

Parametry zmienności genetycznej loci DRB1 i DQA1 MHC klasy II zajęcy polskich (*Lepus europaeus*)

BARBARA KOSOWSKA, TOMASZ STRZAŁA, BEATA DZIEDZIC, ŁUKASZ MAJKA, KRZYSZTOF GRABOWSKI, MAGDALENA MOSKA, TADEUSZ DOBOSZ*

Pracownia Biologii Molekularnej i Cytogenetyki Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt
Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt UP, ul. Kozuchowska 7, 51-631 Wrocław

*Zakład Technik Molekularnych Katedry Medycyny Sądowej AM, ul. M. Curie-Skłodowskiej 52, 50-369 Wrocław

Kosowska B., Strzała T., Dziedzic B., Majka Ł., Grabowski K., Moska M., Dobosz T.

Genetic variability parameters at MHC class II DRB1 and DQA1 loci in Polish hares (*Lepus europaeus*)

Summary

The aim of the study was to evaluate the parameters of genetic variability at the MHC class II DRB1 and DQA1 loci in 112 brown hares from 4 regions of Poland. Disturbances in the Hardy-Weinberg (HW) equilibrium associated with an increase in homozygosity at these loci may lead to an increase in the proportion of females whose fetuses have compatible MHC haplotypes. This compatibility may result in abortion, which diminishes the reproductive success of the species. The extraction of nuclear DNA from peripheral blood lymphocytes was performed with GenElute Blood Genomic DNA Kit manufactured by Sigma-Aldrich. DNA isolation from muscles was performed with Sherlock AX set manufactured by A&A Biotechnology. Primers and PCR conditions for the second DQA gene exon were conducted according to (34). Alleles obtained were analyzed for polymorphism by the SSCP method with modifications according to (34). The following primers were used to obtain exon 2 of the DRB gene: DRB2F 5' – GAG TGT CAT TTC TAC AAC GGG A – 3', DRB2R 5' – CTC CCG AAC CCC GTA GTT GTG TTT GC – 3'. Other reaction conditions were the same as for the DQ gene. Alleles obtained were analyzed with the Arlequin 3.5 program (20). The following parameters were analyzed: expected and observed heterozygosity, the inbreeding level (FIS), and the fixation index (FST). The number of alleles in the population, the number of private alleles, the number of homozygotes and heterozygotes, as well as the allelic richness (R) were determined with the FSTAT v.2.9.3.2 program (23). FIS for the DRB1 locus revealed an HW disequilibrium with a significant excess of DRB1 homozygotes, especially in the Kalisz region. FIS for the DQA 1 locus revealed an HW equilibrium in the Kalisz and Oświęcim regions, whereas in the other regions (Ciechanów and Plock) there was a slight excess of heterozygotes. These results are the first findings for the MHC class II DRB1 and DQA1 loci in a population of Polish hares living in the wild. The above picture of changes in the frequency of genes and DRB1 and DQA1 genotypes shows tendencies towards decreasing heterozygosity and increasing homozygosity. This reveals the local incidence of highly unfavorable phenomena associated with an inadequate gene exchange, resulting in a disturbed HW equilibrium. These findings suggest that poor reproductive performance of Polish hares may be indirectly related to a disturbed HW equilibrium and a significant increase of homozygosity at the MHC class II DRB1 locus.

Keywords: brown hare, the loci DRB1 and DQA1 MHC class II, genetic polymorphism, genetic equilibrium

Utrzymanie szerokiego zakresu zmienności genetycznej wewnątrz gatunku jest kluczowe dla jego przetrwania (4, 46). W szczególności ważna jest zmienność w loci związanych z procesem adaptacji, bowiem mają one podstawowe znaczenie dla utrzymania indywidualnej sprawności z konsekwencjami na poziomie populacji i gatunku (33), jednakże rola zmienności genetycznej w adaptacji jest nadal słabo poznanym zagadnieniem. Skutkiem udanej adaptacji jest sukces reprodukcyjny, który z kolei jest wypadkową wielu czynników, m.in. sprawności indywidualnej (fitness)

oraz wielkości i zróżnicowania genetycznego populacji (46). Wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw sukcesu reprodukcyjnego pozwoli na zrozumienie interakcji między zachowaniami zwierząt, takimi jak wybór partnera i systemów rozrodczych, a czynnikami działającymi wewnątrz populacji i gatunku (4). Perspektywicznym kandydatem do badania związku między adaptacyjną zmiennością genetyczną, sprawnością indywidualną oraz żywotnością populacji są geny głównego układu zgodności tkankowej (MHC). Region MHC zawiera ponad sto genów z wysokim

poziomem allelicznego bogactwa, których produkty chronią ustrój przed pasożytami i chorobami zakaźnymi (37, 38, 44, 49) oraz odgrywają ważną rolę w doskonaleniu adaptacji organizmu w wyniku działania układu immunologicznego (6, 11, 21, 28) i w związku z tym idealnie nadaje się do testowania natury i zakresu wyboru genów zaangażowanych w proces adaptacji i reprodukcji (8). Wyniki badań klinicznych na ludziach wskazują, że sukces rozwoju płodu jest ściśle związany z ekspresją genów MHC w tkankach łączących matkę z płodem (29, 40). Stworzono hipotezę, że prawidłowy rozwój łożyska wymaga inicjowania odpowiedniej odpowiedzi immunologicznej poprzez istnienie niezgodności w *loci* MHC między matką i płodem (9, 27). Mechanizm tkwiący u podłoża tej koncepcji jest nadal niejasny, ale wielokrotnie wykazano, że gdy u płodu ulegają ekspresji antygeny MHC pochodzące od ojca i są one takie same, jak antygeny pochodzące od matki, reakcja powstająca na łożyskowe komórki trofoblastu jest niewystarczająca i powstaje niedostateczna bariera immunologiczna na styku matka–płód (9, 29). W badaniach żyjącej w niewoli populacji makaków wykazano, że skutek zimbredowania populacji i wzrostu homozygotyczności występujące często u potomstwa zgodne rodzicielskie antygeny MHC były przyczyną 72% samoistnych poronień (32). Wysoki poziom polimorfizmu w genach MHC wskazuje, że są one efektem selekcji równoważącej i w naturalnej populacji są niezwykle elastyczne (46). Najszerszy polimorfizm występuje głównie w regionie kodującym miejsce wiązania antygeny (PBR – Peptide Binding Region), znajdującym się w rowku cząsteczki MHC prezentującej antygen na powierzchni komórki (43, 48). Zmienność w PBR jest kluczowym czynnikiem umożliwiającym cząsteczkom MHC wiązanie różnych klas patogenów (2, 12, 48). Wielokrotnie wykazano, że kolejność nukleotydów w sekwencji PBR odbiega od możliwości ich neutralnego ewoluowania (1, 31). Drugi ekson genu DQA1 oraz drugi ekson genu DRB1 MHC klasy II przyciągają najwięcej uwagi, ponieważ wykazują najszerszy z wszystkich badanych *loci* ustroju ssaka zakres polimorfizmu (3, 12, 14, 34), osiągnięty najprawdopodobniej pod wpływem ataków różnych pasożytów (51) i potencjalnie także pod wpływem różnych infekcji (48). Ponadto różne *loci* MHC są związane z odmiennymi i ważnymi cechami biologicznymi, takimi jak m.in. interakcja matki z płodem i wynik ciąży (8, 13, 41). Nie sposób ocenić liczbę przypadków niedonoszonych ciąż w populacji zwierząt dzikich, wolno żyjących na dużym obszarze. Można takie badania prowadzić jedynie wśród zwierząt żyjących w zamkniętej kolonii. Wśród zajęcy europejskich żyjących w zamkniętych koloniach w Austrii i Belgii taki eksperyment przeprowadzono (46). W wyniku analizy szeregu czynników prognostycznych związanych z kondycją osobniczą w badaniach tych wykazano, że wraz ze wzrostem homozygotyczności w *locus* DQA

oraz DRB MHC klasy II samic zmniejszał się ich sukces reprodukcyjny (46). Europejski zajęc szarak idealnie nadaje się do tego typu badań. Z uwagi na fakt, iż gatunek ten jest zarówno w Polsce, jak i Europie zagrożony wyginięciem (18), jego przedstawiciele żyją zarówno na wolności, jak i w licznych ośrodkach hodowlanych w całej Europie. Zajęce są zagniazdownikami, bardzo szybko rosnącymi od pierwszych dni po porodzie. Życie na powierzchni ziemi, niewielki stopień ochrony przed surowym środowiskiem, samotność osesków odwiedzanych przez matkę tylko raz dziennie na bardzo krótki okres ssania, narażenie na nagłe zmiany środowiska praktycznie bez ochrony matki (25, 45) sugerują bardzo wydajny układ odpornościowy przedstawicieli tego gatunku. Sprawność układu odpornościowego w trudnych warunkach środowiska może mieć decydujące znaczenie dla udanej reprodukcji samic (36).

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki, celem badań było określenie zasobów polimorfizmu w *loci* DRB1 oraz DQA1 MHC klasy II dziko żyjących zajęcy i na tej podstawie oszacowanie parametrów zmienności genetycznej, które przeanalizowano i w efekcie oceniono ryzyko związane z zagrożeniem sukcesu reprodukcyjnego samic zajęcy w badanej populacji.

Materiał i metody

Próbki krwi obwodowej oraz mięśni pochodzące od 112 zajęcy szaraków (*Lepus europaeus*) pozyskano w latach 2005-2008 od myśliwych z 4 miejsc odłowu zlokalizowanych w pobliżu Ciechanowa, Kalisza, Oświęcimia oraz Torunia. Miejsce pozyskania prób i ich liczebność przedstawiono na ryc. 1.

Nomenklatura. Haplotyp MHC klasy II kręgowców może zawierać więcej niż jeden gen zarówno DQ, jak i DR. Rowek wiążący antygen jest uformowany wspólnie przez łańcuch zewnętrzny 1 kodowany przez *locus* DQA1, jak i łańcuch zewnętrzny 1 kodowany przez *locus* DRB1. Nie ma dowodów na ekspresję genu DQA2, obecnego u wielu kręgowców, natomiast istnieją dowody na ekspresję dodatkowych domen w *locus* DR: DRB3, DRB4 i DRB5 (16). Na przykład liczba *loci* DRB rezusa (*Macaca mulatta*)



Ryc. 1. Mapa miejsc odłowu zajęcy: (1) Ciechanów (24 osobniki), (2) Kalisz (30 osobników), (3) Oświęcim (28 osobników), (4) Toruń (30 osobników)

wynosi od 2 do 7, człowieka od 1 do 4. Jeśli występuje tylko jeden gen DRB, to jest to zawsze DRB1 (17). Ponieważ nie jest znana ogólna liczba *loci* DQA oraz DRB zajęcy ulegająca ekspresji, w niniejszej pracy zbadano zawsze aktywne i najbardziej zmienne drugie eksony genów DQA1 oraz DRB1.

Analiza genetyczna. Ekstrakcję genomowego DNA komórek z limfocytów krwi obwodowej wykonano przy pomocy zestawu GenElute Blood Genomic DNA Kit firmy Sigma-Aldrich. Izolację DNA z tkanki mięśniowej wykonano z zastosowaniem zestawu Sherlock AX firmy A&A Biotechnology. Primery i warunki reakcji PCR dla eksonu drugiego genu DQA prowadzono wg (34). Wielkości produktów PCR wyniosły, odpowiednio, 250 pz dla eksonu 2 genu DQA oraz 230 dla eksonu 2 genu DRB. Uzyskane allele różniące się długością i konformacją poddano analizie polimorfizmu metodą SSCP zmodyfikowaną przez (34). Do uzyskania eksonu 2 genu DRB użyto primerów: DRB2F 5'-GAG TGT CAT TTC TAC AAC GGG A-3', DRB2R 5'-CTC CCG AAC CCC GTA GTT GTG TTT GC-3'. Wa-

runki reakcji PCR oraz dalsze postępowanie było analogiczne jak dla genu DQA.

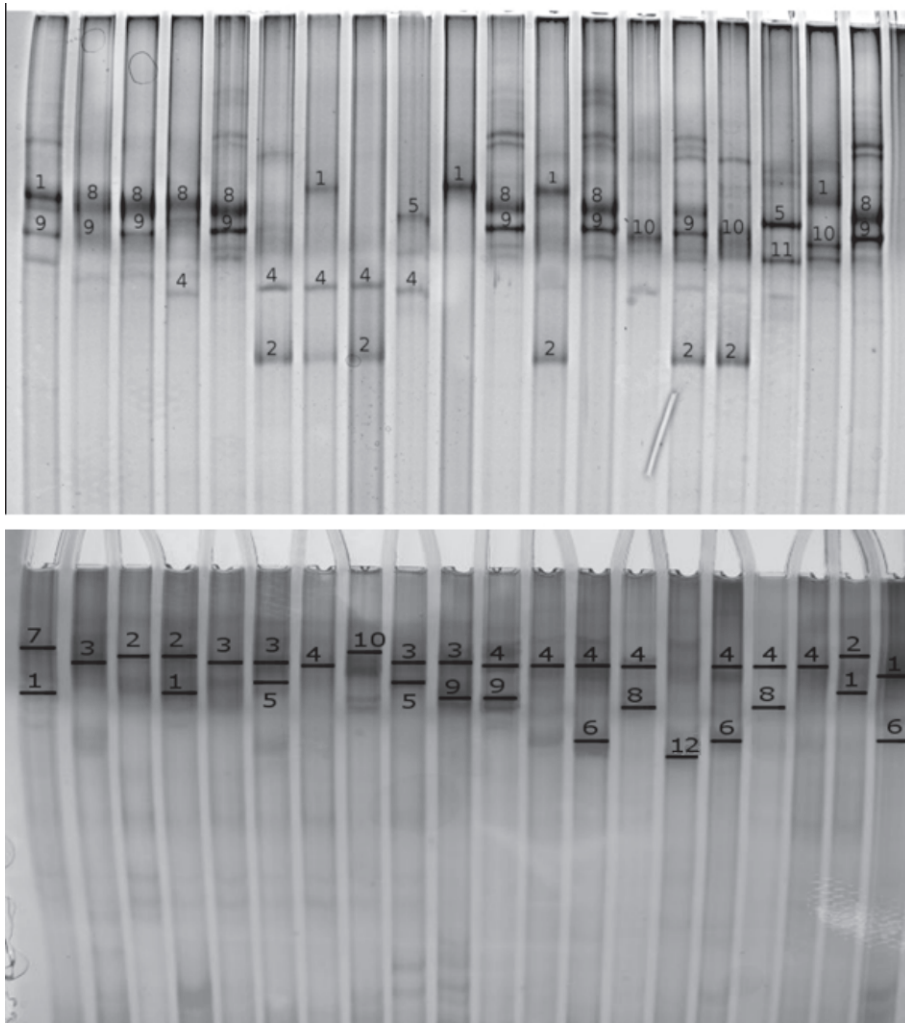
Analiza statystyczna. Uzyskane allele analizowano statystycznie przy użyciu programu Arlequin 3.5 (20). Oszacowano heterozygotyczność oczekiwaną oraz obserwowaną, współczynnik inbrodu (F_{IS}), a także współczynnik odrębności genetycznej (F_{ST}). Ponadto korzystając z programu FSTAT v.2.9.3.2 (23) określono liczbę alleli w populacji, liczbę alleli prywatnych oraz liczbę homozygot i heterozygot, a także określono bogactwo alleliczne (R).

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki są pierwszymi otrzymanymi dla *loci* DRB1 i DQA1 MHC klasy II w dziko żyjącej populacji zajęcy polskich. Są one wstępnymi wynikami prowadzonych analiz, gdyż nie zostało jeszcze zakończone sekwencjonowanie analizowanych próbek. Na ryc. 2 przedstawiono elektroforetogramy obrazujące wszystkie znalezione haplotypy SSCP dla genów DRB i DQA. Wartości wskaźników zmienności będą więc

stanowiąc materiał porównawczy dla następnych badań monitorujących zagrożoną populację zajęcy krajowych. W tabelach 1 oraz 2 przedstawiono wszystkie wyniki dotyczące wartości 9 parametrów zmienności genetycznej badanych zajęcy. W tab. 3 i 4 zawarto dane dotyczące frekwencji alleli, odpowiednio, DQA1 oraz DRB1.

Wyniki porównawcze *loci* DQA i DRB. Łącznie zbadano próbki pochodzące od 112 zajęcy. W przypadku *locus* DRB1 część próbek nie dawała jednoznacznego obrazu i ostatecznie wzięto pod uwagę próby od 94 osobników. Liczba alleli (L) zidentyfikowana w *locus* DRB1 była wyższa (12 alleli na 94 badane zajęce) niż w *locus* DQA1 (9 alleli na 112 zajęcy). Wartość wskaźnika szacującego średni stosunek homozygot do heterozygot (h/H) świadczy o przewadze heterozygot nad homozygotami zarówno w *locus* DQA1, jak i DRB1 (odpowiednio, 20/92 oraz 26/68). Z jednej strony, wskazuje to na istnienie znaczącej heterozygotyczności w całej badanej populacji złożonej z 4 subregionów, z drugiej – (po porównaniu wartości następujących dwóch parametrów – średniej heterozygotyczności oczekiwanej (H_e) i średniej heterozygotyczności obserwowanej (H_o) dla obu *loci*) świadczy o przeciwnie działających i istotnych trendach wewnątrz poszczególnych subpopulacji, bowiem na całym badanym obszarze średnia wartość (H_e) była



Ryc. 2. Elektroforetogram zbiorczy zdenaturowanych i rozdzielonych fragmentów eksonu 2 genu DQA (u góry) oraz eksonu 2 genu DRB (u dołu) pochodzących z próbek uzyskanych od dziewiętnastu zajęcy, ponumerowanych u dołu fotografii. Rozdzielone fragmenty położone na tej samej wysokości w różnych kolumnach w górnej części żelu oznaczają jednakowe allele (oznaczone cyframi 1-9). Na fotografii zebrano wszystkie możliwe allele i genotypy, jakie zidentyfikowano w badanej populacji

Tab. 1. Liczebność próbek pobranych z poszczególnych regionów Polski (N), liczba wykrytych alleli w obrębie tych próbek (L), stosunek homozygot do heterozygot (h/H), bogactwo alleliczne (R) oraz liczba alleli prywatnych w poszczególnych populacjach (N_p)

Region	N		L		h/H		R		N _p	
	DQA	DRB	DQA	DRB	DQA	DRB	DQA	DRB	DQA	DRB
Ciechanów	24	24	4	9	2/22	4/20	4,0	8,8	0	2
Kalisz	30	26	7	6	10/20	10/16	6,9	5,9	1	1
Oświęcim	28	18	7	7	6/22	6/12	7,0	7,0	1	1
Toruń	30	6	6	5	2/28	6/20	5,9	4,9	1	1
suma/średnia	112	94	9	12	20/92	26/68	8,3	9,8	3	5

Tab. 2. Heterozygotyczność oczekiwana (H_e) i obserwowana (H_o), współczynnik inbrodu (F_{IS}) oraz współczynnik utrwalenia (F_{ST})

Region	H _e		H _o		F _{IS}		F _{ST}	
	DQA	DRB	DQA	DRB	DQA	DRB	DQA	DRB
Ciechanów	0,67*	0,84*	0,92*	0,58*	-0,38	0,31*	0,10*	0,09*
Kalisz	0,78*	0,81*	0,67*	0,46*	0,15	0,44*	0,09*	0,09*
Oświęcim	0,85*	0,78*	0,78*	0,66*	0,08	0,15	0,09*	0,10*
Toruń	0,80*	0,77*	0,93*	0,54*	-0,17	0,31*	0,09*	0,10*
suma/średnia	0,84*	0,87*	0,82*	0,55*	0,02	0,36*	0,09*	0,09*

Objaśnienia: * – $p \leq 0,05$

Tab. 3. Frekwencje poszczególnych alleli *locus* DQA1 w badanych populacjach

Populacja	h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7	h8	h9
Ciechanów	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,33	0,46
Kalisz	0,13	0,13	0,00	0,00	0,03	0,40	0,07	0,13	0,10
Oświęcim	0,07	0,18	0,14	0,00	0,07	0,21	0,00	0,14	0,18
Toruń	0,27	0,07	0,00	0,17	0,07	0,00	0,00	0,30	0,13
Cała populacja	0,13	0,13	0,04	0,05	0,05	0,18	0,02	0,22	0,21

Tab. 4. Frekwencje poszczególnych alleli *locus* DRB1 w badanych populacjach

Populacja	h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7	h8	h9	h10	h11	h12
Ciechanów	0,13	0,08	0,08	0,33	0,04	0,08	0,00	0,04	0,00	0,00	0,04	0,17
Kalisz	0,04	0,15	0,23	0,12	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00
Oświęcim	0,06	0,11	0,22	0,39	0,00	0,06	0,00	0,06	0,11	0,00	0,00	0,00
Toruń	0,23	0,31	0,23	0,04	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cała populacja	0,12	0,17	0,19	0,20	0,09	0,03	0,05	0,02	0,02	0,05	0,01	0,04

istotnie wyższa dla obu *loci* od średniej wartości (H_o). Te wartości z kolei dowodzą, że frekwencja genów i genotypów w badanej populacji jako całości wykazuje silne i istotne odchylenia od równowagi Hardy-Weinberga. Wartość wskaźnika bogactwa allelicznego (R) niewiele odbiegała od parametru (L), szacującego liczbę alleli na całym badanym obszarze. Brak zasadniczych różnic między wskaźnikami R i L wynikał ze sposobu szacowania wartości wskaźnika R w stosunku do współczynnika L. Wskaźnik R uwzględnia bo-

wiem wielkość próby, przyrównując ją do populacji o najmniejszej liczebności. Ponieważ między wielkościami prób nie było znaczących różnic, wartości wskaźników R oraz L były do siebie zbliżone. Wartość wskaźnika szacującego liczbę alleli prywatnych charakterystycznych tylko dla badanej subpopulacji (L_p), wykazała, iż więcej „endemicznych” alleli jest związanych z *locus* DRB1 (5 alleli) niż z *locus* DQA1 (3 allele), przy czym obszarem, na którym wystąpiła największa dywersyfikacja alleli prywatnych, był region 1 (Ciechanów). W regionie tym z *locus* DQA1 nie był związany żaden allel prywatny, natomiast z *locus* DRB1 – dwa. Parametrem, który najbardziej zróżnicował wyniki oceny zmienności genetycznej dla obu *loci* był współczynnik inbrodu (F_{IS}). Między średnimi wartościami F_{IS} dla *loci* DQA1 i DRB1 odnotowano bardzo znaczącą różnicę. Wartość F_{IS} dla *loci* DQA1 była bliska zeru (0,02) i nieistotna, natomiast dla *locus* DRB1 wysoka (0,36) i istotna. Świadczy to, że w przypadku *locus* DQA1 w całym obszarze badań, ustaliła się równowaga Hardy-Weinberga (HW), natomiast w przypadku *locus* DRB1, przeciwnie, występowała duża nierównowaga charakteryzująca się istotnym nadmiarem homozygot DRB1, z kumulacją w regionie 2 (Kalisz). Wartości współczynników utrwalenia F_{ST}, określające poziom dystansu genetycznego i w ten sposób oceniające stopień odrębności genetycznej badanych subpopulacji, były średnie i bardzo wyrównane dla obu badanych *loci* DQA1 i DRB1 (od 0,09-0,1). W efekcie wartość średnia F_{ST} była taka sama dla obu *loci* (0,09) i miała istotny charakter. Świadczy to, iż wewnątrz czterech subpopulacji, jak i w badanej populacji jako całości, w odniesieniu zarówno do *loci* DQA1, jak i DRB1 istniał średni poziom zróżnicowania genetycznego, co wskazuje na przeciętny poziom wymiany genów na badanym obszarze (52).

Wyniki szczegółowe dla *locus* DQA1. W badanej populacji liczącej 112 zajęcy, zidentyfikowano 9 alle-

li eksonu 2 genu DQA1, których frekwencję podano w tab. 3.

Trzy allele (h2, h8 i h9) wykryto we wszystkich subpopulacjach, natomiast allele h1 i h5 we wszystkich z wyjątkiem Ciechanowa. Najbardziej zmiennymi regionami były Kalisz i Oświęcim (po 7 alleli), najmniej zmiennym Ciechanów (4 allele). Zidentyfikowano trzy allele prywatne: allel h3 był obecny tylko w Oświęcimiu, allel h4 jedynie w Toruniu, natomiast allel h7 w Kaliszu. Najczęściej występował allel 9, stwierdzono go we wszystkich regionach, przy czym w okolicach Ciechanowa osiągnął frekwencję najwyższą ze wszystkich (0,46), natomiast im bardziej na zachód tym frekwencja jego była niższa, w Kaliszu wyniosła zaledwie 0,1. Z kolei w Kaliszu najbardziej popularnym okazał się allel h6, którego częstotliwość wyniosła 0,40 i spadała w kierunku wschodnim; najniższa była w Ciechanowie (0,08). Allel h8 był za to szeroko rozpowszechniony, występował równie często w okolicach Ciechanowa (0,33), jak i Torunia (0,30). Najmniejszą frekwencję odnotowano dla allelu h5 w Kaliszu (0,03) oraz po 0,07 dla alleli h1 w Oświęcimiu, h5 w Oświęcimiu i Toruniu oraz h7 w Kaliszu. Analiza wartości wskaźników H_o i H_e wewnątrz 4 subpopulacji, wskazała na duże różnice między nimi: w regionach Ciechanów i Toruń nastąpił istotny wzrost wskaźnika H_o w stosunku do H_e , natomiast w regionach Kalisz i Oświęcim przeciwnie – istotny spadek H_o w odniesieniu do H_e . Wartości FIS oszacowane dla subpopulacji Kalisz i Oświęcim były bliskie zeru (odpowiednio 0,15 i 0,08), a w pozostałych regionach ujemne, o niskiej wartości i nieistotne. Wartości te oznaczają, iż w regionach Kalisz i Oświęcim utrzymywał się stan równowagi HW, natomiast w pozostałych – niewielkie rozchwianie z powodu nadmiaru heterozygot. Średnia wartość FIS dla całego regionu badanego (Polska) była bliska zeru (0,02) i nieistotna, co świadczy o zachowaniu równowagi H-W w badanej populacji jako całości. Wartość średnia FST dla całości badanej populacji wyniosła 0,09, podobnie w poszczególnych subpopulacji (0,09-0,1), co świadczy o przeciętnym poziomie wymiany genów.

Wyniki szczegółowe dla locus DRB1. W locus DRB1 zidentyfikowano 12 alleli, ich frekwencję podano w tab. 4.

Cztery allele (h1-h4) wykryto we wszystkich subpopulacjach, dwa allele (h5 i h6) były obecne tylko w 2 subregionach, natomiast 5 alleli (h7 oraz h9-h12) było obecnych tylko w jednym subregionie. Najbardziej zmiennymi regionami były Kalisz i Oświęcim (po 7 alleli), najmniej zmiennym Ciechanów (4 allele). Najwyższą frekwencję osiągnął h4 (0,39 w Oświęcimiu i 0,33 w Ciechanowie) oraz h2 (0,31 w Toruniu). Najniższa frekwencja, jaką odnotowano, wyniosła 0,04 i dotyczyła kilku alleli w różnych regionach. Wykryto 5 alleli prywatnych (od h8-h12). Niektóre osiągnęły znaczącą frekwencję, np. allel h10 – 0,19, a h12 – 0,17. Najbardziej zróżnicowanym subregio-

nem był Ciechanów, na jego terenie zidentyfikowano u zajęcy aż 9 alleli w stawce 24 badanych osobników. We wszystkich regionach odnotowano istotny spadek heterozygotyczności obserwowanej w stosunku do oczekiwanej. Oszacowane wartości FIS były wysokie, istotne i mieściły się w zakresie od 0,15 do 0,44. Tak więc, we wszystkich subregionach występował duży i istotny nadmiar homozygot DRB1. Średnia wartość wskaźnika FIS wyniosła 0,36 i również była istotna. Świadczy to o zaburzeniu równowagi H-W i znacznym nadmiarze homozygot DRB1 na całym badanym obszarze. Wartość wskaźnika FST w badanych subregionach mieściła się w zakresie 0,09-0,1 i była istotna, co świadczy o średnim przepływie genów w locus DRB1.

Dyskusja

Wartość wskaźnika odrębności FST dla obu badanych loci i wszystkich subpopulacji (0,09-0,1) świadczy, iż zarówno wewnątrz subregionów, jak i na całym obszarze badań istnieje przepływ genów o przeciętnym natężeniu. Z pozoru wydaje się, że w tej sytuacji nie dzieje się nic groźnego w populacji zajęcy, jednakże analiza wartości innych wskaźników zmienności wskazuje, że w poszczególnych subpopulacjach dokonały się znaczące i niekorzystne zmiany. W locus DRB1 na całym obszarze badań oraz w poszczególnych subpopulacjach nastąpił istotny spadek heterozygotyczności i wzrost homozygotyczności. W locus DQA1 w dwóch subregionach nastąpił istotny spadek heterozygotyczności (Kalisz i Oświęcim), a w pozostałych dwóch istotny wzrost. Świadczy to o występowaniu lokalnych silnych i niekorzystnych zjawisk związanych z niewystarczającym poziomem wymiany genów, skutkujących rozchwianiem równowagi Hardy-Weinberga (H-W), najczęściej prowadzących do ograniczenia zasobów zmienności genetycznej, wzrostu homozygotyczności oraz powstawania lokalnych endemizmów (10, 42). W pewnym momencie, w najbardziej zmienionych siedliskach niemożliwa staje się kompensacja zaszłych zmian, szczególnie gdy populacja nie wymienia już z innymi genów. W niniejszej pracy, w opisanym obrazie zmian frekwencji genów i genotypów przeważają tendencje do spadku heterozygotyczności i wzrostu homozygotyczności. Porównanie wyników własnych z wynikami Smitha i wsp. (46), sugeruje, iż słaby sukces reprodukcyjny zajęcy polskich w ostatnich latach (47) może mieć pośredni związek z rozchwianiem równowagi H-W w loci DQA1 oraz DRB1 MHC klasy II. Smith i wsp. wykazali bowiem, że stada zajęcy homozygotycznych w loci DQA i DRB miały wyższy udział nieplodnych samic i niższą średnią liczbę potomstwa w porównaniu z heterozygotami. Wzrost homozygotyczności populacji prowadzi do częstszego pojawienia się samic, których płody mają haplotypy MHC takie same, jak matka. U wielu gatunków zwierząt oraz u człowieka, wykazano że zgodność haplotypów

matki i płodu, szczególnie w *locus* DRB, prowadzi często do samoistnej utraty ciąży (16, 30, 32). Z kolei w odniesieniu do *locus* DQA sugerowano nawet, że zgodność haplotypów matki i płodu prowadzi do tak wczesnej samoistnej aborcji, iż ciąża pozostaje niezauważona i trudno o uchwycenie relacji między jej utratą, a wariantem MHC płodu (41). W okresie między kopulacją a narodzinami potomstwa samice wielu gatunków zwierząt potrafią zakończyć ciążę samoistną aborcją (49), aby nie dopuścić do urodzenia potomstwa, które miałyby gorszą sprawność z powodu zmniejszonej odporności na choroby, genetycznych niezgodności lub depresji inbredowej (2, 5). Z ewolucyjnego punktu widzenia eliminacja takiego „mniej pasującego” potomstwa jest zjawiskiem adaptacyjnym, nie patologicznym (5, 39). Ostatnio pojawiły się wyniki badań wspierające tezę o korzyściach bycia heterozygotą w haplotypach MHC klasy II, uwzględniające aktywny udział samca w zwiększaniu zmienności genetycznej. Dzikim kogutom *Gallus gallus* przedstawiono jednocześnie samice z haplotypami MHC podobnymi i niepodobnymi do ich własnych. Samce ujawniły „tajemnicze” preferencje, przydzielając więcej plemników do kur o najbardziej odmiennych od ich własnych haplotypach MHC. Wyniki te stanowią pierwszy eksperymentalny dowód, że samce także mają wpływ na tworzenie heterozygotycznego potomstwa w *loci* MHC klasy II poprzez sterowanie ilością plemników w ejakulacji (22). Tak więc w literaturze przeważają wyniki badań, w których potwierdza się istnienie tendencji do ujemnej korelacji między spadkiem heterozygotyczności/wzrostem homozygotyczności a sukcesem reprodukcyjnym populacji ludzi i zwierząt. Należy przy tym zauważyć, iż parametry heterozygotyczności i homozygotyczności oraz zasoby polimorfizmu w *loci* MHC w badaniach płodności populacji były dotąd słabo kojarzone z jej sukcesem reprodukcyjnym i przez to niedoceniane. Jednakże większość autorów uważa, iż znaczenie optymalnego poziomu heterozygotyczności osobnika polega na tym, iż wpływa on na wszystkie sfery życia: jego jakość i długość przez utrzymanie zdrowia (15, 26), warunkuje dobrą płodność i sukces reprodukcyjny (19) oraz utrzymanie „dobrych genów” (good genes) w populacji (24, 36). W badanej przez nas populacji zajęcy zidentyfikowano 9 polimorfów w *locus* DQA oraz 12 w *locus* DRB. Badacze w Austrii (45) wykryli w *locus* DQA (podobnie jak my w Polsce) – 9 alleli, natomiast w Belgii 7 alleli tego genu. W *locus* DRB, wykryto w Austrii 11 alleli (my w Polsce 12), natomiast w Belgii, podobnie jak w *locus* DQA, wykryto 7 odmian tego genu. W innych badaniach zidentyfikowano w Austrii oraz Belgii 13 alleli *locus* DQA (17). W badaniach polimorfizmu *locus* DQA w Europie, w próbie 674 zajęcy szaraków pochodzących z 11 krajów europejskich, wykryto tylko 10 alleli tego genu (34). Należy przy tym pamiętać, iż liczba alleli w populacji nie wzrasta proporcjonalnie do wielkości próby, co

obrazuje dobrze wartość wskaźnika bogactwa allelicznego R, który mierzy liczbę alleli niezależnie od wielkości próby (35). Wyniki zasobów polimorfizmu w *loci* DRB1 i DQA1 zajęcy polskich w postaci bogactwa allelicznego były zbliżone do analogicznych wskaźników zajęcy z innych krajów europejskich.

Reasumując, w badanych *loci* MHC klasy II w większości subpopulacji zajęcy odnotowano odstępstwa od równowagi Hardy-Weinberga, szczególnie w odniesieniu do *locus* DRB1, w którym u przeważającej części osobników stwierdzono istotny wzrost homozygotyczności. W odniesieniu do samic, wysoki poziom homozygotyczności w *locus* DRB1 może skutkować pogorszeniem ich płodności.

Piśmiennictwo

1. Abbott K., Wickings E., Knapp L.: High levels of diversity characterize mandrill (*Mandrillus sphinx*) Mhc-DRB sequences. *Immunogenetics*. 2006, 58, 628-640.
2. Alberts S., Ober C.: Genetic variability in the major histocompatibility complex: A review of non-pathogen-mediated selective mechanisms. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1993, 36, 71-89.
3. Amills M., Ramirez O., Tomas A., Obexer-Ruff G., Vidal O.: Positive selection on mammalian MHC-DQ genes revisited from a multispecies perspective. *Genes Imm.* 2008, 9, 651-658.
4. Andersson M., Simmons L.: Sexual selection and mate choice. *Trends Ecol. Evol.* 2006, 21, 296-302.
5. Apanius V., Penn D., Slev P. R., Ruff L. R., Potts W. K.: The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Crit. Rev. Imm.* 1997, 7, 179-224.
6. Axtner J., Sommer S.: Gene duplication, allelic diversity, selection processes and adaptive value of MHC class II DRB genes of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. *Immunogenetics* 2007, 59, 417-426.
7. Bellocq J. G. de, Suchentrunk F., Baird S. J. E., Schaschl H.: Evolutionary history of an MHC gene in two leporid species: characterisation of Mhc-DQA in the European brown hare and comparison with the European rabbit. *Immunogenetics*. 2009, 61, 131-144.
8. Bernatchez L., Landry C.: MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J. Evol. Biol.* 2003, 16, 363-377.
9. Beydoun H., Saflas A.: Association of human leucocyte antigen sharing with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 2005, 65, 123-135.
10. Bidlack A., Cook J.: A nuclear perspective on endemism in northern flying squirrels (*Glaucomys sabrinus*) of the Alexander Archipelago, Alaska. *Conserv. Gen.* 2008, 3, 247-259.
11. Bonneaud C., Chastel O., Federici P., Westerdahl H., Sorci G.: Complex Mhc-based mate choice in a wild passerine. *Proc. Royal Soc. B* 2006, 273, 1111-1116.
12. Bryja J., Galan M., Charbonnel N., Cosson J. F.: Duplication, balancing selection and trans-species evolution explain the high levels of polymorphism of the DQA MHC class II gene in voles (*Arvicolinae*). *Immunogenetics* 2006, 58, 191-202.
13. Christiansen O., Ring M., Rosgaard A., Grunnet N., Gluud C.: Association between HLA-DRB1 and -DR3 antigens and unexplained repeated miscarriage. *Hum. Repr. Update* 1999, 5, 249-255.
14. Cutrera A., Lacey E.: Major histocompatibility complex variation in talus tuco-tucos: the influence of demography on selection. *J. Mammal.* 2006, 87, 706-716.
15. Doherty P., Zinkernagel R.: Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 1975, 256, 50-52.
16. Dorak M., Lawson T., Machulla H., Mills K., Burnett A.: Increased heterozygosity for MHC class II lineages in newborn males. *Genes Immun.* 2002, 3, 263-269.
17. Doxiadis G., Otting N., de Groot N., Noort R., Bontrop R.: Unprecedented Polymorphism of Mhc-DRB Region Configurations in Rhesus Macaques. *J. Immunol.* 2000, 164, 3193-3199.
18. Dziedzic R., Kamierniarz R., Dziedzic B., Wójcik M., Beeger S., Flis M.: Przyczyny spadku populacji zająca szaraka w Polsce. Monografia. Wyd. Ministerstwo Środowiska, Warszawa 2000, 12-29.
19. Eizaguirre C., Yeates S., Lenz T., Kalbe M., Milinski M.: MHC-based mate choice combines good genes and maintenance of MHC polymorphism. *Mol. Ecol.* 2009, 18, 3316-3329.

20. *Excoffier L., Lischer H.*: Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.* 2010, 10, 564-567.
21. *Froeschke G., Sommer S.*: MHC Class II DRB Variability and Parasite Load in the Striped Mouse (*Rhabdomys pumilio*) in the Southern Kalahari. *Mol. Biol. Evol.* 2005, 22, 1254-1259.
22. *Gillingham M., Richardson D., Løvlie H., Moynihan A., Worley K., Pizzari T.*: Cryptic preference for MHC-dissimilar females in male red junglefowl, *Gallus gallus*. *Proc. Royal Soc.* 2009, 276, 1083-1092.
23. *Goudet J.*: FSTAT Program v. 2.9.3.2. 2002. Dep. Ecol. Evol., Lausanne, Switzerland.
24. *Grob B., Knapp L., Martin R.*: The Major Histocompatibility Complex and Mate Choice: Inbreeding Avoidance and Selection of Good Genes. *Exp. Clin. Immunogenet.* 1998, 15, 119-129.
25. *Hartl G., Suchentrunk F., Willing R., Petznek R.*: Allozyme heterozygosity and fluctuating asymmetry in the brown hare (*Lepus europaeus*): a test of the developmental homeostasis hypothesis. *Philosoph. Transactions Royal Soc. London B* 1995, 350, 313-323.
26. *Hedrick P.*: Balancing selection and MHC. *Genetica* 1999, 104, 207-214.
27. *Hedrick P. W.*: HLA-sharing, recurrent spontaneous abortion, and the genetic hypothesis. *Genetics* 1988, 119, 199-204.
28. *Hughes A., Nei M.*: Models of Host-Parasite Interaction and Mhc Polymorphism. *Genetics* 1992, 132, 863-864.
29. *Hviid T., Christiansen O.*: Linkage Disequilibrium Between Human Leukocyte Antigen (HLA) Class II and HLA-G – Possible Implications for Human Reproduction and Autoimmune Disease. *Hum. Immunol.* 2005, 66, 688-699.
30. *Kilpatrick D., Liston W.*: Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion and its relevance to leukocyte immunotherapy. *Hum. Repr.* 1993, 8, 1645-1649.
31. *Klein J., Takahata N.*: The Major Histocompatibility Complex and the Quest for Origins. *Immunol. Rev.* 1990, 113, 5-25.
32. *Knapp L., Ha J., Sackett G.*: Parental MHC antigen sharing and pregnancy wastage in captive pigtailed macaques. *J. Repr. Immunol.* 1996, 32, 73-77.
33. *Kosowska B., Zdrojewicz Z.*: The relationship between inbreeding coefficient and sex hormones concentration in rats under stress. I. The effect of various inbreeding level on the pituitary sex hormone concentration during two types of stress. *J. Anim. Breed. Genet.* 1996, 113, 125-134.
34. *Koutsogiannouli E., Moutou K., Sarafidou T., Stamatis C., Spyrou V., Mamuris Z.*: Major histocompatibility complex variation at class II DQA locus in the brown hare (*Lepus europaeus*). *Mol. Ecol.* 2009, 18, 4631-4649.
35. *Leberg P. L.*: Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Mol. Ecol.* 2002, 11, 2445-2449.
36. *Lee K.*: Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Int. Comp. Biol.* 2006, 46, 1000-1015.
37. *Meyer D., Thomson G.*: How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. *Ann. Hum. Genet.* 2001, 65, 1-26.
38. *Meyer-Lucht Y., Sommer S.*: MHC diversity and the association to nematode parasitism in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*). *Mol. Ecol.* 2005, 14, 2233-2243.
39. *Neff B., Pitcher T.*: Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Mol. Ecol.* 2005, 14, 19-38.
40. *Ober C., Hyslop T., Elias S., Weitkamp L., Hauck W.*: Human leukocyte antigen matching and fetal Loss: results of a 10 year prospective study. *Hum. Repr.* 1998, 13, 33-38.
41. *Ober C., Steck T., van der Ven K., Billstrand C., Messer L., Kwak J., Beaman K., Beer A.*: MHC class II compatibility in aborted fetuses and term infants of couples with recurrent spontaneous abortion. *J. Repr. Immunol.* 1993, 25, 195-207.
42. *Ovenden J., Kashiwagi T., Broderick D., Giles J., Salini.*: The extent of population genetic subdivision differs among four co-distributed shark species in the Indo-Australian archipelago. *BMC Evol. Biol.* 2009, 9, 40-44.
43. *Reusch T., Schaschl H., Wegner K.*: Recent duplication and inter-locus gene conversion in major histocompatibility class II genes in a teleost, the three-spined stickleback. *Immunogenetics* 2004, 56, 427-443.
44. *Schwensow N., Fietz J., Dausmann K., Sommer S.*: Neutral versus adaptive genetic variation in parasite resistance: importance of major histocompatibility complex supertypes in a free-ranging primate. *Heredity* 2007, 99, 265-277.
45. *Smith R., Jennings N., Harris S.*: A quantitative analysis of the abundance and demography of European hares *Lepus europaeus* in relation to habitat type, intensity of agriculture and climate. *Mammal Rev.* 2005, 35, 1-24.
46. *Smith S., Mang T., de Bellocq J., Schaschl H., Zeithofer C., Hackländer K., Suchentrunk F.*: Homozygosity at a class II MHC locus depresses female reproductive ability in European brown hares. *Mol. Ecol.* 2010, 19, 4131-4143.
47. *Strzala T., Kosowska B., Brzezińska K.*: Charakterystyka genetyczna zajęcy (*Lepus Sp.*) w Eurazji. *Acta Sci. Pol., Med. Vet.* 2006, 5, 25-31.
48. *Ting J., Trowsdale J.*: Genetic Control of MHC Class II Expression. *Cell* 2002, 109, 21-33.
49. *Tollenaere C., Bryja J., Galan M., Cadet P., Deter J., Chaval Y., Berthier K., Salvador A., Voutilainen L., Laakkonen J., Henttonen H., Cosson J., Charbonnel N.*: Multiple parasites mediate balancing selection at two MHC class II genes in the fossorial water vole: insights from multivariate analyses and population genetics. *J. Evol. Biol.* 2008, 21, 1307-1320.
50. *Tregenza T., Wedell N.*: Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. *Mol. Ecol.* 2000, 9, 1013-1027.
51. *Waine G., Ross A., Williams G., Sleigh A., McManus D.*: HLA class II antigens are associated with resistance or susceptibility to hepatosplenic disease in a Chinese population infected with *Schistosoma Japonicum*. *Int. J. Parasit.* 1998, 28, 537-542.
52. *Weir B., Cockerham C.*: Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 1984, 38, 1358-1370.

Adres autora: prof. dr hab. Barbara Kosowska, ul. Koźuchowska 7, 51-631 Wrocław; e-mail: barbara.kosowska@up.wroc.pl