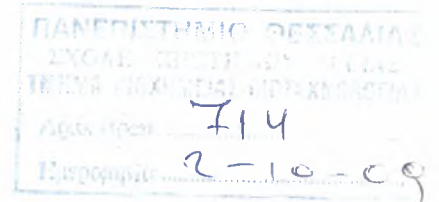
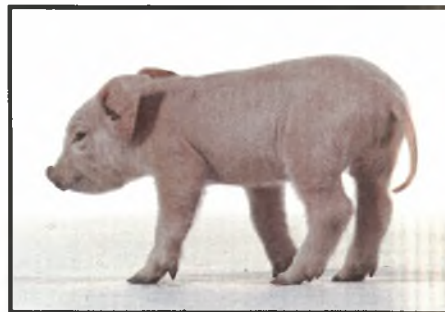




Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας



Μοριακός χαρακτηρισμός των γονιδίων *DQA* και *DRB1* του
μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II σε
καθαρόαιμες, εκτρεφόμενες φυλές χοίρων



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΟΚΚΑΛΗ ΧΡΥΣΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7663/1
Ημερ. Εισ.: 05-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΚΟΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087176



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας

Μοριακός χαρακτηρισμός των γονιδίων *DQA* και *DRB1* του
μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (ΜΗC) τάξης II σε
καθαρόαιμες, εκτρεφόμενες φυλές χοίρων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΖΩΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ
(ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Α. ΜΟΥΤΟΥ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΠΟΝΔΥΛΩΤΩΝ

Θ. ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ: ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ
ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

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 2008-2009, 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. Κατερίνα Μούτου και τη Λέκτορα μοριακής βιολογίας ζωικών οργανισμών κα. Θεολογία Σαραφίδου που με τιμούν συμμετέχοντας στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Εισαγωγή.....	5
Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας.....	6
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.....	12
Το γονίδιο <i>DRB1</i>	15
Το γονίδιο <i>DQA</i>	16
Το είδος <i>Sus scrofa domestica</i>	17
Η μέθοδος <i>SSCP</i>	20
Υλικά και μέθοδοι.....	22
Υλικά.....	23
Δείγματα DNA.....	23
Αντιδραστήρια PCR.....	23
Μάρτυρας DNA.....	23
Εκκινήτες.....	23
Μέθοδοι.....	23
Απομόνωση του DNA.....	24
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	26
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	31
Αποδιάταξη του DNA.....	33
Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης ενός κλώνου (<i>SSCP</i>).....	34
Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με την τεχνική χρώσης νιτρικού αργύρου (<i>Silver staining</i>).....	35
Αποτελέσματα.....	37
Συζήτηση.....	46
Βιβλιογραφία.....	50

Μοριακός χαρακτηρισμός των γονιδίων *DQA* και *DRB1* του ΜHC τάξης II σε καθαρόαιμες, εκτρεφόμενες φυλές χοίρων

Περίληψη

Ο μεγάλος πολυμορφισμός που διατηρείται λόγω επιλογής είναι ένα από τα θεμελιώδη ενδιαφέροντα της εξελικτικής βιολογίας η οποία μελετά τόσο την προέλευση και τη διατήρηση του γενετικού πολυμορφισμού όσο και τους μηχανισμούς που προκαλούν αλλαγές στις αλληλομορφικές συχνότητες. Λίγα γενετικά συστήματα έχουν χαρακτηριστεί τόσο καλά σε γενωμικό, πληθυσμιακό και λειτουργικό επίπεδο, όπως το ΜHC. Σε όλα τα σπονδυλωτά που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα τα γονίδια του ΜHC είναι τα πλέον πολυμορφικά. Όλα τα παραπάνω προσδίδουν στο ΜHC το πλεονέκτημα χρησιμοποίησής του ως πιθανό μοντέλο ελέγχου υποθέσεων για τις αιτίες και τις συνέπειες της επιλογής. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη του ΜHC σε μικρούς πληθυσμούς, σε εξημερωμένα είδη καθώς και σε είδη που έχουν υποστεί έντονη ανθρώπινη μεταχείριση, παράγοντες που επηρεάζουν τη γενετική ποικιλομορφία. Ένα είδος που συγκεντρώνει τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι ο οικόσιτος χοίρος του οποίου η εξημέρωση συνέβη πριν 9.000 χρόνια. Η συγκεκριμένη μελέτη αφορά τη μελέτη των γονιδίων *DQA* και *DRB1* στις φυλές *Leicoma* (18 άτομα), *Pietrain* (14 άτομα) και *Landrace* (40 άτομα). Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *SSCP* (*Single Strand Conformation Polymorphism*, ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονού κλώνου) σε συνδυασμό με την άμεση αλληλούχιση και συνολικά βρέθηκαν 6 αλληλόμορφα του *DRB1* και 4 αλληλόμορφα του *DQA*, σε κάποιες περιπτώσεις χαρακτηριστικά για την κάθε φυλή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η φυλογενετική μελέτη των αλληλομόρφων και η σύγκρισή τους με αλληλόμορφα των γονιδίων που ήδη έχουν δημοσιευτεί. Τα αποτελέσματα αυτά αναλύονται σε σχέση με το γενετικό υπόβαθρο καθώς και την εξελικτική θέση του είδους.

Εισαγωγή

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 νέες λοιμώξεις και να εξαλείφει τις ήδη εγκατεστημένες. 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 είναι ο τύπος άμυνας που 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 και η κυτταρική, 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 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).

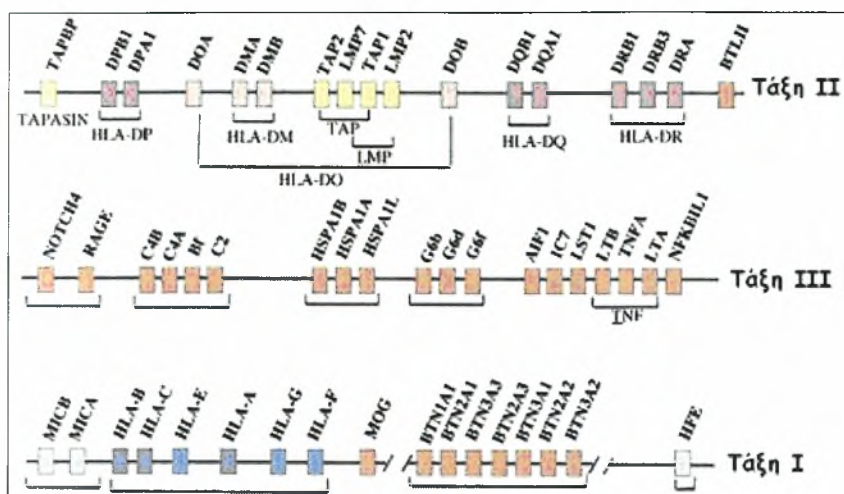
Τα Β και Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν ειδικά τα αντιγόνα (είναι μεγάλα μόρια, συνήθως πρωτεΐνες, στην επιφάνεια των κυττάρων, ιοί, μύκητες ή βακτήρια) των εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μικροοργανισμών, αντίστοιχα. Διαλυτά αντιγόνα ή αντιγόνα επιφάνειας μικροοργανισμών ή άλλων κυττάρων μπορούν να προσδεθούν 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 ΜHC. Η πλειονότητα των Τ λεμφοκυττάρων αναγνωρίζει πεπτιδικά αντιγόνα που είναι συνδεδεμένα με τα μόρια του ΜHC των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα) και παρουσιάζονται από αυτά.

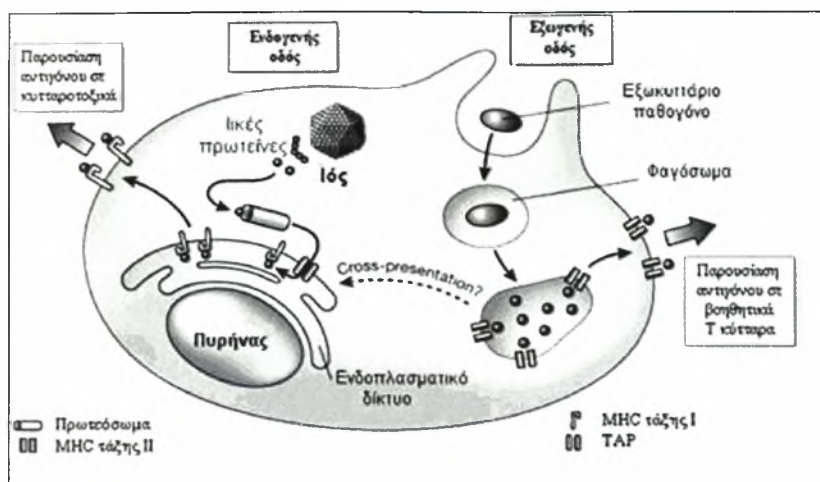
Το ΜHC ανακαλύφθηκε ως ο γενετικός τόπος που καθόριζε κατά κύριο λόγο την αποδοχή ή την απόρριψη μοσχευμάτων από ένα άτομο σε ένα άλλο. Ανακαλύφθηκε σε μελέτες μεταμόσχευσης σε ποντίκια από τον Peter Issac Gorer στο Lister Institute του Λονδίνου το 1937. Τα άτομα που είναι πανομοιότυπα στους τόπους ΜHC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

Οι γενετικοί τόποι του ΜHC είναι ένα σύνολο γονιδίων που βρίσκονται σε όλα τα θηλαστικά. Οι πρωτεΐνες του ΜHC 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 ΜHC περιέχει δύο ομάδες εξαιρετικά πολυμορφικών γονιδίων, τα γονίδια του ΜHC τάξης I και II, τα οποία κωδικοποιούν τα μόρια ΜHC τάξης I και II που παρουσιάζουν πεπτιδία στα Τ κύτταρα. Επιπλέον από τα πολυμορφικά γονίδια, ο τόπος ΜHC περιέχει πολλά μη πολυμορφικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παρουσίαση των αντιγόνων ενώ άλλα κωδικοποιούν πρωτεΐνες με άγνωστη προς το παρόν λειτουργία.



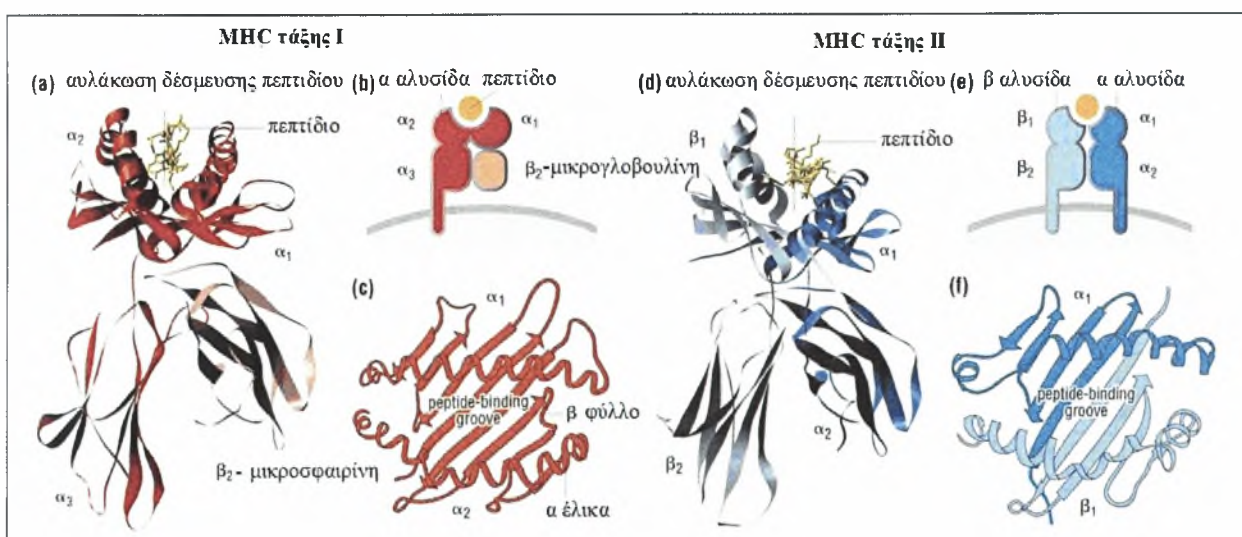
Εικόνα 1: Ο γενετικός τόπος του MHC στον άνθρωπο. Κωδικοποιεί τα HLA γονίδια και είναι μία περιοχή 3.6 Mbp που βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6.

Τα μόρια MHC 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 MHC. Τα αμινοτελικά τμήματα των περιοχών α1 και α2 του μορίου MHC 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 T λεμφοκύτταρα συνδέονται στη βάση της αύλακας σύνδεσης του πεπτιδίου, ενώ ο υποδοχέας των T 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 T κύτταρα. Τα πολυμορφικά αμινοξέα των μορίων τάξης I, δηλαδή τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των μορίων MHC 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 T κυττάρων. Επομένως, τα CD8⁺ T κύτταρα μπορούν να απαντήσουν μόνο σε πεπτίδια που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης I, από τα μόρια δηλαδή με τα οποία συνδέεται ο συνυποδοχέας CD8.



Εικόνα 2: Συνοπτική εικόνα της διαδικασίας παρουσίασης των ενδογενών και εξωγενών αντιγόνων από τα αντιννοτοπαραουσιαστικά

Κάθε μόριο MHC 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 πεπτιδία μήκους 10-30 αμινοξέων. Τα γονίδια της τάξης II κωδικοποιούν πεπτιδία που παρουσιάζουν τα ξένα αντιγόνα στα βοηθητικά T 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 T κυττάρων. Επειδή το CD4 συνδέεται με τα μόρια MHC τάξης II, τα CD4⁺ T κύτταρα απαντούν μόνο σε πεπτιδία που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης II.



Εικόνα 3: Δομή των μορίων MHC τάξης I και II

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ ΜHC

Τα γονίδια του ΜHC 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 ΜHC 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 ΜΗC ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΟΥΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Το ΜΗC 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 ΜΗC.

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 ΜΗC τα οποία μπορούν να παρουσιάσουν πεπτίδια στα T κύτταρα.

Τα γονίδια ΜΗC 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 ΜΗC. Επειδή τα πολυμορφικά αμινοξέα καθορίζουν ποια πεπτίδια θα παρουσιαστούν από κάθε μόριο ΜΗC, 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 ΜΗC αποκτούν το πεπτιδικό τους φορτίο κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης τους και της συναρμολόγησης τους μέσα στα κύτταρα. Επομένως, τα μόρια ΜΗC παρουσιάζουν πεπτίδια που προέρχονται από μικροοργανισμούς που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή και γι' αυτό τα ΜΗC-περιορισμένα T κύτταρα αναγνωρίζουν

μικροοργανισμούς που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα και είναι οι μεσολαβητές της ανοσίας κατά των ενδοκυττάρων μικροοργανισμών. Επιπλέον τα μόρια ΜHC 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. Ένα από τα πιο εντυπωσιακά χαρακτηριστικά γνωρίσματα του ΜHC, ιδιαίτερα στους ανθρώπους, είναι η καταπληκτική ποικιλομορφία αλληλομόρφων που υπάρχει, και ειδικά μεταξύ των εννέα κλασικών γονιδίων. Στους ανθρώπους, οι εμφανώς πιο διαφορετικοί γονιδιακοί τόποι, *HLA-A*, *HLA-B*, και *HLA-DRB1*, έχουν κατά προσέγγιση 250, 500, και 300 γνωστά αλληλόμορφα αντίστοιχα, ποικιλομορφία αληθινά εξαιρετική στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Και ίσως ακόμα πιο αξιοπρόσεκτο είναι ότι πολλά από αυτά τα αλληλόμορφα είναι αρκετά αρχαία. Είναι συχνή η περίπτωση όπου ένα αλληλόμορφο από ένα συγκεκριμένο γονίδιο HLA συσχετίζεται περισσότερο με ένα αλληλόμορφο γονίδιο που βρίσκεται στους χιμπατζήδες από ότι με ένα άλλο ανθρώπινο αλληλόμορφο γονίδιο από τον ίδιο γονιδιακό τόπο! Ακόμη, τα επίπεδα ετεροζυγωτίας που παρατηρούνται στα γονίδια του συγκεκριμένου τόπου είναι ιδιαίτερα ψηλά, πολλές φορές 80-90%. 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 ισοζυγούσα επιλογή αναφέρεται σε μηχανισμούς της φυσικής επιλογής οι οποίοι προσπαθούν να διατηρήσουν τους γενετικούς πολυμορφισμούς (ή τα πολλαπλά αλληλόμορφα) μέσα σε έναν πληθυσμό. Η ισοζυγούσα επιλογή έρχεται σε πλήρη αντίθεση

με την κατευθύνουσα επιλογή η οποία ευνοεί ένα μόνο αλληλόμορφο και προάγει την ομοιομορφία. Ένας ισορροπημένος πολυμορφισμός είναι μία κατάσταση στην οποία η ισοζυγούσα επιλογή μέσα σε ένα πληθυσμό είναι ικανή να διατηρεί σταθερές τις συχνότητες δύο ή περισσότερων φαινοτύπων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ισοζυγούσα επιλογή δεν καταλήγει πάντα σε μία ορατή φαινοτυπική διαφορά.

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).

Η υπόθεση της εξέλιξης δια μέσω των ειδών (trans species evolution) προτείνει ότι, ο υψηλός 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).

Η κατανομή του προτύπου του πολυμορφισμού της ακολουθίας στα γονίδια MHC τάξης I στον άνθρωπο και στον ποντικό παρέχει ενδείξεις για παράγοντες που συνεργάζονται και συμβάλλουν στη δημιουργία και διατήρηση των πολλαπλών αλληλομόρφων που χαρακτηρίζει το γονιδιακό τόπο του MHC. Αυτοί περιλαμβάνουν: 1) μια σταδιακή συσσώρευση τυχαίων μεταλλάξεων κατά τη διάρκεια του εξελικτικού χρόνου,

αλλά όχι ένα ασυνήθιστα υψηλό αριθμό μεταλλάξεων, 2) αρνητική επιλογή των μεταλλάξεων που συμβαίνουν στις περιοχές που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα των T κυττάρων, καθώς και σε περιοχές που αλληλεπιδρούν με κοινά χαρακτηριστικά των αντιγόνων, 3) θετική επιλεκτική πίεση με στόχο τη διατήρηση της ποικιλομορφίας και της ετεροζυγωτίας στις περιοχές αναγνώρισης του αντιγόνου Έχει προταθεί ότι στα γονίδια του ΜHC 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 πεπτίδια 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).

Πρέπει να τονιστεί ότι η εξελικτική αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταλλάξεων και του ανασυνδυασμού ποικίλει μεταξύ των διαφόρων γονιδίων του ΜHC, ακόμη και για διάφορες υποπεριοχές μερικών γονιδίων (Parham P, 1996 ` Hughes & Nei, 1988 ` Hughes & Nei, 1989). Η κύρια πηγή για την ποικιλομορφία των γονιδίων του ΜHC είναι οι σημειακές μεταλλάξεις, αλλά ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης δεν είναι υψηλότερος στο ΜHC από το υπόλοιπο γονιδίωμα (Lawlor et al., 1988 ` Parham et al., 1995).

Υπάρχουν διάφοροι άλλοι σημαντικοί μηχανισμοί με τους οποίους συντηρείται αυτή η ποικιλία και μπορεί συνεπώς να παραχθεί ένας ισορροπημένος πολυμορφισμός. Ένας λιγότερο καλά μελετημένος εξελικτικός μηχανισμός είναι η περιβαλλοντική ετερογένεια.

Η ετερογένεια του περιβάλλοντος μπορεί να οδηγήσει σε εξισορροπημένους πολυμορφισμούς, αλλά μόνο κάτω από ορισμένες συνθήκες. Γενικά, η περιβαλλοντική ετερογένεια τείνει να διατηρήσει τον πολυμορφισμό ευκολότερα αν είναι αδρής παρά λεπτής κατανομής, και αν το περιβάλλον ποικίλλει στο χώρο παρά στο χρόνο. Σε όλες τις περιπτώσεις, βασική προϋπόθεση είναι ότι οι διαφορές στη αρμοστικότητα είναι αρκετά μεγάλες και ότι κυμαίνονται μέσα σε όρια που καθορίζονται από τη συχνότητα των περιβαλλοντικών διακυμάνσεων.

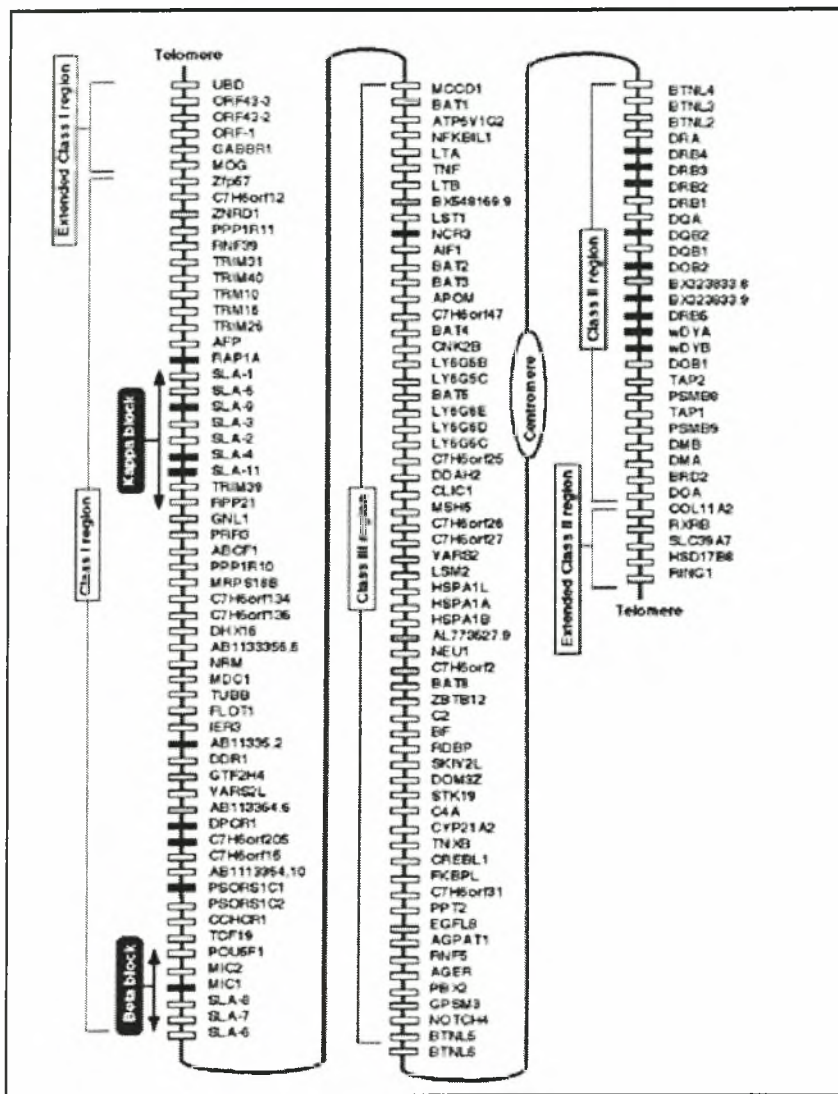
Ο γονιδιακός τόπος του ΜHC έχει μελετηθεί εκτεταμένα και έχουν γίνει πολλές έρευνες για την εύρεση της ποικιλομορφίας του. Έχει πλέον αποδειχθεί ότι ο γενετικός αυτός τόπος αποτελεί τον πλέον πολυμορφικό ολόκληρου του γονιδιώματος.

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 ΜHC (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 ΜHC χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 7 του *Sus scrofa domestica*. Τα γονίδια τάξης II του ΜHC κωδικοποιούν ετεροδιμερείς γλυκοπρωτεΐνες που σχηματίζονται από α και β αλυσίδες, οι οποίες συνδυάζουν και παρουσιάζουν δικά τους και ξένα πεπτιδία προς τα βοηθητικά Τ 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 αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα να δεσμεύουν ένα ευρύ φάσμα πεπτιδίων, γεγονός που παρουσιάζει μεγαλύτερη αντίσταση σε μολυσματικές ασθένειες.



Εικόνα 4: Οργάνωση των γονιδίων του MHC στο χρωμόσωμα 7 του *Sus scrofa domestica*.

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 ΓΟΝΙΔΙΟ *DQA*

Το *HLA-DQA1* ανήκει στην τάξη II του HLA και κωδικοποιεί την α αλυσίδα. Τα μόρια τάξης II είναι ετεροδιμερή που αποτελείται από μία α (*DQA*) και μία β αλυσίδα (*DQB*), όπου και οι δύο προσδένονται στη μεμβράνη. Διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο

στο ανοσοποιητικό σύστημα με την παρουσίαση των πεπτιδίων που προέρχονται από τις εξωκυττάρειες πρωτεΐνες. Τα μόρια τάξης II εκφράζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η α αλυσίδα είναι περίπου 33-35 kDa. Κωδικοποιείται από 5 εξόνια· το εξόνιο 1 κωδικοποιεί το πρώτο τμήμα του πεπτιδίου, τα εξόνια 2 και 3 κωδικοποιούν τις δύο εξωκυττάρειες περιοχές, και το εξόνιο 4 κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική περιοχή και την κυτταροπλασματική ουρά. Μέσα στο μόριο DQ και η α αλυσίδα και η β αλυσίδα περιέχουν τους πολυμορφισμούς που καθορίζουν τις δεσμευτικές ιδιότητες των πεπτιδίων, καταλήγοντας σε τέσσερα διαφορετικά μόρια (2 γονίδια *DQA* και 2 γονίδια *DQB*). Η καταγραφή αυτών των πολυμορφισμών γίνεται συνήθως για τη μεταμόσχευση μυελών των οστών (Hughes & Nei, 1990).

ΤΟ ΕΙΔΟΣ *Sus scrofa domestica*

Οι χοίροι χωρίζονται σε δύο υπογένη και πέντε είδη, τα οποία είναι τα παρακάτω:

S. scrofa

S. barbatus

S. celebensis

S. verrucosus

S. salvanus

Συστηματική κατάταξη του είδους *Sus scrofa domestica*

Βασίλειο: *Animalia*

Φύλο: *Chordata*

Κλάση: *Mammalia*

Τάξη: *Artiodactyla*

Οικογένεια: *Suidae*

Γένος: *Sus*

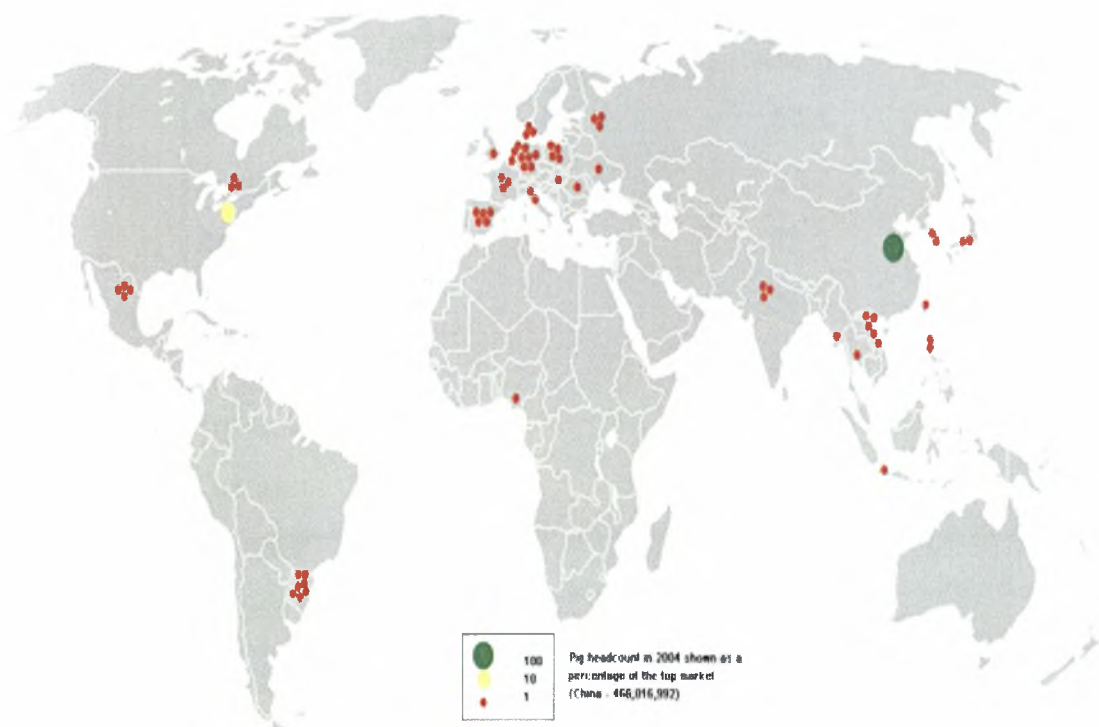
Είδος: *Sus scrofa*

Υποείδος: *Sus scrofa domestica*

Ο οικόσιτος χοίρος έχει πάρει το επιστημονικό όνομα *Sus scrofa*. Μερικοί ταξινομιστές χρησιμοποιούν τον όρο *S. domestica* για τον οικόσιτο χοίρο και τον *S. scrofa* για τον αγριόχοιρο. Οι περισσότεροι οικόσιτοι χοίροι έχουν αραιό τρίχωμα που καλύπτει το δέρμα τους. Μερικοί από αυτούς τράπηκαν σε φυγή, έγιναν άγριοι, σε πολλά μέρη του κόσμου (π.χ. Νέα Ζηλανδία) και προκάλεσαν ουσιώδη ζημιά στο περιβάλλον.

Καταγωγή - Προέλευση

Αρχαιολογικά στοιχεία προτείνουν ότι οι χοίροι εξημερώθηκαν από αγριόχοιρους περίπου πριν 13000 χρόνια στην Εγγύς Ανατολή, στο Λεκανοπέδιο του Τίγρη. Απομεινάρια από χοίρους χρονολογούνται νωρίτερα από 11400 χρόνια πριν στην Κύπρο, τα οποία πρέπει να μεταφέρθηκαν από μη νησιωτική γη. Αυτό προτείνει την εξημέρωση των χοίρων από την κοντινότερη μη νησιωτική γη. Υπήρξε ακόμη μια χωριστή εξημέρωση στην Κίνα.



Εικόνα 5: Το άθροισμα των χοίρων το 2004 παρουσιάζεται ως ποσοστό από τη Μεγάλη Αγορά.

Στοιχεία DNA από απολιθώματα δοντιών και κόκαλα σιαγόνων από Νεολιθικούς χοίρους της Ευρώπης δείχνουν ότι οι πρώτοι οικόσιτοι χοίροι προήλθαν από την Εγγύς Ανατολή. Αυτό υποκίνησε την εξημέρωση των τοπικών ευρωπαϊκών αγριόχοιρων. Ιστορικές καταγραφές μαρτυρούν ότι ασιατικοί χοίροι εισήχθησαν στην Ευρώπη κατά τη διάρκεια του 18^{ου} και πριν τον 19^ο αιώνα.

Η ευπροσάρμοστη φύση και η διατροφή (παμφάγο ζώο) που χαρακτηρίζει τον αγριόχοιρο επέτρεψε νωρίς στους ανθρώπους να τον εξημερώσουν εύκολα. Οι χοίροι χρησιμοποιούνται κυρίως ως τροφή, ενώ στους νεότερους πολιτισμούς χρησιμοποιείται επίσης το δέρμα τους, τα κόκαλα τους για την παραγωγή εργαλείων και όπλων, καθώς και το τρίχωμά τους για την παραγωγή βουρτσών. Οι χοίροι μεταφέρθηκαν από την Ευρώπη στην Αμερική από τον De Soto και άλλους Ισπανούς εξερευνητές.

Παγκόσμια αποθέματα χοίρων το 2005 (σε εκατομμύρια)	
Κίνα	488.8
Ηνωμένες πολιτείες	60.4
Βραζιλία	33.2
Βιετνάμ	27.0
Γερμανία	26.9
Ισπανία	25.3
Πολωνία	18.0
Γαλλία	15.0
Καναδάς	14.7
Μεξικό	14.6
Παγκόσμιο Άθροισμα	960.8
Πηγή: UN Food & Agriculture Organisation (FAO)	

Πίνακας 1: Παγκόσμια αποθέματα χοίρων για το έτος 2005.

Χοίροι - Κατοικίδια

Οι χοίροι είναι γνωστά ως έξυπνα ζώα και μπορούν να εκπαιδευτούν όπως οι σκύλοι. Οι ασιατικοί χοίροι "rot-bellied", ένας μικρός τύπος οικόσιτου χοίρου, έχουν γίνει πολύ γνωστά κατοικίδια στις Ηνωμένες Πολιτείες από την αρχή του δεύτερου μισού του 20^{ου} αιώνα. Οι περισσότεροι χοίροι έχουν το φόβο της αρπαγής, αλλά, συνήθως, ηρεμούν όταν τοποθετηθούν πίσω στο πάτωμα. Τέλος, σπάνια χρησιμοποιούνται σε διάφορες εργασίες, με εξαίρεση κάποια ειδικά εκπαιδευμένα που χρησιμοποιούνται για την ανεύρεση ενός είδους φυτού, του ύδνου.

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 μια 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 ζευγάριμα 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 αλληλουχήσεων 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).
- Έλεγχο 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.

Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά

Δείγματα DNA

Χρησιμοποιήθηκε DNA από πληθυσμούς *Sus scrofa domestica* που προέρχονται από πρότυπες εκτροφές της Γερμανίας. Για την εξαγωγή του DNA χρησιμοποιήθηκε τμήμα του ήπατος.

Αντιδραστήρια PCR

Η Taq DNA πολυμεράση, το $MgCl_2$ και το buffer 10x που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ήταν της εταιρείας invitrogen, ενώ τα δεοξυριβονουκλεοτίδια ήταν από την εταιρεία BIOLINE.

Μάρτυρας DNA

Ο DNA μάρτυρας μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας New England Biolabs.

Εκκινητές

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση τμήματος του πυρηνικού γονιδιώματος (*DRB1* και *DQA*, exon 2) παρασκευάστηκαν από την εταιρεία invitrogen.

Μέθοδοι

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 72 δείγματα DNA από άτομα *Sus scrofa domestica* από τρεις διαφορετικές φυλές: Leicoma (18 άτομα), Pietrain (14 άτομα) και Landrace (40 άτομα). Αρχικά, έγινε απομόνωση του DNA από όλα τα δείγματα. Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε τμήμα του ήπατος όλων των ατόμων. Στη συνέχεια, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ενισχύθηκε το εξόνιο 2 των γονιδίων *DRB1* και *DQA*. Στη συνέχεια λαμβάνοντας το προϊόν της PCR, σε ένα τμήμα αυτού προστέθηκε και αποδιατακτικό διάλυμα. Μετά την αποδιάταξη του DNA τα

δείγματα φορτώθηκαν σε μη αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης και αφού ηλεκτροφορήθηκαν όλο το βράδυ έδωσαν τα πρότυπα τους (μέθοδος SSCP). Για την εμφάνιση των ζωνών έγινε χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με την τεχνική χρώσης του νιτρικού αργύρου (silver staining).

Απομόνωση του DNA

Καθοριστικής σημασίας για τη μελέτη του DNA είναι η σωστή απομόνωσή του από τα κύτταρα των οργανισμών. Μια αποτελεσματική μέθοδος απομόνωσης πρέπει να δίνει αρκετή ποσότητα DNA, δηλαδή να είναι αποδοτική ποσοτικά αλλά και ποιοτικά δίνοντας DNA σε καλή κατάσταση, δηλαδή μη διασπασμένο σε μικρά κομμάτια. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από το είδος και την ποσότητα των κυττάρων αλλά και από το είδος του DNA που πρέπει να απομονωθεί (πυρηνικό, μιτοχονδριακό, πλασμιδιακό).

Διαλύματα

1. Lysis buffer

I. 50mM Tris- HCl 2M, pH=8,0

II. 100mM EDTA

III. 100mM NaCl

IV. 1% SDS

2. Πρωτεΐνάση K (10 mg/ml)

3. Φαινόλη : Χλωροφόρμιο : Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1)

4. Χλωροφόρμιο : Ισοαμυλική αλκοόλη (24:1)

5. CH₃COONa 0,2M

6. Αιθανόλη 100%

Διαδικασία

1. Τοποθέτηση 100mg ιστού αρκετά τεμαχισμένου σε σωληνάριο erpendorf του 1,5ml και προσθήκη 700μl lysis buffer.

2. Προσθήκη 20μl πρωτεΐνάσης K στο δείγμα και ελαφρή ανάδευση.
3. Ολονύκτια (overnight) επώαση στους 55°C με συνεχή ανακίνηση των δειγμάτων.
4. Προσθήκη 350μl φαινόλης και 350μl χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη. Ανάδευση για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4°C.
5. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο erpendorf του 1,5ml. Προσθήκη 350μl φαινόλης και 350μl χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη. Ανάδευση για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4°C.
6. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο erpendorf. Προσθήκη 700μl χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη. Ανάδευση για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C.
7. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο erpendorf του 1,5ml. Προσθήκη 40μl οξικού νατρίου και 1ml 100% παγωμένη αιθανόλη.
8. Απομάκρυνση της αιθανόλης. Παραμονή των δειγμάτων για περίπου 1 ώρα στους 37°C.
9. Αραίωση των δειγμάτων σε 100μl ddH₂O και επώαση overnight σε θερμοκρασία δωματίου.

Η διάσπαση των κυττάρων, από τα οποία θα απομονωθεί το DNA, γίνεται με το NaCl, το οποίο ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, προκαλεί διόγκωση των κυττάρων και συνεπώς τη λύση τους. Η λύση των κυττάρων πρέπει να γίνεται σε κατάλληλο pH το οποίο ρυθμίζεται από το Tris - HCl (ρυθμιστικό διάλυμα). Το EDTA εμποδίζει τη δράση των νουκλεασών δεσμεύοντας με το χηλικό παράγοντα το Ca²⁺ ή το Mg²⁺. Το EDTA μπορεί να δεσμεύσει 4 μονοσθενή ή 2 δισθενή κατιόντα. Το SDS είναι ιοντικό απορρυπαντικό που διασπά τη μεμβράνη του πυρήνα και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες συμβάλλοντας έτσι στην προστασία του DNA από τις νουκλεάσες. Η πρωτεΐνάση K προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών. Η φαινόλη είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας των πρωτεϊνών και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα κατά την εκχύλιση του DNA. Το pH του διαλύματος της φαινόλης

πρέπει να είναι μεγαλύτερο του 7 γιατί η κατανομή του DNA γίνεται κυρίως στη μεσόφαση σε όξινο περιβάλλον. Το χλωροφόρμιο καθιστά πιο εύκολο το διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας, μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και απομακρύνει τη διαλυμένη φαινόλη από την υδατική φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η παγωμένη αιθανόλη 100% αφυδατώνει και κατακρημνίζει με τη βοήθεια του οξικού νατρίου το DNA.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μία *in vitro*, απλή, γρήγορη και ευαίσθητη τεχνική που επιτρέπει την επιλεκτική αντιγραφή ειδικών αλληλουχιών DNA από ένα σύνθετο μίγμα μορίων DNA. Χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική και βιολογική έρευνα και έχει πολλές εφαρμογές όπως την ανίχνευση κληρονομικών ασθενειών, τη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών, την κλωνοποίηση γονιδίων και τα τεστ πατρότητας. Η PCR εφευρέθηκε από τον Kary Mullis το 1983. Γι' αυτή του την εφεύρεση τιμήθηκε με το Βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993. Υπάρχουν τρία κύρια στάδια σε μία PCR τα οποία επαναλαμβάνονται για 30 ή 40 κύκλους. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε έναν αυτοματοποιημένο κυκλοποιητή ο οποίος μπορεί να θερμαίνει και να ψύχει τα σωληνάρια *erpendorf* με το μίγμα της αντίδρασης σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.

Διαδικασία

1. Αποδιάταξη στους 92-95°C:

Κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο και όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις σταματούν, π.χ. η επιμήκυνση ενός μορίου από τον προηγούμενο κύκλο.

2. Θερμική επαναδιάταξη στους 50-65°C:

Ιοντικοί δεσμοί σχηματίζονται και διασπώνται συνεχώς μεταξύ των εκκινητών και των μονόκλωνων αλυσίδων. Οι πιο σταθεροί δεσμοί διαρκούν λίγο περισσότερο (στο σημείο όπου οι εκκινητές είναι ακριβώς συμπληρωματικοί με τις μονόκλωνες αλυσίδες) και σ' αυτό το μικρό διάστημα των δίκλωνων DNA (εκκινητής και μήτρα) η πολυμεράση μπορεί να προσδεθεί και να ξεκινήσει την αντιγραφή του μονόκλωνου DNA. Μόλις προστεθούν

λίγες βάσεις ο ιοντικός δεσμός είναι πλέον τόσο ισχυρός μεταξύ του εκκινητή και της μήτρας που δεν μπορεί να σπάσει.

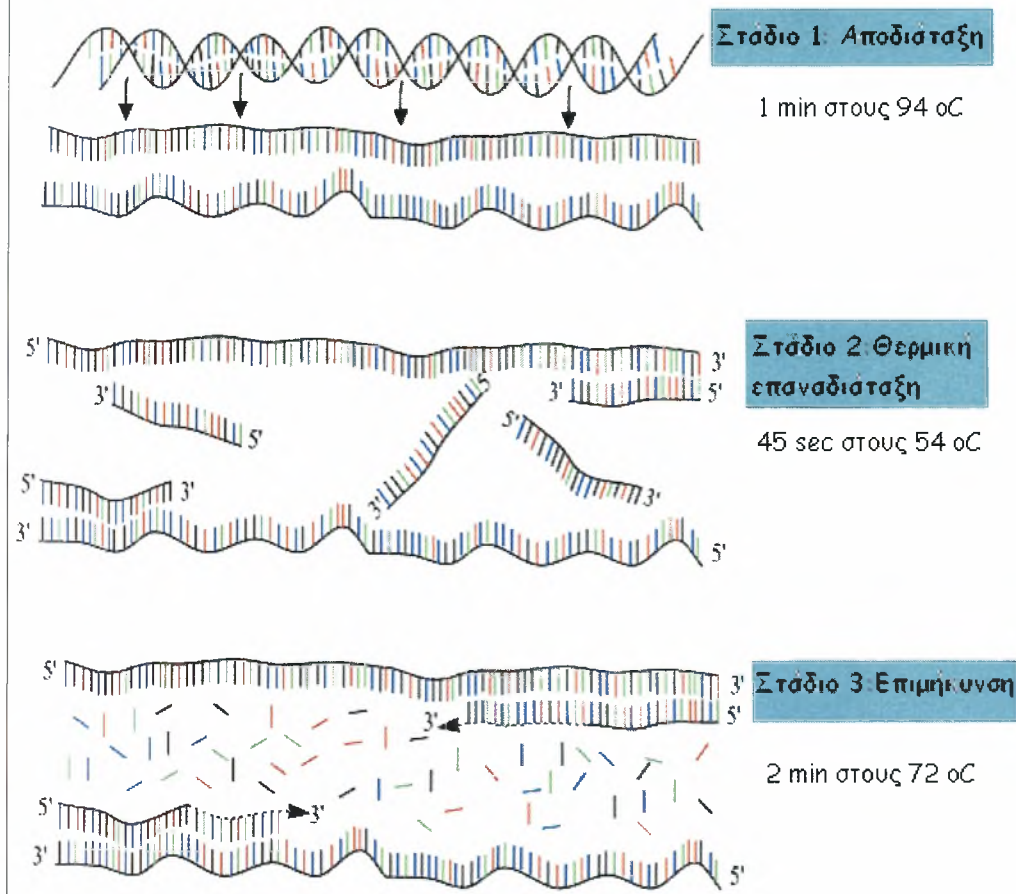
3. Επιμήκυνση στους 70-78°C:

Αυτή είναι η ιδανική θερμοκρασία για τη δράση της πολυμεράσης. Οι εκκινητές, στους οποίους προστέθηκαν λίγες βάσεις, έχουν ισχυρότερη ιοντική έλξη στη μήτρα από τις δυνάμεις που διασπών αυτή την έλξη. Οι εκκινητές που δεν είναι τελείως συμπληρωματικοί με την αλληλουχία στην οποία έχουν προσδεθεί, αποδιατάσσονται (εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας) και έτσι δεν αντιγράφεται αυτό το τμήμα. Οι βάσεις που προστίθενται στους εκκινητές είναι συμπληρωματικές με το μονόκλωνο μόριο του DNA και προστίθενται στο 3' άκρο του εκκινητή (η πολυμεράση προσθέτει τα νουκλεοτίδια σε μία κατεύθυνση 5' προς 3').

Η ευρεία χρήση της PCR οδήγησε στην ανάπτυξη πολλών τροποποιήσεων της που την προσαρμόζουν κάθε φορά στις απαιτήσεις των πειραμάτων. Μερικές από αυτές είναι: Inverse PCR, Nested PCR, Ligation-mediated PCR, RT-PCR, Assembly PCR, Asymmetric PCR, Quantitative PCR, Quantitative real-time PCR, Touchdown PCR, Colony PCR, RACE-PCR, Multiplex-PCR, Methylation Specific PCR. Πιο πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί η Tail PCR και η Meta PCR.

PCR: Polymerase Chain Reaction

30 ή 40 κύκλοι των 3 σταδίων



Εικόνα 6: Τα στάδια που ακολουθούνται σε κάθε κύκλο της PCR.

Δύο βασικά αντιδραστήρια της PCR είναι οι εκκινητές και η πολυμεράση. Η επιλογή του μήκους της αλληλουχίας των εκκινητών και της θερμοκρασίας αποδιάταξης ή τήξεως τους (T_m) εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η T_m ενός εκκινητή ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία οι μισές περιοχές-στόχοι των εκκινητών είναι κατειλημμένες. Η T_m αυξάνει όσο μεγαλώνει και το μήκος του εκκινητή. Εκκινητές με μικρό μήκος θα προσδένονται σε διάφορες θέσεις στο μόριο του DNA, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό ανεπιθύμητων γονιδίων. Υψηλές θερμοκρασίες, π.χ. πάνω από 80°C, μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στην DNA πολυμεράση καθώς είναι λιγότερο δραστική σε τέτοιες θερμοκρασίες. Το ιδανικό μήκος για τους εκκινητές είναι από 15 έως 40 νουκλεοτίδια με T_m από 55°C έως 65°C.

Για τις ανάγκες της PCR πρέπει να χρησιμοποιηθεί μία πολυμεράση η οποία θα είναι θερμοσταθερή, δηλαδή θα αντέχει την επαναλαμβανόμενη θέρμανση στους 94°C. Έτσι, δε χρειάζεται η προσθήκη πολυμεράσης σε κάθε κύκλο και η διαδικασία μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Μία από τις πρώτες θερμοσταθερές πολυμεράσες είναι η Taq πολυμεράση η οποία ακόμη και σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα. Η Taq πολυμεράση απομονώθηκε από το θερμόφιλο οργανισμό *Thermus aquaticus*. Ένα μειονέκτημα της Taq είναι ότι δεν έχει δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διορθώσει τα λάθη που η ίδια κάνει κατά την επιμήκυνση του DNA. Αυτό το μειονέκτημα της Taq καλύπτουν δύο άλλες πολυμεράσες, η Pwo και η Pfu, που προέρχονται από αρχαία. Ωστόσο, αυτές οι πολυμεράσες επιμηκύνουν το DNA με πιο αργό ρυθμό από την Taq. Για τη σωστή δράση της πολυμεράσης απαιτείται ειδικό διάλυμα buffer και κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος MgCl₂.

Η PCR έχει εφαρμοστεί και για την ενίσχυση τμήματος DNA με μήκος 10kb. Ωστόσο, ο μέσος όρος των τμημάτων που ενισχύονται με την PCR είναι από μερικές εκατοντάδες έως μερικές χιλιάδες βάσεις.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου (Mullis et al., 1987) στηρίζεται στη χρήση των παρακάτω:

1. Μικρή ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.
2. Ειδικό διάλυμα (buffer) για την πολυμεράση.
3. Διάλυμα MgCl₂ κατάλληλης συγκέντρωσης.
4. Ζεύγος συνθετικών νουκλεοτιδίων για την έναρξη της αντιγραφής (εκκινητές).
5. Κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων.
6. Θερμοσταθερή Taq πολυμεράση.

Για τις ανάγκες της μελέτης πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των γονιδίων *DRB1* και *DQA* με τη μέθοδο της PCR. Για τον πολλαπλασιασμό χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ζεύγη εκκινητών:

DRB1 Fw 5' GAC GAG TGT CAT TTC TTC AAC G 3'

DRB1 Rv 5' GGC ACC AGG AAT GTA TCC AA 3'

DQA Fw 5' TGT TGG AGC GTT TAG TCA CG 3'

DQA Rv 5' GGC ACC AGG AAT GTA TCC AA 3'

Τα ζεύγη των εκκινήτων κατασκευάστηκαν με βάση αλληλουχίες *DRB1* και *DQA* του *Sus scrofa* που υπήρχαν στη βάση δεδομένων.

Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή *eppendorf*. Το συνολικό διάλυμα της αντίδρασης είναι 50μl. Τα αντιδραστήρια που προστέθηκαν και οι ποσότητές τους έχουν ως εξής:

DNA	1000ng
Buffer (10x → 1x)	5μl
MgCl ₂ (50mM → 2mM)	2,5μl
dNTPs (10mM each)	1μl
Primer F (25pmoles/μl)	1μl
Primer R (25pmoles/μl)	1μl
Taq polymerase 5units/μl	0,2μl
Bovine Serum Albumine (BSA)	0,2μl
dd H ₂ O	38,1μl

Για τον πολλαπλασιασμό του *DRB1* και *DQA* ακολουθήθηκαν τα τρία στάδια της PCR. Οι συνθήκες στις οποίες έλαβε χώρα η PCR για την ενίσχυση του γονιδίου του *DRB1* είναι οι ακόλουθες:

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 4min

Αποδιάταξη: 95°C για 40sec

Συγκόλληση εκκινήτη: 57°C για 50sec

Επιμήκυνση: 72°C για 40sec

Τελική επιμήκυνση: 72°C για 10min

Οι συνθήκες στις οποίες έλαβε χώρα η PCR για την ενίσχυση του γονιδίου του *DQA* είναι οι ακόλουθες:

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 4min

Αποδιάταξη: 95°C για 40sec

Συγκόλληση εκκινήτη: 58°C για 50sec

Επιμήκυνση: 72°C για 40sec

Τελική επιμήκυνση: 72°C για 10min

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

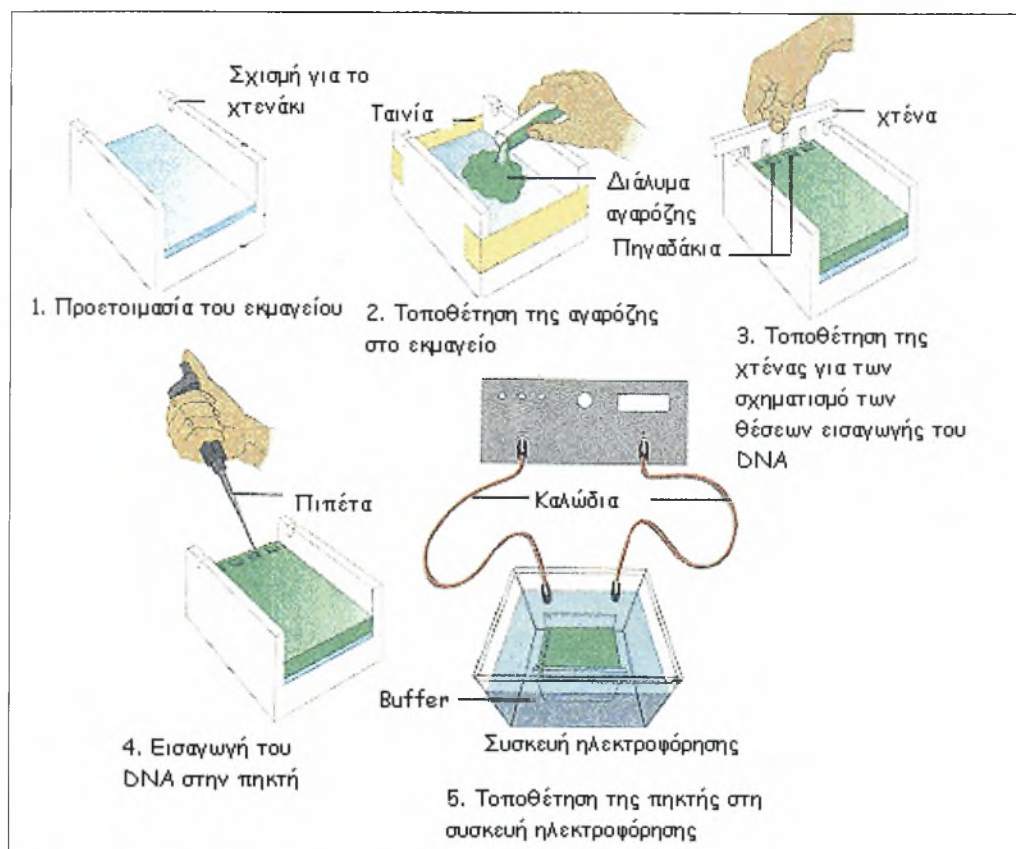
Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για να διαχωρίσει τμήματα του DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Ακόμη, με τη μέθοδο αυτή υπολογίζεται το μέγεθος των τμημάτων που έχουν διαχωριστεί, συγκρίνοντάς τα με τμήματα γνωστού μεγέθους (DNA μάρτυρας μοριακών μεγεθών).

Βασική αρχή της μεθόδου είναι ότι τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA μετακινούνται μέσα στην πηκτή εξαιτίας του ηλεκτρικού πεδίου. Τα μικρά μόρια περνούν εύκολα και γρήγορα μέσα από τους πόρους της πηκτής. Τα μεγαλύτερα μόρια πρέπει να αλλάξουν διαμόρφωση για να περάσουν μέσα από τους πόρους και έτσι η κίνησή τους είναι πιο αργή. Επιπλέον, σημαντική είναι και η διαμόρφωση των μορίων στη μετακίνησή τους (κυκλικό, γραμμικό, υπερελικωμένο DNA). Η παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή αναγκάζει τα μόρια να κινηθούν πιο αργά προς το θετικό πόλο. Όσο μεγαλύτερη είναι η τάση του πεδίου τόσο πιο γρήγορη είναι η μετακίνηση των μορίων. Η τάση όμως δε γίνεται να είναι πολύ υψηλή γιατί αναπτύσσονται μεγάλες θερμοκρασίες και προκαλείται το λιώσιμο της πηκτής.

Η βασική χρωστική στις πηκτές αγαρόζης είναι το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει τη μοναδική ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες. Φορτώνοντας το DNA σε μία πηκτή που περιέχει αιθίδιο και εκθέτοντάς το στο υπεριώδες γίνονται ορατές οι διακριτές μπάντες του DNA καθώς αυτό παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι καρκινογόνο και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά το χειρισμό του. Για να καθιζάνει το DNA καθώς φορτώνεται στην πηκτή και για να είναι εύκολα ορατό στο υπεριώδες προστίθεται το διάλυμα φόρτωσης (loading buffer). Το κυανό του ξυλενίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης χρησιμοποιούνται συνήθως. Τα loading buffers περιέχουν συνήθως γλυκερόλη, σουκρόζη και φυκόλη έτσι ώστε να καταβυθίζεται το

DNA. Περιέχουν χρωστικές για να είναι εύκολη η παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης.

Τα κυριότερα buffers που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αгарόζης είναι το TAE (Tris acetate EDTA) και το TBE (Tris borate EDTA). Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση για μεγάλα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση, περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν.



Εικόνα 7: Προετοιμασία της πηκτής αгарόζης.

Για την προετοιμασία της πηκτής αгарόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή.
2. Προετοιμασία της πηκτής. Χρησιμοποιήθηκαν 0,6gr αгарόζης και 30ml TAE 1x για την παρασκευή διαλύματος 2%.
3. Βράσιμο του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων. Κατά το βράσιμο πρέπει να γίνεται συχνή ανάδευση του διαλύματος.
4. Το διάλυμα ανακινείται έως ότου κρυώσει.

5. Προστίθενται 3μl βρωμιούχου αιθιδίου $C=10\text{mg/ml}$.
 6. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.
 7. Εισάγεται το χτενάκι στην πηκτή για να σχηματιστούν οι θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
 8. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί αφαιρείται το χτενάκι.
 9. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x.
 10. Ανάμειξη 3μl loading buffer με 5μl προϊόντος της αντίδρασης της PCR και στη συνέχεια εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής.
- Η τάση ρυθμίζεται έτσι ώστε να είναι 70V. Μετά από περίπου 40 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή αφού τοποθετηθεί στη συσκευή UV.

Αποδιάταξη του DNA

Η αποδιάταξη του DNA είναι μία μέθοδος που μας επιτρέπει να διατηρήσουμε τα δείγματα του DNA σε μονόκλωνη κατάσταση για λίγη ώρα. Η αποδιάταξη είναι απαραίτητη για τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν με τη μέθοδο SSCP. Η διαδικασία περιλαμβάνει μεταφορά μέρους του προϊόντος της PCR (6μl) σε νέο σωληνάριο erpendorf και προσθήκη 10μl αποδιατακτικού διαλύματος.

Αποδιατακτικό διάλυμα: 10ml, αποθήκευση στους 4°C

- I. 95% formamide
- II. 10mM NaOH
- III. 0,05% Bromophenol blue
- IV. 0,05% xylene cyanol
- V. 10% glycerol

Στη συνέχεια τα erpendorf τοποθετούνται στον αυτοματοποιημένο κυκλοποιητή όπου επέρχεται η αποδιάταξή τους αφότου μείνουν σε υψηλές θερμοκρασίες (96°C για 6 min). Μόλις τα δείγματα βγουν από τον κυκλοποιητή τοποθετούνται απευθείας στον πάγο για να διατηρήσουν για κάποιο χρονικό διάστημα τη μονόκλωνη κατάστασή τους.

Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης ενός κλώνου (SSCP)

Η ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης ενός κλώνου είναι μία μέθοδος στην οποία σχηματίζονται μονόκλωνα DNA από υλικό που έχει πολλαπλασιαστεί με PCR και στη συνέχεια αυτά διαχωρίζονται με βάση την κινητικότητά τους στο πήκτωμα, που οφείλεται σε μετάλλαξη ενός και μόνο νουκλεοτιδίου. Η διαμόρφωση του κάθε κλώνου διαφέρει ελαφρώς ανάλογα με την ακριβή του αλληλουχία και αυτές οι διαφορές στη διαμόρφωση μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορές στην κινητικότητά τους στο πήκτωμα (Orita et al., 1989).

Τα δείγματα του DNA για να διαχωριστούν φορτώνονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η ακρυλαμίδα είναι ένα μονομερές το οποίο πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες παρουσία ελεύθερων ριζών. Η αλυσίδα διασυνδέεται παρουσία ενός διασυνδέτη (crosslinker), συνήθως του N,N - methylenebisacrylamide και έτσι σχηματίζεται μία πορώδης πηκτή. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης.

Για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης είναι απαραίτητο το μητρικό διάλυμα της ακρυλαμίδης (38,5%). Για την παρασκευή του προστίθενται 75gr ακρυλαμίδης και 2gr bis-ακρυλαμίδα σε 120ml H₂O. Αφού διαλυθεί η ακρυλαμίδα και η bis-ακρυλαμίδα, το διάλυμα διηθείται και συμπληρώνεται H₂O μέχρι τον όγκο των 200ml. Το διάλυμα μπορεί να φυλαχτεί στους 4°C για 10-15 ημέρες.

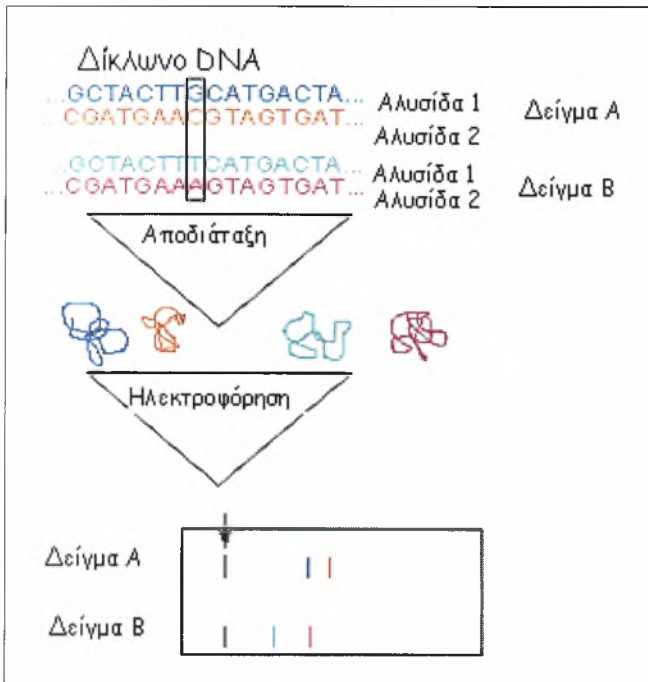
Για την παρασκευή 125ml πηκτής ακρυλαμίδης (10%) χρησιμοποιούνται:

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

Συμπληρώνεται H₂O μέχρι τον όγκο των 125ml ενώ προστίθενται στο διάλυμα 125μl N, N, N', N' -Tetramethylethylenediamine (TEMED) και 650μl ammonium persulfate 20% (APS). Η διαδικασία του πολυμερισμού σταθεροποιείται από το TEMED ενώ το APS παρέχει τις ελεύθερες ρίζες.

Αφού στερεοποιηθεί η πηκτή εισάγεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία προστίθεται TBE 0,5x. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα τα οποία μόλις έχουν αφαιρεθεί από τον κυκλοποιητή και βρίσκονται στον πάγο για να διατηρηθεί η μονόκλωνη

κατάσταση του DNA. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται στο ψυγείο για το *DQA*, ενώ για το *DRBI* παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται overnight.



Εικόνα 8: Ανίχνευση μεταλλαγής μιας βάσης με τη μέθοδο SSCP.

Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με την τεχνική χρώσης νιτρικού αργύρου (Silver Staining)

Για να γίνει ορατό το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών της πολυακρυλαμίδης με την τεχνική silver staining (Ainsworth et al., 1990). Αρχικά, οι πηκτές τοποθετούνται σε δοχεία στα οποία προστίθενται 3 διαλύματα. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι:

Διάλυμα I: 8ml αιθανόλης και 0,5ml οξικό οξύ. Προσθήκη H₂O μέχρι τον όγκο των 400ml.

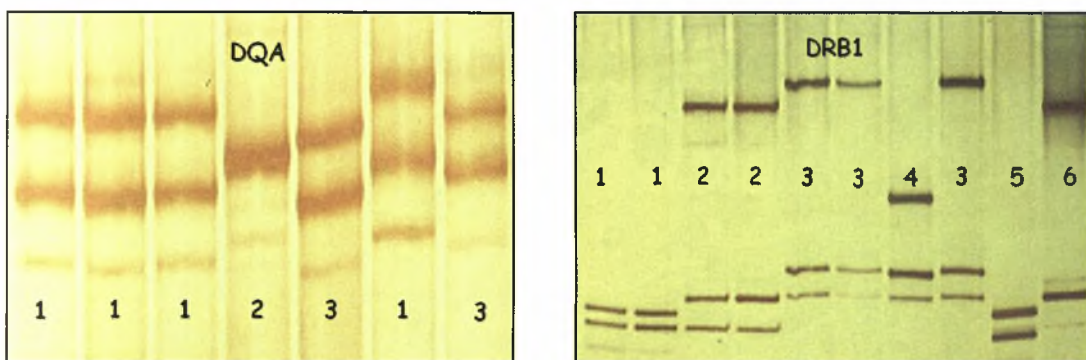
Διάλυμα II: 200ml AgNO₃ 1gr/lit.

Διάλυμα III: 3gr NaOH, 0,01gr NaBH₄, 1ml HCHO. Προσθήκη H₂O μέχρι τον όγκο των 200ml.

Αρχικά, προστίθενται 200ml του πρώτου διαλύματος για 3min. Στη συνέχεια, προστίθεται το υπόλοιπο διάλυμα για 3min. Μετά, προστίθεται το δεύτερο διάλυμα για 20min και τέλος, το τρίτο διάλυμα το οποίο διατηρείται μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των δειγμάτων σε ικανοποιητικό βαθμό (περίπου 20min). Μεταξύ των διαλυμάτων γίνεται ξέπλυμα της πηκτής με απεσταγμένο νερό.

Στην τεχνική silver staining ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με τη φορμαλδεΐδη παρουσία βάσης. Το DNA φαίνεται καφέ σε κίτρινο φόντο. Οι πηκτές μπορούν διατηρηθούν για αρκετό καιρό.

Μετά τη χρώση της πηκτής είναι δυνατή η παρατήρηση των προτύπων. Στα ετερόζυγα άτομα παρατηρούνται τέσσερις καλά διαχωρισμένες ζώνες ενώ στα ομόζυγα άτομα δύο. Η κάθε ζώνη αντιστοιχεί στη μία αλυσίδα του μορίου του DNA.



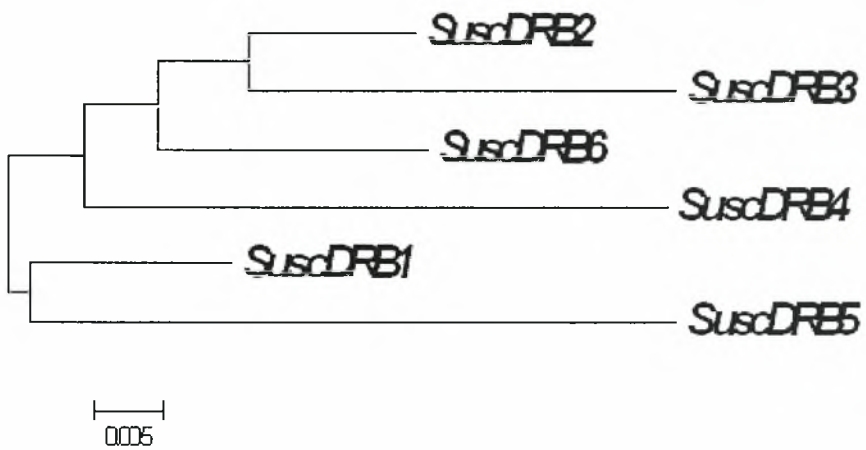
Εικόνα 9: SSCP πρότυπα των γονιδίων *DQA* και *DRB1* που ανιχνεύτηκαν στο *Sus scrofa domestica*.

Αποτελέσματα

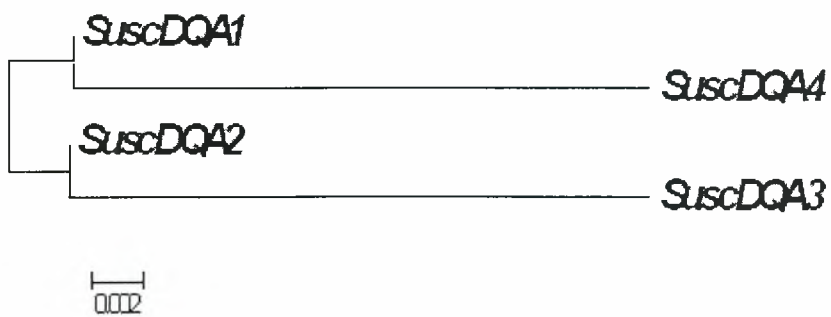
Πραγματοποιήθηκε PCR και κατόπιν SSCP για τα γονίδια *DQA* και *DRB1* σε 72 άτομα *Sus scrofa domestica*. Έτσι, αποκαλύφθηκαν 11 διαφορετικά πρότυπα για το γονίδιο *DRB1* και 8 για το γονίδιο *DQA*. Πιο συγκεκριμένα για το *DRB1*, τα 6 από αυτά αντιστοιχούν σε ομόζυγα άτομα (63 άτομα του προς ανάλυση πληθυσμού) ενώ υπάρχουν και 5 πρότυπα που αντιστοιχούν στα ετερόζυγα άτομα (8 άτομα του προς ανάλυση πληθυσμού). Ενώ για το *DQA*, τα 4 από αυτά αντιστοιχούν σε ομόζυγα άτομα (61 άτομα του προς ανάλυση πληθυσμού) και τα υπόλοιπα 4 πρότυπα σε ετερόζυγα άτομα (20 άτομα του προς ανάλυση πληθυσμού). Δηλαδή, στο είδος *Sus scrofa domestica* υπάρχουν 6 αλληλόμορφα του γονιδίου *DRB1* και 4 αλληλόμορφα ανάλυση των αλληλουχιών έγινε με το BioEdit καθώς και η εύρεση της αμινοξικής αλληλουχίας. Αρχικά βρέθηκαν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των αλληλομόρφων και στη συνέχεια βρέθηκε το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης καθώς και τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR) και τα οποία σημειώνονται με σταυρό (+). Η αμινοξική αλληλουχία των αλληλομόρφων του *DRB1* είναι η ακόλουθη:

SuscDRB1 + + + ++ + + + + + + + + +
 DECHFFNGTERVRL LQKQYNGE EHVRF DSDVGEYRAVTE LGRPDAKYWNSQKDLL EQMRAAVD TYCRHNYRI LDTFF LVP
SuscDRB2 DECHFFNGTERVRL LERQYNGE EFLRF DSDVGEYRAVTE LGRPDAKDWNSQKDLL EQRRAEVD TYCRHNYRI LDTFF LVP
SuscDRB3 DECHFFNGTERVRL LDRHYNGE EI LRF DSDVGEYRAVTE LGRPEAKDWNSRKKDI LEQRRAEVD TYCRHNYRI LDTFF LVP
SuscDRB4 DECHFFNGTERVRFMERHYNGE EHVRF DSDVGEYRAVTE LGRPSAKYWNSQKDLL EEKRAEVD TYCRHNYRT LDTFF LVP
SuscDRB5 DECHFFNGTERVRY LQKYFYNGE EEFVRF DSDLGEFRAVTE LGRPDAKYWNSQKDLL MEQKRAEVD TYCRHNYRI LDTFF LVP
SuscDRB6 DECHFFNGPERVRL LERQYNGE EYVRF DSDVGEYRAVTE LGRPDAKDWNSQKDLL EQRRAEVD TYCRHNYRT LDTFF LVP

Ακόμα βρέθηκαν οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των αλληλομόρφων και απεικονίζονται στο δέντρο. Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έγινε με το πρόγραμμα MEGA.

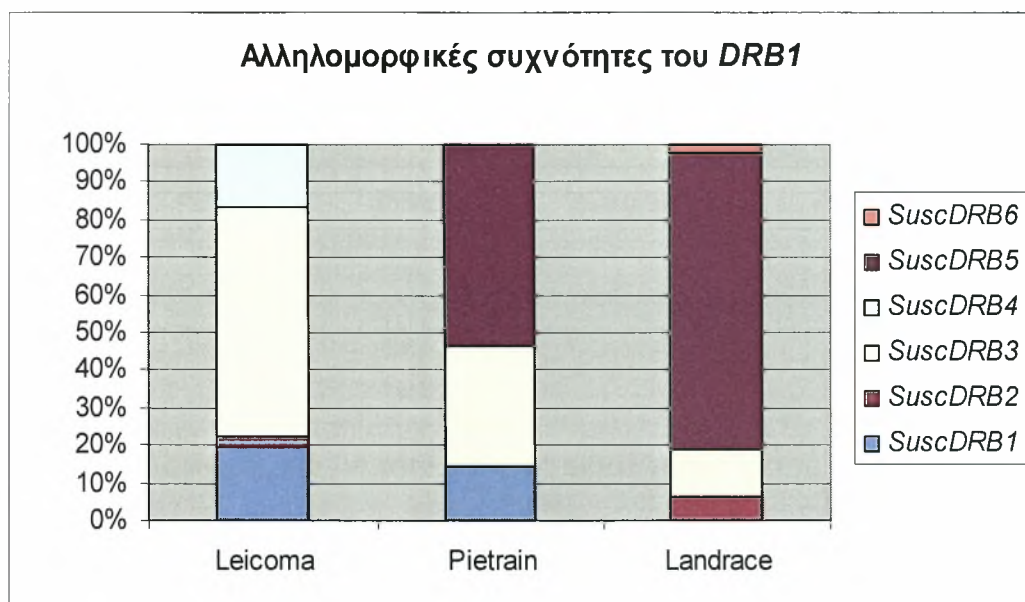


Εικόνα 10: Φυλογενετικό δέντρο που δείχνει τις εξελικτικές σχέσεις των αλληλομόρφων του DRB1.

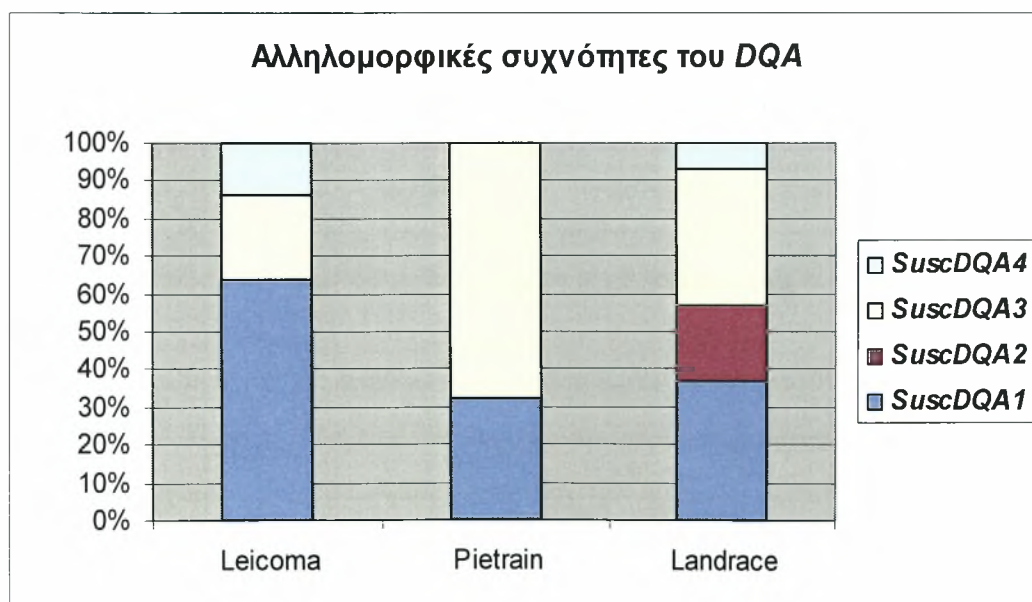


Εικόνα 11: Φυλογενετικό δέντρο που δείχνει τις εξελικτικές σχέσεις των αλληλομόρφων του DQA.

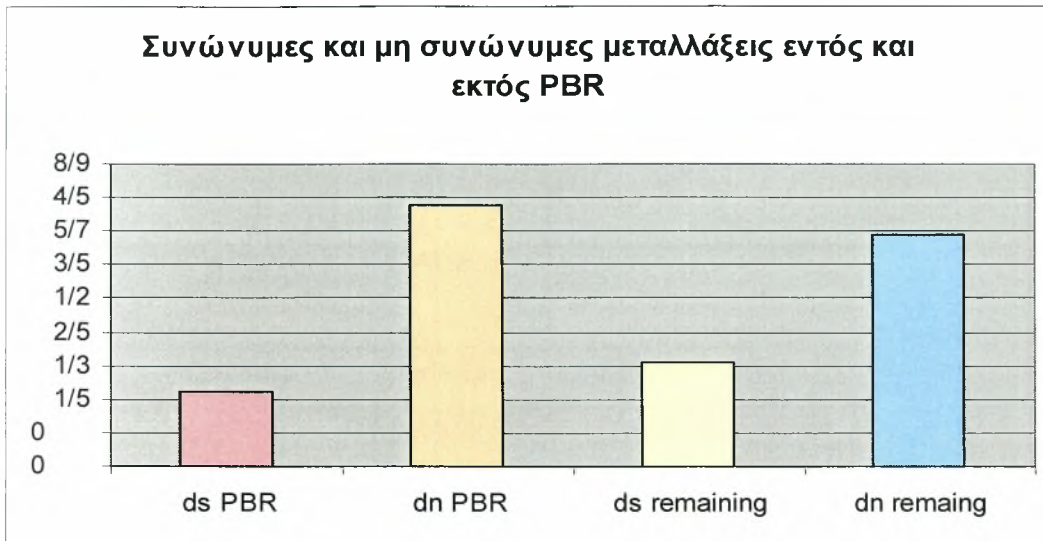
Στη συνέχεια, βρέθηκαν οι αλληλομορφικές συχνότητες, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GENETIX, καθώς και ο αριθμός συνώνυμων και μη συνώνυμων μεταλλάξεων εντός κι εκτός PBR.



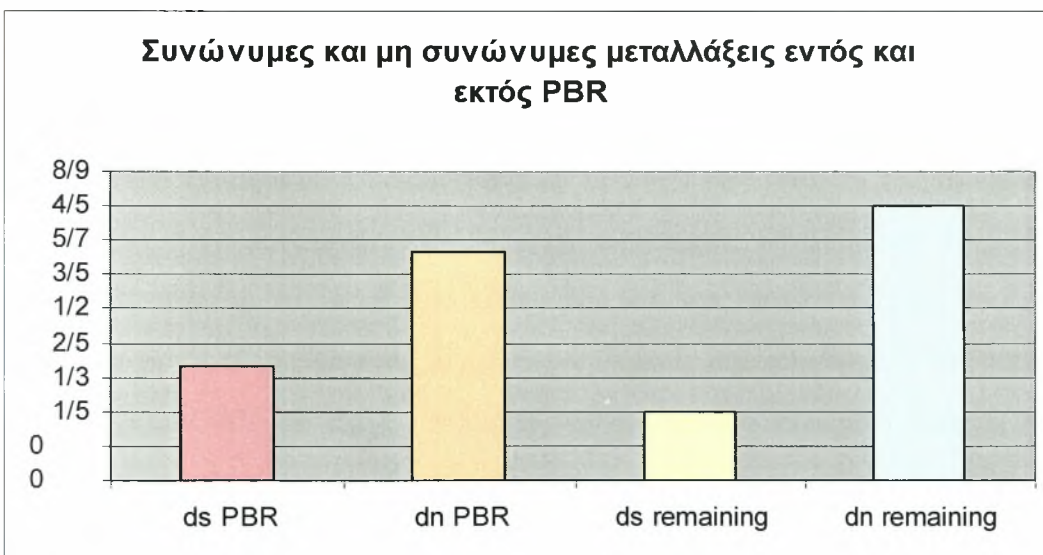
Πίνακας 2: Αλληλομορφικές συχνότητες του DRB1.



Πίνακας 3: Αλληλομορφικές συχνότητες του DQA.



Πίνακας 4: Ποσοστά συνώνυμων και μη συνώνυμων μεταλλάξεων εντός κι εκτός PBR για το *DRB1*.



Πίνακας 5: Ποσοστά συνώνυμων και μη συνώνυμων μεταλλάξεων εντός κι εκτός PBR για το *DQA*.

Ακόμη, υπολογίστηκε η αναμενόμενη ετεροζυγωτία και κατόπιν συγκρίθηκε με την παρατηρούμενη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

	Leicoma	Pietrain	Landrace
H exp.	0.5602	0.5893	0.3672
H obs.	0.1111	0.2143	0.0769

Πίνακας 6: Παρατηρούμενη και αναμενόμενη ετεροζυγωτία για το *DRB1*.

	Leicoma	Pietrain	Landrace
H exp.	0.5231	0.4362	0.6908
H obs.	0.1111	0.2143	0.3061

Πίνακας 7: Παρατηρούμενη και αναμενόμενη ετεροζυγωτία για το *DQA*.

Συνολικά και στις τρεις φυλές ταυτοποιήθηκαν έξι αλληλόμορφα για το *DRB1* και τέσσερα για το *DQA*, ορισμένα από αυτά, χαρακτηριστικά για την κάθε φυλή. Το γεγονός ότι για το *DQA* υπάρχουν λιγότερα αλληλόμορφα οφείλεται στο ότι το γονίδιο αυτό στους χοίρους είναι ολιγομορφικό σε αντίθεση με το *DRB1* που είναι το πιο πολυμορφικό. Ο υπολογισμός των συνώνυμων (*ds*) και μη συνώνυμων μεταλλάξεων (*dn*) τόσο στην περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR) όσο και στο υπόλοιπο τμήμα του εξονίου 2 έδειξε ότι το *dn* είναι σημαντικά μεγαλύτερο, γεγονός που υποδηλώνει τη δράση θετικής επιλογής στα *DRB1* και *DQA*. Μάλιστα, και για τα δύο γονίδια η ένδειξη για θετική επιλογή είναι στατιστικά σημαντική. Ο υπολογισμός της ετεροζυγωτίας έδειξε χαμηλά ποσοστά στους εκτρεφόμενους χοίρους κάτι που πιθανώς οφείλεται σε μειωμένη γονιδιακή ροή και στο μικρό μέγεθος των πληθυσμών των εκτροφείων. Για τον προσδιορισμό των εξελικτικών σχέσεων των αλληλομόρφων κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δέντρο που δείχνει ότι δεν υπάρχει φυλογεωγραφική συσχέτιση καθώς τα αλληλόμορφα των φυλών δεν ομαδοποιούνται, γεγονός που έχει παρατηρηθεί συχνά σε γενετικούς τόπους του ΜHC. Τα χαμηλά ποσοστά ετεροζυγωτίας δείχνουν ότι το πλεονέκτημα του ετεροζυγώτη δεν είναι η μόνη δύναμη που διατηρεί τον πολυμορφισμό στο ΜHC. Ο αυξημένος αριθμός *dn* και στα δύο γονίδια, η στατιστικά σημαντική ένδειξη για δράση θετικής επιλογής, η μη φυλογεωγραφική συσχέτιση των αλληλομόρφων και η

διατήρηση αλληλομόρφων ακόμη και σε μικρές συχνότητες συνηγορούν υπέρ της δράσης της ισοζυγούσας επιλογής στους συγκεκριμένους πληθυσμούς.

Συζήτηση

Σκοπός αυτής της επιστημονικής μελέτης ήταν η διερεύνηση του πολυμορφισμού του εξονίου 2 των γονιδίων *DRB1* και *DQA* του ΜHC στο είδος *Sus scrofa domestica*. Για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SSCP. Βρέθηκαν 6 αλληλόμορφα του γονιδίου *DRB1* και 4 αλληλόμορφα του γονιδίου *DQA*. Έγινε, έτσι, δυνατή η εκτίμηση του πολυμορφισμού του *DRB1* και του *DQA* ενδοπληθυσμιακά και διαπληθυσμιακά.

Το λειτουργικό *DRB1* γονίδιο των θηλαστικών έχει βρεθεί ότι είναι το περισσότερο πολυμορφικό γονίδιο του ΜHC. Μια μεγάλη έρευνα για τα γονίδια ΜHC του ανθρώπου, των αρουραίων, των ποντικιών, των βοοειδών, και άλλων ειδών έχει επιβεβαιώσει αυτό το χαρακτηριστικό. Το *DRB1* του οικόσιτου χοίρου 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). Αντίθετα, το *DQA* γονίδιο έχει βρεθεί στο *Sus scrofa domestica* να είναι ολιγομορφικό (Andon and Chardon, 1997).

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 οποιοδήποτε πεπτιδίου. Αξιοσημείωτη είναι ωστόσο η σημασία των τοπικά προσαρμοσμένων πληθυσμών για τη διατήρηση της γενετικής ποικιλομορφίας (Amills *et al.* 2004).

Οι πληθυσμοί του είδους *Sus scrofa domestica* που μελετήθηκαν προέρχονται από πρότυπες εκτροφές της Γερμανίας. Ο υπολογισμός των συνώνυμων (*ds*) και μη συνώνυμων μεταλλάξεων (*dn*) τόσο στην περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR) όσο και στο υπόλοιπο τμήμα του εξονίου 2 έδειξε ότι το *dn* είναι σημαντικά μεγαλύτερο, γεγονός που υποδηλώνει τη δράση θετικής επιλογής στα *DRB1* και *DQA*. Μάλιστα, και για τα δύο γονίδια η ένδειξη για θετική επιλογή είναι στατιστικά σημαντική. Ο υπολογισμός της ετεροζυγωτίας έδειξε χαμηλά ποσοστά στους εκτρεφόμενους χοίρους κάτι που πιθανώς οφείλεται σε μειωμένη γονιδιακή ροή και στο μικρό μέγεθος των πληθυσμών των εκτροφείων.

Σημαντικός είναι ο ρόλος της επιλογής και της γονιδιακής μετατροπής στην εξέλιξη των ΜHC τόπων. Βάση πρόσφατων ανακαλύψεων των επιδράσεων της πρωτεϊνικής δομής στην αναγνώριση του αντιγόνου και με τη χρήση DNA αλληλουχιών αναφοράς σ' αυτούς τους τόπους, αποδείχτηκε ότι η αντικατάσταση αμινοξέως συμβαίνει πιο συχνά από τη συνώνυμη αντικατάσταση στην περιοχή αναγνώρισης αντιγόνου PBR (Hughes & Nei, 1988). Λόγω αυτής της ανακάλυψης υποστηρίζεται ότι στην PBR λειτουργεί το πλεονέκτημα του ετεροζυγώτη.

Ακόμη, είναι πολύ πιθανό ότι το εξελικτικό μονοπάτι των γονιδίων ΜHC τάξης II είναι αξιόλογα διαφορετικό κάτι που πιθανώς οφείλεται και στις διαφορετικές λειτουργίες που επιτελούν τα μόρια που κωδικοποιούν. Έχει προταθεί ότι η περιοχή HLA-DR ενεργοποιεί την ανοσολογική απόκριση, ενώ ο τύπος HLA-DQ καταστέλλει την ανοσολογική αντίδραση (Ohata T., 1991). Πιθανώς, αυτός ο διαφορετικός ρόλος ευθύνεται για το μεγαλύτερο πολυμορφισμό του *DRB1* σε σχέση με το *DQA* ή ακόμη και το *DQB1*.

Είναι αρκετά σημαντικό να μελετάμε το ΜHC ως δείκτη γενετικής ευρωστίας. Στο πολύ συγγενικό είδος αγριόχοιρο *Sus scrofa* μελετήθηκε η σχετική συμβολή της γενετικής ποικιλότητας του ξενιστή ως προς την ευαισθησία στη μόλυνση από τη βοδινή φυματίωση και την πορεία της ασθένειας σε αγριόχοιρους της Νότιας Ισπανίας. Η ασθένεια αυτή μπορεί να προκαλέσει σημαντικά οικονομικά προβλήματα και να καταστρέψει το διεθνές εμπόριο των ζώων αλλά και των προϊόντων τους. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι η γενετική ετεροζυγωτία είναι μια σημαντική πρόβλεψη της βοδινής φυματίωσης, όχι μόνο ρυθμίζοντας την αντοχή στην μόλυνση, αλλά και επηρεάζοντας την πορεία της ασθένειας σε μολυσμένα άτομα (Acevedo K. et al, 2005).

Ακόμη, οι μολυσματικές ασθένειες είναι ένας μείζονας δημογραφικός και εξελικτικός οδηγός των φυσικών πληθυσμών. Για να κατανοηθούν τα εξελικτικά κρούσματα της ασθένειας, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στο ΜHC, τη γενετική περιοχή που εμπλέκεται στην αντιγονοπαρουσίαση. Το ΜHC είναι πλέον ένα από τα πιο καλά μελετημένα γενετικά συστήματα στα γναθοστόματα σπονδυλωτά που οφείλεται στη μακροπρόθεσμη δράση της φυσικής επιλογής. Έχει αποδειχθεί ότι η c-II PBR είναι αναμφίβολα σημαντική γιατί μας παρουσιάζει τη σημαντικότερη ένδειξη της επιρροής της ισοζυγούσας επιλογής και, επομένως, είναι ένας καλός δείκτης για να εξηγήσει το

μηχανισμό με τον οποίο η οδηγούμενη από παθογόνα ποικιλότητα του MHC διατηρείται (Acevedo K. & Cunningham A., 2006).

Τα περισσότερα γεγονότα εξημέρωσης πιστεύεται ότι συνέβησαν περίπου την ίδια περίοδο στην νοτιοδυτική Ασία, την ανατολική Ασία και την Αμερική, 8000-10000 χρόνια πριν, και είναι πιθανό αυτή η σύνδεση να μην είναι καθόλου τυχαία. Συγκρίνοντας μιτοχονδριακές και πυρηνικές αλληλουχίες DNA από νέες γενιές χοίρων με τους δυνητικούς άγριους και οικόσιτους προγόνους τους, έχουν κερδηθεί νέες γνώσεις σχετικά με την χρονολογία και την τοποθεσία των γεγονότων εξημέρωσης που έχουν παράγει τα σημερινά ζώα της φάρμας. Η πραγματική έκπληξη ήταν ο σημαντικά υψηλός αριθμός γεγονότων εξημέρωσης και οι ποικίλες τοποθεσίες στις οποίες συνέβησαν. Οι δύο αυτοί παράγοντες θα μπορούσαν ραγδαία να μεταβάλλουν τη βιοποικιλότητα των πόρων για το μέλλον (Bruford M. et al, 2003). Επιπρόσθετα, πολλές γενιές χοίρων κατάγονται από τον ευρωπαϊκό αγριόχοιρο, αλλά η γεωγραφική τοποθεσία των περιοχών εξημέρωσης και της πιθανής εισδοχής του γενώματος του χοίρου σε άγριους πληθυσμούς είναι ακόμη αναπάντητα ερωτήματα.

Τα γονίδια του MHC είναι στην κορυφή του ενδιαφέροντος εξαιτίας της δυνατής πίεσης επιλογής που σχηματίζει τη σταθερή ποικιλότητα. Λόγω των ανοσολογικών (και πιθανών άλλων) λειτουργιών, η νουκλεοτιδική ποικιλότητα των γονιδίων του MHC ίσως είναι ευθέως εξαρτώμενη από την ατομική ικανότητα και επιβίωση. Με άλλα λόγια, μεγάλο τμήμα του μοριακού πολυμορφισμού των αλληλομόρφων είναι ευπροσάρμοστο και διατηρείται με φυσική και /ή φυλετική επιλογή (Bos D. et al, 2008).

Βιβλιογραφία

- Acevedo-Whitehouse K, Vicente J, Gortazar C, Höfle U, Fernandez-de-Mera I and Amos W, Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Molecular Ecology* (2005) 14: 3209-3217
- Acevedo-Whitehouse K and Cunningham A, Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? *TRENDS in Ecology and Evolution* Vol.21 No.8, 2006
- Amills M, N Jimé'nez, 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
- Ando Asako and Chardon Patrick, Gene organization and polymorphism of the swine major histocompatibility complex. *Japanese Society of Animal Science* 77: 127-137, 2006
- 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
- Bos D, Gopurenko D, Williams R and DeWoody A, Inferring population history and demography using microsatellites, mitochondrial DNA, and major histocompatibility complex (MHC) genes. *Evolution* (2008) 62-6:1458-1468
- Bruford M, Bradley D and Luikart G, DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature reviews* 4: 900-910, 2003
- Campbell RD, and J Trowsdale. Map of the human MHC. *Immunology Today* 14:349-352
- Flajnik Martin F, Camilo Canel, Jack Kramer, and Masanori Kasahara, Which came first, MHC class I or class II ? *Immunogenetics* 33: 295-300
- Hughes AL, Nei M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 335:167, 1988
- Hughes AL, Nei M. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86:958, 1989

Hughes AL, Nei M: Evolutionary relationships of class II major-histocompatibility-complex genes in mammals. *Molecular Biology & Evolution* 7:491, 1990

Hughes AL, Nei M. Evolutionary relationships of the classes of major histocompatibility complex genes. *Immunogenetics* 3:337-346, 1993

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

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. *Immunogenetics* 31: 217-219

Lawlor DA, Ward FE, Ennis PD, Jackson AP, Parham P: HLA-A and B polymorphisms predate the divergence of humans and chimpanzees. *Nature* 335:268, 1988

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

Mullis K.B., Faloona F.A: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase - catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350, 1987

Ohta Tomoko, Role of diversifying selection and gene conversion in evolution of major histocompatibility complex loci. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 88, pp. 6716-6720, 1991

Orita Masato, Suzuki Youichi, Sekiya Takao, Hayashi Kenshi: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *GENOMICS* 5: 874-879, 1989

Parham P, Adams EJ, Arnett KL: The origins of HLA-A,B,C polymorphism. [Review]. *Immunological Reviews* 143:141, 1995

Parham P, Ohta T, Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 272:67, 1996

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

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

Sunnucks P., Wilson A. C. C., † Beheregaray L. B., Zenger K., French J., Taylor A. C. ‡: SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* 9: 1699-1710, 2000

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

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

