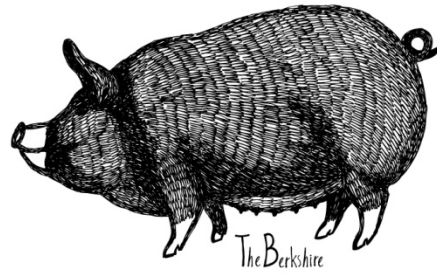


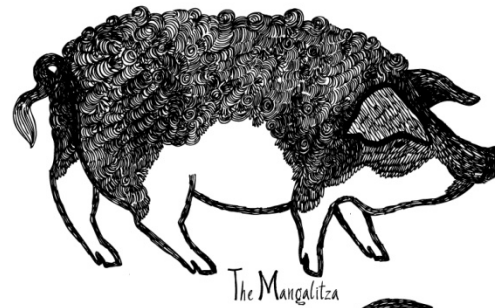
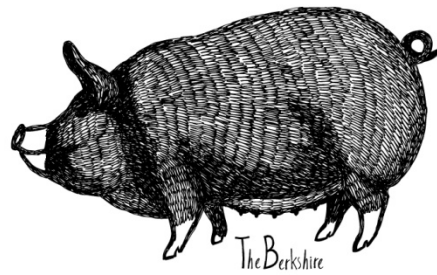


Γενετική Βελτίωση χοίρων με την χρήση μοριακών δεικτών





Genetic improvement of pigs using genetic markers



Περίληψη

Ο χοίρος είναι ένα από τα ζώα που χρησιμοποιείται σήμερα για εκμετάλλευση του κρέατος του. Δεδομένης αυτής της μεταχείρισης, είναι απαραίτητες οι συνεχείς βελτιώσεις οι οποίες επιφέρουν υψηλές αποδόσεις τόσο στην παραγωγή, όσο και την ποιότητα του κρέατος που προορίζεται για κατανάλωση . Ένας μορικός δείκτης που έχει συσχετιστεί με την ημερίσια αύξηση βάρους, πρόσληψης τροφής και εναπόθεση ραχιαίου λίπους, είναι η μετάλλαξη Asp298Asn στο γονίδιο του υποδοχέα MC4R. Σε αυτή τη μελέτη ελέγχθηκαν οι γονότυποι 82 χοίρων των φυλών Duroc, Large White, Pietrain, Welsh και Landrace για τα γονίδια MC4R με χρήση μοριακών εργαλείων. Ελέγχθηκε ποιά από τα ζώα έχουν το φυσιολογικό και ποιά το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, καθώς επίσης για να υπολογίστηκαν οι γονοτυπικές και οι αλληλομορφικές συχνότητες του πληθυσμού , που θα οδηγήσει σταδιακά σε αύξηση της συχνότητας των επιθυμητών χαρακτηριστικών.

Abstract

Pigs are some of the animals that currently are used for their meat. In this view, continuous improvements are necessary, resulting in high output in both the production and the quality of the meat intended for consumption. A molecular marker that has shown to have a strong correlation with daily gain, food intake and backfat is the polymorphism Asn298Asp in the MC4R gene. In this study, the genotypes of 82 Duroc, Large White, Pietrain, Welsh and Landrace breeds were tested for the MC4R polymorphism using molecular tools. It was tested how many animals have the mutated and how many have the original gene. Furthermore it was calculated the genotypic and the allelic frequencies of the population, which will lead to a gradual increase in the frequency of the desirable characteristics.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων Καθηγητής

Ζήσης Μαμούρης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Μέλος

Κατερίνα Μούτου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών

Μέλος

Κωσταντίνος Σταμάτης

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσε για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ πολύ επίσης την κα . Μούτου Κατερίνα Αναπληρώτρια αθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών για την άψογη συνεργασία μας μέσα και έξω απο το εργαστήριο, καθώς και τον κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, μέλος του εργαστηριακού διδακτικού προσωπικού, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή . Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή για τη συνεχή καθοδήγηση, τη βοήθεια και την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της διπλωματικής εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου «Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας» για την φιλική τους διάθεση και συνεργασία.

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή 11

- 1.1 Συστηματική κατάταξη χοίρου 13
- 1.2 Μελανοκορτίνες και υποδοχείς τους 15
 - 1.2.1 Δράσεις μελανοκορτινών 16
 - 1.2.2 Υποδοχείς μελανοκορτινών 17
 - 1.2.3 Υποδοχείς μελανοκορτινών και ρύθμιση σωματικού βάρους 19
- 1.3 Υποδοχείς MC4R 20
 - 1.3.1 Δομή 20
 - 1.3.2 Λειτουργία 21
 - 1.3.3 Μετάλλαξη Asp298Asn στον MC4R του s.scrofa 22
- 1.4 Μοριακοί δείκτες & γενετική βελτίωση στα κτηνοτροφικά ζώα 22

2. Μοριακά εργαλεία 23

- 2.1 Απομόνωση DNA 24
 - 2.1.1 Πηγές απομόνωσης 24
 - 2.1.2 Στάδια απομόνωσης 25
- 2.2 Σχεδιασμός εκκινήτων 27
- 2.3 PCR-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης 29
- 2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 30
- 2.5 RFLP- restriction fragment length polymorphism 32

3.Υλικά και Μέθοδοι 35

- 3.1 Υλικά 35
- 3.2 Δείγματα 35
- 3.3 Απομόνωση DNA 36
- 3.4 PCR 36
- 3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης 38
- 3.6 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες 38
- 3.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμίδης 40
- 3.8 Χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο 42

4. Αποτελέσματα 44

4.1 Απομόνωση 4.1

4.2 PCR 44

4.3 RFLP 45

4.4 Πίνακας αποτελεσμάτων 45

5.Συζήτηση 51

6.Βιβλιογραφία 54

1. Εισαγωγή

Το είδος *sus scrofa*, γνωστό και ως χοίρος, εξημερώθηκε από τον άνθρωπο περίπου το 13.000-12.700 π.Χ. Πρόσφατες μελέτες στο γονιδίωμα του οικόσιτου χοίρου (*sus scrofa domesticus*) έδειξαν ότι οι χοίροι εξημερώθηκαν ξεχωριστά στην Δυτική Ασία και Κίνα. Ενώ χοίροι από την δυτική Ασία ήταν αυτοί που εισήρθαν στην Ευρώπη, όπου και διασταυρώθηκαν με άγριους χοίρους της περιοχής. Παρά τις ελεύθερες διασταυρώσεις των οικόσιτων χοίρων με αγρίους, τα γονιδιώματα των πρώτων φέρουν ισχυρά σημάδια ανθρώπινης επιλογής σε γενετικούς τόπους που αφορούν την συμπεριφορά και την μορφολογία των ατόμων. Έτσι οι μελέτες συμπεραίνουν ότι η κατευθυνόμενη αναπαραγωγή λειτούργησε ανταγωνιστικά σε σχέση με την τάση ομογενοποίησης των χαρακτήρων της ροής γονιδίων από τους άγριους χοίρους και δημιούργησε «νήσους εξημέρωσης» στο γονιδίωμα.

Με αυτόν το τρόπο δημιουργήθηκε ο οικόσιτος χοίρος, ο οποίος, λόγω της εύκολης προσαρμογής του στο περιβάλλον, της παμφάγας διατροφής του και της ικανοποιητικής ποσότητας κρέατος του, εξαπλώθηκε σχεδόν σε όλο τον κόσμο. Το 1758 ο Carl Linnaeus τον ονομάτισε *sus scrofa* ενώ στην συνέχεια πήρε την ονομασία που χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα το 1777: *sus scrofa domesticus*.

Ο ενήλικος χοίρος μπορεί να έχει 153cm έως 240cm μήκος και βάρος από 66 έως 272 κιλά. Τα θηλυκά τείνουν να είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα αρσενικά το οποίο γίνεται ξεκάθαρο με το πέρασ των χρόνων. Είναι ένα μονογαστρικό, παμφάγο αγροτικό ζώο, ιδιαίτερα υψηλής γονιμότητας. Μπορεί να γεννήσει μέχρι 5 φορές μέσα σε δύο έτη, από 10-12 χοιρίδια κάθε φορά. Οι χοίροι εκτρέφονται για την παραγωγή κρέατος και έχουν εντυπωσιακές αποδόσεις. Οι βελτιωμένοι χοίροι έχουν υψηλή απόδοση σε κρέας, περίπου 75-80% του σωματικού τους βάρους και φθάνουν τον ρυθμό ανάπτυξης των 800-900g ανά ημέρα. Τέλος, η ποσότητα τροφής που καταναλώνουν για να παραχθεί 1 kg κρέατος είναι μεταξύ των 2,5 και 3 kg (Σιμιτζής & Στεργίου, 2016).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο χοίρος είναι ένα αγροτικό ζώο γρήγορης ανάπτυξης. Η διάρκεια της κυοφορίας, δηλαδή το διάστημα από τη γονιμοποίηση του θηλυκού μέχρι την γέννηση των χοιριδίων είναι περίπου 114

ημέρες (3 μήνες, 3 εβδομάδες και 3 ημέρες). Τα χοιρίδια παραμένουν με τη μητέρα τους για 3 έως 4 εβδομάδες. Στη συνέχεια και αφού πλέον το μεγαλύτερο μέρος των διατροφικών τους αναγκών καλύπτεται από την κατανάλωση της στερεάς τροφής και όχι τόσο από το γάλα που θηλάζουν, απομακρύνονται από τη μητέρα τους ή αλλιώς «απογαλακίζονται». Από εκεί και πέρα, διατρέφονται με κατάλληλα σιτηρέσια, τα οποία καλύπτουν τις απαιτήσεις τους σε ενέργεια και πρωτεΐνη, έχοντας ως τελικό σκοπό την παραγωγή υψηλής ποιότητας κρέατος. Η περίοδος της πάχυνσης διαρκεί περίπου 20 με 24 εβδομάδες. Από την άλλη, η χοιρομητέρα μετά τον απογαλακτισμό των χοιριδίων της, επαναγονιμοποιείται συνήθως εντός μίας εβδομάδας, αφού πρώτα έχει εκδηλώσει οίστρο. Συνήθως, η χοιρομητέρα διατηρείται στην εκμετάλλευση για 3 έτη, οπότε αν θεωρήσουμε ότι γονιμοποιείται για πρώτη φορά στην ηλικία των 4-5 μηνών, υπολογίζεται ότι γεννάει κατά μέσο όρο 5 με 6 φορές στην παραγωγική της ζωή.

Τα συστήματα εκτροφής στη χοιροτροφία μπορούν να διαχωρισθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα εντατικά και τα εκτατικά.

Στα εντατικά συστήματα, παρατηρείται εντατικοποίηση της χρήσης των παραγωγικών συντελεστών (εδάφους, ζωικού κεφαλαίου, εργασίας κλπ), χρησιμοποιώντας υβρίδια υψηλών αποδόσεων, τα οποία και στεγάζονται σε χώρους με υψηλή πυκνότητα εκτροφής. Η προσπάθειά σε αυτά τα συστήματα επικεντρώνεται στο να εκπυχθεί πλήρως το παραγωγικό δυναμικό των ζώων με την αξιοποίηση της τελευταίας τεχνολογίας και των κατάλληλων σιτηρεσίων. Στόχος είναι η παραγωγή της μέγιστης ποσότητας κρέατος στο μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα και με το χαμηλότερο κόστος.

Από την άλλη, στα εκτατικά συστήματα τα ζώα διατηρούνται σε ομάδες εντός περιφραγμένων χώρων, όπου βόσκουν ελεύθερα και συμπληρωματικές ζωοτροφές χορηγούνται ανάλογα με τις ανάγκες και το παραγωγικό στάδιο, στο οποίο βρίσκονται. Πλεονεκτήματα των εκτατικών συστημάτων αποτελούν οι χαμηλές επενδύσεις σε εγκαταστάσεις και εξοπλισμό, οι μικρές λειτουργικές δαπάνες, η παραγωγή κρέατος και προϊόντων με ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, η βελτίωση του επιπέδου ευζωίας, τα ελάχιστα προβλήματα υγείας των ζώων και η μικρή περιβαλλοντική επιβάρυνση.

Τα ζώα που χρησιμοποιούνται σήμερα στις χοιροτροφικές εκμεταλλεύσεις αποτελούν προϊόντα εκτενών διασταυρώσεων (υβρίδια) και όχι απόγονους καθαρών φυλών . Μέσω της επιλογής και των διασταυρώσεων καταβάλλεται συνεχής προσπάθεια να βελτιωθούν οι αναπαραγωγικές ιδιότητες (πολυδυμία, συχνότητα τοκετών και μητρικές ιδιότητες), η παχυντική ικανότητα (ρυθμός ανάπτυξης και ικανότητα εκμετάλλευσης της τροφής) και οι ιδιότητες του σφάγιου και του κρέατος (απόδοση σε σφάγιο, χρώμα, τρυφερότητα και υφή του κρέατος).

1.1 Συστηματική κατάταξη χοίρου

Η επιστημονική ταξινόμηση των χοίρων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) :

Πίνακας 1. Επιστημονική ταξινόμηση των χοίρων

Βασίλειο	Animalia
Φύλο (ή Συνομοταξία)	Chordata
Κλάση (ή Ομοταξία)	Mammalia
Τάξη	Artiodactyla
Οικογένεια	Suidae
Γένος	Sus
Είδος	<i>S. scrofa</i>
Υποείδος	<i>S. s. Domesticus</i>

Οι κύριες φυλές χοίρων που εκτρέφονται στην Ελλάδα είναι οι εξής:

1. **Landras** (αναπαραγωγική)
2. **Largewhite** (ανθεκτική σε ασθένειες, γρήγορη ανάπτυξη)
3. **Durok** (ανθεκτική σε ασθένειες, γρήγορη ανάπτυξη)
4. **Pietrain** (περισσότερο κρέας, χαμηλότερο λίπος)

Παρακάτω παρουσιάζονται κάποια γενικά χαρακτηριστικά των φυλών αυτών:

Landrace

Μορφολογικά χαρακτηριστικά :

Λευκός χρωματισμός.

Μακρύ κεφάλι και ευρύ
ρύγχος (διάπλαση τσολπίλης).

Μεγάλα αυτιά των οποίων τα
άκρα καλύπτουν τους
οφθαλμούς.

Έκφυση ουράς στην ευθεία της ραχιαίας γραμμής.

Μακριά ράχη.



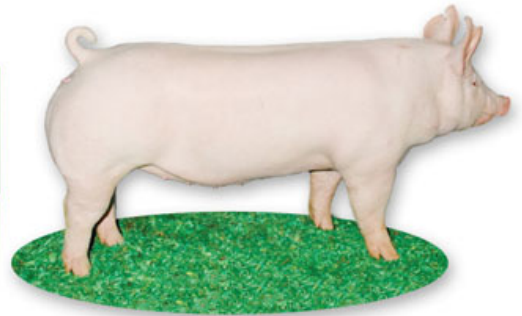
Largewhite:

Μεγαλόσωμα ζώα.

Ο κύριος βελτιωτής των φυλών
χαμηλής παραγωγικότητας-βάση για
την δημιουργία νέων φυλών.

Συνέβαλλε στην δημιουργία της
φυλής Landrace και μαζί αποτελούν
την βάση για όλων των σχημάτων
διασταύρωσης που εφαρμόζονται
σήμερα για την παραγωγή χοίρων πάχυνσης.

Μεγάλη παραλλακτικότητα χαρακτηριστικών σφάγιου.



Duroc:

Η πολυπληθέστερη φυλή τις Η.Π.Α.

Ομοιόμορφος καστανός
χρωματισμός.

Καλή ανάπτυξη μυϊκών μαζών.

Σχετικά ψηλά άκρα με μεγάλη
ευστάθεια.

Χοίροι υψηλής



προσαρμοστικότητας και ανθεκτικότητας με ήρεμο χαρακτήρα.
Υψηλή αυξητική ικανότητα και κρεοπαραγωγική ικανότητα.
Οι κάπροι χρησιμοποιούνται ως τελικοί κάπροι σε διάφορα σχήματα διασταυρώσεων.

Pietrain:

Υπερβολική ανάπτυξη μυϊκών μαζών ωμοβραχιόνιας χώρας, ράχης και κυρίως του οπίσθιου τμήματος του σώματος.

Μικρό κεφάλι, όρθια αυτιά με το άκρο τους να κάμπτεται προς τα εμπρός.

Κατά ζώνες λευκός και λευκοφαιός με διάσπαρτες μαύρες κηλίδες.

Τελικοί κάπροι, βελτιωτές της ποιότητας των σφαγίων.



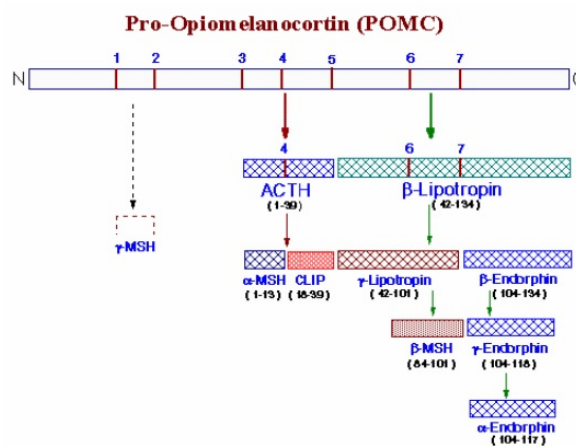
Όπως είναι γνωστό η εκτροφή των χοίρων γίνεται κατά κύριο λόγο για την συγκομιδή του κρέατος τους, ειδικά μετά την δεκαετία του 1980 όπου χρησιμοποιήθηκαν γενετικώς τροποποιημένα βακτήρια για την παραγωγή ινσουλίνης που μέχρι πρότινος παραγόταν από χοίρους. Το χοιρινό κρέας για να μπορέσει να καταναλωθεί πρέπει να πληροί κάποια χαρακτηριστικά τα οποία να αναβαθμίζουν την γεύση του και την υφή του. Όπως επίσης λόγω της ευρείας ζήτησης του, θα πρέπει η παραγωγή του να είναι όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερη. Μέσω σύγχρονων μοριακών τεχνικών έχουμε ανακαλύψει διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν την όρεξη του χοίρου η οποία συνδέεται με την πρόσληψη τροφής καθώς και την ποσότητα εναπόθεσης λίπους η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην αναλογία κρέατος λίπους άρα και στα γευστικά χαρακτηριστικά του. Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι και ο υποδοχέας μελανοκορτίνης MC4R.

1.2 Μελανοκορτίνες και οι υποδοχείς τους

Οι μελανοκορτίνες ανήκουν σε μια οικογένεια βιοενεργών πεπτιδίων που αποτελούν παράγωγα της προοιομελανοκορτίνης (POMC) και εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στην δομή τους. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι τέσσερις από τις επτά παράγωγες ενώσεις της προοιομελανοκορτίνης και συγκεκριμένα, η

αδρενοκορτικοτρόπος (ACTH) ή φλοιοτρόπος ορμόνη και οι α-, β-, γ-μελανοτροπίνες (α-, β-, γ-MSH). Η ονομασία τους προήλθε από την ανακάλυψη της α-MSH και της δράσης της στα μελανοσώματα. Στα παράγωγα της προοπιομελανοκορτίνης ανήκουν επίσης το πεπτιδίο CLIP (Corticotropin-like intermediate lobe peptide), η β-λιποτροπίνη (β-LPH) και η β-ενδορφίνη. Τα πεπτιδία αυτά συντίθενται σε διάφορα σημεία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) και σε περιφερικούς ιστούς όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας, ο πλακούντας και ο πάγκρεας ενώ παίρνουν μέρος στην ρύθμιση πολλών φυσιολογικών λειτουργιών.

Η διαδικασία μετατροπής της προοπιομελανοκορτίνης στα παράγωγα της γίνεται με εξειδικευμένο τρόπο στους διάφορους ιστούς και είναι αποτέλεσμα της δράσης των πρωτεολυτικών ενζύμων προκονβερτάση-1 (Proconvertase-1) και προκονβερτάση -2. Η πρώτη καταλύει την μετατροπή της προοπιομελανοκορτίνης σε ACTH, β-LPH, από τα οποία προκύπτουν στην συνέχεια τα πεπτιδία α-MSH και CLIP, β-MSH καθώς . Η β- ενδορφίνη αντίστοιχα μέσω της προκονβερτάσης-2. Τέλος η γ-MSH προκύπτει από το αμινοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου της προοπιομελανοκορτίνης.



Εικόνα 1. Γονίδιο προσδετών των MCxR

1.2.1 Δράσεις των μελανοκορτινών

Οι μελανοκορτίνες συμμετέχουν στην ρύθμιση πολλών φυσιολογικών λειτουργιών. Η πρώτη δράση που ανακαλύφθηκε είναι η ικανότητα τους να επάγουν την σύνθεση ευμελανίνης στα μελανοκύτταρα η οποία καθορίζει το χρωματισμό του τριχώματος . Σημαντικό ρόλο παίζουν στην ρύθμιση πρόσληψης τροφής, στην ενεργειακή ομοιόσταση, στην παραγωγή λίπους στους υποδόριους αδένες και στην επαγωγή λιπόλυσης. Μπορούν να δράσουν ως ενδογενείς αντιπυρετικοί παράγοντες και έχουν συστηματική και τοπική αντιφλεγμονώδη δράση. Λαμβάνουν μέρος στον έλεγχο του καρδιαγγειακού

συστήματος, τη ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος, την αντοχή στο πόνο και την νατριούρηση. Τέλος, επηρεάζουν την έκκριση άλλων ουσιών όπως η προλακτίνη και η ωχρινοτρόπος ορμόνη. Οι ενδείξεις για την συμμετοχή των μελανοκορτινών στις φυσιολογικές λειτουργίες, προήλθαν από την παρατήρηση μεταλλάξεων που αναστέλλουν την έκφραση του γονιδίου POMC, είχαν σαν συνέπεια ανεπάρκεια επινεφριδίων, παχυσαρκία και χρωματισμό τριχώματος.

1.2.2 Υποδοχείς μελανοκορτινών

Οι μελανοκορτίνες δεν θα μπορούσαν να δράσουν χωρίς την πρόσδεσή τους στους αντίστοιχους υποδοχείς. Ο χαρακτηρισμός των υποδοχέων των μελανοκορτινών επέφερε μεγάλη πρόοδο για την κατανόηση των βιολογικών δράσεων των μελανοκορτινών. Έχουν ανακαλυφθεί πέντε υποδοχείς, οι οποίοι είναι οι: MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, MC5R). Η διαφορά τους έγκειται στην κατανομή τους στα κύτταρα και στην ικανότητα τους να αποκρίνονται στους ενδογενείς αγωνιστές (ACTH, α-, β-, γ-MSH) και ανταγωνιστές τους (agouti-signaling protein και agouti related protein).

Η παρουσία του υποδοχέα MC1R αναγνωρίστηκε αρχικά σε κύτταρα μελανώματος, εκφράζεται όμως και σε φυσιολογικά μελανοκύτταρα και κερατινοκύτταρα, όπου δρα ρυθμίζοντας το χρωματισμό το δέρματος και του τριχώματος αντίστοιχα. Επίσης εκφράζεται στα μακροφάγα όπου επιδρά στην λειμογόνο απόκριση, καθώς και σε άλλους περιφερειακούς ιστούς. Ο MC2R εκφράζεται στην υπόφυση και ευθύνεται για την στεροειδογένεση, ενώ υπάρχει και στα κύτταρα του λιπώδους ιστού όπου παίζει ρόλο στην λιπογένεση. Οι υποδοχείς MC3R & MC4R εκφράζονται σε διάφορα τμήματα του εγκεφάλου και σχετίζονται με την ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης. Επιπλέον ο υποδοχέας MC3R υπάρχει και σε περιφερειακούς ιστούς όπως πλακούντας, στομάχι, δωδεκαδάκτυλο, πάγκρεας, καρδιά και σε μικρότερες ποσότητες στους μύες και στα νεφρά. Ο MC4R μπορεί να διαχωριστεί από τον MC3R από την ικανότητα του να ενεργοποιείται 100 φορές ευκολότερα από την α-MSH σε σχέση με την γ-MSH, ενώ η ενεργοποίηση του MC3R από τους δυο υποδοχείς δεν διαφέρει. Ο υποδοχέας MC5R εκφράζεται σε πολλά όργανα

αλλά υπάρχει σε περιορισμένο βαθμό και στον εγκέφαλο όπου ρόλος του δεν είναι ακόμα γνωστός.

Για το ίδιο είδος θηλαστικού η ομολογία για τους αντίστοιχους υποδοχείς κυμαίνεται από 75-94%, με πιο συντηρημένη την περιοχή του υποδοχέα MC4R και λιγότερα την συντηρημένη περιοχή του MC1R.

Πίνακας 2. Ειδη υποδοχέων και ιδιότητες τους

Υποδοχέας	Σημεία έκφρασης	Αγωνιστές	Ανταγωνιστές	Λειτουργία
MC1R	Μελανοκύτταρα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, ενδοθήλιο, κύτταρα Sertoli	α -MSH = ACTH> β -MSH> γ -MSH	ASP	Χρωματισμός δέρματος, αντι-λοιμογόνος δράση
MC2R	Υπόφυση, λιποκύτταρα	ACTH		Στεροειδογένεση, λιπογένεση
MC3R	Υποθάλαμος, υπόκαμπος, παρεγκεφαλίδα, φλοιός, πλακούντας, στομάχι, δωδεκαδάκτυλο, πάγκρεας	α -MSH = β -MSH = γ -MSH = ACTH	AGRP	Ρύθμιση σωματικού βάρους, αναπαραγωγή, καρδιαγγειακή λειτουργία
MC4R	Φλοιός, θάλαμος, υποθάλαμος, εγκεφαλικό στέλεχος	α -MSH = ACTH> β -MSH> γ -MSH	AGRP, ASP	Ρύθμιση σωματικού βάρους
MC5R	Εξωκρινείς αδένες, υποδόριοι αδένες, σκελετικοί μύες, λιποκύτταρα	α -MSH > ACTH= β -MSH>> γ -MSH	AGRP	Έκκριση υποδόριων αδένων

ASP: Agouti-signaling protein, AGRP: Agouti-related protein

Οι υποδοχείς των μελανοκορτινών ανήκουν στην κατηγορία των GPCR πρωτεϊνών (G-protein coupled receptor, υποδοχείς συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες). Έτσι με την πρόσδεση του υποδοχέα ακολουθείται το μονοπάτι ενεργοποίησης των GPCR. (MacNeil et al., 2002) Πιο αναλυτικά, η δέσμευση του πρώτου μηνύματος επιφέρει μεταβολές στην διαμόρφωση του μεμβρανικού υποδοχέα οι οποίες προκαλούν την σύνδεση ενός εκ των τριών υπομονάδων της πρωτεΐνης G σε μία παρακείμενη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη μέσω της οποίας τελικά πραγματοποιείται η κυτταρική απόκριση. Οι υποδοχείς των μελανοκορτινών οδηγούν στην ενεργοποίηση της εκτελεστικής πρωτεΐνης που ονομάζεται αδενυλική κυκλάση, η οποία στην συνέχεια καταλύει τη μετατροπή μερικών μορίων κυτοσολικού ATP σε 3',5'-κυκλική μονοφωσφορική

αδενοσίνη (κυκλικό AMP, c AMP). Στην συνέχεια το cAMP δρα σαν δεύτερο μήνυμα εκκινώντας την ακολουθία γεγονότων που προκαλούν την τελική απόκριση του κυττάρου ως προς το πρώτο μήνυμα. Συγκεκριμένα το cAMP ενεργοποιεί το ευαίσθητο σε αυτή ένζυμο, αδενυλοεξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (πρωτεϊνική κινάση A), η οποία φωσφορυλιώνει ένζυμα μεταβάλλοντας την δραστικότητα τους.

1.2.3 Υποδοχείς μελανοκορτινών και ρύθμιση σωματικού βάρους σε ποντίκια.

Πολλές έρευνες καταδεικνύουν τον ρόλο του συστήματος των μελανοκορτινών στη ρύθμιση του σωματικού βάρους. Οι αρχικές ενδείξεις για το ρόλο των μελανοκορτινών προήλθαν από μελέτες σε ποντίκια . Παρατηρήθηκε ότι ποντίκια τα οποία ήταν ομόζυγα για την έλλειψη του γονιδίου του υποδοχέα MC4R είχαν σημαντικά αυξημένο βάρος, ενώ αντίθετα τα ετερόζυγα δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση στο βάρος τους. Οι επιστήμονες στην συνέχεια προέβησαν στην χρήση ανταγωνιστών για να ενισχύσουν τα πρώιμα αποτελέσματα τους. Με την χρήση ανταγωνιστών των υποδοχέων MC4R έγινε δυνατή η διαπίστωση ότι η δέσμευση των υποδοχέων από μόρια ανταγωνιστές οδηγεί σε υπερφαγία και αύξηση του σωματικού βάρους. Το φαινόμενο αυτό είναι δυνατόν να αναστραφεί εφ' όσον ο ανταγωνιστής απομακρυνθεί. Επιπλέον, σε μελέτες όπου χορηγούταν ενώσεις αγωνιστές, παρατηρήθηκε μείωση της πρόσληψης τροφής και ελάττωση του σωματικού βάρους.

Οι ενδογενείς ανταγωνιστές του υποδοχέα MC4R είναι τα πεπτίδια agouti-signaling protein (ASP) και agouti-related protein (AGRP). Η πρωτεΐνη ASP είναι ανταγωνιστής και του υποδοχέα MC1R. Εκφράζεται κύρια στην επιδερμίδα των θηλαστικών και δρα ρυθμίζοντας το χρώμα του δέρματος. Σε ποντίκια που προκαλείται υπερέκκριση της πρωτεΐνης αυτής , τα επονομαζόμενα ποντίκια agouti, εμφανίζεται ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από υπερφαγία, υπερινσουλιαιμία και παχυσαρκία. Το μόριο ASP έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στον MC4R εμποδίζοντας την πρόσδεση της α-MSH, γεγονός που οδηγεί σε υπερφαγία και ευθύνεται για το φαινότυπο παχυσαρκίας που παρατηρείται στα ποντίκια agouti.

Η επιβεβαίωση της σημασίας του υποδοχέα MC4R ηρθε και από τη δημιουργία knock out Ποντικών στα οποία είχε αποσιωπηθεί το αντίστοιχο γονίδιο. Τα ομόζυγα Knock out ποντίκια ήταν υπερβολικά παχύσαρκα και είχαν μειωμένη κατανάλωση οξυγόνου, γεγονός που φανερώνει ελαττωματικό ενεργειακό μεταβολισμό. Επίσης εκδήλωσαν υπερφαγία, υπερινσουλιναίμια και υπερλεππιναιμία ενώ το μήκος σώματος τους αυξήθηκε. Τα ετερόζυγα knock out ποντίκια από την άλλη ήταν μετρίως παχύσαρκα, γεγονός από το οποίο μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο υποδοχέας MC4 δεν δρα σαν διακόπτης αλλά μάλλον σαν ρυθμιστής στο μηχανισμό πρόσληψης τροφής και το μεταβολισμό της.

1.3 Υποδοχέας MC4R

1.3.1 Δομή

Ο υποδοχέας MC4R είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με μήκος 332 αμινοξέα που αποτελείται από 7 διαμεμβρανικές λειτουργικές περιοχές σε μορφή α-έλικας, τρεις εξωκυτταρικές θηλιές και 3 ενδοκυτταρικές θηλιές. Το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ενώ το καρβοξυτελικό είναι συνδεδεμένο με το σύμπλεγμα της πρωτεΐνης G στο εσωτερικό του κυττάρου. Όπως όλες οι πρωτεΐνες της οικογένεια G έτσι και οι υποδοχείς μελανοκορτινών έχουν θέσεις γλυκοζυλίωσης κοντά στο αμινοτελικό άκρο και θέσεις φωσφορυλίωσης στην πρώτη και στην τρίτη διαμεμβρανική περιοχή, καθώς και στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Χαρακτηριστικά της οικογένειας των υποδοχέων των μελανοκορτινών είναι η παρουσία καταλοίπων κυστεΐνης στην πρώτη και δεύτερη εξωκυτταρική θηλιά και προλίνης στην τέταρτη και πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή. Όλοι οι υποδοχείς μελανοκορτινών περιέχουν την αλληλουχία DRY (ασπαρτικό οξύ- αργινίνη-τυροσίνη) στο σημείο έναρξης της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής και φέρουν κατάλοιπα κυστεΐνης στο καρβοξυτελικό άκρο τα οποία πιθανόν λειτουργούν σαν θέσεις ακυλίωσης.

Αν και το αμινοτελικό άκρο και οι δύο πρώτες εξωκυτταρικές θηλιές θεωρούνται βασικά για τη δέσμευση του σήματος (Ho & MacKenzie, 1999) εντούτοις, το αμινοτελικό άκρο του ανθρώπινου υποδοχέα MC4R είναι περιορισμένου μήκους, γεγονός που υποδεικνύει ότι μάλλον δεν παίζει

μεγάλο ρόλο στην ικανότητα δέσμευσης (Yang & Harmon, 2003). Από τις έως σήμερα έρευνες έχει δειχθεί ότι τα κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος στις θέσεις 122 και 126 στην τρίτη διαμεμβρανική περιοχή και τα κατάλοιπα φαινυλαλανίνης (θέση 257) και ιστιδίνης (θέση 264) στην έκτη διαμεμβρανική περιοχή επηρεάζουν την ικανότητα δέσμευσης στον υποδοχέα.

Επιπλέον, η καρβοξυτελική περιοχή καθορίζει την ικανότητα του υποδοχέα να ενεργοποιεί την κυτταρική απόκριση. Μεταλλάξεις που επιδρούν στην ικανότητα δέσμευσης του υποδοχέα στην πρωτεΐνη G και ενεργοποίησης του συστήματος της αδενυλικής κυκλάσης αναμένεται να έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένη πρόσληψη τροφής και μειωμένες ενεργειακές δαπάνες.

Η σύνθεση του υποδοχέα γίνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου εκεί γίνεται και η τελική ωρίμανση (γλυκοζυλιωμένη μορφή). Εάν για κάποιο λόγο το μόριο δεν έχει λάβει την φυσιολογική διαμόρφωση εγκλωβίζεται στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου.

1.3.2 Λειτουργία

Ο υποδοχέας MC4R δεσμεύει με διαφορετική συγγένεια διάφορα μέλη της ομάδας των μελανοκορτινών. Κατά κύριο συγγένεια παρουσιάζεται για της α-MSH και ACTH και ακολουθούν οι β-MSH και γ-MSH μελανοκορτίνες. Κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών αυτών είναι η τετραπεπτιδική αλληλουχία που αποτελείται από ισταμίνη-φαινυλαλαμίνη-αργινίνη-τρυποφάνη η οποία σχετίζεται με την εξειδίκευση των υποδοχέων.

Όπως φαίνεται από πειράματα σε ποντίκια, ο μηχανισμός δράσης του υποδοχέα σχετίζεται με την δημιουργία σήματος κορεσμού, και όχι με τον περιορισμό αισθήματος της πείνας. Πειραματόζωα στα οποία χωρηγήθηκε ο ανταγωνιστής HS014 αλλά και ο α-MSH μετά από περίοδο 18 ωρών ασιτίας, έδειξε ότι ο χρόνος διατροφής στην περίπτωση της χορήγησης HS014 ήταν κατά 60% μελαύτερος απο ότι στον μάρτυρα, ενώ στην περίπτωση του α-MSH η διατροφή μειώθηκε κατα περίπου 50%(Vergoni & Bertolini, 2000).

Σε άλλες μελέτες έχει δειχθεί ότι ποντίκια με έλλειψη του υποδοχέα MC4R παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα χρησιμοποίησης της ενέργειας που προέρχεται απο το διαιτητικό λίπος. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου συμβαίνει το παραπάνω, δεν έχει διαλευκανθεί, θεωρείται όμως ότι η ενεργοποίηση του

MC4R μπορεί να προωθεί την κινητοποίηση των αποθηκών λίπους στο σώμα, αποστέλλοντας συγχρόνως σήμα για μείωση πρόληψης λιπών.

Τέλος υπάρχουν ενδείξεις ότι το σύστημα μελανοκορτινών συνδέεται και με την εμφάνιση υποσιτισμού που οφείλεται σε νόσους όπως ο καρκίνος. Σε MC4R knock out ποντίκια εμφανίστηκε καχεξία η οποία οφειλόταν στον καρκίνο σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα φυσιολογικά (Yang & Harmon, 2003). Χορήγηση του ανταγωνιστή AGRP των υποδοχέων MC4R & MC3R φάνηκε να προλαμβάνει την υποφαγία που οφείλεται σε ανάπτυξη καρκινικών όγκων.

1.3.3 Μετάλλαξη Asp298Asn στον MC4R του *sus scrofa*

Το 2000, ο Ροθσάιλντ και οι συνεργάτες του, ανακάλυψαν μια μετάλλαξη στο γονίδιο του υποδοχέα MC4R του χοίρου. Η μετάλλαξη βρίσκεται στο αμινοξύ Asp 298 σε υψηλά συντηρημένη περιοχή στην έβδομη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα. Η πλειοψηφία της οικογένειας A (rhodopsin-like) των GPCRs στην συγκεκριμένη θέση έχουν το αμινοξύ Asn, ενώ οι MCx υποδοχείς είναι από τις περιπτώσεις που στην συγκεκριμένη θέση της TM7 περιοχής έχουν το αμινοξύ Asp. Στην οικογένεια των MC υποδοχέων παρατηρήθηκε ότι η συγκεκριμένη θέση είναι πλήρως συντηρημένη, γεγονός το οποίο καταδεικνύει το πιθανό σημαντικό ρόλο της περιοχής. Ενώ έρευνες οι οποίες έχουν διεξαχθεί για την συγκεκριμένη μετάλλαξη σε ποντικούς και πρόβατα έχουν καταλήξει στο γεγονός ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της μετάλλαξης, του σωματικού βάρους και της όρεξης, στους χοίρους τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντιφατικά.

1.4 Μοριακοί δείκτες και γενετική βελτίωση στην κτηνοτροφία

Μέχρι πρόσφατα η επιλογή ενός επιθυμιού χαρακτηριστικού και η μεταφορά του στις επόμενες γενεές, γινόταν με φαινοτυπική επιλογή ή με προσεγγίσεις μέσω των φαινότυπων των ζώων χωρίς να υπολογίζεται το γενετικό υπόβαθρο των χαρακτηριστικών. Η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών έχει διευρύνει τους ορίζοντες και την αποτελεσματικότητας της κατευθυνόμενης αναπαραγωγής και της γενετικής βελτίωσης των κτηνοτροφικών ζώων. Έτσι, κατέστη δυνατός ο εντοπισμός διαφοροποιήσεων και πολυμορφισμών οι οποίοι υπάρχουν σε συγκεκριμένους τόπους στο γονιδίωμα των ατόμων ενός

συγκεκριμένου πληθυσμού . Αυτοί οι πολυμορφισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία γενετικών χαρτών για την σύγκριση και την συσχέτιση των μορικών δεικτών με τα χαρακτηριστικά των ατόμων. Τέλος, οι γενετικοί δείκτες προσφέρουν και μεθολογικά πλεονεκτήματα τα οποία βοήθησαν στην εξάπλωσή τους ως γενετικά εργαλεία για την γενετική βελτίωση. Πρώτον, δείγματα DNA μπορούν να απομονωθούν εύκολα απο αίμα και διάφορους ιστούς ενώ μικρές ποσότητες είναι αναγκαίες. Δεύτερον, τα δείγματα αποθηκεύονται εύκολα και για μεγάλες περιόδους με αποτέλεσμα την εύκολη μεταφορά τους μεταξύ εργαστηρίων. Τρίτων, η ανάλυση DNA μπορεί να γίνει και σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο , ασχέτως φύλλου . Τέταρτον, οι μέθοδοι των μοριακών δεικτών που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έχουν υψηλή αυτοματοποίηση και επαναληψιμότητα, διασφαλίζοντας έτσι εγκυρότητά τους. (Gholizadeh, Mianji, & Zadeh, 2008).

2. Μοριακά Εργαλεία

Οι μοριακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας και φυλογενετικών αναλύσεων διαφορετικών φυτικών ειδών ή πληθυσμών συγκεκριμένων ειδών.

Για να επιλέξουμε, μέσα από ένα πληθυσμό, συγκεκριμένα άτομα που έχουν ορισμένους επιθυμητούς χαρακτήρες , σε μοριακό επίπεδο , χρησιμοποιούνται οι μοριακοί δείκτες. Υπάρχουν δύο κατηγορίες μοριακών δεικτών, οι DNA-δείκτες και οι πρωτεϊνικοί δείκτες. Οι DNA-δείκτες αφορούν τόσο το πυρηνικό όσο και το εξωπυρηνικό DNA, μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό.

Για την επιλογή των μοριακών δεικτών τα κριτήρια είναι πολλά και σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά τους , όπως , ο πολυμορφισμός , η εξειδίκευση για ορισμένο γενετικό τόπο, αλλά και με τη διαδικασία παραγωγής

τους. Σχετικά με τη διαδικασία παραγωγής τους, θα πρέπει να δίνουν αποτελέσματα τα οποία είναι επαναλήψιμα, να έχει μικρό κόστος εφαρμογής, καθώς και να απαιτούν μικρή ποσότητα DNA.

Στους πρωτεϊνικούς δείκτες, που εμφανίσθηκαν πριν από τους DNA δείκτες, ανήκουν τα ισοένζυμα και τα αλλοένζυμα, μεταξύ των οποίων υπάρχουν μικρές διαφορές. Τα ισοένζυμα είναι διαφορετικές μορφές ενός ενζύμου που καταλύουν την ίδια αντίδραση, αλλά διαφέρουν ελάχιστα στην αμινοξική τους σύσταση ή στην δομή τους, τόσο ώστε να μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους με ηλεκτροφόρηση ή χρωματογραφία. Τα αλλοένζυμα αποτελούν διαφορετικές μορφές του ίδιου ενζύμου που κωδικοποιούνται από διαφορετικά αλληλόμορφα που βρίσκονται στον ίδιο γενετικό τόπο.

Στους DNA-δείκτες ανήκουν τα RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms). Η διαδικασία των RFLP περιλαμβάνει την απομόνωση και τη πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, το διαχωρισμό των τμημάτων του DNA με ηλεκτροφόρηση αгарόζης, τα οποία συνήθως έχουν μέγεθος 2-10 kb, την υβριδοποίησή τους κατά Southern με ειδικό σημαντικό για ορισμένο γενετικό τόπο και τέλος την ανίχνευση τυχόν πολυμορφισμού με αυτοραδιογραφία ή μη ραδιενεργή σήμανση. Οι δείκτες RFLP, υπάρχουν άφθονοι στα περισσότερα γονιδιώματα, όπου είναι τυχαία διασκορπισμένοι, οι ζώνες που παράγουν μπορεί να αποδοθούν σε γενετικούς τόπους και αλληλόμορφα, υπάρχει συγκυριαρχία αλληλομόρφων, ενώ τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι επαναλήψιμα. Γενικά πρόκειται για χρονοβόρα και τεχνικά δύσκολη διαδικασία, με υψηλό κόστος εφαρμογής, και πρόσθετο κόστος σε περίπτωση που δεν υπάρχουν κατάλληλοι σημαντές. Απαιτεί μεγάλη συγκέντρωση DNA (5-10μg) μεγάλου μοριακού βάρους.

2.1 Απομόνωση DNA

2.1.1 Πηγές απομόνωσης

Το DNA είναι απαραίτητη πρώτη ύλη για τα περισσότερα πειράματα μοριακής βιολογίας. Η απομόνωσή του σε «καθαρή» μορφή αποτελεί προϋπόθεση για την επιτυχία όλων των περαιτέρω εφαρμογών. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής απομόνωσης DNA καθορίζεται από πολλές παραμέτρους,

όπως το αρχικό υλικό (π.χ. κύτταρα, ιστός, αίμα), το είδος (π.χ. χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό, ιικό κ.λπ.) και την ποιότητα του DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε.

Στους ανθρώπους, η πιο συνηθισμένη πηγή DNA είναι τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος, από τα οποία απομονώνεται εύκολα γενετικό υλικό υψηλής ποιότητας και συγκέντρωσης. Εναλλακτικά, DNA μπορεί να απομονωθεί εύκολα από τα κύτταρα της στοματικής κοιλότητας (επίχρισμα παρειάς), με πλεονέκτημα την αποφυγή της παρεμβατικής διαδικασίας της αιμοληψίας.

Με την πρόοδο της τεχνολογίας και των μεθόδων απομόνωσης, DNA μπορεί πρακτικά να απομονωθεί από οποιοδήποτε υλικό περιέχει εμπύρηννα κύτταρα, όπως κύτταρα από βιοψία τροφοβλάστης, μουσειακά εκθέματα, ρίζες τριχών, δόντια, οστά, βιοψίες ιστού σε κύβους παραφίνης κ.ά.

2.1.2 Στάδια απομόνωσης DNA

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για την απομόνωση DNA, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους ανάλογα με το αρχικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί και το αν η διαδικασία θα πραγματοποιηθεί με απλά χημικά αντιδραστήρια, με εμπορικά διαθέσιμα κιτ ή με χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων απομόνωσης γενετικού υλικού. Όλες όμως οι μέθοδοι απομόνωσης πυρηνικού DNA ακολουθούν τα παρακάτω κοινά στάδια:

1. *Λύση των κυτταρικών μεμβρανών και της μεμβράνης του πυρήνα για να ελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα.*

Η λύση των κυτταρικών μεμβρανών επιτυγχάνεται με χρήση διαλυμάτων που περιέχουν απορρυπαντικά, το πιο κοινό εκ των οποίων είναι το δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)). Το SDS απομακρύνει επίσης τις ιστόνες από τα μόρια του DNA. Το SDS είναι αμφιφατικό μόριο που αποτελείται από μια υδρόφοβη ουρά και μια υδρόφιλη κεφαλή. Δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας, διαταράσσοντας τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών.

Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων και πρωτεΐνες. Τα φωσφολιπίδια έχουν τις πολικές κεφαλές προς την εξωτερική υδατική φάση και τις υδρόφοβες λιπαρές αλυσίδες προς το εσωτερικό της διπλοστιβάδας. Το SDS διασπά τη συνοχή των φωσφο- λιπιδίων και δημιουργεί σύμπλοκα με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες καθιστώντας τις υδατοδιαλυτές. Το SDS δεσμεύει επίσης και τις μη μεμβρανικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Οι δεσμευμένες με SDS πρωτεΐνες χάνουν την τριτοταγή δομή τους και επομένως τη λειτουργικότητά τους

2. *Αποικοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών με επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων*

Το ένζυμο που χρησιμοποιείται συχνότερα είναι η πρωτεϊνάση K. Η πρωτεϊνάση K δρα έναντι ευρέος φάσματος ενδογενών πρωτεϊνών του κυττάρου και πήρε το ονομά της από την ιδιότητά της να διασπά την κερατίνη. Είναι μια πρωτεάση σερίνης, που αναγνωρίζει και διασπά τον πεπτιδικό δεσμό δίπλα στην καρβοξυλομάδα των αλειφατικών και αρωματικών αμινοξέων. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της ποικίλει από 50° C έως 70° C. Μετά την προσθήκη της στο διάλυμα, η πρωτεϊνάση K απενεργοποιεί αμέσως τις ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες) του κυττάρου, που μπορεί να κατακερματίσουν το DNA κατά τη διαδικασία απομόνωσης. Ένα πλεονέκτημα της πρωτεϊνάσης K είναι ότι παραμένει δραστική ακόμη και παρουσία SDS και χηλικών παραγόντων όπως το Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

3. Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες

Ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλυμάτων αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης (100%) αιθανόλης, με οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης - χλωροφορμίου, με πρόσδεση σε μεμβράνη ιοντοανταλλαγής ή σε μαγνητικά σφαιρίδια. Οι υψηλές συγκεντρώσεις

αλάτων διασπούν τους δεσμούς του DNA με τα μόρια του νερού και το κάνουν λιγότερο υδρόφιλο – άρα και υδατοδιαλυτό. Η προσθήκη της αιθανόλης παρουσία αλάτων προκαλεί δομικές αλλαγές στο μόριο του DNA, με αποτέλεσμα να κατακρημνίζεται εκτός διαλύματος και όταν η ποσότητά του είναι μεγάλη να γίνεται ορατό σαν μια λευκή κλωστή. Μετά από φυγοκέντρηση το DNA βρίσκεται ως ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου και το υπερκείμενο απομακρύνεται.

4. Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα παγωμένης αιθανόλης 70%
5. Ανασύσταση του DNA σε διάλυμα TE

Το διάλυμα Tris-EDTA (TE) είναι ένα ελαφρά αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8-9), που περιέχει EDTA. Το EDTA προστατεύει το DNA, δεσμεύοντας δισθενή ιόντα, όπως Mg^{2+} ή Ca^{2+} , που είναι απαραίτητα για τη δράση ενζύμων όπως οι νουκλεάσες (που διασπούν το DNA) και οι πρωτεάσες.

2.2 Σχεδιασμός εκκινητών

Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Επειδή ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR, για αυτό πρέπει να τηρούνται οι εξής αρχές:

- Μέγεθος των εκκινητών

Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουλεοτίδια 18-30 βάσεων . Εκκινητές μικρότερου μεγέθους οδηγούν σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ μεγαλύτεροι εκκινητές έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά αυξάνεται και η πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού.

- Αλληλουχία των εκκινητών

Οι εκκινητές πρέπει να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την αλληλουχία στόχο , αλλά ταυτόχρονα ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα μεταξύ τους. Ο υβριδισμός μεταξύ των εκκινητών οδηγεί στο σχηματισμό διμερών εκκινητών (Primer dimers) που έχουν μέγεθος 30-50 bp και μειώνουν την αποτελεσματικότητα της PCR. Επίσης, η ύπαρξη περιοχών συμπληρωματικότητας μέσα στον εκκινητή αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού στην αλληλουχία στόχο.

- Η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών

Η θερμοκρασία αποδιάταξης, Melting temperature (T_m), είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλινη μορφή. Η T_m εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και τη σύσταση των βάσεων της αλληλουχίας. Υψηλό ποσοστό σε βάσεις G και C αυξάνει την T_m , καθώς οι βάσεις G και C ενώνονται με τις συμπληρωματικές τους στο δίκλινο DNA με τρεις δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με τις βάσεις A και T που ενώνονται με δύο δεσμούς υδρογόνου. Στην αντίδραση PCR η T_m των εκκινητών κυμαίνεται τυπικά στους 58-68 ° C. Οι δύο εκκινητές δεν πρέπει να έχουν πολύ διαφορετικές T_m μεταξύ τους, με μια διαφορά μικρότερη των 3-5 ° C να θεωρείται αποδεκτή. Υπάρχουν πολλοί τύποι για τον υπολογισμό της T_m των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών . Ένας από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους είναι ο ακόλουθος: $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$.

- Οι εσωτερικές δομές

Η απόδοση της αντίδρασης PCR μειώνεται δραματικά στις περιπτώσεις που οι εκκινητές υβριδοποιούνται μεταξύ τους και σχηματίζουν δομές φουρκέτας ή ομοδιμερίζονται.

2.3 PCR - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για την ενίσχυση ενός μόνο αντιγράφου ή μερικών αντιγράφων ενός τμήματος DNA δημιουργώντας χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Είναι ένας εύκολος, φθηνός και αξιόπιστος τρόπος να πολλαπλασιαστεί επανειλημμένα ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA.

Η PCR ενισχύει μια συγκεκριμένη περιοχή ενός κλώνου του DNA-στόχου. Οι περισσότερες μέθοδοι PCR ενισχύουν τμήματα DNA μεταξύ 0,1 και 10 kbp, αν και μερικές τεχνικές επιτρέπουν την ενίσχυση τμημάτων μεγέθους έως 40 kbp. Η ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος προσδιορίζεται από τα διαθέσιμα υποστρώματα στην αντίδραση, τα οποία περιορίζονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση.

Τα συστατικά και τα αντιδραστήρια που απαιτεί μια αντίδραση PCR:

- Ένα πρότυπο DNA που περιέχει την περιοχή στόχο για ενίσχυση
- Μια DNA πολυμεράση (ένζυμο)
- Δύο εκκινητές DNA που είναι συμπληρωματικοί προς τα 3 άκρα καθενός από τους κλώνους sense και anti-sense του DNA στόχου επιλεκτικοί εκκινητές που είναι συμπληρωματικοί προς την περιοχή στόχου DNA
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια ή dNTPs, τα οποία είναι τα δομικά στοιχεία από τα οποία η DNA πολυμεράση συνθέτει την νέα αλυσίδα DNA

- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστηριότητα και τη σταθερότητα της DNA πολυμεράσης
- Δισθενή κατιόντα μαγνησίου (Mg)
- ddH₂O

Η αντίδραση συνήθως διεξάγεται σε τελικό όγκο 50 μl σε μικρούς σωλήνες αντίδρασης και πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά, και τα οποία είναι:

1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.
2. Υβριδισμός εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια.

2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών . Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων , όπως αυτά του DNA, κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος, που στην προκειμένη περίπτωση κατασκευάζεται από τον πολυσακχαρίτη αγαρόζη, όταν στα άκρα του εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο. Το μόρια του DNA κινούνται προς την κάθοδο (θετικό φορτίο) λόγω του αρνητικού φορτίου τους και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Αυτό συμβαίνει διότι, μόρια διαφορετικού μεγέθους θα κινηθούν με διαφορετική ταχύτητα μέσα από τους πόρους του πηκτώματος όταν εφαρμόζεται σε αυτά ηλεκτρικό πεδίο συγκεκριμένης τάσης.

Διαδικασία ηλεκτροφόρησης:

- Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος των μορίων του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε . Μεγαλύτερη συγκέντρωση αγαρόζης συνεπάγεται και μεγάλη διακριτική ικανότητα , λόγω μικρότερων πόρων. Χρησιμοποιήσαμε πηκτώμα συγκέντρωσης 1,5%, η οποία είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA μέχρι και 5 kb. Για τη δημιουργία του πηκτώματος αναμιγνύεται αγαρόζη σε σκόνη (0.8 γρ) με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x (40 mM Tris-acetate και 1 mM EDTA με περίπου pH 8.3) 50ml και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Στο σημείο αυτό προσθέτουμε 5 μl βρωμιούχου αιθιδίου (1 μl ανά 10ml μίγματος) για την χρώση του πηκτώματος. Στην συνέχεια το μίγμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο προστίθενται εξαρτήματα που μοιάζουν με χτένες για τη δημιουργία μικρών βοθρίων υποδοχής του δείγματος (πηγαδάκια). Όταν κρυώσει η αγαρόζη δημιουργεί το πηκτώμα καθώς οι δεσμοί υδρογόνου συνδέουν τα μόρια της αγαρόζης. Στη συνέχεια τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε προσθήκη Loading buffer 6X (Bromophenol blue 0,1%w/v, TBE 1X, glycerol 8.7%, ddH₂O) όγκου 6 μl σε κάθε δείγμα ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση.

- Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο για τον διαχωρισμό των μορίων DNA.
- Μετά το πέρας του απαραίτητου χρονικού διαστήματος το πήκτωμα μεταφέρεται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για την παρατήρηση των δειγμάτων. Αυτό είναι εφικτό λόγω της χρήσης του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο προσδένεται στο DNA.

Η χρήση της ηλεκτροφόρησης μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε την ποσότητα του DNA που απομονώσαμε από κάθε δείγμα αλλά και να αξιολογήσουμε την ποιότητά του.

2.5 RFLP (restriction fragment length polymorphism)

Η ανάλυση RFLP στην μοριακή βιολογία βασίζεται σε δύο, ευρέως διαδεδομένες τεχνικές: στην πέψη του DNA από ένζυμα περιοριστικών ενδονουκλεασών και στην μεταφορά των θασμάτων σε ένα φίλτρο όπου μπορούν να υβριδοποιηθούν και να σημανθούν. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες τύπου II των βακτηρίων, μπορούν να κόψουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA (τα ένζυμα που συνήθως χρησιμοποιούνται για την ανάλυση RFLP αναγνωρίζουν αλληλουχίες 4-6 ζευγών βάσεων), έτσι τα ένζυμα είναι ικανά να επεξεργαστούν μεγάλα μόρια DNA. Για την ανάλυση των τμημάτων θα πρέπει να ταξινομηθούν κατά μέγεθος μέσω ηλεκτροφόρησης και στην συνέχεια να μεταφερθούν σε μεμβράνη με Southern Blott για να μπορέσουν να σημανθούν κατάλληλα.

Ένας πολυμορφισμός, σε μια αλληλουχία περιορισμού, συμβαίνει όταν μια μετάλλαξη ενός ζεύγους νουκλεοτιδίων οδηγεί στην δημιουργία ή στην απαιφιή ενώ σημείου περιορισμού ή σε άλλη περίπτωση μέσω προσθήκης ή αφαίρεσης ζεύγους το μέγεθος του θραύσματος αλλάζει. Η ανάλυση RFLP χρησιμοποιείται για να αναγνωρίσει γενετικές περιοχές που περιέχουν γονίδια ενδιαφέροντος, καθώς και ως γενετικοί δείκτες για τον υπολογισμό της

συχνότητας ανασυνδιασμού σε σχέση με ένα φαινοτυπικό δείκτη.

Η διαδικασία της RFLP χωρίζεται σε δύο κυρία μέρη. Την πέψη των δειγμάτων με περιοριστική ενδονουκλεάση και την απεικόνιση του αποτελέσματος της πέψης.

Διαδικασία πέψης:

- Τα επιλεγμένα ενισχυμένα δείγματα επιλέγονται και μεταφέρεται η ιδανικότερη ποσότητα DNA (για κάθε δείγμα μεταφέρεται σε κενά eppendorfs.
- Παρασκευάζεται ένα μίγμα (master mix) που περιέχει:

Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα ανάλογα με το περιοριστικό ένζυμο)

Περιοριστικό ένζυμο

ddH₂O

- Στην συνέχεια τοποθετείται ποσότητα απο το master mix τόση ώστε το κάθε δείγμα να έχει τελικό όγκο V=10μl.
- Έτσι αρχίζει η πέψη του DNA των δειγμάτων η οποία θα διαρκέσει για 12 ώρες και κλίβανο με θερμοκρασία 37°C.

Δημιουργία gel ακρυλαμίδης:

- Η δημιουργία του gel χρειάζεται:

Ακρυλαμίδα

Διφωσφορικό

Τρις-βορικό-EDTA

ddH₂O

Ουρία

- Μετά την δημιουργία του μίγματος, το υγρό μπαίνει στους κάθετους γυάλινους οδηγούς για την πήξη του, αφού πρώτα χρησιμοποιηθούν “χτένες” για την δημιουργία των πηγαδιών.

- Μετά την πήξη το gel μεταφέρεται στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εκεί φορτώνονται τα δείγματα που έχουν υποστεί πέψη μαζί με μια χρωστική ουσία.

3.Υλικά & Μέθοδοι

3.1 Υλικά

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία :

Acetic Acid

Acrylamide

Agarose

Bis-Acrylamide

Ammonium persulfate

NaCl

dNTPs

EDTA

EtOH

Proteinase K

NaOH

Formaldehyde

MgCl₂

NaBH₄

Potassium Acetate

TEMED

AgNO₃

100bp Ladder

3.2 Δείγματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 83 δείγματα χοίρων *Sus domesticus* από τα οποία τα 8 ήταν της φυλής Duroc, τα 50 Large White , τα 4 Pietrain, τα 5 Welsh και τα 6 Landrace.

3.3 Απομόνωση DNA

Πρώτο βήμα στην πειραματική διαδικασία είναι να απομονωθεί το γενετικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια . Για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος των χοίρων χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin Tissue από την εταιρία Macherey-Nagel και τηρήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA ελέγχεται ποιοτικά η επιτυχία της διαδικασίας με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v.

3.4 PCR-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο MC4R

Πίνακας 3: Αλληλουχία εκκινητών

Primer-F1	58-TGGCAATAGCCAAGAACA AG-38
Primer-2	58-CAGGGGATAGCAACAGAT GA-38.

Για την ενίσχυση του τμήματος του MC4R γονιδίου πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), και χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η σύσταση του διαλύματος της αντίδρασης PCR (πίνακας 4) :

Πίνακας 4: Σύσταση διαλύματος για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητες per PCR tube (50μl)
Buffer Kappa Taq	10x	1x	5 μl
MgCl ₂	50mM	2mM	1 μl
Εκκινητής Forward	50pM	1pM	0,7 μl
Εκκινητής Reverse	50pM	1pM	0,7 μl
DNA πολυμεράση (Kappa Taq)	5 U/μL	1 U	0,2 μl
dNTPs	10mM	0,2mM	1 μl
DNA εκμαγείο	100 ng		
ddH ₂ O	μέχρι τα 50 μl		

Οι συνθήκες για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου RYR1 είναι οι εξής:

Στάδιο 1

Αρχική αποδιάταξη : 89°C για 4 min

Στάδιο 2

Βήμα 1 - Αποδιάταξη: 95°C για 20 sec

Βήμα 2 - Υβριδοποίηση: 57 °C για 20 sec

Βήμα 3 - Επιμήκυνση: 72°C για 20 sec

Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται για 40 κύκλους

Στάδιο 3

Βήμα 1 - Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 min

Βήμα 2 - Συντήρηση των δειγμάτων: 4 °C

Στη συνέχεια τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v.

3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης πραγματοποιείται διαχωρισμός των τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε 1x TAE , στο οποίο διαλύθηκε η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης ανάλογα ενδεδειγμένη πυκνότητα, η οποία εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν . Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό καλούπι για να πολυμεριστεί.

Για πηκτή αγαρόζης 1% w/v, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για την οπτικοποίηση του DNA μετά από την απομόνωση του, διαλύονται 0,3gr και 0,6gr αγαρόζης σε 50ml και 100ml 1x TAE Electrophoresis Buffer αντίστοιχα.

Για πηκτή αγαρόζης 2% w/v, η οποία χρησιμοποιείται για ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων τμημάτων DNA για έλεγχο της ποιότητας τους, διαλύονται 0,6gr και 1,2gr αγαρόζης σε 50ml και 100ml 1x TAE Electrophoresis Buffer αντίστοιχα.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προστίθενται 3ml loading buffer στο καθένα από αυτά. Όταν το τμήμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί προέρχεται από απομόνωση, χρησιμοποιούνται 3ml από αυτό, ενώ όταν το DNA είναι ενισχυμένο μέσω PCR χρησιμοποιούνται 5ml. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100-150 volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

3.6 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Για την πέψη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση TaqA1. Στην εικόνα βλέπουμε όλες τις πληροφορίες που

χαρακτηρίζουν το ένζυμο. Οι πληροφορίες έχουν ληφθεί από την βάση περιοριστικών ενζύμων REBASE.

Recognition Sequence: [help?](#)

T⁺CGA

```

5' .. T C G A .. 3'
3' .. A G C T .. 5'
  
```

REBASE Enz Num 1801 entered Jan 1 1977 ... modified Feb 10 2016

Acronym: [Taq](#)
 Prototype: TaqI
 Org #: [2551](#)
 Organism: [Thermus aquaticus YTI](#)
 DNA name: chromosome
 Organism type: [bacteria](#)
 Complete genome
 Organism source: [J.J. Harris](#)
 Growth Temperature: 70 °
 Experimental Evidence: [biochemistry](#)
 Exhibits star activity
 Enzyme gene [cloned](#)
 Enzyme gene [sequenced](#)

sites on

Adeno2: 50

Lambda: 121

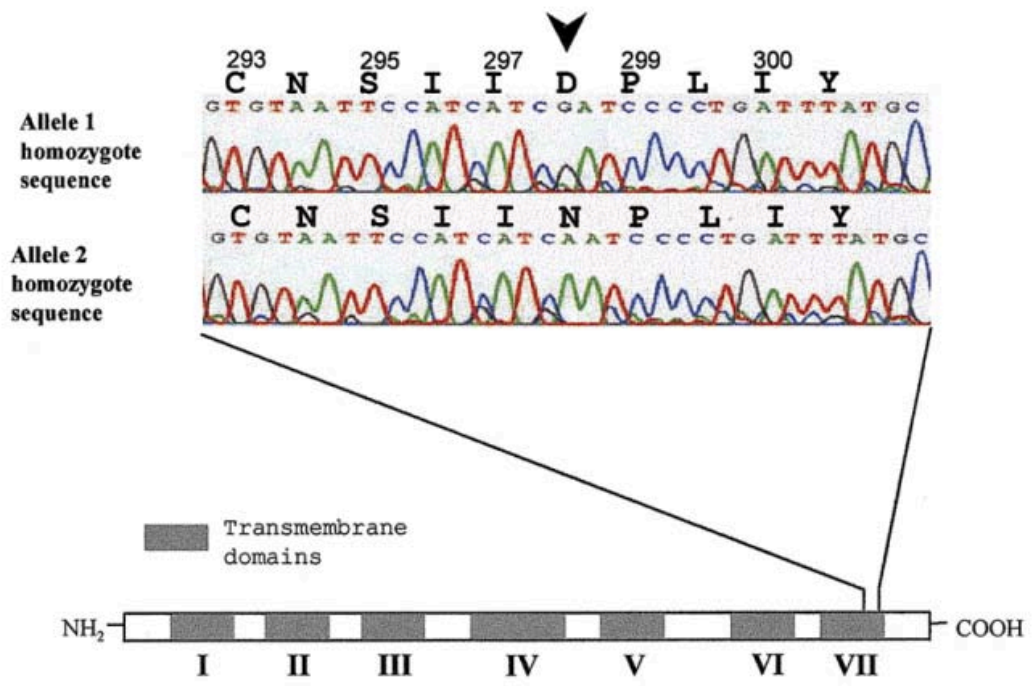
pBR322: 7

PhiX174: 10

SV40: 1

Εικόνα 2. Χαρακτηριστικά του ενζύμου Taq1

Το γονίδιο MC4R έχει μέγεθος περίπου 1 kb κωδικής αλληλουχίας με ένα εξόνιο. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης παράγει τμήματα μεγέθους 750bp. Η αντικατάσταση G→A γίνεται στο κωδικόνιο 298 όπως φαίνεται και στην εικόνα 5. Η εικόνα παρουσιάζει την δομή του υποδοχέα MC4R και το σημείο της μετάλλαξης.



Εικόνα 3. Θέση μετάλλαξης Asp298Asn

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3, από το αλληλόμορφο 1, το οποίο έχει στην επίμαχη θέση γουανίνη, έπειτα από πέψη, παράγονται δύο θραύσματα, 156bp και 70bp. Ενώ το αλληλόμορφο 2, το οποίο έχει αδενίνη στην αντίστοιχη θέση, παράγει τμήμα 226bp.

Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι το ομόζυγο για το αλληλόμορφο (G/G) μετά από επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση και ολοκλήρωση της πέψης, θα δώσει δύο ζώνες, 156bp και 70bp. Το ετερόζυγο άτομο (G/A), το οποίο έχει ένα φυσιολογικό και ένα αλληλόμορφο που φέρει την μετάλλαξη, θα εμφανίζει πρότυπο 3 ζωνών 70bp, 156bp και 226bp αντίστοιχα. Ενώ το ομόζυγο άτομο για το αλληλόμορφο (A/A) θα φέρει πρότυπο μόνο μιας ζώνης μεγέθους 226bp.

Σε κάθε σωληνάριο erpendorf που λαμβάνει χώρα η πέψη, προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

DNA (PCR product)	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1μl
TaqA1	20 U/ul	3 U	0,15 μl
CutSmart Buffer	10x	1x	1μl
ddH ₂ O	Μέχρι τα 10μl		

Ακολούθησε επώαση overnight των erpendorfs με τα δείγματα, στους 37°C η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για το ένζυμο.

3.7 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης γίνεται διαχωρισμός με βάση το μοριακό βάρος καθώς αυτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός. Τα μόρια με μεγάλο μοριακό βάρος έχουν μικρή κινητικότητα, ενώ μόρια με μικρό μοριακό βάρος κινούνται ταχύτερα, για αυτό και δημιουργείται μια κλασμάτωση στην πηκτή που παρατηρείται μετά τη χρώση της.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης αρχικά πρέπει να γίνει η παρασκευή της. Για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης 12% χρησιμοποιούνται τα συστατικά με τη σύσταση όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Ακρυλαμίδα	7,5gr
Bis-ακρυλαμίδα (N,N-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο	0,2gr
Ουρία	8gr
10x TBE Buffer	6,5ml
TEMED	62,5ml
APS 20% w/v	375ml
ddH ₂ O	Έως 62,5ml

Πίνακας 5. Συστατικά παρασκευής πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Η bis-ακρυλαμίδα, συντελεί στον σχηματισμό γεφυρών μεταξύ των αλυσίδων των πολυμερών του ακρυλαμιδίου. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα τρισδιάστατο πολυμερές πλέγμα, το μέγεθος των πόρων του οποίου εξαρτάται από τον βαθμό πολυμερισμού και είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης των μονομερών του ακρυλαμιδίου. Το υπερθειικό αμμώνιο, ή αλλιώς APS χρησιμοποιείται ως καταλύτης έναρξης σχηματισμού των ελεύθερων ριζών, ενώ ο φωτοχημικός καταλύτης, N,N, τετραμεθυλοεθυλενοδιαμίνη, που είναι γνωστός ως TEMED, αποσυνθέτει το υπερθειικό ιόν και δίνει ελεύθερες ρίζες, που διαδίδονται σε άλλα μόρια ακρυλαμιδίου προς σχηματισμό του πολυμερούς.

Αρχικά, με τη χρήση του ηλεκτρονικού ζυγού, ζυγίζονται η ακρυλαμίδη, η bis-ακρυλαμίδη και η ουρία και τοποθετούνται σε ένα ποτήρι ζέσεως. Σε αυτό προστίθεται το 10x TBE buffer και ένα μέρος από το συνολικό όγκο του ddH₂O και αναδεύονται. Στη συνέχεια, με τη χρήση διηθητικού χαρτιού γίνεται διήθηση του διαλύματος σε ογκομετρικό κύλινδρο και συμπληρώνεται με τον υπόλοιπο όγκο ddH₂O μέχρι τα 62,5ml. Στο τέλος προστίθενται το APS 20%w/v και το TEMED, με ήπια ανάδευση, τα οποία θα επιταχύνουν τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, και το διάλυμα ακρυλαμίδης τοποθετείται σε ειδική κατασκευή για κάθετη ηλεκτροφόρηση για να πολυμεριστεί, σε περίπου 30 λεπτά. Η συσκευή αυτή αποτελείται από δύο πλάκες (τζάμια) που ευθυγραμίζονται στην κάτω επιφάνεια της συσκευής και διαχωρίζονται μεταξύ τους από ειδικά τμήματα (αποστάτες) που δημιουργούν ενδιάμεσα κενά όπου θα τοποθετηθεί το διάλυμα ακρυλαμίδης (spacers). Ημιτελής ή λανθασμένη ευθυγράμμιση θα οδηγήσει σε διαρροή του διαλύματος διαμέσου των θέσεων επαφής, πριν τη στερεοποίηση της πηκτής.

Για την ηλεκτροφόρηση της πηκτής, μετακινείται αυτή σε συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα των ηλεκτροδίων, 1x TBE buffer. Σε κάθε δείγμα που πρόκειται να φορτωθεί στην πηκτή προστίθενται 3μl loading buffer. Επίσης, σε κάθε πηκτή, πριν από τα δείγματα φορτώνεται και ένας μάρτυρας μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (100bp ladder). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 220-250 volts σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 ώρες.

3.8 Χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση της πηκτής πολυακρυλαμίδης ακολουθεί χρώση της έτσι ώστε το αποτέλεσμα να είναι οπτικά ορατό. Για τη χρώση είναι απαραίτητα 3 διαφορετικά διαλύματα, των οποίων η σύσταση παρουσιάζεται παρακάτω μαζί με τα βήματα παρασκευής τους.

Διάλυμα 1

Σε ογκομετρικό σωλήνα προστίθενται 400ml ddH₂O (2 x 200ml) και 500μl οξικού οξέος (acetic acid) και αναδεύονται.

Διάλυμα 2

Σε διαφορετικό ογκομετρικό σωλήνα προστίθενται 200ml ddH₂O και 0,3gr νιτρικού αργύρου (AgNO₃). Στο σωλήνα τοποθετήθηκε μαγνήτης για την συνεχή ανάδευση του διαλύματος μέχρι να διαλυτοποιηθεί ο νιτρικός άργυρος.

Διάλυμα 3

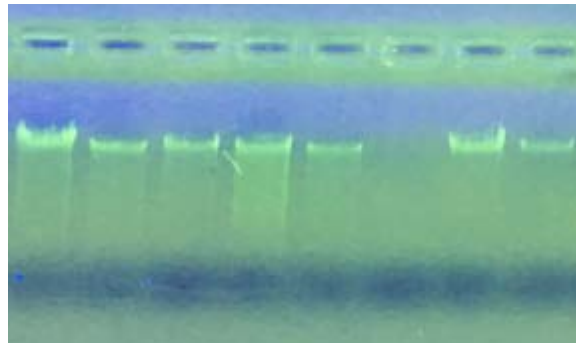
Σε ένα ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 200ml ddH₂O, 3gr υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH), 1ml φορμαλδεύδη και 0,01gr βοροϋδρίδιο του Νατρίου (NaBH₄). Το NaBH₄ προστίθεται τελευταίο από τα συστατικά καθώς είναι διαβρωτικό.

Αρχικά, αφαιρούνται από την πηκτή τα τζάμια που σχηματίζουν την κατασκευή και αυτή τοποθετείται σε ειδικό δοχείο για να ακολουθήσει η χρώση. Στο πρώτο βήμα της χρώσης η πηκτή εμβαπίζεται σε 200ml διαλύματος 1 και αναδεύεται για 2 λεπτά. Το διάλυμα 1 απορρίπτεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Στο δεύτερο βήμα στην πηκτή προστίθενται το διάλυμα 2 με τον νιτρικό άργυρο και η πηκτή αναδεύεται για 15 λεπτά. Στη συνέχεια γίνονται 2 πλύσεις με ddH₂O για 2 λεπτά η κάθε μια. Στο τρίτο και τελευταίο βήμα προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν τα κλάσματα της ηλεκτροφόρησης (ζώνες). Αφού ολοκληρωθεί και η τελευταία πλύση της πηκτής με ddH₂O, αυτή αποθηκεύεται σε μεμβράνη για να είναι εύκολη η παρατήρηση της.

4. Αποτελέσματα

4.1 Απομόνωση

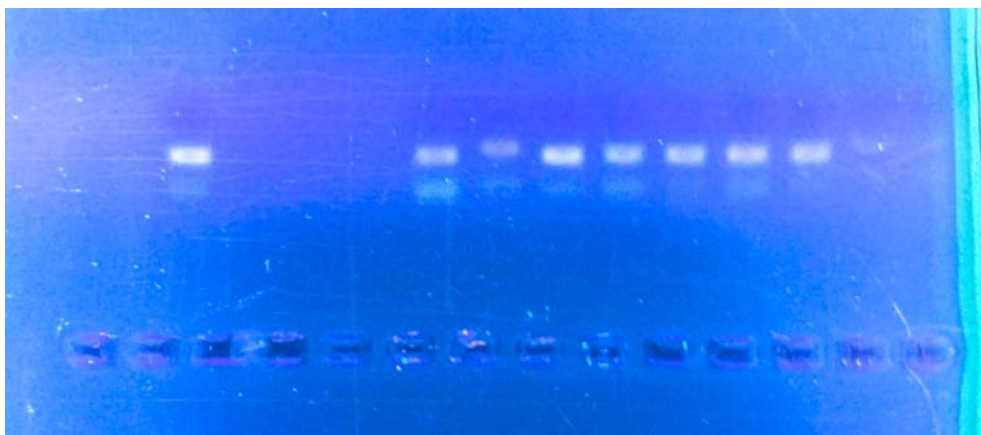
Από την ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v πήραμε το παρακάτω αποτέλεσμα, όπου φαίνονται οι ζώνες του τμήματος DNA που απομονώθηκε.



Εικόνα 4: Απομόνωση DNA

4.2 PCR-Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης

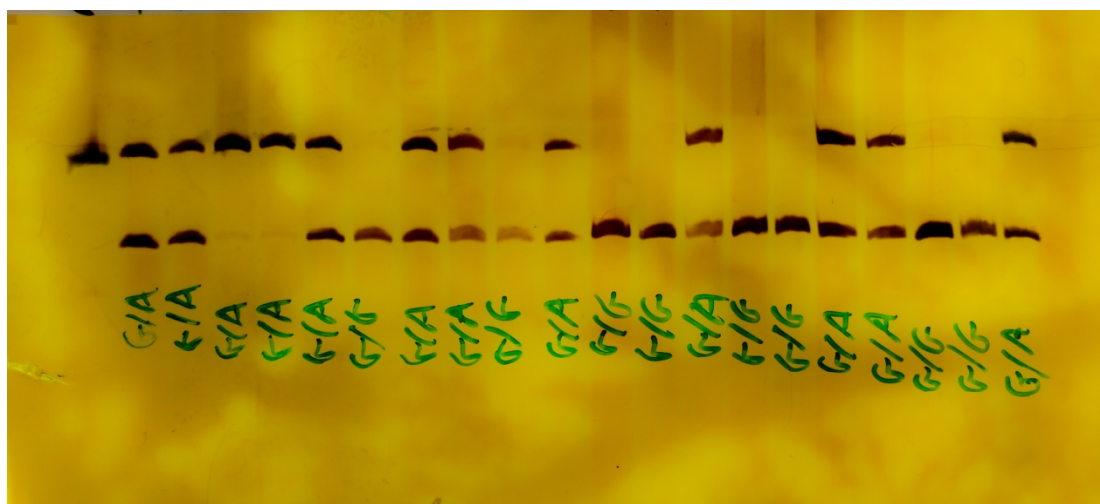
Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινήτων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ενισχύθηκε ένα τμήμα του γονιδίου MC4R. Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της τεχνικής, διεξάχθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα ενισχυμένα προϊόντα PCR.



Εικόνα 5. Αποτέλεσμα PCR μετά απο ηλεκτροφόρηση

4.3 RFLP-Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Τα προϊόντα PCR τα οποία έδωσαν έντονες μπάντες , ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v, επώαστηκαν overnight με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση, το ένζυμο TaqA1, σε θερμοκρασία 37°C. Τα προϊόντα PCR που δεν ενισχύθηκαν επαρκώς (αχνές μπάντες) η αντίστοιχη απομόνωση των δειγμάτων τους ξανά ενισχύθηκε με τους ίδιους εκκινητές. Στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης 12% μαζί με μάρτυρα μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (100bp ladder), σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 ώρες και αφού ολοκληρώθηκε η χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο παρατηρήθηκαν τα πρότυπα ζωνών που εμφανίστηκαν στην πηκτή, για να χαρακτηριστούν οι οργανισμοί ως προς το γονότυπο τους για το γονίδιο ενδιαφέροντος, MC4R.



Εικόνα 6. Αποτέλεσμα RFLP μετά απο ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδα

4.4 Πίνακες αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6. Αποτελέσματα αλληλόμορφων.

Αριθμός δείγματος	Κωδικός δείγματος	Φυλη	Γονότυπος MC4R
1	694	Duroc	G/A

2	680	Duroc	G/A
3	6473	LWM	A/A
4	6307	LWM	G/A
5	6447	LWF	G/A
6	6534	LWF	G/A
7	8484	Pietrain	G/A
8	7141	Welsh	G/G
9	6511	LWF	G/G
10	6545	LWF	G/A
11	702	Duroc	G/A
12	6480	LWM	G/A
13	6378	LWF	G/A
14	6306	LWM	G/G
15	7105	Welsh	A/A
16	690	Duroc	G/A
17	2026	Landrace	G/A
18	6381	LWF	G/A
19	6496	LWM	G/A
20	6373	LWM	G/G
21	691	Duroc	G/A
22	6280	LWF	G/A
23	2044	Landrace	G/A
24	6379	LWF	G/A
25	663	Duroc	G/A
26	6398	LWF	G/A
27	6446	LWF	A/A

28	668	Duroc	G/A
29	5180	LWM	G/G
30	6490	LWM	G/A
31	6552	LWF	G/A
32	2056	Landrace	G/A
33	6380	LWF	G/A
34	2053	Landrace	G/A
35	670	Duroc	G/A
36	6364	LWF	G/A
37	6397	LWF	A/A
38	6315	LWM	G/G
39	6547	LWF	G/A
40	6488	LWM	G/G
41	2059(2052)	Landrace	G/G
42	6445	LWF	G/A
43	7159	Welsh	G/G
44	6487	LWM	A/A
45	7150	Welsh	G/G
46	3221	Pietrain	G/G
47	O111501	LWF	G/A
48	O117305	LWF	G/A
49	7098	Welsh	G/A
50	O100901	LWF	G/G
51	O116206	LWF	A/A
52	O107106	LWF	A/A
53	O110101	LWF	A/A

54	O116305	LWF	G/G
55	O101304	LWF	G/A
56	O102202	LWF	
57	O100301	LWF	G/A
58	O115602	LWF	A/A
59	O115804	LWF	G/A
60	8041	Pietrain	G/G
61	O100603	LWF	G/G
62	O107404	LWF	A/A
63	4975	LWMeat	G/A
64	O100403	LWF	
65	O112302	LWF	A/A
66	O115503	LWF	G/A
67	O105202	LWF	A/A
68	6375	LWF	A/A
69	O102404	LWF	G/A
70	O113902	LWF	A/A
71	O102506	LWF	G/A
72	O552	Duroc	G/A
73	2042	Landrace	G/A
74	8468	Pietrain	G/A
75	O101709	LWF	G/A
76	O115704	LWF	A/A
77	O116401	LWF	A/A
78	O100506	LWF	A/A
79	O114807	LWF	G/G

80	4175	LWF	G/G
81	O101203	LWF	G/A
82	O111403	LWF	G/A
83	O110402	LWF	G/G
84	O105102	LWF	G/A

Με βάση τον παραπάνω πίνακα έγινε ανάλυση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων:

Γονοτυπικές συχνότητες

Ο γονότυπος G/G (ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο) εμφανίζεται σε 18 ζώα, ο γονότυπος G/A (ετερόζυγο για το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη) σε 47 ζώα-φορείς ενώ ο γονότυπος A/A (ομόζυγος για το αλληλόμορφο που φέρει την μετάλλαξη) εμφανίζεται σε 17 ζώα. Συνολικά ο αριθμός των ζώων με γνωστό γονότυπο, είναι 82. Συνεπώς,

- Συχνότητα G/G : $18/82= 0,219$
- Συχνότητα G/A : $47/82= 0,573$
- Συχνότητα A/A : $17/82= 0,207$

Αλληλομορφικές συχνότητες

Το αλληλόμορφο G (φυσιολογικό) εμφανίζεται 65 φορές, ενώ το A (φέρει τη μετάλλαξη) 64 φορές. Ο συνολικός αριθμός των αλληλομόρφων είναι 164. Συνεπώς,

- Συχνότητα G : $83/164= 0,506$
- Συχνότητα A : $81/164= 0,493$

Ανάλυση με βάση την φυλή

Στον παρακάτω πίνακα κατατάσσονται τα δείγματα με βάση την φυλή των sus scrofa από την οποία προήλθαν:

Πίνακας 7. Αποτελέσματα αλληλόμορφων με βάση την φυλή.

	G/G	G/A	A/A	Σύνολο
Duroc	0	9	0	9
Large White	12	30	16	58
Pettrain	2	2	0	4
Welsh	3	1	1	5
Landrace	1	5	0	6
Σύνολο	18	47	17	82

5. Συζήτηση

Ο υποδοχέας της μελανοκορτίνης και συγκεκριμένα ο MC4R εκφράζεται σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου που ρυθμίζουν την όρεξη, την πρόσληψη τροφής και την ενεργειακή ισοροπία του οργανισμού. Ο υποδοχέας ανήκει στην κατηγορία των G πρωτεϊνών και είναι στόχος της α-MSH η οποία είναι προϊόν του γονιδίου της προοπιομελανοκορτίνης (POMC) που με την σειρά του ρυθμίζεται θετικά από την δράση της λεπίνης νευρώνες που εκφράζουν POMC. Η στοχευμένη αποσιώπηση του γονιδίου του υποδοχέα MC4R προκαλεί παχυσαρκία σε ποντίκια (Huszar et al., 1997) ενώ αρκετές μεταλλάξεις τον αντίστοιχο υποδοχέα MC4R του ανθρώπου έχουν συσχετιστεί πάλι με την παχυσαρκία. (Vaisse, Clement, Guy-Grand, & Froguel, 1998)

Στους χοίρους (*sus scrofa*), έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της μετάλλαξης αντικατάστασης βάσης Asp298Asn του MC4R και της πρόσληψης τροφής, σωματικής ανάπτυξης και παχυσαρκίας. (Kim, Larsen, Short, Plastow, & Rothschild, 2000). Η μετάλλαξη προκαλεί την αλλαγή του κωδικονίου GAU σε AAU δημιουργώντας έτσι ένα σημείο τομής για την περιοριστική ενδονουκλεάση Taq1. Η μετάλλαξη προκαλεί την αντικατάσταση του ασπαραγικού οξέος σε ασπαραγίνη στην υψηλά συντηρημένη έβδομη διαμεμβρανική περιοχή της G πρωτεΐνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία του υποδοχέα, ύστερα από το σήμα εισόδου, να ενεργοποιήσει την αδενυλική κυκλάση η οποία με την σειρά της παράγει κυκλικό AMP (Houston, Cameron, & Rance, 2004).

Γενικά το αλληλόμορφο 298Asp έχει συσχετιστεί με λιγότερη πρόσληψη τροφής, χαμηλότερη ημερίσια αύξηση βάρους και εν τέλει έναν πιο λιποβαρές ζώο (Bruun, Jørgensen, Nielsen, Andersson, & Fredholm, 2006) ενώ το αλληλόμορφο 298Asn, με αυξημένη εναπόθεση λίπους, αυξημένη πρόσληψη τροφής και ημερίσια αύξηση βάρους (Kim et al., 2000). Πιο συγκεκριμένα, τα ομόζυγα άτομα Asp298 μεγαλώνουν με μικρότερη ταχύτητα από ότι τα ομόζυγα 298Asn, αλλά και τα ετερόζυγα άτομα (Houston et al., 2004). Παρόλα

αυτά τα ετερόζυγα άτομα έχουν χαμηλότερο ρυθμό αύξησης από τα ομόζυγα 298Asn. Όμως, η επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, σε κάποιες έρευνες φαίνεται να έχει έναν χαρακτήρα που εξαρτάται από συγκεκριμένες σειρές ζώων (line-specific). Η μετάλλαξη αυτή του MC4R συσχετίστηκε ισχυρά με το ραχιαίο λίπος σε σειρές χοίρων Large White αλλά δεν βρέθηκε να έχει κάποια συσχέτιση με αντίστοιχα χαρακτηριστικά στην γενιά F2 της διασταύρωσης Large White x Wild Boar.(Houston et al., 2004).

Για το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό δεν μπορεί να θεωρηθεί κάποιος από τους τρεις γονότυπος επιθυμητός καθώς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ζώου εξαρτώνται από τις ανάγκες του κτηνοτροφίου. Σε σειρές ζώων όπου υπάρχει χαμηλή πρόσληψη τροφής και μικρή ανάπτυξη, η επιλογή του αλληλόμορφου 298Asn θα επιταχύνει την διαδικασία εκτροφής των ζώων, ενώ η επιλογή του αλληλόμορφου 298Asp μπορεί να είναι χρήσιμη σε σειρές ζώων στις οποίες οι εναπόθεση λίπους είναι παραπάνω από την επιθυμητή (Kim et al., 2000). Μέχρι την δεκαετία του 1980 ο κύριο στόχος της εκτροφής ήταν η μείωση του ραχιαίου λίπους, από τότε, στα προγράμματα επιλογής, έχει δοθεί μεγαλύτερη έμφαση την ημερίσια αύξηση του βάρους.(Bruun et al., 2006).

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να χαρακτηριστούν οι γονότυποι 83 χοίρων για το γονίδιο MC4R ως προς την μετάλλαξη Asp298Asn, ενώ είναι απαραίτητη η δημιουργία της αντιστοιχίας μεταξύ των γονότυπων και των φαινότυπων των ατόμων ώστε να μπορέσει να εξαχθεί μία συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων και των χαρακτηριστικών των ζώων. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο (G) εμφανίζεται στον πληθυσμό με συχνότητα 50.6% ενώ το αλληλόμορφο (A) που φέρει τη μετάλλαξη σε συχνότητα 49.3%. Η γονοτυπική συχνότητα για τα ετερόζυγα ζώα-φορείς (GA) έφτασε στο 57,9%, των ομόζυγων ως προς το φυσιολογικό αλληλόμορφο (G/G) 21,9% ενώ των ομόζυγων ως προς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο 20,7%. Σε αντίστοιχες έρευνες που έχουν προηγηθεί (Stachowiak, Szydlowski, Obarzanek-Fojt, & Switonski, 2006) οι γονοτυπική συχνότητα των αλληλομόρφων ανέρχεται σε 76% για το A , 24% για το G σε Large White χοίρους και 29% A και 71% G σε σειρές Landrace. Στην συγκεκριμένα έρευνα με συνολικό δείγμα sus scrofa Large White 58, οι συχνότητα του αλληλόμορφου G έφτασε το 46,5% ενώ για το A το 53,4%.

Περεταίρω έρευνα είναι απαραίτητη για την διαλεύκανση του είδους της συσχέτισης της μετάλλαξης του Asp298Asn του υποδοχέα MC4R με την εναπόθεση ραχιαίου λίπους και την αύξηση πρόσληψης τροφής, καθώς η τα συγκεκριμένα αποτελέσματα της σημειακής αυτής μετάλλαξης μπορούν να ποικίλουν και να εξαρτώνται απο αλληλεπιδράσεις μεταξύ της συγκεκριμένης μετάλλαξης και άλλων SNPs του υποδοχέα MC4R (Fan, Onteru, Plastow, & Rothschild, 2009).

6. Βιβλιογραφία

- Bruun, C. S., Jørgensen, C. B., Nielsen, V. H., Andersson, L., & Fredholm, M. (2006). Evaluation of the porcine melanocortin 4 receptor (MC4R) gene as a positional candidate for a fatness QTL in a cross between Landrace and Hampshire. *Animal Genetics*, 37(4), 359–362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2006.01488.x>
- Fan, B., Onteru, S. K., Plastow, G. S., & Rothschild, M. F. (2009). Detailed characterization of the porcine MC4R gene in relation to fatness and growth. *Animal Genetics*, 40(4), 401–409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01853.x>
- Gholizadeh, M., Mianji, G. R., & Zadeh, H. S. (2008). Potential use of molecular markers in the genetic improvement of livestock. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(3), 120–128. <https://doi.org/10.3923/ajava.2008.120.128>
- Ho, G., & MacKenzie, R. G. (1999). Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 35816–35822. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35816>
- Houston, R. D., Cameron, N. D., & Rance, K. A. (2004). A melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected large white pig populations. *Animal Genetics*, 35(5), 386–390. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01182.x>
- Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Berkemeier, L. R., ... Frank, L. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88(1), 131–141. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81865-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81865-6)
- Kim, K. S., Larsen, N., Short, T., Plastow, G., & Rothschild, M. F. (2000). A missense

variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mammalian Genome*, 11(2), 131–135. <https://doi.org/10.1007/s003350010025>

MacNeil, D. J., Howard, A. D., Guan, X., Fong, T. M., Nargund, R. P., Bednarek, M. A., ... Van der Ploeg, L. H. T. (2002). The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *European Journal of Pharmacology*, 450(1), 93–109. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01989-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01989-1)

Stachowiak, M., Szydlowski, M., Obarzanek-Fojt, M., & Switonski, M. (2006). An effect of a missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene on production traits in Polish pig breeds is doubtful. *Animal Genetics*, 37(1), 55–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01373.x>

Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B., & Froguel, P. (1998). A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity [2]. *Nature Genetics*, 20(2), 113–114. <https://doi.org/10.1038/2407>

Vergoni, A. V., & Bertolini, A. (2000). Role of melanocortins in the central control of feeding. *European Journal of Pharmacology*, 405(1–3), 25–32. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00538-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00538-0)

Yang, Y. K., & Harmon, C. M. (2003). Recent developments in our understanding of melanocortin system in the regulation of food intake, 239–248.

Παναγιώτης Σιμιτζής, Στεργίου, Λέκτορας, Εργαστήριο Γενικής & Ειδικής Ζωοτεχνίας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Άννα Στεργίου , <http://www.ypaithros.gr/ekdoseis/xoirotrofia-prooptikes-provlyhmata-lyseis/>

List of pig breeds, From Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_pig_breeds

Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε. 2015. Απομόνωση DNA. [Κεφάλαιο Συγγράμματος]. Στο Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσιλά, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., Δούκισσας, Λ. 2015. Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 5. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/645>.

