



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΠΑΤΖΙΟΛΑΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DQA (ΕΞΟΝΙΟ 2)
ΤΗΣ ΚΛΑΣΗΣ II ΤΟΥ ΜΗC ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ *L.Europaeus* ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ
ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΑΥΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΟΥ
ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΑΦΕΤΙ ΛΑΓΟΥ**



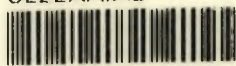
ΛΑΡΙΣΑ 2005-2006



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5002/1
Ημερ. Εισ.: 13-11-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΜΠΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087758

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο
Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας
του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
κατά το έτος 2005, υπό την επίβλεψη του κ. Ζ. Μαμούρη και
την καθοδήγηση του υποψήφιου διδάκτορα κ. Κ. Σταμάτη

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Μαμούρη Ζήση, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
(Επιβλέπων)

Μούτου Αικατερίνη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών

Ζίφα Αιμιλία, Λέκτορας Βιολογίας- Νευροβιολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
• <i>L. Europaëus</i>	6
• Σύνδρομο Ευρωπαϊκού καφετί λαγού (EBHS).....	9
• Μοριακοί δείκτες για την ανάλυση του πολυμορφισμού.....	13
• Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP).....	22
• Αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC).....	27
• Πολυμορφισμός στο μόριο MHC.....	36
• Γενετική πληθυσμών και MHC.....	40
• Σκοπός της εργασίας.....	41
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μέγιστο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) κωδικοποιεί μια ομάδα στενά συνδεδεμένων γονιδίων τα οποία παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών. Από μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα σε φυσικούς πληθυσμούς θηλαστικών έχει δειχθεί ότι το μόριο του MHC παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλά επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας τόσο όσον αφορά τον αριθμό όσο και την έκταση της ποικιλομορφίας μεταξύ των αλληλομόρφων (Klein 1986; Potts et al., 1993; Nei et al., 1991; Hedrick 1994). Σε προηγούμενη έρευνα στο γονίδιο DQA της τάξης II του MHC στο είδος *Lepus europeaus* (Mamuris, 2004) αποκαλύφθηκε χαμηλή γενετική ποικιλομορφία σε σύγκριση με άλλα είδη θηλαστικών. Στην παρούσα μελέτη εξετάζεται η γενετική ποικιλομορφία στο εξόνιο 2 του γονιδίου DQA της τάξης II του MHC. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μια πολύ σημαντική περιοχή στο μόριο του MHC που παίζει ρόλο στη σύνδεση του αντιγόνου με το αντίσωμα- πεπτίδιο. Χρησιμοποιήθηκαν πληθυσμοί του είδους *L. europeaus* από διαφορετικές περιοχές του ελληνικού χώρου και υποβλήθηκαν σε ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) μετά από ενίσχυση του εξονίου 2 του γονιδίου DQA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR και τη χρήση ειδικών μορίων εκκινητών (primer) από κουνέλια. Από την ανάλυση προέκυψε ότι το γονίδιο DQA παρουσιάζει αυξημένη γενετική ποικιλομορφία τόσο ενδοπληθυσμιακά, μέσα στην ίδια γεωγραφική περιοχή, όσο και διαπληθυσμιακά. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η ποικιλομορφία του μορίου δεν έχει επηρεαστεί από φαινόμενα στενωπού ή αναπαραγωγική ασυμβατότητα. Αντίθετα, υποστηρίζεται η άποψη ότι η ποικιλομορφία του μορίου πιθανώς σχετίζεται με την παρουσία παθογόνων ιών όπως είναι ο ιός που προκαλεί το σύνδρομο του ευρωπαϊκού καφετί λαγού και προτείνεται ως μηχανισμός προσαρμογής και άμυνας των παραπάνω οργανισμών ενάντια σε παθογόνα.

ABSTRACT

The major histocompatibility complex (MHC) encodes a group of closely linked genes that play a central role in the vertebrate's immune system. Through studies that have been done so far most natural mammalian populations possess high levels of MHC diversity both in terms of the number of alleles present and in the extent of sequence variation among alleles (Klein 1986; Potts and Wakeland 1990; Nei and Hughes 1991; Hedrick 1994). In a previous research in the MHC class II gene DQA in *L.Europeaus* (Mamuris, 2004) it was revealed low genetic variability compared to other mammalian species. In this investigation the genetic variability in the MHC class II gene DQA (exon 2) is examined. This gene encodes for the antigen binding site and is therefore considered as one of the most important parts of the MHC molecule. Population samples of *L.Europeaus* from different places in Greece were used and studied by using primers of the closely related kind of rabbits which were amplified for the exon 2 of DQA gene by PCR technique and single-strand conformation polymorphism. The research shown that the DQA exon 2 appears to be high polymorphic either between individuals within the same group in a certain geographic area nor between individuals among different groups. The results suggest that the genetic variability of the gene DQA is not affected by selection pressures, bottleneck effect or by mating system abnormalities. In contrast, high MHC polymorphism is interpreted as a consequence of viremia like the virus which causes the European brown hare Syndrome and it is a mimicry and defensive mechanism against parasites and diseases.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

L.europaesus

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Βασίλειο : Animalia
Φύλο : Chordata
Υπόφυλο : Vertabrata
Κλάση : Mammalia
Τάξη : Lagomorpha
Οικογένεια: Leporidae
Γένος : Lepus
Είδος : *Lepus europaesus*



L.Europaesus

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Η φυσική κατανομή του ευρωπαϊκού καφετί λαγού (*Lepus Europaesus* European brown hare) περιλαμβάνει τη Μεγάλη Βρετανία, τη Δυτική Ευρώπη και ανατολικά μέχρι τη Μέση Ανατολή και τη Κεντρική Ασία (Poli *et al.*, 1991). Από τον άνθρωπο στη συνέχεια έχει εισαχθεί και σε άλλες ηπείρους. Στον Καναδά, ο Ευρωπαϊκός καφετί λαγός έχει βρεθεί στο νότιο Οντάριο ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής έχει εντοπισθεί στις Βόρειο-Ανατολικές πολιτείες (Hall and Kelson, 1959). Τέλος, έχει εισαχθεί και σε περιοχές της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής όπως επίσης και στην Αυστραλία (Bonino and Montenegro, 1997). Στον ελλαδικό χώρο ο Ευρωπαϊκός καφετί λαγός εντοπίζεται σε όλη την ηπειρωτική Ελλάδα καθώς και σε ορισμένα νησιά.

ΚΑΤΟΙΚΙΑ

Ο Ευρωπαϊκός καφετί λαγός αφθονεί σε αγροτικές περιοχές και κυρίως σε εκτάσεις όπου καλλιεργούνται δημητριακά, ενώ σε μεγάλη κλίμακα επιβιώνει σε βοσκοτόπους, σε δασικές αλλά και σε θαμνώδεις εκτάσεις με υψόμετρο μέχρι 1500μ. (Mitchell-Jones, 1999). Επίσης, ενδημεί σε περιοχές με άφθονο γρασίδι όπως και σε περιοχές με αγριόχορτα (Peterson *et al.*, 1966).

ΦΥΣΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα του *Lepus Europaeus* είναι το μαύρο χρώμα στην επάνω επιφάνεια της ουράς του. Το τρίχωμά του ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο ζει διαφέρει από κιτρινωπό-καφέ έως γκριζο-καφέ και αλλάζει δύο φορές το χρόνο ενώ το χειμώνα είναι πιο κοκκινωπό. Γενικά, στο οπίσθιο τμήμα του το τρίχωμα είναι γκρι ενώ στο πρόσωπο και τα αυτιά του είναι πιο ανοιχτόχρωμο. Το συνολικό μήκος του κυμαίνεται από 600-750mm ενώ το μήκος της ουράς του από 72-110mm. Τα αυτιά του είναι αρκετά μακριά με μαύρα στίγματα, έχουν μήκος που κυμαίνεται από 94-102mm με μαύρες άκρες και είναι γκριζωπά στο εσωτερικό τους (Peterson, 1966; Hall and Kelson, 1959). Το βάρος των ενήλικων ατόμων του ευρωπαϊκού λαγού κυμαίνεται από 3-5Kg. Διακρίνεται από τα κουνέλια επειδή είναι μεγαλύτερος σε μέγεθος, ψηλότερος και μακροκανής και δεν έχει παρατηρηθεί φυλετικός διμορφισμός (Bansfield, 1974).

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Η κυριότερη περίοδος αναπαραγωγής του *L. Europaeus* είναι μεταξύ Ιανουαρίου-Φεβρουαρίου, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός ατόμων που κυοφορούν παρατηρείται τους μήνες Απρίλιο και Μάιο. Αυτό όμως δε σημαίνει ότι δεν υπάρχουν άτομα που αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Οι λαγοί αυτού του είδους φτάνουν τη σεξουαλική τους ωριμότητα 8 με 12 μήνες μετά τη γέννησή τους. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα θηλυκά άτομα λαγών *L. Europaeus* πριν αλλά και μετά την περίοδο της κυοφορίας δε μεταναστεύουν σε άλλο περιβάλλον σε σχέση με τα αρσενικά άτομα του είδους. Συνήθως τα άτομα του *L. Europaeus* επιβιώνουν περίπου από ένα ως δώδεκα χρόνια. Στην Ελβετία ύστερα από μελέτες και παρατηρήσεις που καταγράφηκαν από κυνηγετικούς συλλόγους, έχει αναφερθεί ότι ο μέγιστος χρόνος ζωής των ατόμων φτάνει περίπου τα 1,5 έτη και στην Πολωνία τα 12,5 έτη. Τα άτομα ηλικίας μέχρι ενός έτους είναι πολύ ευαίσθητα σε ασθένειες και πρέπει να τρέφονται συνεχώς προκειμένου να επιβιώνουν. ((Broekhuizen and Maaskamp, 1980).

ΗΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ο *L. Europaeus* είναι κυρίως μοναχικό ζώο, εκτός από την περίοδο της αναπαραγωγής του. Κύριο είδος της φυσικής διατροφής του είναι τα χόρτα και τα δημητριακά, οι βλαστοί, ταμανιτάρια, οι φλοιοί και τα κλαριά οπωροφόρων δένδρων (Banfield, 1974; William and Whitaker, 1943; Peterson, 1966). Περιπατά με αβίαστους βηματισμούς και τρέχει με αλματώδεις δρασκελιές. Είναι νυκτόβιος οργανισμός, με αρκετά ανεπτυγμένη αίσθηση της όρασης, της ακοής και της όσφρησης. Όταν αντιλαμβάνεται κινδύνους μπορεί να τρέξει αναπτύσσοντας μεγάλες ταχύτητες ενώ έχει αποδειχθεί ότι άτομα τα οποία έχουν τραυματιστεί από κυνηγούς μπορούν και επιβιώνουν. Τέλος, μπορούν ακόμη να βουτήξουν σε ρυάκια εάν χρειαστεί γιατί είναι δεινοί κολυμβητές (William and Whitaker; Banfield, 1974).

ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Σε μερικές περιοχές, όπως η Αργεντινή, η Αυστραλία και σε μικρότερη έκταση, η Βόρεια Αμερική, ο Ευρωπαϊκός καφετί λαγός λειτουργεί ως παρασιτικός οργανισμός. Το πρόβλημα έγκειται στο γεγονός της γρήγορης αναπαραγωγής του, με συνέπεια την καταστροφή της γεωργίας και ειδικότερα πολλών ποικιλιών μήλων (Bonino and Montenegro, 1997). Το είδος *L. Europaeus* ήταν ανέκαθεν θηρεύσιμο είδος. Το κρέας του είναι αρκετά νόστιμο και εξαιρετικής ποιότητας. Αν και το είδος δεν συγκαταλέγεται ανάμεσα στα είδη που απειλούνται με εξαφάνιση, μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα δείχνουν μία σημαντική πτώση των πληθυσμιακών μεγεθών του σε όλη την Ευρώπη. Επιπλέον, οι διάφοροι εμπλουτισμοί που πραγματοποιούνται σε Ευρωπαϊκή κλίμακα έχουν αλλοιώσει την πληθυσμιακή και γενετική σύσταση του είδους με αποτέλεσμα οι γονιδιακές δεξαμενές να βρίσκονται σε κίνδυνο. Μάλιστα, αλλαγή στη γενετική δομή των πληθυσμών του είδους έχει παρατηρηθεί και στην Ελλάδα. Αυτή η αύξηση της θνησιμότητας, κυρίως στην Ευρώπη, τις τελευταίες δεκαετίες οφείλεται σε μία ασθένεια. Τα συμπτώματα της ασθένειας περιλαμβάνουν οξεία ηπάτωση, εντερίτιδα, νέφρωση, γενικό ίκτερο, υπεραιμία, και αιμορραγία των εσωτερικών οργάνων. Η ασθένεια αυτή καλείται ως το σύνδρομο του Ευρωπαϊκού καφετί λαγού- European Brown Hare Syndrome (EBHS) (Poli et al., 1991).

ΤΟ ΓΕΝΟΣ LEPUS

Στο γένος *Lepus* ανήκουν και άλλα είδη μεταξύ των οποίων τα πιο γνωστά είναι τα είδη: *L. americanus*, *L. californicus*, *L. arcticus*, *L. timidus*, *L. Starcki*, *L. Victorie* και *L. capensis*.



Lepus americanus



Lepus californicus

ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΑΦΕΤΙ ΛΑΓΟΥ

Μεγάλη μείωση των τοπικών πληθυσμών ατόμων του Ευρωπαϊκού καφετί λαγού παρατηρήθηκε κυρίως από το 1960. Μερικοί από τους παράγοντες στους οποίους πιθανόν οφείλεται η δραστική πτώση του αριθμού των πληθυσμών των λαγών οφείλονται σε παρεμβάσεις του ανθρώπου πάνω στο οικοσύστημα. Έτσι, η αλλαγή του φυσικού περιβάλλοντος λόγω ανοικοδόμησης και οι κλιματολογικές αλλαγές που αυτή συνεπάγεται, η μείωση των αγροτικών και δασικών εκτάσεων (π.χ. πυρκαγιές δασών), η καταστροφή της τροφικής αλυσίδας και η επακόλουθη αύξηση πληθυσμών θηρευτών (π.χ. αλεπούδων που τρέφονται με λαγούς), η έλλειψη ποικιλίας καλλιεργειών που επηρεάζει τις διατροφικές τους συνήθειες, η λαθροθηρία και η παράνομη θανάτωση ατόμων λαγών από αγρότες προκειμένου να προστατεύσουν τις καλλιέργειές τους από πρόκληση ζημιών, συντελούν στην αυξημένη θνησιμότητα του είδους. Εκτός των παραπάνω όμως, ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που προκαλεί δραστική μείωση των πληθυσμών λαγού *L. Europaeus* με απρόβλεπτες μέχρι στιγμής συνέπειες για το είδος, φαίνεται ότι είναι η προσβολή των ατόμων από ασθένειες όπως είναι: η δυσανατομία στην αιμοσφαιρίνη *Lepore*, ασθένειες

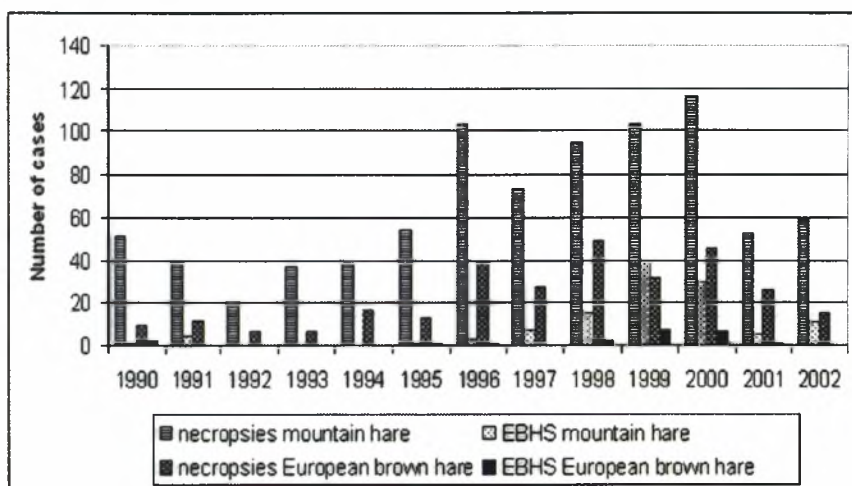


Εικόνα 1. Τοπική κατανομή του EBHS στη Φιλανδία. (Γκρι περιοχή: περιπτώσεις που ανιχνεύθηκαν από 1990-97, Απαλή γκρι περιοχή: νέα περιοχή εμφάνισης της ασθένειας από 1998-2002,

προκαλούμενες από μύκητες (π.χ. coccidiosis), από τριχομονάδες (π.χ. yersiniosis, trichongylosis), και νηματώδεις σκώληκες (π.χ. Graphidium strigosum) και επιδημικά σύνδρομα όπως το ονομαζόμενο Σύνδρομο του Ευρωπαϊκού καφετί λαγού (European brown hare Syndrome-EBHS).

Ειδικότερα, το 1976-77 το EBHS πρωτοεμφανίστηκε στην Αγγλία και συγκεκριμένα στην έρευνα που διεξήχθη σε 50 άτομα τα 23 βρέθηκαν θετικά (Duff et al.,

1994). Στις αρχές του 1980 στη Σουηδία παρατηρήθηκε σε άτομα του είδους *L. Europaesus* το EBHS (Gavier et al., 1991) και έκτοτε εμφανίζεται



Εικόνα 2: Ετήσιος αριθμός νεκροψιών και περιπτώσεων EBHS σε βουνίσιους και Ευρωπαϊκούς καφετί λαγούς στη Φιλανδία από το 1990 ως το 2002.

περιστασιακά και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Μία από αυτές είναι και η Φιλανδία,

όπου από το 1990 έως το 2002 σε 298 άτομα που εξετάστηκαν ανιχνεύθηκαν 20 περιπτώσεις του συνδρόμου (Syrjala et al., 2005). Και στη Σουηδία και στη Φιλανδία έχει βρεθεί ότι και τα δύο είδη *Lepus* που ζουν εκεί, ο *L. Europaesus* και ο *L. timidus*, προσβάλλονται από το σύνδρομο EBHS (Gavier et al., 1991). Η ίδια ασθένεια εντοπίστηκε σε πληθυσμούς στη Γερμανία το 1982, στην Πολωνία το 1993 ακόμη και στην Αργεντινή το 1998 (Frolich et al., 2003). Στην Ελλάδα το σύνδρομο του Ευρωπαϊκού καφετί λαγού αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1999 (Billinis et al., 2005). Το EBHS εκδηλώνεται τόσο σε ελεύθερους, άγριους λαγούς όσο και σε εκτρεφόμενα άτομα του είδους *Lepus* (*L. europaeus* και *L. timidus*), τα οποία χρησιμοποιούνται σε προγράμματα εμπλουτισμών. Η νόσος είναι καθαρά εποχιακή, εξαπλώνεται πιο συχνά κατά τους μήνες Οκτώβριο- Νοέμβριο- Δεκέμβριο κάθε έτους, ενώ παρουσιάζει πολλά κοινά, μακροσκοπικά και μικροσκοπικά, χαρακτηριστικά με την ιογενή αιμορραγική ασθένεια (Viral haemorrhagic disease- VHD) που προσβάλλει τα κουνέλια (*Oryctolagus cuniculus*) (Syrjala et al., 2005). Η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο αυτών ιών είναι δύσκολο να επιτευχθεί καθώς αλληλούχιση του γονιδιώματος των δύο ιών έδειξε

ομοιότητα σε ποσοστό 71%. Επίσης, αυτές οι πληροφορίες έδειξαν ότι οι ιοί EBHSV (European brown hare syndrome virus) και RHDV (Rabbit haemorrhagic disease virus) μοιράζονται ένα κοινό γενωμικό οργανισμό και επιβεβαιώνεται ότι αυτοί οι ιοί είναι δύο διακριτά μέλη της οικογένειας των καλυκοϊών (Gall et al., 1996). Πολλά κλινικά και παθολογικά συμπτώματα είναι παρόμοια και για τις δύο ασθένειες. Επομένως, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί αν πρόκειται για τον ίδιο ή διαφορετικά στελέχη του ίδιου ιού



Εικόνα 3: Εμφάνιση σκούρων κηλίδων σε ευαίσθητες περιοχές του σώματος (π.χ. στη μύτη του ζώου όπου λόγω ύπαρξης πολλών αιμοφόρων αγγείων παρατηρούνται αιμορραγίες).

ή για διαφορετικούς ιούς. Μεταξύ των άλλων και οι δύο ασθένειες εμφανίζονται με οξύτατη μορφή συνδρόμου που συνοδεύεται από νευρικά και αναπνευστικά συμπτώματα και ρινορραγίες. Σε όλες τις περιπτώσεις προκαλείται βαρύτατη ηπατική βλάβη και οι πολλαπλές αιμορραγίες οδηγούν συχνά σε θανατηφόρα σοκ μεταξύ 48 και 72 ωρών (Chasey et al., 1992). Η ηπατική αλλοίωση (από ερεθισμό των ηπατικών κυττάρων μέχρι και νέκρωση των ηπατικών κυττάρων) προκαλείται άμεσα από κυτταρολυτικούς και έμμεσα από μικροθρομβωτικούς παράγοντες. Πιθανές αιτίες του αιμορραγικού συνδρόμου αποτελούν η ενδοθηλιακή αλλοίωση και η πρωτογενής ή δευτερογενής δυσλειτουργία των παραγόντων πήξης. Τυπικά συμπτώματα που εκδηλώνονται σε άτομα που έχουν προσβληθεί από την ασθένεια αποτελούν: η νεκρωτική ηπατίτιδα, οι αιμορραγίες και το οίδημα των πνευμόνων και της τραχείας. Μακροσκοπικά, παρατηρούνται: άπηκτο αίμα στις σωματικές κοιλότητες, εκφύλιση και συμφόρηση του ήπατος, συμφόρηση του σπλήνα και των νεφρών (Marcato et al., 1991). Ο ιός μεταδίδεται μεταξύ των λαγών με στενή επαφή μέσω της στοματικής και ρινικής οδού. Η παρουσία του ιού έχει διαπιστωθεί σε όλες τις εκκρίσεις και απεκκρίσεις των μολυσμένων ζώων. Στη φύση, η μόλυνση δια της πεπτικής οδού είναι η πιο σημαντική (Frolich et al., 1996). Μέχρι στιγμής η διάγνωση του συνδρόμου γίνεται με ιστοπαθολογική εξέταση.

Οι προσπάθειες που έχουν γίνει ως τώρα για απομόνωση του ιού πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες ατόμων που έχουν προσβληθεί δεν έχουν δώσει αποτέλεσμα.

Ωστόσο, σήμερα ο εντοπισμός του ιού σε ομογενοποιημένο ιό με αιμοσυγκόλληση και σήμανση με ηλεκτρονική μικροσκοπία με τη μέθοδο της ELISA δίνει καλά αποτελέσματα (Gavier et al., 1991). Τελευταία, χρησιμοποιείται η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση του νουκλεϊκού οξέος του ιού ενώ ταυτόχρονα γίνονται μελέτες για τον καθορισμό των γενοτύπων και της γενετικής ποικιλομορφίας τόσο των ευρωπαϊκών όσο και των ελληνικών λαγών έτσι ώστε να καθοριστεί αν υπάρχει και σε ποιο βαθμό υφίσταται αλληλεπίδραση μεταξύ των απελευθερωμένων και ενδογενών ατόμων όσον αφορά την εκδήλωση του Συνδρόμου του Ευρωπαϊκού καφετί λαγού.

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ

Μέχρι σήμερα, η εξέταση της ποικιλομορφίας των ατόμων στηρίζονταν σε μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους, όπως πχ. το χρώμα του τριχώματος, το μέγεθος των αυτιών κ.α. Οποιαδήποτε όμως αλλαγή σε αυτά τα χαρακτηριστικά, λόγω αλλαγών στις περιβαλλοντικές συνθήκες, είτε λόγω μετανάστευσης των ατόμων σε διαφορετικό περιβάλλον, δεν σημαίνει κατά ανάγκη ότι τα άτομα διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη γενετική τους σύσταση. Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μοριακές τεχνικές (δείκτες) με τις οποίες επιτυγχάνεται η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας τόσο ενδοειδικά μεταξύ των πληθυσμών όσο και διαειδικά.

Μερικοί από τους μοριακούς δείκτες που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας είναι οι ακόλουθοι:

1. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ- ΑΛΛΟΕΝΖΥΜΑ

Το αλλοένζυμο είναι μια από τις δύο ή περισσότερες μορφές ενζύμου που κωδικοποιούνται από τον ίδιο γενετικό τόπο. Τα μόρια αυτά είναι δυνατόν να προσδιοριστούν σε πήκτωμα (gel) ηλεκτροφόρησης στο οποίο οι διαφορετικές μορφές του ίδιου ενζύμου διαφαίνονται από τη διαφορετική κινητικότητα που παρουσιάζουν στο πήκτωμα. Ο όρος αλλοένζυμο δεν πρέπει να συγχέεται με τον όρο ισοένζυμο, διότι τα ισοένζυμα είναι οι διάφορες μορφές ενός ενζύμου με τις ίδιες καταλυτικές ιδιότητες που κωδικοποιούνται από διαφορετικούς γενετικούς τόπους στο ίδιο γονιδίωμα. Επιπλέον, τα ισοένζυμα διαφέρουν στη δομή τους και σε ιδιότητες όπως είναι η εξειδίκευση με το υπόστρωμα (Markert et al., 1968). Τα αλλοένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό παραμέτρων όπως είναι ο βαθμός ετεροζυγωτίας μεταξύ πληθυσμών ενός είδους, ο αριθμός των αλληλομόρφων ανά γονιδιακό τόπο, ενώ είναι δυνατό να εντοπιστούν μοναδικά αλληλόμορφα για τους πληθυσμούς ενός είδους και να υπολογιστεί ο βαθμός της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών. Τα αλλοένζυμα έχουν ισχυρή επίδραση σε φαινοτυπικούς χαρακτήρες οι οποίοι είναι δυνατό να υπόκεινται συχνά σε επιλεκτικές πιέσεις και επειδή ακριβώς εξελίσσονται αρκετά αργά είναι δυνατό να μη διακρίνουν γενετικές διαφορές μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού ενός είδους

αλλά και μεταξύ ατόμων συγγενικών ειδών (Black et al, 1992; Cognato et al., 1995). Μάλιστα μελέτες που έχουν γίνει σε είδη *L.Europeaus* με ισοενζυμική ανάλυση δεν έδειξαν σημαντικές γενετικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα σε πληθυσμούς που προήλθαν από διαφορετικές περιοχές της Ευρώπης (Hartl et al., 1993, Suchentrunk et al., 2000).

2. ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΥΡΗΝΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

A) Random amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Η τεχνική RAPD, ξεπερνώντας τους περιορισμούς που προκύπτουν από την εξέταση της ποικιλομορφίας του γονιδιώματος με βάση τις μορφολογικές διαφορές των οργανισμών ή από την ισοενζυμική ανάλυση, δίνει τη δυνατότητα να ταυτοποιηθεί μεγαλύτερος αριθμός πολυμορφισμών σε ολόκληρο το γονιδίωμα ενός οργανισμού. Βασίζεται στην τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA με τη χρήση της τεχνικής PCR. Χρησιμοποιώντας μικρά εκκινητικά μόρια (συνήθως μεγέθους 10 βάσεων) και μετά από ενίσχυσή τους με τη βοήθεια της PCR είναι δυνατό να ελεγχθούν πολλές θέσεις στο γονιδίωμα ταυτόχρονα όσον αφορά την ύπαρξη συντηρημένων αλληλουχιών. Για κάθε εκκινητικό μόριο δυνητικά υπάρχουν δύο τουλάχιστον θέσεις οι οποίες εντοπίζονται αρκετά κοντά στο γονιδίωμα και οποίες επιτρέπουν την ενίσχυση του παρεμβαλλόμενου κλάσματος (primer). Συνεπώς για κάθε primer ένας αριθμός διαφορετικών θέσεων πάνω στο γονιδίωμα προσφέρεται για την ενίσχυσή τους. Έτσι, παράγεται ένας αριθμός κλασμάτων διαφορετικού μεγέθους ενισχυμένων τμημάτων. Τα κλάσματα αυτά στη συνέχεια αναλύονται σε πηκτώματα ηλεκτροφόρησης. Ο μεγάλος αριθμός των θέσεων και κατ' επέκταση των προϊόντων που προκύπτουν μετά την ενίσχυση υποδεικνύει ότι τα άτομα διαφέρουν όσον αφορά το μέγεθος των κλασμάτων των μορίων που έχουν ενισχυθεί γεγονός που δίνει τη δυνατότητα να διαχωριστούν δείγματα ατόμων διαφορετικού γονιδιώματος.

Η μέθοδος RAPD έχει εφαρμοστεί για τη μελέτη της γενωμικής ποικιλότητας και την αναγνώριση γενετικών διαφορών μεταξύ πληθυσμών του ίδιου είδους (Cognato et al., 1995), από τα βακτήρια (Welsch et al., 1990) και τους μύκητες (Lanfranco et al., 1995) έως τα φυτά (Mailer et al., 1994) και τα θηλαστικά πχ. σε ποντίκια (Welsch et al., 1991) αλλά και για τη μελέτη άγνωστων γονιδιωμάτων. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι η μέθοδος δεν δίνει πάντοτε αξιόπιστα αποτελέσματα διότι μικρές αλλαγές στη συγκέντρωση των εκκινητικών μορίων, στην

αλατότητα των διαλυμάτων, στη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων με την συμπληρωματική αλυσίδα στόχο του DNA μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά πρότυπα. Επιπλέον, υπάρχει πιθανότητα κλάσματα διαφορετικών τμημάτων του γενώματος να μεταναστεύουν μαζί, είτε διαφορετικά τμήματα του γενώματος να καλύπτουν την ίδια θέση πάνω στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης, με αποτέλεσμα η ανάλυση των γενετικών διαφορών να καθίσταται προβληματική.

B) Expressed sequence tags (ESTs)

Πρόκειται για μικρά τμήματα μιας ακολουθίας μιας κωδικοποιούσας ή μη πρωτεΐνης που έχει μεταγραφεί από μια αλληλουχία DNA και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση μεταγράφων ενός γονιδίου. Οι αλληλουχίες EST εκτός από την εύρεση γονιδίων χρησιμοποιούνται και για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους και δυνητικά για την εύρεση πολυμορφισμών. Αν και μια ακολουθία EST προκύπτει μετά από απευθείας αλληλούχιση κλωνοποιημένου mRNA, εντούτοις το κλάσμα της αλληλουχίας που προκύπτει δεν είναι αξιόπιστο όσον αφορά το μήκος αυτής της αλληλουχίας, ενώ ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που δυνητικά χρησιμοποιούνται για την εύρεση EST ακολουθιών δεν ξεπερνά τις 500-800 βάσεις.

Γ) Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs)

Οι γονιδιακές θέσεις που είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία των πρωτεϊνών, καλύπτουν μόνο το 3-4% της μάζας του ανθρώπινου γονιδιώματος. Στον άνθρωπο αλλά και σε άλλα θηλαστικά οι περισσότεροι πολυμορφισμοί συμβαίνουν στο υπόλοιπο 97-98% του γονιδιώματος, που δεν ευθύνεται για την παραγωγή πρωτεϊνών, αλλά σχετίζεται με δομικές και εσωτερικής λειτουργίας (αυτορρύθμιση) δραστηριότητες του γενετικού υλικού. Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί αφορούν σε αλλαγές μόνο ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs), στο αποκαλούμενο "junk" DNA ("ασήμαντης" αξίας DNA). Οι περιοχές αυτές του γενετικού υλικού όπου παρατηρούνται οι πολυμορφισμοί βρίσκονται είτε εντός των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, των εξονίων (exons), είτε μεταξύ των μη πρωτεΐνοπαραγωγών γονιδίων, των εσονίων (introns). Η ποικιλομορφία που εμφανίζεται στις συγκεκριμένες αυτές μη πρωτεΐνοπαραγωγές αλληλουχίες, δεν έχει ουσιώδη λειτουργική επίπτωση κατά τη διαδικασία μετάφρασης του μορίου του DNA. Οι περιοχές αυτές αποτελούνται από συχνά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ("DNA repeats"). Από αυτές προκύπτουν οι τυχαία

διαταγμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες μπορούν να εμφανίζονται από 10 έως και 100 σταθερά επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια (Variable Number Tandem Repeats- VNTRs) με μέγεθος 0.5-40kb και είναι μοναδικές και ιδιαίτερες για κάθε άτομο συντελώντας στην εξέταση του γενετικού αποτυπώματος (DNA fingerprinting) ενός οργανισμού. Το χαρακτηριστικό των αλληλουχιών αυτών είναι ότι επαναλαμβάνονται πολλές φορές και είναι τοποθετημένες η μια μετά την άλλη έτσι ώστε το τέλος της μιας αλληλουχίας να είναι η αρχή της επόμενης. Έτσι, προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων επειδή το συνολικό μέγεθος της επανάληψης μπορεί να διαφέρει από χρωμόσωμα σε χρωμόσωμα.

Ένα κλάσμα των αλληλουχιών αυτών στον άνθρωπο αποτελείται από απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Simple Tandem Repeats - STRs), τις περισσότερες φορές δινουκλεοτιδικής αρχής (πχ. CGCGCGCG), αλλά και τρι-, τετρανουκλεοτιδικής και οργανώνονται ως ζεύγος A,C στη μία έλικα και T,G στην άλλη έλικα. Τέτοιες αλληλουχίες της τάξης των 2-5 νουκλεοτιδικών τμημάτων είναι γνωστές ως μικροδορυφορικό DNA .

Δ) Polymerase Chain Reaction- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι ένα έξυπνο εργαλείο της μοριακής βιολογίας και ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα μόλις το 1984 από τον βιοχημικό Kary Mullis και χρησιμοποιείται σήμερα συχνά και σε συνδυασμό με άλλες μοριακές τεχνικές ανάλυσης όπως τα ένζυμα περιορισμού και η ανάλυση Southern blotting. Είναι τόσο ευαίσθητη τεχνική, γρήγορη, εύκολη και αυτοματοποιημένη ώστε ένα απλό μόριο DNA μπορεί να πολλαπλασιαστεί ενζυμικά *in vitro* με την βοήθεια ειδικών πολυμερασών και να ενισχυθεί. Πολυμεράσες είναι ένζυμα τα οποία κάτω από κατάλληλες συνθήκες pH και θερμοκρασίας επιμηκύνουν αλυσίδες νουκλεοτιδίων. Τα παραπάνω ένζυμα απομονώνονται σχετικά εύκολα κυρίως από βακτήρια. Η πιο συνήθης DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις PCR σήμερα, είναι η Taq πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και η οποία δρα σε αρκετά υψηλές για ένζυμα θερμοκρασίες, δρα ακόμη και στους 100° C . Η ιδιότητα αυτή συμβάλλει στην άμεση δράση του ενζύμου πάνω στα μόρια DNA τα οποία στις συνθήκες των 100° C έχουν αποδιαταχθεί και μπορεί η Taq να επιμηκύνει τις πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Έτσι γονίδια που απαντώνται ακόμη και ως ένα αντίγραφο μόνο μπορούν

να εντοπιστούν από ένα πλήθος αλληλουχιών να ενισχυθούν και να απεικονιστούν στη συνέχεια σε ζώνες με τη χρήση πηκτών αγαρόζης.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση πολύ μικρής ποσότητας γενετικού υλικού που χρησιμοποιείται ως μόριο-στόχος για την σύνθεση πανομοιότυπων μορίων (Mullis et al., 1989). Η σύνθεση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ειδικών μορίων εκκινητών (primers). Τα πιο πάνω μόρια είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε συνήθεις θερμοκρασίες, διότι αποτελούνται από μονόκλωνη αλυσίδα συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων και έχουν μέγεθος βάσεων το οποίο δεν ξεπερνά τις 15-20bp. Μετά την προσκόλληση των εκκινητικών μορίων (primers) στα αποδιαταγμένα μόρια DNA, η επιμήκυνση των αλυσίδων γίνεται με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης, ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για την Taq καθώς και διαλύματος MgCl₂ και διαλύματος dNTPs.

E) DNA Sequencing- Απευθείας Αλληλούχισης DNA

Η τεχνική DNA sequencing χρησιμοποιεί αναλυτικές συσκευές και με τη βοήθεια κατάλληλα διαμορφωμένων και αυτοματοποιημένων προγραμμάτων επιτυγχάνεται η ανεύρεση πολυμορφισμών σε συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος, ενώ υπάρχει πιθανότητα εντοπισμού και μη γνωστών πολυμορφισμών.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι τα εξής:

1. Αρκετές περιοχές του γονιδιώματος είναι δύσκολο να αλληλουχηθούν διότι περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό σε βάσεις G/C.
2. Απαιτείται αλληλούχιση και προς τις δύο κατευθύνσεις του συγκεκριμένου τμήματος του γονιδίου που εξετάζεται προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, ειδικότερα όταν το μήκος του εξεταζόμενου τμήματος είναι σχετικά μεγάλο.
3. Είναι αρκετά δαπανηρή μέθοδος για τη μελέτη απλών πολυμορφισμών.
4. Είναι δύσκολο να αναλυθούν και να διαχωριστούν τα ετερόζυγα άτομα.

ΣΤ) Ένζυμα περιορισμού - Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

α) Southern blotting RFLP

Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση ενζύμων τα οποία κόβουν το γονιδίωμα σε συγκεκριμένες θέσεις. Για τα τμήματα που προκύπτουν μετά την κοπή

χρησιμοποιούνται τμήματα ανιχνευτών (probes) οι οποίοι προσκολλώνται ταυτόχρονα σε πολλές διαφορετικές θέσεις και υβριδοποιούνται με το τμήμα του γονιδίου που αναλύεται για την εύρεση πολυμορφισμών (minisatellites). Η μέθοδος δίνει αρκετά καλά αποτελέσματα καθώς διαχωρίζονται πολύ εύκολα τα ετερόζυγα άτομα. Βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι απαιτεί μεγάλες σχετικά ποσότητες γενωμικού DNA περίπου 5 μικρογραμμάρια, η υβριδοποίηση των probes με το κλάσμα του γενωμικού DNA είναι αρκετά επίπονη εργαστηριακή διαδικασία. Παρόλο το γεγονός ότι ανιχνεύεται ο πολυμορφισμός του εξεταζόμενου τμήματος του γονιδίου, δεν προσδιορίζεται η ακριβής θέση που εντοπίζεται ο πολυμορφισμός, ενώ για ανιχνευθεί πραγματικά πολυμορφισμός θα πρέπει να υπάρχει δημιουργία ή απώλεια μιας θέσης κοπής του περιοριστικού ενζύμου που χρησιμοποιείται σε σύγκριση με ήδη γνωστή θέση κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο.

β) PCR-RFLP

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλό κόστος είναι γρήγορη και δίνει καλά αποτελέσματα διαχωρίζοντας τους ομοζυγώτες από τα ετερόζυγα άτομα. Η PCR-RFLP με τροποποιημένους primers μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό πολυμορφισμών που δεν δημιουργούν νέες ή προκαλούν απώλεια θέσεων κοπής για τα χρησιμοποιούμενα περιοριστικά ένζυμα.

Z) Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Η τεχνική αυτή αποτελεί πιο εξελιγμένη μορφή της τεχνικής RAPD και τυπικά μπορεί να ανιχνεύσει μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφισμών σε κάθε αντίδραση σε σύγκριση με την ανάλυση RAPD και RFLP. Βασίζεται στη ταυτόχρονη κοπή γενωμικού DNA με τη χρήση δύο περιοριστικών ενζύμων ένα εκ των οποίων κόβει πιο συχνά το γενωμικό υλικό (MseI, με αλληλουχία αναγνώρισης θέσης κοπής μήκους 4bp) και το άλλο πιο σπάνια (EcoRI, με αλληλουχία αναγνώρισης θέσης κοπής 6bp). Τα προϊόντα-κλάσματα που προκύπτουν μετά την κοπή συνδέονται με ειδικά μόρια προσαρμογής και τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε πήκτωμα μετά από ηλεκτροφόρηση. Η ύπαρξη πολυμορφισμού ανιχνεύεται με την εμφάνιση στο πήκτωμα διαφορετικών ζωνώσεων. Επειδή, όμως ο αριθμός των ζωνών που εμφανίζονται στο πήκτωμα ταυτόχρονα είναι μεγάλος τα αποτελέσματα που λαμβάνονται συνήθως δεν είναι αξιόπιστα διότι μια ζώνη δεν μπορεί να διαχωρίσει τα διαφορετικά αλληλόμορφα που προέρχονται από τον ίδιο γενετικό τόπο.

H) Allelic-Specific Oligonucleotide Hybridization (ASO)

Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου το οποίο υβριδοποιείται με το μόριο-στόχο του DNA. Η ακινητοποίηση επιτυγχάνεται πάνω σε ειδική μεμβράνη και ανάλογα με τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται διαφορετικός βαθμός υβριδοποίησης. Το μόριο στόχος συνήθως είναι ενισχυμένο προϊόν της PCR και απαραίτητη προϋπόθεση για την λήψη αποτελεσμάτων με την παραπάνω μέθοδο είναι η χρήση ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία ταιριάζουν απόλυτα και υβριδοποιούνται με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τόσο του άγριου όσο και του μεταλλαγμένου (mutant) τύπου. Η μέθοδος χρησιμοποιείται με πολύ καλά αποτελέσματα καθώς κάνει πολύ καλό διαχωρισμό των ετεροζυγωτικών ατόμων, ωστόσο παρουσιάζει τα εξής μειονεκτήματα:

α) απαιτεί πολύ καλή γνώση της ύπαρξης πολυμορφισμού στο συγκεκριμένο τμήμα του μορίου- στόχος, ενώ σε κάθε υβριδοποίηση εντοπίζεται η ύπαρξη ενός και μόνο πολυμορφισμού και

β) για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων απαιτείται η χρήση ανιχνευτών οι οποίοι συνήθως είναι ραδιενεργοί.

Θ) Allelic-Specific PCR (Amplification Refractory Mutation System –ARMS)

Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι η προέκταση του 3'- άκρου με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης δεν είναι εφικτή όταν το ολιγονουκλεοτίδιο που χρησιμοποιείται δεν υβριδοποιείται απόλυτα με το πρότυπο DNA (template).

Αν και η μέθοδος είναι σχετικά απλή, δίνει γρήγορα αποτελέσματα και μπορεί να αναλύει ταυτόχρονα πολλά δείγματα απαιτεί συνεχώς βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR, δεν ανιχνεύει όλους τους πολυμορφισμούς και δεν δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα διότι σύνθετα δείγματα DNA μπορεί να δώσουν παραπλανητικά αποτελέσματα.

I) DNA chips/ microarrays

Είναι η αντίστροφη ακριβώς μέθοδος της ASO. Διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια ακινητοποιούνται με μεγάλη πυκνότητα πάνω σε μια γυάλινη ή από νάιλον επιφάνεια. Μερικά ολιγονουκλεοτίδια είναι συμπληρωματικά των αλληλουχιών άγριου τύπου, ενώ άλλα είναι συμπληρωματικά των μεταλλαγμένων

αλληλουχιών. Κάτω από συνθήκες υβριδοποίησης ραδιενεργά σημασμένο δείγμα DNA ξεπλένεται πάνω στο chip. Οι κηλίδες που εμφανίζονται αντιστοιχούν σε ολιγονουκλεοτίδιο, ραδιενεργά σημασμένο, το οποίο είναι συμπληρωματικό με την αλληλουχία άγριου τύπου καθώς υβριδοποιείται καλύτερα σε σχέση με την αλληλουχία μεταλλαγμένου DNA. Παρόμοια, όταν το ραδιενεργά σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο είναι μεταλλαγμένο υβριδοποιείται καλύτερα με μεταλλαγμένη αλληλουχία σε σχέση με αλληλουχία άγριου τύπου.

Η παραπάνω μέθοδος δίνει τη δυνατότητα να εντοπιστεί η ποικιλομορφία ολόκληρου του γονιδιώματος ενός οργανισμού και να αποκαλυφθούν νέοι πολυμορφισμοί. Ωστόσο, ο αριθμός των δειγμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανεύρεση όσο το δυνατόν περισσότερων πολυμορφισμών είναι μικρός. Στόχος της ανάλυσης είναι η ανίχνευση κηλίδων πάνω σε ειδικές πλάκες όπου τοποθετούνται τα δείγματα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των κηλίδων που εντοπίζονται τόσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός πολυμορφισμού του γονιδιώματος που εξετάζεται. Τα αποτελέσματα δίνονται άμεσα καθώς οι πληροφορίες των DNA/chips διαβάζονται και επεξεργάζονται από ειδικά αυτοματοποιημένα προγράμματα σε Η/Υ τα οποία αυξάνουν το κόστος της μεθόδου.

K) Denaturing High Pressure Liquid Chromatography (DHPLC)

Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι τα ετεροδιμερή μόρια DNA εκλούνται πιο γρήγορα από στήλη HPLC σε σύγκριση με ομοδιμερή μόρια. Αρχικά το δείγμα DNA θερμαίνεται, στη συνέχεια ψύχεται με το μόριο DNA αναφοράς σχηματίζοντας ετεροδιμερή καθώς και ομοδιμερή μόρια ανάλογα με το αν το δείγμα DNA διαφέρει ή όχι από το μόριο DNA αναφοράς. Όταν ο ανάμικτος πληθυσμός των μορίων DNA αναλύεται σε στήλη HPLC κάτω από θερμοκρασίες που μερικώς αποδιατάσσουν τα μόρια DNA, τότε τα ετεροδιμερή μόρια DNA εκλούνται από τη στήλη πιο γρήγορα σε σχέση με τα ομοδιμερή επειδή ακριβώς τα ετεροδιμερή αποδιατάσσονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Η μέθοδος χρησιμοποιείται όχι μόνο για τον καθορισμό της ετεροζυγωτίας που παρατηρείται σε ένα μόνο άτομο αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ταυτόχρονα σε πολλαπλά δείγματα για την ταυτοποίηση της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων. Με την παραπάνω μέθοδο είναι δυνατή η ανίχνευση πολυμορφισμών μορίων DNA μήκους μέχρι 700bp, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω αλληλούχιση του μορίου-στόχου ώστε να

προσδιοριστεί η φύση της μετάλλαξης που εντοπίστηκε. Αν και η μέθοδος είναι αυτοματοποιημένη και τα αποτελέσματα μπορούν να λαμβάνονται αρκετά γρήγορα, απαιτείται ειδικός εργαστηριακός εξοπλισμός που αυξάνει το κόστος χρήσης της.

Λ) TAQ-MAN

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε 3 αρχές:

- α) όταν η Taq πολυμεράση δημιουργήσει μια συμπληρωματική αλυσίδα εκτοπίζει οποιαδήποτε προϋπάρχουσα συμπληρωματική αλληλουχία ξεκινώντας με κατεύθυνση από το 5'-άκρο,
- β) εάν ένα ολιγονουκλεοτίδιο φέρει προσδεδεμένα ταυτόχρονα μια φθορίζουσα χρωστική (normal) (R) και μια χρωστική Quencher (Q), η φθορίζουσα χρωστική θα φθορίζει ασθενώς λόγω ύπαρξης της χρωστικής Q και
- γ) ολιγονουκλεοτίδια που ταιριάζουν απόλυτα με το μόριο-στόχο DNA υβριδίζονται τέλεια σε σχέση με ολιγονουκλεοτίδια που δεν παρουσιάζουν ομολογία.

Μετά τον πολυμερισμό και την αντίδραση Taq-Man PCR όταν και οι δύο χρωστικές είναι προσκολλημένες στον ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή η φθορίζουσα εκπομπή τους καταστέλλεται. Κατά τη διάρκεια των κύκλων επέκτασης της PCR η Taq DNA πολυμεράση εκτοπίζει προϋπάρχοντα συμπληρωματικά μόρια και διαχωρίζει σταδιακά την χρωστική αναφοράς από τον ανιχνευτή. Έτσι, η χρωστική (R) αναφοράς εκπέμπει φθορισμό ο οποίος ανιχνεύεται εύκολα. Συνήθως χρησιμοποιούνται δύο ανιχνευτές. Ένας που φέρει μπλε χρωστική και φέρει αυτούσια τη ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία και ένας που φέρει πράσινη χρωστική και αντιστοιχεί σε ολιγονουκλεοτίδιο μεταλλαγμένου τύπου.

M) Oligonucleotide Ligation assay (OLA)

Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η επανασύνδεση των αποδιαταγμένων αλυσίδων από ένα δίκλωνο τμήμα DNA πραγματοποιείται μόνο όταν όλες οι βάσεις της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος είναι απόλυτα συμπληρωματικές. Η μέθοδος απαιτεί 3 ανιχνευτές. Έναν κοινό ανιχνευτή που φέρει μια φθορίζουσα χρωστική και υβριδίζεται στην αλυσίδα DNA αμέσως μετά από τη θέση που εντοπίζεται ο πολυμορφισμός και δύο διακριτούς ανιχνευτές που διαφέρουν σε μήκος και στην αλληλουχία του 3'-άκρου εκ των οποίων ο ένας είναι συμπληρωματικός με την αλληλουχία άγριου τύπου και ο δεύτερος με την μεταλλαγμένη αλληλουχία. Όταν το δείγμα DNA είναι άγριου τύπου τότε ο

ανιχνευτής άγριου τύπου προσδένεται σε αυτό. Όταν το δείγμα DNA είναι μεταλλαγμένο τότε προσδένεται σε αυτό ο μεταλλαγμένος ανιχνευτής ενώ όταν το δείγμα είναι φορέας του μεταλλαγμένου τύπου τότε παρατηρείται πρόσδεση και των δύο ανιχνευτών. Μετά από την αντίδραση επανασύνδεσης τα προϊόντα μετουσιώνονται και κλασματώνονται με βάση το μέγεθός τους σε gel υψηλού διαχωρισμού. Αν και η μέθοδος είναι απλή στην εφαρμογή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα εντούτοις τα αποτελέσματα μπορεί να είναι παραπλανητικά όταν χρησιμοποιούνται σύνθετα δείγματα. Επίσης απαιτείται πολύ καλή γνώση του πολυμορφισμού που παρουσιάζουν τα εξεταζόμενα δείγματα ενώ τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια έχουν εξαιρετικά υψηλό κόστος.

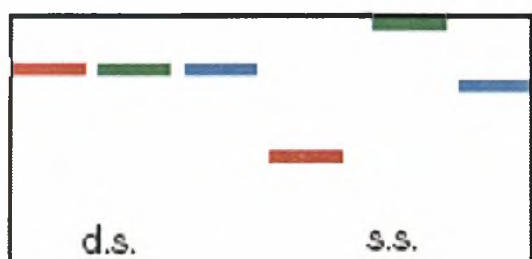
N) Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Στην παρούσα εργασία ως μοριακή μέθοδος ανάλυσης του πολυμορφισμού του γονιδίου DQA και συγκεκριμένα του εξονίου 2, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση του πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας ενώ για την λήψη και ανάγνωση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται κατάλληλα αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης τα οποία υπόκεινται σε ειδική χρώση. Αυτή περιλαμβάνει είτε προσθήκη ραδιενεργών είτε χρώση με νιτρικό άργυρο. Συνήθως και για μεγαλύτερη ασφάλεια χρησιμοποιείται η χρώση νιτρικού αργύρου. Είναι γνωστό ότι η κινητικότητα των δίκλωνων μορίων DNA σε πήκτωμα εξαρτάται από το μήκος και το μέγεθος αλλά είναι σχετικά ανεξάρτητη από το είδος της νουκλεοτιδικής αλυσίδας. Η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων, ωστόσο επηρεάζεται αξιοσημείωτα από πολύ μικρές αλλαγές της αλληλουχίας, πιθανώς ακόμη και από μία αλλαγή σε σύνολο αρκετών εκατοντάδων βάσεων. Οι μικρές αλλαγές είναι αξιοσημείωτες εξαιτίας της ασταθούς φύσης του μονόκλωνου μορίου DNA. Αυτό συμβαίνει διότι απουσία της συμπληρωματικής αλυσίδας, το μονόκλωνο τμήμα μπορεί να υποστεί διμερισμό με τμήμα της ίδιας αλληλουχίας, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο βρόγχους και αναδιπλώσεις οι οποίες δίνουν στη μονόκλωνη αλυσίδα μοναδική τριτοταγή δομή. Η μέθοδος SSCP εκμεταλλεύεται την παραπάνω ιδιότητα των μονόκλωνων μορίων DNA και περιλαμβάνει ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων αλυσίδων νουκλεϊνικών οξέων. Βασίζεται σε πολύ μικρές διαφορές της αλληλουχίας (ακόμη και διαφορά σε μία βάση), ιδιότητα η οποία τροποποιεί τη δευτεροταγή δομή και επηρεάζει την κινητικότητα των μορίων όταν

διαπερνούν μέσα από πήκτωμα κάτω από την επίδραση ηλεκτρικής τάσης (Melcher, 2000).



Εικόνα 4: Διαφορά κινητικότητας που παρουσιάζουν τα δίκλιωνα μόρια DNA ίδιου μήκους (d.s.) από τα αντίστοιχα μονόκλιωνα μόρια ίδιας αλληλουχίας DNA (s.s).

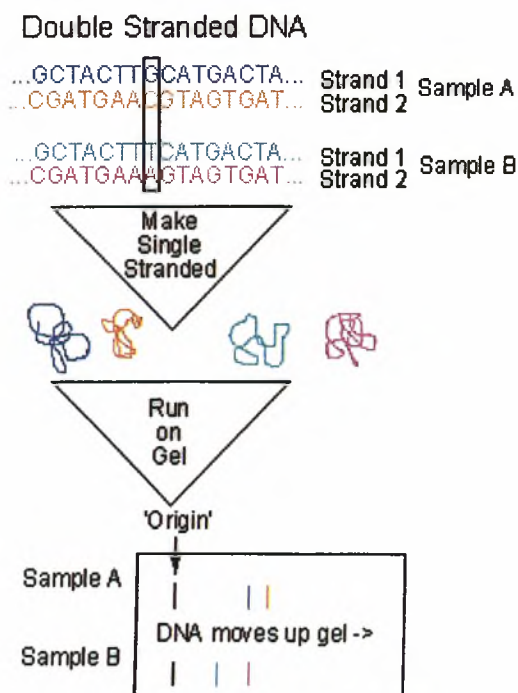


ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ SSCP:

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει:

- διάσπαση του γενομικού DNA
- μετουσίωση των μορίων DNA με βασικό (αλκαλικό) διάλυμα
- ηλεκτροφόρηση σε ουδέτερο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
- μεταφορά σε νάιλον μεμβράνη
- υβριδισμό με μόρια ανιχνευτές (κλάσματα DNA συμπληρωματικά ή κλάσματα RNA που φέρουν ραδιενεργά μόρια τα οποία φθορίζουν κάτω από συνθήκες UV) είτε χρώση με κατάλληλες χρωστικές πχ. AgNO₃ (Orita et al., 1989).

Η όλη διαδικασία απαιτεί χαμηλή θερμοκρασία και κατάλληλες αποδιατακτικές συνθήκες. Οι αλυσίδες DNA αποκτούν τέτοια δομή ώστε μεταναστεύουν σύμφωνα με το σχήμα τους. Αλυσίδες διαφορετικών αλληλουχιών



Εικόνα 5: Διαδικασία SSCP http://www.amonline.net.au/evolutionary_biology/images/sscp.gif

γενικά δεν έχουν το ίδιο σχήμα. Συνεπώς έχουν διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η διαφορά στη κινητικότητα των μορίων οφείλεται στην τριτοταγή παρά την δευτεροταγή τους μορφή. Η ευαισθησία της τεχνικής έγκειται γενικά στην αναλογία μεγέθους των κλασμάτων ssDNA. ssDNA αλυσίδες έως 750bp αναλύονται επιτυχώς. Τροποποιώντας συνθήκες όπως αλλαγή της θερμοκρασίας, σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) και του πηκτώματος καθώς και συνθήκες που τρέχουν τα δείγματα μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για όλες τις διαφορές που προκύπτουν μεταξύ των δειγμάτων. Τρία χαρακτηριστικά που μπορούν να επηρεάσουν τις συνθήκες SSCP ανάλυσης είναι:

1. Το μήκος του πηκτώματος (μικρά σε διαστάσεις πηκτώματα δίνουν ευθύγραμμες ζώνες που πλησιάζουν τις πραγματικές διαστάσεις των μορίων και η μετακίνηση τους είναι πιο γρήγορη)

2. Το μέγεθος του προϊόντος PCR (η σχέση μοριακού βάρους με την απόσταση μετακίνησης δεν είναι ακριβής αλλά υπάρχει η θεωρία ότι μικρότερα προϊόντα PCR τρέχουν πιο γρήγορα). Σε βέλτιστες συνθήκες το μέγεθος των κλασμάτων DNA θα πρέπει να κυμαίνεται από 150-300 bp ενώ η SSCP ανάλυση για RNA επιτρέπει μεγαλύτερο μέγεθος κλασμάτων (Wagner, 2002).

3. Το δυναμικό εφαρμογής (παίζει ρόλο στο σχηματισμό πιο γραμμικών ζωνών).

4. Η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Για καλύτερα αποτελέσματα η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πρέπει να συμβαίνει κάτω από σταθερή θερμοκρασία και τέλος,

5. Έχει βρεθεί ότι η ευαισθησία της μεθόδου SSCP εξαρτάται και από τις συνθήκες pH. Τα δίκλινα μόρια DNA συνήθως αποδιατάσσονται μετά από έκθεσή τους σε βασικό περιβάλλον και επομένως σε υψηλό pH. Οι Kukita et al., 1997 απέδειξαν ότι με την προσθήκη γλυκερόλης στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ελαττώνεται η τιμή του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης που καθορίζεται από την παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της SSCP ανάλυσης και να λαμβάνονται πιο ευδιάκριτα αποτελέσματα.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ SSCP

Η μέθοδος είναι απλή, φθηνή, ευαίσθητη και ικανή να προσδιορίζει εάν κλάσματα DNA είναι πανομοιότυπα σε αλληλουχία ή όχι χρησιμοποιώντας μία μόνο αντίδραση PCR (Sunpuks et al., 2000), ενώ κάτω από σταθερές εργαστηριακές

συνθήκες ανιχνεύονται όλες οι δυνατές αλλαγές βάσεων σε ποσοστό που φθάνει το 80-90% (Wagner, 2002). Έτσι, αποφεύγεται η διαδικασία περαιτέρω αλληλούχισης (sequencing). Είναι αρκετά ευέλικτη μέθοδος προσδιορισμού διαφορών μεταξύ δύο ή περισσότερων αλληλουχιών καθώς δεν απαιτείται εξειδικευμένος εξοπλισμός. Δεν απαιτείται κάποιο ένζυμο προκειμένου να πραγματοποιηθεί κάποια αντίδραση και απαιτείται ελάχιστος εξοπλισμός για την βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Επιπρόσθετα, το προϊόν PCR μπορεί να αναλυθεί τόσο για το μήκος όσο και την ποικιλομορφία της αλληλουχίας του, να ξαναχρησιμοποιηθεί σε άλλες εφαρμογές ή να απομονωθεί για περαιτέρω αλληλούχιση.

Η μέθοδος εφαρμόζεται ευρέως στην κλινική διάγνωση σε συνδυασμό με διαδικασίες αλληλούχισης (sequencing), καθώς πολλές ασθένειες σχετίζονται με σπάνιες μεταλλάξεις οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με την παραπάνω μέθοδο. Αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο σημείο διότι σε κλινικό επίπεδο αποτυχία προσδιορισμού αλλαγής μιας βάσης μπορεί κυριολεκτικά να αποτελέσει θέμα ζωής ή θανάτου. Ωστόσο, μέχρι σήμερα στην πληθυσμιακή γενετική λίγες μελέτες έχουν γίνει με τη χρήση της παραπάνω μεθόδου. Κύριος στόχος σε τέτοιες μελέτες ουσιαστικά είναι ο υπολογισμός του αριθμού των γενετικών διαφορών μεταξύ των ατόμων ή ομάδων ατόμων. Κατά συνέπεια, μικρός αριθμός μη προσδιοριζόμενων διαφορών ουσιαστικά να μην έχει ανατρεπτικό αποτέλεσμα όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των ατόμων. Σε σύγκριση μάλιστα με την μέθοδο PCR-RFLP, η SSCP μπορεί να ανιχνεύσει μεγαλύτερο αριθμό διαφορών. Εφαρμογή της μεθόδου SSCP έχει γίνει για έλεγχο γενετικών διαφορών σε περιοχές μικροδορυφορικού DNA μεταξύ πληθυσμών καγκουρό από περιοχές της Αυστραλίας. Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψε ότι παρά το ίδιο μήκος γονιδιώματος των αλληλομόρφων που εξετάστηκαν υπήρχε διαφορά ως προς την αλληλουχία μεταξύ των πληθυσμών και μάλιστα διαφορά και ως προς το μήκος των αλληλουχιών. Αυτό βοηθά στο να αποφεύγονται λανθασμένα συμπεράσματα για τις διαδικασίες εξέλιξης στους πληθυσμούς ατόμων.

3. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Το περιβάλλον περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία μολυσματικών μικροβίων-ιούς, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα και πολυκύτταρα παράσιτα. Όλα αυτά μπορούν να προκαλέσουν νόσο και αν πολλαπλασιαστούν ανεξέλεγκτα, μπορεί τελικά να σκοτώσουν τον ξενιστή τους. Οι περισσότερες μολύνσεις στα φυσιολογικά

άτομα είναι μικρής διάρκειας και δεν αφήνουν σημαντική βλάβη. Αυτό οφείλεται στο ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο καταπολεμά τους μολυσματικούς παράγοντες. Επειδή, ακριβώς, υπάρχουν πολλά είδη μικροοργανισμών απαιτείται και μεγάλη ποικιλία ανοσοποιητικών αποκρίσεων για να είναι δυνατή η αντιμετώπιση κάθε είδους μόλυνσης. Διακρίνονται δύο είδη ανοσοποιητικής απόκρισης: η έμφυτη ανοσία και οι προσαρμοζόμενες ανοσοποιητικές αποκρίσεις. Η διαφορά ανάμεσα στα δύο είδη είναι ότι η προσαρμοζόμενη απόκριση σε εξωκυτταρικό παθογόνο εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση γεγονός που σημαίνει ότι το προσαρμόσιμο ανοσοποιητικό σύστημα “θυμάται” τον μολυσματικό παράγοντα και μπορεί να τον εμποδίσει να προκαλέσει νόσο. Επομένως, τα δύο κύρια χαρακτηριστικά της προσαρμοζόμενης ανοσοποιητικής απόκρισης είναι η εξειδίκευση και η μνήμη. Τα κύτταρα που εμπλέκονται στις προσαρμοζόμενες ανοσοποιητικές αποκρίσεις ενός οργανισμού και τα οποία ανήκουν στην ομάδα των λευκοκυττάρων είναι τα λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν με αυστηρή εξειδίκευση συγκεκριμένα παθογόνα είτε αυτά βρίσκονται μέσα σε κύτταρα του ξενιστή είτε έξω, στα υγρά του σώματος ή στο αίμα. Τα λεμφοκύτταρα διακρίνονται με τη σειρά τους στα Β και Τ-λεμφοκύτταρα. Όλα πάντως προέρχονται από προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών, αλλά στη συνέχεια τα Τ λεμφοκύτταρα εξελίσσονται στο θύμο αδένα, ενώ τα Β στο μυελό των οστών σε ενήλικα άτομα θηλαστικών. Τα Β λεμφοκύτταρα είναι γενετικά προγραμματισμένα να κωδικοποιούν για έναν υποδοχέα στην επιφάνειά τους, ειδικό για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Όταν αναγνωρίσουν το αντιγόνο τους, τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα, τα οποία εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ενός υποδοχέα σε διαλυτή μορφή, τα γνωστά αντισώματα, τα οποία συνδέονται με τα αντιγόνα που ενεργοποίησαν αρχικά την παραγωγή των Β λεμφοκυττάρων. Από την άλλη πλευρά, τα Τ-λεμφοκύτταρα κατατάσσονται σε διαφορετικούς τύπους ανάλογα με τις ποικίλες λειτουργίες τους πχ. λεμφοκύτταρα που αλληλεπιδρούν με Β-λεμφοκύτταρα, με μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα (ονομαζόμενα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα) καθώς και με κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα. Σε κάθε περίπτωση τα Τ-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα αλλά μόνον όταν αυτά εκτίθενται στην επιφάνεια άλλων κυττάρων μαζί με τα ονομαζόμενα μόρια MHC (Major Histocompatibility Complex). Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ενός ειδικού υποδοχέα που ονομάζεται υποδοχέας του αντιγόνου του Τ-λεμφοκυττάρου (TCR – υποδοχέας). Στη συνέχεια τα Τ-λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν διαλυτές κυτοκίνες

οι οποίες μεταφέρουν μηνύματα σε άλλα κύτταρα, είτε επιδρούν άμεσα με διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις προκειμένου να καταστρέψουν το αντιγόνο. Τα λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους χαρακτηριστικά πρωτεϊνικά μόρια “δείκτες” τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση των διαφόρων κυτταρικών υποπληθυσμών. Οι κυτταρικοί αυτοί δείκτες κατατάσσονται σε οικογένειες οι οποίες έχουν πιθανώς εξελιχθεί από λίγα προγονικά γονίδια. Αυτές οι οικογένειες οι οποίες ξεχωρίζουν με βάση τη μοριακή τους δομή περιλαμβάνουν τις ακόλουθες μεγάλες πρωτεϊνικές ομάδες:

α) την οικογένεια των ιντεγκρινών η οποία αποτελείται από ετεροδιμερή μόρια με α,β αλυσίδες,

β) τις σελεκτίνες (E, L και P) που εκφράζονται σε λεμφοκύτταρα και σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα

γ) τις πρωτεογλυκάνες με τυπικό εκπρόσωπο την CD44, τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF), την υπεροικογένεια των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα των νευρικών κυττάρων (NGF), την υπεροικογένεια των λεκτινών C-τύπου, τη υπεροικογένεια των διαμεμβρανικών υποδοχέων (πχ. II-6) και

δ) την υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών που περιλαμβάνει τους δείκτες CD2, CD3, CD4, CD8, MHC I και MHC II (Roitt, Brostoff, Male, Ανοσολογία, 2000).

ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (MHC)

Οι γενετικοί τόποι που εμπλέκονται στην απόρριψη των ξένων μικροοργανισμών και παθογόνων και γενικότερα στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού σχηματίζουν μία περιοχή γνωστή ως μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex- MHC). Δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί σαφώς το αρχέγονο γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνες των μορίων MHC, ωστόσο όμως, έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες για την προέλευση του. Η πρώτη θεωρία υποστηρίζει ότι το μόριο MHC που εμφανίστηκε πρώτο στην ιστορία της εξέλιξης ανήκει στην τάξη II (Hughes et al, 1993), ενώ σύμφωνα με άλλη θεωρία υποστηρίζεται ότι πρώτα δημιουργήθηκαν τα μόρια τάξης I ως αποτέλεσμα ανασυνδυασμού ανάμεσα στην καρβοξυτελική C-περιοχή μιας πρωτεΐνης, όμοιας με την αιμογλοβίνη, και τη πεπτιδοδεσμεύουσα περιοχή της πρωτεΐνης θερμικού σοκ, HSP-70 (Flaznik et al., 1991). Φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποίησαν οι Hughes et al., έδειξε ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στις πρωτεϊνικές αλυσίδες που δομούν τα μόρια τάξης I και II και μάλιστα φάνηκε ότι το πρόδρομο MHC μόριο παρουσίαζε δομική ομοιότητα με τα μόρια MHC II

τα οποία στη συνέχεια έδωσαν γένεση στα μόρια του MHC I (Lawlor et al., 1990). Οι υποθέσεις αυτές ωστόσο δε μπορούν να εξηγήσουν τη φύση του πρώτου γονιδίου που κωδικοποιεί για το MHC. Ο Ohno (1987) προτείνει ότι οι πρωτεΐνες προσκόλλησης που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (N-CAM) εμπλέκονται στις διαδικασίες ανάπτυξης των οργανισμών και οργανογένεσης. Από πολύ παλιά αποτελούσαν τα θεμελιώδη προγονικά μόρια του ανοσοποιητικού συστήματος και αυτό διότι παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τη β_2 -μικρογλοβουλίνη καθώς αποτελούνται από τέσσερις πρωτεϊνικές περιοχές.

Οι Hughes και Neϊ έχοντας υπόψη τους τα παραπάνω δεδομένα και στην προσπάθειά τους να βρουν τις εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στα μόρια τάξης I και II υπολόγισαν το χρόνο διαχωρισμού των γονιδίων A και B που κωδικοποιούν αντίστοιχα τις αλυσίδες α και β αντίστοιχα του μορίου MHC II, ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ 446 και 521 εκατομμυρίων ετών ανάλογα με τη μέθοδο υπολογισμού (Hughes et al., 1990). Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ της παρατήρησης ότι οργανισμοί όπως τα αμφίβια τα οποία διαχωρίστηκαν πριν από 370 χρόνια διαθέτουν και τα δύο γονίδια A και B του MHC II. Έτσι, η παρουσία όλων των γονιδίων της τάξης I, II και III του MHC στο αμφίβιο *Xenopus* προτείνει ότι η περιοχή του γονιδιώματος που κωδικοποιεί για τα μόρια του MHC είναι τόσο παλιά, που υπολογίζεται σε 370 εκατομμύρια χρόνια ή και περισσότερο.

Το μοναδικό ανοσοποιητικό σύστημα στα ασπόνδυλα είναι το ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα. Το σύστημα αυτό, εκτός από το προσαρμόσιμο ανοσοποιητικό σύστημα με τα συστατικά μόρια των MHC, TCR και Ig γονιδίων καθώς και ενζύμων με δράση αντιγραφής όπως είναι η πρωτεΐνη RAG 1 απαντάται και στα σπονδυλωτά. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα παραπάνω πρωτεϊνικά συστατικά αυτού του ανοσοποιητικού συστήματος απουσιάζουν στα ασπόνδυλα αλλά και σε προγονικά σπονδυλωτά ψάρια του είδους *agnatha* (Matsunaga et al., 1998). Έτσι, εξελικτικά αν και δεν υπάρχει σαφής μοριακός δείκτης που να προσδιορίζει τη σύνδεση του ανοσοποιητικού συστήματος των σπονδυλωτών με τα συστήματα αλληλοαναγνώρισης των ασπόνδυλων, το προσαρμόσιμο ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται να έχει προέλθει από τα προγονικά σπονδυλωτά με σιαγόνα π.χ. καρχαρίες και σαλάχια αμέσως μετά τον εξελικτικό διαχωρισμό των ειδών *agnatha* (σπονδυλωτών άνευ σιαγόνων).

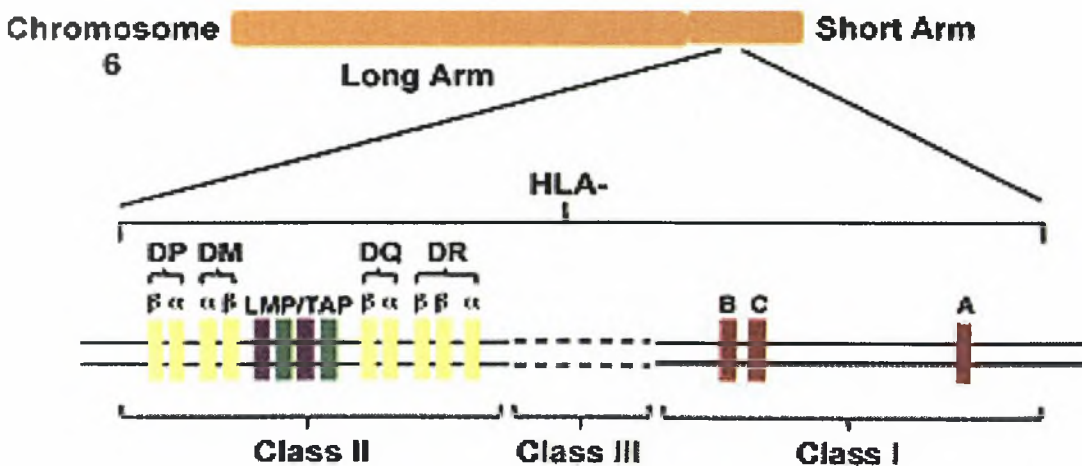
Όσον αφορά τα μόρια MHC σε αμφίβια και πτηνά, αυτά παρουσιάζουν ομοιότητες με τα μόρια MHC των θηλαστικών ενώ σαφείς ενδείξεις για ύπαρξη πολυμορφισμού των μορίων MHC τάξης I και II υπάρχουν και για τα ερπετά. Ωστόσο, μεταξύ των θηλαστικών εντοπίζονται διαφορές μεταξύ των μορίων MHC και δεν είναι

ξεκάθαρο αν αυτές είναι αποτέλεσμα κάποιου ιστορικού εξελικτικού γεγονότος ή κάποιου είδους επιλογή που ασκείται λόγω διαφορετικού τρόπου ζωής ή είναι αποτέλεσμα επιδράσεων του περιβάλλοντος.

Από μελέτες προσδιορισμού της συνολικής οργάνωσης των μορίων MHC του ανθρώπου, του ποντικού αλλά και σε αρκετά είδη πτηνών, ιχθύων και αμφιβίων έχει προκύψει ότι, το MHC είναι μία πολυγονιδιακή οικογένεια (clusters) τουλάχιστον 200 γονιδίων (Penn et al., 1999), η οποία ενεργοποιείται ως απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού σε μολυσματικές ασθένειες και κωδικοποιεί τρεις τάξεις μορίων (μόρια των τάξεων: I, II και III). Τα μόρια αυτά είναι πρωτεΐνες- υποδοχείς, συνήθως γλυκοπρωτεΐνες, της επιφάνειας μιας ποικιλίας κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος οι οποίες προσδένουν κλάσματα πρωτεϊνών από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού με αποτέλεσμα το σύμπλοκο να αναγνωρίζεται από τα T-λεμφοκύτταρα και να ενεργοποιεί το μονοπάτι της ανοσολογικής απόκρισης. (Karpes et al., 1988), το οποίο περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, το γρήγορο πολλαπλασιασμό τους και την αυτόματη λύση των προσβεβλημένων κυττάρων ή των σχηματισμένων αντισωμάτων (Falk et al., 1991).

Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ MHC

Στον άνθρωπο τα μόρια του MHC κωδικοποιούνται από μια εκτεταμένη περιοχή του γενώματος η οποία καλύπτει μήκος περίπου 4 εκατομμυρίων βάσεων (bp) στο βραχύ άκρο του χρωμοσώματος 6 και ειδικότερα μεταξύ των θέσεων 6p21.31 και 6p21.32.1 (Naik, 2003). Η οικογένεια αυτή των γονιδίων του MHC σε θηλαστικά διακρίνεται σε τρεις κύριες υποοικογένειες: τα γονίδια τάξης I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), τα γονίδια τάξης II (DP, DQ, και DR) και τα γονίδια τάξης III όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 6: Δομή του MHC

<http://www.medscape.com/content/2002/00/43/65/436533/art-chap2.fig17.jpg>

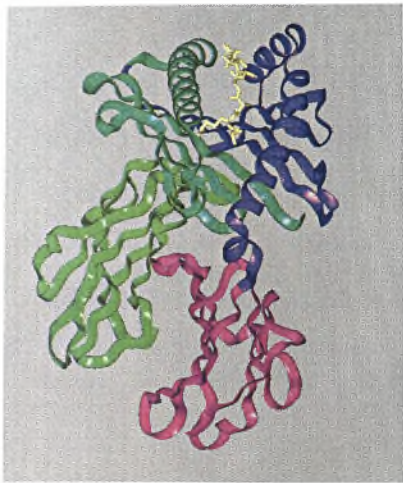
Ειδικότερα, στον άνθρωπο τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια MHC I και MHC II εντοπίζονται σε διαφορετικές περιοχές αλλά σε πολύ κοντινούς γενετικούς τόπους στο χρωμόσωμα 6. Τα προϊόντα των γονιδίων των τάξεων I και II σε γενικές γραμμές καλούνται ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (human leucocyte antigens- HLA) και έχουν παρόμοια δομή. Τα HLA-DP γονίδια (DPA= γονίδια που κωδικοποιούν για την α αλυσίδα και DPB γονίδια που κωδικοποιούν για την β αλυσίδα) βρίσκονται πολύ κοντά στο κεντρομερίδιο στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 και συνδέονται με τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα HLA-DM μόρια (DMA και DMB). Ανάμεσά τους και μεταξύ των DQ γονιδίων βρίσκονται τα LMP γονίδια που κωδικοποιούν για χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες καθώς και τα γονίδια TAP που κωδικοποιούν για πρωτεϊνικούς μεταφορείς του MHC που σχετίζονται με την παρουσίαση του αντιγόνου. Αντίθετα, η περιοχή της τάξης III περιέχει περισσότερα από 20 γονίδια τα οποία εκτός των άλλων κωδικοποιούν για κάποια μόρια του συμπληρώματος (C2, C4, παράγων B) καθώς και μόρια που εμπλέκονται στην επεξεργασία των αντιγόνων, ενώ δεν υπάρχουν επιβεβαιωμένες λειτουργικές ή δομικές ομοιότητες μεταξύ των προϊόντων των γονιδίων της τάξης III και των μορίων της τάξης I ή II.

ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΤΟΠΟΙ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ I

Η περιοχή τάξης I στον άνθρωπο περιλαμβάνει τρεις γενετικούς τόπους που ονομάζονται HLA-A, HLA-B, HLA-C. Κάθε γενετικός τόπος κωδικοποιεί τη βαριά αλυσίδα ενός κλασικού αντιγόνου MHC τάξης I ενώ όλη η περιοχή του γονιδιώματος αποτελείται από περισσότερες από 1,5 εκατομμύριο βάσεις του DNA.

Η δομή των μορίων MHC της τάξης I

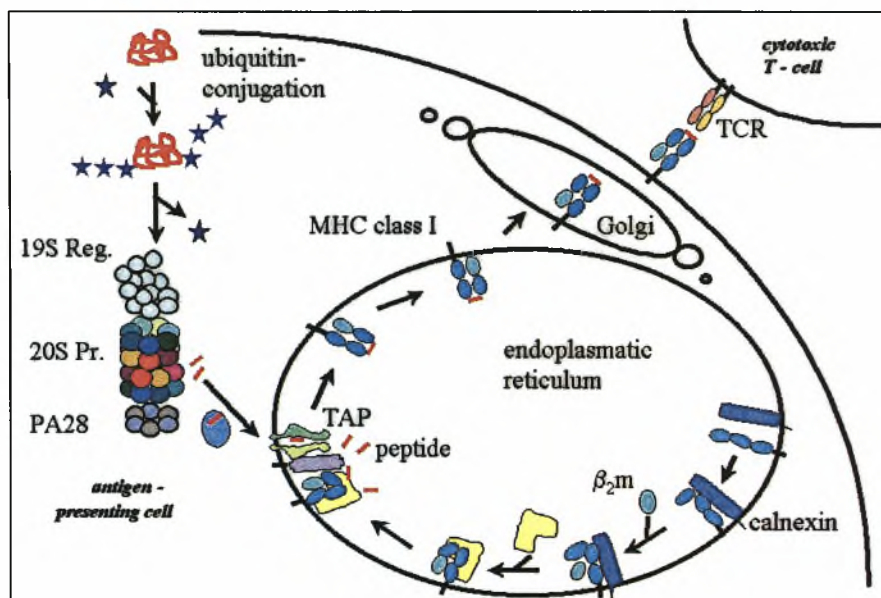
Το μόριο MHC I είναι μια μονομερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη που διαπερνά μια φορά την κυτταρική μεμβράνη. Αποτελείται από μια γλυκοσυλιωμένη βαριά αλυσίδα (M.B 45kDa) που συνδέεται μη-ομοιοπολικά με τη β₂- μικροσφαιρίνη (M.B 12kDa), η οποία είναι ένα πολυπεπτίδιο το οποίο βρίσκεται ελεύθερο στον ορό. Η βαριά αλυσίδα της τάξης I αποτελείται από τρεις εξωκυττάρειες επικράτειες που χαρακτηρίζονται ως α1 (N-τελικό άκρο), α2 και α3 και είναι γλυκοσυλιωμένες. Η κάθε μια αποτελείται από 90 περίπου αμινοξέα, μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή από 25 αμινοξέα, τα οποία διαπερνούν την λιπιδιακή διπλοστιβάδα πιθανόν με μορφή α-έλικας και μια υδρόφιλη κυτταροπλασματική ουρά μήκους 30-40 αμινοξέων, η οποία μπορεί να φωσφορυλιωθεί *in vivo*.



Εικόνα 7: Τρισδιάστατη δομή του μορίου MHC τάξης I. (www.crvst.bbk.ac.uk/.../coadwell/004.htm)

Η συγκρότηση των αντιγόνων τάξης I λαμβάνει χώρα στο κοκκιώδες ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου. Στόχος των γλυκοπρωτεϊνών του συμπλόκου MHC I είναι να συλλέγουν από το βιοσυνθετικό μονοπάτι του κυττάρου κλάσματα πρωτεϊνών που συνθέτονται κατά την φυσιολογική απόκριση του κυττάρου μετά από προσβολή του από κάποιο παθογόνο ιό, ενδοκυτταρικό παράσιτο ή πρωτεϊνικό μόριο του ίδιου του κυττάρου (ενδογενή αντιγόνα που συνθέτονται στο κύτταρο- στόχο και στη συνέχεια

εκθέτουν τα μοριακά αυτά κλάσματα στην κυτταρική επιφάνεια. Το σύμπλοκο MHC I-πεπτίδιο το οποίο συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου εκτίθεται πρώτα στο κύτταρο APC και στη συνέχεια στα T-λεμφοκύτταρα



Εικόνα 8: Μοντέλο του μονοπατιού της παρουσίασης αντιγόνου με το MHC I. (<http://www.uni-konstanz.de/FuF/Bio/research/Arbeitsgruppen/Groettrup/Homepage/Grafiken/ClassIPresScheme1.jpg>)

ενεργοποιώντας το κυτταρολυτικό μονοπάτι του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου ή την έκκριση κυτταροκινών από τα T-λεμφοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση με τον TCR υποδοχέα είναι κατά κανόνα ειδική έτσι ώστε ο TCR να μην προσδένεται με μόρια MHC τα οποία δεν φέρουν τα κατάλληλα πεπτίδια. Τα πεπτίδια της τάξης I δημιουργούνται από πρωτεΐνες

του κυτταρολήματος οι οποίες υφίστανται αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα. Το πρωτεόσωμα για το σκοπό αυτό, περιέχει πρωτεΐνες με ειδική δράση ενδοπεπτιδασών. Η μεταφορά των πεπτιδίων από το κυτόπλασμα στο ενδοπλασματικό δίκτυο πραγματοποιείται με τη βοήθεια της πρωτεΐνης TAP που είναι ένας εσωτερικός μεμβρανικός μεταφορέας και κωδικοποιείται από τα γονίδια TAP1 και TAP 2. Μετά τη μεταφορά μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο τα πεπτίδια ενώνονται με τα μόρια της τάξης I. Η συγκρότηση των μορίων της τάξης I είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει μοριακές συνοδούς όπως είναι η πρωτεΐνη καλνεξίνη. Αυτές οι πρωτεΐνες προωθούν και καθοδηγούν τη συναρμολόγηση ενός σταθερού συμπλέγματος αποτελούμενου από βαριά αλυσίδα τάξης I -β2 μικροσφαιρίνη-πεπτίδιο και το σύμπλεγμα μεταφέρεται στην επιφάνεια του κυττάρου. Τα συμπλέγματα της τάξης I, που δεν διαθέτουν τα παραπάνω πεπτίδια, είναι ασταθή και μη λειτουργικά.

ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΤΟΠΟΙ ΤΑΞΗΣ II

Τα γονίδια του MHC I σε θηλαστικά διαφορετικών τάξεων δεν είναι ορθόλογα σε αντίθεση με τον γενετικό τόπο MHC II (Hughes et al., 1990). Ορθόλογα είναι τα γονίδια εκείνα που κωδικοποιούν για όμοιες ακολουθίες ίδιας λειτουργίας σε δύο διαφορετικούς οργανισμούς και διαχωρίζονται μετά από κάποιο γεγονός ειδογένεσης. Για παράδειγμα, ο γενετικός τόπος HLA-C απαντά μόνο στον άνθρωπο, το γορίλλα και τον χιμπατζή ενώ απουσιάζει σε άτομα μαϊμούδων (Boyson et al., 1996). Οι γενετικοί τόποι των MHC II φαίνεται λοιπόν να προέκυψαν πριν από το διαχωρισμό της τάξης των πλακουντοφόρων.

Εκτός των γενετικών τόπων HLA-DP, HLA-DM, LPM και TAP, στην περιοχή που κωδικοποιεί για το μόριο MHC II σημαντική θέση κατέχουν τα γονίδια



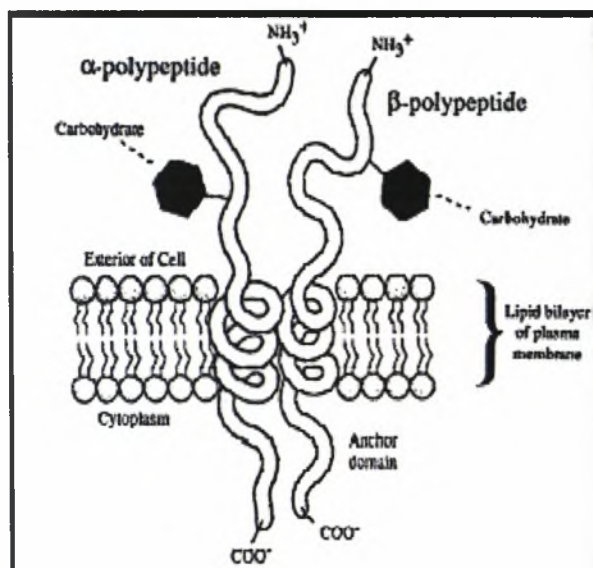
Εικόνα 9: Τρισδιάστατη δομή του μορίου MHC τάξης II.

<http://www.cryst.bbk.ac.uk/pns97/assigments/projects/coadwell/CLASS2.G>

HLA-DRA και HLA-DRB τα οποία κωδικοποιούν για τις αλυσίδες του HLA-DR μορίου το οποίο είναι το κυριότερο αντιγονοπαρουσιαστικό στοιχείο. Η οικογένεια των DR περιλαμβάνει μόνο ένα γονίδιο α (DRA) και μέχρι εννέα γονίδια β (DRB1-9), συμπεριλαμβανομένων και ψευδογονιδίων. Οι αριθμοί 1 έως 9 αντιστοιχούν στον αριθμό εξονίων που αποτελούν τον κάθε γενετικό τόπο. Μέσα στον γενετικό τόπο του DRB λαμβάνουν χώρα ποικίλες διαφορετικές ανακατατάξεις. Η οργάνωση και το μήκος της περιοχής DRB ποικίλλει στους διάφορους απλοτύπους εκφράζοντας διαφορετικούς αριθμούς αλυσίδων β . Ο γενετικός τόπος DRB2 είναι ένα ψευδογονίδιο. Οι γενετικοί τόποι DRB1, DRB3 και DRB4 συνήθως εκφράζονται. Τα γονίδια DPA2, DPB2 και DQB3 είναι εν γένει ψευδογονίδια και επομένως δεν εκφράζονται ενώ αντίθετα τα γονίδια DNA, DOB, DQB2 και DQA2 μπορεί να είναι λειτουργικά.

Η δομή των μορίων MHC της τάξης II

Το μόριο του MHC II είναι ένα ετεροδιμερές, διαμεμβρανικό μόριο «κλειδί». Αποτελείται από μια βαριά αλυσίδα (α) και μια ελαφριά (β) γλυκοπρωτεϊνική αλυσίδα και εκφράζεται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Brown et al., 1993). Κάθε μια από τις πρωτεΐνες του έχει παρόμοιο μέγεθος. Οι α αλυσίδες έχουν μέγεθος από 30-34 kDa ενώ οι β αλυσίδες ανάλογα με τον γενετικό τόπο που εμπλέκεται κυμαίνονται περίπου από 26-29kDa. Η διαφορά στα MB οφείλεται στο διαφορετικό βαθμό γλυκοσυλίωσης των αλυσίδων.

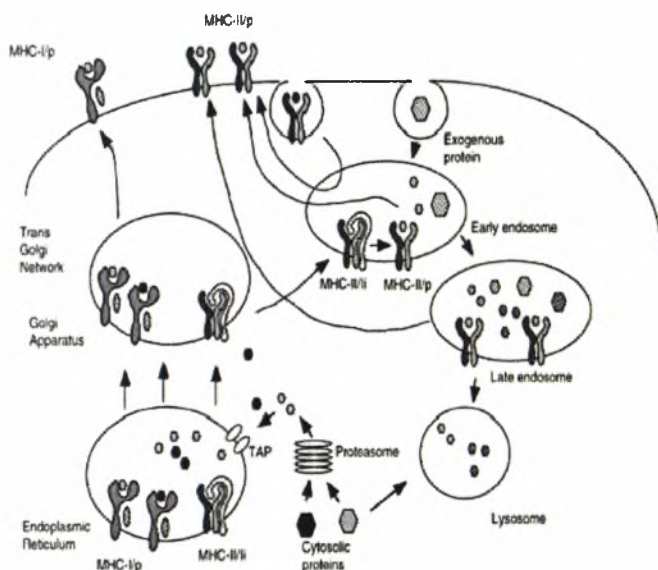


Για κάθε μια αλυσίδα έχει βρεθεί και το αντίστοιχο γονίδιο. Το γονίδιο A (DRA) για την α -αλυσίδα και το γονίδιο B (DRB) για την αλυσίδα B. Κάθε αλυσίδα έχει δύο εξωκυττάρειες περιοχές. Οι περιοχές αυτές καλούνται alpha-1 ($\alpha 1$), alpha-2 ($\alpha 2$), beta-1 ($\beta 1$), και beta-2 ($\beta 2$) αντίστοιχα για κάθε μια πρωτεΐνη.

Εικόνα 10: Δομή του γλυκοπρωτεϊνικού μορίου MHC II

(<http://www.nanomedicine.com/NMI/figures/8.34.jpg>)

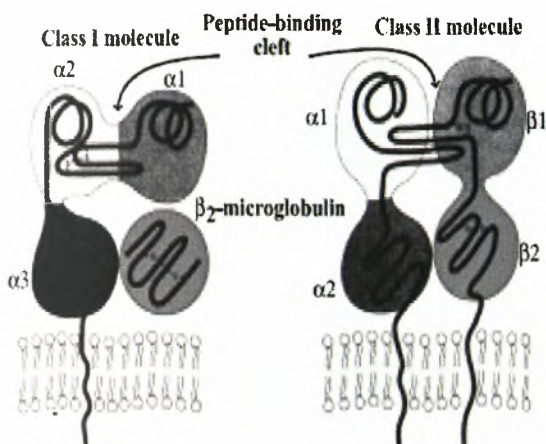
Τα τμήματα α_1 και β_1 σχηματίζουν μια περιοχή σύνδεσης, την περιοχή PBR (peptide-binding region), στην οποία συνδέονται τα αντιγονικά πεπτίδια και αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς των βοηθητικών T-κυττάρων. Οι δύο πρωτεΐνες του μορίου συνδέονται μεταξύ τους χωρίς την ύπαρξη ομοιοπολικών δεσμών. Οι αλυσίδες α και β των μορίων τάξης II εντοπίζονται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο συμπλεγμένες με ένα πολυπεπτίδιο που καλείται αμετάβλητη αλυσίδα (Ii). Αυτή η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που δεν ανήκει στο MHC. Η αμετάβλητη αλυσίδα Ii έχει διττό ρόλο. Από τη μια δρα ως πρωτεΐνη μεταφορέας (chaperon) όπου μαζί με το ετεροδιμερές σύμπλεγμα $\alpha\beta$ -Ii μεταφέρεται μέσω του συμπλέγματος Golgi σε ένα όξινο ενδοσωμικό ή λυσοσωματικό διαμέρισμα όπου απελευθερώνεται η Ii. Από την άλλη προστατεύει την πεπτιδοδεσμεύουσα περιοχή του MHC II ούτως ώστε αυτή να μη δεσμεύει ενδογενή πεπτίδια αλλά προαιρετικά εξωγενή πεπτίδια. Η πρωτεΐνη Ii αποκόβεται από το σύμπλεγμα $\alpha\beta$ συνδεδεμένη με ένα πεπτίδιο με τη μορφή συμπλόκου Ii-CLIP και η όλη διαδικασία απαιτεί την παρουσία ενός μορίου όμοιου με το μόριο MHC II το οποίο καλείται HLA-DM. Το σύμπλεγμα $\alpha\beta$ παραμένει στο διαμέρισμα αυτό για 1-3 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρεται στην επιφάνεια του κυττάρου όπου στη συνέχεια μέσω του TCR υποδοχέα αλληλεπιδρά με τα T-λεμφοκύτταρα και τα ενεργοποιεί. Συνοπτικά τα δύο μονοπάτια ανοσολογικής απόκρισης φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 11: Απεικόνιση του ενδογενούς και εξωγενούς μονοπατιού επεξεργασίας των αντιγόνων τάξης I και II. (Sita Naik, The human HLA System, J Indian Rheumatol Assoc 2003;11:79-83)

Η πεπτιδοδεσμεύουσα θέση PBR σε ένα μόριο MHC διαθέτει μια ποικιλία θυλάκων, αυλάκων επαρμάτων, εσοχών και εντυπωμάτων. Η ακριβής τοπογραφία της εξαρτάται από τη φύση των αμινοξέων μέσα στην αύλακα και επομένως ποικίλει από τον ένα απλότυπο στον άλλο.

Η παραπάνω θέση πρόσδεσης απαντάται τόσο σε μόρια MHC της τάξης I όσο και σε μόρια MHC της τάξης II με τη διαφορά ότι στην αύλακα της τάξης II τα άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας δεν είναι κλειστά και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα πεπτίδια που προσδένονται στα μόρια της τάξης II να προεξέχουν από τα άκρα της αύλακας.



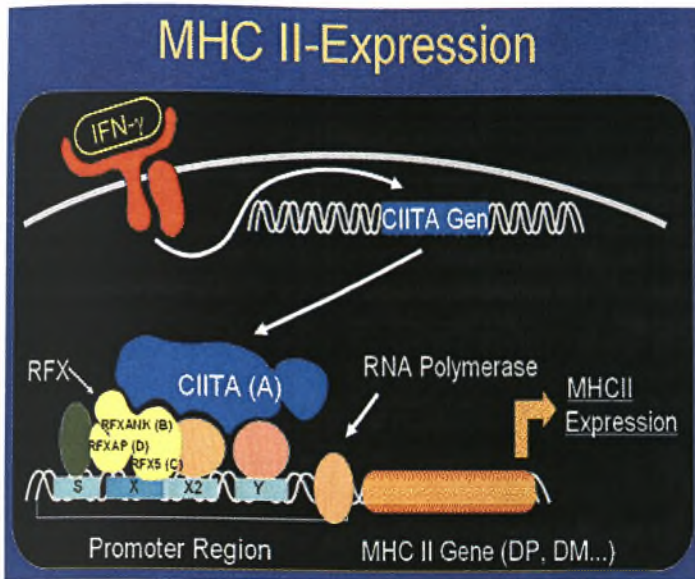
Εικόνα 12: Δομή των μορίων MHC I και II στην οποία διακρίνονται οι θέσεις πρόσδεσης των πεπτιδίων I και II (Sita Naik, The human HLA System, J Indian Rheumatol Assoc 2003:11:79-83)

Έτσι τα μόρια της τάξης II τείνουν να είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος-αριθμό αμινοξέων- περίπου 15 αμινοξέα. Σε πεπτίδια τάξης II έχουν προσδιοριστεί συντηρημένα σταθεροποιητικά αμινοξέα αν και η αποκάλυψη αυτών είναι πιο δύσκολη από ότι των πεπτιδίων της τάξης I εξαιτίας των τεμαχισμένων άκρων τους και της πλέον ομαλής κατανομής των δεσμών οι οποίοι προσδένουν το πεπτίδιο στην αύλακα της τάξης II.

Στα άκρα της πεπτιδοδεσμεύουσας αύλακας παρατηρείται επίσης μια σημαντική διαφορά. Στα αντιγόνα της τάξης I αλληλεπιδράσεις στα καρβοξυ-και στα άμινο-τελικά άκρα περιορίζουν το πεπτίδιο μέσα στην αύλακα ενώ στα μόρια της τάξης II τα πεπτίδια μπορεί να προεξέχουν από τα άκρα της αύλακας.

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ MHC II

Η έκφραση του MHC I και II πάνω στα κύτταρα ελέγχεται από διαλυτές κυτταροκίνες όπως είναι η ιντερφερόνη IFN- γ και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF. Ειδικότερα, η ρύθμιση της έκφρασης του μορίου εμφανίζεται πρωταρχικά σε μεταγραφικό επίπεδο. Το σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί σε έκφραση των γονιδίων του MHC II σε απόκριση στην ιντερφερόνη γ ξεκινά από την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών κινάσων τυροσίνης JAK 1 και JAK 2. Οι ενεργοποιημένες JAK κινάσες φωσφορυλιώνουν σε κατάλοιπα τυροσίνης την πρωτεΐνη STAT 1 η οποία διμερίζεται. Έπειτα τα διμερή των STAT 1 μεταφέρονται στον πυρήνα. Εκεί, συνδέονται με τα στοιχεία μιας αλληλουχίας που καλείται GAS τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από την IFN- γ . Τα στοιχεία της αλληλουχίας



Εικόνα 13: Το σηματοδοτικό μονοπάτι που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του μορίου MHC II. Η έκφραση του μορίου MHC επάγεται από την διαλυτή IFN- γ μέσα στον πυρήνα. (www.immunodefekt.de/cgi-bin/movies.cgi?id=9)

πολυμεράση να ξεκινήσει τη διαδικασία της μεταγραφής των γονιδίων DR, DP, DQ του μορίου MHC II.

Μάλιστα, μελέτη των Giroux et al.(2003), έδειξε ότι η πρωτεϊνική κινάση PKC- α παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση των μορίων MHC II, που επάγονται από την IFN- γ , καθώς ρυθμίζει την δράση του παράγοντα IRF-1, όσον αφορά την τρανσενεργοποίηση του προαγωγέα IV του παράγοντα CIITA. Όταν ο IRF-1 επαχθεί μέσω της PKC- α από την IFN- γ , τότε συνδέεται πάνω στις αλληλουχίες του προαγωγέα γνωστές ως ISREs (IFN-stimulated responsive elements) (Steimle et al., 1994) και στη συνέχεια επάγει τον παράγοντα CIITA.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΜΟΡΙΟ MHC

Ένα χαρακτηριστικό του MHC είναι ο υπερβολικά υψηλός βαθμός πολυμορφισμού και η δομική ποικιλότητα των μορίων που κωδικοποιούνται από αυτό. Ο πολυμορφισμός δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένος σε όλο το MHC. Επικεντρώνεται συνήθως μέσα και γύρω από την πεπτιδοδεσμεύουσα αύλακα (PBR), έχει διαπιστωθεί όμως ότι το ποσοστό πολυμορφισμού μεταξύ των διαφόρων τάξεων και ειδών είναι κυμαινόμενο. Για παράδειγμα σε μελέτες των Swarbrick et al., 1995 στα προϊόντα των

GAS βρίσκονται στον προαγωγέα των γονιδίων που αποκρίνονται στην IFN- γ (Bach et al., 1997) Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για δύο μεταγραφικούς παράγοντες. Τον μεταγραφικό παράγοντα IRF-1 και τον μεταγραφικό συν-ενεργοποιητή των μορίων της τάξης II, CIITA, ο οποίος αν και δεν συνδέεται άμεσα πάνω στις αλληλουχίες του προαγωγέα των γονιδίων του μορίου MHC II (Harada et al., 1989), εντούτοις σχηματίζει σύμπλοκα με παράγοντες όπως είναι ο RFX (εικόνα 10), επιτρέποντας την RNA

γονιδίων DRB στα είδη ελαφιού *Odocoileus virginianus* και *Cervus elaphus*, που κωδικοποιούν για τα αμινοξέα στις θέσεις 11 και 54 της PBR περιοχής του MHC, παρατηρήθηκε υψηλός βαθμός πολυμορφισμού. Μέσα σε ένα συγκεκριμένο μόριο της τάξης I ή της τάξης II ο δομικός πολυμορφισμός συσσωρεύεται σε συγκεκριμένες περιοχές του μορίου. Η μεταβλητότητα της αλληλουχίας των αμινοξέων στα αντιγόνα της τάξης I συσσωρεύεται σε τρεις κύριες περιοχές των επικρατειών α_1 και α_2 ενώ η επικράτεια α_3 φαίνεται πολύ συντηρημένη.

Ο αρχαιότερος, πολυμορφικά, γονιδιακός τόπος του MHC II φαίνεται να είναι αυτός του HLA- DQA1 ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι τα γονίδια του MHC II υπόκεινται σε διαδικασίες "γένεσης και θανάτου" (Nei M et al., 1997). Αυτό σημαίνει ότι τα νέα γονίδια προκύπτουν από επαναλαμβανόμενο διπλασιασμό και μερικά από αυτά, όντας διπλασιασμένα διατηρούνται στο γονιδίωμα με τη μορφή αυτή για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ άλλα διαγράφονται είτε χάνουν τη λειτουργικότητά τους λόγω καταστροφικών μεταλλάξεων. Η ιδέα αυτή έρχεται σε αντίθεση με τη θεωρία ότι η ποικιλομορφία του MHC II είναι σύμφωνη με τους μηχανισμούς εξέλιξης των πολυγονιδιακών οικογενειών των μορίων των υπόλοιπων τάξεων του MHC και των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών (Ig). Τα αλληλόμορφα του MHC II φαίνεται ότι έχουν υψηλό ρυθμό σύνθεσης και αποικοδόμησης (turnover). Μάλιστα, η έλλειψη αντιστοιχίας αλληλομόρφων του, μεταξύ ανθρώπου και χιμπατζή, ο εξελικτικός διαχωρισμός των οποίων συνέβη πριν από 5 εκατομμύρια χρόνια, δείχνει ότι τα αλληλόμορφα του MHC II υφίστανται συνεχώς τροποποιήσεις κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των ειδών (Parham et al., 1996).

Στα μόρια της τάξης II ο βαθμός της μεταβλητότητας εξαρτάται από την υποπεριοχή και από την πολυπεπτιδική αλυσίδα. Για παράδειγμα, στον άνθρωπο, ο μεγαλύτερος πολυμορφισμός απαντάται στις αλυσίδες DRB και DQB ενώ οι αλυσίδες DPB εμφανίζουν λιγότερη ποικιλομορφία. Η αλυσίδα DQA είναι πολυμορφική ενώ η αλυσίδα DRA είναι ουσιαστικά αμετάβλητη, οι δε αλυσίδες DRA αντιπροσωπεύονται από δύο αλληλόμορφα. Σε μη αιμομικτικούς πληθυσμούς όπου τα άτομα διαθέτουν δύο MHC γονότυπους μπορούν να παραχθούν υβριδικά μόρια της τάξης II με μια αλυσίδα από κάθε γονότυπο. Αυτό δημιουργεί επιπλέον ποικιλομορφία και δομική ποικιλία εκφραζόμενων μορίων. Τα περισσότερα από τα πολυμορφικά αμινοξέα των αντιγόνων της τάξης I και II βρίσκονται στην κορυφή του μορίου στη μεγάλη αύλακα η οποία δρα ως πεπτιδοδεσμεύουσα θέση. Έτσι η ποικιλότητα επικεντρώνεται σχεδόν αποκλειστικά στη

βάση της αντιγονοδεσμεύουσας αύλακας ή ξεχωρίζει από τις πλευρές της περιοχής της α-έλικας (Roitt, Brostoff, Male, Ανοσολογία, 2000).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΕΥΘΥΝΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΨΗΛΟ ΒΑΘΜΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΜHC

Μελέτες έχουν δείξει ότι η διατήρηση της άφθονης γενετικής ποικιλότητας των αλληλομόρφων στο μόριο του ΜHC σε διάφορα ζωικά είδη ενισχύεται από παράγοντες όπως είναι η βαθμιαία συσσώρευση αυτόματων γενετικών αλλαγών κατά τη διάρκεια εξέλιξης των ειδών, οι διαδικασίες επιλογής που διατηρούν εκείνες τις γενετικές αλλαγές οι οποίες δεν επηρεάζουν την αλληλεπίδραση περιοχών των αντιγόνων ΜHC με τους TCR υποδοχείς καθώς και φαινόμενα ενδογονιδιακού (ενδοαλληλομορφικού) ή πιο σπάνια διαγονιδιακού ανασυνδυασμού των γονιδίων του ΜHC. Εκτός από τον υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης και την αναστροφή τμημάτων γονιδίων πάνω στο ίδιο χρωμόσωμα έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες που εξηγούν τον υψηλό βαθμό πολυμορφισμού των γενετικών τόπων του ΜHC. Η πρώτη θεωρία στηρίζεται στην επιλεκτική υπερκυριαρχία (overdominant selection) εκείνων των γενετικών τόπων του ΜHC που καθιστούν τα ετερόζυγα άτομα ικανά να αποφεύγουν αντιξοότητες που προκαλούν οι διαταραχές του περιβάλλοντος (Lerner, 1954; Zouros et al., 1980).

Από τη στιγμή που τα παθογόνα αντιγόνα έχουν πολλαπλά επιτόπια θα πρέπει και τα μόρια του ΜHC να υποστούν ανάλογη προσαρμογή. Εδώ η θέση των ετεροζυγωτικών ατόμων είναι πλεονεκτική σε σχέση με τα ομόζυγα άτομα για τα μόρια ΜHC (Flaherty et al., 1988). Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα που έχουν μέχρι σήμερα αναφερθεί και δείχνουν την πλεονεκτική υπεροχή του ετεροζυγώτη σε μολυσματικές ασθένειες όσον αφορά τον άνθρωπο είναι ο συγκεκριμένος γονότυπος που εμφανίζεται σε άτομα που έχουν προσβληθεί από τη ασθένεια του HIV (Hepatitis Infection Virus) (Carrington et al., 1999) καθώς και από την ασθένεια του HBV (Hepatitis B Virus) (Thursz et al., 1997).

1. Μηχανισμοί που εξαρτώνται από την παρουσία παθογόνων

Η επιλογή που ασκείται από την παρουσία παθογόνων φαίνεται ότι ευνοεί τους σπάνιους γονότυπους του ΜHC και αυτό συμβαίνει διότι τα παθογόνα είναι ικανά να αναπτύσσουν μηχανισμούς ώστε με χαρακτηριστική επιδεξιότητα να αποφύγουν την ανοσοποίησή τους από τα μόρια του ΜHC που κωδικοποιούνται από τους συνήθεις γονότυπους (Potts et al., 1993). Δεν υπάρχουν πολλά μοντέλα που έχουν προταθεί να υποστηρίξουν τη σχέση της

ποικιλομορφίας των μορίων MHC με τη μείωση πληθυσμών ατόμων που έχουν προσβληθεί από συγκεκριμένες ασθένειες που οφείλονται σε παθογόνα. Ωστόσο, τα πιο καλά μελετημένα παραδείγματα που υποστηρίζουν τη παραπάνω σχέση είναι της ασθένειας του Marek's σε κοτόπουλα (Briles et al., 1983), η παρουσία παρασίτων στο πρόβατο της ποικιλίας Soay (Paterson et al., 1998) και η ασθένεια της ελονοσίας στον άνθρωπο (Hill et al., 1991). Αντίθετα, στο πρόβατο *Ovis Canadensis* (Gustavo et al., 2001) και στους κάστορες και τα ελάφια των ειδών *Capreolus capreolus* και *Alces Americana* (Mikko et al., 1999) στα οποία εκδηλώνονται επιδημικές ασθένειες από παθογόνα παρά το γεγονός ότι παρουσιάζουν χαμηλή γενετική ποικιλομορφία στο μόριο του MHC, παρατηρήθηκε αυξημένη εξάπλωση των πληθυσμών σε περιοχές της Σουηδίας κατά τα τη διάρκεια του τελευταίου αιώνα, προτείνοντας ότι μηχανισμοί που δεν επιδρούν άμεσα στο γονιδίωμα μπορούν να επιφέρουν αλλαγές στο μέγεθος των φυσικών πληθυσμών ενός είδους.

2. Μηχανισμοί που δεν εξαρτώνται από την παρουσία παθογόνων

Το ζευγάρισμα (mating preference) μεταξύ των ατόμων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα να έρθουν σε επαφή μεταξύ τους. Πρώτο κριτήριο για ζευγάρισμα αποτελεί η υγεία και ευρωστία των ατόμων τα οποία φέρουν αλληλόμορφα που δεν φέρουν αρνητικές μεταλλάξεις και οι φαινοτυπικές τους ιδιότητες δεν έχουν επηρεαστεί από την παρουσία παθογόνων -υπόθεση του κινούμενου στόχου- σύμφωνα με τους Penn et al., 1999. Εκτός αυτού όμως καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία του ζευγαρώματος φαίνεται ότι παίζουν και τα μόρια του MHC. Στην περίπτωση αυτή, ο πολυμορφισμός των μορίων MHC λειτουργεί ως ένας μηχανισμός ώστε να αποφεύγεται η διασταύρωση μεταξύ συγγενικών ατόμων του είδους όπως πχ. το ασυμβίβαστο στα φυτά ή όπως συμβαίνει πχ. με διάφορες οσμές που προσελκύουν ή απωθούν το ζευγάρισμα θηλυκών και αρσενικών ατόμων ενός είδους, σύμφωνα με τους Penn et al., 2002. Το γενετικό πλεονέκτημα των μορίων MHC, να εμφανίζουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού, οδηγεί σε παραγωγή εύρωστων ετερόζυγων απογόνων και κατά συνέπεια με αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι σε παθογόνα.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ ΟΣΩΝ ΑΦΟΡΑ ΤΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ ΤΟΥ ΜHC ΣΕ ΕΥΡΩΠΑΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Σε Ευρωπαϊκό επίπεδο έχουν γίνει πάρα πολλές μελέτες σε διάφορους πληθυσμούς θηλαστικών για να διαπιστωθεί ο πολυμορφισμός του ΜHC και πως συμβάλλει στην αύξηση ή τη μείωση της γενετικής ποικιλομορφίας των πληθυσμών αυτών. Μάλιστα, εξαιτίας της ιδιομορφίας του μορίου ΜHC, έχουν μελετηθεί πολλοί γενετικοί τόποι τόσο της τάξης II του ΜHC όσο και της τάξης I. Ακολούθως, θα αναφερθούν περιληπτικά διάφορες μελέτες και τα αποτελέσματά τους.

Στην αντιλόπη *Damaliscus pygargus* της Νότιας Αφρικής έχουν παρατηρηθεί δύο υποείδη με τη μέθοδο SSCP και τη βοήθεια της αλληλούχισης του γονιδίου DRB τάξεως II του ΜHC. Μεγαλύτερος πολυμορφισμός βρέθηκε στο υποείδος blesbok (D.P. phillipsi) σε σύγκριση με το υποείδος bontebok (D.P. pygargus). Στο πρώτο υποείδος βρέθηκαν 22 αλληλόμορφα σε σύνολο 44 ατόμων που εξετάστηκαν ενώ στο δεύτερο υποείδος βρέθηκαν μόνο 6 αλληλόμορφα σε σύνολο 45 ατόμων. Η διάβρωση της γενετικής ποικιλομορφίας που παρατηρείται στο δεύτερο υποείδος οφείλεται σε δύο σοβαρά φαινόμενα στενωπού που προκλήθηκαν από κυνηγητικές πιέσεις και παρασιτικές μολύνσεις (Van der Walt et al., 2001).

Το είδος της φώκιας *Mirounga angustirostris* που ήταν προς εξαφάνιση το 19^ο αιώνα, έχει επανέλθει σε πολύ μεγάλο βαθμό και μάλιστα τώρα αριθμεί περίπου 175000 άτομα (Stewart et al., 2004). Η έρευνα διεξήχθη σε 110 φώκιες χρησιμοποιώντας SSCP και αλληλούχιση των γονιδίων DQA, DQB και DRB της τάξεως II του ΜHC, για να μελετήσουμε τις γενετικές συνέπειες του φαινομένου της στενωπού στο πληθυσμό εξαιτίας αυτών των γονιδιακών τόπων σε σύγκριση με άλλα καλά-μελετημένα γονίδια. Τελικά, βρέθηκαν πολύ λίγα αλληλόμορφα σε κάθε γονιδιακό τόπο του ΜHC, σημαντική διακύμανση του γονιδίου DQA ανάμεσα στις περιοχές της αναπαραγωγής του είδους και ανισοροπία σύνδεσης μεταξύ του γονιδίου DQB και DRB. Επίσης, αυτό το είδος της φώκιας είναι ομομικτικό σε πολύ μεγάλο βαθμό (Weber et al., 2004).

Οι περισσότερες μελέτες σε φυσικούς πληθυσμούς θηλαστικών μέχρι τώρα, έχουν δείξει υψηλά επίπεδα ποικιλομορφίας στο ΜHC. Παρόλο αυτά, στην έρευνα που διεξήχθη στο γονίδιο DQA τάξεως II του ΜHC (εξόνιο 2) στο τρωκτικό *Hypogeomys antimena*, που είναι είδος προς εξαφάνιση, υπό την εποπτεία του Sommer et al., 2001 αποκαλύφθηκε πολύ χαμηλή ποικιλομορφία σε σύγκριση με άλλα είδη θηλαστικών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αυτή η χαμηλή ποικιλομορφία του ΜHC μπορεί να μην είναι

μόνο αποτέλεσμα του φαινομένου της στενωπού, που οφείλεται σε μειώσεις στο μέγεθος του πληθυσμού, αλλά και εξαιτίας του μονογαμικού συστήματος ζευγαρώματος (Sommer et al., 2001).

Πληθυσμοί του Σουηδικού ζαρκαδιού *A.alces* αναλύθηκαν για τη γενετική ποικιλομορφία του MHC τάξεως I και II (γονίδια DQA,DQB και DRB) χρησιμοποιώντας RFLP και SSCP. Και οι δύο μέθοδοι αποκάλυψαν χαμηλά ποσά πολυμορφισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα χαμηλά αυτά ποσά του πολυμορφισμού οφείλονται στο φαινόμενο της στενωπού που όμως δεν έγινε στο πρόσφατο παρελθόν, όπως επίσης, στη μοναχική ζωή του ζαρκαδιού που ευθύνεται για την πλάγια μεταβίβαση παθογόνων στους πληθυσμούς (Ellegren et al., 1996).

Ο πολυμορφισμός σε γονιδιακούς τύπους του MHC σε πληθυσμούς τρωκτικών που ζουν σε νησιά είναι γενικά χαμηλός. Οι σημαντικότεροι γενετικοί παράγοντες που συνεισφέρουν σ' αυτό το μειωμένο επίπεδο της γενετικής ποικιλομορφίας είναι η γενετική παρέκκλιση, η μειωμένη γονιδιακή ροή και το φαινόμενο της αρχής του ιδρυτή. Η έρευνα αφορούσε το εξόνιο 2 του γονιδιού DQA του MHC και διεξήχθη σε 8 Βόρειο-Μεσογειακούς πληθυσμούς του τρωκτικού *Apodemus sylvaticus* (5 νησιώτικοι και 3 ηπειρωτικοί πληθυσμοί). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέθοδος αλληλούχισης cDNA και αλληλούχισης νουκλεοτιδίων. Αυτή η έρευνα παρουσίασε καινοτόμα αλληλόμορφα DQA. Υψηλός πολυμορφισμός των γονιδίων DQA καταγράφηκε σε φυσικούς πληθυσμούς *A.sylvaticus* που ήταν συνέπεια των 13 αλληλομόρφων που βρέθηκαν σε 8 πληθυσμούς. Παρόλο αυτά, οι νησιωτικοί πληθυσμοί έδειξαν μικρότερο μέγεθος πολυμορφισμού σε σχέση με τους ηπειρωτικούς (Bellocq et al., 2005).

Η συγκεκριμένη έρευνα μελετάει τη γενετική ποικιλομορφία του εξονίου 2 του γονιδιού DRB τάξεως II του MHC σε 59 άτομα του είδους ελαφιού *Rupicapra r. Rupicapra* από διάφορες περιοχές των Ανατολικών και Δυτικών Άλπεων. Η αλληλούχιση αποκάλυψε 19 αλληλόμορφα ανάμεσα στα 59 άτομα. Τα αποτελέσματα έδειξαν θετική επιλογή για ετερογένεια στο γονιδιακό τόπο DRB (Schaschl et al., 2004).

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ένα από τα σημαντικότερα ερωτήματα της εξελικτικής βιολογίας είναι η διασάφηση των μηχανισμών φυσικής επιλογής που καθιστούν τα είδη ικανά να προσαρμόζονται σε αλλαγές όπως είναι η γονιδιακή ροή, η γενετική παρέκκλιση και η μεταλλαξιγένεση. Παρά το γεγονός ότι έχουν ταυτοποιηθεί πολυάριθμα γονίδια, τα οποία

δυναμικά υπόκεινται στην επίδραση θετικής επιλογής, εξακολουθούν να υπάρχουν πρακτικά θεμελιώδεις περιορισμοί που εμποδίζουν τη μελέτη των παραπάνω διαδικασιών σε επίπεδο DNA σε πολλούς οργανισμούς. Αυτό συμβαίνει διότι είναι δύσκολο να εντοπιστούν τα γονίδια τα οποία είναι κατάλληλα για μελέτη σε οργανισμούς που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρότυπα μελέτης και ταυτόχρονα διότι οι πληροφορίες που υπάρχουν για τη λειτουργία των γονιδίων αυτών δεν είναι επαρκείς. Επειδή ακριβώς τα μόρια του MHC ασκούν επίδραση στη φυσική κατάσταση ενός οργανισμού, εκτός από το λειτουργικό τους ρόλο στην ανοσοποίηση του έναντι σε παθογόνα, σχετίζονται με διαδικασίες όπως η βιωσιμότητα, η επιλογή του συντρόφου, η δυναμική του σπέρματος, τα επίπεδα της τεστοστερόνης και παραγωγής ωαρίων και γάλακτος (Finch et al., 1995; Schantz et al., 1996). Έτσι, τα γονίδια του MHC προσφέρουν αρκετές πληροφορίες και αποτελούν ίσως τα μοναδικά γονίδια (Potts et al., 1990; Hedrick, 1994) για μελέτες προσαρμογής των φυσικών πληθυσμών διαφόρων ειδών. Μάλιστα, μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί αρκετοί γενετικοί τόποι των μορίων τόσο της τάξης I όσο και της τάξης II σε πλήθος οργανισμών συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών (Trowsdale, 1995), των πτηνών (Edwards et al., 1996), των ψαριών (Dixon et al., 1995), των ερπετών (Grossberger, 1992), και των αμφιβίων (Radtky et al., 1996).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του πολυμορφισμού του εξονίου 2 του γονιδίου DQA που κωδικοποιεί για την β-αλυσίδα της πρωτεΐνης του μορίου του MHC II σε φυσικούς πληθυσμούς του είδους *Lepus europeus* από διάφορες περιοχές του ελλαδικού χώρου με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Ειδικότερα, προσδιορίζεται ο βαθμός πολυμορφισμού του γονιδίου μετά από τον καθορισμό των διαφορετικών απλοτύπων ανά περιοχή του ελλαδικού χώρου που εξετάζεται, με μελέτη του πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας DNA (SSCP) του εξονίου 2 του γονιδίου DQA, μετά από ενίσχυση συγκεκριμένου τμήματός του με τη χρήση της μεθόδου PCR. Εκτιμώντας τον βαθμό πολυμορφισμού του συγκεκριμένου γονιδίου και γνωρίζοντας από μελέτες που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί σε επίπεδο mtDNA ότι η εισαγωγή αλλόχθονων πληθυσμών του είδους από προγράμματα εμπλουτισμών είναι δυνατόν να επηρεάσουν αρνητικά τη γενετική δομή των πληθυσμών μειώνοντας τη γενετική ποικιλομορφία, μπορούμε να οδηγηθούμε σε συμπεράσματα που να αιτιολογούν την μείωση των τοπικών πληθυσμών που παρατηρείται τις τελευταίες δεκαετίες στο είδος *L. europeus* με την εμφάνιση του συνδρόμου του Ευρωπαϊκού Καφετί Λαγού.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

A) Βιολογικό Υλικό - Δείγματα:

Οι ιστοί που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν από διαφορετικά σημεία του σώματος λαγών, όπως νεφροί, μυς, συκώτι και πνεύμονες. Η συγκομιδή των ατόμων ή ιστών τους πραγματοποιήθηκε από κνηγετικούς συλλόγους διάφορων περιοχών της Ελλάδας, όπως Άρτα, Ιωάννινα, Τρίκαλα και Βόλος.

Τα δείγματα ακινητοποιήθηκαν σε 100% διάλυμα αιθανόλης και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C μέχρι την εφαρμογή διαδικασίας απομόνωσης DNA.

Χρησιμοποιήθηκαν 108 δείγματα λαγών *L.europeaus* τα οποία προέρχονταν από διαφορετικές περιοχές του ελλαδικού χώρου. Στον πίνακα που ακολουθεί περιγράφονται αναλυτικά οι περιοχές δειγματοληψίας.

Πίνακας 1. Περιοχές του ελλαδικού χώρου από τις οποίες απομονώθηκαν οι εξεταζόμενοι ιστοί – και η ειδική ονομασία αυτών.

A/A	Περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν τα άτομα & ειδική ονομασία αυτών	A/A	Περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν τα άτομα & ειδική ονομασία αυτών
1	Άρτα 1	22	Ολίτσικα Ζαλ. 11
2	Άρτα 2	23	Ολίτσικα Ζαλ. 14
3	Άρτα 3	24	Ολίτσικα Ζαλ. 16
4	Άρτα 4	25	Ζάλογγο 1
5	Αμπέλια Άρτας 1	26	Ζάλογγο 2
6	Καταράκτης Άρτας 1	27	Ζάλογγο 4
7	Πατιόπουλο Άρτας 1	28	Ζάλογγο 7
8	Αυλότοπος Άρτας 1	29	Ζάλογγο 3
9	Άγναντα Άρτας 1	30	Ζάλογγο 8
10	Ανώγειο Άρτας 1	31	Λ.1-Ζαγόρι
11	Ανώγειο Άρτας 2	32	Λ.2-Ζαγόρι
12	Μυρσίνη Πρεβ.1	33	Λ.8-Ζαγόρι
13	Σαλανίκη Πρεβ. 1	34	Λ.9-Ζαγόρι
14	Λ.4-Άρτα	35	Λ.10-Ζαγόρι
15	Λ.6-Άρτα	36	Λ.11-Ζαγόρι
16	Λ.7-Άρτα	37	Λ.26-Ζαγόρι
17	Λ.17-Άρτα	38	Λ.27-Ζαγόρι
18	Λ.29-Άρτα	39	Αυγό Ιωαν. 2
19	Καναλάκι Πρεβ.1	40	Αυγό Ιωαν. 3
20	Καναλάκι Πρεβ.4	41	Αυγό Ιωαν. 4
21	Ολίτσικα Ζαλ. 10	42	Αυγό Ιωαν. 5

	Περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν τα άτομα & ειδική ονομασία αυτών		Περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν τα άτομα & ειδική ονομασία αυτών
43	Σμόλικας 1	66	Μαγνησία 4
44	Σμόλικας 2	67	Μαγνησία 5
45	Σμόλικας 3	68	Μαγνησία 6
46	Σμόλικας 4	69	Μαγνησία 7
47	Βραδέτο 1	70	Μαγνησία 8
48	Βραδέτο 3	71	Μαγνησία 12
49	Βραδέτο 5	72	Λ.43-Βόλος
50	Βραδέτο 6	73	Λ.44-Βόλος
51	Βραδέτο 10	74	Βόλος 1
52	Βραδέτο 11	75	Βόλος 2
53	Αγ.Παρασκευή 1	76	Βελεστίνο 1
54	Αγ.Παρασκευή 2	77	Βελεστίνο 2
55	Γυφτ. Ζαγόρι 7	78	Βελεστίνο 5
56	Αετομίλιτσα 1	79	Βελεστίνο 6
57	Ιωάννινα 1	80	Λ.28-Τρίκαλα
58	Ιωάννινα 2	81	Λ.34-Καλαμπάκα
59	Ιωάννινα 3	82	Λ.36-Καλαμπάκα
60	Κάπουρνα 8	83	Λ.37-Καλαμπάκα
61	Κάπουρνα 9	84	Λ.38-Καλαμπάκα
62	Κάπουρνα 10	85	Λ.39-Καλαμπάκα
63	Μαγνησία 1	86	Λ.40-Καλαμπάκα
64	Μαγνησία 2	87	Λ.41-Καλαμπάκα
65	Μαγνησία 3	88	Μαρώσα 1

	Περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν τα άτομα & ειδική ονομασία αυτών		Περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν τα άτομα & ειδική ονομασία αυτών
89	Μαρώσα 2	99	Νεοχώρι 2
90	Μεσοχ. Τρικάλων 1	100	Δέση 3
91	Μεσοχ. Τρικάλων 3	101	Δέση 4
92	Μεσοχ. Τρικάλων 5	102	Δέση 6
93	Μεσοχ. Τρικάλων 9	103	Δέση 7
94	Μεσοχ. Τρικάλων 11	104	Δέση 8
95	Παλαιοχ. Τρικάλων 4	105	Δέση 9
96	Κόζιακας 1	106	Πύρρα 6 - Κανάλια
97	Κόζιακας 3	107	Πύρρα 7
98	Νεοχώρι 1	108	Πύρρα 9

Σημείωση: Με το γράμμα Λ και το κίτρινο χρώμα χαρακτηρίζονται τα άτομα *L.europeus* που έχουν βρεθεί θετικά στο Σύνδρομο του Ευρωπαϊκού καφετί λαγού (EBHS).

B) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΛΑΓΟΥ

Βασικό βήμα για τη μελέτη του πολυμορφισμού σε επίπεδο γονιδίου αποτελεί η απομόνωση γενετικού υλικού DNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εξαγωγή και απομόνωση ολικού DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Bernatchez et al. (1988) με κάποιες μικρές τροποποιήσεις. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

- **Extraction buffer** (100ml)

Το διάλυμα αυτό αποτελείται από:

- 2ml Tris-HCL 2M-pH:8,5, το οποίο ρυθμίζει το pH.
- 2ml EDTA 0,5M, το οποίο χρησιμοποιείται ως χηλικός παράγοντας δεσμεύοντας κατιόντα Ca^{++} και Mg^{++} τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση νουκλεασών. Συνεπώς το διάλυμα που περιέχει EDTA απενεργοποιεί τη δράση των νουκλεασών προστατεύοντας το DNA από διάσπαση.
- 4ml NaCl 5M, το οποίο συμβάλλει στην διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και την ομογενοποίηση του ιστού.
- 92ml d.d H₂O.

Το παραπάνω διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

- **Digestion buffer** (20ml).

Το διάλυμα αυτό αποτελείται από:

- ✦ 18ml extraction buffer
- ✦ 2ml SDS 10%. Το SDS είναι ιονικό απορρυπαντικό το οποίο συμβάλλει στη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ιδιαίτερα της πυρηνικής μεμβράνης ενώ ταυτόχρονα συντελεί στην αποδιάταξη πρωτεϊνών γεγονός που προστατεύει το DNA από τη δράση νουκλεασών.
- ✦ 100μl διαλύματος proteinase K (100mg/ml). Η πρωτεϊνάση K συντελεί στη πέψη των πρωτεϊνών.

Το παραπάνω διάλυμα αποθηκεύεται και αυτό στους 4°C.

Ιστός: Για την απομόνωση χρησιμοποιείται ιστός περίπου 50-100mg από μυ, σπλήνα, καρδιά και πνεύμονες λαγού (συνήθως δεν χρησιμοποιείται ιστός από σκώτι διότι δεν γίνεται καλή απομόνωση).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

- 1.-Αρχικά, τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα erpendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 1ml **extraction buffer** προκειμένου να γίνει καθαρισμός από το αίμα.
- 2.-Αναδεύουμε έντονα (vortex) και φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία δωματίου (φυγόκεντρος erpendorf) στις 10.000στροφές για 2min.
- 3.-Αδειάζουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και προσθέτουμε ξανά 1ml extraction buffer ακολουθώντας το προηγούμενο στάδιο.
- 4.-Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά, προσθέτουμε 400μl **digestion buffer** το οποίο προηγουμένως έχουμε ανακινήσει αρκετά. Το **digestion buffer** βοηθάει στη λύση του κυτταρικού τοιχώματος του ιστού.
- 5.-Αναδεύουμε έντονα (vortex) ώστε να αναμιχθεί ο ιστός – ίζημα με το διάλυμα.
- 6.-Τοποθετούμε τα δείγματα στο μικρό υδατόλουτρο (Medingen), με τη βοήθεια λεπτού φελιζολ, ώστε το υγρό τμήμα των δειγμάτων να είναι βυθισμένο στους 37°C για δύο περίπου ώρες.
- 7.-Κάθε μισή ώρα ανακινούμε τα δείγματα ώστε να επαναιωρηθεί το ίζημα.
- 8.-Προσθέτουμε 150μl οξικού Na (CH_3COONa 3M, pH=5.2), το οποίο βοηθάει στην κατακρήμνιση του ιστού.
- 9.-Ανακινούμε έντονα και τοποθετούμε τα δείγματα στους -20°C για 15min.
- 10.-Φυγοκεντρούμε στις 13.000στροφές για 10min στους 4°C.
- 11.-Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε σωλήνα erpendorf.
- 12.-Προσθέτουμε 1ml εξισορροπημένης φαινόλης προκειμένου να διαλυθούν οι πρωτεΐνες. Η φαινόλη είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας των πρωτεϊνών. Έτσι μετά την προσθήκη φαινόλης πραγματοποιείται διαχωρισμός λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται εκχύλιση του DNA. Ειδικότερα το διάλυμα της φαινόλης θα πρέπει να έχει τουλάχιστον pH=7 ώστε το DNA μετά την εκχύλιση να κατανέμεται στην επάνω υδατική φάση.
- 13.-Ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex.
- 14.-Φυγοκέντρωση στις 13.000στροφές για 20min στους 4°C.
- 15.-Γίνεται προσεκτική μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf.
- 16.-Προσθήκη 0,5ml φαινόλης και 0,5ml χλωροφορμίου- ισοαμυλικής αλκοόλης (24V:1V) και μικρή ανάδευση στο vortex. Το χλωροφόρμιο διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας απομακρύνει τη διαλυμένη φαινόλη από την υδατική φάση και συντελεί στην μετουσίωση των πρωτεϊνών, ενώ στόχος της ισοαμυλικής αλκοόλης είναι η σταθεροποίηση του χλωροφορμίου.
- 17.-Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 5min στους 4°C.

- 18.-Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα eppendorf.
- 19.-Προσθήκη 1ml χλωροφορμίου- ισοαμλικής (24V:1V)
- 20.-Μικρή ανάδευση σε vortex.
- 21.-Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 5min στους 4°C.
- 22.-Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα eppendorf.
- 23.-Προσθήκη 1ml ισοπροπανόλης (2-προπανόλη)
- 24.-Μικρή ανάδευση σε vortex και παραμονή των δειγμάτων για 20min σε θερμοκρασία δωματίου
- 25.-Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 20min στους 4°C
- 26.-Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο παρατηρώντας ταυτόχρονα το ίζημα στο κάτω μέρος του eppendorf ώστε αυτό να μην μετακινηθεί.
- 27.-Προσθέτουμε 1ml παγωμένης αλκοόλης (αιθανόλης) 70%.
- 28.-Ανακινούμε με το χέρι
- 29.-Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 5min στους 4°C
- 30.-Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο παρατηρώντας το ίζημα
- 31.-Στεγνώνουμε τα δείγματα στον κλίβανο στους 37°C για 30min-1hr παρατηρώντας ώστε να μην υπάρχουν μικροσταγονίδια στα τοιχώματα του eppendorf.
- 32.-Διαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100μl ddH₂O
- 33.-Τα παραπάνω δείγματα συντηρούνται στο ψυγείο στους 4°C όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν άμεσα ή στους -20°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αποθήκευσης.
- 34.-Εναλλακτικά αντί για τα βήματα 23-28, προσθέτουμε 1ml παγωμένης αλκοόλης (αιθανόλης) 100% και τοποθετούμε τα δείγματα στους -20°C για όλο το βράδυ. Η παγωμένη αιθανόλη αφυδατώνει το DNA και προκαλεί την κατακρύμνισή του.

Γ) ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ DNA ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ

Μετά την επαναιώρηση των δειγμάτων γίνεται μέτρηση του κάθε δείγματος στο φωτόμετρο προκειμένου να πιστοποιήσουμε σε ένα πρώτο βήμα αν τα δείγματα που απομονώθηκαν με την παραπάνω διαδικασία περιέχουν αρκετή ποσότητα DNA.

Για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιούμε 1μl διαλύματος από το κάθε δείγμα (DNA+100μl H₂O) και προσθέτουμε 49μl ddH₂O. Φωτομετρούμε αφού πρώτα κάνουμε πρώτα ένα spin. Ενδείξεις του φωτομέτρου οι οποίες κυμαίνονται πάνω από 250ng/μl σημαίνει ότι οι ποσότητες DNA που απομονώθηκαν από την παραπάνω διαδικασία είναι ικανοποιητικές.

Στόχος του πειράματος ήταν η ενίσχυση του εξονίου 2 του γονιδίου DQA της κλάσης II του MHC με τη βοήθεια της αντίδρασης PCR.

Δ) ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ 2 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DQA ΤΗΣ ΚΛΑΣΗΣ II ΤΟΥ MHC ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Το τμήμα του DNA-στόχος που θέλουμε να ενισχυθεί έχει μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 220-250 ζευγών βάσεων.

Για μια αντίδραση PCR των 30μl χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Ⓢ DNA 500ngr για το κάθε δείγμα. Το DNA προέρχεται από ιστούς διαφορετικών ατόμων από τα οποία έγινε η απομόνωση. Αυτή η μικρή ποσότητα του DNA θα αποτελέσει μόριο- μήτρα για την ενίσχυση του γονιδίου DQA.
- Ⓢ 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Buffer) 50mM. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9.0
- Ⓢ 1μl. MgCl₂ 50mM. Τα ιόντα Mg⁺² είναι δυνατόν να επηρεάσουν την ενίσχυση των primer, τη θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η αποδιάταξη των αλυσίδων, το PCR προϊόν, την ειδικότητα του προϊόντος, τον σχηματισμό ψευδοδιμερών primer καθώς και την ενζυμική ενεργότητα και πιστότητα. Επίσης για να δράσει η Taq πολυμεράση απαιτείται ελεύθερο Mg η οποία με τη σειρά της θα ενώσει το μόριο του DNA με τους primers και τα dNTPs. Η παρουσία EDTA ή άλλων χηλικών ενώσεων δρα αρνητικά στην ενίσχυση του DNA.
- Ⓢ 0,6 μl μίγματος dNTPs συγκέντρωσης 10mM για το καθένα. Η σταθερότητα των δεοξυνουκλεοτιδίων είναι αρκετά μεγάλη μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους επομένως η συγκέντρωσή τους θα πρέπει να είναι ελάχιστη διότι η εξειδίκευσή τους και η πιστότητά τους αυξάνεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις
- Ⓢ 30pmoles από κάθε εκκινητή
- Ⓢ 1 unit Taq DNA polymerase η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοσταθερή σε θερμοκρασίες 94-95^oC.
- Ⓢ dH₂O 22,2μl

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

A) DQA-Forward : 5'-TCATCAGCTGACCACGTTGG-3'

B) DQA-Reverse: 5'-CTATTGACAGCAGCAGTAGAG-3' (Fain et al., 2001).

Η επιλογή των primers γίνεται με βάση την περιεκτικότητα σε βάσεις G-C η οποία θα πρέπει να ξεπερνά το 50% των επιλεγόμενων βάσεων. Επιπλέον θα πρέπει να μην υπάρχουν αλληλουχίες που να περιέχουν πολυπουρίνες, πολυπυριμιδίνες και άλλες ασυνήθιστες αλληλουχίες καθώς και επικαλύψεις στο 3' άκρο διότι κάτι τέτοιο οδηγεί σε σχηματισμό διμερών μορφών primer και παράλληλα θα πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (T_m).

Οι συνθήκες ενίσχυσης των PCR προϊόντων είναι οι ακόλουθες:

- | | | |
|--|----------------|-------------|
| 1. Αρχική αποδιάταξη | 95°C για 5min. | } 35 κύκλοι |
| 2. Αποδιάταξη | 95°C για 45sec | |
| 3. Επικόλληση των
εκκινητών (Annealing) | 65°C για 50sec | |
| 4. Επέκταση | 72°C για 30sec | |
| 5. Τελική επέκταση | 72°C για 7min | |

Αναλυτικά σε κάθε βήμα συμβαίνουν τα εξής:

1. Η θέρμανση στην θερμοκρασία των 95°C συμβάλλει στην αρχική αποδιάταξη του DNA και στη διάσπαση ειδικών πρωτεϊνικών μορίων, των ιστονών με τις οποίες συνδέονται τα μόρια του DNA και οι οποίες διατηρούν τα μόρια DNA στη συμπαγή τους μορφή. Το στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντικό για να πετύχει η αντίδραση της PCR διότι από την ολική αποδιάταξη του DNA στόχου θα εξαρτηθεί η συγκέντρωση του προϊόντος που παράγεται σε κάθε κύκλο.
2. Με τη θέρμανση στους 95°C για 45sec επιτυγχάνεται το σπάσιμο των διπλών και τριπλών δεσμών μεταξύ των δίκλωνων αλυσίδων των μορίων DNA και η μετατροπή τους από τη δίκλωνη στη μονόκλωνη μορφή. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία της αρχικής αποδιάταξης όσο και της αποδιάταξης είναι υψηλή και θα πρέπει να μη διαρκεί περισσότερο χρόνο γιατί ελαττώνεται η ενεργότητα του ενζύμου.
3. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας η οποία μπορεί να κυμαίνεται από 50°C έως 65°C. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται πρόσδεση- υβριδισμός των εκκινητών (primers) με τις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA (μητρικά μόρια). Αυξάνοντας τη θερμοκρασία σταδιακά αυξάνεται και η ειδικότητα του τελικού προϊόντος με αποτέλεσμα να περιορίζεται η υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων σε μη ειδικές περιοχές.

4. Στη συνέχεια η μικρή άνοδος της θερμοκρασίας στους 72°C και για 30sec εμποδίζει την προσκόλληση επιπλέον εκκινητικών μορίων και επιτρέπει την Taq polymerase να προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο, παρουσία MgCl₂ και dNTPs επεκτείνοντας την συμπληρωματική αλυσίδα του μορίου που συντίθεται. Τέλος ακολουθεί τελική επέκταση στους 70-78°C.

Τα βήματα 2-5 της διαδικασίας PCR επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους. Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων κύκλων καθορίζεται από τη συγκέντρωση του προϊόντος που ενισχύεται καθώς και από την απόδοση της PCR η οποία εξαρτάται από τη διατήρηση σταθερών των συνθηκών της. Αν ο αριθμός των κύκλων είναι μεγαλύτερος τότε αυξάνεται ο αριθμός των μη ειδικών προϊόντων ενώ αν ο αριθμός των κύκλων είναι μικρότερος τότε ο αριθμός των παραγόμενων προϊόντων είναι μικρότερος γεγονός που δεν ευνοεί την ανίχνευσή τους σε επόμενο στάδιο.

Ε) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ - ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική. Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μακρομορίων (νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών). Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το ηλεκτρικό φορτίο των μορίων και το μοριακό τους βάρος μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε κατάλληλη πηκτή. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται πηκτές αγαρόζης και πολυακρυλαμίδης. Επομένως είναι εύκολος ο διαχωρισμός δύο ή και περισσότερων τμημάτων DNA διαφορετικού μεγέθους. Σύμφωνα με το παρόν πρωτόκολλο χρησιμοποιούνται και τα δύο είδη πηκτών. Σε πρώτη φάση για την ανίχνευση των ενισχυμένων προϊόντων του DNA στόχου που προέκυψε από την αντίδραση της PCR χρησιμοποιείται η πηκτή αγαρόζης.

Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης 2% χρησιμοποιούμε τα εξής:

- Ⓢ 30ml TAE 1X (Tris-Acetic-EDTA).
- Ⓢ 0,6gr αγαρόζης
- Ⓢ 2,5μl βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

Ζυγίζουμε και τοποθετούμε 0,6gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη των 100ml αφού έχουμε προσθέσει προηγουμένως 30ml TAE. Το μίγμα αγαρόζης - TAE θερμαίνεται κατάλληλα για τη διάλυση της αγαρόζης και ακολούθως αφού αφηθεί σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί προσθήκη 2,5 μl βρωμιούχου αιθιδίου, η οποία πραγματοποιείται σε

απαγωγό εστία επειδή το τοξικό βρωμιούχο αιθίδιο λόγω και της πτητικότητάς του καθίσταται ακόμη πιο επιβλαβές. Στη συνέχεια γίνεται έκχυση του διαλύματος σε ειδικό πιάτο που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση στο οποίο τοποθετούνται ειδικές χτένες για τη δημιουργία πηγαδιών. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει μέσα στην συσκευή και να σταθεροποιηθεί για 20-30 λεπτά περίπου.

Το TAE είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως για την παρασκευή της πηκτής αгарόζης και για TAE 50X η περιεκτικότητα του κάθε συστατικού είναι:

- 1.-Tris base 121gr
- 2.-Acetic acid 28,5ml
- 3.-EDTA 0,5M 50ml

Για TAE 1X buffer χρειάζεται να γίνει ανάμιξη 20ml του 50X TAE με 980ml ddH₂O.

ΣΤ) ΦΟΡΤΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για τη φόρτωση των δειγμάτων χρειαζόμαστε:

Ⓢ 2,5μl loading buffer 6X

Το παραπάνω διάλυμα περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης, γλυκερόλη και Tris. Το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι ένα αλογονωμένο παράγωγο της φαινόλης το οποίο έχει την ιδιότητα λόγω φορτίου, να δεσμεύει όξινα μόρια, στην προκειμένη περίπτωση τα μόρια του DNA στόχου. Έτσι, δείγματα που περιέχουν αρκετή ποσότητα DNA μετά την αντίδραση PCR ανιχνεύονται στο πήκτωμα κάτω από UV. Η γλυκερόλη συμβάλλει στην καθίζηση του δείγματος μέσα στα πηγαδάκια του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης, ενώ το Tris είναι ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για τη ρύθμιση του pH του κάθε διαλύματος.

Ⓢ 5μl PCR προϊόν

Ⓢ 2μl DNA ladder (100bp). Το διάλυμα αυτό περιέχει αλληλουχίες μορίων DNA γνωστού μήκους 100 βάσεων.

Συνήθεις εργαστηριακές συνθήκες για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης είναι η εφαρμογή τάσης των 100Volt σε θερμοκρασία 25°C. Τα δείγματα τρέχουν στο πήκτωμα για χρόνο ίσο μέχρι να διανύσουν τα 2/3 της διαδρομής του πηκτώματος και αφού διανύσουν την πιο πάνω απόσταση ελέγχονται κάτω από ακτίνες UV. Τα δείγματα που δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται για ανάλυση SSCP.

Z) PCR-SSCP

Από τα θετικά δείγματα που προέκυψαν μετά την ανίχνευση σε πηκτή αφαρόζης αφαιρέθηκαν 3λ και έγινε προσθήκη αποδιατακτικού διαλύματος (denaturation buffer) 10μl το οποίο αποδιατάσσει τα δίκλιωνα μόρια του PCR προϊόντος. Μετά την αποδιάταξη πραγματοποιείται φυγοκέντρηση (spin) για λίγα δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια με εφαρμογή ενός προγράμματος της PCR για 8 λεπτά στους 96°C πραγματοποιείται πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Τα δείγματα προς το τέλος του 7^{ου} λεπτού εξέρχονται της συσκευής PCR και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο προκειμένου να μην συμβεί επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων DNA. Ακολούθως τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% με γλυκερόλη για SSCP .

Η) ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΓΙΑ SSCP

Ανάλογα με το πόσο γρήγορα είναι επιθυμητό να τρέξουν τα δείγματα και κατά πόσο ακριβή αποτελέσματα (ανίχνευση μπαντών) θέλουμε να πάρουμε χρησιμοποιούνται διαφορετικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης με συγκεντρώσεις 6%, 8% και 10%. Όσο πιο μικρό σε μήκος- αριθμό βάσεων- είναι το τμήμα του εξεταζόμενου δείγματος (μονόκλινο μόριο DNA) για SSCP τόσο πιο πυκνό θα πρέπει να είναι το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για να επιτευχθεί καλύτερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%.

Για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 10% οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

38,5% μητρικό διάλυμα	13,3 ml
50% glycerol	8,3 ml
10X TBE	4,2 ml
DdH ₂ O έως	50 ml
TEMED	66 μl
APS 20%	335 μl

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Στη συσκευή εφαρμόζεται τάση V~180Volts και τα δείγματα αφήνονται να τρέξουν στο πήκτωμα για 16-18 ώρες (over night) σε θερμοκρασία 4°C. Για την λήψη των αποτελεσμάτων ακολουθεί χρώση του πηκτώματος. Αυτό γίνεται είτε με βρωμιούχο αιθίδιο (Yap,McGee, 1992) είτε με νιτρικό άργυρο (Ainsworth et al.,1991). Στο πείραμά μας χρησιμοποιήσαμε τη χρήση νιτρικού αργύρου (Silver staining).

Θ) ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (SILVER STAINING)

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1^ο ΣΤΑΔΙΟ:

Παρασκευή διαλύματος I το οποίο περιέχει:

72ml H₂O + 8ml ethanol + 0,5ml οξικό οξύ

και έχει τελικό όγκο $V_{\text{τελ}}=400\text{ml}$. Ακολουθούν 2πλύσεις. Η κάθε μια διαρκεί χρόνο 3 min.

2^ο ΣΤΑΔΙΟ:

Παρασκευή διαλύματος II το οποίο περιέχει:

AgNO₃ 1gr/lit με τελικό όγκο $V_{\text{τελ}}= 200\text{ml}$. Η Παρασκευή του διαλύματος γίνεται με προσθήκη 1 gr AgNO₃ σε 1lt dH₂O.

Ο χρόνος που διαρκεί η πλύση είναι ~15min και ακολουθούν 2 ξεπλύματα με dH₂O

3^ο ΣΤΑΔΙΟ:

Παρασκευή διαλύματος III το οποίο περιέχει τα εξής:

3gr NaOH,

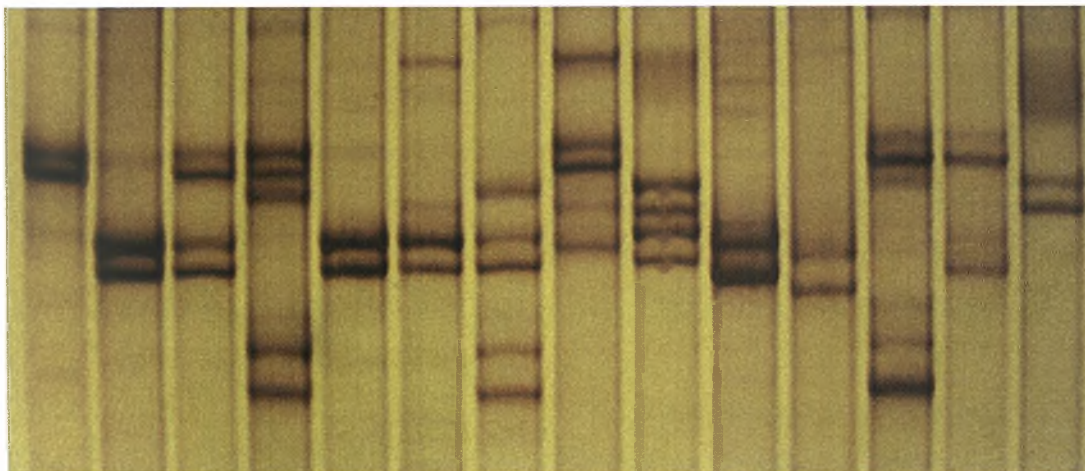
0,01gr NaHB₄

0,8ml HCHO σε τελικό όγκο $V_{\text{τελ}}= 200\text{ml}$ για χρόνο 15-20min και ακολουθεί πλύση με dH₂O.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ SSCP

Στην εικόνα που ακολουθεί απεικονίζονται πρότυπα ηλεκτροφόρησης που προέκυψαν μετά από ανάλυση SSCP για 14 από τα 108 συνολικά άτομα που εξετάστηκαν.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



1 2 * * 3 4

Εικόνα 14: Αποτελέσματα ανάλυσης SSCP 14 ατόμων.

Στο πήκτωμα διακρίνονται 12 διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης. Τα άτομα στις θέσεις 5, 6 εμφανίζουν το ίδιο πρότυπο ηλεκτροφόρησης με το άτομο στη θέση 2. Οι αριθμοί με έντονο χρώμα αντιστοιχούν πιθανώς σε πρότυπα ομοζυγωτικών ατόμων. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το άτομο στη θέση 3 που σημειώνεται με κόκκινο αστερίσκο εμφανίζει πρότυπο ηλεκτροφόρησης το οποίο προκύπτει από συνδυασμό των ζωνών των ατόμων στις θέσεις 1, 2. Με ανάλογο τρόπο το άτομο στη θέση 9 (με πράσινο αστερίσκο) εμφανίζει πρότυπο το οποίο φαίνεται να έχει προκύψει από συνδυασμό των ζωνών των ατόμων στις θέσεις 2, 14, υποδεικνύοντας τελικά ότι τα άτομα στις θέσεις 3, 9 είναι ετεροζυγωτικά. Με αντίστοιχο τρόπο εξετάστηκαν με τυχαία σειρά όλα τα δείγματα. Στο παραπάνω πήκτωμα τα υπόλοιπα άτομα όπως για παράδειγμα τα άτομα στις θέσεις 4, 7, 12 πιθανώς αντιστοιχούν σε ετεροζυγωτικά άτομα τα οποία έχουν προκύψει από συνδυασμό ζωνών προτύπων ομοζυγωτικών ατόμων που δεν υπάρχουν στο παρόν πήκτωμα. Μετά από σύγκριση όλων των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης επιλέχθηκαν τα άτομα εκείνα που εμφάνισαν καθαρά διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης τα οποία μετά από κατάλληλο καθαρισμό στάλθηκαν για ανάλυση της αλληλουχίας τους.

I) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR ΓΙΑ SEQUENCING

Ο καθαρισμός του DNA έγινε με βάση το GFX PCR DNA και Gel Band Purification Kit της Amersham Biosciences. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

α) από gel

- 1.-Ζυγίζουμε ένα άδειο eppendorf.
- 2.-Κόβουμε την μπάντα που θέλουμε να καθαρίσουμε και ζυγίζουμε αφού την τοποθετήσουμε στο eppendorf.
- 3.-Για κάθε 10mg του gel προσθέτουμε 10μl capture buffer.
- 4.-Επιάζουμε το δείγμα στους 60°C από 5-15min μέχρι να λιώσει η αγαρόζη
- 5.-Φυγοκεντρούμε το δείγμα για 30sec
- 6.-Μεταφέρουμε το δείγμα στη στήλη GFX και φυγοκεντρούμε με τη μέγιστη ταχύτητα για 30sec.
- 7.-Αδειάζουμε το διάλυμα από τη στήλη και τοποθετούμε τη στήλη GFX μέσα σε νέο σωλήνα eppendorf.
- 8.-Προσθέτουμε 500μl του wash buffer στη στήλη GFX. Φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 30sec.

9.-Προσθέτουμε 50μl ddH₂O (όχι μικρότερη ποσότητα από 10μl) μέσα στο σωλήνα eppendorf με τη στήλη GFX και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min.

11.-Φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 1min για ανάκτηση του DNA.

β) Από διάλυμα

1.-Τοποθετούμε τη στήλη GFX σε σωλήνα συλλογής για τον καθαρισμό.

2.-Προσθέτουμε 500μl του capture buffer στη στήλη GFX

3.-Μεταφέρουμε το διάλυμα DNA (100μl) στη στήλη GFX

4.-Αναμιγνύουμε τα δείγματα με την πιπέτα

5.-Φυγοκεντρούμε στη μικρή φυγόκεντρο σε μέγιστη ταχύτητα για 30 sec.

6.-Απορρίπτουμε το διάλυμα αδειάζοντας το σωλήνα συλλογής. Τοποθετούμε πάλι τη στήλη GFX στο σωλήνα συλλογής.

7.-Τοποθετούμε το wash buffer στη στήλη και φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 30 sec

8.-Απορρίπτουμε τον σωλήνα συλλογής και μεταφέρουμε τη στήλη GFX σε νέο σωλήνα eppendorf.

9.-Προσθέτουμε 50μl elution buffer (10ml Tris-HCl-pH 8.0) ή ddH₂O στη κορυφή της στήλης GFX

10.-Επωάζουμε τα δείγματα για 1min

11.-Φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 1min για ανάκτηση του καθαρισμένου DNA.

Ακολουθεί υπολογισμός της ποσότητας του PCR προϊόντος ποσοτικά με φωτόμετρο ή ποιοτικά με gel αγαρόζης.

Συνήθως στέλνουμε το DNA για sequencing σε στερεά μορφή και όχι σε διάλυμα. Γι'αυτό κατακρυσνίζουμε το DNA με αιθανόλη και sodium acetate buffer solution. Για 50μl δείγμα χρειαζόμαστε 1/10 =5μl sodium acetate buffer solution και 250μl αιθανόλη.

Τα αφήνουμε όλη τη νύχτα σε $\theta = -20^{\circ}\text{C}$ και την επόμενη φυγοκεντρούμε στους -4°C στις 13.000rpm για 20min και στεγνώνουμε τα δείγματα στους 37°C για 1ώρα.

Κ) ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (Sequencing)

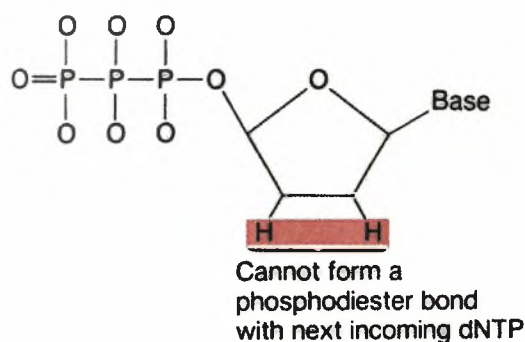
Από τα 108 δείγματα που εξετάστηκαν, μετά από ανάλυση SSCP προέκυψαν 7 διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης.

Για το σκοπό αυτό καθαρίστηκαν με το παραπάνω πρωτόκολλο και στη συνέχεια στάλθηκαν για προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA στην εταιρεία MWG. Ο

προσδιορισμός της αλληλουχίας κάθε δείγματος βασίστηκε στην τεχνική κατά Sanger (Sanger et. al, 1977).

Η μέθοδος Sanger σχεδιάστηκε για πρώτη φορά το 1975 και είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ανάλυση γονιδίων σε επίπεδο νουκλεϊνικών οξέων. Η τεχνική Sanger είναι ένα πολύτιμο εργαλείο της μοριακής βιολογίας που βρίσκει εφαρμογή σε πολλά πεδία έρευνας. Όσον αφορά τα ευκαρυωτικά γονίδια η αλληλούχιση του γονιδιώματος έδωσε τη δυνατότητα στους ερευνητές να ταυτοποιήσουν άμεσα συντηρημένες αλληλουχίες και μοτίβα αλληλουχιών και να προσδιορίσουν τη σημασία τους. Η παραπάνω διαδικασία μέχρι πρόσφατα γινόταν έμμεσα με την αλληλούχιση πρωτεϊνών και την αντιστοιχία των αμινοξέων με κομμάτια cDNA. Εκτός αυτών, όμως, σήμερα η μέθοδος απευθείας αλληλούχισης του γονιδιώματος δίνει τη δυνατότητα στους μοριακούς βιολόγους να προσδιορίσουν τη θέση στην οποία μπορεί να συμβεί μια αλλαγή σε μια βάση (point mutation).

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση 2,3 διδεοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (ddNTPs) τα οποία διαφέρουν από τα δεοξυνουκλεοτίδια διότι φέρουν ένα επιπλέον άτομο υδρογόνου (H) ενωμένο με το 3' καρβοξυ-άκρο αντί για ομάδα OH. Τα μόρια αυτά τερματίζουν την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA διότι δεν σχηματίζουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο δεοξυνουκλεοτίδιο.



Εικόνα 15:

Δομή ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου.

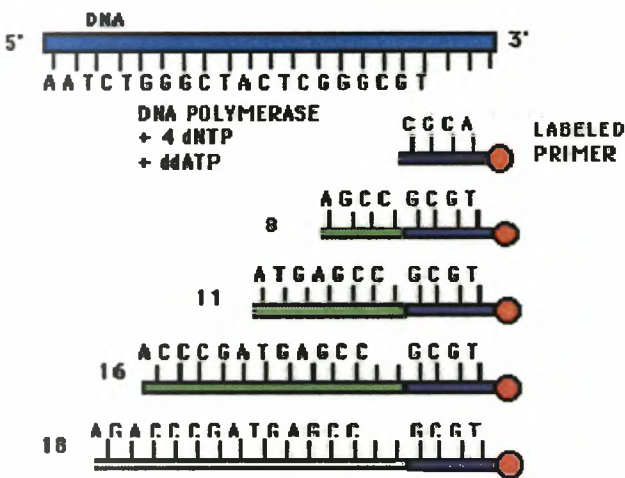
(<http://www.cas.muohio.edu/~wilsonkg/gene2005/manipulation/geneengineering/tools/fl4p23.jpg>)

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αλληλούχιση το πρώτο βήμα που ακολουθείται είναι η μετατροπή της διπλής έλικας του μορίου DNA σε μονόκλωνη αλυσίδα. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται παρουσία NaOH το οποίο αποδιατάσσει το δίκλωνο μόριο DNA. Η αντίδραση Sanger περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

A) Την αλυσίδα που υφίσταται αλληλούχιση (η οποία προκύπτει μετά από αποδιάταξη παρουσία NaOH)

B) Εκκινητικά μόρια DNA (primers), τα οποία είναι συμπληρωματικά τμήματα DNA με την αλυσίδα που υφίσταται αλληλούχιση και ραδιενεργά σημασμένα στο 5'-άκρο τους

Γ) Ένα μίγμα από συγκεκριμένα μόρια ddNTPs (πχ.ddATP) μαζί με κανονικά δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Η συγκέντρωση των ddATP δε θα πρέπει να ξεπερνά το 1% της συγκέντρωσης των dATP. Η λογική που κρύβεται πίσω από αυτό το ποσοστό συγκέντρωσης είναι ότι μετά την προσθήκη της DNA πολυμεράσης ο πολυμερισμός που λαμβάνει χώρα θα τερματίσει όταν ολόκληρη η ποσότητα των ddATP θα έχει ενσωματωθεί στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα. Αν τα ddATP αποτελούν μόνο το 1% της συνολικής ποσότητας των dATP τότε θα προκύψει μια σειρά από αλληλουχίες καθεμιά από τις οποίες θα έχει και διαφορετικό μήκος ανάλογα με τη θέση που προστίθεται η βάση στην
 εξεταζόμενη
 αλυσίδα.



Εικόνα 16: Στην εικόνα φαίνονται τα συστατικά μόρια μιας αντίδρασης Sanger καθώς και οι αλληλουχίες διαφορετικών μηκών που έχουν προκύψει.(Elizabeth Canfield, Sanger Method for DNA Sequencing, 1999)

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται τέσσερις φορές χρησιμοποιώντας κάθε φορά και διαφορετικά ddNTP. Όταν όλες οι αντιδράσεις ολοκληρωθούν τότε τα προϊόντα υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση σε ειδική πηκτή πολυακρυλαμίδης (PAGE). Στο πήκτωμα διακρίνονται 4 γραμμές καθεμιά από τις οποίες αντιστοιχεί σε μια από τις παραπάνω αντιδράσεις. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης και υπόκειται σε αυτοραδιογραφία στην οποία μόνο τα ραδιοσημασμένα 5' άκρα είναι ορατά. Στην PAGE τα μικρότερα τμήματα DNA μεταναστεύουν πιο πολύ. Συνεπώς η πρώτη ζώνη στη βάση του πηκτώματος υποδεικνύει το πρώτο διδεοξυνουκλεοτίδιο το οποίο προστέθηκε στην αντίδραση Sanger.



Στο πήκτωμα κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει συνολικά όλες τις αντιδράσεις που έχουν γίνει για κάθε ddNTP



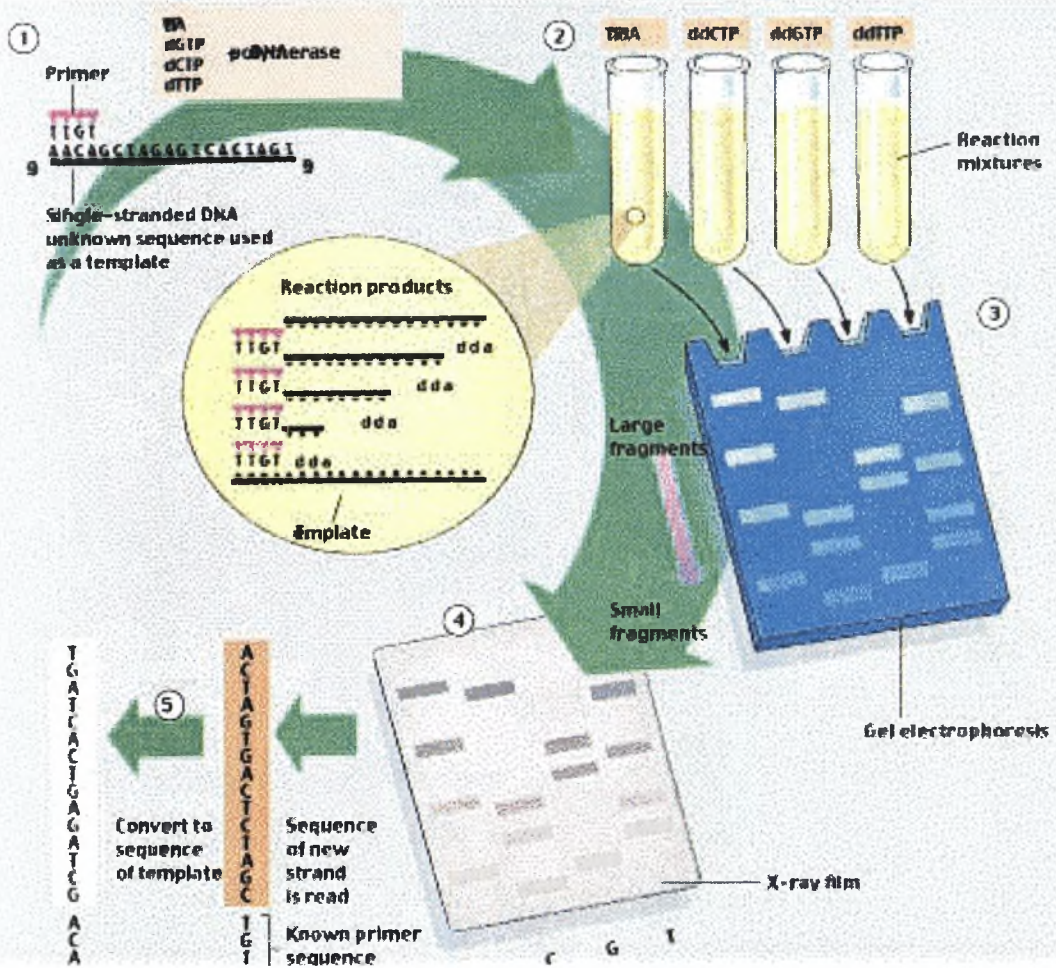
Στο πήκτωμα όλες οι αντιδράσεις απεικονίζονται σε μια γραμμή η οποία διαβάζεται από κάτω προς τα επάνω για την εύρεση της αλληλουχίας

Εικόνα 17:

Απεικόνιση σε PAGE της αλληλούχισης τμήματος DNA με τη μέθοδο Sanger

(<http://www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec3/sanger.html>)

Συνολικά, η μέθοδος Sanger φαίνεται αναλυτικά στην παρακάτω εικόνα.

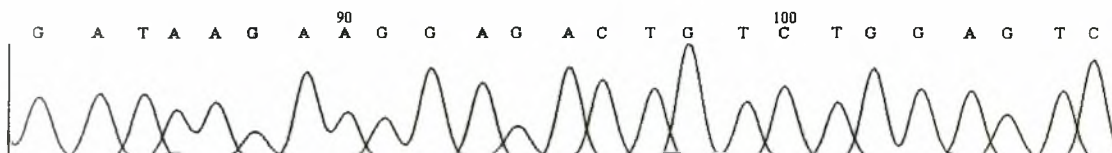


Εικόνα 18: Η μέθοδος αλληλούχισης του DNA, βάση της τεχνικής κατά Sanger (<http://www.txtwriter.com/Backgrounders/graphics/genetech/RAV18.12L.GIF>)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα: BIOEDIT 7.0, CLUSTAL X 1.8, TREEVIEW. Μετά την ανάλυση των αλληλουχιών (sequencing) και τη χρήση του προγράμματος Bioedit 7.0 προέκυψαν τελικά 17 διαφορετικές ακολουθίες του γονιδίου DQA των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε σύνολο 108 ατόμων που εξετάστηκαν (Πίνακας 2).



Εικόνα 19: Στην εικόνα φαίνεται το χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από ανάλυση ενός τυχαίου τμήματος μιας ακολουθίας (sequencing) με τη βοήθεια του προγράμματος Bioedit 7.0

Οι αλληλουχίες των 17 προτύπων ηλεκτροφόρησης ομοπαρατέθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος CLUSTAL X 1.8. (Thomson et al., 1997). Το πρόγραμμα αυτό είναι πρόγραμμα πολλαπλής ομοπαραθέσης που εμφανίζει πάνω στην οθόνη όλες τις επιλεγμένες αλληλουχίες και ομοπαραθέσεις κατά ζεύγη αναζητώντας ομοιότητες μεταξύ των αλληλουχιών. Στην επιφάνεια εργασίας οι συντηρημένες ακολουθίες χρωματίζονται με τη βοήθεια χρωματιστού προγράμματος το οποίο είναι ενσωματωμένο ενώ η ομοιότητα των χαρακτήρων για όλες τις αλληλουχίες που ομοπαρατέθηκαν φαίνεται ως τελεία. Στόχος του προγράμματος και των επιλογών που διαθέτει ο κατάλογος του προγράμματος είναι η ανεύρεση όσον το δυνατόν μεγαλύτερου αριθμού ομοιοτήτων και η στοίχιση των αλληλουχιών ώστε οι όμοιοι χαρακτήρες να βρίσκονται στην ίδια στήλη.

	10	20	30	40	50	60	70	80
<u><i>Or unicusulus</i></u>							
	T T C A T C A G C T G A C C A C G T T G G C T C C S T A T G G C A T A A A C G T C T A C C A G T C T T A T G G T C C C T C T G G C C A G T A C A C C C A T G A A T T T G A T G G							
<u>Allele 1</u>	G T G A A T							
<u>Allele 2</u>	G T G							
<u>Allele 3</u>	G G A T A A T T							
<u>Allele 4</u>	G T G							
<u>Allele 5</u>	G T G							
<u>Allele 6</u>	G A A							
<u>Allele 7</u>	G C A A T							

	150	160	170	180	190	200	210	220
<u><i>Or unicusulus</i></u>							
	C C T A T G T T T C G C G A A T T T A G A A G T T T T G A T C C C A C A G G G T G C A C T G G G A A A C A T A G C C C A G C A A A A T A C A C C T T G G A C A T C A T C A T T A							
<u>Allele 1</u>	... G A G A G A G A T A C G G							
<u>Allele 2</u>	... G A A A G G C C A G A T G G G							
<u>Allele 3</u>	... G A A A G C A G A G G T A A A C G G							
<u>Allele 4</u>	... G A A A G G C							
<u>Allele 5</u>	... G A A A G G C C G G C G							
<u>Allele 6</u>	... G A A A G C							
<u>Allele 7</u>	... G A A A G C A G A G G T A C A A C G G							

Εικόνα 20: Αποτέλεσμα πολλαπλής ομοπαράθεσης των 7 προτύπων ηλεκτροφόρησης λαγών και ενός προτύπου ηλεκτροφόρησης κουνελιού του είδους: *Oryctolagus cuniculus*

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Μετά από πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών των ατόμων που στάλθηκαν για sequencing οι 17 αλληλουχίες που προέκυψαν είχαν μήκος 264 νουκλεοτιδίων. Οι παραπάνω αλληλουχίες που συνολικά αντιστοιχούν σε 17 διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης έχουν προκύψει από 7 διαφορετικούς απλότυπους.

Τα παραπάνω πρότυπα με τη σειρά τους ομαδοποιήθηκαν όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 2: Ομαδοποίηση των 108 εξεταζόμενων ατόμων σε 17 διαφορετικά πρότυπα.

ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 1	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 2	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 3	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 4	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 5
Ολίτσικα Ζαλ. 10	Άρτα 1	Άρτα 4	Βελεστίνο 1	Νεοχώρι 1
Ολίτσικα Ζαλ. 11	Άρτα 3	Ανώγειο Άρτας 2		
Ολίτσικα Ζαλ. 14	Αμπέλια Άρτας 1	Σμόλικας 1		
Ζάλογγο 7	Λ.7-Άρτα	Κόζιακας 1		
Λ.11-Ζαγόρι	Λ.17-Άρτα	Δέση 3		
Λ.26-Ιωάννινα	Ολίτσικα Ζάλ. 16	Δέση 4		
Λυγό Ιωαν. 3	Ζάλογγο 1	Δέση 6		
Σμόλικας 4	Ζάλογγο 2	Πύρρα 7		
Βραδέτο 5	Ζάλογγο 4			
Λγ.Παρασκευή 2	Λ.8-Ζαγόρι			
Αετομίλιτσα 1	Λ.27-Ιωάννινα			
Κάπουρνα 8	Λυγό Ιωαν. 4			
Κάπουρνα 9	Λυγό Ιωαν. 5			
Μαγνησία 1	Σμόλικας 2			
Μαγνησία 12	Βραδέτο 1			
Λ.43-Βόλος	Βραδέτο 6			
Λ.34-Καλαμπάκα	Βραδέτο 10			
Λ.36-Καλαμπάκα	Βραδέτο 11			
Λ.37-Καλαμπάκα	Γυφτ. Ζαγόρι 7			
Λ.38-Καλαμπάκα	Ιωάννινα 1			
Λ.39-Καλαμπάκα	Ιωάννινα 2			
Λ.40-Καλαμπάκα	Ιωάννινα 3			
Μαρώσα 2	Κάπουρνα 10			
Μεσοχ. Τρικάλων 1	Μαγνησία 2			
Παλαιοχ. Τρικάλων 4	Μαγνησία 5			
Δέση 7	Μαγνησία 7			

Δέση 8	Μαγνησία 8			
Πύρρα 6 - Κανάλια	Βόλος 1			
	Βόλος 2			
	Λ.28-Τρίκαλα			
	Μεσοχ. Τρικάλων 3			
	Μεσοχ. Τρικάλων 5			
	Μεσοχ. Τρικάλων 9			
	Μεσοχ. Τρικάλων 11			
	Κόζιακας 3			
	Νεοχώρι 2			
	Πύρρα 9			

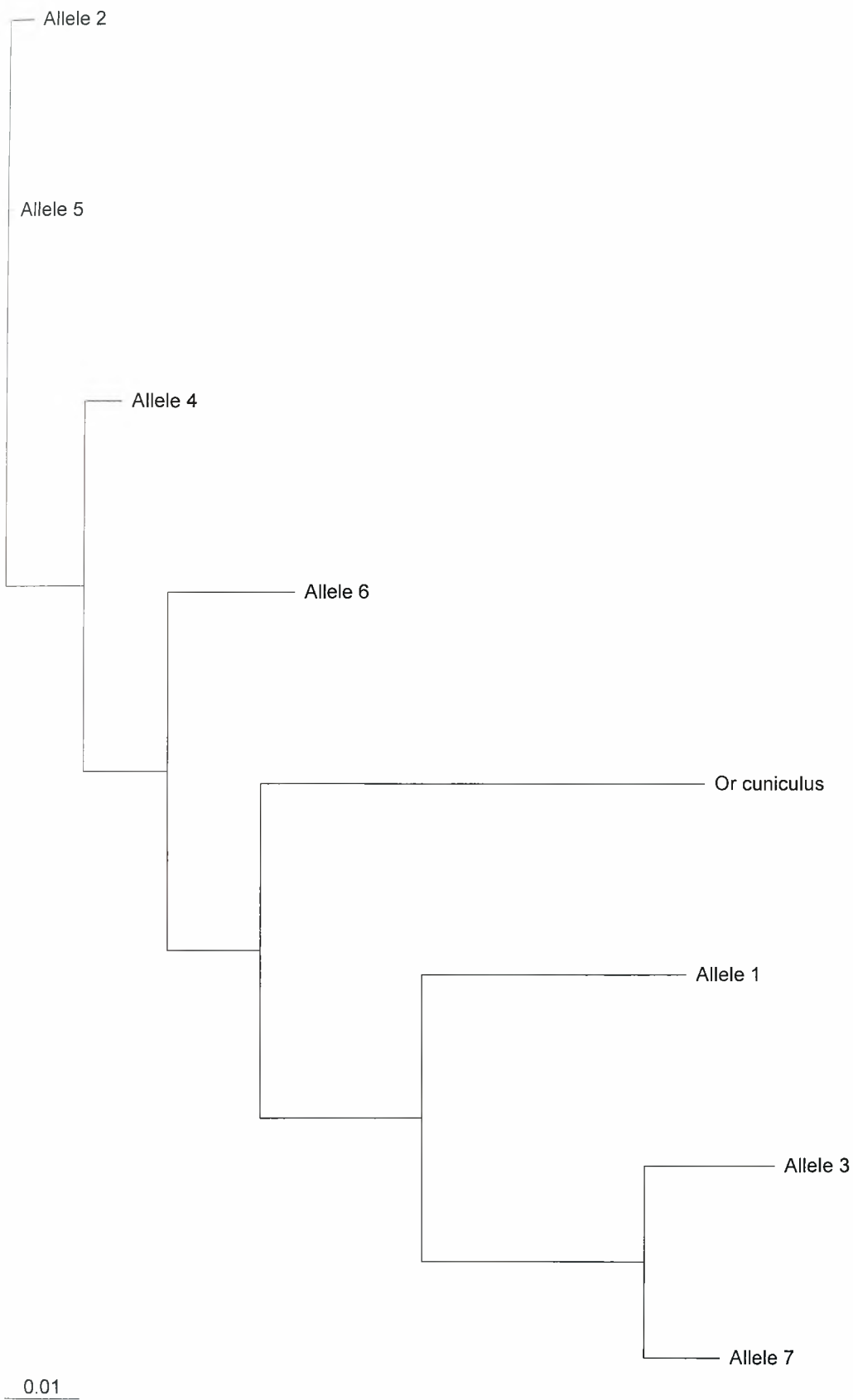
ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 6	ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 7	ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 8(2+7)	ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 9(2+3)	ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 10(1+2)	ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 11(3+6)
Λ.9-Ζαγόρι		Άρτα 2	Καταράκτης Άρτας 1	Αυλότοπος Άρτας 1	Μυρσίνη Πρεβ.1
		Μαρώσα 1	Πατιόπουλο Άρτας 1	Άγναντα Άρτας 1	Ζάλογγο 8
			Καναλάκι Πρεβ.4	Ανώγειο Άρτας 1	Δέση 9
			Αγ.Παρασκευή 1	Λ.29-Άρτα	
			Μαγνησία 4	Λ.1-Ζαγόρι	
				Λ.10-Ζαγόρι	
				Σμόλικας 3	
				Βραδέτο 3	

ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 12(1+3)	ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 13(3+4)	ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 14(4+7)	ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 15(2+6)	ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 16(2+4)	ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ 17(4+6)
Σαλανίκη Πρεβ. 1	Λ.6-Άρτα	Λ.2-Ζαγόρι	Μαγνησία 3	Μαγνησία 6	Λ.44-Βόλος
Λ.4-Άρτα	Βελεστίνο 2		Βελεστίνο 5		
Καναλάκι Πρεβ.1					
Ζάλογγο 3					
Λυγό Ιωαν. 2					
Βελεστίνο 6					
Λ.41- Καλαμπάκα					

Παρατηρήσεις του Πίνακα 2:

- 1) Οι απλότυποι σε λευκό πλαίσιο αντιστοιχούν σε αλληλουχίες ετεροζυγωτικών ατόμων που έχουν προκύψει μετά από sequencing, ενώ οι απλότυποι σε πράσινο πλαίσιο αντιστοιχούν σε αλληλουχίες ομοζυγωτικών ατόμων.
- 2) Τα ετεροζυγωτικά άτομα στο πρόγραμμα που εκτελεί ομοπαράθεση διακρίνονται από τα ομοζυγωτικά επειδή στην νουκλεοτιδική αλληλουχία οι βάσεις που δεν διαβάζονται ευδιάκριτα [εμφανίζονται στο χρωματογράφημα με δύο κορυφές (peak)] συμβολίζονται με N.
- 3) Οι χρωματισμοί αντιστοιχούν στις γεωγραφικές περιοχές από τις οποίες ελήφθησαν τα δείγματα.

Αποκλείοντας τους απλότυπους των ετεροζυγωτικών ατόμων και συγκρίνοντας τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ομοζυγωτικών με τη μέθοδο Neighbor Joining κατασκευάστηκε ένα δενδρόγραμμα και υπολογίστηκαν οι αποστάσεις μεταξύ των ακολουθιών των ομοζυγωτικών ατόμων οι οποίες ομοπαράτέθηκαν και οι οποίες φανερώνουν την ποσοστιαία ποικιλότητα των προτύπων. Για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της πολλαπλής ομοπαράθεσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Treewiew. Από την ομοπαράθεση προέκυψαν επτά διαφορετικοί απλότυποι. Εδώ, πρέπει να αναφερθεί ότι κάθε κλάδος μιας ομάδας αντιπροσωπεύει διαφορετικό απλότυπο και το μήκος σε κάθε κλάδο μιας ομάδας είναι διαφορετικό, γεγονός που αντιστοιχεί στον διαφορετικό εξελικτικό ρυθμό που παρουσιάζουν τα άτομα που περιλαμβάνει ο κάθε απλότυπος όπως προκύπτει από τον πίνακα 2. Στο φυλογενετικό διάγραμμα τοποθετήσαμε και το κουνέλι *Oryctolagus cuniculus* για να συγκρίνουμε εξελικτικά με τα πρότυπα των λαγών *L. Europaeus*. Απ' ότι παρατηρούμαι στην παρακάτω εικόνα το κουνέλι εξελικτικά μοιάζει με αρκετά πρότυπα λαγών.



Εικόνα 21: Φυλογενετικό διάγραμμα των 7 απλοτύπων των λαγών και τους ενός απλότυπου του κουνελιού: *Oryctolagus cuniculus* με τη χρήση του Tree view.

Πίνακας 3: Όπως είναι γνωστό οι αλληλουχίες των εξεταζόμενων προτύπων έχουν μέγεθος 264 νουκλεοτίδια. Με τη βοήθεια εφαρμογής του προγράμματος Bioedit 7.0 υπολογίστηκε συνολικά πόσες φορές επαναλαμβάνεται σε κάθε απλότυπο κάθε ένα από τα τέσσερα διαφορετικά νουκλεοτίδια καθώς και ο λόγος G+C /A+T για κάθε απλότυπο.

Απλότυπος	A	C	G	T	G+C(%)	A+T(%)
Or.cuniculus	73	64	59	68	46,59	53,41
Απλότυπος 1	75	56	63	70	45,08	54,92
Απλότυπος 2	72	62	62	68	46,97	53,03
Απλότυπος 3	78	53	60	73	42,80	57,20
Απλότυπος 4	74	61	61	68	46,21	53,79
Απλότυπος 5	71	63	62	68	47,35	52,65
Απλότυπος 6	77	61	57	69	44,70	55,30
Απλότυπος 7	77	57	59	71	43,94	56,06

Πίνακας 4: Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι 17 απλότυποι σε σχέση με την περιοχή που εμφανίζονται.. Ο σταυρός (+) συμβολίζει ότι στη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή εμφανίζεται ο αντίστοιχος απλότυπος που βλέπουμε από την πρώτη στήλη. Ο απλότυπος 1 και 2 που είναι ομοζυγώτες αλλά και ο απλότυπος 12 που είναι ετεροζυγώτης εμφανίζεται και στις 4 περιοχές.

ΑΠΛΟΤΥΠΟΙ	ΗΠΕΙΡΟΣ		ΘΕΣΣΑΛΙΑ	
	Ν. ΑΡΤΑΣ	Ν. ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	Ν. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	Ν. ΤΡΙΚΑΛΩΝ
	1	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+		+
4			+	
5				+
6		+		
7				
8	+			+
9	+	+	+	
10	+	+		
11	+			+
12	+	+	+	+
13	+		+	
14		+		
15			+	
16			+	
17			+	

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διατήρηση της γενετικής σύστασης ενός ζωϊκού είδους αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα θέματα που απασχολούν τη σύγχρονη βιολογία ήδη από τη δεκαετία του 1950 (Simon, 1984). Βιολογικοί, οικονομικοί, ηθολογικοί και συναισθηματικής φύσεως είναι μερικοί από τους λόγους που δικαιολογούν την πρωτοβουλία επιστημόνων οι οποίοι επιχειρούν την εύρεση μεθόδων ώστε να αποφεύγεται η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας των φυσικών πληθυσμών η οποία είναι απαραίτητη για την διατήρηση αυτόχθονων πληθυσμών. Από προηγούμενες μελέτες έχειδειχθεί ότι η γενετική ποικιλότητα στο είδος *L. europeaus* στον Ελλαδικό χώρο έχει επηρεαστεί από προγράμματα εμπλουτισμών και έχει προταθεί ότι όταν αυτά πραγματοποιούνται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες και σε περιόδους που οι φυσικοί πληθυσμοί δεν διέρχονται από φάσεις μείωσης των πληθυσμιακών μεγεθών, αυξάνουν τη γενετική ποικιλομορφία καθώς προκαλείται ανάμειξη των γονιδιακών δεξαμενών. Όταν όμως οι απελευθερώσεις γίνονται ανεξέλεγκτα τότε μπορούν να επηρεάσουν και να μειώσουν τη γενετική ποικιλομορφία. Στην παρούσα μελέτη στόχος ήταν να προσδιοριστεί εάν και κατά πόσο η ποικιλομορφία στο μόριο του MHC II και στον γονιδιακό τόπο DQA (εξόνιο 2) του είδους *L. europeaus* επηρεάζεται από την παρουσία παθογόνων και να προταθούν μηχανισμοί που πιθανώς συμβάλλουν στη διατήρηση της ποικιλομορφίας του μορίου. Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι οι πληθυσμοί του είδους *L. europeaus* στον Ελλαδικό χώρο εμφανίζουν εκτεταμένο γενετικό πολυμορφισμό στο γονίδιο DQA του MHC II όπως φάνηκε από τον αριθμό των διαφορετικών απλοτύπων και τον υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας. Σε ελληνικούς πληθυσμούς του είδους *L. europeaus* ταυτοποιήθηκαν 17 διαφορετικοί απλότυποι και ο αριθμός αυτός είναι συγκριτικά μεγαλύτερος από τον αριθμό των διαφορετικών απλοτύπων για τον ίδιο γονιδιακό τόπο που έχει βρεθεί από αντίστοιχες μελέτες που έχουν γίνει σε άλλα είδη θηλαστικών πχ. σε μηρυκαστικά και σε πληθυσμούς από ελάφια του είδους *Moschus moschiferus*, *Alces Americana*, *Cervus elaphus* (Mikko et al., 1995;1997) και σε ζαρκάδια του γένους *Capreolus capreolous* (Swarbrick et al., 1995). Ο μεγάλος βαθμός γενετικής ποικιλομορφίας ο οποίος είναι σύμφωνος με προηγούμενα δεδομένα πάνω στη γενετική ποικιλομορφία του mtDNA στο άτομα του ίδιου είδους, αποδεικνύει ότι υπάρχει μεγάλο γενετικό απόθεμα όσον αφορά το πυρηνικό γονιδίωμα.

Ποικιλομορφία μεταξύ των απλοτύπων

Παρατηρούμε ότι τα άτομα που εξετάστηκαν παρουσίασαν υψηλό ποσοστό ποικιλομορφίας το οποίο κυμαίνεται σε 15,7% (από τα 108 άτομα προέκυψαν 17 διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης), δηλαδή συνολικά ανά έξι περίπου άτομα εμφανίζεται διαφορετικό πρότυπο. Στα 108 συνολικά άτομα τα 85 ήταν φυσιολογικά (ομοζυγωτικά-ετεροζυγωτικά) ενώ τα 23 που εξετάστηκαν ήταν παθολογικά (θετικά στο σύνδρομο)(ομοζυγωτικά-ετεροζυγωτικά). Επίσης ο λόγος των ομοζυγωτικών παθολογικών ατόμων προς τα ετεροζυγωτικά παθολογικά άτομα είναι $15/8 > 1$. Το γεγονός ότι τα παθολογικά άτομα που είναι ομόζυγα ως προς μια μορφή αλληλομόρφων είναι περισσότερα σε αριθμό ενισχύει την άποψη ότι τα άτομα αυτά είναι επιρρεπή σε παθογόνα και εκδηλώνουν σίγουρα το σύνδρομο σε αντίθεση με τα ετεροζυγωτικά που καθίστανται παθολογικά κάτω από την επίδραση ειδικών συνθηκών. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 1 τα περισσότερα παθολογικά άτομα που είναι ομόζυγα αντιστοιχούν στους απλοτύπους 1 και 2.

Επίσης στα 17 διαφορετικά πρότυπα που προέκυψαν, τα 7 από αυτά αντιστοιχούν σε ομοζυγωτικά άτομα (ποσοστό 41%), απλότυποι No 1, No 2, No 3, No 4, No 5, No 6, No 7, ενώ οι υπόλοιποι 10 απλότυποι ανήκουν σε ετεροζυγωτικά άτομα (ποσοστό 59%) και είναι οι απλότυποι No 8, No 9, No 10, No 11, No 12, No 13, No 14, No 15, No 16 και No 157. Το υψηλό ποσοστό των ετεροζυγωτικών ατόμων στο σύνολο των δειγμάτων μας, πιθανώς δικαιολογεί ότι τα ετερόζυγα άτομα για το συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο του εξονίου 2 του γονιδίου DQA είναι ικανά να προσδένουν και να παρουσιάζουν μια ευρύτερη ποικιλία αντιγονικών πεπτιδίων σε σύγκριση με τα ομοζυγωτικά άτομα. Η αρμοστικότητα τους είναι μεγαλύτερη και κατά συνέπεια είναι ικανά να αναπτύσσουν έντονη ανοσοποιητική απόκριση και περισσότερο ανθεκτικά έναντι σε μεγαλύτερη ποικιλία παθογόνων. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με την υπόθεση της υπερκυριαρχίας του ετεροζυγώτη (overdominance selection), ωστόσο, δεν μπορούμε με σιγουριά να γενικεύσουμε τα αποτελέσματα για το είδος *L.europeaus* διότι και σε άλλους φυσικούς πληθυσμούς διαφόρων ειδών, τα άτομα είναι ετερόζυγα για τον συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο του MHC II, χωρίς ωστόσο να ασκείται επιλογή από την παρουσία παθογόνων.

Θα πρέπει επίσης να τονιστεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων είναι αρκετά μικρός και είναι πιθανό να μην αντιπροσωπεύει το σύνολο για την ποικιλομορφία των πληθυσμών. Για το λόγο αυτό πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα για το ποσοστό της ποικιλομορφίας των απλοτύπων λαμβάνονται όταν ξεχωρίσουμε τους

απλότυπους των ομοζυγωτικών ατόμων από εκείνους των ετεροζυγωτικών στο σύνολο των δειγμάτων. Οι απλότυποι των ετεροζυγωτικών ατόμων θα πρέπει να κλώνοποιηθούν σε κατάλληλα πλασμίδια και να υποβληθούν σε αλληλούχιση (sequencing) εκ νέου ώστε να ταυτοποιηθεί η θέση της σημειακής μετάλλαξης στα δύο αλληλόμορφα που δημιουργεί τη διαφορετικότητα των απλοτύπων

Επίσης, πρέπει να αναφέρουμε ότι όπως φαίνεται από τον πίνακα 2, τα περισσότερα θετικά άτομα στο σύνδρομο του EBHS εμφανίζουν τους απλότυπους 1 και 2 όπως και το μεγαλύτερο ποσοστό των φυσιολογικών ατόμων. Έτσι, τα παθολογικά άτομα με απλοτύπους 1 & 2 αντιστοιχούν σε ποσοστό 61% στο σύνολο των παθολογικών ατόμων και 13% στο σύνολο των δειγμάτων που ελέγχθησαν, ενώ τα φυσιολογικά άτομα με τους ίδιους απλότυπους αντιπροσωπεύουν ποσοστό 53% στο σύνολο των φυσιολογικών ατόμων και 49% στο σύνολο των δειγμάτων.

Τα θετικά άτομα στο σύνδρομο που περιλαμβάνονται στους απλότυπους 1 και 2 προέρχονται από όλες τις περιοχές που έχουμε δείγματα (Άρτα, Ιωάννινα, Μαγνησία και Τρίκαλα). Οι παραπάνω απλότυποι βέβαια ανήκουν σε δύο διαφορετικές ομάδες όπως φαίνονται στο φυλογενετικό διάγραμμα με πιο πρόσφατο από άποψη εξελικτικού ρυθμού τον απλότυπο 1.

Ποικιλομορφία μεταξύ των πληθυσμών

Αν και ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν είναι σχετικά μικρός αλλά και το γεγονός ότι από κάθε γεωγραφική περιοχή δεν εξετάστηκε ίδιος αριθμός ατόμων ώστε να μπορούμε να μιλήσουμε συγκριτικά και να οδηγηθούμε σε ξεκάθαρα και γενικευμένα αποτελέσματα όσον αφορά την ποικιλομορφία των πληθυσμών παρατηρούμε ότι τα άτομα από Άρτα και Μαγνησία εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό διαφορετικών απλοτύπων

Αν και δεν υπάρχουν φυσικοί φραγμοί που να εμποδίζουν τη γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών που προέρχονται από περιοχές της Θεσσαλίας, μπορούμε να υποθέσουμε ότι μη- επιλεκτικοί παράγοντες πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ποικιλομορφίας σε αυτό τον γονιδιακό τόπο. Η παραπάνω υπόθεση μπορεί να ενισχυθεί από ευρύματα των Mamuris et al. 2001 οι οποίοι σε άρθρο τους πάνω στην μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού των λαγών *L.europeaus* σε επίπεδο mtDNA αναφέρουν ότι σε ανάλογα δείγματα που λήφθηκαν από τις ανωτέρω περιοχές παρατηρείται αντίστοιχη ποικιλομορφία μεταξύ των απλοτύπων και αυτό διότι τα τελευταία 10 χρόνια άτομα του είδους που εισήχθησαν

από περιοχές της Ευρώπης και εκτράφηκαν σε ελληνικές φάρμες, στη συνέχεια απελευθερώθηκαν σε περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας. Παρατηρούμε έτσι, ότι η γενετική ποικιλομορφία του γονιδιακού τόπου DQA είναι ανεξάρτητη από τις γεωγραφικές αποστάσεις

Από τον πίνακα 5 φαίνεται ότι οι πιο κοινοί απλότυποι είναι ο απλότυπος 1, ο 2 και ο 12 οι οποίοι παρατηρήθηκαν σε όλες τις περιοχές που εξετάστηκαν, ενώ ο απλότυπος 7 και σύμφωνα με τον πίνακα δεν εμφανίζεται σε καμία περιοχή. Εδώ βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν ελήφθησαν δείγματα από πολλές περιοχές της Ελλάδας.

Από την ανάλυση των δεδομένων προέκυψε ότι τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα παθολογικά άτομα εμφανίζουν χαρακτηριστικά και με μεγαλύτερη συχνότητα δύο συγκεκριμένους απλότυπους. Ωστόσο, δεν μπορούμε με σιγουριά να πούμε ότι η μείωση των πληθυσμών που παρατηρείται στο είδος οφείλεται στο σύνδρομο και αυτό διότι στη παρούσα μελέτη, μελετήσαμε μόνο έναν γονιδιακό τόπο του MHC II από τον αρκετά μεγάλο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσοποιητική απόκριση, ο οποίος φάνηκε ότι είναι εξαιρετικά πολυμορφικός.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Βασική Ανοσολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα 2004, p.59-66.
- Alberts S.C., Thirteen MHC-DQA1 alleles from two populations of baboons, *Immunogenetics* (1999) 49:825-827
- Alves PC, Branco M, Matias O, Ferrand N., New genetic variation in European hares, *Lepus granatensis* and *L. europaeus.*, *Biochem Genet.* 2000 Apr;38(3-4):87-96.
- Antunes G. Susana et al., The common marmoset: A new world primate species with limited MHC class II variability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.95, pp. 11745-11750, (1998)
- Bach, E. A., M. Aguet, R. D. Schreiber. 1997. The IFN- γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15:563.
- Bansfield, A. (1974). *Mammals of Canada*. Toronto: University of Toronto Press
- Bellocq J.G. et al., Allelic diversity at the MHC-DQA locus of woodmouse populations (*Apodemus sylvaticus*) present in the islands and mainland of the northern Mediterranean, *Global Ecology and Biogeography*, (2005) 14, 115-122
- Belov K. et al., Marsupial MHC Class II b genes are not orthologous to the Eutherian b gene families, *Journal of Heredity* 2004:95(4):338-345
- Bernatchez L., Landry C., MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J.Evol.Biol.* 16 (2003) 363-377
- Billinis C. et al., European Brown Hare Syndrome in Wild European Brown Hares from Greece, *Journal of Wildlife Diseases*, 41(4), 2005, pp. 783-786
- Bonino, N., A. Montenegro. 1997. Reproduction of the European hare in Pantagonia, Argentina. *Acta Theriologica*, 42(1): 47-54.
- Borino, N., Montenegro, A. (1997). Reproduction of the European Hare in Pantagonia, Argentina. *Acta Theriologica*, 42 (1): 47-54
- Bowen Elizabeth et al., Immunogenetics and disease in the California Sea Lion (*Zalophus Californianus*), 2003
- Broekhuizen, S., F. Maaskamp. 1980. Behaviour of does and leverets of the European hare (*Lepus europaeus*) whilst nursing. *J. Zool. Lond.*, 191: 487-501.
- Brown JH, Jardedtsky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993), Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1, *Nature* 364: 33- 39

Caillol, M., M. Meunier, M. Mondain-Monval, P. Simon. 1988. Seasonal variations in testis size, testosterone and LH basal levels, and pituitary response to luteinizing hormone releasing hormone in the brown hare, *Lepus europaeus*. *Can. J. Zool.*, 67: 1626-1630.

Chasey D., Lucas M., Westcott D., Williams M. (1992) European brown hare Syndrome in the U.K.; a calicivirus related to but distinct from that of viral hemorrhagic disease in rabbits. *Arch. Virol.* 124: 363-370

Dixon, B., S.H.M.van Erp, P.N. S. Rodrigues, E. Egberts, and R. J. M. Stet. 1995. Fish major histocompatibility complex genes: an expansion. *Developmental and Comparative Immunology* 19:109-133

Duff JP et al., European brown hare syndrome in England, *The Veterinary Record*, Vol 134, Issue 26, 669-673

Ellegren H, Mikko S, Wallin K, Andersson L, Limited polymorphism at major histocompatibility complex (MHC) loci in the Swedish moose *A. alces*, *Mol Ecol.* 1996 Feb;5(1):3-9.

Edwards, S.V., and W. Hedrick. 1998. Evolution and ecology of MHC molecules from genomics to sexual selection. *Trends in ecology and evolution* 13: 305-311

Fain M.A. et al. Improved typing procedure for the polymorphic single-copy RLA-DQA gene of the rabbit reveals a new allele. *Tissue Antigens*; 2001;57:332-338

Flugge Perris, Fuchs Eberhard, Gunther Eberhard, MHC class I genes of the tree shrew *Tupaia belangeri*, *Immunogenetics* (2002) 53:984-988

Frölich K. et al., European brown hare syndrome virus in free-ranging European brown hares from Argentina, *Journal of Wildlife Diseases*: Vol. 39, No. 1, pp. 121-124.

Gall G.L. et al., European brown hare syndrome virus: molecular cloning and sequencing of the genome, *Journal of General Virology*, Vol 77, 1693-1697

Gavier-widen D, Morner T- : Epidemiology and diagnosis of EBHS in Scandinavian countries: a review, *Sci Tech* 1991 Jun; 10(2) 453-8

Gustavo A. Gutierrez-Espeleta, Philip W. Hedrick, Steven T.Kalinowski, Daniel Garrigan & Walter M. Boyce, Is the decline of desert bighorn sheep from infectious disease the result of low MHC variation, *Heredity* 86 (2001) 439-450

Hall, E., K. Kelson. 1959. *Mammals of North America*. New York: The Ronald Press Co..

Hamilton, W., J. Whitaker. 1943. *Mammals of the Eastern United States*. 2nd ed. Ithica, NY: Cornell University Press.

- Hartl, G. B., Suckentrunk, F., Nadlinger, K. and Willing, R. (1993). An integrative analysis of genetic differentiation in the brown hare *Lepus europeus* based on morphology, allozymes and mitochondrial DNA. *Acta Theriologica* 38, Suppl. 2:33-57.
- Hedrick PW (1994) Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *Am Nat* 143:945-964
- Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM: Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352:595, 1991
- Hoelzel A. Rus, Stephens J. Claiborne, O'Brien J. Stephen, Molecular Genetic Diversity and Evolution at the MHC DQB Locus in Four Species of Pinnipeds, *Mol. Biol. Evol.* 16(5): 611-618, 1999
- Hugnes Al, Nei M: Evolutionary relationships of class II major histocompatibility complex genes in mammals. *Molecular Biology & Evolution* 7: 491, 1990
- Klein J (1986) Natural History of the major Histocompatibility complex
- Klein J, o; hUigin C: Composite origin of the major histocompatibility complex genes [Review]. *Current Opinio in Genetics & Developmnet* 3: 923, 1993
- Klein J, Sato A: Birth of the major histocompatibility complex. *Scandinavian Journal of Immunology* 47: 199, 1998
- Lincoln, G. 1974. Reproduction and March madness in the Brown hare, *Lepus europaeus*. *J. Zool. Lond.*, 174: 1-14.
- Laurent S. et al., Structural, antigenic and immunogenic relationships between European brown hare syndrome virus and rabbit haemorrhagic disease virus, *J Gen Virol.* 1997 Nov;78 (Pt 11):2803-11.
- Lavazza A. et al., Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions, *Zentralbl Veterinarmed B.* 1996 Sep;43(7):401-10.
- Leontides, s., Psychas, V., Kanteres, D. And Gogos, C (1999). European brown hare Syndrome (necrotic hepatitis) in farmed and wild hares. *Proc. 8th Hellenic Veterinary congress, Athens, 199, p 63*
- Marcato PS, Benazzi C, Yecchi G, Galleoti M, Della Saldal, Sarli G, Lucidi P. “ Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and EBHS”, *Sci Tech*, 1991 Jun; 10(2)Q 371-92
- Matsugana T, Rahman a: What brought the adaptive immune system to vertebrates? *Immunological Reviews* 166: 177, 1998

Mikko, S, Roed, K., Schmutz, S. and Andersson, L. 1999. Monomorphism and polymorphism at MHC DRB loci in domestic and wild ruminants. *Immunol. Rev.*, 167: 169-178

Nei M, Huges AL (1991) Polymorphism and evolution of the major histocompatibility complex loci in mammals. In Selander RK, Clark AG, Whittam TS eds* *Evolution at the molecular level*. Sinauer, Sunderland, Mass, pp 222-247

Nowotny N. et al., Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene, *Arch Virol.* 1997;142(4):657-73.

Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E., HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII, 1997 Feb;77(2):238-42.

Paterson S, Wilson K, Pemberton JM: Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:3714, 1998

Perez-Suarez G, Palacios F, Boursot P., Speciation and paraphyly in western Mediterranean hares (*Lepus castroviejoi*, *L. europaeus*, *L. granatensis*, and *L. capensis*) revealed by mitochondrial DNA phylogeny, *Biochem Genet.* 1994 Dec; 32(11-12):423-36.

Peterson, R., (1966) *The mammals of the Eastern Canada*. Oxford University Press

Poli, A., M. Nigro, D. Gallazi, G. Sironi, A. Lavazza. 1991. Acute hepatitis in the European brown hare (*Lepus europaeus*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 27(4): 621-629.

Polvi A, Garden OA, Elwood CM, Sorensen SH, Batt RM, Maki M, Partanen J., Canine major histocompatibility complex genes DQA and DQB in Irish setter dogs, *Tissue Antigens*, 1997 Mar;49(3 Pt 1):236-43.

Riley EM, Olerup O, Bennett S, Rowe P, Allen SJ, Blackman MJ, Troye-Blomberg M, Holder AA, Greenwood BM., MHC and malaria: the relationship between HLA class II alleles and immune responses to *Plasmodium falciparum*, *Int Immunol.* 1992 Sep;4(9):1055-63.

Roitt I., Brostoff J., Male D., *Ανοσολογία, Πέμπτη Έκδοση, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου*, p.85-92, Αθήνα 2000

Saruhan-Direskeneli G. et al., HLA-DR and -DQ Associations with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in a Population of Turkey, *Human Immunology* 61, 296-302 (2000)

Saruhan-Direskeneli G. et al., HLA-DR and -DQ Associations with Multiple Sclerosis in Turkey, *Human Immunology* 55, 59-65 (1997)

- Sawhney S.M.S., Taylor D.W., Russell G.C., Polymorphism of bovine major histocompatibility complex (MHC) class I genes revealed by polymerase chain reaction (PCR) and restriction enzyme analysis, *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 32, 27-31, 2001
- Schaschl H. et al., Sequence analysis of the MHC class II DRB alleles in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*), *Developmental and Comparative Immunology* 28, 2004:265-277
- Scicluna MT et al., European brown hare syndrome in northern Italy: results of a virological and serological survey, *Rev Sci Tech.* 1994 Sep;13(3):893-94.
- Seddon M. Jennifer, Ellegren Hans, MHC class II genes in European wolves: a comparison with dogs, *Immunogenetics* (2002) 54:490-500
- Slade W. Robert et al., Molecular Population Genetics of the Southern Elephant Seal *Mirounga leonina*, *Genetics Society of America* 149: 1945-1957, (1998)
- Smulders M.J.M., Snoek L.B., Booy G., Vosman B., Complete loss of MHC genetic diversity in the Common Hamster (*Cricetus cricetus*) population in the Netherlands. Consequences for conservation strategies, *Conservation Genetics* 4: 441-451, 2003
- Sommer S., Schwab D., Ganzhorn J., MHC diversity of endemic Malagasy rodents in relation to geographic range and social system, *Behaviour Ecology Sociobiology* (2002), 51:214-221
- Sommer S., Effects of habitat fragmentation and changes of dispersal behaviour after a recent population decline on the genetic variability of noncoding and coding DNA of a monogamous Malagasy rodent, *Molecular Ecology* (2003) 12, 2845-2851.
- Sunnucks P. et al., SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*; 2000, (9): 1699-710.
- Swabrick Pa, Schwaiger F-W, Epplen Jt, Buchan GS Griffin JFT, Crawford AM (1995), Cloning and sequencing of expressed DRB genes of the red deer (*Cervus elaphus*) Mhc. *Immunogenetics* 42: 1-9
- Syrjälä Paula, Minna Nylund, Sirpa Heinikainen, European brown hare syndrome in free-living mountain hares (*lepus timidus*) and european brown hares (*lepus europaeus*) in finland 1990–2002, *Journal of Wildlife Diseases*, 41(1), 2005, pp. 42-47
- Takada Toyoyuki, Kikkawa Yoshiaki, Yonekawa Hiromichi, Amano Takashi, Analysis of goat MHC class II DRA and DRB genes: identification of the expressed gene and the new DRB alleles, *Immunogenetics* (1998) 48:408-412
- Takahashi K., Rooney A.P., Nei M., Origins and divergence times of mammalian class II MHC gene clusters, *The American Genetic Association* 91:198-204, 2000

Trowsdale, J.1995. Both man and bird and beat: comparative organization of the MHC genes. *Immunogenetics* 41: 1-17

Van Der Walt J.M., Nel L.H., Hoelzel A.R., Characterization of major histocompatibility complex DRB diversity in the endemic South African antelope *Damaliscus pygargus*: is a comparison in two subspecies with different demographic histories, *Molecular Ecology* 10, 1679-1688, (2001)

Weber S. Diana et al., Major histocompatibility complex variation at three class II loci in the northern elephant seal, *Molecular Ecology* (2004) 13, 711-718.

Welsch, J., Peterson, C., and Mc Clelland M., (1991). Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res.* 19: 303-306

www.amonline.net.au/evolutionary_biology/tour/sscp.htm

www.caletao.com.ar/ran/mami/liebre.htm

www.pradesmontsant.com/Frames/fauna/fitxa_fauna.asp?ID_animal=%20%2043

http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Lepus_europaeus.html

www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec3/sanger.html

www.nanomedicine.com/NMI/List_Figures.htm

Yonggui Fu et al., Extensive polymorphism and different evolutionary patterns of intron 2 were identified in the HLA-DQB1 gene, *Immunogenetics*, 54:761-766, 2003.