

# Značaj gena glavnog sustava tkivne podudarnosti preživača

---

**Zelko, Krunoslav**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:046130>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**AGRONOMSKI FAKULTET**

Značaj gena glavnog sustava tkivne podudarnosti  
preživača

DIPLOMSKI RAD

Krunoslav Zelko

Zagreb, Rujan, 2018

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:  
Genetika i oplemenjivanje životinja

**Značaj gena glavnog sustava tkivne podudarnosti  
preživača**

**DIPLOMSKI RAD**

**Krunoslav Zelko**

Mentor: Prof.dr.sc. Ino Čurik

Zagreb, Rujan, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Krunoslav Zelko**, JMBAG 0178080017, rođen 1.11.1989. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

**Značaj gena glavnog sustava tkivne podudarnosti preživača**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studenta*

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**IZVJEŠĆE**

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Krunoslav Zelko**, JMBAG 0178080017, naslova

**Značaj gena glavnog sustava tkivne podudarnosti preživača**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

- |    |  |        |       |
|----|--|--------|-------|
| 1. | prof. dr. sc. Ino Čurik                | mentor | _____ |
| 2. | Izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik | član   | _____ |
| 3. | Doc.dr.sc. Maja Ferenčaković           | član   | _____ |

## Zahvale:

Mentor: prof. dr. sc. Ino Čurik

Članovi povjerenstva : izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik  
: Doc.dr.sc. Maja Ferenčaković

Posebna zahvala: dr.sc. Dinko Novosel i Lucija Andjel

Na podršci, literaturi, saslušanju rada, ispravicima grešaka i sugestijama

## **Sažetak**

Diplomskog rada studenta **Krunoslav Zelko**, naslova

### **Značaj gena glavnog sustava tkivne podudarnosti preživača**

MHC (Major histocompatibility complex) sustav je glavni sustav tkivne podudarnosti čija je primarna uloga prepoznavanje stranih molekula koje prodru u organizam. Ovaj sustav molekula se nalazi na površinama stanica s kojih obavljaju svoju funkciju. Geni koji kodiraju ovaj sustav su specifični za preživače i kompleksne su prirode što je karakteristično za njihovu ekspresiju. Njihova kompleksnost proizlazi iz razloga što su nastali tokom dugih evolucijskih razdoblja pod utjecajem mnogobrojnih čimbenika i interakcija. Funkcija MHC molekula primarno ovisi o stanicama u kojima se nalaze i njihovoj kemijskoj građi radi koje su podijeljene na tri klase. Unutar klasa postoje dodatne podjele obzirom na ekspresiju njihovih gena koja još nije dovoljno istražena u svih pasmina preživača. Mnogo je složenih procesa u kojem ovaj sustav sudjeluje u organizmu od kojih su neki tek nedavno otkriveni. Ovaj je rad opisuje građu i ulogu MHC sustava molekula, te odgovorima na pitanje kako je on nastao. Osim navedenog, u radu su opisani razni procesi u kojima ovaj sustav sudjeluje kao i njegova ekspresija.

**Ključne riječi:** MHC sustav, gen, evolucija, funkcija, preživači

## Summary

Of the master's thesis – student **Krunoslav Zelko**, entitled

### **Significance of major histocompatibility complex genes in ruminants**

The Major histocompatibility complex (MHC) system is the main system of tissue compatibility whose primary role is the recognition of foreign molecules that penetrate the organism. This system of molecules is located on the cell surfaces of which they perform their function. The genes coding for this system are specific in the ruminants and their characteristic of expression is complex. The reason why they are complex is that they originate from long evolutionary periods influenced by many factors and interactions. The function of the MHC molecule primarily depends on the cells in which they operate and their chemical structure for which they are divided into two classes. Within the classes there are additional divisions with respect to the expression of their genes that have not yet been sufficiently explored in all breeds. There are many complex processes in which this system participates in the body, some of which have only recently been discovered. This thesis is focused on the structure and role of the molecular MHC system in ruminants as well as on the question of how it originated. In addition, the paper describes the various processes involved in this system as well as its expression.

**Key words:** MHC system, gene, evolution, function, ruminants



## Sadržaj:

Sažetak .....	1
Summary .....	2
Sadržaj:.....	3
1. UVOD.....	4
2. PREGLED LITERATURE .....	5
2.1. Građa MHC molekule .....	5
2.2. Imunološka funkcija MHC molekule .....	7
2.3. Ekspresija MHC gena .....	9
2.4. Mutacije MHC gena .....	10
2.5. Evolucija i varijabilnost MHC gena .....	11
2.6. Utjecaj parazita, virusa i mikroorganizama na MHC sustav .....	15
2.7. Uloga MHC sustava u tkivima.....	18
2.8. MHC sustav koza.....	18
2.9. MHC sustav ovaca.....	20
2.10. MHC sustav goveda .....	21
3. ZAKLJUČAK .....	22
POPIS LITERATURE .....	23

## 1. UVOD

Glavni sustav tkivne podudarnosti (Major histocompatibility complex - MHC) sustav je glikoproteinski sustav molekula kojeg posjeduju svi kralježnjaci (Tizard 2004). MHC čini bitnu kariku u imunološkom sustavu organizama, a ovisno o svojem smještaju nalazi se na površini stanica inkorporiran unutar membrana (Klein 1986).

Njegova je funkcija prepoznavanje stranih molekula koje su štetne za stanicu s ciljem njihovog otklanjanja iz organizma. Upravo te štetne molekule nazivamo antigeni iz razloga što se ponašaju kao strana tijela. Mogu biti virusnog porijekla, produkti bakterija, a često antigene nalazimo kao produkte vlastitog organizma s ciljem pokretanja autoimunog odgovora.

Osim obrane organizma i imunološke funkcije, ovaj sustav ima ulogu tkivne podudarnosti koja je bitna za organizaciju i smještaj organa te raspored tkiva u organizmu, on određuje gdje započinje, a gdje završava određeno tkivo ili organ. Ova karakteristika je iznimno važna prilikom presađivanja organa jer može doći do njihovog odbacivanja. Znanost ulaže velike napore kako bi što bolje razumjela prirodu ovog sustava s ciljem prelaženja prepreka koje taj sustav nameće svojim prisustvom.

Utvrđeno je da MHC sustav ima centralnu ulogu pri spontanim pobačajima jer su organizam majke i ploda u specifičnim tkivnim odnosima, a razlog je taj što se ovdje nalaze tkivne prepreke u obliku ovojnica i krvnih žila Bainbridge (2000). Do pobačaja dolazi jer u određenim uvjetima organizam majke počinje tretirati fetus kao strano tijelo, što za rezultat ima odbacivanje ploda.

Ovaj sustav molekula posjeduju svi kralježnjaci bez obzira koliko su razvijeni, stoga je važno utvrditi njegovu genetsku, evolucijsku, fiziološku i selekcijsku komponentu odnosa MHC sustava u nasljeđivanju gena i svojstava.

Postoje određene podjele ovog sustava s obzirom na smještaj u stanicama i funkcijama koje obavljaju, kako na mikrobiološkoj razini, tako i na makrobiološkoj razini organizma. Prema tome je MHC sustav svrstan u tri klase: prva klasa je smještena unutar svih stanica koje posjeduju jezgru, druga se nalazi na površini imunskih stanica, a treća klasa je fiziološke prirode (Klein 1986). Osim ove podjele, postoji i podjela na tipične i netipične MHC molekule obzirom na njihove karakteristike pri ekspresiji gena.

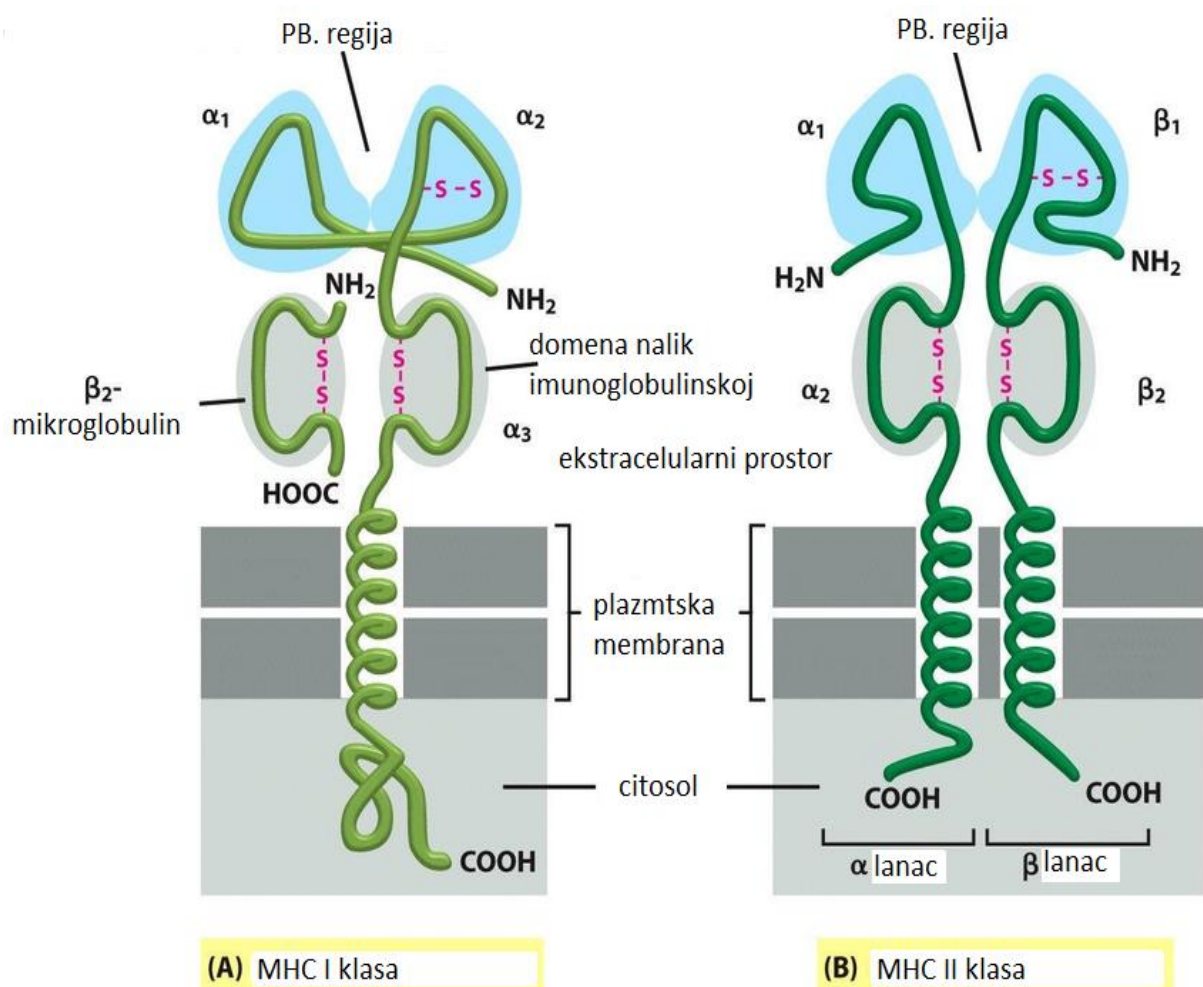
Građa ovog sustava molekula je organizirana na način koji funkcionira prema točno određenim zakonima i pravilima fizike i kemije. Osim građe MHC molekule i predodžbe njenog izgleda te razumijevanja uloge koju taj sustav obavlja u organizmu na mikrobiološkoj razini, ovaj sustav utječe i na međusobne odnose organizama unutar i između vrsta te na njihovo potomstvo, a odraz je evolucije i okoliša u kojima su te jedinice živjele.

U ovom radu želi se objasniti prema kojim principima funkcionira sustav tkivne podudarnosti preživača i njegovih gena. Osim toga, ovaj rad ukazuje na fiziološke uloge koje MHC sustav obavlja u preživača te objašnjava na koji način ovaj sustav djeluje na evoluciju.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Građa MHC molekule

MHC sustav je glikoproteinski sustav molekula koji za svoju funkciju koristi aminokiselinski slijed peptida kako bi bio u stanju vezati se za antigen (Klein 1986). Funkcionalno najbitniji i najkompleksniji dijelovi MHC molekule su upravo ti koji su zaslužni za vezanje s drugim molekulama. Kroz njihovu građu možemo dobiti dojam o principima prema kojima one funkcioniraju.



Slika 1. Građa MHC molekula

Izvor: [https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-MHC-Class-I-A-and-class-II-proteins-B-The-two-globular-domains-furthest\\_fig1\\_303995647](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-MHC-Class-I-A-and-class-II-proteins-B-The-two-globular-domains-furthest_fig1_303995647)

Prema navedenom principu, stabilne kovalentne veze između atoma koji dijele elektrone održavaju određene dijelove MHC kompleksa stabilnima. Stabilne se kovalentne veze stvaraju kada svi atomi u vezi potpuno popune svoje vanjske elektronske ljuske, što je rezultat povezivanja elektrona s elektronima drugih atoma u elektronske parove. Broj kovalentnih veza što ih pojedinačni atom može tvoriti ovisi o broju elektrona u njegovoj vanjskoj elektronskoj

ljusci i o broju elektrona potrebnih za popunjavanje ljuske. Upravo je takva građa omogućila potrebnu stabilnost na dijelovima gdje ona mora postojati.

Za razliku od njih, postoje i nestabilnije građeni dijelovi u kojima su zastupljene vodikove veze odgovorne za slabiju strukturu koja je neophodna kako bi moglo dolaziti do pucanja takvih veza i njihovog ponovnog spajanja. Ovaj princip primarno funkcionira na razini cjelokupne DNA molekule a, time i na njihove proteinske produkte.

Do formiranja MHC molekule dolazi unutar stanica na endoplazmatskom retikulumu gdje se formira spoj MHC I molekule i peptida, dok za razliku od ove sinteze, MHC II peptidni kompleks nastaje u lizosomalnom okruženju na ruti za endocitozu i degradaciju extracelularnih proteina.

Za obje MHC klase je karakteristično da su uronjene u membranu i sastoje se od tri glavna dijela: jedan dio koji strši izvan membrane na koji se primaju strane molekule, drugi dio koji služi kao sidro, jer je uronjen u membranu i treći dio koji se nalazi s unutarnje strane stanice.

Prva MHC klasa sadrži jedan beta-mikroglobulin lakši lanac koji je nekovalentnim vezama povezan s ostatkom sustava i jedan alfa teži lanac, koji su tako nazvani zbog značajne razlike u svojoj masi. Alfa lanac sadrži tri podjedinice koje su označene rednim brojevima: 1, 2 i 3. Molekularna struktura gena prve klase sastoji se od šest egzona i sedam introna (Hughes i Nei, 1991).

Prva i druga podjedinica sa svojim specifično oblikovanom građom služe za prihvatanje antigena, a mjesto na koje se prihvaćaju nazvano je PB regijom (*peptid binding*) (Brown, 1988.), i upravo je taj dio glavni predmet proučavanja mnogih znanstvenika zbog svoje kompleksnosti i uloge.

Drugu klasu MHC-a čine dvije alfa i dvije beta podjedinice, a PB regija se nalazi na prvoj alfa i beta podjedinici. Prema Andersonu (1998), „preživjeli specifično posjeduju regiju koja kodira drugu klasu MHC molekula koja je podjeljena u dvije podregije, a i b koje su jedna od druge udaljene najmanje 15 centiMorgana“.

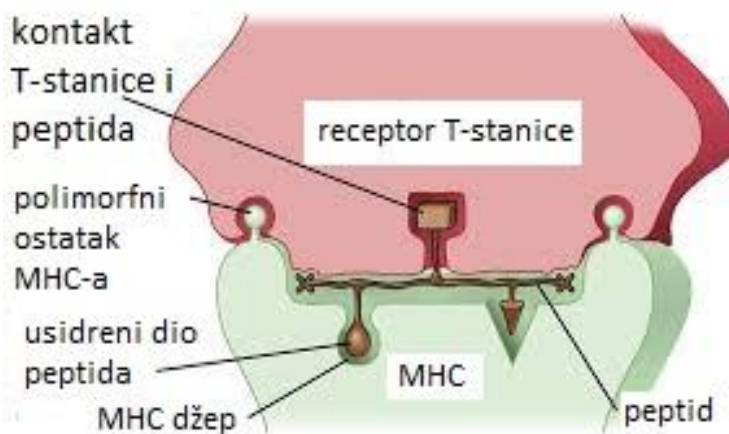
DRB geni druge klase MHC molekula koji sudjeluju u imunološkom odgovoru su najvarijabilniji geni ovog sustava (Schwaiger i sur. 1993). Ovi geni kodiraju beta proteinski lanac koji se nalazi na površini stanica koje prezentiraju antigene. Najviše znanstvene pozornosti je usmjereno na fragment drugog egzona DRB gena jer kodira PB regiju koja je od iznimne funkcionalne važnosti.

U obje klase MHC molekula nalazimo PB regiju sa specifičnim afinitetom na pozitivno ili negativno nabijene antigene molekule ovisno o prostornoj trodimenzionalnoj konformaciji i mogućem elektronskom naboju, što je moguće utvrditi kristalografijom X-zrakama.

Treća klasa ima primarno fiziološku ulogu, ali geni u toj regiji kodiraju za specifične proteine uključene u ostale imunološke sustave kao što su sustav komplementa, citokine i proteine zaslužne za toplinske podražaje.

## 2.2. Imunološka funkcija MHC molekule

Uloga imuniteta je obrana organizma od patogenih uzročnika bolesti, stoga je bitno za organizam da je u stanju prepoznati vlastite zdrave stanice i molekule od inficiranih stanica i stranih molekula. Upravo tu ulogu prepoznavanja obavlja MHC sustav koji je time i dio imuniteta (Klein 1986). Ovaj sustav prepoznaje antigene molekule te ih nakon prepoznavanja ukomponira u svoju građu. Ovisno o tipu molekule nastaje spoj antigena i MHC kompleksa, pri čemu se pokreću mehanizmi potrebni kako bi se otklonila novonastala molekula. MHC molekule postaju funkcionalne pri nastanku PB regije koja nastaje pri formiranju podjedinica koje se razlikuju s obzirom na MHC klasu.



Slika 2. Spoj MHC molekule i T-stanice

Izvor: <https://www.memorangapp.com/flashcards/183467/How+T+cells+Recognize+Antigen/>

Sve stanice koje posjeduju jezgru sadrže MHC sustav prve klase koji stvara komplekse s virusima i tumorima nakon njihovog prodora u stanicu, potom ih dopremaju na površinu s ciljem otklanjanja iz organizma. Nakon što su ti kompleksi tumora ili virusa zajedno s MHC kompleksom izloženi na vanjskoj membrani zaražene stanice, prepoznaju ih „natural killer“ stanice (NK-stanice) (Herberman et al., 1975). Razlog je taj što je njihova uloga u većini slučajeva uništavanje stanica zaraženih virusima i tumorima, što ne isključuje i utjecaj druge klase. Ovu funkciju NK obavljaju na način koji doslovno možemo opisati kao sugestijom na samoubojstvo, jer u ciljnu stanicu izlučuju niz peptidnih molekula koje svojim kaskadnim djelovanjem stimuliraju jezgru zaražene stanice na uključivanje gena odgovornih za samouništenje ili, drugim riječima, apoptozu stanice.

Za razliku od navedenog principa, druga klasa MHC molekula funkcionira na potpuno drukčiji način. Ova MHC klasa se nalazi na površini specifičnih imunskih stanica: makrofaga, dendritskih stanica i B-stanica čija se uloga razlikuje zbog djelovanja po drukčijim principima i obrane organizma od drukčijih vrsta patogena. U ovom slučaju makrofag, dendrit ili B-stanica najprije fagocitira neželjeni antigen koji se nalazi u izvanstaničnoj tekućini te ga nakon transporta u stanicu prerađuje na endoplazmatskom retikulumu zajedno s MHC molekulom u kompleks koji šalju na staničnu površinu kako bi ih T-limfociti mogli prepoznati (Klein 1986).

Prema skripti Limfni sustav (Liker 2012), „T-limfociti nastaju u timusu i kroz postupak negativne selekcije uništavaju se svi limfociti koji posjeduju T-receptore prema vlastitim molekulama, a istovremeno se kroz pozitivnu selekciju potiču stanice koje na svojoj površini posjeduju osjetljivost prema MHC molekulama nespecifičnim prema vlastitim antigenima (CD4 i CD8)“. Za T-limfocite je ovakvo nastajanje preduvjet kako bi mogli izvršavati svoju funkciju, a to je prepoznavanje MHC-a i antigena pri čemu se formira kompleks koji sadrži Tcr, CD4 ili CD8 i MHC molekule.

Nakon prepoznavanja, T-limfocit dolazi u interakciju sa B-limfocitom nakon čega diferencira u plazma stanicu. Plazma stanice su završni proizvod klonalne ekspanzije B-stanica, a u stanju su izlučivati 2000 protutijela po sekundi, što čini okosnicu humoralne imunosti. Naime, protutijela funkcioniraju na način da svojim prostornom konformacijom odgovaraju obliku molekula koje su im cilj i prepoznaju ih po principu koji nazivamo „ključ-brava“ (Fischer, 1980). Zbog ovog razloga je imunitetu potrebno određeno vrijeme kako bi procesuirao štetne molekule koje prođu u organizam.

Naspram navedenog djelovanja koje je limitirano vremenom, prva klasa MHC molekula djeluje efikasnije i brže jer su tim procesom stanice uništene na licu mjesta, stoga je logično da su uključene u obranu od virusa i tumora koji se šire brzo.

Životinje koje su uzgajane u srodstvu imaju narušene ove imunološke mehanizame. U prirodi također postoje ovakvi rijetki slučajevi koji su okarakterizirani kao genetski defekt, a uzrokuju neučinkovito procesuiranje peptida i nemogućnost spajanja MHC molekula s antigenima. Takvi posebni slučajevi su dobro proučeni u sisavaca čiji su MHC lokusi heterozigotni, pa se ekspresija odvija samo na jednom lokusu, što ograničava spektar antigena na koje MHC molekule reagiraju.

MHC sustav specifično djeluje i u obrani od crijevnih parazita, što se često koristi kao mjerljivi dokaz postojanja veze između bolesti i MHC sustava. Obzirom da se koprološka pretraga često koristi, nije skupa i nije ju teško izvesti, u mogućnosti smo direktno povezati utjecaj MHC sustava na mikrofloru crijeva domaćih životinja. Naime, koprološka pretraga je pretraga fecesa kojom se utvrđuje ponajprije broj jajašca patogenih parazita crijeva. Ako uzmemo u obzir da preživaci sadrže veliki broj mikroorganizama u probavnom traktu i povoljne uvjete za njihov razvoj, nije slučajno da upravo na crijevima dolazi do parazitarnih invazija. Za preživace je specifično da njihovi B-limfociti sazrijevaju u crijevnoj sluznici gdje postaju imunokompetentni i upravo je to jedan od bitnih čimbenika njihovog efektivnog imuniteta.

Kako se ne bi dobila kriva predodžba o utjecaju MHC molekula, bitno je reći da su MHC molekule glikoproteinskog sastava, zbog čega ovise o energetske stopi stanice i organizma obzirom na proizvedenu energiju u obliku ATP i ADP molekula, a samim time i količinu unesene energije organizma. Naime, proizvodnja proteina u velikoj mjeri ovisi o količini energije koju stanice posjeduju u obliku ovih molekula. Time je MHC sustav ovisan o ostalim sustavima čija je uloga osiguravanje energije organizma kao što su probavni i dišni sustavi. Kada se uzima u obzir cijeli biološki set proteinskih receptora određenog organizma, treba imati na umu da je MHC sustav samo jedna od karika u lancu.

### 2.3. Ekspresija MHC gena

Ekspresija gena je proces nastajanja produkta određenog gena na način da se gen koristi kao informacija ili predložak. Većina gena kodira proteine, ali postoje i geni čiji su produkti nuklearne ili transfer RNA. Obzirom da je MHC proteinski sustav molekula, njegove gene ubrajamo u tu tipičnu grupu gena.

Osim standardne podjele MHC sustava na dvije klase, postoji i podjela s obzirom na ekspresiju njihovih gena. Time ne samo da se klase MHC molekula razlikuju zbog toga što je ekspresija njihovih gena zastupljena u drukčijim tipovima stanica, nego postoji i dodatna razlika. Ova podjela je orijentirana na tipičan ili klasičan tip MHC molekula koji podrazumijeva visoku stopu ekspresije i polimorfnosti ovih gena, dok za razliku od njih, netipičane ili neklasičane MHC molekule posjeduju gene sa niskim stupnjem ekspresije i polimorfnosti.

Geni su pod direktnom kontrolom drugih gena ili pak promotora, pa time ekspresija postaje kompleksan proces. Specifični geni MHC druge klase su uvijek pod kontrolom posebnih transaktivatora koji su također pod kontrolom specifičnih molekula. Njih u dendritičnim stanicama i B limfocitima kontroliraju  $\gamma$ -interferoni zajedno s nizom diferencijalnih aktivatora i promotora pojedinih gena. Interferoni nastaju kao reakcija na prodor virusnih infekcija kako bi moglo doći do aktiviranja MHC i niza ostalih gena.

Osim interferona, ekspresiju transaktivatora na neočekivan način kontroliraju još i četiri nezavisna promotora. Oni ne samo da utječu na transaktivatore u dendritičnim stanicama i B limfocitima, nego čak i na interferone koji vrše stimulaciju.

Geni druge klase MHC sustava svoju ekspresiju vrše u ograničenom broju stanica specijaliziranih za procesuiranje antigena i unutar tih stanica su pod direktnom razvojnom kontrolom. Ovaj proces je utvrđen kod miševa, pri čemu su rani B limfociti MHC negativni i tek nakon indukcije interferonom dolazi do konstitutivne MHC ekspresije. Utvrđeno je i da nakon što B limfociti diferenciraju u plazma stanice, dolazi do potpunog stagniranja ekspresije MHC gena druge klase.

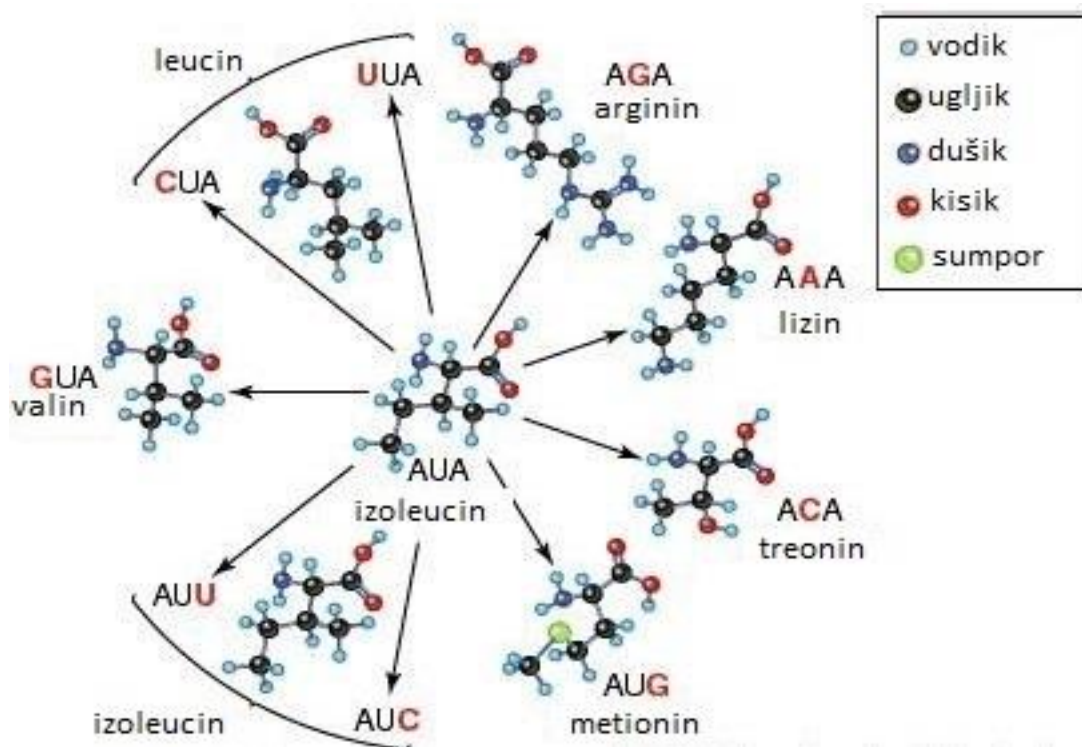
Za sve MHC gene je utvrđen veliki broj mikroRNA, što ukazuje na njihov aktivan utjecaj na regulaciju i ekspresiju ovih gena prema Gao i sur. (2010). Konkretni primjer utjecaja mRNA utvrđen je na regulaciji trofoblasta koji rezultira fetalnom inaktivacijom prve klase MHC sustava molekula. Na ovaj način dolazi do skladnog majčinskog odnosa s fetusom, što dovodi do normalnog fetalnog razvoja. U ovaca je ovaj princip najzastupljeniji, ali postoje i drukčiji tipovi interakcija, npr. modulacija imunološkog sustava majke i placentalna obrana od utjecaja majčinih molekula koje su u stanju dovesti do negativne reakcije fetusa. Intenzitet svih ovih mehanizama varira i nisu jednako zastupljeni u svih vrsta sisavaca.

U slučaju da dođe do neskladnih odnosa ovog sustava molekula i njegovih mehanizama, organizam majke će reagirati na fetus kao da se radi o stranom tijelu, što će uzrokovati pobačaj. Prema Gau i sur. (1990), u goveda nije konkretno utvrđen točan mehanizam djelovanja, ali je utvrđena povećana stopa regulacije MHC molekula preko mRNA i to ne na trofoblastu kao u ovaca, već na korionskoj membrani.

## 2.4. Mutacije MHC gena

Geni MHC sustava imaju drukčiji omjer mutacija od ostatka gena na genomu. Te mutacije uzrokuju neophodnu varijabilnost, posebno PB regije koja sadrži nekarakterističan omjer nesinonimnih naspram sinonimnih supstitucija. Te nesinonimne supstitucije uzrokuju promjene aminokiselina i prostorne konformacije koje direktno utječu na povećani spektar vrsta mikroorganizama od kojih se imunitet u stanju oduprijeti. Stoga je logično da se nesinonimne supstitucije u većoj stopi nalaze baš u tom djelu zbog te svoje specifične uloge.

Geni u regijama izvan kodirajuće PB regije imaju veći postotak sinonimnih supstitucija. Za njih je karakteristično da promjena u nukleotidnom slijedu ne uzrokuje promjenu kodiranja u drugi tip aminokiseline, a time oblik MHC molekule ostaje isti.



Slika 3. Promjene aminokiselina koje uzrokuju mutacije

Izvor: <https://www.britannica.com/science/point-mutation>

Omjer nesinonimnih mutacija PB regije su konkretan dokaz selekcije koja je zastupljena u ovoj regiji. Omjer nesinonimnih i sinonimnih supstitucija u regijama koje nisu pod direktnim utjecajem selekcije bi trebale biti ravnomjerne (Hughes i Nei, 1991). Selekcija PB regije u preživača funkcionira preko spontanih pobačaja, a ne preko receptornih osjetila što je utvrđeno u primata i miševa nego (Paterson i Pemberton, 1997).



## 2.5. Evolucija i varijabilnost MHC gena

Smještaj gena MHC sustava na genomu i njihova organizacija unutar kromosoma usko je povezana s funkcijom koju taj sustav obavlja u organizmu. Genom posjeduje određene regije koje nisu stalno aktivne u ekspresiji svojih gena, što za rezultat ima stagniranje proizvodnje molekula koje ti geni kodiraju, a upravo je to slučaj i s genima MHC sustava.

Stoga bi se bilo logično zapitati: zašto organizam posjeduje gene koje ne koristi? Više je razloga zašto je to upravo tako, ali glavni je razlog taj što organizam rijetko dolazi u situacije pri kojima se mora istovremeno braniti od svih uzročnika bolesti za koje posjeduje imunski odgovor, stoga nije potrebno uzaludno proizvoditi molekule i trošiti dragocjenu energiju. Za drugi primjer možemo uzeti izloženost životinja negativnom utjecaju patogena samo u određenim periodima iz razloga što je život mikroorganizama, između ostalog, ovisan i o klimatskim promjenama. Iz tih razloga organizam konzervira određene gene, jer molekule koje oni kodiraju nisu potrebne u tom trenutku.

Postoje i slučajevi u kojima je neka vrsta životinja bila izložena određenim štetnim mikroorganizmima kroz duži vremenski period, nakon čega je razvila gene koji kodiraju sada neaktivan MHC sustav iz razloga što su te životinje migrirale s mjesta na kojem prevladavaju ti mikroorganizmi. Iz navedenih primjera možemo zaključiti da životinje do određene razine prilagođavaju raspored i organizaciju svojih gena obzirom na okolišne uvjete koje susreću u prirodi.

Radi raznolikosti okolišnih uvjeta mora doći do raznolikosti gena koji se tim uvjetima prilagođavaju, što u ovom slučaju dovodi do varijabilnosti MHC molekula. Tu raznolikost omogućavaju posebni mehanizmi koji djeluju na razini gena u obliku njihovih promjena unutar i između lokusa. Jedan od bitnijih mehanizama je održavanje varijabilnosti MHC gena zbog prednosti heterozigotnih i rijetkih alela, a smanjivanje populacije i domestikacija nisu u stanju negirati ove efekte, što je utvrđeno u ovaca.

Osim ovih gena koji imaju visoku stopu varijabilnosti, postoji i konzervirana MHC regija s jako malo varijabilnosti. Varijabilna regija je potrebna kako bi se imunitet mogao braniti od novih vrsta mikroorganizama, dok je nevarijabilna konzervirana regija potrebna kako bi se zadržali postojeći geni stečeni kroz duge nizove replikacija u prijašnjim generacijama. Varijabilna je regija također pod utjecajem evolucije, i razlog zbog kojeg ta postojeća varijabilnost određenih dijelova ima tendenciju ostajati u istom stupnju varijabilnosti kroz duže vremenske periode je taj što sadrži gene koji kodiraju dio MHC-a odgovoran za vezanje s antigenima nazvan („peptid binding region“ PB). I upravo varijabilnost na tim genima omogućava različitost prostornih konformacija koje su u mogućnosti ti specifični geni proizvesti i vezati se na širi spektar različitih antigena. Kako navode Yeager i Hughes (1999.), ovaj efekt je ostvaren pod utjecajem gubitaka gena, duplikacija gena, rekombinacija, a kontrolira ga selekcija na mutacije koje se akumuliraju kroz vrijeme.

Obzirom da na jedinke i populacije utječe prirodna selekcija koja je dosta širok pojam, došlo je do potrebe za njenom klasifikacijom i detaljnijim opisom. Iz tog je razloga prirodna selekcija opisana kroz stabilizacijsku, direkcijsku, disruptivnu, balansirajuću selekciju ovisnu o frekvenciji rijetkog gena i seksualnu selekciju. Seksualna selekcija u većine kralježnjaka pridonosi varijabilnosti PB regije jer jedinke pri odabiru partnera koriste receptorna osjetila favorizirajući različitost MHC sustava što dovodi do heterozigotnosti.

Preživaci pri odabiru partnera za parenje ne funkcioniraju preko principa MHC podudarnosti. Oni imaju drukčiji mehanizam MHC selekcije koja se vrši putem spontanijih pobačaja, što dovodi do varijabilnosti gena, i to je samo jedan u nizu razloga zbog kojih se njihova evolucija razlikuje od ostalih životinja. Kako navode Hedrick i Black (1997.), osim ovih tipova selekcije utvrđeno je da pozitivnom selekcijom na MHC može doći do povećanja broja MHC lokusa i njihove varijabilnosti putem interakcija placente između majke i mladunčeta.

Jednako važan proces je dijeljenje varijabilnosti između lokusa nazvan interlokusna konverzija pri čemu homologni kromosomi dijele genetski materijal, a time i mutacijama akumuliranu varijabilnost. Ovaj mehanizam dovodi do prebacivanja varijabilnosti određenog lokusa na drugi lokus ili smanjuje njihovu varijabilnost. Prema Christophe Eizaguirre i sur (2012.), rapidna genetska prilagodba kralježnjaka na parazitarne invazije utvrđena je u riba. Oni objašnjavaju da je postojeća osnovna varijabilnost u stanju dovesti do brzih evolucijskih prilagodba putem reorganizacije postojećih alelnih varijanti.

Neki varijabilni egzoni MHC gena, osobito onih koji kodiraju PBR su poprilično stari jer se održavaju milijunima godina balansirajućom selekcijom, međutim ovaj slučaj ne vrijedi i za introne. Njihovu homogenizaciju na svim alelima nekog lokusa ne uzrokuje samo rekombinacija, već i genetsko proklizavanje ili „drift“. Na njihove lokuse još utječe i „*hitch-hiking*“ efekt čije se djelovanje razlikuje ovisno da li je pod utjecajem direkcijske ili balansirajuće selekcije ovisne o frekvenciji rijetkog gena.

Postoje i neke fiziološke prepreke koje su ključne u ograničavanju kapaciteta genetske varijabilnosti. Zbog raznolikosti MHC molekula, organizam si ne može priuštiti proizvodnju prevelikog broja raznovrsnih MHC molekula jer je svakoj varijanti potrebna specifična T-stanica za interakciju. Zbog toga određeni postotak T-stanica mora biti uništen obzirom na vlastitu neaktivnost. Broj polimorfnih lokusa ne može biti prevelik, radi velikog broja različitih receptora koje posjeduje T-stanica. Svi ovi mehanizmi djeluju zajedno i u određenim uvjetima se međusobno isključuju ili im se efekti preklapaju negirajući ostale mehanizme koje ostavljaju na organizam. Oni su iz tog razloga glavni ograničavajući čimbenici organizacije i funkcije MHC polimorfizama na genomu uzimajući u obzir da ih kontrolira okoliš u kojem se jedinke nalaze tokom evolucije.

MHC je podsustav imunološkog sustava i njegovi geni su se razvijali tokom evolucije sukladno genima čija se imunološka uloga međusobno podudara. Ovaj sustav molekula spada u imunoglobulinsku superfamiliju koju čine dvije glavne C i V domene među koje spadaju i CD glikoproteinski receptori. Rezultati analize u postocima aminokiselinskog sastava ukazuju na sličnosti u odstupanjima između CD4 i CD8 receptora uspoređujući ih s odstupanjima MHC

molekula. To dokazuje da su se CD4 i CD8 molekule razdvojile od svojeg protooblika otprilike u isto vrijeme kao i MHC I i MHC II (Hughers i Nei 1993.). Ova teorija je logična obzirom na zajedničku funkcionalnu ulogu CD i MHC molekula u imunitetu. CD4 i CD8 su receptori urojeni u membranu T-limfocita koji čine jednu od okosnica imunološkog sustava sisavaca.

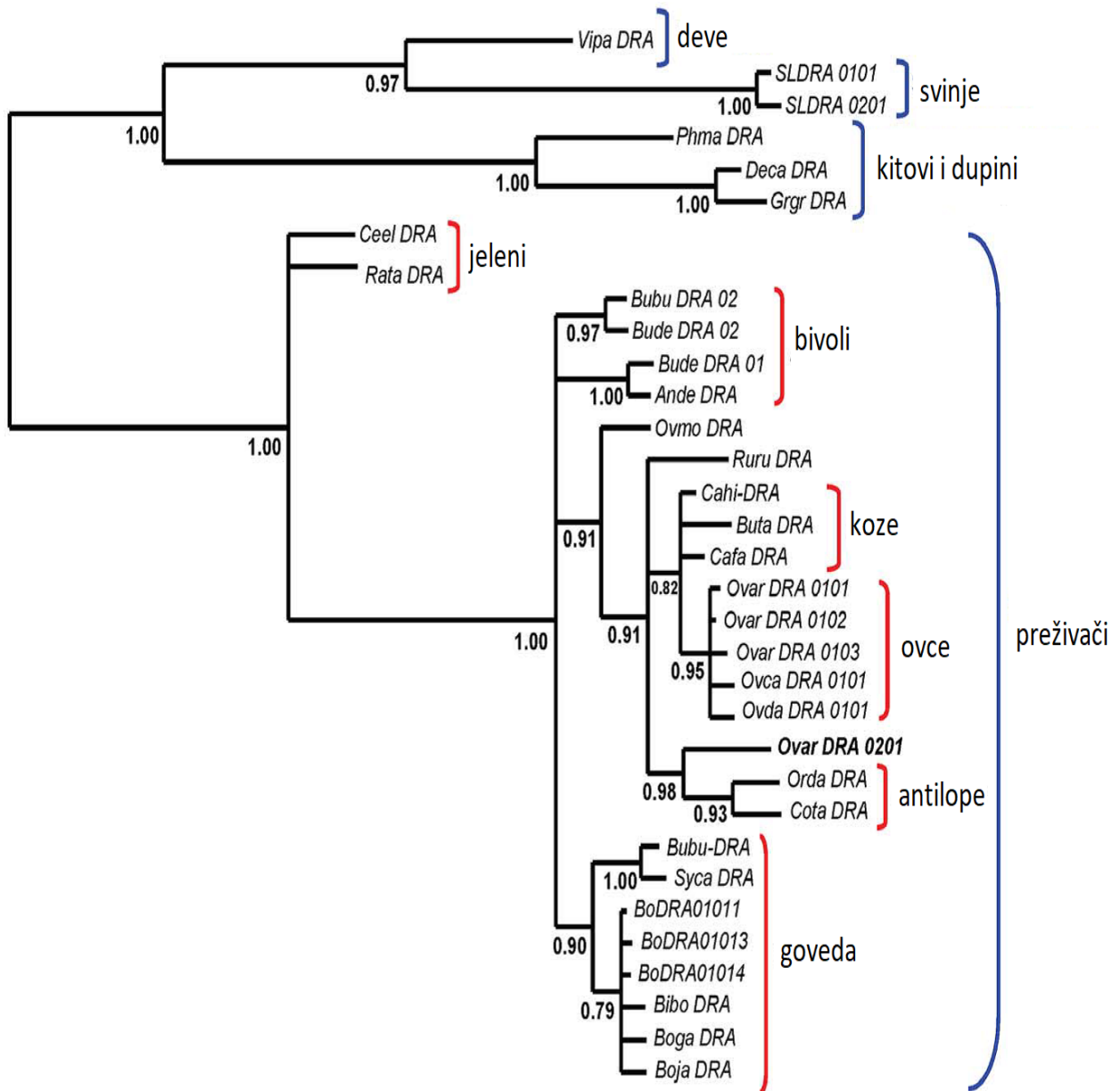
Postoji niz indikatora da je protooblik MHC-a kojeg je posjedovao daleki predak sisavaca bio nalik drugoj klasi MHC molekula kojeg danas nalazimo. Jedan od zanimljivijih indikatora koji potvrđuje ovu teoriju je ekspresija druge klase MHC molekula u vodozemaca koja se odvija prije njihove metamorfoze (Flajnik i sur. 1986). Ova skupina životinja ne samo da potvrđuje postojanje kralježnjaka koji su u mogućnosti preživljavati samo s drugom klasom MHC-a, nego i potvrđuje da je druga klasa ili njoj sličan sustav postojao prije prve klase. Peters i sur. (1991.), iznose teoriju da je MHC I kompleksnije prirode i navodi da je to bitan razlog zašto je nedavno evolucijski nastala.

Prema Gau i sur (2010.), utvrđeno je da goveda i ovce imaju isti kromosom na kojem se nalazi MHC regija koju je posjedovao njihov zajednički pra-predak prije evolucijske podjele na vrste. Ovi znanstvenici su utvrdili i da postoji skup gena na granici druge i treće klase MHC-a odgovoran za sekreciju i produkciju mlijeka nazvan (Btntl). Ti geni su u ovaca slabije zastupljeni u usporedbi s istim genima pronađenim u ostalih sisavaca kao što su miševi, štakori i svinje koji imaju veći broj mladunaca u leglu. Ostali kralježnjaci koji ne spadaju u skupinu sisavaca ne posjeduju te gene, što ukazuje da je proizvodnja mlijeka usko povezana sa funkcijom MHC sustava zbog potrebe koje sisavci imaju pri uspostavljanju imuniteta preko mljeziva i konzumacijom mlijeka. Iz tih razloga Gau i sur (2010.), iznose hipotezu da je skupina Btntl lokusa povezana ne samo s duplikacijom imunoloških gena, nego i s pojavom sisavaca tokom evolucije.

Sposobnost organizma pri generiranju toliko velike raznolikosti stanica i molekula koje su u kompleksnoj interakciji tokom borbe protiv stranih patogena je izvanredno evolucijsko postignuće. Evolucija je sama po sebi vrlo nevjerojatan pojam, pogotovo kada se uzme u obzir količina izumrlih vrsta i onih koje nisu ostavile nikakve fosilne ili druge tragove. Iz ove perspektive gledano, nije sporno da su razne varijante MHC gena također nepovratno izgubljene jer se radi o dugačkim vremenskim razdobljima.

Ako razmotrimo populacije životinja koje danas možemo naći, utvrdit ćemo da postoje raznovrsni hijerarhijski odnosi unutar tih populacija. Većina jedinki koje neprestano obitavaju u stadu i ovisе o životinjskoj zajednici su reproduktivno aktivne i time pridonose evoluciji MHC gena. Sistem parenja je takav da su mužjaci većine sisavaca poligamni, a stado preživaača sačinjava alfa mužjak koji sam ili uz pomoć pokojeg mužjaka brani stado ženki. Mužjaci se na nižem hijerarhijskom stupnju grupiraju i tvore posebna stada ili se jednostavno sami brinu o svojem opstanku. Ti mužjaci također pridonose evoluciji MHC sustava time što ne obitavaju u istim okolišnim uvjetima kao i jedinke stada i pod drugačijem su pritisku mikroorganizama i parazita, a unatoč tome dobivaju priliku svake godine konkurirati glavnom mužjaku i prenijeti svoje gene u slučaju da prežive.

Određeni MHC lokusi dijele ortologne gene, što znači da ih možemo naći u različitim vrsta iz razloga što su nastali evolucijom od zajedničkog pretka. Taj zajednički predak je živio prije podjele vrsta u kojima je zastupljen gen koji u nekim slučajevima ostaje funkcionalan i moguće ga je detektirati u određenim populacijama. U goveda i ovaca su utvrđena dva MHC lokusa druge klase; DR i DQ koji su ortolojni sa lokusima primata i glodavaca (Ballingall i sur., 2010.), (Slika 4).



Slika 4. Poligenetsko stablo odnosa DR gena

Izvor: Trans-Species Polymorphism and Selection in the MHC Class II DRA Genes of Domestic Sheep Ballingall i sur. (2010.)

## 2.6. Utjecaj parazita, virusa i mikroorganizama na MHC sustav

Promatrajući evoluciju gena uključenih u imunološke funkcije moramo u obzir uzeti i principe kojima se razvijaju mikroorganizmi i paraziti, jer je njihova evolucija međusobno povezana. Za nematode su utvrđena dva mehanizma koji su imali veliki efekt na faze njihove evolucije, a to su stanična poliploidizacija i proliferacija.

Poliploidizacija je proces u kojem se broj kromosoma povećava sukladno porastu cijelog kromosomskog seta, a proliferacija je proces rapidnog stvaranja novih stanica pri rastu novog tkiva.

Evolucija nematoda i mikroorganizama ovisi o životinjama koje nastanjuju jer se među njima odvija neprestano nadmetanje. Iz tog se razloga imunitet kralježnjaka konstantno bori s promjenama genotipa svake sukcesivne generacije patogena, što je objašnjeno hipotezom „crvene kraljice“. Ova hipoteza govori da se organizmi moraju konstantno prilagođavati, evoluirati i rasti ne samo zbog reprodukcije, već i zbog konstantnog pritiska ostalih organizama u okruženju koje se stalno mijenja (Valen 1973) .

Za razliku od prirodnog okruženja, kada u laboratorijima uzgajamo mikroorganizme, moramo im osigurati hranjivu podlogu kako bi imali dovoljno hrane i optimizirati im temperaturu i vlagu. U prirodi to ne funkcionira na taj način i životni uvjeti nisu toliko idealni, pa se često mikroorganizmi i paraziti nalaze u situaciji gdje više nisu u mogućnosti parazitirati jer se populacija životinja drastično smanjila ili čak izumrla. Stoga nije slučajno da prelaze na druge vrste kako bi preživjeli i dalje se mogli razvijati.

Iz ovih razloga postoje slučajevi u životinjskih vrsta koje nisu imale bliskih srodnika kroz duža vremenska razdoblja, a čiji MHC geni pokazuju visoki stupanj sličnosti zbog izloženosti istim vrstama patogena tokom evolucije.

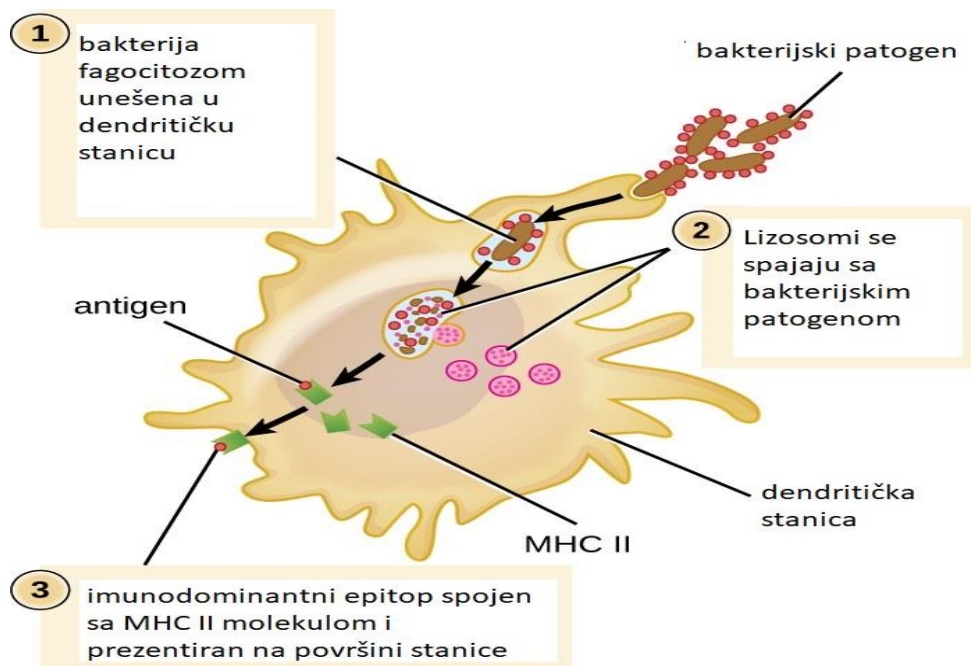
Neke vrste mikroorganizama i parazita su se toliko prilagodile da su u stanju parazitirati na više vrsta životinja ovisno o preobrazbama i stadijima koje prolaze tokom životnog ciklusa. Standardni primjer ovog slučaja bio bi ovčji metilj koji tokom svojeg razvoja parazitira na preživačima i puževima.

Osim njih, postoje raznovrsne bakterije i virusi koji uzrokuju bolesti u više vrsta životinja. Zanimljivo je da su neke porodice bakterija klasificirane prema životinjama kod kojih uzrokuju bolesti. Na taj način su klasificirane bakterije iz roda *Brucella* u koje spadaju: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. sus* i *B. canis*.

Tokom evolucije neke bakterije i virusi su otišli korak dalje u razvoju mehanizama kako bi zaobišli prepreke imunoloških sustava životinja stvarajući superantigene (Bergdol i sur. 1960). Oni se razlikuju od tipičnih proteinskih antigena po tome što ih T-limfociti prepoznaju bez prethodnog procesuiranja koje obavlja MHC sustav, čime uzrokuju masivnu proizvodnju citokina koji su toksični i usporavaju imunološki sustav. Proizvedeni se superantigeni vežu na hipervarijabilnu i  $V_{\beta}$  regiju receptora T-limfocita jer su specifični za pojedine genetske segmente, čime stimuliraju i do 20% T-limfocita. Sve funkcije superantigena još nisu

razjašnjene i slabo su proučene, ali ih dosta veliki broj virusnih tumora proizvodi u različitim vrsta životinja. Utvrđeno je da ih neki virusi koriste kako bi se dalje štitili, dok drugima služe kako bi uništili T-limfocite pri njihovom nastanku u timusu.

Epstein-Barr virus u proizvodnji proteina preko mutacija eliminira sve peptide koji bi potencijalno mogli reagirati s MHC molekulom, čime preskače detekciju imunološkog sustava, dok je za bakteriju *Staphylococcus spp.* karakteristično da preko trovanja hranom uzrokuje toksični šok sindrom u goveda koristeći superantigene.



Slika 5. Imunološka obrana dendritičke stanice putem MHC molekula nakon prodora patogena

Izvor: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/major-histocompatibility-complexes-and-antigen-presenting-cells/>

Vagenas (2002.) u svojem radu na malim preživcima utvrdio neravnomjernu raspodjelu pri analizi broja jajašca u fecesu među životinjama iz razloga što uzgajivači primjenjuju preventivne mjere izolirajući bolesne jединke iz stada. Osim toga Vagenas navodi da većina studija obavljenih u temperaturnim regijama Europe dokazuje da je najzastupljenija vrsta nematoda *T. Circumcincta*, dok u tropskim i subtropskim regijama prevladavaju *Haemonchus contortous* i *Trichostrongylous*.

Europske studije na broju jajašca fetusa također dokazuju i da postoji negativna korelacija između broja jajašaca i produktivnih svojstava što je utvrdio Bishop (1996.). To je direktan dokaz činjenice koja govori da paraziti utječu na rast i razvoj životinja kao i njihovu masu.

Njemačka studija na QTL lokusima ovaca za otpornost od parazita pokazuje konkretnu povezanost broja jajašaca u fecesu sa markerima: OarCp73, DYMS1 i BM1815 (Janssen i sur. 2002). U Škotskoj je identificiran antigen MHC druge klase koji je povezan s 98% nižom stopom jajašaca u fecesu škotskih pasmina „*Blackface*“ prethodno inficiranih nematodama *Ostertagia circumcincta* (Schwaiger i sur. 1995).

Druga MHC klasa je odgovorna i za otpornost na parazite u populacijama Europskih bizona (Radwan i sur. 2010). Ova vrsta životinja je pod striktnim programom konzervacije zbog prijetnje infekcija (IUCN, 2009). Utvrđena je povećana prisutnost parazita *A. sidemi* koji je prešao na populaciju poljskih bizona preko jelenske divljači. Ova vrsta parazita je karakteristična za Azijsku divljač, posebno za vrstu *Cervus nippon* preko koje je prvo prešao na bizone u Bjelorusiji 1999. godine, nakon čega se kasnije širio. Kao i u većine ostalih životinja, ova povezanost otpornosti na parazite i druge MHC klase osnosi se na DRB gene koji kodiraju varijabilni dio sustava odgovoran za prihvat stranih molekula (Schwaiger i sur. 1993).

Osim toga, Ditchkoff i sur. (2005.) su u svojem radu uspjeli identificirati 15 MHC-DRB alela u populaciji Američkih divljih jelena koje su svrstali u dvije klase obzirom na otpornost parazita s kojom su povezani. Objašnjavaju razlike itenziteta otpornosti heterozigota i homozigota pri čemu su heterozigotni aleli odgovorni za otpornost šireg spektra, dok je homozigotnost povezana sa otpornošću na specifične parazite, ali jačeg itenziteta, što potvrđuje manji broj jajašaca u fecesu.

Postoji razlika otpornosti na parazite između primitivnih i plemenitih pasmina ovisno o genima koje posjeduju, što je također dokazano među polimorfizmima mirkosatelita DRB1 alela. Osim navedenog primjera, Charon et al. (2002.), je u radu temeljenom na raznovrsnim pasminama ovaca dokazao prednost primitivnih pasmina naspram pasmina oplemenjenih kroz selekciju na proizvoljna svojstva.

Kao što je navedeno u poglavlju o imunološkoj funkciji, prva MHC klasa primarno sudjeluje u obrani organizma od virusa i tumora, ali neki geni ove klase su ipak povezani s otpornošću na parazite. U goveda, ovaca i koza utvrđena je povezanost gena MHC prve klase s otpornošću na raznovrsnih infekcija i parazitarnih bolesti kao što su mastitis, virus govede leukemije, *caprine* artritisa-encefalitisa, i nematode *Trichostrongylus*. To dokazuje da obje MHC klase sudjeluju u obrani organizma od parazitarnih invazija (Zidi i sur., 2008.).

Bitno je za napomenuti da ove studije specifičnih gena MHC sustava fokusiraju povezanost određenih gena i bolesti što i dokazuju, ali izostavljaju utjecaj ostalih gena spomenutog sustava koje ne razmatraju iz raznih razloga (Ditchkoff i sur. 2005). Osim toga, logično je uzeti u obzir prednost koju paraziti ostvaruju radi povoljnih uvjeta za razvoj koji im indirektno osiguravamo uzgojem životinja. Moramo imati na umu nebrojne generacije preživača koje su provodile vrijeme migrirajući, što je samo po sebi nepovoljno za parazite jer u tom slučaju životinje konstantno pasu na novim pašnjacima za razliku od današnjeg stacioniranog držanja životinja. Životinje koje konstantno obavljaju fiziološke potrebe na pašnjaku s kojeg pasu su pod većim pritiskom parazita.

## 2.7. Uloga MHC sustava u tkivima

MHC sustav molekula utječe na međustanično prepoznavanje i tkivnu toleranciju. To se odnosi na činjenicu da unutar svake skupine stanica istog tipa postoje receptori koje MHC sustav prepoznaje u određenim stupnju signalnog prepoznavanja. Obzirom da postoje razne vrste tkiva unutar nekog organizma, MHC sustav je okosnica mehanizma koji omogućava njihov raspored.

Ako se iz bilo kojeg razloga u određenom tkivu nalazi tkivno nekompetentna stanica, dolazi do reakcije koja uzrokuje pokretanje odstranjivanja neželjene stanice kao da se radi o patogenu. Iz ovog razloga dolazi do neprihvatanja i odbacivanja organa pri presađivanju organa što je jedan od najbitnijih problema današnjice prilikom presađivanja. Čak se i na eritrocitima nalaze setovi proteina koje nazivamo markerima krvnih grupa na koje MHC sustav reagira.

MHC sustav djeluje i na površinama stanica plodnih ovojnica pri čemu sudjeluje u procesima spontanijih pobačaja (Bainbridge 2000). Osim toga, ovaj sustav sudjeluje u procesu stvaranja tkivnih barijera u mozgu, što je utvrđeno na slučajevima plastičnosti mozga.

U centralnom živčanom sustavu geni MHC molekula ne dolaze do izražaja, što znači da je njihova ekspresija inhibirana. Tu inhibiciju vrše električno aktivni neuroni unutar svojih membrana i u perinuklearnom prostoru glija stanica (Neumann 2001). Zbog tkivnih ozljeda mozga dolazi do električne inaktivacije neurona na traumatski pogođenim mjestima. Nakon električne inaktivacije dolazi do pokretanja MHC sustava preko protuupalnih signala. Na taj način neuroni održavaju centralni živčani sustav funkcionalnim, a pri njegovoj inaktivaciji pogođeno tkivo dobiva signalnu imunosnu funkciju.

## 2.8. MHC sustav koza

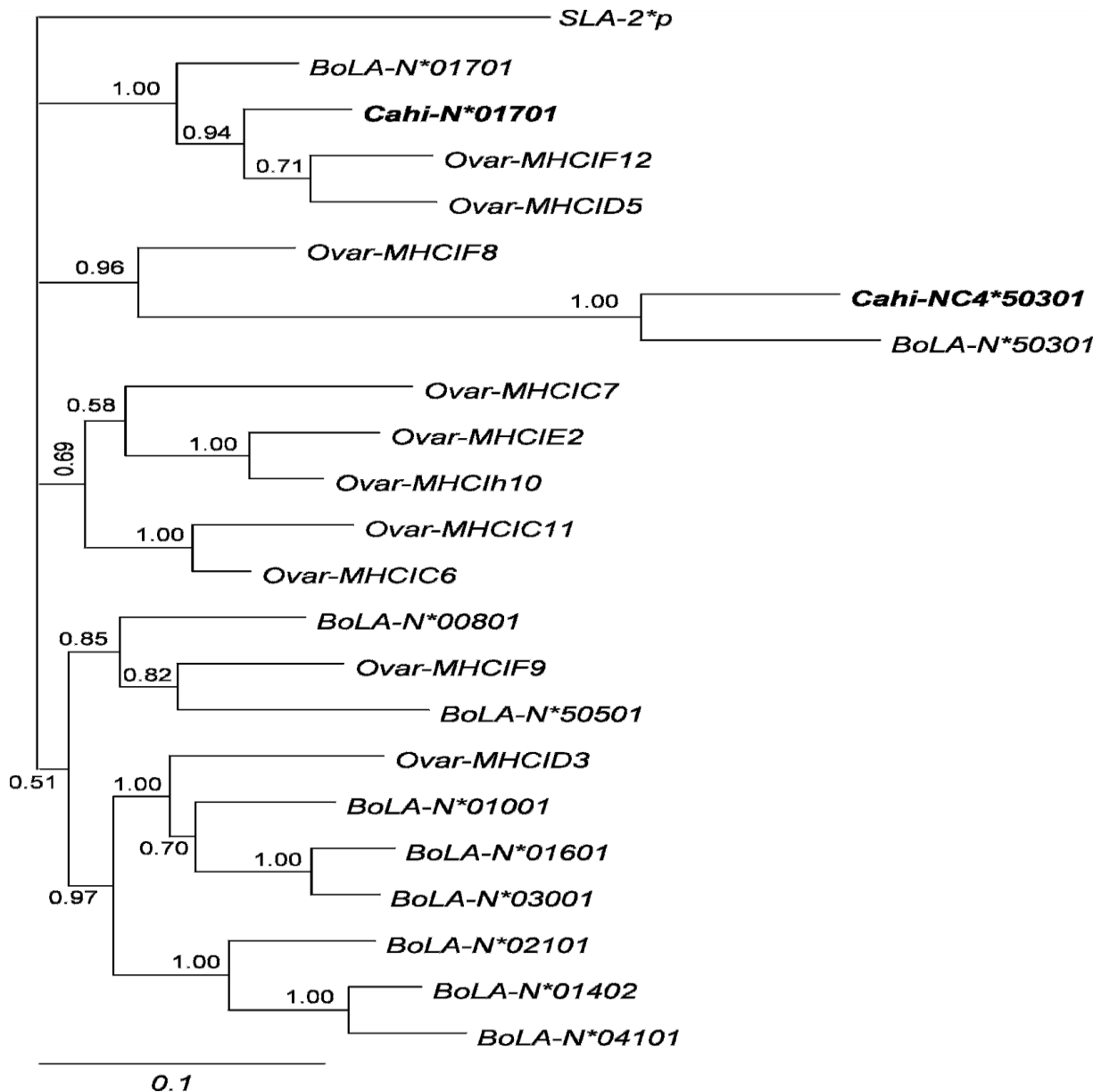
MHC sustav u koza nazvan „caprine leukocyte antigen“ (CLA) ili „goat leukocyte antigen“ (GoLA) ima slične karakteristike kao i ostali MHC sustavi domesticiranih preživača. GoLA geni su kao i u goveda smješteni na 23. kromosomu od njih sveukupno 29 autosomalnih kromosoma.

U koza, kao i u goveda, PB kodirajuću regiju tvore DQ i DR skupina u koju spadaju DRB geni. Specifičnosti MHC gena u koza vezane su uz bolesti kojima su izložene. Osjetljivost kozjeg artritisa kojeg uzrokuje virus segregira sa prvom klasom MHC-a čija je uloga vezana uz staničnu obranu od virusa i tumora. Prema Cameronu i sur. (1990.), utvrđeno je postojanje 10 – 13 MHC gena klase I i njihovu udaljenost unutar 800 kilobaza od gena odgovornih za faktore tumora nekroze (TNF).

Na MHC genima u divljih alpskih koza (*Capra ibex ibex*) utvrđeno je postojanje introgresije srodnih vrsta. To se odnosi na DRB gen koji je najpolimorfiji gen druge MHC klase gena, a sadrži čak 58 alela koji pokazuju (99.8%) sličnosti s DRB genima u domesticiranih koza. Ova introgresija je uzrokovala povećanu varijabilnost MHC gena u alpskih koza (*Capra ibex ibex*).



MHC sustav kao i cijeli genom divljih koza primarno je nastao hibridizacijom dvaju ancestralnih divljih podvrsta od kojih je jedna odgovorna za naslijeđe nuklearnog genoma, dok je druga odgovorna za naslijeđe mitohondrija koji im omogućuju preživljavanje na višim nadmorskim visinama (Ballingal i sur 2010).



Slika 6. Poligenetsko stablo prve klase MHC gena ovaca, govoda i koza, korišetna „outgrupa“ SLA-2\*p

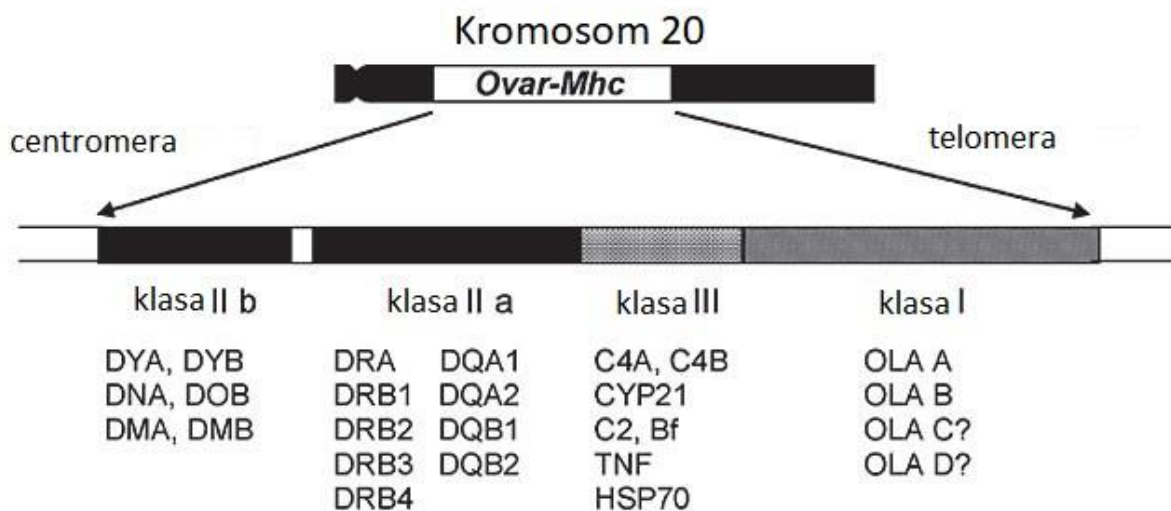
Izvor: Sequence analysis of goat major histocompatibility complex class 1 genes Zidi i sur. (2008)

Za koze je specifičan artritis encephalitis virus koji spada u skupinu retrovirusa zajedno s HIV-om. U ovom slučaju MHC sustav čini ključnu ulogu usporavanja njegovog razvoja i prepoznavanja pri čemu utječe na epitope B i T stanice pri obrani organizma (Fluri i sur. 2006).

## 2.9. MHC sustav ovaca

MHC sustav ovaca ima poseban naziv, ovar-MHC (*Ovis aries*) koji se koristi u literaturi radi sistematike ove vrste. Struktura MHC-a je u ovaca slična kao i u ostalih domaćih životinja, a nalazimo ih u sveukupno tri klase (Blair i sur. 2006.).

Geni ovog sustava se u ovaca nalaze na 20. kromosomu (slika 6). Većina se gena pri nasljeđivanju prenose u blokovima kao haplotipovi sa slabom stopom rekombinacija, ovaj fenomen je dobro objašnjen pojmom koji nazivamo („linkage disequilibrium“ ili LD).



Slika 7. shematski prikaz gena ovar MHC-a

Izvor: 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: structure and gene polymorphisms (Dukkipati i sur.2006)

Na sve vrste preživača utječu raznovrsni paraziti uzrokujući efekt balansirajuće selekcije, što je u ovaca također utvrđeno utjecajem ovčjeg metilja. Ovaj tip selekcije može favorizirati heterozigote ili rijetke varijante alela, ali može dovoditi i do promjene jačine selekcije. Parazitima se općenito posvećuje velika pažnja jer kroz liječenje stijeću rezistenciju na lijekove, što dovodi do neefikasnog i neekonomičnog liječenja.

Obzirom na ove okolnosti, jedino rješenje koje preostaje je selekcija životinja na otpornosti od pojedinih vrsta parazita. Selekcijom ovce stijeću otpornost na nematode vrlo brzo, i to već sa 6 mjeseci. Suprotan slučaj je utvrđen pri stjecanju otpornosti na crve, jer pri izlaganju ovaca tokom prve sezone nije zabilježeno stjecanje otpornosti (Winter 2002.). Ovaj fenomen dovodi do zaključka da se geni za otpornost od crva i metilja lokaliziraju na drukčiji način, što je dokazano na (QTL)lokusima (Davies et al 2006.).

Za ovce je specifičan SY1 gen koji kodira prvu klasu MHC molekula. Ovaj gen sudjeluje u stjecanju otpornosti od određenih vrsta parazita. Ovaj slučaj je specifičan po tome što se za prvu MHC klasu smatra da u kralježnjaka sudjeluje u imunskim reakcijama protiv virusa i tumora.

Osim imunosne uloge, geni koji kodiraju MHC sustav povezani su s ostalim svojstvima kao što su mramoriranost mesa, porodnom masom i masom vune (Blair i sur., 2006.). Bitno je spomenuti da pri otpornosti na parazite ne sudjeluju samo geni MHC sustava, već se radi i o tri seta protuparazitarnih gena koji snažno djeluju na otpornost ovaca (Blair i sur., 2006.).

Za ovce je karakteristično da ne posjeduju DP podregiju koju nalazimo u drugih životinja, ali je za razliku od nje DQ podregija visokopolimorfna, što ukazuje da ova regija u ovaca ima značajniju ulogu. U ovoj podregiji su utvrđena dva gena DQA1 i DQA2 koji se razlikuju po tome što je drugi zastupljeniji u populacijama ovaca i u odsutnosti prvog dolazi do pojave trećeg gena. Taj treći gen koji se pojavljuje okarakteriziran je kao gen sličan DQA2 genu i najvjerojatnije je nastao rekombinacijama između lokusa prije podjele vrsta *Bovidae* (Ballingall et al., 2015).

## 2.10. MHC sustav goveda

U goveda je utvrđeno da prva klasa MHC regije sadrži 10 do 20 gena od kojih je njih najmanje tri uključeno u ekspresiju. Ovi geni su polimorfni i njih 21 nalazimo u goveda kao različite *Bovine* (BoLA) sekvence.

BoLA geni su smješteni na 23. kromosomu od njih sveukupno 29 autosomalnih kromosoma, a drugi su naziv za MHC sustav u goveda i označavaju leukocitnu antigenu familiju ovih gena. Nalazimo preko 150 BoLA gena koji su organizirani u grupama čiji su lokusi neravnomjerno udaljeni jedni od drugih.

Ukupna veličina prve klase MHC regije kreće se od 770 do 1650 Kb koja sadrži dva lokusa; B i A međusobno udaljena 200 Kb s visokom stopom ekspresije. Za razliku od nje, regija druge klase sadrži DMA, DMB, LMP2, LMP7 i TAP gene koji služe za procesiranje i transport antigena te uz njih posjeduje i gene čija je funkcija još do danas nepoznata, a to su DNA, DOB, DIB, DYA, i DYB geni.

Uočene su značajne razlike u stopi rekombinacije u intervalu između DRB3 i DYA gena različitih bikova, što ukazuje na prisustvo polimorfne rekombinacije pri kromosomskoj preraspodjeli gena u toj regiji. Ovi podaci upućuju na to da je organizacija gena klase II u goveda nastala kromosomskom inverzijom koja se odvijala tokom evolucije njihovih zajedničkih predaka.

Prije otprilike 20 milijuna godina došlo je do razdvajanja vrsta između goveda i ovaca što nam dokazuje usporedba funkcionalnih DYA gena utvrđenih u ove dvije vrste životinja. Stupanj očuvanosti između tih MHC gena sukladan je utjecaju selekcije tokom evolucije, što upućuje na to da ti geni zadržavaju jedinstvenu funkciju u preživaa. Nivo konzervacije promotorne, kodirajuće i intronske regije ovog gena je preko 90%, što je mjerljivo samo s funkcionalno aktivnim genima.

### 3. ZAKLJUČAK

Uloga sustava tkivne podudarnosti (MHC) u preživača je od iznimne važnosti. Bez obzira na ograničavajuće čimbenike, kao što su energetske kapacitete organizma za proizvodnju ovih molekula, MHC sustav obavlja ključnu ulogu pri imunološkom odgovoru kralježnjaka, pogotovo kompleksnijih i većih organizama kao što su sisavci.

Osim što sudjeluje u imunom odgovoru organizma, bitan je za sveukupno funkcioniranje i rast životinja. Na području tkivne podudarnosti i gena koji sudjeluju u procesima prepoznavanja molekula je do sada ostvaren izniman napredak, što se može uočiti na različitim kompleksnim mehanizmima u kojima sudjeluje.

Geni ovog sustava nam ukazuju na principe kojima životinje funkcioniraju i objašnjavaju njihovo nasljeđe. Pomoću mapiranih gena MHC sustava moguće je ciljano unaprijediti otpornost životinja u slučajevima rapidne otpornosti patogena na lijekove. U određenim slučajevima selekcija na MHC gene ne daje dobre rezultate zbog drugih čimbenika koji utječu na životinje.

Daljnja istraživanja ovog sustava i mapiranje njegovih gena bitna su ne samo iz funkcionalnih razloga, već i iz razloga što se na godišnjoj razini gube masivne količine ovih gena u procesu izumiranja vrsta. Budući znanstveni radovi iz ovog kompleksnog područja dovest će do boljeg razumijevanja ovih gena i njihove prirode, a time i boljeg poimanja biologije, imuniteta i procesa prepoznavanja molekula u kojima MHC sustav sudjeluje.

## POPIS LITERATURE

- Amills, M., Ramiya, V., Nonmine, J., & Lewin, H. A. (1998). The major histocompatibility complex. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, *17*(1), 108-120.
- Baghizadeh, A., Bahaaddini, M., Mohamadabadi, M. R., & Askari, N. (2009). Allelic variations in exon 2 of caprine MHC class II DRB3 gene in Raeini Cashmere goat. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, *6*(4), 454-459.
- Bahr, A., & Wilson, A. B. (2012). The evolution of MHC diversity: evidence of intralocus gene conversion and recombination in a single-locus system. *Gene*, *497*(1), 52-57.
- Bainbridge, D. R., Sargent, I. L., & Ellis, S. A. (2001). Increased expression of major histocompatibility complex (MHC) class I transplantation antigens in bovine trophoblast cells before fusion with maternal cells. *Reproduction*, *122*(6), 907-913.
- Ballingall, K. T., & Tassi, R. (2010). Sequence-based genotyping of the sheep MHC class II DRB1 locus. *Immunogenetics*, *62*(1), 31-39.
- Ballingall, K. T., Rocchi, M. S., McKeever, D. J., & Wright, F. (2010). Trans-species polymorphism and selection in the MHC class II DRA genes of domestic sheep. *PLoS One*, *5*(6), e11402.
- Behl, J. D., Verma, N. K., Tyagi, N., Mishra, P., Behl, R., & Joshi, B. K. (2012). The major histocompatibility complex in bovines: a review. *ISRN veterinary science*, *2012*.
- Cameron, P. U., Tabarias, H. A., Pulendran, B., Robinson, W., & Dawkins, R. L. (1990). Conservation of the central MHC genome: PFGE mapping and RFLP analysis of complement, HSP70, and TNF genes in the goat. *Immunogenetics*, *31*(4), 253-264.
- Ditchkoff, S. S., Hooper, S. R., Lochmiller, R. L., Masters, R. E., & Van Den Bussche, R. A. (2005). MHC-DRB evolution provides insight into parasite resistance in white-tailed deer. *The Southwestern Naturalist*, *50*(1), 57-64.
- Dukkipati, V. S. R., Blair, H. T., Garrick, D. J., & Murray, A. (2006). 'Ovar-Mhc '—Ovine major histocompatibility complex: Role in genetic resistance to diseases. *New Zealand veterinary journal*, *54*(4), 153-160.
- Flemming, A. J., Shen, Z. Z., Cunha, A., Emmons, S. W., & Leroi, A. M. (2000). Somatic polyploidization and cellular proliferation drive body size evolution in nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(10), 5285-5290.

- Fluri, A., Nenci, C., Zahno, M. L., Vogt, H. R., Charan, S., Busato, A., ... & Bertonni, G. (2006). The MHC-haplotype influences primary, but not memory, immune responses to an immunodominant peptide containing T-and B-cell epitopes of the caprine arthritis encephalitis virus Gag protein. *Vaccine*, *24*(5), 597-606
- Gao, J., Liu, K., Liu, H., Blair, H. T., Li, G., Chen, C., ... & Ma, R. Z. (2010). A complete DNA sequence map of the ovine major histocompatibility complex. *BMC genomics*, *11*(1), 466.
- Grossen, C., Keller, L., Biebach, I., Croll, D., & International Goat Genome Consortium. (2014). Introgression from domestic goat generated variation at the major histocompatibility complex of alpine ibex. *PLoS genetics*, *10*(6), e1004438.
- Hughes, A. L., & Nei, M. (1993). Evolutionary relationships of the classes of major histocompatibility complex genes. *Immunogenetics*, *37*(5), 337-346.
- Hughes, A. L., & Nei, M. (1990). Evolutionary relationships of class II major-histocompatibility-complex genes in mammals. *Molecular Biology and Evolution*, *7*(6), 491-514.
- Hughes, A. L., Ota, T., & Nei, M. (1990). Positive Darwinian selection promotes charge profile diversity in the antigen-binding cleft of class I major-histocompatibility-complex molecules. *Molecular Biology and Evolution*, *7*(6), 515-524.
- Khatib, H. (Ed.). (2015). *Molecular and quantitative animal genetics*. John Wiley & Sons. Understanding the Major Histocompatibility Complex and Immunoglobulin Genes
- Koutsogiannouli, E. A., Moutou, K. A., Stamatis, C., & Mamuris, Z. (2016). MHC class II DRB1 and DQA2 gene polymorphisms in four indigenous breeds of sheep (*Ovis aries*). *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, *81*(6), 628-636.
- Muhlethaler-Mottet, A., Otten, L. A., Steimle, V., & Mach, B. (1997). Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *The EMBO journal*, *16*(10), 2851-2860.
- Nei, M., & Hughes, A. L. (1991). Polymorphism and evolution of the major histocompatibility complex loci in mammals. *Evolution at the molecular level*, 222-247.
- Paterson, S., & Pemberton, J. M. (1997). No evidence for major histocompatibility complex-dependent mating patterns in a free-living ruminant population. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *264*(1389), 1813-181

Paterson, S. (1998). Evidence for balancing selection at the major histocompatibility complex in a free-living ruminant. *Journal of Heredity*, 89(4), 289-294.

Paterson, S., Wilson, K., & Pemberton, J. M. (1998). Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3714-3719.

Radwan, J., Demiaszkiewicz, A. W., Kowalczyk, R., Lachowicz, J., Kawałko, A., Wójcik, J. M., ... & Babik, W. (2010). An evaluation of two potential risk factors, MHC diversity and host density, for infection by an invasive nematode *Ashworthius sidemi* in endangered European bison (*Bison bonasus*). *Biological conservation*, 143(9), 2049-2053.

Thiriet, M. (2011). *Cell and tissue organization in the circulatory and ventilatory systems* (Vol. 1, p. 735). New York: Springer. Recognition of body's cells – Major Histocompatibility Complex

van Oosterhout, C. (2009). A new theory of MHC evolution: beyond selection on the immune genes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(1657), 657-665.

Wekerle, H. (2005). Planting and pruning in the brain: MHC antigens involved in synaptic plasticity?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(1), 3-4

Zidi, A., Sanchez, A., Obexer-Ruff, G., & Amills, M. (2008). Sequence analysis of goat major histocompatibility complex class I genes. *Journal of dairy science*, 91(2), 814-817.