

# Genetička raznolikost i uloga MHC sustava u specifičnom imunološkom odgovoru kod ljudi i pasa

---

**Gaberšček, Anita**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:907426>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu

**Veterinarski fakultet**

**Anita Gaberščik**

**GENETIČKA RAZNOLIKOST I ULOGA MHC SUSTAVA U  
SPECIFIČNOM IMUNOLOŠKOM ODGOVORU KOD LJUDI I  
PASA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2018.**

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentor: doc. dr. sc. Vladimir Stevanović

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Suzana Hađina
2. izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina
3. doc. dr. sc. Vladimir Stevanović
4. prof. dr. sc. Ljubo Barbić (zamjena)

## **Zahvala**

*„Dječice, ne ljubimo riječju i jezikom, već djelom i istinom.“*

*Prva Ivanova 3, 16-18.*

*Prije svega, želim i osjećam se dužnom zahvaliti Bogu na Njegovoj ustrajnosti i neumornosti u traganju zamnom čak i onda kada sam ga ja napustila. Hvala mu što je bio moja snaga i utjeha kada je toga nedostajalo u svijetu, hvala mu na svim talentima i strastima s kojima sam se rodila. Sigurna sam da ovo ne bih sada pisala da nije bilo nekih od njih.*

*Mojoj majci Ljiljani zahvaljujem na svim odricanjima i žrtvama koje je radila i nastavlja raditi za našu obitelj. Mojem pokojnom ocu, Žarku, hvala na nepresušnom i iskrenom veselju radi mojih uspjeha, a kojeg je uvijek neumorno pokazivao. Hvala im na svim godinama ljubavi i mudrosti, zbog kojih su prepoznali i njegovali sve moje težnje. Zahvaljujem se i njihovim roditeljima, pokojnoj baki Danici i djedu Stjepanu, koji su mi bili velika podrška u svakom smislu. Posebno hvala mojoj mlađoj sestri Emi, moj Yang, na neumornom ohrabrivanju i svim poticajima. Hvala joj što je uvijek štitila našu vatrenu borbenost, pazeći da se ona nikad ne ugasi.*

*Veliko hvala mojim prijateljima, mojoj drugoj obitelji, što su mi omogućili brojne trenutke razbibrige i smijeha, koji su tijekom studija bili prijeko potrebni. Hvala vam na nepresušnom razumijevanju i strpljenju koje ste pokazali prateći me i slušajući me kroz sve ove godine.*

*Posebnu zahvalnost dugujem cijelom fakultetskom osoblju na stečenom znanju i vještinama, osobito prof. dr. sc. Ljubi Barbiću koji je prepoznao moj potencijal i uključio me u rad laboratorija. Na kraju, osobito hvala mome mentoru doc. dr. sc. Vladimiru Stevanoviću na ogromnom povjerenju koje mi je ukazao, na svim riječima utjehe i savjetima koji će me pratiti kroz doktorsku karijeru. Sigurna sam da ću ih se vrlo rado sjećati.*

Popis kratica

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

HLA = (*eng. human leukocyte antigen*) ljudski leukocitni antigen

H-gen = (*eng. histocompatibility gene*) gen tkivne podudarnosti

DLA = (*eng. dog leukocyte antigen*) pseći leukocitni antigen

TCR = (*eng. T-cell receptor*) receptor T-limfocita

TNF $\alpha$  = (*eng. tumor necrosis factor alpha*) faktor tumorske nekroze alfa

CTL = (*eng. cytotoxic T lymphocyte*) citotoksični T-limfocit

TAP = (*eng. transporter associated with antigen processing*) transportna molekula povezana s obradom antigena

IL-2 = interleukin-2

IL-4 = interleukin-4

IL-5 = interleukin-5

LD = (*eng. linkage disequilibrium*) neuravnoteženo vezanje alela

FISH = (*eng. fluorescence in situ hybridization*) fluorescentna in situ hibridizacija

HIV = (*eng. human immunodeficiency virus*) virus ljudske imunodeficijencije

AIDS = (*eng. acquired immunodeficiency syndrome*) stečeni sindrom imunodeficijencije

HCV = (*eng. hepatitis C virus*) virus hepatitisa C

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

Popis slika:

Slika 1. Molekularna građa skupina HLA I i HLA II

Slika 2. Genetička struktura glavnog sustava tkivne podudarnosti kod čovjeka

Slika 3. Komparativni prikaz genetičke strukture i genomske pozicije HLA i DLA sustava

# SADRŽAJ

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD .....                                                     | 1  |
| 2. PREGLED LITERATURE .....                                       | 2  |
| 2.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti kroz povijest .....        | 2  |
| 2.2. MHC sustav .....                                             | 3  |
| 2.2.1. Struktura MHC sustava .....                                | 4  |
| 2.2.2. Građa MHC molekula skupine I .....                         | 4  |
| 2.2.3. Građa MHC molekula skupine II .....                        | 5  |
| 2.2.4. Uloga MHC sustava u specifičnom imunološkom odgovoru ..... | 6  |
| 2.2.5. Geni MHC sustava .....                                     | 7  |
| 2.2.6. Genetička struktura HLA skupine I i HLA skupine II .....   | 8  |
| 2.3. DLA sustav .....                                             | 9  |
| 2.3.1. Početna istraživanja i rezultati .....                     | 10 |
| 2.3.2. Genetička i molekularna građa DLA skupine I .....          | 11 |
| 2.3.3. Genetička i molekularna građa DLA skupine II .....         | 12 |
| 2.3.4. Polimorfnost DLA sustava .....                             | 14 |
| 2.4. Klinička važnost HLA sustava u patogenezi bolesti .....      | 16 |
| 2.4.1. Zarazne bolesti .....                                      | 18 |
| 2.4.2. Autoimune bolesti .....                                    | 21 |
| 2.5. Klinička važnost DLA sustava u patogenezi bolesti .....      | 21 |
| 2.5.1. Autoimune bolesti .....                                    | 21 |
| 2.5.2. Zarazne bolesti .....                                      | 22 |
| 3. ZAKLJUČCI .....                                                | 25 |
| 4. LITERATURA .....                                               | 27 |
| 5. SAŽETAK .....                                                  | 44 |
| 6. SUMMARY .....                                                  | 45 |
| 7. ŽIVOTOPIS .....                                                | 46 |





## 1.UVOD

Glavni sustav tkivne podudarnosti (*engl. major histocompatibility complex*, MHC) sustav je transmembranskih glikoproteinskih receptora na površini stanica kralježnjaka koji se pojavio prije otprilike 528 do 766 milijuna godina (KLEIN, 1986.; DANCHIN i sur., 2004.). Njegova uloga prvotno je zamijećena u transplantacijskim istraživanjima prilikom odbacivanja tkiva (LITTLE i TYZER, 1916.), što je kasnije bilo povezano s imunosnim odgovorom na strani antigen (MEDAWAR, 1946.). S obzirom na razlike u građi receptora, podrijetlu i obradi antigenskih peptida te načinu njihovog prezentiranja na površini stanice; MHC sustav podijeljen je na MHC skupinu I i MHC skupinu II. Geni koji kodiraju ove receptore čine najvažniju komponentu imunološkog sustava kralježnjaka (KLEIN i FIGUEROA, 1986.) i najpolimorfnija su skupina gena u njihovom genomu (HEDRICK, 1994.). Važnost ove raznolikosti u obrani od patogena, očituje se u postojanju ravnotežne selekcije koja kontinuirano održava genetičku varijabilnost MHC sustava kao odgovor na stalni pritisak od strane patogena (HEDRICK i sur., 2000.). Utjecaj ove varijabilnosti na otpornost i sklonost bolestima (HILL, 1998.; GILBERT i sur., 1998.; KLEIN i SATO, 2000.; LOPEZ i sur., 2010.), težinu kliničke slike i tijek bolesti (RAMSURAN i sur., 2018.), istražen je u opsežnim istraživanjima zaraznih i drugih bolesti kod ljudi. Kod pasa istraživanja na ovom polju, iako predstavljaju vrijedne modele za autoimune homologne bolesti kod ljudi (KENNEDY i sur., 2012.), ipak slabo uključuju zarazne bolesti. Potonje se posebice odnosi na bolesti virusne etiologije (HEDRICK i sur., 2003.; KENNEDY i sur., 2011.). Do danas nisu pronađeni podatci o postojanju sličnih istraživanja u veterinarskoj medicini na području naše zemlje, iako je potreba za njima očita (KENNEDY i sur., 2012.). Ovaj rad nudi komparativni prikaz molekularne i genetičke strukture MHC sustava ljudi i pasa, opisuje njegovu ulogu u specifičnom imunološkom odgovoru, te kliničku važnost u patogenezi bolesti kod pasa i ljudi. Naposljetku, ovim će radom biti ukazana specifična područja u veterinarskoj medicini koja su od kliničkog značaja, a koja zahtijevaju detaljnija istraživanja; kako u svijetu tako i u našoj zemlji.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti kroz povijest

Glavni sustav tkivne podudarnosti (*eng. major histocompatibility complex*, MHC) pojavio se prije otprilike 528 do 766 milijuna godina te se javlja isključivo kod čeljustoustih kralježnjaka (DANCHIN i sur., 2004.). Njegova važnost bila je prepoznata već u samim počecima razvoja imunologije kao znanstvene discipline zbog svoje uloge prilikom odbacivanja organa i tkiva (BERGGREN BREMDAL, 2010.). LITTLE i TYZER izveli su 1916. pokusnu transplantaciju tumorskog tkiva na miševima i otkrili da je transplantacija uspješna samo između pojedinih miševa, dok kod drugih vodi do odbacivanja tkiva. BAUER je 1927. otkrio da tkivni transplantanti neće biti odbačeni ukoliko su davatelj i primatelj blizanci. To otkriće dovelo je naposljetku do spoznaje da je tkivna podudarnost kontrolirana na genskoj razini. Ovo je potvrdio Gorer kada je opisao postojanje 4 krvnih antigena u miša i nazvao ih „antigen I, II, III i IV“ (GORER, 1936.) te godinu dana iza toga dokazao da je odbijanje ili prihvatanje stranog tkiva povezano s ekspresijom tih istih gena (GORER, 1937.). MEDAWAR je 1946. povezao odbacivanje transplantacijskog tkiva s imunosnim odgovorom na strani antigen. Samo dvije godine iza ovog otkrića uočeno je da je transplantacija kože između miševa sličnog genetičkog profila bila uspješna, dok je između miševa različitih rodova ona bila neuspješna (SNELL, 1948.). Nekoliko godina kasnije uspješno su uzgojeni miševi identičnog genetičkog profila koji su se razlikovali jedino u regiji genoma koja kontrolira odbijanje stranog tkiva. Te su gene nazvali genima tkivne podudarnosti ili H genima (*eng. histocompatibility gene*, H gen) (SNELL, 1951.). Daljnjim istraživanjima utvrđeno je da postoji nekoliko gena za tkivnu podudarnost koji se nalaze na istom kromosomu, stoga je ta regija genoma dobila naziv MHC, odnosno glavni sustav tkivne podudarnosti (SNELL i HIGGINGS, 1951.). Više od dvadeset godina kasnije dokazana je po prvi put njegova uloga u prezentiranju antigena kada je otkriveno da aktivacija i djelovanje T-limfocita ne ovisi samo o antigenu već i o MHC molekulama (DOHERTY i ZINKERNAGEL, 1975.). Leukocitni antigen kod ljudi prvi je definirao Dausset utvrdivši leukoaglutinine u ljudskim serumima nakon većeg broja transfuzija krvi (DAUSSET, 1958.). Kratica HLA (*eng. human leukocyte antigen*) prvi put se pojavljuje 1975. i uvedena je od strane Svjetske zdravstvene organizacije i njenog Odbora za nomenklaturu faktora HLA sustava (*eng. Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*; Bull World Health Organ. 1975.).

Struktura MHC molekula otkrivena je 80-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća metodama rendgenske kristalografije (BJORKMAN i sur., 1987.; BROWN i sur., 1993.).

Karakterizacija genske strukture MHC sustava kod pasa započela je ranih 1960-ih godina kada se serološkim metodama putem alogenih antiseruma dokazalo prisustvo staničnih antigena na psećim leukocitima (PUZA i sur., 1964.; RUBINSTEIN i FERREBEE, 1964.). Otkrivena je značajna uloga ovih antigena u određivanju pozitivnog ili negativnog ishoda prilikom korištenja alogenih presađaka (EPSTEIN i sur., 1968.). Genetička kontrola ovih antigena tkivne podudarnosti i njihov utjecaj na preživljavanje tkivnih presađaka, vrlo su brzo bili povezani sa zajedničkom kromosomnom regijom (VRIESENDORP i sur., 1971.). Utvrđeno je da ova regija kromosoma ima ulogu i u regulaciji staničnog prepoznavanja i proliferacije limfocita dvaju različitih pasa prilikom njihovog zajedničkog uzgoja na mješanoj limfocitnoj staničnoj kulturi (TEMPLETON i THOMAS, 1971.). Tada su po uzoru na HLA i ovi leukocitni antigeni dobili svoju kraticu, DLA (*eng. dog leukocyte antigen*). Detaljnija karakterizacija DLA sustava putem seroloških metoda i staničnih kultura provedena je većinom kroz tri međunarodne radionice iz područja tkivne podudarnosti (DEEG i sur., 1986.; BULL i sur., 1987.; VRIESENDORP i sur., 1976. i 1973.). Tamo je i utvrđena njegova sličnost s drugim vrstama jer DLA također čine tri skupine gena kao što je slučaj i kod drugih vrsta. Molekularne metode korištene za identifikaciju alela uvedene su 1990.-ih kada je i prepoznat poveći potencijal za korištenje psećih bolesti kao homolognih modela za brojne bolesti kod ljudi (KENNEDY i sur., 2012.).

## **2.2. MHC sustav**

Ovaj sustav je sustav transmembranskih glikoproteinskih receptora koji su izloženi na stanicama kralježnjaka. Njihova je uloga vrlo važna u pokretanju imunološkog odgovora odnosno u prikazivanju proteinskih antigena T-limfocitima. Geni ovog sustava, koji kodiraju već spomenute receptore čine najvažniju komponentu imunološkog sustava kralježnjaka (KLEIN, 1986.; KLEIN i FIGUEROA, 1986.). Oni su najpolimorfnija skupina gena u kralježnjaka (HEDRICK, 1994.; HUGHES i HUGHES, 1995.). Utvrđeno je da vezna mjesta antigena na ovim receptorima (*eng. peptid-binding region, PBR*) pokazuju visok stupanj različitosti kako u broju alela koji ih kodiraju tako i u aminokiselinskim sljedovima koji ih grade (HUGHES i YEAGER, 1998.). Na temelju razlika u građi i načinu djelovanja receptora, geni koji ih kodiraju su podijeljeni u dvije skupine, MHC geni skupine I i MHC geni skupine II ( KLEIN i FIGUEROA, 1986.).

Uz polimorfnost, još jedno vrlo bitno obilježje ovog sustava je poligenost. Ono omogućava da se kod pojedinca nalazi više različitih tipova MHC molekula jer svaku molekulu određuje više gena. Svaki taj tip molekule u mogućnosti je vezati različiti set peptida, odnosno proizvod proteinskih antigena. Zbog toga prisutnost nekoliko genskih mjesta za jednu MHC skupinu omogućuje svakoj jedinci predočavanje puno šireg raspona različitih peptida nego što bi to bilo moguće uz samo jedno gensko mjesto. Taj je raspon ipak puno širi od očekivanog s obzirom na poznat broj gena za svaku skupinu, a razlog tome je već spomenuti polimorfizam svakog gena te kodominantna ekspresija istih (KNAPP, 2005.; ABBAS i LICHTMAN, 2007.). Potonje omogućava da oba roditeljska alela za isti gen u jednakoj mjeri sudjeluju u nastajanju glikoproteinskih receptora na površini stanice.

Upravo zbog prethodno navedenog, razumno je zaključiti da ova raznovrsnost, tj. polimorfizam gena ima vrlo važnu ulogu u određivanju sposobnosti pojedinca za odgovor na veći ili manji broj antigena. Priroda je ovo prepoznala još od pamtivijeka te je razvila različite evolucijske mehanizme pomoću kojih će ta raznovrsnost biti održana.

### **2.2.1. Struktura MHC sustava**

Kod sisavaca se osim MHC skupine I i II pojavljuje i skupina III koja, za razliku od prethodne dvije, nema ulogu u prezentiranju antigena. Geni ove skupine kodiraju za neke druge sastavnice nespecifičnog imunološkog odgovora kao što su komponente sustava komplementa (npr. C2, C4 i B faktor) i citokini (npr. faktor tumorske nekroze alfa, *eng. tumor necrosis factor alpha*, TNF $\alpha$ ) (AGUADO i sur., 1996.). Kako ovaj rad razmatra genetičku strukturu i ulogu MHC sustava u specifičnom imunološkom odgovoru, daljnja poglavlja bit će posvećena isključivo MHC skupini I i MHC skupini II.

### **2.2.2. Građa MHC molekula skupine I**

Određivanje nukleotidnog slijeda sekvenci i analize građe MHC I molekula upućuju na njihovu heterodimernu građu koju čine teški  $\alpha$  lanac i laki lanac,  $\beta$ 2 mikroglobulin. Teški  $\alpha$  lanac sastoji se od transmembranske, citoplazmatske i izvanstanične regije koju čine tri podjedinice ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 i  $\alpha$ 3). Prva i druga podjedinica izrazito su polimorfne i ta je polimorfnost većinom prisutna u području veznog mjesta antigena. Treća podjedinica je visoko očuvana i usko vezana uz  $\beta$ 2 mikroglobulin (MEHRA, 2005.). Vezno mjesto antigena, PBR, ima oblik žlijeba i taj se dio molekule sastoji od 180 aminokiselina (ANDREIS, 2004.). U žlijeb se može vezati osam do deset aminokiselina (CHICZ i sur., 1992.) te je on na svojem kraju zatvoren zbog čega ima oblik

đepa u kojem se usidruju peptidi (CRESSWELL, 1994.). Vrlo je zanimljivo što, iako je ovo mjesto izrazito polimorfno, ipak na oba svoja kraja sadrži isključivo visoko očuvane, nevarijabilne bočne lance (MADDEN, 1995.).

Raspored aminokiselinskih ostataka unutar PBR-a određen je različitim alelima MHC gena. Zbog toga svi peptidi koji će se vezati za određeni oblik MHC molekule, kodiran određenim alelom MHC gena, pokazuju zajedničke strukturne karakteristike (motive) koje nisu iste kao kod peptida koji se vežu za neki drugi oblik MHC molekule kodiran drugim alelom MHC gena. Receptori T-limfocita (*eng. T-cell receptor*, TCR) prepoznaju ovaj kompleks MHC molekule i vezanog peptida tako što se vežu za površinu sačinjenu od izloženih aminokiselinskih ostataka vezanog peptida i dostupnih elemenata dviju  $\alpha$  uzvojnica MHC molekule (PAMER i CRESSWELL, 1998.).

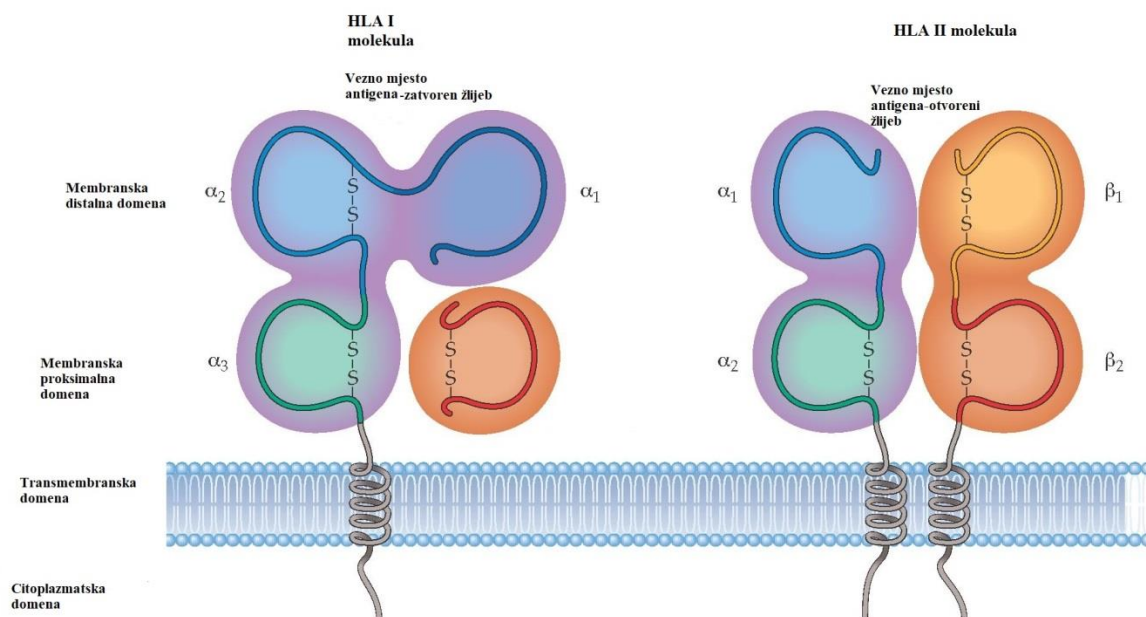
Za razliku od podjedinica teškog lanca koje imaju ulogu u vezanju antigena, laki lanac ( $\beta 2$  mikroglobulin) ima ulogu u stabilizaciji i ekspresiji molekule. Ovo je potvrđeno istraživanjem provedenom na genetički modificiranim miševima s neaktivnim genom za  $\beta$  lanac. Kod takvih miševa izostala je ekspresija MHC molekula skupine I na površini stanica (WILLIAMSON i sur., 1989.).

### **2.2.3. Građa MHC molekula skupine II**

Molekule ove skupine su heterodimeri sačinjeni od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice te svaku od njih kodira jedan MHC II gen. Obje su transmembranski glikoproteini te se sastoje od izvanstanične, transmembranske i citoplazmatske regije. Dvije izvanstanične regije proksimalno u odnosu na membranu ( $\alpha 2$  i  $\beta 2$ ) strukturno nalikuju na konstantnu regiju imunoglobulina (KAPPES i STROMINGER, 1988.). Dvije izvanstanične regije distalno od membrane ( $\alpha 1$  i  $\beta 1$ ) zajedno tvore PBR. Uvidom u njihovu strukturu potvrđena je njihova sličnost s  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  regijama MHC I molekula (BROWN i sur., 1993.).

Za razliku od veznog žlijeba MHC molekule skupine I koji je na svom kraju zatvoren, krajevi žlijeba MHC molekule skupine II su otvoreni. Zbog toga peptidni antigen viri izvan ovih molekula te su one na ovaj način u mogućnosti vezati veće peptide, sastavljene od 13 do 24 (25) aminokiselina (RUDENSKY i sur., 1991.; HUNT i sur., 1992.; NEWCOMB i CRESSWELL, 1993.; CHICZ i sur., 1993.; CRESSWELL, 1994.).

Za razliku od  $\beta$  lanca MHC molekule skupine I,  $\beta$  lanci MHC molekule skupine II izrazito su polimorfni. U populaciji može biti prisutno i do nekoliko stotina različitih alela. Zbog toga heterozigotna jedinka na površini svojih stanica može imati izloženo i više od deset MHC molekula skupine II (ANDREIS i sur., 2004.).



**Slika 1.** Molekularna građa skupina HLA I i HLA II. Preuzeto i prilagođeno iz TANKESHWAR, 2017.

#### 2.2.4. Uloga MHC sustava u specifičnom imunološkom odgovoru

Kao što je već spomenuto, antigen prezentirajuću ulogu imaju samo MHC molekule skupine I i skupine II. Uloga ovih dviju skupina razlikuje se kako u načinu obrade i podrijetlu proteinskog antigena tako i u načinu njegovog prezentiranja.

Molekule MHC I nalaze se na svim stanicama s jezgrom i prezentiraju peptide podrijetlom od proteina koje je sintetizirala sama stanica. Kod zdravih stanica ovo su autologni proteini te citotoksični T-limfociti (CD8<sup>+</sup> T-limfociti, *eng. cytotoxic T lymphocyte*, CTL) na njih neće reagirati, odnosno neće ih prepoznati kao strani antigen. Međutim, ukoliko se na površini stanice nalaze peptidi koji u sebi sadrže mutirane sekvence (npr. kod tumora), podrijetlom mikrobnog antigena (npr. kod virusnih infekcija) ili stranih polimorfnih gena (npr. transplantanti), CD8<sup>+</sup> T-limfociti će ovakve stanice prepoznati kao strane i započeti kaskadu imunoloških reakcija s ciljem njihovog uništenja (KENNETH i sur., 2016.). Vlastiti i strani proteini su u proteosomu razloženi na peptidne fragmente (MICHALEK i sur., 1993.; ROCK i sur., 1994.). Ove peptide u

većoj mjeri uništavaju ili dalje skraćuju enzimi peptidaze koji se nalaze u citosolu (REITS i sur., 2003.), no neki uspijevaju preživjeti ovo i pobjeći u endoplazmatski retikulum (ER) pomoću transportne molekule povezane s obradom antigena (*eng. transporter associated with antigen processing*, TAP) koja je ugniježđena u ER-u (NEEFJES i sur., 2011.). Tu je i mjesto sinteze kompleksa MHC-peptid (CRESSWELL i sur., 1999.). Ovo su obično peptidi točno određene veličine od osam do deset aminokiselina. Ovi kompleksi bivaju zatim transportirani do površine stanice gdje će biti prezentirani CD8<sup>+</sup> T-limfocitima (SCHUMACHER i sur., 1990.; KELLY i sur., 1992.).

Molekule MHC II nalaze se na antigen prezentirajućim stanicama kao što su B limfociti, monociti, makrofagi, dendritičke stanice i također na epitelnim stanicama uslijed reakcije na upalne signale. One prezentiraju antigen pomoćničkim T-limfocitima (CD4<sup>+</sup> T-limfociti) i aktiviraju ih (UNANUE i sur., 2016.). Proupalni citokini koje otpuštaju aktivirani CD4<sup>+</sup> T-limfociti [npr. interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-5 ili  $\gamma$ -interferon] pojačavaju ukupni imunološki odgovor tako što potiču proliferaciju T i B-limfocita, aktivaciju makrofaga ili diferencijaciju B-limfocita. Aktivacija CD4<sup>+</sup> T-limfocita može, iako rijede, dovesti do citolize kao što je slučaj prilikom aktivacije CD8<sup>+</sup> T-limfocita putem MHC I molekula (CRESSWELL, 1994.). Molekule ove skupine na sebe vežu većinom peptide podrijetlom proteina koji su uneseni izvana. Ovo mogu biti stanični površinski proteini, topljivi proteini te različiti mikroorganizmi kao što su virusi, bakterije ili protozoe koji prodiru u stanicu ili su fagocitirani (CRESSWELL, 1994.). Ovi su peptidi veći od onih koje prezentiraju MHC I molekule, uslijed toga što je PBR otvorenih krajeva što omogućuje peptidima da se protežu i izvan žlijeba (STEM i sur., 1994). Za razliku od peptida vezanih na MHC I molekule koji se prerađuju u proteosomu, peptidi vezani na MHC II molekule prerađuju se u endolizosomu nakon endocitoze ili fagocitoze (SURI i sur., 2006.).

### **2.2.5. Geni MHC sustava**

Područje MHC sustava zauzima veliki dio ljudskog genoma i veličine je otprilike četiri milijuna baznih parova (Mb) (KULSKI i INOKO, 2005.). Smješten je na „p kraku“ kromosoma 6, odnosno 6p21.31 (ELLIS i sur., 2006.; KULSKI i INOKO, 2005.; *THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM*, 1999.). Kod mnogih vrsta postoji nekoliko kopija svakog gena i iako je većina njih u svom aktivnom obliku, neke kopije predstavljaju pseudogene (BECK i sur., 1999.). Neki smatraju da je ova duplikacija gena evolucijska strategija koja omogućuje da uvijek postoji jedan gen s već postojećom aktivnom ulogom, dok je kopija tog gena slobodna preuzeti novu ili

promijenjenu ulogu (OHNO, 1970.). Geni MHC skupine I i MHC skupine II koji kodiraju antigen prezentirajuće MHC molekule nazivaju se klasičnim MHC genima (BECK i sur., 1999.). Unatoč tome što su MHC geni najvarijabilniji geni unutar čitavog genoma pojedinca (MEYER i THOMSON, 2001.; PIERTNEY i OLIVER, 2006.), aleli unutar jedne populacije imaju poprilično ravnomjernu distribuciju (HEDRICK i THOMSON, 1983.). Posljedica ovoga je da pojedini MHC aleli unutar jedne vrste pokazuju veću povezanost s alelima drugih vrsta, nego što to pokazuju s većinom alela unutar svoje vrste. Ova pojava naziva se međuvrtni polimorfizam (KLEIN, 1980.; PARHAM i sur., 1989.). Tako se došlo do zaključka da mora postojati neki oblik ravnotežne selekcije koji održava ovaj oblik genetičkih varijacija (HEDRICK i THOMSON, 1983.; MARKOW i sur., 1993.).

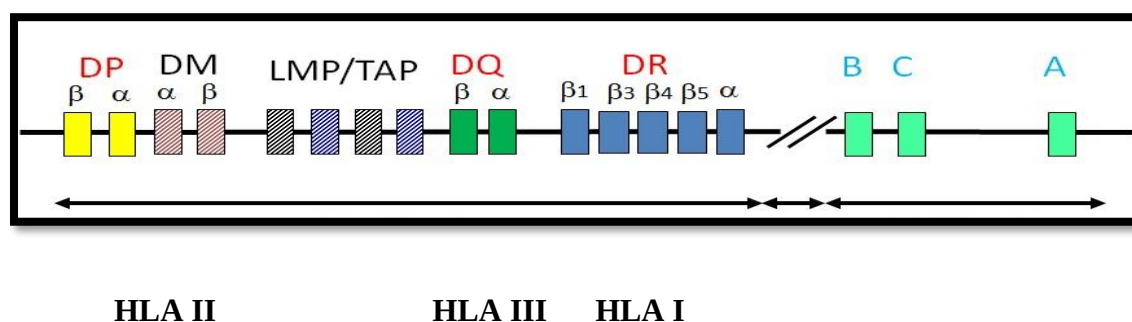
Pojedini MHC aleli različitih gena češće se nasljeđuju zajedno (kao MHC haplotipovi) nego što bi to bilo za očekivati s obzirom na slučajni odabir. Ova se pojava naziva neuravnoteženo vezanje alela (*eng. linkage disequilibrium, LD*) (RAYMOND i sur., 2005.). Ovako usko povezani različiti geni na istom kromosomu imaju vrlo niski postotak rekombinacija (MEHRA, 2005.). Time je onemogućen učinak negativne selekcije koja bi u protivnom ovim putem uklanjala recesivne nepoželjne mutacije na inače poželjnim haplotipovima. Moguće je da je upravo ovo objašnjenje za pojavu heterozigotne prednosti jer na taj način ove recesivne nepoželjne mutacije neće biti ispoljene, a poželjni haplotipovi će i dalje biti prisutni (VAN OOSTERHOUT, 2009.).

## **2.2.6. Genetička struktura HLA skupine I i HLA skupine II**

Geni HLA skupine I zauzimaju područje ljudskog genoma veličine od oko dva Mb. Ovo područje genoma sastoji se od tri regije koje kod ljudi čine HLA-A, HLA-B i HLA-C geni. Oni su visoko polimorfni i nazivaju se „klasični“ geni. Jedna druga regija HLA skupine I sastoji se od „ne-klasičnih“ gena koji imaju znatno smanjeni polimorfizam i varijabilnu tkivnu ekspresiju te nemaju ulogu u prezentiranju antigena. Geni MHC skupine I visoko su konzervirani i unutar vrste i među vrstama (GUILLEMOT i sur., 1986.). Čitava genska regija nalazi se na šestom kromosomu, osim gena koji kodira  $\beta 2$  mikroglobulin. Kod ljudi on se nalazi na 15-om kromosomu. Taj gen, kao i njegov proteinski proizvod, nije varijabilan i jednak je unutar svake vrste (GOLUB i GREEN, 1991.).



Druga HLA skupina obuhvaća područje ljudskog genoma veličine preko jedan Mb i podijeljena je u šest podregija unutar jedne HLA-D regije: HLA-DR, -DQ, -DP, -DO, -DN i -DM (MEHRA, 2005.). Unutar svakog gena nalazi se pet do šest različitih eksona, isprekidanih regijama introna. Podregija HLA-DR sadrži veći broj visoko polimorfnih beta gena (DRB) i samo jedan monomorfan ili neznatno polimorfan alfa gen (DRA) (MEHRA, 2005.). Pokazalo se da je HLA-DRB1 najpolimorfiji gen u odnosu na preostalih osam koliko ih je otkriveno u čovjeka (DOXIADIS i sur., 2012.). Zbog visokog stupnja polimorfizma on je opsežno proučavan i kod različitih vrsta životinja; npr. kod porodice *Bovidae*, te kod pasa i mačaka (AMMER i sur., 1992; YUHKI i O'BRIEN, 1997; WAGNER i sur., 1999.). Polimorfnost poprima najveće razmjere kod gena skupine I i skupine II na području eksona koji kodiraju  $\alpha$  i  $\beta$  domene, a koje vežu obrađene peptide. Unutar skupine I to su drugi i treći ekson koji kodiraju  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  domene, a unutar skupine II to je drugi ekson koji kodira  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  domene (HUGHES i NEI, 1988.; HUGHES i NEI, 1989.; HEDRICK i sur., 1991.; LITTLE i PARHAM, 1999.). Ova mjesta također pokazuju i veći stupanj heterozigotnosti nego što to pokazuju susjedni nukleotidi (HEDRICK i sur., 1991.). Za razliku od ljudi kod kojih postoji nekoliko kopija istog gena, kod pasa postoje pojedinačni funkcionalni geni za DRB, DQA i DQB genska mjesta (WAGNER, 2003.). Postoje istraživanja kod pasa u kojima je zabilježeno prisustvo nepotpune kopije DRB (WAGNER, 2003.) i DQB gena (WAGNER i sur., 1998.).



**Slika 2.** Genetička struktura glavnog sustava tkivne podudarnosti kod čovjeka.

### 2.3. DLA sustav

Pas predstavlja idealnu vrstu za rasvijetljavanje odnosa između gena MHC sustava i njihovog utjecaja na niz imuno-bioloških funkcija. Preko 400 zasebnih pasmina proizašlo je iz selektivnog uzgoja pasa, koji je zaslužan za pojavu ove iznimne fenotipske raznolikosti te za njeno održavanje. Ovako ustaljene pasmine pasa predstavljaju genetičke paralele s populacijama ljudi

kod kojih postoji visok stupanj razmnožavanja u srodstvu (KENNEDY i sur., 2012.). Selektivni uzgoj pasa razlog je pojave parenja u srodstvu kojim se postiže ujednačenost fenotipskih obilježja i karakternih osobina. S druge strane, ovo značajno smanjuje genetičku raznolikost MHC sustava za koju se smatra da proizlazi iz prilagodbe na selekcijski pritisak od strane nanovo prilagođenih patogena te potrebe za raznim načinima izbjegavanja parenja u srodstvu (APANIUS i sur., 1997.; PATERSON, 1998.; BERNATCHEZ i LANDRY, 2003.). Ova prilagodba će za posljedicu imati manju pojavu homozigota u prirodno nastalim populacijama gdje je prisutno razmnožavanje van srodstva (BLACK i SALZANO, 1981.; RITTE i sur., 1991.; NEVO i BEILES, 1992.), što kod današnjih pasa nije slučaj. S obzirom na sve navedeno, trebali bismo moći uvidjeti važnost i ulogu DLA sustava u patogenezi zaraznih i ostalih bolesti pasa.

### **2.3.1. Početna istraživanja i rezultati**

Početna istraživanja DLA sustava uključivala su stanične, serološke i imunokemijske analize. Tako je ovaj genski sustav bio razdijeljen na četiri područja: DLA-A, DLA-B, DLA-C (BULL i sur., 1987.) i DLA-D (DEEG i sur., 1986.). Molekule podrijetlom DLA-A gena okarakterizirane su kao molekule skupine I prema njihovoj povezanosti s  $\beta 2$  mikroglobulinom (KRUMBACHER i sur., 1986.). Molekule DLA-B gena pokazale su tipične karakteristike molekula skupine II te se došlo do zaključka da su prisutne na gotovo svim limfocitima, što nije slučaj kod ljudi (DOXIADIS i sur., 1989.). Molekularne analize započele su krajem 1980.-ih koristeći gene HLA sustava kao model. U DLA skupinu I svrstalo se otprilike osam genskih mjesta (SARMIENTO i STORB, 1989.), dok su se tri genska mjesta u skupini II pokazala izuzetno polimorfna. To su DRB, DQA i DQB (SARMIENTO i sur., 1990., 1992., 1993.). Gensko mjesto DRA pokazalo se monomorfno (WAGNER i sur., 1995.). Ubrzo se precizno odredilo i točno mjesto DLA sustava unutar genoma pomoću fluorescencijske „in situ“ hibridizacije (*eng. fluorescence in situ hybridization*, FISH). Tako je DLA sustav smješten na kromosom 12 (DUTRA i sur., 1996.). Jedan od gena (DLA-79) skupine I pokazao je ograničeni polimorfizam i relativno slabu ekspresiju u raznim tkivima, zbog čega je svrstan u skupinu ne-klasičnih (skupina Ib) gena (BURNETT i GERAGHTY, 1995.). Klasični (Ia) geni u usporedbi s Ib genima imaju veći stupanj ekspresije u više različitih tkiva te su polimorniji (WAGNER i sur., 1999.). Unutar skupine I ovo su DLA-88, DLA-12 i DLA-64. Analizom sekvenci pokazalo se da su ovo potpuni geni koji su prisutni u psećim leukocitima (BURNETT i sur., 1997.). Čini se da je DLA-88 polimorniji od DLA-12, DLA-79 ili DLA-64 (GRAUMANN i sur., 1998.). Preostali geni

pokazali su se kao pseudogeni (BURNETT i sur., 1997.). Svi ovi polimorfizmi bili su utvrđivani na psima križanih pasmina te su pokazali, osim DLA-64, prisustvo nesinonimnih substitucija nukleotida koje su vodile ka promijeni aminokiselinskog slijeda u sekvenci. Većinom su ove substitucije bile prisutne unutar veznog mjesta antigena. Broj aminokiselina koje su se razlikovale između alela varirao je od jedan do pet (BURNETT i GERAGHTY, 1995.; WAGNER i sur., 1995., 1996.a, c, 1998.; BURNETT i sur., 1997.; GRAUMANN i sur., 1998.;). Unutar DRB genskog mjesta otkriven je jedan izrazito polimorfan gen (DLA-DRB1) te jedan pseudogen (DLA-DRB2) (WAGNER i sur., 1996.b, c). Također, unutar DQ genskog mjesta utvrđen je jedan DQA gen ograničenog polimorfizma (WAGNER i sur., 1996.a), jedan polimorfni DQB gen te jedan DQB pseudogen (WAGNER i sur., 1998.). Mnogi geni DLA skupine II pokazali su se ortolognima s ljudskim HLA II genima (DEBENHAM i sur., 2005.). Jedna studija utvrdila je sličnost od 87% između nukleotida DLA-DRB1 i HLA-DRB1 (SARMIENTO i STORB, 1990.).

### **2.3.2. Genetička i molekularna građa DLA skupine I**

Ovu skupinu čini sedam genskih mjesta od kojih je šest smješteno na kromosomu 12, a jedan gen (DLA-79) smješten je na kromosomu 18 (BURNETT i GERAGHTY, 1995.; DUTRA i sur., 1996.). Otprilike 0,5Mb ove skupine nalazi se na kromosomu 35 te se smatra da je ova podjela u genomu nastupila prije podjele mesojeda na *Canidae* i *Felidae* (YUHKI i sur., 2007.). Tako je DLA skupina I za razliku od HLA skupine I raspoređena na čak tri kromosoma. Samo četiri od ovih sedam gena kodiraju funkcionalne MHC komplekse, a to su DLA-12, DLA-64, DLA-79 i DLA-88 (BURNETT i sur., 1997.). U skupinu klasičnih gena pripada samo izrazito polimorfan DLA-88 (GRAUMANN i sur., 1998.; WAGNER i sur., 2000.), dok ostali ne pokazuju tipične karakteristike te skupine (BURNETT i GERAGHTY, 1995.; BURNETT i sur., 1997.; GRAUMANN i sur., 1998.). Svi aleli gena DLA-88 pokazuju visok stupanj polimorfizma na području drugog i trećeg eksona, koji se sastoje od ustaljenih i hipervarijabilnih regija i kodiraju  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  domene veznog mjesta antigena (GRAUMANN i sur., 1998.; KENNEDY i sur., 2001.). Nedavno se pokazalo kako je polimorfnost DLA- 64 i DLA-12 ipak veća nego što se to prije smatralo (MIYAMAE i sur., 2017.). Tako pitanje kojoj od ove dvije skupine gena unutar DLA skupine I oni pripadaju, ostaje pod upitnikom do daljnjega. Gen DLA-79 smatrao se ne-klasičnim genom (BURNETT i GERAGHTY, 1995.; BURNETT i sur., 1997.; GRAUMANN i sur., 1998.), iako se kasnije pokazalo da ima umjeren stupanj polimorfizma zbog čega bi se

mogao svrstati među klasične gene (YUHKI i sur., 2007.). Za razliku od ostalih gena, ovaj gen pokazuje posebno visoku ekspresiju u mišićnom tkivu. Također, njegova proteinska struktura razlikuje se u dodatku jedne aminokiseline unutar  $\alpha 1$  domene veznog mjesta antigena. Posljedično, peptidi koji će se vezati također će imati drugačiju strukturu od peptida koji se vežu na ostale molekule ove skupine (BURNETT i GERAGHTY, 1995.). Ostali geni su pseudogeni koji ne pokazuju potpunu homolognost s drugim genima skupine I (BURNETT i sur., 1997.). Analizom kompletnog genoma pasmine bokser pokazalo se da je jedan od njih smješten na sedmom kromosomu (YUHKI i sur., 2007.).

Spomenuto je kako je pojava duplikacije MHC gena kod pasa izrazito rijetka i svedena na gene DLA skupine II. No, ovo se promijenilo kada je zamijećena moguća duplikacija DLA-88 gena, odnosno njegova dva alela (ROSS i sur., 2012.). Kasnije se pokazalo da se ovi aleli nalaze u području DLA-12 genskog mjesta te je moguće da pripadaju potencijalno novom genskom mjestu (MIYAMAE i sur., 2017.).

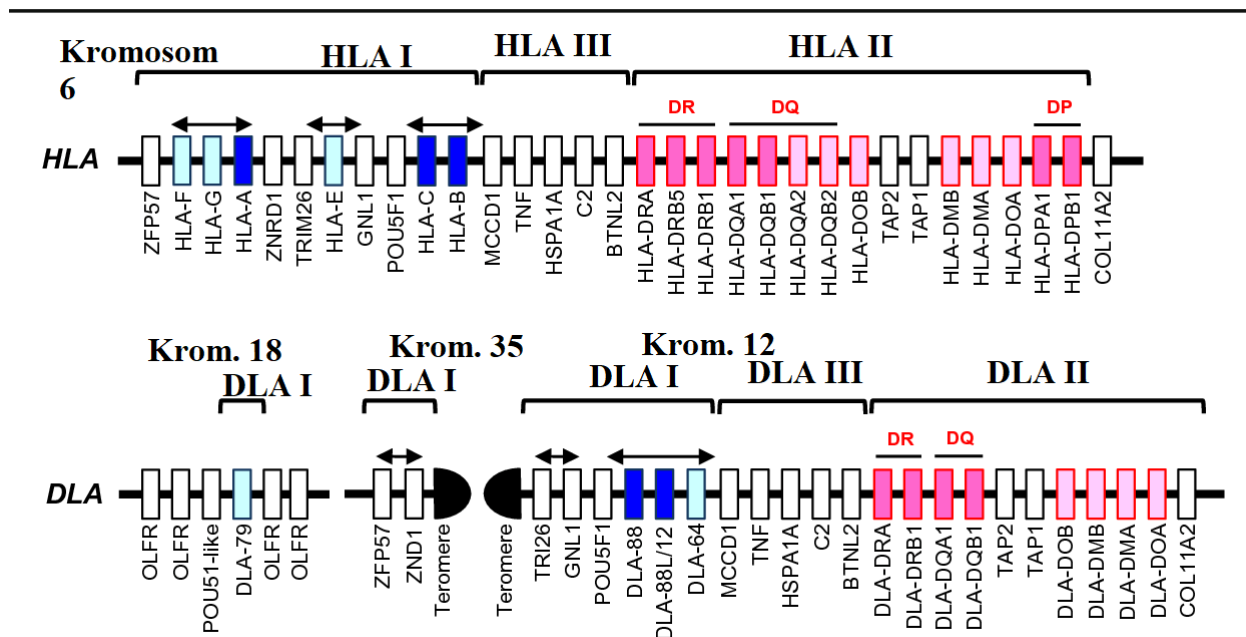
Molekularna struktura ove skupine prikazana je, prema dosadašnjim podacima, specifično kod pasa tek nedavno (XIAO i sur., 2016.). Kako je bilo i za očekivati, utvrđeno je da DLA I molekule pokazuju zajednička obilježja s MHC I molekulama ostalih sisavaca što se tiče topologije i organizacije domena (BJORKMAN i sur., 1987.; LIU i sur., 2011.). Teški  $\alpha$  lanac sastoji se od tri domene, te njegove dvije  $\alpha$  uzvojnice čine okvir koji omeđuje  $\beta$  ploču i tako zajedno formiraju žlijeb veznog mjesta antigena. Treća domena vezana je uz  $\beta 2$  mikroglobulin. U usporedbi sa strukturama MHC I molekula drugih kralježnjaka, pseća se pokazala izrazito slična ljudskoj MHC I molekuli (XIAO i sur., 2016.).

### **2.3.3. Genetička i molekularna građa DLA skupine II**

U početnim studijama bilo je utvrđeno prisustvo dva DRB genska mjesta, dva DQB genska mjesta, jedno DOB gensko mjesto (SARMIENTO i STORB., 1988.a) te jedno DRA i DPA gensko mjesto zajedno sa dva DQA mjesta (SARMIENTO i STORB, 1988.b). Daljnje analize DQA genskog mjesta nisu utvrdile duplikaciju ovog gena (WAGNER i sur., 1996.a), a ovo se potvrdilo i kasnije. Tada je i potvrđeno prisustvo DLA-DRA, DLA-DQA1, DLA-DQB1, DLA-DRB1 i DRB2 te pseudogena DLA-DQB2, DPA i dva DPB pseudogena (DEBENHAM i sur., 2005.). Ova potonja DP regija pokazala se kao nefunkcionalna kod pasa (DEBENHAM i sur., 2005.). Gen DLA-DRA1 pokazao se kao monomorf, dok su se DLA-DRB1, DQA1 i DQB1

geni pokazali polimorfizma (KENNEDY i sur., 1999.; 2000.) Struktura DLA II gena vrlo je dobro očuvana među sisavcima, te između ljudi i pasa postoji ortologna veza ovih gena (WAGNER i sur., 1999.). To znači da su ovi geni nastali tijekom razdvajanja vrsta i u jednom trenutku imali zajedničkog pretka (FITCH, 2000.). To nije slučaj kod DLA I skupine. Tu je svaki pojedini gen nastajao zasebno i specifično za vrstu (YUHKI i sur., 2007.).

Za razliku od opisane molekularne građe DLA I molekula, za ovu skupinu nisu pronađeni podatci osim onih već navedenih za istu skupinu kod ljudi. Sudeći prema već spomenutoj znatnoj sličnosti između građe DLA I i HLA I molekula, analogno bi se dalo zaključiti da će ovo biti slučaj i kod molekula DLA II skupine. Uz navedenu ortologiju HLA II i DLA II gena, u prilog ovome govori i činjenica da se za dokazivanje ekspresije DLA II molekula koriste monoklonalna ljudska protutijela koja pokazuju postojanje križne reakcije s ovim molekulama (DOVEREN i sur., 1985.; RIMMELZWAAN i sur., 1990.). Nadalje, zamijećena je nevjerojatna sličnost veznog mjesta antigena između jednog od alela DLA skupine I i alela HLA skupine I na temelju homolognosti sekvenci u području  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  domene i aminokiselinskih ostataka unutar ovog područja (BARTH i sur., 2016.).



**Slika 3.** Komparativni prikaz genetičke strukture i genomske pozicije HLA i DLA sustava. Prilagođeno iz MIYAMAE i sur., 2017.

#### 2.3.4. Polimorfnost DLA sustava

Polimorfnost DLA sustava značajno se razlikuje kada se promatra na razini pojedine pasmine i uspoređuje s njenom pojavom kroz različite pasmine unutar populacije. Naime, DLA sustav unutar jedne pasmine pokazuje puno manji stupanj polimorfnosti od polimorfnosti koja je prisutna među različitim pasminama. Ovo je potvrđeno jednim opsežnim istraživanjem na preko 80 različitih pasmina zajedno s grupom križanih pasmina. Raznolikost se temeljila na broju alela pojedinog genskog mjesta i broju njihovih kombinacija (haplotipova), kao i na frekvenciji tj. učestalosti njihovog pojavljivanja unutar pojedine grupe pasa. Naravno, zbog veće genetičke raznolikosti, broj alela i haplotipova pokazali su se većima kod križanih pasmina. S druge strane, kod većine čistokrvnih pasmina ova raznolikost bila je ograničena te je stupanj DLA homozigotnosti bio veći. Ovo potvrđuje visoki stupanj uzgoja u srodstvu kod velikog broja pasmina. Sklonost pojavi homozigota pokazale su rijede pasmine kao što su bichon frise, lhasa apso, leonberger, samojed i druge. Za razliku od njih, češće prisutne pasmine zastupljene u većim populacijama pokazale su sklonost pojavi heterozigota (njemački ovčar, labrador retriever, zlatni retriever i border colli).

Neki od alela i haplotipova pokazali su se gotovo karakterističnima samo za pojedinu pasminu, dok su drugi pokazali veću proširenost među različitim pasminama. Za nekoliko DRB1 alela pokazalo se da su prisutni kod velikog broja pasmina, iako je njihova zastupljenost primjetno varirala unutar pojedinačne pasmine. Tako je frekvencija za DRB1\*001 bila 3.8% kod vajmarskih ptičara, dok je kod zapadnoškotskih bijelih terijera ona bila čak 73.1% (KENNEDY i sur., 2002.a). Međupasminske varijacije toliko su znatne da se u nekim slučajevima pokazalo kako nema nikakvog poklapanja u alelima i haplotipovima između pojedinih pasmina, npr. dobermana i zapadnoškotskih bijelih terijera. Neke pasmine pokazale su veći raspon u broju alela i haplotipova, kao npr. već spomenute zastupljenije pasmine (KENNEDY i sur., 2002.a). Nasuprot tome, neke pasmine kao što su doberman i rottweiler pokazale su prisutnost svega dva DRB1 alela unutar čak 20 testiranih životinja (KENNEDY i sur., 2002.a).

Geni DQA1 i DQB1 imaju puno manji stupanj polimorfnosti od DRB1, ali njihove međupasminske varijacije pokazuju istu, već spomenutu dinamiku. Zanimljivo je što neki aleli dolaze u točno određenim kombinacijama s drugim alelima, dok neki mogu postojati u više različitih kombinacija (KENNEDY i sur., 2002.a). Jedan od mogućih razloga je, na primjeru kod ljudi, da pojedini alel upotpunjuje ulogu nekog alela na drugom genskom mjestu te je poželjno da se onda i pojavljuje s njim u kombinaciji (HIRAYAMA i sur., 1987.). Drugi mogući razlog je da postoji određena funkcionalna prednost pojedinih kombinacija alela nad ostalima (FESTENSTEIN i sur., 1986.; KWOK i sur., 1993.).

Pokretačke sile iza ovih međupasminskih varijacija postaju očite kada se osvrne na današnju uzgojnu praksu koja se razlikuje od nekadašnje. U početku se malo kada moglo spriječiti parenje pripitomljenih ženki s divljim psima tako da su starije populacije pasa bile izložene većem genetičkom materijalu i većem broju alela. Većina današnjih pasmina nastala je unazad 150 godina iz vrlo malog broja životinja koje su bile temelj za osnivanje pasmine, a česta praksa uzgajivača je da koriste jednog kvalitetnog mužjaka za oplodnju većeg broja ženki kako bi se njegov poželjni genetički materijal proširio kroz pasminu. Zato se može očekivati da će starije pasmine pasa imati veći raspon alela na pojedinim lokusima, za razliku od novijih pasmina kod kojih će ovo biti ograničeno (KENNEDY i sur., 1999.). Ovo je slučaj kod njemačkih ovčara i labradora za koje je poznato da postoje kao pasmina već preko 1000 godina (WAYNE, 1993.), te posjeduju veći broj alela od ostalih pasmina. Nadalje, ovo su vrlo popularne i zastupljene

pasmine što je razlog zašto broj životinja unutar ovih populacija nikada nije drastično pao i ugrozio genetičku raznolikost. Suprotno je slučaj kod rijetkih pasmina koje nikada nisu imale veliku populaciju na raspolaganju te je njihov broj znatno pao onog trena kada su prestale biti popularne. Ovo je rezultiralo gubitkom genetičke raznolikosti (KENNEDY i sur., 1999.) što se vidi iz već spomenute činjenice da je njihov stupanj homozigotnosti puno veći od onog kod zastupljenijih i popularnijih pasmina.

Kada promatramo polimorfnost DLA sustava u populaciji pasa potrebno je uzeti u obzir i geografsko područje pojedinih populacija. Čini se da će raspon varijacija DLA gena biti to veći što će više pasa biti obuhvaćeno s različitih geografskih područja. Tako se pokazalo za neke alele i haplotipove koji su bili specifični za pojedine pasmine (papillon i shih tzu), da su prisutni i kod križanih pasmina s područja Brazila (KENNEDY i sur., 2002.b). Ovo je pokazalo i istraživanje na vukovima gdje se utvrdilo da vukovi s područja Kanade pokazuju veći stupanj varijacija DLA alela i haplotipova od vukova s područja Aljaske (KENNEDY i sur., 2007.a).

Što se tiče polimorfnosti DLA I gena, ona nije toliko opsežno proučena kao kod DLA II gena. Dosadašnja istraživanja ipak mogu uputiti na sličnost s dinamikom polimorfnosti DLA II gena. U DLA I skupini također postoji jedan gen (DLA-88) koji je polimorniji od ostalih (MIYAMAE i sur., 2017.), te se međupasminska varijabilnost ovog gena pokazala većom od one unutar jedne pasmine. Nadalje, neki aleli pokazali su se dominantnima unutar jedne pasmine dok su kod druge bili zastupljeni u vrlo malom stupnju ili nisu bili uopće prisutni (ROSS i sur., 2012.). Stupanj homozigotnosti također je pratio već potvrđeni stupanj od 33-44% za DLA II gene (KENNEDY i sur., 2002.a; KENNEDY i sur., 2007.b; ROSS i sur., 2012.). U odnosu na DLA II haplotipove, pokazalo se da određeni haplotip dolazi u kombinaciji s različitim DLA-88 alelima i da će u pravilu unutar jedne pasmine biti moguća samo jedna od tih kombinacija (KENNEDY i sur., 2012.).

#### **2.4. Klinička važnost HLA sustava u patogenezi bolesti**

Populacijska istraživanja koja su provedena zadnjih par desetljeća navela su niz bolesti kod ljudi koje su prepoznatljivo češće kod pojedinaca koji su nosioci određenih alela. Tako je spondilitis povezan s HLA-B alelima, jedan HLA-DQB1 alel povezan je s narkolepsijom te su neki HLA-DRB1 aleli povezivani sa seropozitivnim reumatoidnim artritismom (HOLOSHITZ, 2013.). Mehanizam u pozadini ove povezanosti HLA sustava i bolesti nije u potpunosti razjašnjen te bi



se većina pretpostavki mogla svrstati u dvije kategorije. Prva govori o tzv. „zamijenjenom identitetu“ gdje se bolest naizgled povezuje s određenim alelom, a zapravo je glavni krivac drugo gensko mjesto ili alel s kojim prvi dolazi u kombinaciji unutar haplotipa. Druga podrazumijeva prezentiranje antigena i upućuje na imunoreaktivnost na vlastite antigene zbog poremećaja prilikom selekcije repertoara T limfocita, križna imunoreaktivnost sa stranim antigenima ili imunoreaktivnost na promijenjene vlastite antigene (OLDSTONE, 1998.; NEPOM i KWOK, 1998.; HOLOSHITZ, 2013.; YIN i sur., 2013.). Primjer za prvu kategoriju je nasljedna hemokromatoza za koju se mislilo da je povezana s HLA-A alelima te se kasnije utvrdilo da je zapravo povezana s mutacijom jednog ne-klasičnog HLA I gena koji je vezan za te alele (CARDOSO i sur., 2002.). Drugu kategoriju pretpostavki teško je potvrditi jer postoje brojne zapreke koje onemogućuju direktnu povezanost bolesti s prezentiranjem specifičnih antigena od strane HLA-sustava. Neki aleli nisu vezani isključivo uz jednu bolest i mogu biti povezani i s bolestima koje ne dijele patogenezu, ciljna tkiva niti antigene. Nadalje, neki aleli nisu niti vrsno specifični i povezivani su sa sličnim bolestima kod različitih vrsta (TANEJA i sur., 2007.). Zadnje, ova povezanost alela zamijećena je i kod stanja koja uopće ne uključuju prepoznavanje antigena niti bilo kakvu imunološku patogenezu (NISHINO i sur., 2010.). Svi ovi navedeni ograničavajući čimbenici vodili su do novih teorija koje bi mogle objasniti vezu HLA sustava i bolesti. Jedna od aktualnijih je teorija koja u centar stavlja jednu polimorfnu regiju HLA molekula koja je u obliku šiljka te je očuvana kroz cijelu MHC porodicu. Ova regija kodira za ligande specifične za svaki alel, koji aktiviraju različite signalizacijske puteve vežući se s receptorima izvan HLA sustava. Promjene u ovim putevima mogle bi biti uzrok bolestima koje su vezane uz HLA sustav (DE ALMEIDA i HOLOSHITZ, 2011.). Ovaj šiljasti dio HLA I molekule nalazi se unutar  $\alpha 2$  domene i ekvivalentan je  $\beta 1$  domeni HLA II molekula. Ovakve strukture očuvane su kroz cijelu porodicu MHC gena bez obzira imaju li oni ili nemaju ulogu u prezentiranju antigena (RUDOLPH i sur., 2006.). Pokazale su se kao ligandi za NK receptore kod klasičnih i ne-klasičnih HLA I molekula, što znači da njihova uloga ne ovisi o prezentiranju antigena (BOYINGTON i sur., 2000.). Kod HLA I i HLA II molekula ta šiljasta regija obuhvaća hipervarijabilne regije alela. Tako se prema ovoj teoriji smatra da HLA molekule mogu dovesti do bolesti zbog svojih bioloških učinaka koji su specifično vezani uz same alele, neovisno o tome prezentiraju li antigen ili ne (HOLOSHITZ, 2013.).

Povezanost HLA sustava i pojedinih bolesti znatno se razlikuje unutar različitih istraživanja i opsežne analize pokazale su da se, u najboljem slučaju, u daljnjim istraživanjima može ponoviti ne više od pola dobivenih rezultata. Kao razlozi navode se greške u genotipizaciji, loš izbor kontrolnih skupina, neuzimanje u obzir povezanost gena unutar haplotipova, različite frekvencije alela unutar populacija i drugi (DORAK, 2009.). Ovo je posebno problem kod zaraznih bolesti gdje postoji vrlo malen broj onih za koje bi se ta uzročno-posljedična veza HLA sustava i obilježja bolesti mogla potvrditi. Ovdje će biti opisane neke od bolje istraženih zaraznih bolesti te navedene neke bolesti drugih etiologija, a koje pokazuju povezanost s HLA sustavom u patogenezi.

#### **2.4.1. Zarazne bolesti**

Za dostatan imunološki odgovor na neki patogen, HLA molekula mora vezati peptide patogena proteinskog podrijetla te repertoar T limfocita mora uključivati točno one klonove stanica koje mogu biti aktivirane od strane ovih peptida vezanih na HLA molekulu. Ukoliko bilo koji od ovih uvjeta nije ispunjen, pojedinac koji nosi određenu kombinaciju alela može postati podložniji određenoj bolesti od onoga koji ima drugačiju kombinaciju alela (KLEIN i SATO, 2000.; HILL, 1998.).

Jedan od boljih primjera ove otpornosti je povezanost HLA I i HLA II alela sa zaštitom od teških oblika malarije u Africi. Tamo su infekcije ovim parazitom razmjerno česte, iako je stopa smrtnosti djece pogođene kompliciranim oblikom bolesti (malarijskom ili cerebralnom anemijom) niska. Tipiziranje tamošnje populacije pokazalo je frekvenciju HLA-B\*53 alela od 25% među zdravim ljudima i djecom s blagim oblikom bolesti. Ovaj alel je rijedak među neafričkim populacijama. Nasuprot ovome, frekvencija ovog alela je 15% među pacijentima s teškim oblikom malarije. Može se pretpostaviti da ovaj alel vrlo učinkovito veže peptide podrijetlom parazitskog proteina i predočuje ih točno određenim CD8<sup>+</sup>T-limfocitima. Potonje potvrđuje nalaz ovih citotoksičnih stanica kod pacijenata te izolacija peptida sporozoit iz HLA-B\*53 molekula. Posjedovanje određenog DRB1/DQB haplotipa također je povezano sa zaštitom od malarijske anemije. Neki drugi HLA I i HLA II aleli povezivani su s otpornošću prema malariji kod ostalih afričkih populacija (HILL, 1998.; GILBERT i sur., 1998.; KLEIN i SATO, 2000.; LOPEZ i sur., 2010.). Kod malarije nedostatak jake i jasne povezanosti HLA sustava i bolesti posljedica je njene specifične biologije koja umanjuje važnost HLA sustava. Naime,

parazit se većinom ne nalazi slobodno u krvi nego opstaje u unutarstaničnim oblicima u eritrocitima. Eritrocit je kao ciljna stanica primamljiv zbog svojeg hranjivog sadržaja u obliku željeza i proteina, ali također zbog nedostatka HLA ekspresije nakon enukleacije (VILLARTAY i sur., 1985.). Tako je on u nemogućnosti obraditi i prikazati antigenske peptide i započeti stečeni imunološki odgovor (CSERTI-GAZDEWICH i sur., 2011. ).

Jedna od zaraznih bolesti koja pokazuje ustaljenu povezanost s HLA sustavom je infekcija virusom humane imunodeficijencije (*eng. human immunodeficiency virus*, HIV) i stečeni sindrom imunodeficijencije (*eng. acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS). Opsežne genomske studije poduprle su prethodno zabilježena genetičko-epidemiološka istraživanja koja su navela ulogu HLA alela kod različitih obilježja HIV infekcije. Tako svi dostupni dokazi upućuju na HLA kao najznačajnije genomsko mjesto u kontroli ove bolesti unutar ljudske populacije. Uzevši u obzir teoriju heterozigotne prednosti, bilo bi za očekivati da će HLA homozigotni pojedinci puno brže napredovati do AIDS-a od heterozigotnih pojedinaca. Ova pretpostavka potvrđena je u jednom od istraživanja gdje se pokazalo da je HLA I homozigotnost u visokom stupnju povezana s brzim napretkom bolesti do AIDS-a. Ovome doprinose sva tri genska mjesta pojedinačno te je učinak najviše bio naglašen kod pojedinaca koji su bili homozigoti za dva ili sva tri genska mjesta. Sve u svemu, ovi podatci ukazuju nam na puno učinkovitiji i specifičniji CTL odgovor na patogen od strane HLA heterozigota, budući da su oni u stanju prepoznati širi spektar virusnih peptida. Također, moguće je i da virusu treba dulje vrijeme kako bi nagomilao mutacije potrebne da izbjegne imunološki odgovor kod heterozigota. Još jedna od mogućih teorija vezana je uz prednost rijetkih alela, koja tvrdi da se HIV prilagođava na alele koji su učestali u populaciji. Ti aleli imaju veliku vjerojatnost pojavljivanja kod homozigota. S druge strane, za heterozigote je vjerojatnije da će nositi rijetke alele u kombinaciji s učestalima, te su ovi pojedinci sposobniji obuzdati virus koji se na rijetke alele nije dobro prilagodio (MARTIN i CARRINGTON, 2013.). U novijim istraživanjima pokazalo se da je ekspresija nekih alela HLA-A i HLA-B lokusa povezana s većom koncentracijom virusa u organizmu, smanjenim brojem CD4+T-limfocita i bržom progresijom do sindroma stečene imunodeficijencije (RAMSURAN i sur., 2018.). Neki od HLA-B alela (\*B27 i \*B57) snažno su pak vezani uz sporo napredovanje prema AIDS-u (KASLOW i sur., 1996.). Pojačana ekspresija HLA-C lokusa povezuje se sa smanjenom koncentracijom HIV-a u organizmu (APPS i sur., 2013.). Zamijećen je i utjecaj međudjelovanja određenih genskih mjesta HLA skupine I i

receptora NK stanica na kontrolu HIV infekcije (RAMSURAN i sur., 2018.). Neke studije potvrđuju da bi i HLA skupina II mogla imati utjecaj na kontrolu HIV infekcije (JULG i sur., 2011.; RANASINGHE i sur., 2013.). Tako se pokazala povezanost nekih DRB1 alela s većom ili manjom koncentracijom virusa (ORIOLO-TORDERA i sur., 2017.). Neke od novijih spoznaja povezale su i ulogu regulatornih T-limfocita u kroničnim virusnim infekcijama zajedno s ovim zaštitnim HLA-B alelima. Pokazalo se da su CTL, koji su specifični i ograničeni na zaštitne alele, puno otporniji prema potiskivanju aktivacije od strane regulatornih T-limfocita nego CTL ograničeni na alele koji nemaju zaštitnu ulogu kod infekcije. Izostanak CTL potiskivanja kod pojedinaca koji su nosioci zaštitnih alela, omogućava ovim stanicama neprekidnu proliferaciju i uklanjanje inficiranih stanica tijekom kronične infekcije. Ovime bi se moglo objasniti odgođeno napredovanje bolesti kod ovakvih pacijenata (ELAHI i HORTON, 2012.).

Druga bolest koja je opsežno proučavana kroz globalnu populaciju je virusni hepatitis B i C. Istraživana je povezanost HLA sustava sa sklonošću i otpornošću prema bolesti, težinom bolesti, odgovorom na terapiju interferonom i cijepljenje (SINGH i sur., 2007.). Povezanost HLA I gena s ishodom infekcije virusom hepatitisa C (*eng. hepatitis C virus, HCV*) detaljno je istražena kod različitih etničkih populacija te su zabilježeni kontradiktorni rezultati zbog etničkih i geografskih razlika (MOSAAD i sur., 2010.). Zanimljivo je što postoji zaprepašujuće podudaranje nekih HLA alela povezanih s eliminacijom virusa kod HIV i HCV infekcija. Ovo se odnosi najviše na HLA-B\*27, jer se za ostale nisu pokazali održivi rezultati što bi se moglo povezati s razlikama u virusnim sekvencama kod određenih subpopulacija. Aleli HLA-B\*27 i B\*57 identificirani su kao zaštitni aleli kod HIV kao i kod HCV infekcija. Brojna su moguća objašnjenja za ovu zajedničku učinkovitost. Moguće je da su oba alela vezana uz druge gene u istom haplotipu, te da su ti geni odgovorni za ovaj učinak. Druga mogućnost je da obje HLA molekule odabiru epitope koji imaju utjecaj na sposobnost opstanka virusa. Treće, moguće je da je povezanost ovih alela samo posljedica određene prevalencije gena u populaciji. U svakoj populaciji vjerojatnije je da će jedinke biti manje izložene rijetkim alelima i da će posljedično za njih i selekcija biti umanjena, pogotovo u onim populacijama u kojima je prevalencija određene bolesti tek nedavno porasla (PETROVIC i sur., 2012.).

#### **2.4. 2. Autoimune bolesti**

Snažna povezanost HLA sustava i autoimunoloških bolesti utvrđivana je već preko 50 godina. Za nekoliko ovih bolesti utvrđena je povezanost HLA-DRB1-DQA1-DQB1 haplotipova. To su reumatoidni artritis, dijabetes tip 1 i Gravesova bolest. Kako ovi geni HLA II skupine imaju ulogu u prezentiranju izvanstaničnih antigena pomoćničkim T-limfocitima, tako možemo pretpostaviti važnost ovih imunoloških puteva u započinjanju i napredovanju autoimunoloških bolesti. Osim HLA II skupine, s nekim bolestima povezivan je i HLA I. Ovo uključuje izrazitu povezanost HLA-B genskog mjesta s dijabetesom tip 1 te HLA-C genskog mjesta s multiplom sklerozom i Gravesovom bolesti. Za razliku od HLA II, HLA I ima ulogu u prezentiranju unutarstaničnih antigena i njegova uloga kod nekih od ovih bolesti može uputiti na virusnu ili bakterijsku ulogu te na CTL ulogu u nastupu autoimunoloških bolesti (GOUGH i SIMMONDS, 2007.).

#### **2.5. Klinička važnost DLA sustava u patogenezi bolesti**

Domaći pas, zbog svoje izrazite genetske homogenosti i posljedičnog značajnog rizika za razvoj određenih bolesti, predstavlja idealnu vrstu za razjašnjavanje genetičkih i okolišnih čimbenika koji stoje u pozadini etio-patologije velikog broja bolesti. Odavno je zamijećeno od strane veterinara kao i uzgojnih organizacija da neke bolesti predstavljavaju bitan problem kod određenih pasmina. One uključuju autoimunološke reakcije, preosjetljivost, podložnost raznim infekcijama, tumore, neuspješna cijepljenja te cijepljene nezgode (KENNEDY i sur., 2012.). Nadalje, mnoge pseće bolesti homologne su s velikim brojem ljudskih poremećaja (OSTRANDER i sur., 2000.). Zbog navedenog, uloga domaćeg psa kao modela u istraživanjima ovih bolesti; u potpunosti je jedinstvena.

##### **2.5.1. Autoimune bolesti**

Najranija istraživanja DLA sustava kroz svijetlo psećih autoimunoloških bolesti započela su još 1990. na temelju primjećene povezanosti jednog alela s pojavom sistemskog lupusa kod njemačkih ovčara (TEICHNER i sur., 1990.). Od tada su istražene i brojne druge bolesti od kojih većina pokazuje izrazitu kliničku sličnost s određenim bolestima kod ljudi (KENNEDY i sur., 2012.). Jedan od mnogih primjera je povezanost DQ i DR lokusa sa sklonošću i otpornošću na tip 1 dijabetes kod ljudi (ERLICH i sur., 2008.). Većina ovih bolesti pojavljuje se kod raznih pasmina pasa, iako dosta njih pokazuje veću prevalenciju kod točno određenih pasmina dok su kod drugih izrazito rijetke. Tako se pokazalo da samojeđi nose puno veći rizik za pojavu

dijabetesa melitusa, dok je on kod boksera izrazito rijedak; ako se uopće i pojavi (CATCHPOLE i sur., 2008.). Neki od alela predstavljaju rizik za istu bolest kod puno različitih pasmina, dok su neki ograničeni na određene pasmine. Ovo je slučaj kod limfocitnog tiroiditisa gdje je DLA-DQA1\*00101 rizičan alel među mnogim pasminama, a određeni DRB1/DQA1/DQB1 haplotip povezan je s bolešću kod dobermana i velikog šnaučera (KENNEDY i sur., 2006.a; WILBE i sur., 2010.a). S druge strane, neki aleli i haplotipovi pokazuju povezanost s više različitih bolesti. Jedan od DLA II haplotipova primjećen je kod dijabetesa (KENNEDY i sur., 2006.b) i Addisonove bolesti (HUGHES i sur., 2010.), a dva od tri genska mjesta ovog haplotipa primjećena su i kod imunoposredovane hemolitičke anemije (KENNEDY i sur., 2006.c). Jedan od DQA1 alela povezan je sa simetričnom lupoidnom onihodistrofijom (WILBE i sur., 2010.b), limfocitnim tiroiditisom (KENNEDY i sur., 2007.c) i analnom furunkulozom (KENNEDY i sur., 2006.a; KENNEDY i sur., 2008.; BARNES i sur., 2009.; WILBE i sur., 2010.a.).

### **2.5.2. Zarazne bolesti**

Za razliku od ljudi, kod kojih je uloga MHC sustava u patogenezi zaraznih bolesti uvelike priznata, kod domaćih pasa ovo još nije ni u začetku. Istraživanja povezanosti DLA sustava i virusnih zaraznih bolesti (bjesnoća, parvovirusni enteritis i štenecak) provedena su na vukovima, iako se mogu smatrati samo kao preliminarne smjernice zbog malog broja uzorkovanih životinja (KENNEDY i sur., 2011.) i previsokog koeficijenta uzgoja u srodstvu koji ne daje pravu sliku ove povezanosti (HEDRICK i sur., 2003.). Genotipizacija roditelja i njihova tri legla meksičkih vukova provedena je nakon što su zamijećena uginuća od parvovirusnog enteritisa i štenecaka. Broj uzorkovanih životinja bio je vrlo mali i genotipizacija je provedena na samo dva alela, te se nije uspjelo doći do nekih značajnih poveznica DLA sustava i ovih bolesti (HEDRICK i sur., 2003.). Spomenuta dva alela nađena su u prijašnjem istraživanju (HEDRICK i sur., 2000.) kada je proučavana razina genetskih varijacija za DRB1 gen. Nađena su dva alela, *Calu-1* i *Calu-2*. Pokazala su se znatno različitima, budući da su se razlikovali u čak deset aminokiselina od njih 69. Većina ovih razlika bila je prisutna unutar PBR-a što upućuje na snažan utjecaj ravnotežne selekcije, koja je moguće bila vezana uz otpornost na patogene (HEDRICK i sur., 2000.). Zbog genetičke strukture roditelja u spomenutom istraživanju koje je slijedilo, samo je u jednom leglu jedno štene bilo homozigot za ove alele. Ovo onemogućava proučavanje mogućeg djelovanja heterozigotne prednosti unutar populacija. Spomenuto leglo oboljelo je od štenecaka. Od testiranih štenadi jedno je preživjelo i bilo je heterozigot, dok su ostala dva uginula. Od uginulih

štenadi, jedan je bio heterozigot i drugi je bio homozigot. U ostala dva legla oboljela od parvovirusnog enteritisa sva su štenad bila heterozigoti. U prvom leglu troje štenadi je uginulo i dvoje ih je preživjelo. U drugom leglu dvoje štenadi je uginulo, a dvoje ih je preživjelo. Frekvencije za oba alela bile su podjednake kod roditelja i kod njihovih potomaka (HEDRICK i sur., 2003.).

Još jedno iznimno važno kliničko područje koje je kod pasa podistraženo je utjecaj DLA sustava na cijeplni odgovor. Do sada je već više puta naglašena važnost i uloga MHC sustava u imunološkom odgovoru. Hiporeaktivni imunološki odgovor na cijeplni antigen može voditi do infekcija i proboja imunosti (EK-KOMMONEN i sur., 1997.), dok hiperreaktivni odgovor (TIZARD, 1996.) utječe na učestalost cijepljenja i pojavu popratnih reakcija (TJALVE, 1997.). Ključna uloga u stečenom imunološkom odgovoru je varijabilnost polimorfnih MHC gena, pogotovo MHC II alela i haplotipova. Razumijevanje ovog genetičkog sustava može biti važno ukoliko želimo upravljati mehanizmima ovih imunoloških odgovora, potaknuti zaštitnu imunost na bolesti te poboljšati izradu cijepliva i strategiju cijepljenja (KENNEDY i sur., 2011.). Kod nekih domaćih životinja već se potvrdila uloga MHC sustava kod cijepljenja. Istraživanja na govedima pokazala su da su cijeplna zaštita kao i njen izostanak, povezani s polimorfnošću DRB3 gena ovog sustava (GLASS, 2004.). Uspoređivanje titra protutijela kod etiopijskih vukova cijepljenih protiv bjesnoće s njihovim DLA II haplotipovima, pokazalo je jedan koji je bio vezan uz nešto slabiji odgovor na cijepljenje (KENNEDY i sur., 2011.). Kod pasa se pokazalo da je ovaj odgovor pod pasminskim utjecajem, (KENNEDY i sur., 2007.d), što nije začuđujuće s obzirom na već spomenuti izražen međupasminski polimorfizam DLA sustava. U navedenom istraživanju zamijećen je slabiji cijeplni odgovor kod dobermana i rottweilera. Zanimljivo je što se upravo ove pasmine navode kao one koje imaju nisku genetičku varijabilnost i vrlo malen broj različitih DLA alela, što je već napomenuto.

Ostale bolesti koje se navode kao one koje su povezane s DLA sustavom, pripadaju parazitarnim bolestima. Jedna studija povezala je DRB1\*01502 alel sa značajno većom razinom imunoglobulin G protutijela kod visceralne lišmanioze, te većom vjerojatnosti za pozitivan PCR (*eng. polymerase chain reaction*, PCR) nalaz. Aleli DQA1 i DQB1 nisu pokazali značajnu povezanost. Zamijećena je veća genetička povezanost s imunološkim i parazitarnim fenotipom, nego s kliničkim fenotipom. Razlog ovome mogli bi biti nespecifični simptomi kod ove bolesti,

ali i mogućnost postojanja veće genetičke kontrole nad infektivnom dozom nego nad patološkim učincima bolesti. Mogućnost pojave već spomenutog „zamijenjenog identiteta“ alela mogla bi se isključiti, s obzirom na izostanak povezanosti pojedinačnih DQA1 i DQB1 alela. Deset pasa koji su postali inficirani nosili su ovaj DRB1alel i svi su bili heterozigoti. Zanimljivo je i što se taj alel većinom pojavljivao u točno određenom haplotipu s ostalim alelima. U ovom istraživanju još je jednom potvrđena razlika u frekvenciji alela s obzirom na geografsko područje pojedinih populacija. Ovo ne bi trebalo utjecati na rezultate, budući da aleli koji su pokazivali značajne razlike u frekvenciji; nisu bili pojedinačno povezani s ovom bolesti (QUINELL i sur., 2003.). Povezanost DLA sustava zamijećena je i kod juvenilne generalizirane demodikoze kod boksera, argentinskog mastifa i križanih pasmina. U ovom istraživanju korištena su tri mikrosatelitna markera koja odgovaraju različitim mjestima unutar ove kromosomne regije, odnosno prisutnim alelima na tom području. Cilj je bio prvenstveno odrediti područje unutar DLA sustava koje je usko vezano uz bolest, kako bi se u budućnosti mogli izabrati specifični geni za genotipizaciju. Dva markera imala su poziciju blizu područja DQB1 genskog mjesta, dok je treći bio puno udaljeniji. Sve tri grupe pokazale su visoki stupanj povezanosti određenih alela s ovom bolesti. Neki od alela bili su prisutni samo kod oboljelih pasa unutar svake grupe, dok su sasvim drugi aleli bili prisutni kod njihovih kontrolnih skupina. Nadalje, neki od alela bili su značajno češće prisutni samo kod mastifa što je potvrdilo već spomenutu izrazitu međupasminsku varijabilnost DLA sustava. Pokazalo se da ovi aleli kod mastifa pripadaju području genoma koje je puno udaljenije od DQB1 mjesta, što nije bio slučaj kod druge dvije grupe (IT i sur., 2010.).



### 3. ZAKLJUČCI

1. Genomska pozicija HLA sustava, je na šestom kromosomu, dok je DLA sustav razdijeljen na čak tri različita kromosoma.
2. Najveći stupanj polimorfnosti zamijećen je u području veznog mjesta antigena, kako kod ljudi tako i kod pasa.
3. Molekularna građa DLA II skupine do danas nije istražena, iako bi se na temelju prethodno navedenog dalo pretpostaviti da je i ona vrlo slična HLA II skupini.
5. Unutar DLA I skupine prisutan je znatno manji polimorfizam gena od polimorfizma gena DLA II skupine, iako je i broj ovih istraživanja puno manji nego kod DLA II skupine.
6. Kompleksnost genetičke strukture DLA skupine I je znatna s obzirom na postojanje duplikacije DLA-88 gena ili mogućeg postojanja novog genskog mjesta, te njenu raspodjelu na još dva dodatna kromosoma. Vrlo vjerojatno ovo utječe na sliku polimorfnosti gena, te su potrebna detaljnija istraživanja kako bi ona postala jasnija.
7. Mnoge autoimune bolesti pasa koje se povezuju s DLA sustavom homologne su sa sličnim poremećajima kod ljudi, zbog čega on predstavlja vrijedan model u istraživanjima. Uputno bi bilo istražiti vrijedi li ovo i za zarazne bolesti.
8. Kod pasa je prisutan opširan međupasminski polimorfizam i vrlo ograničen pasminski polimorfizam. Očituje se kroz postojanje haplotipova, alela i njihovih frekvencija specifičnih za pojedinu pasminu, te dolazak pojedinih alela u točno određenim kombinacijama s drugim alelima u haplotipu. Ovo otežava istraživanja povezanosti pojedinačnih alela s utjecajem na zarazne bolesti.
9. Buduća istraživanja na psima trebala bi se temeljiti na grupama pasa formiranih prema pasminama ili na grupama križanaca, te određivanju utjecaja na bolesti kako pojedinačnih alela tako i haplotipova u kojima oni dolaze.

10. Slabiji cijepni odgovor kod dobermana i rotweilera može biti posljedica njihove vrlo slabe genetičke raznolikosti DLA sustava. Istraživanja na ovom području mogla bi unaprijediti imunoprofilaksu zaraznih bolesti pasa.

#### 4. LITERATURA

1. ABBAS, A. K., A. H. LICHTMAN (2006-2007): Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, Updated Edition, Elsevier Inc. NY, USA, 11, 161-177.
2. AGUADO, B., C. M. MILNER, R. D. CAMPBELL (1996): Genes of the MHC class III region and the functions of the proteins they encode. U: HLA and MHC: Genes, Molecules and Function (Browning, M., A. McMichael, ur.), Bios Scientific Publishers, Oxford, UK, 9–76.
3. AMMER, H., F. W. SCHWAIGER, C. KAMMBERBAUER, M. GOMOLKA, A. ARRIENS, S. LAZARY, J. T. EPPLIN (1992): Exonic polymorphism vs intronic simple repeat hypervariability in MHC-DRB genes. Immunogenetics. 35, 332-340.
4. ANDREIS, I., D. BATINIĆ, F. ČULO, D. GRČEVIĆ, M. MARUŠIĆ, M. TARADI, D. VIŠNJIĆ (2004): Imunologija, Medicinska naklada, Zagreb
5. APANIUS V., D. PENN, P. R. SLEV, L. R. RUFF, W. K. POTSS (1997): The nature of selection on the major histocompatibility complex. Crit. Rev. Immunol. 17, 179–224.
6. APPS, R., Y. QI, J. M. CARLSON, H. CHEN, X. GAO, R. THOMAS, Y. YUKI, G. Q. DEL PRETE, P. GOULDER, Z. L. BRUMME, C. J. BRUMME, M. JOHN, S. MALLAL, G. NELSON, R. BOSCH, D. HECKERMAN, J. L. STEIN, K. A. SODERBERG, M. A. MOODY, T. N. DENNY, X. ZENG, J. FANG, A. MOFFETT, J. D. LIFSON, J. J. GOEDERT, S. BUCHBINDER, G. D. KIRK, J. FELLAY, P. McLAREN, S. G. DEEKS, F. PEREYRA, B. WALKER, N. L. MICHAEL, A. WEINTROB, S. WOLINSKY, W. LIAO, M. CARRINGTON (2013): Influence of HLA-C expression level on HIV control. Science. 340, 87-91.
7. BARNES, A., T. O'NEILL, L. J. KENNED, A. D. SHORT, B. CATCHPOLE., A. HOUSE., M. BINNS, N. FRETWELL, M. J. DAY, W. E. OLLIER (2009): Association of canine anal furunculosis with TNFA is secondary to linkage disequilibrium with DLA-DRB1. Tissue Antigens. 73, 218-224.
8. BARTH, S. M., C. M. SCHREITMÜLLER, F. PROEHL, K. OEHL, L. M. LUMPP, D. J. KOWALEWSKI, M. DI MARCO, T. STURM, L. BACKERT, H. SCHUSTER, S. STEVANOVIĆ, H. G. RAMMENSEE, O. PLANZ (2016): Characterization of the Canine MHC Class I DLA-88\*50101 peptide binding motif as a prerequisite for canine T Cell immunotherapy. PLoS ONE. 11, e0167017.

9. BAUER, K. H. (1927): Homeotransplantation von Epidermis bei eineiigen Zwillingen. Beitr. Khn. Chir. 141, 442-447.
10. BECK, S., D. GERAGHTY, H. INOKO, L. ROWEN, B. AGUADO, S. BAHRAM, R. D. CAMPBELL, S. A. FORBES, T. GUILLAUX, L. HOOD, R. HORTON, M. JANER, C. JASONI, A. MADAN, S. MILNE, M. NEVILLE, A. OKA, S. QIN, G. RIBAS-DESPUIG, J. ROGERS, T. SHIINA, T. SPIES, G. TAMIYA, H. TASHIRO, J. TROWSDALE, Q. VU, L. WILLIAMS, M. YAMAZAKI (1999): Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. Nature. 401, 921-923.
11. BERGGREN BREMDAL, K. (2010): Evolution of MHC genes and MHC gene expression. Phd Thesis, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
12. BERNATCHEZ, L., C. LANDRY (2003): MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? J. Evol. Biol. 16, 363–377.
13. BJORKMAN, P. J., M. A. SAPER, B. SAMRAOUI, W. S. BENNETT, J. L. STROMINGER, D. C. WILEY (1987): Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature. 329, 506-512.
14. BLACK, F. L., F. M. SALZANO (1981): Evidence for heterosis in the HLA system. Am. J. Hum. Genet. 33, 894–899.
15. BOYINGTON, J. C., S. A. MOYOTKA, P. SCHUCK, A. G. BROOKS, P. D. SUN (2000): Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. Nature . 405, 537–543.
16. BROWN, J. H., T. S. JARDETZKY, J. C. GORGA, L. J. STERN, R. G. URBAN, J. L. STROMINGER, C. D. WILEY (1993): Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. Nature 364, 33–39.
17. BULL R. W., H. M. VRIESENDORP, R. CECH, H. GROSSE WILDE, A. M. BIJMA, W. L. LADIGES, K. KRUMBACHER, I. DOXIADIS, H. EJIMA, J. TEMPLETON, E. D. ALBERT, R. STORB, H. J. DEEG (1987): Joint report of the Third International Workshop of Canine Immunogenetics. II. Analysis of the serological typing of cells. Transplantation. 43, 154-161.
18. BURNETT, R. C., D. E. GERAGHTY (1995): Structure and expression of a divergent canine class I gene. J. Immunol. 155, 4278-4285.

19. BURNETT, R. C., S. A. DEROSE, J. L. WAGNER, R. STORB (1997): Molecular analysis of six dog leukocyte antigen (DLA) class I sequences including three complete genes, two truncated genes, and one full-length processed gene. *Tissue Antigens*. 49, 484-495.
20. CARDOSO, C. S., H. ALVES, M. MASCARENHAS, R. GONÇALVES, P. OLIVEIRA, P. RODRIGUES, E. CRUZ, M. DE SOUSA, G. PORTO (2002): Co-selection of the H63D mutation and the HLA-A29 allele: a new paradigm of linkage disequilibrium? *Immunogenetics*. 53, 1002–1008.
21. CATCHPOLE, B., L. J. KENNEDY, L. J. DAVISON, W. E. R. OLLIER (2008): Canine diabetes mellitus: from phenotype to genotype. *Journal of Small Animal Practice*. 49, 4-10.
22. CHICZ, R. M., R. G. URBAN, W. S. LANE, J. C. GORGA, L. J. STERN, D. A. VIGNALI, J. L. STROMINGER (1992): Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature*. 358, 764-768.
23. CHICZ, R. M., R. G. URBAN, J. C. GORGA, D. A. VIGNALI, W. S. LANE, J. L. STROMINGER (1993): Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 178, 27- 47.
24. CRESSWELL, P. (1994): Assembly, transport and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293.
25. CRESSWELL, P., N. BANGIA, T. DICK, G. DIEDRICH (1999): The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunological Reviews*. 172, 21-28.
26. CSERTI-GAZDEWICH, C. M., W. R. MAYR, W. H. DZIK (2011): *Plasmodium falciparum* malaria and the immunogenetics of ABO, HLA, and CD36 (platelet glycoprotein IV). *Vox Sang.* 100, 99–111.
27. DANCHIN, E. G. J., V. VITIELLO, A. VIENNE, O. RICHARD, P. GOURET, M. F. MCDERMOTT, P. PONTAROTTI (2004): The major histocompatibility complex origin. *Immunol. Rev.* 198, 216–232.
28. DAUSSET, J. (1958): Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.* 20, 156–166.

29. DE ALMEIDA, D. E., J. HOLOSHITZ (2011): MHC molecules in health and disease: at the cusp of a paradigm shift. *Self Nonself*. 2, 43-48.
30. DEBENHAM, S. L., E. A. HART, J. L. ASHURST, K. L. HOWE, M. A. QUAIL, W. E. R. OLLIER, M. M. BINNS (2005): Genomic sequence of the class II region of the canine MHC: comparison with the MHC of other mammalian species. *Genomics*. 85, 48-59.
31. DEEG, H. J., R. F. RAFF, H. GROSSE WILDE, A. M. BIJMA, W. A. BUURMAN, G. SCHOCH, WESTBROEK, D. L., R. W. BULL, R. STORB (1986): Joint report of the Third International Workshop on Canine Immunogenetics. I. Analysis of homozygous typing cells. *Transplantation*. 41, 111-117.
32. DOHERTY, P. C., R. M. ZINKERNAGEL (1975): Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature*. 25, 50-52.
33. DORAK, M. T. (2009): Statistical analysis in HLA and disease association studies. Internet. Dostupno na: <http://www.dorak.info/hla/stat.html>. Pristupljeno: 27.9.2018.
34. DOVEREN, R. F. C., W. A. BUURMAN, B. SCHUTTE, G. GROENEWEGEN, C. J. VAN DER LINDEN (1985): Class II antigens on canine T lymphocytes. *Tissue Antigens*. 25, 255-265.
35. DOXIADIS, I., K. KRUMBACHER, J. J. NEEFJES. H. L. PLOEGH, H. GROSSE-WILDE (1989): Biochemical evidence that the DLA-B locus codes for class II determinant expressed on all canine peripheral blood lymphocytes. *Exp. Clin. Immunogenet*. 6, 219-224.
36. DOXIADIS, G. G. M., I. HOOF, N. DE GROOT, R. E. BONTROP (2012): Evolution of HLA-DRB Genes. *Mol. Biol. Evol.* 29, 3843-3853.
37. DUTRA, A. S., E. MIGNOT, J. M. PUCK (1996): Gene localization and syntenic mapping by FISH in the dog. *Cytogenet. Cell. Genet.* 74, 113-117.
38. EK-KOMMONEN, C., L. SIHVONEN, K. PEKKANEN, U. RIKULA, L. NUOTIO (1997): Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet. Rec.* 141, 380–383.
39. ELAHI, S., H. HORTON (2012): Association of HLA-alleles with the immune regulation of chronic viral infections. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 44, 1361–1365.
40. ELLIS, S. A, R. E. BONTROP, D. F. ANTCZAK, K. BALLINGALL, C. J. DAVIES, J. KAUFMAN, L. J. KENNEDY, J. ROBINSON, D. M. SMITH, M. J. STEAR, R. J.

- STET, M. J. WALLER, L. WALTER, S. G. MARSH (2006): ISAG/IUIS-VIC Comparative MHC Nomenclature Committee. ISAG/IUIS-VIC Comparative MHC Nomenclature Committee report, 2005. *Immunogenetics*. 57, 953-958.
41. EPSTEIN R. B., R. STORB., H. RAGDE, E. D. THOMAS (1968): Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs. *Transplantation*. 6, 45-58.
  42. ERLICH, H., A. M. VALDES, J. NOBLE, J. A. CARLSON, M. VARNEY, P. CONCANNON, J. C. MYCHALECKYJ, J. A. TODD, P. BONELLA, A. L. FEAR, E. LAVANT, A. LOUEY, P. MOONSAMY (2008): HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*. 57, 1084-1092.
  43. FESTENSTEIN, H., J. AWAD, G. A. HITMAN, S. CUTBUSH, A. V. GROVES, P. CASSELL, W. OILLIER, J. A. SACHS (1986): New HLA DNA polymorphisms associated with autoimmune diseases. *Nature*. 322, 64–67.
  44. FITCH, W. M. (2000): Homology a personal view on some of the problems. *Trends Genet*. 16, 227–231.
  45. GILBERT, S. C., M. PLEBANSKI, S. GUPTA, J. MORRIS, M. COX, M. AIDOO, D. KWIATKOWSKI, B. M. GREENWOOD, H. C. WHITTLE, A. V. HILL (1998): Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. *Science*. 279, 1173–1177.
  46. GLASS, E. J. (2004): Genetic variation and responses to vaccines. *Anim. Health. Res. Rev*. 5, 197–208.
  47. GOLUB, E. S., D. R. GREEN (1991): *Immunology: A synthesis*, 2nd ed, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
  48. GORER, P. A. (1936): The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Journal of Experimental Biology*. 17, 42-46.
  49. GORER, P.A. (1937): The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *Journal of Pathology & Bacteriology* . 44, 691-697.
  50. GOUGH, S. C. L., SIMMONDS, M. J. (2007): The HLA region and autoimmune disease: associations and mechanisms of action. *Curr. Genomics*. 8, 453–465.
  51. GRAUMANN, M. B., S. A. DEROSE, E. OSTRANDER, R. STORB (1998): Polymorphism analysis of four canine class I genes. *Tissue Antigens*. 51, 978-982.

52. GUILLEMOT, F., P. TURMEL, D. CHARRON, N. LE DOUARIN, C. AUFRAY (1986): Structure, biosynthesis, and polymorphism of chicken MHC class II (B-L) antigens and associated molecules. *J. Immunology*. 137, 1251-1257.
53. HEDRICK, P. W. (1994): Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *Am. Nat.* 143, 945-964.
54. HEDRICK, P. W., G. THOMPSON (1983): Evidence for balancing selection at HLA. *Genetics* . 104, 449–456.
55. HEDRICK, P. W., T. S. WHITTAM, P. PARHAM (1991): Heterozygosity at individual amino-acid sites-extremely high-levels for HLA-A and HLA-B genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88, 5897-5901.
56. HEDRICK, P. W., R. N. LEE, K. M. PARKER (2000): Major histocompatibility complex (MHC) variation in the endangered Mexican wolf and related canids. *Heredity*. 85, 617–624.
57. HEDRICK, P. W., N. R. LEE, C. BUCHANAN (2003): Canine parvovirus enteritis, canine distemper, and major histocompatibility complex genetic variation in Mexican Wolves. *Journal of Wildlife Diseases*. 39, 909-913.
58. HILL, A. V. S. (1998): The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 593-617.
59. HIRAYAMA, K., S. MATSUSHITA, I. KIKUCHI, M. IUCHI, N. OHTA, T. SASAZUKI (1987): HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response to schistosomal antigen in humans. *Nature*. 327, 426-430.
60. HOLOSHITZ, J. (2013): The quest for better understanding of HLA-disease association: scenes from a road less travelled by. *Discov. Med.* 16, 93–101.
61. HUGHES, A. L., M. NEI (1988): Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class-I loci reveals overdominant selection. *Nature*. 335, 167-170.
62. HUGHES, A. L., M. NEI (1989): Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class-II loci-evidence for overdominant selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86, 958-962.
63. HUGHES, A. L., M. K. HUGHES (1995): Natural selection on the peptide-binding regions of major histocompatibility complex molecules. *Immunogenetics* 42, 233-243.



64. HUGHES, A. L., M. YEAGER (1998): Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annu. Rev. Genet.* 32, 415-434.
65. HUGHES, A. M., P. JOKINEN, D. L. BANNASCH, H. LOHI, A. M. OBERBAUER (2010): Association of a dog leukocyte antigen class II haplotype with hypoadrenocorticism in Nova Scotia Duck Tolling Retrievers. *Tissue Antigens.* 75, 684-690.
66. HUNT, D. F., H. MICHEL, T. A. DICKINSON, J. SHABANOWITZ, A. L. COX, K. SAKAGUCHI, E. APELLA, H. M. GREY, A. SETTE (1992): Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I. *Ad Science.* 256, 1817-1820.
67. IT, V., L. BARRIENTOS, J. LOPEZ GAPPA, D. POSIK, S. DIAZ, C. GOLIJOW, G. GIOVAMBATTISTA (2010): Association of canine juvenile generalized demodicosis with the dog leukocyte antigen system. *Tissue Antigens.* 76, 67-70.
68. JULG, B., E. S. MOODLEY, Y. QI, D. RAMDUTH, S. REDDY, Z. MNCUBE, X. GAO, P. J. GOULDER, R. DETELS, T. NDUNG'U, B. D. WALKER, M. CARRINGTON (2011): Possession of HLA class II DRB1\*1303 associates with reduced viral loads in chronic HIV-1 clade C and B infection. *J. Infect. Dis.* 203, 803-809.
69. KAPPES, D., J. L. STROMINGER (1988): Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 991-1028.
70. KASLOW, R. A., M. CARRINGTON, R. APPLE, L. PARK, A. MUNOZ, A. J. SAAH, J. J. GOEDERT, C. WINKLER, S. J. O'BRIEN, C. RINALDO, R. DETELS, W. BLATTNER, J. PHAIR, H. ERLICH, D. L. MANN (1996): Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.* 2, 405-411.
71. KELLY, A., S. H. POWIS, L. A. KERR, I. MOCKRIDGE, T. ELLIOT, J. BASTIN, B. UCHANSKA-ZIEGLER, A. ZIEGLER, J. TROWSDALE, A. TOWNSEND (1992): Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* . 355, 641-644.
72. KENNEDY, L. J., L. ALTET, J. M. ANGLES, A. BARNES, S. D. CARTER, O. FRANCINO, J. A. GERLACH, G. M. HAPP, W. E. OLLIER, A. POLVI, W. THOMSON, J. L. WAGNER: (1999): Nomenclature for factors of the dog major

- histocompatibility system (DLA), 1998. First report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *International Society for Animal Genetics. Tissue Antigens.* 54, 312–321.
73. KENNEDY, L. J., L. ALTET, J. M. ANGLES, A. BARNES, S. D. CARTER, O. FRANCINO, J. A. GERLACH, G. M. HAPP, W. E. OLLIER, A. POLVI, W. THOMSON, J. L. WAGNER (2000): Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 1998. First report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *Anim. Genet.* 31, 52–61.
  74. KENNEDY, L. J., J. M. ANGLES, A. BARNES, S. D. CARTER, O. FRANCINO, J. A. GERLACH, G. M. HAPP, W. E. THOMSON, J. L. WAGNER (2001): Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 2000: Second report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *Tissue Antigens.* 58, 55-70.
  75. KENNEDY, L. J., A. BARNES, G. M. BARNES, R. J. QUINELL, D. BENNETT, J. M. ANGLES, M. J. DAY, N. CARMICHAEL, J. F. INNES, D. ISHERWOOD, S. D. CARTER, W. THOMSON, W. E. R. OLLIER (2002a): Extensive interbreed, but minimal intrabreed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs. *Tissue Antigens.* 59, 194–204.
  76. KENNEDY, L. J., A. BARNES, G. M. HAPP, R. J. QUINNELL, O. COURTENAY, S. D. CARTER, W. E. R. OLLIER, W. THOMSON (2002b): Evidence for extensive DLA-polymorphism in different dog populations. *Tissue Antigens.* 60, 43–52.
  77. KENNEDY, L. J., H. J. HUSON, J. LEONARD, J. M. ANGLES, L. E. FOX, J. W. WOJCIECHOWSKI, C. YUNCKER, G. M. HAPP (2006a): Association of hypothyroid disease in Doberman Pinscher Dogs with a rare major histocompatibility complex DLA class H haplotype. *Tissue Antigens.* 67, 53-56.
  78. KENNEDY, L. J., L. J. DAVISON, A. BARNES, A. D. SHORT, N. FRETWELL, C. A. JONES, A. G. LEE, W. E. R. OLLIER, B. CATCHPOLE (2006b): Identification of susceptibility and protective major histocompatibility complex (MHC) haplotypes in canine diabetes mellitus. *Tissue Antigens.* 68, 467-476.
  79. KENNEDY, L. J., A. BARNES, W. E. R. OLLIER, M. J. DAY (2006c): Association of a common DLA class H haplotype with canine primary immune-mediated haemolytic anaemia. *Tissue Antigens.* 68, 502-506.

80. KENNEDY, L. J., J. M. ANGLES, A. BARNES, L. E. CARMICHAEL, A. D. RADFORD, W. E. R. OLLIER, G. M. HAPP (2007a): DLA-DRB1, DQA1, and DQB1 alleles and haplotypes in North American Gray Wolves. *Journal of Heredity*. 98, 491–499.
81. KENNEDY, L. J., A. BARNES, A. SHORT, J. J. BROWN, S. LESTER, J. SEDDON, L. FLEEMAN, O. FRANCINO, M. BRKLJAČIĆ, S. KNYAZEV, G. M. HAPP, W. E. R. OLLIER (2007b): Canine DLA diversity: 1. New alleles and haplotypes. *Tissue Antigens*. 69, 272–88.
82. KENNEDY, L. J., A. BARNES, A. D. SHORT, J. J. BROWN, J. M. SEDDON, L. M. FLEEMAN, M. BRKLJACIC, G. M. HAPP, B. CATCHPOLE, W. E. R. OLLIER (2007c) Canine DLA diversity: 3. Disease studies. *Tissue Antigens*. 69, 292-296.
83. KENNEDY, L. J., M. LUNT, A. BARNES, L. MCELHINNEY, A. R. FOOKS, D. N. BAXTER, W. E. OLLIER (2007d): Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies. *Vaccine*. 25, 8500–8507.
84. KENNEDY, L. J., T. O'NEILL, A. HOUSE, A. BARNES, K. KYOSTILA, J. INNES, N. FRETWELL, M. J. DAY, B. CATCHPOLE, H. LOHI, W. E. R. OLLIER (2008): Risk of anal furunculosis in German Shepherd dogs is associated with the major histocompatibility complex. *Tissue Antigens*. 71, 51-56.
85. KENNEDY, L. J., D. A. RANDALL, D. KNOBEL, J. J. BROWN, A. R. FOOKS, K. ARGAW, F. SHIFERAW, W. E. OLLIER, C. SILLERO-ZUBIRI, D. W. MACDONALD, M. K. LAURENSEN (2011): Major histocompatibility complex diversity in the endangered Ethiopian wolf (*Canis simensis*). *Tissue Antigens*. 77, 118-125.
86. KENNEDY, L. J., E. R. WILLIAM, E. M. OLLIER, J. L. WAGNER, R. F. STORB (2012): Canine immunogenetics. U: *The Genetics of the Dog*, 2nd Edition. (Ostrander, E. A., A. Ruvinsky, ur.), CAB International, Oxfordshire, UK, 91-135.
87. KENNETH, L. R., C. GRAMM, L. ROTHSTEIN, K. CLARK, R. STEIN, L. DICK, D. HWANG, A. L. GOLDBERG (1994): Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 78, 761-771.

88. KENNETH, L. R., E. REITS, J. NEEFJES (2016): Series: The Biology of Antigen Presentation. Present yourself! By MHC class I and MHC class II molecules. Trends in Immunology. 37, 724-737.
89. KLEIN, J. (1980): Generation of diversity at MHC loci: implications for T-cell repertoires. U: Immunology 80. (Fougereau M., J. Dausset, ur.), Academic press, London, 239-253.
90. KLEIN, J. (1986): Natural History of the Major Histocompatibility Complex, Wiley & Son, New York.
91. KLEIN, J., F. FIGUEROA (1986): Evolution of the major histocompatibility complex. Critical Reviews in Immunology. 4, 295-386.
92. KLEIN, J., A. SATO (2000): The HLA system. N. Engl. J. Med. 343, 782–786.
93. KNAPP, L. A. (2005): The ABCs of MHC. Evolutionary Anthropology. 14, 28 –37.
94. KRUMBACHER, K., M. J. M. VAN DER FELTZ, M. HAPPEL, C. GERLACH, L. K. LOSSLEIN, H. GROSSE-WILDE (1986): Revised classification of the DLA loci by serological studies. Tissue Antigens. 27, 262-268.
95. KULSKI, J. K., H. INOKO (2005): Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes. U: Encyclopedia Of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd. USA. 1-8.
96. KWOK, W. W., S. KOVATS, P. THURTLIE, G. T. NEPOM (1993): HLA-DQ polymorphisms constrain patterns of class II heterodimer formation. J.Immunol. 150, 2263-2272.
97. LITTLE, C. C., E. E. TYZER (1915-1916): Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a transplantable tumor, carcinoma (J.w.A) of the Japanese waltzing mouse. J. Med. Res. 33, 393-453.
98. LITTLE, A. M., P. PARHAM (1999): Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. Rev. Immunogenet. 1, 105-123.
99. LIU, J. LIU, L. DAI, J. QI, F. GAO, Y. FENG, W. LIU, J. YAN, G. F. GAO (2011): Diverse peptide presentation of rhesus macaque major histocompatibility complex class I Mamu-A 02 revealed by two peptide complex structures and insights into immune escape of simian immunodeficiency virus. J. Virol. 85, 7372–7383.
100. LÓPEZ, C., C. SARAIVA, A. GOMEZ, J. HOEBEKE, M. A. PATARROYO (2010): Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. Gene. 2, 1-12.

101. MADDEN, D. R. (1995): The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 587-622.
102. MARKOW, T., P. W. HEDRICK, K. ZUERLEIN, J. DANILOVS, J. MARTIN, T. VYVIAL, C. ARMSTRONG (1993): HLA polymorphism in the Havasupai: evidence for balancing selection. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 943–952.
103. MARTIN, M. P., M. CARRINGTON (2013): Immunogenetics of HIV disease. *Immunol. Rev.* 254, 245–64.
104. MEDAWAR, P. B. (1946): Behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits (report to the War Wounds Committee of the medical Research Council). *J. Anat.* 78, 176-199.
105. MEHRA, N. K. (2005): Histocompatibility Antigens. U: *Encyclopedia Of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd. USA, 1-6.
106. MEYER, D., G. THOMSON (2001): How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. *Annals of Human Genetics.* 65, 1-26.
107. MICHALEK, M.T., E.P. GRANT, C. GRAMM, A.L. GOLDBERG, K.L. ROCK (1993): A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature.* 363, 552-554.
108. MIYAMAE, J., S. SUZUKI, F. KATAKURA, S. UNUOL, M. TANAKA, M. OKANO, T. MATSUMOTO, J. K. KULSKI, T. MORITOMO, T. SHIINA (2017): Identification of novel polymorphism and two distinct haplotype structures in dog leukocyte antigen class I genes: DLA-88, DLA-12 and DLA-64. *Immunogenetics.* 70, 237-255.
109. MOSAAD, Y. M., FARAG, R. E., M. M. ARAFA, S. ELETREBY, H. A. EL-ALFY, B. S. ELDEEK, Z. M. TAWHID (2010): Association of human leucocyte antigen Class I (HLA-A and HLA-B) with chronic hepatitis C virus infection in Egyptian patients. *Scand. J. Immunol.* 72, 548–553.
110. NEEFJES, J., M. L. M. JONGSMA, P. PAUL, O. BAKKE (2011): Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology.* 11, 823–836.
111. NEPOM, G. T, W. W. KWOK (1998): Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes.* 47, 1177–1184.

112. NEVO, E., A. BEILES (1992): Selection for class II MHC heterozygosity by parasites in subterranean mole rats. *Experientia*. 48, 512–515.
113. NEWCOMB J. R., P. CRESSWELL (1993): Characterization of endogenous peptides bound to purified HLA-DR molecules and their absence from invariant chain-associated  $\alpha\beta$  dimers. *J. Immunol.* 150, 499–507.
114. NISHINO, S., M. OKURO, N. KOTORII, E. ANEGAWA, Y. ISHIMARU, M. MATSUMARA, T. KANBAYASHI (2010): Hypocretin/orexin and narcolepsy: new basic and clinical insights. *Acta Physiol. (Oxf)*. 198, 209–222.
115. NOMENCLATURE FOR FACTORS OF THE HLA SYSTEM (1975): *Bull World Health Organ.* 52, 261–265.
116. OHNO, S. (1970): *Evolution by Gene Duplication*, Springer, Berlin, Heidelberg.
117. OLDSTONE, M. B. (1998): Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J.* 12, 1255–1265.
118. ORIOL-TORDERA, B., A. LLANO, C. GANOZA, S. CATE, W. HILDEBRAND, J. SANCHEZ, M. L. CALLE, C. BRANDER, A. OLVERA (2017): Impact of HLA-DRB1 allele polymorphisms on control of HIV infection in a Peruvian MSM cohort. *HLA*. 90, 234–237.
119. OSTRANDER, E. A, F. GALIBERT, D. F. PATTERSON (2000): Canine genetics comes of age. *Trend. Genet.* 16, 117–124.
120. PAMER, E., P. CRESSWELL (1998): Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 323–358.
121. PARHAM, P., D. A. LAWLOR, C. E. LOMEN, P. D. ENNIS (1989b): Diversity and diversification of HLA-A, B, C alleles. *Journal of Immunology*. 142, 3937–3950.
122. PATERSON, S. (1998): Evidence for balancing selection at the major histocompatibility complex in a freeliving ruminant. *J. Hered.* 89, 289–294.
123. PETROVIC, D., E. DEMPSEY, D. G. DOHERTY, D. KELLEHER, A. LONG (2012): Hepatitis C virus-T-cell responses and viral escape mutations. *Eur. J. Immunol.* 42, 17–26.
124. PIERTNEY, S. B, M. K. OLIVER (2006): The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*. 96, 7–21.

125. PUZA, A., P. RUBINSTEIN., S. KASAKURA., S. VLAHOVIC., J. W. FERREBEE (1964): The production of isoantibodies in the dog by immunization with homologous tissue. *Transplantation*. 2, 722-725.
126. QUINELL, R. J., L. J. KENNEDY, A. BARNES, O. COURTENAY, C. DYE, Garcez, L. M. GARCEZ, M. A. SHAW, S. D. CARTER, W. THOMSON, W. E. OLLIER (2003): Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*. 55, 23-28.
127. RAMSURAN, V., V. NARANBHAI, A. HOROWITZ, Y. QI, M. P. MARTIN, Y. YUKI, X. GAO, V. WALKER-SPERLING, G. Q. DEL PRETE, D. K. SCHNEIDER, J. D. LIFSON, J. FELLAY, S. G. DEEKS, J. N. MARTIN, J. J. GOEDERT, S. M. WOLINSKY, N. L. MICHAEL, G. D. KIRK, S. BUCHBINDER, D. HAAS, T. NDUNG'U, P. GOULDER, P. PARHAM, B. D. WALKER, J. M. CARLSON, M. CARRINGTON (2018): Elevated HLA-A expression impairs HIV control through inhibition of NKG2A-expressing cells. *Science*. 359, 86–90.
128. RANASINGHE, S., S. CUTLER, I. DAVIS, R. LU, D. Z. SOGHOIAN, Y. QI, J. SIDNEY, G. KRANIAS, M. FLANDERS, M. LINDQVIST, B. KUHL, G. ALTER, S. G. DEEKS, B. D. WALKER, X. GAO, A. SETTE, M. CARINNGTON, H. STREECK (2013): Association of HLA-DRB1-restricted CD4+ T cell responses with HIV immune control. *Nat. Med.* 19, 930-933.
129. RAYMOND, C. K, A. KAS, M. PADDOCK, R. L. QIU, Y. ZHOU, S. SUBRAMANIAN, J. CHANG, A. PALMIERI, E. HAUGEN, R. KAUL, M. V. OLSON (2005): Ancient haplotypes of the HLA class II region. *Genome Research*. 15, 1250-1257.
130. REITS, E., A. GRIEKSPoor, J. NEIJSEN, T. GROOTHUIS, K. JALINK, P. VAN VELEN, H. JANSSEN, J. CALAFAT, J. WOUTER DRIJFHOUT, J. NEEFJES (2003): Peptide Diffusion, Protection, and Degradation in Nuclear and Cytoplasmic Compartments before Antigen Presentation by MHC Class I. *Immunity*. 18, 97-108.
131. RIMMELZWAAN, G. F., M. C. M. POELEN, R. H. MELOEN, J. CARLSON, F. G. C. M. UYTDEHAAG, A. D. M. E. OSTERHAUS (1990): Delineation of canine parvovirus T cell epitopes with peripheral blood mononuclear cells and T cell clones from immunized dogs. *Journal of General Virology*. 71, 2321-2329.

132. RITTE, U., E. NEUFELD, E. O'HUIGIN, F. FIGUEROA, J. KLEIN (1991): Origins of H-2 polymorphism in the house mouse: II. Characterization of a model population and evidence for heterozygote advantage. *Immunogenetics*. 34, 164–173.
133. RUBINSTEIN, P., J. W. FERREBEE (1964): Efforts to differentiate isohemagglutinins in the dog. *Transplantation*. 2, 734-742.
134. RUDENSKY, A. Y., P. PRESTON-HULBURT, S. C. HONG, A. BARLOW, C. A. JANEWAY JR. (1991): Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*. 353, 622-27.
135. RUDOLPH, M. G., STANFIELD, R. L., I. A. WILSON (2006): How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 419–466.
136. SARMIENTO, U. M., R. F. STORB (1988a): Restriction fragment length polymorphism of the major histocompatibility complex of the dog. *Immunogenetics*. 28, 117– 124.
137. SARMIENTO, U. M., R.F. STORB (1988b): Characterisation of class II alpha genes and DLA-D region allelic associations in the dog. *Tissue Antigens*. 32, 224–234.
138. SARMIENTO, U. M., R. STORB (1989): RFLP analysis of DLA class I genes in the dog. *Tissue Antigens*. 34, 158-163.
139. SARMIENTO, U. M., R. STORB (1990): Nucleotide sequence of a dog class I cDNA clone. *Immunogenetics*. 31, 400-404.
140. SARMIENTO, U. M., J. I. SARMIENTO, R. STORB (1990): Allelic variation in the DR subregion of the canine major histocompatibility complex. *Immunogenetics*. 32, 13-19.
141. SARMIENTO, U. M., S. DEROSE, J. I. SARMIENTO, R. STORB (1992): Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: I. DQA. *Immunogenetics*. 35, 416-420.
142. SARMIENTO, U. M., S. DEROSE, J. I. SARMIENTO, R. STORB (1993): Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: II. DQA. *Immunogenetics*. 37, 148-152.
143. SCHUMACHER, N. M., T. M. T. HEEMELS, J. J. NEEFJES, W. M. KAST, C. J. M. MELIEF, H. L. PLOEGH (1990): Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro. *Cell*. 62, 563-567.



144. SINGH, R., R. KAUL, A. KAUL, K. KHAN (2007): A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J. Gastroenterol.* 13, 1770–1787.
145. SNELL, G. D. (1948): Methods for the study of histocompatibility genes. *Journal of Genetics.* 49, 87-108.
146. SNELL, G. D. (1951): A fifth allele on the histocompatibility-2 locus of the mouse as determined by tumor transplantation. *Journal of the National Cancer Institute.* 11, 1299-1305.
147. SNELL, G. D., G. F. HIGGINS (1951): Alleles at the histocompatibility-2 locus in the mouse as determined by tumor transplantation. *Genetics.* 36, 306-310.
148. STERN, L. J., J. H. BROWN, T. S. JARDETZKY, J. C. GORGA, R. G. URBAN, J. L. STROMINGER, D. C. WILEY (1994): Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature.* 368, 215-221.
149. SURI, A., S. B. LOVITCH, E. R. UNANUE: (2006): The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. *Current Opinion in Immunology.* 1, 70-77.
150. TANEJA,V., M. BEHRENS, A. MANGALAM, M. M. GRIFFITHS, H. S. LUTHRA, C. S. DAVID (2007): New humanized HLA-DR4-transgenic mice that mimic the sex bias of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56, 69–78.
151. TANKESHWAR, A. (2017): Difference between MHC Class I and MHC Class II Proteins. Internetska stranica. Dostupno na <https://microbeonline.com/difference-mhc-class-mhc-class-ii-proteins/> . Zadnji put pristupljeno 30. 9. 2018.
152. TEICHNER, M., Krumbacher, K. KRUMBACHER, I. DOXIADIS, G. DOXIADIS, C. FOURNEL, D. RIGAL, J. C. MONIER, H. GROSSE-WILDE (1990): Systemic lupus erythematosus in dogs: association to the major histocompatibility complex class I antigen DLA-A7. *Clinical Immunology and Immunopathology.* 55, 255-262.
153. TEMPLETON, J.W., E. D. THOMAS (1971): Evidence for a major histocompatibility locus in the dog. *Transplantation.* 11, 429-431.
154. THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM (1999): Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature.* 401, 921-923.

155. TIZARD, I. R. (1996): Vaccination and vaccines. U: Veterinary Immunology, 5th ed., W. B. Saunders, London.
156. TJALVE, H. (1997): Adverse reactions to veterinary drugs reported in Sweden during 1991–1995. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 20, 105–110.
157. UNANUE, E. R., V. TURK, J. NEEFJES (2016): Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Annual Review of Immunology*. 34, 265-297.
158. VAN OOSTERHOUT, C. (2009): Trans-species polymorphism, HLA-disease associations and the evolution of the MHC. *Communicative & Integrative Biology*. 2, 408-410.
159. VILLARTAY, J. P., P. ROUGER, J. Y. MULLER, C. SALMON (1985): HLA antigens on peripheral red blood cells: analysis by flow cytofluorometry using monoclonal antibodies. *Tissue Antigens*. 26, 12–19.
160. VRIESENDORP, H. M., C. ROTHENGATTER, E. BOS, D. L. WESTBROEK, J. J. VAN ROOD (1971): The production and evaluation of dog allolymphocytotoxins for donor selection in transplantation experiments. *Transplantation*. 11, 440-445.
161. VRIESENDORP, H. M., D. L. WESTBROEK, J. D'AMARO, J. A. VAN DER DOES, G. J. VAN DER STEEN, J. J. VAN ROOD, E. ALBERT, L. BERNINI, R. W. BULL, J. CABASSON, R. B. EPSTEIN, V. ERIKSON, T. E. FELTKAMP, H. D. FLAD, C. HAMMER, R. LANG, F. LARGIADER, K. VON LORINGHOVEN, W. LOS, P. MEERA KHAN, R. SAISON, B. SERROU, H. SCHNAPPAUF, S. N. SWISHER, J. W. TEMPLETON, G. UHLSCHMIDT, A. ZWEIBAUM (1973): Joint report of First International Workshop on Canine Immunogenetics. *Tissue Antigens*. 3, 145-163.
162. VRIESENDORP, H. M., E. D. ALBERT, J. W. TEMPLETON, S. BELOTSKY, B. TAYLOR, D. A. BLUMENSTOCK, R. W. BULL, F. D. CANNON, R. B. EPSTEIN, J. W. FERREBEE, H. GROSSE-WILDE, C. HAMMER, K. KRUMBACHER, S. LEON, P. MEERA KHAN, M. R. MICKEY, M. MOTOLA, E. T. RAPAPORT, R. SAISON, H. SCHNAPPAUF, S. SCHOLZ, M. L. SCHROEDER, R. STORB, R. WANK, D. L. WESTBROEK, A. ZWEIBAUM (1976): Joint report of the Second International Workshop on Canine Immunogenetics. *Transplantation Proceedings*. 8, 289-314.
163. WAGNER, J. L. (2003): Molecular organization of the canine major histocompatibility complex. *Journal of Heredity*. 94, 23-26.
164. WAGNER, J. L., S. A. DEROSE, R. C. BURNETT, R. STORB (1995): Nucleotide sequence and polymorphism analysis of canine DRA cDNA clones. *Tissue Antigens*. 45, 284-287.
165. WAGNER, J. L., R. C. BURNETT, S. A. DEROSE, R. STORB (1996a): Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQA gene. *Tissue Antigens*. 48, 199-204.

166. WAGNER, J. L., R. C. BURNETT, R. STORB (1996b): Molecular analysis of the DLA DR subregion. *Tissue Antigens*. 48, 549-553.
167. WAGNER, J. L., R. C. BURNETT, J. D. WORKS, R. STORB (1996c): Molecular analysis of DLA-DRB1 polymorphism. *Tissue Antigens*. 48, 554-561.
168. WAGNER, J. L., B. HAYES-LATTIN, J. D. WORKS, R. STORB (1998): Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQB genes. *Tissue Antigens*. 52, 242-250.
169. WAGNER, J. L., R. C. BURNETT, R. STORB (1999): Organization of the canine major histocompatibility complex: Current perspectives. *J. Hered.* 90, 35-38.
170. WAGNER, J. L., CREER, S. A., R. STORB (2000): Dog class I gene DLA-88 histocompatibility typing by PCR-SSCP and sequencing. *Tissue Antigens*. 55, 564-567.
171. WAYNE, R. K. (1993): Molecular evolution of the dog family. *Trends in Genetics*. 9, 218-224.
172. WILBE, M., K. SUNDBERG, I. R. HANSEN, E. STRANDBERG, R. F. NACHREINER, A. HEDHAMMAR, L. J. KENNEDY, G. ANDERSSON, S. BJORNERFELDT (2010a): Increased genetic risk or protection for canine autoimmune lymphocytic thyroiditis in Giant Schnauzers depends on DLA class II genotype. *Tissue Antigens*. 75, 712-719.
173. WILBE, M., M. L. ZIENER, A. ARONSSON, C. HARLOS, K. SUNDBERG, E. NORBERG, L. ANDERSSON, K. LINDBLAD-TOH, A. HEDHAMMAR, G. ANDERSSON, F. LINGAAS (2010b): DLA class II alleles are associated with risk for canine symmetrical lupoid onychodystrophy [corrected](SLO). *PLoS One*. 5, e12332.
174. WILLIAMSON, P., F. W. NICHOLAS, G. J. STEWART (1989): Restriction fragment length polymorphism analysis of dog class II major histocompatibility complex genes. *Transplantation Proceedings*. 21, 3751-3752.
175. XIAO, J., W. XIANG, Y. CHAI, J. HAYWOOD, J. QI, L. BA, P. QI, M. WANG, J. LIU, G. F. GAO (2016): Diversed anchoring features the peptide presentation of DLA-88\*50801: first structural insight into domestic dog MHC class I. *J. Immunol.* 197, 2306-2315.
176. YIN, L., S. DAI, G. CLAYTON, W. GAO, Y. WANG, J. KAPPLER, P. MARRACK (2013): Recognition of self and altered self by T cells in autoimmunity and allergy. *Protein Cell*. 4, 8-16.
177. YUHKI, N., S. J. O'BRIEN (1997): Nature and origin of polymorphism in feline MHC class II DRA and DRB genes. *J. Immunol.* 158, 2822-2833.

## 5. SAŽETAK

Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC) određen je najpolimorfnijom skupinom gena u kralježnjaka, koji kodiraju za transmembranske stanične receptore ovog sustava. Kod sisavaca njega čine tri skupine, od kojih MHC skupina I i II imaju ulogu u specifičnom imunološkom odgovoru i prezentiranju antigena. Ovaj sustav kod ljudi (HLA) smješten je na šestom kromosomu, dok se kod pasa (DLA) on proteže na čak tri kromosoma. Najveći stupanj polimorfizma prisutan je u području veznog mjesta antigena na receptorima obaju vrsta. Molekularna građa DLA skupine I pokazuje značajnu sličnost s HLA skupinom I, posebice u području veznog mjesta antigena. S druge strane, za DLA II skupinu ovo do sada nije istraženo. Ovaj rad ukazuje na potrebu za dodatnim istraživanjima na ovom području, te pretpostavlja da je i ovdje prisutna znatna sličnost s HLA sustavom. Genetička struktura DLA skupine II pokazuje ortolognu vezu s genima HLA II skupine, dok se genetička struktura prve skupine razlikuje od vrste do vrste. Polimorfizam je prisutan u puno većem stupnju kod DLA skupine II, iako se genetička struktura DLA skupine I pokazala također dosta kompleksnom; a to može mijenjati pravu sliku polimorfizma njenih gena.

Pas predstavlja izvrstan model za istraživanja povezanosti autoimunih bolesti s HLA sustavom, no za zarazne bolesti ovo još nije prepoznato. Zbog specifičnosti DLA sustava u vidu visokog stupnja međupasminske varijabilnosti gena, proučavanje ovih povezanosti dodatno je otežano. Neke smjernice za buduća istraživanja bile bi formiranje grupa pasa prema pasminama, te uzimanje u obzir utjecaja pojedinačnih alela i haplotipova na kliničku sliku i druge odrednice bolesti. Utjecaj pojedinih alela zamijećen je kod koncentracije virusa u krvi, broja T-limfocita, kontrole infekcije, tijeka bolesti i težine kliničke slike kod HIV infekcija. U veterinarskoj medicini do sada nije provedeno niti jedno uspješno slično istraživanje na zaraznim bolestima pasa, iako bi ono vrlo vjerojatno bilo od izrazitog kliničkog značaja; gledajući po uzoru na istraživanja u humanoj medicini. Još jedno vrlo bitno kliničko područje u veterinarskoj medicini je odgovor na cijeplni antigen. Slabiji cijeplni odgovor povezan je s pasminama rottweiler i doberman, te je ovo moguća posljedica njihove izrazito slabe varijabilnosti DLA sustava. Slabiji cijeplni odgovor već je povezivan s određenim DLA II haplotipom kod etiopijskih vukova.

**Ključne riječi:** glavni sustav tkivne podudarnosti, polimorfizam, ljudi, pas, bolesti

## 6. SUMMARY

### GENETIC DIVERSITY OF MHC AND ITS ROLE IN SPECIFIC IMMUNE RESPONSE IN HUMANS AND DOGS

The major histocompatibility complex (MHC) is characterized by the most polymorphic group of genes in the genome of vertebrates, which code for its transmembrane cell surface receptors. In mammals it is comprised of three classes, two of which (MHC class I and MHC class II) have a role in specific immune response and antigen presentation. The human MHC (HLA) is located at the sixth chromosome, while its canine counterpart (DLA) is widespread across even three chromosomes. The greatest degree of polymorphism is present in the peptide-binding region of both species. The molecular structure of DLA class I exhibits significant similarity with HLA class I, particularly in this forementioned area. On the other hand, to this day, the latter is not studied for the DLA class II. This paper denotes the need for additional research in this area and implies significant similarity with HLA as well. The genetic structure of DLA class II highlights an orthologues connection with HLA class II genes, while the genetic structure of DLA class I is species-specific. Genes of DLA class II show a higher degree of polymorphism than genes of DLA class I, although its genetic structure seems to be quite complex as well. This consecutively may interfere with the real image of gene polymorphism.

The dog represents an excellent model for the research of connection between HLA and autoimmune diseases, but this has not yet been recognized for infectious diseases. These investigations are further hampered by extensive interbreed variability of the DLA system. Guidelines in future research would consist of forming breed specific dog groups and determining the influence of haplotypes as well as individual alleles on clinical phenotype and other aspects of infectious disease. The influence of individual alleles was noted for viral load, number of T cells, infection course and control, and severity of clinical symptoms in HIV infections. It would be of outmost clinical importance to conduct similar research for canine viral infections. Vaccine response is another important clinical aspect. Lower vaccine response in Rottweilers and Dobermans may be due to their very low DLA gene diversity. The link between one particular DLA II haplotype was already noted in Ethiopian wolves.

**Key words:** major histocompatibility complex, polymorphism, human, dog, disease

## 7. ŽIVOTOPIS

Anita Gabersčik rođena je 7. 11. 1990. u Zagrebu, u Republici Hrvatskoj. Godine 1995. upisuje „Umjetničku plesnu školu Silvije Hercigonje“ koju završava 2003. godine i stječe osmogodišnje iskustvo u plesnoj tehnici klasičnog baleta, kao i dvogodišnje iskustvo u sviranju klavira. Godine 1998. upisuje Osnovnu školu „Voltino“ tijekom koje pohađa literarne radionice i nastupa na plesnim priredbama, a završava ju 2005. godine. Također, paralelno uz ove dvije škole pohađa i školu stranih jezika (engleski) „Sova“ koju završava 2004. godine. Godine 2005. upisuje jezičnu, IV. Gimnaziju u Zagrebu koju završava 2009. godine kada maturira s odličnim uspjehom. Kroz cijelo vrijeme nastavlja se baviti raznim plesnim tehnikama, te sudjeluje na lokalnim i međunarodnim plesnim natjecanjima, kao i u srednjoškolskoj razmjeni učenika s Poljskom.

Godine 2009. upisuje Fakultet veterinarske medicine, Sveučilišta u Zagrebu. Od 2010. do 2011. godine radi kao demonstrator na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju. Tijekom studija bila je pasivni sudionik kongresa, seminara i simpozija iz različitih područja veterinarske medicine, te je jedno kraće vrijeme volontirala na Klinici za unutarnje bolesti. Godine 2013. kraće vrijeme volontira u Utočištu za medvjede „Kuterevo“. Ljetnu sezonu 2015. provodi radeći kao turistički animator u Opatiji. Godine 2016. uključuje se u znanstveno-istraživački rad virološkog laboratorija u sklopu Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, gdje stječe teorijsko i praktično znanje molekularnih metoda dijagnostike. Studentsku kliničku praksu završava u Zagrebu, u veterinarskoj ambulanti „Buba“. Krajem iste godine postaje stipendist programa studijske razmjene „CEEPUS“, te provodi tri mjeseca na Sveučilištu veterinarske medicine u Beču gdje prolazi program kliničkog treninga na Sveučilišnoj klinici za male životinje, Odjel interne medicine za male životinje s izolacijskom jedinicom. Tamo sudjeluje u dnevnom i noćnom radu klinike, te pomaže u organizaciji rada mlađih studenata tijekom noćnih dežurstava. Fakultet veterinarske medicine završava 2018. godine s prosjekom ocjena 4,388 te 388,5 osvojenih ECTS bodova.