

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**POLIMORFIZMI PRIONSKIH PROTEINOV,
POVEZANI Z DOVZETNOSTJO ZA CWD V
POPULACIJI NAVADNEGA JELENA (*CERVUS
ELAPHUS*) V SLOVENIJI**

**PRION PROTEIN POLYMORPHISMS ASSOCIATED
WITH CWD SUSCEPTIBILITY TO CWD IN THE RED
DEER (*CERVUS ELAPHUS*) POPULATION IN
SLOVENIA**

Angela Jakljič

Ljubljana, 2024

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 543.384:577.113.3:591.151:636.111.1(497.4)(043.2)

**POLIMORFIZMI PRIONSKIH PROTEINOV,
POVEZANI Z DOVZETNOSTJO ZA CWD V POPULACIJI
NAVADNEGA JELENA (*CERVUS ELAPHUS*) V SLOVENIJI**

**PRION PROTEIN POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH
CWD SUSCEPTIBILITY TO CWD IN THE RED DEER
(*CERVUS ELAPHUS*) POPULATION IN SLOVENIA**

Angela Jaklič

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad
študentom pod mentorstvomizr. prof. dr. Jelke Zabavnik Piano
na Enoti za biokemijo, molekularno biologijo in genetiko
Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani

Ljubljana, 2024

IZVLEČEK

Ključne besede: jeleni; bolezen kroničnega hiranja jelenjadi; prioni; prionski proteini; genotip; aleli; polimorfizem posameznega nukleotida; Slovenija

Bolezen kroničnega hiranja jelenjadi (chronic wasting disease – CWD) je smrtna prionska bolezen družine jelenov (Cervidae), ki spada pod transmisivne spongiformne encefalopatije. Želeli smo določiti polimorfizme gena za prionski protein (*PRNP*), ki so lahko povezani z dovzetnostjo za CWD v populaciji navadnega jelena (*Cervus elaphus*) v Sloveniji, določiti najpogostejši genotip *PRNP* in ugotoviti, ali imamo v Sloveniji v populaciji navadnega jelena prisotne bolj in manj dovzetne genotipe *PRNP*. Uporabili smo 22 vzorcev mišičnega tkiva navadnih jelenov iz različnih regij Slovenije, iz katerih smo izolirali DNA, pomnožili *PRNP* z metodo verižne reakcije s polimerazo (polymerase chain reaction – PCR), opravili sekvenčno reakcijo, vzorce sekvencirali in podatke o nukleotidnih zaporedjih računalniško obdelali. Odkrili smo 5 polimorfizmov *PRNP*, in sicer sinonimne substitucije na kodonih 21 (gtc → gtt), 78 (cag → caa) in 136 (gct → gcc) ter nesinonimne substitucije T98A in Q226E. Odkrili smo 9 različnih genotipov, 5 različnih fenotipov in 5 različnih haplotipov. Najpogostejši genotip je bil V₂₁(gtc/gtc)Q₇₈(cag/cag)T₉₈(acc/acc)A₁₃₆(gct/gcc)Q_{E226}(cag/gag), ki ga je imelo 27,27 % vzorčenih navadnih jelenov. Rezultati nakazujejo na to, da imamo v Sloveniji prisotne različne genotipe pri navadnih jelenih, tudi tiste, za katere domnevajo, da določajo nižjo dovzetnost na CWD, in ki bi v primeru pojava CWD ohranjali populacijo.

ABSTRACT

Keywords: deer; chronic wasting disease; prions; prion proteins; genotype; alleles; single nucleotide polymorphism; Slovenia

Chronic wasting disease (CWD) is a fatal prion disease of the deer family (Cervidae) belonging to a group of diseases known as transmissible spongiform encephalopathies. We wanted to determine prion protein gene (*PRNP*) polymorphisms associated with the susceptibility to CWD in the population of red deer (*Cervus elaphus*) in Slovenia, determine the most common *PRNP* genotype and determine whether there are *PRNP* genotypes that are more and less susceptible to CWD in Slovenia. We used 22 samples of red deer muscle tissue from different regions of Slovenia, isolated their DNA, amplified the *PRNP* gene using the polymerase chain reaction (PCR), performed a sequence reaction, sequenced the samples, and analyzed the nucleotide sequence data using computer programmes. We discovered 5 *PRNP* polymorphisms, which were synonymous substitutions at codons 21 (gtc → gtt), 78 (cag → caa) and 136 (gct → gcc) and non-synonymous substitutions T98A and Q226E. We discovered 9 different genotypes, 5 different phenotypes and 5 different haplotypes. The most common genotype was V₂₁(gtc/gtc)Q₇₈(cag/cag)T₉₈(acc/acc)A₁₃₆(gct/gcc)Q_{E226}(cag/gag), which was present in 27.27% of the sampled red deer. The results indicate that there might be less susceptible *PRNP* genotypes present in Slovenia, which would maintain the population in case of a CWD outbreak.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	1
1.1 BOLEZEN KRONIČNEGA HIRANJA JELENJADI	1
1.2 ZOONOTIČEN POTENCIAL PRIONSKIH BOLEZNI	2
1.3 CWD V SEVERNI AMERIKI	3
1.4 CWD V JUŽNI KOREJI	3
1.5 CWD V EVROPI.....	4
1.6 VARIACIJE <i>PRNP</i> PRI NAVADNIH JELENIH V EVROPI.....	6
2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	8
3 MATERIALI IN METODE	9
3.1 VZORČENJE ŽIVALI IN IZOLACIJA DNA	9
3.2 PREVERJANJE KONCENTRACIJE DNA PO IZOLACIJI	11
3.3 POMNOŽEVANJE <i>PRNP</i> Z METODO PCR	12
3.4 PREVERJANJE PCR PRODUKTA NA ELEKTROFOREZI	12
3.5 SEKVENČNA REAKCIJA	13
3.6 ČIŠČENJE SEKVENČNE REAKCIJE.....	14
3.7 PRIPRAVA VZORCEV NA SEKVENCIRANJE.....	14
3.8 SEKVENCIRANJE	14
3.9 OBDELAVA PODATKOV	14
4 REZULTATI.....	15
5 RAZPRAVA.....	25
6 SKLEPI.....	29
7 POVZETEK.....	30
8 SUMMARY	32
9 ZAHVALE.....	34
10 LITERATURA	35

KAZALO TABEL

Tabela 1: Frekvence posameznih polimorfizmov <i>PRNP</i> glede na kodone pri navadnih jelenih v Sloveniji.....	15
Tabela 2: Haplotipi <i>PRNP</i> in njihove frekvence pri navadnih jelenih v Sloveniji.....	16
Tabela 3 Fenotipi <i>PRNP</i> in njihove frekvence navadnih jelenov v Sloveniji.....	16
Tabela 4: Genotipi <i>PRNP</i> navadnih jelenov v Sloveniji glede na regije in njihove frekvence.....	17
Priloga	
Tabela 1: Polimorfizmi <i>PRNP</i> vseh 22 vzorčenih navadnih jelenov v Sloveniji.....	1, 2
Tabela 2: Polimorfizmi <i>PRNP</i> pri vzorčenem vapitiju (<i>Cervus canadensis</i>).....	3
Tabela 3: Povzetek pregledanih domnevnih in odkritih lokacij polimorfizmov <i>PRNP</i> navadnih jelenov v Sloveniji.....	3

KAZALO SLIK

Slika 1: Vzorec mišičnega tkiva vapidija (<i>Cervus canadensis</i>).....	10
Slika 2: Hlajenje vzorca v epruveti na ledenem bloku v procesu izolacije DNA.....	11
Slika 3: Preverjanje PCR produkta na UV presvetljevalniku.....	13
Slika 4: Razporeditev različnih genotipov <i>PRNP</i> glede na vzorčene regije in gostoto populacije jelenjadi v Sloveniji.....	18
Slika 5: Polimorfizem na kodonu 21.....	19
Slika 6: Polimorfizem na kodonu 78.....	20
Slika 7: Polimorfizem na kodonu 98.....	21
Slika 8: Polimorfizem na kodonu 132.....	22
Slika 9: Polimorfizem na kodonu 136.....	23
Slika 10: Polimorfizem na kodonu 226.....	24

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

A – aminokislina alanin

a – purinska baza adenin, sestavina nukleozidov adenzina in deoksiadenozina, nukleotidov, koencimov ter nukleinskih kislin

BSE – angl. Bovine spongiform encephalopathy, bovina spongiformna encefalopatija je smrtna prionska bolezen govedi

c – pirimidinska baza citozin, sestavina nukleozidov citidina in deoksicitidina, nukleotidov in nukleinskih kislin

CJD – angl. Creutzfeldt-Jakob disease, Creutzfeldt-Jakobova bolezen je smrtna prionska bolezen pri ljudeh

vCJD – angl. variant Creutzfeldt-Jakob disease, je variantna Creutzfeldt-Jakobova bolezen, ki jo povezujejo z uživanjem tkiv govedi, okužene z BSE

CWD – angl. chronic wasting disease, bolezen kroničnega hiranja jelenjadi je smrtna prionska bolezen jelenjadi

CŽS – centralni živčni sistem

DNA – angl. Deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleinska kislina, je molekula, ki nosi genski zapis v vseh živih organizmih

E – aminokislina glutaminska kislina

EFSA – angl. European Food Safety Authority, Evropska agencija za varnost hrane, ki pripravlja neodvisne znanstvene nasvete o tveganjih v zvezi s hrano

ELISA – angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay je encimska imunoabsorpcijska preiskava, s katero se v vzorcih zaznava protitelesa ali antigene

FII – angl. Fatal Familial Insomnia, smrtna familiarna nespečnost, smrtna prionska bolezen pri ljudeh

FSE – angl. Feline spongiform encephalopathy, mačja spongiformna encefalopatija, smrtna prionska bolezen pri mačkah

G – aminokislina glicin

g – purinska baza gvanin, sestavina nukleozidov gvanozina in deoksigvanozina, nukleotidov in nukleinskih kislin

GSS – angl. Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease, dedna smrtna prionska bolezen pri ljudeh

I – aminokislina izolevcin

K – aminokislina lizin

L – aminokislina levcin

M – aminokislina metionin

OD – angl. optical density, optična gostota je lastnost snovi, da absorbira svetlobo

P – aminokislina prolin

PCR – angl. polymerase chain reaction, verižna reakcija s polimerazo, laboratorijska tehnika pomnoževanja DNA

PrP^C – angl. prion protein cellular, normalna oblika prionskega proteina

PrP^{CWD} – angl. prion protein chronic wasting disease, patološka oblika prionskega proteina pri bolezni kroničnega hiranja jelenjadi

PRNP – gen, ki kodira prionski protein

Q – aminokislina glutamin

S – aminokislina serin

SNP – angl. single nucleotide polymorphism, mutacija, pri kateri pride do spremembe enega nukleotida, česar posledica je sinonimna substitucija, pri kateri ne pride do spremembe aminokislina ali nesinonimna substitucija, pri kateri pride do spremembe aminokislina ali do nastanka stop kodona

T – aminokislina treonin

t – pirimidinska baza timin, sestavina nukleozidov deoksitimidina in redko pojavljajočega se ribotimidina, nukleotidov in predvsem deoksiribonukleinskih kislin

TME – angl. transmissible mink encephalopathy, transmisivna encefalopatija minkov oz. močvirskih podlasic je smrtna prionska bolezen vrst iz rodov *Neovison* in *Mustela* v družini kun (Mustelidae)

TSE – angl. transmissible spongiform encephalopathy, transmisivne spongiformne encefalopatije so smrtne prionske neurodegenerativne bolezni ljudi in živali

V – aminokislina valin

wt – angl. wild type, alel, ki se v populaciji pogosteje pojavlja, divji tip alela

1 UVOD

1.1 BOLEZEN KRONIČNEGA HIRANJA JELENJADI

Chronic wasting disease (CWD) ali bolezen kroničnega hiranja jelenjadi je smrtna prionska bolezen vrst, ki spadajo v družino jelenov (Cervidae), ki spada pod transmisivne spongiformne encefalopatije (TSE), med katere spadajo tudi bovina spongiformna encefalopatija (BSE) pri govedu, klasični in atipični praskavec pri ovcah in kozah, transmisivna encefalopatija minkov (TME), mačja spongiformna encefalopatija (FSE), encefalopatija eksotičnih kopitarjev pri podvrstah antilop in transmisivna encefalopatija nečloveških primatov pri lemurjih; pri ljudeh so to Creutzfeldt-Jakobova bolezen (CJD), nova variantna Creutzfeldt-Jakobova bolezen (vCJD), kuru, bolezen Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) in smrtna familiarna nespečnost (FFI). Za prionske bolezni je značilna dolga inkubacijska doba in odsotnost splošnega vnetnega ali specifičnega imunskega odgovora na bolezen. Prionske bolezni imajo tudi podobne nevrološke simptome in histopatološke karakteristike, kot so: spongiformna degeneracija centralnega živčnega sistema (CŽS), formacija amiloidnih naslag, reaktivna glijoza, kjer pride do povečanih glia celic kot pri poškodbi CŽS, in izguba nevronov (Atkinson in sod., 2016).

Klinični znaki CWD so bili večinoma opisani pri jelenjadi v ujetništvu zaradi boljšega nadzora živali v času razvoja bolezni. Glavna nespecifična klinična znaka sta progresivno hiranje in vedenjske spremembe, ki trajajo od več tednov do več mesecev. Drugi klinični znaki, ki lahko spremljajo bolezen, so: škrtanje z zobmi oz. bruksizem, prekomerno slinjenje oz. sialoreja zaradi težav s požiranjem, ataksija, tremor glave, dilatacija požiralnika in regurgitacija ter posledična aspiracijska pljučnica. V terminalnem stadiju bolezni se lahko pojavijo tudi povečano pitje oz. polidipsija, uriniranje oz. poliurija, izgube zavesti oz. sinkope, fiksiran pogled, spremembe v obnašanju do drugih živali v čredi ali do oskrbnikov v smislu povečane oz. zmanjšane cone pobega, spremenjena stoja, pogosto s povešeno glavo, ponavljajoči vzorci premikanja v ogradi ter pretirana vzdražnost oz. hiperekscitabilnost ob času rokovanja z živaljo (Williams, 2005). Srbež oz. pruritus in brezdlačna področja, ki se pojavljajo v končnih stadijih praskavca pri ovcah, se naj ne bi pojavljala pri jelenih, vendar so pri najdbah obbolele jelenjadi brezdlačna področja pogosta. Dlaka kožuha je velikokrat suha in groba z območji zaplat zimske dlake v času poletja, kar na naj bi bil znak slabe kondicije in ne simptom bolezni (Sohn in sod., 2002; Williams, 2005; Benestad in sod., 2016).

Prioni so infektivni delci, modificirani proteini (v primeru CWD, PrP^{CWD}), za katere je včasih veljalo, da so 'počasni virusi', ki povzročajo bolezni pri živalih in ljudeh. Ti nastanejo s posttranslacijskimi procesi, pri katerih pridobijo večje število beta upognjenih ravnin iz normalnih celičnih prionskih proteinov (PrP^C), ki jih kodira gen za prionski protein (*PRNP*). PrP^{CWD} imajo terciarno strukturo, ki določa značilnosti posameznih sevov. Širjenje oz. razmnoževanje infektivnih delcev se zgodi tako, da PrP^{CWD} služi kot matrica za modifikacijo PrP^C v infektivno obliko. Prioni so izjemno odporni, odporni so na ultravijolično in ionizirajoče sevanje (Prusiner, 1998), popolnoma pa jih inaktivira šele temperatura 1000 °C (Brown in sod., 2000), v naravi pa lahko zemljo kontaminirajo več let (Brown in Gajdusek, 1991). Nekateri sevi, ki povzročajo CWD, se štejejo med najbolj infektivne, saj jih jelenjad izloča s krvjo, urinom, slino in celo fecesom, infektivna pa je tudi koža, ki prekriva novo rogovje (Mathiason in sod., 2006; Haley in sod., 2009; Tamgüney in sod., 2009; Angers in sod., 2009), za oralno okužbo pa je dovolj že 100 do 300 ng prionov okuženega možganskega tkiva ali enakovredne doze prionov iz sline (Denkers in sod., 2020).

1.2 ZOONOTIČEN POTENCIAL PRIONSKIH BOLEZNI

O zoonotičnem potencialu prionskih bolezni pri živalih se je resno začelo razmišljati po letu 1996, ko so v Veliki Britaniji odkrili vCJD, ki naj bi bila posledica uživanja govedine, okužene s prioni, povzročitelji BSE, in za katero so obolevali mlajši bolniki kot za klasično CJD (Will in sod., 1996). BSE so prvič opisali leta 1987 v Angliji, kjer so opazili klinične znake, ki so nastopili počasi in so se pojavili pri 3 do 6 let starem govedu, ki so ga v času 1 do 6 mesecev po začetku kliničnih znakov morali zaklati. Klinični znaki pri obolelem govedu so bili nezaupljivost, hiperestezija, spremembe v hoji in progresivne spremembe v vedenju, kjer so živali postajale vse bolj prestrašene ali agresivne, brcale, padale ali celo obležale. S histološkimi preiskavami so našli simetrične spremembe sivine možganskega debla, in sicer vakuolizacijo neuropila in fibrile, podobne tistim v primerih praskavca pri drobnici (Wells in sod., 1987). Zoonotičen potencial CWD je z odkritjem CWD v Evropi ponovno postal aktualna tema zaradi novoodkritih evropskih sevov. Kljub nedavnim sumom prenosa CWD na ljudi v Severni Ameriki pri 72 letnem moškem, ki naj bi redno užival meso jelenjadi s CWD in je imel nenaden pojav zmedenosti in agresije, so prenos CWD na človeka ovrgli, pri njem je bila postmortalno diagnosticirana sporadična oblika CJD, ki je genetsko pogojena (Trout in sod., 2024). Zaenkrat ima CWD nizek zoonotičen potencial glede na vse do zdaj izvedene raziskave. Kljub temu bi

bilo zaradi možnega preskoka bolezni na druge živalske vrste in potencialno na ljudi primerno omejiti stik ljudi in živali z živalmi s prionskimi boleznimi in nadzorovati živalske proizvode, ki bi lahko vsebovali prione z namenom, da ne bi vstopali v prehransko verigo (Tranulis in Tryland, 2023).

1.3 CWD V SEVERNI AMERIKI

CWD je bil prvič opažen pri 53 mulastih jelenih (*Odocoileus hemionus hemionus*) in črnorepem jelenju (*Odocoileus hemionus columbianus*) v ujetništvu med letoma 1967 in 1979 v zveznih državah Združenih držav Amerike (ZDA) Colorado in Wyoming. Jeleni, ki so kazali spremenjeno obnašanje, polidipsijo, poliurijo, prekomerno slinjenje, škripanje z zobmi, hipotonijo obrazne miškulature, povešanje glave in ušes ter izgubo telesne mase, so poginili v obdobju 2 tednov do 8 mesecev od začetka kliničnih znakov (Williams in Young, 1980). Ob času nastanka te naloge je bil CWD dokazan pri divjih cervidih v 34 zveznih državah ZDA in 4 provincah Kanade ter pri cervidih v ujetništvu v 19 zveznih državah ZDA in 3 provincah Kanade (USGS, 2024). Škoda, povzročena zaradi CWD, je še slabo raziskana, vendar naj bi zvezne vladne agencije ZDA med letoma 2000 in 2021 stala okoli 284,1 milijona dolarjev, sam vpliv na endemično okužene populacije jelenov pa je pri belorepih jelenih (*Odocoileus virginianus*) v zvezni državi Wyoming pokazal letni upad populacije za 10,4 % (Edmunds in sod., 2016; Chiavacci, 2022). Vpliv na širjenje in pojavnost CWD naj bi po raziskavah v Kanadi imela geografska povezanost pokrajine, porazdelitev vodnih virov in poljedelstvo, kjer je večja gostota živali in njihovih stikov, nekateri viri pa navajajo hitrejši prenos bolezni v bolj gozdnatih predelih in ne toliko na travnatih in poljedelskih področjih. Večja pojavnost bolezni naj bi bila pri jelenih moškega spola, ki naj bi se okužili od drugih jelenov moškega spola izven časa parjenja, ko skupaj potujejo v čredah (Nobert in sod., 2016; Samuel, 2023). Različni modeli in raziskave v ZDA so pokazali, da je lahko CWD na nekem področju v populaciji jelenov prisotna že 10–20 let pred samim odkritjem in se na druge populacije širi precej počasi, vendar se sčasoma prevalenca bolezni povečuje in lahko v več desetletjih povzroči hude upade v populaciji (Miller in sod., 2000; Miller in Fischer, 2016).

1.4 CWD V JUŽNI KOREJI

Prvi primer CWD v Južni Koreji so opisali leta 2001 pri 7 let starem skalnogorskem losu (*Cervus elaphus nelsoni*), ki so ga uvozili iz Kanade marca 1997. Los je bil po 3 tednih

neuspešnega zdravljenja z antibiotiki in tekočinsko terapijo zaradi hiranja, slabotnosti, pretiranega slinjenja, bruksizma, vročine, anoreksije in respiratornega distresa evtanaziran. Po evtanaziji so opravili patološko sekcijo, pri kateri so odkrili kaheksijo, brezdlačno področje na desnem ramenu, rdeče sublobarne in lobarne konsolidacije v frontalnih in kavdalnih pljučnih režnjih ter fibrinozne adhezije med pljuči in steno prsne votline. V možganih so odkrili spongiformne spremembe, manjše vakuole v nevropilu sivine jeder možganskega debla, posamezne ali multiple vakuole v periferni citoplazmi nevronov, odkrili so tudi povečano število astrocitov, skrčenih, hiperkromatičnih nevronov, v malih možganih pa fokalne spongiformne spremembe z vakuolami v citoplazmi Purkinjevih celic. Bolezen so diagnosticirali glede na karakteristične lezije v možganih in detekcijo PrP^{CWD} s testom Western blot ter z imunohistokemijo, tkivo na histoloških preparatih se je najbolj obarvalo v podaljšani hrbtenjači in zunanji granularni plasti možganske skorje in skorje malih možganov. Vsi uvoženi losi so bili usmrčeni in z njimi povezani živalski produkti uničeni z namenom eradikacije bolezni. Posmrtno so bili vsi losi testirani za CWD (Sohn in sod., 2002). Kasnejše raziskave so pokazale povezavo med okuženimi kanadskimi farmami skalnogorskih losov in korejskimi bolnimi skalnogorskimi losi, vendar se je izkazalo, da naj bi CWD imeli tudi losi z neokuženih kanadskih farm, kar je sprožilo sum na horizontalen prenos bolezni v času transporta oz. kohabitacije. Pri korejskih skalnogorskih losih, ki so kohabitirali z okuženimi kanadskimi, niso ugotovili PrP^{CWD} (Kim in sod., 2005). Bolezen so poleg leta 2001 potrdili tudi leta 2004 in 2005 in s karakterizacijo seva na transgenih miših s prekomernim izražanjem prionskega proteina skalnogorskih losov, patološkimi sekcijami in biokemičnimi analizami dokazali, da gre v vseh treh primerih za isti sev (Lee in sod., 2013).

1.5 CWD V EVROPI

Prvi primer CWD v Evropi so odkrili marca 2016 na Norveškem v regiji Nordfjella, kjer so v sklopu druge raziskave na severnih jelenih (*Rangifer tarandus tarandus*) naključno našli košuto te vrste, staro 3-4 leta, ki se je ločila od črede in obležala. Imela je majhno količino bele pene na ustih, telesno temperaturo 41,9 °C in je kmalu po najdbi poginila. Ob patološki sekciji in po opravljenih histopatoloških preiskavah so ugotovili, da je bila košuta v zelo slabi telesni kondiciji, z brezdlačnimi mesti po telesu, akutno degeneracijo skeletne mišičnine, povzročeno z naporom, ter akutno multifokalno kataralno bronhopneumonijo z najdbami tujkov v vnetem pljučnem tkivu, najverjetneje povzročenih sekundarno po CWD zaradi aspiracijske pljučnice.

V možganih so našli vakuolizacijo dorzalnega motornega jedra živca vagusa v nevropilu in nevronih, zaradi avtolize pa spongiformne degeneracije niso mogli določiti. Opravili so test ELISA za določitev PrP^{CWD} na vzorcu tkiva podaljšane hrbtenjače in dobili pozitiven rezultat, nato pa s testom Western blot odkrili, da ima vzorec z ugotovljenim PrP^{CWD} tri na proteinazo K odporne pasove, velike med 17 in 29 kDa, enake tistim, najdenim pri CWD pri vapitijih (*Cervus canadensis*) v ZDA. Z imunohistokemičnim barvanjem so dodatno prikazali prisotnost PrP^{CWD} v različnih delih možganov in limfoidnih foliklih traheobronhialnih bezgavk (Benestad in sod., 2016).

Možni, a manj verjetni vzroki za pojav bolezni na tem področju zaradi rednih testiranj in strogih omejitev, naj bi bili vnos belorepih jelenov iz Severne Amerike na Finsko leta 1934, ilegalen uvoz jelenov iz Severne Amerike ter prenos klasičnega ali atipičnega praskavca preko ovc na jelene in urinske vabe, uvožene iz Severne Amerike. Bolj verjetno je bil za pojav CWD kriv pojav genetske ali spontane TSE pri predstavniku jelenov (Benestad in sod., 2016). Dodatno je to podprla raziskava sevov PrP^{CWD} iz vzorcev, odvzetih v Kanadi, in vzorcev, odvzetih na Norveškem na gozdnih voluharicah (*Myoides glareolus*), kjer so ugotovili, da imata seva različne značilnosti glede časa inkubacije, nevropatologije, regij depozicije agregatov napačno zvitega proteina v možganih in velikosti jedra teh agregatov, odpornega na proteazo. Dokazali so ne samo, da so evropski in severnoameriški sevi PrP^{CWD} različni, temveč tudi da sta norveška seva pri jelenih in losih različna, kar je porodilo veliko vprašanj glede nastanka, patogeneze in možnega zoonotičnega potenciala novoodkritih sevov CWD v Evropi (Nonno in sod., 2020).

Evropska komisija je od leta 2017 do leta 2022 zahtevala monitoring CWD v naslednjih državah: Norveška, Švedska, Finska, Islandija, Latvija, Litva in Poljska. EFSA je nato leta 2023 izdala poročilo, v katerem so poročali, da so testirali 155.660 cervidov, starejših od 12 mesecev, in med testiranjem na Švedskem in Finskem prvič odkrili CWD. Bolezen so potrdili pri 31 živalih, in sicer pri: 13 severnih jelenih, 15 losih (*Alces alces*) in prvič pri 3 navadnih jelenih (*Cervus elaphus*). Odkrili so, da je prevalenca v okuženih regijah okoli 0,05 % pri losih, 0,16 % pri navadnih jelenih in 0,23 % pri severnih jelenih, prevalenca pa je bila tudi za 10 x višja pri tarčnih skupinah z večjim tveganjem (živali z značilnimi kliničnimi znaki, poginjene, šibke živali, odstreljene živali, zaklane živali, ki so neprimerne za človeško prehrano), v katero ne spadajo povožene živali. Ugotovili so dva glavna fenotipa, ki se ločita po detekciji PrP^{CWD} v

limforetikularnih tkivih. Fenotip, pri katerem so dokazali prisotnost PrP^{CWD} v limforetikularnih tkivih (Ly+), se pojavlja pri divjih severnih jelenih, njegova geografska porazdelitev je gručasta, pojavlja se več pri jelenih moškega spola, starejših od 2 let, in se pogosteje pojavlja pri jelenih z določenimi aleli *PRNP*. V Severni Ameriki in Aziji se pri cervidih pojavlja le Ly+ fenotip. Fenotip, pri katerem prisotnosti PrP^{CWD} niso dokazali v limforetikularnih tkivih (Ly-), pa se pojavlja pri navadnih jelenih in losih, geografska razporeditev je razpršena, pojavlja pa se bolj pri živalih, starih nad 10 let in ženskega spola. Domneva se, da fenotip Ly+ predstavlja večjo nevarnost za prenos bolezni v naravi, saj je PrP^{CWD} razširjen tudi v limforetikularnem tkivu in bi se tako lažje razširil tudi na druge cervide in potencialno na druge dovzetne živali, zato moramo pomisliti tudi na zoonotičen potencial bolezni (Koutsoumanis in sod., 2023).

1.6 VARIACIJE *PRNP* PRI NAVADNIH JELENIH V EVROPI

Genetska variacija *PRNP* je velikega pomena, ko gre za dovzetnost in potek prionskih bolezni. Dobro raziskan primer tega je genetska variacija *PRNP* pri ovcah in delno tudi pri kozah, ki jih načrtno selekcioniramo na odpornost proti klasični obliki praskavca (angl. scrapie). Različni aleli *PRNP* določajo različno dovzetnost na bolezen, kar lahko prenesemo tudi na CWD pri jelenih (Belt in sod., 1995; Koutsoumanis in sod., 2023). Za razliko od srn (*Capreolus capreolus*), ki naj bi imele le en, divji tip (wt) alela, imajo navadni jeleni polimorfizme – nesinonimne substitucije na kodonih 59, 98, 168, 208, 226 in 247, z najpogostejšo substitucijo glutamina (Q) z glutaminsko kislino (E) na kodonu 226 (Q226E) (Moazami-Goudarzi in sod., 2021). Na Hrvaškem pa naj bi odkrili tudi navadnega jelena z nesinonimno substitucijo na kodonu 132 (Zecevic in sod., 2019). Edini CWD pozitiven navadni jelen, ki so mu sekvencirali *PRNP* na Norveškem, je bil homozigot E/E na položaju 226, kar naj bi bilo v tisti populaciji pogosto (Koutsoumanis in sod., 2023). Variacije na kodonu 59, kjer je pri wt glicin (G) in pride do substitucije s serinom (S) (G59S), kar so opazili pri italijanskih navadnih jelenih (Peletto in sod., 2009), in kodonu 168, kjer je pri wt prolin (P), substitucija s serinom (S) (P168S), naj bi bile precej redke, našli so jih pri čeških in škotskih navadnih jelenih (Robinson in sod., 2019). Variacije na kodonu 98, kjer je wt treonin (T) substituiran z alaninom (A) (T98A), pa so bile opažene pri škotskih, italijanskih, čeških, angleških, hrvaških, portugalskih in španskih navadnih jelenih, vendar so odsotne pri navadnih jelenih na Norveškem (Peletto in sod., 2009; Pitarch in sod., 2018; Robinson in sod., 2019; Zecevic in sod., 2019; Pereira in sod., 2023). Poročalo se je tudi o substituciji metionina (M) z izolevcinom (I) na kodonu 208 (M208I) pri

navadnem jelenu v Italiji (Kaluz in sod., 1997). Polimorfizma P168S in I247L (substitucijo izolevcina z levcinom (L)) so do zdaj našli le pri škotskih in čeških populacijah navadnih jelenov (Robinson in sod., 2019). Znanih je tudi 7 sinonimnih substitucij na kodonih 15, 21, 26, 63, 78, 79 in 136, ki se pojavljajo v Evropi (Zecevic in sod., 2019; Moazami-Goudarzi in sod., 2021).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Želeli smo določiti polimorfizme *PRNP*, povezane z domnevno dovzetnostjo na CWD v populaciji navadnega jelena (*Cervus elaphus*) v Sloveniji. Zanimala nas je geografska porazdelitev navadnih jelenov s podobnimi polimorfizmi v Sloveniji in v povezavi z drugimi državami v Evropi, kjer so naredili podobne raziskave. Naš cilj je bil odkriti najpogostejši genotip *PRNP* in ugotoviti, ali so glede na ugotovljene genotipe navadni jeleni v Sloveniji bolj ali manj dovzetni za CWD, saj bi ob primeru izbruha to pomembno vplivalo na širjenje bolezni in obseg posledic, povzročenih na populaciji jelena v Sloveniji. S to študijo pa bi lahko v prihodnosti potencialno pripomogli k boljšemu razumevanju širjenja in obvladovanja bolezni v Evropi z epizootiološkega vidika.

Zastavili smo si naslednje hipoteze:

1. V Sloveniji je več različnih genotipov *PRNP* pri navadnih jelenih.
2. V Sloveniji se glede na znane podatke pojavljajo domnevno bolj ali manj na CWD dovzetni genotipi *PRNP* pri navadnih jelenih.
3. Pojavlja se prevladujoči genotip *PRNP* pri navadnih jelenih v Sloveniji.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORČENJE ŽIVALI IN IZOLACIJA DNA

Za genotipizacijo *PRNP* smo uporabili mišično tkivo 22 navadnih jelenov in enega vapitija (Slika 1). 9 vzorcev je iz Prekmurja, 4 iz Kočevja, 3 iz Notranjske, 2 iz Štajerske – pri čemer je bil eden od vzorcev odvzet živali, ki je bila odstreljena zaradi živčnih znakov v kraju Sveti Jurij v Slovenskih goricah –, 1 iz Goriške, 1 iz Zasavja, 1 iz Primorsko-notranjske regije, 1 vzorec iz leta 2002 pa je bil odvzet na neznani lokaciji v Sloveniji. Analizirali smo tudi 1 vzorec mišičnega tkiva vapitija iz klavnice iz kraja Mokronog. Vzorci so bili od zdravih živali, poginulih živali in živali s kliničnimi nevrološkiimi znaki. Možgani vseh vzorčenih živali so bili pregledani s hitrimi postmortalnim testom (Prionics® Check Western ali Enfer ali IDEXX), histopatološko in v večini primerov imunohistokemijsko. Vse živali so bile negativne na prisotnost PrP^{CWD}.

Odvzeti vzorci mišičnega tkiva so bili shranjeni v zamrzovalniku pri temperaturi pod $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Opravili smo izolacijo DNA iz tkiva po protokolu Wizard® DNA extraction (Promega):

Pripravili smo približno 3 mm^3 tkiva v 1,5 ml epruveti.

Pripravili smo 120 μl 0,5 M EDTA in 500 μl Nuclei Lysis Solution in ga ohladili na ledu.

V 1,5 ml epruveto s tkivom smo pipetirali 600 μl ohlajene raztopine Nuclei Lysis Solution/EDTA.

Dodali smo 17,4 μl 20 mg/ml proteinaze K.

Mešanico smo inkubirali pri $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ vsaj 3 ure in epruveto vsako uro premešali na vorteksu ali preko noči z nežnim stresanjem.

Dodali smo 3 μl RNase Solution in mešanico premešali z obračanjem epruvete 2 do 5-krat.

Mešanico smo inkubirali 15–30 minut pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Mešanico smo ohladili tako, da smo jo pustili 5 minut na sobni temperaturi.

V mešanico smo dodali 200 μl Protein Precipitation Solution in epruveto vorteksirali 20 sekund.

Vzorec smo 5 minut hladili na ledu (Slika 2).

Vzorec smo centrifugirali 4 minute pri 13.000–16.000 ref. Precipitiran protein je oblikoval belo usedlino oz. pelet.

Supernatant, ki je vseboval DNA, smo previdno prenesli v čisto 1,5 ml epruveto, v kateri je bilo 600 μl izopropanola sobne temperature.

Mešanico smo previdno premešali z obračanjem epruvete do nastanka belih nitk DNA.

Centrifugirali smo 3 minute na 13.000–16.000 rcf pri sobni temperaturi. Po koncu se DNA vidi kot peleta na dnu epruvete.

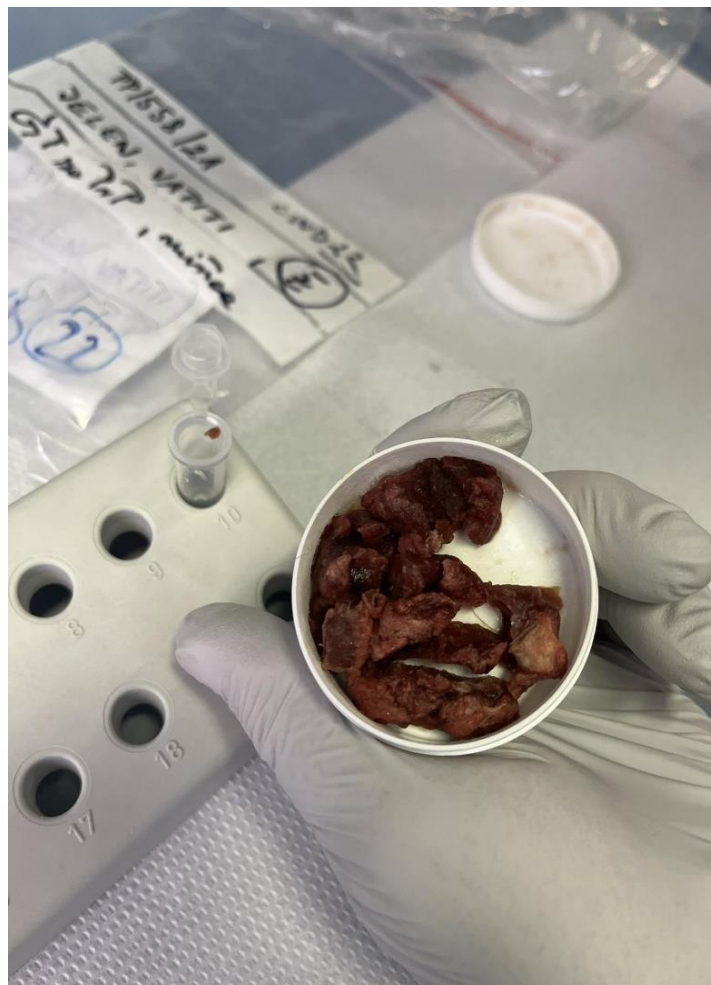
Previdno smo odlili supernatant in dodali 600 μ l 70 % etanola pri sobni temperaturi ter premešali z nežnim obračanjem epruvete.

Centrifugirali smo 3 minute na 13.000–16.000 rcf pri sobni temperaturi.

Previdno smo odlili etanol in odprto epruveto obrnili na čisti papir ter jo sušili na zraku 1 uro.

Dodali smo 50 μ l DNA Rehydration Solution in rehidrirali DNA pri 65 °C 1 uro. Občasno smo premešali raztopino z nežnim udarjanjem po epruveti ali pa rehidrirali DNA preko noči v hladilniku.

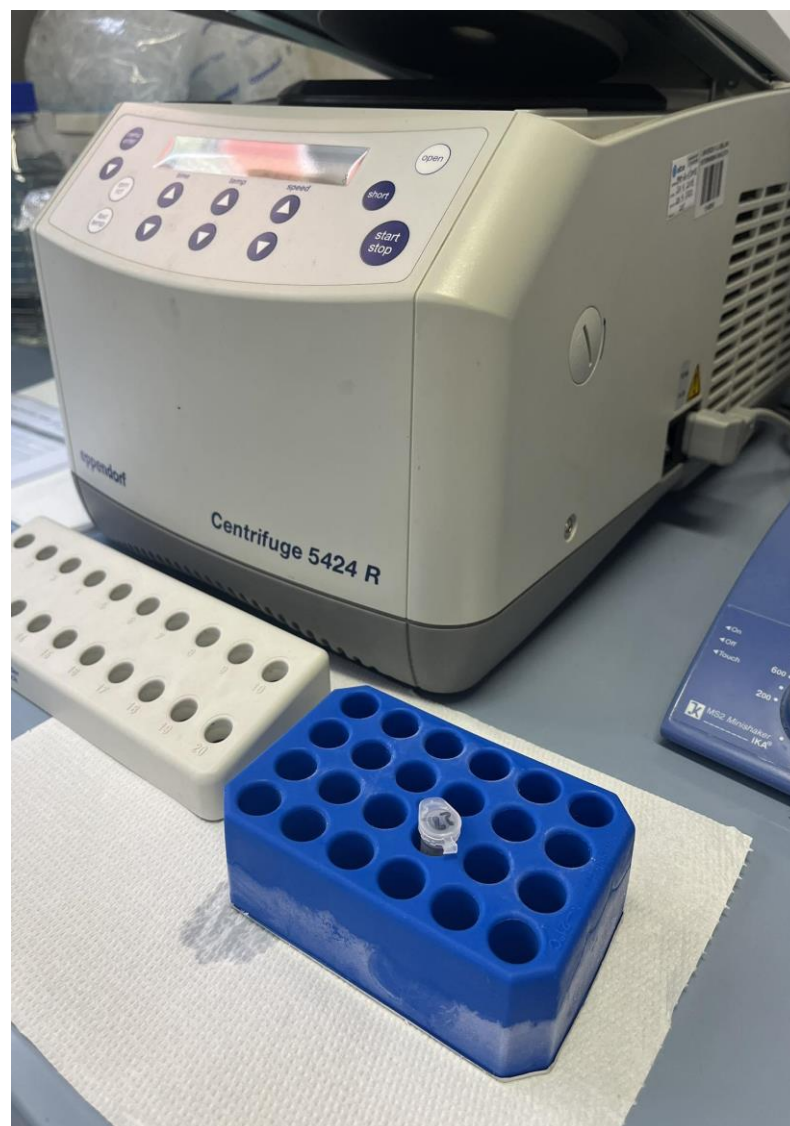
Izolirano DNA smo hranili pri 2–8 °C .



Slika 1: Vzorec mišičnega tkiva vavitija (*Cervus canadensis*).

3.2 PREVERJANJE KONCENTRACIJE DNA PO IZOLACIJI

Optično gostoto (OD) raztopine smo preverili na aparaturi Lambda 12 UV/VIS Spectrometer (PerkinElmer). 10 μ l raztopine DNA smo z 990 μ l vode prenesli v 1,5 ml epruveto in odčitali OD pri valovni dolžini 260 nm in 280 nm. Nato smo iz razmerja meritev 260 nm/280 nm izračunali čistost vzorca, ki naj bi bila med vrednostmi 1,8 in 2,0. Koncentracijo DNA smo izračunali glede na predpostavko, da absorbanca 1 pri 260 nm pomeni koncentracijo 50 μ g/ml DNA. Nato smo preračunali, da je v merjeni raztopini (1 ml) 10 μ l originalne raztopine DNA, in določili koncentracijo DNA v 1 μ l.



Slika 2: Hlajenje vzorca v epruveti na ledenem bloku v procesu izolacije DNA.

3.3 POMNOŽEVANJE *PRNP* Z METODO PCR

Za reakcijo smo uporabili modificiran protokol Platinum Supermix (Invitrogen).

Pripravili smo reakcijsko mešanico: 1 μ l oligonukleotida SPrP1 (5'-CATCATGGTGAAAAGCCACATAGGC-3'), 1 μ l oligonukleotida SPrP2 (5'-GAAAACAGGAAGGTTGCCCTATCC-3') (Ishiguro in sod., 1998), 11,5 μ l Platinum Supermix, 10,5 μ l destilirane vode in 1 μ l vzorca.

Za negativno kontrolo smo ponovili postopek in namesto 1 μ l vzorca dodali 1 μ l destilirane vode.

Amplifikacijo *PRNP* smo opravili v termopomnoževalniku SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific) na nastavitvi:

inkubacija 94 °C 10 min,

nato 35 ciklov

95 °C 1 min,

55 °C 1 min,

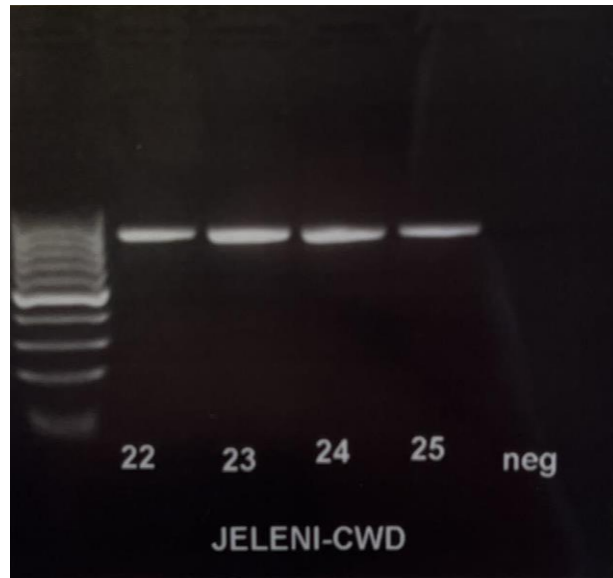
72 °C 2 min.

Po koncu ciklov 72 °C 10 min, čemur je sledilo ohlajanje do 8 °C.

3.4 PREVERJANJE PCR PRODUKTA NA ELEKTROFOREZI

Pripravili smo gel za elektroforezo po receptu 1 g agaroze na 100 ml TBE (Tris borat EDTA) pufra, da smo dobili 1 % raztopino, ki smo jo segrevali do zbitritve in dodali 1 μ l etidijevega bromida, ki je naredil produkte vidne pod ultravijolično svetlobo. Nato smo raztopino nalili v kadičke za elektroforezni gel ter nastavili glavnik za udrtine. Ko se je gel popolnoma ohladil, smo aplicirali v prvo udrtino označevalec velikosti DNA fragmentov GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific), nato pa naše produkte in negativno kontrolo.

Nato smo z virom elektrike pri napetosti 120 V 45 min dosegli elektroforezo. Produkte smo pogledali pod UV presvetljevalnikom.



Slika 3: Preverjanje PCR produkta na UV presvetljevalniku. V prvi liniji se nahaja označevalec velikosti (delci DNA velikosti od 1000 bp do 100 bp), v linijah od 22 do 25 so PCR produkti vzorcev od 22 do 25, v zadnji liniji je produkt PCR negativne kontrole. Vzorec 22 je bil odvzet vapitiju, vzorca 23 in 25 pa sta bila odvzeta istemu jelenu.

3.5 SEKVENČNA REAKCIJA

Za sekvenčno reakcijo smo uporabili protokol BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Pripravili smo dve 200 µl epruveti in v vsako dodali:

13,68 µl destilirane vode,

4 µl sekvenčnega pufra,

1 µl BDT,

0,32 µl oligonukleotida SprP1 v eno epruveto

in v drugo isto količino oligonukleotida SprP2 in

1 µl PCR produkta.

Amplifikacijo smo opravili v termopomnoževalniku SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific) na nastavitvi:

inkubacija 94 °C 1 min,

nato 25 ciklov

96 °C 20 s,

50 °C 20 s,

60 °C min.

Po koncu ciklov je sledilo ohlajanje do 8 °C.

3.6 ČIŠČENJE SEKVENČNE REAKCIJE

Najprej smo naredili kratko centrifugiranje in vsaki epruveti s sekvenčno reakcijo dodali:

50 µl 100 % etanola,

2 µl 3 M Na acetata in

2 µl 125 mM EDTA.

Nato smo mešanico dali na vortex, sledilo je 15 min inkubacije in potem 20 min centrifugiranja.

Odpipetirali smo 74 µl supernatanta in dodali 250 µl 70 % etanola v vsako epruveto.

Znova smo centrifugirali 7 min.

Odstranili smo supernatant in ostanek v epruveti sušili 1 min na 90 °C.

3.7 PRIPRAVA VZORCEV NA SEKVENCIRANJE

V vsako epruveto smo dodali 15 µl formamida (TSR pufer) in naredili kratko centrifugiranje, sledilo je mešanje, nato kratko centrifugiranje.

Sledila je denaturacija 3 min pri 96 °C in nato ohlajanje na ledu 1 min.

Po ponovnem kratkem centrifugiranju je sledil prenos vsebine v niz 8 epruвет.

3.8 SEKVENCIRANJE

Za sekvenciranje smo uporabili Sangerjevo sekvenciranje, ki je bilo izvedno pri Macrogen (Kitajska) za vzorce od 1 do 17 in vzorec 2 – 2002, ali pri ELIXIR Slovenija (aparatura SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)) za vzorce od 20 do 24. Vzorci, ki so bili poslani v Macrogen, so bili procesirani do produktov PCR.

3.9 OBDELAVA PODATKOV

Kromatogrami so bili poslani v dokumentih formata .ab1, ki smo jih pregledovali v programu Chromas (Technelysium Pty Ltd), da smo preverili njihovo točnost.

V programu BLAST® (National Library of Medicine) smo nato iz nukleotidnih zaporedij v informacijskih zbirkah določili, ali so dobljena nukleotidna zaporedja enaka sekvencam *PRNP* pri navadnih jelenih (*Cervus elaphus*), da smo se prepričali, ali so odvzeti vzorci mišičnega tkiva zares pripadali navadnim jelenom.

Za poravnave različnih dobljenih sekvenc smo uporabili program za prileganje več sekvenc Clustal Omega (EMBL's European Bioinformatics Institute), s katerim smo primerjali sekvence različnih navadnih jelenov in preverili kodone, potencialno pomembne za odpornost na CWD.

4 REZULTATI

Analizirali smo 22 vzorcev mišičnega tkiva navadnih jelenov. Vzorce mišičnega tkiva smo pridobili iz različnih regij Slovenije. Za 1 vzorec iz leta 2002 pa lokacije odvzema ne vemo, kar je v tabelah z rezultati označeno s poševno črto (/) (Priloga: Tabela 1).

Odkrili smo polimorfizme posameznih nukleotidov (angl. single nucleotide polymorphism - SNP) *PRNP* na 5 kodonih, drugje so se nukleotidna zaporedja med različnimi živalmi ujemala. Odkrili smo sinonimne substitucije nukleotidov na kodonih 21, 78 in 136 in nesinonimne substitucije T98A in Q226E (Priloga: Tabela 3). Pri vapitiju smo odkrili nesinonimno substitucijo M132L in dve sinonimni substituciji na kodonih 21 in 136 (Slika 8 in Priloga: Tabela 2). Frekvence posameznih polimorfizmov *PRNP* pri navadnih jelenih so predstavljene v Tabeli 1. Našli smo 9 genotipov (Tabela 4), ki kodirajo 5 različnih fenotipov (Tabela 3). Pojavlja se 5 različnih haplotipov s predpostavljeno povezavo med polimorfizmi na kodonu 136 in 226 (Tabela 2). Najpogostejši je haplotip V(gtc)Q(cag)TA(gcc)E, ki se pojavlja v frekvenci 38,64 % populacije vzorčenih navadnih jelenov.

Tabela 1: Frekvence posameznih polimorfizmov *PRNP* glede na kodone pri navadnih jelenih v Sloveniji.

Položaj kodona	SNP	Frekvenca (%)
21	V (gct)	86,36
	V (gtt)	13,64
78	Q (cag)	93,18
	Q (caa)	6,82
98	T (acc)	93,18
	A (gcc)	6,82
136	A (gcc)	52,27
	A (gct)	47,73
226	E (gag)	52,27
	Q(cag)	47,73

Aminokislina, ki jo kodira kodon, je označena s črko, v oklepaju je navedeno nukleotidno zaporedje kodona, na katerem so bili odkriti polimorfizmi posameznih nukleotidov (SNP).

Tabela 2: Haplotipi *PRNP* in njihove frekvence pri navadnih jelenih v Sloveniji.

Položaj kodona	21	78	98	136	226	frekvenca (%)
Haplotip						
V(gtc) Q(cag) T A(gcc) E	V (gtc)	Q (cag)	T (acc)	A (gcc)	E (gag)	38,64
V(gtc) Q(cag) T A(gct) Q	V (gtc)	Q (cag)	T (acc)	A (gct)	Q (cag)	34,09
V(gtt) Q(cag) T A(gcc) E	V (gtt)	Q (cag)	T (acc)	A (gcc)	E (gag)	13,64
V(gtc) Q(caa) T A(gct) Q	V (gtc)	Q (caa)	T (acc)	A (gct)	Q (cag)	6,82
V(gtc) Q(cag) A A(gct) Q	V (gtc)	Q (cag)	A (gcc)	A (gct)	Q (cag)	6,82

Haplotipi so bili ugotovljeni s predpostavljeno povezavo med kodonom 136 in 226. Črke v haplotipu označujejo aminokislino, ki jo kodira kodon, na katerem je bil odkrit polimorfizem. V oklepaju so v primeru tihih mutacij zapisana nukleotidna zaporedja kodonov. Ostali del tabele bolj nazorno prikazuje haplotipe za vsak kodon posebej.

Tabela 3: Fenotipi *PRNP* in njihove frekvence navadnih jelenov v Sloveniji.

Fenotip	Število živali	Frekvenca (%)
V ₂₁ Q ₇₈ T ₉₈ A ₁₃₆ Q _{E226}	8	36,36
V ₂₁ Q ₇₈ T ₉₈ A ₁₃₆ Q ₂₂₆	4	18,18
V ₂₁ Q ₇₈ T _{A98} A ₁₃₆ Q ₂₂₆	2	9,09
V ₂₁ Q ₇₈ T ₉₈ A ₁₃₆ E ₂₂₆	7	31,82
V ₂₁ Q ₇₈ T ₉₈ T _{A136} Q _{E226}	1	4,55

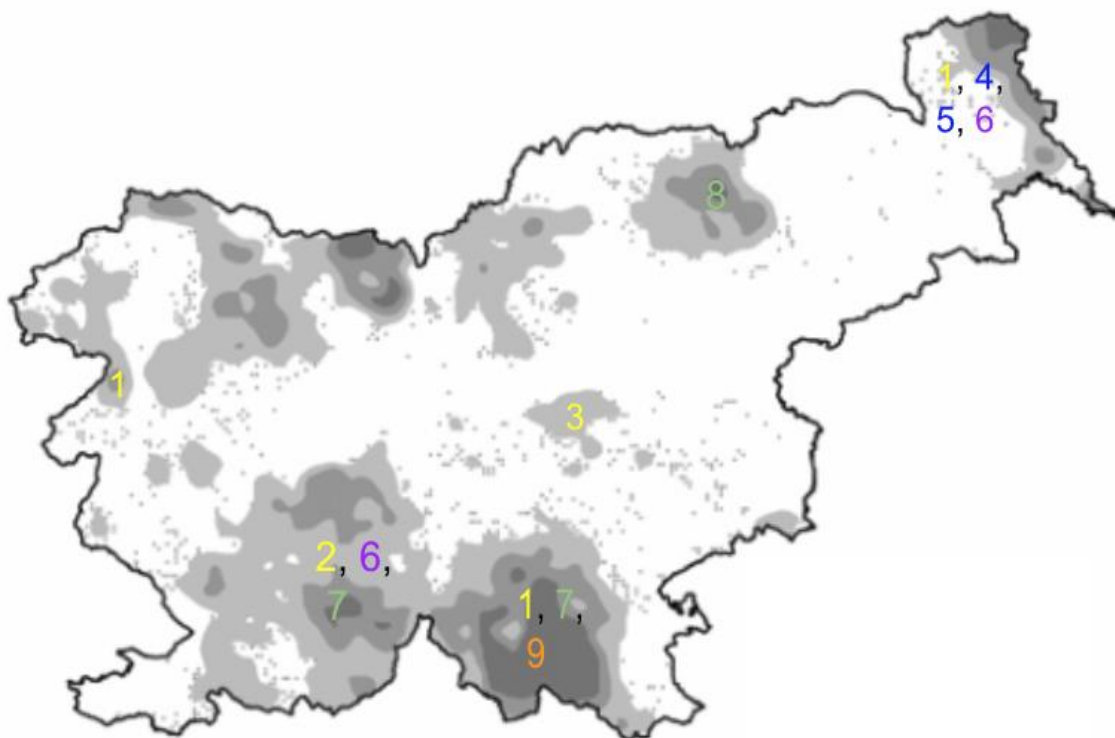
Fenotipi so označeni s črkami aminokislin s podpisanimi položaji kodonov, ki jih kodirajo. Vrstice so obarvane v skladu z ujemačimi se fenotipi. Fenotip V₂₁Q₇₈T₉₈A₁₃₆Q_{E226} je obarvan rumeno, V₂₁Q₇₈T₉₈A₁₃₆Q₂₂₆ je obarvan modro, V₂₁Q₇₈T_{A98}A₁₃₆Q₂₂₆ je obarvan vijolično, V₂₁Q₇₈T₉₈A₁₃₆E₂₂₆ je obarvan zeleno, V₂₁Q₇₈T₉₈T_{A136}Q_{E226} je obarvan oranžno.

Legenda številke genotipov *PRNP* navadnih jelenov v Sloveniji se nahaja v Tabeli 4. Številke so bile določene naključno. V Prekmurju se pojavljajo genotipi 1, 4, 5 in 6, tam pa je bil vzorčen tudi edini jelen homozigot Q(caa) na kodonu 78. V Kočevju se pojavljajo genotipi 1, 7 in 9, v Notranjski regiji se pojavljajo genotipi 2, 6 in 7, v Štajerski regiji sta imela oba vzorčena jelena genotip 8, jelen iz Zasavja je imel genotip 3, jelen iz Primorsko-notranjske regije pa genotip 8 (Slika 4).

Tabela 4: Genotipi *PRNP* navadnih jelenov v Sloveniji glede na regije in njihove frekvence

Položaj kodona	21	78	98	136	226			
Št. Genotipa						Število živali	Frekvenca (%)	Regije
1	VV (gtc/gtc)	QQ (cag/cag)	TT (acc/acc)	AA (gct/gcc)	QE (cag/gag)	6	27,27	4 Prekmurje, 1 Kočevje, 1 Goriška
2	VV (gtc/gtt)	QQ (cag/cag)	TT (acc/acc)	AA (gct/gcc)	QE (cag/gag)	1	4,55	Notranjska
3	VV (gtc/gtt)	QQ (cag/caa)	TT (acc/acc)	AA (gct/gcc)	QE (cag/gag)	1	4,55	Zasavje
4	VV (gtc/gtc)	QQ (cag/cag)	TT (acc/acc)	AA (gct/gct)	QQ (cag/cag)	3	13,64	Prekmurje
5	VV (gtc/gtc)	QQ (caa/caa)	TT (acc/acc)	AA (gct/gct)	QQ (cag/cag)	1	4,55	Prekmurje
6	VV (gtc/gtc)	QQ (cag/cag)	TA (acc/gcc)	AA (gct/gct)	QQ (cag/cag)	2	9,09	1 Prekmurje, 1 Notranjska
7	VV (gtc/gtt)	QQ (cag/cag)	TT (acc/acc)	AA (gcc/gcc)	EE (gag/gag)	4	18,18	2 Kočevje, 1 Notranjska, 1 /
8	VV (gtc/gtc)	QQ (cag/cag)	TT (acc/acc)	AA (gcc/gcc)	EE (gag/gag)	3	13,64	2 Štajerska, 1 Primorsko-notranjska
9	VV (gtc/gtc)	QQ (cag/cag)	TA (acc/gcc)	AA (gct/gcc)	QE (cag/gag)	1	4,55	Kočevje

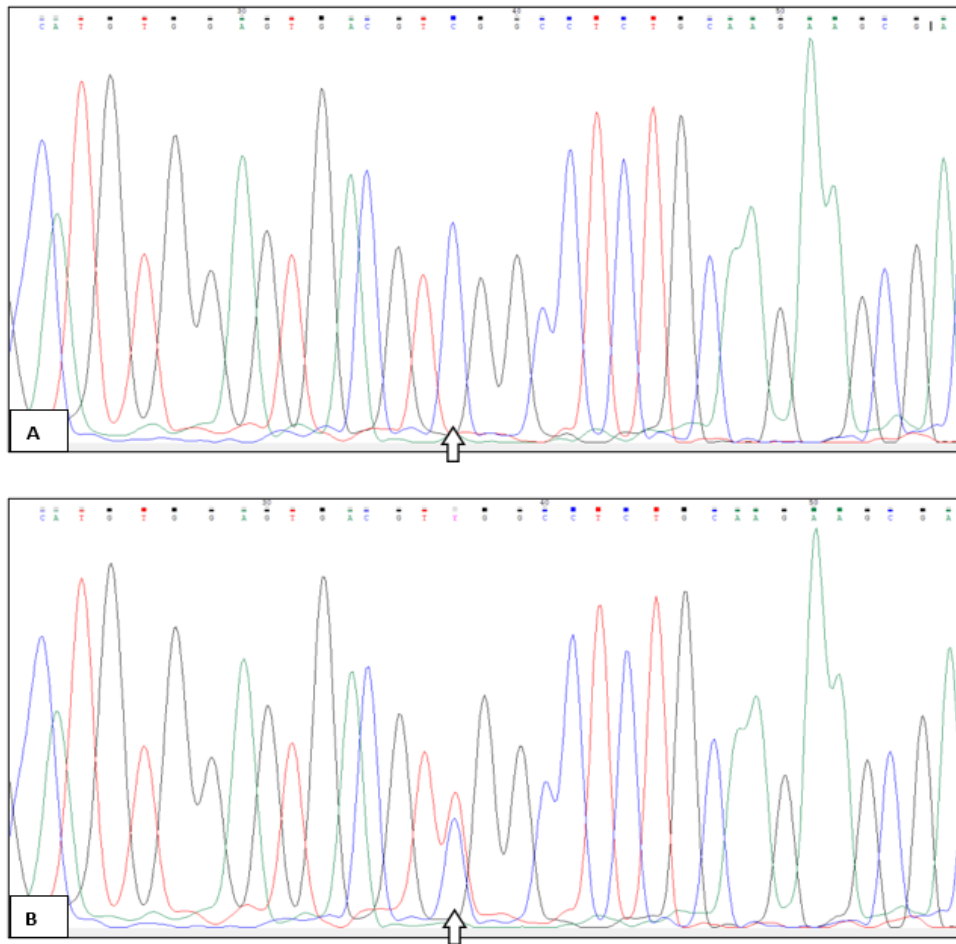
V tabeli so z naključnimi številkami označeni genotipi, ki so razvrščeni glede na polimorfizme *PRNP* na določenih kodonih. Kodoni oz. aminokislina posameznih jelenov so označene s črno, kadar gre za divji tip (wt); oranžno, kadar gre za heterozigote v primeru sinonimne substitucije; odebeljeno oranžno, kadar gre za heterozigote v primeru nesinonimne substitucije; zeleno, kadar gre za homozigote v primeru sinonimne substitucije; odebeljeno zeleno, kadar gre za homozigote v primeru nesinonimne substitucije. Vrstice so obarvane v skladu z ujemajočimi fenotipi. S poševno črto (/) je označen vzorec, za katerega lokacija odvzema ni znana.



Slika 4: Razporeditev različnih genotipov *PRNP* glede na vzorčene regije in gostoto populacije jelenjadi v Sloveniji. S številkami so označeni genotipi iz Tabele 4, ki se pojavljajo v regijah. Barve številke indicirajo različne fenotipe. Fenotip $V_{21}Q_{78}T_{98}A_{136}QE_{226}$ je obarvan rumeno, $V_{21}Q_{78}T_{98}A_{136}Q_{226}$ je obarvan modro, $V_{21}Q_{78}TA_{98}A_{136}Q_{226}$ je obarvan vijolično, $V_{21}Q_{78}T_{98}A_{136}E_{226}$ je obarvan zeleno in $V_{21}Q_{78}T_{98}TA_{136}QE_{226}$ je obarvan oranžno. Gostota populacije je največja na mestih, obarvanih temno sivo, manj gosta na mestih, obarvanih svetlo sivo in najmanjša na belih področjih (Vir zemljevida z gostoto populacije jelenjadi: Stergar M, Kobler A, Jerina K. Kaj vpliva na zdajšnji prostorski razporeditev jelenjadi v Sloveniji in kakšna bo njena prihodnja razširjenost? Lovca 2011; 94(3): 134. Uporabljeno z dovoljenjem Lovske zveze Slovenije in Stergar M.).

Kodon 21 kodira aminokislino valin (V), ki jo na tem mestu izražajo vsi testirani navadni jeleni. Nukleotidno zaporedje pa je bilo različno pri 6 jelenih (27,3 %), ki so bili heterozigoti gtc/gtt, kjer je prišlo do substitucije citozina (c) s timinom (t) in tihe mutacije, posledično ni prišlo do spremembe aminokislina. Ostali jeleni so bili homozigoti gtc (72,7 %) (Slika 5).

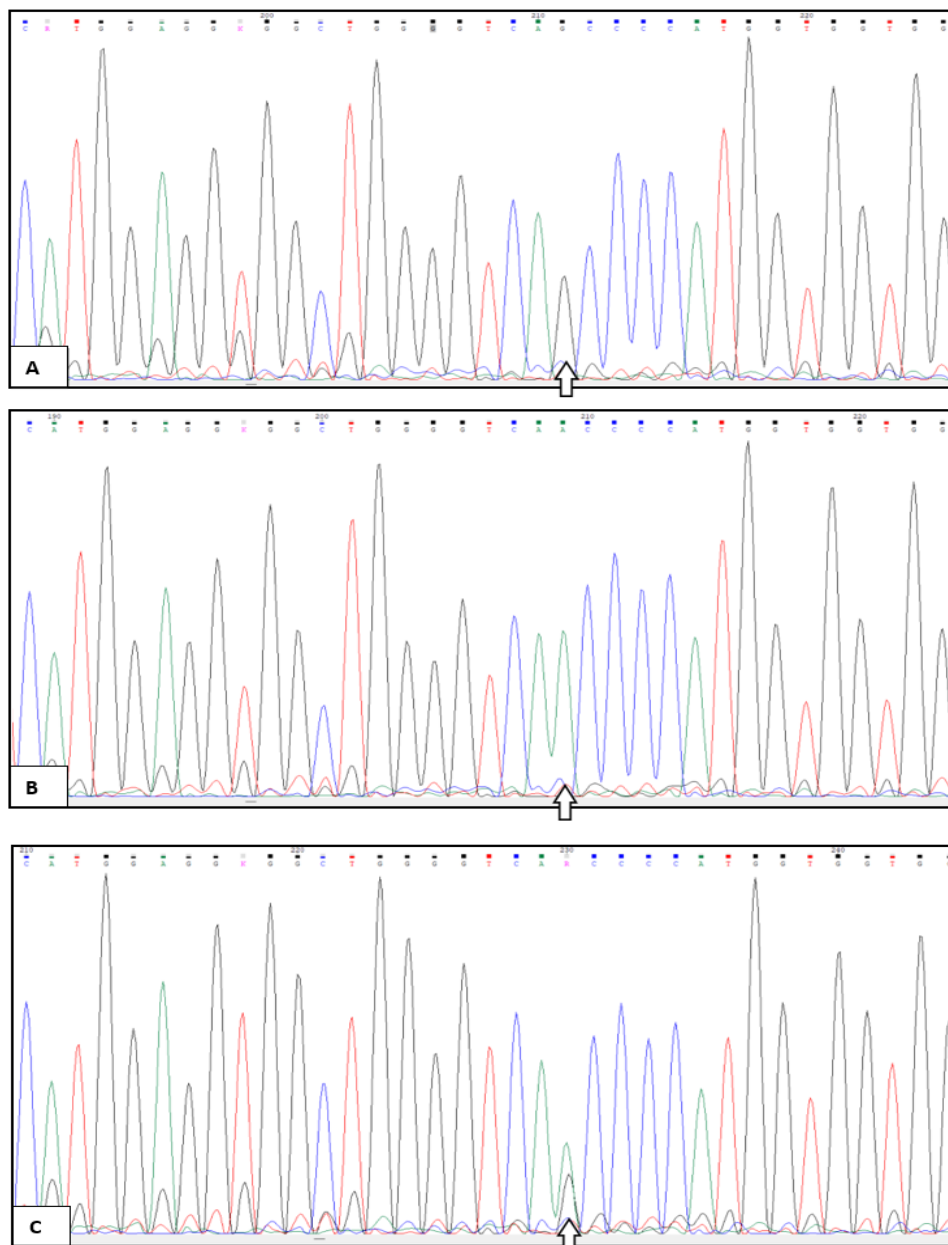
Kodon 78 kodira aminokislino Q, ki jo prav tako izražajo vsi testirani navadni jeleni, vendar pa je bilo nukleotidno zaporedje različno pri 2 (9,1 %) jelenih. Jelen številka 4 (4,5 %) je bil homozigot caa, jelen številka 24 pa heterozigot cag/caa. Pri obeh je bila ugotovljena substitucija gvanina (g) z adeninom (a). Ostali jeleni so bili homozigoti cag (90,9 %) (Slika 6).



Slika 5: Polimorfizem na kodonu 21. Kodon 21 kodira aminokislino V. A - homozigot gtc; B - heterozigot gtc/gcc. Mesto polimorfizma tretjega nukleotida kodona 21 označuje puščica.

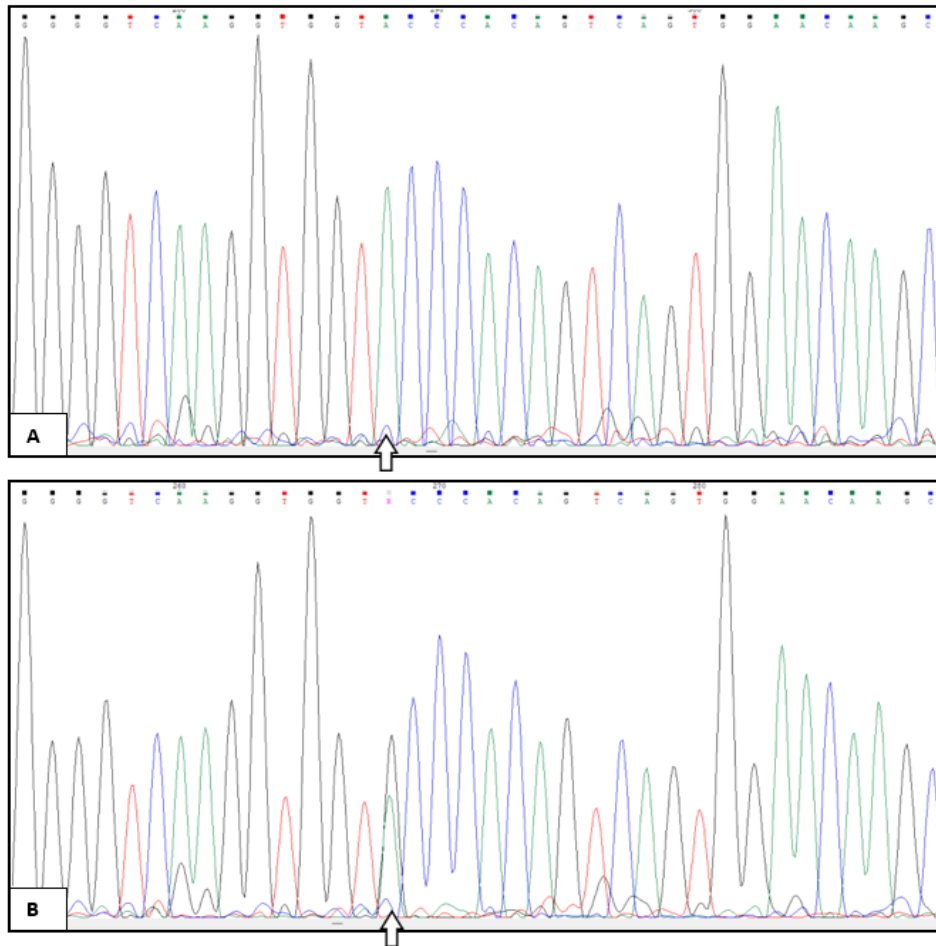
Kodon 98 kodira aminokislino T in A, 19 (86,4 %) navadnih jelenov je homozigotov acc, izražajo aminokislino T. Ostali 3 (13,6 %) jeleni so bili heterozigoti acc/gcc (Slika 7), kjer je prišlo do substitucije nukleotida a z g in posledično do spremembe aminokislino T v A. Zaradi heterozigotnosti ti jeleni izražajo obe aminokislini.

Kodon 132 kodira aminokislino M, ki jo izražajo vsi navadni jeleni, ki so heterozigoti atg. Vzorec vapiti je bil na tem mestu heterozigot atg/ttg in je zaradi nesinonimne substitucije nukleotida a s t izražal tudi aminokislino L (Slika 8).



Slika 6: Polimorfizem na kodonu 78. Kodon 78 kodira aminokislino Q. A - homozigot cag; B - homozigot caa; C - heterozigot caa/cag. Mesto polimorfizma tretjega nukleotida kodona 78 označuje puščica.

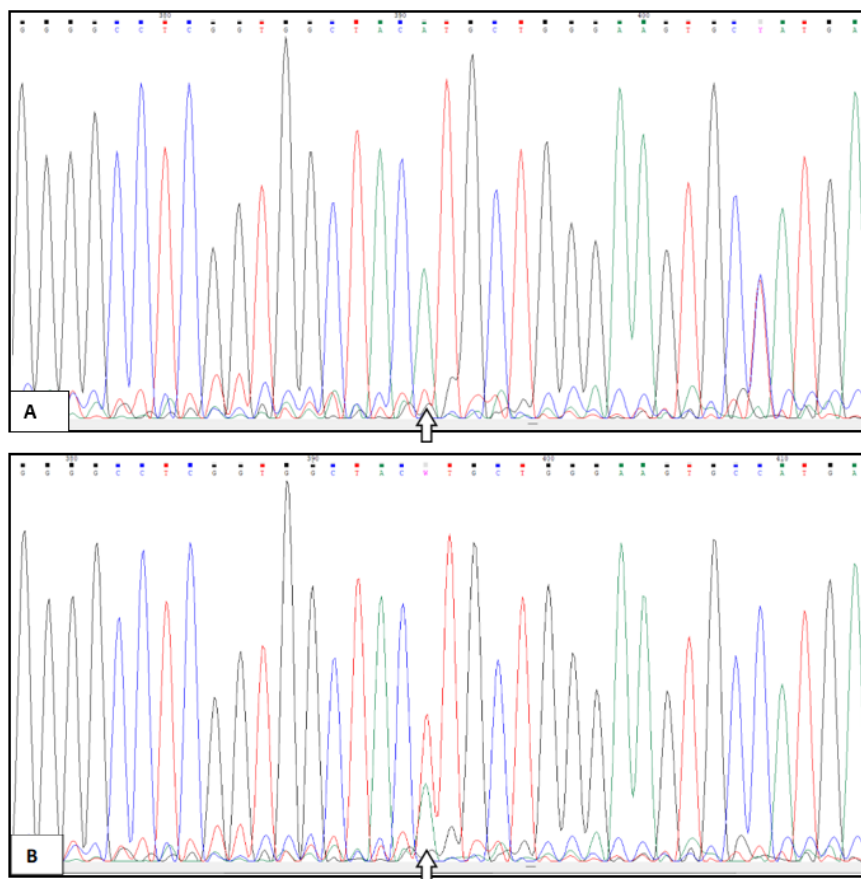
Kodon 136 kodira aminokislino A, ki jo izražajo vsi navadni jeleni, 6 (27,3 %) je homozigotov gct, 9 (40,9 %) jelenov je heterozigotov gct/gcc, 7 (31,8 %) pa homozigotov gcc (Slika 9). Do spremembe aminokislina ne pride zaradi sinonimne substitucije nukleotida.



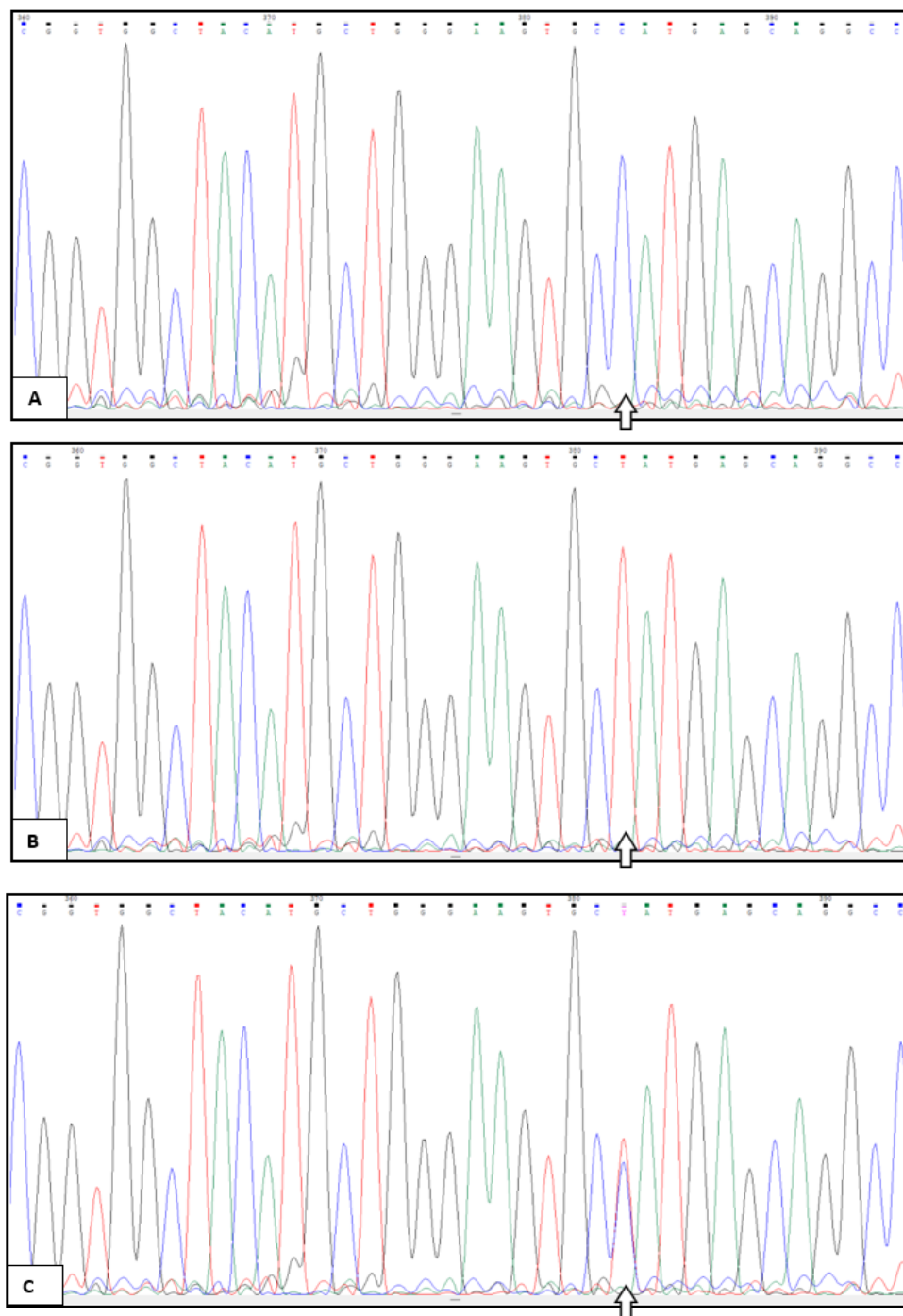
Slika 7: Polimorfizem na kodonu 98. Kodon 98 kodira aminokislino A ali T. A - homozigot acc; B - heterozigot acc/gcc. Mesto polimorfizma prvega nukleotida kodona 98 označuje puščica.

Kodon 226 kodira aminokislini Q in E, 6 (27,3 %) navadnih jelenov je homozigotov cag in izraža aminokislino Q, 7 (31,8 %) jelenov je homozigotov gag, pri katerih je prišlo do substitucije nukleotida c z g in tako do nesinonimne substitucije ter spremembe aminokislina Q v E. 9 (40,9 %) jelenov je heterozigotov cag/gag, ki izražajo obe aminokislini (Slika 10).

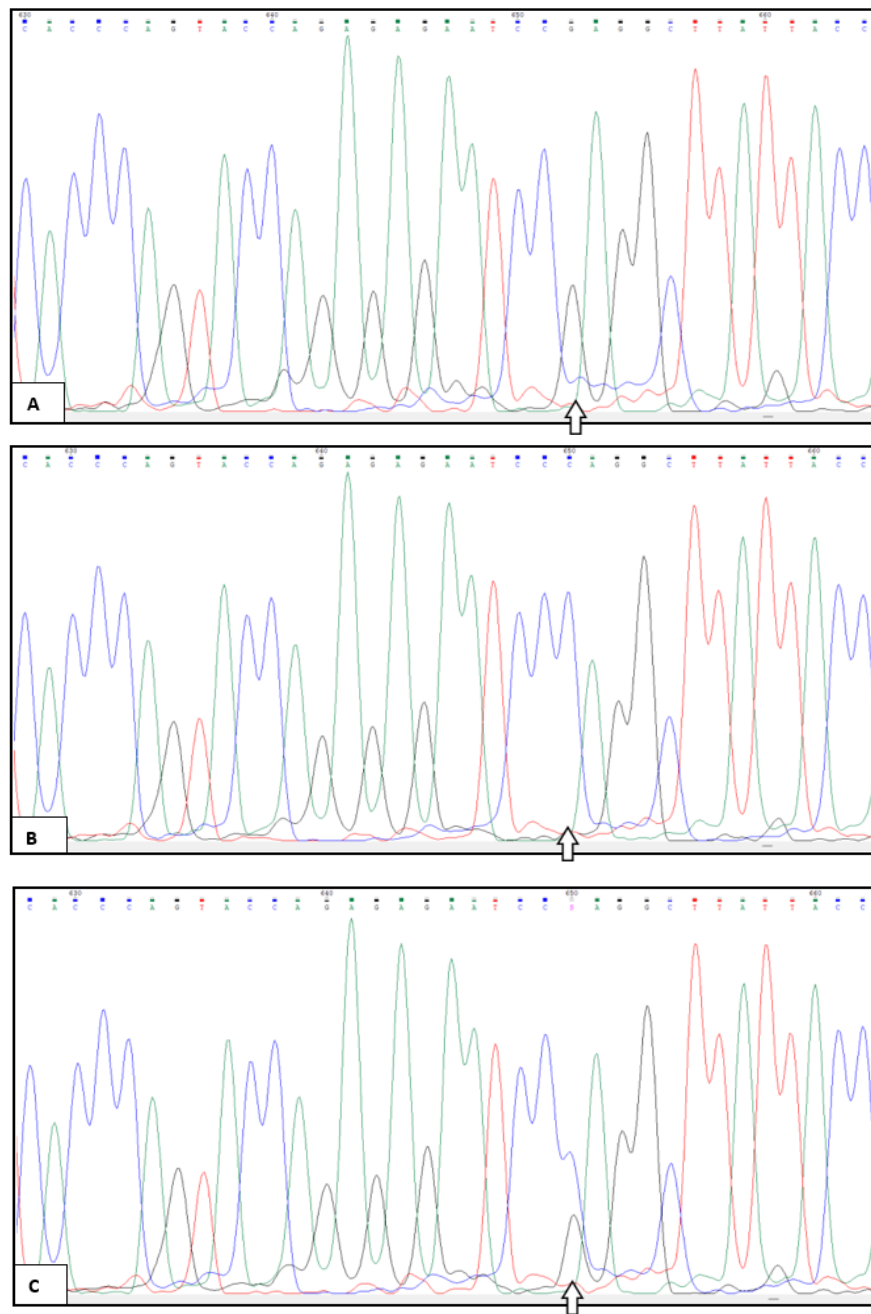
Ugotovili smo povezavo med polimorfizmi na kodonu 136 in 226, saj so navadni jeleni homozigoti gct na kodonu 136 bili homozigoti cag na kodonu 226, jeleni heterozigoti gct/gcc na kodonu 136 tudi heterozigoti cag/gag na kodonu 226 in homozigoti gcc na kodonu 136 tudi homozigoti gag na kodonu 226. Ostalih takšnih povezav nismo našli.



Slika 8: Polimorfizem na kodonu 132. Kodon 132 kodira aminokislino M in L. A - navadni jelen homozigot atg; B - vapiti, heterozigot atg/ttg z nesinonimno substitucijo. Mesto polimorfizma prvega nukleotida kodona 132 označuje puščica.



Slika 9: Polimorfizem na kodonu 136. Kodon 136 kodira aminokislino A, prisotne so tihe mutacije. A - homozigot gcc; B – homozigot gct; C - heterozigot gct/gcc. Mesto polimorfizma tretjega nukleotida kodona 136 označuje puščica.



Slika 10: Polimorfizem na kodonu 226. Kodon 226 kodira aminokislino Q ali E. A - homozigot gag; B - homozigot gag; C - heterozigot gag/gag; . Mesto polimorfizma prvega nukleotida kodona 226 je označeno s puščico.

5 RAZPRAVA

Ta naloga predstavlja prvo raziskavo polimorfizmov *PRNP* navadnih jelenov v Sloveniji. *PRNP* polimorfizmi ključno vplivajo na dovzetnost jelenjadi na CWD v smislu dolžine inkubacijske dobe in časa razvoja kliničnih znakov bolezni in pogina živali, kar je bilo dokazano tudi na mišjih modelih, kljub temu, da so najverjetneje vsi genotipi dovzetni za bolezen (Cortez in Sim, 2013; Moazami-Goudarzi in sod., 2021). Če je populacija navadnega jelena v Sloveniji še vedno podobna ali celo večja, glede na podatke iz leta 2010, ko je štela okoli 10.000 do 14.000 osebkov (Adamič in Jerina, 2010), naše število vzorcev ni reprezentativno glede na celotno populacijo, saj smo testirali le 22 navadnih jelenov, vendar nam daje dober uvid v genetsko ozadje *PRNP* jelenov v Sloveniji. Vsi testirani navadni jeleni in vapiti so bili negativni na CWD.

Glede na obstoječo literaturo smo se pri pregledovanju polimorfizmov osredotočili na kodone 15, 21, 59, 63, 78, 79, 96, 98, 132, 136, 168, 208, 225, 226 in 247. Odkrili smo 5 polimorfizmov *PRNP* na kodonih 21, 78, 98, 136 in 226. Vsi odkriti polimorfizmi so že bili omenjeni v obstoječi literaturi. Odkrili smo sinonimne substitucije na kodonih 21 (gtc →gtt), 78 (cag →caa) in 136 (gct →gcc). Literature, ki bi omenjala občutno odpornost določenih genotipov zaradi sinonimnih substitucij, nismo našli.

Sinonimno substitucijo na kodonu 21, ki kodira aminokislino V, smo odkrili v frekvenci 13,64 % alelov populacije vzorčenih navadnih jelenov. Odkrili so jo tudi na Škotskem, kjer se je pojavljala varianta, enaka naši, v Italiji pa so odkrili varianto gtc →gtg (Peletto in sod., 2009).

Sinonimno substitucijo na kodonu 78 (cag →caa), ki kodira aminokislino Q, so odkrili le pri navadnih jelenih v Italiji in na Hrvaškem (Peletto in sod., 2009; Zecevic in sod., 2019), pojavila pa se je pri nas pri dveh navadnih jelenih (v frekvenci 6,82 % alelov populacije vzorčenih navadnih jelenov), ki sta izviralna iz Zasavja (heterozigotna oblika) in Prekmurja (homozigotna oblika). Zanimivo je, da pri navadnih jelenih, vzorčenih bližje italijanski meji, tega polimorfizma nismo našli.

Sinonimno substitucijo na kodonu 136 (gct →gcc), ki kodira aminokislino A, smo odkrili v frekvenci 52,27 % alelov populacije vzorčenih navadnih jelenov, zaradi pojava pri večini jelenov pa smo jo v tabelah označili kot wt. Pojavlja pa se tudi pri norveških, portugalskih, hrvaških, italijanskih, britanskih, španskih in čeških jelenih (Peletto in sod., 2009; Pitarch in sod., 2018; Robinson in sod., 2019; Zecevic in sod., 2019; Güere in sod., 2020; Pereira in sod., 2023), kar nakazuje na številno in široko geografsko razširjenost tega polimorfizma. V povezavi dovzetnosti ovc na klasično obliko praskavca so ugotovili, da so ovce z alelom, ki je kodiral na kodonu 136 aminokislino A, zbolevala manj ali celo niso zbolevala (Hunter in sod., 1994; Goldmann in sod. 2006). Ugotovili smo povezavo med polimorfizmi na kodonu 136 in 226, ki je bila opažena tudi pri portugalskih, italijanskih in britanskih navadnih jelenih (Peletto in sod., 2009; Robinson in sod., 2019; Pereira in sod., 2023). Navadne jelene s haplotipoma A₁₃₆(gcc)Q₂₂₆ in A₁₃₆(gct)E₂₂₆ so odkrili le na Škotskem v zelo nizkih frekvencah (1,40 % in 0,15 %) (Peletto in sod., 2009).

Nesinonimno substitucijo T98A (acc →gcc) smo odkrili pri treh navadnih jelenih (v frekvenci 6,82 % alelov populacije vzorčenih jelenov), pri vseh v heterozigotni obliki. Pojavlja pa se tudi pri italijanskih, hrvaških, britanskih, španskih in portugalskih navadnih jelenih (Peletto in sod., 2009; Pitarch in sod., 2018; Robinson in sod., 2019; Zecevic in sod., 2019; Pereira in sod., 2023). Trenutno ni nobenih dokazov, da bi ta polimorfizem *PRNP*, kljub spremembi aminokislina, spremenil dovzetnost na CWD. Pri britanskih navadnih jelenih so opazili tudi povezavo med pojavom polimorfizma acc →gcc na kodonu 98 in aminokislino Q na kodonu 226 (Robinson in sod., 2019). Te informacije smo vzeli v zakup pri ugotavljanju haplotipov, kljub temu smo pri enem navadnem jelenu ugotovili haplotip acc na kodonu 98 in aminokislino E na kodonu 226.

Nesinonimno substitucijo Q226E (cag →gag) smo odkrili v frekvenci 52,27 % alelov populacije vzorčenih navadnih jelenov, ker pa se pojavlja pri večini navadnih jelenov, smo jo v tabelah označili kot wt. Aminokislino E na tem kodonu naj bi izražali bolj skalnogorski losi, aminokislino Q pa bolj mulasti jeleni (Cervenáková in sod., 1997). V Evropi imamo pri navadnih jelenih obe verziji, heterozigoti QE₂₂₆ pa so pogosti. Kodon 226 kodira aminokislino

tretje alfa vijačnice PrP^C, ki naj bi bila vključena v patološke procese v času prionskih bolezni (Robinson in sod., 2019). Aminokislina, ki jo kodira kodon 226, je imela pri transgenih miših, ki so izražale prionski protein skalnogorskega losa ali pa mulastega jelena, velik vpliv na lastnosti sevov CWD v smislu časa inkubacije (ki je glede na aminokislino na kodonu 226 in inokuliranega seva variirala), konformacije PrP^{CWD} in distribucije PrP^{CWD} v mišjih možganih (Angers in sod. 2010; Bian in sod., 2019). Eksperimentalna oralna inokulacija s CWD štirih navadnih jelenov z genotipi EE₂₂₆, QE₂₂₆ in QQ₂₂₆ ni pokazala večjih razlik v času inkubacije ali profilu Western blota (Bian in sod., 2019). Pri drugi raziskavi, kjer so eksperimentalno okužili 6 navadnih jelenov z BSE, pa je pripeljala do okužbe le pri jelenu z QQ₂₂₆ genotipom (Dagleish in sod., 2015). Glede na majhno število raziskav in naravno okuženih navadnih jelenov je težko določiti točen vpliv nesinonimnih substitucij Q26E na dovzetnost jelenov za CWD, je pa očitno, da imajo velik vpliv na propagacijo PrP^{CWD}.

Pri vapitju smo poleg sinonimnih substitucij na kodonih 21 in 136 odkrili tudi nesinonimno substitucijo M132L. Ta sprememba aminokislina naj bi že v eni verziji imela velik vpliv na zmanjšano dovzetnost za CWD pri skalnogorskih losih (Hamir in sod., 2006; O'Rourke in sod., 2007). Nesinonimno substitucijo M132L pri jelenih enačijo s človeško verzijo polimorfizmov kodona 129, ki so ključnega pomena pri razvoju prionskih bolezni pri ljudeh (Arifin in sod., 2021).

Odkriti polimorfizmi nam nakazujejo, da imamo v Sloveniji morda tudi bolj odporne genotipe, ki vplivajo na konformacijo PrP^C, ki bi potencialno zaradi manjšega ujemanja z matrico PrP^{CWD} pripeljali do slabše konverzije PrP^C v patološko obliko in tako do manjše možnosti razvoja bolezni (Arifin in sod., 2021). Upamo lahko, da bi v primeru izbruha bolezni odpornejši genotipi populacijo jelenjadi ohranjali. CWD v Sloveniji zaenkrat še ni ugotovljena, vendar možnosti, da se bo prenesla ali se spontano pojavila, ne moremo izključiti. Slovenska jelenjad je bila praktično iztrebljena v 18. stoletju in ponovno naseljena ob koncu 19. stoletja z jeleni iz Karpatov, Nemčije, Avstrije, Poljske in Madžarske, zato bi bilo zanimivo pridobiti podatke o polimorfizmih *PRNP* s teh področij in ostalih sosednjih držav Slovenije, ki teh raziskav še niso opravile, saj se populacije slovenske in tuje jelenjadi na mnogih mejnih področjih srečujejo in mešajo, zlasti na Madžarski meji (Adamič in Jerina, 2010). Pomisliti moramo tudi na druge vrste jelenjadi v Sloveniji, saj so bili damjaki (*Dama dama*) dokazano dovzetni za CWD preko

intracerebralne inokulacije (Hamir in sod., 2011), srne (*Capreolus capreolus*) pa imajo v Evropi zelo ohranjen *PRNP* večinoma brez polimorfizmov, kar bi znalo predstavljati problem, če bi se izkazalo, da so dovzetne za CWD (Moazami-Goudarzi in sod., 2021). V naslednjih letih bo v Evropi pomemben nadaljnji nadzor in vzorčenje jelenjadi za ugotavljanje in omejitev potencialnega izbruha CWD, še posebej zato, ker so prve okužbe velikokrat neopažene, prevalenca okuženih živali pa je v Evropskih državah s CWD zelo nizka (Koutsoumanis in sod, 2023).

6 SKLEPI

Potrdili smo 2 zastavljeni hipotezi, 1 delno:

1. Ugotovili smo, da je Sloveniji vsaj 9 različnih genotipov *PRNP* pri navadnih jelenih in 5 različnih fenotipov.
2. Delno smo potrdili, da se v Sloveniji glede na znane podatke morda pojavljajo bolj ali manj na CWD dovzetni genotipi *PRNP* pri navadnih jelenih. Za vse polimorfizme *PRNP*, ki smo jih odkrili pri slovenskih navadnih jelenih še ni dokaza, da bi očitno vplivali na dovzetnost, razen polimorfizma na kodonu 226, ki naj bi glede na nekatere raziskave imel vpliv na dovzetnost jelenov za CWD.
3. Dokazali smo prevladujoči genotip *PRNP* pri navadnih jelenih v Sloveniji, in sicer genotip V₂₁(gct/gtc)Q₇₈(cag/cag)T₉₈(acc/acc)A₁₃₆(gct/gcc)QE₂₂₆(cag/gag).

7 POVZETEK

V tej raziskavi smo pregledovali gen za prionski protein (*PRNP*) 22 navadnih jelenov (*Cervus elaphus*), katerih mišični vzorci so bili odvzeti z več regij v Sloveniji, da bi odkrili polimorfizme, ki bi vplivali na dovzetnost jelenov na bolezen kroničnega hiranja jelenjadi (chronic wasting disease – CWD). V raziskavo je bilo vključeno 22 navadnih jelenov in 1 vapiti (*Cervus canadensis*). Regije, iz katerih smo dobili vzorce mišičnega tkiva jelenov, so bile Prekmurje, Kočevje, Notranjska, Štajerska, Zasavje, Goriška in Primorsko-notranjska. Vzorec mišičnega tkiva vapitija pa je izhajal iz kraja Mokronog.

Vzorci mišičnega tkiva so bili do uporabe zamrznjeni na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, nato pa smo iz tkiva izolirali DNA po protokolu Wizard® DNA extraction (Promega) in koncentracijo izoliranega DNA določili na spektrometru. Sledilo je pomnoževanje *PRNP* z metodo verižne reakcije s polimerazo (polymerase chain reaction – PCR), za katero smo uporabili modificiran protokol Platinum Supermix (Invitrogen), po katerem smo preverili PCR produkte na elektroforezi. Za sekvenčno reakcijo smo uporabili protokol BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), po zaključku smo reakcijo še očistili in pripravili vzorce na sekvenciranje. Uporabili smo Sangerjevo sekvenciranje z aparaturo SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) pri Macro genu na Kitajskem ali pri ELIXIR v Sloveniji. Kromatogrami so bili poslani v dokumentih formata .ab1, ki smo jih nato pregledovali in popravljali v programu Chromas (Technelysium Pty Ltd). Nukleotidna zaporedja vse vzorcev smo preverili v programu BLAST® (National Library of Medicine) in jih poravnali z Multiple Sequence Alignment programa Clustal Omega (EMBL's European Bioinformatics Institute).

V raziskavi smo ugotovili 5 polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNPs) na kodonih 21, 78, 98, 136 in 226 pri navadnih jelenih. Pri vapitiju pa smo ugotovili SNPs na kodonih 21, 132 in 136. Pri jelenih smo ugotovili sinonimne substitucije na kodonih 21 (gtc →gtt), 78 (cag →caa) in 136 (gct →gcc) ter nesinonimne substitucije T98A in Q226E. Ugotovili smo 9 različnih genotipov, 5 različnih fenotipov ter 5 različnih haplotipov. Najpogostejši genotip je bil $V_{21}(gtc/gtc)Q_{78}(cag/cag)T_{98}(acc/acc)A_{136}(gct/gcc)QE_{226}(cag/gag)$, najpogostejši fenotip pa $V_{21}Q_{78}T_{98}A_{136}QE_{226}$.

Rezultati kažejo, da imamo v Sloveniji prisotne različne genotipe pri navadnih jelenih, tudi tiste, za katere domnevajo, da določajo nižjo dovzetnost na CWD, in ki bi v primeru pojava CWD ohranjali populacijo.

8 SUMMARY

In this research, we analyzed the prion protein gene (*PRNP*) of 22 red deer (*Cervus elaphus*), whose muscle tissue samples were taken from several regions in Slovenia, with the aim of discovering polymorphisms that would affect the susceptibility of deers to chronic wasting disease (CWD). 22 red deer and 1 wapiti (*Cervus canadensis*) were included in the research. The regions from which we obtained deer muscle tissue samples were Prekmurje, Kočevje, Notranjska, Štajerska, Zasavje, Gorička and Primorsko-notranjska. The wapiti muscle tissue sample came from Mokronog.

The muscle tissue samples were kept frozen at a temperature of -20 °C until they were used. First, DNA was isolated from the tissue using the Wizard® DNA extraction protocol (Promega), then the concentration of the isolated DNA was determined on a spectrometer. This was followed by *PRNP* amplification using the polymerase chain reaction (PCR), for which we used a modified Platinum Supermix protocol (Invitrogen). Afterwards, PCR products were examined with electrophoresis. The BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) protocol was used for the sequencing reaction, and after its completion, the reaction was purified and samples were prepared for sequencing. Sanger sequencing was used with the SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) at Macrogen in China or at ELIXIR in Slovenia. Chromatograms were sent in .ab1 format documents, which were then reviewed and revised in the Chromas programme (Technelysium Pty Ltd). Nucleotide sequences were inspected in the BLAST ® programme (National Library of Medicine) and the nucleotide sequences of all samples were aligned by Multiple Sequence Alignment of the Clustal Omega programme (EMBL's European Bioinformatics Institute).

In the research, we found 5 single nucleotide polymorphisms (SNPs) on codons 21, 78, 98, 136 and 226 in red deer. In the wapiti, however, we found SNPs at codons 21, 132 and 136. In red deer, we found synonymous substitutions at codons 21 (gtc → gtt), 78 (cag → caa) and 136 (gct → gcc) and non-synonymous substitutions T98A and Q226E. We found 9 different genotypes, 5 different phenotypes and 5 different haplotypes. The most common genotype was V₂₁(gtc/gtc)Q₇₈(cag/cag)T₉₈(acc/acc)A₁₃₆(gct/gcc)QE₂₂₆(cag/gag) and the most common phenotype was V₂₁Q₇₈T₉₈A₁₃₆QE₂₂₆.

The results suggest that there might be red deer in Slovenia with less susceptible *PRNP* genotypes that would preserve the population in the event of a CWD outbreak.

9 ZAHVALE

Najprej bi se rada zahvalila svoji mentorici izr. prof. dr. Jelki Zabavnik Piano, da mi je zaupala to nalogo, me spodbujala čez celoten proces, mi pomagala z nasveti in vsem novim podanim znanjem odkriti svet raziskovanja. Neskončno sem ji hvaležna za potrpljenje pri branju mojih preštevlnih elektronskih sporočil z neštetimi idejami in vprašanji ter za neumorno popraviljanje mojih 'končnih' verzij raziskovalne naloge.

Zahvalila bi se tudi gospe Magdaleni Dobravec, ki je s svojim nepogrešljivim delom v laboratoriju omogočila nastanek te naloge in mi bila v veliko pomoč, ko me je s svojim nadobudnim očesom nadzorovala pri delu in drastično izboljšala moje sposobnosti pipetiranja. Zahvala gre tudi prof. dr. Poloni Juntas, ki je opravila vse teste na CWD pri vzorčenih jelenih in vapitiju.

Za lekturo se zahvaljujem svoji dolgoletni prijateljici Lei Košmrlj, dipl. anglistiki in nemcistki, in lekt. dr. Mateji Gaber s Filozofske fakultete, ki sta mi obe priskočili na pomoč v zadnjem trenutku.

Velika zahvala gre tudi zaposlenim v Knjižnici Veterinarske fakultete, ki so bliskovito odpisovali na moja elektronska sporočila in mi uredili vire v izjemno kratkem času. Še posebej bi se rada zahvalila gospe Slavici Sekulič za vse nasvete in pomoč.

Za temeljit pregled naloge in koristne informacije se zahvaljujem recenzentoma prof. dr. Gorazdu Venguštu in doc. dr. Marku Cotmanu.

Brez prijateljev in družine, ki so mi stali ob strani in me spodbujali, te naloge verjetno ne bi bilo, zato se jim iz srca zahvaljujem. Najbolj pa bi se zahvalila svoji mami Barbari, ki me je nesebično podpirala od samega začetka, mi pomagala pri pisanju, poslušala o mojih idejah, mi svetovala in vedno našla spodbudne besede, ko sem se znašla v zagati. Draga mama, hvala za vse.

Zasluge dolgujem tudi moji pokojni teti Meti, ki me je še pred nastankom te naloge spodbujala, da vstopim v svet raziskovanja. Upam, da bi bila ponosna name, če bila še tu.

Na koncu pa bi se rada zahvalila tudi vsem drugim, ki so sodelovali pri nastanku te naloge.

Hvala!

10 LITERATURA

1. Adamič M, Jerina K. Ungulate Management in Europe in the XXI Century: Slovenia. In: Apollonio M, eds. European Ungulates and Their Management in the 21st Century. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. https://www.researchgate.net/publication/250308630_UNGULATE_MANAGEMENT_IN_EUROPE_IN_THE_XXI_CENTURY_SLOVENIA (11. 6. 2024)
2. Angers RC, Kang HE, Napier D, et al. Prion strain mutation determined by prion protein conformational compatibility and primary structure. *Science* 2010; 328(5982): 1154–8. doi: 10.1126/science.1187107
3. Angers RC, Seward TS, Napier D, et al. Chronic wasting disease prions in elk antler velvet. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(5): 696–703. doi: 10.3201/eid1505.081458
4. Arifin MI, Hannaoui S, Chang SC, Thapa S, Schatzl HM, Gilch S. Cervid prion protein polymorphisms: role in chronic wasting disease pathogenesis. *Int J Mol Sci* 2021; 22(5): 2271. doi: 10.3390/ijms22052271
5. Atkinson CJ, Zhang K, Munn A, Wiegmans A, Wei MQ. Prion protein scrapie and the normal cellular prion protein. *Prion* 2016; 10(1): 63–82. doi: 10.1080/19336896.2015.1110293
6. Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, Bos-de Ruijter J, Gielkens AL, Smits MA. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol* 1995; 76 (3): 509–17. doi: 10.1099/0022-1317-76-3-509
7. Benestad SL, Mitchell G, Simmons M, Ytrehus B, Vikøren T. First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. *Vet Res* 2016; 47(1): 88. doi: 10.1186/s13567-016-0375-4
8. Bian J, Christiansen JR, Moreno JA, et al. Primary structural differences at residue 226 of deer and elk PrP dictate selection of distinct CWD prion strains in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019; 116(25): 12478–87. doi: 10.1073/pnas.1903947116
9. Brown P, Gajdusek DC. Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* 1991; 337(8736): 269–70. doi: 10.1016/0140-6736(91)90873-n
10. Brown P, Rau EH, Johnson BK, Bacote AE, Gibbs CJ, Gajdusek DC. New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600°C suggests an inorganic template of replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(7): 3418–21. doi: 10.1073/pnas.97.7.3418

11. Cervenáková L, Rohwer R, Williams S, Brown P, Gajdusek DC. High sequence homology of the PrP gene in mule deer and Rocky Mountain elk. *Lancet* 1997; 350(9072): 219–20. doi: 10.1016/s0140-6736(05)62387-2
12. Chiavacci SJ. The economic costs of chronic wasting disease in the United States. *PLoS ONE* 2022; 17(12): e0278366. doi:10.1371/journal.pone.0278366
13. Cortez LM, Sim VL. Implications of prion polymorphisms. *Prion* 2013; 7(4): 276–9. doi: 10.4161/pri.25566
14. Dagleish MP, Martin S, Steele P, et al. Susceptibility of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) to alimentary challenge with bovine spongiform encephalopathy. *PLoS One* 2015; 10(1): e0116094. doi: 10.1371/journal.pone.0116094
15. Denkers ND, Hoover CE, Davenport KA, et al. Very low oral exposure to prions of brain or saliva origin can transmit chronic wasting disease. *PLoS One* 2020; 15(8): e0237410. doi: 10.1371/journal.pone.0237410
16. Edmunds DR, Kauffman MJ, Schumaker BA, et al. Chronic wasting disease drives population decline of white-tailed deer. *PLoS ONE* 2016; 11(8): e0161127. doi: 10.1371/journal.pone.0161127
17. Goldmann W, Houston F, Stewart P, Perucchini M, Foster J, Hunter N. Ovine prion protein variant A(136)R(154)L(168)Q(171) increases resistance to experimental challenge with bovine spongiform encephalopathy agent. *J Gen Virol* 2006; 87(12): 3741–5. doi: 10.1099/vir.0.82083-0
18. Güere ME, Våge J, Tharaldsen H, et al. Chronic wasting disease associated with prion protein gene (*PRNP*) variation in Norwegian wild reindeer (*Rangifer tarandus*). *Prion* 2020; 14(1): 1–10. doi: 10.1080/19336896.2019.1702446
19. Haley NJ, Seelig DM, Zabel MD, Telling GC, Hoover EA. Detection of CWD prions in urine and saliva of deer by transgenic mouse bioassay. *PLoS One* 2009; 4(3): e4848. doi: 10.1371/journal.pone.0004848
20. Hamir AN, Gidlewski T, Spraker TR, et al. Preliminary observations of genetic susceptibility of elk (*Cervus elaphus nelsoni*) to chronic wasting disease by experimental oral inoculation. *J Vet Diagn Invest* 2006; 18(1): 110–4. doi: 10.1177/104063870601800118

21. Hamir AN, Greenlee JJ, Nicholson EM, et al. Experimental transmission of chronic wasting disease (CWD) from elk and white-tailed deer to fallow deer by intracerebral route: final report. *Can J Vet Res* 2011; 75(2): 152–6.
22. Hunter N, Goldmann W, Smith G, Hope J. The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch Virol* 1994; 137(1/2): 171–7. doi: 10.1007/BF01311184
23. Ishiguro N, Shinagawa M, Onoe S, Yamanouchi K, Saito T. Rapid analysis of allelic variants of the sheep PrP gene by oligonucleotide probes. *Microbiol Immunol* 1998; 42(8): 579–82. doi: 10.1111/j.1348-0421.1998.tb02327
24. Kaluz S, Kaluzova M, Flint AP. Sequencing analysis of prion genes from red deer and camel. *Gene* 1997; 199(1/2): 283–6. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00382-x
25. Kim TY, Shon HJ, Joo YS, Mun UK, Kang KS, Lee YS. Additional cases of Chronic Wasting Disease in imported deer in Korea. *J Vet Med Sci* 2005; 67(8): 753–9. doi: 10.1292/jvms.67.753
26. Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordoñez A, et al. Monitoring of Chronic Wasting Disease (CWD) (IV). *EFSA J* 2023; 21(4): e07936. doi: 10.2903/j.efsa.2023.7936
27. Lee YH, Sohn HJ, Kim MJ, Kim HJ, et al. Strain characterization of the Korean CWD cases in 2001 and 2004. *J Vet Med Sci* 2013; 75(1): 95–8. doi: 10.1292/jvms.12-0077
28. Mathiason CK, Powers JG, Dahmes SJ, et al. Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* 2006; 314(5796): 133–6. doi: 10.1126/science.1132661
29. Miller MW, Fischer JR. The first five (or more) decades of chronic wasting disease: lessons for the five decades to come. In: *Transactions of the 81st North American wildlife and natural resources conference: proceedings*. Pittsburgh: Wildlife Management Institute, 2016: 110–120. https://cwd-info.org/wp-content/uploads/2018/12/81st-NAWNRC-Transactions_FINAL-CWD-Excerpt.pdf (11. 6. 2024)
30. Miller MW, Williams ES, McCarty CW, et al. Epizootiology of chronic wasting Disease in free-ranging cervids in Colorado and Wyoming. *J Wildl Dis* 2000; 36 (4): 676–90. doi: 10.7589/0090-3558-36.4.676

31. Moazami-Goudarzi K, Andréoletti O, Vilotte JL, Béringue V. Review on *PRNP* genetics and susceptibility to chronic wasting disease of Cervidae. *Vet Res* 2021; 52(1): 128. doi: 10.1186/s13567-021-00993-z
32. Nobert BR, Merrill EH, Pybus MJ, Bollinger TK, Hwang YT. Landscape connectivity predicts chronic wasting disease risk in Canada. *J App Ecol* 2016; 53(5): 1450–9. doi: 10.1111/1365-2664.12677
33. Nonno R, Di Bari MA, Pirisinu L, et al. Studies in bank voles reveal strain differences between chronic wasting disease prions from Norway and North America. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020; 117(49): 31417–26. doi: 10.1073/pnas.2013237117
34. O'Rourke KI, Spraker TR, Zhuang D, Greenlee JJ, Gidlewski TE, Hamir AN. Elk with a long incubation prion disease phenotype have a unique PrPd profile. *Neuroreport* 2007; 18(18): 1935–8. doi: 10.1097/WNR.0b013e3282f1ca2f
35. Peletto S, Perucchini M, Acín C, et al. Genetic variability of the prion protein gene (*PRNP*) in wild ruminants from Italy and Scotland. *J Vet Sci* 2009; 10(2): 115–20. doi: 10.4142/jvs.2009.10.2.115
36. Pereira JC, Gonçalves-Anjo N, Orge L, et al. Estimating sequence diversity of prion protein gene (*PRNP*) in Portuguese populations of two cervid species: red deer and fallow deer. *Prion* 2023; 17(1): 75–81. doi: 10.1080/19336896.2023.2191540
37. Pitarch JL, Raksa HC, Arnal MC, et al. Low sequence diversity of the prion protein gene (*PRNP*) in wild deer and goat species from Spain. *Vet Res* 2018; 49(1): 33. doi: 10.1186/s13567-018-0528-8
38. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13363–83. doi: 10.1073/pnas.95.23.13363
39. Robinson AL, Williamson H, Güere ME, et al. Variation in the prion protein gene (*PRNP*) sequence of wild deer in Great Britain and mainland Europe. *Vet Res* 2019; 50(1): 59. doi: 10.1186/s13567-019-0675-6
40. Samuel, MD. Spatiotemporal Epizootiology of chronic wasting disease in Wisconsin Deer. *Ecosphere* 2023; 14(7): e4612. doi:10.1002/ecs2.4612
41. Sohn HJ, Kim JH, Choi KS, et al. A case of chronic wasting disease in an elk imported to Korea from Canada. *J Vet Med Sci* 2002; 64(9): 855–8. doi: 10.1292/jvms.64.855.
42. Stergar M, Kobler A, Jerina K. Kaj vpliva na zdajšnja prostorsko razporeditev jelenjadi v Sloveniji in kakšna bo njena prihodnja razširjenost? *Lovec* 2011; 94(3): 131–4.

43. Tamgüney G, Miller MW, Wolfe LL, et al. Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature* 2009; 461(7263): 529–32. doi: 10.1038/nature08289
44. Tranulis MA, Tryland M. The zoonotic potential of chronic wasting disease - a review. *Foods* 2023; 12(4): 824. doi: 10.3390/foods12040824.
45. Trout J, Roberts M, Tabet M, Kotkowski E, Horn S. Hunters from the same lodge afflicted with sporadic CJD: is chronic wasting disease to blame? (P7-13.002). *Neurology* 2024; 102 (17/supplement. 1) doi: 10.1212/WNL.0000000000204407
46. USGS. Distribution of chronic wasting disease in North America. Reston: United States Geological Survey, 2024. <https://www.usgs.gov/media/images/distribution-chronic-wasting-disease-north-america-0> (7.5. 2024)
47. Wells GA, Scott AC, Johnson CT, et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec.* 1987; 121(18): 419–20. doi: 10.1136/vr.121.18.419.
48. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347(9006): 921–5. doi: 10.1016/s0140-6736(96)91412-9.
49. Williams ES, Young S. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wild Dis* 1980; 16(1): 89–98. doi:10.7589/0090-3558-16.1.89
50. Williams ES. Chronic wasting disease. *Vet Pathol* 2005; 42(5): 530–49. doi: 10.1354/vp.42-5-530.
51. Zecevic E, Dokso A, Rustempasic A, Brka M. PRP gene polymorphism in the red deer (*Cervus elaphus L.*). *Genetika* 2019; 51(3): 1053–60. doi: 10.2298/GENSR1903053Z

PRILOGA

Tabela 1: Polimorfizmi *PRNP* vseh 22 vzorčenih navadnih jelenov v Sloveniji

Položaj kodona	15	21	59	63	78	79	96	98	132	136	168	208	225	226	247	Regija
Številka živali																
1	VV	VV (gtc/gtc)	GG	PP	QQ (cag/cag)	PP	GG	TT (acc/acc)	MM	AA (gct/gct)	PP	MM	SS	QQ (cag/cag)	II	Prekmurje
2		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TA (acc/gcc)		AA (gct/gct)				QQ (cag/cag)		Prekmurje
3		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gct/gcc)				QE (cag/gag)		Prekmurje
4		VV (gtc/gtc)			QQ (caa/caa)			TT (acc/acc)		AA (gct/gct)				QQ (cag/cag)		Prekmurje
5		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TA (acc/gcc)		AA (gct/gct)				QQ (cag/cag)		Notranjska
6		VV (gtc/gtt)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gct/gcc)				QE (cag/gag)		Notranjska
7		VV (gtc/gtt)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gcc/gcc)				EE (gag/gag)		Notranjska
8		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gct/gct)				QQ (cag/cag)		Prekmurje
9		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gct/gcc)				QE (cag/gag)		Prekmurje
10		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gct/gcc)				QE (cag/gag)		Prekmurje
11		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gct/gcc)				QE (cag/gag)		Prekmurje
12		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TA (acc/gcc)		AA (gct/gcc)				QE (cag/gag)		Kočevje
13		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gct/gcc)				QE (cag/gag)		Kočevje

Položaj kodona	15	21	59	63	78	79	96	98	132	136	168	208	225	226	247	
Številka živali																
14		VV (gtc/gtt)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gcc/gcc)				EE (gag/gag)		Kočevje
15		VV (gtc/gtt)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gcc/gcc)				EE (gag/gag)		Kočevje
16		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gcc/gcc)				EE (gag/gag)		Štajerska
17		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gct/gct)				QQ (cag/cag)		Prekmurje
sample 2 - from 2002		VV (gtc/gtt)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gcc/gcc)				EE (gag/gag)		/
20		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gct/gcc)				QE (cag/gag)		Goriška (Bovec)
21		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gcc/gcc)				EE (gag/gag)		Primorsko-notranjska
23		VV (gtc/gtc)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)		AA (gcc/gcc)				EE (gag/gag)		Štajerska
24		VV (gtc/gtt)			QQ(cag/caa)			TT (acc/acc)		AA (gct/gcc)				QE (cag/gag)		Zasavje
aminokislina	VV	VV	GG	PP	QQ	PP	GG	TT (19); TA (3)	MM	AA	PP	MM	SS	QE (9); QQ (6); EE (7)	II	

Številke označujejo laboratorijske številke vzorcev. Kodoni oz. aminokislina posameznih navadnih jelenov so označene s črno, kadar gre za divji tip (wt); oranžno, kadar gre za heterozigote v primeru sinonimne substitucije; odebeljeno oranžno, kadar gre za heterozigote v primeru nesinonimne substitucije; zeleno, kadar gre za homozigote v primeru sinonimne substitucije; odebeljeno zeleno, kadar gre za homozigote v primeru nesinonimne substitucije. Z rdečo so označena mesta, kjer je prišlo do mutacij. S poševno črto (/) je označen vzorec, za katerega lokacija odvzema ni znana.

Tabela 2: Polimorfizmi *PRNP* pri vzorčenem vapitiju (*Cervus canadensis*)

Položaj kodona	15	21	59	63	78	79	96	98	132	136	168	208	225	226	247
vzorec 22 - vapiti (Lokacija: Mokronog)	/	VV (gtc/gtt)			QQ (cag/cag)			TT (acc/acc)	ML (atg/ttg)	AA (gcc/gcc)				EE (gag/gag)	

Kodoni oz. aminokisliline so označene s črno, kadar gre za divji tip (wt); oranžno, kadar gre za heterozigotnost v primeru sinonimne substitucije; odebeljeno oranžno, kadar gre za heterozigotnost v primeru nesinonimne substitucije. Z rdečo so označena mesta, kjer je prišlo do mutacij.

Tabela 3: Povzetek pregledanih domnevnih in odkritih lokacij polimorfizmov *PRNP* navadnih jelenov v Sloveniji

Položaj kodona	15	21	59	63	78	79	96	98	132	136	168	208	225	226	247
Nukleotidi	gtg/gtg	gtc/gtc (16)	ggc/ggc	ccc/ccc	cag/cag (20)	ccc/ccc	ggt/ggt	acc/acc (19)	atg/atg (22)	gcc/gct (9)	cca/cca	atg/atg	tcc/tcc	cag/gag (9)	atc/atc
		gtc/gtt (6)			caa/caa (1)			acc/gcc (3)		gct/gct (6)				cag/cag (6)	
					cag/caa (1)					gcc/gcc (7)				gag/gag (7)	
Aminokisliline	VV (22)	VV	GG	PP	QQ	PP	GG	TT (19); TA (3)	MM (22)	AA	PP	MM	SS	QE (9); QQ (6); EE (7)	II

Aminokisliline, ki jih kodirajo določeni kodoni, so označene s črno, kadar gre za divji tip (wt); odebeljeno oranžno, kadar gre za heterozigote v primeru nesinonimne substitucije; odebeljeno zeleno, kadar gre za homozigote v primeru nesinonimne substitucije. Z rdečo so označena mesta kodonov, kjer je prišlo do mutacij.