



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Poslijediplomski doktorski studij „Poljoprivredne znanosti“
Javna obrana teme doktorskog rada

16.12.2019.

Raznolikost *DRB* lokusa MHC gena skupine II u
divokoza (*Rupicapra spp.*)

STUDENT:

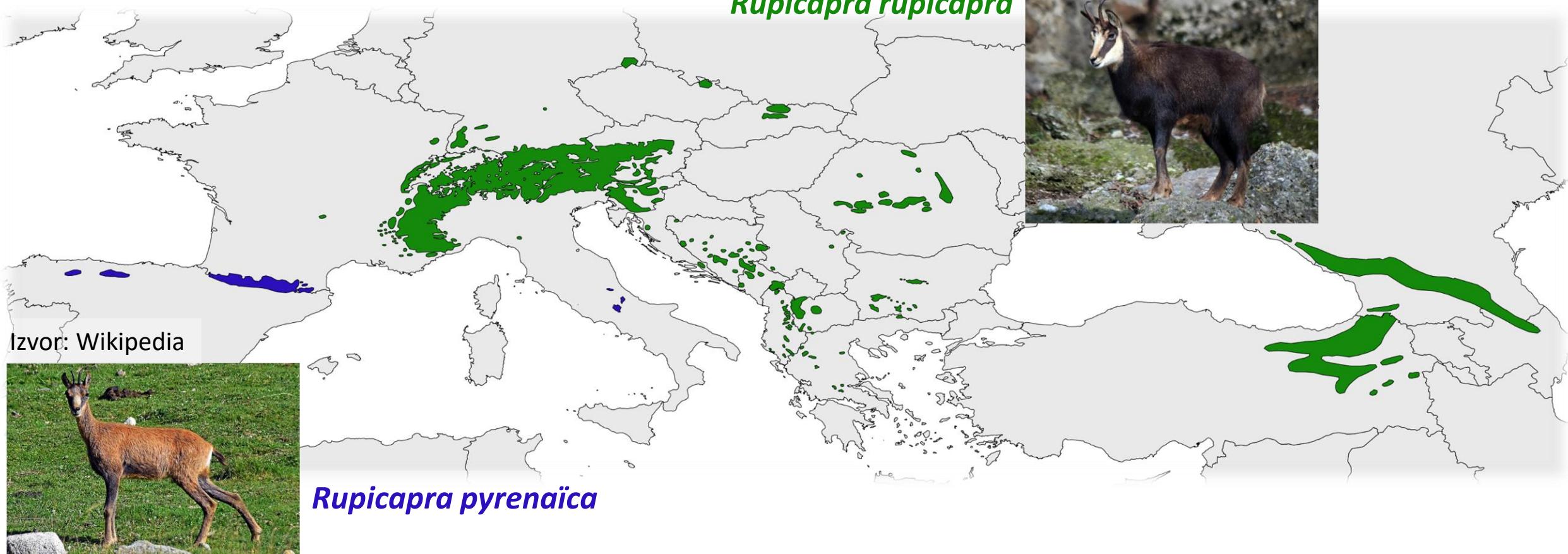
Sunčica Stipoljev

STUDIJSKI SAVJETNIK/CI:

Izv. prof. dr. sc. Nikica Šprem
Prof. dr. sc. Elena Bužan

Uvod

Divokoza, *Rupicapra* spp.



Izvor: Wikipedia



Rupicapra rupicapra

Izvor: Wikipedia



Rupicapra pyrenaica



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Obrana teme doktorskog rada

16.12.2019.

Uvod

Glavni sustav tkivne podudarnosti



R. pyrenaica

- *ornata*
- *pyrenaica*
- *parva*

R. rupicapra

- *balcanica*
- *rupicapra*
- *tatrica*
- *cartusiana*
- *carpathica*
- *asiatica*
- *caucasica*

Rodríguez et al. 2010. BMC Evolutionary biology



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Obrana teme doktorskog rada

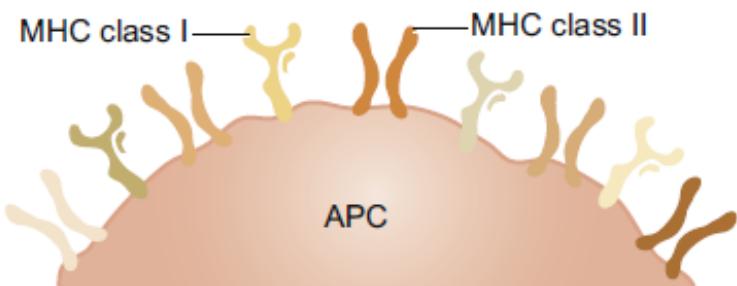
16.12.2019.

Uvod

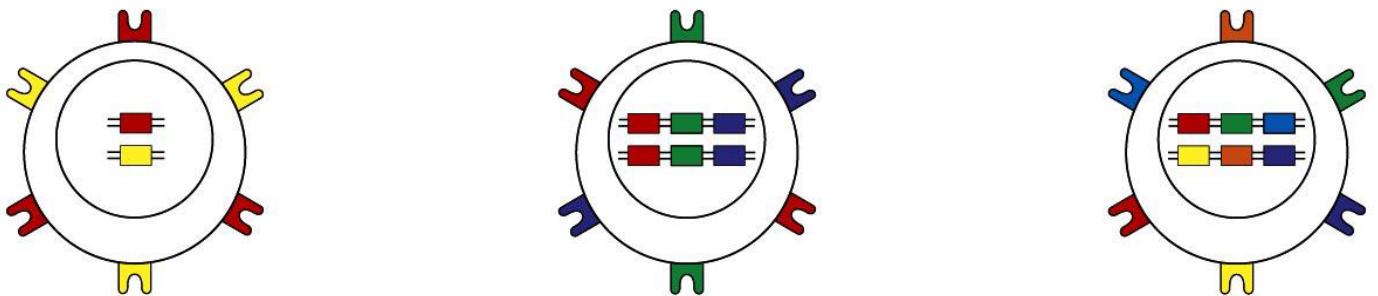
Glavni sustav tkivne podudarnosti

- adaptivni imuni odgovor
- koevolucija domaćina i patogena
- kodominantna ekspresija polimorfnih gena i poligenost
- visokopropusne metode sekvenciranja sljedeće generacije (NGS)

Izvor: Primer to the Immune Response 2ed., 2014



Izvor: Immunobiology, 7ed., 2008



Obrana teme doktorskog rada

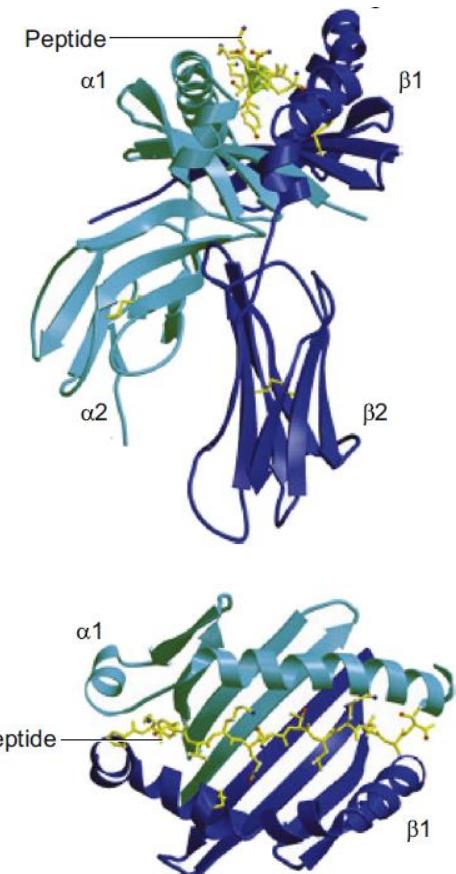
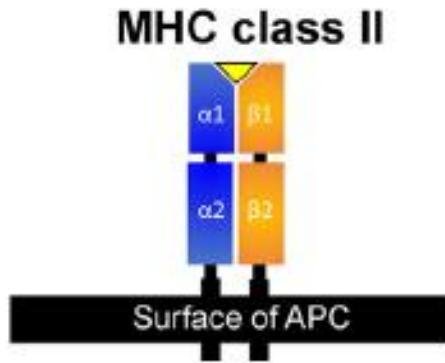
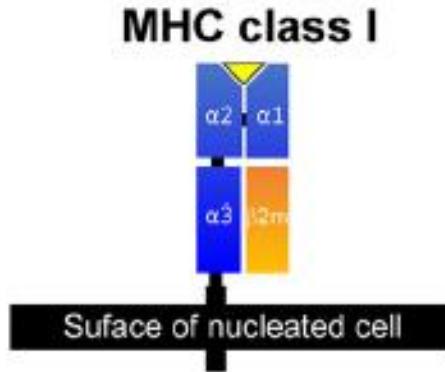
16.12.2019.

4

Uvod

Glavni sustav tkivne podudarnosti

- transmembranski glikoproteinski receptori
- egzon 2 *DRB* lokusa MHC gena skupine II
- balansirajuća selekcija



Izvor: Primer to the Immune Response 2ed., 2014

Wieczorek et al. 2017 Frontiers in Immunology



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Obrana teme doktorskog rada

16.12.2019.

Ciljevi i hipoteze

Ciljevi:

1. Istražiti genetičku raznolikost egzona 2 *DRB* lokusa skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u populacijama divokoza.
2. Usporediti raznolikost i učestalost alela egzona 2 *DRB* lokusa među populacijama divokoza.
3. Istražiti dupliciranost *DRB* lokusa unutar roda *Rupicapra*.

Hipoteze:

1. Postoji visoki stupanj nukleotidnog i aminokiselinskog polimorfizma egzona 2 *DRB* lokusa skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u populacijama divokoza.
2. Raznolikost i učestalost alela egzona 2 *DRB* lokusa u populaciji ovise o lokalnoj adaptaciji i o veličini i izoliranosti populacije, koji su pod utjecajem prirodne selekcije i neutralnih evolucijskih procesa (migracija i genetički drift).
3. Prisutna je genska duplikacija, dok se broj dupliciranih lokusa razlikuje među populacijama, pogotovo između populacija koje su prostorno izolirane.

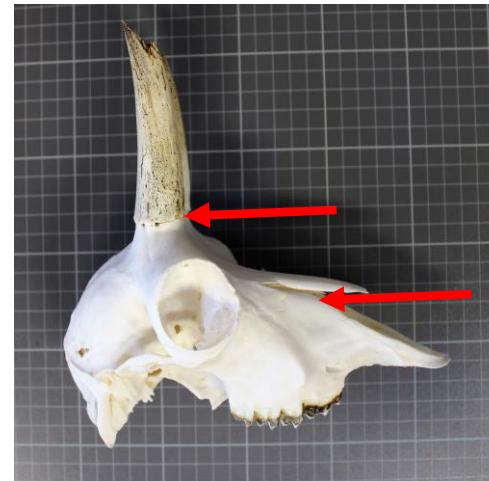


Materijal i metode istraživanja

Prikupljanje uzoraka

- uzorci mišićnog tkiva divokoze i uzorci kostiju
- prosječan broj uzorka po podvrsti: ~ 5

Izvor: Laboratorij za molekularnu ekologiju, Koper, Slovenija



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Obrana teme doktorskog rada

16.12.2019.

Materijal i metode istraživanja

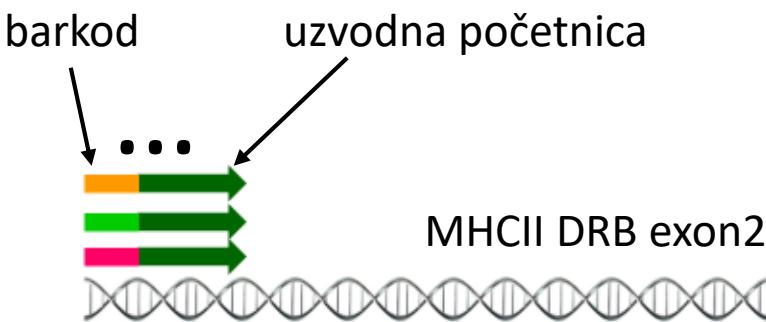
Laboratorijske analize

1. Izolacija DNA

Komercijalni kit

Demineralizacija uzorka kostiju
(EDTA)

Izvor: Peqlab Biotechnologie



2. PCR umnožavanje

nizvodna početnica

3. Sekvenciranje DNA

Izvor: ThermoFisher



**Ion Torrent S5,
Thermo Fisher**



Materijal i metode istraživanja

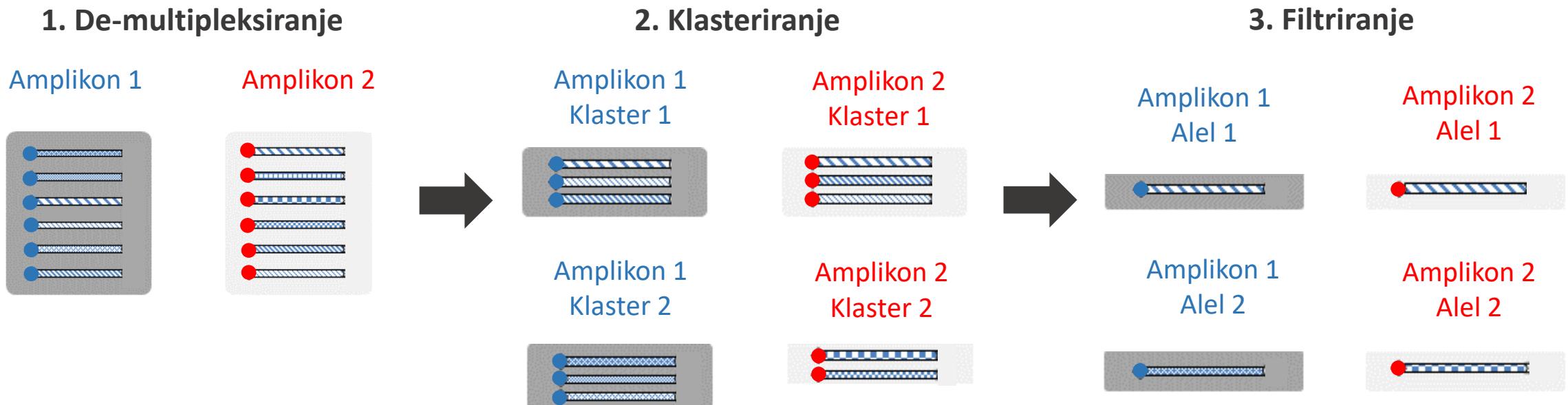
Statističke analize

Izvor: Snimka ekrana AmpliSAT web servera

Nije sigurno | evobiolab.biol.amu.edu.pl/amplisat/index.php

AmpliSAT - Amplicon Sequencing Analysis Tools

Procesiranje sirovih podataka (sekvenci)



Materijal i metode istraživanja

Statističke analize

3. Filtriranje

razlika:
1 – 2 pb
> 2 pb

SEQUENC	MD5	LENGTH	DEPTH	SAMPLES	MEAN_FR	MAX_FRE	MIN_FRE	DEPTH_AMPLICON		396	261	615	542	2351	1426	2563	586	507	776	692	1176	1295	2163	574	350		
								DEPTH_ALLELES		242	209	385	332	1985	1228	2244	500	369	640	604	952	1116	1942	454	219		
								COUNT_ALLELES	9	1	8	10	2	2	2	2	8	2	4	5	3	2	1	10			
TGGAGTA\66269a7e	260	1871	6	34,45	88,52	1,63	Ruru-DRB*04_AY368440.1			10	25																
TGGAGTA\d715ed17	260	12428	26	45,26	85,37	1,1	Ruru-DRB1			24		40	141	894													58
TGGAGTA\20728ad5	260	6773	18	31,24	81,15	3,27	Ruru-DRB*30			29		24	27	1091													1269
TGGAGTA\ffc0eb365	260	240	2	43,95	80,08	7,83	Rupy-DRB1*12_AY898754.1			31	209																
TGGAGTA\5061f787	260	762	3	41,77	79,09	21,98	Ruru-DRB*19_AY368455.1																			454	
TGGAGTA\5d5e48f0	260	3593	19	16,03	67,74	1,2	Ruru-DRB*17_AY368453.1			13		82	10													673	35
TGGAGTA\125f79fez	260	941	8	10,29	57,08	1,25	Ruru-DRB*18_AY368454.1					12	14														17
TGGAGTA\73284357	260	2709	11	23,16	52,17	1,24	NEW_ALLELE_1			14																	
TGGAGTA\681e0613	260	1839	9	15,56	51,23	1,66	Ruru-DRB*15_AY368451.1					181														51	
TGGAGTA\6a6245792	260	442	1	48,79	48,79	48,79	NEW_ALLELE_5																				
TGGAGTA\2a77d44c	260	1236	3	45,02	48,46	41,44	NEW_ALLELE_3																				
TGGAGTA\ad9bddc3	260	626	1	46	46	46	NEW_ALLELE_4																				
TGGAGTA\d141343e	260	520	3	16,07	45,37	1,25	NEW_ALLELE_2																				
TGGAGTA\c72af701	260	1613	5	24,18	41,4	3,71	Rupy-DRB1*11_AY898753.1					21														383	
TGGAGTA\aa4136f4	260	1032	4	24,83	35,14	1,48	Ruru-DRB*21_EU887490.1					8														13	
TGGAGTA\de5c691b	260	359	12	5,62	33,14	1,05	CeelHap113_EU573271.1			20		25														12	
TGGAGTA\fb8e855e	260	1776	11	16,53	29,03	1,25	Ruru-DRB*38_EU887507.1			5		62		414												16	
TGGAGTA\bca990f2	260	547	2	27,32	28,88	25,76	NEW_ALLELE_14			102																	
TGGAGTA\47efbb1e	260	118	3	7,78	20,12	1,01	NEW_ALLELE_15			4		12														102	
TGCTGTAT\18f5b3f2e	260	183	4	5,75	13,02	1,14	CEEL-DRB7																			66	
TGGAGTA\10cf197c	260	47	1	10,59	10,59	10,59	NEW_ALLELE_9																			15	
TGGAGCA\8ff238b9t	260	66	6	2,09	3,63	1,02	CeelHap115_EU573273.1					11														9	
TGGAGTA\6fcf56d7e	260	57	3	2,29	2,46	2,04	Ruru-DRB*39_EU887508.1																				
TGGAGTA\5ce86219	260	16	1	2,31	2,31	2,31	2,31																			16	
TGGAGTA\dca05c65	260	28	2	1,71	2,25	1,17	NEW_ALLELE_10																			9	
TGGAGTA\d606e3e8	260	9	1	1,78	1,78	1,78	MHC-00484																				
TGGAGTA\231e63ae	260	15	1	1,49	1,49	1,49	Ruru-DRB*06_AY368442.1																				
TGGAGTA\5522da8	260	22	1	1,47	1,47	1,47	MHC-00124																				
TGCTGTAT\afdb0854	260	19	1	1,47	1,47	1,47	MHC-00403																				
TGGAGTA\151d393e	260	16	1	1,36	1,36	1,36	MHC-00086																				
TGGAGCA\7cdd6057	260	10	2	1,16	1,18	1,14	MHC-00139																				
TGGAGTA\20b0763t	260	6	1	1,18	1,18	1,18	MHC-00687																				
TGGAGTA\1e022107	260	6	1	1,18	1,18	1,18	MHC-00701																				
TGGAGCA\97f9228b	260	6	1	1,18	1,18	1,18	MHC-00783																				
TGGAGTA\b24b5fb8	260	3	1	1,15	1,15	1,15	MHC-01198																				
TGGAGTA\be451b9c	260	3	1	1,15	1,15	1,15	MHC-00625																				
TGGAGTA\f05214c4	260	3	1	1,15	1,15	1,15	MHC-01407																				



Materijal i metode istraživanja

Statističke analize

Analiza i identifikacija alela



Izvor: Snimka ekrana genske baze GenBank (NCBI)

A screenshot of the NCBI BLAST search interface. At the top, it shows the NIH logo, U.S. National Library of Medicine, and NCBI National Center for Biotechnology Information. Below that is the BLAST logo. The main content area is titled "Basic Local Alignment Search Tool" and describes what BLAST does: finding regions of similarity between biological sequences by comparing nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculating statistical significance. It includes links to "Learn more" and a news banner about version 4 databases being updated. Below this, there's a section for "Web BLAST" with three options: "Nucleotide BLAST" (nucleotide to nucleotide), "blastx" (translated nucleotide to protein), and "tblastn" (protein to translated nucleotide). To the right is a "Protein BLAST" section (protein to protein). The bottom right corner shows the date "Fri, 27 Sep 2019 16:00:00 EST" and a link to "More BLAST news...".

Pretraživanje baze pomoću alata BLAST
(Basic Local Alignment Search Tool)



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Obrana teme doktorskog rada

16.12.2019.

11

Materijal i metode istraživanja

Statističke analize

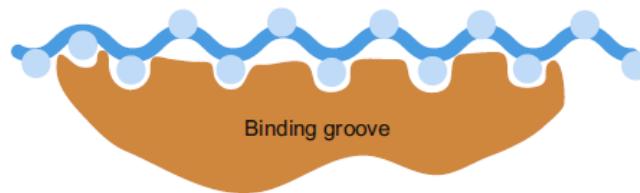
Evolucijske analize nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova

Kvantificiranje selekcije

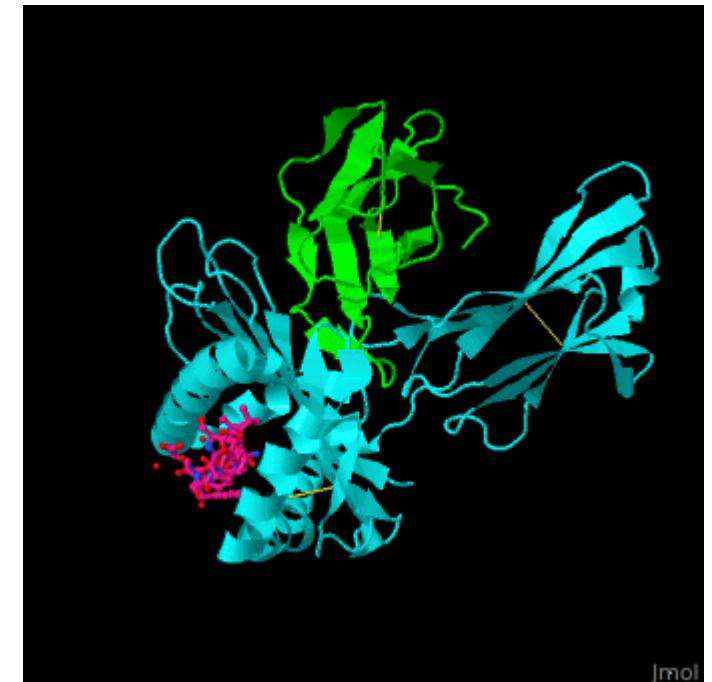
dN/dS test - standardna mjera selekcijskog pritiska

- ≈ 1 neutralna evolucija
- < 1 negativna selekcija
- > 1 pozitivna selekcija

Izvor: Primer to the Immune Response
(Second Edition), 2014



Izvor: Proteopedia



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Obrana teme doktorskog rada

16.12.2019.

12

Očekivani znanstveni doprinos predloženog istraživanja

Rezultati ovog istraživanja pridonijet će:

- boljem poznavanju raznolikosti i evolucije MHC gena u populacijama divokoza
 - procjeni fitnesa i imunosne kompetentnosti tih populacija
- definiranju uvjeta koji su važni za očuvanje i gospodarenje populacijama divokoza

Izvor: Divokoza na Biokovu, slikao Krešimir Kavčić



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Obrana teme doktorskog rada

16.12.2019.

13