



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας

Μοριακή ανάλυση του γονιδίου *DRB1* του μείζονος
συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στο είδος

Ovis aries



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΚΟΚΚΑΛΗΣ

ΛΑΡΙΣΣΑ 2008



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

Αριθ. Εισ.: 6603/1
Ημερ. Εισ.: 10-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2008
ΚΟΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087356



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας

Μοριακή ανάλυση του γονιδίου *DRB1* του μείζονος
συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στο είδος

Ovis aries

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΖΩΙΚΩΝ
ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Α. ΜΟΥΤΟΥ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΠΟΝΔΥΛΩΤΩΝ

Θ. ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ: ΔΙΔΑΣΚΟΥΣΑ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ Π.Δ. 407

Πρόλογος

Το πειραματικό μέρος της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2007-2008, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Τον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη για την τιμή που μου έκανε και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της εργασίας. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας και ιδιαίτερα τους υποψήφιους Διδάκτορες, Κώστα Σταμάτη και Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη για την πολύτιμη βοήθεια και το φιλικό κλίμα συνεργασίας. Ευχαριστώ επίσης την Επίκουρο Καθηγήτρια βιολογίας σπονδυλωτών κα. Αικατερίνη Μούτου και την διδάσκουσα συμφωνά με το Π.Δ. 407 κα. Θεολογία Σαραφίδου που με τιμούν συμμετέχοντας στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Κτηνιατρικής του ΠΘ, κ. Μπιλλίνη Χαράλαμπο, για την παροχή των δειγμάτων στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Εισαγωγή.....	6
Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας.....	7
Εξελικτική πορεία του ΜHC.....	10
Χαρακτηριστικά των γονιδίων και των μορίων του ΜHC που είναι σημαντικά για τη φυσιολογική του λειτουργία.....	11
Πολυμορφισμός στο ΜHC.....	13
Το γονίδιο DRB1.....	15
Το είδος <i>Onis aries</i>	17
Η μέθοδος SSCP.....	21
Υλικά και μέθοδοι.....	23
Υλικά.....	24
Μέθοδοι.....	24
Απομόνωση DNA.....	24
Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα.....	26
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	26
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	30
Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης ενός κλώνου (SSCP).....	32
Αποτελέσματα.....	39
Συζήτηση.....	50
Βιβλιογραφία.....	56

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *DRB1* ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (ΜΗC) ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ *Ovis aries*

Περίληψη

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (ΜΗC) αποτελείται από ένα σύνολο στενά συνδεδεμένων γονιδίων, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπάντηση και έχει μελετηθεί ιδιαίτερα, λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας που παρουσιάζει. Η στενή σύνδεση ανάμεσα στον αυξημένο πολυμορφισμό και τα συστήματα αυτό-αναγνώρισης υποδεικνύει ότι η σύγκριση των εξελικτικών χαρακτηριστικών αυτών των συστημάτων μπορεί να αποκαλύψει γενικές οργανωτικές αρχές που αποτελούν το θεμέλιο για τη διατήρηση του γενετικού πολυμορφισμού. Στόχος της μελέτης, ήταν η προκαταρκτική διερεύνηση του γενετικού πολυμορφισμού του γονιδίου *DRB1* του ΜΗC τάξης II του είδους *Ovis aries*, προκειμένου να εξεταστεί ο πολυμορφισμός του, ο ρόλος της δράσης της επιλογής καθώς και των άλλων παραγόντων που συντελούν στη διατήρηση της ποικιλομορφίας. Η ανάλυση έγινε σε 82 άτομα του *Ovis aries* χρησιμοποιώντας τη μέθοδο SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism, ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονού κλώνου) σε συνδυασμό με την άμεση αλληλούχιση. Βρέθηκαν 31 αλληλόμορφα και προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες των 22. Παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό ετεροζυγωτίας (75.5%), ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η φυλογενετική μελέτη των αλληλομόρφων, η σύγκρισή τους με αλληλόμορφα του *DRB1* που ήδη έχουν δημοσιευτεί καθώς και αλληλόμορφα άλλων ειδών προβάτων. Τα αποτελέσματα αυτά αναλύονται σε σχέση με το γενετικό υπόβαθρο καθώς και την εξελικτική θέση του είδους.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (ΜΗC)

Τα μόρια του ΜΗC διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπάντηση (ανοσοποιητικό σύστημα και συντονισμένη αντίδραση κυττάρων και μορίων). Η φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι να αναχαιτίζει τις λοιμώξεις και να εξαλείφει τις ήδη εγκατεστημένες λοιμώξεις. Οι μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή περιλαμβάνουν τη φυσική ανοσία που μεσολαβεί στην αρχική φάση της προστασίας απέναντι στις λοιμώξεις, και την επίκτητη ανοσία που αναπτύσσεται πιο αργά και μεσολαβεί στο όψιμο αλλά και πιο αποτελεσματικό στάδιο.

Η φυσική ή μη ειδική ανοσία αναφέρεται στο γεγονός ότι ο τύπος αυτός άμυνας του ξενιστή υπάρχει πάντα σε υγιή άτομα ώστε να εμποδίσει την είσοδο ή να απομακρύνει γρήγορα τους μικροοργανισμούς που εισήλθαν στους ιστούς του ξενιστή. Η επίκτητη ή ειδική ανοσία είναι ο τύπος άμυνας του ξενιστή που διεγείρεται από τους μικροοργανισμούς που εισβάλλουν στους ιστούς και προσαρμόζεται στην παρουσία μικροβιακών εισβολέων (Tortorella et al., 2000).

Υπάρχουν δύο τύποι επίκτητης ανοσίας, η χυμική ανοσία και η κυτταρική ανοσία, στις οποίες μεσολαβούν διαφορετικά μόρια και κύτταρα και παρέχουν την άμυνα κατά εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μικροοργανισμών αντίστοιχα. Στη χυμική ανοσία μεσολαβούν πρωτεΐνες που ονομάζονται αντισώματα οι οποίες παράγονται από κύτταρα που ονομάζονται Β λεμφοκύτταρα ενώ στην κυτταρική μεσολαβούν τα Τ λεμφοκύτταρα. Μεταξύ των λεμφοκυττάρων, τα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα (T_H) ονομάζονται βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα επειδή βοηθούν τα Β-λεμφοκύτταρα να παράγουν αντισώματα και τα φαγοκύτταρα να καταστρέφουν τους μικροοργανισμούς που έχουν ήδη ή φαγοκυτώσει. Τα CD8+ Τ-λεμφοκύτταρα ονομάζονται κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα (T_C) επειδή φονεύουν κύτταρα που φέρουν ενδοκυττάρους μικροοργανισμούς (προκαλούν λύση των κυττάρων) (Banchereau et al., 2000).

Τα Β και Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν ειδικά τα αντιγόνα (είναι μεγάλα μόρια, συνήθως πρωτεΐνες, στην επιφάνεια των κυττάρων, ιοί, μύκητες ή βακτήρια) των εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μικροοργανισμών, αντίστοιχα. Διαλυτά

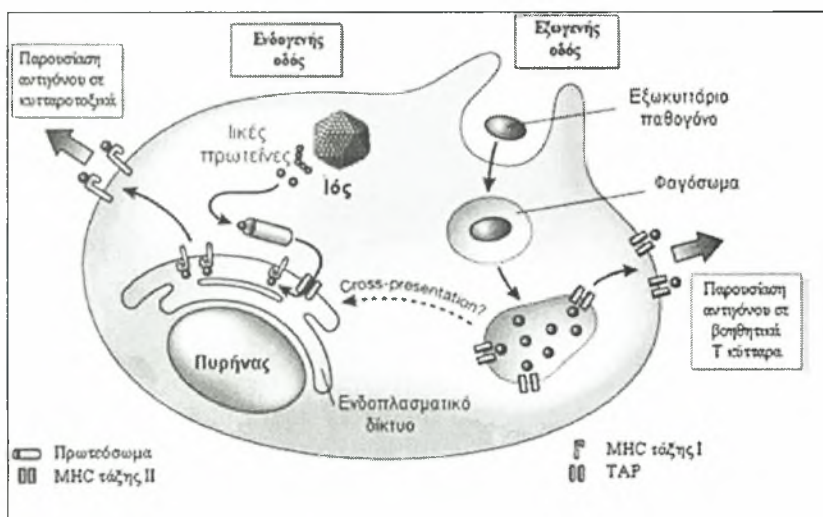
αντιγόνα ή αντιγόνα επιφανείας μικροοργανισμών ή άλλων κυττάρων μπορούν να προσδεθούν στους αντιγονικούς αυτούς υποδοχείς των Β λεμφοκυττάρων και να προκαλέσουν χυμικές ανοσοαπαντήσεις. Τα Τ λεμφοκύτταρα είναι τα κύτταρα της κυτταρικής ανοσίας. Ο αντιγονικός υποδοχέας των Τ λεμφοκυττάρων αναγνωρίζει μόνο πεπτιδικά τμήματα πρωτεϊνικών αντιγόνων τα οποία είναι προσδεμένα σε ειδικά μόρια παρουσίασης πεπτιδίων.

Αυτός ακριβώς είναι ο ρόλος των μορίων του (MHC). Η πλειονότητα των Τ λεμφοκυττάρων αναγνωρίζει πεπτιδικά αντιγόνα που είναι συνδεδεμένα με τα μόρια του (MHC) των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα) και παρουσιάζονται από αυτά.

Το MHC ανακαλύφθηκε ως ο γενετικός τόπος που καθόριζε κατά κύριο λόγο την αποδοχή ή την απόρριψη των μοσχευμάτων από ένα άτομο σε ένα άλλο. Ανακαλύφθηκε σε μελέτες μεταμόσχευσης σε ποντίκια από τον Peter Issac Gorer στο Lister Institute του Λονδίνου το 1937. Τα άτομα που είναι πανομοιότυπα στους τόπους MHC θα αποδεχθούν μοσχεύματα το ένα του άλλου, ενώ άτομα που διαφέρουν στους τόπους MHC θα απορρίψουν τα μοσχεύματα αυτά. Σήμερα, είναι γνωστό ότι η κύρια φυσιολογική λειτουργία των μορίων του MHC είναι η παρουσίαση πεπτιδίων από πρωτεϊνικά αντιγόνα στα Τ λεμφοκύτταρα.

Οι γενετικοί τόποι του MHC είναι ένα σύνολο γονιδίων που βρίσκονται σε όλα τα θηλαστικά. Οι πρωτεΐνες MHC στον άνθρωπο ονομάζονται ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (HLA), επειδή πρώτα ανακαλύφθηκαν σαν αντιγόνα λευκοκυττάρων τα οποία ταυτοποιήθηκαν με ειδικά αντισώματα (Campbell et al., 1993). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια αυτά αποτελούν το γενετικό τόπο HLA. Σε όλα τα είδη, ο τόπος MHC περιέχει δύο ομάδες εξαιρετικά πολυμορφικών γονιδίων, τα γονίδια του MHC τάξης I και II τα οποία κωδικοποιούν τα μόρια MHC τάξης I και II που παρουσιάζουν πεπτιδία στα Τ κύτταρα. Επιπλέον από τα πολυμορφικά γονίδια, ο τόπος MHC περιέχει πολλά μη πολυμορφικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παρουσίαση των αντιγόνων ενώ άλλα κωδικοποιούν πρωτεΐνες με άγνωστη προς το παρόν λειτουργία.

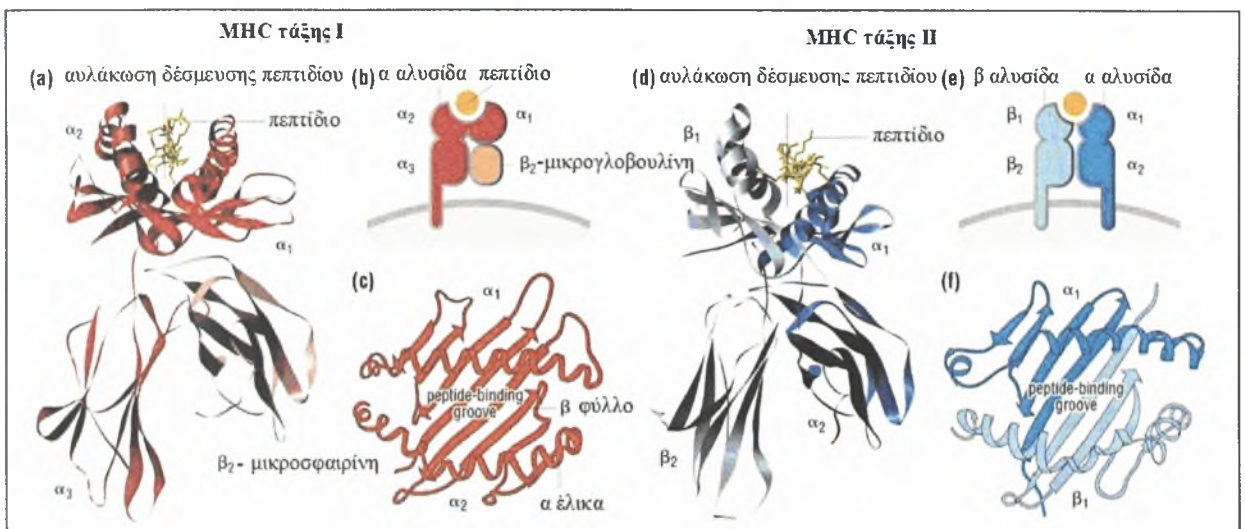
Τα μόρια ΜΗC τάξης I και II είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες η καθεμία από τις οποίες περιέχει μία αύλακα σύνδεσης του πεπτιδίου στο αμινοτελικό τους άκρο. Αν και η σύνθεση των υπομονάδων των μορίων τάξης I και II είναι διαφορετική, η συνολική τους δομή μοιάζει πολύ. Κάθε μόριο τάξης I αποτελείται από μία α αλυσίδα, μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη σε μία πρωτεΐνη τη β2-μικροσφαιρίνη, η οποία κωδικοποιείται εκτός του ΜΗC. Τα αμινοτελικά τμήματα των περιοχών α1 και α2 του μορίου ΜΗC τάξης I σχηματίζουν μία αύλακα σύνδεσης του πεπτιδίου, η οποία είναι αρκετά μεγάλη ώστε να εφαρμόζουν πεπτίδια 8 ως 11 αμινοξέων. Τα πεπτίδια που θα παρουσιαστούν στα Τ λεμφοκύτταρα συνδέονται στη βάση της αύλακας σύνδεσης του πεπτιδίου, ενώ ο υποδοχέας των Τ κυττάρων έρχεται σε επαφή με τις πλευρές της αύλακας (Rock et al., 1999). Τα γονίδια της τάξης I κωδικοποιούν πεπτίδια που παρουσιάζουν ενδοκυτταρικά παθογόνα στα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα. Τα πολυμορφικά αμινοξέα των μορίων τάξης I, δηλαδή τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των μορίων ΜΗC διαφορετικών ατόμων, εντοπίζονται στις περιοχές α1 και α2 της α αλυσίδας. Η περιοχή α3 είναι σταθερή και περιέχει τη θέση σύνδεσης για το συνυποδοχέα CD8 των Τ κυττάρων. Επομένως, τα CD8⁺ Τ κύτταρα μπορούν να απαντήσουν μόνο σε πεπτίδια που παρουσιάζονται από μόρια ΜΗC τάξης I, από τα μόρια δηλαδή με τα οποία συνδέεται ο συνυποδοχέας CD8.



Εικ.1: Συνοπτική εικόνα της διαδικασίας παρουσίασης των ενδογενών και εξωγενών αντιγόνων από τα αντινοτοπαρουσιαστικά

Κάθε μόριο ΜΗC τάξης II αποτελείται από δυο αλυσίδες, τις α και β. Τα αμινοτελικά τμήματα και των δύο αλυσίδων, οι περιοχές α1 και β1, περιέχουν

πολυμορφικά αμινοξέα και σχηματίζουν μια αύλακα αρκετά μεγάλη ώστε να εφαρμόζουν πεπτίδια μήκους 10-30 αμινοξέων. Τα γονίδια της τάξης II κωδικοποιούν πεπτίδια που παρουσιάζουν τα ξένα αντιγόνα στα βοηθητικά Τ κύτταρα (Wolf et al., 1995). Υπάρχουν τρεις ομάδες πολυμορφικών γονιδίων τάξης II, τα HLA-DR, HLA-DQ και HLA-DP. Η μη πολυμορφική περιοχή β2 περιέχει τη θέση σύνδεσης του συνυποδοχέα CD4 των Τ κυττάρων. Επειδή το CD4 συνδέεται με τα μόρια MHC τάξης II, τα CD4⁺ Τ κύτταρα απαντούν μόνο σε πεπτίδια που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης II.



Εικ.2: Δομή των μορίων MHC τάξης I και II

ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ ΜHC

Τα γονίδια του MHC τάξης I και II έχουν βρεθεί σε όλα τα σπονδυλωτά μαζί με τα γονίδια TCR και Ig τα οποία αποτελούν το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα, το κυριότερο σύστημα στα σπονδυλωτά, ενώ περιέχουν και το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο είναι το μοναδικό ανοσοποιητικό σύστημα στα ασπόνδυλα (Klein et al., 1998; Matsunaga et al., 1998). Το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα εμφανίζεται στα πιο πρωτόγονα γναθοστόματα σπονδυλωτά και εξελίσσεται προς τα ανώτερα σπονδυλωτά ενώ το MHC σαν οργανωμένη μονάδα προκύπτει με την εμφάνιση των γναθοστόματων σπονδυλωτών. Η σύγκριση μεταξύ θηλαστικών και

μη θηλαστικών δείχνει μια πολύπλοκη δομή για το ΜHC των θηλαστικών και ένα σχετικά απλούστερο σχεδιασμό για τα μη θηλαστικά και με μια υποθετική δομή για τον καρχαρία.

Ακόμα και σήμερα δεν έχει καταστεί σαφές ποια είναι η πρωταρχική ΜHC τάξη γονιδίων, παρότι έχουν γίνει μια σειρά από υποθέσεις. Είναι γενικά αποδεκτό ότι με βάση τις δομικές και λειτουργικές ομοιότητες τα ΜHC τάξης I και τάξης II γονίδια έχουν κοινή προέλευση. Η στενή σύνδεση των ΜHC τάξης I και II γονιδίων με γονίδια του προτεασώματος υποδηλώνει ισχυρή λειτουργική και εξελικτική σχέση μεταξύ αυτών των γονιδίων σε διάφορα είδη, τουλάχιστον από την εμφάνιση των πρώτων σπονδυλωτών.

Υπάρχουν διάφορες θεωρίες σχετικά με το ποια είναι η πρωταρχική ΜHC τάξη γονιδίων. Μια επικρατούσα άποψη είναι ότι τα γονίδια της τάξης II πιθανόν να έχουν παραχθεί από γονίδια τάξης I [δημιουργήθηκαν από ανασυνδυασμό ανάμεσα σε μία καρβοξυτελική περιοχή ανοσοσφαιρίνης και σε μία περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίου της πρωτεΐνης θερμικού σοκ HSP70 από μια σειρά παράλληλων επαναλήψεων, ακολουθούμενη από δομική και λειτουργική απόκλιση (Flajnik et al., 1991)]. Αντιθέτως πολλοί υποστηρίζουν ότι τα γονίδια της τάξης I προέρχονται από αυτά της τάξης II. Μία φυλογενετική ανάλυση υποστηρίζει ότι υπάρχει μία σχέση μεταξύ της α αλυσίδας των μορίων ΜHC τάξης II και της β2-μικροσφαιρίνης, καθώς και ανάμεσα στη β αλυσίδα των μορίων ΜHC τάξης II και της α αλυσίδας των μορίων ΜHC τάξης I (Hughes & Nei, 1993). Τα σημαντικότερα δεδομένα ενισχύουν την υπόθεση ότι το προγονικό μόριο ΜHC είχε δομή όμοια με αυτή του μορίου τάξης II και από αυτό προήλθαν τα μόρια του ΜHC τάξης I.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΤΟΥ ΜHC ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΟΥΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Το ΜHC είναι η πλέον πυκνή περιοχή του γονιδιώματος των θηλαστικών. Περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό γονιδίων τα οποία μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες: 1) τα γονίδια τάξης I και II που κωδικοποιούν τα

αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια 2) τα γονίδια που συμμετέχουν στην επεξεργασία των αντιγόνων όπως το LMP και TAP 3) τα γονίδια με ανοσολογική λειτουργία που δε σχετίζονται όμως εξελικτικά και λειτουργικά με τα γονίδια τάξης I και II (συστατικά του συμπληρώματος C4, C2 και παράγοντας B) 4) γονίδια που δεν έχουν λειτουργική σχέση με την ανοσοαπάντηση (Kasahara, 1997). Τα γονίδια τάξης I και II έχουν χαρακτηριστικά που τα ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα γονίδια του MHC.

Η έκφρασή τους είναι συγκυρίαρχη, δηλαδή τα αλληλόμορφα που κληρονομούνται από κάθε γονέα εκφράζονται εξίσου. Η συγκυρίαρχη έκφραση διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο καθώς αυξάνεται ο αριθμός των διαφορετικών μορίων MHC τα οποία μπορούν να παρουσιάσουν πεπτίδια στα Tα κύτταρα.

Τα γονίδια MHC είναι εξαιρετικά πολυμορφικά, δηλαδή υπάρχουν πολλά διαφορετικά αλληλόμορφα σε διαφορετικά άτομα ενός πληθυσμού. Ο πολυμορφισμός είναι τόσο μεγάλος ώστε σε συνήθεις ανοιχτούς πληθυσμούς δεν υπάρχουν δύο άτομα με τα ίδια ακριβώς γονίδια και μόρια MHC. Επειδή τα πολυμορφικά αμινοξέα καθορίζουν ποια πεπτίδια θα παρουσιαστούν από κάθε μόριο MHC, η ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων εξασφαλίζει ότι τουλάχιστον κάποιο μέλος του πληθυσμού θα μπορεί να παρουσιάσει πρακτικά οποιοδήποτε αντιγόνο μικροοργανισμού.

Τα μόρια τάξης I εκφράζονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα, αλλά τα μόρια τάξης II εκφράζονται κυρίως στα επαγγελματικά ACPs όπως τα δενδριτικά κύτταρα καθώς και στα μακροφάγα και στα B λεμφοκύτταρα (Banchereau et al., 2000).

Τα μόρια MHC αποκτούν το πεπτιδικό τους φορτίο κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης τους και της συναρμολόγησης τους μέσα στα κύτταρα. Επομένως, τα μόρια MHC παρουσιάζουν πεπτίδια που προέρχονται από μικροοργανισμούς που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή και γι' αυτό τα MHC-περιορισμένα T κύτταρα αναγνωρίζουν μικροοργανισμούς που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα και είναι οι μεσολαβητές της ανοσίας κατά των ενδοκυττάρων μικροοργανισμών. Επιπλέον τα μόρια MHC τάξης I αποκτούν τα πεπτίδια τους από πρωτεΐνες του κυτοσολίου ενώ τα μόρια τάξης II από πρωτεΐνες των ενδοκυττάρων κυστιδίων.

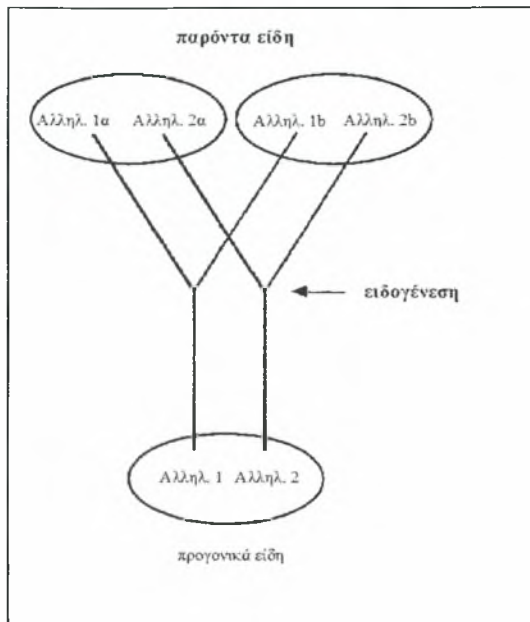
Τέλος σε κάθε άτομο τα μόρια ΜHC μπορούν να παρουσιάσουν πεπτίδια που προέρχονται από ξένες πρωτεΐνες (πρωτεΐνες μικροοργανισμών) αλλά και πεπτίδια από πρωτεΐνες του ίδιου του ατόμου.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΜHC

Πολυμορφισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο διαφορετικά αλληλόμορφα μπορούν να ανιχνευθούν σε έναν μόνο γενετικό τόπο. Υπάρχουν πολλά αλληλόμορφα σε κάθε λειτουργικό τόπο του ΜHC και κάθε ένα από αυτά εμφανίζεται με αξιόλογη συχνότητα στον πληθυσμό. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με το φαινόμενο το οποίο παρατηρείται σε άλλα γενετικά συστήματα, στα οποία κάθε τόπος έχει είτε ένα μόνο αλληλόμορφο είτε λίγα αλληλόμορφα από τα οποία μόνο ένα είναι το πιο συχνό. Επειδή υπάρχουν πολλοί ΜHC τόποι και κάθε τόπος έχει πολλά αλληλόμορφα είναι θεωρητικά δυνατοί πολλοί συνδυασμοί αλληλομόρφων. Ωστόσο, λόγω της στενής σύνδεσης των γονιδίων του συστήματος και της κληρονομικότητάς τους, μόνο ένα μέρος αυτών των πιθανών συνδυασμών απαντά στην πραγματικότητα.

Ο πολυμορφισμός εντοπίζεται στα $\alpha 1$ και $\alpha 2$ πεδία των ΜHC τάξης I, στα $\alpha 1$ και $\beta 1$ πεδία των ΜHC τάξης II και ιδιαίτερα στη σχισμοειδή θήκη, καθώς και τις εσωτερικές και τις ανώτερες επιφάνειες των α -ελίκων. Η προέλευση του εκτεταμένου πολυμορφισμού του ΜHC αποτελεί αντικείμενο έντονης αντιπαράθεσης. Οι γενετικοί μηχανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για την δημιουργία του καθώς και οι επιλεκτικές δυνάμεις οι οποίες ευθύνονται για την διατήρησή του παραμένουν ακόμα αντικείμενο έρευνας. Η υπόθεση της εξέλιξης δια μέσω των ειδών (trans species evolution) προτείνει ότι, ο υψηλού βαθμός πολυμορφισμός ο οποίος παρατηρείται στα σύγχρονα είδη είναι αποτέλεσμα διαφοροποίησης των αλληλομόρφων γονιδίων (Richman, 2000). Η διαφοροποίηση αυτή πραγματοποιήθηκε στα αρχέγονα είδη και διατηρήθηκε για εκατομμύρια χρόνια (μέσω της επιλογής ή, όπως αρχικά προτάθηκε, μέσω τυχαίας γενετικής μεταστροφής?) με μικρή διαφοροποίηση μετά τον σχηματισμό των νέων ειδών. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση προσπαθεί να εξηγήσει την προέλευση του πολυμορφισμού

πριν από πολλά εκατομμύρια χρόνια, χωρίς όμως να ερμηνεύει την προέλευσή του (Parham P, 1996; Hughes & Nei, 1988, 1989)



Εικ. 3: Διαειδική εξέλιξη ως συνέπεια της μεγάλης ανθεκτικότητας των αλληλομορφικών γενεαλογικών. Δύο αλληλομορφικές γενεαλογίες παρούσες σε πανάρχαια είδη τα οποία μεταβιβάζονται σε καθένα από τα δύο θυγατρικά είδη. Σε αυτή την περίπτωση, το πιο συγγενικό αλληλόμορφο του ενός θυγατρικού είδους δεν βρέθηκε σε αυτό το είδος αλλά στα άλλα θιναυαυικά είδη.

Εκτός από την υπόθεση της εξέλιξης δια μέσω των ειδών (trans species evolution) η ισοζυγούσα επιλογή θεωρείται ότι συμβάλλει καθοριστικά στον υψηλό πολυμορφισμό. Σημαντικές ενδείξεις δράσης της ισοζυγούσας επιλογής είναι τα υψηλά ποσοστά ετεροζυγωτίας, οι περισσότερες μη συνώνυμες σε σχέση με τις συνώνυμες μεταλλάξεις και η διατήρηση αλληλομορφικών σειρών για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Satta et al., 1994).

Η ισοζυγούσα επιλογή μπορεί και διατηρεί πολλά αλληλόμορφα στον πληθυσμό κάτι που απαιτεί ένα τύπο πλεονεκτήματος των σπάνιων αλληλομόρφων. Δύο τύποι επιλογής που περιλαμβάνουν αυτά τα χαρακτηριστικά είναι η υπεροχή του ετεροζυγώτη και η συχνο-εξαρτώμενη επιλογή. Γενικά, στην υπεροχή του ετεροζυγώτη, τα ετερόζυγα άτομα είναι καλύτερα προσαρμοσμένα από τα ομόζυγα. Έτσι, τα σπάνια αλληλόμορφα ευνοούνται από την αυξημένη αντιπροσώπευσή τους στα ετερόζυγα άτομα. Οι δύο αυτοί τύποι επιλογής διατηρούν την ποικιλομορφία στο MHC και φανερώνουν τη δράση της ισοζυγούσας επιλογής (Richman, 2000).

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό του MHC είναι ο υψηλός αριθμός μεταλλάξεων που παρατηρείται. Έχει προταθεί ότι στα γονίδια του MHC δε συμβαίνουν περισσότερες μεταλλάξεις από τις υπόλοιπες περιοχές του γονιδιώματος

αλλά ότι μέσω θετικής επιλογής οι μεταλλάξεις αυτές διατηρούνται. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών τόσο στα σπονδυλωτά όσο και στα ασπόνδυλα δείχνει ότι τα αντιμικροβιακά πεπτιδία εξελίσσονται μέσω της θετικής επιλογής. Ενδείξεις δράσης της θετικής επιλογής είναι ο μεγάλος αριθμός μη συνώνυμων νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων, ο μεγάλος αριθμός αντικαταστάσεων φορτίου μέσω υποκαταστάσεως αμινοξέος και το μη ουδέτερο πρότυπο αλληλομορφικού πολυμορφισμού (Tennessee, 2005).

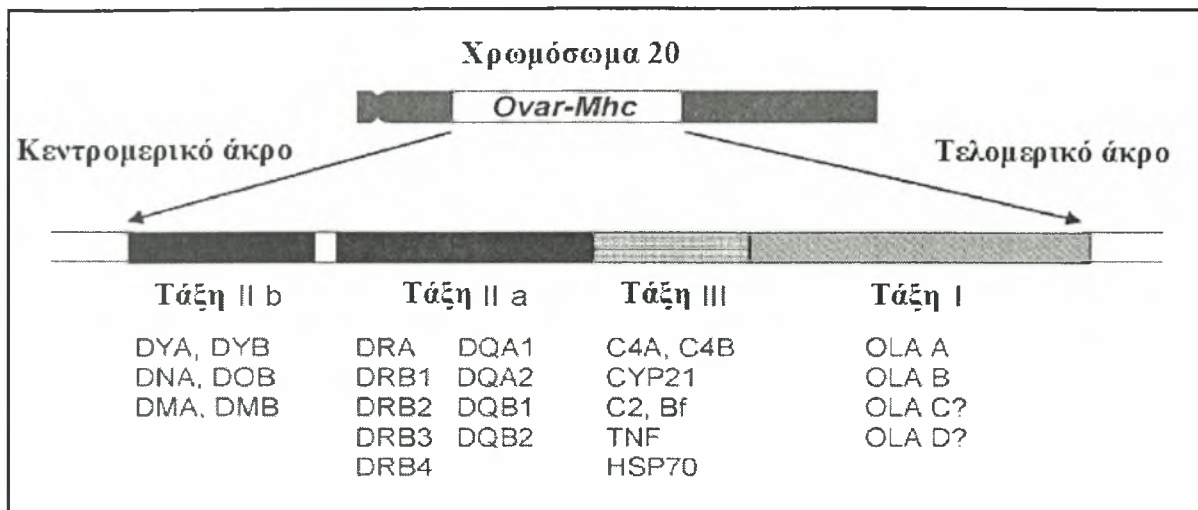
ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *DRB1*

Υπάρχουν τρεις ομάδες πολυμορφικών γονιδίων τάξης II που στον άνθρωπο ονομάζονται *HLA-DR*, *HLA-DQ*, *HLA-DP* και στην περίπτωση αυτή και η α και η β είναι πολυμορφικές. Καθώς η α αλυσίδα από ένα αλληλόμορφο μπορεί να συνδυαστεί με τη β αλυσίδα από το άλλο αλληλόμορφο, οι συνδυασμοί τους δημιουργούν ορισμένα "υβριδικά" μόρια τάξης II, έτσι ώστε να μπορούν να εκφραστούν 10 ως 20 διαφορετικά μόρια MHC (Campbell et al., 1993).

Η γονιδιακή περιοχή του *DRB1* είναι η πιο γνωστή πολυμορφική περιοχή της τάξης II στον άνθρωπο, με περίπου 360 αλληλόμορφα (Robinson et al., 2003). Το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού που παρατηρήθηκε για αυτά τα γονίδια προέκυψε από την ανάγκη να αναγνωρίσουν όσο το δυνατό περισσότερους παθογόνους παράγοντες που παρουσιάζουν ανταγωνισμό για να αποφύγουν την αναγνώριση από το ανοσοποιητικό σύστημα (Doherty και Zinkernagel, 1975).

Το MHC των προβάτων (*Ovis aries*) είναι γνωστό ως *Ovar* και έχει μελετηθεί λιγότερο σε σχέση με άλλα οικόσιτα είδη. Ωστόσο, η βασική οργάνωσή του παραμένει παρόμοια με αυτή των άλλων θηλαστικών. Το MHC χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 20 του *O. aries* και περιλαμβάνει ένα λειτουργικό γονίδιο *DRB* και τρία ψευδογονίδια. Τα γονίδια τάξης II του MHC κωδικοποιούν ετεροδιμερείς γλυκοπρωτεΐνες που σχηματίζονται από α και β αλυσίδες, οι οποίες συνδυάζουν και παρουσιάζουν δικά τους και ξένα πεπτιδία προς τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα. Οι αμινοξικές θέσεις της DR-β αλυσίδας, που σχηματίζουν την περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR), έχουν δείξει ότι είναι η πιο πολυμορφική στα σπονδυλωτά είδη. Η

γενετική ποικιλομορφία σε αυτή την περιοχή πιστεύεται ότι διατηρήθηκε με την εξισορροπούσα επιλογή ευνοώντας τα αντιγόνοπαρουσιαστικά κύτταρα να δεσμεύουν ένα ευρύ φάσμα πεπτιδίων, γεγονός που παρουσιάζει μεγαλύτερη αντίσταση σε μολυσματικές ασθένειες (O'Brien και Evermann, 1988· Hughes et al, 1994).



Εικ.4:Οργάνωση των γονιδίων του MHC στο χρωμόσωμα 20 του *Ovis aries*.

Το δεύτερο εξώνιο των λειτουργικών γονιδίων *DRB* των θηλαστικών έχει δύο εξέχοντα χαρακτηριστικά: πρώτον, ότι είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό, και δεύτερον ότι είναι πολυμορφικό σε περισσότερες από μία θέσεις. Μια μεγάλη έρευνα για τα γονίδια MHC του ανθρώπου, των αρουραίων, των ποντικών, των βοοειδών, και άλλα είδη έχει επιβεβαιώσει αυτά τα χαρακτηριστικά. Το *DRB* του προβάτου είναι παρόμοιο με εκείνο των άλλων θηλαστικών, όχι μόνο σε πολυμορφισμό αλλά και στην ακολουθία νουκλεϊκών οξέων (Blattman et al., 1993· Escayg et al., 1993, 1996 Grain et al., 1993· Amills et al., 1995, 1996).

ΤΟ ΕΙΔΟΣ *Ovis aries*

Συστηματική κατάταξη του είδους

Ovis aries

Βασίλειο: Animalia

Φύλο: Chordata

Υποφύλο: Vertebrata

Κλάση: Mammalia

Τάξη: Artiodactyla

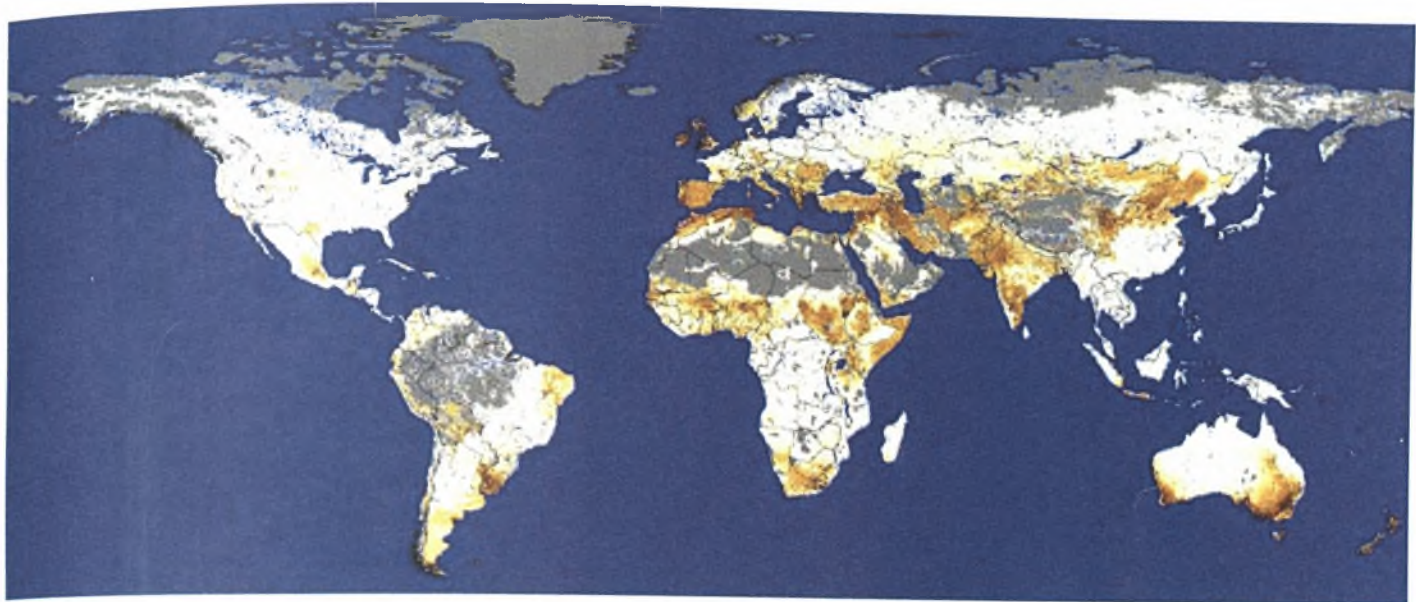
Οικογένεια: Bovidae

Υποοικονέχεια: Caprinae



Εικ.5: *Ovis aries*.

Το οικόσιτο πρόβατο (*Ovis aries*), το πιο κοινό μέλος της οικογένειας των προβάτων (*Ovis*), είναι ένα μηρυκαστικό, τετράποδο ζώο, που πιθανότατα κατάγεται από τα άγρια πρόβατα μουflon της Νότιας και Νοτιοδυτικής Ασίας. Για την εξημέρωση των προβάτων υπάρχουν τεκμήρια στο Ιράκ που χρονολογούνται από το 9.000 π.Χ. Τα πρόβατα συνδέθηκαν με πολλούς πολιτισμούς, κυρίως στη Βρετανία και τη Μεσόγειο, όπου αποτελούν το πιο κοινό αντικείμενο της κτηνοτροφίας (MacDonald et al, 1984). Έχουν μεγάλη οικονομική σημασία, καθώς η απόδοση εισοδήματος που προσφέρουν σε σχέση με το κόστος της εκτροφής τους είναι γύρω στο 400%. Ο παγκόσμιος πληθυσμός των προβάτων υπολογίζεται γύρω στο ένα δισεκατομμύριο.



<1

20-50

1-5

50-100

5-10

100-250

10-20

250

Όλες οι πικνότητες είναι σε κεφάλια ανά km².

Ακατάλληλες περιοχές

Εικ. 6: Απεικόνιση περιοχών διαβίωσης προβάτων

Χαρακτηριστικά

Ανάλογα με την ηλικία και το φύλο τους, ονομάζονται αρνιά μέχρι δυο μηνών, ζυγούρια μέχρι ενός έτους, κριάρια τα ώριμα αρσενικά και προβατίνες τα θηλυκά. Έχουν μέτριο σώμα που καλύπτεται από πυκνό τρίχωμα, απαλό στην αφή, σγουρό ή ίσιο, μακρύ ή κοντό, λευκό, μαύρο, καστανό ή γκριζο. Ζουν 10 έως 14 χρόνια, ανάλογα με τις συνθήκες διαβίωσής τους (Grzimek 1990, MacDonald 1984). Τρέφονται με νωπά χόρτα, τα οποία καταπίνουν σχεδόν αμάσητα, ώστε να εξασφαλιστούν κατά τη διάρκεια της ημερήσιας βοσκής οι μεγάλες ποσότητες που

απαιτούνται - αργότερα όταν αναπαύονται, η τροφή επανέρχεται στο στόμα και αναμασιέται.

Φυσική περιγραφή

Οι φυσικές λεπτομέρειες των οικόσιτων προβάτων ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των φυλών. Η κεφαλή και το σώμα είναι μήκους 1200-1800 mm ενώ το ύψος ώμου είναι 650-1270 mm. Θηλυκά πρόβατα τείνουν να είναι τα τρία τέταρτα ή τα δύο τρίτα του μεγέθους των αρσενικών. Άγρια πρόβατα έχουν ουρές μεταξύ 70-150 mm αλλά στα οικόσιτα πρόβατα οι ουρές μπορεί να είναι μεγαλύτερες. Τα πρόβατα έχουν στενό ρύγχος πλήρως καλυμμένο με τρίχωμα, εκτός από τα ρουθούνια και τα χείλη. Το γένος *Ovis* χαρακτηρίζεται από την παρουσία των αδένων που βρίσκονται κοντά στα οστά και μεταξύ των δύο κύριων δακτύλων του ποδιού. Αυτοί οι αδένες εκκρίνουν μια ουσία που δίνει στα πρόβατα τη χαρακτηριστική τους οσμή. Το κρανίο των εξημερωμένων προβάτων διαφέρει από εκείνο των άγριων προβάτων ως προς το ότι η οφθαλμική κόγχη και η περιοχή του εγκεφάλου είναι μειωμένη. Για οικονομικούς λόγους έχουν παραχθεί οικόσιτα πρόβατα με ή χωρίς μαλλί, κέρατα, και εξωτερικά αυτιά. Ο χρωματισμός κυμαίνεται από γαλακτώδες λευκό ως σκούρο καστανό και μαύρο. Υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση με πάνω από 200 ξεχωριστές φυλές προβάτων (Lydekker, 1913).

Αναπαραγωγή

Το είδος *O. aries* αναπαράγεται σε εποχιακή βάση, η οποία προσδιορίζεται από το μήκος της μέρας, με τα θηλυκά ζώα (προβατίνες) να γίνονται γόνιμα στην αρχή του φθινοπώρου και να παραμένουν γόνιμα μέχρι τα μέσα του χειμώνα. Τα αρσενικά (κριοί) είναι γόνιμα όλο το χρόνο και πλέον κτηνοτρόφοι χρησιμοποιούν ένα οικόσιτο αρσενικό πρόβατο να ζευγαρώσει με 25 έως 35 προβατίνες. Μέσος όρος κυοφορίας είναι οι 148 ημέρες, με τα περισσότερα αρνιά να έχουν γεννηθεί στα μέσα της άνοιξη. Τα θηλυκά γεννούν 1-2 ή σπανιότερα 3-4 μικρά, ύστερα από κύηση 5 μηνών. Αξίζει να αναφερθεί ότι κάθε προβατίνα αναγνωρίζει το δικό της μικρό,

ανάμεσα σε πλήθος άλλων, βάσει της μυρωδιάς του. Και τα αρσενικά και τα θηλυκά αρνιά φθάνουν στη σεξουαλική ωριμότητα εντός ενός έτους (Ensminger, 1965).

Συμπεριφορά

Το είδος *O. aries* είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένο σε αγέλες ή κοπάδια. Οι μεγάλες ομάδες των προβάτων (μέχρι 1000 ή περισσότερες) κινούνται σε πάνω από μια περιοχές σε ομάδες, και όχι ως άτομα. Δεν υπάρχουν "ηγέτες" στα κοπάδια κατά τη βόσκηση ή σε άλλες δραστηριότητες του κοπαδιού. Αυτό το ένστικτο συμβάλλει στην οικονομική τους σημασία όπου ένας βοσκός μπορεί να ελέγχει ένα μεγάλο κοπάδι των ζώων. Τα πρόβατα συχνά διαχωρίζονται από αυτά άλλων κοπαδιών, όταν φωνάζουν.

Προϊόντα

Σήμερα υπάρχουν φυλές που κάθε χρόνο δίνουν διαφορετική ποσότητα μαλλιού και γάλακτος. Για παράδειγμα, τα πρόβατα που υπάρχουν στην περιοχή της Κεφαλονιάς δίνουν, κατά μέσο όρο, μέχρι 1,5 κιλό γάλα ημερησίως. Εξαιρέση αποτελεί η γερμανική φυλή προβάτων, που αποδίδουν καθημερινά μέχρι και 3 κιλά γάλα. Δυστυχώς στη σημερινή εποχή το μαλλί που συλλέγεται από το κούρεμα των προβάτων - που όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, γίνεται για λόγους υγιεινής και άνετης διαβίωσης του ζώου - δεν αξιοποιείται, αφού δεν υπάρχει μεγάλη ζήτηση σε τοπικό και εθνικό επίπεδο.

Οικονομικές επιπτώσεις στον άνθρωπο: Αρνητικές

Το *O. aries* δεν έχει επιπτώσεις στους ανθρώπινους πληθυσμούς. Ο πολλαπλασιασμός των οικόσιτων προβάτων, όμως, έχει επιπτώσεις στους άγριους συγγενείς τους επηρεάζοντας τους πληθυσμούς μέσω του ανταγωνισμού για τις κτηνοτροφικές ανάγκες αλλά και με την εξάπλωση μιας νόσου.

Οικονομικές επιπτώσεις στον άνθρωπο: Θετικές

Το *O. aries* είναι ένα από τα πιο σημαντικά οικονομικά είδη στον πλανήτη. Από την εξημέρωσή τους έχουν αποτελέσει πηγή κρέας, γάλακτος, μαλλιού και

δέρματος σχεδόν σε κάθε χώρα. Η ικανότητά τους να ζουν σε διαφορετικά περιβάλλοντα συμβάλλει στην οικονομική τους σημασία, π.χ. μεγάλα κοπάδια ζώων μπορούν να διατηρηθούν σε πολλά περιβάλλοντα με σχετικά χαμηλό κόστος. Εκτός από τη χρησιμότητά τους στο γεωργικό τομέα, τα πρόβατα έχουν γίνει ένα σημαντικό εργαλείο για την επιστημονική έρευνα. Λόγω του μεγάλου μεγέθους τους και του χαμηλού κόστους συντήρησης αποτελούν ένα ιδανικό πρότυπο για επιστημονική έρευνα (Weaver et al., 2005).

Η ΜΕΘΟΔΟΣ SSCP

Η ανάλυση SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) βασίζεται στην αποδιάταξη μικρών προϊόντων PCR και την ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Καθώς τα PCR προϊόντα μετακινούνται διαμέσου της πηκτής επανακτούν τη δευτεροταγή τους δομή που εξαρτάται από την αλληλουχία τους. Η κινητικότητα του δίκλωνου DNA σε gel ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος των κλώνων, αλλά είναι σχετικά ανεξάρτητη από τη συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Η κινητικότητα του μονόκλωνου DNA, ωστόσο επηρεάζεται αισθητά από πολύ μικρές αλλαγές στην ακολουθία, ίσως και μια μόνο αλλαγή νουκλεοτιδίου. Μικρές αλλαγές είναι εμφανείς λόγω της σχετικά ασταθής φύσης του μονόκλωνου DNA, απουσία ενός συμπληρωματικού κλώνου, καθώς στο μονόκλωνο DNA μπορεί να δημιουργηθούν βρόγχοι και πτυχώσεις που δίνουν μια μοναδική τρισδιάστατη δομή, ανεξάρτητα από το μήκος του. Μια μόνο αλλαγή νουκλεοτιδίου θα μπορούσε να επηρεάσει καθοριστικά την κινητικότητα ενός κλώνου μέσω ενός πηκτώματος, διαφοροποιώντας το ζευγάρι βάσεων και τη 3D δομή (Melcher, 2000).

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- Η τεχνική SSCP αποτελεί μία ευαίσθητη αλλά όχι ακριβή, γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό των δειγμάτων που διαφέρουν στην αλληλουχία και έτσι μόνο ένα μικρό μέρος των δειγμάτων χρειάζεται να αλληλουχηθεί (Sunpuks et al., 2000).

- Πολλά ξεχωριστά προϊόντα PCR μπορούν να ελεγχθούν για διαφοροποιήσεις ταυτόχρονα. Η ανάλυση SSCP εφαρμόζεται για να μειωθεί ο αριθμός των αλληλουχίσεων που απαιτούνται για τον προσδιορισμό νέων αλληλομόρφων σε γενετικούς τόπους (e.g. Sweetman et al. 1992) ή για την καλύτερη εκτίμηση των αλληλικών συχνοτήτων σε πληθυσμούς (e.g. Aguadé et al. 1994).
- Έλεγχος των PCR προϊόντων γονιδίων που πρόκειται να αλληλουχηθούν για φυλογενετικές αναλύσεις.
- Κατάλληλη για την άντληση πληροφοριών σχετικά με τα επίπεδα των πολυμορφισμών σε πυρηνικούς γενετικούς τόπους.

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- οι διάφορες στην κινητικότητα δε σχετίζονται με τον αριθμό των διαφορών στην αλληλουχία
- το βέλτιστο μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων για την ανίχνευση των περισσότερων σημειακών μεταλλάξεων είναι ιδιαίτερα μικρό, περίπου 500bp.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ DNA

Τα δείγματα DNA προέρχονται από το είδος *Ovis aries* από την περιοχή των Τρικάλων και της Άρτας ενώ ανήκουν σε δύο διαφορετικές φυλές. Η εξαγωγή DNA έγινε από το αίμα των προβάτων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ PCR

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) buffer 10x, MgCl₂ και Taq polymerase προέρχονται από τις εταιρίες Hy Test και Omni. Τα dNTP's από την εταιρία Promega και οι εκκινητές από την invitrogen.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την παρούσα μελέτη αναλύθηκαν 82 δείγματα DNA του είδους *Ovis aries* τα οποία συλλέχθηκαν από την περιοχή των Τρικάλων και της Άρτας. Αρχικά έγινε απομόνωση του DNA όλων των δειγμάτων από αίμα. Στη συνέχεια με χρήση της PCR ενισχύθηκε το 2^ο εξώνιο του γονιδίου *DRB1*. Μέρος του προϊόντος της PCR μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf στον οποίο προστίθεται και Buffer αποδιάταξης. Έπειτα με χρήση της ανάλυσης SSCP τα δείγματα μέσω αποδιάταξης και ηλεκτροφόρησης δίνουν τα πρότυπά τους. Για την εμφάνιση των ζωνών γίνεται χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με την τεχνική χρώσης του νιτρικού αργύρου (silver staining).

Απομόνωση DNA

Το πρώτο βήμα που απαιτείται για την ταυτοποίηση γονιδιακών πολυμορφισμών είναι η απομόνωση του πυρηνικού DNA. Μια αποτελεσματική μέθοδος απομόνωσης πρέπει να δίνει αρκετή ποσότητα DNA, δηλαδή να είναι αποδοτική ποσοτικά αλλά και ποιοτικά δίνοντας DNA σε καλή κατάσταση το οποίο

δεν είναι διασπασμένο σε μικρά κομμάτια. Η μέθοδος απομόνωσης DNA που χρησιμοποιήθηκε είναι η εξής:

Απομόνωση DNA από αίμα

- 1) Αρχικά τοποθετείται 0,5 ml αίματος σε σωλήνα erpendorf και προστίθεται 1 ml SSC 1X. Στη συνέχεια vortex και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 3min
- 2) Απομάκρυνση 1ml υπερκείμενου και προσθήκη 1ml SSC 1X. Στη συνέχεια vortex και φυγοκέντρηση για 1 min στις 13000 rpm
- 3) Απομάκρυνση υπερκείμενου, προσθήκη 0.5ml NaOAc 0.2 M, vortex , προσθήκη 50μl SDS 5% και 10 μl πρωτεΐνάση K, επώαση για 1 hour 55 °C
- 4) Προσθήκη 0.5ml phenol και 0.5 ml chloroform, vortex, και φυγοκέντρηση για 5min 13000rpm
- 5) Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα erpendorf προσθήκη 1ml chloroform, φυγοκέντρηση για 10min στις 13000 rpm
- 6) Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα erpendorf προσθήκη 1ml isopropanol κι επώαση στους -20 °C για 15 min
- 7) Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 1ml ethanol 70%, φυγοκέντρηση για 10min στις 13000 rpm
- 8) Αφαίρεση του υπερκείμενου, επώαση και ξήρανση για 1 h στους 37 °C
- 9) Προσθήκη 100μl dd H₂O
- 10) Παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για διάλυση

Ο ρόλος των αντιδραστηρίων της απομόνωσης

Η οσμωτική πίεση ρυθμίζεται από το NaOAc το οποίο προκαλεί τη διόγκωση και στη συνέχεια λύση των κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται η διάσπαση των κυττάρων. Το SSC δεσμεύει τα κατιόντα τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών. Το ιοντικό απορρυπαντικό SDS προστατεύει το DNA από τις νουκλεάσες διασπώντας τις πυρηνικές μεμβράνες και αποδιατάσσοντας τις πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνάση K προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό των λιπιδίων και των πρωτεϊνών από τα νουκλεϊκά

οξέα ενώ το pH της πρέπει να είναι μεγαλύτερο του 7 έτσι ώστε το DNA να βρίσκεται στην υδατινή (πάνω) φάση. Το χλωροφόρμιο καθιστά πιο εύκολο των διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας, μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και απομακρύνει τη διαλυμένη φαινόλη από την υδατική φάση Η ισοπροπανόλη και η αιθανόλη 70% κατακρημνίζουν το DNA επειδή είναι αδιάλυτο σε αυτούς τους οργανικούς διαλύτες.

Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα

Η επιτυχία της απομόνωσης ελέγχεται με φωτομέτρηση ή/και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v. Κατά τη φωτομέτρηση πραγματοποιείται αραιώση 1 μl δείγματος DNA σε 49 μl ddH₂O. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA η οποία πρέπει να είναι πάνω από 150ng/μl. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA που αναμένεται να έχει τιμή περίπου 2 σε κατάλληλα για χρήση δείγματα.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών απλών αντιδράσεων, οι οποίες διαφέρουν στη θερμοκρασία και το χρόνο. Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
2. Υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο (primer annealing).
3. Σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης (primer extension).

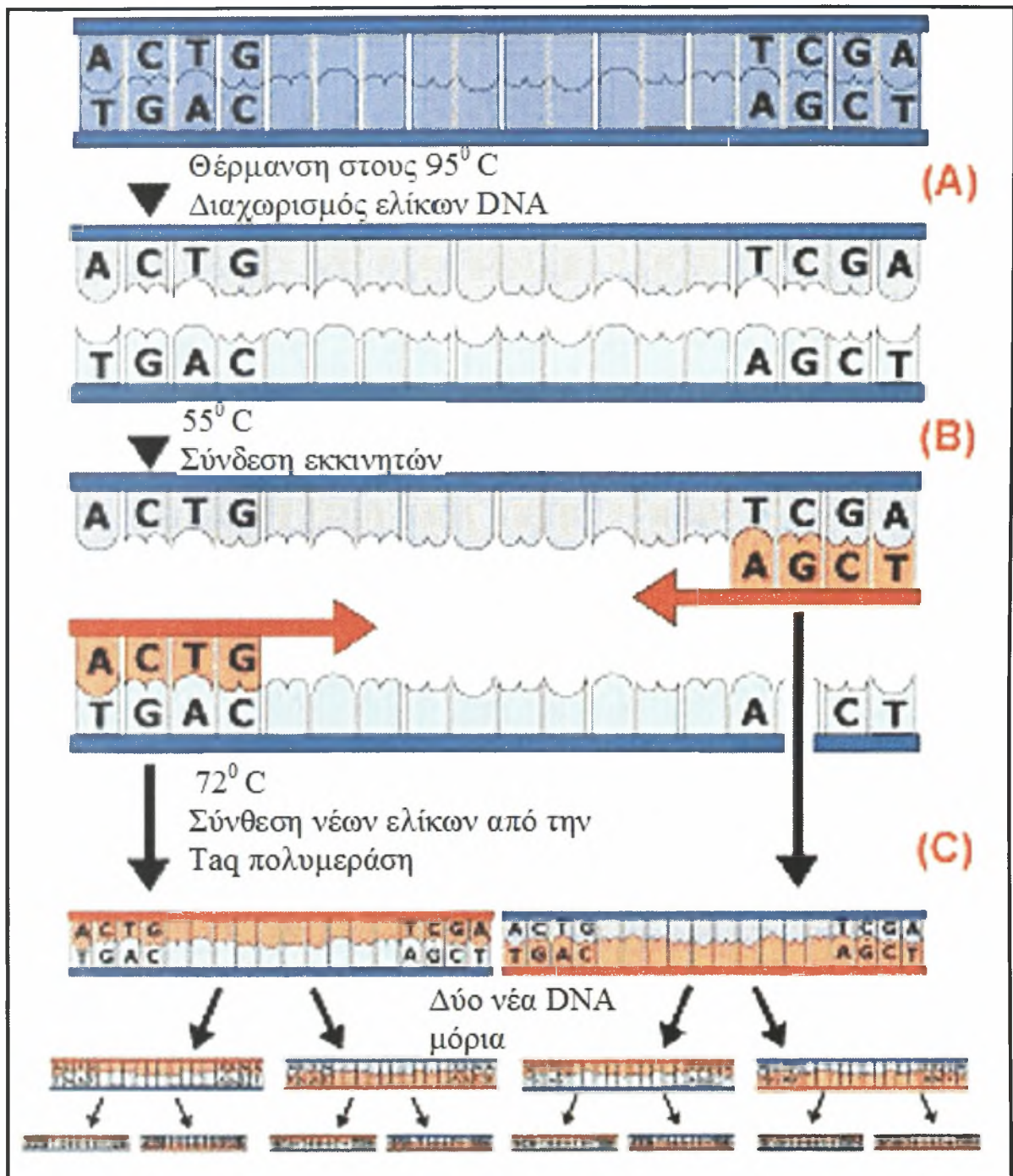
Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί από το δείγμα, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως μεταξύ 92°C και 96°C. Με αυτό τον τρόπο οι συμπληρωματικοί κλώνοι του DNA απομακρύνονται.

Στο δεύτερο βήμα με μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης (50°-65°C) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων, τα οποία προσδένονται στην αλληλουχία του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές, μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA.

Στο τρίτο και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72°C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση που επιτρέπει τη σύνθεση του DNA σε κατεύθυνση 5' προς 3'. Μεγάλη ώθηση στην τεχνική PCR έδωσε η ανακάλυψη του θερμοανθεκτικού ενζύμου πολυμεράσης του βακτηριδίου *Thermus Aquaticus* (Taq Polymerase). Η Taq Polymerase συνθέτει περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Ο χρόνος που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA-στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR.

Σε μια τυπική ανάλυση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, συνήθως 30 ή 40, καταλήγοντας στο σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο, ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA.

Η αξιολόγηση του προϊόντος της PCR γίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.



Εικ.7: Χαρακτηριστικό απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Βήμα 1: Θερμαίνεται σε θερμοκρασία 95 ° C για την αποδιάταξη των δύο κλώνων του DNA-στόχου (A). Βήμα 2: ψύχεται στους ~ 55 ° C για να μπορέσουν οι εκκινητές να προσδεθούν στα άκρα των δύο κλώνων (B). Βήμα 3: θερμαίνεται στους ~ 75 ° C, για να μπορέσει η Ταq πολυμεράση να συνθέσει συμπληρωματικά αντίγραφα του κάθε κλώνου.

Το συνολικό διάλυμα της αντίδρασης είναι 50μl. Τα αντιδραστήρια που προστέθηκαν και οι ποσότητές τους είναι:

DNA	3μl
Buffer 10x	5μl
MgCl ₂ 50mM	0,7μl
dNTPs (10mM each)	1μl
Primer F (25pmol/μl)	1μl
Primer R (25pmol/μl)	1μl
Taq polymerase 5U/μl	0,2μl
dd H ₂ O	38,1μl

Οι συνθήκες PCR στις οποίες ενισχύθηκε το εξόνιο2 του γονιδίου DRB1 είναι οι εξής:

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95	4 min
Αποδιάταξη (Denaturation)	94	40 sec
Συγκόλληση Primer (Annealing)	57	50 sec
Επέκταση (Extension)	72	45 sec
Τελική επέκταση	72	10 min

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του DRB1 είναι:

Fw 5' ATC CCC TCT CTG CAG CAC ATT TC 3'

Rv 5' CCC GCG CTC ACC TCG CCG CTG 3'

Τα PCR προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό, τον χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από τις παρακάτω παραμέτρους:

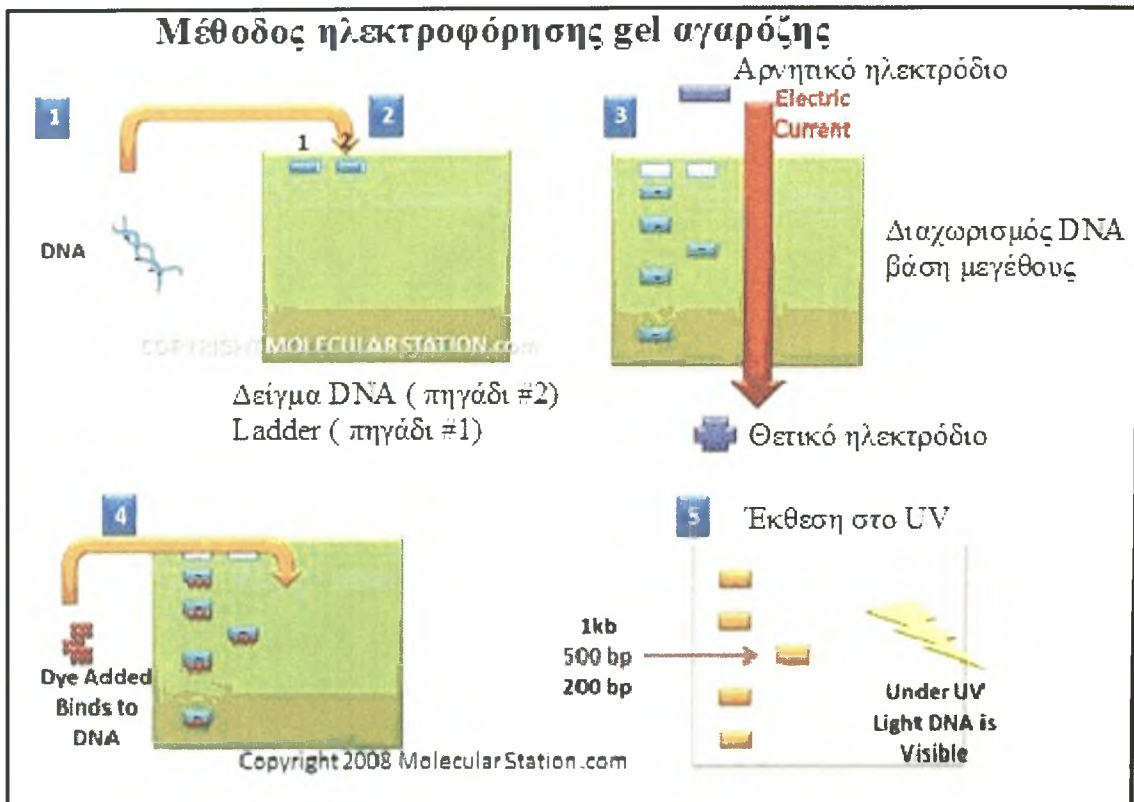
1. Το μέγεθος των μορίων DNA. Δίκλινα γραμμικά μόρια DNA κινούνται μέσω του πηκτώματος με ρυθμούς αντιστρόφως ανάλογους του λογαρίθμου (\log_{10}) του αριθμού των ζευγών των βάσεων (Helling R.B. et al., 1974).
2. Τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα.
3. Τη στερεοδομή των μορίων DNA. Υπερελικωμένα γραμμικά και κυκλικά μόρια DNA του ίδιου μοριακού βάρους κινούνται με διαφορετικούς ρυθμούς στο ίδιο πήκτωμα αγαρόζης (Thorne H.V. 1966).
4. Την τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται. Σε χαμηλές τάσεις ο ρυθμός μετανάστευσης γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος με την εφαρμοζόμενη τάση, ενώ σε υψηλές τάσεις ο ρυθμός μετανάστευσης των τμημάτων του DNA μεγάλου μοριακού βάρους είναι αντιστρόφως ανάλογος.

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται για πολύ μικρές ποσότητες DNA και γίνεται με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) στο πήκτωμα αγαρόζης. Το βρωμιούχο αιθίδιο με μια πλευρική ομάδα που περιέχει παρεμβάλλεται μεταξύ γειτονικών βάσεων του DNA και φθορίζει όταν ακτινοβολείται με υπεριώδη ακτινοβολία. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι καρκινογόνο και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά το χειρισμό του.

Διαδικασία

1. Αρχικά ετοιμάζεται η ειδική συσκευή στην οποία τοποθετείται η πηκτή.

2. Στη συνέχεια ετοιμάζεται η πηκτή 2% χρησιμοποιώντας 0,6 gr αγαρόζης και 30 ml από το buffer TAE 1x.
3. Θέρμανση του διαλύματος έτσι ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη (ταυτόχρονη ανακίνηση).
4. Το διάλυμα κρύνει, προστίθεται 3ml βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml) και στη συνέχεια τοποθετείται στην ειδική συσκευή.
5. Εισάγεται το χτενάκι της συσκευής έτσι ώστε να σχηματιστούν οι θέσεις της πηκτής στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
6. Αφήνουμε την αγαρόζη να πήξει καλά για περίπου 30 min και αφαιρούνται τα χτενάκια.
7. Τοποθέτηση της πηκτής σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει buffer TAE.
8. Ανάμειξη 3ml loading buffer με 5 ml προϊόντος της αντίδρασης της PCR και στη συνέχεια εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής.
9. Παρέχουμε ρεύμα στο κύκλωμα προσέχοντας να διατηρούνται σταθερά τα Volt κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ανάμεσα σε 80-100. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 30 min. Διακόπτεται όταν είναι ικανοποιητική η απόσταση που έχει διατρέξει το μέτωπο της ταχέως κινούμενης χρωστικής του loading buffer μέσα στο πήκτωμα.
10. Πραγματοποιείται παρατήρηση του πηκτώματος κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία και ακολουθεί φωτογράφησή του και ακολούθως ανάλυση του αποτελέσματος.



Εικ. 8: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης ενός κλώνου (SSCP)

Η ανάλυση SSCP, όπως έχει περιγραφεί, βασίζεται στην αποδιάταξη μικρών προϊόντων PCR και την ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η ανάλυση αποτελείται από τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη PCR προϊόντων

Για την αποδιάταξη των δειγμάτων μεταφέρεται μέρος του προϊόντος της PCR (8 μl) σε eppendorf και την προστίθενται 10 μl buffer αποδιάταξης. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στον κυκλοποιητή όπου και θερμαίνονται στους 97°C για 6 min. Για να διατηρηθούν στη μονόκλωνη κατάσταση γίνεται άμεση μεταφορά τους σε πάγο..

Buffer Αποδιάταξης

95% formamide

0,05% Bromophenol blue

0,05% Xylene Cyanol

10mM NaOH

2. Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Τα δείγματα του DNA για να διαχωριστούν φορτώνονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα:

Μητρικό διάλυμα της ακρυλαμίδης (38,5%)

Ακρυλαμίδα 75gr

Bis-acrylamide 2gr

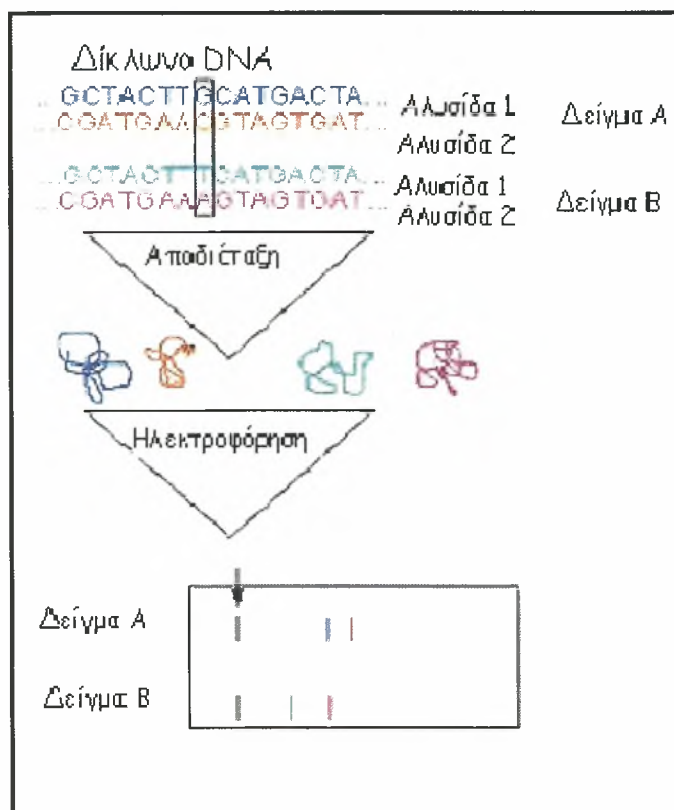
ddH₂O έως τα 200ml

Για την παρασκευή 125ml πηκτής ακρυλαμίδης (8%) χρησιμοποιούνται:

1. 33ml μητρικού διαλύματος 38,5%
2. 6,2ml TBE 10x
3. 12,5ml γλυκερόλης 50%

Συμπληρώνεται H₂O μέχρι τον όγκο των 100ml ενώ προστίθενται στο διάλυμα 100μl TEMED και 620μl ammonium persulfate 20% (APS).

Μετά τον πολυμερισμό της πηκτής εισάγεται σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου προστίθεται το buffer TBE 0.5% και στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα τα οποία βρίσκονται στο πάγο. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 220 volts σε θερμοκρασία δωματίου για 12 με 16 ώρες.



Εικ.9: Η ανάλυση SSCP

Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης γίνονται ορατά με χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining). Η τεχνική στηρίζεται στη δέσμευση του DNA από τον άργυρο και στην αντίδραση με φορμαλδεΐδη παρουσία βάσης. Το DNA μετά τη χρώση αποκτά ένα καστανό (καφέ) χρώμα στην πηκτή ενώ το φόντο είναι κίτρινο.

Οι πηκτές τοποθετούνται σε δοχεία στα οποία προστίθενται τα εξής 3 διαλύματα:

Διάλυμα 1 (400ml)

EtOH 8ml

Acetic Acid 0,5ml

ddH₂O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml)

Διάλυμα AgNO_3 1gr/lit

Διάλυμα 3 (200ml)

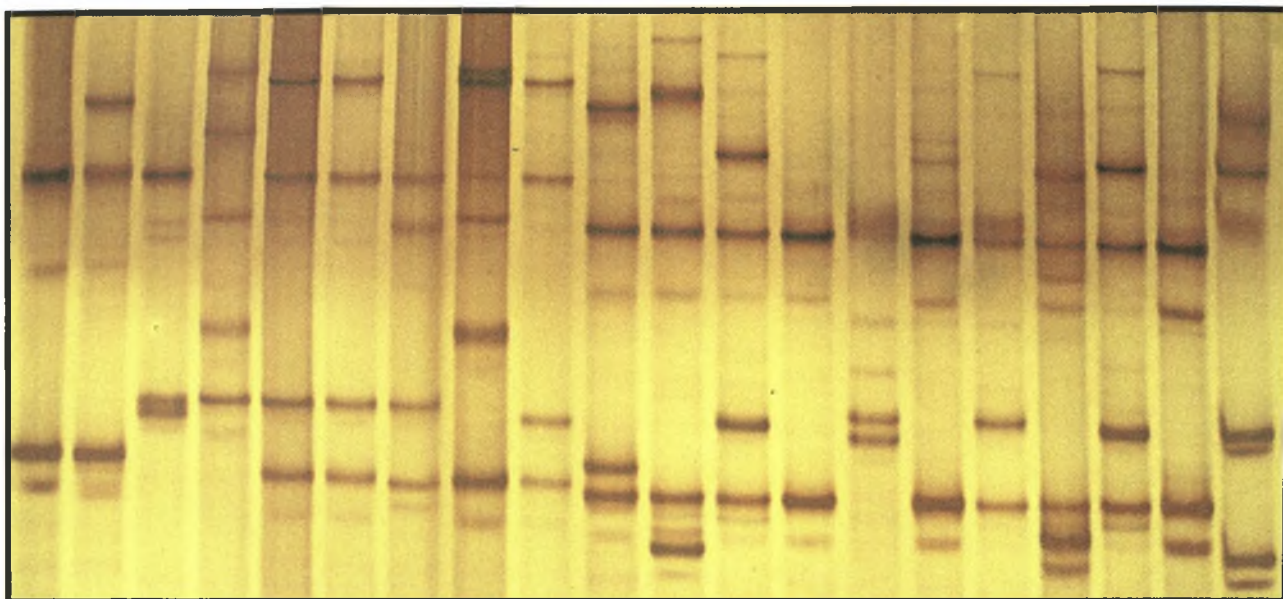
NaOH 3gr

NaBH_4 0,01gr

Formaldehyde 1ml

dd H_2O έως τα 200ml

Αρχικά προστίθενται τα 200 ml του διαλύματος 1 και αναδεύονται για 3 min. Στη συνέχεια αφαιρούνται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται με τα υπόλοιπα 200 ml. Ακολουθεί πλύση με δισ απεσταγμένο νερό για 1 min και κατόπιν προστίθεται το διάλυμα 2 με ταυτόχρονη ανάδευση για 18 min και ακολουθούν δύο πλύσεις του 1 min η κάθε μια με δισ απεσταγμένο νερό. Τέλος, προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές.



Εικ. 10: Πρότυπα μετά από ανάλυση SSCP του γονιδίου *DRB1* του *Ovis aries*.

Κλωνοποίηση τμήματος DNA

Με την ανάλυση SSCP εντοπίσαμε τα διαφορετικά πρότυπα των ατόμων καθώς και τα ομόζυγα κι ετερόζυγα άτομα. Στην τελευταία περίπτωση, με σκοπό τον διαχωρισμό των δύο αλληλομόρφων, κλωνοποιήθηκε το προϊόν της PCR σε κατάλληλο φορέα. Μετά την κλωνοποίηση, πραγματοποιήθηκε PCR στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από διαφορετικές αποικίες ώστε να ελεγχθεί η ύπαρξη του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου και η αλληλούχηση αντιπροσωπευτικών κλώνων. Η διαδικασία περιλαμβάνει:

- 1) Καθαρισμός των προϊόντων της PCR και ποσοτικοποίησή τους
- 2) Αντίδραση σύνδεσης (ligation) που περιλαμβάνει:

5μl ενθέματος-προϊόντος PCR (~100ng)

1,5μl φορέα pGEM T-Easy(~70ng)

1μl ligase

7,5μl 2X ρυθμιστικού διαλύματος

Επώαση της αντίδρασης ο/η στους 4°C.

Φορέας pGEM-T Easy (Promega, #A3600)

Παρέχεται σαν γραμμικός φορέας και είναι κατάλληλος για την κλωνοποίηση προϊόντων PCR καθώς στα 3' άκρα του φέρει προεξέχοντα νουκλεοτίδια θυμιδίνης που υβριδοποιούνται με τα προεξέχοντα νουκλεοτίδια αδενίνης που προστίθενται από πολλές Taq DNA πολυμεράσες στα 5' άκρα των προϊόντων PCR. Επιπλέον, περιλαμβάνει τους υποκινητές T7 και SP6 που επιτρέπουν την αλληλούχηση με τη χρήση των αντίστοιχων εκκινητών. Επίσης, περιλαμβάνει το γονίδιο *lacZ* για χρωματική επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων.

3) Μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli* ως εξής:

Προσθήκη της αντίδρασης σύνδεσης (7μl) σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli*, που προηγουμένως έχουν ξεπαγώσει σε πάγο, ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για 20min. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων στους 42°C για 90sec, προσθήκη υγρού θρεπτικού υλικού LB και επώαση στους 37°C για 1h. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 2500rpm για 15min, ακολουθεί αφαίρεση του περισσώτερου υπερκείμενου θρεπτικού, επαναιώρηση των κυττάρων και επίστρωσή τους σε στερεό θρεπτικό υλικό LB που περιέχει αμπικιλίνη (100μg/ml) και X-gal για την επιλογή του πλασμιδίου και των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων αντίστοιχα. Οι αποικίες σχηματίζονται μετά από ολονύκτια επώαση των κυττάρων στους 37°C.

Παρασκευή θρεπτικού υλικού LB

15g LB (Scharlau) ή 30g LB+άγαρ (Scharlau) ανά 1lt ddH₂O για υγρό και στερεό θρεπτικό υλικό αντίστοιχα και αποστείρωση για 20min. Στην περίπτωση που θέλουμε να προσθέσουμε αντιβιοτικό ή X-gal στο στερεό θρεπτικό υλικό, αυτό γίνεται αφού η θερμοκρασία του ρυθμιστεί στους ~50°C.

4) Καλλιέργεια αποικιών

Από τις αποικίες που έχουν σχηματιστεί επιλέγονται οι λευκές που πιθανότατα αντιστοιχούν σε ανασυνδυασμένους κλώνους, τοποθετούνται σε 3ml υγρού

θρεπτικού LB που περιέχει αμπικιλίνη (100μg/ml) και επωάζονται υπό ανάδευση ο/η στους 37°C.

5) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η καλλιέργεια των βακτηρίων μεταφέρεται σε errendorf και τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 15 min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα βακτήρια επαναιωρούνται σε 300 μl διαλύματος P1 (15mM Tris.Cl pH 8, 10mM EDTA pH 8). Ακολουθεί προσθήκη 300μl διαλύματος αποδιάταξης P2 (200mM NaOH, 1% SDS), ήπια ανάδευση και επώαση σε RT για 5-15min (μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές). Η εξουδετέρωση γίνεται με προσθήκη 300μl διαλύματος P3 (3M οξικό κάλιο pH 5,5), ισχυρή ανάδευση και επώαση για 20min σε πάγο. Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12000rpm στους 4°C για 15min, το υπερκείμενου συλλέγεται και ακολουθεί επαναληπτική φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη ισοπροπανόλης (0,8 του όγκου) και συλλέγεται μετά από επώαση για 15min σε πάγο και φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15min στους 4°C. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, στεγνώνει και επαναδιαλύεται σε 50μl TE (10mM Tris.Cl pH 8, 1mM EDTA pH 8).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση των αλληλουχιών έγινε με το BioEdit καθώς και η εύρεση της αμινοξικής αλληλουχίας. Βρέθηκαν 31 αλληλόμορφα στις φυλές μπούτσικα και Frizarta που μελετήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα 22 από τα οποία τα 13 είναι νέα (δεν υπήρχαν στη βάση δεδομένων) ενώ ένα αλληλόμορφο (Onar6) είναι κοινό και στις δύο φυλές. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των αλληλομόρφων είναι:

```

Onar1  CATTTCTTGG AGTATCATAA GAGCGAGTGT CGTTTCTCCA ACGGGACGGA GCGGGTGGG TACCTGGACA GATACTTCTA TAAATGGAGAA
Onar2  .....C... ..AG... ..A.....T... ..C.....C.....T..... ..A.AC ...C.....
Onar3  ..... .. ..A.....T... .. .. ..T..... .. .. .. ..
Onar4  ..... ..G..... .. .. .. ..T..... .. .. .. ..
Onar5  ..... ..GC... ..A.....T... .. .. .. ..T..... .. .. .. ..
Onar6  .....C... ..T... ..G.....T... ..A.....T... ..C.....TG..C... ..T..A.AC .. ..
Onar7  .....C... ..TC..C .. .. .. ..A..... .. .. .. ..TG.....C. ....
Onar8  .....C... ..T..G .. ..A.....T... .. ..C... ..A.....CT.....A. ....C. ....
Onar9  ..... ..GC... .. .. .. ..T... .. .. .. ..T.....A. .... .. ..
Onar10 ..... .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..T..... .. .. .. ..
Onar11 ..... ..TC... .. .. .. ..T... .. .. .. ..T.....A. .... .. ..
Onar12 ..... ..AC... ..AA..... .. .. .. ..T..... .. .. .. ..
Onar13 ..... ..TC..C .. .. .. ..A.....T... .. .. .. ..T..... .. .. .. ..
Onar14 ..... .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
Onar15 ..... ..AC... ..AA..... .. .. .. ..T..... .. .. .. ..T.....C. ....

```

Ovar16AC...AA.....T.....C.....
Ovar17A...T.....T.....C.....
Ovar18G.....
Ovar19A...T.....T.....C.....
Ovar20
Ovar21GC...T.....T.....A.....
Ovar22AC...A.....T.....

Ovar1 GAGTACGTCC GCTTCGACAA CGACTGGGGC GAGTACCGAG CCGTGGCCGA GCTGGGCGG CCGGACGCCA AGTACTGGAA CAGCCAGAAG
Ovar2 ...A.....G.....T...G.....A.....TG...C.A.....
Ovar3G.....G.....T...G.....G.AG...G.....
Ovar4 ...A.....G.....
Ovar5G.....T...G.....G.AG...G.....
Ovar6 ...AC.....G.....T...G.....A.C...A...GA.....G.C.....
Ovar7 ...T.....G.....T...G.....G.....T.....
Ovar8 ...T.C.....G T.....TT.G.A...A.....C...TG.C.A.....
Ovar9G.....
Ovar10C.....G.....G.AG...G.....
Ovar11G.....GA.....
Ovar12C.....G.....T...G.....A.....

Ovar13G
Ovar14 ...AC.C...GG.AG...G
Ovar15C.....
Ovar16C.....
Ovar17 ...T.....G.....T..G.....G.AG...G
Ovar18
Ovar19 ...T.....G.....T..G.....G.AG...G
Ovar20G.....G.AG...G
Ovar21 ...AC.C.....
Ovar22
Ovar1 GAGATCCTGG AGCGGAAGCG GGCCGGCCGTG GACACGTACT GCAGACACAA CTACGGGGTC ATTGAGAGTT TCAGTGTGCA GCGGCGA
Ovar2 ..CT.....A.C.G.A..A...G.....T.....
Ovar3 ...C.....G.....AG.....
Ovar4 ...C.....AAT.....T.....
Ovar5 ..CT.....GC.....GG.....
Ovar6AG.....GTG.....G.....
Ovar7 ..CT.....A.C.G.A..A...G.....
Ovar8 A.C.....A.....AG...A....GTG.....T.....
Ovar9 ..CT.....AAT.....T.....

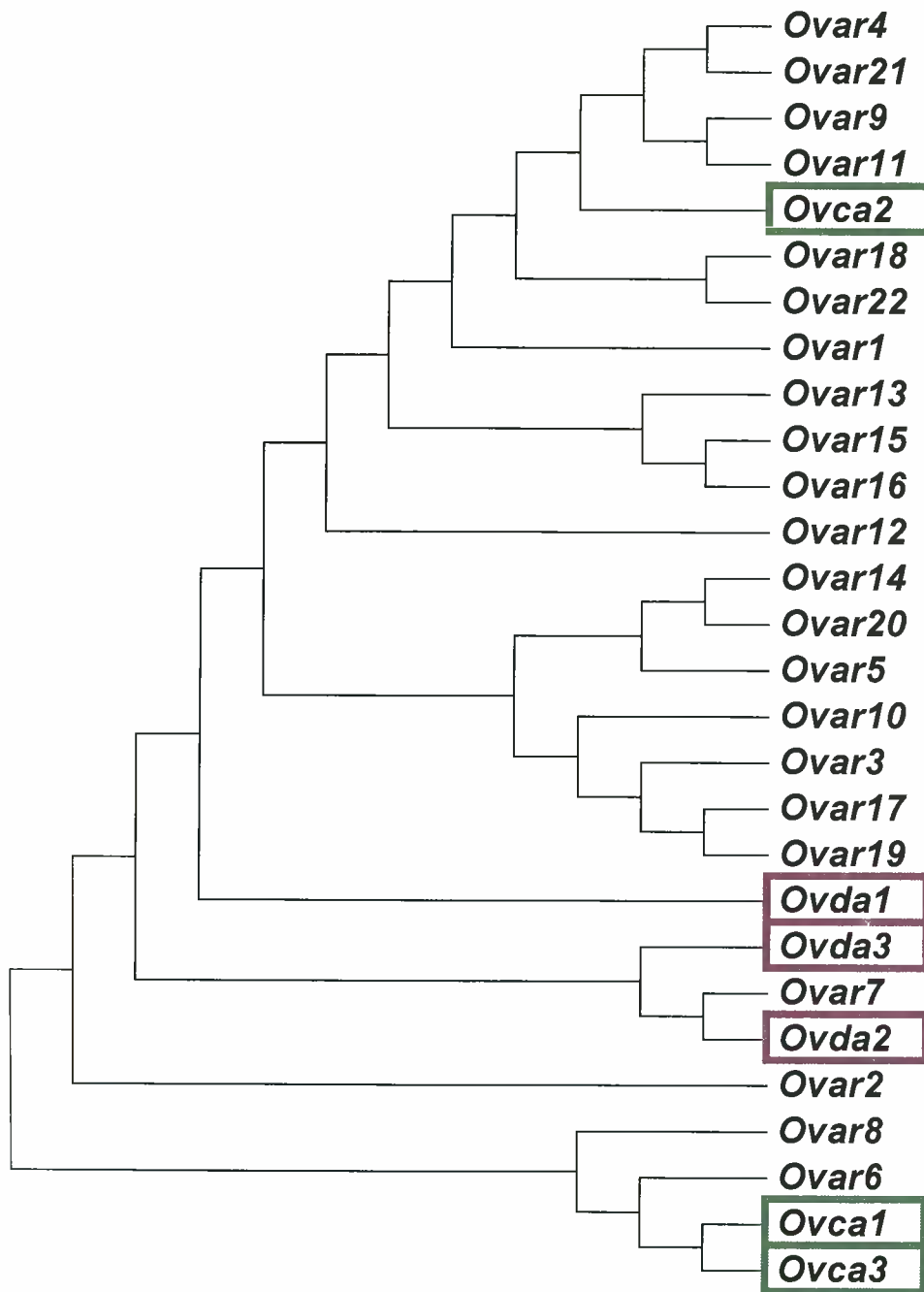
Ovar10 ...C.....G...A..AG.....GG.....
Ovar11 ..CT.....AAT.....T.....
Ovar12 ...C.....GC.....GG.....
Ovar13G...A..AG.....
Ovar14 ..CT.....A.C.....AG.....
Ovar15G...A..AG.....
Ovar16G...A..AG.....
Ovar17 ...C.....G...A..AG.....T.....
Ovar18 ...C.....AAT.....
Ovar19 ...C.....G...A..AG.....T.....
Ovar20 ..CT.....A.C.....AG.....
Ovar21 ...C.....AAT.....GG.....
Ovar22 ...C.....AAT.....A.....

Στη συνέχεια βρέθηκε το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης καθώς και τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR) και τα οποία σημειώνονται με αστερίσκο.

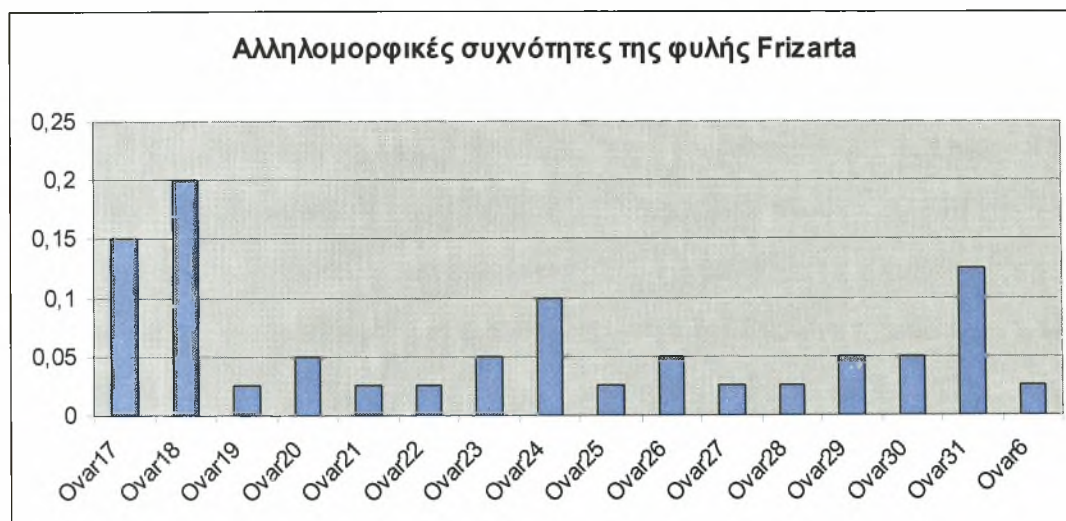
	** * *	**	*	*	**	*	**	*	**	*
Οvar1	HFLYHKSEC	RFSNGTERVR	YLDRYFYNGE	EYVRFNDWS	EYRAVAELGR	FDAKIWNISQK	EILERKRAAV	DIYCRHNYGV	IESEFSVQR	
Οvar2S....	H.F.....	F...YT... .	N...S... .	F..T... .	..EQ....	DF..SR.T..	F.....	
Οvar3	H.F.....	F.....	S... .	F.....	RS.E.....	L...R..E.	
Οvar4R....	F.....	N...S...	L.....N.	F.....	
Οvar5A....	H.F.....	F.....	S... .	F.....	RS.E.....	DF..A....	G.....	
Οvar6Y.G..	H.F.....	L.H.FYT... .	T...S... .	F..TQQ.Q	E..EH....	E..V.....	V.....	
Οvar7ST... .	H.....	L.....	H... .	F...S... .	F.....	DF..SR.T..	
Οvar8YR... .	H.F.....	L.E...H... .	FA...S... .	F..T... .	A.EQ....	N...Q...E.	N.V.....	F.....	
Οvar9A....	F.E.....	S...	DF.....N.	F.....	
Οvar10	F.....	A..S...	RS.E.....	L...R..TE.	G.....
Οvar11S....	F.E.....	S... .	T.....	DF.....N.	F.....	
Οvar12T.K..	F.....	A..S... .	F.....	L...A....	G.....	
Οvar13ST... .	H.F.....	F.....	S...	R..TE.	
Οvar14	TL..S...	RS.E.....	DF..QT..E.	
Οvar15T.K..	F.....	H... .	A..S...	R..TE.	

Ovar16 T.K. P.....H.....A...S.....R.TE.
Ovar17 H.F.....F.....H.....F.....S.....F.....R.S.E.....L...R.TE. F.....
Ovar18 R.....L.....N.....
Ovar19 H.F.....F.....H.....F.....S.....F.....R.S.E.....L...R.TE. F.....
Ovar20 R.S.E.....D.F..Q.T..E.
Ovar21 A.....F.E.....T.L...S.....L.....N.....G.....
Ovar22 T.R.....F.....L.....M.....

Ακόμα βρέθηκαν οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των αλληλομόρφων και απεικονίζονται στο δέντρο. Η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου έγινε με το πρόγραμμα MEGA και χρησιμοποιήθηκαν και αλληλόμορφα των ειδών *Ovis dalli* (σημειώνονται με μοβ χρώμα) και *Ovis canadensis* (σημειώνονται με πράσινο χρώμα).



Στη συνέχεια, βρέθηκαν οι αλληλομορφικές συχνότητες, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GENETIX, καθώς και ο αριθμός συνώνυμων και μη συνώνυμων μεταλλάξεων εντός κι εκτός PBR.



Πίνακας 1: Αλληλομορφικές συχνότητες



Πίνακας 2: Ποσοστά συνώνυμων και μη συνώνυμων μεταλλάξεων εντός κι εκτός PBR.

Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 22 μοναδιαία αλληλόμορφα που, κατά μέσο όρο, παρουσιάζουν 8,6% και 16% απόκλιση σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο αντίστοιχα. Το ποσοστό ετεροζυγωτίας, αν και κατά λίγο μικρότερο από το αναμενόμενο και από αυτά που έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες, είναι υψηλό (75,5%). Ο υπολογισμός των αλληλομορφικών συχνοτήτων οδήγησε στην ταυτοποίηση τριών κύριων αλληλομόρφων με ποσοστό εμφάνισης 20, 30 και 12% αντίστοιχα στη φυλή μπούτσικα ενώ στη φυλή Frizarta παρατηρούνται τέσσερα αλληλόμορφα με υψηλότερη συχνότητα από τα υπόλοιπα. Η ανάλυση των συνώνυμων (ds) και μη συνώνυμων (dn) μεταλλάξεων στο εξόνιο 2 του *DRB1* έδειξε σαφώς αυξημένο αριθμό των τελευταίων, τόσο εντός όσο και εκτός της περιοχής πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR), γεγονός που αποτελεί ένδειξη δράσης θετικής επιλογής.

Ο προσδιορισμός των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των αλληλομόρφων του *DRB1* του *O. aries* και αλληλομόρφων που έχουν ταυτοποιηθεί σε άλλα είδη του γένους *Ovis* έδειξε ότι αλληλόμορφα που συναντώνται μόνο στο είδος *O. canadensis* ή *O. dalli* είναι περισσότερο συγγενικά με αλληλόμορφα που συναντώνται στο *O. aries* απ' ότι αλληλόμορφα που προέρχονται από το ίδιο είδος. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλους γενετικούς τόπους του MHC και προτείνεται ότι

πρόκειται για αλληλουχίες που υπήρχαν στον κοινό πρόγονο και διατηρήθηκαν στα είδη και μετά τον διαχωρισμό τους. Η υπόθεση αυτή ονομάζεται «δια-ειδική» (trans-species hypothesis) και ως υπεύθυνος μηχανισμός προτείνεται η δράση της ισοζυγούσα επιλογής.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός αυτή της επιστημονικής μελέτης ήταν η προκαταρκτική διερεύνηση του πολυμορφισμού του εξωνίου 2 του γονιδίου *DRB1* του ΜHC στο είδος *O. aries*. Για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SSCP. Βρέθηκαν 31 αλληλόμορφα και τατοποιήθηκαν τα 22 από τα οποία τα 13 είναι νέα και δεν προϋπήρχαν στη βάση δεδομένων. Έγινε, έτσι, δυνατή η εκτίμηση του πολυμορφισμού του *DRB* ενδοπληθυσμιακά και διαπληθυσμιακά.

Το λειτουργικό *DRB1* γονίδιο των θηλαστικών έχει βρεθεί ότι είναι το περισσότερο πολυμορφικό γονίδιο του ΜHC. Το ΜHC του προβάτου δεν είναι τόσο καλά μελετημένο σε σχέση με τα άλλα είδη. Ωστόσο, μια μεγάλη έρευνα για τα γονίδια ΜHC του ανθρώπου, των αρουραίων, των ποντικών, των βοοειδών, και άλλων ειδών έχει επιβεβαιώσει αυτό το χαρακτηριστικό. Το *DRB1* του προβάτου και της κασίτσας είναι παρόμοιο με εκείνο των άλλων θηλαστικών, όχι μόνο σε πολυμορφισμό αλλά και στην ακολουθία νουκλεϊκών οξέων (Amills *et al.*, 1995, 1996; Blattman *et al.*, 1993; Escayg *et al.*, 1993, 1996; Grain *et al.*, 1993).

Έχει διατυπωθεί η θεωρία ότι αυτός ο πολυμορφισμός έχει αναπτυχθεί εξελικτικά για να εξασφαλίσει ότι ο πληθυσμός δε θα υποκύψει σε ένα νέο μικροοργανισμό γιατί τουλάχιστον κάποια άτομα θα είναι ικανά να εγείρουν αποτελεσματικές απαντήσεις κατά οποιουδήποτε πεπτιδίου. Αξιοσημείωτη είναι ωστόσο η σημασία των τοπικά προσαρμοσμένων πληθυσμών για τη διατήρηση των γενετικής ποικιλομορφίας (Amills *et al.* 2004).

Οι πληθυσμοί του είδους *O. aries* που μελετήθηκαν προέρχονται από την περιοχή των Τρικάλων και της Άρτας. Το υψηλό επίπεδο ετεροζυγωτίας που παρατηρήθηκε (75,5%), ο υψηλός αριθμός μη συνώνυμων μεταλλάξεων εντός κι εκτός της περιοχής πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR) καθώς κι ότι ένας πολύ μικρός αριθμός αλληλομόρφων βρίσκεται σε υψηλή συχνότητα, ενώ τα υπόλοιπα αλληλόμορφα βρίσκονται σε πολύ μικρές συχνότητες είναι ισχυρές ενδείξεις ισοζυγούσας επιλογής της οποίας κύριος ρόλος είναι η διατήρηση του πολυμορφισμού.

Ακόμη βρέθηκε ότι αλληλόμορφα του *DRB1* του *O. aries* και αλληλόμορφα που έχουν ταυτοποιηθεί σε άλλα είδη του γένους *Ovis* είναι περισσότερο συγγενικά

με αλληλόμορφα που συναντώνται στο *O. aries* απ' ό,τι αλληλόμορφα που προέρχονται από το ίδιο είδος. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί γενικότερα στο ΜHC και προτείνεται ότι πρόκειται για αλληλουχίες που υπήρχαν στον κοινό πρόγονο και διατηρήθηκαν στα είδη και μετά τον διαχωρισμό τους. Η υπόθεση αυτή ονομάζεται «δια-ειδική» (trans-species hypothesis) και είναι ένας από τους βασικούς μηχανισμούς διατήρησης της ποικιλομορφίας.

Η μελέτη του πολυμορφισμού του ΜHC είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς αυτή αποτελεί σημαντικό δείκτη γενετικής ευρωστίας των πληθυσμών. Ακόμη η στενή σύνδεση ανάμεσα στον αυξημένο πολυμορφισμό και τα συστήματα αυτό-αναγνώρισης υποδεικνύει ότι η σύγκριση των εξελικτικών χαρακτηριστικών αυτών των συστημάτων μπορεί να αποκαλύψει γενικές οργανωτικές αρχές που αποτελούν το θεμέλιο για τη διατήρηση του γενετικού πολυμορφισμού. Έτσι, παρατηρείται ότι οι κύριοι μηχανισμοί που δρουν και διατηρούν τον πολυμορφισμό στο ΜHC διαφόρων ειδών συντελούν και στον πολυμορφισμό του *DRB1* των φυλών που μελετήθηκαν.

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων αιώνων, το ισπανικό αγριοκάτσικο (*Capra pygæaica*), έδειξε μια σημαντική δημογραφική παρακμή ως αποτέλεσμα της σταδιακής καταστροφή των φυσικών του ενδιαιτημάτων, επιδημίες ασθενειών, και την ανεξέλεγκτη θήρα. Μερική αλληλούχιση του *DRB1* της τάξης II του ΜHC αποκάλυψε ότι το ισπανικό αγριοκάτσικο έχει αξιοσημείωτα χαμηλά επίπεδα γενετικής διακύμανσης. Μια φυλογενετική ανάλυση του ισπανικού αγριοκάτσικου και ένα σύνολο αλληλομόρφων *DRB1* εγχώριας αίγας αποκάλυψε ότι οι ακολουθίες αντιπροσωπεύουν τέσσερις μεγάλες αλληλομορφικές γενεαλογίες (Amills et al, 2004). Ο περιορισμένος αριθμός αλληλομόρφων οφείλεται σε φαινόμενο στενωπού. Από αυτό το γεγονός διακρίνεται η σημασία της φυσικής επιλογής και της δημογραφικής ιστορίας της πληθυσμών κατά τον καθορισμό του ρυθμού γενετικής ποικιλομορφίας στην περιοχή του ΜHC. Επιπλέον τονίζει τη σημασία των τοπικά προσαρμοσμένων πληθυσμών για τη διατήρηση των γενετικής ποικιλομορφίας.

Τα πρόβατα του είδους *Ovis canadensis* ήταν άφθονα στο μεγαλύτερο μέρος της Βορειοδυτικής Αμερικής πριν από την Ευρωπαϊκή εγκατάσταση και ο Seton (1929), χρησιμοποιώντας πληροφορίες για τη διανομή και την πυκνότητα, εκτιμά ότι

το είδος *Ovis canadensis* αριθμούσε πάνω από ένα εκατομμύριο ζώα. Ωστόσο, ο Buechner (1960), κατά την επανεξέταση της κατάστασης των ειδών, εκτιμά ότι μόνο 25.000 ζώα παρέμειναν, ένας αριθμός κατά 40 φορές μικρότερος από την προηγούμενη πριν την εγκατάσταση εκτίμηση. Μετάδοση ασθενειών από τα ντόπια οικόσιτα (πιστεύεται ότι είναι απόγονοι του παλαιού κόσμου ειδών προβάτων), τις κατσίκες, και τα βοοειδή θεωρείται η σημαντικότερη αιτία της εν λόγω δραστηρικής μείωσης του πληθυσμού (Buechner, 1960). Πολλοί διαφορετικοί τύποι ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων της βακτηριακής πνευμονίας καθώς και του ιού της κυανής γλώσσας που προκλήθηκαν, έχουν εμπλακεί σε αυτή τη μείωση του πληθυσμού (Brown, 1993· Elliot et al., 1994· Bunch et al., 1999). Σε αυτές τις δύο περιπτώσεις φαίνεται η σπουδαιότητα του πολυμορφισμού των γονιδίων του MHC καθώς έτσι επιτυγχάνεται η προσαρμογή των ατόμων σε νέες συνθήκες και μπορούν να αντιμετωπίσουν καλύτερα και πιο αποτελεσματικά ένα ευρύτερο φάσμα μικροοργανισμών.

Χαρακτηριστική είναι η μελέτη που έγινε σε κινέζικες φυλές προβάτων. Αυτές οι τοπικές φυλές έχουν ισχυρή αντίσταση στις ασθένειες κάτι που προκύπτει από το μεγάλο πολυμορφισμό του *DRB1* που παρατηρείται σε αυτές. Μογγολικά πρόβατα, μογγολική αίγα, πρόβατα από το Καζακστάν, αίγα από το Καζακστάν είναι κινέζικα πρόβατα και κατσίκες τοπικών φυλών, που ποτέ δεν ανταλλάσσονται με το αίμα ξένων φυλών. Μογγολικά πρόβατα και μογγολική κατσίκια προέρχονται από την περιοχή της Μογγολίας στη Βόρεια Κίνα, τα πρόβατα και οι αίγες του Καζακστάν προέρχονται από την Sinkiang μια περιοχή στη βορειοδυτική Κίνα. Οι δύο περιοχές έχουν ειδικές κλιματικές και γεωγραφικές συνθήκες. Ειδικά στο Sinkiang, ο χειμώνας είναι πολύ κρύος και το υψόμετρο είναι μεγαλύτερο άρα αυτές οι τοπικές φυλές έχουν ισχυρή αντίσταση στις ασθένειες και στον παγετό (Dongxiao et al., 2004).

Ένα άλλο βασικό χαρακτηριστικό του *DRB1*, που επιβεβαιώθηκε και από την παρούσα μελέτη, είναι η ύπαρξη περισσότερων μη συνώνυμων υποκαταστάσεων από τις συνώνυμες. Αυτή η ένδειξη θετικής επιλογής παρατηρείται σε πολλές περιπτώσεις. Η αντιλόπη (*Rupicapra r. rupicapra*) παρουσιάζει γενετική

ποικιλομορφία στο εξώνιο 2 του *DRB1* του ΜHC τάξης ΙΙ. Το εκφρασμένο DRB γονίδιο περιέχει όλα τα αναμενόμενα χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων όλων των συντηρημένων καταλοίπων που βρέθηκαν και σε άλλα θηλαστικά. Το απομονωμένο γονίδιο *DRB* που εκφράζεται στην αντιλόπη θεωρείται ορθόλογο με το *DRB* ΜHC τάξης ΙΙ άλλων θηλαστικών. Σε αυτό τον πληθυσμό παρατηρείται σημαντικά υψηλότερο ποσοστό μη συνώνυμων υποκαταστάσεων σε σχέση με τις συνώνυμες υποκαταστάσεις, μια ισχυρή ένδειξη θετικής επιλογής (Schaschl et al., 2004).

Στα πρόβατα υπάρχει ένα λειτουργικό γονίδιο *DRB* και τρία ψευδογονίδια. Ένα άλλο γονίδιο που έχει μελετηθεί στα πρόβατα είναι το γονίδιο *DQA* της τάξης ΙΙ του ΜHC. Οι προβλεπόμενες αμινοξικές αλληλουχίες του *Ovar-DQA* έχουν συγκριθεί με την *DQA* αλληλουχία στον άνθρωπο, το ποντίκι, αρουραίο, κουνέλι, καθώς και τα βοοειδή και χρησιμοποιήθηκαν για να καθορίσει τις εξελικτικές σχέσεις των προβάτων τάξης ΙΙ ΜHC γονιδίων αυτών με άλλα είδη. Northern blot ανάλυση των mRNA του *DQA* των προβάτων με τη χρήση ειδικών ανιχνευτών εξωνίων για τα δύο *Ovar-DQA* γονίδια δείχνουν ότι τα δύο γονίδια είναι μεταγραφικά ενεργά, ενώ σε ανθρώπους δεν υπάρχει καμία απόδειξη ότι *HLA-DQA2* είναι μεταγραφικά ενεργό. Με τη χρήση RFLP για τη διερεύνηση του πολυμορφισμού έχει αποδειχθεί ότι ο αριθμός των γονιδίων *DQA* στα πρόβατα δεν είναι σταθερός όπως στον άνθρωπο αλλά εξαρτάται από τον απλότυπο (Sott et al 1991). Ακόμα έχει βρεθεί ότι το δεύτερο εξώνιο του *OLA-DQA2* γονιδίου είναι πιο πολυμορφικό από την αντίστοιχη γονιδιακή περιοχή του *OLA-DQA1* (Snibson et al 1998).

Για περίπου 10.000 χρόνια, οι αγρότες έχουν τη διαχείριση των βοοειδών, προβάτων, αιγών με ένα βιώσιμο τρόπο, που οδηγεί σε ζώα τα οποία είναι καλά προσαρμοσμένα στις τοπικές συνθήκες. Περίπου 200 χρόνια πριν, η κατάσταση άρχισε να αλλάζει δραματικά, με την άνοδο της έννοιας της φυλής. Όλα τα ζώα από την ίδια φυλή άρχισαν να επιλέγονται για τα ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, και η αναπαραγωγή μεταξύ των φυλών ήταν σοβαρά μειωμένη. Αυτό αντιστοιχούσε σε έναν ισχυρό κατακερματισμό του αρχικού πληθυσμού. Λίγες δεκαετίες πριν, η επιλογή των

πιέσεων αυξήθηκαν εκ νέου, προκειμένου να βελτιώσουν περαιτέρω την παραγωγικότητα, χωρίς αρκετή έμφαση στην διατήρηση της συνολικής γενετικής ποικιλότητας. Η αποτελεσματικότητα των σύγχρονων μεθόδων επιλογής οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή, αλλά με μια δραματική απώλεια της γενετικής ποικιλομορφίας. Πολλές βιομηχανικές φυλές υποφέρουν σήμερα από ενδογαμία. Με την ανάπτυξη των βιομηχανικών αυτών φυλών ήρθε οικονομική πίεση στους αγρότες να εγκαταλείψουν τις παραδοσιακές ράτσες, ως αποτέλεσμα πολλές από αυτές να έχουν πρόσφατα εξαφανιστεί. Αυτό σημαίνει ότι οι γενετικοί πόροι σε βοοειδή, πρόβατα, αίγες είναι άκρως απειλούμενοι με εξαφάνιση, ιδιαίτερα στις ανεπτυγμένες χώρες. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να ληφθούν μέτρα που προωθούν τη βιώσιμη διαχείριση των εν λόγω γενετικών πόρων: πρώτον, με *in situ* διατήρηση των απειλούμενων με εξαφάνιση φυλών, δεύτερο, χρησιμοποιώντας την επιλογή των προγραμμάτων για την αποκατάσταση της γενετικής ποικιλομορφίας των βιομηχανικών φυλών και τέλος με την προστασία των άγριων συγγενικών ειδών που ενδέχεται να παράσχουν χρήσιμες γενετικών πόρων (Taberlet et al., 2007).

Συνεπώς θα πρέπει να μελετηθούν εκτενέστερα αυτά τα γονίδια καθώς κι άλλα για να υπάρξει μια πιο εμπειριστατωμένη άποψη για την εξελικτική πορεία του *Ovis aries* αλλά και οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των διάφορων ειδών του *Ovis*. Επίσης θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω το πώς σχετίζονται οι διάφορες ασθένειες με τις περιοχές του MHC του *Ovis* και οι τρόποι για τη βελτίωση των διαφόρων ειδών του *Ovis* για την καλύτερη αντιμετώπιση ασθενειών και την ύπαρξη μεγαλύτερης γενετικής ευρωστίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acevedo-Whitehouse Karina and Andrew A. Cunningham, Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? *TRENDS in Ecology and Evolution* Vol.21 No.8

Amills M, N Jimenez, J Jordana, A Riccardi, A Fernandez-Arias, J Guiral, JL Bouzat, J Folch and A Sanchez, Low diversity in the major histocompatibility complex class II DRB1 gene of the Spanish ibex, *Capra pyrenaica*. *Heredity* (2004) 93, 266-272

Andersson Leif, Kenth Gustafsson, Ann-Kristin Jonsson z, and Lars Rask, Concerted evolution of polymorphic MHC class II loci: a comment to reviewer's reply. *Immunogenetics* 34: 346-347

Andersson Leif, Kenth Gustafsson , Ann-Kristin Jonsson , and Lars Rask Concerted evolution in a segment of the first domain exon of polymorphic MHC class II/3 loci. *Immunogenetics* 33: 235-242

Aguirre Arrieta, K. Garcí'a-Etxebarria & B. M. Jugo, Optimization of the MhcOvar-DRB1 gene typing. Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, University of the Basque Country, PO Box 644, E-48080 Bilbao, Spain

Ballingall Keith T., Kathleen Fardoe, Declan J. McKeever, Genomic organisation and allelic diversity within coding and non-coding regions of the Ovar-DRB1 locus. *Immunogenetics* (2008) 60:95-103

Banchereau j, F Briere, C Caux, J Davoust, S Lebecque, Y-J Liu, B Pulendran, and K Palucka. Immunology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 18:767-811.

Bartl Simona, What sharks can tell us about the evolution of MHC genes. *immuno/ogicof Reviews* Vol. 166:317-331

Bernatchez I. & c. landry MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J . EVOL. B IOL.* 16, 363-377

Campbell RD, and J Trowsdale. Map of the human MHC. *Immunology Today* 14:349-352

Danchin Etienne, Verane Vitiell, Alexandre Vienne, Olivier Richard, Philippe Gouret, Michael F McDermott, Pierre Pontarotti, The major histocompatibility complex origin. *Immunological Reviews* Vol. 198: 216-232

De Tomaso Anthony W., Spencer V. Nyholm, Karla J. Palmeri, Katherine J. Ishizuka, William B. Ludington, Katrina Mitchel & Irving L. Weissman, Isolation and characterization of a protochordate histocompatibility locus. *nature* Vol 438|24

Dongxiao Sun and Zhang Yuan. Polymorphisms of the Second Exon of MHC DRB Gene in Chinese Local Sheep and Goat. *Biochemical Genetics*, Vol. 42, Nos. 9/10,

Dukkipati V.S.R., H.T. Blair, D.J. Garrick¹ and A. Murray, 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: structure and gene polymorphisms. *Genet. Mol. Res.* 5 (4): 581-608

Fagan m. b. and i. l. weissman, HSP70 genes and historecognition in *Botryllus schlosseri*: implications for MHC evolution. *Hereditas* 127: 25-35

Flajnik Martin F., Camilo Canel, Jack Kramer, and Masanori Kasahara, Which came first, MHC class I or class II? *Immunogenetics* 33: 295-300

Geraghty Daniel E., Riza Daza, Luke M. Williams, Quyen Vu Akiko Ishitani, Genetics of the immune response: identifying immune variation within the MHC and throughout the genome. *Immunological Reviews* 2002 Vol 190: 69-85

Gruszczyńska Joanna, Karolina Brokowska, Krystyna M. Charon, Wiesław P. Owiderek, Restriction fragment length polymorphism of exon 2 Ovar-DRB1 gene in Polish Heath Sheep and Polish Lowland Sheep. Department of Genetics and Animal Breeding, Warsaw Agricultural University, Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, Poland

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

Hedrick Philip W., Balancing selection and MHC. *Genetica* 104: 207-214

Hedrick p. w., g. a. gutierrez-espeleta* and r. n. lee, Founder effect in an island population of bighorn sheep. *Molecular Ecology* (2001)10 , 851-857

Hempel Paul Schmid, Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 357-366

Herrmann Lynn M., Wendy C. Brown, Greg S. Lewis, Donald P. Knowles
Identification and phylogenetic analysis of 15 MHC class II DRB1 β 1 expressed alleles in a ewe-lamb flock. *Immunogenetics* (2005) 57: 855-863

Hewitt godfrey m., Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10 537-549

Hughes Austin L., Natural selection and the diversification of vertebrate immune effectors. *Immunological Reviews* 2002 Vol. 190: 161-168

Hughes Austin L. and Masatoshi Nei, Evolutionary relationships of the classes of major histocompatibility complex genes. *Immunogenetics* 3~337-346, 1993

Hughes AL, Looking for Darwin in all the wrong places: the misguided quest for positive selection at the nucleotide sequence level. *Heredity* 99, 364-373

Hughes Austin L., and Masatoshi Nei, Evolutionary Relationships of Class II Major Histocompatibility Complex Genes in Mammals. *Mol. Biol. Evol.* 7(6):491-514

Janko Nikolich-Žugich, Daved H. Fremont b, Michael J. Miley b, Ilhem Messaoudi, The role of mhc polymorphism in anti-microbial resistance. *Microbes and Infection* 6 501-512

Jugo B. M. & A. Vicario, Lymphocyte antigens in sheep: linkage to the MHC class II DRB1 gene. 2001 Blackwell Science Ltd, *European Journal of Immunogenetics* 28, 451-458

Kasahara M., New insights into the genomic organization and origin of the major histocompatibility complex: Role of chromosomal (genome) duplication in the emergence of the adaptive immune system. *Hereditas* 127: 59-65

Kelley James, Lutz Walter, John Trowsdale, Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics* (2005) 56: 683-695

Klein J, Sato A. Birth of MHC. *Scand. J. Immunol.* 47, 199-209

Klein Jan and Colm O'huigin, Composite origin of major histocompatibility complex genes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3:923-930

Klein Jan, Ronald E. Bontrop, Roger L. Dawkins, Henry A. Erlich s, Ulf B. Gyllensten, Eugene R. Heise, Patricia P. Jones s, Peter Parham, Edward K. Wakeland, and David I. Watkins Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. *Immunogene~cs* 31: 217-219

Konnai S., Y. Nagaoka, S. Takeshima, M. Onuma & Y. Aida, Sequences and diversity of 17 new Ovar-DRB1 alleles from three breeds of sheep. Blackwell Publishing Ltd, *European Journal of Immunogenetics* 30, 275-282

Konnai S., 1 Y. Nagaoka, S. Takesima, M. Onuma and Y. Aida, Technical Note: DNA Typing for Ovine MHC DRB1 Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). *J. Dairy Sci.* 86:3362-3365

Kostia S , J Kantanen, M Kolkkala, S-L Varvio, Applicability of SSCP analysis for MHC genotyping: fingerprinting of Ovar-DRB1 exon 2 alleles from Finnish and Russian breeds. *Animal Genetics*,1998, 29, 453±455

Kulski, Jerzy K., Takashi Shiina, Tatsuya Anzai, Sakae Kohara, Hidetoshi Inoko, Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunological Reviews* 2002 Vol 190: 95-122

Lydekker, R. 1913. Catalogue of the ungulate mammals in the British Museum (Natural History). British Museum (Natural History), London 1:1-249.

Mainguy Julien Z, Kirsty Worley, Z Steeve D., Corte' Z David, W. Coltman, Low MHC DRB class II diversity in the mountain goat: past bottlenecks and possible role of pathogens and parasites. *Conserv Genet* (2007) 8:885-89

Matsunaga Takeshi, Arman Rahman, What brought the adaptive immune system to vertebrates? - The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunoiological Reviews* Vol. 166: 177-136

Nagaoka Yoshiko, Hidenori Kabeya, Misao Onuma, Noriyuki Kasai, Kosuke Okada, and Yoko Aida2, Ovine MHC Class II DRB1 Alleles Associated with

Resistance or Susceptibility to Development of Bovine Leukemia Virus-induced Ovine Lymphoma. *CANCER RESEARCH* 59, 975-981

Newbigin Ed and Marcy K. Uyenoyama, The evolutionary dynamics of self-incompatibility systems. *TRENDS in Genetics* Vol.21 No.9

Ohta t. Role of diversifying selection and gene conversion in evolution of major histocompatibility complex loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 88, pp. 6716-6720

Paterson s., k. wilson, and j. m. pemberton, Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, pp. 3714-3719

Piertney SB, and MK Oliver, The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* (2006) 96, 7-21

Puri n. k. & m. r. brandon, Sheep MHC class II molecules II. identification and characterization of four distinct subsets of sheep mhc class ii molecules. *Immunology* 1987 62 575-580

Rached L Abi, M. R McDermott, R Pontarotti, The MHC Big Bang. *Immunological Reviews* Vol. 167:33-45

Richman adam, Evolution of balanced genetic polymorphism. *Molecular Ecology* (2000) 9, 1953-1963 Blackwell Science Ltd

Rock KL, and AL Goldberg. Degradation of cell proteins and generation of MHC class I-presented peptides. *Annual Review of Immunology* 17:739-779

Santucci F, KM Ibrahim, A Bruzzone1, and GM Hewit, Selection on MHC linked microsatellite loci in sheep populations. *Heredity* (2007) 99, 340-348

Satta yoko, colm o'huigin, naoyuki takahata, and jan klein, Intensity of natural selection at the major histocompatibility complex loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 91, pp. 7184-7188

Schaschl Helmut, Franz Suchentrunk, Sabine Hammer, Simon J. Goodman Recombination and the origin of sequence diversity in the DRB MHC class II locus in chamois (*Rupicapra* spp.). *Immunogenetics* (2005) 57: 108-115

Schaschla Helmut, Simon J. Goodman, Franz Suchentrunk, Sequence analysis of the MHC class II DRB alleles in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*). *Developmental and Comparative Immunology* 28 (2004) 265-277

Schierup Mikkel H., Anders M. Mikkelsen and Jotun Hein, Recombination, Balancing Selection and Phylogenies in MHC and Self-Incompatibility Genes. *Genetics* 159: 1833-1844

Scott Peter C., Jillian F. Maddox, Kathryn J. Gogolin-Ewens, and Malcolm R. Brandon. The nucleotide sequence and evolution of ovine MHC class II B genes: DQB and DRB. *Immunogenetics* 34: 80-87, 1991

Taberlet p., a. valentini , h. r. rezaei, s. naderi, f. pompanon, r . negrini and p. ajmone-marsan, Are cattle, sheep, and goats endangered species? *Molecular Ecology* (2007)

Takahata Naoyuki ,Yoko Satta and Jan Klein Polymorphism and Balancing Selection at Major Histocompatibility Complex Loci. *Genetics* 130 925-938

Tennessen j. a., Molecular evolution of animal antimicrobial peptides: widespread moderate positive selection. *J . EVOL. B IOL.* 18 (2005) 1387-1394

Tennessen j. a., Molecular evolution of animal antimicrobial peptides: widespread moderate positive selection. *J . EVOL. B IOL.* 18 1387-1394

Tortorella D, BE Gewurz, MH Furman, DJ Schust, and HL Ploegh. Viral subversion of the immune system. *Annual Review of Immunology* 18:861-926)

Wegner k. m., t. b. h. reusch & m. kalbe, Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *J . EVOL . BIOL.* 16 224-232

Worley k., j. carey, a. veitch and d. w. coltman Detecting the signature of selection on immune genes in highly structured populations of wild sheep (*Ovis dalli*). *Molecular Ecology* (2006)15, 623-637

Worley k., j. carey, a. veitch and d. w. coltman, Detecting the signature of selection on immune genes in highly structured populations of wild sheep (*Ovis dalli*). *Molecular Ecology* (2006) 15, 623-637

Wolf PR, and HL Ploegh. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11:267-306

Yeager Meredith, Austin L Hughes, Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and convergent evolution. *Immunological Reviews* 1999 Vol. 167:45-58

Yeager Meredith, Sudhir Kumar, and Austin L. Hughes, Sequence Convergence in the Peptide-Binding Region of Primate and Rodent MHC Class Ib Molecules. *Mol. Biol. Evol.* 14(10): 1035-1041

