., Li S. Z., Wei F. W., Zhou K. Y., Yang G. (2009): Sequence polymorphism and evolution of three cetacean MHC genes. Journal of Molecular Evolution 69: 260-275.

Yang W., Chou L., Hu J. (2007): Molecular characterization of major histocompatibility complex class II DQB and DRB genes in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus* and *T. aduncus*) from the western Pacific. Zoological Studies 46: 664-679.

Yang Z. (1998): Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. Molecular Biology and Evolution 15: 568-573.