

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μοριακή ανάλυση του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC) σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς ζωικών ειδών»

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ Α. ΚΟΥΤΣΟΓΙΑΝΝΟΥΛΗ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

Επιβλέπων Καθηγητής: Ζ. Μαμούρης

Λάρισα, Απρίλιος 2011

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

Ph. D. THESIS

«Molecular analysis of Major Histocompatibility Complex (MHC)
in natural and breeding populations of animal species»

EVANGELIA A. KOUTSOGIANNOULI

Genetics, Comparative and Evolutionary Biology Laboratory

Advisor: Prof. Z. Mamuris

Larissa, April 2011

Επιβλέπων Καθηγητής

Z. Μαμούρης (Καθηγητής)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Z. Μαμούρης (Καθηγητής)

K. Ματθιόπουλος (Αν. Καθηγητής)

K. Μούτου (Αν. Καθηγήτρια)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ζήσης Μαμούρης

Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζαχαρίας Σκούρας

Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Απόστολος Αποστολίδης

Αν. Καθηγητής, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος

Αν. Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κατερίνα Μούτου

Αν. Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χαράλαμπος Μπιλλίνης

Αν. Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Παπανικολάου

Επ. Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Ευχαριστίες

Η συγγραφή μιας διδακτορικής διατριβής είναι χρονοβόρα διαδικασία, περιέργως ωστόσο, όχι τόσο όσο χρειάζεται για την ανακατασκευή των σταδίων από τα οποία αυτή πέρασε. Θα ήθελα σε αυτό το σημείο να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε ανθρώπους που με βοήθησαν όλη αυτή την περίοδο της διατριβής.

Θα ήθελα να εκφράσω τη βαθειά και ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών Ζήση Μαμούρη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ευρεία του γνώση και ο λογικός τρόπος σκέψης του ήταν ανεκτίμητης αξίας για εμένα. Η κατανόηση, η ενθάρρυνση και η προσωπική του καθοδήγηση υπήρξαν μία στέρεα βάση για τη συγκεκριμένη διατριβή ενώ παράλληλα μου δίδαξε τον επιστημονικό τρόπο σκέψης και συνέβαλε στην επιστημονική μου κατάρτιση.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στον Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο και στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Κατερίνα Μούτου που με τίμησαν συμμετέχοντας στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, για την πρόθυμη βοήθεια που προσέφεραν και τα λεπτομερή και εποικοδομητικά σχόλια με τα οποία συνέβαλαν σημαντικά στη διεκπεραίωση της διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στην εξεταστική επιτροπή: στον Καθηγητή Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας κ. Ζ. Σκούρα, στον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιχθυοκομίας κ. Α. Αποστολίδη, στον Αναπληρωτή Καθηγητή Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας κ. Χ. Μπιλλίνη και στον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Ν. Α. Παπανικολάου, για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και τις διορθώσεις της διατριβής.

Ευχαριστώ τον κ. Κώστα Σταμάτη, για την καθοδήγησή του στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο και τη μύηση στις μοριακές τεχνικές. Ο τρόπος

σκέψης του και οι ιδέες του θα έχουν εντυπωσιακή επίδραση σε όλη την ερευνητική μου πορεία. Ακόμη, ευχαριστώ τη Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών Θεολογία Σαραφίδου για τη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Ιδιαίτερης σημασίας για εμένα ήταν η αποδοχή του Dr Lutz Walter να με εντάξει στην ερευνητική του ομάδα στο Εργαστήριο Γενετικής Πρωτευόντων του Γερμανικού Κέντρου Πρωτευόντων (DPZ). Θα ήθελα να ευχαριστήσω αυτόν που μου έδωσε τη δυνατότητα να εργαστώ σε ένα άλλο εργαστηριακό χώρο καθώς και τα μέλη της ερευνητικής του ομάδας, Dr Anne Averdam και Nico Westral για τη βοήθειά τους.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χαράλαμπο Μπιλλίνη στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παροχή των δειγμάτων στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις. Για τον ίδιο λόγο θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους Dr Franz Suchentrunk, Dr Massimo Scandura, Claudia Kalbe καθώς και το νομό μου και κτηνίατρο Αντώνη Τζουρτζουκλή. Τον ευχαριστώ, επιπλέον, για τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής αλλά και γιατί, είναι ένας από τους πιο σημαντικούς ανθρώπους στη ζωή μου.

Επίσης, ευχαριστώ όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές που περάσανε όλα αυτά τα χρόνια από το εργαστήριο και κάνανε ευχάριστες τις ώρες της πολύωρης εργασίας. Εκτός από την πολύ καλή συνεργασία, με αρκετούς μας συνδέει και μια βαθιά φιλία. Για το λόγο αυτό, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Αντώνη Κόκκαλη, το Στέλιο Μπουλινάκη, τη Χρύσα Κόκκαλη, το Βασίλη Γκοτοσόπουλο, το Βάιο Σαλγκάμη, τη Χρύσα Πανυτσίδου και την Κατερίνα Θεοδοσιάδη. Δε θα παραλείψω να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Κωνσταντίνο Βουδούρη για τη φιλία που αναπτύξαμε όντας στον ίδιο χώρο όλα αυτά τα χρόνια, για το ενδιαφέρον του για τα επιστημονικά και προσωπικά μου προβλήματα αλλά και για την εμπύχωση που μου προσέφερε όταν έχανα το κουράγιο και την πίστη στις δυνάμεις μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου τη Νάνσυ, την Κρυστάλλω, τη Χριστίνα, τον Κώστα και το Μάρκο για την πίστη τους σε εμένα, την ενθάρρυνση και τη συμπαράσταση στις στιγμές που έχανα το κουράγιο μου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Παύλο για την πολύτιμη βοήθεια του στη μορφοποίηση αυτού του κειμένου. Όλη αυτή υποστήριξη με παρακινούσε για να δουλέψω σκληρότερα και να δώσω τον καλύτερό μου εαυτό.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη σε αυτούς που νιώθω οικογένειά μου επειδή αποτελούν την προέλευση της ευτυχίας μου. Η αγάπη και η υποστήριξη των γονιών μου καθώς και του Γιάννη, της Ελίνας, του Γιάννη, της Στεργιανής και της Κωνσταντίνας χωρίς καμία απαίτηση κατέστησαν εφικτό να τελειώσω αυτή τη διατριβή. Ανέλαβαν κάθε ευθύνη μου για να μου επιτρέψουν να αφοσιωθώ στην έρευνα. Η αποφασιστικότητά τους και η καλοσύνη τους μου έμαθαν να μένω προσηλωμένη στο στόχο μου και να μη λυγίζω στις δυσκολίες. Πάντα με έκαναν να νιώθω ότι είναι υπερήφανοι για εμένα και δεν έχω άλλο τρόπο για να τους ευχαριστήσω παρά μόνο αφιερώνοντάς τους αυτή τη διατριβή.

Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη

Λάρισα, Απρίλιος 2011

*Στους γονείς μου Τάσο και Ντίνα που μου δίδαξαν την αγάπη για τη γνώση,
στο Γιάννη Β. και στην Ελίνα που ήταν δίπλα μου σε αυτή τη διαδρομή.*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
I. Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC)	4
II. Δομή και Εξέλιξη του MHC	5
III. Ο Πολυμορφισμός και η διατήρησή του στο MHC	12
IV. <i>Lepus europaeus</i>	21
V. <i>Ovis aries</i>	24
VI. <i>Sus scrofa</i>	28
VII. Σκοπός της εργασίας	32
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
I. Γενικά	35
II. Βιολογικό Υλικό	35
III. Απομόνωση DNA	41
IV. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	43
V. Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονής αλυσίδας (SSCP)	49
VI. Χρώση με την τεχνική χρώσης νιτρικού αργύρου (Silver Staining)	52
VII. Κλωνοποίηση τμήματος DNA	53
VIII. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου <i>DRB</i> στο <i>L. europaeus</i>	55
IX. Προσδιορισμός των γενετικών παραμέτρων	58
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
I. <i>Sus scrofa</i>	66
i. Απομόνωση και ποικιλότητα του εξωνίου 2 των <i>MHC-DRB1</i> και <i>MHC-DQA</i>	66
ii. Αλληλομορφική κατανομή και συχνότητες	69
iii. Πληθυσμιακή διαφοροποίηση	73
iv. Φυλογενετική ανακατασκευή των <i>MHC-DRB1</i> και <i>MHC-DQA</i>	80
v. Πρότυπα συνώνυμων και μη συνώνυμων υποκαταστάσεων	83
vi. Θύλακες δέσμευσης πεπτιδίου και υποκατάσταση αμινοξέως με αντικατάσταση φορτίου	84
II. <i>Lepus europaeus</i>	91
i. Απομόνωση και ποικιλότητα του εξωνίου 2 των <i>MHC-DRB1</i> και <i>MHC-DQA</i>	91
ii. Αλληλομορφική κατανομή και συχνότητες	96

iii. Πληθυσμιακή διαφοροποίηση	102
iv. Φυλογενετική ανακατασκευή των <i>MHC-DRB1</i> και <i>MHC-DQA</i>	107
v. Πρότυπα συνώνυμων και μη συνώνυμων υποκαταστάσεων	113
vi. Θύλακες δέσμευσης πεπτιδίου και υποκατάσταση αμινοξέως με αντικατάσταση φορτίου	114
III. <i>Ovis aries</i>	127
i. Απομόνωση και ποικιλότητα του εξωνίου 2 των <i>MHC-DRB1</i> και <i>MHC-DQA</i>	127
ii. Αλληλομορφική κατανομή και συχνότητες	132
iii. Πληθυσμιακή διαφοροποίηση	136
iv. Φυλογενετική ανακατασκευή των <i>MHC-DRB1</i> και <i>MHC-DQA</i>	137
v. Πρότυπα συνώνυμων και μη συνώνυμων υποκαταστάσεων	144
vi. Θύλακες δέσμευσης πεπτιδίου και υποκατάσταση αμινοξέως με αντικατάσταση φορτίου	145
IV. Σύγκριση πολυμορφισμού ανά είδος και ανά πληθυσμό	156
V. Σύγκριση πολυμορφισμού που έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία	163
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	165
I. Μοριακή ανάλυση των γονιδίων <i>DRB1</i> και <i>DQA</i> με τη μέθοδο PCR-SSCP	166
II. Σύγκριση του πολυμορφισμού μεταξύ <i>DQA</i> και <i>DRB1</i>	167
III. Πολυμορφισμός του <i>MHC-DRB1</i> και <i>MHC-DQA</i> στο <i>Sus scrofa</i>	170
IV. Πολυμορφισμός του <i>MHC-DRB1</i> και <i>MHC-DQA</i> στο <i>Lepus europaeus</i>	175
V. Πολυμορφισμός του <i>MHC-DRB1</i> και <i>MHC-DQA2</i> στο <i>Ovis aries</i>	184
VI. MHC και φυλογεωγραφία	186
VII. MHC και ετεροζυγωτία	191
VIII. Συνώνυμες vs. μη συνώνυμες υποκαταστάσεις	194
IX. MHC/PBR λειτουργικός πολυμορφισμός	196
X. Συμπεράσματα	198
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	202

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

	Σελ.
Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του είδους <i>Lepus europaeus</i> (από http://animaldiversity.ummz.umich.edu)	22
Πίνακας 2: Συστηματική κατάταξη του είδους <i>Ovis aries</i> (από http://animaldiversity.ummz.umich.edu)	25
Πίνακας 3: Συστηματική κατάταξη του είδους <i>Sus scrofa</i> (από http://animaldiversity.ummz.umich.edu)	29
Πίνακας 4: Μέγεθος κομματιού και ακολουθία των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων του MHC στα διάφορα είδη	47
Πίνακας 5: Βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων του MHC τάξης II στα είδη <i>Lepus europaeus</i> και <i>Sus scrofa</i>	48
Πίνακας 6: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση των γονιδίων MHC τάξης II στο είδος <i>Lepus europaeus</i>	48
Πίνακας 7: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση των γονιδίων MHC τάξης II στο είδος <i>Sus scrofa</i>	48
Πίνακας 8: Βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων του MHC τάξης II στο είδος <i>Ovis aries</i>	49
Πίνακας 9: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση των γονιδίων MHC τάξης II στο είδος <i>Ovis aries</i>	49
Πίνακας 10: Σύσταση πηκτής και ηλεκτροφορητικές συνθήκες για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε στα είδη <i>Lepus europaeus</i> και <i>Sus scrofa</i>	52
Πίνακας 11: Σύσταση πηκτής και ηλεκτροφορητικές συνθήκες για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε στο είδος <i>Ovis aries</i>	52
Πίνακας 12: Ακολουθία των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του εξωνίου 3 του <i>DRB</i> στο <i>L. europaeus</i>	56
Πίνακας 13: Οι αριθμοί ID των αλληλομόρφων <i>SLA-DRB1</i> και <i>SLA-DQA</i> που έχουν βρεθεί από προηγούμενες μελέτες	67
Πίνακας 14: Αμινοξική αλληλουχία του εξωνίου 2 του <i>DRB1</i> . Με «T» σημειώνονται οι θέσεις που συμμετέχουν στο σχηματισμό του TCR και σημειώνονται και τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό των διαφορετικών θυλάκων της PBR	68
Πίνακας 15: Αμινοξική αλληλουχία του εξωνίου 2 του <i>DQA</i> . Με «T» σημειώνονται οι θέσεις που συμμετέχουν στο σχηματισμό του TCR και σημειώνονται και τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό των διαφορετικών θυλάκων της PBR	68
Πίνακας 16: Αλληλομορφικές συχνότητες του <i>DRB1</i> ανά πληθυσμό. Παρουσιάζονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε πληθυσμό (N), τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L), ο αλληλομορφικός πλούτος (Rs), η αναμενόμενη (H.exp) και παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (H.obs)	71
Πίνακας 17: Αλληλομορφικές συχνότητες του <i>DQA</i> ανά πληθυσμό. Παρουσιάζονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε πληθυσμό (N), τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L), ο αλληλομορφικός πλούτος (Rs), η αναμενόμενη (H.exp) και παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (H.obs)	72
Πίνακας 18: Κατά ζεύγη τιμές F_{ST} (επάνω) και γενετικές αποστάσεις (κάτω) για όλους τους πληθυσμούς στο <i>DRB1</i>	75
Πίνακας 19: Κατά ζεύγη τιμές F_{ST} (επάνω) και γενετικές αποστάσεις (κάτω) για όλους τους πληθυσμούς στο <i>DQA</i>	76
Πίνακες 20, 21, 22: Αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης για το <i>Sus scrofa</i> , χρησιμοποιώντας τις τρεις κύριες γεωγραφικές περιοχές δειγματοληψίας (Ελληνικοί αγριόχοιροι, Ευρωπαϊκοί αγριόχοιροι και ήμεροι χοίροι) ως επίπεδα ομαδοποίησης ή χωρίς ομαδοποίηση για το <i>DRB1</i> . Το ποσοστό της ποικιλομορφίας, η πιθανότητα (P) υπολογισμένη από δοκιμασίες μετάθεσης (permutation tests) και το F statistics δίνονται για κάθε ιεραρχικό επίπεδο (Excoffier <i>et al.</i> , 1992). Οι ενδείξεις Eu (Europe, Ευρώπη), Gr (Greece, Ελλάδα), Wb (Wild boar, αγριόχοιροι) και Do (Domestic pig, ήμεροι χοίροι) κάτω από κάθε παράμετρο υποδεικνύουν τις ομάδες πληθυσμών	77

Πίνακες 23, 24, 25: Αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης για το <i>Sus scrofa</i> , χρησιμοποιώντας τις τρεις κύριες γεωγραφικές περιοχές δειγματοληψίας (Ελληνικοί αγριόχοιροι, Ευρωπαϊκοί αγριόχοιροι και ήμεροι χοίροι) ως επίπεδα ομαδοποίησης ή χωρίς ομαδοποίηση για το DQA . Το ποσοστό της ποικιλομορφίας, η πιθανότητα (P) υπολογισμένη από δοκιμασίες μετάθεσης (permutation tests) και το F statistics δίνονται για κάθε ιεραρχικό επίπεδο (Excoffier <i>et al.</i> , 1992). Οι ενδείξεις Eu (Europe, Ευρώπη), Gr (Greece, Ελλάδα), Wb (Wild boar, αγριόχοιροι) και Do (Domestic pig, ήμεροι χοίροι) κάτω από κάθε παράμετρο υποδεικνύουν τις ομάδες πληθυσμών	78
Πίνακες 26, 27: Συνώνυμες (d_S) και μη συνώνυμες (d_N) υποκαταστάσεις ανά θέση (per site) και τα αποτελέσματα του Z-test για θετική επιλογή στα κωδικόνια της περιοχής πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR), των κωδικονίων εκτός PBR (non-PBR) και σε ολόκληρο το εξώνιο 2	83
Πίνακας 28: Συχνότητες των παραλλαγών θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο DQA	86
Πίνακας 29: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο DQA	86
Πίνακας 30: Συχνότητες των παραλλαγών θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο DRB1	87
Πίνακας 31: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο DRB1	88
Πίνακας 32: Αμινοξική αλληλουχία του εξωνίου 2 του DRB1 . Με «T» σημειώνονται οι θέσεις που συμμετέχουν στο σχηματισμό του TCR και σημειώνονται και τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό των διαφορετικών θυλάκων της PBR	93
Πίνακας 33: Αμινοξική αλληλουχία του εξωνίου 2 του DQA . Με «T» σημειώνονται οι θέσεις που συμμετέχουν στο σχηματισμό του TCR και σημειώνονται και τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό των διαφορετικών θυλάκων της PBR	95
Πίνακας 34: Αλληλομορφικές συχνότητες του DRB1 ανά πληθυσμό. Δείχνονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε πληθυσμό (N), τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L), ο αλληλομορφικός πλούτος (R_s), η αναμενόμενη (H_{exp}) και παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (H_{obs})	99
Πίνακας 35: Αλληλομορφικές συχνότητες του DQA ανά πληθυσμό. Δείχνονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε πληθυσμό (N), τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L), ο αλληλομορφικός πλούτος (R_s), η αναμενόμενη (H_{exp}) και παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (H_{obs})	101
Πίνακας 36: Κατά ζεύγη τιμές F_{ST} (επάνω) και γενετικές αποστάσεις (κάτω) για όλους τους πληθυσμούς στο DQA	104
Πίνακας 37: Κατά ζεύγη τιμές F_{ST} (επάνω) και γενετικές αποστάσεις (κάτω) για όλους τους πληθυσμούς στο DRB1	105
Πίνακας 38: Αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης για το <i>L. europaeus</i> , χρησιμοποιώντας τις τέσσερις κύριες γεωγραφικές περιοχές δειγματοληψίας (δηλ. SEEa, OVERa, CEUa, AMa) ως επίπεδα ομαδοποίησης ή χωρίς ομαδοποίηση για το DQA . Το ποσοστό της ποικιλομορφίας, η πιθανότητα (P) υπολογισμένη από δοκιμασίες μετάθεσης (permutation tests) και το F statistics δίνονται για κάθε ιεραρχικό επίπεδο (Excoffier <i>et al.</i> , 1992). Οι ενδείξεις 4 (SEEa, OVERa, CEUa, AMa) και 2 (CEUa, AMa) κάτω από κάθε παράμετρο υποδεικνύουν τις ομάδες πληθυσμών	106
Πίνακας 39: Αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης για το <i>L. europaeus</i> , χρησιμοποιώντας τις τέσσερις κύριες γεωγραφικές περιοχές δειγματοληψίας (δηλ. SEEa, OVERa, CEUa, AMa) ως επίπεδα ομαδοποίησης ή χωρίς ομαδοποίηση για το DRB1 . Το ποσοστό της ποικιλομορφίας, η πιθανότητα (P) υπολογισμένη από δοκιμασίες μετάθεσης (permutation tests) και το F statistics δίνονται για κάθε ιεραρχικό επίπεδο (Excoffier <i>et al.</i> , 1992). Οι ενδείξεις 4 (SEEa, OVERa, CEUa, AMa) και 2 (CEUa, AMa) κάτω από κάθε παράμετρο υποδεικνύουν τις ομάδες πληθυσμών	106
Πίνακες 40, 41: Συνώνυμες (d_S) και μη συνώνυμες (d_N) υποκαταστάσεις ανά περιοχή (per site) και τα αποτελέσματα του Z-test για θετική επιλογή στα	113

κωδικόνια της περιοχής πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR), των κωδικονίων εκτός PBR (non-PBR) και σε ολόκληρο το εξώνιο 2	
Πίνακας 42: Συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο DQA	118
Πίνακας 43: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο DQA	119
Πίνακας 44: Συχνότητες των παραλλαγών του θύλακα 4 του γονιδίου DRB1 που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό	121
Πίνακας 45: Συχνότητες των παραλλαγών του θύλακα 7 του γονιδίου DRB1 που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό	122
Πίνακας 46: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο DRB1	123
Πίνακας 47: Οι αριθμοί ID των αλληλομόρφων <i>Ovar-DRB1</i> και <i>Ovar-DQA2</i> που έχουν βρεθεί από προηγούμενες μελέτες	129
Πίνακας 48: Αμινοξική αλληλουχία του εξωνίου 2 του DRB1 . Με «T» σημειώνονται οι θέσεις που συμμετέχουν στο σχηματισμό του TCR και σημειώνονται και τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό των διαφορετικών θυλάκων της PBR	130
Πίνακας 49: Αμινοξική αλληλουχία του εξωνίου 2 του DQA2 . Με «T» σημειώνονται οι θέσεις που συμμετέχουν στο σχηματισμό του TCR και σημειώνονται και τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό των διαφορετικών θυλάκων της PBR	131
Πίνακας 50: Αλληλομορφικές συχνότητες του DRB1 ανά φυλή. Δείχνονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε πληθυσμό (N), τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L), ο αλληλομορφικός πλούτος (Rs), η αναμενόμενη (H.exp) και παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (H.obs)	134
Πίνακας 51: Αλληλομορφικές συχνότητες του DQA2 ανά φυλή. Δείχνονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε φυλή (N) και τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L)	135
Πίνακας 52: Κατά ζεύγη τιμές F_{ST} (επάνω) και γενετικές αποστάσεις (κάτω) για όλους τους πληθυσμούς στο DRB1	136
Πίνακας 53: Αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης για το <i>O. aries</i> , χρησιμοποιώντας τις τέσσερις κύριες φυλές δειγματοληψίας (δηλ. μπούτσικα λ.κ., μπούτσικα κ.κ., Frizarta, Comisana) ως επίπεδα ομαδοποίησης ή χωρίς ομαδοποίηση για το DRB1 . Το ποσοστό της ποικιλομορφίας, η πιθανότητα (P) υπολογισμένη από δοκιμασίες μετάθεσης (permutation tests) και το F statistics δίνονται για κάθε ιεραρχικό επίπεδο (Excoffier <i>et al.</i> , 1992). Οι ενδείξεις 3 (μπούτσικα, Comisana, Frizarta) και 2 (μπούτσικα, Frizarta) κάτω από κάθε παράμετρο υποδεικνύουν τις ομάδες πληθυσμών	137
Πίνακες 54, 55: Συνώνυμες (d_S) και μη συνώνυμες (d_N) υποκαταστάσεις ανά περιοχή (per site) και τα αποτελέσματα του Z-test για θετική επιλογή στα κωδικόνια της περιοχής πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR), των κωδικονίων εκτός PBR (non-PBR) και σε ολόκληρο το εξώνιο 2	144
Πίνακας 56: Συχνότητες των παραλλαγών του θύλακα 4 του γονιδίου DRB1 που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό	150
Πίνακας 57: Συχνότητες των παραλλαγών του θύλακα 7 του γονιδίου DRB1 που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό	150
Πίνακας 58: Συχνότητες των παραλλαγών του θύλακα 9 του γονιδίου DRB1 που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό	151
Πίνακας 59: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά φυλή για το γονίδιο DRB1	152
Πίνακας 60: Συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων του γονιδίου DQA2 που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό	153
Πίνακας 61: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά φυλή για το γονίδιο DQA2	154
Πίνακες 62, 63: Σύγκριση πολυμορφισμού για το DRB1 στα είδη <i>Sus scrofa</i> και <i>Lepus europaeus</i>	157
Πίνακας 64: Σύγκριση πολυμορφισμού για το DRB1 στα είδη <i>Sus scrofa</i> f. <i>domestica</i> και <i>Ovis aries</i>	159

Πίνακες 65, 66: Σύγκριση πολυμορφισμού για το DQA στα είδη <i>Sus scrofa</i> και <i>Lepus europaeus</i>	160
Πίνακας 67: Σύγκριση πολυμορφισμού για το DQA στα είδη <i>Sus scrofa</i> f. <i>domestica</i> και <i>Ovis aries</i>	162
Πίνακας 68: Καταγραφή του πολυμορφισμού του DRB από διάφορες μελέτες. Σημειώνονται με «*» όσες μελέτες έχουν βρει πολλαπλά αντίγραφα του DRB γονιδίου	163

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

	Σελ.
Εικόνα 1: Λειτουργικά στοιχεία των μορίων MHC τάξης I και II (Klein & O'Uigin, 1993).	9
Εικόνα 2: Δια-ειδική εξέλιξη ως συνέπεια της μεγάλης ανθεκτικότητας των αλληλομορφικών σειρών. Δύο αλληλομορφικές σειρές παρούσες σε προγονικό είδος οι οποίες μεταβιβάζονται σε καθένα από τα δύο θυγατρικά είδη. Σε αυτή την περίπτωση, το πιο συγγενικό αλληλόμορφο του ενός θυγατρικού είδους δεν βρέθηκε σε αυτό το είδος αλλά στα άλλα θυγατρικά είδη (Richman, 2000).	17
Εικόνα 3: Παγκόσμια κατανομή του <i>Lepus europaeus</i> (Flux & Angermann, 1990).	21
Εικόνα 4: Παγκόσμια κατανομή του <i>Ovis aries</i> . Όλες οι πυκνότητες είναι σε κεφάλια ανά km ² .	24
Εικόνα 5: Σχηματική παρουσίαση της δομής του <i>Ovar</i> -MHC.	26
Εικόνα 6: Σχηματική παρουσίαση της δομής της υποπεριοχής <i>Ovar</i> -DQ (Dukkipati <i>et al.</i> , 2006). Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής των γονιδίων. Οι αποστάσεις έχουν υπολογιστεί από τους Wright & Ballingall (1994).	27
Εικόνα 7: Παγκόσμια κατανομή (πράσινο) του αγριόχοιρου. Με μπλε σημειώνονται οι περιοχές που έχει γίνει εισαγωγή αγριόχοιρων (από http://en.wikipedia.org/wiki/Wild_boar).	28
Εικόνα 8: Γονιδιακός χάρτης της περιοχής <i>SLA</i> -MHC. Τα γονίδια παρουσιάζονται σε σειρά από την εκτεταμένη περιοχή της τάξης I στο χρωμόσωμα 7p1.1 έως την εκτεταμένη περιοχή της τάξης II στο 7q1.1. Με λευκό συμβολίζονται τα γονίδια που μεταγράφονται, με γκρι τα νέα μετάγραφα και με μαύρο τα ψευδογονίδια (Andon & Chardon, 2006).	31
Εικόνα 9: Χάρτης δειγματοληψίας των πληθυσμών <i>Sus scrofa</i> . Οι περιοχές συλλογής δειγμάτων δείχνονται με συντομογραφίες των χωρών και οι ακριβείς τοποθεσίες συμβολίζονται με τρίγωνο. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις (που δείχνονται ως δείκτες) δείχνουν τον αριθμό ατόμων που συλλέχθηκαν σε κάθε περιοχή. Η δειγματοληπτική πυκνότητα ήταν μεγαλύτερη στην Ελλάδα και τα ελληνικά δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε πληθυσμούς με βάση την περιοχή προέλευσης: Λάρισα (LA), Μαγνησία (MA), Ήπειρος (EP), Βόρεια Ελλάδα (Northern Greece, GR-N) και Νότια Ελλάδα (South Greece, GR-S). Τα αλληλόμορφα DRB1 που ανιχνεύθηκαν σε κάθε πληθυσμό παρουσιάζονται μόνο με τον αριθμό χωρίς το πρόθεμα <i>Susc</i> -DRB1*, και τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά για κάθε πληθυσμό κυκλώνονται. Το ένθεμα επάνω δεξιά δείχνει τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά ή μοιράζονται μεταξύ των πληθυσμών μετά από ομαδοποίηση των πληθυσμών σε τρεις κύριες ομάδες με βάση τη γεωγραφική περιοχή και την εξημέρωση, Ελλάδα (Greece), Κεντρική Ευρώπη (Europe) και οικόσιτοι χοίροι (Domestic).	37
Εικόνα 10: Χάρτης δειγματοληψίας των πληθυσμών <i>Sus scrofa</i> . Οι περιοχές συλλογής δειγμάτων δείχνονται με συντομογραφίες των χωρών και οι ακριβείς τοποθεσίες συμβολίζονται με τρίγωνο. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις (που δείχνονται ως δείκτες) δείχνουν τον αριθμό ατόμων που συλλέχθηκαν σε κάθε περιοχή. Η δειγματοληπτική πυκνότητα ήταν μεγαλύτερη στην Ελλάδα και τα ελληνικά δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε πληθυσμούς με βάση την περιοχή προέλευσης: Λάρισα (LA), Μαγνησία (MA), Ήπειρος (EP), Βόρεια Ελλάδα (Northern Greece, GR-N) και Νότια Ελλάδα (South Greece, GR-S). Τα	38

- αλληλόμορφα **DQA** που ανιχνεύτηκαν σε κάθε πληθυσμό παρουσιάζονται μόνο με τον αριθμό χωρίς το πρόθεμα Susc-DQA*. Το ένθεμα επάνω δεξιά δείχνει τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά ή μοιράζονται μεταξύ των πληθυσμών μετά από ομαδοποίηση των πληθυσμών σε τρεις κύριες ομάδες με βάση τη γεωγραφική περιοχή και την εξημέρωση, Ελλάδα (Greece), Κεντρική Ευρώπη (Europe) και οικόσπιτοι χοίροι (Domestic).
- Εικόνα 11:** Χάρτης δειγματοληψίας των πληθυσμών *Lepus europaeus*. Οι περιοχές συλλογής δειγμάτων δείχνονται με συντομογραφίες των χωρών και οι ακριβείς τοποθεσίες συμβολίζονται με τρίγωνο. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις (που δείχνονται ως δείκτες) δείχνουν τον αριθμό ατόμων που συλλέχθηκαν σε κάθε περιοχή. Η δειγματοληπτική πυκνότητα ήταν μεγαλύτερη στην Ελλάδα και τα ελληνικά δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε πληθυσμούς με βάση την περιοχή προέλευσης: Κεντρική Ελλάδα (Central Greece, GR-C), Δυτική Ελλάδα (Western Greece, GR-W), Νότια Ελλάδα (Southern Greece, GR-S), Βόρεια Ελλάδα (Northern Greece, GR-N) και Βόρειο Ανατολική Ελλάδα (North-eastern Greece, GR-NE). Τα αλληλόμορφα **DQA** που ανιχνεύτηκαν σε κάθε πληθυσμό παρουσιάζονται μόνο με τον αριθμό χωρίς το πρόθεμα Leeu-DQA*, και τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά για κάθε πληθυσμό κυκλώνονται. Το ένθεμα επάνω δεξιά δείχνει τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά ή μοιράζονται μεταξύ των πληθυσμών μετά από ομαδοποίηση των πληθυσμών σε τέσσερις κύριες ομάδες με βάση τη γεωγραφική περιοχή, Νοτιο-ανατολική Ευρώπη (SEE a, South-Eastern European area), περιοχή επικάλυψης (OVER a, Overlap area), Κεντρική Ευρώπη (CEU a, Central European area) και Ανατολή (AM a, Anatolia / Middle East area), όπως προσδιορίστηκαν από τους Stamatis *et al.* (2009). 39
- Εικόνα 12:** Χάρτης δειγματοληψίας των πληθυσμών *Lepus europaeus*. Οι περιοχές συλλογής δειγμάτων δείχνονται με συντομογραφίες των χωρών και οι ακριβείς τοποθεσίες συμβολίζονται με τρίγωνο. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις (που δείχνονται ως δείκτες) δείχνουν τον αριθμό ατόμων που συλλέχθηκαν σε κάθε περιοχή. Η δειγματοληπτική πυκνότητα ήταν μεγαλύτερη στην Ελλάδα και τα ελληνικά δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε πληθυσμούς με βάση την περιοχή προέλευσης: Κεντρική Ελλάδα (Central Greece, GR-C), Δυτική Ελλάδα (Western Greece, GR-W), Νότια Ελλάδα (Southern Greece, GR-S), Βόρεια Ελλάδα (Northern Greece, GR-N) και Βόρειο Ανατολική Ελλάδα (North-eastern Greece, GR-NE). Τα αλληλόμορφα **DRB1** που ανιχνεύτηκαν σε κάθε πληθυσμό παρουσιάζονται μόνο με τον αριθμό χωρίς το πρόθεμα Leeu-DRB1*, και τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά για κάθε πληθυσμό κυκλώνονται. Το ένθεμα επάνω δεξιά δείχνει τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά ή μοιράζονται μεταξύ των πληθυσμών μετά από ομαδοποίηση των πληθυσμών σε τέσσερις κύριες ομάδες με βάση τη γεωγραφική περιοχή, Νοτιο-ανατολική Ευρώπη (SEE a, South-Eastern European area), περιοχή επικάλυψης (OVER a, Overlap area), Κεντρική Ευρώπη (CEU a, Central European area) και Ανατολή (AM a, Anatolia / Middle East area), όπως προσδιορίστηκαν από τους Stamatis *et al.* (2009). 40
- Εικόνα 13:** Τα στάδια που ακολουθούνται σε κάθε κύκλο της PCR. (1) Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA. (2) Συγκόλληση των εκκινητών στην αλληλουχία – στόχο. (3) Δράση της πολυμεράσης για τη σύνθεση των νέων μορίων DNA. (4) Εκθετική αύξηση των αντιγράφων (από <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pcr.png>). 45
- Εικόνα 14:** Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων του επιθυμητού γονιδίου (από <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>). 46
- Εικόνα 15:** Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου SSCP. 51
- Εικόνα 16:** Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των 14 αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του **DRB1** του *Sus scrofa* (SLA-DRB1*01–14) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη, μαζί με αλληλουχίες από τη GenBank. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό υποστήριξης bootstrap (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε 81

- αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις.
- Εικόνα 17:** Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των εννέα αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του **DQA** του *Sus scrofa* (SLA-DQA*01–09) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη, μαζί με αλληλουχίες από τη GenBank. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό υποστήριξης bootstrap (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις. 82
- Εικόνα 18:** Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των 37 αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του **DQA** του *Lepus europaeus* (Leeu-DQA*14–50) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη, μαζί με αλληλουχίες από τη GenBank. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό bootstrap υποστήριξης (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις. 109
- Εικόνα 19:** Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των 57 αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του **DRB1** του *Lepus europaeus* (Leeu-DRB1*01–58) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό bootstrap υποστήριξης (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις. 111
- Εικόνα 20:** Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των 48 αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του **DRB1** του *Ovis aries* (Ovar-DRB1*55–102) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη, μαζί με αλληλουχίες από τη GenBank. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό bootstrap υποστήριξης (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις, η φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (LK), η φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι (KK), η φυλή Frizarta (FR) και η φυλή πρόγονος Μπούτσικα (IT). 140
- Εικόνα 21:** Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των 46 αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του **DQA2** του *Ovis aries* (Ovar-DQA2*01–46) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη, μαζί με αλληλουχίες από τη GenBank. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό bootstrap υποστήριξης (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις, η φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (LK), η φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι (KK), η φυλή Frizarta (FR) και η φυλή πρόγονος Μπούτσικα (IT). 142

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προσαρμοστική σημασία του γενετικού πολυμορφισμού είναι ένα θεμελιώδες ερώτημα στη βιολογία. Καλύτερη κατανόηση της σχετικής συνεισφοράς των εξελικτικών δυνάμεων απαιτεί γνώση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο γενετικό πολυμορφισμό και την αρμοστικότητα. Τα γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) συγκαταλέγονται μεταξύ των πλέον πολυμορφικών τόπων του πυρηνικού γονιδιώματος των θηλαστικών με καλά μελετημένη τη λειτουργία τους σε μοριακό επίπεδο. Το MHC είναι μία πολυγονιδιακή οικογένεια υποδοχέων που προσδέουν και παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια στα T-κύτταρα. Το πρότυπο ποικιλομορφίας σε αυτά τα γονίδια υποδεικνύει ότι αυτά επιλέγονται. Επομένως η μελέτη τους βοηθά στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η φυσική επιλογή μπορεί να διαμορφώσει τη γενετική ποικιλομορφία και προβάλλουν ως πιθανό μοντέλο για τον έλεγχο των υποθέσεων που αφορούν στις αιτίες και τις συνέπειες της επιλογής. Η μελέτη φυσικών πληθυσμών μη προτυποποιημένων ειδών με παγκόσμια εξάπλωση θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά σε αυτή την κατεύθυνση. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τα επίπεδα ενδο- και δια-πληθυσμιακού γενετικού πολυμορφισμού στο MHC σε πληθυσμούς λαγού (*Lepus europaeus*), αγριόχοιρου (*Sus scrofa scrofa*), οικόσιτου χοίρου (*Sus scrofa f. domestica*) και προβάτου (*Ovis aries*) επιλέγοντας για ανάλυση το δεύτερο εξόνιο των τόπων *DQA* και *DRB1*. Οι δύο αυτοί τόποι είναι από τους πιο πολυμορφικούς της τάξης II του MHC. Είναι γεγονός ότι η κατανόηση της γενετικής πληθυσμών αποτελεί πλέον απαραίτητη συνιστώσα στη διερεύνηση των εξελικτικών διαδικασιών. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε και για τα δύο γονίδια και για τα τρία είδη μια πλήρης πληθυσμιακή γενετική ανάλυση. Με τη μέθοδο PCR-SSCP προσδιορίστηκε ο αριθμός των αλληλομόρφων των γονιδίων *DRB1* και *DQA* σε κάθε είδος, στη συνέχεια ταυτοποιήθηκε η αλληλουχία τους και τέλος τα αποτελέσματα αυτά αναλύθηκαν *in silico* με μεθόδους βιοπληροφορικής. Σε κάθε περίπτωση το γονίδιο *DRB1* βρέθηκε να είναι πιο πολυμορφικό σε σχέση με το *DQA*. Οι δύο τόποι βρίσκονται υπό την επίδραση ισοζυγούσας επιλογής εφόσον υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός μη συνώνυμων υποκαταστάσεων ($d_N/d_S > 1$) και τα δεδομένα συνηγορούν στην συγχο-εξαρτώμενη επιλογή ως κύριο μηχανισμό δράσης. Στο *L. europaeus* παρατηρείται αξιοσημείωτος γενετικός πολυμορφισμός στο MHC με την Ανατολή να διαθέτει τα μεγαλύτερα επίπεδα. Σύμφωνα με το πρότυπο της μεταπαγετωνικής εξάπλωσης των πληθυσμών

του λαγού, οι πληθυσμοί της βόρειας Ευρώπης θα πρέπει να διαθέτουν χαμηλότερα ποσοστά πολυμορφισμού σε σχέση με τα Νότια καταφύγια (Βαλκάνια, Ανατολία), όπως έδειξαν και οι αναλύσεις του μιτοχονδριακού DNA. Ωστόσο και οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί δείχνουν σταθερά επίπεδα υψηλού πολυμορφισμού στο MHC, γεγονός που αποδίδεται στην ισοζυγούσα επιλογή. Αντίθετα, στο *S. scrofa* παρατηρείται χαμηλός πολυμορφισμός, που εξηγείται μερικώς αφενός από φαινόμενα στενωπού στο παρελθόν του αγριόχοιρου και αφετέρου από την εξημέρωση στον οικόσιτο χοίρο. Παράλληλα θα πρέπει να ξεκαθαριστεί ο ρόλος των Βαλκανίων στην εξημέρωση και στη διαμόρφωση της ποικιλομορφίας του χοίρου. Τέλος, στο *O. aries* καταγράφηκαν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και για τα δύο γονίδια και σε αυτή τη μελέτη και οι αιτίες πρέπει να αναζητηθούν σε παθογόνους παράγοντες, άλλους γεωγραφικούς ή κοινωνικούς παράγοντες και στην περιβαλλοντική ετερογένεια. Τα συνολικά δεδομένα δείχνουν ότι το MHC δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της φυλογεωγραφίας καθώς σε καμία περίπτωση τα αλληλομόρφα των γονιδίων δεν εμφάνισαν ισχυρό φυλογεωγραφικό σήμα. Η δια-ειδική εξέλιξη του MHC είναι διάχυτη σε όλα τα φυλογενετικά δέντρα. Οι θύλακες πρόσδεσης πιθανόν να ανταποκρίνονται σε επιλεκτικές πιέσεις με ένα τρόπο που να εξαρτάται από το ρόλο τους στην πρόσδεση πεπτιδίων ενώ και στα δύο γονίδια υπάρχουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου με κοινά κατάλοιπα και στα τρία είδη. Οι συσχετίσεις των διαφόρων αλληλομόρφων με ανθεκτικότητα ή ευαισθησία σε ασθένειες είναι μεγάλης πρακτικής σημασίας επειδή μπορεί να δώσει δείκτες για γενετική επιλογή ανθεκτικών ατόμων και φυλών, με σημαντικές εφαρμογές στην εκτροφή χοίρων και προβάτων.

ABSTRACT

The importance of adaptive genetic polymorphisms is a fundamental and unsolved issue in biology. Improved understanding of the relative contribution of evolutionary forces requires knowledge of interactions between genetic polymorphisms and adaptation. Major histocompatibility complex (MHC) genes are among the most polymorphic loci in nuclear genome of mammals, and their function is well studied at the molecular level. MHC is a multigene receptor family that binds and presents antigenic peptides to T-cells. Diversity in these genes indicates that they are selected. Hence their study helps in understanding the role of natural selection in the shaping of genetic polymorphisms and is considered as a possible model for testing the hypothesis for the reasons and consequences of selection. The study of natural populations of non-model species with cosmopolitan distribution could contribute in this direction. In this study intra- and inter-population genetic polymorphisms within the second exon of *DQA* and *DRBI* loci in MHC have been examined in hares (*Lepus europaeus*), wild boars (*Sus scrofa scrofa*), domestic pigs (*Sus scrofa* L. *domestica*) and sheeps (*Ovis aries*). These two loci are among the most polymorphic in MHC class II genes. For this reason, were performed a complete population genetic analysis of both genes in all three species. PCR-SSCP was used to define the *DRBI* and *DQA* alleles in each species, followed by identification of their sequences. Results were analyzed *in silico* with bioinformatics methods. In each species *DRBI* was more polymorphic than *DQA*. These two loci are under the influence of balancing selection, indicated by excess of non-synonymous substitutions ($d_N/d_S > 1$). The data suggest frequency-dependent selection as a major mechanism. In *L. europaeus* there is remarkable genetic polymorphism in MHC with Anatolia exhibiting the greatest levels. According to the post-glaciation distribution pattern of hare, North-European populations should hold lower numbers of polymorphisms compared to South refugia (Balkan, Anatolia) as has been shown by mitochondrial DNA analysis. However, European populations appeared to be highly polymorphic at NHC, attributed to balancing selection. Conversely, *S. scrofa* exhibits reduced polymorphisms and that is partly explained both from bottleneck effects in recent wild boar past and from pig domestication. In parallel, has to be disentangled the role of Balkan Peninsula in pig domestication and in shaping boar diversity. Finally, both genes exhibit increased polymorphism in *O. aries* and the reasons have to be attributed to pathogens,

geographic or social factors and environmental heterogeneity. The data indicate that MHC cannot be used in phylogeography studies as gene alleles show weak phylogeographic signal. Trans-species evolution of MHC is pervasive in all phylogenetic trees. Binding pockets are possible to respond to selection forces in a way that depends on their role in peptide binding whereas in both genes there are charged amino acid substitutions with common residues in all three species. The correlation of different alleles with disease resistance or susceptibility is of great practical importance because markers for genetic selection could be developed for individuals and races, with important applications in pig and sheep breeding.

Εισαγωγή

Ολα τα είδη θηλαστικών που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα έχουν μια στενά συνδεδεμένη συστοιχία γονιδίων, το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (**M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex-MHC), του οποίου τα προϊόντα παίζουν ρόλο στη διακυτταρική αναγνώριση και στη διάκριση μεταξύ των οικείων αντιγόνων (self) και ξένων αντιγόνων (nonself) (Goldsby *et al.*, 2003). Από τα αρχαία χρόνια οι ιατρικοί παρατηρητές είχαν αντιληφθεί ότι το σώμα δείχνει να έχει δυνάμεις ώστε να προστατεύεται και να δείχνει ανθεκτικότητα στις ασθένειες. Σήμερα, είναι γνωστό ότι το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ο βιολογικός μηχανισμός άμυνας του σώματος που το προστατεύει από ξένους και βλαβερούς εισβολείς. Μόλις τον τελευταίο αιώνα ανακαλύφθηκαν τα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος και ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί το σύστημα αυτό.

Το ανοσοποιητικό σύστημα προστατεύει το σώμα από πιθανώς βλαβερές ουσίες, αναγνωρίζοντας και απαντώντας στα αντιγόνα. Τα αντιγόνα είναι μεγάλα μόρια (συνήθως πρωτεΐνες) στην επιφάνεια των κυττάρων, ιοί, μύκητες ή βακτήρια. Οι ουσίες όπως οι τοξίνες (συστατικά που παράγονται από τα ζώα και από τα φυτά και είναι δηλητηριώδη για τον άνθρωπο· οι περισσότερες τοξίνες που είναι βλαβερές για τον άνθρωπο εκκρίνονται από μικροοργανισμούς όπως τα βακτήρια και οι ιοί), τα χημικά, τα φάρμακα και τα ξένα σωματίδια (όπως μία αγκίδα) μπορούν να είναι αντιγόνα.

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 άμυνας απέναντι στα μικρόβια. Η φυσική ή μη ειδική ανοσία αναφέρεται στο γεγονός ότι ο τύπος αυτός άμυνας του ξενιστή υπάρχει πάντα σε υγιή άτομα ώστε να εμποδίσει την είσοδο ή να απομακρύνει γρήγορα τους μικροοργανισμούς που εισήλθαν στους ιστούς του ξενιστή. Η επίκτητη ή ειδική ανοσία είναι ο τύπος άμυνας του ξενιστή που διεγείρεται από τους μικροοργανισμούς που εισβάλλουν στους ιστούς και προσαρμόζεται στην παρουσία μικροβιακών εισβολέων (Abbas & Lichtman, 2004).

Υπάρχουν δύο τύποι επίκτητης ανοσίας, **η χυμική ανοσία και η κυτταρική ανοσία**. Στη χυμική ανοσία εξουδετερώνονται οι εξωκυτταριοί μικροοργανισμοί από τις πρωτεΐνες που ονομάζονται αντισώματα και παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα. Τα αντισώματα εκκρίνονται στα σωματικά υγρά και εξουδετερώνουν τους

μικροοργανισμούς και τις τοξίνες τους. Στην κυτταρική ανοσία εξουδετερώνονται οι ενδοκυττάριοι μικροοργανισμοί και στη διαδικασία αυτή μεσολαβούν τα T-λεμφοκύτταρα. Μεταξύ των λεμφοκυττάρων, τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα (T_H) ονομάζονται βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα επειδή βοηθούν τα B-λεμφοκύτταρα να παράγουν αντισώματα και τα φαγοκύτταρα να καταστρέφουν τους μικροοργανισμούς που έχουν ήδη φαγοκυτταρώσει. Τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα ονομάζονται κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (T_C) επειδή φονεύουν κύτταρα που φέρουν ενδοκυττάριους μικροοργανισμούς (προκαλούν λύση των κυττάρων) (Abbas & Lichtman, 2004).

Οι επίκτητες ανοσοαπαντήσεις ξεκινούν με την αναγνώριση του αντιγόνου από τους αντιγονικούς υποδοχείς των λεμφοκυττάρων. Οι αντιγονικοί υποδοχείς των B λεμφοκυττάρων (τα αντισώματα) αναγνωρίζουν μία μεγάλη ποικιλία μακρομορίων (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα) αλλά και μικρομοριακές χημικές ουσίες. Τα περισσότερα T λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν μόνο πεπτιδικά τμήματα πρωτεϊνικών αντιγόνων και μόνο όταν παρουσιάζονται από εξειδικευμένα μόρια παρουσίασης, που βρίσκονται στα κύτταρα του ξενιστή (Abbas & Lichtman, 2004).

Αυτός ακριβώς είναι ο ρόλος των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Η πλειονότητα των T λεμφοκυττάρων αναγνωρίζει πεπτιδικά αντιγόνα που είναι συνδεδεμένα με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs, δένδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, λεμφοζιδιακά δένδριτικά κύτταρα) και παρουσιάζονται από αυτά (Abbas & Lichtman, 2004, Klein, 1986). Ενώ τα αντισώματα μπορούν να αντιδρούν μόνο με τα αντιγόνα, τα περισσότερα T κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα μόνο όταν είναι συνδεδεμένα με ένα μόριο του MHC (Goldsby *et al.*, 2003). Ακόμη, εκτός της απόκρισης των T κυττάρων στα αντιγόνα, τα μόρια του MHC είναι σημαντικά και για την ωρίμανση των πρόδρομων T κυττάρων στο θύμο αδέν. Ο κεντρικός ρόλος των μορίων του MHC στις αλληλεπιδράσεις των T κυττάρων αναφέρεται ως MHC περιορισμός των T κυτταρικών απαντήσεων (Coico *et al.*, 2003).

Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC)

Ο όρος μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας προκύπτει από προηγούμενη έρευνα στην αποδοχή ή στην απόρριψη ιστών, την ιστοσυμβατότητα, που μεταμοσχεύτηκαν μεταξύ διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους (Gorer, 1937). Η ιδέα ότι η απόρριψη ξένων ιστών είναι το αποτέλεσμα μιας ανοσολογικής απόκρισης σε μόρια της κυτταρικής επιφάνειας προέκυψε από την έρευνα του Peter Issac Gorer στο Lister Institute του Λονδίνου το 1937. Ο Gorer χρησιμοποιούσε ομομικτικά στελέχη ποντικών για να προσδιορίσει τα αντιγόνα των ομάδων αίματος. Στην πορεία της μελέτης, ταυτοποίησε τέσσερις ομάδες γονιδίων, που τις όρισε ως I έως IV, οι οποίες κωδικοποιούσαν αντιγόνα κυττάρων του αίματος. Η έρευνα που εκτελούνταν τις δεκαετίες 1940 και 1950 από τους Gorer και George Snell στοιχειοθέτησε ότι αντιγόνα που κωδικοποιούνταν από γονίδια στην ομάδα που ονομάστηκε II έπαιρνε μέρος στην απόρριψη των μεταμοσχευμένων όγκων και άλλων ιστών (Gorer *et al.*, 1948). Ο Snell ονόμασε αυτά τα γονίδια «γονίδια ιστοσυμβατότητας». Αν και ο Gorer απεβίωσε πριν αναγνωριστεί πλήρως η συνεισφορά του, ο Snell τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1980 για την εργασία του (Goldsby *et al.*, 2003). Άλλες μελέτες υποδείκνυαν ότι τα T κύτταρα έπαιζαν σημαντικό ρόλο στην απόρριψη του μοσχεύματος. Λαμβάνοντας υπ' όψιν αυτά τα δεδομένα και συνδέοντάς τα με τα αποτελέσματα των Gorer και Snell, υποδηλώνεται η ύπαρξη μίας σύνδεσης με τα μόρια που κωδικοποιούνται από τα γονίδια του MHC και τις T κυτταρικές απαντήσεις (Coico *et al.*, 2003). Επειδή τα άτομα δεν υφίστανται υπό φυσιολογικές συνθήκες μεταμοσχεύσεις, η λειτουργία του MHC στις «καθημερινές» T κυτταρικές απαντήσεις έγινε το επίκεντρο εντατικής μελέτης. Έτσι, από τη δεκαετία του 1970 προέκυψε μια πιο σαφής εικόνα του ρόλου των μορίων του MHC στις T κυτταρικές απαντήσεις σε ένα άτομο (Zinkernagel & Doherty, 1974).

Ιστορικά το MHC των θηλαστικών χωρίζεται σε **3 τάξεις**. Η **περιοχή τάξης I** κωδικοποιεί τα πολυμορφικά, κλασικά γονίδια τάξης I (ή τάξης Ia), δύο σειρές από μη κλασικά γονίδια τάξης I (ή τάξης Ib) και άλλα γονίδια που δε σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα (Flajnik & Kasahara, 2001). Η **περιοχή τάξης II** περιέχει τα πολυμορφικά τάξης II α και β γονίδια, όπως επίσης και γονίδια που κωδικοποιούν τη γ-ιντερφερόνη, επαγώγιμα συστατικά του πρωτεασώματος (LMP2 και LMP7) και μεταφορείς που σχετίζονται με την επεξεργασία των αντιγόνων (TAP1 και TAP2) που εμπλέκονται στην παραγωγή και μεταφορά των πεπτιδίων που προσδένονται στα

μόρια τάξης Ia, αντίστοιχα. Η αποκαλούμενη «εκτεταμένη περιοχή τάξης II» περιλαμβάνει κυρίως γονίδια μη σχετιζόμενα με την ανοσοποίηση αλλά κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που προσδένεται στην TAP (TAPBP) η οποία είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση της τάξης Ia, και την RXRB, ένα μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την έκφραση της τάξης I. Η κεντρική **περιοχή τάξης III** είναι η πιο πυκνή σε γονίδια και το πιο καλά συντηρημένο τμήμα του MHC στα θηλαστικά, με την παρουσία διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στη φυσική/επίκτητη ανοσία όπως το συστατικό του συμπληρώματος C4 και τον παράγοντα B (Bf), τον παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF), και την HSP70 (Flajnik & Kasahara, 2001). Ωστόσο, υπάρχουν πολλά γονίδια σε αυτή την περιοχή που δεν έχουν κάποιο ρόλο στις ανοσολογικές αποκρίσεις (Aguado *et al.*, 1996, Milner & Campbell, 2001, Xie *et al.*, 2003). Η περιοχή τάξης III, και συγκεκριμένα το τμήμα που γειτνιάζει με την περιοχή τάξης I, έχει βαπτιστεί ως η «φλεγμονώδης περιοχή» και έχει προταθεί ότι η σύνδεση αυτών των γονιδίων μεταξύ τους καθώς και με τα γονίδια τάξης I και II είναι κατά κάποιο τρόπο πλεονεκτική (Gruen & Weissman, 1997). Ωστόσο, δεν υπάρχει ακόμη κάποια ένδειξη που να υποστηρίζει το μοντέλο ότι αυτά τα γονίδια πρέπει να συνδέονται, εφόσον πολλά γονίδια της τάξης III δεν έχουν προφανή σύνδεση με τη φυσική ή την επίκτητη ανοσία (Klein & Sato, 1998). Αυτή η ομαδοποίηση των γονιδίων θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα μιας προηγούμενης θετικής επιλογής που έφερε τα γονίδια μαζί, ακολουθούμενη από συντηρητική επιλογή (conservative selection) που έδρασε ενάντια στο διαχωρισμό αυτών των τόπων (Trowsdale & Powis, 1992). Εξαιτίας της απουσίας σύνδεσης της τάξης III με τη φυσική ή την επίκτητη ανοσία (Klein & Sato, 1998) των οργανισμών, ο ρόλος της και η εξέλιξή της δεν θα αναλυθούν περαιτέρω.

Δομή και Εξέλιξη του MHC

Το MHC είναι η πλέον πυκνή περιοχή του γονιδιώματος των θηλαστικών (Xie *et al.*, 2003) και κωδικοποιεί ένα σύνολο από γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα (Benacerraf, 1981, Snell, 1981) καθώς και γονίδια που δε σχετίζονται με αυτό (MHC Sequencing Consortium, 1999). Περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό γονιδίων τα οποία μπορούν να χωριστούν με βάση τη λειτουργία τους 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 τάξης II είναι έμφυτα χαρακτηριστικά του MHC και έχουν βρεθεί σε όλα τα γναθοστόματα σπονδυλωτά που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών εξελίχθηκε στις γαστροεντερικές περιοχές των πρώτων γναθοστόματων ψαριών εξαιτίας των αυξημένων τοπικών τραυματισμών και λοιμώξεων που αναπόφευκτα προέκυψαν από τη νέα δομή της γνάθου και το θηρευτικό τρόπο ζωής (Matsunaga & Rahman, 1998).

Τα γονίδια τάξης Ia και II έχουν χαρακτηριστικά που τα ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα γονίδια του MHC. Συγκεκριμένα, τα μόρια αυτά είναι γλυκοπρωτεΐνες στην κυτταρική επιφάνεια και παρουσιάζουν αντιγόνα στα T κύτταρα. Τα γονίδια MHC τάξης I εκφράζονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων σε διάφορα επίπεδα και αναλαμβάνουν την παρουσίαση πεπτιδικών αντιγόνων στα T_C κύτταρα. Τα γονίδια MHC τάξης II έχουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης καθώς εκφράζονται κατά κύριο λόγο στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και B κύτταρα) από όπου και παρουσιάζουν επεξεργασμένα αντιγονικά πεπτίδια στα T_H κύτταρα (Goldsby *et al.*, 2003).

Το ανθρώπινο MHC βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και ονομάζεται HLA (**H**uman **L**eukocyte **A**ntigen, Ανθρώπινα Λευκοκυτταρικά Αντιγόνα). Πιο ειδικά βρίσκεται στην περιοχή 6p21.3 σε μία χρωμοσωμική ζώνη R (reverse) που είναι λιγότερο συμπιεσμένες από τις ζώνες G (Giemsa) της χρωματίνης και είναι γενικά πιο πλούσιες σε γονίδια και περιέχουν περισσότερο μεταγραφικά ενεργά γονίδια (Kumánovics *et al.*, 2003). Υπάρχουν τρία πολυμορφικά γονίδια τάξης I στον άνθρωπο, και είναι γνωστά αυτά καθώς και τα πρωτεϊνικά τους μόρια ως HLA-A, HLA-B και HLA-C. Υπάρχουν τρεις ομάδες πολυμορφικών γονιδίων τάξης II, τα HLA-DR, HLA-DQ και HLA-DP. Κάθε υποπεριοχή του MHC τάξης II περιέχει ένα A και ένα B γονίδιο τα οποία κωδικοποιούν για μία αλυσίδα, την α και β αντίστοιχα, για το ένα μόριο με δύο αλυσίδες του MHC τάξης II (Coico *et al.*, 2003). Τόσο τα μόρια τάξης I όσο και τα μόρια τάξης II εκφράζονται συγκυρίαρχα, που σημαίνει ότι κάθε κύτταρο που εκφράζει τα μόρια MHC, εκφράζει πρωτεΐνες που μεταγράφονται και από το μητρικό αλλά και από το πατρικό χρωμόσωμα. Συνεπώς, εξαιτίας της

συγκυρίαρχης έκφρασης, κάθε κύτταρο μέσα σε ένα άτομο εκφράζει μέχρι έξι διαφορετικά μόρια HLA τάξης I. Υπάρχουν επίσης τρεις ομάδες πολυμορφικών γονιδίων τάξης II, αλλά στην περίπτωση αυτή και η α και η β αλυσίδα 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 έως 20 διαφορετικά μόρια MHC (Coico *et al.*, 2003, Abbas & Lichtman, 2004). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι συχνά οι υποπεριοχές DP και DQ έχουν περισσότερα από ένα γονίδια A και B, και η υποπεριοχή DR έχει περισσότερα από ένα B γονίδια. Συνεπώς, μία υποπεριοχή μπορεί να συνθέσει περισσότερα από ένα $\alpha\beta$ πολυπεπτίδια (Coico *et al.*, 2003).

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. Και οι δύο κατηγορίες μορίων είναι ετεροδιμερή των οποίων το εξωκυττάριο τμήμα αποτελείται από δύο πολυμορφικές περιοχές που προσδένουν τα αντιγόνα και δύο υψηλά συντηρημένες περιοχές που προσδένονται στη μεμβράνη (Εικόνα 1). Ωστόσο, αυτή η βασική δομή επιτυγχάνεται διαφορετικά στις δύο τάξεις (Coico *et al.*, 2003, Goldsby *et al.*, 2003).

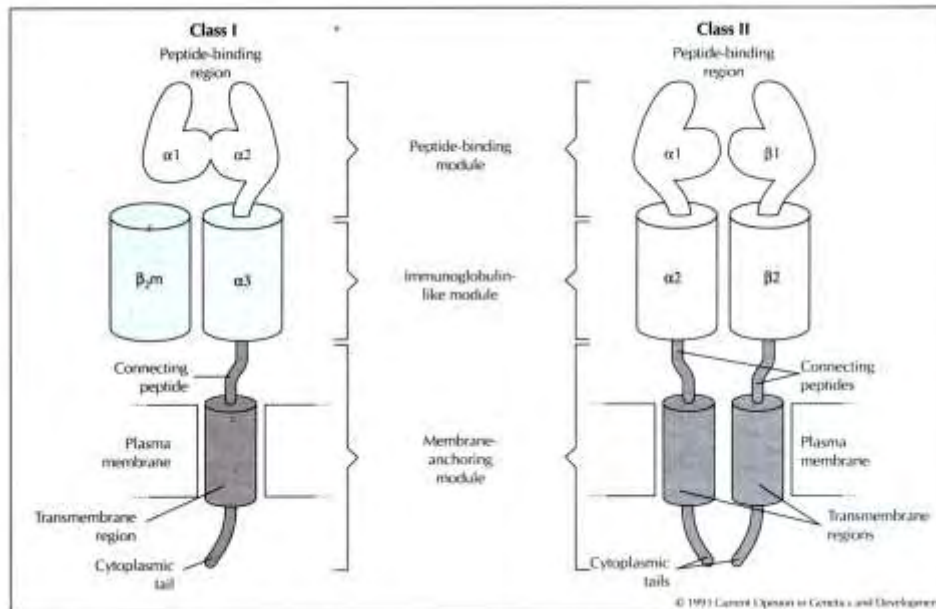
Στα **μόρια τάξης I** η βαριά αλυσίδα (τάξης I α) περιέχει δύο περιοχές πρόσδεσης του πεπτιδίου (**P**eptide **B**inding **R**egion-PBR) τις α_1 και α_2 , και μία συντηρημένη περιοχή (α_3). Η α αλυσίδα συνδέεται μη ομοιοπολικά με ένα μικρό μη πολυμορφικό πεπτίδιο τη β_2 -μικροσφαιρίνη (β_2m) το γονίδιο της οποίας βρίσκεται σε διαφορετικό χρωμόσωμα και είναι μέλος της υπερικογένειας Ig. Έτσι, στην κυτταρική επιφάνεια το MHC τάξης I μαζί με τη β_2m έχουν την εμφάνιση ενός μορίου με τέσσερις περιοχές (Εικόνα 1), με την α_3 περιοχή του μορίου MHC τάξης I και τη β_2m να είναι τοποθετημένες δίπλα δίπλα, πολύ κοντά στη μεμβράνη (Coico *et al.*, 2003, Abbas & Lichtman, 2004). Τα αμινοτελικά τμήματα των περιοχών α_1 και α_2 του μορίου MHC τάξης I σχηματίζουν την αύλακα σύνδεσης του πεπτιδίου, η οποία είναι αρκετά μεγάλη ώστε να εφαρμόζουν πεπτίδια οκτώ έως 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. Τα πολυμορφικά αμινοξέα των μορίων τάξης I, δηλαδή

τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των μορίων MHC διαφορετικών ατόμων, εντοπίζονται στις περιοχές α_1 και α_2 της α αλυσίδας (Coico *et al.*, 2003, Goldsby *et al.*, 2003, Abbas & Lichtman, 2004). Η περιοχή α_3 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, αντίθετα οι λειτουργίες των μη κλασικών γονιδίων τάξης I είναι διάφορες (O'Callaghan & Bell, 1998, Williams *et al.*, 2002).

Στα **μόρια τάξης II** κάθε μία από τις δύο αλυσίδες (α και β) περιλαμβάνει μία περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου (**P**eptide **B**inding **R**egion-PBR) την α_1 και β_1 αντίστοιχα, και μία συντηρημένη περιοχή την α_2 και β_2 αντίστοιχα. Τα αμινοτελικά τμήματα και των δύο αλυσίδων, οι περιοχές α_1 και β_1 , περιέχουν πολυμορφικά αμινοξέα και σχηματίζουν μία αύλακα αρκετά μεγάλη ώστε να εφαρμόζουν πεπτίδια μήκους εννέα έως 22 αμινοξέων (Εικόνα 1). Συσσωρευτικά κρυσταλλογραφικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η PBR σχηματίζεται από τις α_1 και β_1 περιοχές και αποτελείται από δύο α -έλικες που ενώνονται με ένα β -φύλλο (McFarland & Beeson, 2002). Το αντιγονικό πεπτίδιο τοποθετείται στο β -φύλλο μεταξύ των δύο α -ελίκων και προσδέεται ειδικά μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καταλοίπων του αντιγονικού πεπτιδίου στις θέσεις 1, 4, 6, 7 και 9 με κατάλοιπα που ορίζονται ως άγκυρες (anchor) σε θύλακες δέσμευσης (binding **P**ocket-**P**, P1, P4, P6, P7 και P9 αντίστοιχα) που σχηματίζονται στην αύλακα. Το εξωκυτταρικό τμήμα φέρει περιοχές που μοιάζουν με την Ig, ενώ τα μόρια MHC τάξης II είναι μέλη της υπερικογένειας Ig. Η μη πολυμορφική περιοχή β_2 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 πεπτίδια που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης II (Villadangos, 2001). Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα πεπτίδια που συνδέονται σε διαφορετικά μόρια MHC τάξης II επιδεικνύουν μοτίβα, και συνήθως τα αντιγονικά πεπτίδια είναι πιο μεγάλα και πολυμορφικά από αυτά που συνδέονται στα μόρια MHC τάξης I. Έτσι, το μοτίβο παρατηρείται στην κεντρική περιοχή του πεπτιδίου, την περιοχή που ταιριάζει μέσα στην αύλακα πρόσδεσης του MHC τάξης II (Coico *et al.*, 2003, Goldsby *et al.*, 2003, Abbas & Lichtman, 2004).

Δεν υπάρχει ένας καθορισμένος πρόγονος για το αρχέτυπο γονίδιο του MHC. Σύμφωνα με μία υπόθεση τα γονίδια του MHC τάξης II εξελίχθηκαν πρώτα (Hughes

& Nei, 1993), ενώ μία άλλη υπόθεση υποστηρίζει ότι το MHC τάξης I προήλθε πρώτο ως αποτέλεσμα ανασυνδυασμού ανάμεσα σε μία μη μεταβλητή περιοχή ανοσοσφαιρίνης και σε μία περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίου της πρωτεΐνης θερμικού σοκ HSP70 (Flajnik *et al.*, 1991).



Εικόνα 1: Λειτουργικά στοιχεία των μορίων MHC τάξης I και II (Klein & O'Uigin, 1993).

Μία φυλογενετική ανάλυση των μη μεταβλητών περιοχών (C-περιοχές) του MHC υποστηρίζει ότι υπάρχει μία σχέση μεταξύ της α αλυσίδας των μορίων MHC τάξης II και της β_2 -μικροσφαιρίνης, καθώς και ανάμεσα στη β αλυσίδα των μορίων MHC τάξης II και της α αλυσίδας των μορίων MHC τάξης I (Hughes & Nei, 1993). Οι περισσότερες ενδείξεις υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το προγονικό μόριο MHC είχε δομή όμοια με αυτή του μορίου τάξης II και από αυτό προήλθαν τα μόρια του MHC τάξης I (Hughes & Nei, 1993, Lawlor *et al.*, 1990, Klein *et al.*, 1993). Σύμφωνα, λοιπόν, με την επικρατούσα άποψη, ότι το MHC τάξης II προήλθε πρώτο, η αλυσίδα α της τάξης I προήλθε με ένα φαινόμενο ανασυνδυασμού που ένωσε σε ένα γονίδιο το εξόνιο που κωδικοποιεί την α_1 περιοχή του MHC τάξης II και τα εξόνια που κωδικοποιούν τις περιοχές β_1 και β_2 του MHC τάξης II (Hood *et al.*, 1985, Kaufman, 1988, Lawlor *et al.*, 1990). Αυτό ακόμα, ωστόσο, δεν εξηγεί την προέλευση του πρώτου γονιδίου MHC.

Και σε αυτό το σημείο η επικρατέστερη θεωρία είναι ότι το πρώτο μόριο MHC τάξης II ήταν ένα ομοδιμερές από δύο αλυσίδες β , του οποίου το γονίδιο διπλασιάστηκε και απέκλινε έτσι ώστε να δώσει το συγγενικό ετεροδιμερές τάξης II.

Στη συνέχεια υπήρξε μία αναδιάταξη εξονίων, η οποία τοποθέτησε το εξόνιο α_1 της τάξης II μπροστά από το γονίδιο β τάξης II για να δημιουργηθεί το πρωταρχικό γονίδιο της α αλυσίδας της τάξης I, αφήνοντας την α_2 περιοχή της τάξης II και τα άλλα εξόνια της περιοχής 3' πίσω για να σχηματιστεί το πρωταρχικό γονίδιο $\beta 2m$. Ένα ακόμη περίπλοκο συμβάν πιθανόν να έχει συμβεί, μετακινώντας τη $\beta 2m$ έξω από το MHC την ίδια χρονική στιγμή. Ωστόσο η αλλαγή δε χρειάζεται να ήταν μεγάλη: όλα τα γνωστά γονίδια α/β τάξης II έχουν αντίθετο μεταγραφικό προσανατολισμό, μία απλή αναστροφή και μετάλλαξη σε μία θέση αποδέκτη συρραφής (splice acceptor) θα μπορούσε να συμβεί πολλές φορές. Στην αποσαφήνιση της προέλευσης του MHC θα βοηθούσε πολύ η μελέτη μη θηλαστικών σπονδυλωτών ωστόσο η συγκεκριμένη έρευνα παρουσιάζει δυσκολίες (Kaufman *et al.*, 1990). Πρέπει ωστόσο, να σημειωθεί ότι το πρώτο μόριο MHC άσχετα εάν έμοιαζε δομικά με τα μόρια τάξης I ή II θα είχε προφανώς λειτουργία και κατανομή όμοια με αυτή των μορίων τάξης I έτσι ώστε να προστατεύονται όλα τα κύτταρα από ιικές επιθέσεις (Flajnik & Kasahara, 2001).

Τα γονίδια του MHC τάξης I και II έχουν απομονωθεί από όλα τα γναθοστόματα σπονδυλωτά που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα με τους χονδριχθούς (π.χ. καρχαρίες) να είναι η παλαιότερη ομάδα (Flajnik & Kasahara, 2001). Ομοιότητες σε δομικά χαρακτηριστικά δείχνουν ότι οι καρχαρίες έχουν γονίδια τάξης I και γονίδια α και β τάξης II που κωδικοποιούν για τα κλασικά αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια (Bartl, 1998). Συνεπώς, το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα προέκυψε σε προγονικά είδη των γναθοστόματων σπονδυλωτών περίπου 500 εκατομύρια χρόνια πριν και άρα αποτελεί ένα νέο απόκτημα της σειράς των σπονδυλωτών. Είναι εξαιρετικού ενδιαφέροντος για την ανοσολογία και την εξελικτική βιολογία το ερώτημα, πώς μέσα σε ένα πολύ μικρό διάστημα του εξελικτικού χρόνου προέκυψε ένα τέτοιο περίπλοκο και ενιαίο σύστημα (Cannon *et al.*, 2004).

Ένα άλλο ερώτημα που εγείρεται είναι πώς αποκτήθηκε η σημερινή οργάνωση του MHC. Έχει βρεθεί ότι το γονιδίωμα των θηλαστικών περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις χρωμοσωμικές περιοχές παράλογες με το MHC. Παράλογες περιοχές ορίζονται ως τα χρωμοσωμικά τμήματα που περιλαμβάνουν στενά συνδεδεμένα ζεύγη διπλασιασμένων γονιδίων. Τα παράλογα γονίδια είναι γονίδια μέσα στο ίδιο είδος που έχουν προκύψει από το ίδιο προγονικό γονίδιο με

διπλασιασμό και απόκλιση στην πορεία της εξέλιξης (Comparative Genome Organization, 1996). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η περιοχή του MHC προέκυψε σαν αποτέλεσμα αρχαίων χρωμοσωμικών διπλασιασμών που προφανώς έλαβαν χώρα σε ένα κοινό πρόγονο των γναθοστόματων σπονδυλωτών (Kasahara, 1999). Για την ύπαρξη των τεσσάρων παράλογων περιοχών απαιτούνται τουλάχιστον δύο γύροι διπλασιασμού. Είναι πιθανό ότι ο ένας γύρος διπλασιασμού συνέβη σε ένα κοινό πρόγονο όλων των γναθοστόματων και άγναθων σπονδυλωτών, και ο άλλος σε ένα κοινό πρόγονο των γναθοστόματων σπονδυλωτών μετά το διαχωρισμό τους από τους άγναθους ιχθύες (Kasahara, 1999, Flajnik & Kasahara, 2001).

Η ομοιότητα του MHC με άλλες τρεις χρωμοσωμικές περιοχές θα μπορούσε να είναι το υπόλειμμα αρχαίων διπλασιασμών μεγάλης κλίμακας που συνέβησαν κατά τη διάρκεια δύο γύρων τετραπλοειδίας που έλαβε χώρα κατά την εξέλιξη των χορδωτών και πριν την ακτινωτή εξέλιξη των γναθοστόματων σπονδυλωτών. Μία από αυτές τις τετραπλασιασμένες περιοχές, απαλλαγμένη από λειτουργικούς φραγμούς, έδωσε το MHC με ένα γρήγορο γύρο cis-διπλασιασμών και cis-αναδιατάξεων εξονίων, που επέτρεψαν την εμφάνιση νέων γονιδίων που συμμετέχουν σε νέες βιολογικές λειτουργίες όπως η επίκτητη ανοσολογική απάντηση (Abi Rached *et al.*, 1999). Στην αποσαφήνιση αυτού του ερωτήματος θα βοηθούσε η εκτενής μελέτη των «προδιπλασιασμένων MHC» στα άγναθα σπονδυλωτά και στα ασπόνδυλα. Είναι σίγουρο πάντως ότι μερικά από τα γονίδια του MHC εξαιτίας της λειτουργίας τους τείνουν να διατηρούν σταθερή την περιοχή ενώ άλλα συμβάλλουν στην εξέλιξή της. Έτσι, στο MHC υπάρχουν δύο αντίθετες επιλεκτικές δυνάμεις, και αυτός ο «εξελικτικός πόλεμος» κάνει αυτή την περιοχή ένα ενδιαφέρον μοντέλο για τους εξελικτικούς βιολόγους (Abi Rached *et al.*, 1999).

Η **συγκριτική γονιδιωματική** των MHC διαφόρων ειδών θα βοηθούσε στην κατανόηση της οργάνωσης του MHC. Για το λόγο αυτό γίνονται προσπάθειες κατασκευής χαρτών MHC σε διάφορα είδη όπως στον άνθρωπο (Beck & Trowsdale, 2000, MHC Sequencing Consortium, 1999), στον αρουραίο (Walter *et al.*, 2002), στο χοίρο (Chardon *et al.*, 2000), στο σκύλο (Wagner, 2003), στο άλογο (Gustafson *et al.*, 2003), στο πρόβατο (Scott *et al.*, 1987), ενώ τα τελευταία χρόνια κατασκευάζονται χάρτες και σε άλλα είδη όπως στο πάντα *Ailuropoda melanoleuca* (Wan *et al.*, 2009) και σε μαρσιποφόρα ζώα, π.χ. στο *Monodelphis domestica* (Belov *et al.*, 2006).

Ακόμη υπάρχει ο μοριακός χάρτης του MHC του κοτόπουλου που δείχνει το ελάχιστο MHC (Guillemot *et al.*, 1988, Kaufman *et al.*, 1995). Το MHC του ορτυκιού και του σπουργιτιού έχουν παρόμοιο περιεχόμενο και οργάνωση με αυτά του κοτόπουλου αν και είναι διπλά σε μέγεθος και αριθμό γονιδίων μέσω γονιδιακού αναδιπλασιασμού και δείχνει ότι δεν έχουν όλα τα πτηνά το μοντέλο του ελάχιστου MHC όπως το κοτόπουλο (Freeman-Gallant *et al.*, 2002; Shiina *et al.*, 1999, 2004). Οι γενετικοί τόποι του MHC δεν υπάρχουν πάντα σε μία στενά συνδεδεμένη συστοιχία όπως στα θηλαστικά, αλλά μπορεί να βρεθούν σε δύο (π.χ. στο κοτόπουλο, Miller *et al.*, 1994) ή σε περισσότερες συστοιχίες (π.χ. ψάρι *Danio rerio*, Bingulac-Popovic *et al.*, 1997). Τέλος, υπάρχουν λίγα δεδομένα σχετικά με την οργάνωση του MHC στα ερπετά, στα αμφίβια και στους χονδριχθύες, κάτι που δυσχεραίνει την αποκάλυψη της εξέλιξης της οργάνωσης του συστήματος ιστοσυμβατότητας.

Η έρευνα των περιοχών MHC σε διάφορα σπονδυλωτά είδη αντανακλά την εικόνα ότι αυτή η περιοχή είναι μία από τις πιο δυναμικές του γονιδιώματος. Φυλογενετικές αναλύσεις των γονιδίων τάξης I και II των σπονδυλωτών συνηγορούν στη θεωρία ότι το MHC εξελίσσεται μέσω διαδικασίας **γεννήσεως-θανάτου (Birth-and-Death)** (Nei *et al.*, 1997, Kumánovics *et al.*, 2003). Ο αριθμός των γονιδίων μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ειδών κυρίως μέσω **απώλειας και ανάκτησης (loss and gain)** τόπων. Όταν απαλείφονται τόποι, εμφανίζονται άλλοι που αντισταθμίζουν το χάσιμο αναλαμβάνοντας μία επιπλέον λειτουργία (Kelley *et al.*, 2005). Για παράδειγμα, στους αρουραίους οι τόποι DR της τάξης II έχουν διαγραφεί και η λειτουργία τους αντισταθμίζεται από τα πολλαπλά α και β γονίδια των τόπων της DP (Nizetic *et al.*, 1987). Η γάτα δεν έχει την υποπεριοχή DQ της τάξης II, αλλά έχει μια εκτεταμένη υποπεριοχή DR (Yuhki *et al.*, 2003). Οι αγελάδες και τα πρόβατα δεν έχουν την υποπεριοχή DP αλλά αντισταθμίζεται από νέες συστοιχίες γονιδίων DI/DY (Scott *et al.*, 1987, Stone & Muggli-Cockett, 1990, van der Poel *et al.*, 1990, Wright *et al.*, 1994).

Ο πολυμορφισμός και η διατήρησή του στο MHC

Ένα χαρακτηριστικό του MHC είναι η απουσία ενός «αγρίου τύπου». Αυτό παρατηρείται για κάθε χωριστό γονίδιο, όπου **πολλαπλά αλληλόμορφα** είναι παρόντα σε οποιαδήποτε συχνότητα και πιο εκτεταμένα στο επίπεδο των απλοτύπων και στους κατά ζεύγη συνδυασμούς τους για να σχηματίσουν τους φαινοτύπους

(Parham, 1999). Αυτές οι ιδιότητες συνεισφέρουν στο ότι τα γονίδια του MHC είναι ένα από τα λίγα συστήματα των θηλαστικών όπου μπορεί η Δαρβινική φυσική επιλογή να είναι ευαπόδεικτη (Yeager & Hughes, 1999). Συγκεκριμένα, οι τόποι του MHC παρουσιάζουν ένα πολύ μεγάλο βαθμό πολυμορφισμού που κανένας άλλος τύπος ο οποίος κωδικοποιεί πρωτεΐνες στο γονιδίωμα των θηλαστικών δεν τον παρουσιάζει (Nei & Hughes, 1991a). Για το λόγο αυτό, το MHC έγινε ένα από τα καλύτερα μελετημένα γενετικά συστήματα στα γναθοστόματα που παρέχει ενδείξεις για τη μακροπρόθεσμη δράση της φυσικής επιλογής (Avecedo-Whitehouse & Cunningham, 2006).

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα του MHC είναι ο **εκτεταμένος πολυμορφισμός** που παρατηρείται σε πολλά γονιδιά του. Αν και υπάρχουν καλές ενδείξεις για τη φυσική επιλογή στο MHC δεν είναι ακόμη σαφές ποια μορφή έχει ακριβώς αυτή η επιλογή (Page & Holmes, 1998). Ο πολυμορφισμός στο MHC χαρακτηρίζεται από διακριτά γνωρίσματα και οποιαδήποτε υπόθεση για τη διατήρηση του πολυμορφισμού στο MHC πρέπει να εξηγεί τις ακόλουθες παρατηρήσεις: **1)** ο βαθμός του πολυμορφισμού είναι ιδιαίτερα υψηλός, **2)** ο αριθμός των νουκλεοτιδικών διαφορών μεταξύ των αλληλομόρφων είναι ασυνήθιστα υψηλός, **3)** στις περιοχές πρόσδεσης του πεπτιδίου, ο ρυθμός των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων είναι υψηλότερος από αυτό των συνώνυμων και **4)** τα πολυμορφικά αλληλόμορφα (αλληλομορφικές σειρές) παραμένουν στον πληθυσμό για δεκάδες εκατομμύρια χρόνια (Nei & Hughes, 1991a). Η εξήγηση για τις παραπάνω παρατηρήσεις μπορεί να δοθεί από την **ισοζυγούσα επιλογή** (Nei & Hughes, 1991b) και οι μηχανισμοί που έχουν καταγραφεί (Nei & Hughes, 1991a, Nei & Hughes, 1991b, Hughes & Yeager, 1998) ότι συνεισφέρουν στη διατήρηση του πολυμορφισμού έχουν βρεθεί ότι είναι η υπερκυριαρχία του ετεροζυγώτη (Doherty & Zinkernagel, 1975, Hughes & Nei, 1988), η συχνο-εξαρτώμενη επιλογή (Snell, 1968, Bodmer, 1972), η μη συμβατότητα μητέρας-εμβρύου (Clarke & Kirby, 1966, Hedrick & Thompson, 1988), η επιλογή συντρόφου (Yamazaki *et al.*, 1976), ο δια-ειδικός πολυμορφισμός (Lawlor *et al.*, 1988, Gyllensten & Erlich, 1989) και η γονιδιακή μετατροπή (Lopez de Castro *et al.*, 1982, Ohta, 1982). Η κύρια πηγή ωστόσο, για την ποικιλομορφία των γονιδίων του MHC είναι οι σημειακές μεταλλάξεις, αλλά ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης δεν είναι υψηλότερος στο MHC από το υπόλοιπο γονιδίωμα (Lawlor *et al.*, 1988, Parham *et al.*, 1995).

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 (Futuyma, 1995). Η ισοζυγούσα επιλογή αναμένεται να διατηρεί τους πολυμορφισμούς σε συνδεδεμένες ουδέτερες περιοχές για μεγαλύτερες περιόδους και σε πιο ενδιάμεσες συχνότητες από ότι προβλέπεται με τη θεωρία της ουδετερότητας (Hudson & Kaplan, 1988, Charlesworth, 2006) και άρα θα πρέπει να οδηγεί σε υπερβολικό συνώνυμο πολυμορφισμό (Tajima, 1989). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ισοζυγούσα επιλογή δεν καταλήγει πάντα σε μία ορατή φαινοτυπική διαφορά. Η ισοζυγούσα επιλογή διατηρεί, μέσω της υπερκυριαρχίας του ετεροζυγώτη, τον πολυμορφισμό στο γονίδιο *Pgi* (ισομεράση της φωσφογλυκόζης) σε ένα μεταπληθυσμό πεταλούδων (*Melitae cinxia*). Το *Pgi* είναι γονίδιο του μεταβολισμού και είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό σε σχέση με υπόλοιπα γονίδια του μεταβολισμού (Wheat *et al.*, 2010). Άλλο παράδειγμα δράσης της ισοζυγούσας επιλογής είναι η διατήρηση του πολυμορφισμού στην έγχρωμη όραση στους πιθήκους του Νέου Κόσμου και συγκεκριμένα στο γονίδιο της οψίνης L-M. Η μεγάλη διάρκεια αυτού του πολυμορφισμού σε αυτές τις οικογένειες πρωτεύοντων του Νέου Κόσμου είναι σύμφωνη με την ισοζυγούσα επιλογή, μια μορφή θετικής φυσικής επιλογής που δρα για να διατηρήσει τον πολυμορφισμό μέσω του πλεονεκτήματος του ετεροζυγώτη στα τριχρωματικά θηλυκά (Hiwatashi *et al.*, 2010). Τέλος, η δράση της ισοζυγούσας επιλογής διατηρεί υψηλή ποικιλομορφία στο MHC στο πιο μονομορφικό γενετικά, φυλετικά αναπαραγόμενο είδος, την αλεπού του νησιού San Nicolas (*Urocyon littoralis dickeyi*). Η εξέταση της ποικιλομορφίας πέντε τόπων του MHC σε αυτό το είδος δείχνει αξιοσημείωτα επίπεδα πολυμορφισμού υποστηρίζοντας τη σπουδαιότητα της ισοζυγούσας επιλογής σαν ένα μηχανισμό για να διατηρεί τον πολυμορφισμό σε φυσικούς πληθυσμούς και φέρνει στο φως τη δυσκολία χρησιμοποίησης ουδέτερων δεικτών σαν υποκατάστατα για την ποικιλομορφία σε τόπους που σχετίζονται με την αρμοστικότητα (Aguilar *et al.*, 2004).

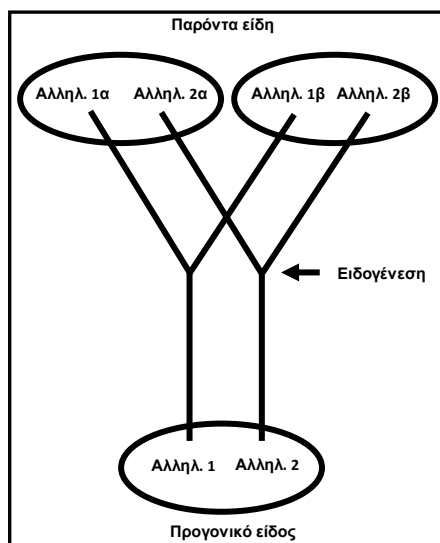
Η επιλογή που είναι ικανή να διατηρεί αλληλόμορφα στον πληθυσμό εμπλέκει απαραίτητα κάποιο τύπο πλεονεκτήματος των σπάνιων αλληλομόρφων. Οι δύο κύριοι τύποι ισοζυγούσας επιλογής που ενσωματώνουν αυτά τα χαρακτηριστικά είναι η **υπερκυριαρχία του ετεροζυγώτη** και η **αρνητική συχνο-εξαρτώμενη επιλογή** (Richman, 2000). 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. Αυτό το είδος επιλογής θεωρήθηκε ότι συμβάλλει στη διατήρηση του αλληλομορφικού πολυμορφισμού στο MHC. Επειδή τα πολυμορφικά αμινοξέα καθορίζουν ποια πεπτιδία θα παρουσιαστούν από κάθε μόριο MHC, η ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων εξασφαλίζει ότι τουλάχιστον κάποιο μέλος του πληθυσμού θα μπορεί να παρουσιάσει πρακτικά οποιοδήποτε αντιγόνο μικροοργανισμού. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο πολυμορφισμός έχει δημιουργηθεί εξελικτικά για να εξασφαλιστεί ότι ο πληθυσμός δε θα υποκύψει σε ένα νέο μικροοργανισμό ή σε ένα παλαιό μικροοργανισμό που έχει μεταλλαχθεί, γιατί τουλάχιστον κάποια άτομα θα είναι ικανά να εγείρουν αποτελεσματικές ανοσοαπαντήσεις κατά οποιοδήποτε πεπτιδίου (Doherty & Zinkernagel, 1975). Μία σημαντική ένδειξη δράσης αυτής της επιλογής έχει βρεθεί σε τρεις περιπτώσεις ανθρώπινων μολυσματικών ασθενειών. Η μία αναφέρεται σε ένα συγκεκριμένο γενότυπο που προσδίδει πλεονέκτημα κατά τη μόλυνση με τον ιό HIV (Carrington *et al.*, 1999), η άλλη σε μόλυνση με τον ιό HBV (Thursz *et al.*, 1997, Thio *et al.*, 1999) και η τρίτη σε προστασία από τη μαλάρια που προσδίδουν συγκεκριμένα αλληλόμορφα τάξης I και II σε Δυτικο-αφρικανούς (Hill *et al.*, 1991). Αντίστοιχη σύνδεση έχει γίνει και με συγκεκριμένους γενοτύπους του βόειου MHC, και ασθένειες όπως η μαστίτιδα και το λέμφωμα που προέρχεται από τον BLV, ιό της βόειας λευχαιμίας (Takeshima & Aida, 2006). Βρέθηκε ακόμη ότι πρόβατα μολύνονταν με τον ιό BLV και είχαν τα κατάλοιπα Arg-Lys στις θέσεις 70-71 σε αλληλόμορφα του *DRB1* προστατεύονταν από τον ιό (Nagaoka *et al.*, 1999, Konnai *et al.*, 2003). Ωστόσο, υπάρχουν ισχυρισμοί ότι η υπερκυριαρχία του ετεροζυγώτη δεν είναι μια επαρκής εξήγηση για τον πολυμορφισμό του MHC. Οι ισχυρισμοί αυτοί βασίζονται στη λειτουργική αρμοστικότητα των αλληλομόρφων και υποστηρίζουν ότι το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού είναι εφικτό μόνο εάν οι αρμοστικότητες όλων των αλληλομόρφων είναι παρόμοιες, το οποίο έρχεται σε

αντίθεση με αυτό που παρατηρείται στην πραγματικότητα (De Boer *et al.*, 2004, Borghans *et al.*, 2004).

Αρνητική συχνο-εξαρτώμενη επιλογή είναι ο όρος που δίνεται σε μια εξελικτική διαδικασία όπου η αρμοστικότητα ενός φαινοτύπου αυξάνεται όσο ο φαινότυπος αυτός γίνεται σπανιότερος. Η πρώτη αναφορά για την αρνητική συχνο-εξαρτώμενη επιλογή έγινε το 1884 από τον Roulton που περιέγραψε τον τρόπο με τον οποίο οι θηρευτές μπορούσαν να διατηρούν τους πολυμορφισμούς της λείας τους. Το μοντέλο της συχνο-εξαρτώμενης επιλογής που είχε προταθεί είναι αυτό της προσαρμογής στα παθογόνα (Snell, 1968, Bodmer, 1972). Αυτό το μοντέλο βασίζεται στην υπόθεση ότι τα άτομα ξενιστές που φέρουν νέα αντιγόνα τα οποία προέκυψαν πρόσφατα από μεταλλάξεις θα έχουν ένα πλεονέκτημα επειδή οι ιοί δεν είχαν το χρόνο για να προσαρμοστούν σε αυτά. Έτσι, δημιουργείται μια μορφή συχνο-εξαρτώμενης επιλογής στην οποία ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο MHC έχει αρχικά ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα σε σύγκριση με ένα παλιό αλληλόμορφο, έτσι ώστε ο ρυθμός ενσωμάτωσης των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στον πληθυσμό αυξάνεται, αλλά αυτό το πλεονέκτημα σταδιακά μειώνεται με το χρόνο. Αυτό σημαίνει ότι με την παρουσία της προσαρμογής του παθογόνου η μέση ετεροζυγωτία, ο αριθμός των αλληλομόρφων και ο ρυθμός των υποκαταστάσεων κωδικονίων θα αυξάνεται σε σχέση με τα ουδέτερα αλληλόμορφα (Takahata & Nei, 1990). Συνεπώς, μόνο από τα μαθηματικά στοιχεία δεν είναι δυνατόν να γίνει διάκριση ανάμεσα στις μορφές της επιλογής (υπερκυριαρχία του ετεροζυγώτη και συχνο-εξαρτώμενη επιλογή). Και αυτό το μοντέλο ωστόσο παρουσιάζει αδυναμίες, όπως όταν ένα αλληλόμορφο γίνεται παλιό και πάλι σπάνιο στον πληθυσμό υπάρχει δυνατότητα να επανακτήσει επιλεκτικό πλεονέκτημα; Όταν η συχνότητα ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου αυξάνεται, το επιλεκτικό του πλεονέκτημα χάνεται και πιθανόν η τελική του μοίρα είναι να εξαφανιστεί από τον πληθυσμό με τυχαία γενετική παρέκκλιση ή επιλογή (Howard, 1987). Μέχρι στιγμής υπάρχουν δεδομένα και ενδείξεις για τη δράση και των δύο μορφών επιλογής.

Οι περισσότερες μη συνώνυμες σε σχέση με τις συνώνυμες μεταλλάξεις και η **διατήρηση αλληλομορφικών σειρών για μεγάλα χρονικά διαστήματα** υποδεικνύουν έμμεσα τη δράση της ισοζυγούσας επιλογής στους λειτουργικούς τόπους του MHC (Satta *et al.*, 1994). Μία διαφορετική εξήγηση για τον πολυμορφισμό στο MHC προτάθηκε ύστερα από την παρατήρηση ότι κάποια άτομα

από δύο είδη ποντικών που απέκλιναν 1-2 εκατομμύρια χρόνια είχαν πολύ όμοια ή ίδια αλληλόμορφα στο MHC (Figueroa & Klein, 1987) και η πιο ετερόδοξη εξήγηση γι' αυτό ήταν ότι τα αλληλόμορφα στα δύο είδη προέρχονται από ένα κοινό προγονικό γονίδιο. Αυτή η υπόθεση υπαινίσσεται ότι ο πολυμορφισμός που υπάρχει σε ένα προγονικό είδος δε μπορεί να τα καταφέρει μέσα από αυτή την πολύ στενή πληθυσμιακή στενωπό και ως εκ τούτου ο πολυμορφισμός ενός νέου είδους πρέπει να ξεκινήσει εκ νέου. Η ετεροδοξία αυτής της εξήγησης που αφορά κοινά αλληλόμορφα, ήταν στην υπόθεση ότι αυτός ο περιορισμός δεν εφαρμόζεται στα γονίδια του MHC. Εάν αυτό συμβαίνει, κάποια αλληλόμορφα θα μπορούσε να είναι παλιότερα από τα είδη και έτσι θα είχαν αρκετό χρόνο για την συσσώρευση πολλαπλών διαφορών μεταξύ τους. Έτσι, γεννήθηκε η ιδέα της **δια-ειδικής εξέλιξης** (Klein *et al.*, 2007), (Εικόνα 2). Τα γονίδια που εμφανίζουν δια-ειδικό πολυμορφισμό είναι διακριτά από άλλα (που εξελίσσονται ουδέτερα) γονίδια από δύο απόψεις: τον χρόνο σύμφυσης (coalescent time) των υφιστάμενων αλληλομόρφων και τη μορφή ή τοπολογία (topology) της αλληλομορφικής γενεαλογίας (van Oosterhout, 2009). Η εξελικτική διαδικασία που είναι υπεύθυνη για τα εκτεταμένα τελικά κλαδιά (long terminal branches) των ισοζυγισμένων γενεαλογιών ήταν αντικείμενο πολλών συζητήσεων (Richman, 2000). Έχει προταθεί ότι η συνέχιση υψηλά αποκλιόντων αλληλομόρφων του MHC για εκατομμύρια χρόνια θα μπορούσε να εξηγηθεί θεωρώντας ότι αυτά δίνουν ένα πλεονέκτημα στην παρουσίαση ενός πιο ευρέος φάσματος αντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα (Wakeland *et al.*, 1990).



Εικόνα 2: Δια-ειδική εξέλιξη ως συνέπεια της μεγάλης ανθεκτικότητας των αλληλομορφικών σειρών. Δύο αλληλομορφικές σειρές παρούσες σε προγονικό είδος οι οποίες μεταβιβάζονται σε καθένα από τα δύο θυγατρικά είδη. Σε αυτή την περίπτωση, το πιο συγγενικό αλληλόμορφο του ενός θυγατρικού είδους δεν βρέθηκε σε αυτό το είδος αλλά στα άλλα θυγατρικά είδη (Richman, 2000).

Η πιο ισχυρή ένδειξη δράσης της ισοζυγούσας επιλογής είναι η ανίχνευση **θετικής επιλογής**. Ενδείξεις για τη δράση της θετικής επιλογής στα αντιμικροβιακά

πεπτίδια είναι ο μεγάλος αριθμός μη συνώνυμων υποκαταστάσεων, ο μεγάλος αριθμός αμινοξικών υποκαταστάσεων με ανταλλαγή φορτίου και τα μη ουδέτερα πρότυπα αλληλομορφικού πολυμορφισμού (Tennesen, 2005). Εάν η αναλογία των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων σε σχέση με τις συνώνυμες υποκαταστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών είναι σημαντικά μεγαλύτερη από ένα τότε μπορεί να υποδειχθεί δράση της θετικής επιλογής (Hill & Hastie, 1987, Hughes & Nei, 1988). Η κύρια πηγή για την ποικιλομορφία των γονιδίων του MHC είναι οι σημειακές μεταλλάξεις που διατηρούνται μέσω θετικής επιλογής αλλά ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης δεν είναι υψηλότερος στο MHC από το υπόλοιπο γονιδίωμα (Lawlor *et al.*, 1988, Parham *et al.*, 1995). Παρουσία θετικής ή αρνητικής επιλογής, ο ρυθμός υποκατάστασης γίνεται αντίστοιχα υψηλότερος ή χαμηλότερος από το ρυθμό μετάλλαξης. Τα λειτουργικά γονίδια του MHC περιέχουν περιοχές που επηρεάζονται από τη φυσική επιλογή: υποκαταστάσεις στις μη συνώνυμες θέσεις της περιοχής πρόσδεσης πεπτιδίου (PBR) είναι είτε επιβλαβείς είτε πλεονεκτικές και οι υποκαταστάσεις στις μη συνώνυμες θέσεις της υπόλοιπης περιοχής (non-PBR) είναι είτε επιβλαβείς είτε ουδέτερες. Εφόσον οι επιβλαβείς μεταλλάξεις δε συνεισφέρουν στο ρυθμό υποκατάστασης γίνεται η υπόθεση ότι όλες οι μη συνώνυμες υποκαταστάσεις παρατηρούνται στην PBR και επιλέγονται θετικά (Satta *et al.*, 1994). Ο πολυμορφισμός εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή που κωδικοποιεί την περιοχή PBR των μορίων τάξης I και II. Μέσα στην PBR ο αριθμός των μη συνώνυμων νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά θέση είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των συνώνυμων νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά θέση, ενώ στο υπόλοιπο του μορίου συμβαίνει το αντίθετο. Εφόσον, η συνώνυμη υποκατάσταση είναι επιλεκτικά ουδέτερη, το συγκριτικά υψηλό επίπεδο των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων μέσα στην PBR δείχνει ότι ο πολυμορφισμός διατηρείται από κάποια μορφή ισοζυγούσας επιλογής. Αυτό το πρότυπο υποκατάστασης το οποίο είναι το αντίθετο από αυτό που παρατηρείται στα περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υποδεικνύει ότι η φυσική επιλογή ευνοεί την ποικιλότητα στην PBR, προφανώς επειδή η ετεροζυγωτία στο MHC αυξάνει την ανοσολογική παρακολούθηση καθιστώντας δυνατή παρουσίαση ενός μεγάλου συνόλου πεπτιδίων (Yeager & Hughes, 1999).

Οι προηγούμενοι μηχανισμοί συναντώνται στο MHC και διατηρούν τα υψηλά ποσοστά ποικιλομορφίας και θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν ως μηχανισμοί που βασίζονται στις ασθένειες. Ωστόσο, υπάρχει και άλλη μία κατηγορία

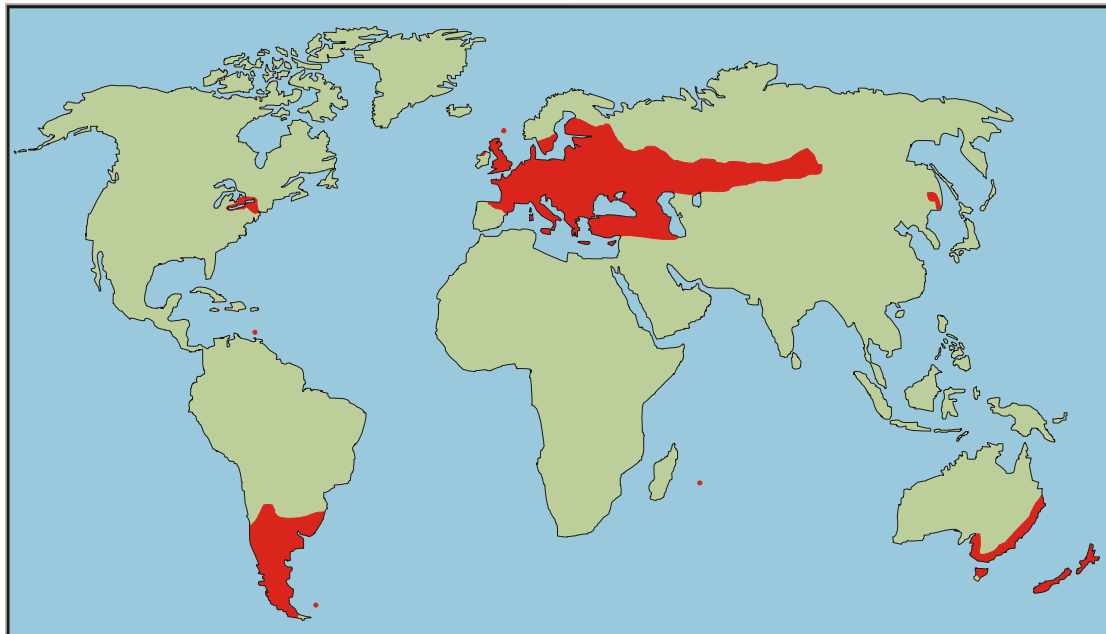
μηχανισμών, **οι αναπαραγωγικοί μηχανισμοί** που πιθανόν συνεισφέρουν στον πολυμορφισμό (Bernatchez & Landry, 2003). Αυτό το μοντέλο που συσχετίζει τον πολυμορφισμό με τους αναπαραγωγικούς μηχανισμούς είναι η υπόθεση αποφυγής της ομομιξίας (inbreeding avoidance hypothesis) (Potts & Wakeland, 1990). Αυτή η υπόθεση προτείνει ότι η επιλογή ζευγαρώματος που βασίζεται στο MHC είναι όμοια με αυτή σε άλλα γενετικά συστήματα ασυμβατότητας. Επειδή οι τόποι του MHC είναι συχνά πολυμορφικοί, τα άτομα που φέρουν κοινά αλληλόμορφα του MHC είναι πιθανό να σχετίζονται. Ακόμη, είναι γνωστό ότι τα αλληλόμορφα του MHC επηρεάζουν συγκεκριμένες οσμές και μπορεί έτσι να παρέχεται ένας πιθανό δείκτης συνάφειας (Penn, 2002). Με αυτό τον τρόπο, προτιμήσεις ζευγαρώματος χωρίς ανάμιξη MHC μπορεί να εμποδίζουν το ζευγάρι μεταξύ συγγενών και τις αρνητικές συνέπειες της ομομιξίας όπως η έκφραση υπολειπόμενων επιβλαβών μεταλλάξεων (Bernatchez & Landry, 2003). Αυτή η υπόθεση συνεπώς προβλέπει ότι η επιλογή ζευγαρώματος που βασίζεται στο MHC θα πρέπει πρωταρχικά να ευνοείται σε είδη που υπάρχει κίνδυνος ομομιξίας (Jordan & Bruford, 1998).

Τα άτομα σε ορισμένα είδη προτιμούν συντρόφους που φέρουν ανόμοια γονίδια στο MHC κάτι που λειτουργεί υπέρ της αύξησης της συνολικής ετεροζυγωτίας ή της ετεροζυγωτίας στο MHC (Penn, 2002) καθώς διαφορές στο MHC μεταξύ των ατόμων μπορεί να αντανακλούν γενικές γενετικές ανομοιότητες (Brown & Eklund, 1994). Το MHC παίζει ρόλο στην οσμή ενός ατόμου μέσω της παραγωγής διαλυτών πρωτεϊνών ή πρωτεϊνών που προσδένουν πτητικά μόρια και μέσω επιρροής στη βακτηριακή χλωρίδα του εντέρου (Tregenza & Wedell, 2000). Υπάρχουν πλέον αρκετές ενδείξεις για την επιλογή συντρόφου που βασίζεται στο MHC μεταξύ μη συγγενικών ατόμων σε διάφορα θηλαστικά και έχει αποδειχθεί η προτίμηση συντρόφου που βασίζεται στο MHC στα ποντίκια, στους αρουραίους και στους ανθρώπους (Tregenza & Wedell, 2000). Μελέτες σε εργαστηριακά ποντίκια και αρουραίους έδειξαν ότι τουλάχιστον μερικώς η αναγνώριση του συγγενούς, η επιλογή συντρόφου ακόμη και η διατήρηση της εγκυμοσύνης επηρεάζονται από τα γονίδια του MHC (Knapp, 2005). Υπάρχουν λίγες μελέτες για μη τυχαίο ζευγάρι σε σχέση με το MHC σε άλλα θηλαστικά. Μελέτες στο πρόβατο της φυλής Soay και στον αφρικανικό βούβαλο δεν παρείχαν ενδείξεις για MHC ανομοιογενές ζευγάρι αλλά άλλοι παράγοντες όπως ο ανταγωνισμός των αρσενικών μπορεί να καθορίσουν την αναπαραγωγική επιτυχία σε αυτά τα είδη, με μικρή πιθανότητα επιλογής του

θηλυκού (Tregenza & Wedell, 2000). Τα πρότυπα ζευγαρώματος σε άγριους πληθυσμούς δεν είναι απλά, ούτε πρέπει να αναμένεται αυτό, επειδή αντανακλούν έναν αριθμό πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ χαρακτηριστικών που ο καθένας εισάγει διαφορετικά πλεονεκτήματα και κόστη. Χρειάζονται περισσότερες μελέτες σε αυτή την κατεύθυνση αλλά το πρότυπο που εγείρεται είναι ότι η επιλογή συντρόφου που βασίζεται στο MHC δεν εξηγείται πάντα με την επιλογή του πιο ανόμοιου συντρόφου (Roberts, 2009). Τέλος, ευρήματα δείχνουν ότι το MHC ανομοιογενές ζευγάρι μπορεί να είναι πιο σημαντικό για την αποφυγή της ομομιξείας παρά για την αποφυγή ομοζυγωτίας στο MHC (Potts *et al.*, 2010).

Lepus europaeus

Η φυσική κατανομή του ευρωπαϊκού λαγού (*L. europaeus*, Πίνακας 1) περιλαμβάνει τη Μεγάλη Βρετανία και τη δυτική Ευρώπη και εκτείνεται ως την Τουρκία και την κεντρική Ασία (Lincoln, 1974, Broekhuizen & Maaskamp, 1980, Caillol & Meunier, 1989, Poli *et al.*, 1991). Ωστόσο, έχει εισαχθεί από τον άνθρωπο στην βόρεια και κεντρική Αμερική (Bonino & Montenegro, 1997), στη νότια Αμερική και στην Αυστραλία (Bonino & Montenegro, 1997, Caillol & Meunier, 1989, Lincoln, 1974), (Εικόνα 3). Έχουν συνολικό μήκος 600-750mm και το βάρος τους ποικίλλει από 3 έως 5 κιλά (Peterson, 1966, Hall & Kelson, 1959). Το χειμώνα ο ευρωπαϊκός λαγός δεν αλλάζει το τρίχωμά του σε άσπρο αλλά το τρίχωμα γίνεται ελαφρά πιο γκρι.



Εικόνα 3: Παγκόσμια κατανομή του *Lepus europaeus* (Flux & Angermann, 1990).

Δεν υπάρχει αξιοσημείωτος φυλετικός διμορφισμός (Peterson, 1966, Bansfield, 1974, Dragg 1974). Η αναπαραγωγική περίοδος του *L. europaeus* είναι μεταξύ Ιανουαρίου/Φεβρουαρίου και Ιουνίου/Ιουλίου (Peterson, 1966, Bansfield, 1974). Οι λαγοί γίνονται αναπαραγωγικά ώριμοι μετά από 8 έως 12 μήνες. Η μητέρα για να προστατέψει τα νεογέννητα, τα σκορπίζει σε μία μεγάλη περιοχή και στη συνέχεια κάνει κύκλους για να τα φροντίσει (Peterson 1966, Bansfield, 1974). Οι ευρωπαϊκοί λαγοί είναι κυρίως μοναχικά ζώα με εξαίρεση την περίοδο του ζευγαρώματος. Παραμένουν ενεργοί όλη τη διάρκεια του χρόνου. Έχουν ιδιαίτερα

αναπτυγμένη την αίσθηση της όρασης, της ακοής και της όσφρησης. Υπό την απειλή κάποιου θηρευτή έχουν την ικανότητα να τρέξουν πολύ γρήγορα και να αλλάξουν κατεύθυνση εάν αυτό χρειαστεί. Οι θηρευτές τους είναι οι αλεπούδες, οι λύκοι, τα γεράκια και οι κουκουβάγιες (Peterson 1966, Bansfield, 1974). Στην Αργεντινή και στην Αυστραλία αποτελεί πρόβλημα εξαιτίας της γρήγορης αναπαραγωγής και τη ζημιογόνο δράση του στις καλλιέργειες (Bonino & Montenegro, 1997, Bansfield, 1974). Στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική αποτελεί θηρεύσιμο είδος καθώς το κρέας του είναι εξαιρετικής ποιότητας (Bansfield, 1974).

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του είδους *Lepus europaeus* (από <http://animaldiversity.ummz.umich.edu>)

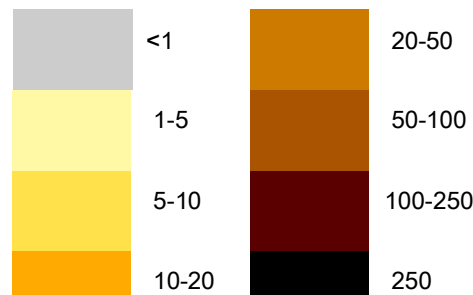
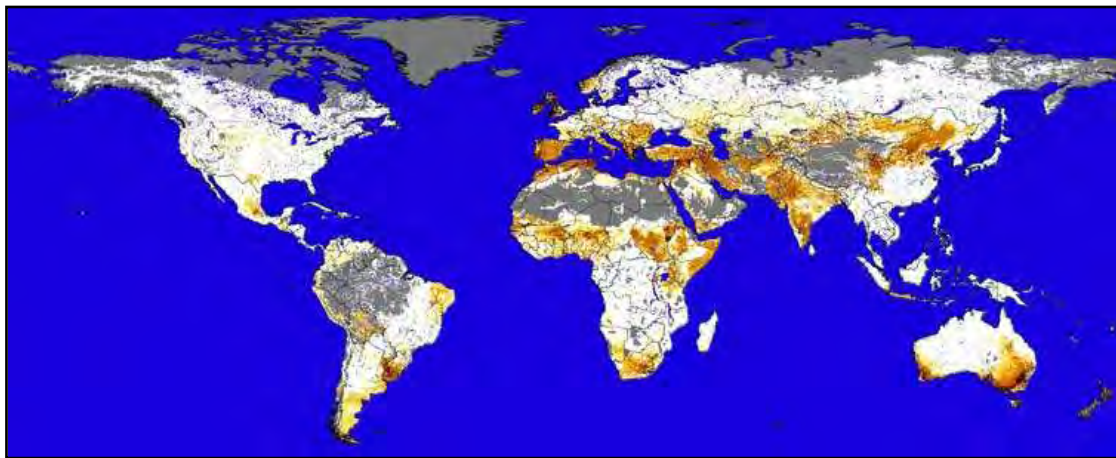
Βασίλειο	Ζώων
Φύλο	Χορδωτά
Υπόφυλο	Σπονδυλωτά
Κλάση	Θηλαστικά
Τάξη	Λαγόμορφα
Οικογένεια	Leporidae
Γένος	<i>Lepus</i>
Είδος	<i>europaeus</i>

Η οικογένεια Leporidae αποτελείται από περίπου 60 είδη σε 11 γένη τα οποία θεωρείται ότι προέκυψαν από ακτινωτή προσαρμογή πριν από εννέα έως 20 εκατομμύρια χρόνια (Matthee *et al.*, 2004, Robinson & Matthee, 2005, Su & Nei, 1999). Το *L. europaeus* υπόκειται σε διάφορες ασθένειες όπως το σύνδρομο του ευρωπαϊκού καφετί λαγού (EBHS) που ευθύνεται για υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα κυρίως στα ενήλικα άτομα, ενώ οι κοκκιωματώδεις νόσοι είναι συχνά υπεύθυνες για υψηλή θνησιμότητα σε νεαρά άτομα (Wibbelt & Frölich, 2005). Συνεπώς, ο καφετί λαγός είναι ένα ενδιαφέρον είδος για τη μελέτη της δυναμικής των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παρασίτων και την επίδρασή τους στην εξέλιξη των γονιδίων του MHC σε φυσικούς πληθυσμούς (de Bellocq *et al.*, 2008). Η γονιδιωματική οργάνωση και έκφραση των γονιδίων MHC τάξης II του κουνελιού (*Oryctolagus cuniculus*) έχει ήδη περιγραφεί (LeGuern *et al.*, 1985, Sittisombut & Knight, 1986) και το γονίδιο *DQA* σε αυτό υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο (Fain *et*

al., 2001, LeGuern *et al.*, 1985) ενώ έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο και στο *L. europaeus* (SurrIDGE *et al.*, 2008). Αντίθετα, δεν υπάρχει κανένα δεδομένο που να αφορά το γονίδιο *DRB* στο *L. europaeus*.

Ovis aries

Το οικόσιτο πρόβατο (*O. aries*, Πίνακας 2) έχει παγκόσμια κατανομή σε συνάφεια πάντα με τους ανθρώπους (Εικόνα 4). Το πρώτο εξημερωμένο πρόβατο διέμενε στη Μέση Ανατολή και στην Κεντρική Ασία αλλά από τότε έχουν εισαχθεί παντού. Τα πρόβατα είναι εξαιρετικά ευέλικτα και υπάρχουν σε ένα μεγάλο εύρος φυσικών περιβαλλόντων παγκοσμίως που ποικίλλουν από εύκρατα ορεινά δάση έως συνθήκες ερήμου (Grzimek, 1990, MacDonald, 1984). Τα φυσικά χαρακτηριστικά του προβάτου ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των φυλών.



Εικόνα 4: Παγκόσμια κατανομή του *Ovis aries*. Όλες οι πυκνότητες είναι σε κεφάλια ανά km².

Έχουν συνολικό μήκος 120-180cm και το βάρος τους ποικίλλει από 20 έως 200 κιλά. Το κρανίο του εξημερωμένου προβάτου διαφέρει από αυτό των άγριων προβάτων έτσι ώστε οι κόγχες των ματιών και το κρανίο να μειώνονται. Η επιλογή για οικονομικά σημαντικά χαρακτηριστικά έχει παράγει πρόβατα με ή χωρίς μαλλί, κέρατα και εξωτερικά αυτιά. Ο χρωματισμός ποικίλλει από άσπρο έως σκούρο καστανό και μαύρο. Υπάρχει αξιοσημείωτη ποικιλομορφία μεταξύ των 200 διακριτών φυλών προβάτου. Αναπαράγονται σε εποχική βάση, που καθορίζεται από τη διάρκεια

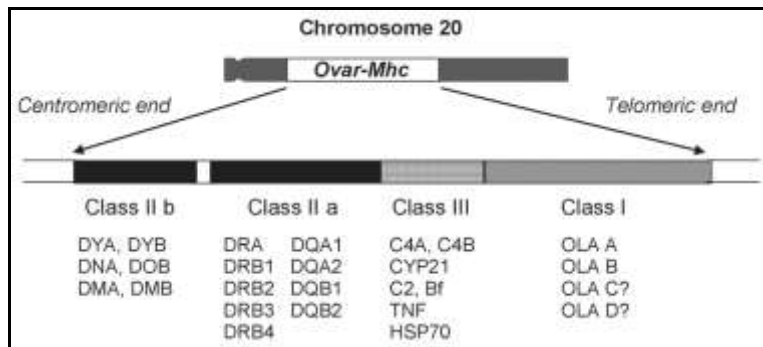
της ημέρας, με τα θηλυκά να είναι γόνιμα στην αρχή του φθινοπώρου και να παραμένουν έως τα μέσα του χειμώνα. Τα αρσενικά είναι γόνιμα καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου και οι περισσότεροι εκτροφείς προβάτων χρησιμοποιούν ένα αρσενικό ζώο για κάθε 25-35 θηλυκά. Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά γίνονται αναπαραγωγικά ώριμα μέσα σε ένα χρόνο (Ensminger, 1965). Έχουν ανεπτυγμένο το ένστικτο της αγέλης και μεγάλες ομάδες προβάτων (μέχρι 1000 ή και περισσότερα) κινούνται σε περιοχές. Αυτό το ένστικτο συνεισφέρει στην οικονομική τους σημασία καθώς ένας εκτροφέας μπορεί να ελέγξει ένα μεγάλο κοπάδι από πρόβατα (Hecker, 1983). Το *O. aries* δεν έχει δυσμενείς επιπτώσεις στους ανθρώπινους πληθυσμούς. Ωστόσο, ο πολλαπλασιασμός του εξημερωμένου προβάτου έχει επηρεάσει ανασταλτικά τους άγριους προγόνους μέσω του ανταγωνισμού για την αναζήτηση τροφής και την εξάπλωση ασθενειών. Πέρα από τη χρησιμότητά τους στην κτηνοτροφία, τα πρόβατα είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την επιστημονική έρευνα εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους δείγματος και του χαμηλού κόστους συντήρησης. Ο παγκόσμιος πληθυσμός των προβάτων αυξάνεται σταθερά μετά την εξημέρωσή τους και εκτιμάται ότι ξεπερνά το ένα δισεκατομμύριο πρόβατα.

Πίνακας 2: Συστηματική κατάταξη του είδους *Ovis aries* (από <http://animaldiversity.ummz.umich.edu>)

Βασίλειο	Ζώων
Φύλο	Χορδωτά
Υπόφυλο	Σπονδυλωτά
Κλάση	Θηλαστικά
Τάξη	Αρτιοδάκτυλα
Οικογένεια	Bovidae
Γένος	<i>Ovis</i>
Είδος	<i>aries</i>

Υπάρχει αξιοσημείωτη αντιπαράθεση σχετικά με το πότε και από ποιο άγριο είδος προέρχεται το οικόσιτο πρόβατο. Σύγχρονες χρωμοσωμικές και αρχαιολογικές ενδείξεις δείχνουν ότι η απόκλιση συνέβη πριν από 9.000-11.000 χρόνια πριν και ότι το πρώτο πρόβατο που εξημερώθηκε ήταν το *Ovis musimon* από τη Σαρδηνία και την Κορσική (Grzimek 1990).

Έχει διερευνηθεί η δομή του MHC στο πρόβατο (βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20) και η τάξη II είναι καλά χαρακτηρισμένη με ενδείξεις για ένα γονίδιο *DRA*, τέσσερα *DRB* (ένα λειτουργικό και τρία μη λειτουργικά γονίδια), ένα *DQA1*, δύο *DQA2*, και ένα από τα *DQB1*, *DQB2*, *DNA*, *DOB*, *DYA*, *DYB*, *DMA*, και *DMB* (Εικόνα 5), (Dukkipati *et al.*, 2006).

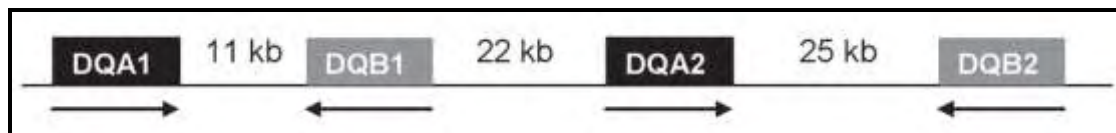


Εικόνα 5: Σχηματική παρουσίαση της δομής του Ovar-MHC.

Τα DR γονίδια είναι ιδιαίτερα πολυμορφικά και τα μόριά τους εκφράζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τα μόρια DQ στην κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων και των B κυττάρων (Outteridge *et al.*, 1996). Ο πιο πολυμορφικός τύπος μεταξύ των γονιδίων MHC είναι το *DRB* (Andersson & Rask, 1988). Τα *Ovar-DRB* έχουν βρεθεί ότι υπάρχουν σε πολλαπλά αντίγραφα, κάποια λειτουργικά και κάποια άλλα όχι. Τέσσερις *Ovar-DRB* τύποι έχουν περιγραφεί (Scott *et al.*, 1991b), σε ένα από αυτούς βρίσκεται το λειτουργικό *DRB1* και στους υπόλοιπους βρίσκονται τα ψευδογονίδια *DRB2*, *DRB3* and *DRB4*. Τα ψευδογονίδια δεν έχουν καλά προσδιορισμένα εξόνια 1 και 2, έχουν πολλές μεταλλάξεις στην αλληλουχία τους και κωδικόνια λήξης στα εξόνια 3 και 4. Υπάρχουν ενδείξεις ότι επιπρόσθετα *DRB* ψευδογονίδια υπάρχουν (Schwaiger *et al.*, 1996).

Δεδομένα από RFLP και αλληλούχιση από γονιδιωματικούς κλώνους (Scott *et al.*, 1991a) και cDNA κλώνους (Fabb *et al.*, 1993) υποδεικνύουν την ύπαρξη δύο γονιδίων *DQA* ανά απλότυπο στο πρόβατο. Αυτό είναι σύμφωνο με ένα λεπτομερή γονιδιωματικό χάρτη της υποπεριοχής DQ του προβάτου (Wright & Ballingall, 1994) που αποκάλυψε δύο DQ τύπους που ο καθένας περιέχει ένα *DQA* και ένα *DQB* γονίδιο διευθετημένα σε αντίθετο προσανατολισμό (tail to tail). Οι δύο τύποι είναι 22kb μακριά. Η υποπεριοχή *Ovar-DQ* είναι πιο συμπαγής από την HLA-DQ (Campbell & Trowsdale, 1993). Τα γονίδια *Ovar-DQA1* και *DQB1* στον πρώτο τύπο χωρίζονται από 11Kb ενώ τα *DQA2* και *DQB2* είναι 25kb μακριά (Εικόνα 6).

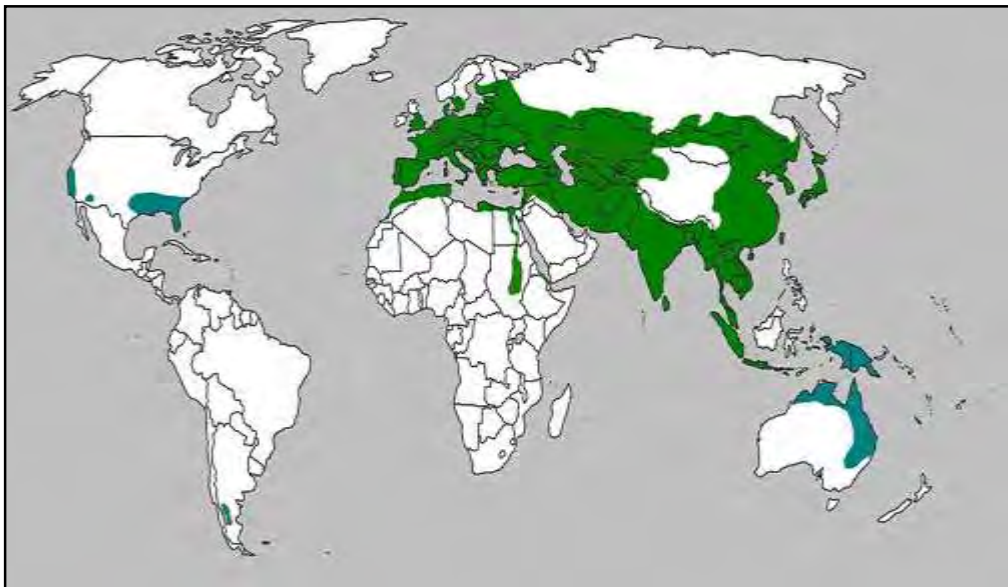
Διάφορα αλληλόμορφα *Ovar-DQA1* και *DQA2* έχουν προσδιοριστεί βασισμένα στην ποικιλομορφία της αλληλουχίας του εξονίου 2 που ενισχύθηκε με τη μέθοδο PCR. Είκοσι τρία διαφορετικά αλληλόμορφα *DQA2* (Scott *et al.*, 1991a, Fabb *et al.*, 1993, Wright & Ballingall, 1994, Snibson *et al.*, 1998, Hickford *et al.*, 2004) και 16 *DQA1* αλληλόμορφα (Scott *et al.*, 1991a, Fabb *et al.*, 1993, Wright & Ballingall, 1994, Snibson *et al.*, 1998, Zhou & Hickford, 2001, Zhou & Hickford, 2004) έχουν προσδιοριστεί. Η μέθοδος PCR-SSCP είναι μία ιδανική μέθοδος για την ταυτοποίηση αλληλομόρφων *DQA* (Snibson *et al.*, 1998). Τέλος, τρεις ή περισσότερες μοναδικές αλληλουχίες *DQA2* μπορούν να βρεθούν σε ένα μόνο πρόβατο, προτείνοντας έτσι την παρουσία δύο *DQA2* τόπων (Dukkipati *et al.*, 2006).



Εικόνα 6: Σχηματική παρουσίαση της δομής της υποπεριοχής *Ovar-DQ* (Dukkipati *et al.*, 2006). Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής των γονιδίων. Οι αποστάσεις έχουν υπολογιστεί από τους Wright & Ballingall (1994).

Sus scrofa

Από όλα τα μέλη της οικογένειας των χοίρων, το *Sus scrofa* (Πίνακας 3) εμφανίζει την ευρύτερη γεωγραφική κατανομή. Αρχικά, υπήρχαν στην Ευρώπη, την Ασία, τη Βόρεια Αφρική και το Αρχιπέλαγος Μαλάι ενώ υπήρχαν και νησιωτικοί πληθυσμοί, στη Βρετανία, την Κορσική, τη Σαρδηνία, την Ιαπωνία, τη Σρι Λάνκα και άλλα μικρότερα νησιά. Στη συνέχεια, το *S. scrofa* εισήχθη σε όλο τον κόσμο σαν εξημερωμένο είδος και πλέον μπορεί να βρεθεί σχεδόν παντού (Hopf, 1979, Storer, 1992, Nowak, 1991) αν και το τυπικό ενδιαίτημά του είναι τα υγρά δάση, ειδικά τα δάση βελανιδιάς και είναι ευαίσθητα σε σημαντικές αλλαγές της θερμοκρασίας (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Παγκόσμια κατανομή (πράσινο) του αγριόχοιρου. Με μπλε σημειώνονται οι περιοχές που έχει γίνει εισαγωγή αγριόχοιρων (από http://en.wikipedia.org/wiki/Wild_boar).

Έχουν συνολικό μήκος 900mm έως 1800mm και το βάρος τους ποικίλλει από 50 έως 350 κιλά. Κατά την εξημέρωση το *S. scrofa* ανέπτυξε διάφορους χρωματισμούς του τριχώματος και άλλα χαρακτηριστικά (Hopf, 1979, vanLoon, 1979, Nowak, 1991). Η περίοδος του ζευγαρώματος είναι συχνά βίαιη καθώς τα αρσενικά μάχονται για την πρόσβαση στα θηλυκά. Το σύστημα ζευγαρώματος είναι πολύγυνο (polygynous). Σε εύκρατα κλίματα τα θηλυκά γεννούν ένα νεογνό την άνοιξη. Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά γίνονται αναπαραγωγικά ώριμα μέσα σε οκτώ έως 10 μήνες, αν και τα θηλυκά δε ζευγαρώνουν μέχρι τους 18 μήνες και τα αρσενικά δεν έχουν το επιθυμητό μέγεθος για μάχη μέχρι τα πέντε έτη (Hopf, 1979,

Nowak, 1991). Τα θηλυκά είναι πολύ προστατευτικά με τα μικρά τους, αν και μόνο τα μισά θα ωριμάσουν καθώς συνήθως γίνονται λεία θηρευτών ή αναπτύσσουν ασθένειες (Nowak, 1991). Ο αγριόχοιρος στην Ευρώπη συχνά βρίσκεται σε μεγάλες αγέλες μέχρι 100 άτομα, αν και ο πιο αντιπροσωπευτικός αριθμός είναι το 20. Οι αγέλες σχηματίζονται από τα θηλυκά και τα μικρά τους, και μπορεί να μετακινούνται μαζί σε μεγάλο εύρος αλλά δε μεταναστεύουν. Όταν τα αρσενικά ωριμάσουν αφήνουν την αγέλη και ζουν μόνα τους. Οι αγριόχοιροι είναι κατά κανόνα νυχτόβια ζώα (Hopf, 1979, vanLoon, 1979, Nowak, 1991). Ο πρωταρχικός θηρευτής των ώριμων αγριόχοιρων είναι ο άνθρωπος ενώ άλλοι θηρευτές τους είναι οι αρκούδες και οι αγριόγατες ενώ οι χοίροι είναι εξαιρετικά επιθετικοί και ατίθασοι όταν νιώθουν ότι απειλούνται. Το *S. scrofa* φέρει παρασιτικές λοιμώξεις που μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο είτε τρώγοντας όχι καλά ψημένο κρέας είτε με την επαφή και σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι τριχίνωση, κυστικέρκωση και βρουκέλωση. Οι εισαχθέντες ημιάγριοι (feral) πληθυσμοί του *S. scrofa* είναι υπεύθυνοι για περιβαλλοντικές καταστροφές παγκοσμίως ενώ προκαλούν ή φέρουν ασθένειες των οικόσιτων ζώων. Οι ευρείες διατροφικές τους συνήθειες, οι εξαιρετικά καταστροφικές συμπεριφορές και η επιθετικότητα τα καθιστά ένα από τα πιο καταστροφικά, εισαχθέντα είδη παγκοσμίως (Nowak, 1991). Το *S. scrofa* δεν είναι γενικά απειλούμενο αν και πληθυσμοί αγριόχοιρων είχαν αφανιστεί εξαιτίας της θήρευσής τους. Υπάρχουν ακόμη αρκετοί πληθυσμοί φυλών του εξημερωμένου χοίρου οι οποίοι κινδυνεύουν με εξαφάνιση και είναι ο στόχος προσπαθειών για συντήρηση (Porter, 1993, Nowak, 1991).

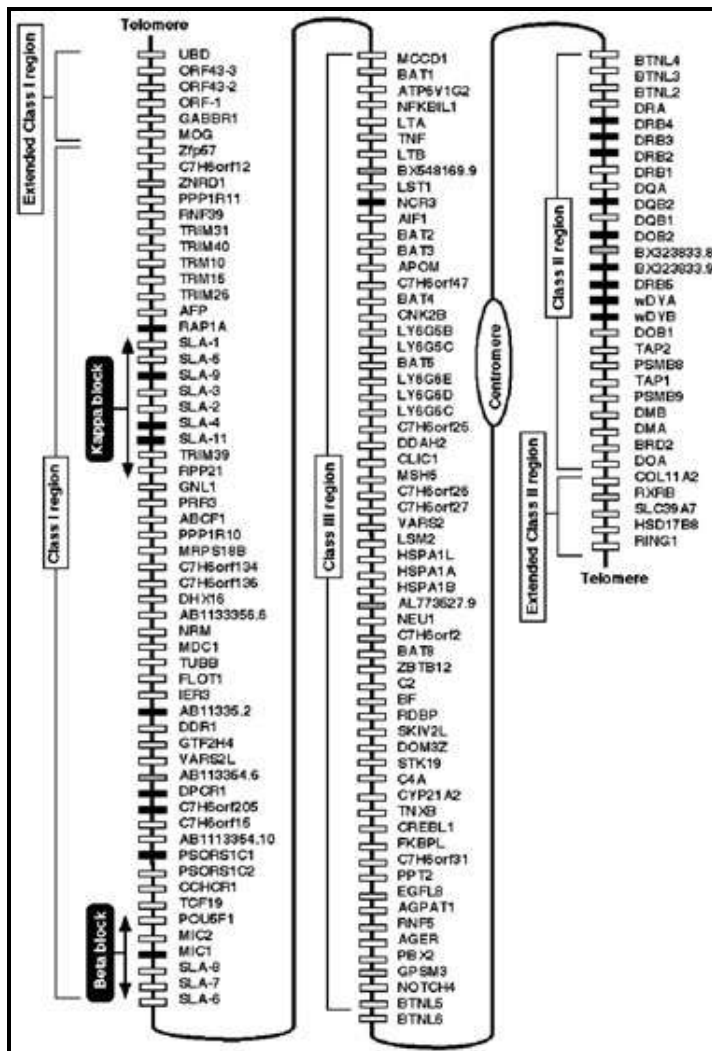
Πίνακας 3: Συστηματική κατάταξη του είδους *Sus scrofa* (από <http://animaldiversity.ummz.umich.edu>)

Βασίλειο	Ζώων
Φύλο	Χορδωτά
Υπόφυλο	Σπονδυλωτά
Κλάση	Θηλαστικά
Τάξη	Αρτιοδάκτυλα
Οικογένεια	Suidae
Γένος	<i>Sus</i>
Είδος	<i>scrofa</i>

Ο ευρωπαϊκός αγριόχοιρος έχει υποστεί τοπικές εξαφανίσεις και μετεγκαταστάσεις στο παρελθόν, ενώ πλέον επεκτείνεται ανησυχητικά και ευρέως σε κάποιες περιοχές, όπου απαιτούνται προγράμματα διαχείρισης. Η κατανόηση των σχετικών ρόλων των παλαιότερων και των πρόσφατων γεγονότων στη διαμόρφωση της γενετικής δομής αυτού του είδους είναι συνεπώς όχι μόνο ένα ενδιαφέρον θέμα, αλλά κρίνεται θεμελιώδες για την κατεύθυνση μελλοντικών στρατηγικών διαχείρισης. Ακόμη, διάφορες φυλές χοίρων προέρχονται από τον ευρωπαϊκό αγριόχοιρο αλλά οι γεωγραφικές τοποθεσίες των περιοχών εξημέρωσης και πιθανή εισδοχή του γονιδιώματος των χοίρων στους άγριους πληθυσμούς παραμένουν ανοικτά ερωτήματα (Scandura *et al.*, 2008). Μέχρι στιγμής έχουν μελετηθεί ουδέτεροι δείκτες (Scandura *et al.*, 2008 Vernesi *et al.*, 2003) σε πληθυσμούς αγριόχοιρων ενώ η μόνη μελέτη που αφορά το MHC πραγματοποιήθηκε στο *DRB1* σε αγριόχοιρους της Ιταλίας (Barbisan *et al.*, 2009).

Ο αγριόχοιρος συνιστά ένα ενδιαφέρον μοντέλο για τη μελέτη των σχετικών ρόλων των διάφορων δημογραφικών και επιλεκτικών γεγονότων στην ποικιλομορφία του MHC. Στην πραγματικότητα υπάρχουν πολλά δεδομένα για το SLA-MHC (Swine Leukocyte Antigen-SLA) και το αποτέλεσμα της εντατικής εκτροφής μπορεί να αναλυθεί συγκρίνοντας άγριες ομάδες με ζώα που έχουν υποστεί διαφορετικό βαθμό τεχνητής επιλογής (Barbisan *et al.*, 2008).

Στο *Sus scrofa* το MHC βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7, χωρίζεται από το κεντρομερές και έχουν χαρακτηριστεί περισσότερα από 70 γονίδια (Εικόνα 8). Όσον αφορά τα γονίδια τάξης II, κάποια από αυτά κωδικοποιούν τουλάχιστον ένα λειτουργικό ετεροδιμερές *SLA-DR* και ένα *SLA-DQ*, αλλά κανένα *DP*. Όπως και στα υπόλοιπα είδη αυτά τα ετεροδιμερή που αποτελούνται από μία α αλυσίδα 32 kDa που συνδέονται με μία β αλυσίδα 26 kDa (Chardon *et al.*, 1999). Παρόλα αυτά, δεν αποκλείεται να υπάρχει ποικιλομορφία στον αριθμό αντιγράφων των γονιδίων στους απλοτύπους όπως αναφέρεται και στην περίπτωση της HLA περιοχής τάξης II (Ando & Chardon, 2006). Στην υποπεριοχή DR υπάρχει ένα ενεργό γονίδιο *DRA* και το *DRB1*, καθώς και τέσσερα ψευδογονίδια *SLA-DRB*. Στην υποπεριοχή DQ υπάρχουν τα ενεργά *DQA* και *DQB* ενώ υπάρχει και ένα *DQB* ψευδογονίδιο. Τα γονίδια τάξης II είναι είτε μονομορφικά, όπως το *DRA*, είτε ολιγομορφικά όπως το *DQA* είτε φέρουν αξιόλογο πολυμορφισμό όπως το *DRB1* και το *DQB* (Chardon *et al.*, 2000).



Εικόνα 8: Γονιδιακός χάρτης της περιοχής SLA-MHC. Τα γονίδια παρουσιάζονται σε σειρά από την εκτεταμένη περιοχή της τάξης I στο χρωμόσωμα 7p1.1 έως την εκτεταμένη περιοχή της τάξης II στο 7q1.1. Με λευκό συμβολίζονται τα γονίδια που μεταγράφονται, με γκρι τα νέα μετάγραφα και με μαύρο τα ψευδογονίδια (Andon & Chardon, 2006).

Σκοπός της εργασίας

Ο ακραίος πολυμορφισμός που διατηρείται από τη φυσική επιλογή είναι εξαιρετικού ενδιαφέροντος τόσο για τους εξελικτικούς βιολόγους που μελετούν την προέλευση και τη διατήρηση του γενετικού πολυμορφισμού, όσο και για τους γενετιστές πληθυσμών προκειμένου να εξάγουν συμπεράσματα ως προς την ιστορία των πληθυσμών από γενετικά δεδομένα (Richman, 2000). Ο εντοπισμός των γονιδίων που υπόκεινται σε προσαρμογή, ο τρόπος που αυτά μεταβάλλονται ανταποκρινόμενα στη φυσική επιλογή και οι επιλεκτικές δυνάμεις που κατευθύνουν την εξέλιξή τους είναι πρωταρχικοί στόχοι στην ενοποίηση της εξελικτικής βιολογίας και της γενετικής (Tennesen, 2005). Η στενή σύνδεση μεταξύ του ακραίου πολυμορφισμού και των συστημάτων αυτο-αναγνώρισης προτείνει ότι η σύγκριση των εξελικτικών ιδιοτήτων αυτών των συστημάτων μπορεί να αποκαλύψει γενικές οργανωτικές αρχές που υπόκεινται στη διατήρηση του ισοζυγισμένου γενετικού πολυμορφισμού. Επιπροσθέτως, η δομή και το μέγεθος του πληθυσμού έχουν πολύ διαφορετικές συνέπειες για την εξέλιξη του ισοζυγισμένου γενετικού πολυμορφισμού σε σχέση με τον ουδέτερο πολυμορφισμό, υποδεικνύοντας ότι αυτή η ποικιλομορφία μπορεί να είναι μία επιπρόσθετη πηγή για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ιστορία των πληθυσμών (Takahata, 1993a,b). Ταυτόχρονα, ένα μεγάλο τμήμα της έρευνας προσανατολίζεται προς την κατανόηση της γενετικής του MHC καθώς αυτά τα γονίδια καθορίζουν την ευπάθεια σε λοιμώξεις και αυτοάνοσες ασθένειες και είναι σημαντικά για τη μεταμόσχευση ιστών (Page & Holmes, 1998). Η μελέτη του MHC έχει πολλά να προσφέρει σε αυτόν τον τομέα καθώς τα γονίδιά του προσφέρουν διάφορα πλεονεκτήματα που τα κάνουν μοναδικά για τη μελέτη της προσαρμοστικότητας στους φυσικούς πληθυσμούς (δρουν στη διεπιφάνεια του ανοσοποιητικού συστήματος και των μολυσματικών ασθενειών, Bernatchez & Landry, 2003). Μαζί με την αναπαραγωγική επιτυχία και τη θήρευση, οι μολυσματικές ασθένειες είναι καθοριστικός δημογραφικός και εξελικτικός παράγοντας των φυσικών πληθυσμών (Avededo-Whitehouse & Cunningham, 2006). Το πρότυπο ποικιλομορφίας στα γονίδια του MHC δείχνει ότι τα γονίδια αυτά επιλέγονται. Η μελέτη τους παρέχει ένα μικρόκοσμο για την κατανόηση του πώς η φυσική επιλογή μπορεί να διαμορφώσει γενετική ποικιλομορφία (Meyer & Thompson, 2001). Λίγα γενετικά συστήματα είναι τόσο καλά χαρακτηρισμένα σε γονιδιωματικό, πληθυσμιακό και λειτουργικό επίπεδο όπως τα γονίδια του MHC,

καθιστώντας τα ιδανικά για μελέτες που περιλαμβάνουν σχεδόν κάθε πλευρά της πληθυσμιακής γενετικής (Hedrick & Kim, 2000). Όλα τα παραπάνω προσδίδουν στο MHC το πλεονέκτημα χρησιμοποίησής του ως πιθανό μοντέλο ελέγχου υποθέσεων για τις αιτίες και τις συνέπειες της επιλογής καθώς τα γονίδια του προβάλλουν ανάμεσα στις καλύτερες υποψηφιότητες για τη μελέτη της φυσικής επιλογής σε φυσικούς πληθυσμούς (Piertney & Oliver, 2006). Ακόμη, οι πρόσφατες και ραγδαίες περιβαλλοντικές αλλαγές εξαιτίας της ανθρώπινης παρέμβασης υπογραμμίζουν επιπλέον τη σπουδαιότητα μελέτης της γενετικής προσαρμοστικότητας στη βιολογία της διατήρησης (Gutierrez-Espeleta *et al.*, 2000, van der Walt *et al.*, 2001, Aguilar *et al.*, 2004). Έτσι, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη του MHC σε μικρούς πληθυσμούς, σε εξημερωμένα είδη καθώς και σε είδη που έχουν υποστεί έντονη ανθρώπινη μεταχείριση, παράγοντες που επηρεάζουν τη γενετική ποικιλομορφία. Ακόμη, η μελέτη φυσικών πληθυσμών μη προτυποποιημένων (non model) ειδών με παγκόσμια εξάπλωση θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά σε αυτή την κατεύθυνση. Στη συγκεκριμένη μελέτη γίνεται προσπάθεια σύγκρισης του γενετικού πολυμορφισμού και των μηχανισμών εξέλιξης ανάμεσα σε τρία είδη θηλαστικών (*Lepus europaeus*, *Sus scrofa* και *Ovis aries*) με διαφορετική εξελικτική πορεία που έχουν υποστεί την επίδραση διαφορετικών εξελικτικών δυνάμεων. Κρίνεται, έτσι, σκόπιμο να μελετηθούν γονίδια του MHC σε αυτά τα είδη έτσι ώστε αφενός να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί εξέλιξης του κάτω από διαφορετικές εξελικτικές πιέσεις και αφετέρου να διερευνηθεί η δυνατότητα ένταξης των μοριακών δεικτών του MHC σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης και διαχείρισης.

Υλικά και Μέθοδοι

Γενικά

Για τη μελέτη των γονιδίων *DRBI* και *DQA* εφαρμόστηκαν μοριακές μέθοδοι που επέτρεψαν τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των γονιδίων και την περαιτέρω ανάλυσή τους. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκε βιολογικό υλικό από διάφορα άτομα των υπό μελέτη ειδών, απομονώθηκε το γενετικό τους υλικό, ενισχύθηκαν τα γονίδια με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και με τη μέθοδο ανάλυσης πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονής αλυσίδας (SSCP) προσδιορίστηκαν τα αλληλόμορφα που φέρει το κάθε άτομο. Στη συνέχεια, έγινε *in silico* επεξεργασία των αλληλουχιών και οι γενετικές παράμετροι των πληθυσμών αναλύθηκαν με τη χρήση στατιστικών πακέτων.

Βιολογικό Υλικό

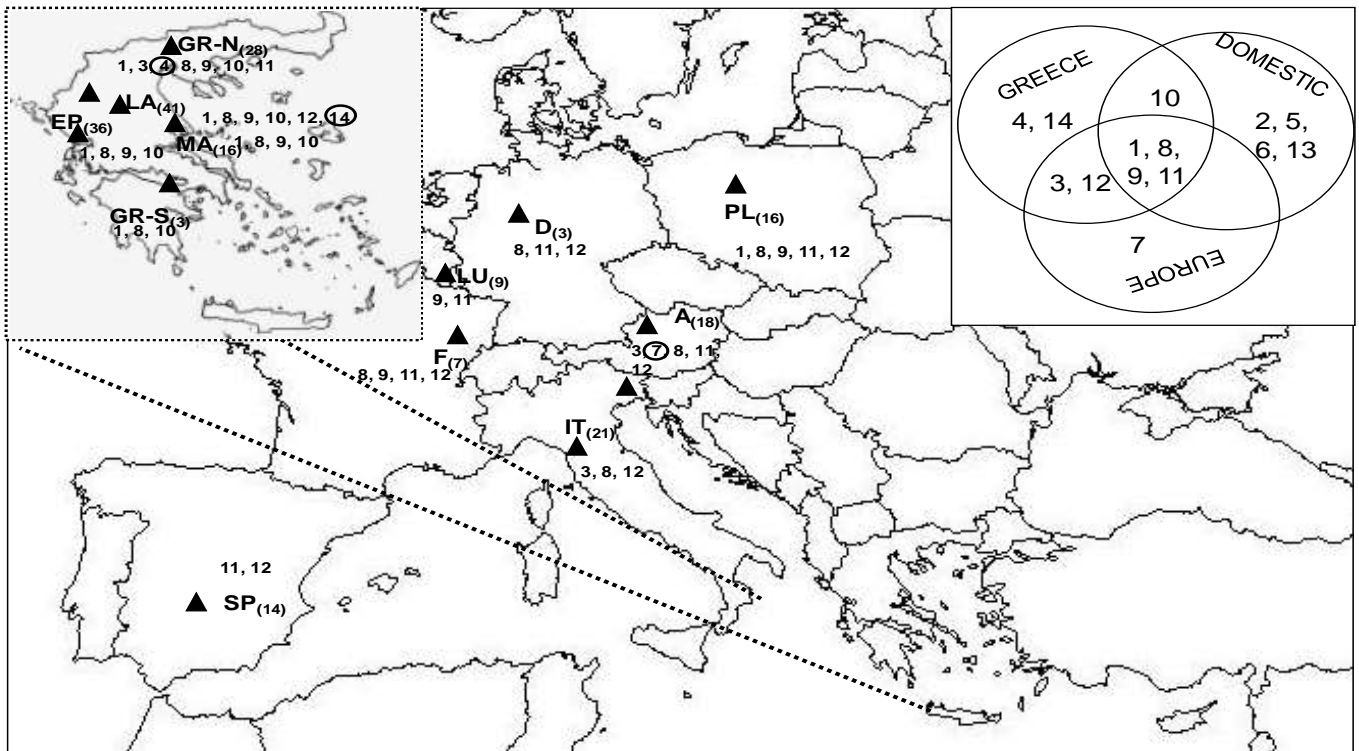
Συγκεντρώθηκε βιολογικό υλικό από τα τρία υπό μελέτη είδη.

Sus scrofa: Συλλέχθηκαν 117 δείγματα αγριόχοιρων κατά τη διάρκεια της κυνηγετικής περιόδου διαφόρων ετών (μέσα Σεπτεμβρίου έως αρχές Ιανουαρίου, 2005-2008) από διάφορες κυνηγετικές οργανώσεις. Οι μυϊκοί και ηπατικοί ιστοί διατηρήθηκαν σε απόλυτη αιθανόλη στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση. Τα δείγματα αυτά αντιστοιχούν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της Ευρώπης (Εικόνες 9 και 10). Ειδικότερα τα ελληνικά δείγματα προέρχονται από την Ήπειρο (EP), τη Λάρισα (LA), τη Μαγνησία (MA), τη νότια Ελλάδα (GR-S) και τη βόρεια Ελλάδα (GR-N). Δείγματα ευρωπαϊκών αγριόχοιρων (78) εστάλησαν από το Dr Massimo Scandura, και αντιστοιχούν στις εξής ευρωπαϊκές χώρες: Αυστρία (A), Γαλλία (F), Γερμανία (D), Ισπανία (SP), Πολωνία (PL), Ιταλία (IT) και Λουξεμβούργο (LU). Οι μυϊκοί και ηπατικοί ιστοί διατηρήθηκαν σε απόλυτη αιθανόλη στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση. Ακόμη, αναλύθηκαν 81 χοίροι που προέρχονται από πρότυπες εκτροφές της Γερμανίας (Leibniz Institute for Farm Animal Biology), οι οποίοι είναι καθαρόαιμα άτομα των φυλών Leicoma (Lei), Pietrain (Pie) και Landrace (Lan). Οι ηπατικοί ιστοί διατηρήθηκαν σε απόλυτη αιθανόλη στους -20°C για την περαιτέρω ανάλυση. Τέλος, συγκεντρώθηκαν 49 δείγματα χοίρων της φυλής Danbred (Dan) που προέρχονται από εκτροφείο στην περιοχή της Άρτας. Από αυτά τα δείγματα συγκεντρώθηκαν 10 ml αίματος τα οποία φυλάχθηκαν σε αντιπηκτικό (EDTA, 0,5M pH 8.0) στους -20°C .

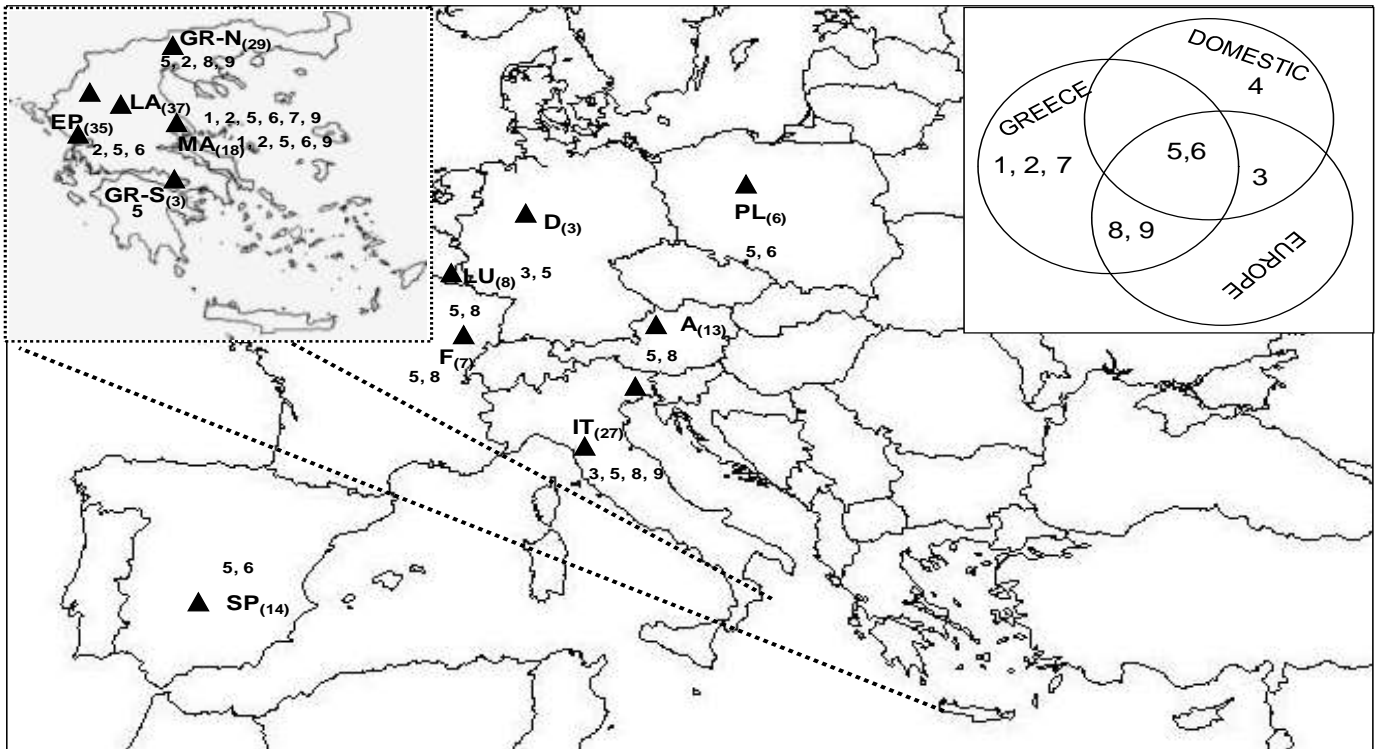
Lepus europaeus: Συλλέχθηκαν 801 δείγματα κατά τη διάρκεια της κυνηγετικής περιόδου διαφόρων ετών (μέσα Σεπτεμβρίου έως αρχές Ιανουαρίου, 1996-2006) από διάφορες κυνηγετικές οργανώσεις. Οι μυϊκοί και ηπατικοί ιστοί διατηρήθηκαν σε απόλυτη αιθανόλη στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση. Τα δείγματα αυτά αντιστοιχούν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας, της κεντρικής Ευρώπης και της Ανατολής (Εικόνες 11 και 12). Συγκεκριμένα, τα ελληνικά δείγματα προέρχονται από την κεντρική Ελλάδα (GR-C), τη δυτική Ελλάδα (GR-W), τη νότια Ελλάδα (GR-S), τη βόρεια Ελλάδα (GR-N) και στη βορειοανατολική Ελλάδα (GR-NE). Ακόμη, υπάρχουν δείγματα από ευρωπαϊκές χώρες όπως η Βουλγαρία (BG), η Αυστρία (A), η Γαλλία (F), η Γερμανία (D), η Ολλανδία (NL), η Μεγάλη Βρετανία (GB), η Πολωνία (PL), η Ιταλία (IT) και η Ελβετία (CH) καθώς και δείγματα από την Ανατολή από τις χώρες Τουρκία (TR) και Ισραήλ (IL).

Ovis aries: Συνολικά, συγκεντρώθηκαν 102 δείγματα από άτομα και των τριών φυλών. Όλα τα δείγματα ήταν αίμα και συγκεκριμένα, 10 ml αίματος τα οποία φυλάχθηκαν σε αντιπηκτικό (EDTA, 0,5M pH 8.0) στους -20°C . Τα 53 άτομα της φυλής Μπούτσικα προέρχονται από εκτροφείο στην περιοχή των Τρικάλων ενώ τα 19 άτομα Frizarta προέρχονται από εκτροφείο στην περιοχή της Άρτας. Τέλος, τα 30 άτομα Comisana προέρχονται από εκτροφείο της Ιταλίας.

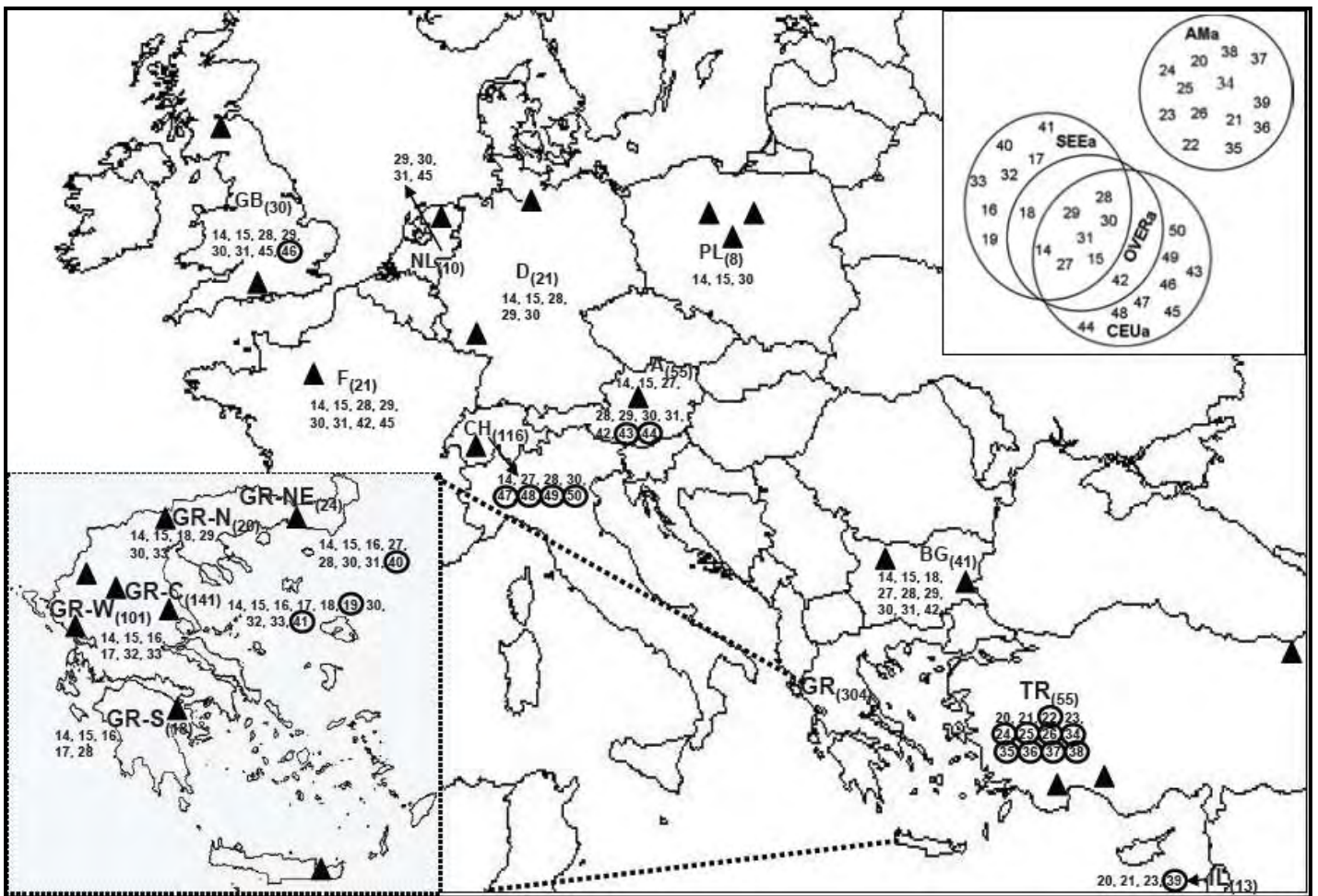
Στους παρακάτω χάρτες (Εικόνες 9-12) φαίνονται οι περιοχές δειγματοληψίας, ο αριθμός των ατόμων κάθε περιοχής καθώς και τα αλληλόμορφα που εντοπίστηκαν στα δείγματα κάθε περιοχής για τα είδη *Sus scrofa* και *Lepus europaeus* για τα γονίδια *DQA* και *DRB1*.



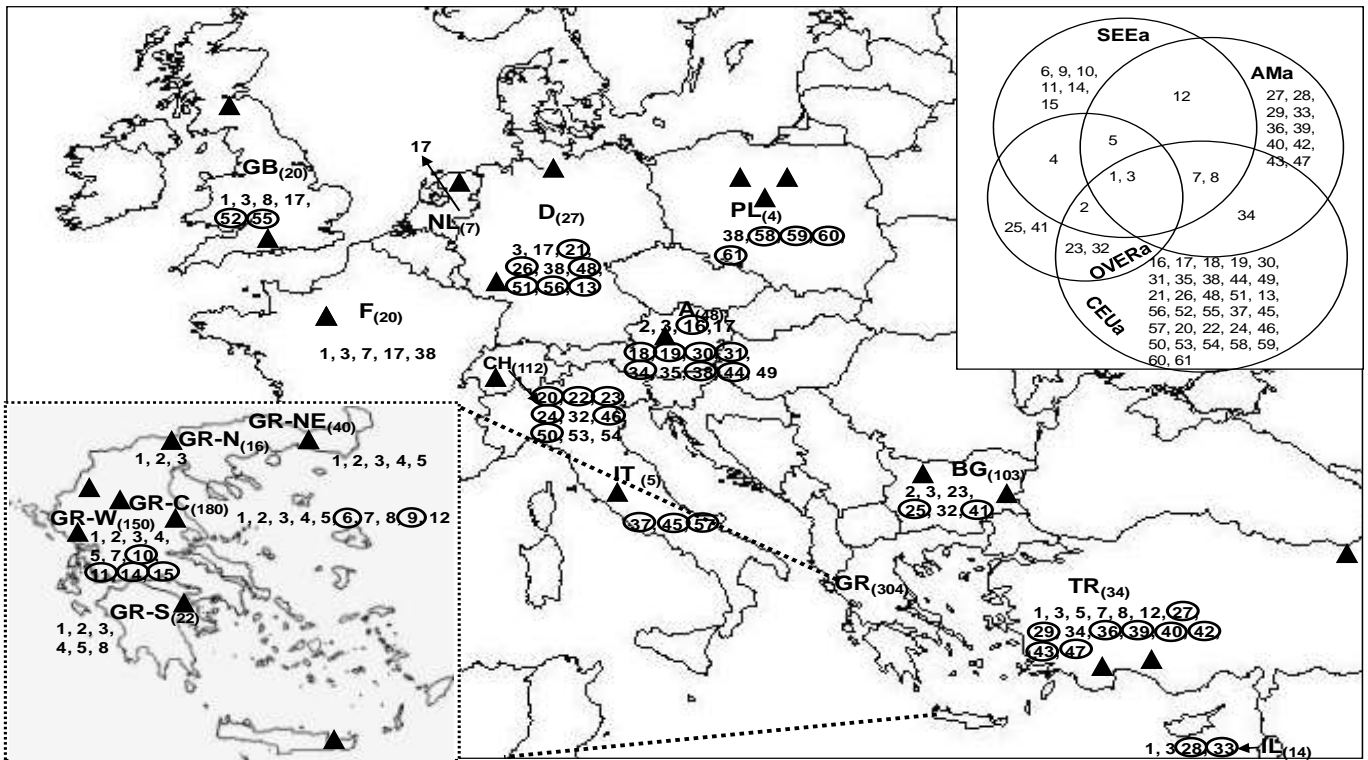
Εικόνα 9: Χάρτης δειγματοληψίας των πληθυσμών *Sus scrofa*. Οι περιοχές συλλογής δειγμάτων δείχνονται με συντομογραφίες των χωρών και οι ακριβείς τοποθεσίες συμβολίζονται με τρίγωνο. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις (που δείχνονται ως δείκτες) δείχνουν τον αριθμό ατόμων που συλλέχθηκαν σε κάθε περιοχή. Η δειγματοληπτική πυκνότητα ήταν μεγαλύτερη στην Ελλάδα και τα ελληνικά δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε πληθυσμούς με βάση την περιοχή προέλευσης: Λάρισα (LA), Μαγνησία (MA), Ήπειρος (EP), Βόρεια Ελλάδα (Northern Greece, GR-N) και Νότια Ελλάδα (South Greece, GR-S). Τα αλληλόμορφα **DRB1** που ανιχνεύθηκαν σε κάθε πληθυσμό παρουσιάζονται μόνο με τον αριθμό χωρίς το πρόθεμα Susc-DRB1*, και τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά για κάθε πληθυσμό κυκλώνονται. Το ένθεμα επάνω δεξιά δείχνει τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά ή μοιράζονται μεταξύ των πληθυσμών μετά από ομαδοποίηση των πληθυσμών σε τρεις κύριες ομάδες με βάση τη γεωγραφική περιοχή και την εξημέρωση, Ελλάδα (Greece), Κεντρική Ευρώπη (Europe) και οικόστοι χοίροι (Domestic).



Εικόνα 10: Χάρτης δειγματοληψίας των πληθυσμών *Sus scrofa*. Οι περιοχές συλλογής δειγμάτων δείχνονται με συντομογραφίες των χωρών και οι ακριβείς τοποθεσίες συμβολίζονται με τρίγωνο. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις (που δείχνονται ως δείκτες) δείχνουν τον αριθμό ατόμων που συλλέχθηκαν σε κάθε περιοχή. Η δειγματοληπτική πυκνότητα ήταν μεγαλύτερη στην Ελλάδα και τα ελληνικά δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε πληθυσμούς με βάση την περιοχή προέλευσης: Λάρισα (LA), Μαγνησία (MA), Ήπειρος (EP), Βόρεια Ελλάδα (Northern Greece, GR-N) και Νότια Ελλάδα (South Greece, GR-S). Τα αλληλόμορφα **DQA** που ανιχνεύτηκαν σε κάθε πληθυσμό παρουσιάζονται μόνο με τον αριθμό χωρίς το πρόθεμα Susc-DQA*. Το ένθεμα επάνω δεξιά δείχνει τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά ή μοιράζονται μεταξύ των πληθυσμών μετά από ομαδοποίηση των πληθυσμών σε τρεις κύριες ομάδες με βάση τη γεωγραφική περιοχή και την εξημέρωση, Ελλάδα (Greece), Κεντρική Ευρώπη (Europe) και οικόστοι χοίροι (Domestic).



Εικόνα 11: Χάρτης δειγματοληψίας των πληθυσμών *Lopus europaeus*. Οι περιοχές συλλογής δειγμάτων δείχνονται με συντομογραφίες των χωρών και οι ακριβείς τοποθεσίες συμβολίζονται με τρίγωνο. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις (που δείχνονται ως δείκτες) δείχνουν τον αριθμό ατόμων που συλλέχθηκαν σε κάθε περιοχή. Η δειγματοληπτική πυκνότητα ήταν μεγαλύτερη στην Ελλάδα και τα ελληνικά δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε πληθυσμούς με βάση την περιοχή προέλευσης: Κεντρική Ελλάδα (Central Greece, GR-C), Δυτική Ελλάδα (Western Greece, GR-W), Νότια Ελλάδα (Southern Greece, GR-S), Βόρεια Ελλάδα (Northern Greece, GR-N) και Βόρειο Ανατολική Ελλάδα (North-eastern Greece, GR-NE). Τα αλληλόμορφα *DQA* που ανιχνεύτηκαν σε κάθε πληθυσμό παρουσιάζονται μόνο με τον αριθμό χωρίς το πρόθεμα *Leu-DQA**, και τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά για κάθε πληθυσμό κυκλώνονται. Το ένθεμα επάνω δεξιά δείχνει τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά ή μοιράζονται μεταξύ των πληθυσμών μετά από ομαδοποίηση των πληθυσμών σε τέσσερις κύριες ομάδες με βάση τη γεωγραφική περιοχή, Νοτιο-ανατολική Ευρώπη (SEE a, South-Eastern European area), περιοχή επικάλυψης (OVER a, Overlap area), Κεντρική Ευρώπη (CEU a, Central European area) και Ανατολή (AM a, Anatolia / Middle East area), όπως προσδιορίστηκαν από τους Stamatis *et al.* (2009).



Εικόνα 12: Χάρτης δειγματοληψίας των πληθυσμών *Lepus europaeus*. Οι περιοχές συλλογής δειγμάτων δείχνονται με συντομογραφίες των χωρών και οι ακριβείς τοποθεσίες συμβολίζονται με τρίγωνο. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις (που δείχνονται ως δείκτες) δείχνουν τον αριθμό ατόμων που συλλέχθηκαν σε κάθε περιοχή. Η δειγματοληπτική πυκνότητα ήταν μεγαλύτερη στην Ελλάδα και τα ελληνικά δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε πληθυσμούς με βάση την περιοχή προέλευσης: Κεντρική Ελλάδα (Central Greece, GR-C), Δυτική Ελλάδα (Western Greece, GR-W), Νότια Ελλάδα (Southern Greece, GR-S), Βόρεια Ελλάδα (Northern Greece, GR-N) και Βόρειο Ανατολική Ελλάδα (North-eastern Greece, GR-NE). Τα αλληλόμορφα **DRB1** που ανιχνεύθηκαν σε κάθε πληθυσμό παρουσιάζονται μόνο με τον αριθμό χωρίς το πρόθεμα *Leeu-DRB1**, και τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά για κάθε πληθυσμό κυκλώνονται. Το ένθεμα επάνω δεξιά δείχνει τα αλληλόμορφα που είναι μοναδικά ή μοιράζονται μεταξύ των πληθυσμών μετά από ομαδοποίηση των πληθυσμών σε τέσσερις κύριες ομάδες με βάση τη γεωγραφική περιοχή, Νοτιο-ανατολική Ευρώπη (SEE a, South-Eastern European area), περιοχή επικάλυψης (OVER a, Overlap area), Κεντρική Ευρώπη (CEU a, Central European area) και Ανατολή (AM a, Anatolia / Middle East area), όπως προσδιορίστηκαν από τους Stamatis *et al.* (2009).

Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από μυϊκό ιστό ή ήπαρ ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο προτείνεται από την εταιρεία eppendorf (Herrmann & Frischauf, 1987, Laws & Adams, 1996, Murphy & Hellwig, 1996) με κάποιες τροποποιήσεις. Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Τοποθέτηση 100mg ιστού αρκετά τεμαχισμένου σε σωληνάριο eppendorf (1,5ml) και προσθήκη 700μl lysis buffer (50mM Tris-HCl 2M, pH 8.0, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS).
2. Προσθήκη 20μl πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) στο δείγμα και ήπια ανάδευση.
3. Ολονύκτια (overnight) επώαση στους 55°C με συνεχή ανακίνηση των δειγμάτων.
4. Προσθήκη 15μl RNase A (1mg/ml) και επώαση στους 37°C για 2 ώρες με συνεχή ανακίνηση των δειγμάτων.
5. Προσθήκη 350μl φαινόλης και 350μl χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης. Ανάδευση για 10 min και φυγοκέντρηση για 10 min στις 13.000 στροφές στους 4°C.
6. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο eppendorf του 1,5ml. Προσθήκη 350μl φαινόλης και 350μl χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης. Ανάδευση για 10 min και φυγοκέντρηση για 10 min στις 13.000 στροφές στους 4°C.
7. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο eppendorf. Προσθήκη 700μl χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης. Ανάδευση για 10 min και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 10 min στους 4°C.
8. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο eppendorf του 1,5ml. Προσθήκη 40μl οξικού νατρίου (CH₃COONa, 3M) και 1ml 100% παγωμένη αιθανόλη.
9. Απομάκρυνση της αιθανόλης. Παραμονή των δειγμάτων για περίπου 1 ώρα στους 37°C.
10. Αραίωση των δειγμάτων σε 100μl ddH₂O και επώαση ολονύκτια (overnight) σε θερμοκρασία δωματίου.

Η σωστή απομόνωση του DNA είναι καθοριστικής σημασίας για τη μελέτη του και περιλαμβάνει ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμό. Μια αποτελεσματική μέθοδος απομόνωσης πρέπει να είναι αποδοτική ποσοτικά αλλά και ποιοτικά δίνοντας DNA σε καλή κατάσταση, δηλαδή μη διασπασμένο σε μικρά κομμάτια. 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 Ca^{++} ή το Mg^{++} . 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 επειδή είναι αδιάλυτο σε αυτούς τους οργανικούς διαλύτες.

Για την απομόνωση DNA από δείγματα αίματος χρησιμοποιήθηκε ένα δεύτερο πρωτόκολλο απομόνωσης του Budwold και των συνεργατών του (1990). Τα δείγματα από αίμα φυλάσσονται σε αντιπηκτικό (EDTA, 0,5M pH 8.0) στους -20°C .

1. Αρχικά τοποθετείται 0,5ml αίματος σε σωλήνα eppendorf και προστίθεται 1 ml SSC 1X. Στη συνέχεια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 3 min.
2. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 1ml SSC 1X. Στη συνέχεια ανάδευση και φυγοκέντρηση για 1 min στις 13.000 στροφές.
3. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη 500μl NaOAc 0,2M, ανάδευση, προσθήκη 50μl SDS 5% και 10μl πρωτεΐνάση K (10mg/ml), επώαση για 1 ώρα στους 55°C .

4. Προσθήκη 500μl φαινόλης και 500μl χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης, ανάδευση, και φυγοκέντρηση για 5 min στις 13.000 στροφές.
5. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα erpendorf, προσθήκη 1ml χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης, φυγοκέντρηση για 10 min στις 13.000 στροφές.
6. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα erpendorf. Προσθήκη 40μl οξικού νατρίου (CH_3COONa , 3M) και 1ml 100% παγωμένη αιθανόλη.
7. Απομάκρυνση της αιθανόλης. Παραμονή των δειγμάτων για περίπου 1 ώρα στους 37°C.
8. Αραίωση των δειγμάτων σε 100μl ddH₂O και επώαση ολονύκτια (overnight) σε θερμοκρασία δωματίου.

Η οσμωτική πίεση ρυθμίζεται από το NaOAc το οποίο προκαλεί τη διόγκωση και στη συνέχεια λύση των κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται η διάσπαση των κυττάρων. Το SSC δεσμεύει τα κατιόντα τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών. Το ιοντικό απορρυπαντικό SDS προστατεύει το DNA από τις νουκλεάσες διασπώντας τις πυρηνικές μεμβράνες και αποδιατάσσοντας τις πρωτεΐνες. Ο ρόλος των υπόλοιπων αντιδραστηρίων έχει αναλυθεί προηγουμένως.

Η απομόνωση ελέγχεται με φωτομέτρηση ή/και με ηλεκτροφόρηση (3μl διαλύματος DNA) σε πηκτή αгарόζης 1% w/v, 1x TAE ρυθμιστικό διάλυμα (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA), 1 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο. Η εξέταση της πηκτής αгарόζης γινόταν σε τράπεζα υπεριώδους φωτός, και σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος ακολουθούσε ενίσχυση των αλληλουχιών-στόχων με τη μέθοδο PCR. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA η οποία πρέπει να είναι πάνω από 150ng/μl. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm (στην τιμή αυτή απορροφούν οι πρωτεΐνες και κυρίως τα αρωματικά αμινοξέα) είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA, δηλαδή το δείγμα έχει απαλλαγεί από τις πρωτεΐνες, και αναμένεται να έχει τιμή περίπου 2 σε κατάλληλα για χρήση δείγματα.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Δεδομένου ότι ο βασικός σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του πολυμορφισμού των γονιδίων του MHC επιλέχθηκαν να ενισχυθούν γονίδια που θα

κωδικοποιούν για την α- και β-αλυσίδα και που θα υπάρχουν και στα τρία υπό μελέτη είδη. Έτσι ενισχύθηκαν τα γονίδια *DRB1* και *DQA* στα είδη *Sus scrofa*, *Lepus europaeus* και *DRB1* και *DQA2* στο είδος *Ovis aries*. Για κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών καθώς και διαφορετικές βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης.

Η PCR είναι μία *in vitro* τεχνική απλή, γρήγορη και ευαίσθητη που επιτρέπει την επιλεκτική αντιγραφή ειδικών αλληλουχιών DNA από ένα σύνθετο μίγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου δηλαδή χωρίς την επίπονη διαδικασία της κλωνοποίησης (Saiki *et al.*, 1988). Υπάρχουν τρία κύρια στάδια σε μία PCR τα οποία επαναλαμβάνονται για 30 έως 40 κύκλους. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε έναν αυτοματοποιημένο κυκλοποιητή ο οποίος μπορεί να θερμαίνει και να ψύχει τα σωληνάρια *eppendorf* με το μίγμα της αντίδρασης σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.

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

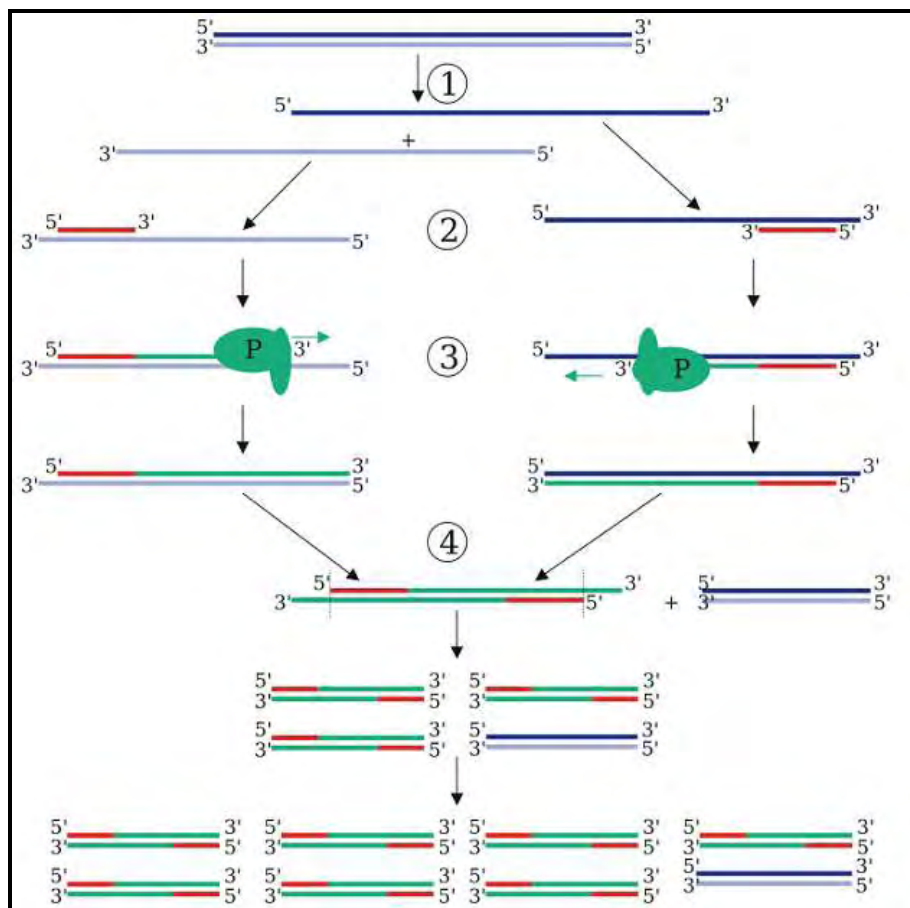
1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
2. Υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο.
3. Σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης (Εικόνα 13).

Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί από το δείγμα, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως μεταξύ 92°C και 96°C. Με αυτό τον τρόπο οι συμπληρωματικοί κλώνοι του DNA απομακρύνονται ενώ όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις σταματούν, π.χ. η επιμήκυνση ενός μορίου από τον προηγούμενο κύκλο.

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

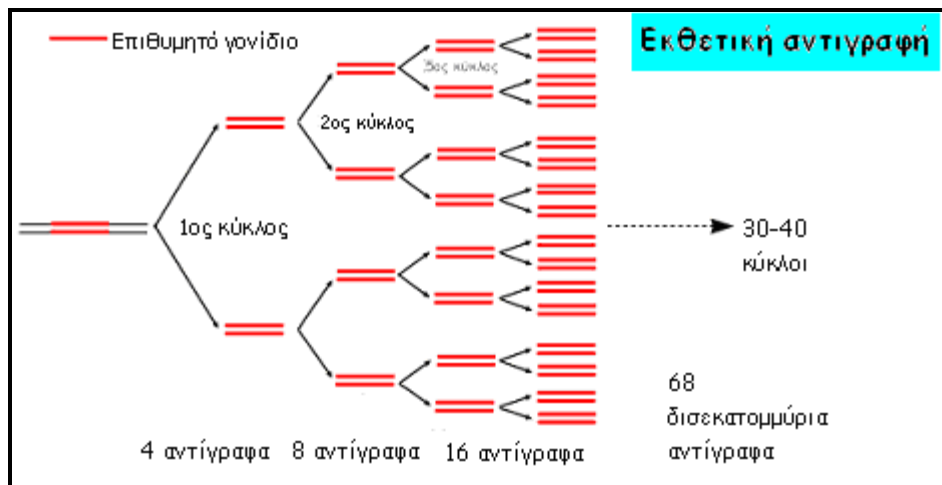
Στο τρίτο και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72°C καθώς αυτή είναι η ιδανική θερμοκρασία για τη δράση της πολυμεράσης. Η χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση επιτρέπει τη σύνθεση του DNA σε κατεύθυνση 5' προς 3'. Μεγάλη ώθηση στην τεχνική PCR έδωσε η ανακάλυψη του θερμοανθεκτικού ενζύμου πολυμεράσης (Taq Polymerase) του βακτηριδίου *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988).



Εικόνα 13: Τα στάδια που ακολουθούνται σε κάθε κύκλο της PCR. (1) Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA. (2) Συγκόλληση των εκκινητών στην αλληλουχία – στόχο. (3) Δράση της πολυμεράσης για τη σύνθεση των νέων μορίων DNA. (4) Εκθετική αύξηση των αντιγράφων (από <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pcr.png>).

Η Taq Polymerase συνθέτει περίπου 2.000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Ο χρόνος που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA-στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR. 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.

Σε μια τυπική ανάλυση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA επαναλαμβάνεται πολλές φορές, συνήθως 30 ή 40, καταλήγοντας στο σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο, ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων του επιθυμητού γονιδίου (από <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>).

Στην παρούσα μελέτη ενισχύθηκαν τα γονίδια *DRB1* και *DQA* στα είδη *Sus scrofa*, *Lepus europaeus* και *DRB1*, *DQA2* στο είδος *Ovis aries*. Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50μl. Στους Πίνακες 4-9 φαίνεται το μήκος των κομματιών που ενισχύθηκαν, η ακολουθία των εκκινητών του κάθε γονιδίου για το κάθε είδος, οι βέλτιστες συνθήκες και τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων.

Πίνακας 4: Μέγεθος προϊόντος PCR (με τους εκκινητές) και ακολουθία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων του MHC στα διάφορα είδη

Όνομα είδους	Όνομα εκκινητή	Περιοχή	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Ακολουθία εκκινητών
<i>Lepus europaeus</i>	DRB.Fw	<i>DRB1</i> (εξώνιο 2)	222	5'GAGTGTCATTTCTACAACGGGA 3'
	DRB.Rv	<i>DRB1</i> (εξώνιο 2)		5'CTCCCGAACCCCGTAGTTGTGTTTGC 3'
	DQA.Fw	<i>DQA</i> (εξώνιο 2)	254	5' TCATCAGCTGACCACGTTGG3'
	DQA.Rv	<i>DQA</i> (εξώνιο 2)		5' GACAGCAGCAGTAGAGTTGG 3'
<i>Sus scrofa</i>	DRB1.Fw	<i>DRB1</i> (εξώνιο 2)	240	5'CGACCATGTTGCCTCCTATG 3'
	DRB1.Rv	<i>DRB1</i> (εξώνιο 2)		5'GGCACCAGGAATGTATCCAA 3'
	DQA.Fw	<i>DQA</i> (εξώνιο 2)	230	5'CGACCATGTTGCCTCCTATG 3'
	DQA.Rv	<i>DQA</i> (εξώνιο 2)		5'TGTTGGAGCGTTTAGTCACG 3'
<i>Ovis aries</i>	DRB1.Fw	<i>DRB1</i> (εξώνιο 2)	258	5'TATCCCGTCTCTGCAGCACATTC3'
	DRB1.Rv	<i>DRB1</i> (εξώνιο 2)		5'TCGCCGCTGCACACTGAAACTCTC3'
	DQA2.Fw	<i>DQA2</i> (εξώνιο 2)	242	5'ACTACCAATCTCATGGTCCCTCT3'
	DQA2.Rv	<i>DQA2</i> (εξώνιο 2)		5'GGAGTAGAATGGTGGACACTTACC3'

Πίνακας 5: Βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων του MHC τάξης II στα είδη *Lepus europaeus* και *Sus scrofa*

Συστατικά	Ενισχυμένα τμήματα			
	<i>DRB</i> (<i>Lepus europaeus</i>)	<i>DQA</i> (<i>Lepus europaeus</i>)	<i>DRB</i> (<i>Sus scrofa</i>)	<i>DQA</i> (<i>Sus scrofa</i>)
Ρυθμιστικό διάλυμα	1x	1x	1x	1x
MgCl ₂	2mM	2mM	2mM	2mM
dNTPs	0,8mM	0,8mM	0,8mM	0,8mM
Εκκινητές	1 pmole	1 pmole	1 pmole	1 pmole
Πολυμεράση	1 unit	1 unit	1 unit	1 unit
Μητρικό DNA	300ng	300ng	300ng	300ng

Πίνακας 6: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση των γονιδίων MHC τάξης II στο είδος *Lepus europaeus*

<i>DRBI</i>		<i>DQA</i>	
	95°C – 4 min		95°C – 4 min
35 κύκλοι	95°C – 40 sec	35 κύκλοι	95°C – 40 sec
	59°C – 50 sec		57°C – 50 sec
	72°C – 40 sec		72°C – 40 sec
	72°C – 10 min		72°C – 10 min

Πίνακας 7: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση των γονιδίων MHC τάξης II στο είδος *Sus scrofa*

<i>DRBI</i>		<i>DQA</i>	
	95°C – 4 min		95°C – 4 min
35 κύκλοι	95°C – 40 sec	35 κύκλοι	95°C – 40 sec
	57°C – 50 sec		58°C – 50 sec
	72°C – 40 sec		72°C – 40 sec
	72°C – 10 min		72°C – 10 min

Πίνακας 8: Βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων του MHC τάξης II στο είδος *Ovis aries*

Συστατικά	Ενισχυμένα τμήματα	
	<i>DRB1</i> (<i>Ovis aries</i>)	<i>DQA2</i> (<i>Ovis aries</i>)
Ρυθμιστικό διάλυμα	1x	1x
MgCl ₂	2mM	2mM
dNTPs	0,8mM	0,8mM
Εκκινητές	1 pmole	1 pmole
Πολυμεράση	1 unit	1 unit
Μητρικό DNA	300ng	300ng

Πίνακας 9: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση των γονιδίων MHC τάξης II στο είδος *Ovis aries*

<i>DRB1</i>		<i>DQA2</i>	
	95°C – 4 min		95°C – 4 min
35 κύκλοι	95°C – 40 sec	35 κύκλοι	95°C – 40 sec
	57°C – 50 sec		57°C – 50 sec
	72°C – 40 sec		72°C – 40 sec
	72°C – 10 min		72°C – 10 min

Ο έλεγχος επιτυχίας της PCR γινόταν με ηλεκτροφόρηση (5μl διαλύματος αντίδρασης) σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v, 1x TAE ρυθμιστικό διάλυμα (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA), και 1μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο. Αν ο έλεγχος της πηκτής αγαρόζης σε τράπεζα υπεριώδους φωτός έδινε θετικό αποτέλεσμα, τότε μέρος του προϊόντος της PCR, χρησιμοποιούνταν για αποδιάταξη και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονής αλυσίδας (SSCP)

Η μέθοδος SSCP (ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονής αλυσίδας) είναι μία τεχνική στην οποία σχηματίζονται μονόκλωνα DNAs από αποδιάταξη τα οποία αναδιπλώνονται και αποκτούν μία ημισταθερή δομή που καθορίζεται από την αλληλουχία των βάσεων του τμήματος DNA και στη συνέχεια αυτά διαχωρίζονται με βάση την ηλεκτροφορητική κινητικότητα τους στο πήκτωμα, που μπορεί να οφείλεται

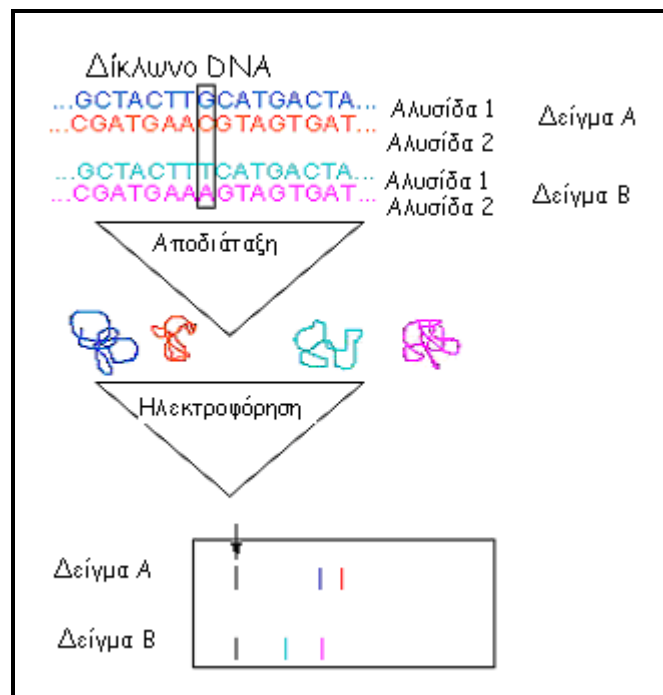
ακόμη και σε μετάλλαξη ενός και μόνο νουκλεοτιδίου. Η διαμόρφωση του κάθε κλώνου διαφέρει ελαφρώς ανάλογα με την ακριβή του αλληλουχία και αυτές οι διαφορές στη διαμόρφωση μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορές στην κινητικότητα τους στο πήκτωμα (Εικόνα 15).

Η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων και η διακριτική ικανότητα της μεθόδου εξαρτάται από τη σύσταση της πηκτής (ποσοστό ακρυλαμίδης, αναλογία ακρυλαμίδης / bis-ακρυλαμίδης), την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος, την τάση του ηλεκτρικού πεδίου και τη θερμοκρασία ηλεκτροφόρησης (Orita *et al.*, 1989). Εξαιτίας των πολλών παραγόντων που επηρεάζουν την ανάλυση SSCP, δοκιμάζονται περισσότερες από μία συνθήκες. Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου είναι καλύτερη για μικρότερα κομμάτια (έως περίπου 300bp). Συνεπώς, εφαρμόστηκαν διαφορετικές συνθήκες για τα γονίδια που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία τα οποία είχαν όλα μέγεθος από 210-250bp.

Αρχικά γίνεται αποδιάταξη του DNA για να διατηρηθούν τα δείγματα του DNA σε μονόκλωνη κατάσταση για λίγη ώρα. Η διαδικασία περιλαμβάνει μεταφορά μέρους του προϊόντος της PCR (6μl) σε νέο σωληνάριο erpendorf και προσθήκη 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (95% v/v φορμαμίδιο, 10mM NaOH, 0,05% v/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,05% v/v κυανού του ξυλενίου, 10% v/v γλυκερόλης, αποθήκευση στους 4°C)

Στη συνέχεια τα erpendorf τοποθετούνται στον αυτοματοποιημένο κυκλοποιητή όπου επέρχεται η αποδιάταξή τους αφότου μείνουν σε υψηλές θερμοκρασίες (95°C για 2 min, 97°C για 2 min, 99°C για 7 min). Μόλις τα δείγματα βγουν από τον κυκλοποιητή τοποθετούνται απευθείας στον πάγο για να διατηρήσουν για κάποιο χρονικό διάστημα τη μονόκλωνη κατάστασή τους.

Τα δείγματα του DNA για να διαχωριστούν φορτώνονται σε πηκτική 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.



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου SSCP.

Για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης είναι απαραίτητο το μητρικό διάλυμα της ακρυλαμίδης (38,5% w/v). Για την παρασκευή του προστίθενται 75g ακρυλαμίδης και 2g bis-ακρυλαμίδη σε 120ml ddH₂O. Αφού διαλυθεί η ακρυλαμίδη και η bis-ακρυλαμίδη, το διάλυμα διηθείται και συμπληρώνεται με ddH₂O μέχρι τον όγκο των 200ml. Το διάλυμα μπορεί να φυλαχτεί στους 4°C για 10-15 ημέρες. Για την παρασκευή πηκτής ακρυλαμίδης χρησιμοποιούνται μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης ανάλογα με την πυκνότητα της πηκτής, 1x TBE (89mM Tris-Base, 89mM boric acid, 20mM EDTA pH 8.0), γλυκερόλη και γίνεται πολυμερισμός με 6μl/ml (20%) υπερθειικού αμμωνίου (APS) που δρα καταλυτικά και 1μl/ml N, N, N', N'- τετραμεθυλαιθυλοδιαμίνης (TEMED), που ενεργοποιεί τον καταλύτη. Αφού στερεοποιηθεί η πηκτή εισάγεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία προστίθεται TBE 0,5x και ηλεκτροφορείται για 18 ώρες.

Στους Πίνακες 10 και 11 φαίνονται η σύσταση της πηκτής καθώς και οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης κάθε γονιδίου που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά.

Πίνακας 10: Σύσταση πηκτής και ηλεκτροφορητικές συνθήκες για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε στα είδη *Lepus europaeus* και *Sus scrofa*

	DRB (<i>Lepus europaeus</i>)	DQA (<i>Lepus europaeus</i>)	DRB1 (<i>Sus scrofa</i>)	DQA (<i>Sus scrofa</i>)
Σύσταση πηκτής	10% w/v	10% w/v	10% w/v	12% w/v
Θερμοκρασία	Θερμοκρασία δωματίου	4 °C	Θερμοκρασία δωματίου	4 °C
Τάση ηλ. πεδίου	190 V	220 V	200 V	180 V

Πίνακας 11: Σύσταση πηκτής και ηλεκτροφορητικές συνθήκες για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε στο είδος *Ovis aries*

	DRB1 (<i>Ovis aries</i>)	DQA2 (<i>Ovis aries</i>)
Σύσταση πηκτής	10% w/v	12% w/v
Θερμοκρασία	Θερμοκρασία δωματίου	Θερμοκρασία δωματίου
Τάση ηλ. πεδίου	210 V	230 V

Χρώση 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. Αρχικά, οι πηκτές τοποθετούνταν σε δοχεία και ξεπλένονται δύο φορές για 3 min με 200ml διαλύματος μονιμοποίησης (10% αιθανόλη, 0,5% οξικό οξύ). Ακολουθούσε χρώση με 200 ml διαλύματος AgNO₃ 0,1% για 20 min, ξέπλυμα με 200ml ddH₂O και στη συνέχεια εμφάνιση με 200ml διαλύματος εμφάνισης [1,5% w/v NaOH, 0,8ml 37% φορμαλδεΰδη και 0,1g Na(BH)₄] μέχρι οι ζώνες να γίνουν διακριτές. Οι πηκτές φωτογραφίζονταν και τοποθετούνταν στους 4°C.

Στην τεχνική silver staining ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με τη φορμαλδεΰδη παρουσία βάσης. Το DNA φαίνεται καφέ σε κίτρινο φόντο. 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.

Κλωνοποίηση τμήματος DNA

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

1. Καθαρισμός και ποσοτικοποίηση των προϊόντων της PCR.

2. Αντίδραση σύνδεσης (ligation) που περιλαμβάνει:

7,5μl 2X ρυθμιστικού διαλύματος

5μl ενθέματος-προϊόντος PCR (~100ng)

1,5μl φορέα pGEM T-Easy (~70ng)

1μl ligase

Ολονύκτια επώαση της αντίδρασης στους 4°C.

Φορέας pGEM-T Easy (Promega, #A3600)

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

3. Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*.

Σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* που προηγουμένως έχουν ξεπαγώσει σε πάγο, γίνεται προσθήκη της αντίδρασης σύνδεσης (7μl), ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για 20min. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υφίστανται θερμικό σοκ στους 42°C για 90sec, προστίθεται υγρό θρεπτικό υλικό LB και επάζονται στους 37°C για 1 ώρα. Έπειτα, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 2.500rpm για 15min, αφαιρείται το περισσότερο υπερκείμενο θρεπτικό, ακολουθεί

επαναιώρηση των κυττάρων και επίστρωσή τους σε στερεό θρεπτικό υλικό LB που περιέχει αμπικιλίνη (100μg/ml) και X-gal για την επιλογή του πλασμιδίου και των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων αντίστοιχα. Ο σχηματισμός των αποικιών γίνεται μετά από ολονύκτια (overnight) επώαση των κυττάρων στους 37°C. Για την παρασκευή θρεπτικού υλικού LB χρησιμοποιούνται 15g LB (Scharlau) ή 30g LB+άγαρ (Scharlau) ανά 1lt ddH₂O για υγρό και στερεό θρεπτικό υλικό αντίστοιχα και ακολουθεί αποστείρωση για 20min. Εάν πρέπει να προστεθεί αντιβιοτικό ή X-gal στο στερεό θρεπτικό υλικό, πρέπει πρώτα να ρυθμιστεί η θερμοκρασία στους ~50°C.

4. Καλλιέργεια των αποικιών.

Από τις σχηματισμένες αποικίες επιλέγονται οι λευκές επειδή πιθανόν να αντιστοιχούν σε ανασυνδυασμένους κλώνους, τοποθετούνται στη συνέχεια σε 3ml υγρού θρεπτικού LB που περιέχει αμπικιλίνη (100μg/ml) και ακολουθεί ολονύκτια (overnight) επώαση στους 37°C υπό ανάδευση.

5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

Η καλλιέργεια των βακτηρίων μεταφέρεται σε σωλήνες eppendorf και τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 2.500rpm για 15min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα βακτήρια επαναωρούνται σε 300μl διαλύματος P1 (15mM Tris-Cl pH 8, 10mM EDTA pH 8). Προστίθενται 300μl διαλύματος αποδιάταξης P2 (200mM NaOH, 1% SDS), ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-15min έτσι ώστε το διάλυμα να γίνει διαυγές. Η εξουδετέρωση γίνεται με προσθήκη 300μl διαλύματος P3 (3M οξικό κάλιο pH 5.5), ισχυρή ανάδευση και επώαση για 20min σε πάγο. Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000rpm στους 4°C για 15min, προκειμένου να συλλεχθεί το υπερκείμενο. Ακολουθεί επαναληπτική φυγοκέντρηση με τις ίδιες συνθήκες. Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθεται περίπου 0,8 του όγκου ισοπροπανόλη και συλλέγεται το DNA μετά από επώαση 15min σε πάγο και φυγοκέντρηση στις 12.000rpm στους 4°C για 15 min. Τέλος, το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, στεγνώνει και επαναδιαλύεται σε 50μl ddH₂O.

Η παραπάνω μεθοδολογία εφαρμόστηκε για τον επιτυχή διαχωρισμό αλληλομόρφων των γονιδίων *DRB*, *DQA* στο λαγό, *DRB1* στον αγριόχοιρο και οικόσιτο χοίρο, *DRB1* και *DQA2* στο πρόβατο.

Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου DRB στο *L. europaeus*

Επειδή η οργάνωση του MHC είναι γνωστή τόσο στο *Onis aries* όσο και στο *Sus scrofa* ήταν γνωστός ο αριθμός των γονιδίων *DRB* και *DQA* καθώς και τα ψευδογονίδια αυτών. Έτσι, γνωρίζαμε ότι το πρόβατο έχει ένα λειτουργικό γονίδιο *DRB* (*DRB1*) και τρία ψευδογονίδια (*DRB2*, *DRB3*, *DRB4*), καθώς και δύο λειτουργικά γονίδια *DQA*, τα *DQA1* και *DQA2* (Dukkipati *et al.*, 2006). Για τον οικόσιτο χοίρο ήταν γνωστό ότι έχει ένα λειτουργικό γονίδιο *DRB*, το *DRB1* και τέσσερα ψευδογονίδια (*DRB2*, *DRB3*, *DRB4*, *DRB5*) και ένα λειτουργικό γονίδιο *DQA* (Renard *et al.*, 2006). Αντίθετα, για τον ευρωπαϊκό λαγό δεν είναι γνωστή η οργάνωση του MHC, ωστόσο, σε όσες μελέτες έχουν γίνει μέχρι σήμερα έχει καταγραφεί ένα μόνο γονίδιο για το *DQA* (Surridge *et al.*, 2008; de Bellocq *et al.*, 2009) ενώ το *DRB* δεν έχει διερευνηθεί καθόλου στο λαγό. Κρίθηκε, λοιπόν, σκόπιμο να μελετηθεί εάν για το *DRB* γονίδιο υπάρχουν ψευδογονίδια εφόσον είναι η πλέον πολυμορφική περιοχή που έχει καταγραφεί στα θηλαστικά μέχρι στιγμής. Η διαδικασία για την εύρεση του αριθμού των γονιδίων και πιθανών ψευδογονιδίων έχει ως εξής:

1. Έλεγχος έκφρασης *DRB* (απομόνωση mRNA από ιστό σπλήνας *L. europaeus*).
2. Στύπωμα Southern

Αρχικά, απομονώθηκε ολικό RNA από ιστό σπλήνας. Έγινε απομόνωση από σπλήνες που ανήκουν σε δύο διαφορετικούς λαγούς που προέρχονται από την περιοχή της Λάρισας. Η σπλήνα τοποθετήθηκε απευθείας σε RNA later και ψύχθηκε στους -20°C. Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο κωδικό της Qiagen. Στη συνέχεια, μέσω της μεθόδου RT-PCR πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του εξωνίου 2, του εξωνίου 3 αλλά και ολόκληρου του τμήματος εξώνιο2-εξώνιο3. Οι εκκινητές και για το εξώνιο 3 σχεδιάστηκαν με βάση αλληλουχία που υπάρχει για το *Oryctolagus cuniculus* (http://www.ensembl.org/Oryctolagus_cuniculus/Gene/Family/Genes?family=ENSF M00500000269593). Αρχικά παρασκευάστηκε το cDNA ως εξής:

1. 1-2,5μg RNA με 1μl Oligodt (0,5μg/μl).
2. Συμπλήρωση μέχρι τα 15μl με DEPC-H₂O.
3. Επώαση 5 min στους 70°C.
4. Τοποθέτηση στον πάγο.

5. Πρόσθεση 5μl M-MLV 5x Buffer, 0,5μl dNTP mix (25mM each), 0,7μl RNasin (40V/μl) και 1μl M-MLVRT (200V/μl) και συμπληρώνεται μέχρι 25μl με DEPC-H₂O.
6. Επώαση μία ώρα στους 42°C και μετά τοποθέτηση στον πάγο.
7. Επώαση 15 min στους 70°C.

Στη συνέχεια ενισχύθηκαν τα τμήματα που αναφέρθηκαν με RT-PCR στην οποία ακολουθήθηκαν οι συνθήκες που περιγράφηκαν για την ενίσχυση του εξωνίου 2 του *DRB1* του *L. europaeus*. Οι εκκινητές για το εξώνιο 3 του *DRB1* παρατίθενται Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Ακολουθία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του εξωνίου 3 του *DRB* στο *L. europaeus*

Όνομα είδους	Όνομα εκκινητή	Περιοχή	Ακολουθία εκκινητών
<i>Lepus europaeus</i>	DRB.Fw	<i>DRB1</i> (εξώνιο 3)	5' AAGGTGACYGTGTAYCCT 3'
	DRB.Rv	<i>DRB1</i> (εξώνιο 3)	5' TCCATTCCACGGTGAKRG 3'

Τα τμήματα που προέκυψαν από την ενίσχυση με PCR αλληλουχίστηκαν και βρέθηκε ότι και στα δύο δείγματα υπάρχουν μόνο μέχρι δύο διαφορετικές αλληλουχίες. Συγκεκριμένα, το ένα δείγμα είχε μόνο μία αλληλουχία (ομόζυγο) ενώ το δεύτερο είχε δύο αλληλουχίες (ετερόζυγο). Επιπροσθέτως, τα τμήματα κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο φορέα. Μετά την κλωνοποίηση, πραγματοποιήθηκε PCR στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από διαφορετικές αποικίες ώστε να ελεγχθεί η ύπαρξη του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου και η αλληλούχηση αντιπροσωπευτικών κλώνων. Η διαδικασία κλωνοποίησης έχει ήδη περιγραφεί. Και πάλι, το αποτέλεσμα ήταν να βρεθούν σε αποικίες που προερχόταν από ένα μόνο άτομο μέχρι δύο αλληλουχίες *DRB*. Συμπερασματικά, στο *Lepus europaeus* υπάρχει ένα μόνο λειτουργικό γονίδιο *DRB* το οποίο μπορεί να ονομαστεί και *DRB1*. Εντούτοις, παραμένει άγνωστο το αν και πόσα ψευδογονίδια του *DRB* υπάρχουν.

Λύση στο πρόβλημα αυτό δίνει η ανάλυση κατά Southern. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται σε γενωμικό DNA, που έχει υποστεί πέψη με περιοριστικά ένζυμα, για να προσδιορίσει τον αριθμό αλληλουχιών (π.χ., αντίγραφα γονιδίου) στο γονιδίωμα. Μία ειδική αλληλουχία ανιχνευτής (probe) υβριδίζεται μόνο με ένα τμήμα

DNA στο οποίο δεν έχει γίνει πέψη από το περιοριστικό ένζυμο, θα παράγει μόνο μία ζώνη στην ανάλυση Southern ενώ πολλαπλές ζώνες πιθανόν να αποκαλυφθούν όταν ο ανιχνευτής υβριδίζεται με άλλες πολύ όμοιες αλληλουχίες (π.χ. αυτές που μπορεί να έχουν προκύψει από διπλασιασμό της αλληλουχίας). Τροποποιήσεις στις συνθήκες υβριδισμού (για παράδειγμα, αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού ή μείωση της συγκέντρωσης άλατος) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αυξηθεί η ειδικότητα και να μειωθεί ο υβριδισμός του ανιχνευτή με αλληλουχίες που είναι λιγότερο όμοιες.

Ως ανιχνευτής στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το εξώνιο 3 του *DRB* καθώς αυτό είναι καλύτερα συντηρημένο εξελικτικά (μόνο ένα μικρό τμήμα του συμμετέχει στην περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου, PBR). Έγινε ενίσχυση του εξωνίου 3 σε 10 άτομα με τη μέθοδο PCR όπου χρησιμοποιήθηκε ραδιενεργό ^{32}P Alpha-dCTP.

Στη συνέχεια, έγινε πέψη με το ένζυμο EcoRI στο DNA έξι ατόμων. Το ένζυμο EcoRI επιλέχθηκε επειδή δεν υπάρχει στο εξώνιο 3 θέση αναγνώρισής του και επομένως δε θα έπεπτε το DNA εντός του εξωνίου 3. Για την αντίδραση πέψης χρησιμοποιήθηκαν 4 μl DNA με 0,6 μl buffer του ενζύμου και 5U ενζύμου σε κάθε αντίδραση. Ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν 10 μl και επωάστηκαν στους 37°C ολονύκτια (overnight).

Το gel που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση παρασκευάστηκε με 1xTPE buffer και αγαρόζη, ο όγκος του ήταν 300ml και ηλεκτροφορήθηκε ολονύκτια στα 50V. Για την παρασκευή 1000ml 10x TPE buffer χρησιμοποιούνται:

108g Tris-Base

40ml 0,5M EDTA με pH 8

Συμπληρώνεται ddH₂O μέχρι τα 900ml

15,5ml Φωσφορικό οξύ 85%

Συμπληρώνεται ddH₂O μέχρι τα 1000ml

Μετά την ηλεκτροφόρηση με ένα νυστέρι σημειώθηκαν στο gel ζώνες ενός δείκτη μεγέθους ζευγών βάσεων. Ακολούθησε η εξισορρόπηση του gel που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Αποπουρίνωση: 15min με HCl 0,25M
2. Μετουσίωση: 25min με 0,5M NaOH και 1,5M NaCl
3. Εξουδετέρωση: 25min με 1M Tris pH 7.5/ 1,5M NaCl

Κατά τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών το gel θα πρέπει να κινείται ελαφρά.

Στη συνέχεια ετοιμάστηκε ένα ανοικτό δοχείο με μία γέφυρα (bridge) το μέγεθος των οποίων ταίριαζε με αυτό του gel. Τοποθετήθηκε η γέφυρα πάνω σε ένα γυάλινο πιάτο στο ανοικτό δοχείο έτσι ώστε τα χαρτιά Whatman που τοποθετούνται να φθάνουν στο buffer που τοποθετείται στο ανοικτό δοχείο. Το buffer που τοποθετήθηκε στο δοχείο είναι 20x SSC (175,3g NaCl, 88,2g NaCl και συμπληρώνεται νερό μέχρι τα 1000ml) και διαπότιζε τα χαρτιά Whatman που βρίσκονταν στη γέφυρα. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε δοχείο με 2x SSC. Το gel τοποθετήθηκε επάνω στα υγρά χαρτιά Whatman και επάνω από αυτό τοποθετήθηκε η μεμβράνη η οποία είχε το μέγεθος του gel. Περιορίστηκαν κατά το δυνατό οι φυσαλίδες αέρα ανάμεσα στο gel και επάνω από αυτό τοποθετήθηκαν 3 χαρτιά Whatman τα οποία πρώτα είχαν τοποθετηθεί σε δοχείο με 2x SSC. Έτσι διαμορφώθηκε μία βαθμίδωση του άλατος κάτω και επάνω από το gel που επέτρεπε τη μεταφορά του DNA στη μεμβράνη. Στις άκρες του gel τοποθετήθηκε αλουμινόχαρτο. Επιπλέον, τοποθετήθηκαν τρία στεγνά χαρτιά Whatman επάνω από τα υγρά. Για να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή μεταφορά τοποθετήθηκαν χαρτιά στην κατασκευή και παρέμεινε έτσι ολονύκτια (overnight). Είναι σημαντικό, ότι η μεμβράνη δεν πρέπει να στεγνώσει πριν ολοκληρωθεί η μεταφορά και για αυτό το λόγο πρέπει να τοποθετηθεί αρκετό 20x SSC. Την επόμενη ημέρα αφαιρέθηκαν όλα τα χαρτιά και η μεμβράνη ξεπλύθηκε με ddH₂O και στη συνέχεια αφέθηκε να στεγνώσει θερμοκρασία δωματίου. Για τη σταθεροποίηση του DNA τοποθετήθηκε η μεμβράνη για 1 h σε φούρνο στους 80°C. Τέλος, ένα φιλμ αυτοραδιογραφίας τοποθετήθηκε μαζί με τη μεμβράνη σε μία κασέτα. Η έκθεση του φιλμ διήρκεσε δύο μέρες και η κασέτα τοποθετήθηκε στον καταψύκτη στους -80°C. Μετά από αυτό το φιλμ εμφανίστηκε σε μηχανήμα εμφάνισης. Το αποτέλεσμα ήταν να εμφανιστούν πέντε ζώνες, προτείνοντας (σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα από την RT-PCR) ότι υπάρχει ένα λειτουργικό γονίδιο *DRB* και άλλα τέσσερα ψευδογονίδια.

Προσδιορισμός των γενετικών παραμέτρων

Σκοπός της μελέτης είναι η μοριακή ανάλυση γονιδίων του MHC σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς ζωικών ειδών, είναι δηλαδή η ένωση δύο ξεχωριστών κλάδων της μελέτης της εξέλιξης στο μοριακό επίπεδο: της ανακατασκευής των εξελικτικών ιστοριών των οργανισμών και της διερεύνησης των μηχανισμών εξέλιξης. Για να γίνει αντιληπτή όμως η εξελικτική διαδικασία είναι απαραίτητο να

υπάρχει μία πλήρης κατανόηση της γενετικής πληθυσμών (Hedrick, 2000). Για το λόγο αυτό μέσω των διαδικασιών που περιγράφηκαν προηγουμένως προσδιορίστηκε ο αριθμός των αλληλομόρφων των γονιδίων *DRB1* και *DQA*, στη συνέχεια ταυτοποιήθηκε η αλληλουχία τους και τέλος τα αποτελέσματα αυτά αναλύθηκαν *in silico*. Εξαιτίας των τεχνολογικών καινοτομιών (ανάπτυξη βιοχημικών τεχνικών όπως η PCR) υπάρχει η δυνατότητα να μελετηθεί η μοριακή εξελικτική γενετική των δεδομένων από τις αλληλουχίες του DNA. Σε αυτή την κατεύθυνση είναι σημαντική και η συμβολή των στατιστικών μεθόδων ανάλυσης δεδομένων. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει πρόοδος στην υπολογιστική τεχνολογία και έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για φυλογενετική ανάλυση και για τη μελέτη των μηχανισμών εξέλιξης.

Για όλους τους παραπάνω λόγους εφαρμόστηκε πληθυσμιακή ανάλυση στους ζωικούς οργανισμούς που μελετήθηκαν, φυλογενετική μελέτη των αλληλουχιών των γονιδίων, υπολογισμός συνώνυμων και μη συνώνυμων υποκαταστάσεων και ανάλυση του δομικού ρόλου που επιτελούν τα αμινοξέα της αμινοξικής αλληλουχίας που κωδικοποιείται από τα γονίδια *DRB1* και *DQA*.

Συγκεκριμένα, για την πληθυσμιακή ανάλυση έγιναν μετρήσεις γενετικής ποικιλότητας, δηλαδή, βρέθηκαν τα αλληλόμορφα κάθε πληθυσμού και η συχνότητά τους, υπολογίστηκε η παρατηρούμενη και αναμενόμενη ετεροζυγωτία, μετρήθηκε η νουκλεοτιδική και αμινοξική ποικιλομορφία, οι γενετικές αποστάσεις των πληθυσμών και το F_{ST} .

Για να γίνει κατανοητό γιατί οι **αλληλομορφικές συχνότητες** διαμορφώνονται ως έχουν είναι απαραίτητο να εισαχθούν σε θεωρητικά (μαθηματικά) μοντέλα τα οποία μπορεί να γίνουν ιδιαίτερα πολύπλοκα.

Η μέτρηση των αλληλομορφικών συχνοτήτων παρέχει μία απλή περιγραφή του ποσού της γενετικής ποικιλότητας σε ένα πληθυσμό. Η ακρίβεια αυτής της μέτρησης εξαρτάται από το μέγεθος του δείγματος και όσο μεγαλύτερο είναι το δείγμα τόσο πιο σωστός είναι ο υπολογισμός των συχνοτήτων σε ένα πληθυσμό (Hedrick, 2000). Η μέτρηση των αλληλομορφικών συχνοτήτων έγινε με το στατιστικό πακέτο GENETIX (Belkhir, 1999). Συνήθως, σε ένα πληθυσμό υπάρχουν περισσότερα από δύο αλληλόμορφα για ένα τόπο και μόνο ο υπολογισμός των συχνοτήτων τους είναι μία νωθρή διαδικασία. Έτσι, μία πιο χρήσιμη μέτρηση γενετικής ποικιλότητας είναι η συνολική συχνότητα των ετεροζυγωτών στο πληθυσμό γνωστή και ως ετεροζυγωτία (h) και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

όπου m είναι ο αριθμός των αλληλομόρφων και x_i η συχνότητα του i αλληλομόρφου στον τόπο (Page & Holmes, 1998). Η μέτρηση της ετεροζυγωτίας είναι η πιο κοινή μέτρηση γενετικής ποικιλότητας σε ένα πληθυσμό. Επειδή τα άτομα στα διπλοειδή είδη είναι είτε ομόζυγα είτε ετερόζυγα σε έναν τόπο, αυτή η μέτρηση είναι ένα βιολογικά χρήσιμο μέγεθος. Ακόμη είναι πολύ χρήσιμη η σύγκριση της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας με την αναμενόμενη ετεροζυγωτία, δηλαδή την ετεροζυγωτία που θα παρατηρούνταν σύμφωνα με το νόμο Hardy – Weinberg. Τόσο η παρατηρούμενη όσο και η αναμενόμενη ετεροζυγωτία υπολογίστηκαν με το στατιστικό πακέτο GENETIX (Belkhir, 1999).

Μία ακόμη συχνά χρησιμοποιούμενη μέτρηση της μοριακής γενετικής ποικιλότητας στους πληθυσμούς είναι ο **μέσος όρος του αριθμού των κατά ζεύγη νουκλεοτιδικών διαφορών** μεταξύ των αλληλουχιών (Π) και υπολογίζεται από τον τύπο

$$\Pi = \frac{1}{[n(n-1)/2]} \sum_{i < j} \Pi_{ij}$$

όπου n είναι ο αριθμός των αλληλουχιών στο δείγμα (έτσι ώστε $n(n-1)/2$ είναι ο αριθμός των κατά ζεύγη συγκρίσεων) και Π_{ij} είναι η διαφορά μεταξύ των i και j αλληλουχιών. Αυτός ο αριθμός μπορεί να τυποποιηθεί διαιρώντας τον με το μήκος της αλληλουχίας (L). Αυτή η νέα μέτρηση είναι γνωστή και ως νουκλεοτιδική ποικιλομορφία που συμβολίζεται με π . Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τον υπολογισμό της αμινοξικής ποικιλομορφίας με τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες (Page & Holmes, 1998). Για να υπολογιστεί η συνολική νουκλεοτιδική και αμινοξική ποικιλομορφία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA4. Ο υπολογισμός του π έγινε με το μοντέλο δύο παραμέτρων του Kimura το οποίο προτείνει ότι ο ρυθμός των υποκαταστάσεων μεταστροφής σε μία νουκλεοτιδική θέση είναι διαφορετικός από το ρυθμό μεταπτώσεων (Kimura, 1980).

Ο **αλληλομορφικός πλούτος (Rs)** δείχνει ότι ο αριθμός των αλληλομόρφων μέσα σε ένα πληθυσμό δεν αυξάνει ανάλογα με το μέγεθος του δείγματος και μετράει τον αριθμό των αλληλομόρφων ανεξάρτητα από το μέγεθος του δείγματος και συνεπώς μπορεί να συγκριθεί μεταξύ δειγμάτων διαφορετικού μεγέθους. Αυτό

υποδεικνύει και σε αυτή την περίπτωση ότι για τον οργανισμό και για το τμήμα DNA που μελετήθηκε υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός αλληλομόρφων του γονιδίου και ότι η δειγματοληψία μεγαλύτερου αριθμού ατόμων δε θα αύξανε τον αριθμό των αλληλομόρφων που παρατηρούνται σε μία ορισμένη περιοχή. Ο υπολογισμός του αλληλομορφικού πλούτου έγινε με το πρόγραμμα FSTAT, έκδοση 2.9.3 (Goudet, 2001).

Η σταθερά **F-statistics** (F_{ST}) μετράει πόσο συχνά συμβαίνει ομομιξία, πληθυσμιακή υποδιαίρεση και γονιδιακή ροή καθώς αυτοί οι παράγοντες είναι πολύ σημαντικοί στη διαμόρφωση της γενετικής δομής των πληθυσμών. Αυτό μπορεί να υπολογιστεί αποτιμώντας πόσο τα επίπεδα της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας διαφέρουν από την αναμενόμενη ετεροζυγωτία των Hardy-Weinberg. Αυτός ο υπολογισμός γίνεται με την τιμή F_{ST} (Page & Holmes, 1998). Ακόμη, οι αλληλομορφικές συχνότητες διαφορετικών πληθυσμών μπορεί να διαφέρουν εξαιτίας της γενετικής παρέκκλισης χωρίς να δρα η επιλογή. Όταν ένας πληθυσμός διαιρείται σε πολλούς πληθυσμούς με δραστικό μέγεθος N σε μία γενιά, η έκταση της διαφοροποίησης των αλληλομορφικών συχνοτήτων στις επόμενες γενιές μπορεί να μετρηθεί με την τιμή F_{ST} (Nei & Kumar, 2000). Συνεπώς, η τιμή F_{ST} είναι μία ένδειξη της διαφοροποίησης πληθυσμών του ίδιου είδους εξαιτίας της δράσης των δυνάμεων της εξέλιξης χωρίς τη φυσική επιλογή. Ο υπολογισμός της τιμής F_{ST} έγινε με το πρόγραμμα FSTAT, έκδοση 2.9.3 (Goudet, 2001).

Το 1972 ο Nei ανέπτυξε τη μέτρηση της **γενετικής απόστασης** της οποίας η τιμή αναμένεται να είναι ανάλογη του εξελικτικού χρόνου όταν λαμβάνονται υπ' όψιν οι επιδράσεις της μετάλλαξης και της γενετικής παρέκκλισης. Όταν οι πληθυσμοί είναι σε ισορροπία μετάλλαξης-παρέκκλισης κατά την εξελικτική διαδικασία και όλες οι μεταλλάξεις καταλήγουν σε νέα αλληλόμορφα, η γενετική απόσταση μεταξύ δύο πληθυσμών αυξάνει ανάλογα με το χρόνο μετά το διαχωρισμό μεταξύ των δύο πληθυσμών (Nei & Kumar, 2000). Αυτή η μέτρηση βοηθάει στην ενοποίηση των δεδομένων σε διαχειρίσιμες αντιστοιχίες και βοηθά στην οπτικοποίηση των σχέσεων μεταξύ πληθυσμών (Hedrick, 2000). Ο υπολογισμός των γενετικών αποστάσεων έγινε με το πρόγραμμα GENETIX (Belkhir, 1999).

Η **ανάλυση μοριακής διασποράς (AMOVA)** χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί ο βαθμός της γενετικής διαφοροποίησης σε διάφορα ιεραρχικά επίπεδα. Ο ίδιος ο χρήστης ορίζει διάφορες ομαδοποιήσεις όπως μέσα στα δείγματα, μεταξύ των

δειγμάτων του ίδιου πληθυσμού, μέσα και μεταξύ πληθυσμών και υπολογίζεται ο τρόπος κατανομής του συνολικού βαθμού ποικιλότητας στις διάφορες ομαδοποιήσεις με τη χρήση του F-statistics (Excoffier *et al.*, 1992). Οι τιμές κυμαίνονται από 0 (έλλειψη διαφοροποίησης) μέχρι 1 (πλήρης διαφοροποίηση). Για την ανάλυση AMOVA χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο ARLEQUIN, έκδοση 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Η στατιστική σημασία των αποτελεσμάτων του F-statistics και των συνιστωσών της διακύμανσης ελέγχεται πραγματοποιώντας 10.000 προσομοιώσεις.

Για τη **φυλογενετική μελέτη** των αλληλουχιών που ταυτοποιήθηκαν κατασκευάστηκαν **φυλογενετικά δέντρα**. Ένα δέντρο είναι η μαθηματική δομή που χρησιμοποιείται για να προσομοιώσει την πραγματική εξελικτική ιστορία μίας ομάδας αλληλουχιών ή οργανισμών. Αυτό το υπαρκτό πρότυπο των ιστορικών σχέσεων είναι το φυλογενετικό ή εξελικτικό δέντρο. Ένα δέντρο αποτελείται από κόμβους (ταξινομικές ομάδες) και κλάδους (τμήματα που συνδέουν τους κόμβους) και τα οποία δείχνουν τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ αλληλουχιών, ειδών, ατόμων ή πληθυσμών (Avice, 1994, Hartl & Clark, 1989). Οι εσωτερικοί κόμβοι αναπαριστούν υποθετικούς προγόνους, οι εξωτερικοί υπάρχουν ως ταξινομικές μονάδες ενώ ο πρόγονος όλων των μονάδων που συνιστούν το δέντρο βρίσκεται στη ρίζα του δέντρου (Page & Holmes, 1998).

Στη συγκεκριμένη μελέτη κατασκευάστηκαν δέντρα σύμφωνα με τη μέθοδο UPGMA και Neighbor-Joining. Η **μέθοδος UPGMA** περιγράφηκε αρχικά από τους Sneath & Sokal (1973). Προϋποθέτει απαραίτητα ότι οι διάφορες φυλογενετικές γραμμές εξελίσσονται με τον ίδιο ρυθμό και έτσι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ εξελικτικών αποστάσεων και χρόνου απόκλισης. Η μέθοδος UPGMA είναι παράδειγμα προσέγγισης που χρησιμοποιεί την πληροφορία της απόστασης (που ονομάζεται φυλογενετική) ενώ η μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας χρησιμοποιεί την κατάσταση του χαρακτήρα (που καλείται κλαδιστική). Οι μέθοδοι απόστασης ενσωματώνουν πληροφορίες από όλες τις μεταβλητές θέσεις (Saitou & Nei, 1986). Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο UPGMA για να προσδιοριστεί η οργάνωση, αρχίζει η ομαδοποίηση των δύο ομάδων με τη μικρότερη γενετική απόσταση, οι οποίοι συνδυάζονται σε μία νέα ταξινομική μονάδα. Στη συνέχεια, υπολογίζεται η γενετική απόσταση της νέας ταξινομικής μονάδας με αυτές που έχουν απομείνει λαμβάνοντας υπ' όψιν την αριθμητική μέση τιμή των αποστάσεών τους (Hedrick, 2000).

Η μέθοδος **Neighbor-Joining** περιγράφηκε από τους Saitou & Nei (1987) και αντίθετα με τη μέθοδο UPGMA μπορεί να ενσωματώσει διαφορετικούς ρυθμούς εξέλιξης σε διάφορες σειρές. Αν και η μέθοδος ακούγεται ίδια με την προσέγγιση που χρησιμοποιείται στη UPGMA, αυτό που ελαχιστοποιεί σε κάθε βήμα είναι το σύνολο του μήκους των κλάδων στο συνολικό δέντρο. Για να ξεκινήσει ένα δέντρο Neighbor-Joining υποτίθεται ότι υπάρχει ένα κεντρικό δέντρο (star tree) στο οποίο δεν υπάρχει ομαδοποίηση. Ο πρώτος υπολογισμός είναι να προσδιοριστεί το συνολικό μήκος του δέντρου όταν όλα τα ζευγάρια των ταξινομικών μονάδων είναι υποθετικά κοντινότεροι γείτονες (Nei & Kumar, 2000). Η ελάχιστη ποσότητα που εξετάζεται σε ένα δέντρο UPGMA είναι διαφορετική από αυτή που εξετάζεται σε ένα δέντρο Neighbor-Joining: για το UPGMA είναι η ελάχιστη απόσταση μεταξύ των ταξινομικών μονάδων και για το Neighbor-Joining είναι το ελάχιστο συνολικό μήκος του δέντρου δεδομένου ότι ένα ζευγάρι ταξινομικών μονάδων είναι κοντινότεροι γείτονες (Hedrick, 2000).

Όταν υπάρχει πληθώρα δεδομένων υπάρχει και ένας μεγάλος αριθμός τοπολογιών δέντρου και έτσι κρίνεται απαραίτητη η στατιστική υποστήριξη των διαφόρων μέρων του δέντρου. Η πιο κοινή προσέγγιση είναι να προσδιοριστεί το επίπεδο στατιστικής εμπιστοσύνης σε ένα συγκεκριμένο κόμβο του δέντρου υπολογίζοντας τις **τιμές bootstrap** (Felsenstein, 1985). Το Bootstrapping είναι προσέγγιση που κάνει αναδειγματοληψία τα αρχικά δεδομένα για να αποκτήσουν επίπεδο σημαντικότητας (significance level). Σε αυτή την περίπτωση, σχεδιάζεται ένα δέντρο με ένα τυχαίο δείγμα και το δέντρο εξετάζεται για να βρεθεί ποια ομαδοποίηση ταξινομικών μονάδων περιέχει. Γενικά, αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές, 10.000, και το ποσοστό των φορών που μία ομαδοποίηση εμφανίζεται, σημειώνεται στο δέντρο (Hedrick, 2000).

Επειδή οι ρυθμοί μετάλλαξης στις συνώνυμες και μη συνώνυμες θέσεις θα έπρεπε να είναι πολύ όμοιοι, η διαφορά στους ρυθμούς υποκατάστασης μεταξύ συνώνυμων και μη συνώνυμων θέσεων μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές στην ένταση της επιλογής καθαρισμού μεταξύ των δύο ειδών θέσεων. Αυτό είναι κατανοητό υπό το πρίσμα της θεωρίας της ουδετερότητας στη μοριακή εξέλιξη. Οι μεταλλάξεις που καταλήγουν σε αλλαγές αμινοξέων έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι επιβλαβείς και να διαταράσσουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών από ότι οι συνώνυμες. Συνεπώς, η πλειοψηφία των μη συνώνυμων μεταλλάξεων περιορίζονται στον πληθυσμό από την

επιλογή καθαρισμού. Αυτό καταλήγει σε μείωση στο ρυθμό των υποκαταστάσεων σε μη συνώνυμες θέσεις. Αντίθετα, οι συνώνυμες αλλαγές έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι ουδέτερες και να σταθεροποιηθούν στον πληθυσμό. Ωστόσο, είναι πιθανό οι μη συνώνυμες αλλαγές να βελτιώσουν τη λειτουργία μίας πρωτεΐνης και έτσι αυτές οι μεταλλάξεις να σταθεροποιηθούν πιο γρήγορα σε ένα πληθυσμό από ότι οι ουδέτερες. Έτσι, ο ρυθμός των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων υπερέρχει του ρυθμού των συνώνυμων μεταλλάξεων εάν η θετική επιλογή παίζει κάποιο ρόλο στην εξέλιξη μιας πρωτεΐνης. Συνεπώς, ένας τρόπος για να ανιχνευτεί η θετική επιλογή είναι να δειχτεί ότι ο αριθμός των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων είναι σημαντικά μεγαλύτερος από αυτό των συνώνυμων υποκαταστάσεων. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι υπολογισμού αυτής της διαφοράς. Όταν ο αριθμός των συνώνυμων και μη συνώνυμων υποκαταστάσεων είναι μικρός υπάρχει μεγάλη πιθανότητα απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης πιο συχνά από ότι αναμένεται και για να λυθεί το πρόβλημα ο Zhang (1999) πρότεινε το ακόλουθο τεστ. Σε αυτή τη δοκιμασία, χρησιμοποιούνται οι αριθμοί των συνώνυμων και μη συνώνυμων διαφορών μεταξύ δύο αλληλουχιών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και οι μέσοι όροι των συνώνυμων και μη συνώνυμων θέσεων. Υπό την επίδραση της ουδετερότητας αναμένεται οι λόγοι αυτών των αριθμών να είναι ίσοι (Graur & Li, 2000). Θετική επιλογή έχει ανιχνευτεί σε συγκεκριμένες περιοχές των γονιδίων του MHC.

Αποτελέσματα

*Sus scrofa****Απομόνωση και ποικιλότητα του εξωνίου 2 των MHC-DRB1 και MHC-DQA***

Η ενίσχυση με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τον κάθε τόπο, έδωσε ένα τμήμα 240bp με τους εκκινητές και ένα τμήμα 198bp χωρίς τους εκκινητές για το *DRB1* ενώ για το *DQA* έδωσε ένα τμήμα 230bp με τους εκκινητές και ένα τμήμα 190bp χωρίς τους εκκινητές. Η ανάλυση με τη μέθοδο SSCP και ακολουθούμενη από τη διαδικασία κλωνοποίησης κατέληξε σε 14 επιβεβαιωμένα αλληλόμορφα *MHC-DRB1* και σε εννέα *MHC-DQA* αλληλόμορφα. Και για τους δύο τόπους βρέθηκαν μόνο μέχρι δύο αλληλουχίες ανά άτομο. Το PCR προϊόν, μετά τη διαγραφή των εκκινητών, αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 20-85 για τη DRβ αλυσίδα και στα κατάλοιπα 9α-72 της DQα αλυσίδας, σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης που προτάθηκε από τους Bondinas *et al.* (2007) ως μία ενοποιημένη πλατφόρμα για τα αλληλόμορφα του MHC τάξης II σε όλα τα ζωικά είδη. Το ακόλουθο σύστημα αρίθμησης βασίζεται στις αμινοξικές αλληλουχίες του HLA-DR και κάθε πρόσθετο αμινοξύ που βρίσκεται σε συγκεκριμένες θέσεις στις ορθόλογες πρωτεΐνες θεωρούνται σαν ενθέσεις. Στο *DQA* του *Sus scrofa* υπάρχει μία ένθεση μεταξύ των θέσεων α9 και α10, που ονομάζεται α9α (Bondinas *et al.*, 2007). Τα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν σε 346 άτομα *Sus scrofa scrofa* και *Sus scrofa f. domestica* και συμβολίζονται ως *SLA-DQA*01* ως *SLA-DQA*09* και *SLA-DRB1*01* ως *SLA-DRB1*14*, σύμφωνα με τους Ellis *et al.* (2006). Πέντε αλληλόμορφα του *DQA* (*SLA-DQA*05, 06, 07, 08, 09*) και επτά του *DRB1* (*SLA-DRB1*08, 09, 10, 11, 12, 13, 14*) είχαν ήδη ανιχνευτεί από προηγούμενες μελέτες (Πίνακας 13). Τα υπόλοιπα αλληλόμορφα κατατέθηκαν στη GenBank, *SLA-DQA*01-04* (HM008962-HM008965) και *SLA-DRB1*01-07* (HM008966-HM008972).

Πενήντα από τα 198 νουκλεοτίδια (25,25%) και 24 από τα 66 αμινοξέα (36,36%) είναι μεταβλητά για το *DRB1* ενώ για το *DQA* 22 από τα 190 νουκλεοτίδια (11,57%) και 14 από τα 64 αμινοξέα (7,29%) είναι μεταβλητά. Στην περιοχή PBR, για το *DQA* η νουκλεοτιδική και αμινοξική ποικιλότητα με 11 και 7 μεταβλητές θέσεις αντίστοιχα ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με του *DRB1* με 27 και 12 μεταβλητές θέσεις αντίστοιχα. Η συνολική νουκλεοτιδική ποικιλότητα (π) είναι $0,092 \pm 0,014$ για το *DRB1* και $0,049 \pm 0,011$ για το *DQA*, ενώ η αμινοξική ποικιλότητα είναι $0,170 \pm 0,037$ για το *DRB1* και $0,092 \pm 0,025$ για το *DQA*. Η υψηλότερη

αμινοξική ποικιλότητα σε σχέση με τη νουκλεοτιδική υποδηλώνει ότι οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις ευνοούνται σε σχέση με τις συνώνυμες υποδεικνύοντας μία επιλεκτική διατήρηση των μη συνώνυμων πολυμορφισμών (Luetkemeier *et al.*, 2009). Γενικά, η κατανομή του πολυμορφισμού ήταν σύμφωνη με δεδομένα από λειτουργικά MHC γονίδια. Και για τα δύο γονίδια ο μεγαλύτερος πολυμορφισμός εντοπίζεται στην περιοχή PBR (27 από τα 50 μεταβλητά νουκλεοτίδια και 12 από τα 24 αμινοξέα για το *DRB1*, και τα μισά από τα μεταβλητά νουκλεοτίδια και αμινοξέα για το *DQA*). Στους Πίνακες 14 και 15 που ακολουθούν φαίνονται οι αμινοξικές αλληλουχίες των δύο γονιδίων.

Πίνακας 13: Οι αριθμοί ID των αλληλομόρφων *SLA-DRB1* και *SLA-DQA* που έχουν βρεθεί από προηγούμενες μελέτες

<i>SLA-DRB1*08</i>	AK348716, GU263817, FJ169413, EU432072, DQ883227, AB215120, AF464046, BX088590, NM01113695, AB016755
<i>SLA-DRB1*09</i>	AK345514, CU468849, FJ169434, EU722919, EU432078, AK238644, AB215121, AY247785, AY247784, AY962314, AF464031, AY135582, EU039935, L36571, Z26641
<i>SLA-DRB1*10</i>	GU263816, FJ169424, FJ169415, EU039937, AK237255, AK347078, AK352455, AK351376, AK350429, L36574, Z26637
<i>SLA-DRB1*11</i>	FJ169439, FJ169427
<i>SLA-DRB1*12</i>	FJ169430, EU496105, EU440344, EF143988, AY135584, AY135581
<i>SLA-DRB1*13</i>	GU263820, EU087427, AY102481
<i>SLA-DRB1*14</i>	AK351871, AK351740, FJ169418, EU432074, EU170460, AK239579, AK238672, AB215123, AY102479, AF464035, AF464032
<i>SLA-DQA*05</i>	EU195194, EU195183, EU195171, EU195160, EU195146, DQ883218, AB215110, BX0885907, NM001114062
<i>SLA-DQA*06</i>	EU195179, EU195174, DQ159886
<i>SLA-DQA*07</i>	EU195216, EU195178, EU195157, EU195151, AY102475
<i>SLA-DQA*08</i>	EU195202, EU195201, AK236590, EU195182, EU195176, EU195189, EU195169, EU195165, DQ159901, DQ159899
<i>SLA-DQA*09</i>	EU195192, EU195180, EU195167, AY247776

Αλληλομορφική κατανομή και συχνότητες

Ο αριθμός των αλληλομόρφων του *DRB1* ανά πληθυσμό κυμαίνεται από δύο στους SP και LU έως επτά στο GR-N και οι συχνότητες αυτών των αλληλομόρφων ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών (Πίνακας 16). Τα αλληλόμορφα *SLA-DRB1*02*, *05*, *06*, και *13* βρέθηκαν μόνο στους ήμερους χοίρους και πιο συγκεκριμένα το αλληλόμορφο *SLA-DRB1*02* εντοπίστηκε μόνο στη φυλή Danbred και το *SLA-DRB1*06* μόνο στη Landrace. Ομοίως, τα αλληλόμορφα *SLA-DRB1*03*, *04*, *07*, *12*, *14* βρέθηκαν μόνο στους αγριόχοιρους. Το *SLA-DRB1*07* παρατηρήθηκε μόνο στην Αυστρία σε δύο ετερόζυγα άτομα ενώ τα *SLA-DRB1*10*, *04*, *14* βρέθηκαν μόνο σε ελληνικούς πληθυσμούς. Υπήρξαν αλληλόμορφα μοναδικά σε κάποιους πληθυσμούς (*SLA-DRB1*02*, *04*, *06*, *07*, *14*) σε πολύ χαμηλές συχνότητες (0,0204, 0,0357, 0,0256, 0,0556, 0,0244 αντίστοιχα), αλλά επίσης και αλληλόμορφα με μία ευρεία κατανομή σε διάφορους πληθυσμούς (π.χ., *SLA-DRB1*08*, *09*, *10*), με συχνότητες που φτάνουν 0,5000 στην EP και GR-S, 0,5556 στη FR και 0,4688 στη MA αντίστοιχα. Πέντε σπάνια αλληλόμορφα (*SLA-DRB1*02*, *03*, *06*, *07* και *14*) ανιχνεύθηκαν και η αυθεντικότητά τους πιστοποιήθηκε από επαναλαμβανόμενες ενισχύσεις με PCR και κλωνοποίηση. Ο αλληλομορφικός πλούτος (*Rs*) μετρά τον αριθμό των αλληλομόρφων ανεξάρτητα από το μέγεθος του δείγματος. Ο αριθμός των αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό δεν αυξάνει ανάλογα με το μέγεθος του πληθυσμού, όπως φάνηκε από τον υπολογισμό του *Rs* (π.χ. την υψηλότερη τιμή *Rs* την είχε ο πολωνικός πληθυσμός, ο οποίος έχει 16 άτομα, ενώ μεγαλύτεροι ή ισοδύναμοι πληθυσμοί είχαν χαμηλότερο *Rs* όπως SP και Dan). Αυτό υποδεικνύει ότι για το *Sus scrofa* και για το τμήμα DNA που μελετήθηκε υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός αλληλομόρφων *DRB1* και ότι η δειγματοληψία μεγαλύτερου αριθμού ατόμων δε θα αύξανε τον αριθμό των αλληλομόρφων που παρατηρούνται σε μία ορισμένη περιοχή. Ο υπολογισμός της ετεροζυγωτίας έδειξε για όλους τους πληθυσμούς, εκτός από τους οικόσιτους χοίρους Danbred, χαμηλότερα επίπεδα ετεροζυγωτίας από ότι αναμενόταν.

Για το *DQA* γονίδιο ο αριθμός των αλληλομόρφων ήταν χαμηλότερος από αυτόν του *DRB1* και κυμαινόταν από ένα στη GR-S έως έξι στη LA (Πίνακας 17). Υπάρχει μόνο ένα αλληλόμορφο που βρέθηκε στους ήμερους χοίρους (*SLA-DQA*04*, στις φυλές Leicoma και Landrace), ενώ τα *SLA-DQA*01*, *02*, *08*, *09* βρέθηκαν μόνο στους αγριόχοιρους. Το αλληλόμορφο *SLA-DQA*03* βρέθηκε σε υψηλές συχνότητες

σε μερικούς Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (IT, D) και σε όλους τους ήμερους χοίρους ενώ το *SLA-DQA*07* βρέθηκε σε χαμηλή συχνότητα (0,0270) στην περιοχή της Λάρισας. Τέλος, το αλληλόμορφο *SLA-DQA*05* υπάρχει σε όλους τους πληθυσμούς σε συχνότητες που κυμαίνονται από 0,1852 (IT) έως 1,000 (GR-S). Την υψηλότερη τιμή Rs την είχε ο πληθυσμός Landrace, ο οποίος έχει 49 άτομα ενώ οι τιμές Rs άλλων μεγάλων ή μικρότερων πληθυσμών ήταν ελαφρά χαμηλότερες (π.χ. 2,849 για τη MA με 18 άτομα και 2,497 για την EP με 35 άτομα).

Πίνακας 16: Αλληλομορφικές συχνότητες του **DRB1** ανά πληθυσμό. Παρουσιάζονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε πληθυσμό (N), τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L), ο αλληλομορφικός πλούτος (Rs), η αναμενόμενη (H exp) και παρατηρούμενη (H obs) ετεροζυγωτία

ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ																
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	EP	LA	MA	GR-N	GR-S	PL	FR	SP	LU	IT	D	A	Lei	Pie	Lan	Dan
SLA-DRB1*01	0,0694	0,4024	0,2188	0,2143	0,1667	0,1563	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5714
SLA-DRB1*02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0204
SLA-DRB1*03	0	0	0	0,1071	0	0	0	0	0	0,2857	0	0,1111	0	0	0	0
SLA-DRB1*04	0	0	0	0,0357	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SLA-DRB1*05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5357	0,7821	0
SLA-DRB1*06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0256	0
SLA-DRB1*07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0556	0	0	0	0
SLA-DRB1*08	0,5000	0,0488	0,1250	0,4821	0,5000	0,1875	0,1111	0	0	0,0952	0,3333	0,0556	0,1944	0,1429	0	0
SLA-DRB1*09	0,0694	0,0488	0,1875	0,0179	0	0,0938	0,5556	0	0,5000	0	0	0	0,0278	0	0,0641	0,0612
SLA-DRB1*10	0,3611	0,4512	0,4688	0,1071	0,3333	0	0	0	0	0	0	0	0,6111	0,3214	0,1282	0,2143
SLA-DRB1*11	0	0	0	0,0357	0	0,2188	0,2222	0,6250	0,5000	0	0,3333	0,5556	0	0	0	0,1122
SLA-DRB1*12	0	0,0244	0	0	0	0,3438	0,1111	0,3750	0	0,6190	0,3333	0,2222	0	0	0	0
SLA-DRB1*13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1667	0	0	0,0204
SLA-DRB1*14	0	0,0244	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(N)	36	41	16	28	3	16	9	16	9	21	3	18	18	14	39	49
(L)	4	6	4	7	3	5	4	2	2	3	3	5	4	3	3	6
(Rs)	2,650	2,753	3,121	3,305	3,000	3,640	2,974	1,956	1,991	2,359	3,000	2,956	2,616	2,566	2,060	2,851
H exp.	0,6100	0,6285	0,6816	0,6958	0,6111	0,7656	0,6173	0,4688	0,5000	0,5261	0,6667	0,6235	0,5602	0,5893	0,3672	0,6104
H obs.	0,1667	0,1220	0,1875	0,0714	0,3333	0,4375	0,0000	0,2500	0,1111	0,0952	0,0000	0,3333	0,1111	0,2143	0,0769	0,6122

Πίνακας 17: Αλληλομορφικές συχνότητες του **DQA** ανά πληθυσμό. Παρουσιάζονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε πληθυσμό (N), τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L), ο αλληλομορφικός πλούτος (Rs), η αναμενόμενη (H exp) και παρατηρούμενη (H obs) ετεροζυγωτία

ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ																
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	EP	LA	MA	GR-N	GR-S	PL	FR	SP	LU	IT	D	A	Lei	Pie	Lan	Dan
<i>SLA-DQA*01</i>	0	0,0270	0,0556	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>SLA-DQA*02</i>	0,5286	0,0135	0,0278	0,0690	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>SLA-DQA*03</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5926	0,6667	0	0,2222	0,6786	0,3571	0,0612
<i>SLA-DQA*04</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1389	0	0,0714	0
<i>SLA-DQA*05</i>	0,3429	0,2568	0,3889	0,5862	1,0000	0,5833	0,4286	0,7857	0,3750	0,1852	0,3333	0,6923	0,6389	0,3214	0,3673	0,2551
<i>SLA-DQA*06</i>	0,1286	0,6622	0,4444	0	0	0,4167	0	0,2143	0	0	0	0	0	0	0,2041	0,6837
<i>SLA-DQA*07</i>	0	0,0270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>SLA-DQA*08</i>	0	0	0	0,0345	0	0	0,5714	0	0,6250	0,1852	0	0,3077	0	0	0	0
<i>SLA-DQA*09</i>	0	0,0135	0,0833	0,3103	0	0	0	0	0	0,0370	0	0	0	0	0	0
(N)	35	37	18	29	3	6	7	14	8	27	3	13	18	14	49	49
(L)	3	6	5	4	1	2	2	2	2	4	2	2	3	2	4	3
(Rs)	2,497	2,318	2,849	2,462	1,000	1,992	1,990	1,802	1,974	2,662	2,000	1,919	2,428	1,928	3,000	2,160
H exp.	0,5865	0,4938	0,6404	0,5541	0,0000	0,4861	0,4898	0,3367	0,4688	0,5789	0,4444	0,4260	0,5231	0,4362	0,6908	0,4638
H obs.	0,1429	0,1351	0,3889	0,1379	0,0000	0,5000	0,2857	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,1538	0,1111	0,2143	0,3061	0,2653

Πληθυσμιακή διαφοροποίηση

Η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των συγκεκριμένων πληθυσμών αποκαλύφθηκε με κατά ζεύγη συγκρίσεις των τιμών F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) και τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων (Nei, 1972). Από τις 120 κατά ζεύγη συγκρίσεις, αξιόλογη γενετική απόκλιση ανιχνεύτηκε μεταξύ 93 πληθυσμών για το *DRBI* και 89 για το *DQA*.

Η ανάλυση έδειξε ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών αγριόχοιρων και εξημερωμένων χοίρων εξαρτάται κάθε φορά από το γονίδιο που μελετάται. Επιπλέον, για το *DRBI* παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφοροποίηση ανάμεσα στους ελληνικούς και ευρωπαϊκούς πληθυσμούς και ήταν υψηλότερη από αυτή που παρατηρούνταν ανάμεσα στους πληθυσμούς αγριόχοιρων και εξημερωμένων χοίρων (Πίνακας 18). Καθόλου ή μόνο ήπια διαφοροποίηση ανιχνεύτηκε για το *DQA* σε όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των πληθυσμών (Πίνακας 19).

Έτσι, πραγματοποιήθηκε ανάλυση AMOVA με τους πληθυσμούς των αγριόχοιρων να κατηγοριοποιούνται σε τρεις κύριες γεωγραφικές περιοχές, σύμφωνα με τις περιοχές δειγματοληψίας τους: (i) στον ελληνικό πληθυσμό, (ii) στην περιοχή της κεντρικής Ευρώπης και (iii) στους ήμερους χοίρους. Η ανάλυση AMOVA για το *DRBI* αποκάλυψε ότι 66,81% της παρατηρούμενης ποικιλότητας θεωρήθηκε ενδο-πληθυσμιακή διαφοροποίηση, 21,93% θεωρήθηκε δια-πληθυσμιακή διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών και 11,26% θεωρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών με συνολική τιμή F_{ST} 33,18% (Πίνακες 20-22). Για το *DQA* η ίδια ανάλυση έδειξε ότι 71,18% της παρατηρούμενης ποικιλότητας θεωρήθηκε ενδο-πληθυσμιακή διαφοροποίηση, 26,97% θεωρήθηκε δια-πληθυσμιακή διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών και 1,84% θεωρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών με συνολική τιμή F_{ST} 28,82% (Πίνακες 23-25).

Η διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών και η τιμή F_{ST} ήταν 2,67% και 29,00% για το *DRBI* όταν οι ελληνικοί πληθυσμοί αγριόχοιρων συγκρίνονταν με τους ήμερους χοίρους ενώ οι αντίστοιχες τιμές όταν συγκρίνονταν οι ευρωπαϊκοί αγριόχοιροι με τους ήμερους χοίρους ήταν 13,82% και 40,19%. Στην ίδια σύγκριση για το *DQA* δεν ανιχνεύτηκαν αξιόλογες διαφορές, ούτε για τη διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών ή για την τιμή F_{ST} . Παρατηρήθηκε επίσης ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών για το *DRBI* μεταξύ των ευρωπαϊκών και ελληνικών πληθυσμών αγριόχοιρων (18,12%) ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από ότι η διαφοροποίηση μεταξύ

όλων των πληθυσμών αγριόχοιρων και των ήμερων χοίρων (3,12%) ενώ οι τιμές F_{ST} ήταν σχεδόν ίδιες. Ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, για το *DQA* δεν παρατηρήθηκε κάτι ξεκάθαρο αλλά υπάρχει η τάση οι ευρωπαϊκοί και ελληνικοί πληθυσμοί αγριόχοιρων να είναι πιο διαφοροποιημένοι από ότι οι πληθυσμοί αγριόχοιρων και ήμερων χοίρων.

Πίνακας 18: Κατά ζεύγη τιμές F_{ST} (επάνω) και γενετικές αποστάσεις (κάτω) για όλους τους πληθυσμούς στο **DRB1**

	LA	MA	GR-N	GR-S	PL	FR	SP	LU	IT	D	A	Lei	Pie	Lan	Dan
EP	0,18855	0,09497	0,04592	-0,16737	0,20589	0,28407	0,42834	0,37894	0,37887	0,12600	0,34493	0,10588	0,22948	0,47550	0,29447
	0,554	0,304	0,152	0,020	1,001	1,412	-1,000	2,543	2,200	0,772	2,624	0,259	0,758	2,281	1,167
LA		0,00648	0,19203	0,04881	0,21892	0,31648	0,41067	0,37252	0,38502	0,25080	0,34746	0,13326	0,24906	0,45592	0,06155
		0,088	0,749	0,452	1,245	2,371	3,883	2,872	3,056	2,669	3,829	0,344	0,944	2,073	0,143
MA			0,14063	-0,03747	0,17663	0,19854	0,39375	0,28547	,36195	0,16797	0,31071	0,04264	0,18861	0,44823	0,13642
			0,661	0,321	1,290	1,084	-1,000	1,448	3,485	2,056	3,909	0,169	0,763	1,828	0,396
GR-N				-0,14388	0,12177	0,23691	,36498	0,32458	0,30719	0,02098	0,26808	0,21519	0,24196	0,45821	0,21976
				0,096	0,694	1,564	2,891	2,678	1,602	0,612	1,755	0,829	1,230	3,384	0,827
GR-S					0,08478	0,19517	0,41629	0,34578	0,32974	-0,10000	0,27748	0,01089	0,14592	0,50195	0,20956
					0,924	1,938	-1,000	-1,000	2,199	0,770	2,623	0,318	0,806	2,452	0,848
PL						0,11068	0,11915	0,18562	0,12479	-0,12588	0,08359	0,27769	0,26426	0,45138	0,21130
						0,629	0,284	0,784	0,368	0,112	0,355	2,106	2,450	4,160	0,927
FR							0,29508	-0,02273	0,34036	0,05263	0,21314	0,34327	0,33453	0,50805	0,32698
							0,915	0,118	1,680	0,880	0,900	2,405	3,218	2,626	1,879
SP								0,24587	0,31893	0,02086	-0,00343	0,45744	0,44353	0,58067	0,39161
								0,500	0,771	0,233	0,038	-1,000	-1,000	-1,000	1,870
LU									0,44766	0,15385	0,16221	0,41603	0,40559	0,55565	0,35703
									-1,000	0,896	0,446	3,519	-1,000	2,865	1,627
IT										0,09412	0,27408	0,42007	0,40702	0,55282	0,41315
										0,512	0,884	3,205	3,479	-1,000	-1,000
D											-0,04201	0,24823	0,23504	0,50628	0,29662
											0,243	1,776	2,050	-1,000	2,265
A												0,37313	0,35625	0,51452	0,32973
												3,629	3,903	-1,000	1,815
Lei													0,21662	0,49881	0,30330
													0,640	1,885	1,113
Pie														0,08891	0,33799
														0,102	1,759
Lan															0,48090
															2,761

Πίνακας 19: Κατά ζεύγη τιμές F_{ST} (επάνω) και γενετικές αποστάσεις (κάτω) για όλους τους πληθυσμούς στο **DQA**

	LA	MA	GR-N	GR-S	PL	FR	SP	LU	IT	D	A	Lei	Pie	Lan	Dan
EP	0,32516	0,20392	0,23028	0,32537	0,21309	0,31307	0,28882	0,34319	0,35807	0,31135	0,29028	0,25898	0,38616	0,22884	0,35530
	0,931	0,631	0,592	0,629	0,598	1,140	0,567	1,293	1,883	1,434	0,719	0,707	1,477	0,854	0,988
LA		0,02990	0,36416	0,46889	0,07873	0,41336	0,32072	0,43549	0,42268	0,41538	0,40836	0,37247	0,46637	0,21221	-0,01254
		0,072	1,116	1,019	0,181	1,530	0,522	1,684	2,263	1,824	1,109	1,097	1,868	0,545	0,005
MA			0,17038	0,26160	-0,03743	0,26012	0,13542	0,29804	0,31575	0,26039	0,22592	0,19012	0,34928	0,10437	0,05546
			0,448	0,433	0,042	0,944	0,198	1,098	1,645	1,238	0,523	0,511	1,281	0,356	0,086
GR-N				0,08677	0,13749	0,22397	0,12140	0,27379	0,32918	0,26805	0,11184	0,10250	0,35250	0,18426	0,39442
				0,130	0,336	0,566	0,166	0,701	1,232	0,935	0,195	0,208	0,979	0,545	1,185
GR-S					0,25000	0,38650	-0,05963	0,47910	0,43053	0,50000	0,06792	0,02659	0,50184	0,22430	0,50339
					0,206	0,511	0,036	0,665	1,254	0,805	0,090	0,078	0,848	0,415	1,055
PL						0,27733	0,00098	0,34051	0,33764	0,30198	0,16816	0,11699	0,39125	0,08425	0,11188
						0,717	0,064	0,871	1,460	1,011	0,296	0,284	1,055	0,287	0,191
FR							0,33117	-0,08349	0,27897	0,32779	0,05257	0,23871	0,42356	0,23369	0,44586
							0,547	0,005	0,918	1,316	0,136	0,589	1,359	0,925	1,565
SP								0,39543	0,41392	0,39742	0,10390	0,07911	0,44867	0,17201	0,34683
								0,700	1,290	0,841	0,126	0,114	0,884	0,309	0,542
LU									0,29843	0,39326	0,12432	0,29563	0,45348	0,26586	0,46540
									0,938	1,469	0,200	0,742	1,513	1,079	1,719
IT										-0,15354	0,33671	0,22941	0,00478	0,09416	0,42590
										0,057	0,976	0,584	0,054	0,255	1,739
D											0,33973	0,08978	-0,19791	-0,03879	0,42913
											0,895	0,354	0,000	0,139	1,467
A												0,09475	0,41049	0,19929	0,43642
												0,168	0,939	0,505	1,145
Lei													0,21052	0,06863	0,39122
													0,376	0,170	1,052
Pie														0,07508	0,46719
														0,147	1,493
Lan															0,21290
															0,468

Πίνακες 20, 21, 22: Αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης για το *Sus scrofa*, χρησιμοποιώντας τις τρεις κύριες γεωγραφικές περιοχές δειγματοληψίας (Ελληνικοί αγριόχοιροι, Ευρωπαϊκοί αγριόχοιροι και ήμεροι χοίροι) ως επίπεδα ομαδοποίησης ή χωρίς ομαδοποίηση για το **DRB1**. Το ποσοστό της ποικιλομορφίας, η πιθανότητα (P) υπολογισμένη από δοκιμασίες μετάθεσης (permutation tests) και το F statistics δίνονται για κάθε ιεραρχικό επίπεδο (Excoffier *et al.*, 1992). Οι ενδείξεις Eu (Europe, Ευρώπη), Gr (Greece, Ελλάδα), Wb (Wild boar, αγριόχοιροι) και Do (Domestic pig, ήμεροι χοίροι) κάτω από κάθε παράμετρο υποδεικνύουν τις ομάδες πληθυσμών

Πηγή της διακύμανσης	d.f.	Σύνολο τετραγώνων	Συνιστώσες Διακύμανσης	Ποσοστό ποικιλότητας
Μεταξύ ομάδων	2	34,592	0,05138 Va	11,26
Μεταξύ πληθυσμών στις ομάδες	13	54,162	0,10008 Vb	21,93
Μέσα στους πληθυσμούς	656	200,030	0,30492 Vc	66,81
Συνολικό	671	288,784	0,45638	
Δείκτες καθήλωσης (συνολικές τιμές)				
FST		FSC		FCT
0,33187		0,24712		0,11257

Πηγή της διακύμανσης	d.f.		Σύνολο τετραγώνων		Συνιστώσες Διακύμανσης		Ποσοστό ποικιλότητας	
	Eu-Gr	Wb-Do	Eu-Gr	Wb-Do	Eu-Gr	Wb-Do	Eu-Gr	Wb-Do
Μεταξύ ομάδων	1	1	21,408	13,184	0,08626 Va	0,01400 Va	18,12	3,12
Μεταξύ πληθυσμών στις ομάδες	10	14	24,253	75,570	0,06252 Vb	0,13028 Vb	13,13	29,00
Μέσα στους πληθυσμούς	420	656	137,468	200,030	0,32731 Vc	0,30492 Vc	68,75	67,88
Συνολικό	431	671	183,130	288,784	0,47608	0,44921		
Δείκτες καθήλωσης (συνολικές τιμές)								
FST			FSC			FCT		
0,31250		0,32119	0,16037		0,29936	0,18118		0,03117

Πηγή της διακύμανσης	d.f.		Σύνολο τετραγώνων		Συνιστώσες Διακύμανσης		Ποσοστό ποικιλότητας		
	Gr-Do	Eu-Do	Gr-Do	Eu-Do	Gr-Do	Eu-Do	Gr-Do	Eu-Do	
Μεταξύ ομάδων	1	1	10,706	20,691	0,01120 Va	0,06718 Va	2,67	13,82	
Μεταξύ πληθυσμών στις ομάδες	7	9	40,606	43,465	0,11037 Vb	0,12826 Vb	26,34	26,38	
Μέσα στους πληθυσμούς	479	413	142,510	120,082	0,29752 Vc	0,29076 Vc	70,99	59,80	
Συνολικό	487	423	193,822	184,238	0,41908	0,48620			
Δείκτες καθήλωσης (συνολικές τιμές)									
FST		FSC				FCT			
0,29008		0,40198		0,27059		0,30609		0,02671	0,13818

Πίνακες 23, 24, 25: Αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης για το *Sus scrofa*, χρησιμοποιώντας τις τρεις κύριες γεωγραφικές περιοχές δειγματοληψίας (Ελληνικοί αγριόχοιροι, Ευρωπαϊκοί αγριόχοιροι και ήμεροι χοίροι) ως επίπεδα ομαδοποίησης ή χωρίς ομαδοποίηση για το **DQA**. Το ποσοστό της ποικιλομορφίας, η πιθανότητα (P) υπολογισμένη από δοκιμασίες μετάθεσης (permutation tests) και το F statistics δίνονται για κάθε ιεραρχικό επίπεδο (Excoffier *et al.*, 1992). Οι ενδείξεις Eu (Europe, Ευρώπη), Gr (Greece, Ελλάδα), Wb (Wild boar, αγριόχοιροι) και Do (Domestic pig, ήμεροι χοίροι) κάτω από κάθε παράμετρο υποδεικνύουν τις ομάδες πληθυσμών

Πηγή της διακύμανσης	d.f.	Σύνολο τετραγώνων	Συνιστώσες Διακύμανσης	Ποσοστό ποικιλότητας
Μεταξύ ομάδων	2	15,287	0,000707 Va	1,84
Μεταξύ πληθυσμών στις ομάδες	13	53,643	0,10345 Vb	26,97
Μέσα στους πληθυσμούς	644	175,802	0,27298 Vc	71,18
Συνολικό	659	244,732	0,38350	
Δείκτες καθήλωσης (συνολικές τιμές)				
FST		FSC		FCT
0,28818		0,27481		0,01844

Πηγή της διακύμανσης	d.f.		Σύνολο τετραγώνων		Συνιστώσες Διακύμανσης		Ποσοστό ποικιλότητας		
	Eu-Gr	Wb-Do	Eu-Gr	Wb-Do	Eu-Gr	Wb-Do	Eu-Gr	Wb-Do	
Μεταξύ ομάδων	1	1	9,405	5,882	0,02296 Va	-0,00691 Va	5,75	-1,83	
Μεταξύ πληθυσμών στις ομάδες	10	14	36,096	63,048	0,10918 Vb	0,11219 Vb	27,33	29,66	
Μέσα στους πληθυσμούς	388	644	103,707	175,802	0,26728 Vc	0,27298 Vc	66,92	72,17	
Συνολικό	399	659	149,208	244,732	0,39942	0,37827			
Δείκτες καθήλωσης (συνολικές τιμές)									
FST			FSC			FCT			
0,33082		0,27833		0,29002		0,29127		0,05748	
								-0,01826	

Πηγή της διακύμανσης	d.f.		Σύνολο τετραγώνων		Συνιστώσες Διακύμανσης		Ποσοστό ποικιλότητας		
	Gr-Do	Eu-Do	Gr-Do	Eu-Do	Gr-Do	Eu-Do	Gr-Do	Eu-Do	
Μεταξύ ομάδων	1	1	7,092	6,617	-0,00120 Va	0,00588 Va	-0,32	1,55	
Μεταξύ πληθυσμών στις ομάδες	7	9	37,820	33,371	0,09952 Vb	0,10244 Vb	26,32	27,07	
Μέσα στους πληθυσμούς	495	405	138,491	109,406	0,27978 Vc	0,27014 Vc	74,00	71,38	
Συνολικό	503	415	183,403	149,394	0,37809	0,37846			
Δείκτες καθήλωσης (συνολικές τιμές)									
FST			FSC			FCT			
0,26002		0,28621		0,26237		0,27495		-0,00319	
								0,01553	

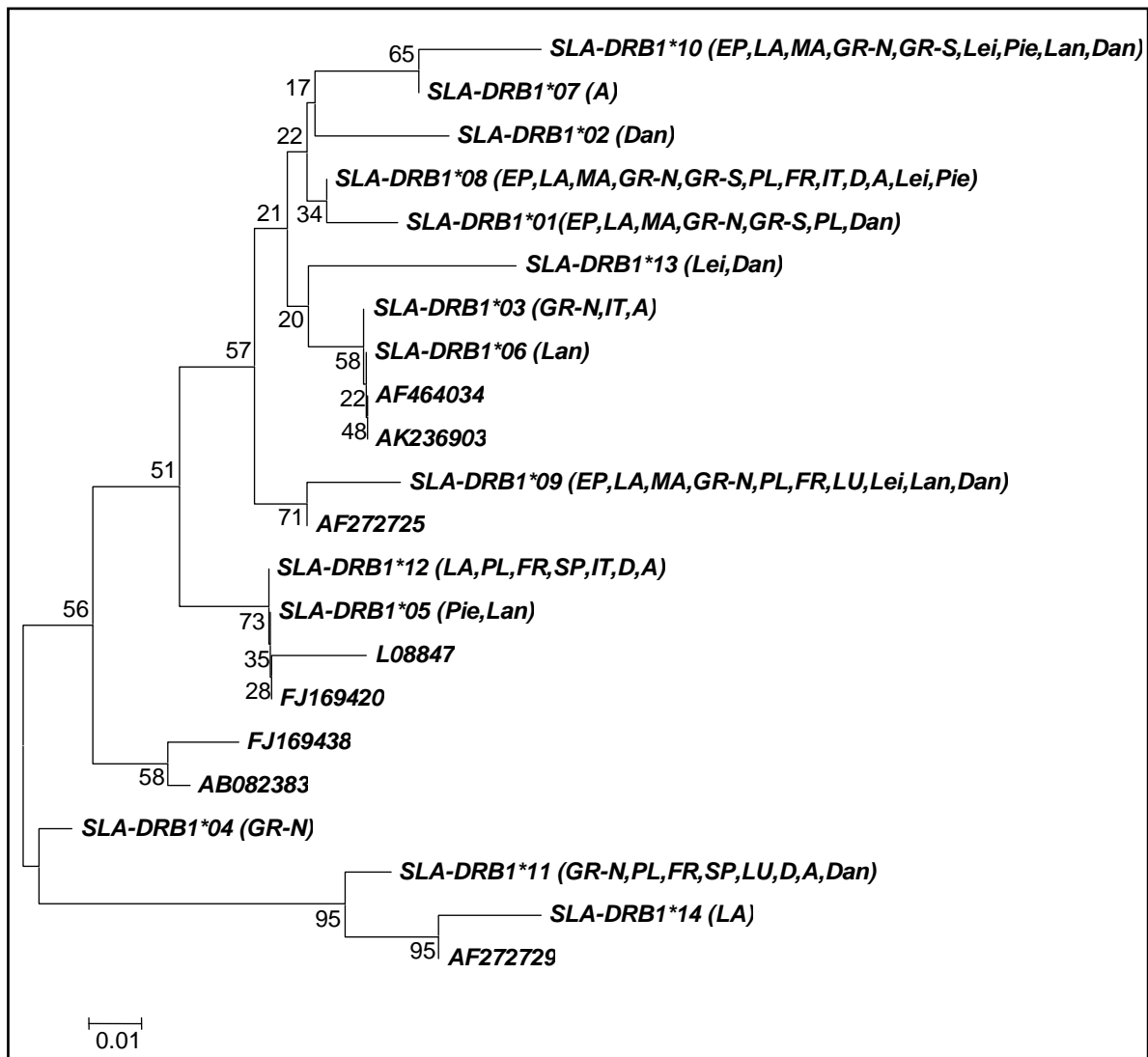
Φυλογενετική ανακατασκευή των *MHC-DRB1* και *MHC-DQA*

Ο αριθμός των κατά ζεύγη νουκλεοτιδικών διαφορών για το *DRB1* κυμαίνεται από 0,8% (*SLA-DRB1*05* vs. *SLA-DRB1*12*, *SLA-DRB1*03* vs. *SLA-DRB1*06*) έως 14,7% (*SLA-DRB1*11* vs. *SLA-DRB1*02*), και των κατά ζεύγη αμινοξικών διαφορών από 1,3% (*SLA-DRB1*03* vs. *SLA-DRB1*06*) έως 22,3% (*SLA-DRB1*10* vs. *SLA-DRB1*11*, *SLA-DRB1*10* vs. *SLA-DRB1*12* και *SLA-DRB1*11* vs. *SLA-DRB1*07*). Για το *DQA* ο αριθμός των κατά ζεύγη νουκλεοτιδικών διαφορών κυμαίνεται από 1,3% (*SLA-DQA*05* vs. *SLA-DQA*06*) έως 8,8% (*SLA-DQA*04* vs. *SLA-DQA*07*) και των κατά ζεύγη αμινοξικών διαφορών από 1,3% (*SLA-DQA*05* vs. *SLA-DQA*06*) έως 15,6% (*SLA-DQA*04* vs. *SLA-DQA*07*). Και για τα δύο γονίδια όλες οι αμινοξικές αλληλουχίες που προέκυψαν ήταν διαφορετικές μεταξύ τους. Οι φυλογενετικές σχέσεις των αλληλουχιών του εξωνίου 2 των *DRB1* και *DQA* κατασκευάστηκαν για κάθε γονίδιο.

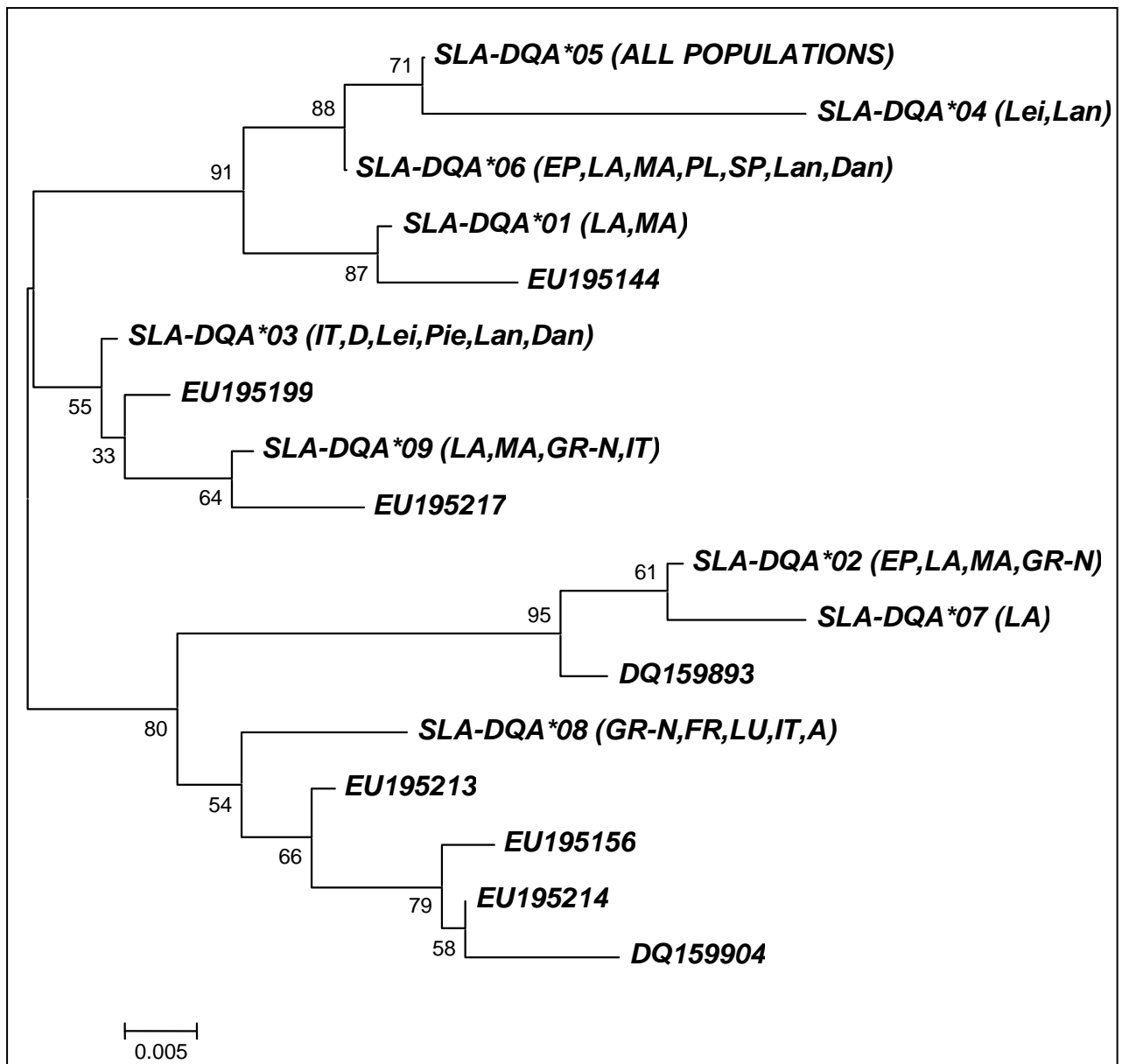
Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των αλληλομόρφων του *DRB1* και *DQA* ταυτοποιήθηκαν και μαζί με συγκεκριμένες αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες από *DRB1* και *DQA* από χοίρους από τη GenBank χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή ενός δέντρου neighbour-joining, και ενός δέντρου UPGMA, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μέγιστης πιθανότητας (maximum composite likelihood). Και οι δύο προσεγγίσεις έδωσαν όμοια αποτελέσματα με συγκρίσιμες τιμές bootstrap (Εικόνες 16 και 17).

Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ξεκάθαρα ότι αλληλόμορφα που παρατηρούνται μόνο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς δεν ομαδοποιούνται μαζί, και δεν υπάρχει διαχωρισμός των αλληλομόρφων με βάση τη γεωγραφική απόσταση ή τη φυλή, π.χ. το *SLA-DRB1*05* που παρατηρείται στους ήμερους χοίρους ομαδοποιείται με το *SLA-DRB1*12* που παρατηρείται στους αγριόχοιρους και το *SLA-DQA*04* που παρατηρείται στους ήμερους χοίρους ομαδοποιείται με το *SLA-DQA*07* που παρατηρείται στους αγριόχοιρους. Αυτή η συγγένεια των αλληλομόρφων μεταξύ απομακρυσμένων πληθυσμών και διαφορετικών ειδών είναι χαρακτηριστικό μερικών τόπων του MHC (Klein *et al.*, 1998), και πιστεύεται πως προκύπτει από την ισοζυγούσα επιλογή (Hughes *et al.*, 1996). Οι αλληλουχίες από τη GenBank που χρησιμοποιήθηκαν για το φυλογενετικό δέντρο ήταν διαφορετικές από αυτές που ταυτοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη και προέρχονται από τις αλληλουχίες με τους εξής αριθμούς: για το *DRB1* AF464034, AK236903, AF272725, L08847, FJ169420,

FJ169438, AB082383, AF272729 και για το *DQA* EU195199, EU195217, EU195213, EU195214, EU195156, DQ159904, DQ159893.



Εικόνα 16: Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των 14 αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του *DRB1* του *Sus scrofa* (*SLA-DRB1**01–14) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη, μαζί με αλληλουχίες από τη GenBank. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό υποστήριξης bootstrap (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις.



Εικόνα 17: Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των εννέα αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του *DQA* του *Sus scrofa* (SLA-DQA*01–09) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη, μαζί με αλληλουχίες από τη GenBank. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό υποστήριξης bootstrap (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις.

Πρότυπα συνώνυμων και μη συνώνυμων υποκαταστάσεων

Η εξέταση των συνώνυμων vs. των μη συνώνυμων μεταλλάξεων μέσα στην κωδική περιοχή του PBR έδειξε ότι ο αριθμός των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων (d_N) ήταν πολύ υψηλότερος από τον αριθμό των συνώνυμων υποκαταστάσεων (d_S) ($d_N = 0,161 \pm 0,068$ vs., $d_S = 0,091 \pm 0,085$ για το *DQA* και $d_N = 0,457 \pm 0,097$ vs., $d_S = 0,210 \pm 0,102$ για το *DRB1*) το οποίο αναμένεται για τα αλληλόμορφα του MHC που βρίσκονται κάτω από τη δράση ισοζυγούσας επιλογής. Αυτές οι διαφορές ευνοούν την υπόθεση της θετικής επιλογής με στατιστικά σημαντική τιμή $P = 0,016$ για το *DRB1* και την καταγραφή τάσης για θετική επιλογή με τιμή $P = 0,277$ για το *DQA*. Ωστόσο, όταν η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τα κωδικόνια της μη-PBR, η αναλογία των συνώνυμων έναντι των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων αντιστρέφεται ($d_N = 0,029 \pm 0,011$ vs., $d_S = 0,032 \pm 0,017$ για το *DQA* και $d_N = 0,033 \pm 0,010$ vs., $d_S = 0,069 \pm 0,024$ για το *DRB1*), και παρατηρείται μία τάση προς την επιλογή καθαρισμού όπως έχει περιγραφεί και από τους Hughes & Nei, 1988 (Πίνακες 26 και 27).

Πίνακες 26, 27: Συνώνυμες (d_S) και μη συνώνυμες (d_N) υποκαταστάσεις ανά θέση (per site) και τα αποτελέσματα του Z-test για θετική επιλογή στα κωδικόνια της περιοχής πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR), των κωδικονίων εκτός PBR (non-PBR) και σε ολόκληρο το εξώνιο 2

<i>DQA</i>	<i>n</i>	d_S	d_N	d_N/d_S	<i>P</i>
PBR	12	0,091(0,085)	0,161(0,068)	1,77	0,277 *
Non-PBR	52	0,032(0,017)	0,029(0,011)	0,91	0,319 *
Εξώνιο 2	64	0,041(0,019)	0,048(0,014)	1,17	0,285 *

<i>DRB1</i>	<i>n</i>	d_S	d_N	d_N/d_S	<i>P</i>
PBR	13	0,210(0,102)	0,457(0,097)	2,18	0,016 *
Non-PBR	53	0,069(0,024)	0,033(0,010)	0,48	0,097 **
Εξώνιο 2	66	0,080(0,023)	0,098(0,021)	1,23	0,309 *

Τα κωδικόνια που αντιστοιχούν στον εκκινητή εξαιρέθηκαν της ανάλυσης. Το πιθανό σφάλμα υπολογίστηκε από τη μέθοδο bootstrap με 500 επαναληπτικά, και φαίνονται στις παρενθέσεις. Το *n* υποδεικνύει τον αριθμό των κωδικονίων σε κάθε κατηγορία. Η πιθανότητα (*P*) απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης της αυστηρής ουδετερότητας ($d_N = d_S$) υπέρ της εναλλακτικής υπόθεσης ($*d_N > d_S$) ή ($**d_N < d_S$).

Θύλακες δέσμευσης πεπτιδίου και υποκατάσταση αμινοξέως με αντικατάσταση φορτίου

Δεκαεπτά κατάλοιπα της α1 και δεκαεννιά της β1 περιοχής συνεισφέρουν στο σχηματισμό των θυλάκων δέσμευσης του αντιγονικού πεπτιδίου (P1, P6 και P9 για τη DQα αλυσίδα και P1, P4, P6, P7 και P9 για τη DRβ αλυσίδα). Στα αλληλόμορφα που απομονώθηκαν υπάρχουν 12 κατάλοιπα για την α1 περιοχή και 13 κατάλοιπα για τη β1 περιοχή. Για τη DQα αλυσίδα υπάρχουν πέντε κατάλοιπα των P1 και P6 και τρία κατάλοιπα του P9. Ο πιο πολυμορφικός θύλακας είναι ο P6 με πέντε παραλλαγές ενώ οι άλλοι θύλακες (P1 και P9) έχουν τρεις παραλλαγές (Πίνακας 28). Κάθε αλληλόμορφο φέρει ένα συνδυασμό των P1, P6 και P9 παραλλαγών. Επτά διαφορετικοί συνδυασμοί παραλλαγών ανιχνεύτηκαν στα εννέα αλληλόμορφα. Πιο συγκεκριμένα, για τον P1 η παραλλαγή HEFWT υπήρχε στα αλληλόμορφα *SLA-DQA*02, 03, 04, 05* και *06*, η παραλλαγή HQFWT στα *SLA-DQA*01, 07* και *08*. Το *SLA-DQA*09* είχε την HEFWR παραλλαγή. Για την P6 η παραλλαγή NNTLN υπήρχε στα *SLA-DQA*01, 03, 05, 06* και *09*, η παραλλαγή NNAGT στο *SLA-DQA*02*, η παραλλαγή NNTLR στο *SLA-DQA*04*, η παραλλαγή NNVGT στο *SLA-DQA*07* και η παραλλαγή NNTAN στο *SLA-DQA*08*. Για τον P9 η παραλλαγή HNI υπήρχε στα *SLA-DQA*05, 06, 01, 03, 08* και *09*, η παραλλαγή LTI υπήρχε στα *SLA-DQA*02* και *07* και η παραλλαγή HRF στο *SLA-DQA*04*. Οι περισσότεροι συνδυασμοί παραλλαγών που ανιχνεύτηκαν ήταν μοναδικοί για το κάθε αλληλόμορφο και μόνο ένας συγκεκριμένος συνδυασμός παραλλαγών υπήρχε σε τρία αλληλόμορφα (Πίνακας 29). Ο συνδυασμός HEFWT/NNTLN/HNI υπήρχε στα αλληλόμορφα *SLA-DQA*03, 05* και *06* και ήταν ένας συνδυασμός που εμφανίζεται σε όλους τους πληθυσμούς και στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ο κυρίαρχος συνδυασμός με συχνότητες από 0,5286 (EP) έως 1 (GR-S, PL, SP, D). Ενώ οι πληθυσμοί αγριόχοιρων, σύμφωνα με τα αλληλόμορφα που υπήρχαν σε κάθε πληθυσμό, εμφάνισαν σχεδόν όλους τους συνδυασμούς των θυλάκων οι ήμεροι χοίροι είχαν μόνο τους συνδυασμούς HEFWT/NNTLN/HNI (όλες οι φυλές ήμερων χοίρων) και HEFWT/NNTLR/HRF (Lei και Lan). Ωστόσο, υπήρχαν πληθυσμοί αγριόχοιρων (GR-S, PL, SP και D) που είχαν μόνο ένα συνδυασμό παραλλαγών (HEFWT/NNTLN/HNI).

Για την αλυσίδα DRβ υπάρχουν έξι κατάλοιπα του P4, πέντε κατάλοιπα του P7, 1 του P6, 2 του P9 και 1 του P1. Εξαιτίας του μικρού αριθμού των καταλοίπων

των θυλάκων P1, P6 και P9 αυτοί δε θα αναλυθούν περαιτέρω για παραλλαγές αλλά θα ληφθούν υπ' όψιν για τη μελέτη της ποικιλομορφίας της PBR. Συνεπώς, οι θύλακες P4 και P7 αναλύονται για παραλλαγές. Ο πιο πολυμορφικός φαίνεται να είναι ο P4 με 12 παραλλαγές ενώ ο P7 έχει 11 παραλλαγές (Πίνακας 30). Κάθε αλληλόμορφο έφερε ένα συνδυασμό των παραλλαγών των P4 και P7. Συνολικά, βρέθηκαν 12 διαφορετικοί συνδυασμοί. Για τον P4 τα *SLA-DRB1*03*, *06* και *09* μοιράζονται την παραλλαγή LEQREY, ενώ για τον P7 τα *SLA-DRB1*03*, *06* και *09* έχουν την παραλλαγή EYWLR και τα *SLA-DRB1*05* και *12* μοιράζονται την παραλλαγή GFWLK. Τα αλληλόμορφα *SLA-DRB1*03* και *06* έχουν ακριβώς την ίδια PBR που σημαίνει ότι όλοι οι θύλακες συμπεριλαμβανομένου και των P1, P6 και P9 είναι ακριβώς ίδιοι και παρουσιάζουν διαφορές μόνο στη μη-PBR (Πίνακας 31). Από αυτά τα δύο αλληλόμορφα το *SLA-DRB1*03* υπάρχει μόνο στους πληθυσμούς αγριόχοιρων (GR-N, IT και A) ενώ το *SLA-DRB1*06* υπάρχει στους ήμερους χοίρους και κυρίως στη φυλή Landrace. Κάτι ανάλογο παρατηρείται και για τα *SLA-DRB1*05* και *12*. Το *SLA-DRB1*12* υπάρχει μόνο στους αγριόχοιρους (LA, PL, FR, SP, IT, D και A) ενώ το *SLA-DRB1*05* υπάρχει στις φυλές Pietrain και Landrace, αλλά αυτά τα δύο αλληλόμορφα μοιράζονται την ίδια P7 παραλλαγή αν και έχουν μόνο ένα διαφορετικό κατάλοιπο στον P4.

Πίνακας 28: Συχνότητες των παραλλαγών θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο **DQA**

	EP	LA	MA	GR-N	GR-S	PL	FR	SP	LU	IT	D	A	Lei	Pie	Lan	Dan
Παραλλαγές θύλακα 1 (P1)																
HEFWT	1,000	0,932	0,861	0,655	1,000	1,000	0,428	1,000	0,375	0,7778	1,000	0,692	1,000	1,000	1,000	1,000
HQFWT	0	0,054	0,055	0,034	0	0	0,572	0	0,625	0,1852	0	0,308	0	0	0	0
HEFWR	0	0,013	0,083	0,310	0	0	0	0	0	0,0370	0	0	0	0	0	0
Παραλλαγές θύλακα 6 (P6)																
NNTLN	0,472	0,959	0,971	0,896	1,000	1,000	0,428	1,000	0,375	0,8148	1,000	0,692	0,861	1,000	0,928	1,000
NNAGT	0,528	0,013	0,028	0,069	00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NNTLR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,139	0	0,072	0
NNVGT	0	0,027	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NNTAN	0	0	0	0,310	0	0	0,572	0	0,625	0,1852	0	0,308	0	0	0	0
Παραλλαγές θύλακα 9 (P9)																
HNI	0,472	0,959	0,971	0,930	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,861	1,000	0,928	1,000
LTI	0,528	0,040	0,028	0,069	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HRF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,139	0	0,072	0

Πίνακας 29: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο **DQA**

	P1/P6/P9	EP	LA	MA	GR-N	GR-S	PL	FR	SP	LU	IT	D	A	Lei	Pie	Lan	Dan
SLA-DQA*01	HQFWT/NNTLN/HNI	0	0,027	0,0556	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SLA-DQA*02	HEFWT/NNAGT/LTI	0,5286	0,0135	0,0278	0,069	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SLA-DQA*03, 05, 06	HQFWT/NNTLN/HNI	0,4715	0,919	0,8333	0,5862	1	1	0,4286	1	0,375	0,7778	1	0,6923	0,8611	1	0,9285	1
SLA-DQA*04	HEFWT/NNTLR/HRF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1389	0	0,0714	0
SLA-DQA*07	HQFWT/NNVGT/LTI	0	0,027	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SLA-DQA*08	HQFWT/NNTAN/HNI	0	0	0	0,0345	0	0	0,5714	0	0,625	0,1852	0	0,3077	0	0	0	0
SLA-DQA*09	HEFWR/NNTLN/HNI	0	0,0135	0,0833	0,3103	0	0	0	0	0	0,037	0	0	0	0	0	0

Πίνακας 30: Συχνότητες των παραλλαγών θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο **DRB1**

	EP	LA	MA	GR-N	GR-S	PL	FR	SP	LU	IT	D	A	Lei	Pie	Lan	Dan
<i>Παραλλαγές θύλακα 4 (P4)</i>																
LQQMAY	0,500	0,049	0,125	0,482	0,500	0,188	0,111	0	0	0,095	0,333	0,055	0,194	0,143	0	0
LEQREY	0,069	0,049	0,1875	0,125	0	0,094	0,556	0	0,500	0,286	0	0,111	0,028	0	0,090	0,061
LDQREY	0,360	0,451	0,468	0,107	0,333	0	0	0	0	0	0	0	0,611	0,321	0,128	0,214
FDDSSY	0	0	0	0,036	0	0,219	0,222	0,625	0,500	0	0,333	0,555	0	0	0	0,112
YQQKVY	0	0,024	0	0	0	0,344	0,111	0,375	0	0,619	0,333	0,222	0	0	0	0
LEQRAY	0,069	0,402	0,218	0,178	0,167	0,156	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,551
FEEKEY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,167	0	0	0,021
LQQKEY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,021
FDQREY	0	0	0	0,036	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
YQQKEY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,536	0,782	0
LHQMAY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,055	0	0	0	0
LDDSSY	0	0,024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Παραλλαγές θύλακα 7 (P7)</i>																
QYWLM	0,500	0,049	0,125	0,482	0,500	0,188	0,111	0	0	0,095	0,333	0,055	0,194	0,143	0	0
EYWLR	0,069	0,049	0,1875	0,125	0	0,094	0,556	0	0,500	0,286	0	0,111	0,028	0	0,090	0,061
DYWIR	0,360	0,451	0,468	0,107	0,333	0	0	0	0	0	0	0	0,611	0,321	0,128	0,214
DFWFS	0	0	0	0,036	0	0,219	0,222	0,625	0,500	0	0,333	0,555	0	0	0	0,112
QFWLK	0	0,024	0	0	0	0,344	0,111	0,375	0	0,619	0,333	0,222	0	0,536	0,782	0
EYWFR	0,069	0,402	0,218	0,178	0,167	0,156	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,551
EYWIK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,167	0	0	0,021
QYWIK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,021
DYWLR	0	0	0	0,036	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HYWLM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,055	0	0	0	0
DFWIS	0	0,024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Πίνακας 31: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο **DRB1**

	P4/P7	EP	LA	MA	GR-N	GR-S	PL	FR	SP	LU	IT	D	A	Lei	Pie	Lan	Dan
<i>SLA-DRB1*01</i>	LEQRAY/EYWFR	0,0694	0,4024	0,2188	0,2143	0,1667	0,1563	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5714
<i>SLA-DRB1*02</i>	LQQKEY/QYWIK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0204
<i>SLA-DRB1*03, 06, 09</i>	LEQREY/EYWLR	0,0694	0,0488	0,1875	0,125	0	0,0938	0,5556	0	0,5	0,2857	0	0,1111	0,0278	0	0,0897	0,0612
<i>SLA-DRB1*04</i>	FDQREY/DYWLR	0	0	0	0,0357	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>SLA-DRB1*05</i>	YQQKEY/QFWLK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5357	0,7821	0
<i>SLA-DRB1*07</i>	LHQMAY/HYWLM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0556	0	0	0	0
<i>SLA-DRB1*08</i>	LQQMAY/QYWLM	0,5	0,0488	0,125	0,4821	0,5	0,1875	0,1111	0	0	0,0952	0,3333	0,0556	0,1944	0,1429	0	0
<i>SLA-DRB1*10</i>	LDQREY/DYWIR	0,3611	0,4512	0,4688	0,1071	0,3333	0	0	0	0	0	0	0	0,6111	0,3214	0,1282	0,2143
<i>SLA-DRB1*11</i>	FDDSSY/DFWFS	0	0	0	0,0357	0	0,2188	0,2222	0,625	0,5	0	0,3333	0,5556	0	0	0	0,1122
<i>SLA-DRB1*12</i>	YQQKVY/QFWLK	0	0,0244	0	0	0	0,3438	0,1111	0,375	0	0,619	0,3333	0,2222	0	0	0	0
<i>SLA-DRB1*13</i>	FEEKEY/EYWIK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1667	0	0	0,0204
<i>SLA-DRB1*14</i>	LDDSSY/DFWIS	0	0,0244	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Οι αμινοξικές αλλαγές πιθανόν να δείχνουν λειτουργικές διαφορές εάν υπάρχουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου στην PBR. Για την αλυσίδα DQa τρία από τα 12 κατάλοιπα της PBR φαίνεται να έχουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου. Δύο ουδέτερα κατάλοιπα (Gln31 και Thr52) αντικαθίστανται από ένα αρνητικό (Glu) και ένα θετικό (Arg) κατάλοιπο αντίστοιχα. Το κατάλοιπο 69 έχει τρία εναλλακτικά κατάλοιπα δύο από τα οποία είναι ουδέτερα (Asn και Thr) και ένα είναι θετικό (Arg). Για την αλυσίδα DRβ πέντε από τα 13 κατάλοιπα εμφανίζουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου. Στο κατάλοιπο 28 υπάρχουν δύο ουδέτερα (Gln και His) και δύο αρνητικά φορτισμένα (Asp και Glu) αμινοξέα. Στο κατάλοιπο 57 υπάρχουν δύο αρνητικά (Asp και Glu) και τρία ουδέτερα κατάλοιπα (Phe, Val και Ser). Στο κατάλοιπο 70 υπάρχουν δύο αρνητικά (Asp και Glu) και ένα ουδέτερο (Gln) αμινοξύ, στο κατάλοιπο 71 υπάρχουν δύο ουδέτερα (Met και Ser) και δύο θετικά (Arg και Lys) αμινοξέα, και τέλος, στο κατάλοιπο 74 υπάρχουν τρία ουδέτερα (Ala, Val και Ser) και ένα αρνητικό (Glu) αμινοξύ. Αυτές οι διαφορές στο φορτίο μπορεί να καταλήγουν σε μια διαφορετική τρισδιάστατη διαμόρφωση της πρωτεΐνης.

Αν και τα μόρια του MHC είναι ιδιαίτερα πολυμορφικά περιέχουν κάποια καλά συντηρημένα χαρακτηριστικά όπως θέσεις γλυκοσυλίωσης, ενδοπεριοχικές (intradomain) δισουλφιδικές γέφυρες και συντηρημένα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με τον TCR των T_H κυττάρων (Πίνακες 14 και 15). Στα μόρια του MHC μόνο N-συνδεδεμένοι ολιγοσακχαρίτες προσδένονται σε κατάλοιπα Asn. Στην αλυσίδα DRβ υπάρχει μόνο μία θέση γλυκοσυλίωσης η Asn19. Πράγματι, σε όλες τις αλληλουχίες *DRB1* που ταυτοποιήθηκαν βρέθηκε ένα μη μεταβλητό κατάλοιπο Asn19. Για την αλυσίδα DQa υπάρχουν δύο θέσεις γλυκοσυλίωσης, η Asn78 και η Asn119. Στις αλληλουχίες *DQA* που ταυτοποιήθηκαν η θέση 119 ήταν εκτός του εύρους της αλληλουχίας ενώ στη θέση 78 υπήρχε Asn, αν και εντοπίζεται στην περιοχή του εκκινήτη (Ahour, 2001). Στην περιοχή α1 ενός μορίου MHC τάξης II δεν υπάρχουν κατάλοιπα κυστεΐνης ενώ η β1 περιοχή περιέχει ένα δισουλφιδικό δεσμό. Πράγματι, δε βρέθηκαν κατάλοιπα κυστεΐνης στις *DQA* αλληλουχίες, ενώ στις αλυσίδες DRβ που κωδικοποιούνται βρέθηκαν δύο συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, η Cys15 (στην περιοχή του εκκινήτη) και η Cys79 (Ahour, 2001). Έχει βρεθεί ότι μόνο μία αμινοξική αλλαγή προκαλεί την α αλυσίδα να κάμψει 2Α° προς την επιφάνεια εσοχής (floor) του θύλακα πρόσδεσης σε σχέση με την αλυσίδα της

τάξης I. Συνεπώς, στο καρβοξυτελικό άκρο της α1 ελικοειδούς περιοχής της HLA-DR1 έχει αποδειχτεί ότι υπάρχει ένα κατάλοιπο αργινίνης σε μία κρίσιμη θέση (Arg76) που καταλαμβάνεται από μία τυροσίνη στην αντίστοιχη περιοχή της τάξης I (Tyr84). Στη DQα αλυσίδα υπάρχει στη θέση 76 ένα κατάλοιπο Arg που πιθανόν συνεισφέρει σε αυτό το σχηματισμό.

*Lepus europaeus****Απομόνωση και ποικιλότητα του εξωνίου 2 των MHC-DRB1 και MHC-DQA***

Η ενίσχυση με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τον κάθε τόπο, έδωσε ένα τμήμα 222bp με τους εκκινητές και ένα τμήμα 174bp χωρίς τους εκκινητές για το *DRB1* ενώ για το *DQA* έδωσε ένα τμήμα 254bp με τους εκκινητές και ένα τμήμα 212bp χωρίς τους εκκινητές. Η ανάλυση με τη μέθοδο SSCP και ακολουθούμενη από τη διαδικασία κλωνοποίησης κατέληξε σε 61 επιβεβαιωμένα αλληλόμορφα *MHC-DRB1* και σε 37 *MHC-DQA* αλληλόμορφα (και για τους δύο τόπους βρέθηκαν μόνο μέχρι δύο αλληλουχίες ανά άτομο). Το PCR προϊόν, μετά τη διαγραφή των εκκινητών, αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 8-65 για τη DRβ αλυσίδα και στα κατάλοιπα 8-76 της DQα αλυσίδας, σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης που προτάθηκε από τους Bondinas *et al.* (2007) ως μία ενοποιημένη πλατφόρμα για τα αλληλόμορφα του MHC τάξης II σε όλα τα ζωικά είδη. Το ακόλουθο σύστημα αρίθμησης βασίζεται στις αμινοξικές αλληλουχίες του HLA-DR και κάθε πρόσθετο αμινοξύ που βρίσκεται σε συγκεκριμένες θέσεις στις ορθόλογες πρωτεΐνες θεωρούνται σαν ενθέσεις. Στο *DQA* του *L. europaeus* υπάρχει μία ένθεση μεταξύ των θέσεων α9 και α10, που ονομάζεται α9α (Bondinas *et al.*, 2007). Τα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν σε 801 άτομα *L. europaeus* και συμβολίζονται ως *Leeu-DQA*14* ως *Leeu-DQA*50* και *Leeu-DRB1*01* ως *Leeu-DRB1*61*, σύμφωνα με τους Ellis *et al.* (2006). Οι αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν και για τα δύο γονίδια δεν είχαν ανιχνευτεί από προηγούμενες μελέτες και κατατέθηκαν στη GenBank, *Leeu-DQA*14-50* (EU876909–EU876945) και *Leeu-DRB1*01-61*(JF284758-JF284769 και JF284771-JF284815).

Εξήντα οκτώ από τα 174 νουκλεοτίδια (39,08%) και 32 από τα 58 αμινοξέα (55,17%) είναι μεταβλητά για το *DRB1* ενώ για το *DQA* 58 από τα 212 νουκλεοτίδια (27,36%) και 30 από τα 70 αμινοξέα (42,86%) είναι μεταβλητά. Στην περιοχή PBR, για το *DQA* η νουκλεοτιδική και αμινοξική ποικιλότητα με 19 και 10 μεταβλητές θέσεις αντίστοιχα ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με του *DRB1* με 29 και 10 μεταβλητές θέσεις αντίστοιχα. Η συνολική νουκλεοτιδική ποικιλότητα (π) είναι $0,112 \pm 0,016$ για το *DRB1* και $0,068 \pm 0,011$ για το *DQA*, ενώ η αμινοξική ποικιλότητα είναι $0,197 \pm 0,042$ για το *DRB1* και $0,129 \pm 0,023$ για το *DQA*. Η υψηλότερη αμινοξική ποικιλότητα σε σχέση με τη νουκλεοτιδική υποδηλώνει ότι οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις ευνοούνται σε σχέση με τις συνώνυμες υποδεικνύοντας μία

επιλεκτική διατήρηση των μη συνώνυμων πολυμορφισμών (Luetkemeier *et al.*, 2009). Γενικά, η κατανομή του πολυμορφισμού ήταν σύμφωνη με δεδομένα από λειτουργικά MHC γονίδια. Και για τα δύο γονίδια ο μεγαλύτερος πολυμορφισμός εντοπίζεται στην περιοχή PBR (29 από τα 68 μεταβλητά νουκλεοτίδια και 10 από τα 32 αμινοξέα για το *DRB1*, και 19 από τα 58 μεταβλητά νουκλεοτίδια και 10 μεταβλητά αμινοξέα από τα 30 για το *DQA*). Στους πίνακες 32 και 33 φαίνονται οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες των δύο γονιδίων.

	P	4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	4	7	6	9	7	9	7	TT	TTT	4	4	
<i>Leeu-DRB1*01</i>	T	Q	R	V	R	Y	V	E	R	L	F	Y
<i>Leeu-DRB1*51</i>	F	L	H	F	M	D	S
<i>Leeu-DRB1*52</i>	F	L	H	F	M	D	S
<i>Leeu-DRB1*53</i>	F	L	K	N	F	M	D
<i>Leeu-DRB1*54</i>	F	L	F	M	S	R
<i>Leeu-DRB1*55</i>	F	L	F	M	S	R
<i>Leeu-DRB1*56</i>	L	L	H	T	N
<i>Leeu-DRB1*57</i>	F	L	F	M	D	S
<i>Leeu-DRB1*58</i>	F	L	F	M	S	R
<i>Leeu-DRB1*59</i>	M	D	F	I	D
<i>Leeu-DRB1*60</i>	L	L	H	F	V	D
<i>Leeu-DRB1*61</i>	L	L	D	H	E	D

Αλληλομορφική κατανομή και συχνότητες

Ο αριθμός των αλληλομόρφων του *DRB1* ανά πληθυσμό κυμαίνεται από ένα στην NL έως 15 στην TR και οι συχνότητες αυτών των αλληλομόρφων ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών (Πίνακας 34). Γενικά, σε όλους τους πληθυσμούς κάποια αλληλόμορφα π.χ. τα *Leeu-DRB1*01* και *Leeu-DRB1*02* ήταν σε αφθονία ενώ άλλα ανιχνεύτηκαν σε πολύ χαμηλές συχνότητες. Επιπλέον, κάποια αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν μόνο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, όπως τα *Leeu-DRB1*06* και *Leeu-DRB1*09* στη GR-C, τα *Leeu-DRB1*10*, *Leeu-DRB1*11*, *Leeu-DRB1*14* και *Leeu-DRB1*15* στη GR-W, τα *Leeu-DRB1*16*, *Leeu-DRB1*18*, *Leeu-DRB1*19*, *Leeu-DRB1*30*, *Leeu-DRB1*31*, *Leeu-DRB1*35*, *Leeu-DRB1*44* και *Leeu-DRB1*49* στην A, τα *Leeu-DRB1*20*, *Leeu-DRB1*22*, *Leeu-DRB1*24*, *Leeu-DRB1*46*, *Leeu-DRB1*50*, *Leeu-DRB1*53* και *Leeu-DRB1*54* στην CH, τα *Leeu-DRB1*25* και *Leeu-DRB1*41* στην BG, τα *Leeu-DRB1*27*, *Leeu-DRB1*29*, *Leeu-DRB1*36*, *Leeu-DRB1*39*, *Leeu-DRB1*40*, *Leeu-DRB1*42*, *Leeu-DRB1*43* και *Leeu-DRB1*47* στην TR, τα *Leeu-DRB1*28* και *Leeu-DRB1*33* στο IL, τα *Leeu-DRB1*37*, *Leeu-DRB1*45* και *Leeu-DRB1*57* στην IT, τα *Leeu-DRB1*52* και *Leeu-DRB1*55* στη GB, τα *Leeu-DRB1*21*, *Leeu-DRB1*26*, *Leeu-DRB1*48*, *Leeu-DRB1*51*, *Leeu-DRB1*13* και *Leeu-DRB1*56* στη D, τα *Leeu-DRB1*58*, *Leeu-DRB1*59*, *Leeu-DRB1*60* και *Leeu-DRB1*61* στην PL. Δεκαεννέα από τα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν σε συχνότητα μεγαλύτερη του 10%: το *Leeu-DRB1*01* με συχνότητα 35,71% στο IL, το *Leeu-DRB1*02* με 56,25% στη GR-N, το *Leeu-DRB1*03* με 35,92% στη BG, το *Leeu-DRB1*05* με 29,55% στη GR-S, το *Leeu-DRB1*07* με 45% στη F, το *Leeu-DRB1*08* με 27,5% στη GB, το *Leeu-DRB1*17* με 53,7% στη D, το *Leeu-DRB1*23* με 43,3% στην CH, τα *Leeu-DRB1*27* και *Leeu-DRB1*29* με 27,94% και 20,59% αντίστοιχα στην TR, το *Leeu-DRB1*33* με 28,57% στο IL, το *Leeu-DRB1*32* με 20,98% στην CH, το *Leeu-DRB1*48* με 11,11% στη D, τα *Leeu-DRB1*52* και *Leeu-DRB1*55* με 12,5% και 25% αντίστοιχα στη GB, τα *Leeu-DRB1*38*, *Leeu-DRB1*58* και *Leeu-DRB1*59* με συχνότητα 25% στην PL και τα *Leeu-DRB1*60* και *Leeu-DRB1*61* με συχνότητα 12,5% στην PL. Υπήρχαν ωστόσο και σπάνια αλληλόμορφα και η αυθεντικότητά τους πιστοποιήθηκε από επαναλαμβανόμενες ενισχύσεις με PCR και κλωνοποίηση όπως τα αλληλόμορφα *Leeu-DRB1*37* και *Leeu-DRB1*45* που βρέθηκαν σε ετεροζυγωτία σε ένα άτομο στην IT. Ο αριθμός των αλληλομόρφων μέσα σε ένα πληθυσμό δεν αύξανε ανάλογα

με το μέγεθος του δείγματος, όπως φαίνεται και από τους υπολογισμούς του αλληλομορφικού πλούτου, που μετράει τον αριθμό των αλληλομόρφων ανεξάρτητα από το μέγεθος του δείγματος. Για παράδειγμα, οι υψηλότερες τιμές *Rs* καταγράφηκαν για τους πληθυσμούς της TR, της A, της GB, της D και της PL με 34, 48, 20, 27 και 4 άτομα αντίστοιχα, ενώ οι *Rs* τιμές μεγαλύτερων πληθυσμών όπως GR-C, GR-W και BG με 180, 150 και 103 άτομα αντίστοιχα ήταν χαμηλότερες. Αυτό υποδεικνύει και σε αυτή την περίπτωση ότι για το *L. europaeus* και για το τμήμα DNA που μελετήθηκε υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός αλληλομόρφων *DRBI* και ότι η δειγματοληψία μεγαλύτερου αριθμού ατόμων δε θα αύξανε τον αριθμό των αλληλομόρφων που παρατηρούνται σε μία ορισμένη περιοχή.

Για το *DQA* γονίδιο ο αριθμός των αλληλομόρφων ήταν χαμηλότερος από αυτόν του *DRBI* και κυμαινόταν από τρία στην PL έως 12 στην TR ενώ οι συχνότητες αυτών των αλληλομόρφων διέφεραν σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών (Πίνακας 35). Γενικά, σε όλους τους πληθυσμούς κάποια αλληλόμορφα π.χ. τα *Leeu-DQA*14* και *Leeu-DQA*15* ήταν σε αφθονία ενώ άλλα ανιχνεύτηκαν σε πολύ χαμηλές συχνότητες. Επιπλέον, κάποια αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν μόνο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, όπως τα *Leeu-DQA*19* και *Leeu-DQA*41* βρέθηκαν μόνο στη GR-C, τα *Leeu-DQA*22*, *Leeu-DQA*24–26* και *Leeu-DQA*34–38* στην TR, το *Leeu-DQA*39* στο IL, το *Leeu-DQA*40* στη GR-NE, τα *Leeu-DQA*43–44* στην A, το *Leeu-DQA*46* στη GB και τα *Leeu-DQA*47–50* στην CH. Τρία από τα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν σε συχνότητα μεγαλύτερη του 10%: το *Leeu-DQA*39* με 23% στο IL, το *Leeu-DQA*47* με 13,4% στην CH και το *Leeu-DQA*35* με 11,8% στην TR. Υπήρχαν ωστόσο και σπάνια αλληλόμορφα και η αυθεντικότητά τους πιστοποιήθηκε από επαναλαμβανόμενες ενισχύσεις με PCR και κλωνοποίηση. Τα *Leeu-DQA*37*, *Leeu-DQA*40*, *Leeu-DQA*41*, *Leeu-DQA*43*, *Leeu-DQA*44* και *Leeu-DQA*46* ανιχνεύτηκαν σε ετερόζυγα άτομα και το καθένα υπήρχε μόνο σε ένα άτομο ενώ το *Leeu-DQA*38* ταυτοποιήθηκε σε ομοζυγωτία. Ο αριθμός των αλληλομόρφων μέσα σε ένα πληθυσμό δεν αύξανε ανάλογα με το μέγεθος του δείγματος, όπως φαίνεται και από τους υπολογισμούς του αλληλομορφικού πλούτου, που μετράει τον αριθμό των αλληλομόρφων ανεξάρτητα από το μέγεθος του δείγματος. Για παράδειγμα, οι υψηλότερες τιμές *Rs* καταγράφηκαν για τους πληθυσμούς της TR και της F οι οποίες περιείχαν 55 και 21 άτομα αντίστοιχα, ενώ οι *Rs* τιμές μεγαλύτερων πληθυσμών όπως GR-C, GR-W και CH με 141, 101 και 116

άτομα αντίστοιχα ήταν χαμηλότερες. Αυτό υποδεικνύει και σε αυτή την περίπτωση ότι για το *L. europaicus* και για το τμήμα DNA που μελετήθηκε υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός αλληλομόρφων *DQA* και ότι η δειγματοληψία μεγαλύτερου αριθμού ατόμων δε θα αύξανε τον αριθμό των αλληλομόρφων που παρατηρούνται σε μία ορισμένη περιοχή. Ο υπολογισμός της ετεροζυγωτίας έδειξε ότι για όλους τους πληθυσμούς, εκτός από τη F, χαμηλότερα επίπεδα ετεροζυγωτίας από ότι αναμενόταν.

Πίνακας 34: Αλληλομορφικές συχνότητες του **DRB1** ανά πληθυσμό. Δείχνονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε πληθυσμό (N), τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L), ο αλληλομορφικός πλούτος (Rs), η αναμενόμενη (H exp) και παρατηρούμενη (H obs) ετεροζυγωτία

ΠΕΡΙΟΧΕΣ	SEE a			OVER a			AM a		CEU a							
	GR-C	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	PL	IT	CH
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ																
Leeu-DRB1*01	0,2917	0,2900	0,2045	0,2000	0,2875	0	0,1029	0,3571	0	0,0250	0	0	0,2000	0	0	0
Leeu-DRB1*02	0,4556	0,4067	0,3182	0,6000	0,5375	0,5146	0	0	0,1146	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*03	0,0639	0,1000	0,0227	0,2000	0,0750	0,3592	0,0441	0,2857	0,1667	0,2000	0,0556	0	0,1000	0	0	0
Leeu-DRB1*04	0,0278	0,0100	0,0909	0	0,0750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*05	0,1111	0,1533	0,2955	0	0,0250	0	0,0294	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*06	0,0056	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*07	0,0306	0,0200	0	0	0	0	0,0147	0	0	0,4500	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*08	0,0028	0	0,0682	0	0	0	0,0735	0	0	0	0	0	0,2750	0	0	0
Leeu-DRB1*09	0,0056	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*10	0	0,0067	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*11	0	0,0067	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*12	0,0056	0	0	0	0	0	0,0441	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0556	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*14	0	0,0033	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*15	0	0,0033	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*16	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*17	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4375	0,2250	0,5370	1,0000	0,0500	0	0	0
Leeu-DRB1*18	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0625	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*19	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0208	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0446
Leeu-DRB1*21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0370	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0580
Leeu-DRB1*23	0	0	0	0	0	0,0097	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4330
Leeu-DRB1*24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0402
Leeu-DRB1*25	0	0	0	0	0	0,0485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0370	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*27	0	0	0	0	0	0	0,2794	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*28	0	0	0	0	0	0	0	0,0714	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*29	0	0	0	0	0	0	0,2059	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*30	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*31	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0313	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*32	0	0	0	0	0	0,0194	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2098
Leeu-DRB1*33	0	0	0	0	0	0	0	0,2857	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*34	0	0	0	0	0	0	0,0147	0	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*35	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*36	0	0	0	0	0	0	0,0735	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1000	0
Leeu-DRB1*38	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0833	0,1000	0,0556	0	0	0,2500	0	0
Leeu-DRB1*39	0	0	0	0	0	0	0,0441	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*40	0	0	0	0	0	0	0,0147	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*41	0	0	0	0	0	0,0485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*42	0	0	0	0	0	0	0,0147	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ΠΕΡΙΟΧΕΣ	SEE a				OVER a		AM a		CEU a							
ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ	GR-C	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	PL	IT	CH
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ																
Leeu-DRB1*43	0	0	0	0	0	0	0,0294	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*44	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1000	0
Leeu-DRB1*46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0446
Leeu-DRB1*47	0	0	0	0	0	0	0,0147	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1111	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*49	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0313	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0982
Leeu-DRB1*51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0556	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1250	0	0	0
Leeu-DRB1*53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0357
Leeu-DRB1*54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0357
Leeu-DRB1*55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2500	0	0	0
Leeu-DRB1*56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0556	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8000	0
Leeu-DRB1*58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2500	0	0
Leeu-DRB1*59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2500	0	0
Leeu-DRB1*60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1250	0	0
Leeu-DRB1*61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1250	0	0
(N)	180	150	22	15	40	103	34	14	48	20	27	7	20	4	5	112
(L)	10	10	6	3	5	6	15	4	13	5	9	1	6	5	3	9
(Rs)	3,539	3,626	3,998	3,146	3,093	2,861	5,293	3,402	4,382	3,563	4,130	1,000	4,396	5,000	2,600	4,213
H exp.	0,6892	0,7164	0,7562	0,5600	0,6166	0,6010	0,8495	0,7041	0,7539	0,6963	0,6811	0	0,7937	0,7813	0,3400	0,7473
H obs.	0,5222	0,5533	0,5455	0,6667	0,5250	0,3883	0,6176	0,3571	0,5208	0,5500	0,4815	0	0,3500	0,7500	0,2000	0,2857

Πίνακας 35: Αλληλομορφικές συχνότητες του **DQA** ανά πληθυσμό. Δείχνονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε πληθυσμό (N), τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L), ο αλληλομορφικός πλούτος (Rs), η αναμενόμενη (H exp.) και παρατηρούμενη (H obs) ετεροζυγωτία

ΠΕΡΙΟΧΕΣ	SEE a				OVER a		AM a		CEU a						
	GR-C	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	PL	CH
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ															
Leeu-DQA*14	0,2801	0,2822	0,0833	0,3000	0,3125	0,3415	0	0	0,2545	0,0714	0,2619	0	0,5167	0,3750	0,3578
Leeu-DQA*15	0,3688	0,4901	0,4167	0,5000	0,3958	0,1951	0	0	0,1182	0,0476	0,0238	0	0,0500	0,2500	0
Leeu-DQA*16	0,1454	0,1881	0,1944	0	0,0625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*17	0,0851	0,0099	0,2778	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*18	0,0071	0	0	0,0500	0	0,0122	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*19	0,0071	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*20	0	0	0	0	0	0	0,3818	0,2692	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*21	0	0	0	0	0	0	0,1364	0,3462	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*22	0	0	0	0	0	0	0,0273	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*23	0	0	0	0	0	0	0,1182	0,1538	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*24	0	0	0	0	0	0	0,0455	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*25	0	0	0	0	0	0	0,0727	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*26	0	0	0	0	0	0	0,0364	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*27	0	0	0	0	0,0625	0,0366	0	0	0,0091	0	0	0	0	0	0,1121
Leeu-DQA*28	0	0	0,0278	0	0,0417	0,0732	0	0	0,0545	0,0476	0,0952	0	0,1500	0	0,1940
Leeu-DQA*29	0	0	0	0,0500	0	0,0366	0	0	0,0455	0,0714	0,1190	0,1000	0,0167	0	0
Leeu-DQA*30	0,0071	0	0	0,0500	0,0833	0,2439	0	0	0,4455	0,1667	0,5000	0,7000	0,0167	0,3750	0,0991
Leeu-DQA*31	0	0	0	0	0,0208	0,0366	0	0	0,0455	0,3333	0	0,1000	0,1833	0	0
Leeu-DQA*32	0,0745	0,0198	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*33	0,0213	0,0099	0	0,0500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*34	0	0	0	0	0	0	0,0182	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*35	0	0	0	0	0	0	0,1182	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*36	0	0	0	0	0	0	0,0182	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*37	0	0	0	0	0	0	0,0091	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*38	0	0	0	0	0	0	0,0182	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*39	0	0	0	0	0	0	0	0,2308	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*40	0	0	0	0	0,0208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*41	0,0035	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*42	0	0	0	0	0	0,0244	0	0	0,0091	0,0714	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*43	0	0	0	0	0,0091	0	0	0	0,0091	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*44	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0091	0	0	0	0	0	0
Leeu-DQA*45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1905	0	0,1000	0,0500	0	0
Leeu-DQA*46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0167	0	0
Leeu-DQA*47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1336
Leeu-DQA*48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0862
Leeu-DQA*49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0086
Leeu-DQA*50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0086
(N)	141	101	18	20	24	41	55	13	55	21	21	10	30	8	116
(L)	10	6	5	6	8	9	12	4	10	8	5	4	8	3	8
(Rs)	5,095	3,553	4,275	4,584	5,468	5,712	6,782	3,985	5,185	6,528	4,168	3,905	4,956	3,000	5,605
H exp.	0,7510	0,6442	0,7037	0,6500	0,7283	0,7757	0,7972	0,7308	0,7154	0,8050	0,6576	0,4800	0,6711	0,6563	0,7866
H obs.	0,3050	0,3366	0,2222	0,3000	0,2083	0,3902	0,5091	0,0769	0,2909	0,8095	0,1905	0,2000	0,5333	0,2500	0,4655

Πληθυσμιακή διαφοροποίηση

Η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των συγκεκριμένων πληθυσμών αποκαλύφθηκε με κατά ζεύγη συγκρίσεις των τιμών F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) και τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων (Nei, 1972). Από τις 105 κατά ζεύγη συγκρίσεις για το *DQA*, αξιόλογη γενετική απόκλιση ανιχνεύτηκε μεταξύ 80 πληθυσμών και για το *DRB1* από τις 120 κατά ζεύγη συγκρίσεις, αξιόλογη γενετική απόκλιση ανιχνεύτηκε μεταξύ 114 πληθυσμών.

Για το *DQA* η ανάλυση έδειξε μία ξεκάθαρη διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών της Ανατολής και όλων των υπό μελέτη Ευρωπαϊκών πληθυσμών. Επιπροσθέτως, μια μικρότερη αλλά και πάλι σημαντική διαφοροποίηση παρατηρήθηκε μεταξύ των Ελληνικών και των Ευρωπαϊκών πληθυσμών (Πίνακας 36). Καθόλου ή μόνο ήπια διαφοροποίηση ανιχνεύτηκε μεταξύ των ελληνικών πληθυσμών και το ίδιο σημειώθηκε και για τους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, μία ανάλυση AMOVA με τους πληθυσμούς να κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις κύριες γεωγραφικές περιοχές σύμφωνα με τη φυλογεωγραφία των δειγμάτων που βασίζεται στην ανάλυση του mtDNA (Stamatis *et al.*, 2009) και ονομάζονται: (i) Νοτιο-Ανατολική περιοχή (SEEA) που αντιστοιχεί σε όλους τους ελληνικούς πληθυσμούς εκτός από τη GR-NE, (ii) στην περιοχή επικάλυψης (OVERa), με τους πληθυσμούς GR-NE και BG (iii) στην περιοχή της Ανατολής και της Μέσης Ανατολής (AMa), με τους ανατολικούς πληθυσμούς και (iv) στην Κεντρική Ευρωπαϊκή περιοχή (CEUa), με τους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Η ανάλυση AMOVA έδειξε ότι το 83,48% της παρατηρούμενης ποικιλότητας θεωρήθηκε ενδοπληθυσμιακή διαφοροποίηση, το 5,93% δια-πληθυσμιακή διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών και το 10,59% θεωρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών με συνολική τιμή F_{ST} 16,52%. Η διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών και η τιμή F_{ST} αυξήθηκαν σε 17,45% και 26,11% αντίστοιχα όταν μόνο δύο περιοχές συγκρίθηκαν, η Ευρώπη και η Ανατολή (Πίνακας 38).

Η ξεκάθαρη διαφοροποίηση του *DQA* μεταξύ των πληθυσμών της Ανατολής και όλων των υπό μελέτη Ευρωπαϊκών πληθυσμών, δεν υπήρχε όταν η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε για το *DRB1*. Και σε αυτή την περίπτωση, μια μικρότερη αλλά και πάλι σημαντική διαφοροποίηση παρατηρήθηκε μεταξύ των Ελληνικών και των Ευρωπαϊκών πληθυσμών. Καθόλου ή μόνο ήπια διαφοροποίηση ανιχνεύτηκε μεταξύ των ελληνικών πληθυσμών ενώ μεγαλύτερη ανομοιογένεια σημειώθηκε για τους

ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (Πίνακας 37). Συγκεκριμένα, η ανάλυση AMOVA με τους πληθυσμούς και πάλι να κατηγοριοποιούνται στις τέσσερις κύριες γεωγραφικές περιοχές (δηλ. SEEa, OVERa, CEUa, AMa) σύμφωνα με τη φυλογεωγραφία των δειγμάτων που βασίζεται στην ανάλυση του mtDNA, έδειξε ότι το 77,39% της παρατηρούμενης ποικιλότητας θεωρήθηκε ενδοπληθυσμιακή διαφοροποίηση, το 12,88% δια-πληθυσμιακή διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών και το 9,73% θεωρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών με συνολική τιμή F_{ST} 22,61%. Όταν συγκρίθηκαν μόνο δύο περιοχές, η Ευρώπη και η Ανατολή, δεν υπήρχε διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών ενώ η τιμή F_{ST} αυξήθηκε σε 23,75% (Πίνακας 39).

Πίνακας 36: Κατά ζεύγη τιμές F_{ST} (επάνω) και γενετικές αποστάσεις (κάτω) για όλους τους πληθυσμούς στο *DQA*

	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	PL	CH
GR-C	0,011	0,032	0,016	0,003	0,070	0,221	0,236	0,159	0,180	0,206	0,319	0,133	0,070	0,140
	0,027	0,171	0,089	0,067	0,333	-1,000	-1,000	0,813	1,738	1,226	4,283	0,561	0,381	0,826
GR-W		0,060	0,012	0,010	0,115	0,279	0,305	0,213	0,243	0,276	0,392	0,198	0,119	0,198
		0,195	0,066	0,056	0,386	-1,000	-1,000	0,897	1,801	1,406	-1,000	0,697	0,426	1,004
GR-S			0,078	0,061	0,138	0,224	0,239	0,213	0,197	0,263	0,355	0,240	0,148	0,204
			0,322	0,329	0,835	-1,000	-1,000	1,395	2,182	2,226	-1,000	1,523	0,857	1,966
GR-N				-0,017	0,063	0,250	0,274	0,162	0,204	0,225	0,364	0,169	0,058	0,165
				0,042	0,266	-1,000	-1,000	0,679	1,520	1,048	2,367	0,625	0,303	0,890
GR-NE					0,022	0,217	0,231	0,112	0,155	0,164	0,299	0,110	0,009	0,106
					0,160	-1,000	-1,000	0,509	1,280	0,801	1,828	0,439	0,211	0,578
BG						0,201	0,214	0,020	0,107	0,044	0,177	0,066	-0,038	0,054
						-1,000	-1,000	0,109	0,109	0,198	0,651	0,264	0,034	0,284
TR							0,047	0,233	0,183	0,247	0,301	0,248	0,226	0,201
							0,329	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000
IL								0,252	0,197	0,268	0,336	0,275	0,235	0,215
								-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000
A									0,120	-0,012	0,065	0,156	-0,028	0,109
									0,677	0,030	0,181	0,635	0,069	0,518
F										0,145	0,171	0,143	0,138	0,147
										0,799	0,592	0,738	0,939	1,380
D											0,044	0,184	0,000	0,115
											0,154	0,734	0,162	0,514
NL												0,358	0,155	0,258
												2,423	0,477	1,569
GB													0,113	0,055
													0,459	0,206
PL														0,081
														0,458

Πίνακας 37: Κατά ζεύγη τιμές F_{ST} (επάνω) και γενετικές αποστάσεις (κάτω) για όλους τους πληθυσμούς στο *DRB1*

	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	IT	CH	PL
GR-C	0,00056	0,03382	0,02276	0,00348	0,12503	0,20538	0,19100	0,22886	0,27361	0,30380	0,48324	0,20405	0,39213	0,28011	0,23145
	0,009	0,131	0,071	0,020	0,314	1,687	0,907	1,482	2,207	4,485	-1,000	1,352	-1,000	-1,000	-1,000
GR-W		0,01991	0,03308	0,01786	0,12098	0,18526	0,16257	0,21104	0,25399	0,28541	0,46927	0,18298	0,37527	0,26476	0,21146
		0,103	0,093	0,049	0,316	1,562	0,785	1,429	2,091	3,991	-1,000	1,269	-1,000	-1,000	-1,000
GR-S			0,10629	0,07277	0,17820	0,14516	0,17236	0,19641	0,24339	0,26172	0,49324	0,14474	0,35541	0,23453	0,16312
			0,326	0,218	0,596	1,467	1,217	1,806	3,338	5,397	-1,000	1,287	-1,000	-1,000	-1,000
GR-N				0,00249	0,03832	0,23900	0,24384	0,23483	0,31730	0,34695	0,63867	0,24603	0,49301	0,30676	0,26855
				0,039	0,096	2,175	1,032	1,170	2,095	3,518	-1,000	1,614	-1,000	-1,000	-1,000
GR-NE					0,11681	0,23101	0,23009	0,24740	0,31862	0,33827	0,55284	0,23539	0,44452	0,30015	0,27773
					0,254	1,950	0,998	1,422	2,733	4,430	-1,000	1,465	-1,000	-1,000	-1,000
BG						0,27212	0,26818	0,23110	0,30000	0,34532	0,54037	0,28368	0,44942	0,31443	0,29298
						2,744	1,208	0,970	1,578	2,883	-1,000	2,078	-1,000	3,647	-1,000
TR							0,14921	0,18049	0,18856	0,21465	0,42459	0,11420	0,29809	0,19615	0,11052
							1,458	3,250	2,480	4,499	-1,000	1,366	-1,000	-1,000	-1,000
IL								0,20808	0,21862	0,27080	0,54503	0,12533	0,38252	0,24947	0,17577
								1,735	1,512	2,963	-1,000	0,904	-1,000	-1,000	-1,000
A									0,13534	0,02574	0,18097	0,17714	0,35248	0,24145	0,15572
									0,669	0,119	0,126	1,766	-1,000	-1,000	2,410
F										0,17910	0,42176	0,19858	0,39481	0,25855	0,18307
										0,817	0,896	1,932	-1,000	-1,000	2,333
D											0,13658	0,21563	0,40058	0,26838	0,18126
											0,050	2,069	-1,000	-1,000	1,847
NL												0,44724	0,83352	0,44959	0,64424
												2,206	-1,000	-1,000	-1,000
GB													0,32386	0,21675	0,12170
													-1,000	-1,000	-1,000
IT														0,34727	0,35774
														-1,000	-1,000
CH															0,17141
															-1,000

Πίνακας 38: Αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης για το *L. euroraeus*, χρησιμοποιώντας τις τέσσερις κύριες γεωγραφικές περιοχές δειγματοληψίας (SEEA, OVERa, CEUa, AMa) ως επίπεδα ομαδοποίησης ή χωρίς ομαδοποίηση για το **DQA**. Το ποσοστό της ποικιλομορφίας, η πιθανότητα (P) υπολογισμένη από δοκιμασίες μετάθεσης (permutation tests) και το F statistics δίνονται για κάθε ιεραρχικό επίπεδο (Excoffier *et al.*, 1992). Οι ενδείξεις 4 (SEEA, OVERa, CEUa, AMa) και 2 (CEUa, AMa) κάτω από κάθε παράμετρο υποδεικνύουν τις ομάδες πληθυσμών

Πηγή της διακύμανσης	d.f.		Σύνολο τετραγώνων		Συνιστώσες Διακύμανσης		Ποσοστό ποικιλότητας	
	4	2	4	2	4	2	4	2
Μεταξύ ομάδων	3	1	965,464	483,347	0,86693 Va	1,61565 Va	10,59	17,46
Μεταξύ πληθυσμών στις ομάδες	11	13	475,161	957,278	0,48575 Vb	0,80101 Vb	5,93	8,66
Μέσα στους πληθυσμούς	1333	1333	9114,355	9114,355	6,83748 Vc	6,83748 Vc	83,48	73,89
Συνολικό	1347	1347	10554,981	10554,98	8,19015	9,25414	100	100
Δείκτες καθήλωσης (συνολικές τιμές)								
FSC			FST			FCT		
4		2	4		2	4		2
0,06633		0,10486	0,16516		0,26114	0,10585		0,17459

Πίνακας 39: Αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης για το *L. euroraeus*, χρησιμοποιώντας τις τέσσερις κύριες γεωγραφικές περιοχές δειγματοληψίας (SEEA, OVERa, CEUa, AMa) ως επίπεδα ομαδοποίησης ή χωρίς ομαδοποίηση για το **DRB1**. Το ποσοστό της ποικιλομορφίας, η πιθανότητα (P) υπολογισμένη από δοκιμασίες μετάθεσης (permutation tests) και το F statistics δίνονται για κάθε ιεραρχικό επίπεδο (Excoffier *et al.*, 1992). Οι ενδείξεις 4 (SEEA, OVERa, CEUa, AMa) και 2 (CEUa, AMa) κάτω από κάθε παράμετρο υποδεικνύουν τις ομάδες πληθυσμών

Πηγή της διακύμανσης	d.f.		Σύνολο τετραγώνων		Συνιστώσες Διακύμανσης		Ποσοστό ποικιλότητας	
	4	2	4	2	4	2	4	2
Μεταξύ ομάδων	3	1	74,106	7,622	0,04402 Va	-0,00816 Va	9,73	-1,68
Μεταξύ πληθυσμών στις ομάδες	12	8	58,906	51,082	0,05826 Vb	0,12335 Vb	12,88	25,43
Μέσα στους πληθυσμούς	1588	572	556,040	211,578	0,35015 Vc	0,36989 Vc	77,39	76,25
Συνολικό	1603	581	689,052	270,282	0,45243			
Δείκτες καθήλωσης (συνολικές τιμές)								
FSC			FST			FCT		
4		2	4		2	4		2
0,14265		0,25008	0,22606		0,23746	0,09729		-0,01682

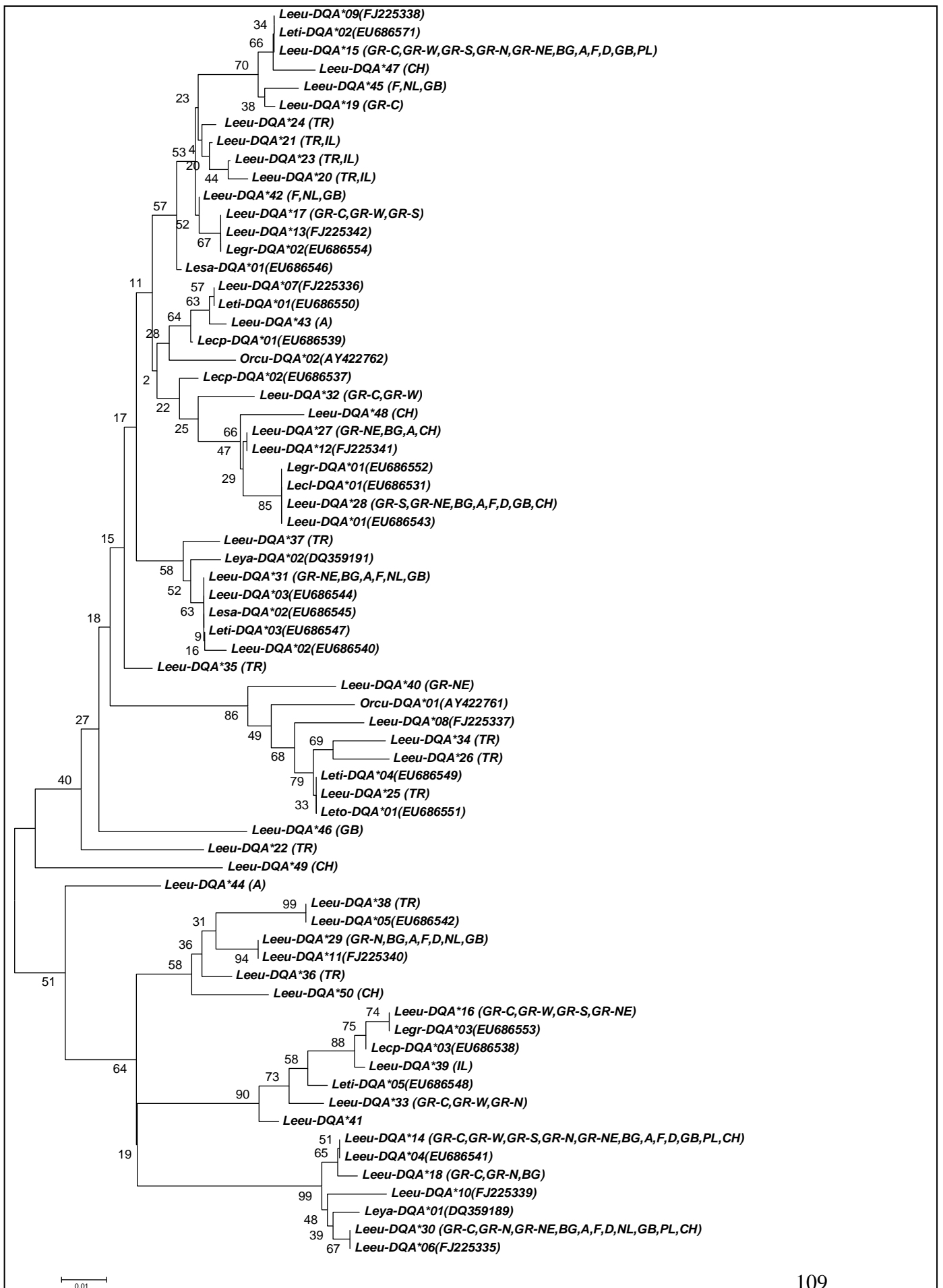
Φυλογενετική ανακατασκευή των *MHC-DRB1* και *MHC-DQA*

Ο αριθμός των κατά ζεύγη νουκλεοτιδικών διαφορών για το *DRB1* κυμαίνεται από 0,6% (*Leeu-DRB1*30* vs. *Leeu-DRB1*31*, *Leeu-DRB1*56* vs. *Leeu-DRB1*57*) έως 30,3% (*Leeu-DRB1*04* vs. *Leeu-DRB1*13*), και των κατά ζεύγη αμινοξικών διαφορών από 0% (*Leeu-DRB1*02* vs. *Leeu-DRB1*17* vs. *Leeu-DRB1*57*) έως 47,7% (*Leeu-DRB1*13* vs. *Leeu-DRB1*53*, *Leeu-DRB1*13* vs. *Leeu-DRB1*34*).

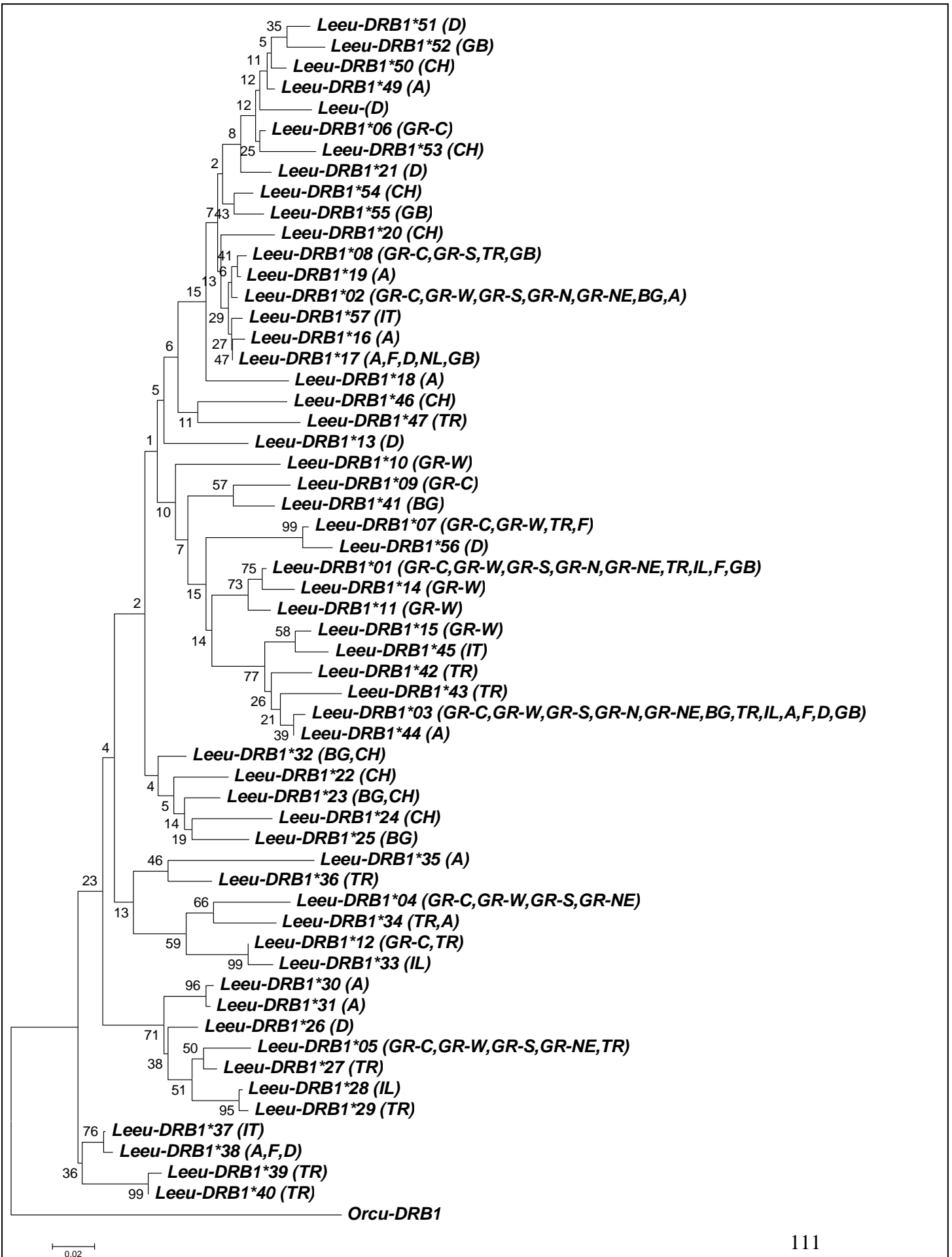
Για το *DQA* ο αριθμός των κατά ζεύγη νουκλεοτιδικών διαφορών κυμαίνεται από 0,4% (*Leeu-DQA*14* vs. *Leeu-DQA*18*, *Leeu-DQA*15* vs. *Leeu-DQA*19*, *Leeu-DQA*23* vs. *Leeu-DQA*20* και *Leeu-DQA*21*, *Leeu-DQA*24* vs. *Leeu-DQA*21*, και *Leeu-DQA*42* vs. *Leeu-DQA*17*) έως 14,1% (*Leeu-DQA*16* vs. *Leeu-DQA*26* και *Leeu-DQA*34*) και των κατά ζεύγη αμινοξικών διαφορών από 0% (*Leeu-DQA*14* vs. *Leeu-DQA*18*) έως 24,1% (*Leeu-DQA*38* vs. *Leeu-DQA*47*). Τα αλληλόμορφα *Leeu-DQA*14* και *Leeu-DQA*18* ήταν τα μόνα τα όποια έδιναν την ίδια αμινοξική αλληλουχία. Οι σχέσεις ανάμεσα (i) στα 37 αλληλόμορφα που ταυτοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, (ii) τα 13 *DQA* αλληλόμορφα *L. europaeus* που έχουν ήδη δημοσιευτεί (SurrIDGE *et al.*, 2008; de Bellocq *et al.*, 2009) και (iii) αλληλουχίες *DQA* αντιπροσώπων των leporid από τη GenBank προσδιορίστηκαν με την κατασκευή ενός δέντρου neighbour-joining, και ενός δέντρου UPGMA χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μέγιστης μεικτής πιθανότητας (maximum composite likelihood). Και οι δύο προσεγγίσεις έδωσαν όμοια αποτελέσματα με συγκρίσιμες bootstrap τιμές (Εικόνα 18). Για το φυλογενετικό δέντρο του *DRB1* χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη καθώς και μία αλληλουχία *O. cuniculus* καθώς δεν υπάρχουν στη GenBank αλληλουχίες από είδη *Lepus* (Εικόνα 19).

Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ξεκάθαρα ότι αλληλόμορφα που παρατηρούνται μόνο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς δεν ομαδοποιούνται μαζί, και δεν υπάρχει διαχωρισμός των αλληλομόρφων με βάση τη γεωγραφική απόσταση, π.χ. κάποια αλληλόμορφα της Ανατολής εξαπλώνονται σε όλο το neighbour-joining δέντρο. Αυτή η έλλειψη φυλογεωγραφικού σήματος ήταν ακόμη πιο προφανής όταν αλληλουχίες από το εξώνιο 2 του *DQA* από διάφορα είδη *Lepus*, όπως επίσης και του *Oryctolagus cuniculus* σχημάτιζαν κλαδιά με αλληλόμορφα του *L. europaeus*. Αυτή η συγγένεια των αλληλομόρφων μεταξύ απομακρυσμένων πληθυσμών και διαφορετικών ειδών είναι χαρακτηριστικό μερικών τόπων του MHC (Klein *et al.*, 1998), και πιστεύεται πως προκύπτει από την ισοζυγούσα επιλογή (Hughes *et al.*,

1996). Οι αλληλουχίες από τη GenBank που χρησιμοποιήθηκαν για το φυλογενετικό δέντρο προέρχονται από 13 *L. europaeus* (*Leeu-DQA*01-13*, IDs: EU686543, -40, -44, -41 και -42, FJ225335-42), πέντε *L. timidus* (*Leti-DQA*01-05*, IDs: EU686550, -71, -47, -49 και -48), τρία *L. granatensis* (*Legr-DQA*01-03*, IDs: EU686552-4), ένα *L. townsendii* (*Leto-DQA*01*, ID: EU686551), δύο *L. saxatilis* (*Lesa-DQA*01-02*, IDs: EU686546 και -45), τρία *L. capensis* (*Lecp-DQA*01-03*, IDs: EU686539, -38 και -37), ένα *L. californicus* (*Lecl-DQA*01*, ID: EU686531), δύο *L. yarkandensis* (*Leya-DQA*01-02*, ID: DQ359189 και -91) και δύο *Oryctolagus cuniculus* (*Orcu-DQA*01-02*, IDs: AY422761-62).



Εικόνα 18: Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των 37 αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του **DQA** του *Lepus europaeus* (*Leeu-DQA*14-50*) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη, μαζί με αλληλουχίες από τη GenBank. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό bootstrap υποστήριξης (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις.



Εικόνα 19: Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των 57 αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του **DRB1** του *Lepus europaeus* (*Leeu-DRB1*01–58*) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό bootstrap υποστήριξης (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις.

Πρότυπα συνώνυμων και μη συνώνυμων υποκαταστάσεων

Η εξέταση των συνώνυμων vs. των μη συνώνυμων μεταλλάξεων μέσα στην κωδική περιοχή του PBR έδειξε ότι ο αριθμός των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων (d_N) ήταν πολύ υψηλότερος από τον αριθμό των συνώνυμων υποκαταστάσεων (d_S) ($d_N = 0,153 \pm 0,051$ vs. $d_S = 0,062 \pm 0,036$ για το *DQA* και $d_N = 0,450 \pm 0,134$ vs. $d_S = 0,221 \pm 0,096$ για το *DRBI*) το οποίο αναμένεται για τα αλληλόμορφα του MHC που βρίσκονται κάτω από τη δράση ισοζυγούσας επιλογής. Αυτές οι διαφορές ευνοούν την υπόθεση της θετικής επιλογής με στατιστικά σημαντική τιμή P 0,041 για το *DQA* και τιμή 0,035 για το *DRBI*. Ωστόσο, όταν η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τα κωδικόνια της μη-PBR, η αναλογία των συνώνυμων έναντι των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων αντιστρέφεται ($d_N = 0,062 \pm 0,015$ vs. $d_S = 0,088 \pm 0,027$ για το *DQA* και $d_N = 0,050 \pm 0,014$ vs. $d_S = 0,076 \pm 0,026$ για το *DRBI*), και παρατηρείται μία τάση προς την επιλογή καθαρισμού όπως έχει περιγραφεί και από τους Hughes & Nei, 1988 (Πίνακες 40 και 41).

Πίνακες 40, 41: Συνώνυμες (d_S) και μη συνώνυμες (d_N) υποκαταστάσεις ανά θέση (per site) και τα αποτελέσματα του Z -test για θετική επιλογή στα κωδικόνια της περιοχής πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR), των κωδικονίων εκτός PBR (non-PBR) και σε ολόκληρο το εξώνιο 2

<i>DQA</i>	n	d_S	d_N	d_N/d_S	P
PBR	16	0,062 (0,036)	0,153 (0,051)	2,46	0,041*
Non-PBR	54	0,088 (0,027)	0,062 (0,015)	0,70	0,084**
Εξώνιο 2	70	0,073 (0,019)	0,067 (0,013)	0,92	0,397**

<i>DRBI</i>	n	d_S	d_N	d_N/d_S	P
PBR	12	0,221(0,096)	0,450(0,134)	2,04	0,035*
Non-PBR	46	0,076(0,026)	0,050(0,014)	0,66	0,176**
Εξώνιο 2	58	0,108(0,026)	0,122(0,025)	1,13	0,323*

Τα κωδικόνια που αντιστοιχούν στον εκκινητή εξαιρέθηκαν της ανάλυσης. Το πιθανό σφάλμα υπολογίστηκε από τη μέθοδο bootstrap με 500 επαναληπτικά, και φαίνονται στις παρενθέσεις. Το n υποδεικνύει τον αριθμό των κωδικονίων σε κάθε κατηγορία. Η πιθανότητα (P) απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης της αυστηρής ουδετερότητας ($d_N = d_S$) υπέρ της εναλλακτικής υπόθεσης (* $d_N > d_S$) ή (** $d_N < d_S$).

Θυλάκες δέσμησης πεπτιδίου και υποκατάσταση αμινοξέως με αντικατάσταση φορτίου

Δεκαέξι κατάλοιπα της περιοχής DQa1 συμμετέχουν στο σχηματισμό των θυλάκων δέσμησης του αντιγονικού πεπτιδίου P1, P6 και P9 (κατάλοιπα της PBR, Bondinas *et al.*, 2007). Δεκαπέντε από αυτά τα κατάλοιπα κωδικοποιούνται από το PCR προϊόν που αποκτήθηκε από τη μελέτη. Δέκα από αυτά τα κατάλοιπα ήταν πολυμορφικά. Ο P6 έδειξε το μεγαλύτερο πολυμορφισμό με 15 συνολικά υποκαταστάσεις στα πέντε κατάλοιπα. Δεν ανιχνεύτηκαν ενθέσεις, διαγραφές ή κωδικόνια λήξης, το οποίο υποδεικνύει ότι όλες οι αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν μπορούν να σχηματίσουν λειτουργικά μόρια. Ανάμεσα στα αλληλόμορφα που απομονώθηκαν οι μη συνώνυμες υποκαταστάσεις στην PBR παρήγαγαν διαφορετικούς αριθμούς παραλλαγών των P1, P6 και P9. Δέκα παραλλαγές ανιχνεύτηκαν για τον P1, 12 για τον P6 και επτά για τον P9 (Πίνακας 42). Οι συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων για κάθε πληθυσμό υπολογίστηκαν ως το άθροισμα των συχνοτήτων όλων των αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό που φέρουν μία συγκεκριμένη παραλλαγή.

Τέσσερα από τις 10 παραλλαγές της P1 ήταν ειδικές για πληθυσμούς με τρεις από αυτές να υπάρχουν μόνο στην TR (YHEFWS, YHLFWS και YHEFWK). Μόνο μία παραλλαγή του P1 υπήρχε στο IL, το YHQFWT, το οποίο ήταν και το κυρίαρχο στη TR. Η παραλλαγή του P1 YHQFWA υπήρχε σε όλους τους πληθυσμούς εκτός από αυτούς της Ανατολής. Επιπλέον, ήταν η κυρίαρχη παραλλαγή στη GR-S με συχνότητα 0,9167, η οποία μειωνόταν ανεβαίνοντας πιο βόρεια.

Ένας μέσος όρος από τέσσερις P6 παραλλαγές ανιχνεύτηκε για κάθε πληθυσμό. Μόνο δύο παραλλαγές υπήρχαν στο IL και στην PL, ενώ οι GR-NE, GR-C και GR-W ήταν οι πιο πλούσιοι πληθυσμοί με 6 P6 παραλλαγές ανά πληθυσμό. Πέντε από τις 12 P6 παραλλαγές ήταν ειδικές για πληθυσμούς. Η EETAT παραλλαγή του P6 υπήρχε μόνο στους πληθυσμούς της Ανατολής. Αντίθετα η παραλλαγή NNTAG δεν ανιχνεύτηκε στη Ανατολή ενώ η συχνότητά της ήταν υψηλή στους ελληνικούς πληθυσμούς και μειωνόταν προς τα βόρεια.

Μόνο επτά παραλλαγές ανιχνεύτηκαν για τον P9. Ωστόσο, δεν υπήρχαν παραλλαγές ειδικές για πληθυσμούς. Όλα οι παραλλαγές του P9 υπήρχαν στην GR-C ενώ η παραλλαγή YNLR υπήρχε σε όλους τους πληθυσμούς. Αυτή η παραλλαγή είχε τη μεγαλύτερη συχνότητα στη D και μειωνόταν με τη γεωγραφική απόσταση. Τέλος, η P9 παραλλαγή YGIMR δεν ανιχνεύτηκε σε ανατολικούς πληθυσμούς, ενώ

παρουσίαζε υψηλή συχνότητα σε ελληνικούς πληθυσμούς και μειωνόταν εκτός Ελλάδας και προς τη Βόρεια Ευρώπη.

Κάθε αλληλόμορφο έφερε ένα συγκεκριμένο συνδυασμό από τους P1, P6 και P9 παραλλαγές. Είκοσι εννέα διαφορετικοί συνδυασμοί παραλλαγών ανιχνεύτηκαν στα 37 αλληλόμορφα που απομονώθηκαν. Οι περισσότεροι συνδυασμοί παραλλαγών ήταν μοναδικοί για το αλληλόμορφο που ανιχνεύτηκαν. Ωστόσο, έξι συγκεκριμένοι συνδυασμοί παραλλαγών υπήρχαν σε δύο ή τρία αλληλόμορφα (Πίνακας 43). Ο συνδυασμός YHEFWR/NETAN/YNILR υπήρχε στα αλληλόμορφα *Leeu-DQA*14*, *18* και *30*. Αντιπροσώπευε τον κυρίαρχο συνδυασμό στους Βόρειους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (D με 0,7619, PL με 0,7500, A και NL με 0,7000) ενώ απουσίαζε εντελώς από την Ανατολή. Ο συνδυασμός YHQFWA/NTAG/YGIMR υπήρχε στα αλληλόμορφα *Leeu-DQA*15* και *47*. Τα αλληλόμορφα αυτά απουσιάζουν από τους ανατολικούς πληθυσμούς αλλά υπήρχαν σε μεγάλη συχνότητα στους ελληνικούς πληθυσμούς (0,3688–0,5000). Ο συνδυασμός YHQFWT/NTAN/YNILR που υπήρχε στα *Leeu-DQA*21* και *23* περιορίζεται στην Ανατολή ενώ ο συνδυασμός YHEFWR/NTAN/YNILR των *Leeu-DQA*25* και *34* υπάρχει μόνο στον πληθυσμό της TR. Τέλος, ο συνδυασμός YHLFWT/NETAN/YNILR των *Leeu-DQA*29*, *36* και *50* ήταν ο μοναδικός που ανιχνεύτηκε έστω σε μικρή συχνότητα στη GR-N, στη BG, σε αρκετούς ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης είχε στη D με 0,119 και στη NL με 0,1) και στη TR (0,0182). Οι συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων σε κάθε περιοχή υπολογίστηκαν ως η μέση συχνότητα της κάθε παραλλαγής μεταξύ των πληθυσμών που ομαδοποιούνταν σε κάθε περιοχή. Για κάθε θύλακα, μία ελληνική και μία ευρωπαϊκή παραλλαγή προσδιορίστηκαν. Οι ελληνικές παραλλαγές (για τον P1 η YHQFWA, για τον P6 η NNTAG και για τον P9 η YGIMR) κυριάρχησαν στους ελληνικούς πληθυσμούς όπου παρουσίαζαν και τη μεγαλύτερη συχνότητα η οποία μειωνόταν προς τα βόρεια. Οι ευρωπαϊκές παραλλαγές (για τον P1 η YHEFWR, για τον P6 η NETAN και για τον P9 η YNILR) έδειξαν μία αντίθετη τάση με τις δικές τους υψηλότερες συχνότητες και την κυριαρχία τους στην Ευρώπη ενώ η συχνότητα μειωνόταν προς το νότο. Οι ελληνικές παραλλαγές δεν υπήρχαν στην Ανατολή αλλά υπήρχαν οι ευρωπαϊκές. Για τους P1 και P6 ταυτοποιήθηκαν ανατολικές παραλλαγές (για τον P1 η YHQFWT και για τον P6 η NNTAN) οι οποίες υπήρχαν στους πληθυσμούς της TR και του IL σε

συχνότητες 0,8909 και 0,8665 αντίστοιχα. Ωστόσο, δεν υπήρξε ανατολική παραλλαγή για τον P9.

Δεκαεννιά κατάλοιπα της β1 περιοχής συνεισφέρουν στο σχηματισμό των αντιγονικών θυλάκων (P1, P4, P6, P7 και P9 για τη DRβ αλυσίδα). Στα αλληλόμορφα *DRB1* που απομονώθηκαν υπάρχουν 12 από τα 19 κατάλοιπα. Για την αλυσίδα DRβ υπάρχουν έξι κατάλοιπα του P4, πέντε κατάλοιπα του P7, 1 του P6 και 2 του P9. Εξαιτίας του μικρού αριθμού των καταλοίπων των θυλάκων P6 και P9 αυτές δε αναλυθούν περαιτέρω για παραλλαγές αλλά θα ληφθούν υπ' όψιν για τη μελέτη της ποικιλομορφίας του PBR. Συνεπώς, οι θύλακες P4 και P7 αναλύονται για παραλλαγές. Ο πιο πολυμορφικός φαίνεται να είναι ο P4 με 31 παραλλαγές (Πίνακας 44) ενώ ο P7 έχει 23 παραλλαγές (Πίνακας 45). Κάθε αλληλόμορφο έφερε ένα συνδυασμό των παραλλαγών των P4 και P7. Συνολικά, βρέθηκαν 40 διαφορετικοί συνδυασμοί. Δεν ανιχνεύτηκαν ενθέσεις ή διαγραφές το οποίο υποδεικνύει ότι όλες οι αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν μπορούν να σχηματίσουν λειτουργικά μόρια. Οι συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων για κάθε πληθυσμό υπολογίστηκαν ως το άθροισμα των συχνοτήτων όλων των αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό που φέρουν μία συγκεκριμένη παραλλαγή.

Δώδεκα από τις 31 παραλλαγές του P4 ήταν ειδικές για πληθυσμούς με τρεις από αυτές να υπάρχουν μόνο στην TR (LEEVAY, LDD SAY και LDDRSY) και άλλες τρεις μόνο στην CH (FDDRSY, FDDKPY και FEYTPY). Μόνο μία παραλλαγή του P4 υπήρχε στην NL, η FEYAAF, η οποία ήταν και η κυρίαρχη σε όλους τους ελληνικούς πληθυσμούς και σε αρκετούς ευρωπαϊκούς ενώ απουσίαζε από την Ανατολή. Η παραλλαγή του P4 FDDRQV παρουσίαζε τη μεγαλύτερη συχνότητα στην TR και παρατηρούνταν σε μικρότερες συχνότητες στην Ελλάδα, στο IL και στην A.

Δεκαπέντε από τις 23 παραλλαγές του P7 ήταν ειδικές για πληθυσμούς με τρεις από αυτές να υπάρχουν μόνο στην TR (DYWIR, DYWLS και GYWRA) και άλλες τρεις μόνο στην CH (DYWFK, EYWTT και EYWIA). Η παραλλαγή EYWRA ήταν η κυρίαρχη στους ελληνικούς και ευρωπαϊκούς πληθυσμούς και παρατηρήθηκε σε μικρή συχνότητα στην TR αλλά απουσίαζε από το IL. Η παραλλαγή DYWIR ήταν η κυρίαρχη στην TR και υπάρχει και σε μικρή συχνότητα στο IL.

Κάθε αλληλόμορφο έφερε ένα συγκεκριμένο συνδυασμό από P4 και P7 παραλλαγές. Σαράντα διαφορετικοί συνδυασμοί παραλλαγών ανιχνεύτηκαν στα 61

αλληλόμορφα που απομονώθηκαν. Οι περισσότεροι συνδυασμοί παραλλαγών ήταν μοναδικοί για το αλληλόμορφο που ανιχνεύτηκαν. Ωστόσο, δώδεκα συγκεκριμένοι συνδυασμοί παραλλαγών υπήρχαν σε δύο έως και έξι αλληλόμορφα (Πίνακας 46). Ο συνδυασμός FEYAAF/EYWRA υπήρχε στα αλληλόμορφα *Leeu-DRB1*02*, *16*, *17*, *20*, *56*, *57* και *58* και είναι ο κυρίαρχος στους ελληνικούς και ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (GR-C με 0,4556, GR-W με 0,4067, GR-S με 0,3182, GR-N με 0,6, GR-NE με 0,5375, BG με 0,5146, A με 0,5625, D με 0,5926, NL με 1,0000, PL με 0,2500 και IT με 0,8000) ενώ απουσιάζει εντελώς από την Ανατολή. Ο συνδυασμός FDDRQV/DYWIR υπήρχε στα αλληλόμορφα *Leeu-DRB*27*, *28* και *29*. Τα αλληλόμορφα *Leeu-DRB*27* και *29* υπάρχουν σε μεγάλη συχνότητα στον πληθυσμό της TR (0,4853) και το *Leeu-DRB*28* υπάρχει σε μικρότερη συχνότητα στο IL (0,0714). Στο IL ο κυρίαρχος συνδυασμός ήταν ο YEDRSY/EYWLR, υπήρχε στα αλληλόμορφα *Leeu-DRB1*01* και *11* και εμφανίστηκε σε συχνότητα 0,3571, ο οποίος συνδυασμός παρατηρήθηκε σε υψηλές συχνότητες στους ελληνικούς πληθυσμούς, στην TR και στη GB αλλά απουσίαζε από τους υπόλοιπους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (μόνο στη F υπήρχε σε συχνότητα 0,025). Στη F ο κυρίαρχος συνδυασμός ήταν ο LEDRSY/EYWFR (*Leeu-DRB1*07*) με συχνότητα 0,45. Στη GB ο κυρίαρχος συνδυασμός ήταν ο FEYAAAY/EYWRA με συχνότητα 0,275 και υπήρχε στα αλληλόμορφα *Leeu-DRB1*08* και *19*. Τέλος στη CH ο κυρίαρχος συνδυασμός ήταν ο FDDRPY/DYWFR του αλληλομόρφου *Leeu-DRB1*23* (0,433). Οι συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων σε κάθε περιοχή υπολογίστηκαν ως η μέση συχνότητα της κάθε παραλλαγής μεταξύ των πληθυσμών που ομαδοποιούνταν σε κάθε περιοχή. Στην περίπτωση του *DRB1* δεν ταυτοποιήθηκε κάποια ελληνική ή ευρωπαϊκή παραλλαγή. Ακόμη, σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκαν κοινές παραλλαγές μεταξύ Ελλάδας και Ανατολής (για το *DQA* οι ελληνικές παραλλαγές δεν υπήρχαν στην Ανατολή αλλά υπήρχαν οι ευρωπαϊκές).

Πίνακας 42: Συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο **DQA**

	GR-C	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	PL	CH
<i>Παραλλαγές θύλακα 1 (P1)</i>															
YHEFWR	0,2943	0,2822	0,0833	0,4000	0,3958	0,5976	0,0909	0	0,7000	0,2381	0,7619	0,7000	0,5334	0,7500	0,4569
YHQFWA	0,7022	0,7178	0,9167	0,5500	0,5625	0,3293	0	0	0,2000	0,1666	0,1190	0	0,2000	0,2500	0,5259
YHQFWT	0,0035	0	0	0	0,0208	0	0,7819	1,0000	0	0,1905	0	0,1000	0,0500	0	0
YHLFWT	0	0	0	0,0500	0	0,0366	0,0182	0	0,0455	0,0714	0,1190	0,1000	0,0334	0	0,0086
YHQFWS	0	0	0	0	0	0	0,0455	0	0,0091	0	0	0	0	0	0
YHEFWK	0	0	0	0	0	0	0,0364	0	0	0	0	0	0	0	0
YHEFWA	0	0	0	0	0,0208	0,0366	0	0	0,0455	0,3333	0	0,1000	0,1833	0	0
YHEFWS	0	0	0	0	0	0	0,0091	0	0	0	0	0	0	0	0
YHLFWS	0	0	0	0	0	0	0,0182	0	0	0	0	0	0	0	0
YHQFWR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0086
<i>Παραλλαγές θύλακα 6 (P6)</i>															
NETAN	0,2943	0,2822	0,0833	0,4500	0,3958	0,6342	0,0182	0	0,7455	0,3095	0,8809	0,8000	0,5501	0,7500	0,4655
NNTAG	0,3759	0,4901	0,4167	0,5000	0,3958	0,1951	0	0	0,1182	0,2381	0,0238	0,1000	0,1000	0,2500	0,1336
NNTAN	0,0851	0,0099	0,2778	0	0,0208	0,0610	0,9638	0,7692	0,0637	0,4047	0	0,1000	0,1833	0	0
NNTEN	0,0745	0,0198	0,0278	0	0,1042	0,1098	0	0	0,0636	0,0476	0,0952	0	0,1500	0	0,3923
HETTN	0,0248	0,0099	0	0,0500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EETAT	0	0	0	0	0	0	0,0182	0,2308	0	0	0	0	0	0	0
EETAN	0,1454	0,1881	0,1944	0	0,0625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NNTTN	0	0	0	0	0	0	0,0273	0	0	0	0	0	0	0	0
NNTIN	0	0	0	0	0,0208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DDTAN	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0091	0	0	0	0	0	0
NKTAN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0167	0	0
NETEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0086
<i>Παραλλαγές θύλακα 9 (P9)</i>															
YNILR	0,3688	0,3020	0,0833	0,4500	0,4166	0,6586	0,5911	0,5000	0,7637	0,3809	0,8809	0,8000	0,5501	0,7500	0,4655
YNIMR	0,0035	0	0,0278	0	0,1250	0,1464	0,4091	0,2692	0,1182	0,3809	0,0952	0,1000	0,3500	0	0,5345
YGIMR	0,3688	0,4901	0,4167	0,5000	0,3958	0,1951	0	0	0,1182	0,0476	0,0238	0	0,0500	0,2500	0,1336
YNNLR	0,1454	0,1881	0,1944	0	0,0625	0	0	0,2308	0	0	0	0	0	0	0
YGILR	0,0071	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1905	0	0,1000	0,0500	0	0
YNILS	0,0851	0,0099	0,2778	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HNILR	0,0213	0,0099	0	0,0500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Πίνακας 43: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο **DQA**

Αλληλόμορφα	P1	P6	P9	SEE a				OVER a		AM a		CEU a						
				GR-C	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	PL	CH
<i>Leeu-DQA*14, 18, 30</i>	YHEFWR	NETAN	YNILR	0,2943	0,2822	0,0833	0,4	0,3958	0,5976	0	0	0,7	0,2381	0,7619	0,7	0,5334	0,75	0,4569
<i>Leeu-DQA*25, 34</i>	YHEFWR	NNTAN	YNILR	0	0	0	0	0	0	0,0909	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*15, 47</i>	YHQFWA	NNTAG	YGIMR	0,3688	0,4901	0,4167	0,5	0,3958	0,1951	0	0	0,1182	0,0476	0,0238	0	0,05	0,25	0,1336
<i>Leeu-DQA*28, 27</i>	YHQFWA	NNTEN	YNIMR	0	0	0,0278	0	0	0,0366	0	0	0,0455	0,0476	0,0952	0	0,15	0	0,0086
<i>Leeu-DQA*21, 23</i>	YHQFWT	NNTAN	YNILR	0	0	0	0	0	0	0,2546	0,5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*29, 36, 50</i>	YHLFWT	NETAN	YNILR	0	0	0	0,05	0	0,0366	0,0182	0	0,0455	0,0714	0,119	0,1	0,0167	0	0,0086
<i>Leeu-DQA*17</i>	YHQFWA	NNTAN	YNILS	0,0851	0,0099	0,2778	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*16</i>	YHQFWA	EETAN	YNNLR	0,1454	0,1881	0,1944	0	0,0625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*33</i>	YHQFWA	HETTN	HNILR	0,0213	0,0099	0	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*32</i>	YHQFWA	NNTEN	YNILR	0,0745	0,0198	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*42</i>	YHQFWA	NNTAN	YNILR	0	0	0	0	0	0,0244	0	0	0,0091	0,0714	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*44</i>	YHQFWA	DDTAN	YNILR	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0091	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*48</i>	YHQFWA	NNTEN	YNIMR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0862
<i>Leeu-DQA*22</i>	YHQFWT	NNTTN	YNIMR	0	0	0	0	0	0	0,0273	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*20</i>	YHQFWT	NNTAN	YNIMR	0	0	0	0	0	0	0,3818	0,2692	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*40</i>	YHQFWT	NNTIN	YNILR	0	0	0	0	0,0208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*39</i>	YHQFWT	EETTN	YNNLR	0	0	0	0	0	0	0	0,2308	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*41</i>	YHQFWT	HETTN	YNIMR	0,0035	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*45</i>	YHQFWT	NNTAG	YGILR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1905	0	0,1	0,05	0	0
<i>Leeu-DQA*35</i>	YHQFWT	NNTAN	YNILR	0	0	0	0	0	0	0,1182	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*46</i>	YHLFWT	NKTAN	YNIMR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0167	0	0
<i>Leeu-DQA*24</i>	YHQFWS	NNTAN	YNILR	0	0	0	0	0	0	0,0455	0	0	0	0	0	0	0	0

Αλληλόμορφα	P1	P6	P9	SEE a				OVER a		AM a		CEU a						
				GR-C	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	PL	CH
<i>Leeu-DQA*43</i>	YHQFWS	NNTAN	YNIMR	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0091	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*26</i>	YHEFWK	NNTAN	YNILR	0	0	0	0	0	0	0,0364	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*31</i>	YHEFWA	NNTAN	YNIMR	0	0	0	0	0,0208	0,0366	0	0	0,0455	0,3333	0	0,1	0,1833	0	0
<i>Leeu-DQA*38</i>	YHLFWS	EETTN	YNILR	0	0	0	0	0	0	0,0182	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*37</i>	YHEFWS	NNTAN	YNILR	0	0	0	0	0	0	0,0091	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leeu-DQA*49</i>	YHQFWR	NETEN	YNIMR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0086
<i>Leeu-DQA*19</i>	YHQFWA	NNTAG	YGILR	0,0071	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Πίνακας 44: Συχνότητες των παραλλαγών του θύλακα 4 του γονιδίου *DRB1* που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό

	GR-C	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	IT	CH	PL
<i>Παραλλαγές θύλακα 4 (P4)</i>																
YEDRSY	0,2917	0,3	0,2045	0,1875	0,2875	0	0,1029	0,3571	0	0,025	0	0	0,2	0	0	0
FEYAAF	0,4556	0,4067	0,3182	0,5625	0,5375	0,5146	0	0	0,5625	0,225	0,574	1	0,05	0,8	0,0803	0,2500
YDDRSY	0,0639	0,1	0,0227	0,1875	0,075	0,3592	0,0735	0,2857	0,1771	0,2	0,0556	0	0,1	0,1	0	0,2500
FDYKQY	0,0278	0,01	0,0909	0	0,075	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FDDRQV	0,1111	0,1533	0,2955	0	0,025	0	0,5147	0,0714	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
FEYTSF	0,0056	0	0	0	0	0	0	0	0,0313	0	0	0	0	0	0,1339	0
LEDRSY	0,0306	0,02	0	0	0	0	0,0147	0	0	0,45	0,0556	0	0	0	0	0,1250
FEYAAAY	0,0028	0	0,0682	0	0	0	0,0735	0	0,0208	0	0	0	0,275	0	0	0
FEYRSY	0,0056	0,0067	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FEYKQY	0,0056	0	0	0	0	0	0,0588	0,2857	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
YDDTSF	0	0,0033	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FDYAAF	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0625	0	0	0	0	0	0	0
FDDRSY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,058	0
FDDRPY	0	0	0	0	0	0,0097	0	0	0	0	0	0	0	0	0,433	0
FDDKPY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0402	0
FDDRPF	0	0	0	0	0	0,0485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FEDRQV	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0313	0	0,037	0	0	0	0	0
FEDRPY	0	0	0	0	0	0,0194	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2098	0
FEEVQY	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
LEEVAY	0	0	0	0	0	0	0,0735	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LEGRAY	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0833	0,1	0,0556	0	0	0,1	0	0,2500
LDDSAAY	0	0	0	0	0	0	0,0588	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FDYRSY	0	0	0	0	0	0,0485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LDDRSY	0	0	0	0	0	0	0,0147	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1250
FEYTPY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0446	0
FGYATF	0	0	0	0	0	0	0,0147	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FEYTVF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1111	0	0	0	0	0
FEYTLF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0556	0	0	0	0	0
FEYTCY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,125	0	0	0
FDYAAAY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0
LEDTAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0556	0	0	0	0	0

Πίνακας 45: Συχνότητες των παραλλαγών του θύλακα 7 του γονιδίου **DRB1** που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό

	GR-C	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	IT	CH	PL
<i>Παραλλαγές θύλακα 7 (P7)</i>																
EYWLR	0,2973	0,2967	0,2045	0,1875	0,2875	0,0194	0,1029	0,3571	0,1146	0,1250	0,0556	0	0,2000	0,1	0,2098	0,2500
EYWRA	0,4584	0,4067	0,3864	0,5625	0,5375	0,5146	0,0735	0	0,5833	0,2250	0,5370	1,0000	0,3250	0,8	0,0446	0,2500
DYWLR	0,0639	0,1000	0,0227	0,1875	0,075	0,3592	0,0882	0,2857	0,1875	0,2000	0,0556	0	0,1000	0	0,0580	0
DYWTK	0,0278	0,0100	0,0909	0	0,0750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DYWFR	0,1111	0,1533	0,2955	0	0,0250	0,0582	0,0294	0	0	0	0	0	0	0,1	0,4330	0,2500
EYWLT	0,0056	0	0	0	0	0	0	0	0,0313	0	0,1667	0	0,1250	0	0,1339	0
EYWFR	0,0306	0,0233	0	0	0	0	0,0147	0	0	0,4500	0,0926	0	0	0	0	0,1250
EYWRR	0	0,0067	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EYWTK	0,0056	0	0	0	0	0	0,0441	0,2857	0	0	0	0	0	0	0	0
DYWFT	0	0,0033	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DYWTA	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0625	0	0	0	0	0	0	0
EYWLA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0370	0	0	0	0	0
DYWFK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0402	0
DYWIR	0	0	0	0	0	0	0,4853	0,0714	0	0	0	0	0	0	0	0
EYWAK	0	0	0	0	0	0	0,0147	0	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
EYWRV	0	0	0	0	0	0	0,0735	0	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
DYWLS	0	0	0	0	0	0	0,0588	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DYWLR	0	0	0	0	0	0,0485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1250
EYWTT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0446	0
GYWRA	0	0	0	0	0	0	0,0147	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EYWIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0357	0
DYWIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2500	0	0	0
EYWWT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0556	0	0	0	0	0

Πίνακας 46: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό για το γονίδιο **DRB1**

Αλληλόμορφα	P4	P7	SEE a				AM a		OVER a		CEU a							
			GR-C	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	IT	CH	PL
Leeu-DRB1*16, 17, 02, 56, 57, 20, 58	FEYAAF	EYWRA	0,4556	0,4067	0,3182	0,6	0,5375	0,5146	0	0	0,5625	0,225	0,5926	1	0,05	0,8	0,0446	0,2500
Leeu-DRB1*27, 28, 29	FDDRQV	DYWIR	0	0	0	0	0	0	0,4853	0,0714	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*39, 40	LDDSAY	DYWLS	0	0	0	0	0	0	0,0588	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*49, 6, 50, 53	FEYTSF	EYWLT	0,0056	0	0	0	0	0	0	0	0,0313	0	0	0	0	0	0,1339	0
Leeu-DRB1*43, 44, 03	YDDRSY	DYWLR	0,0639	0,1	0,0227	0,2	0,075	0,3592	0,0735	0,2857	0,1771	0,2	0,0556	0	0,1	0	0	0
Leeu-DRB1*12, 33	FEYKQY	EYWTK	0,0056	0	0	0	0	0	0,0441	0,2857	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*08, 19	FEYAAAY	EYWRA	0,0028	0	0,0682	0	0	0	0,0735	0	0,0208	0	0	0	0,275	0	0	0
Leeu-DRB1*37, 38	LEGRAY	EYWLR	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0833	0,1	0,0556	0	0	0,1	0	0,2500
Leeu-DRB1*01, 11	YEDRSY	EYWLR	0,2917	0,2967	0,2045	0,2	0,2875	0	0,1029	0,3571	0	0,025	0	0	0,2	0	0	0
Leeu-DRB1*07, 60	LEDRSY	EYWFR	0,0306	0,02	0	0	0	0	0,0147	0	0	0,45	0	0	0	0	0	0,1250
Leeu-DRB1*54	FEYAAF	EYWIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0357	0
Leeu-DRB1*21	FEYAAF	EYWLA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,037	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*05	FDDRQV	DYWFR	0,1111	0,1533	0,2955	0	0,025	0	0,0294	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*45, 59	YDDRSY	DYWFR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,2500
Leeu-DRB1*23	FDDRPF	DYWFR	0	0	0	0	0	0,0097	0	0	0	0	0	0	0	0	0,433	0
Leeu-DRB1*25	FDDRPF	DYWFR	0	0	0	0	0	0,0485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*48	FEYTVF	EYWLT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1111	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*51	FEYTLF	EYWLT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0556	0	0	0	0	0

Αλληλόμορφα	P4	P7	SEE a				AM a		OVER a		CEU a							
			GR-C	GR-W	GR-S	GR-N	GR-NE	BG	TR	IL	A	F	D	NL	GB	IT	CH	PL
Leeu-DRB1*52	FEYTCY	EYWLT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1250	0	0	0
Leeu-DRB1*42, 61	LDDRSY	DYWLR	0	0	0	0	0	0	0,0147	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1250
Leeu-DRB1*31	FEDRQV	EYWLR	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0313	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*09	FEYRSY	EYWLR	0,0056	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*32	FEDRPY	EYWLR	0	0	0	0	0	0,0194	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2098	0
Leeu-DRB1*22	FDDRSY	DYWLR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,058	0
Leeu-DRB1*30	FDDRQV	DYWLR	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*34	FEYKQY	EYWAK	0	0	0	0	0	0	0,0147	0	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*14	YEDRSY	EYWER	0	0,0033	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*26	FEDRQV	EYWER	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,037	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*46	FEYTPY	EYWTT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0446	0
Leeu-DRB1*47	FGYATF	GYWRA	0	0	0	0	0	0	0,0147	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*15	YDDTSF	DYWFT	0	0,0033	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*13	LEDTAD	EYWWT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0556	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*18	FDYAAF	DYWTA	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0625	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*24	FDDKPY	DYWFK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0402	0
Leeu-DRB1*10	FEYRSY	EYWRR	0	0,0067	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*04	FDYKQY	DYWTK	0,0278	0,01	0,0909	0	0,075	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*35	FEEVQY	EYWRV	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0104	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*36	LEEVAY	EYWRV	0	0	0	0	0	0	0,0735	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*41	FDYRSY	DYWLR	0	0	0	0	0	0,0485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leeu-DRB1*55	FDYAAY	DYWIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0

Οι αμινοξικές αλλαγές πιθανόν να δείχνουν λειτουργικές διαφορές εάν υπάρχουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου στην PBR. Για την αλυσίδα DQa έξι από τα 15 κατάλοιπα της PBR φαίνεται να έχουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου. Στο κατάλοιπο 11 υπάρχουν δύο ουδέτερα (Asn και His) και δύο αρνητικά αμινοξέα (Glu και Asp). Δύο ουδέτερα κατάλοιπα (Gln και Thr) αντικαθίστανται από ένα αρνητικό (Glu) στη θέση 31. Το κατάλοιπο 52 έχει πέντε εναλλακτικά κατάλοιπα δύο από τα οποία είναι θετικά (Arg και Lys) και τρία είναι ουδέτερα (Ala, Thr και Ser). Στο κατάλοιπο 62 υπάρχουν δύο αρνητικά αμινοξέα (Glu και Asp), ένα ουδέτερο (Asn) και ένα θετικό (Lys). Τέλος, στο κατάλοιπο 66 υπάρχουν τρία ουδέτερα (Ala, Thr και Ile) και ένα αρνητικό αμινοξύ (Glu) ενώ στο κατάλοιπο 76 υπάρχει ένα θετικό (Arg) και ένα ουδέτερο αμινοξύ (Ser).

Για την αλυσίδα DRβ επτά από τα 12 κατάλοιπα εμφανίζουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου. Στο κατάλοιπο 28 υπάρχουν δύο ουδέτερα (Gly και Phe) και δύο αρνητικά φορτισμένα (Asp και Glu) αμινοξέα. Στο κατάλοιπο 30 υπάρχουν πέντε ουδέτερα (Phe, Leu, Asn, Tyr και His) και ένα αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ (Asp). Στο κατάλοιπο 57 υπάρχουν δύο αρνητικά (Asp και Glu) και έξι ουδέτερα (Thr, Ala, Ser, Ile, Asn και Val) αμινοξέα. Στο κατάλοιπο 67 υπάρχουν έξι ουδέτερα (Thr, Ile, Leu, Phe, Ala και Trp) και ένα θετικό αμινοξύ (Arg) ενώ στο κατάλοιπο 70 υπάρχουν δύο αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα (Asp και Glu) και δύο ουδέτερα (Tyr και Gly). Στο κατάλοιπο 71 υπάρχουν τέσσερα ουδέτερα (Val, Ser, Ala και Thr) και δύο θετικά (Arg και Lys) αμινοξέα, και τέλος, στο κατάλοιπο 78 υπάρχουν τρία ουδέτερα (Phe, Val και Tyr) και ένα αρνητικό (Asp) αμινοξύ. Αυτές οι διαφορές στο φορτίο μπορεί να καταλήγουν σε μια διαφορετική τρισδιάστατη διαμόρφωση της πρωτεΐνης.

Αν και τα μόρια του MHC είναι ιδιαίτερα πολυμορφικά περιέχουν κάποια καλά συντηρημένα χαρακτηριστικά όπως θέσεις γλυκοσυλίωσης, ενδοπεριοχικές (intradomain) δισουλφιδικές γέφυρες και συντηρημένα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με τον TCR των T_H κυττάρων (Πίνακες 32 και 33). Στα μόρια του MHC μόνο N-συνδεδεμένοι ολιγοσακχαρίτες προσδένονται σε κατάλοιπα Asn. Στην αλυσίδα DRβ υπάρχει μόνο μία θέση γλυκοσυλίωσης η Asn19. Πράγματι, σε όλες τις αλληλουχίες *DRB1* που ταυτοποιήθηκαν βρέθηκε ένα μη μεταβλητό κατάλοιπο Asn19 αν και εντοπίζεται στην περιοχή του εκκινήτη. Για την αλυσίδα DQa υπάρχουν δύο θέσεις γλυκοσυλίωσης, η Asn78 και η Asn119. Στις αλληλουχίες *DQA*

που ταυτοποιήθηκαν και οι δύο θέσεις ήταν εκτός του εύρους της αλληλουχίας (Achour, 2001). Στην περιοχή α1 ενός μορίου MHC τάξης II δεν υπάρχουν κατάλοιπα κυστεΐνης ενώ η β1 περιοχή περιέχει ένα δισουλφιδικό δεσμό. Πράγματι, δε βρέθηκαν κατάλοιπα κυστεΐνης στις *DQA* αλληλουχίες, ενώ στις αλυσίδες DRβ που κωδικοποιούνται βρέθηκαν δύο συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, η Cys15 (στην περιοχή του εκκινήτη) και η Cys79 (Achour, 2001). Έχει βρεθεί ότι μόνο μία αμινοξική αλλαγή προκαλεί την α αλυσίδα να κάμψει 2Α° προς την επιφάνεια εσοχής (floor) του θύλακα πρόσδεσης σε σχέση με την αλυσίδα της τάξης I. Συνεπώς στο καρβοξυτελικό άκρο της α1 ελικοειδούς περιοχής της HLA-DR1 έχει αποδειχτεί ότι υπάρχει ένα κατάλοιπο αργινίνης σε μία κρίσιμη θέση (Arg76) που καταλαμβάνεται από μία τυροσίνη στην αντίστοιχη περιοχή της τάξης I (Tyr84). Στη DQα αλυσίδα υπάρχει στη θέση 76 ένα κατάλοιπο Arg που πιθανόν συνεισφέρει σε αυτό το σχηματισμό.

Ovis aries**Απομόνωση και ποικιλότητα του εξωνίου 2 των MHC-DRB1 και MHC-DQA2**

Η ενίσχυση με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τον κάθε τόπο, έδωσε ένα τμήμα 285bp με τους εκκινητές και ένα τμήμα 237bp χωρίς τους εκκινητές για το *DRB1* ενώ για το *DQA2* έδωσε ένα τμήμα 242bp και 239bp με τους εκκινητές και ένα τμήμα 195bp και 192bp χωρίς τους εκκινητές (στις αλληλουχίες *Ovar-DQA2*14* και *44* λείπει μία τριπλέτα βάσεων που αντιστοιχούν δύο βάσεις στο κωδικόνιο 33 και μία βάση στο κωδικόνιο 34). Η ανάλυση με τη μέθοδο SSCP και ακολουθούμενη από τη διαδικασία κλωνοποίησης κατέληξε σε 48 επιβεβαιωμένα αλληλόμορφα *MHC-DRB1* και σε 46 *MHC-DQA2* αλληλόμορφα. Στο *DRB1* βρέθηκαν μόνο μέχρι δύο αλληλουχίες ανά άτομο ενώ στο *DQA2* βρέθηκαν μέχρι τρεις αλληλουχίες σε επτά άτομα. Το PCR προϊόν, μετά τη διαγραφή των εκκινητών, αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 8-86 για τη DRβ αλυσίδα και στα κατάλοιπα 20-84 της DQα αλυσίδα, σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης που προτάθηκε από τους Bondinas *et al.* (2007) ως μία ενοποιημένη πλατφόρμα για τα αλληλόμορφα του MHC τάξης II σε όλα τα ζωικά είδη. Το ακόλουθο σύστημα αρίθμησης βασίζεται στις αμινοξικές αλληλουχίες του HLA-DR και κάθε πρόσθετο αμινοξύ που βρίσκεται σε συγκεκριμένες θέσεις στις ορθόλογες πρωτεΐνες θεωρείται ως ένθεση. Τα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν σε 102 άτομα *Ovis aries* των φυλών Μπούτσικα με λευκό κεφάλι, Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι, Frizarta και Comisana και συμβολίζονται ως *Ovar-DQA2*01* ως *Ovar-DQA2*46* και *Ovar-DRB1*55* ως *Ovar-DRB1*102*, σύμφωνα με τους Ellis *et al.* (2006). Δεκαέξι αλληλόμορφα του *DQA2* (*Ovar-DQA2*31-46*) και 19 του *DRB1* (*Ovar-DRB1*84-102*) είχαν ήδη ανιχνευτεί από προηγούμενες μελέτες (Πίνακας 47). Τα υπόλοιπα αλληλόμορφα κατατέθηκαν στη GenBank, *Ovar-DQA2*01-30* (HM008962-JF284728) και *Ovar-DRB1*55-83* (JF284729- JF284757).

Εβδομήντα έξι από τα 237 νουκλεοτίδια (32,07%) και 34 από τα 79 αμινοξέα (43,04%) είναι μεταβλητά για το *DRB1* ενώ για το *DQA2* 89 από τα 195 νουκλεοτίδια (45,64%) και 42 από τα 65 αμινοξέα (64,62%) είναι μεταβλητά. Στην περιοχή PBR, για το *DQA2* η νουκλεοτιδική και αμινοξική ποικιλότητα με 24 και 12 μεταβλητές θέσεις αντίστοιχα ήταν λιγότερο έκδηλη σε σύγκριση με του *DRB1* με 35 και 15 μεταβλητές θέσεις αντίστοιχα. Η συνολική νουκλεοτιδική ποικιλότητα (π) είναι $0,081 \pm 0,011$ για το *DRB1* και $0,112 \pm 0,014$ για το *DQA2*, ενώ η αμινοξική ποικιλότητα

είναι $0,165 \pm 0,030$ για το *DRBI* και $0,202 \pm 0,032$ για το *DQA2*. Η υψηλότερη αμινοξική ποικιλότητα σε σχέση με τη νουκλεοτιδική υποδηλώνει ότι οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις ευνοούνται σε σχέση με τις συνώνυμες υποδεικνύοντας μία επιλεκτική διατήρηση των μη συνώνυμων πολυμορφισμών (Luetkemeier *et al.*, 2009). Γενικά, η κατανομή του πολυμορφισμού ήταν σύμφωνη με δεδομένα από λειτουργικά MHC γονίδια. Και για τα δύο γονίδια μεγάλο μέρος του πολυμορφισμού εντοπίζεται στην περιοχή PBR (35 από τα 76 μεταβλητά νουκλεοτίδια και 15 από τα 34 αμινοξέα για το *DRBI*, 24 από τα 89 μεταβλητά νουκλεοτίδια και 12 από τα 42 αμινοξέα για το *DQA2*). Στους Πίνακες 48 και 49 φαίνονται οι αμινοξικές αλληλουχίες των δύο γονιδίων.

Πίνακας 47: Οι αριθμοί ID των αλληλομόρφων *Ovar-DRB1* και *Ovar-DQA2* που έχουν βρεθεί από προηγούμενες μελέτες

<i>Ovar-DRB1</i> *84	FN870433
<i>Ovar-DRB1</i> *85	DQ659131, AM885933
<i>Ovar-DRB1</i> *86	DQ659114
<i>Ovar-DRB1</i> *87	DQ659127
<i>Ovar-DRB1</i> *88	FN543119, DQ659122, AM180938, AY884016
<i>Ovar-DRB1</i> *89	AY884014
<i>Ovar-DRB1</i> *90	DQ659123, AM885928
<i>Ovar-DRB1</i> *91	FN543115, DQ659121, AM180937
<i>Ovar-DRB1</i> *92	DQ659125
<i>Ovar-DRB1</i> *93	FM209549
<i>Ovar-DRB1</i> *94	FN543116, AY884020, AM180936
<i>Ovar-DRB1</i> *95	FR751086
<i>Ovar-DRB1</i> *96	FN543117, AM182982
<i>Ovar-DRB1</i> *97	FR751087
<i>Ovar-DRB1</i> *98	FM998806
<i>Ovar-DRB1</i> *99	FN393738
<i>Ovar-DRB1</i> *100	DQ659119
<i>Ovar-DRB1</i> *101	FM244837
<i>Ovar-DRB1</i> *102	FN821402
<i>Ovar-DQA2</i> *31	AY312390, M33305, M93433
<i>Ovar-DQA2</i> *32	AY312388
<i>Ovar-DQA2</i> *33	AY312380
<i>Ovar-DQA2</i> *34	FJ179555, AY312381
<i>Ovar-DQA2</i> *35	AY312382, Z28421
<i>Ovar-DQA2</i> *36	EU176819, AY312377
<i>Ovar-DQA2</i> *37	AY312379
<i>Ovar-DQA2</i> *38	AY312383
<i>Ovar-DQA2</i> *39	AY312387
<i>Ovar-DQA2</i> *40	AY312386, AY312385
<i>Ovar-DQA2</i> *41	AY312389, Z28419
<i>Ovar-DQA2</i> *42	AY312394

<i>Ovar-DQA2*43</i>	AY312393, AY829359
<i>Ovar-DQA2*44</i>	AY312392
<i>Ovar-DQA2*45</i>	AY312375, M93431
<i>Ovar-DQA2*46</i>	AY829356

Πίνακας 48: Αμινοξική αλληλουχία του εξωνίου 2 του **DRB1**. Με «Τ» σημειώνονται οι θέσεις που συμμετέχουν στο σχηματισμό του TCR και σημειώνονται και τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό των διαφορετικών θυλάκων της PBR

			P						P	P4					
	P P P		P 4 P		P		P		P P	7 47	P	P			PP
	9 6 4		4 7 6		9		7		9 7	TT TTT	4	T4	T		11
<i>Ovar-DRB1*55</i>	LEYHKSECHFFN	GERVRF	LDRYFYNG	EEYVRF	DSDW	GFEFRAVA	ELGRRSAEY	WNSQK	ELLERRRAE	VD	TYCR	HNY	GVI		
<i>Ovar-DRB1*56</i>	...R...	...R.S...	...N...	...Y...	...PD.K...	...K.N...	...F								
<i>Ovar-DRB1*57</i>	...Y.G...	...L.H.FYT...	...T...	...TQQ.QED...	...H...	...I.K...	...V...	...V							
<i>Ovar-DRB1*58</i>	...R.S...	...A...	...Y...	...T...	...G										
<i>Ovar-DRB1*59</i>	...S...	...R...	...E...	...Y.T...	...PD.K...	...DF...	...K.N...	...F							
<i>Ovar-DRB1*60</i>	...T.K.R.S...	...A...	...Y...	...PD.K...	...A.A...	...G									
<i>Ovar-DRB1*61</i>	...R.S...	...Y...	...TL...	...Y...	...DF...	...QT...									
<i>Ovar-DRB1*62</i>	...ST...	...R.S...	...Y...	...Y...	...PD.K...	...K.N...									
<i>Ovar-DRB1*63</i>	...ST...	...R.S...	...Y...	...Y...	...PD.K...	...K.N...									
<i>Ovar-DRB1*64</i>	...R...	...R.S...	...Y...	...N...	...Y...	...PD.K...	...K.N...								
<i>Ovar-DRB1*65</i>	...T.R...	...R...	...N...	...Y...	...PD.K...	...K.N...									
<i>Ovar-DRB1*66</i>	...R...	...R.S...	...H...	...F...	...Y...	...PD.K...	...T...	...I...	...FF						
<i>Ovar-DRB1*67</i>	...R...	...R.S...	...N...	...Y...	...PD.K...	...DF...	...K.T...								
<i>Ovar-DRB1*68</i>	...C...	...N...	...Y...	...PD.K...	...I...	...T...	...F								
<i>Ovar-DRB1*69</i>	...T.K...	...YT...	...N...	...T...	...PD.Q...	...DF...	...K.TA...								
<i>Ovar-DRB1*70</i>	...PD.K...	...DF...	...S.TA...	...G											
<i>Ovar-DRB1*71</i>	...C...	...R.S...	...Y...	...Y...	...PD.K...	...K.N...									
<i>Ovar-DRB1*72</i>	...C...	...C...	...Y...	...Y...	...PD.K...	...K.N...									
<i>Ovar-DRB1*73</i>	...R.S...	...PN.K...	...K...												
<i>Ovar-DRB1*74</i>	...P...	...PE.K...	...I...	...T...											
<i>Ovar-DRB1*75</i>	...A...	...R...	...E...	...Y...	...PD.K...	...DF...	...K.N...	...F							
<i>Ovar-DRB1*76</i>	...N.K...	...L.E...	...I...	...S.TA...	...AG										
<i>Ovar-DRB1*77</i>	...R...	...V													
<i>Ovar-DRB1*78</i>	...YR...	...L.E.H...	...FA...	...T...	...PA.Q...	...NI.HK...	...N.V...	...F							
<i>Ovar-DRB1*79</i>	...N...	...N...	...N...	...PN.Q...	...DF...	...NT.T...	...F								
<i>Ovar-DRB1*80</i>	...H...	...F...	...PE.K...	...DI...	...T...										
<i>Ovar-DRB1*81</i>	...S.K.R.S...	...A...	...Y...	...I...	...QT...	...G									
<i>Ovar-DRB1*82</i>	...R.S...	...Y...	...N...	...Y...	...QT...										
<i>Ovar-DRB1*83</i>	...DI...	...K.A...	...G												
<i>Ovar-DRB1*84</i>	...R.S...	...Y...	...N...	...Y...	...PD.K...	...I...	...K.A...								
<i>Ovar-DRB1*85</i>	...S...	...YT...	...N...	...T...	...PD.Q...	...DF...	...S.TA...	...F							
<i>Ovar-DRB1*86</i>	...A...	...DF...	...A.A...	...G											
<i>Ovar-DRB1*87</i>	...ST...	...S...	...L.H...	...F...	...PD...	...DF...	...S.TA...								
<i>Ovar-DRB1*88</i>	...YR...	...L.E.H...	...FA...	...T...	...PA.Q...	...NI.QK...	...N.V...	...F							
<i>Ovar-DRB1*89</i>	...A...	...R...	...E...	...Y...	...PD.K...	...DF...	...K.N...	...F							
<i>Ovar-DRB1*90</i>	...ST...	...Y...	...Y...	...PD.K...	...I...	...T...									
<i>Ovar-DRB1*91</i>	...T.K.R.S...	...H...	...A...	...Y...	...PD.K...	...I...	...T...								
<i>Ovar-DRB1*92</i>	...Q...	...T...	...F												
<i>Ovar-DRB1*93</i>	...R.S...	...Y...	...N...	...Y...	...DF...	...QT...									
<i>Ovar-DRB1*94</i>	...A...	...R...	...E...	...TL...	...Y...	...PD.K...	...K.N...	...G							
<i>Ovar-DRB1*95</i>	...T.K.R.S...	...H...	...TL...	...PD.K...	...DF...	...A.A...									
<i>Ovar-DRB1*96</i>	...A...	...R...	...E...	...Y...	...DF...	...K.N...	...G								
<i>Ovar-DRB1*97</i>	...T.K.R.S...	...H...	...A...	...Y...	...PD.K...	...T...									
<i>Ovar-DRB1*98</i>	...R...	...R.S...	...N...	...Y...	...PD.K...	...DF...	...K.N...	...G							
<i>Ovar-DRB1*99</i>	...PE.K...	...I...	...T...												
<i>Ovar-DRB1*100</i>	...R.S...	...A...	...Y...	...PD...	...T...	...G									
<i>Ovar-DRB1*101</i>	...R...	...R.S...	...Y...	...Y...	...K.N...	...G									
<i>Ovar-DRB1*102</i>	...R...	...R.S...	...Y...	...Y...	...PD.K...	...K.N...									

Αλληλομορφική κατανομή και συχνότητες

Ο αριθμός των αλληλομόρφων του *DRB1* ανά φυλή (ή πληθυσμό) κυμαίνεται από εννέα στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι έως 26 στη φυλή Comisana και οι συχνότητες αυτών των αλληλομόρφων ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών (Πίνακας 50). Γενικά, σε όλους τους πληθυσμούς κάποια αλληλόμορφα π.χ. τα *Ovar-DRB1*84* και *Ovar-DRB1*85* στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι ήταν σε αφθονία ενώ άλλα ανιχνεύτηκαν σε πολύ χαμηλές συχνότητες. Επιπλέον, τα περισσότερα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν μόνο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, όπως τα *Ovar-DRB1*84-Ovar-DRB1*86*, *Ovar-DRB1*55*, *Ovar-DRB1*56*, *Ovar-DRB1*58* και *Ovar-DRB1*59* στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι, τα *Ovar-DRB1*90*, *Ovar-DRB1*61* και *Ovar-DRB1*63* στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι, τα *Ovar-DRB1*64*, *Ovar-DRB1*94*, *Ovar-DRB1*65*, *Ovar-DRB1*67*, *Ovar-DRB1*69*, *Ovar-DRB1*95*, *Ovar-DRB1*96* και *Ovar-DRB1*71* στη φυλή Frizarta και τέλος, τα *Ovar-DRB1*66*, *Ovar-DRB1*68*, *Ovar-DRB1*70*, *Ovar-DRB1*72* - *Ovar-DRB1*83* και *Ovar-DRB1*97-Ovar-DRB1*102* στη φυλή Comisana. Δύο από τα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν σε τρεις από τις τέσσερις φυλές, τα *Ovar-DRB1*57* και *Ovar-DRB1*87*. Δώδεκα από τα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν σε συχνότητα μεγαλύτερη του 10%: στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι τα *Ovar-DRB1*84* με συχνότητα 26,14%, *Ovar-DRB1*85* με 36,36% και *Ovar-DRB1*56* με 15,91%, στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι τα *Ovar-DRB1*57* με 22,22%, *Ovar-DRB1*87* με 16,67%, *Ovar-DRB1*60* με 11,11% και *Ovar-DRB1*90* με 22,22%, στη φυλή Frizarta τα *Ovar-DRB1*62* με 15,79%, *Ovar-DRB1*64* με 21,05%, *Ovar-DRB1*67* με 15,79% και *Ovar-DRB1*71* με 13,16% και τέλος, στη φυλή Comisana το *Ovar-DRB1*73* με συχνότητα 10,00%. Υπήρχαν ωστόσο και σπάνια αλληλόμορφα και η αυθεντικότητά τους πιστοποιήθηκε από επαναλαμβανόμενες ενισχύσεις με PCR και κλωνοποίηση όπως πολλά αλληλόμορφα χαρακτηριστικά της φυλής Comisana. Ο αριθμός των αλληλομόρφων μέσα σε ένα πληθυσμό δεν αύξανε ανάλογα με το μέγεθος του δείγματος, όπως φαίνεται και από τους υπολογισμούς του αλληλομορφικού πλούτου, που μετράει τον αριθμό των αλληλομόρφων ανεξάρτητα από το μέγεθος του δείγματος. Για παράδειγμα, η υψηλότερη τιμή *Rs* καταγράφηκε για τη φυλή Comisana με 30 άτομα, ακολουθούν οι φυλές Frizarta και Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι με 19 και 9 άτομα αντίστοιχα ενώ η *Rs* τιμή της φυλής Μπούτσικα με λευκό κεφάλι με το μεγαλύτερο πληθυσμό ήταν η χαμηλότερη. Αυτό υποδεικνύει και σε αυτή την περίπτωση ότι για το *O. aries* και για το τμήμα DNA που

μελετήθηκε υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός αλληλομόρφων *DRB1* και ότι η δειγματοληψία μεγαλύτερου αριθμού ατόμων δε θα αύξανε τον αριθμό των αλληλομόρφων που παρατηρούνται σε μία ορισμένη φυλή.

Για το *DQA2* ο αριθμός των αλληλομόρφων ανά φυλή κυμαίνεται από 11 στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι έως 24 στη φυλή Frizarta και οι συχνότητες αυτών των αλληλομόρφων ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών (Πίνακας 51). Γενικά, σε όλους τους πληθυσμούς κάποια αλληλόμορφα π.χ. τα *Ovar-DQA2*31* και *Ovar-DQA2*34* στις φυλές Μπούτσικα με λευκό κεφάλι και Comisana ήταν σε αφθονία ενώ άλλα ανιχνεύτηκαν σε πολύ χαμηλές συχνότητες. Επιπλέον, τα περισσότερα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν μόνο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, όπως τα *Ovar-DQA2*02*, *Ovar-DQA2*13*, *Ovar-DQA2*14*, *Ovar-DQA2*15*, *Ovar-DQA2*17* και *Ovar-DQA2*44* στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι, τα *Ovar-DQA2*01*, *Ovar-DQA2*18*, *Ovar-DQA2*19*, *Ovar-DQA2*20*, *Ovar-DQA2*22*, *Ovar-DQA2*23* και *Ovar-DQA2*45* στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι, τα *Ovar-DQA2*03-12*, *Ovar-DQA2*21*, *Ovar-DQA2*27*, *Ovar-DQA2*28*, *Ovar-DQA2*29*, *Ovar-DQA2*32* και *Ovar-DQA2*33* στη φυλή Frizarta και τέλος, τα *Ovar-DQA2*24*, *Ovar-DQA2*25*, *Ovar-DQA2*26*, *Ovar-DQA2*30*, *Ovar-DQA2*40*, *Ovar-DQA2*41* και *Ovar-DQA2*46* στη φυλή Comisana. Δύο από τα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν και στις τέσσερις φυλές, τα *Ovar-DQA2*34* και *Ovar-DQA2*35*. Επτά από τα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν σε συχνότητα μεγαλύτερη του 10%: στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι τα *Ovar-DQA2*02* με συχνότητα 25,80%, *Ovar-DQA2*31* με 17,20% και *Ovar-DQA2*34* με 11,82% *Ovar-DQA2*43* με 27,95%, στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι τα *Ovar-DQA2*20* με 19,04% και *Ovar-DQA2*42* με 14,28% και τέλος, στη φυλή Comisana τα *Ovar-DQA2*34* και *Ovar-DQA2*39* με συχνότητα 10,00% και το *Ovar-DQA2*31* με συχνότητα 26,00%. Υπήρχαν ωστόσο και σπάνια αλληλόμορφα και η αυθεντικότητά τους πιστοποιήθηκε από επαναλαμβανόμενες ενισχύσεις με PCR και κλωνοποίηση όπως πολλά αλληλόμορφα χαρακτηριστικά της φυλής Frizarta. Επειδή στο *DQA2* παρατηρήθηκαν άτομα με τρία αλληλόμορφα, τα στατιστικά προγράμματα δε μπορούν να υπολογίσουν τις γενετικές παραμέτρους (είναι σχεδιασμένα μόνο για διπλοειδείς οργανισμούς) και για το λόγο αυτό δεν πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω αναλύσεις.

Πίνακας 50: Αλληλομορφικές συχνότητες του **DRB1** ανά φυλή. Δείχνονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε φυλή (N), τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L), ο αλληλομορφικός πλούτος (Rs), η αναμενόμενη (H exp) και παρατηρούμενη (H obs) ετεροζυγωτία

ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ	<i>Μπούτσικα Λευκό κεφάλι</i>	<i>Μπούτσικα Κόκκινο Κεφάλι</i>	<i>Frizarta</i>	<i>Comisana</i>
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ				
<i>Ovar-DRB1*55</i>	0,0227	0	0	0,05
<i>Ovar-DRB1*56</i>	0,1591	0	0	0
<i>Ovar-DRB1*57</i>	0,0114	0,2222	0,0526	0
<i>Ovar-DRB1*58</i>	0,0455	0	0	0
<i>Ovar-DRB1*59</i>	0,0114	0	0	0
<i>Ovar-DRB1*60</i>	0,0114	0,1111	0	0
<i>Ovar-DRB1*61</i>	0	0,0556	0	0
<i>Ovar-DRB1*62</i>	0	0,0556	0,1579	0
<i>Ovar-DRB1*63</i>	0	0,0556	0	0
<i>Ovar-DRB1*64</i>	0	0	0,2105	0
<i>Ovar-DRB1*65</i>	0	0	0,0263	0
<i>Ovar-DRB1*66</i>	0	0	0	0,0167
<i>Ovar-DRB1*67</i>	0	0	0,1579	0
<i>Ovar-DRB1*68</i>	0	0	0	0,0333
<i>Ovar-DRB1*69</i>	0	0	0,0526	0
<i>Ovar-DRB1*70</i>	0	0	0	0,0167
<i>Ovar-DRB1*71</i>	0	0	0,1316	0
<i>Ovar-DRB1*72</i>	0	0	0	0,0833
<i>Ovar-DRB1*73</i>	0	0	0	0,1
<i>Ovar-DRB1*74</i>	0	0	0	0,0333
<i>Ovar-DRB1*75</i>	0	0	0	0,0333
<i>Ovar-DRB1*76</i>	0	0	0	0,0167
<i>Ovar-DRB1*77</i>	0	0	0	0,0167
<i>Ovar-DRB1*78</i>	0	0	0	0,0167
<i>Ovar-DRB1*80</i>	0	0	0	0,05
<i>Ovar-DRB1*81</i>	0	0	0	0,0333
<i>Ovar-DRB1*82</i>	0	0	0	0,0167
<i>Ovar-DRB1*83</i>	0	0	0	0,0167
<i>Ovar-DRB1*84</i>	0,2614	0	0	0
<i>Ovar-DRB1*85</i>	0,3636	0	0	0
<i>Ovar-DRB1*86</i>	0,0227	0	0	0
<i>Ovar-DRB1*87</i>	0,0114	0,1667	0	0,0833
<i>Ovar-DRB1*88</i>	0,0455	0,0556	0	0
<i>Ovar-DRB1*89</i>	0,0341	0	0	0,05
<i>Ovar-DRB1*90</i>	0	0,2222	0	0
<i>Ovar-DRB1*91</i>	0,0114	0,0556	0	0
<i>Ovar-DRB1*92</i>	0	0	0,0263	0,05
<i>Ovar-DRB1*93</i>	0	0	0,0526	0,05
<i>Ovar-DRB1*94</i>	0	0	0,0263	0
<i>Ovar-DRB1*95</i>	0	0	0,0526	0
<i>Ovar-DRB1*96</i>	0	0	0,0526	0
<i>Ovar-DRB1*97</i>	0	0	0	0,0167
<i>Ovar-DRB1*98</i>	0	0	0	0,05
<i>Ovar-DRB1*99</i>	0	0	0	0,0167
<i>Ovar-DRB1*100</i>	0	0	0	0,0333
<i>Ovar-DRB1*101</i>	0	0	0	0,0167
<i>Ovar-DRB1*79</i>	0	0	0	0,1
<i>Ovar-DRB1*102</i>	0	0	0	0,0667
(N)	44	9	19	30
(L)	13	9	12	26
(Rs)	6,239	9,000	9,008	13,423
H exp.	0,7673	0,8457	0,8726	0,9472
H obs.	0,7273	0,8889	0,6316	0,8000

Πίνακας 51: Αλληλομορφικές συχνότητες του **DQA2** ανά φυλή. Δείχνονται ακόμη τα άτομα που εξετάστηκαν από κάθε φυλή (N) και τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν (L)

ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ	<i>Μπούτσικα Λευκό κεφάλι</i>	<i>Μπούτσικα Κόκκινο Κεφάλι</i>	<i>Frizarta</i>	<i>Comisana</i>
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ				
<i>Ovar-DQA2*01</i>	0	0,0476	0	0
<i>Ovar-DQA2*02</i>	0,2580	0	0	0
<i>Ovar-DQA2*03</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*04</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*05</i>	0	0	0,0285	0,0200
<i>Ovar-DQA2*06</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*07</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*08</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*09</i>	0	0	0,0857	0
<i>Ovar-DQA2*10</i>	0	0	0,0285	0,0200
<i>Ovar-DQA2*11</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*12</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*13</i>	0,0215	0	0	0
<i>Ovar-DQA2*14</i>	0,0215	0	0	0
<i>Ovar-DQA2*15</i>	0,0322	0	0	0
<i>Ovar-DQA2*16</i>	0	0	0,0285	0,0200
<i>Ovar-DQA2*17</i>	0,0107	0	0	0
<i>Ovar-DQA2*18</i>	0	0,0476	0	0
<i>Ovar-DQA2*19</i>	0	0,0476	0	0
<i>Ovar-DQA2*20</i>	0	0,1904	0	0
<i>Ovar-DQA2*21</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*22</i>	0	0,0476	0	0
<i>Ovar-DQA2*23</i>	0	0,0476	0	0
<i>Ovar-DQA2*24</i>	0	0	0	0,0400
<i>Ovar-DQA2*25</i>	0	0	0	0,0200
<i>Ovar-DQA2*26</i>	0	0	0	0,0800
<i>Ovar-DQA2*27</i>	0	0	0,0571	0
<i>Ovar-DQA2*28</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*29</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*30</i>	0	0	0	0,0200
<i>Ovar-DQA2*31</i>	0,1720	0	0,0857	0,2600
<i>Ovar-DQA2*32</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*33</i>	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*34</i>	0,1182	0,0476	0,0285	0,1000
<i>Ovar-DQA2*35</i>	0,0430	0,0476	0,0857	0,0600
<i>Ovar-DQA2*36</i>	0	0,0476	0,0571	0,0400
<i>Ovar-DQA2*37</i>	0	0,0476	0	0,0600
<i>Ovar-DQA2*38</i>	0	0,0952	0,0571	0,0200
<i>Ovar-DQA2*39</i>	0,0322	0,0476	0,0571	0,1000
<i>Ovar-DQA2*40</i>	0	0	0	0,0600
<i>Ovar-DQA2*41</i>	0	0	0	0,0400
<i>Ovar-DQA2*42</i>	0	0,1428	0	0,0200
<i>Ovar-DQA2*43</i>	0,2795	0	0,0571	0
<i>Ovar-DQA2*44</i>	0,0107	0	0	0
<i>Ovar-DQA2*45</i>	0	0,0952	0	0
<i>Ovar-DQA2*46</i>	0	0	0	0,0200
(N)	44	10	17	25
(L)	11	14	24	18

Πληθυσμιακή διαφοροποίηση

Η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των συγκεκριμένων πληθυσμών αποκαλύφθηκε με κατά ζεύγη συγκρίσεις των τιμών F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) και τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων (Nei, 1972). Από τις έξι κατά ζεύγη συγκρίσεις, αξιόλογη γενετική απόκλιση ανιχνεύτηκε και στις έξι για το *DRB1*.

Η ανάλυση έδειξε ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών προβάτων εξαρτάται κάθε φορά από το γονίδιο που μελετάται. Επιπλέον, για το *DRB1* δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς (Πίνακας 52).

Έτσι, πραγματοποιήθηκε ανάλυση AMOVA με τους πληθυσμούς των προβάτων να κατηγοριοποιούνται σε τρεις ή δύο κύριες ομάδες, σύμφωνα με τις περιοχές δειγματοληψίας τους: (i) στη φυλή Μπούτσικα (λευκό και κόκκινο κεφάλι), (ii) στη φυλή Comisana και (iii) στη φυλή Frizarta. Όταν η κατηγοριοποίηση περιλάμβανε δύο ομάδες συγκρίθηκαν όλοι οι εκπρόσωποι της φυλής Μπούτσικα (λευκό και κόκκινο κεφάλι Μπούτσικα, Comisana) με τη φυλή Frizarta. Και οι δύο συγκρίσεις έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση AMOVA για το *DRB1* (με τρεις ομάδες σύγκρισης) αποκάλυψε ότι 88,13% της παρατηρούμενης ποικιλότητας θεωρήθηκε ενδο-πληθυσμιακή διαφοροποίηση, 16,12% θεωρήθηκε δια-πληθυσμιακή διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών και -4,25% θεωρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών με συνολική τιμή F_{ST} 11,87% (Πίνακας 53).

Πίνακας 52: Κατά ζεύγη τιμές F_{ST} (επάνω) και γενετικές αποστάσεις (κάτω) για όλους τους πληθυσμούς στο *DRB1*

	<i>Μπούτσικα Κόκκινο Κεφάλι</i>	<i>Frizarta</i>	<i>Comisana</i>
<i>Μπούτσικα Λευκό κεφάλι</i>	0,16490	0,16598	0,12838
	3,139	5,663	3,376
<i>Μπούτσικα Κόκκινο Κεφάλι</i>		0,07737	0,05046
		1,924	1,871
<i>Frizarta</i>			0,06127
			3,034

Πίνακας 53: Αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης για το *O. aries*, χρησιμοποιώντας τις τέσσερις κύριες φυλές δειγματοληψίας (δηλ. μπούτσικα λ.κ., μπούτσικα κ.κ., Frizarta, Comisana) ως επίπεδα ομαδοποίησης ή χωρίς ομαδοποίηση για το **DRB1**. Το ποσοστό της ποικιλομορφίας, η πιθανότητα (P) υπολογισμένη από δοκιμασίες μετάθεσης (permutation tests) και το F statistics δίνονται για κάθε ιεραρχικό επίπεδο (Excoffier *et al.*, 1992). Οι ενδείξεις 3 (μπούτσικα, Comisana, Frizarta) και 2 (μπούτσικα-Comisana, Frizarta) κάτω από κάθε παράμετρο υποδεικνύουν τις ομάδες πληθυσμών

Πηγή της διακύμανσης	d.f.		Σύνολο τετραγώνων		Συνιστώσες Διακύμανσης		Ποσοστό ποικιλότητας	
	3	2	3	2	3	2	3	2
Μεταξύ ομάδων	1	1	4,002	3,047	-0,02064 Va	-0,00164 Va	-4,25	-0,33
Μεταξύ πληθυσμών στις ομάδες	1	2	2,769	6,771	0,07832 Vb	0,06172 Vb	16,12	12,55
Μέσα στους πληθυσμούς	163	200	69,789	86,368	0,42815 Vc	0,43184 Vc	88,13	87,79
Συνολικό	165	203	76,560	96,186	0,48584	0,49192		
Δείκτες καθήλωσης (συνολικές τιμές)								
FSC			FST			FCT		
3		2	3		2	3		2
0,15465		0,12505	0,11873		0,12214	-0,04249		-0,00333

Φυλογενετική ανακατασκευή των MHC-DRB1 και MHC-DQA2

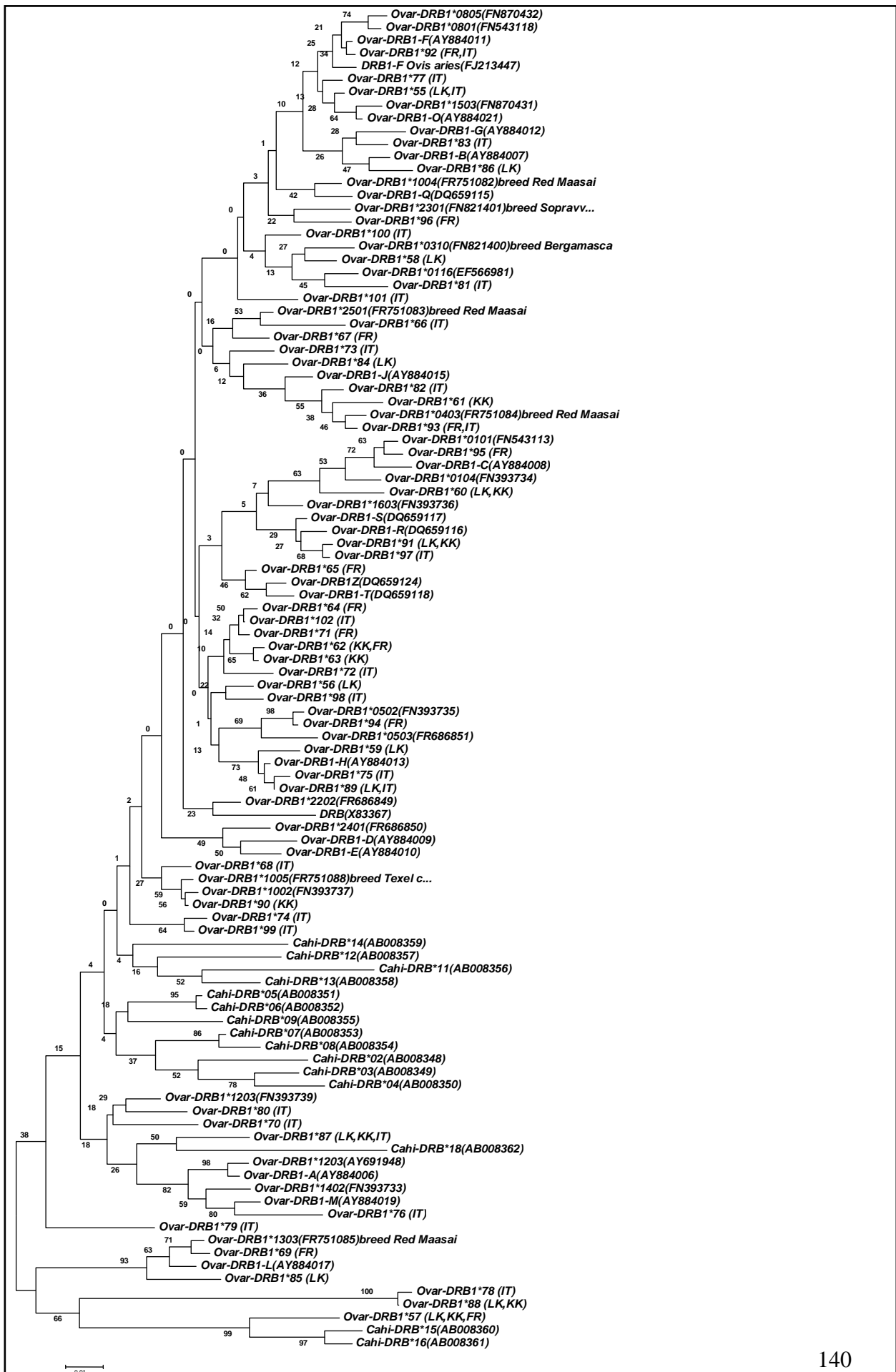
Ο αριθμός των κατά ζεύγη νουκλεοτιδικών διαφορών για το *DRB1* κυμαίνεται από 0,4% (*Ovar-DRB1*91* vs. *Ovar-DRB1*97*, *Ovar-DRB1*62* vs. *Ovar-DRB1*63*, *Ovar-DRB1*71* vs. *Ovar-DRB1*102*, *Ovar-DRB1*88* vs. *Ovar-DRB1*78*, *Ovar-DRB1*75* vs. *Ovar-DRB1*89* και *Ovar-DRB1*64* vs. *Ovar-DRB1*102*) έως 20,3% (*Ovar-DRB1*88* vs. *Ovar-DRB1*76*), και των κατά ζεύγη αμινοξικών διαφορών από 0% (*Ovar-DRB1*75* vs. *Ovar-DRB1*89*) έως 36,8% (*Ovar-DRB1*57* vs. *Ovar-DRB1*93* και *Ovar-DRB1*57* vs. *Ovar-DRB1*66*). Τα αλληλόμορφα *Ovar-DRB1*75* και *Ovar-DRB1*89* ήταν τα μόνα τα όποια έδιναν την ίδια αμινοξική αλληλουχία. Το *Ovar-DRB1*89* παρατηρήθηκε σε τρία ετερόζυγα άτομα της φυλής μπούτσικα με λευκό κεφάλι (0,0341 συχνότητα) και τρία ετερόζυγα άτομα της φυλής Comisana (0,0500 συχνότητα) ενώ το *Ovar-DRB1*75* βρέθηκε σε δύο ετερόζυγα άτομα της φυλής Comisana (0,0333 συχνότητα). Οι σχέσεις ανάμεσα (i) στα 48 αλληλόμορφα που ταυτοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, (ii) 40 *DRB1* αλληλόμορφα *O. aries* που έχουν ήδη δημοσιευτεί και (iii) αλληλουχίες *DRB1* αντιπροσώπων των *caprinae* από τη GenBank προσδιορίστηκαν με την κατασκευή ενός δέντρου neighbour-joining (Εικόνα 20), και ενός δέντρου UPGMA χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μέγιστης

πιθανοφάνειας (maximum composite likelihood). Και οι δύο προσεγγίσεις έδωσαν όμοια αποτελέσματα με συγκρίσιμες bootstrap τιμές. Οι αλληλουχίες από τη GenBank που χρησιμοποιήθηκαν για το φυλογενετικό δέντρο προέρχονται από *O. aries* (IDs: FR751088, FR751085, FR751084, FR751083, FR751082, FR686851, FR686850, FR686849, AY691948, FJ213447, FN870432, FN870431, FN821401, FN821400, AY884021, AY884019, AY884017, AY884015, AY884013, AY884012, AY884011, AY884009, AY884008, AY884007, AY884006, AY884010, FN543113, FN543118, FN393739, FN393736, FN393734, FN393737, FN393735, FN393733, DQ659124, DQ659118, DQ659117, DQ659116, DQ659115, EF566981 και X83367), και *Capra hircus* (IDs: AB008350-62).

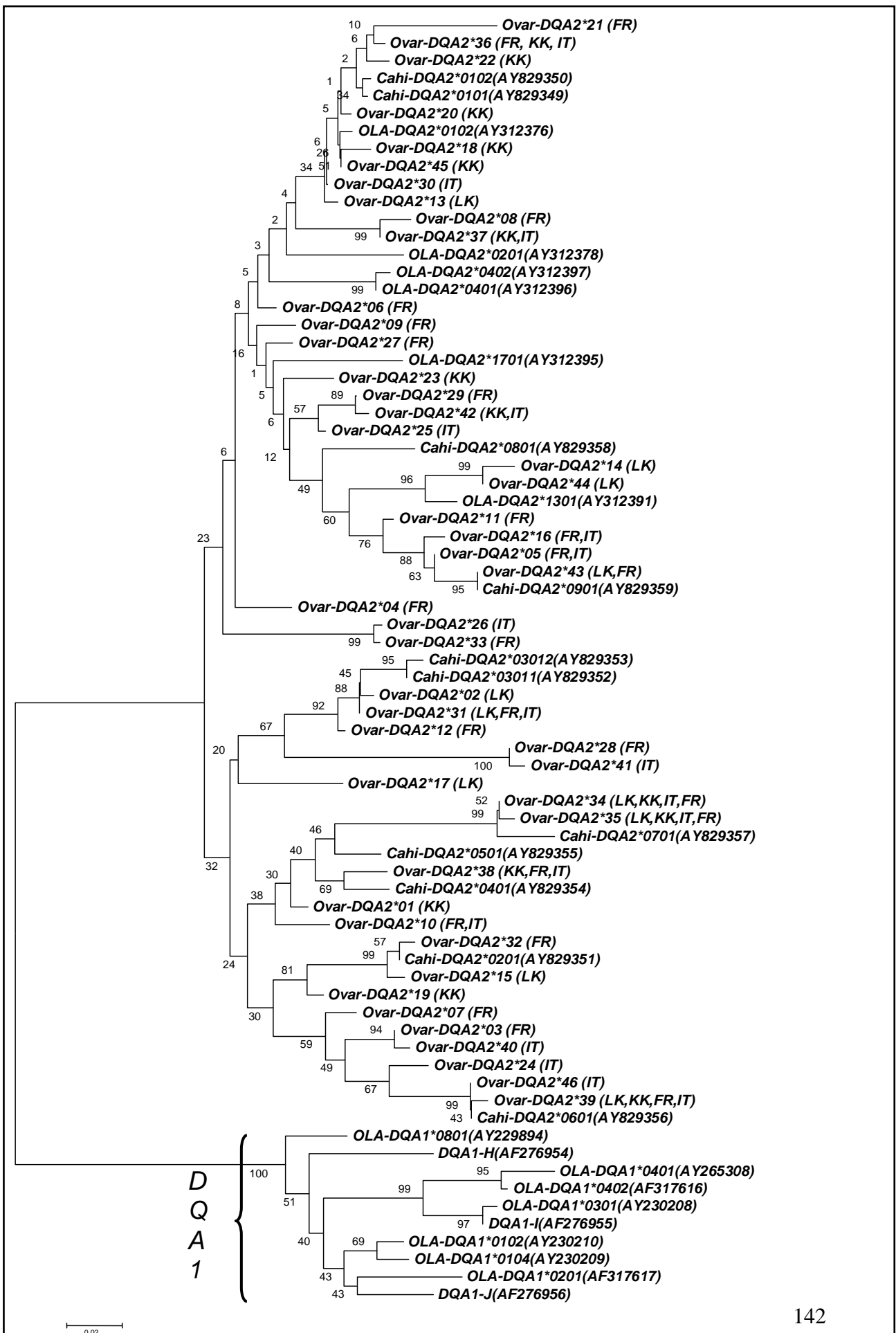
Για το *DQA2* ο αριθμός των κατά ζεύγη νουκλεοτιδικών διαφορών κυμαίνεται από 0,5% (*Ovar-DQA2*31* vs. *Ovar-DQA2*02*, *Ovar-DQA2*34* vs. *Ovar-DQA2*35*, *Ovar-DQA2*39* vs. *Ovar-DQA2*46*, *Ovar-DQA2*41* vs. *Ovar-DQA2*28*, *Ovar-DQA2*42* vs. *Ovar-DQA2*29*, *Ovar-DQA2*20* vs. *Ovar-DQA2*45* και *Ovar-DQA2*26* vs. *Ovar-DQA2*33*) έως 23% (*Ovar-DQA2*41* vs. *Ovar-DQA2*16* και *Ovar-DQA2*43* vs. *Ovar-DQA2*28*) και των κατά ζεύγη αμινοξικών διαφορών από 0% (*Ovar-DQA2*40* vs. *Ovar-DQA2*03* και *Ovar-DQA2*13* vs. *Ovar-DQA2*30*) έως 43% (*Ovar-DQA2*41* vs. *Ovar-DQA2*16*). Τα αλληλόμορφα *Ovar-DQA2*40* και *Ovar-DQA2*03* καθώς και τα *Ovar-DQA2*13* και *Ovar-DQA2*30* έδιναν την ίδια αμινοξική αλληλουχία. Στα αλληλόμορφα *Ovar-DQA2*14* και *Ovar-DQA2*44* λείπει μία τριπλέτα βάσεων με αποτέλεσμα την έλλειψη ενός αμινοξέος από το πρωτεϊνικό παράγωγο. Το αλληλόμορφο *Ovar-DQA2*14* βρέθηκε σε δύο ετερόζυγα άτομα της φυλής Μπούτσικα με λευκό κεφάλι και το *Ovar-DQA2*44* βρέθηκε σε ένα ετερόζυγο άτομο της ίδιας φυλής. Οι σχέσεις ανάμεσα (i) στα 46 αλληλόμορφα που ταυτοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, (ii) στα έξι διαφορετικά *DQA2* αλληλόμορφα *O. aries* που έχουν ήδη δημοσιευτεί (iii) αλληλουχίες *DQA2* αντιπροσώπων των *caprinae* από τη GenBank και (iv) δέκα αλληλουχιών *DQA1* από το *O. aries* προσδιορίστηκαν με την κατασκευή ενός δέντρου neighbour-joining (Εικόνα 21), και ενός δέντρου UPGMA χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum composite likelihood). Και οι δύο προσεγγίσεις έδωσαν όμοια αποτελέσματα με συγκρίσιμες τιμές bootstrap. Οι αλληλουχίες από τη GenBank που χρησιμοποιήθηκαν για το φυλογενετικό δέντρο προέρχονται από *O. aries DQA2* (IDs: AY312376, AY312378, AY312395, AY312391, AY312397, AY312396) από *O. aries DQA1*

(AY265308, AY230210, AY230209, AY230208, AY229894, AF317617, AF317616, AF276956, AF276955, AF276954), και *Capra hircus* (IDs: AY829349-59).

Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ξεκάθαρα ότι αλληλόμορφα που παρατηρούνται μόνο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς δεν ομαδοποιούνται μαζί, και δεν υπάρχει διαχωρισμός των αλληλομόρφων με βάση τη φυλή, π.χ. αλληλόμορφα της φυλής Comisana εξαπλώνονται σε όλο το neighbour-joining δέντρο. Αυτή η έλλειψη σήματος ήταν ακόμη πιο προφανής όταν αλληλουχίες από το εξόνιο 2 του *DQA2* και του *DRB1* από το *Capra hircus*, σχημάτιζαν κλαδιά με αλληλόμορφα του *O. aries*. Αυτή η συγγένεια των αλληλομόρφων μεταξύ απομακρυσμένων πληθυσμών και διαφορετικών ειδών είναι χαρακτηριστικό μερικών τόπων του MHC (Klein *et al.*, 1998), και πιστεύεται πως προκύπτει από την ισοζυγούσα επιλογή (Hughes *et al.*, 1996).



Εικόνα 20: Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των 48 αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του **DRB1** του *Ovis aries* (*Ovar-DRB1*55-102*) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη, μαζί με αλληλουχίες από τη GenBank. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό bootstrap υποστήριξης (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις, η φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (LK), η φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι (KK), η φυλή Frizarta (FR) και η φυλή Comisana (IT).



Εικόνα 21: Neighbour-joining φυλογενετικό δέντρο των 46 αλληλομόρφων του εξωνίου 2 του **DQA2** του *Ovis aries* (*Ovar-DQA2*01–46*) που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη, μαζί με αλληλουχίες από τη GenBank. Οι αριθμοί δείχνουν το ποσοστό bootstrap υποστήριξης (10.000 επαναληπτικά). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέγιστης μεικτής πιθανότητας και οι μονάδες μέτρησης είναι ο αριθμός αντικατεστημένων βάσεων ανά περιοχή. Οι πληθυσμοί στους οποίους υπάρχει το κάθε αλληλόμορφο δίνονται στις παρενθέσεις, η φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (LK), η φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι (KK), η φυλή Frizarta (FR) και η φυλή Comisana (IT).

Πρότυπα συνώνυμων και μη συνώνυμων υποκαταστάσεων

Η εξέταση των συνώνυμων vs. των μη συνώνυμων μεταλλάξεων μέσα στην κωδική περιοχή του PBR έδειξε ότι ο αριθμός των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων (d_N) ήταν πολύ υψηλότερος από τον αριθμό των συνώνυμων υποκαταστάσεων (d_S) ($d_N = 0,221 \pm 0,051$ vs. $d_S = 0,161 \pm 0,077$ για το *DQA2* και $d_N = 0,332 \pm 0,082$ vs. $d_S = 0,047 \pm 0,026$ για το *DRB1*) το οποίο αναμένεται για τα αλληλόμορφα του MHC που βρίσκονται κάτω από τη δράση ισοζυγούσας επιλογής. Αυτές οι διαφορές ευνοούν την υπόθεση της θετικής επιλογής με στατιστικά σημαντική τιμή P τιμή 0,000 για το *DRB1* και δείχνουν μία τάση για θετική επιλογή με τιμή P 0,265 για το *DQA2*. Ωστόσο, όταν η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τα κωδικόνια της μη-PBR, η αναλογία των συνώνυμων έναντι των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων αντιστρέφεται ($d_N = 0,098 \pm 0,015$ vs. $d_S = 0,136 \pm 0,031$) για το *DQA2* και παρατηρείται μία τάση προς την επιλογή καθαρισμού όπως έχει περιγραφεί και από τους Hughes & Nei, 1988 (Πίνακες 54 και 55). Για το *DRB1* μειώνεται αρκετά ο λόγος d_N/d_S ($d_N = 0,095 \pm 0,019$ vs. $d_S = 0,044 \pm 0,011$) αλλά παρατηρείται και πάλι στατιστικά σημαντική ένδειξη για θετική επιλογή με τιμή P 0,011.

Πίνακες 54, 55: Συνώνυμες (d_S) και μη συνώνυμες (d_N) υποκαταστάσεις ανά περιοχή (per site) και τα αποτελέσματα του Z-test για θετική επιλογή στα κωδικόνια της περιοχής πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR), των κωδικονίων εκτός PBR (non-PBR) και σε ολόκληρο το εξώνιο 2

<i>DQA2</i>	<i>n</i>	d_S	d_N	d_N/d_S	<i>P</i>
PBR	13	0,161(0,077)	0,221(0,051)	1,373	0,265*
Non-PBR	52	0,134(0,037)	0,072(0,014)	0,537	0,029**
Εξώνιο2	65	0,136(0,031)	0,098(0,015)	0,721	0,117**

<i>DRB1</i>	<i>n</i>	d_S	d_N	d_N/d_S	<i>P</i>
PBR	17	0,047(0,026)	0,332(0,082)	7,064	0,000*
Non-PBR	62	0,044(0,013)	0,043(0,011)	0,977	0,482**
Εξώνιο 2	79	0,044(0,011)	0,095(0,019)	2,159	0,011*

Τα κωδικόνια που αντιστοιχούν στον εκκινητή εξαιρέθηκαν της ανάλυσης. Το πιθανό σφάλμα υπολογίστηκε από τη μέθοδο bootstrap με 500 επαναληπτικά, και φαίνονται στις παρενθέσεις. Το *n* υποδεικνύει τον αριθμό των κωδικονίων σε κάθε κατηγορία. Η πιθανότητα (*P*) απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης της αυστηρής ουδετερότητας ($d_N = d_S$) υπέρ της εναλλακτικής υπόθεσης ($*d_N > d_S$) ή ($**d_N < d_S$).

Θύλακες δέσμευσης πεπτιδίου και υποκατάσταση αμινοξέως με αντικατάσταση φορτίου

Δεκαεννιά κατάλοιπα της β1 περιοχής συνεισφέρουν στο σχηματισμό των αντιγονικών θυλάκων (P1, P4, P6, P7 και P9 για τη DRβ αλυσίδα). Στα αλληλόμορφα *DRB1* που απομονώθηκαν υπάρχουν 17 από τα 19 κατάλοιπα. Για την αλυσίδα DRβ υπάρχουν επτά κατάλοιπα του P4, πέντε κατάλοιπα του P7, τρία του P9, δύο του P6 και δύο του P1. Εξαιτίας του μικρού αριθμού των καταλοίπων των θυλάκων P6 και P1 αυτοί δε αναλυθούν περαιτέρω για παραλλαγές αλλά θα ληφθούν υπ' όψιν για τη μελέτη της ποικιλομορφίας της PBR. Συνεπώς, οι θύλακες P4, P7 και P9 αναλύονται για παραλλαγές. Ο πιο πολυμορφικός φαίνεται να είναι ο P7 με 22 παραλλαγές (Πίνακας 57) ενώ ο P4 έχει 21 παραλλαγές (Πίνακας 56) και ο P9 έχει 11 παραλλαγές (Πίνακας 58). Κάθε αλληλόμορφο έφερε ένα συνδυασμό των παραλλαγών των P4, P7 και P9. Συνολικά, βρέθηκαν 39 διαφορετικοί συνδυασμοί. Δεν ανιχνεύθηκαν ενθέσεις ή διαγραφές το οποίο υποδεικνύει ότι όλες οι αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν μπορούν να σχηματίσουν λειτουργικά μόρια. Οι συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων για κάθε πληθυσμό υπολογίστηκαν ως το άθροισμα των συχνοτήτων όλων των αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό που φέρουν μία συγκεκριμένη παραλλαγή.

Εννέα από τις 21 παραλλαγές του P4 ήταν ειδικές για πληθυσμούς με πέντε από αυτές να υπάρχουν μόνο στη φυλή Comisana (SFDRKAY, SLEHKEV, SFDNTEY, KLESRAY και KFDQTEY), άλλες δύο στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (SFDRAAY και SYDRKAY) και άλλες δύο στη φυλή Frizarta (RFDRKNY και KFDRKAY). Η παραλλαγή SFDRREY υπήρχε σε όλους τους πληθυσμούς και ήταν η κυρίαρχη στις φυλές Comisana και Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι ενώ υπήρχε και σε μικρότερες συχνότητες στις φυλές Μπούτσικα με λευκό κεφάλι και Frizarta. Η φυλή Comisana είχε τις περισσότερες παραλλαγές (14), ωστόσο σε όλες τις φυλές παρατηρούνται κυρίαρχες παραλλαγές και κάποιες άλλες σε μικρότερες συχνότητες. Συγκεκριμένα, στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι κυρίαρχες ήταν οι SFDRKNY, SFDSRAY και SYDRKAY και στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι κυρίαρχες ήταν οι SFDRREY, KFDRRAY, GLHRKEV και SLDSRAY. Τέλος, στη φυλή Frizarta κυρίαρχες ήταν οι SYDRKNY, SFERKNY και SFDRKEY και στη φυλή Comisana οι SFDRREY, SFDRKNY, SFDRKEY και SLDSRAY. Οι υπόλοιπες παραλλαγές υπήρχαν στους πληθυσμούς σε χαμηλότερες συχνότητες.

Δέκα από τις 22 παραλλαγές του P7 ήταν ειδικές για πληθυσμούς με επτά από αυτές να υπάρχουν μόνο στη φυλή Comisana (DYWIT, DYWLT, DFWLK, DFWFT, DFWIK, EFWIR και DFWIR), άλλες δύο μόνο στη φυλή Frizarta (DFWFK και EYWLK) και μία στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (DYWIK). Η παραλλαγή DYWLK υπήρχε σε όλους τους πληθυσμούς και ήταν η κυρίαρχη στις φυλές Comisana και Frizarta ενώ υπήρχε σε υψηλές συχνότητες στις φυλές Μπούτσικα με λευκό κεφάλι και Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι.

Πέντε από τις 11 παραλλαγές του P9 ήταν ειδικές για πληθυσμούς με τέσσερις από αυτές να υπάρχουν μόνο στη φυλή Comisana (EYE, EYN, ENN, EFE) και μία στη φυλή Μπούτσικα κόκκινο κεφάλι (ETS). Η παραλλαγή EYD ήταν η μόνη που υπήρχε σε όλους τους πληθυσμούς και ήταν η κυρίαρχη σε τρεις πληθυσμούς με συχνότητες 0,5001 για τη φυλή Μπούτσικα κόκκινο κεφάλι, 0,5263 για τη φυλή Frizarta και 0,3000 για τη φυλή Comisana ενώ στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι ήταν η δεύτερη σε συχνότητα παραλλαγή με 0,3297.

Κάθε αλληλόμορφο έφερε ένα συγκεκριμένο συνδυασμό από P4, P7 και P9 παραλλαγές. Τριάντα εννέα διαφορετικοί συνδυασμοί παραλλαγών ανιχνεύτηκαν στα 48 αλληλόμορφα που απομονώθηκαν. Οι περισσότεροι συνδυασμοί παραλλαγών ήταν μοναδικοί για το αλληλόμορφο που ανιχνεύτηκαν. Ωστόσο, πέντε συγκεκριμένοι συνδυασμοί παραλλαγών υπήρχαν σε δύο έως και τέσσερα αλληλόμορφα (Πίνακας 59). Ο συνδυασμός SYDRKNY/DYWLK/EYD υπήρχε στα αλληλόμορφα *Ovar-DRB1*62, 64, 71 και 102* και ήταν ο κυρίαρχος στη φυλή Frizarta με 0,5000 ενώ απουσιάζει εντελώς από τη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι και υπήρχε σε χαμηλές συχνότητες στις φυλές Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι (0,0556) και Comisana (0,0667). Οι υπόλοιποι συνδυασμοί υπάρχουν σε μικρές συχνότητες στις φυλές που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός SFDRREY/DFWIR/EYE υπήρχε στα αλληλόμορφα *Ovar-DRB*74 και 99* στη φυλή Comisana σε συχνότητα 0,0500. Τα αλληλόμορφα *Ovar-DRB*55, 92 και 77* φέρουν το συνδυασμό SFDRREY/DFWIR/EYS και παρατηρούνται στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι σε συχνότητα 0,0227, στη φυλή Frizarta σε συχνότητα 0,0263 και στη φυλή Comisana σε συχνότητα 0,0667. Ο συνδυασμός SFERKNY/EYWFK/EYD υπήρχε στα αλληλόμορφα *Ovar-DRB*89, 59 και 75* και μόνο στις φυλές Μπούτσικα με λευκό κεφάλι με συχνότητα 0,0455 και Comisana με συχνότητα 0,0833. Τέλος, ο συνδυασμός SFDRKNY/DYWLK/EYD υπήρχε στα αλληλόμορφα *Ovar-DRB1*63 και 72* και παρατηρούνται στις φυλές Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι με συχνότητα

0,0556 και στη φυλή Comisana με συχνότητα 0,0833. Ο κυρίαρχος συνδυασμός στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι ήταν ο SFDSRAY/DFWFR/END του αλληλομόρφου *Ovar-DRB1*85* με συχνότητα 0,3636. Οι κυρίαρχοι συνδυασμοί στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι ήταν οι SFDRREY/DYWIR/EYD (*Ovar-DRB1*90*) και GLHRKEV/HFWIK/ETD (*Ovar-DRB1*57*) με συχνότητα 0,2222. Τέλος, στη φυλή Comisana ο κυρίαρχος συνδυασμός ήταν ο SFDRREY/DFWLR/EYS των αλληλομόρφων *Ovar-DRB1*55*, 77 και 92 με συχνότητα 0,1167. Οι συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων σε κάθε περιοχή υπολογίστηκαν ως η μέση συχνότητα της κάθε παραλλαγής μεταξύ των πληθυσμών που ομαδοποιούνταν σε κάθε φυλή. Ακόμη, σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκαν κοινές παραλλαγές μεταξύ όλων των φυλών.

Δεκαέξι κατάλοιπα της περιοχής DQA συμμετέχουν στο σχηματισμό των θυλάκων δέσμευσης του αντιγόνου P1, P6 και P9 (κατάλοιπα της PBR, Bondinas *et al.*, 2007). Δεκατρία από αυτά τα κατάλοιπα κωδικοποιούνται από το PCR προϊόν που αποκτήθηκε από τη μελέτη. Δώδεκα από αυτά τα κατάλοιπα ήταν πολυμορφικά. Ο P9 έδειξε το μεγαλύτερο πολυμορφισμό με 14 συνολικά παραλλαγές. Κάθε αλληλόμορφο έφερε ένα συνδυασμό των παραλλαγών των P1, P6 και P9. Συνολικά, βρέθηκαν 32 διαφορετικοί συνδυασμοί. Δεν ανιχνεύτηκαν ενθέσεις αλλά στις αλληλουχίες *Ovar-DQA2*14* και 44 λείπει το κατάλοιπο 52, το οποίο συμμετέχει στο σχηματισμό του P1. Ανάμεσα στα αλληλόμορφα που απομονώθηκαν οι μη συνώνυμες υποκαταστάσεις στην PBR παρήγαγαν διαφορετικούς αριθμούς παραλλαγών των P1, P6 και P9. Δέκα παραλλαγές ανιχνεύτηκαν για τον P1, 13 για τον P6 και 14 για τον P9 (Πίνακας 60). Οι συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων για κάθε πληθυσμό υπολογίστηκαν ως το άθροισμα των συχνοτήτων όλων των αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό που φέρουν μία συγκεκριμένη παραλλαγή.

Δύο από τις 10 παραλλαγές για τον P1 ήταν μοναδικές, μία από τις οποίες υπήρχε στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι (HLLWP) και άλλη μία στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (HQLW-). Η τελευταία παραλλαγή παρουσιάζει μία διαγραφή σε ένα αμινοξύ που είναι πιθανό να συνεισφέρει σε ένα αρκετά διαφορετικό σχηματισμό της PBR. Τρεις παραλλαγές υπήρχαν σε όλους τους πληθυσμούς (QLFWA, QLLWA και HLFWT). Η παραλλαγή QLFWA είναι η κυρίαρχη στις φυλές Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (0,4729) και Comisana (0,48) και η παραλλαγή HLFWT είναι η κυρίαρχη στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι (0,5712). Τέλος, στη φυλή Frizarta η κυρίαρχη παραλλαγή είναι η HLFWA (0,2283).

Πέντε από τις 13 παραλλαγές για τον P6 ήταν μοναδικές με μία από αυτές, η ESAN να υπάρχει σε υψηλή συχνότητα στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (0,258), μία στη φυλή Comisana (QTSN) σε συχνότητα 0,04, μία στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι (KKAT) σε συχνότητα 0,0476 και δύο στη φυλή Frizarta (QTAN και DTAN) και οι δύο σε συχνότητα 0,0285. Η παραλλαγή NIAN ήταν η κυρίαρχη στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι και η δεύτερη σε συχνότητα στη φυλή Frizarta με συχνότητες 0,3117 και 0,2282 αντίστοιχα. Στη φυλή Frizarta η κυρίαρχη παραλλαγή ήταν η NTAN (0,2568). Στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι η κυρίαρχη παραλλαγή είναι η NIAN (0,1904) και ακολουθείται από τις ETAN και NTAN (0,1428). Τέλος, στη φυλή Comisana η μεγαλύτερη σε συχνότητα παραλλαγή είναι η ETAN (0,28) και ακολουθούν η NTAN και NAAN σε λίγο μικρότερες συχνότητες.

Πέντε από τις 14 παραλλαγές για τον P9 ήταν μοναδικές με μία από αυτές, να υπάρχει στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (HNRLW), μία στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι (HTILR), μία στη φυλή Comisana (HNIMC) και δύο στη φυλή Frizarta (HNILC και QTILR). Όλες οι παραπάνω παραλλαγές παρατηρήθηκαν σε σχετικά μικρές συχνότητες που κυμαίνονται από 0,0285-0,08. Η κυρίαρχη παραλλαγή για τη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι είναι η QNILR (0,43) και είναι η δεύτερη σε συχνότητα παραλλαγή στη φυλή Comisana αλλά απουσιάζει εντελώς από τη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι. Στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι οι κυρίαρχες παραλλαγές είναι οι HNILR και HTIMR (0,238) με την πρώτη να υπάρχει σε υψηλές συχνότητες σε όλες τις φυλές ενώ η δεύτερη απουσιάζει από τις υπόλοιπες φυλές προβάτων. Στη φυλή Frizarta η κυρίαρχη παραλλαγή είναι η HNILR και παρουσιάζεται στα μισά σχεδόν αλληλόμορφα που υπάρχουν στη φυλή αυτή (0,485) ενώ η συγκεκριμένη παραλλαγή είναι η κυρίαρχη και στη φυλή Comisana (0,3).

Κάθε αλληλόμορφο έφερε ένα συγκεκριμένο συνδυασμό από P1, P6 και P9 παραλλαγές. Τριάντα δύο διαφορετικοί συνδυασμοί παραλλαγών ανιχνεύτηκαν στα 46 αλληλόμορφα που απομονώθηκαν. Οι περισσότεροι συνδυασμοί παραλλαγών ήταν μοναδικοί για το αλληλόμορφο που ανιχνεύτηκαν. Ωστόσο, εννέα συγκεκριμένοι συνδυασμοί παραλλαγών υπήρχαν σε δύο έως και πέντε αλληλόμορφα (Πίνακας 61). Ο συνδυασμός QLFWA/NAAN/HNILR υπήρχε στα αλληλόμορφα *Ovar-DQA2*39, 40, 24, 46* και *3* και υπήρχε σε πιο υψηλή συχνότητα στη φυλή Comisana (0,22) αλλά και σε μικρότερες συχνότητες στις υπόλοιπες φυλές (0,0322 στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι, 0,0476 στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο

κεφάλι και 0,0856 στη φυλή Frizarta). Ο συνδυασμός HQLW-/NIAN/HNRLW υπήρχε σε χαμηλή συχνότητα μόνο στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι και εξαιτίας της έλλειψης αμινοξέως στην P1 είναι πιθανό να έχει αρκετά διαφορετική διαμόρφωση της PBR. Ο συνδυασμός HLLWT/NIAN/HNILR στα αλληλόμορφα *Ovar-DQA2*23* και *27* υπήρχε σε συχνότητα 0,0476 στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι και 0,0571 στη φυλή Frizarta. Ο συνδυασμός HQLWT/NIAN/HNILR των αλληλομόρφων *Ovar-DQA2*11* και *16* υπήρχε σε συχνότητα 0,057 στη φυλή Frizarta και σε συχνότητα 0,02 στη φυλή Comisana. Ο συνδυασμός HLLWT/NTEN/HNIMR υπήρχε στα *Ovar-DQA2*08* και *37* σε συχνότητα 0,0476 στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι, 0,0285 στη φυλή Frizarta και 0,06 στη φυλή Comisana. Τα αλληλόμορφα *Ovar-DQA2*15* και *32* έφεραν το συνδυασμό QLLWA/NTAT/DTILR και υπήρχαν σε συχνότητα 0,0322 στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι και 0,0285 στη φυλή Frizarta. Ο συνδυασμός HLFWT/ETAN/HNIMR υπήρχε σε τέσσερα αλληλόμορφα, στα *Ovar-DQA2*13*, *18*, *45* και *30* και υπήρχε στις φυλές Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (0,0215), στη φυλή Frizarta (0,1428) και στη φυλή Comisana (0,02). Ο συνδυασμός HLFWT/NIAN/HNILR των αλληλομόρφων *Ovar-DQA2*12* και *29* υπήρχε στις φυλές Μπούτσικα κόκκινο κεφάλι (0,1428), στη φυλή Frizarta (0,0285) και στη φυλή Comisana (0,02). Τέλος, ο συνδυασμός HLFWA/NTAN/HNIMW των αλληλομόρφων *Ovar-DQA2*01* και *38* υπάρχει στις φυλές Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι (0,1428) και Comisana (0,02). Στη φυλή Μπούτσικα με λευκό κεφάλι ο κυρίαρχος συνδυασμός ήταν ο HEFWR/NIAN/HNILR με συχνότητα 0,2795 του αλληλομόρφου *Ovar-DRB1*43*. Στη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι ο κυρίαρχος συνδυασμός ήταν ο HLFWT/ETAT/HTIMR του αλληλομόρφου *Ovar-DRB1*20* με συχνότητα 0,1904. Ο συνδυασμός QLFWA/ETAN/QNILR (*Ovar-DRB1*31*) ήταν ο κυρίαρχος στις φυλές Frizarta και Comisana με συχνότητες 0,0857 και 0,26 αντίστοιχα ενώ στη φυλή Frizarta και ο συνδυασμός QLLWA/NTEN/HNVMW (*Ovar-DRB1*35*) υπήρχε στην ίδια συχνότητα. Οι συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων σε κάθε περιοχή υπολογίστηκαν ως η μέση συχνότητα της κάθε παραλλαγής μεταξύ των πληθυσμών που ομαδοποιούνταν σε κάθε φυλή. Ακόμη, σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκαν κοινές παραλλαγές μεταξύ όλων των φυλών.

Πίνακας 56: Συχνότητες των παραλλαγών του θύλακα 4 του γονιδίου **DRB1** που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό

	Μπούτσικα Λευκό Κεφάλι	Μπούτσικα Κόκκινο Κεφάλι	Frizarta	Comisana
<i>Παραλλαγές θύλακα 4 (P4)</i>				
SFDRREY	0,0682	0,2222	0,0263	0,3000
SYDRKNY	0	0,0556	0,5000	0,0834
SFDRKNY	0,1591	0,0556	0	0,1333
SFERKNY	0,0455	0	0,0789	0,0833
SYDQTEY	0	0,0556	0,0526	0,0667
SFDRKEY	0	0	0,1579	0,1000
KFDRAAY	0,0114	0,1111	0,0526	0
SFDSRAY	0,3636	0	0	0,0167
KFDRREY	0,0114	0,0556	0	0,0167
SFDRAAY	0,0227	0	0	0
GLHRKEV	0,0114	0,2222	0,0526	0
SLDSRAY	0,0114	0,1667	0	0,0833
SLEQKEV	0,0455	0,0556	0	0
SYDRKAY	0,2614	0	0	0
RFDRKNY	0	0	0,0263	0
SFDRKAY	0	0	0	0,0167
KFDRKAY	0	0	0,0526	0
SLEHKEV	0	0	0	0,0167
SFDNTEY	0	0	0	0,0333
KFDQTEY	0	0	0	0,0333
KLESRAY	0	0	0	0,0167

Πίνακας 57: Συχνότητες των παραλλαγών του θύλακα 7 του γονιδίου **DRB1** που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό

	Μπούτσικα Λευκό Κεφάλι	Μπούτσικα Κόκκινο Κεφάλι	Frizarta	Comisana
<i>Παραλλαγές θύλακα 7 (P7)</i>				
DFWFR	0,375	0,1667	0	0,1
DFWLR	0,0227	0	0,0263	0,1167
DYWLK	0,1591	0,1112	0,5263	0,1667
DYWIR	0,0114	0,2778	0	0,0333
DYWFT	0	0,0556	0,0526	0,05
DYWLR	0,0455	0	0	0,0667
EYWFK	0,0455	0	0,0526	0,0833
DFWIR	0	0	0	0,1
DYWFK	0	0	0,1579	0,05
DFWFA	0,0227	0	0,0526	0
EFWIK	0,0455	0,0556	0	0,0167
DYWIK	0,2614	0	0	0
HFWIK	0,0114	0,2222	0,0526	0
DFWLA	0,0114	0,1111	0	0
EYWLK	0	0	0,0263	0
DFWFK	0	0	0,0526	0
DFWLK	0	0	0	0,1
DFWFT	0	0	0	0,0333
DYWIT	0	0	0	0,0333
DYWLT	0	0	0	0,0167
DFWIK	0	0	0	0,0167
EFWIR	0	0	0	0,0167

Πίνακας 58: Συχνότητες των παραλλαγών του θύλακα 9 του γονιδίου **DRB1** που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό

	Μπούτσικα Λευκό Κεφάλι	Μπούτσικα Κόκκινο Κεφάλι	Frizarta	Comisana
Παραλλαγές θύλακα 9 (P9)				
EYD	0,3297	0,5001	0,5263	0,3
EYS	0,0909	0	0,1315	0,2668
END	0,5227	0	0,2105	0,0833
ETD	0,0114	0,2222	0,1315	0
EFD	0,0114	0,1667	0	0,1
EFA	0,0455	0,0556	0	0,0167
EYE	0	0	0	0,05
ETS	0	0,0556	0	0
EYN	0	0	0	0,1
ENN	0	0	0	0,1
EFE	0	0	0	0,05

Πίνακας 59: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά φυλή για το γονίδιο **DRB1**

Αλληλόμορφα	P4	P7	P9	Μπούτσικα Λευκό κεφάλι	Μπούτσικα Κόκκινο κεφάλι	Frizarta	Comisana
Ovar-DRB1*62, 64, 71, 102	SYDRKNY	DYWLK	EYD	0	0,0556	0,5	0,0667
Ovar-DRB1*74, 99	SFDRREY	DFWIR	EYE	0	0	0	0,05
Ovar-DRB1*55, 77, 92	SFDRREY	DFWLR	EYS	0,0227	0	0,0263	0,1167
Ovar-DRB1*59,75, 89	SFERKNY	EYWFK	EYD	0,0455	0	0	0,0833
Ovar-DRB1*63, 72	SFDRKNY	DYWLK	EYD	0	0,0556	0	0,0833
Ovar-DRB1*76	KLESRAY	EFWIR	EYS	0	0	0	0,0167
Ovar-DRB1*80	SFDRREY	DFWIR	EFE	0	0	0	0,05
Ovar-DRB1*100	SFDRREY	DYWLR	EYD	0	0	0	0,0333
Ovar-DRB1*101	SYDRKNY	DYWLK	EYS	0	0	0	0,0167
Ovar-DRB1*98	SFDRKNY	DYWFK	END	0	0	0	0,05
Ovar-DRB1*56	SFDRKNY	DYWLK	END	0,1591	0	0	0
Ovar-DRB1*96	SFERKNY	EYWFK	EYS	0	0	0,0526	0
Ovar-DRB1*94	SFERKNY	EYWLK	ETD	0	0	0,0263	0
Ovar-DRB1*68	SFDRREY	DYWIR	END	0	0	0	0,0333
Ovar-DRB1*66	SFDRREY	DYWLR	EFD	0	0	0	0,0167
Ovar-DRB1*90	SFDRREY	DYWIR	EYD	0	0,2222	0	0
Ovar-DRB1*58	SFDRREY	DYWLR	EYS	0,0455	0	0	0
Ovar-DRB1*61	SYDQTEY	DYWFT	ETS	0	0,0556	0	0
Ovar-DRB1*93	SYDQTEY	DYWFT	EYS	0	0	0,0526	0,05
Ovar-DRB1*82	SYDQTEY	DYWLT	EYS	0	0	0	0,0167
Ovar-DRB1*67	SFDRKEY	DYWFK	END	0	0	0,1579	0
Ovar-DRB1*73	SFDRKEY	DFWLK	EYN	0	0	0	0,1
Ovar-DRB1*60	KFDRAAY	DFWLA	EYD	0,0114	0,1111	0	0
Ovar-DRB1*95	KFDRAAY	DFWFA	ETD	0	0	0,0526	0
Ovar-DRB1*85	SFDSRAY	DFWFR	END	0,3636	0	0	0
Ovar-DRB1*70	SFDSRAY	DFWFR	EYD	0	0	0	0,0167
Ovar-DRB1*91	KFDRREY	DYWIR	EYD	0,0114	0,0556	0	0
Ovar-DRB1*97	KFDRREY	DYWLR	EYD	0	0	0	0,0167
Ovar-DRB1*86	SFDRAAY	DFWFA	EYS	0,0227	0	0	0
Ovar-DRB1*57	GLHRKEV	HFWIK	ETD	0,0114	0,2222	0,0526	0
Ovar-DRB1*87	SLDSRAY	DFWFR	EFD	0,0114	0,1667	0	0,0833
Ovar-DRB1*88	SLEQKEV	EFWIK	EFA	0,0455	0,0556	0	0
Ovar-DRB1*84	SYDRKAY	DYWIK	EYD	0,2614	0	0	0
Ovar-DRB1*65	RFDKKNY	DYWLK	EYD	0	0	0,0263	0
Ovar-DRB1*83	SFDRKAY	DFWIK	EYS	0	0	0	0,0167
Ovar-DRB1*69	KFDRKAY	DFWFK	END	0	0	0,0526	0
Ovar-DRB1*78	SLEHKEV	EFWIK	EFA	0	0	0	0,0167
Ovar-DRB1*79	SFDNTEY	DFWFT	ENN	0	0	0	0,1
Ovar-DRB1*81	KFDQTEY	DYWIT	EYS	0	0	0	0,0333

Πίνακας 60: Συχνότητες των παραλλαγών των θυλάκων του γονιδίου **DQA2** που παρατηρήθηκαν ανά πληθυσμό

	Μπούτσικα Λευκό Κεφάλι	Μπούτσικα Κόκκινο Κεφάλι	Frizarta	Comisana
Παραλλαγές θύλακα 1 (P1)				
QLFWA	0,4729	0,0476	0,1998	0,48
QLLWA	0,1934	0,0952	0,1712	0,16
HLFWT	0,0215	0,5712	0,1426	0,1
HLLWT	0	0,0952	0,1141	0,14
HLFWA	0	0,1428	0,2283	0,08
HQLW-	0,0322	0	0	0
HQLWT	0	0	0,057	0,02
HEFWR	0,2795	0	0,0571	0
HLLWP	0	0,0476	0	0
HQFWT	0	0	0,0285	0,02
Παραλλαγές θύλακα 6 (P6)				
ETAN	0,1935	0,1428	0,1142	0,28
NIAN	0,3117	0,1904	0,2282	0,06
NTAN	0,1289	0,1428	0,2568	0,24
NAAN	0,0322	0,0476	0,1141	0,22
NTEN	0,043	0,0952	0,1142	0,12
NTAT	0,0322	0,0476	0,0285	0
ETAT	0	0,1904	0,0285	0
ESAN	0,258	0	0	0
EKAT	0	0,0476	0,0571	0,04
QTSN	0	0	0	0,04
KKAT	0	0,0476	0	0
QTAN	0	0	0,0285	0
DTAN	0	0	0,0285	0
Παραλλαγές θύλακα 9 (P9)				
QNILR	0,43	0	0,0857	0,26
HNILR	0,3224	0,238	0,485	0,3
HNVMW	0,1612	0,0952	0,1142	0,16
HNIMR	0,0215	0,1904	0,0855	0,1
HNIMW	0	0,1428	0,0571	0,02
HTIMR	0	0,238	0	0
HNRLW	0,0322	0	0	0
HNVMH	0	0	0,0285	0,04
QTIMR	0	0,0476	0,0571	0,04
DTILR	0,0322	0	0,0285	0
HTILR	0	0,0476	0	0
HNIMC	0	0	0	0,08
HNILC	0	0	0,0285	0
QTILR	0	0	0,0285	0

Πίνακας 61: Συχνότητες των παραλλαγών των συνδυασμών των θυλάκων που παρατηρήθηκαν ανά φυλή για το γονίδιο **DQA2**

Αλληλόμορφα	P1	P6	P9	Μπούτσικα Λευκό κεφάλι	Μπούτσικα Κόκκινο κεφάλι	Frizarta	Comisana
<i>Ovar-DQA2*13, 18, 30, 45</i>	HLFWT	ETAN	HNIMR	0,0215	0,1428	0	0,02
<i>Ovar-DQA2*3, 24, 39, 40, 46</i>	QLFWA	NAAN	HNILR	0,0322	0,0476	0,0856	0,22
<i>Ovar-DQA2*14, 44</i>	HQLWX	NIAN	HNRLW	0,0322	0	0	0
<i>Ovar-DQA2*42, 29</i>	HLFWT	NIAN	HNILR	0	0,1428	0,0285	0,02
<i>Ovar-DQA2*1, 38</i>	HLFWA	NTAN	HNIMW	0	0,1428	0,0571	0,02
<i>Ovar-DQA2*23, 27</i>	HLLWT	NIAN	HNILR	0	0,0476	0,0571	0
<i>Ovar-DQA2*11, 16</i>	HQLWT	NIAN	HNILR	0	0	0,057	0,02
<i>Ovar-DQA2*8, 37</i>	HLLWT	NTEN	HNIMR	0	0,0476	0,0285	0,06
<i>Ovar-DQA2*15, 32</i>	QLLWA	NTAT	DTILR	0,0322	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*31</i>	QLFWA	ETAN	QNILR	0,172	0	0,0857	0,26
<i>Ovar-DQA2*02</i>	QLFWA	ESAN	QNILR	0,258	0	0	0
<i>Ovar-DQA2*43</i>	HEFWR	NIAN	HNILR	0,2795	0	0,0571	0
<i>Ovar-DQA2*34</i>	QLLWA	NTAN	HNVMW	0,1182	0,0476	0,0285	0,1
<i>Ovar-DQA2*35</i>	QLLWA	NTEN	HNVMW	0,043	0,0476	0,0857	0,06
<i>Ovar-DQA2*36</i>	HLFWT	EKAT	QTIMR	0	0,0476	0,0571	0,04
<i>Ovar-DQA2*41</i>	HLFWA	QTSN	HNVMH	0	0	0	0,04
<i>Ovar-DQA2*17</i>	QLFWA	NTAN	HNILR	0,0107	0	0	0
<i>Ovar-DQA2*19</i>	HLLWP	NTAT	HTILR	0	0,0476	0	0
<i>Ovar-DQA2*20</i>	HLFWT	ETAT	HTIMR	0	0,1904	0	0
<i>Ovar-DQA2*22</i>	HLFWT	KKAT	HTIMR	0	0,0476	0	0
<i>Ovar-DQA2*25</i>	HLFWT	NTAN	HNILR	0	0	0	0,02
<i>Ovar-DQA2*26</i>	HLLWT	NTAN	HNIMC	0	0	0	0,08
<i>Ovar-DQA2*28</i>	HLFWA	QTAN	HNVMH	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*33</i>	HLLWT	NTAN	HNILC	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*4</i>	HLFWT	NTAN	HNIMR	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*5</i>	HQFWT	NIAN	HNILR	0	0	0,0285	0,02
<i>Ovar-DQA2*6</i>	HLFWT	DTAN	HNILR	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*7</i>	QLLWA	NAAN	HNILR	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*9</i>	HLFWA	NTAN	HNILR	0	0	0,0857	0
<i>Ovar-DQA2*10</i>	HLFWA	NTAN	HNIMR	0	0	0,0285	0,02
<i>Ovar-DQA2*12</i>	QLFWA	ETAN	HNILR	0	0	0,0285	0
<i>Ovar-DQA2*21</i>	HLFWA	ETAT	QTILR	0	0	0,0285	0

Οι αμινοξικές αλλαγές πιθανόν να δείχνουν λειτουργικές διαφορές εάν υπάρχουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου στην PBR. Για την αλυσίδα DQa οχτώ από τα 13 κατάλοιπα της PBR φαίνεται να έχουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου. Δύο ουδέτερα κατάλοιπα (Gln και Leu) αντικαθίστανται από ένα αρνητικό (Glu) στη θέση 31. Το κατάλοιπο 52 έχει τέσσερα εναλλακτικά κατάλοιπα τρία από τα οποία είναι ουδέτερα (Ala, Thr και Pro) και ένα είναι θετικό (Arg). Στο κατάλοιπο 62 υπάρχουν δύο αρνητικά αμινοξέα (Glu και Asp), δύο ουδέτερα (Asn και Gln) και ένα θετικό (Lys). Στο κατάλοιπο 65 υπάρχουν πέντε εναλλακτικά αμινοξέα με τέσσερα από αυτά να είναι ουδέτερα (Ala, Ile, Ser, Thr) και ένα θετικό (Lys). Τέλος, στο κατάλοιπο 66 υπάρχουν δύο ουδέτερα (Ala και Ser) και ένα αρνητικό αμινοξύ (Glu), στο κατάλοιπο 68 υπάρχει ένα αρνητικό (Asp) και δύο ουδέτερα αμινοξέα (Gln και His), στο κατάλοιπο 72 υπάρχουν τρία ουδέτερα αμινοξέα (Ile, Val και Tyr) και ένα θετικό (Arg) ενώ στο κατάλοιπο 76 υπάρχει ένα θετικό (Arg) και τρία ουδέτερα αμινοξέα (Trp, His και Cys).

Για την αλυσίδα DRβ επτά από τα 17 κατάλοιπα εμφανίζουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου. Στο κατάλοιπο 11 υπάρχουν οκτώ ουδέτερα (Ser, His, Ala, Thr, Cys, Pro, Asn και Tyr) αμινοξέα και ένα θετικό (Arg) ενώ στο κατάλοιπο 13 υπάρχουν δύο ουδέτερα (Ser και Gly) και δύο θετικά (Arg και Lys) αμινοξέα. Στο κατάλοιπο 28 υπάρχει ένα ουδέτερο (His) και δύο αρνητικά φορτισμένα (Asp και Glu) αμινοξέα. Στο κατάλοιπο 57 υπάρχουν τρία ουδέτερα (Ser, Asn και Ala) και δύο αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (Asp και Glu). Στο κατάλοιπο 70 υπάρχει ένα θετικό (Arg) και τέσσερα ουδέτερα (Ser, Gln, Asn και His) αμινοξέα. Στο κατάλοιπο 71 υπάρχουν δύο ουδέτερα (Ala και Thr) και δύο θετικά (Arg και Lys) αμινοξέα, και τέλος, στο κατάλοιπο 74 υπάρχουν δύο ουδέτερα (Ala και Asn) και ένα αρνητικό (Glu) αμινοξύ. Αυτές οι διαφορές στο φορτίο μπορεί να καταλήγουν σε μια διαφορετική τρισδιάστατη διαμόρφωση της πρωτεΐνης.

Αν και τα μόρια του MHC είναι ιδιαίτερα πολυμορφικά περιέχουν κάποια καλά συντηρημένα χαρακτηριστικά όπως θέσεις γλυκοσυλίωσης, ενδοπεριοχικές (intradomain) δισουλφιδικές γέφυρες και συντηρημένα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με τον TCR των T_H κυττάρων (Πίνακες 48 και 49). Στα μόρια του MHC μόνο N-συνδεδεμένοι ολιγοσακχαρίτες προσδένονται σε κατάλοιπα Asn. Στην αλυσίδα DRβ υπάρχει μόνο μία θέση γλυκοσυλίωσης η Asn19. Πράγματι, σε όλες τις αλληλουχίες *DRB1* που ταυτοποιήθηκαν βρέθηκε ένα μη μεταβλητό κατάλοιπο Asn19. Για την αλυσίδα DQa υπάρχουν δύο θέσεις γλυκοσυλίωσης, η Asn78 και η

Asn119. Στις αλληλουχίες *DQA2* που ταυτοποιήθηκαν πράγματι στη θέση 78 υπάρχει μία αμετάβλητη Asn ενώ η θέση 119 ήταν εκτός του εύρους της αλληλουχίας (Achour, 2001). Στην περιοχή α1 ενός μορίου MHC τάξης II δεν υπάρχουν κατάλοιπα κυστεΐνης ενώ η β1 περιοχή περιέχει ένα δισουλφιδικό δεσμό. Πράγματι, δε βρέθηκαν κατάλοιπα κυστεΐνης στις *DQA2* αλληλουχίες εκτός των αλληλουχιών *Ovar-DQA2*26* και *Ovar-DQA2*33* όπου παρατηρήθηκαν δύο κατάλοιπα Cys στις θέσεις 76 και 79, ενώ στις αλυσίδες DRβ που κωδικοποιούνται βρέθηκαν δύο συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, η Cys15 και η Cys79 (Achour, 2001). Έχει βρεθεί ότι μόνο μία αμινοξική αλλαγή προκαλεί την α αλυσίδα να κάμψει 2Α° προς την επιφάνεια εσοχής (floor) τη θηλιά πρόσδεσης σε σχέση με την αλυσίδα της τάξης I. Συνεπώς, στο καρβοξυτελικό άκρο της α1 ελικοειδούς περιοχής της HLA-DR1 έχει αποδειχτεί ότι υπάρχει ένα κατάλοιπο αργινίνης σε μία κρίσιμη θέση (Arg76) που καταλαμβάνεται από μία τυροσίνη στην αντίστοιχη περιοχή της τάξης I (Tyr84). Στη DQα αλυσίδα υπάρχει στη θέση 76 ένα κατάλοιπο Arg που πιθανόν συνεισφέρει σε αυτό το σχηματισμό, ωστόσο παρατηρήθηκε ότι στις συγκεκριμένες αλληλουχίες *Ovar-DQA2* η Arg δεν είναι αμετάβλητη αλλά υπάρχουν και εναλλακτικά κατάλοιπα (Trp, His και Cys).

Σύγκριση πολυμορφισμού ανά είδος και ανά πληθυσμό

Με τις παραπάνω αναλύσεις καταγράφηκε συνολικά ο πολυμορφισμός και στα τρία υπό μελέτη είδη αλλά και σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας ξεχωριστά. Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος θα ήταν η σύγκριση του πολυμορφισμού σε κάθε πληθυσμό των άγριων ειδών (*Sus scrofa* και *Lepus europaeus*) και σε κάθε φυλή των ήμερων ειδών (*Sus scrofa f. domestica* και *Ovis aries*). Για το λόγο αυτό καταγράφηκε πλέον σε συγκριτικούς πίνακες (Πίνακες 62-67) ο αριθμός των ατόμων κάθε πληθυσμού, ο αριθμός των αλληλομόρφων, ο αλληλομορφικός πλούτος, η παρατηρούμενη και αναμενόμενη ετεροζυγωτία, ο αριθμός των διαφόρων θυλάκων και των συνδυασμών τους, η νουκλεοτιδική και αμινοξική ποικιλομορφία.

Πίνακες 62, 63: Σύγκριση πολυμορφισμού για το **DRB1** στα είδη *Sus scrofa* και *Lepus europaeus*

<i>Sus scrofa</i>												
Πληθυσμοί	<i>EP</i>	<i>LA</i>	<i>MA</i>	<i>GR-N</i>	<i>GR-S</i>	<i>PL</i>	<i>FR</i>	<i>SP</i>	<i>LU</i>	<i>IT</i>	<i>D</i>	<i>A</i>
(N)	36	41	16	28	3	16	9	16	9	21	3	18
(L)	4	6	4	7	3	5	4	2	2	3	3	5
(Rs)	2,65	2,753	3,121	3,305	3	3,64	2,974	1,956	1,991	2,359	3	2,956
H exp.	0,61	0,6285	0,6816	0,6958	0,6111	0,7656	0,6173	0,4688	0,5	0,5261	0,6667	0,6235
H obs.	0,1667	0,122	0,1875	0,0714	0,3333	0,4375	0	0,25	0,1111	0,0952	0	0,3333
P4	4	6	4	6	3	5	4	2	2	3	3	5
P7	4	6	4	6	3	5	4	2	2	3	3	5
Συνδυασμοί θυλάκων	4	6	4	6	3	5	4	2	2	3	3	5
NT ποικιλομορφία	0,052	0,095	0,052	0,083	0,062	0,099	0,113	0,138	0,157	0,075	0,125	0,101
AA ποικιλομορφία	0,107	0,167	0,107	0,150	0,136	0,181	0,202	0,238	0,258	0,159	0,214	0,187

<i>Lepus europaeus</i>																
Πληθυσμοί	<i>GR-C</i>	<i>GR-W</i>	<i>GR-S</i>	<i>GR-N</i>	<i>GR-NE</i>	<i>BG</i>	<i>TR</i>	<i>IL</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>D</i>	<i>NL</i>	<i>GB</i>	<i>IT</i>	<i>CH</i>	<i>PL</i>
(N)	180	150	22	15	40	103	34	14	48	20	27	7	20	5	112	4
(L)	10	10	6	3	5	6	15	4	13	5	9	1	6	3	9	5
(Rs)	3.863	3.918	4.330	2,869	3,337	3,064	6,137	3,564	4,954	3,821	4,735	1,000	4,791	3,000	4,724	5,000
H exp.	0,6892	0,7164	0,7562	0,5600	0,6166	0,601	0,8495	0,7041	0,7539	0,6963	0,6811	0	0,7937	0,34	0,7473	0,7813
H obs.	0,5222	0,5533	0,5455	0,6667	0,525	0,3883	0,6176	0,3571	0,5208	0,55	0,4815	0	0,35	0,2	0,2857	0,7500
P4	10	8	6	3	5	6	10	4	10	5	8	1	6	3	7	5
P7	8	8	5	3	5	5	11	4	7	4	7	1	5	3	8	5
Συνδυασμοί θυλάκων	10	9	6	3	5	6	12	4	10	5	8	1	6	3	8	5
NT ποικιλομορφία	0,121	0,118	0,132	0,184	0,145	0,087	0,127	0,149	0,115	0,104	0,101	N/C	0,076	0,132	0,081	0,130
AA ποικιλομορφία	0,121	0,118	0,132	0,265	0,247	0,145	0,216	0,243	0,197	0,176	0,174	N/C	0,138	0,204	0,147	0,187

Πίνακας 64: Σύγκριση πολυμορφισμού για το **DRB1** στα είδη *Sus scrofa f. domestica* και *Ovis aries*

	<i>Sus scrofa f. domestica</i>				<i>Ovis aries</i>			
	<i>Lei</i>	<i>Pie</i>	<i>Lan</i>	<i>Dan</i>	<i>ΜΠΟΥΤΣΙΚΑ Λ. Κ.</i>	<i>ΜΠΟΥΤΣΙΚΑ Κ. Κ.</i>	<i>Frizarta</i>	<i>Comisana</i>
(N)	18	14	39	49	44	9	19	30
(L)	4	3	3	6	13	9	12	26
(Rs)	2,616	2,566	2,06	2,851	6,239	9	9,008	13,423
H exp.	0,5602	0,5893	0,3672	0,6104	0,7673	0,8457	0,8726	0,9472
H obs.	0,1111	0,2143	0,0769	0,6122	0,7273	0,8889	0,6316	0,8
P4	4	3	3	6	11	9	9	14
P7	4	3	3	6	11	7	9	16
Συνδυασμοί θυλάκων	4	4	3	6	12	9	10	22
NT ποικιλομορφία	0,075	0,091	0,077	0,1	0,102	0,108	0,082	0,074
ΑΑ ποικιλομορφία	0,156	0,196	0,161	0,171	0,201	0,214	0,176	0,154

Πίνακες 65, 66: Σύγκριση πολυμορφισμού για το **DQA** στα είδη *Sus scrofa* και *Lepus europaeus*

<i>Sus scrofa</i>												
Πληθυσμοί	<i>EP</i>	<i>LA</i>	<i>MA</i>	<i>GR-N</i>	<i>GR-S</i>	<i>PL</i>	<i>FR</i>	<i>SP</i>	<i>LU</i>	<i>IT</i>	<i>D</i>	<i>A</i>
(N)	35	37	18	29	3	6	7	14	8	27	3	13
(L)	3	6	5	4	1	2	2	2	2	4	2	2
(Rs)	2,497	2,318	2,849	2,462	1	1,992	1,99	1,802	1,974	2,662	2	1,919
H exp.	0,5865	0,4938	0,6404	0,5541	0	0,4861	0,4898	0,3367	0,4688	0,5789	0,4444	0,426
H obs.	0,1429	0,1351	0,3889	0,1379	0	0,5	0,2857	0	0,5	0	0	0,1538
P1	1	3	3	3	1	1	2	1	2	3	1	2
P6	2	3	2	3	1	1	2	1	2	2	1	2
P9	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
Συνδυασμοί θυλάκων	2	5	4	4	1	1	2	1	2	3	1	2
NT ποικιλομορφία	0,039	0,048	0,033	0,032	N/C	0,06	0,032	0,06	0,032	0,027	0,032	0,032
AA ποικιλομορφία	0,065	0,091	0,062	0,048	N/C	0,098	0,032	0,098	0,032	0,065	0,065	0,032

Lepus europaeus

Πληθυσμοί	<i>GR-C</i>	<i>GR-W</i>	<i>GR-S</i>	<i>GR-N</i>	<i>GR-NE</i>	<i>BG</i>	<i>TR</i>	<i>IL</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>D</i>	<i>NL</i>	<i>GB</i>	<i>PL</i>	<i>CH</i>
(N)	141	101	18	20	24	41	55	13	55	21	21	10	30	8	116
(L)	10	6	5	6	8	9	12	4	10	8	5	4	8	3	8
(Rs)	5,095	3,553	4,275	4,584	5,468	5,712	6,782	3,985	5,185	6,528	4,168	3,905	4,956	3	5,605
H exp.	0,751	0,6442	0,7037	0,65	0,7283	0,7757	0,7972	0,7308	0,7154	0,805	0,6576	0,48	0,6711	0,6563	0,7866
H obs.	0,305	0,3366	0,2222	0,3	0,2083	0,3902	0,5091	0,0769	0,2909	0,8095	0,1905	0,2	0,5333	0,25	0,4655
P1	3	2	2	3	4	4	7	1	5	5	3	4	5	2	4
P6	6	6	5	3	6	4	4	2	5	4	3	3	5	2	4
P9	7	5	5	3	4	3	2	3	3	4	3	3	4	2	3
Συνδυασμοί θυλάκων	8	6	5	4	5	6	10	3	8	7	4	4	7	2	6
NT ποικιλομορφία	0,093	0,096	0,102	0,087	0,101	0,087	0,068	0,064	0,081	0,084	0,101	0,098	0,089	0,091	0,087
AA ποικιλομορφία	0,234	0,247	0,258	0,203	0,247	0,209	0,130	0,167	0,188	0,196	0,242	0,218	0,204	0,221	0,212

Πίνακας 67: Σύγκριση πολυμορφισμού για το **DQA** στα είδη *Sus scrofa f. domestica* και *Ovis aries*

	<i>Sus scrofa f. domestica</i>				<i>Ovis aries</i>			
	<i>Lei</i>	<i>Pie</i>	<i>Lan</i>	<i>Dan</i>	ΜΠΟΥΤΣΙΚΑ Α. Κ.	ΜΠΟΥΤΣΙΚΑ Κ. Κ.	<i>Frizarta</i>	<i>Comisana</i>
(N)	18	14	49	49	44	10	17	25
(L)	3	2	4	3	11	14	24	18
(Rs)	2,428	1,928	3	2,16				
H exp.	0,5231	0,4362	0,6908	0,4638				
H obs.	0,1111	0,2143	0,3061	0,2653				
P1	1	1	1	1	5	6	8	7
P6	2	1	2	1	7	9	10	7
P9	2	1	2	1	6	7	10	8
Συνδυασμοί θυλάκων	2	1	2	1	10	12	22	15
NT ποικιλομορφία	0,05	0,032	0,059	0,047	0,137	0,103	0,115	0,127
ΑΑ ποικιλομορφία	0,105	0,065	0,114	0,087	0,251	0,198	0,211	0,235

Σύγκριση πολυμορφισμού που έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία

Η ανάγκη για κατανόηση των εξελικτικών διαδικασιών έχει οδηγήσει στη λεπτομερή μελέτη του MHC σε διάφορα είδη θηλαστικών. Πολλές μελέτες αφορούν τη διερεύνηση του πολυμορφισμού σε γονίδια τάξης I και II σε διάφορα είδη καθώς και την οργάνωσή του ακόμη και σε μη προτυποποιημένα είδη. Επειδή σε όλες τις περιπτώσεις ο μεγαλύτερος πολυμορφισμός αφορά το *DRB* οι περισσότερες μελέτες αφορούν αυτό και ακολουθεί το γονίδιο *DQB* και στη συνέχεια το *DQA*. Στον Πίνακα 68 καταγράφεται ο πολυμορφισμός του *DRB* σε διάφορα είδη θηλαστικών όπως βρέθηκε σε διάφορες μελέτες. Όπως προκύπτει από τη σύγκριση με τα δεδομένα αυτής της μελέτης, εμφανίζεται μειωμένος πολυμορφισμός για τον αγριόχοιρο και τον εξημερωμένο χοίρο ενώ για ο λαγός και το πρόβατο έχουν σαφώς υψηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού.

Πίνακας 68: Καταγραφή του πολυμορφισμού του *DRB* από διάφορες μελέτες. Σημειώνονται με «*» όσες μελέτες έχουν βρει πολλαπλά αντίγραφα του *DRB* γονιδίου

Είδος και αριθμός ατόμων	Αριθμός Αλληλομόρφων	Πληθυσμοί	Βιβλιογραφική Αναφορά
313 φάλαινες (<i>Delphinapterus leucas</i>)	8	13 περιοχές στη Βόρεια Αμερική	Murray <i>et al.</i> , 1999*
wood mouse 162 (<i>Apodemus sylvaticus</i>)	38	9 περιοχές στη Γερμανία και Ελβετία	Musolf <i>et al.</i> , 2004
60 yellow-necked mouse (<i>Apodemus flavicollis</i>)	15	3 περιοχές στη Βόρεια Γερμανία	Musolf <i>et al.</i> , 2004
191 αίγαγροι Άλπεων (<i>Rupicapra rupicapra</i>)	28	10 πληθυσμοί στις ανατολικές Άλπεις στην Ιταλία	Mona <i>et al.</i> , 2008
230 μυγαλή (<i>Tupaia belangeri</i>)	13	Εκτροφείο στο τμήμα Φυσιολογίας Ζώων του Πανεπιστημίου Bayreuth (15 ^η γενιά σε αιχμαλωσία)	Oppelt <i>et al.</i> , 2010
40 hairy footed gerbil rodentia (<i>Gerbillurus paeba</i>)	34	Νότια Αφρική, έρημος Καλαχάρι	Harf & Sommer, 2005*
146 (<i>Apodemus flavicollis</i>)	27	7 τοποθεσίες γύρω από το Αμβούργο	Meyer-Lucht & Sommer, 2005
16 τίγρεις (<i>Panthera tigris tigris</i>)	4	Βόρεια, Κεντρική και Δυτική Ινδία καθώς και τίγρεις από ζωολογικούς κήπους	Pokorny <i>et al.</i> , 2010*

Είδος και αριθμός ατόμων	Αριθμός Αλληλομόρφων	Πληθυσμοί	Βιβλιογραφική Αναφορά
60 πάντα (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)	7	3 πληθυσμοί, Chengdu, Ya'an-Wolong και Foping-Louguantai	Wan <i>et al.</i> , 2006
227 sea lions (<i>Zalophus californianus</i>)	40	2 γεωγραφικά απομονωμένοι πληθυσμοί της Καλιφόρνια	Bowen <i>et al.</i> , 2006
14 άλογα Przewalski	6	Υπό εξαφάνιση, ένας πληθυσμός από 13 ιδρυτές	Hedrick <i>et al.</i> , 1999
85 νυχτερίδες (<i>Saccopteryx bilineata</i>)	11	79 συλλέχθηκαν από ένα πληθυσμό	Mayer & Brunner, 2007*
48 κόκκινοι λύκοι	4	Πληθυσμός σε αιχμαλωσία	Hedrick <i>et al.</i> , 2002
10 κογιότ	8	Τέξας	Hedrick <i>et al.</i> , 2002
29 κογιότ	15	Βόρεια Καρολίνα	Hedrick <i>et al.</i> , 2002
163 Ευρωπαϊκοί λύκοι	17	Βόρεια Ευρώπη και Ισπανία	Seddon & Ellegren, 2002
36 μεξικανικοί λύκοι	6	McBride lineage 18 άτομα, Ghost Ranch lineage (10), Aragon lineage (8)	Hedrick <i>et al.</i> , 2000
228 <i>Microcebus murinus</i>	14	Παραθαλάσσιο δάσος στη Mandena	Schad <i>et al.</i> , 2005
22 χιμπατζήδες (<i>Pan troglodytes</i>)	7	Αποικία χιμπατζήδων στην Ιαπωνία	Bak <i>et al.</i> , 2005

Συζήτηση

Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη εκτενή ερευνητική προσπάθεια για τον προσδιορισμό και τη σύγκριση του πολυμορφισμού δύο γονιδίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) σε τρία είδη με παγκόσμια εξάπλωση (*Lepus europaeus*, *Sus scrofa* και *Ovis aries*) που ωστόσο έχουν διαφορετική εξελικτική πορεία και έχουν υποστεί την επίδραση διαφορετικών εξελικτικών δυνάμεων.

Μοριακή ανάλυση των γονιδίων *DRB1* και *DQA* με τη μέθοδο PCR-SSCP

Για την παραγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται στη μεθοδολογία για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού οποιουδήποτε τύπου του MHC (ειδικότερα για είδη που είναι λιγότερο καλά μελετημένα), θα πρέπει να είναι πολύ καλά και αυστηρά προσδιορισμένα και τα οποία συνοψίζονται στη συνέχεια. Αρχικά, θα πρέπει να συγκριθούν αποτελέσματα από διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για να εκτιμηθεί η πιθανότητα απώλειας αλληλομόρφων (άκυρα αλληλόμορφα, null) εξαιτίας μεταλλάξεων στις περιοχές συγκόλλησης των εκκινητών (Kwok *et al.*, 1990, Hurley *et al.*, 2001). Στην περίπτωση του προβάτου το πρόβλημα ξεπεράστηκε με σύγκριση εκκινητών που υπήρχαν ήδη στη βιβλιογραφία (Hickford *et al.*, 2004, Ammils *et al.*, 1995). Ειδικότερα, για το *DRB1* του προβάτου δοκιμάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών των Ammils *et al.* (1995) και των van Eijk *et al.* (1992) και προτιμήθηκε το πρώτο καθώς τα προϊόντα της PCR ήταν καλύτερα ποσοτικά. Για το *DQA* του λαγού οι εκκινητές σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τους Fain *et al.* (2001) ύστερα από μικρή τροποποίηση των εκκινητών. Για την περίπτωση του *DRB1* του λαγού οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία του κουνελιού που υπάρχει στο διαδίκτυο (http://www.ensembl.org/Oryctolagus_cuniculus/Gene/Family/Genes?family=ENSMF00500000269593) και πάλι ύστερα από μικρή τροποποίηση τους. Τέλος, για το *Sus scrofa* και τα δύο ζεύγη εκκινητών σχεδιάστηκαν ύστερα από συλλογή και επεξεργασία αλληλουχιών SLA-DQA και SLA-DRB1 από τη GenBank.

Στη συνέχεια, θα πρέπει να περιοριστούν κατά το μέγιστο δυνατό αλλαγές που μπορεί να προκύψουν από λάθη κατά την PCR. Αυτό είναι αναγκαίο στην περίπτωση που υπάρχουν σπάνια αλληλόμορφα, αλληλόμορφα δηλαδή με πολύ χαμηλή συχνότητα που παρατηρούνται σε λίγα άτομα μέσα στον πληθυσμό. Στην περίπτωση αυτή η αυθεντικότητά τους πιστοποιήθηκε από επαναλαμβανόμενες ενισχύσεις με

PCR και κλωνοποίηση και απαιτούνται αλληλουχίες από δύο κλώνους κάτι που εφαρμόστηκε στη συγκεκριμένη μελέτη (Lukas & Vigilant, 2005).

Η ανάλυση SSCP είναι η κύρια τεχνική που σε συνδυασμό με την αλληλούχιση χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αλληλομόρφων διαφόρων τόπων του MHC. Εναλλακτικά, και σε μικρότερο βαθμό χρησιμοποιείται η μέθοδος RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism - Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων). Ωστόσο, η SSCP είναι μια γρήγορη και ευαίσθητη μεθοδολογία ικανή να ανιχνεύσει σημειακές μεταλλάξεις και πολυμορφισμούς. Η μεθοδολογία SSCP είναι αποτελεσματικότερη για κομμάτια μικρότερα των 300bp επειδή διαφορές στη νουκλεοτιδική σύσταση οδηγούν συχνά σε σημαντικές αλλαγές στη δευτεροταγή δομή ενώ σε μεγαλύτερα τμήματα η επίδραση μιας σημειακής αλλαγής είναι μικρότερη (Fujita & Silver, 1991). Τέλος, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τμήματα DNA με παρόμοια νουκλεοτιδική σύσταση και μικρή διαφορά στο μέγεθος έχουν διαφορετική κινητική ικανότητα, αποδεικνύοντας ότι η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται και από το μέγεθος του τμήματος που έχει ενισχυθεί (Glavac & Dean, 1993). Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι επηρεάζεται από διαφορετικές συνθήκες που εφαρμόζονται κατά την ηλεκτροφόρηση όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση γλυκερόλης, η σύσταση της πηκτής πολυακρυλαμίδης και οι αποδιατακτικές συνθήκες (Hayashi *et al.*, 1991, Fujita & Silver, 1994). Για την επίτευξη της επαναληψιμότητας των προτύπων απαιτείται αυστηρός έλεγχος των συνθηκών. Είναι χαρακτηριστικό πως για κάθε γονίδιο σε κάθε είδος που μελετήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συνθήκες οι οποίες προέκυψαν ύστερα από δοκιμές για τη συλλογή των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων.

Σύγκριση του πολυμορφισμού μεταξύ DQA και DRB1

Στη συγκεκριμένη μελέτη προσδιορίστηκε ο πολυμορφισμός δύο γονιδίων MHC τάξης II σε όλα τα δείγματα των τριών ειδών. Ο πολυμορφισμός των γονιδίων του MHC συγκεντρώνεται γενικά στα αμινοξικά κατάλοιπα που παίρνουν μέρος στην PBR, την περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου (Hedrick, 1999), όπου, μέσω έντονης θετικής επιλογής συντηρούνται οι νέοι συνδυασμοί αλληλομόρφων (Schwaiger *et al.*, 1994). Ο πιο κοινός τρόπος μέτρησης της θετικής επιλογής είναι η ανάλυση των κωδικονίων, δηλαδή η σύγκριση των συνώνυμων (d_s) και μη συνώνυμων

υποκαταστάσεων (d_N) στις κωδικοποιητικές αλληλουχίες. Μία άλλη πληθυσμιακή μέθοδος που θα μπορούσε να καταγράψει τη δράση θετικής επιλογής είναι αυτή στην οποία μετρώνται τα αλληλόμορφα που υπάρχουν για κάθε γονίδιο μέσα στο είδος καθώς και η φύση αυτού του πολυμορφισμού, δηλαδή η μέτρηση του αριθμού των μεταβλητών θέσεων (Yeager & Hughes, 1999). Μία ακόμη ένδειξη για τη δράση της θετικής επιλογής στα αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι ο μεγάλος αριθμός αμινοξικών υποκαταστάσεων με αντικατάσταση φορτίου (Tennesen, 2005) καθώς αυτές οι αλλαγές στο φορτίο μπορούν να καταλήξουν σε διαφορετική τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης και δομή της PBR (Burri *et al.*, 2008).

Στο *O. aries* ο λόγος d_N/d_S για την PBR είναι σαφώς μεγαλύτερος για το γονίδιο *DRB1* σε σχέση με αυτόν που καταγράφεται για το *DQA2* ενώ και τα αποτελέσματα του Z-test για θετική επιλογή στα κωδικόνια της PBR, δείχνουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ένδειξη για τη δράση θετικής επιλογής στο *DRB1* ενώ αυτή αντικαθίσταται από μία τάση για θετική επιλογή στο *DQA2*. Ο αριθμός των αλληλομόρφων *DRB1* που προσδιορίστηκαν ήταν μεγαλύτερος από τον αριθμό των αλληλομόρφων *DQA2* ενώ υπάρχουν οχτώ υποκαταστάσεις με αντικατάσταση φορτίου στο *DQA2* και επτά στο *DRB1*. Είναι γεγονός ότι στο πρόβατο το *DRB1* έχει καταγραφεί ως το πιο πολυμορφικό γονίδιο (Andersson & Rask, 1988, Dukkupati *et al.*, 2006) αν και για το *DQA2* έχει παρατηρηθεί πολυμορφισμός (Scott *et al.*, 1991a, Fabb *et al.*, 1993, Wright & Ballingall, 1994, Snibson *et al.*, 1998, Hickford *et al.*, 2004). Σε κάθε περίπτωση το *DQA2* είναι περισσότερο πολυμορφικό από το *DQA1* (Dukkupati *et al.*, 2006) ενώ έχουν βρεθεί άτομα που έχουν τρεις ή τέσσερις αλληλουχίες *DQA2* (Hickford *et al.*, 2004) που προφανώς προέρχονται από 2 τόπους *DQA2* κάτι που επιβεβαιώνεται και από τη συγκεκριμένη μελέτη. Έχει βρεθεί ότι στο MHC όταν απαλείφονται τόποι, εμφανίζονται άλλοι που αντισταθμίζουν την απώλεια, αναλαμβάνοντας μία επιπλέον λειτουργία (Kelley *et al.*, 2005). Στη γάτα αυτό εμφανίζεται με μία εκτεταμένη υποπεριοχή DR λόγω έλλειψης της υποπεριοχής DQ της τάξης II (Yuhki *et al.*, 2003) ενώ το πρόβατο δεν έχει την υποπεριοχή DP αλλά αντισταθμίζεται από νέες συστοιχίες γονιδίων DI/DY και μία πιο πολυμορφική περιοχή DQ (Scott *et al.*, 1987, Stone & Muggli-Cockett, 1990, van der Poel *et al.*, 1990, Wright *et al.*, 1994).

Για το *S. scrofa* ο λόγος d_N/d_S για την PBR είναι σαφώς μεγαλύτερος για το γονίδιο *DRB1* σε σχέση με αυτόν που καταγράφεται για το *DQA* και παράλληλα τα

αποτελέσματα του Z-test για θετική επιλογή στα κωδικόνια της PBR, δείχνουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ένδειξη για τη δράση θετικής επιλογής στο *DRBI* που αντικαθίσταται από μία τάση για θετική επιλογή στο *DQA*. Ακόμη, το *DQA* είχε λιγότερα αλληλόμορφα σε σχέση με το *DRBI* και για το *DRBI* υπάρχουν περισσότερες αμινοξικές υποκαταστάσεις με αντικατάσταση φορτίου στην περιοχή PBR (πέντε) σε σχέση με το *DQA* (τρεις). Για το *SLA-DQA* μέχρι στιγμής έχει καταγραφεί μέτριος πολυμορφισμός ενώ το *SLA-DRBI* είναι το πιο πολυμορφικό γονίδιο του SLA-MHC (Chardon *et al.*, 1999, Ando & Chardon, 2006) κάτι που φαίνεται και στη νουκλεοτιδική και στην αμινοξική ποικιλότητα οι οποίες είναι μεγαλύτερες για το *DRBI* σε σχέση με το *DQA*.

Τέλος, για το *L. europaeus* ο λόγος d_N/d_S για την PBR του *DRBI* είναι ελάχιστα χαμηλότερος από του *DQA* ενώ και στα δύο γονίδια τα αποτελέσματα του Z-test για θετική επιλογή στα κωδικόνια της PBR, δείχνουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ένδειξη για τη δράση θετικής επιλογής. Στο λαγό η νουκλεοτιδική και η αμινοξική ποικιλότητα είναι μεγαλύτερες για το *DRBI* σε σχέση με το *DQA* ενώ καταγράφεται και μεγαλύτερος αριθμός αλληλομόρφων *DRBI* από τον αριθμό των αλληλομόρφων *DQA*. Για το *DRBI*, τέλος υπάρχουν περισσότερες αμινοξικές υποκαταστάσεις με αντικατάσταση φορτίου στην περιοχή PBR (επτά) σε σχέση με το *DQA* (έξι).

Η σύγκριση επομένως ανάμεσα στα δύο αυτά γονίδια, αποκαλύπτει, ότι σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν το *DRBI* είναι πιο πολυμορφικό σε σχέση με το *DQA* και πιθανώς αυτό οφείλεται στην πιο έντονη δράση της θετικής επιλογής. Ο μικρότερος βαθμός πολυμορφισμού της *DQA* αλυσίδας σε σχέση με τη *DRBI* μπορεί να εξηγηθεί τόσο με βάση το ρόλο των δύο υποπεριοχών στις ανοσοαπαντήσεις όσο και από το ρόλο των δύο αλυσίδων στην παρουσίαση των πεπτιδίων. Έχει διαπιστωθεί ότι η επιβράδυνση των αμινοξικών υποκαταστάσεων μπορεί να εξηγηθεί μόνο εάν ορισμένοι τύποι αμινοξικών υποκαταστάσεων ευνοούνται ακόμη και στην PBR με αλληλοδιαδοχικές (back and forth) υποκαταστάσεις που καλούνται «κορεσμός». Αυτή η υπόθεση μπορεί να εξηγήσει τον πολυμορφισμό στα γονίδια τάξης II, αφού η μέση απόκλιση είναι υψηλή. Έχει προταθεί ότι η περιοχή DR ενεργοποιεί την ανοσολογική απόκριση ενώ η DQ καταστέλλει την απάντηση (Ohta, 1991). Συνεπώς, οι γενετικές μεταβολές μπορεί να εμποδίζονται περισσότερο στην περιοχή DQ, όπου απαιτείται μία πιο συντηρημένη δομή. Μελέτη που έγινε στο *DRB*

γονίδιο πολλών θηλαστικών αποκάλυψε μεγάλες ομοιότητες στα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι υπό τη δράση θετικής επιλογής, προτείνοντας ότι το *DRB* επιτελεί σε γενικές γραμμές την ίδια λειτουργία στην πρόσδεση και παρουσίαση πεπτιδίων στα διάφορα είδη, με εμπλοκή των ίδιων αμινοξικών καταλοίπων (Furlong & Yang, 2008). Ακόμη, ο πολυμορφισμός των α αλυσίδων της τάξης II είναι πολύ μικρότερος από αυτό των β αλυσίδων καθώς και από την αλυσίδα α τάξης I. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο ρόλος τους είναι κυρίως η σταθεροποίηση του διμερούς μορίου. Σε αυτό το σημείο, αξίζει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με την επικρατούσα θεωρία για την προέλευση του MHC, υπάρχει μία σχέση μεταξύ της α αλυσίδας των μορίων MHC τάξης II και της $\beta 2$ -μικροσφαιρίνης (Hughes & Nei, 1993). Η $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη δε συμμετέχει καθόλου στην αναγνώριση του πεπτιδικού αντιγόνου και ο ρόλος της είναι η σταθεροποίηση του μορίου τάξης I. Τέλος, ενώ έχει αποδειχτεί ότι τα *DRA* αλληλόμορφα μπορούν να ζευγαρώνουν με οποιοδήποτε από τα αλληλόμορφα *DRB*, στην υποπεριοχή DQ το ζευγάρι των $\alpha\beta$ αλυσίδων εξαρτάται από τον πολυμορφισμό που εμφανίζουν οι αλυσίδες στις περιοχές $\alpha 44-53$ και $\beta 85-90$ (Bondinas *et al.*, 2007). Συνεπώς, και αυτός ο περιοριστικός παράγοντας παίζει ρόλο στο διαμορφούμενο πολυμορφισμό του *DQA*.

Συνοψίζοντας, λοιπόν, το γονίδιο *DQA* παρουσιάζει μειωμένο πολυμορφισμό σε σχέση με το *DRBI* και επομένως συνάγεται ότι υπόκειται σε μειωμένη άσκηση θετικής επιλογής, κάτι που οφείλεται στο ρόλο των δύο μορίων στις ανοσοαπαντήσεις, στο ρόλο των δύο αλυσίδων στην παρουσίαση του αντιγόνου καθώς και σε περιοριστικούς παράγοντες στο ζευγάρι των $\alpha\beta$ αλυσίδων στην υποπεριοχή DQ. Μόνο στην περίπτωση του *DQA2* του *O. aries* ο μεγαλύτερος πολυμορφισμός που παρατηρείται ενδεχομένως να οφείλεται στην αντιστάθμιση του πολυμορφισμού λόγω έλλειψης της περιοχής DP.

Πολυμορφισμός του MHC-DRBI και MHC-DQA στο Sus scrofa

Μέχρι στιγμής στον αγριόχοιρο η μόνη μελέτη που αφορά στο MHC έχει γίνει από τους Barbisan και τους συνεργάτες του (2008) οι οποίοι μελέτησαν το ιντρόνιο 1 και μέρος του εξωνίου 2 του *DRBI* σε πληθυσμούς αγριόχοιρων από την Ιταλία, την Ουγγαρία και την Πολωνία. Η μελέτη έγινε σε 57 άτομα και βρέθηκαν 18 αλληλόμορφα του *DRBI*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους στον πληθυσμό της Φλωρεντίας υπάρχει πρόσφατος διπλασιασμός του *DRB*. Παρόμοιο αποτέλεσμα δεν

προέκυψε από την παρούσα εργασία, καθώς μόνο μέχρι δύο αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν από τη συνολική ανάλυση της περιοχής σε κάθε άτομο. Είναι επίσης άξιο συζήτησης, ότι στα 10 άτομα της Πολωνίας που μελέτησαν ο Barbisan και οι συνεργάτες του βρέθηκαν εννέα αλληλόμορφα *DRBI* σε σχέση με τα πέντε αλληλόμορφα σε 16 άτομα από την Πολωνία που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη. Στον ιταλικό πληθυσμό, ωστόσο, που γεωγραφικά τοποθετείται στην περιοχή της Ρώμης, σε 15 άτομα βρέθηκαν μόλις δύο αλληλόμορφα κάτι που είναι κοντά στα αποτελέσματα της εργασίας αυτής εφόσον σε 21 ιταλικά άτομα βρέθηκαν μόλις τρία αλληλόμορφα *DRBI*. Αν και είναι δύσκολη η σύγκριση ανάμεσα σε δύο μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικούς δείκτες, σε διαφορετικούς πληθυσμούς και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές η απόκλιση που παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς της Πολωνίας αν δεν οφείλεται σε τυχαίους παράγοντες είναι δύσκολο να εξηγηθεί.

Στην παρούσα μελέτη τον μεγαλύτερο πολυμορφισμό εμφανίζουν η περιοχή της Λάρισας και η Βόρεια Ελλάδα καθώς έχουν από έξι και επτά αλληλόμορφα αντίστοιχα αλλά και σε επίπεδο θυλάκων είναι οι πιο πολυμορφικές περιοχές με έξι διαφορετικούς συνδυασμούς των P4/P7. Οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί SP, LU, D και IT είναι αυτοί που εμφανίζουν το χαμηλότερο αριθμό αλληλομόρφων που μεταφράζεται και σε μικρότερο αριθμό συνδυασμών θυλάκων.

Και στην περίπτωση του οικόσιτου χοίρου έχει γίνει μελέτη δύο λειτουργικών τόπων του MHC, του *DRBI* και του *DQB* (Luetkemeier *et al.*, 2009). Στην ανάλυση τους περιλαμβάνονται ευρωπαϊκές και ασιατικές φυλές χοίρων. Στις έξι ευρωπαϊκές φυλές των οικόσιτων χοίρων και ταυτοποιήθηκαν 17 αλληλόμορφα *DRBI* σε 116 άτομα. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν εννέα αλληλόμορφα σε 120 άτομα. Ανάμεσα στη μελέτη του Luetkemeier και των συνεργατών του και στην παρούσα υπάρχουν δύο κοινές φυλές, η Landrace και η Danbred στην οποία γίνεται πάντοτε διασταύρωση ενός αρσενικού ατόμου της φυλής Duroc και ενός θηλυκού που ανήκει είτε στη φυλή Landrace είτε στη Yorkshire. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι υπόλοιπες φυλές χοίρων αυτής της μελέτης προέρχονται από πρότυπες εκτροφές και είναι αμιγή στελέχη των φυλών Leicoma, Pietrain και Landrace. Τα περισσότερα αλληλόμορφα παρατηρούνται στη φυλή Danbred ενώ σε αυτή τη φυλή παρατηρούνται και οι περισσότεροι διαφορετικοί συνδυασμοί θυλάκων.

Μέχρι στιγμής δεν έχει γίνει άλλη προσπάθεια καταγραφής του πολυμορφισμού του SLA-DQA. Σύμφωνα, με τη βιβλιογραφία το *DQA* στο χοίρο

εμφανίζει μόνο μέτριο πολυμορφισμό (Chardon *et al.*, 1999, Ando & Chardon, 2006). Όπως αναμενόταν, το *DQA* είχε λιγότερα αλληλόμορφα από το *DRB1*, σε όλους τους πληθυσμούς (ελληνικούς, ευρωπαϊκούς και εξημερωμένους χοίρους). Αυτός ο μειωμένος πολυμορφισμός που παρατηρείται για το *DQA* μπορεί να γίνει καλύτερα κατανοητός σε επίπεδο θυλάκων. Υπάρχουν πληθυσμοί αγριόχοιρων οι οποίοι εμφανίζουν μόνο ένα συνδυασμό θυλάκων όπως οι PL, SP και D ενώ και στις φυλές Pietrain και Danbred παρατηρείται μόνο ο κυρίαρχος συνδυασμός HEFWT/NNTLN/HNI.

Η αιτία αυτής της εμφανούς διαφοράς πολυμορφισμού μεταξύ του *DRB1* και του *DQA* θα πρέπει να αναζητηθεί στο ρόλο των δύο μορίων στις ανοσοαπαντήσεις καθώς τα δύο μόρια εξειδικεύονται για διαφορετικούς σκοπούς, έχουν διαφορετικούς λειτουργικούς ρόλους και ανταποκρίνονται σε διαφορετικού είδους πεπτίδια (Andersson, 1998). Συνεπώς, το *DQA* του *S. scrofa* παρουσιάζει ένα πιο στενό φάσμα πεπτιδικών αντιγόνων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα σε σχέση με το *DRB1* που εμφανίζει ένα πιο ευρύ φάσμα αντιγόνων. Ωστόσο, ο πολυμορφισμός ενός τόπου του MHC δεν είναι αντιπροσωπευτικός του πολυμορφισμού σε όλο το MHC. Στον ταμαρίνο *Saguinus oedipus*, βρέθηκαν χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού σε τόπους του MHC τάξης I και II ενώ το *DRB* είχε υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού (Gyllensten *et al.*, 1994). Παρόμοιες παρατηρήσεις μπορούν να εξηγηθούν από την υπόθεση αυξομειούμενης μετατόπισης (shifting accordion) (Klein *et al.*, 1993), σύμφωνα με την οποία ο πολυμορφισμός μειώνεται σε μικρούς ιδρυτικούς πληθυσμούς μέσω τυχαίας γενετικής παρέκκλισης και στη συνέχεια ανακτάται από επιλεκτική πίεση και διπλασιασμό των τόπων του MHC. Συνεπώς, πριν αποφανθούμε ότι υπάρχει μειωμένος πολυμορφισμός είναι σημαντικό να χαρακτηριστεί και να ποσοτικοποιηθεί προηγουμένως η ποικιλότητα που υπάρχει σε περισσότερους από έναν τόπους του MHC πριν γίνει αποδεκτή η υπόθεση μειωμένων επιπέδου πολυμορφισμού στο MHC σε ένα είδος (Murray & White, 1998).

Η σύγκριση του *DRB1* του *Sus scrofa* με *DRB1* γονίδια άλλων ειδών δείχνει ότι παρατηρείται μικρότερος πολυμορφισμός σε σχέση με αυτόν που καταγράφεται στη βιβλιογραφία (πίνακας 68, σελ. 163).

Στις περισσότερες περιπτώσεις ο περιορισμένος πολυμορφισμός στο MHC ερμηνεύεται ως το αποτέλεσμα μιας στενωπού του πληθυσμού (Axtner & Sommer, 2007). Είναι παραδεκτό, ότι στους μικρούς πληθυσμούς και στα απειλούμενα είδη

παρατηρούνται χαμηλότερα επίπεδα γενετικού πολυμορφισμού και η θνησιμότητα από παθογόνα και παράσιτα μπορεί να είναι μια σημαντική απειλή (Hedrick *et al.*, 2000). Μια τέτοια εξήγηση φαίνεται να ταιριάζει με την εξελικτική ιστορία του αγριόχοιρου. Ο ευρωπαϊκός αγριόχοιρος είναι ένα σημαντικό θήραμα το οποίο έχει υποστεί στο παρελθόν μετεγκαταστάσεις και τοπικούς αφανισμούς εξαιτίας της αδιάκριτης θήρευσης που κατέληξε σε μεγάλη δημογραφική μείωση (Vernesi *et al.*, 2003, Scandura *et al.*, 2008). Τα τελευταία χρόνια παρατηρούνται επανεισαγωγές αγριόχοιρων (Vernesi *et al.*, 2003) ενώ οι πληθυσμοί του σε μερικές περιπτώσεις αυξάνουν κατά πολύ και ανησυχητικά με αποτέλεσμα να απαιτούνται προγράμματα διαχείρισής του (Scandura *et al.*, 2008). Είδη τα οποία έχουν υποστεί πληθυσμιακές στενωπές διατηρούν κάποια επίπεδα του πολυμορφισμού τους στο MHC μέσω της ισοζυγούσας επιλογής. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι ο αφρικανικός βούβαλος (Wenink *et al.*, 1998), η αλεπού του νησιού San Nicolas (Aguilar *et al.*, 2004), το άλογο Przewalski όπου σε 14 άτομα βρέθηκαν τέσσερα αλληλόμορφα *DRB* αν και το είδος συνεχίστηκε μόνο από 13 άτομα (Hedrick *et al.*, 1999) και το άγριο πρόβατο του νησιού Tiburon που 14 άτομα έδωσαν πέντε αλληλόμορφα παρόλο που ο αρχικός πληθυσμός ήταν 20 άτομα (Hedrick *et al.*, 2001). Ακόμη και στον αμερικανικό βίσωνα που στα τέλη του 1800 ο πληθυσμός του μειώθηκε από 60.000.000 σε 1.000 άτομα βρέθηκαν εννέα *DRB* αλληλόμορφα σε 20 άτομα (Mikko *et al.*, 1997). Κατά συνέπεια, ένα φαινόμενο στενωπής ακόμη και όταν ακολουθείται από ομομιξεία δεν επαρκεί για την εξήγηση της απώλειας της γενετικής ποικιλότητας (Weber *et al.*, 2004) λόγω αντισταθμιστικής δράσης της ισοζυγούσας επιλογής.

Η θεωρία ότι ο συγκριτικά χαμηλότερος πολυμορφισμός του *DRB1* στον αγριόχοιρο προέκυψε από στενωπή και ότι στη συνέχεια λόγω της ισοζυγούσας επιλογής διατηρούνται τα αλληλόμορφα αν και φαίνεται ελκυστική για την αποσαφήνιση των παραγόντων που επέδρασαν στη διαμόρφωση του πολυμορφισμού δε μπορεί από μόνη της να εξηγήσει και τα χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού που παρατηρούνται και στον οικόσιτο χοίρο. Σίγουρα, τα εξημερωμένα ζώα έχουν υποβληθεί στη «στενωπή της εξημέρωσης» και θεωρητικά διαθέτουν μειωμένη γενετική ποικιλότητα σε σχέση με τον άγριο πρόγονό τους. Αυτή η στενωπός επηρεάζει όλο το γονιδίωμα και τροποποιεί την κατανομή του γενετικού πολυμορφισμού στους γενετικούς τόπους (Chen *et al.*, 2007) ενώ σε πολλές περιπτώσεις ο οικόσιτος χοίρος έχει υποστεί και τεχνητή (artificial) επιλογή από τον

άνθρωπο έτσι ώστε οι διάφορες φυλές να αποκτήσουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά (Fang *et al.*, 2009). Συγκρίνοντας όμως, μελέτες και σε άλλα εξημερωμένα είδη οι οικόσιτοι χοίροι εμφανίζουν μειωμένο πολυμορφισμό και αυτό γίνεται αντιληπτό και από το πρόβατο που μελετήθηκε σε αυτή την εργασία, ένα ζώο που εξημερώθηκε χρονικά την ίδια περίοδο με το χοίρο αλλά παρόλα αυτά εμφανίζει σαφώς μεγαλύτερο πολυμορφισμό. Δηλαδή, η στενωπός της εξημέρωσης του οικόσιτου χοίρου αλλά και η πληθυσμιακή στενωπός του αγριόχοιρου δε μπορούν ερμηνεύσουν τα χαμηλό πολυμορφισμό σε αυτά τα δύο είδη.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι για να αντισταθμιστεί η ελάττωση του πληθυσμού του αγριόχοιρου τις προηγούμενες δεκαετίες εφαρμόστηκαν προγράμματα εισαγωγής εκτρεφόμενων χοίρων σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας αν και τα αποτελέσματα αυτής της διαχείρισης παραμένουν αντιφατικά (Booth, 1988, Conant, 1988, Griffith *et al.*, 1989, Kleiman, 1989, Storfer, 1998). Για να βρεθεί η έκταση της εισδοχής του γονιδιώματος των εξημερωμένων χοίρων στους άγριους πληθυσμούς όλα τα δείγματα αγριόχοιρων εξετάστηκαν και για το δείκτη MC1R, έναν αξιόπιστο δείκτη που διαχωρίζει τον εξημερωμένο χοίρο από τον αγριόχοιρο ενώ μπορεί να ανιχνεύει και τα υβρίδια αυτών (Kijas *et al.*, 1998, Koutsogiannouli *et al.*, 2009). Τέσσερις ελληνικοί και ένας Πολωνικός αγριόχοιρος ήταν υβρίδια ενώ ένας ελληνικός και δύο πολωνικοί αγριόχοιροι δεν έδωσαν φαινότυπο αγριόχοιρου. Το 5,0% των υβριδίων που ανιχνεύτηκαν στην Ελλάδα είναι ένα ποσοστό που συμφωνεί με αυτό που έχει ήδη βρεθεί για την εισδοχή γονιδίων εξημερωμένων χοίρων στους αγριόχοιρους (Scandura *et al.*, 2008).

Σύμφωνα όμως με τη μελέτη του Scandura και των συνεργατών του (2008) και του Vernesi και των συνεργατών του (2003), η δημογραφική μείωση που έλαβε χώρα σε μερικές περιοχές τις τελευταίες δεκαετίες δεν προκάλεσε και μια αξιοσημείωτη μείωση του γενετικού πολυμορφισμού του αγριόχοιρου, ενώ η γονιδιακή ροή και η εισδοχή γονιδιώματος από εξημερωμένους χοίρους λόγω ανθρώπινης παρέμβασης είναι ασθενής. Σύμφωνα λοιπόν με αυτή την υπόθεση ο χαμηλός πολυμορφισμός που παρατηρείται και στα δύο υποείδη μπορεί μόνο μερικώς να ερμηνευτεί από στενωπούς ενώ η κύρια αιτία πρέπει να αναζητηθεί αλλού. Παρόλα αυτά, πολλοί άλλοι παράγοντες όπως η γεωγραφική ή η κοινωνική απομόνωση και οι έντονες επιλεκτικές πιέσεις από σοβαρές μολύνσεις μπορεί να

επηρεάζουν το βαθμό πολυμορφισμού στο MHC (Hill *et al.*, 1991, Hedrick, 2002). Είναι προφανές ωστόσο ότι στο πλαίσιο της παρούσας ανάλυσης θα ήταν αδύνατον να αναλυθούν όλοι οι παράγοντες που συνεισφέρουν στη δόμηση του πολυμορφισμού.

Συμπερασματικά, η διαφορά πολυμορφισμού μεταξύ του *DRBI* και του *DQA* οφείλεται στο ρόλο των δύο μορίων στις ανοσοαπαντήσεις και στην εξειδίκευση των μορίων σε διαφορετικούς λειτουργικούς ρόλους. Ο συγκριτικά χαμηλότερος πολυμορφισμός του *DRBI* εξηγείται μερικώς από φαινόμενα στενωπού στο παρελθόν του αγριόχοιρου και από την εξημέρωση στον οικόσιτο χοίρο. Η ισοζυγούσα επιλογή δρα αντισταθμιστικά σε αυτή την απώλεια αλληλομόρφων όπως και σε άλλα είδη που έχουν υποστεί στενωπό. Ωστόσο, η κύρια μορφή δράσης της ισοζυγούσας επιλογής που είναι η συχνο-εξαρτώμενη επιλογή εμφανίζεται μόνο σε ορισμένους πληθυσμούς, σε αυτούς δηλαδή που εμφανίζουν τον υψηλότερο πολυμορφισμό τόσο σε αριθμό αλληλομόρφων όσο και σε επίπεδο θυλάκων ενώ απουσιάζει από τις περιοχές με το χαμηλότερο πολυμορφισμό. Οι παραπάνω επιλεκτικές πιέσεις θα πρέπει να συμψηφιστούν και με άλλους γεωγραφικούς ή κοινωνικούς παράγοντες για να διαλευκανθούν πλήρως οι μηχανισμοί που οδηγούν την εξέλιξη στο MHC του *Sus scrofa*.

Πολυμορφισμός του MHC-DRBI και MHC-DQA στο *Lepus europaeus*

Μέχρι στιγμής στον ευρωπαϊκό λαγό η μόνη μελέτη που αφορά το MHC εξετάζει την ποικιλότητα και την εξέλιξη του *DQA* στα leporidae (SurrIDGE *et al.*, 2008) και η δεύτερη αφορά το χαρακτηρισμό αλληλουχιών του εξωνίου 2 του *DQA* στον ευρωπαϊκό λαγό και τις συγκρίνει με αλληλουχίες *DQA* του κουνελιού, *Oryctolagus cuniculus* (de Bellocq *et al.*, 2009). Στην πρώτη περίπτωση μελετήθηκαν 53 άτομα που ανήκουν σε 16 διαφορετικά είδη leporidae ενώ στη δεύτερη αναλύθηκε το *DQA* σε 267 λαγούς από την Αυστρία και το Βέλγιο. Στην παρούσα μελέτη ο πολυμορφισμός του *DQA* και του *DRBI* αναλύεται σε ένα πολύ μεγαλύτερο δείγμα με εκτενή γεωγραφική κατανομή και συμπεριλαμβάνονται και δείγματα από την Ανατολία (Τουρκία και Ισραήλ). Επιπλέον, για τα ίδια δείγματα υπάρχουν μοριακά δεδομένα και από άλλους πυρηνικούς και μιτοχονδριακούς βιοδείκτες, γεγονός που επέτρεψε τη σύγκριση αυτών των δεικτών με τα δεδομένα από την ανάλυση του MHC.

Σε αυτή τη μελέτη προσδιορίστηκαν 37 αλληλόμορφα *DQA* και 61 αλληλόμορφα *DRB1*. Όσο αφορά στο *DQA* σε κανένα άτομο δεν ανιχνευτήκαν περισσότερες από δύο αλληλουχίες το οποίο υποδηλώνει ότι μόνο ένας τύπος MHC ενισχύθηκε και ότι αυτό το γονίδιο είναι μοναδικό στο γονιδίωμα του *L. europaeus*. Αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα σε άλλα είδη *Lepus* και *leporidae* (LeGuern *et al.*, 1985, Sittisombut & Knight, 1986, Fain *et al.*, 2001, Surrridge *et al.*, 2008, de Bellocq *et al.*, 2009). Για την περιοχή DR δεν υπάρχει κανένα δεδομένο στο λαγό ενώ βρίσκεται σε εξέλιξη το πρόγραμμα χαρτογράφησης του γονιδιώματος του κουνελιού. Στην πολυγονιδιακή οικογένεια DR έχουν συμβεί διάφοροι διπλασιασμοί, ανασυνδυασμοί και συστολές (contraction) κατά την εξέλιξή της. Η πλαστικότητα της περιοχής DR με τον πολυμορφισμό στον αριθμό των γονιδίων *DRB* σε σύγκριση με το συντηρημένο αριθμό γονιδίων στις DP και DQ είναι αξιοπερίεργη. Αυτά τα χαρακτηριστικά προτείνουν ότι τα γονίδια στη DR υπόκεινται σε διακριτές επιλεκτικές πιέσεις από τα άλλα γονίδια τάξης II. Αυτό καταδεικνύεται από το συντηρημένο *DRA* τόπο στο ένα άκρο και από τον αλληλομορφικό και απλοτυπικό πολυμορφισμό των *DRB* τόπων στο άλλο. Ο λόγος για αυτή τη διαφορά πρέπει να σχετίζεται με μια εξελικτική επιλογή που δρα στην αντιγονοπαρουσιαστική λειτουργία των μορίων DR. Οι απλοτυπικές σειρές και οι περισσότεροι *DRB* τόποι που υπάρχουν σήμερα, δημιουργήθηκαν νωρίς κατά την εξέλιξη των θηλαστικών. Επίσης, η μεγάλη αναλογία ρετροστοιχείων (retroelements) μέσα στην περιοχή HLA-DR τάξης II συνεισέφερε σημαντικά στην εξέλιξη αυτής της χρωμοσωμικής περιοχής (Andersson, 1998). Για το λόγο αυτό εξετάστηκε η έκφραση των πιθανών γονιδίων *DRB* στο *Lepus europaeus* με τη μεθοδολογία της αντίστροφης μεταγραφής. Ύστερα από αλληλούχιση των εξονίων 2 και 3 που ενισχύθηκαν με RT-PCR βρέθηκε ότι μόνο ένα γονίδιο *DRB* εκφράζεται και άρα στην περιοχή DR υπάρχει μόνο ένα λειτουργικό γονίδιο *DRB*, το *DRB1*. Η ανάλυση κατά Southern που πραγματοποιήθηκε στο *L. europaeus* για εύρεση των τόπων *DRB* έδειξε ότι υπάρχουν πέντε τόποι, προτείνοντας ότι υπάρχει ένα λειτουργικό γονίδιο *DRB* και άλλα τέσσερα ψευδογονίδια. Όσο αφορά την περαιτέρω ανάλυση με PCR-SSCP σε κανένα άτομο δεν ανιχνευτήκαν περισσότερες από δύο αλληλουχίες το οποίο ενισχύει το ότι μόνο ένας τύπος MHC ενισχύθηκε.

Τα συνολικά αποτελέσματα δείχνουν ένα αξιόλογο επίπεδο πολυμορφισμού για το *DQA* και το *DRB1*, που συμφωνεί γενικώς με τα αποτελέσματα προηγούμενων

αναλύσεων της ποικιλότητας δεικτών του mtDNA (Mamuris *et al.*, 2001, Stamatis *et al.*, 2009), τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (Mamuris *et al.*, 2002), αλλοενζύμων (Suchentrunk *et al.*, 2003, Sert *et al.*, 2005) και μικροδορυφόρων (Ben Slimen *et al.*, 2008) του είδους.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τη δειγματοληπτική πυκνότητα σε σχέση με τον αριθμό των αλληλομόρφων που προσδιορίστηκαν, το οποίο αντανακλάται στις τιμές Rs, η περιοχή της Ανατολής εμφάνισε τα μεγαλύτερα επίπεδα πολυμορφισμού στο *DQA* και στο *DRB1*. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με δεδομένα από δείκτες mtDNA και αλλοενζύμων (Sert *et al.*, 2005, Stamatis *et al.*, 2009) και μάλλον οφείλεται στη βιογεωγραφική θέση της Ανατολής η οποία, διαχρονικά, χαρακτηρίζεται από λίγους περιβαλλοντικούς φραγμούς, επιτρέποντας τη γονιδιακή ροή κατά τις περιόδους του Πλειστόκαινου και του Ολόκαινου για πολλά είδη θηλαστικών (Cheylan, 1991, Roberts *et al.*, 1999). Παρά τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού στους ανατολικούς πληθυσμούς, για το *DQA* δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική διαφορά στο συνολικό αριθμό των παραλλαγών θυλάκων ανάμεσα στις τέσσερις γεωγραφικές περιοχές (SEEA, 17; OVERa, 15; CEUa, 18; AMa, 14) ενώ στο *DRB1* παρατηρήθηκαν περισσότεροι συνδυασμοί θυλάκων στην Ευρώπη (SEEA, 14; OVERa, 9; CEUa, 26; AMa, 11). Αξίζει, ωστόσο, να αναφερθεί ότι στην Ευρώπη υπήρχαν αλληλόμορφα που μοιράζονταν κοινούς θύλακες ενώ στις υπόλοιπες περιοχές σχεδόν κάθε αλληλόμορφο είχε το δικό του μοναδικό συνδυασμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο συνδυασμός FEYAAF/EYWRA που τον φέρουν στη CEUa τα αλληλόμορφα *Leeu-DRB1*02*, *16*, *17*, *20*, *56*, *57* ενώ στην περιοχή OVERa και τα εννέα αλληλόμορφα έχουν το δικό τους συνδυασμό θυλάκων και στη SEEA μόνο τα *Leeu-DRB1*01* και *11* μοιράζονται το συνδυασμό YEDRSY/EYWLR. Δηλαδή, για το *DRB1* ο μεγαλύτερος πολυμορφισμός στην Ευρώπη μπορεί ενδεχομένως να οφείλεται στην ανάλυση περισσότερων πληθυσμών με άτομα αρκετά απομακρυσμένα μεταξύ τους τόσο διαπληθυσμιακά όσο και ενδοπληθυσμιακά, σε περιοχές που εμφανίζουν περιβαλλοντική ετερογένεια και κατ' επέκταση δράση διαφορετικών επιλεκτικών δυνάμεων σε κάθε περιοχή.

Οι προηγούμενες παρατηρήσεις αποτελούν ενδείξεις ότι η επιλεκτική πίεση έχει διαφορετικό αποτέλεσμα κατά μήκος του εξωνίου και ειδικότερα στα κωδικόνια της PBR. Ωστόσο, παρά τα υψηλά επίπεδα γενετικού πολυμορφισμού, ο λειτουργικός πολυμορφισμός φαίνεται να υπόκειται σε περιορισμούς.

Σε αυτό συνηγορεί και το γεγονός ότι στο *DRB1* βρέθηκαν σε διαφορετικούς πληθυσμούς διαφορετικά αλληλόμορφα που ωστόσο μοιράζονται κοινό συνδυασμό θυλάκων όπως π.χ. το *Leeu-DRB1*06* στη SEEa με τα *Leeu-DRB1*49, 50, 53* της CEUa και το *Leeu-DRB1*08* στη SEEa με το *Leeu-DRB1*19* της CEUa. Μία ακόμη ένδειξη που συγκλίνει σε αυτή την κατεύθυνση είναι η ομοιότητα που παρατηρείται στους θύλακες του *Leeu-DRB1*05* (FDDRQV/DYWIR) των SEEa και OVERa με τους θύλακες των *Leeu-DRB1*27, 28* και *29* (FDDRQV/DYWFR) της AMa. Όπως παρατηρείται αυτά διαφέρουν μόνο σε ένα αμινοξύ της P7. Πιο χαρακτηριστική περίπτωση είναι αυτή των αλληλομόρφων *Leeu-DRB1*43* και *44* που παρόλο που το πρώτο υπάρχει μόνο στην AMa και το δεύτερο στη CEUa μοιράζονται τον ίδιο συνδυασμό θυλάκων. Και για το *DQA* βρέθηκαν σε διαφορετικούς πληθυσμούς διαφορετικά αλληλόμορφα που μοιράζονται κοινό συνδυασμό θυλάκων με πιο χαρακτηριστική την περίπτωση του συνδυασμού YHLFWT/NETAN/YNILR που υπάρχει στα αλληλόμορφα *Leeu-DQA*29* (BG, A, F, D, NL, GB), *Leeu-DQA*36* (TR) και *Leeu-DQA*50* (CH).

Όπως και πολλοί άλλοι ζωικοί πληθυσμοί, οι πληθυσμοί του λαγού στην Κεντρική Ευρώπη έχουν επηρεαστεί από την τελευταία παγετωνική περίοδο που έληξε πριν από 18.000 χρόνια. Οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί προέκυψαν μετά την απομάκρυνση των πάγων στο τέλος της περιόδου του Πλειστόκαινου. Δύο μελέτες του mtDNA (Kasapidis *et al.*, 2005, Stamatis *et al.*, 2009) έχουν δείξει ότι η μεταπαγετώνια αποίκιση μεγάλων τμημάτων της Ευρώπης προέκυψε από ένα αρχικό πληθυσμό στην αρχή του Ολόκαινου που τοποθετείται στα Κεντρικά ή Νοτιοκεντρικά Βαλκάνια. Θεωρητικά πληθυσμοί που έχουν προκύψει από καταφύγια του Πλειστόκαινου έχουν πιθανώς υποστεί μείωση της γενετικής ποικιλότητας ως συνέπεια φαινομένων της αρχής του ιδρυτή και αυτό αληθεύει για μεγάλο αριθμό ζωικών ειδών (Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 2000). Αυτό αληθεύει επίσης και στην περίπτωση του *L. europaeus* δεδομένου ότι οι πληθυσμοί του στην Κεντρική και Βόρεια Ευρώπη εμφανίζουν χαμηλότερη γενετική ποικιλομορφία σε σχέση με τους πληθυσμούς των Βαλκανίων και της Ανατολής, όπως προκύπτει από ανάλυση του mtDNA (Stamatis *et al.*, 2009) και αλλοενζύμων (Sert *et al.*, 2005). Τα πρότυπα ποικιλότητας, ωστόσο, των τόπων *DQA* και *DRB1* δε συμφωνούν με αυτό το φυλογεωγραφικό σενάριο καθώς πληθυσμοί της Κεντρικής και Βόρειας Ευρώπης δείχνουν όμοιο ή ακόμη και μεγαλύτερο πολυμορφισμό (π.χ. για το *DQA* η F, η A και

η GB, και για το *DRBI* η A, η D, η GB και η CH) από τους πληθυσμούς των Βαλκανίων και της Ανατολής. Στον πληθυσμό της GB, για παράδειγμα, αν και τα επίπεδα ποικιλομορφίας στο mtDNA είναι εξαιρετικά χαμηλά (Stamatis *et al.*, 2009), ο πληθυσμός διαθέτει αξιόλογο πολυμορφισμό για το *DQA* και το *DRBI* τόσο ως προς ολόκληρο το εξόνιο όσο και ως προς τον αριθμό των παραλλαγών θυλάκων. Σίγουρα, αυτοί οι πληθυσμοί έφεραν μόνο ένα τμήμα της γενετικής ποικιλομορφίας που υπήρχε στα καταφύγια της Νότιας Ευρώπης και επιπλέον ίσως μέρος του πολυμορφισμού να χάθηκε και μέσω τυχαίας γενετικής παρέκκλισης. Ωστόσο, όπως ήδη αναφέρθηκε, είδη τα οποία έχουν υποστεί πληθυσμιακές στενωπούς διατηρούν τον πολυμορφισμό τους στο MHC μέσω της ισοζυγούσας επιλογής. Αυτά τα ευρήματα συνηγορούν ότι η τελευταία περίοδος των παγετώνων δεν επηρέασε τον πολυμορφισμό στο MHC ή ότι η όποια απώλεια παρατηρήθηκε αντισταθμίστηκε χάρη στη δράση της ισοζυγούσας επιλογής σε συνδυασμό με τον περίπλοκο τρόπο εξέλιξης του MHC (θετική επιλογή των υποκαταστάσεων, διατήρηση σπάνιων αλληλομόρφων μέσω συχνο-εξαρτώμενης επιλογής).

Η ανάλυση της αλληλομορφικής κατανομής αποκάλυψε επτά κοινά *DQA* αλληλόμορφα μεταξύ Ελλάδας και Ευρώπης (τα *Leeu-DQA*14*, *15* και *27-31*) και 14 παραλλαγές θυλάκων [P1 (5), P6 (4) και P9 (5)]. Για το *DRBI* βρέθηκαν πέντε κοινά αλληλόμορφα (τα *Leeu-DRBI*01*, *02*, *03*, *07* και *08*) και 14 παραλλαγές θυλάκων [P4 (7) και P7 (7)]. Σε γενικές γραμμές αυτή η κατανομή συμφωνεί με την κατανομή της ποικιλότητας των αλλοενζύμων (Suchentrunk *et al.*, 2003) αλλά διαφοροποιείται από την κατανομή των απλοτύπων mtDNA, το οποίο δείχνει ότι η Ελλάδα και η Κεντρική Ευρώπη έχουν δύο διαφορετικές φυλογενετικές γραμμές mtDNA (Stamatis *et al.*, 2009). Η πιο λογική εξήγηση για τα κοινά αλληλόμορφα είναι ότι αυτά προέκυψαν από αρχαίες αλληλουχίες οι οποίες διατηρήθηκαν στους πληθυσμούς ή από υψηλή γονιδιακή ροή σε μεγάλες γεωγραφικές αποστάσεις. Εναλλακτικά, μπορεί να προέκυψαν από την εισαγωγή λαγών από την Κεντρική Ευρώπη στην Ελλάδα οι οποίοι ανατράφηκαν σε εκτροφεία και απελευθερώθηκαν (Mamuris *et al.*, 2001, Stamatis *et al.*, 2007). Υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής ανιχνεύθηκαν επίσης και μεταξύ των πληθυσμών των Βαλκανίων (Ελλάδα και Βουλγαρία) όπως καταγράφεται από τον αριθμό των αλληλομόρφων που μοιράζονται (επτά για το *DQA* και πέντε για το *DRBI*).

Σε κάθε περίπτωση ωστόσο σε κάθε πληθυσμό καταγράφηκαν μοναδικά αλληλόμορφα όπως για το *DQA* στην Ελλάδα τα *Leeu-DQA*16, 17, 19, 32, 33, 40* και *41* και τα *Leeu-DQA*42–50* στην υπόλοιπη Ευρώπη. Για το *DRB1* τα *Leeu-DRB1*04, 05, 06* και *9-12* και *14, 15* είναι μοναδικά στον ελληνικό χώρο ενώ στην Ευρώπη τα *Leeu-DRB1*16-22, 24, 26,30, 31, 34, 35, 37-39* και *44-59*. Μεγάλο δηλαδή ποσοστό των αλληλομόρφων ήταν ειδικά για πληθυσμούς ενώ κάποια από αυτά ανιχνεύτηκαν και σε μεγάλες συχνότητες, όπως για το *DQA* το *Leeu-DQA*35* στην TR (11,82%), το *Leeu-DQA*39* στο IL (23,08%) και το *Leeu-DQA*47* στην CH (13,36%) και για το *DRB1* τα *Leeu-DRB1*27* και *29* στην TR (27,94% και 20,59% αντίστοιχα), το *Leeu-DRB1*33* στο IL (28,57%), το *Leeu-DRB1*37* στην IT (10,00%), το *Leeu-DRB1*48* στη D (11,11%), τα *Leeu-DRB1*52* και *55* στη GB (12,5% και 25% αντίστοιχα), το *Leeu-DRB1*56* στη NL (100%) και το *Leeu-DRB1*57* στην IT (80%). Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν ότι η γονιδιακή ροή είναι ανίκανη από μόνη της να ομογενοποιήσει τις γονιδιακές δεξαμενές εντελώς και/ή διάφορες επιλεκτικές πιέσεις διατηρούν τις αλληλομορφικές διαφορές στο MHC. Διάφοροι άλλοι παράγοντες οι οποίοι περιλαμβάνουν παθογόνους παράγοντες και το σύστημα ζευγαρώματος πιθανόν να οδηγούν την εξέλιξη του MHC (Arañius *et al.*, 1997).

Σύμφωνα με δεδομένα στο mtDNA, τα Νοτιο-ανατολικά Βαλκάνια (Βουλγαρία και Βορειο-ανατολική Ελλάδα) σχηματίζουν μια ζώνη επαφής (OVERa) στην οποία αναμειγνύονται απλότυποι όλων των σειρών mtDNA (Ευρωπαϊκοί και Ανατολικοί) και έτσι δημιουργείται μια εξαιρετική γενετική ποικιλότητα (Stamatis *et al.*, 2009). Αντίθετα με το mtDNA, τα αλληλόμορφα *DQA* από τους ανατολικούς πληθυσμούς δεν εκτείνονται σε αυτή τη ζώνη επαφής. Τα δεδομένα του *DRB1*, ωστόσο δείχνουν ότι μεταξύ των δύο περιοχών υπάρχουν 3 κοινά αλληλόμορφα δύο εκ των οποίων (τα *Leeu-DRB1*01* και *03*) είναι κοινά σε όλους τους πληθυσμούς. Το *Leeu-DRB1*05* βρίσκεται σε μεγάλη συχνότητα στη Νότια Ελλάδα και η συχνότητά του μειώνεται προς τα βόρεια και ανιχνεύεται σε πολύ μικρή συχνότητα στη Βορειο-ανατολική Ελλάδα και στην Τουρκία. Δεδομένα από αναλύσεις διαφορετικών γενετικών δεικτών (mtDNA, Stamatis *et al.*, 2009, αλλοένζυμα, Sert *et al.*, 2005) παρέχουν ενδείξεις για μια παλαιότερη γονιδιακή ροή από την Ανατολή προς την Ευρώπη στο τέλος του Πλειστόκαινου. Επιπλέον, κοινές παραλλαγές θυλάκων ανιχνεύτηκαν ανάμεσα στην AMa και την OVERa. Τέλος, υπολογισμοί του Rs

δείχνουν ότι η περιοχή που αντιστοιχεί στη Βορειο-ανατολική Ελλάδα και τη Βουλγαρία δεν δείχνει ιδιαίτερα υψηλό επίπεδο γενετικής ποικιλομορφίας στο *DQA* και στο *DRB1*.

Η ανάλυση της αλληλομορφικής κατανομής έδειξε ξεκάθαρα για το *DQA* ότι η Ευρώπη και η Ανατολή δεν μοιράζονται κοινά αλληλόμορφα. Αυτό φάνηκε και από τις τιμές F_{ST} μεταξύ της Τουρκίας και του Ισραήλ με όλους τους υπόλοιπους πληθυσμούς. Στην περίπτωση όμως του *DRB1* παρατηρήθηκαν κοινά αλληλόμορφα μεταξύ Ευρώπης και Ανατολής. Πιο συγκεκριμένα, τα κοινά αλληλόμορφα μεταξύ CEUa και AMa είναι τα *Leeu-DRB1*01*, *03*, *07*, *08* και *34*. Τα *Leeu-DRB1*01* και *03* είναι αλληλόμορφα που παρατηρούνται σε όλους τους πληθυσμούς. Τα *Leeu-DRB1*07* και *08* παρατηρούνται σε χαμηλή συχνότητα σε κάποιους ελληνικούς πληθυσμούς και στον πληθυσμό της Τουρκίας ενώ είναι τα κυρίαρχα αλληλόμορφα στη Γαλλία και στη Μεγάλη Βρετανία αντίστοιχα. Το *Leeu-DRB1*34* παρατηρήθηκε σε πολύ μικρή συχνότητα στην Αυστρία και στην Τουρκία. Οι τιμές F_{ST} που καταγράφηκαν για την Τουρκία και το Ισραήλ σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς είναι γενικά λίγο μικρότερες από το *DQA* ενώ στην περίπτωση της Γαλλίας, της Αυστρίας και της Μεγάλης Βρετανίας οι τιμές F_{ST} με την Τουρκία είναι αρκετά πιο χαμηλές και σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς και σε σχέση με τις τιμές που καταγράφονται για το *DQA*.

Τα αλληλόμορφα *Leeu-DRB1*01* και *03* υπάρχουν σε γενικές γραμμές σε όλους τους πληθυσμούς και πιθανόν να αντιπροσωπεύουν αρχαίες σειρές αλληλομόρφων που εξαιτίας πλεονεκτήματος που προσφέρουν διατηρούνται στους πληθυσμούς (Klein *et al.*, 1998). Τα υπόλοιπα αλληλόμορφα που ανιχνεύονται σε πιο μικρές συχνότητες πιθανόν να είναι το αποτέλεσμα εισαγωγής λαγών από χώρες της Κεντρικής Ευρώπης στην Τουρκία κάτι που έχει συμβεί και στην Ελλάδα (Mamuris *et al.*, 2001; Stamatis *et al.*, 2007). Ωστόσο, δεδομένα από μακροχρόνιες μελέτες εμπλουτισμών λαγών στην Ελλάδα, έδειξαν ότι οι εισαγόμενοι λαγοί είχαν μεγάλες δυσκολίες προσαρμογής και παρ' όλους τους μαζικούς εμπλουτισμούς πολύ μικρό ποσοστό των ζώων τελικά επιβίωσαν (Stamatis *et al.*, 2007). Μία ακόμη πιθανή εξήγηση είναι ο ενδογονιδιακός ανασυνδυασμός, ο οποίος θεωρείται ότι συμβαίνει στα γονίδια του MHC και είναι ένας σημαντικός εξελικτικός μηχανισμός στη δημιουργία ποικιλότητας στο MHC (Andersson & Mikko, 1995; Richman *et al.*, 2003). Τόσο το *DQA* όσο και το *DRB1* περιείχαν τις χ -like αλληλουχίες οι οποίες

θεωρούνται σημαντικές θέσεις για γονιδιακό ανασυνδυασμό. Ωστόσο, οι περισσότερες ενδείξεις συγκλίνουν στο ότι ο γονιδιακός ανασυνδυασμός δεν αποτελεί σημαντικό μηχανισμό που δημιουργεί ποικιλομορφία στα γονίδια του MHC (Martinsohn *et al.*, 1999). Επιπλέον, έχει δειχτεί ότι έχει ομογενοποιητική δράση παρά αποκλίνουσα στον πολυμορφισμό (Eickbush & Eickbush, 2007). Γενικά, η υπόθεση του γονιδιακού ανασυνδυασμού δεν προσφέρει κάποιο μεγαλύτερο πλεονέκτημα περισσότερο από την υπόθεση των μεταλλάξεων (δηλαδή, ότι οι μεταλλάξεις που διατηρούνται μέσω θετικής επιλογής είναι η κύρια πηγή ποικιλομορφίας του MHC) στην εξήγηση της μεγάλης ποικιλότητας που συσσωρεύεται σε σύντομο χρονικό διάστημα στο μόριο αυτό (Klein *et al.*, 2007). Είναι επομένως, πολύ πιθανό ότι η δυσκολία στην ανίχνευση γονιδιακής ροής μεταξύ Ευρώπης και Ανατολής οφείλεται στις σημειακές μεταλλάξεις που διαφοροποιούν σε σύντομο χρονικό διάστημα τις γονιδιακές δεξαμενές του MHC και ακυρώνουν τα όποια επίπεδα γονιδιακής ροής. Διάφορα *DQA* αλληλόμορφα διέφεραν μεταξύ τους μόνο σε λίγες υποκαταστάσεις, π.χ. τα *Leeu-DQA*21* (AMa) και *Leeu-DQA*42* (BL) διέφεραν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο, και *Leeu-DQA*16* (GR-NE) και *Leeu-DQA*39* (AMa) και *Leeu-DQA*31* (GR-NE) και *Leeu-DQA*37* (AMa) είχαν μόνο τρεις διαφορετικές υποκαταστάσεις. Στο *DRB1* ωστόσο τα αλληλόμορφα μεταξύ Ευρώπης και Ανατολής διέφεραν συνήθως σε περισσότερες από μία υποκαταστάσεις. Υπήρχαν όμως αλληλόμορφα Ευρώπης και Ανατολής που ενώ η περιοχή PBR ήταν κοινή είχαν διαφορές στο υπόλοιπο τμήμα του εξωνίου. Αυτό παρατηρείται στα αλληλόμορφα *Leeu-DRB1*43* (AMa) και *Leeu-DRB1*44* (CEUa, A) όπου ενώ έχουν κοινό PBR εν τούτοις έχουν επτά διαφορές στο υπόλοιπο τμήμα. Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι και τα δύο αλληλόμορφα έχουν κοινό PBR και με το *Leeu-DRB1*03* που είναι το πιο κοινό αλληλόμορφο σε όλους τους πληθυσμούς. Ακόμη πιο εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι το *Leeu-DRB1*44* (CEUa) έχει μόνο μια συνώνυμη υποκατάσταση με το *Leeu-DRB1*03* ενώ το *Leeu-DRB1*43* (AMa) έχει έξι νουκλεοτιδικές αλλαγές. Ένα πιθανό σενάριο που εξηγεί τις παραπάνω παρατηρήσεις είναι ότι το *Leeu-DRB1*03* διατηρήθηκε σε υψηλές συχνότητες σε όλους τους πληθυσμούς λόγω εξελικτικού πλεονεκτήματος που προσφέρει, ενώ εξαιτίας των σημειακών μεταλλάξεων δημιουργήθηκε σε αυτό μόνο μία συνώνυμη μετάλλαξη. Από την άλλη το *Leeu-DRB1*43* (AMa) είναι αλληλόμορφο που προέκυψε στην Ανατολή και εξαιτίας των συντηρητικών περιορισμών του λειτουργικού

πολυμορφισμού που περιγράφηκαν προηγουμένως διατήρησε την ίδια PBR αλλά υπήρξαν σημειακές μεταλλάξεις στο υπόλοιπο τμήμα. Τα παραπάνω πρότυπα κατανομής των αλληλομόρφων *DQA* και *DRB1* συνηγορούν στην κατεύθυνση ότι τα δύο γονίδια έχουν διαφορετικό ρυθμό εξέλιξης και γι' αυτό οι δυνάμεις εξέλιξης του MHC δρουν με διαφορετική ένταση σε κάθε ένα τόπο. Τα επιδημιολογικά δεδομένα των παθογόνων μικροοργανισμών ποικίλουν τόσο κατά τη διάρκεια του χρόνου όσο και μεταξύ των πληθυσμών. Σε αυτό το ζήτημα θα μπορούσε να βοηθήσει μία μελέτη σχετικά με το παρασιτικό φορτίο (parasite load) και την αντοχή στις διάφορες μολυσματικές ασθένειες στους λαγούς. Η διατήρηση αλληλομόρφων του *DRB1* ανάμεσα στους πληθυσμούς δείχνει και τη σημασία τους στη γενετική ευρωστία των πληθυσμών καθώς η διατήρηση αυτών των αλληλομόρφων συνεπάγεται πλεονέκτημα των πληθυσμών εφόσον έχουν άτομα ικανά να εγείρουν ανοσοαπαντήσεις (Klein *et al.*, 1998).

Συμπερασματικά, ο λαγός είναι ένα είδος στο οποίο καταγράφεται αξιόλογος γενετικός πολυμορφισμός στο MHC βάσει των αποτελεσμάτων των τόπων *DQA* και *DRB1*. Η περιοχή της Ανατολής διαθέτει τα μεγαλύτερα επίπεδα πολυμορφισμού και για τους δύο τόπους κάτι που ενδεχομένως οφείλεται είτε στο ρόλο που έπαιξε ως καταφύγιο κατά τη διάρκεια της τελευταίας παγετωνικής περιόδου, είτε στη γεωγραφική της θέση με την απουσία φυσικών φραγμών για τη μετακίνηση των πληθυσμών. Στην Ευρώπη, αν και θεωρητικά αναμένεται μείωση του πολυμορφισμού από το Νότο προς το Βορά ως αποτέλεσμα φαινομένων του ιδρυτή, που ακολούθησαν το λιώσιμο των πάγων μετά την τελευταία παγετωνική περίοδο, τα δεδομένα δείχνουν σταθερά επίπεδα υψηλού πολυμορφισμού σε όλη την Ευρώπη, πιθανότατα χάρη στη δράση της ισοζυγούσας επιλογής. Η άμεση αντίδραση των μορίων του MHC σε σύγχρονες επιλεκτικές πιέσεις, καθιστά δυσχερή τη χρήση του ως δείκτη μελέτης φυλογεωγραφικών και φυλογενετικών φαινομένων. Η έντονη δε μεταλλακτικότητα του εμποδίζει την ανάλυση και τον εντοπισμό της γονιδιακής ροής σε σχέση με άλλους πιο ουδέτερους δείκτες όπως το mtDNA και οι μικροδορυφόροι. Στο *DRB1* διαπιστώθηκε η ύπαρξη κοινών αλληλομόρφων σε ένα ευρύ φάσμα πληθυσμών σε αντίθεση με το *DQA* για το οποίο κοινά αλληλόμορφα βρέθηκαν ανάμεσα σε λιγότερους πληθυσμούς. Υποθέτουμε λοιπόν ότι στο *DRB1* υπάρχουν πιο αρχαία αλληλόμορφα. Παράλληλα αλληλόμορφα με κοινή προέλευση του *DRB1* διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερο από αυτά του *DQA* υποδηλώνοντας ότι τα δύο αυτά γονίδια

έχουν διαφορετικό ρυθμό εξέλιξης. Η επιδημιολογία των παθογόνων παραγόντων και η περιβαλλοντική ετερογένεια ποικίλλει τόσο κατά τη διάρκεια του χρόνου όσο και μεταξύ των πληθυσμών και η επίδραση αυτών στο MHC θα βοηθούσε στην πλήρη αποσαφήνιση των μηχανισμών που οδηγούν την εξέλιξή του.

Πολυμορφισμός του MHC-DRB1 και MHC-DQA2 στο *Ovis aries*

Το *O. aries* είναι ένα εξημερωμένο είδος σπουδαίας οικονομικής σημασίας για τον άνθρωπο. Αυτός είναι πιθανότατα και ο λόγος που το MHC είναι καλύτερα μελετημένο σε σχέση με τα άλλα δύο είδη κυρίως επειδή καταβάλλεται προσπάθεια να συσχετίσουν συγκεκριμένα αλληλόμορφα με ασθένειες και στη συνέχεια να ενσωματωθούν σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης. Οι μέχρι τώρα μελέτες εξετάζουν τον πολυμορφισμό του *DRB1* και σε μικρότερο βαθμό τον πολυμορφισμό στο *DQA2* καταγράφοντας υψηλά ποσοστά ποικιλομορφίας σε διάφορες φυλές προβάτων. Για το *DRB1* έχουν μελετηθεί 52 άτομα της φυλής Suffolk με 16 αλληλόμορφα (Konnai *et al.*, 2003), 31 άτομα Φιλανδικών και Ρωσικών φυλών με 19 αλληλόμορφα (Kostia *et al.*, 1998), 32 άτομα μία άλλης φυλής προβάτων με 15 αλληλόμορφα (Herrmann *et al.*, 2005), 187 άτομα της φυλής Laxta με 19 αλληλόμορφα (Arrieta-Aguirre *et al.*, 2006) ενώ μελέτη έχει γίνει και σε πρόβατα κινεζικών φυλών (Dongxiao & Yuan, 2004). Όσον αφορά το *DQA2* έχει μελετηθεί σε πολύ μικρότερη έκταση, με 23 αλληλόμορφα να ανιχνεύονται σε έξι διαφορετικές φυλές (Merino, Corriedale, Borderdale, Romney, Awassi, και Finnish Landrace), μία μελέτη 2.000 προβάτων (Hickford *et al.*, 2004) και 12 αλληλόμορφα να ανιχνεύονται σε μελέτη των φυλών Merino και Romney (Snibson *et al.*, 1998).

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν 102 άτομα που ανήκουν σε τέσσερις διαφορετικές φυλές και στις οποίες καταγράφηκαν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και για τα δύο γονίδια. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν 48 *Ovar-DRB1* αλληλόμορφα και 46 *MHC-DQA2*. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε επτά άτομα βρέθηκαν μέχρι τρεις αλληλουχίες *DQA2* και συνεπώς διαθέτουν δύο τύπους *DQA2*, αποτέλεσμα που συμφωνεί με προηγούμενες αναλύσεις (Hickford *et al.*, 2004).

Μεταξύ των φυλών που αναλύθηκαν δεν υπάρχει κάποιο *DRB1* αλληλόμορφο το οποίο να εμφανίζεται σε όλες τις φυλές. Για το *DQA2* μόνο τα αλληλόμορφα *Ovar-DQA2*04* και *05* υπάρχουν σε όλες τις φυλές. Ο μεγαλύτερος πολυμορφισμός σε επίπεδο *DRB1* αλληλομόρφων και συνδυασμό θυλάκων παρατηρείται στη φυλή

Comisana. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που κάθε θύλακας δεν έχει σημαντικά αυξημένο αριθμό παραλλαγών, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός των συνδυασμών αυτών (39 διαφορετικοί συνδυασμοί σε 48 αλληλόμορφα). Αυτό σημαίνει ότι το 80% των αλληλομόρφων φέρει το δικό του συνδυασμό. Το ίδιο φαινόμενο είναι έντονο και για το *DQA2* όπου για κάθε θύλακα παρατηρούνται ακόμη λιγότερες παραλλαγές αλλά και σε αυτή την περίπτωση παρατηρούνται 32 διαφορετικοί συνδυασμοί σε 46 αλληλόμορφα. Για το *DQA2* το μεγαλύτερο πολυμορφισμό παρουσίασε η φυλή Frizarta τόσο σε αριθμό αλληλομόρφων όσο και σε αριθμό διαφορετικών συνδυασμών θυλάκων. Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες φυλές μοιράζονται λίγα κοινά αλληλόμορφα και στα δύο γονίδια οι τιμές F_{ST} δείχνουν μεγαλύτερη διαφοροποίηση για τη φυλή Μπούτσικα λευκό κεφάλι ενώ οι υπόλοιπες φυλές είναι κοντά η μία στην άλλη. Η ανάλυση AMOVA έδειξε ότι το μεγαλύτερο μέρος του πολυμορφισμού παρατηρείται μέσα στην κάθε φυλή και δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών. Οι αιτίες του ιστάμενου, δηλαδή, πολυμορφισμού θα πρέπει να αναζητηθούν σε παθογόνους παράγοντες, άλλους γεωγραφικούς ή κοινωνικούς παράγοντες και στην περιβαλλοντική ετερογένεια. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί η σημασία της καταγραφής των διαφορετικών συνδυασμών θυλάκων και όχι στις παραλλαγές που μπορεί να έχει ο καθένας καθώς όπως εξάγεται από τα παραπάνω από ένα μικρό αριθμό παραλλαγών οι διάφορες επιλεκτικές πιέσεις μπορούν να δημιουργήσουν έναν εξαιρετικό πολυμορφισμό. Ακόμη, οι μελέτες που έχουν γίνει στα γονίδια *DRB1* του προβάτου περιλαμβάνουν τόσο ανάλυση RFLP όσο και SSCP προσπαθώντας να εντοπίσουν την καταλληλότερη μέθοδο εξαιτίας του μικρού αριθμού κοινών αλληλομόρφων μεταξύ μακρινών πληθυσμών (Kostia *et al.*, 1998).

Το βασικότερο εύρημα στη μελέτη του MHC στο *O. aries* είναι ο μεγάλος πολυμορφισμός που παρατηρείται για το *DQA2*. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το *DQA* στο *S. scrofa* εμφανίζεται μέτρια πολυμορφικό. Στο *L. europaeus* είναι σαφώς πιο πολυμορφικό αλλά και σε αυτήν την περίπτωση οι ενδείξεις συνηγορούν στην πιο έντονη δράση ισοζυγούσας επιλογής στο *DRB1*, το οποίο εμφανίζεται σαφώς πιο πολυμορφικό. Για πρώτη φορά σε αυτή τη μελέτη στο *O. aries* καταγράφεται και διαγραφή τριπλέτας νουκλεοτιδίων σε δύο αλληλουχίες του *DQA2*. Στις αλληλουχίες *Ovar-DQA2*14* και *44* απουσιάζει το κατάλοιπο *52*, το οποίο συμμετέχει στο σχηματισμό του P1. Τα αλληλόμορφα αυτά παρατηρούνται μόνο στη φυλή

Μπούτσικα με λευκό κεφάλι και διαφέρουν μεταξύ τους μόνο σε δύο νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις. Προφανώς, αυτή η διαγραφή θα έχει πολύ μεγαλύτερη επίδραση στην τριτοταγή δομή της DQα αλυσίδας και ειδικά στην περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου εφόσον το αμινοξύ που απαλείφθηκε αφορά τον P1. Ο εκτεταμένος πολυμορφισμός στη περιοχή DQ στο πρόβατο όπως αναφέρθηκε πιθανόν παρατηρείται λόγω έλλειψης της περιοχής DP. Στο πρόβατο υπάρχουν δύο γονίδια *DQA*, τα *DQA1* και *DQA2* και η μέχρι στιγμής μελέτη τους συνηγορεί στο ότι *DQA2* είναι περισσότερο πολυμορφικό από το *DQA1* (Dukkipati *et al.*, 2006). Ακόμη έχει παρατηρηθεί ότι ένα ποσοστό προβάτων (10-18%) δεν έχουν το γονίδιο *DQA1* υποδηλώνοντας ότι ο αριθμός των γονιδίων *DQA* ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών απλοτύπων κάτι που παρατηρείται στην DQ του βοδιού (Andersson & Rask, 1988) και στα ανθρώπινα *DRB* γονίδια. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα λειτουργικά μόρια είναι προϊόντα του γονιδίου *DQA2* που ζευγαρώνει με μια συμβατή β αλυσίδα (Snibson *et al.*, 1998). Ο λειτουργικός πολυμορφισμός που καταγράφηκε για το *DQA2* προτείνει έναν πιο ενεργό ρόλο της περιοχής DQ του προβάτου στις ανοσοαπαντήσεις από ότι συνηθίζεται. Η πλήρης διαλεύκανση της σπουδαιότητας αυτού του πολυμορφισμού μπορεί να γίνει μόνο ύστερα από μελέτη και των γονιδίων *DQB* καθώς και συσχέτιση αυτών με ανθεκτικότητα σε διάφορες ασθένειες.

Και στην περίπτωση του *O. aries* γίνεται αντιληπτή η παρουσία της συχνοεξαρτώμενης επιλογής τόσο βάσει των αλληλομορφικών συχνοτήτων όσο και βάσει των συχνοτήτων διαφόρων παραλλαγών θυλάκων. Σε κάθε φυλή παρατηρούνται 3-5 *DRB1* αλληλόμορφα σε υψηλές συχνότητες και τα υπόλοιπα σε χαμηλότερες. Στην περίπτωση του *DQA2* σε κάθε φυλή παρατηρούνται και πάλι από 2-5 *DQA2* αλληλόμορφα σε υψηλές συχνότητες ενώ τα υπόλοιπα ανιχνεύονται σε αρκετά χαμηλότερες συχνότητες.

MHC και φυλογεωγραφία

Τα αποτελέσματα της επιλογής που δρα μέσω στη διάρκεια της ιστορίας ενός πληθυσμού μπορεί να ανιχνευτούν από πληροφορίες στις συχνότητες των αλληλομόρφων και την κατανομή των μεταλλάξεων μέσα και μεταξύ των πληθυσμών (Piertney & Oliver, 2006). Συνήθως, το αποτύπωμα της φυσικής επιλογής στα πρότυπα των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων εμμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα, αλλά τα αποτελέσματα της επιλογής στις αλληλομορφικές συχνότητες

είναι πιο παροδικά (Garrigan & Hedrick, 2003). Μέχρι στιγμής μικροδορυφορικοί και mtDNA δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί σε αναλύσεις φυλογεωγραφίας λόγω της μεταβλητότητας και της εικαζόμενης ουδετερότητας. Το ερώτημα που τίθεται είναι αν γονίδια όπως αυτά του MHC τα οποία υπόκεινται σε ισχυρές επιλεκτικές πιέσεις ως προς τη διαμόρφωση του πολυμορφισμό τους, θα μπορούσαν να αποτελέσουν αξιόπιστους δείκτες για τη μελέτη της φυλογεωγραφίας. Αν και το MHC έχει πολλά να προσφέρει στην εξελικτική βιολογία μέσω της δια-ειδικής εξέλιξης, το πέρασμα δηλαδή αλληλομορφικών σειρών από προγονικά είδη σε επόμενα και ο πολυμορφισμός του μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση μακροπρόθεσμων πληθυσμιακών δημογραφιών (Klein *et al.*, 2007), ο ρόλος του στη μελέτη της φυλογεωγραφίας δεν έχει διασαφηνιστεί.

Είναι δεδομένο ότι η φυλογένεση ολόκληρου του εξωνίου 2 των αλληλομόρφων *Leeu-DQA* και *Leeu-DRB1* δε δίνουν ένα ισχυρό φυλογενετικό σήμα επειδή τα αλληλόμορφα που ανήκουν σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό δεν ομαδοποιούνται μαζί. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με τους mtDNA δείκτες (Stamatis *et al.*, 2009), που επιδεικνύουν ένα ισχυρό φυλογεωγραφικό σήμα σε όλες τις περιοχές. Μια πιθανή εξήγηση αυτής της διαφοράς είναι ότι προέκυψε από τη φιλοπατρία (philopatric) στη συμπεριφορά των θηλυκών ατόμων που καταλήγει σε χωρική διαφοροποίηση του mtDNA. Επιπλέον όταν στην ανάλυση για το *DQA* συμπεριλήφθηκαν αλληλουχίες και από άλλα είδη *Lepus* όπως τα *L. yarkandensis*, *L. timidus*, *L. granatensis*, *L. townsendii*, *L. saxatilis*, *L. capensis* και *L. californicus* τα οποία κατοικούν σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου, μαζί με αλληλόμορφα από μια διαφορετική τάξη λαγόμορφων (*Oryctolagus cuniculus*), αυτά τα αλληλόμορφα βρίσκονται σε όλο το δέντρο και αναμειγνύονται με τα αλληλόμορφα *DQA* του *L. europaeus*. Η απουσία φυλογεωγραφικού σήματος είναι χαρακτηριστικό μερικών τόπων του MHC (Klein *et al.*, 1998) και πιστεύεται ότι προκύπτει από την ισοζυγούσα επιλογή (Hughes *et al.*, 1996). Το ίδιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί για τόπους του MHC σε διάφορους οργανισμούς, όπως ψάρια, τρωκτικά, σαρκοβόρα ζώα, οπληφόρα ζώα και πρωτεύοντα (Figueroa *et al.*, 1988, Edwards & Hedrick, 1998, Seddon & Baverstock, 2000, Hedrick *et al.*, 2000a,b, Seddon & Ellegren, 2002, Otting *et al.*, 2002, Musolf *et al.*, 2004, Ottova *et al.*, 2005, Surridge *et al.*, 2008) και πιστεύεται ότι προκύπτει από πρωταρχικές αλληλουχίες που υπήρχαν σε ένα κοινό πρόγονο και παρέμειναν στους πληθυσμούς και μετά την

απόκλιση τους. Αυτό το φαινόμενο καλείται δια-ειδική εξέλιξη (Klein *et al.*, 1998). Ο μηχανισμός πίσω από τη δια-ειδική εξέλιξη πιστεύεται ότι είναι κάποια μορφή φυσικής επιλογής, δεδομένου ότι οι ουδέτεροι πολυμορφισμοί δεν αναμένεται να εμμένουν για μακρά διαστήματα στους πληθυσμούς, και καταλήγει σε πιο στενή συγγένεια αλληλομόρφων διαφορετικών ειδών σε σχέση με αλληλόμορφα που βρίσκονται στο ίδιο είδος. Η διατήρηση των συγκεκριμένων αλληλομορφικών σειρών πρέπει να αναζητηθεί στην ανάγκη για μια συγκεκριμένη ανοσοαπάντηση σε ένα κοινό παθογόνο, και αυτό προκύπτει από την παρατήρηση ότι τα γένη *Lepus* και *Oryctolagus* μοιράζονται πολύ όμοιες αλληλομορφικές αλληλουχίες. Η αναγνώριση των παθογόνων μπορεί να είναι η απαιτούμενη επιλεκτική πίεση για τη διατήρηση αυτών των αλληλομορφικών σειρών. Η έλλειψη φυλογεωγραφικής δομής για τα *DQA* και *DRB1* υποστηρίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι μέσες γενετικές αποστάσεις μεταξύ των τεσσάρων κύριων γεωγραφικών περιοχών ήταν συγκρίσιμες, το οποίο δείχνει ξεκάθαρα ότι το επίπεδο της διαφοροποίησης στο εσωτερικό κάθε περιοχής ήταν όμοιο με αυτό που παρατηρείται μεταξύ των περιοχών. Επιπλέον, οι τιμές bootstrap για το φυλογενετικό δέντρο ήταν χαμηλές, το οποίο επίσης υποδηλώνει χαμηλό φυλογεωγραφικό σήμα. Αυτό είναι σε συμφωνία με την προτεινόμενη παλαιότητα των τόπων του MHC και τον υψηλό παρατηρούμενο νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό. Ωστόσο, τα πιο εσωτερικά κλαδιά του δέντρου *DQA* που περιέχουν αλληλουχίες από διαφορετικά είδη δείχνουν τιμές υποστήριξης (support values) μεγαλύτερες από 90% (εικόνα 18, σελ. 119).

Και στην περίπτωση των *SLA-DQA* και *SLA-DRB1* στο *Sus scrofa* η ανάλυση των αλληλομόρφων δεν εμφάνισε ισχυρό φυλογεωγραφικό σήμα επειδή τα αλληλόμορφα που ανήκουν σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό ή φυλή δεν ομαδοποιούνται μαζί. Η δια-ειδική εξέλιξη που περιγράφηκε προηγουμένως είναι διάχυτη και στα φυλογενετικά δέντρα του *Sus* και προφανώς υποδεικνύει την ανάγκη για μια συγκεκριμένη ανοσοαπάντηση σε ένα κοινό παθογόνο στους δύο πολύ συγγενικούς οργανισμούς.

Η ανάλυση του Scandura και των συνεργατών του (2008) σε μικροδορυφορικούς δείκτες ευρωπαϊκών αγριόχοιρων έδειξε ότι όλοι οι πληθυσμοί είναι παρόμοια διαφοροποιημένοι αλλά υπήρξε μια ασυνέχεια κατά μήκος των Άλπεων. Δηλαδή μιτοχονδριακές σειρές που εντοπίστηκαν σε πληθυσμούς της Ιταλίας δεν βρέθηκαν σε υπόλοιπους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Αυτή η διαπίστωση

γίνεται και με βάση την ανάλυση του *DRB1* καθώς με βάση τις τιμές F_{ST} οι πληθυσμοί της A, D, FR, SP και LU παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαφοροποίηση από τους υπόλοιπους (GR, IT και PL). Η μελέτη του Scandura στηρίζει την υπόθεση ότι τα πρότυπα γενετικής ποικιλομορφίας στους Ευρωπαϊκούς αγριόχοιρους διαμορφώθηκαν από την μετα-παγετώνια αποίκιση από ένα ή περισσότερα καταφύγια στο νότο. Η ιταλική χερσόνησος φαίνεται να έχει συμβάλει λίγο στη διαδικασία επαναποίκισης σε σχέση με την Ιβηρική και τη Βαλκανική πιθανόν εξαιτίας του φυσικού φραγμού των Άλπεων (Hewitt, 2000). Το σενάριο ενισχύεται από τη μελέτη αυτή στο MHC. Παρατηρείται ότι οι ελληνικοί πληθυσμοί είναι από τους πιο πολυμορφικούς και στα δύο γονίδια τόσο σε επίπεδο αλληλομόρφων όσο και σε επίπεδο θυλάκων ενώ είναι και οι περισσότερο διαφοροποιημένοι σε σχέση με τους υπόλοιπους ευρωπαϊκούς. Υψηλή παραμένει και η διαφοροποίηση της Ιταλίας από τους υπόλοιπους πληθυσμούς. Συνεπώς, με βάση τα δεδομένα από αυτή την ανάλυση ενισχύεται το σενάριο ότι η Νότια Ευρώπη κατά την περίοδο των παγετώνων υπήρξε καταφύγιο για τον αγριόχοιρο, από όπου στη συνέχεια επαναποίκισε την Κεντρική Ευρώπη. Οι πληθυσμοί ωστόσο της Ιταλίας δε συνεισέφεραν σε αυτό λόγω του φυσικού εμποδίου των Άλπεων. Ανάλυση περισσότερων δειγμάτων από την Ισπανία θα βοηθούσαν στην πλήρη αποσαφήνιση των επιδράσεων αυτής της περιοχής στην αποίκιση της Ευρώπης από τον αγριόχοιρο μετά την περίοδο των παγετώνων.

Αποτελέσματα από διάφορες μελέτες που έχουν γίνει δείχνουν ότι η εξημέρωση του χοίρου συνέβη στην αρχή στην Εγγύς Ανατολή περίπου 9.000 YBP και μπορεί να έχει συμβεί επανειλημμένα από τοπικούς πληθυσμούς αγριόχοιρων (Bökönyí, 1974) χωρίς να είναι ξεκάθαρο εάν οι εξημερωμένοι χοίροι που έχουν αξιολογηθεί μορφολογική διαφοροποίηση από τον αγριόχοιρο έχουν μία ή πολλαπλές προελεύσεις (Giuffra *et al.*, 2000). Υπάρχουν ξεκάθαρες ενδείξεις ότι η εξημέρωση του Ασιατικού και Ευρωπαϊκού αγριόχοιρου ήταν δύο ανεξάρτητες διαδικασίες. Η ανάλυση του Larson *et al.* (2005) έδειξε μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των ευρωπαϊκών χοίρων και του ευρωπαϊκού αγριόχοιρου σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι σειρές mtDNA από τη Μέση Ανατολή δε βρέθηκαν σε ευρωπαϊκές φυλές χοίρων, προτείνοντας ότι οι σύγχρονες φυλές χοίρων στην Ευρώπη προέκυψαν από τοπικούς άγριους πληθυσμούς. Προτείνεται ότι το ένα κέντρο εξημέρωσης βρίσκεται στην Κεντρική Ευρώπη ενώ ένα δεύτερο κέντρο εξημέρωσης βρίσκεται στην Νότια Ευρώπη, πιθανόν στην Ιταλία. Η ανάλυση του Scandura *et al.* (2008) αποκλείει την

Ιταλία ως κέντρο εξημέρωσης ή τουλάχιστον ότι οι χοίροι που πιθανώς εξημερώθηκαν στην Ιταλία άφησαν απογόνους στις σύγχρονες φυλές, ενώ θεωρείται ότι η ανάλυση δειγμάτων από την Ιβηρική και τα Βαλκάνια θα υποδείξει το ρόλο αυτών των περιοχών στην εξημέρωση του χοίρου. Ένα από τα πιο αξιολογικά ευρήματα αυτής της μελέτης είναι η στενή σχέση των ελληνικών αγριόχοιρων με τους εξημερωμένους χοίρους. Συγκεκριμένα, για το *DRB1* γονίδιο βρέθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις μικρότερες τιμές F_{ST} για τους εξημερωμένους χοίρους και τους ελληνικούς αγριόχοιρους παρά για τους ευρωπαϊκούς ενώ και η ανάλυση AMOVA δίνει χαμηλότερο ποσοστό ποικιλότητας μεταξύ των ομάδων Ελλάδα-Ήμεροι χοίροι από ότι Ευρώπη-Ήμεροι χοίροι παρόλο που όλοι πληθυσμοί ήμερων χοίρων είναι από την Ευρώπη. Περαιτέρω γενετική ανάλυση με διαφορετικούς πυρηνικούς και μιτοχονδριακούς δείκτες θα μπορούσε να διαλευκάνει το ρόλο των Βαλκανίων στην εξημέρωση και στη διαμόρφωση της ποικιλομορφίας του χοίρου.

Μέχρι πρόσφατα οι μειώσεις στον πληθυσμό και τη γεωγραφική κατανομή των θηραμάτων στην Ευρώπη αντισταθμίζονταν απλά με ελεγχόμενες επανεισαγωγές από τις τοπικές αρχές. Διάφοροι πληθυσμοί ειδών θηλαστικών εμπλουτίστηκαν χρησιμοποιώντας ζώα που ανατράφηκαν σε συνθήκες αιχμαλωσίας ή που συλλέχθηκαν από μακρινές περιοχές (Caughley & Gunn, 1996, Rhymer & Simberloff, 1996), χωρίς να δίνεται ιδιαίτερη σημασία στις πιθανές συνέπειες στις αυτόχθονες φυλές (υβριδισμός ή ακόμη και εξαφάνιση) και στην οικολογική δομή γενικότερα. Στην Ελλάδα, παρόλο που τέτοια προγράμματα έχουν εγκαταλειφθεί από το 2001 σύμφωνα με καταγραφές του Υπουργείου Γεωργίας και κτηνοτροφικών συλλόγων εκτρεφόμενα άτομα από ελληνικά ιδιωτικά εκτροφεία έχουν απελευθερωθεί τη δεκαετία 1991-2001 χωρίς να υπάρχει έλεγχος των ζώων σε κανένα επίπεδο. Μία ακόμη τέτοια τυπική περίπτωση συνέβη και στην Ιταλία όπου εξαιτίας της ανθρώπινης παρέμβασης οι πληθυσμοί αγριόχοιρων υπέστησαν εξαιρετική μείωση των πληθυσμών τους κατά το 18^ο και 19^ο αιώνα (Apollonio *et al.*, 1988, Massei & Genov, 2000). Επιπλέον, κατά το 18^ο και 19^ο αιώνα έχουν καταγραφεί εισαγωγές ασιατικών χοίρων στην Ευρώπη (Jones, 1998) κάτι που είναι καλά καταγεγραμμένο από αναλύσεις mtDNA (Fang & Andersson, 2006). Μετά το 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο, αλλαγές στις αγροτικές πρακτικές, τοποθέτηση τεχνητών θέσεων σίτισης, μείωση στον αριθμό των θηρευτών και η παγκόσμια υπερθέρμανση ευνόησαν τη δημογραφική αύξηση στους πληθυσμούς των αγριόχοιρων (Massei &

Toso, 1993, Massei & Genov, 2000), όπως επίσης και η εισαγωγή ζώων (Vernesi *et al.*, 2003). Γενετικά οι αγριόχοιροι και οι εξημερωμένοι χοίροι δεν αποκλίνουν περισσότερο από ότι ζεύγη πληθυσμών αγριόχοιρων (Scandura *et al.*, 2008). Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο γεγονός ότι την εξημέρωση δεν ακολούθησε ένα έντονο φαινόμενο αρχής του ιδρυτή ή ότι όπως συνέβη και κατά την εξημέρωση άλλων ειδών υπήρξε μια μακριά συνύπαρξη των ήμερων και άγριων ζώων με περιοδικούς υβριδισμούς μειώνοντας τη γενετική απόκλιση (Vilà *et al.*, 2005, Beja-Pereira *et al.*, 2006). Ένα ποσοστό αγριόχοιρων μεταξύ 5-10% δείχνουν σημάδια εισδοχής γονιδιώματος του ήμερου χοίρου δείχνοντας ότι υβριδισμός των χοίρων και των αγριόχοιρων συνέβαινε στο παρελθόν και πιθανόν να εξακολουθεί μέχρι και σήμερα (Scandura *et al.*, 2008). Η ανάλυση του δείκτη MC1R που έγινε σε όλα τα δείγματα της μελέτης έχει δώσει παρόμοια αποτελέσματα (Koutsogiannouli *et al.*, 2009). Αυτοί οι υβριδισμοί είναι λογικό να έχουν επίδραση και στο MHC. Μάλιστα, η ανάλυση του *DRB* διάφορων εξημερωμένων ζώων έδειξε ότι υπάρχουν διασταυρώσεις των ήμερων ζώων με τους άγριους προγόνους είτε τυχαία είτε επίτηδες διαμορφώνοντας σημαντικά τη γενετική ποικιλομορφία των εξημερωμένων ζώων (Vilà *et al.*, 2005). Η σαφής ομοιότητα που υπάρχει στο MHC αγριόχοιρων και χοίρων είναι πιθανότερο να οφείλεται στη δια-ειδική εξέλιξη και στην ανάγκη ανοσοαπαντήσεων σε κοινά παθογόνα παρά στους υβριδισμούς που έχουν κατά καιρούς υπάρξει χωρίς ωστόσο να αγνοείται η συνεισφορά των τελευταίων στη διαμορφούμενη ποικιλότητα.

Στην περίπτωση του *O. aries*, δεδομένου ότι οι πληθυσμοί που αναλύθηκαν ανήκουν σε συγκεκριμένες τεχνητά δημιουργημένες παραγωγικές φυλές θεωρήθηκε περιττή η αναφορά στη φυλογεωγραφία. Θα άξιζε ωστόσο να αναφερθεί ότι δεν ομαδοποιούνται μαζί αλληλόμορφα του *DRB1* που παρατηρούνται μόνο σε συγκεκριμένες φυλές. Αυτή η δια-ειδική εξέλιξη είναι πιο έντονη όταν προστίθενται άτομα που ανήκουν στα είδη *O. canadensis* και *O. dalli* καθώς αλληλόμορφα που ανήκουν σε αυτά βρίσκονται σε όλο το δέντρο και αναμειγνύονται με τα αλληλόμορφα *DRB1* που έχουν ταυτοποιηθεί στο πρόβατο (δεδομένα δεν δείχνονται).

MHC και ετεροζυγωτία

Η υπεροχή του ετεροζυγώτη, θεωρήθηκε ότι συμβάλλει στη διατήρηση του αλληλομορφικού πολυμορφισμού στο MHC επειδή τα ετερόζυγα άτομα είναι καλύτερα προσαρμοσμένα από τα ομόζυγα (Doherty & Zinkernagel, 1975).

Για το *L. europaeus* σχεδόν όλοι οι πληθυσμοί είχαν χαμηλότερη παρατηρούμενη ετεροζυγωτία από ότι αναμενόμενη. Μία πιθανή εξήγηση είναι η ύπαρξη άκυρων (null) αλληλομόρφων με αποτέλεσμα ετερόζυγα άτομα να φαίνονται ως ομόζυγα, αν και PCR ανάλυση ομόζυγων ατόμων με εσωτερικούς εκκινητές κατέληξε στο ίδιο πρότυπο. Μία άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι μέρος του πολυμορφισμού των υπό μελέτη γονιδίων να βρίσκεται εκτός του εξωνίου 2 και έτσι δείγματα που θεωρήθηκαν ομόζυγα στην πραγματικότητα να είναι ετερόζυγα εκτός του εξωνίου 2, οδηγώντας σε υποεκτίμηση της πραγματικής ετεροζυγωτίας.

Η μειωμένη ετεροζυγωτία καταγράφηκε και στην περίπτωση του αγριόχοιρου και για τα δύο γονίδια με μόνη εξαίρεση τη φυλή Danbred στο *DRB1*. Όπως προαναφέρθηκε τα άτομα της φυλής Danbred προέρχονται από τη διασταύρωση ενός αρσενικού ατόμου της φυλής Duroc και ενός θηλυκού που ανήκει είτε στη φυλή Landrace είτε στη Yorkshire και επομένως εκεί θα έπρεπε ίσως να αναζητηθεί εκεί η αιτία της υψηλότερης ετεροζυγωτίας.

Στην περίπτωση του προβάτου καταγράφονται υψηλότερα ποσοστά ετεροζυγωτίας με τη φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι να έχει το μεγαλύτερο ποσοστό.

Σε κάθε περίπτωση όμως η υπόθεση της υπερκυριαρχίας του ετεροζυγώτη η οποία αξιώνει ότι ο πολυμορφισμός στο MHC πιθανόν διατηρείται από ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα των ετεροζυγωτών δεν υποστηρίζεται από τις παρούσες πληθυσμιακές μελέτες ή από πειραματικές μολύνσεις. Για παράδειγμα, μία μελέτη σε ημιάγρια πρόβατα δεν ανίχνευσε υπερκυριαρχία του ετεροζυγώτη στο MHC μετά από μόλυνση με ένα νηματοειδές παράσιτο (Paterson *et al.*, 1998) ενώ μια μεγάλη έρευνα στους ανθρώπους κατέληξε ότι οι ετεροζυγώτες στο MHC είχαν μειονέκτημα (Hill *et al.*, 1991). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι το αλληλόμορφο *SLA-DRB1*01* παρατηρήθηκε σχεδόν σε όλα τα ετερόζυγα άτομα στην Ελλάδα αλλά δεν υπήρχε στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς αγριόχοιρων (εκτός από τρία πολωνικά άτομα) και μόνο σε μία φυλή οικόσιτων χοίρων. Κάτι ανάλογο παρατηρήθηκε και για το *SLA-DQA*05* ένα αλληλόμορφο που παρατηρήθηκε σε όλους τους πληθυσμούς και υπήρχε σχεδόν σε όλα τα ετερόζυγα άτομα. Παρόμοιες καταστάσεις καταγράφηκαν και για αλληλόμορφα *Ovar-DRB1* και *Ovar-DQA2* όπως το *Ovar-DRB1*02*, *Ovar-DQA2*02* και *Ovar-DQA2*03* που παρατηρούνται με μεγάλη συχνότητα στα ετεροζυγωτικά άτομα της φυλής Μπούτσικα με λευκό κεφάλι, το *Ovar-DRB1*06* στη

φυλή Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι και το *Ovar-DQA2*01* στη φυλή πρόγονος Μπούτσικα. Στο *Salmo salar* έχει παρατηρηθεί ότι η ανθεκτικότητα ή η ευαισθησία σε βακτηριακή λοίμωξη σχετίζεται με συγκεκριμένα αλληλόμορφα Β τάξης II παρά με την ετεροζυγωτία στο MHC (Lohm *et al.*, 2002). Είναι λοιπόν πιθανόν τα παραπάνω αλληλόμορφα να ευνοούν την επιβίωση των ατόμων που τα φέρουν και για το λόγο αυτό να υπάρχουν στον πληθυσμό έστω και σε ετερόζυγη κατάσταση.

Ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας ποικιλομορφίας του MHC έχει προταθεί ότι είναι το πλεονέκτημα των σπάνιων αλληλομόρφων (Bernatchez & Landry, 2003). Οι ξενιστές με τα σπάνια αλληλόμορφα έχουν την υψηλότερη προσαρμοστικότητα και έτσι η συχνότητα των σπάνιων αλληλομόρφων θα αυξάνεται και τα πιο κοινά αλληλόμορφα MHC θα γίνονται λιγότερο συχνά, καταλήγοντας σε ένα δυναμικό πολυμορφισμό (Snell, 1968, Bodmer, 1972, Beck, 1984, Slade & McCallum, 1992). Οι σχετικοί ρόλοι της υπερκυριαρχίας του ετροζυγώτη και της συχνο-εξαρτώμενης επιλογής στην εξέλιξη του MHC έχουν συζητηθεί για δεκαετίες (Lewontin *et al.*, 1978, Aoki, 1980, Hughes & Nei, 1988, 1989, Parham *et al.*, 1989, Takahata & Nei, 1990, Lawlor *et al.*, 1990, Wills, 1991). Η μελέτη του Borghans και των συνεργατών του (2004) έδειξε ότι η συχνο-εξαρτώμενη επιλογή δίνει έναν υψηλό πολυμορφισμό για το MHC ενώ η υπερκυριαρχία του ετεροζυγώτη δίνει μόνο χαμηλού επιπέδου πολυμορφισμό. Το MHC εξελίσσεται κυρίως μέσω της συνεξέλιξης ξενιστή-παθογόνου (host-pathogen coevolution) η οποία εξηγεί ένα υψηλό βαθμό πολυμορφισμού ενώ η υπερκυριαρχία του ετεροζυγώτη δίνει πολυμορφισμό μόνο μικρού βαθμού (Borghans *et al.*, 2004). Εφόσον, η εξέλιξη ευνοεί τα παθογόνα που αποφεύγουν την παρουσίαση από τα πιο κοινά μόρια του MHC στον πληθυσμό του ξενιστή, υπάρχει επιλογή για τους ξενιστές με τα σπάνια (π.χ. νέα) μόρια του MHC (Trachtenberg *et al.*, 2003). Συνεπώς, η συχνοεξαρτώμενη επιλογή η οποία προστίθεται στην υπερκυριαρχία του ετεροζυγώτη όταν ξενιστές και παθογόνα συνεξελίσσονται αυξάνει αξιόλογα τον πολυμορφισμό στο MHC. Η υπερκυριαρχία του ετεροζυγώτη μπορεί να δημιουργήσει υψηλό πολυμορφισμό μόνο εάν υποτεθεί ότι τα αλληλόμορφα του MHC έχουν όμοιες αρμοστικότητες στους πληθυσμούς. Ωστόσο, αυτό το σενάριο θεωρείται μη ρεαλιστικό (Borghans *et al.*, 2004). Στην παρούσα εργασία ένας υψηλός αριθμός σπάνιων αλληλομόρφων έχει καταγραφεί και για τα τρία υπό μελέτη είδη και στα δύο γονίδια. Τα περισσότερα από

τα αλληλόμορφα αυτά έχουν βρεθεί σε ετερόζυγα άτομα κάτι που είναι αναμενόμενο στο πλαίσιο δράσης της ισοζυγούσας επιλογής (Takahata & Nei, 1990).

Για το *S. scrofa* αυτή η επιλογή εμφανίζεται πιο έντονα για το *DRB1* στους πληθυσμούς με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία (που αντανακλάται στην τιμή R_s και στον αριθμό των θυλάκων) όπως οι ελληνικοί πληθυσμοί, ο πληθυσμός PL και η φυλή Danbred ενώ υπάρχει σε μικρότερο βαθμό στη Γαλλία και την Ιταλία και απουσιάζει από τους υπόλοιπους ευρωπαϊκούς. Η παρουσία της συχνο-εξαρτώμενης επιλογής γίνεται αντιληπτή καθώς λίγα αλληλόμορφα είναι τα κυρίαρχα στον πληθυσμό ενώ υπάρχουν άλλα σε μικρότερες συχνότητες.

Και για το *L. europaeus* συμπεραίνεται ότι στο *DRB1* υπάρχει εντονότερη δράση της συχνο-εξαρτώμενης επιλογής που οδηγείται από τη συνεξέλιξη ξενιστή παθογόνου. Αυτός ο δυναμικός πολυμορφισμός καταγράφεται πιο έντονα για το *DRB1* τόσο από το μεγαλύτερο αριθμό αλληλομόρφων, από το μεγαλύτερο αριθμό των θυλάκων αλλά και από το μεγαλύτερο αριθμό σπάνιων και μοναδικών για πληθυσμούς αλληλομόρφων.

Τέλος, στο *O. aries* η συχνο-εξαρτώμενη επιλογή εμφανίζεται για το *DQA2* και πιο έντονα για το *DRB1* σε όλους τους πληθυσμούς. Στους πληθυσμούς με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία (που αντανακλάται στην τιμή R_s και στον αριθμό των θυλάκων) υπάρχουν πιο πολλά σπάνια αλληλόμορφα δείχνοντας έτσι ότι μέρος της ποικιλομορφίας του MHC στο πρόβατο προκύπτει από αυτού του είδους εξελικτικό μηχανισμό.

Συνώνυμες vs. μη συνώνυμες υποκαταστάσεις

Ανάλυση των συνώνυμων και μη συνώνυμων υποκαταστάσεων στην περιοχή PBR αποκάλυψαν σαφώς περισσότερες μη συνώνυμες μεταλλάξεις σε σχέση με τις συνώνυμες και στα τρία είδη. Στατιστικά η ένδειξη για δράση της θετικής επιλογής είναι πιο έντονη για το *DRB1* του λαγού και του προβάτου ενώ η πιο ασθενής ένδειξη καταγράφεται για το *DQA* του χοίρου και του προβάτου. Γενικά, πιστεύεται ότι σε αυτή την περιοχή, ένας υψηλός λόγος μη συνώνυμων προς συνώνυμες υποκαταστάσεις προκύπτει από θετική επιλογή και αυξάνει την ικανότητα των πρωτεϊνών MHC να αναγνωρίζουν διαφορετικά αντιγόνα (Bernatchez & Landry, 2003). Αντιθέτως, ο αριθμός των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων (d_N) δεν διέφερε σημαντικά από τον αριθμό των συνώνυμων υποκαταστάσεων όταν λαμβάνονταν υπ’

όψιν ολόκληρο το εξώνιο 2. Το φαινόμενο αυτό ήταν πιο έντονο για το *DQA* παρά για το *DRB1* αλλά παρόλα αυτά φαίνεται να είναι αντίθετο σε άλλες μελέτες του MHC που αναφέρουν τον προσδιορισμό της ισοζυγούσας επιλογής σε όλο το εξώνιο (Bernatchez & Landry, 2003). Ωστόσο, σε αυτές τις μελέτες υπήρχε έντονη μεροληψία (bias) στον τύπο των τεστ που εφαρμόζονταν. Η συντριπτική πλειοψηφία των μελετών έχουν αναφέρει αποτελέσματα μόνο για το τεστ του λόγου d_N/d_S και δεν έχουν εξετάσει εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική παρέκκλιση από την ουδετερότητα (Bernatchez & Landry, 2003).

Οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις στα κατάλοιπα των θυλάκων δεν παρήγαγαν έναν αριθμό παραλλαγών θυλάκων ίσο με τον αριθμό των αλληλομόρφων. Στο *O. aries* για την αλυσίδα DRβ υπάρχουν 21 παραλλαγές στον P7, 20 παραλλαγές στον P4 και 11 παραλλαγές στον P9 σε σύνολο 48 αλληλομόρφων. Για την αλυσίδα DQα2 υπάρχουν 10 παραλλαγές για τον P1, 13 για τον P6 και 14 για τον P9 σε σύνολο 46 αλληλομόρφων. Στο *L. europaeus* για την αλυσίδα DRβ ο P4 έχει 32 παραλλαγές ενώ ο P7 έχει 25 παραλλαγές σε 59 αλληλόμορφα. Η αλυσίδα DQα έχει 10 παραλλαγές για τον P1, 12 για τον P6 και επτά για τον P9 σε 37 αλληλόμορφα. Τέλος, στο *S. scrofa* η αλυσίδα DRβ έχει 12 παραλλαγές στον P4 και 11 παραλλαγές στον P7 σε 14 αλληλόμορφα ενώ η DQα έχει 5 παραλλαγές στον P6 και από τρεις παραλλαγές έχουν οι P1 και P9 σε εννέα αλληλόμορφα. Οι συχνότητες αυτών των παραλλαγών διαφέρουν μεταξύ των πληθυσμών και ανιχνεύτηκαν ειδικές παραλλαγές για κάθε πληθυσμό. Οι αμινοξικές υποκαταστάσεις στους θύλακες πρόσδεσης μπορούν να αλλάξουν τη λειτουργία των θυλάκων ως προς την πρόσδεση αντιγονικών πεπτιδίων. Έτσι, κάποια αλληλόμορφα του MHC συσχετίζονται με ευαισθησία ή ανθεκτικότητα σε διαφορετικά παθογόνα στα σπονδυλωτά (Hill *et al.*, 1991, van Eijk *et al.*, 1992, Xu *et al.*, 1993, Paterson *et al.*, 1998, Kjøglum *et al.*, 2006). Συνεπώς, είναι πολύ πιθανό η συχνότητα των διαφορετικών παραλλαγών θυλάκων να αναπαριστά ένα αποτύπωμα του φορτίου παθογόνων σε ένα δεδομένο πληθυσμό. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται επιπλέον από: (i) την παρουσία των ίδιων παραλλαγών θυλάκων σε διαφορετικά αλληλόμορφα, (ii) την υψηλή συχνότητα συγκεκριμένων συνδυασμών των παραλλαγών θυλάκων στους πληθυσμούς, που είναι πιθανό να συνεισφέρουν στη βέλτιστη ανθεκτικότητα στα τοπικά παθογόνα και (iii) τη διαφοροποίηση της συχνότητας με τη γεωγραφική απόσταση. Ο αριθμός των παραλλαγών ανά θύλακα και των πολυμορφικών θέσεων σε κάθε θύλακα ήταν διαφορετικός για όλους τους

θύλακες, το οποίο υποδεικνύει ότι οι θύλακες πρόσδεσης μπορεί να ανταποκρίνονται σε επιλεκτικές πιέσεις με ένα τρόπο που να εξαρτάται από το ρόλο τους στην πρόσδεση πεπτιδίων.

MHC/PBR λειτουργικός πολυμορφισμός

Συσσωρευτικά κρυσταλλογραφικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η PBR σχηματίζεται από τις α1 και β1 περιοχές και το αντιγονικό πεπτίδιο τοποθετείται στο β-φύλλο μεταξύ δύο α-ελίκων και προσδέεται ειδικά μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καταλοίπων του πεπτιδίου στις θέσεις 1, 4, 6, 7 και 9 καταλοίπων στους αντίστοιχους θύλακες (P1, P4, P6, P7 και P9) της PBR (McFarland & Beeson, 2002). Για κάθε αλληλόμορφο MHC τάξης II κάθε ένας από τους πέντε θύλακες έχει μία στενή ή ευρύτερη ειδικότητα για διαφορετικά κατάλοιπα, προσδιορίζοντας έτσι τη συγγένεια της πρόσδεσης ενός δεδομένου πεπτιδίου (Rammensee *et al.*, 1995). Η έναρξη της ανοσοαπάντησης απαιτεί την πρόσδεση των αντιγόνων στο MHC και την παρουσίασή τους στους TCRs. Οι κρίσιμοι παράγοντες σε αυτή τη διαδικασία περιλαμβάνουν: (i) λειτουργικό διμερισμό των α και β αλυσίδων, (ii) το σχηματισμό των θυλάκων πρόσδεσης του αντιγόνου, (iii) το σχηματισμό των δεσμών υδρογόνου κατά μήκος του σκελετού (backbone) του πεπτιδίου και (iv) επιτυχή επαφή με τους TCRs. Για την περιοχή HLA-DQ, το ζευγάρι μεταξύ των α και β αλυσίδων επηρεάζεται από τον πολυμορφισμό στις περιοχές α44–53 και β85–90 (Kwok *et al.*, 1993, Siebold *et al.*, 2004). Υπάρχουν στην ουσία δύο ομάδες πολυμορφισμών για κάθε περιοχή. Τα DQA αλληλόμορφα της μιας περιοχής θα ζευγαρώσουν μόνο με DQB αλληλόμορφα με μία από τις δύο ομάδες DQB, το οποίο περιορίζει τους συνδυασμούς DQA/DQB που είναι πιθανοί. Στα είδη που μελετήθηκαν η περιοχή DQ α44-53 ήταν πολυμορφική, κάτι που υποδεικνύει ένα πιθανό ρόλο της στον καθορισμό του ζευγαρώματος των αλυσίδων αβ. Στο DQA του *L. europaeus* και του *O. aries* όλα τα κατάλοιπα που συνεισφέρουν στο σχηματισμό των P6 και P9 ήταν πολυμορφικά. Στο *S. scrofa* στον P9 ήταν όλα τα κατάλοιπα πολυμορφικά και στον P6 ήταν τα τρία από τα πέντε. Στον P1 για το *L. europaeus* τέσσερα από τα έξι κατάλοιπα ήταν μονομορφικά, στο *O. aries* στον P1 ένα από τα πέντε και στο *S. scrofa* τρία από τα πέντε ήταν μονομορφικά. Τρία από τα μη πολυμορφικά κατάλοιπα (αH24, αF32 και αW43) είναι συντηρημένα σε όλα τα HLA-DQ α1 αλληλόμορφα (Reche & Reinherz, 2003). Το αW43 είναι συντηρημένο και στο πρόβατο ενώ τα

άλλα δύο εμφανίζονται να είναι διμορφικά. Μελέτες στις αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου-MHC για διαφορετικά HLA-DR, HLA-DQ και HLA-DP αλληλόμορφα και πεπτίδια έχουν αποδώσει διαφορετικούς ρόλους σε κάθε θύλακα (Rammensee *et al.*, 1995, Cárdenas *et al.*, 2005, 2007). Ο P1 φαίνεται να είναι ένας συντηρημένος θύλακας με σημαντικό ρόλο στην αγκυροβόληση ενώ οι P6 και P9 τείνουν να είναι πιο πολυμορφικοί. Ο P6 θεωρείται ότι συνεισφέρει σημαντικά στην ειδικότητα του αλληλομόρφου και είναι υπεύθυνος για μεγάλες αλλαγές στο ηλεκτροστατικό δυναμικό, ενώ ο P9 έχει περιγραφεί σαν θύλακας που εξυπηρετεί δύο σκοπούς με ένα ρόλο στην ειδικότητα και διαμόρφωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ θύλακα και πεπτιδίου. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι και στα τρία είδη υπήρχαν υποκαταστάσεις με αντικατάσταση φορτίου σε διάφορα κατάλοιπα με το κατάλοιπο α31 (P1) να αλλάζει φορτίο και στα τρία είδη ενώ το κατάλοιπο α52 (P1) στο λαγό και στο χοίρο. Οι διαφορές που ανιχνεύτηκαν σε αυτή τη μελέτη σύμφωνα με το βαθμό πολυμορφισμού μεταξύ των P1, P6 και P9 στα αλληλόμορφα *DQA* ήταν σύμφωνα με τη λειτουργία που έχει καθοριστεί για κάθε ένα θύλακα πρόσδεσης.

Για το *DRB1* γονίδιο αναλύθηκαν για τον πολυμορφισμό τους οι θύλακες P4 και P7. Στο *S. scrofa* στον P4 και στον P7 όλα τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό τους ήταν πολυμορφικά εκτός από το β78 (P4) και β61 (P7). Στο *L. europaeus* όλα τα κατάλοιπα του P4 ήταν πολυμορφικά και στον P7 μόνο το β61 διέφερε μεταξύ των αλληλομόρφων. Τέλος, στο *O. aries* τα μόνα κατάλοιπα που παραμένουν σταθερά σε όλα τα αλληλόμορφα είναι τα β9 (P9) και β61 (P7). Και σε αυτή την περίπτωση με βάση τις μελέτες που αφορούν τις αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου-MHC έχουν αποδοθεί διαφορετικοί ρόλοι σε κάθε θύλακα (Rammensee *et al.*, 1995, Cárdenas *et al.*, 2005, 2007). Έτσι, ο P4 έχει ρυθμιστικό ρόλο (modulating) ενώ ο P7 (όπως και ο P6) θεωρείται ότι συνεισφέρει σημαντικά στην ειδικότητα του αλληλομόρφου και είναι υπεύθυνος για μεγάλες αλλαγές στο ηλεκτροστατικό δυναμικό. Και στο *DRB1* γονίδιο υπάρχουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου με κοινά κατάλοιπα και στα τρία είδη που εμφανίζουν αυτήν την αλλαγή τα β28, β57, β70 και β71. Μάλιστα, η αλλαγή του φορτίου γίνεται με τον ίδιο τρόπο, δηλαδή στα κατάλοιπα β28, β57 και β70 υπάρχουν αρνητικά και ουδέτερα αμινοξέα ενώ στο β71 υπάρχουν θετικά και ουδέτερα αμινοξέα. Και σε αυτήν την περίπτωση, οι διαφορές που ανιχνεύτηκαν σε αυτή τη μελέτη σύμφωνα με το βαθμό

πολυμορφισμού μεταξύ των P4 και P7 στα αλληλόμορφα *DRB1* ήταν σύμφωνα με τη λειτουργία που έχει καθοριστεί για κάθε ένα θύλακα πρόσδεσης.

Συμπεράσματα

Η κατανόηση των παραγόντων και των εξελικτικών δυνάμεων που επηρεάζουν και διαμορφώνουν τον πολυμορφισμό στους τόπους του MHC είναι μια δύσκολη και πολύπλοκη διαδικασία. Τα συνεχώς αυξανόμενα δεδομένα για σύνδεση του MHC με ανθεκτικότητα σε ασθένειες και μια σειρά άλλων βιολογικών διεργασιών (π.χ. επιλογή συντρόφου) πολλές φορές εγείρουν περισσότερα ερωτήματα από όσα απαντούν. Η συγκριτική ανάλυση του MHC σε είδη που έχουν υποστεί διαφορετικές επιλεκτικές πιέσεις μπορεί να συνεισφέρει σε αυτή την κατεύθυνση, δεδομένου ότι: (α) οι μελέτες λειτουργικού πολυμορφισμού στα γονίδια αυτά επιτρέπουν τη διερεύνηση των προσαρμοστικών δυνατοτήτων πληθυσμών σε παθογόνα και (β) οι συγκρίσεις γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών και ειδών μπορεί να αποκαλύψει πιθανούς διαφορετικούς μηχανισμούς άσκησης επιλογής. Για να γίνουν αντιληπτές οι δυνάμεις που διαμορφώνουν την ποικιλομορφία του MHC σε χερσαία είδη θηλαστικών εξετάστηκαν τρία είδη με διαφορετικά δημογραφικά χαρακτηριστικά και ξεχωριστές εξελικτικές ιστορίες. Τα συμπεράσματα που εξάγονται από αυτή την εργασία συνοψίζονται στα εξής:

1. Η ανάλυση των λειτουργικών αλληλομόρφων του MHC και στα τρία είδη προτείνει ότι η ισοζυγούσα επιλογή δρα και στα δύο γονίδια (*DQA* και *DRB1*). Η βασική ένδειξη ότι οι δύο τόποι βρίσκονται υπό την επίδραση **ισοζυγούσας επιλογής** παρέχεται από το μεγαλύτερο αριθμό μη συνώνυμων υποκαταστάσεων ($d_N/d_S > 1$). Το γεγονός ότι οι μη συνώνυμες υποκαταστάσεις συγκεντρώνονται κυρίως στην περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίου (PBR) του μορίου ενισχύουν αυτή την υπόθεση.

2. Ο μεγαλύτερος αριθμός μη συνώνυμων υποκαταστάσεων είναι σύμφωνος τόσο με την **υπερκυριαρχία του ετεροζυγώτη** όσο και με την **αρνητική συχνο-εξαρτώμενη επιλογή**. Στην παρούσα εργασία ένας υψηλός αριθμός σπάνιων αλληλομόρφων έχει καταγραφεί και για τα τρία υπό μελέτη είδη και στα δύο γονίδια ενώ σε κάθε περίπτωση έχουν καταγραφεί χαμηλότερα ποσοστά ετεροζυγωτίας από τα αναμενόμενα. Εξάγεται λοιπόν το συμπέρασμα ότι η ισοζυγούσα επιλογή δρα κυρίως

μέσω της **συχνο-εξαρτώμενης επιλογής με πλεονέκτημα των σπάνιων αλληλομόρφων.**

3. Σε όλες τις περιπτώσεις το *DQA* είναι λιγότερο πολυμορφικό σε σχέση με το *DRBI* (πιο έντονη δράση της θετικής επιλογής) και αυτό εξηγείται βάσει: **(α)** του ρόλου των δύο υποπεριοχών στις ανοσοαπαντήσεις (η DR ενεργοποιεί την ανοσολογική απόκριση ενώ η DQ την καταστέλλει), **(β)** του ρόλου των δύο αλυσίδων στην παρουσίαση των πεπτιδίων (ο ρόλος των α αλυσίδων είναι κυρίως η σταθεροποίηση του διμερούς μορίου) και **(γ)** των περιοριστικών παραγόντων στο ζευγάρι των αβ αλυσίδων στην υποπεριοχή DQ. Στην περίπτωση του *DQA2* του *O. aries* ο μεγαλύτερος πολυμορφισμός που παρατηρείται ενδεχομένως να οφείλεται στην αντιστάθμιση του πολυμορφισμού λόγω έλλειψης της περιοχής DP.

4. Στο *L. europaeus* καταγράφεται αξιόλογος γενετικός πολυμορφισμός στο MHC με την Ανατολή να διαθέτει ελαφρώς μεγαλύτερα επίπεδα. Σύμφωνα με το πρότυπο της μεταπαγετωνικής εξάπλωσης των πληθυσμών του λαγού και αναλύσεων του μιτοχονδριακού DNA, οι πληθυσμοί της βόρειας Ευρώπης θα πρέπει να διαθέτουν χαμηλότερα ποσοστά πολυμορφισμού σε σχέση με τα Νότια καταφύγια (Βαλκάνια, Ανατολία). Ωστόσο και οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί δείχνουν σταθερά επίπεδα υψηλού πολυμορφισμού στο MHC, γεγονός που αποδίδεται στην ισοζυγούσα επιλογή. Στο *DRBI* διαπιστώθηκε η ύπαρξη κοινών αλληλομόρφων σε ένα ευρύ φάσμα πληθυσμών σε αντίθεση με το *DQA*. Πιθανόν στο *DRBI* να υπάρχουν πιο αρχαία αλληλόμορφα. Τα δύο γονίδια έχουν διαφορετικό ρυθμό εξέλιξης καθώς αλληλόμορφα με κοινή προέλευση του *DRBI* διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερο από αυτά του *DQA*.

5. Στο *S. scrofa* παρατηρείται χαμηλός πολυμορφισμός που εξηγείται μερικώς από φαινόμενα στενωπού στο παρελθόν του αγριόχοιρου και από την εξημέρωση στον οικόσιτο χοίρο. Η Νότια Ευρώπη υπήρξε καταφύγιο για τον αγριόχοιρο κατά την περίοδο των παγετώνων, από όπου στη συνέχεια, με εξαίρεση την Ιταλία, επαναποίκισε την Κεντρική Ευρώπη. Οι μικρές τιμές F_{ST} για το *DRBI* για τους εξημερωμένους χοίρους και τους ελληνικούς αγριόχοιρους και το χαμηλό ποσοστό ποικιλότητας της ανάλυσης AMOVA μεταξύ των ομάδων Ελλάδα-Ήμεροι χοίροι

δείχνουν ότι πρέπει να διαλευκανθεί ο ρόλος των Βαλκανίων στην εξημέρωση και στη διαμόρφωση της ποικιλομορφίας του χοίρου. Τέλος, η ομοιότητα που υπάρχει στο MHC αγριόχοιρων και χοίρων οφείλεται κυρίως στη δια-ειδική εξέλιξη και στην ανάγκη ανοσοαπαντήσεων σε κοινά παθογόνα παρά στους υβριδισμούς που έχουν κατά καιρούς υπάρξει.

6. Παρά τη στενωπό της εξημέρωσης και τον θεωρητικά ομομικτικό υποβιβασμό, στο *O. aries* καταγράφηκαν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και για τα δύο γονίδια σε συμφωνία με άλλες μελέτες. Σχεδόν κάθε αλληλόμορφο φέρει το δικό του συνδυασμό θυλάκων προτείνοντας ότι παρόλο που κάθε θύλακας δεν έχει σημαντικά αυξημένο αριθμό παραλλαγών, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός των συνδυασμών αυτών και συνεπώς οι διάφορες επιλεκτικές πιέσεις μπορούν να δημιουργήσουν έναν εξαιρετικό πολυμορφισμό από ένα μικρό αριθμό παραλλαγών. Η ανάλυση AMOVA έδειξε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών υποδεικνύοντας ότι οι αιτίες του παρατηρούμενου πολυμορφισμού θα πρέπει να αναζητηθούν σε παθογόνους παράγοντες, άλλους γεωγραφικούς ή κοινωνικούς παράγοντες και στην περιβαλλοντική ετερογένεια των εκτροφών. Ο λειτουργικός πολυμορφισμός που καταγράφηκε για το *DQA2* προτείνει έναν πιο ενεργό ρόλο της περιοχής DQ του προβάτου στις ανοσοαπαντήσεις από ότι συνηθίζεται.

7. Ο ρόλος του MHC στη μελέτη της **φυλογεωγραφίας** δεν έχει διασαφηνιστεί. Σε κάθε περίπτωση τα αλληλομόρφα των γονιδίων δεν εμφάνισαν ισχυρό φυλογεωγραφικό σήμα καθώς αλληλόμορφα από συγκεκριμένους πληθυσμούς ή φυλές δεν ομαδοποιούνται μαζί. Η απουσία φυλογεωγραφικού σήματος είναι χαρακτηριστικό τόπων του MHC και θεωρείται ότι προκύπτει από την ισοζυγούσα επιλογή.

8. Το MHC μπορεί να συνεισφέρει στη μελέτη της εξελικτικής βιολογίας μέσω της **δια-ειδικής εξέλιξης**. Η δια-ειδική εξέλιξη είναι διάχυτη σε όλα τα φυλογενετικά δέντρα είναι πιο έντονη όταν προστίθενται άτομα που ανήκουν σε άλλα είδη από αυτά που μελετήθηκαν (π.χ. αλληλόμορφα *DRB1* των *O. canadensis* και *O. dalli* και αλληλόμορφα *DQA* διαφόρων ειδών του γένους *Lepus*).

9. Η συχνότητα των διαφορετικών παραλλαγών θυλάκων είναι πιθανό να αναπαριστά ένα αποτύπωμα του φορτίου παθογόνων σε ένα δεδομένο πληθυσμό κάτι που υποστηρίζεται από την παρουσία των ίδιων παραλλαγών θυλάκων σε διαφορετικά αλληλόμορφα, την υψηλή συχνότητα συγκεκριμένων συνδυασμών των παραλλαγών θυλάκων στους πληθυσμούς και τη διαφοροποίηση της συχνότητας με τη γεωγραφική απόσταση. Οι θύλακες πρόσδεσης μπορεί να ανταποκρίνονται σε επιλεκτικές πιέσεις με ένα τρόπο που να εξαρτάται από το ρόλο τους στην πρόσδεση πεπτιδίων. Τέλος, και στα δύο γονίδια υπάρχουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου με κοινά κατάλοιπα και στα τρία είδη ενώ η αλλαγή του φορτίου γίνεται με τον ίδιο τρόπο.

Η επιδημιολογία των παθογόνων παραγόντων και της περιβαλλοντικής ετερογένειας ποικίλλουν τόσο κατά τη διάρκεια του χρόνου όσο και μεταξύ των πληθυσμών και η επίδραση αυτών στο MHC θα βοηθούσε στην πλήρη αποσαφήνιση των μηχανισμών που οδηγούν την εξέλιξή του. Εξάλλου εάν είναι αλήθεια η διαπίστωση ότι η συχνο-εξαρτώμενη επιλογή είναι ο κύριος μηχανισμός ισοζυγούσας επιλογής που δημιουργεί τον πολυμορφισμό στο MHC τότε αυτός ο πολυμορφισμός είναι δυναμικός καθώς δημιουργείται ένας κινούμενος στόχος για την εξέλιξη του παθογόνου. Επιπλέον, συσχετίσεις των διαφόρων αλληλομόρφων με ανθεκτικότητα ή ευαισθησία σε ασθένειες είναι μεγάλης πρακτικής σημασίας. Διαφορετικές ανοσοαπαντήσεις σε σχέση με τις ασθένειες μπορεί να δώσει δείκτες για γενετική επιλογή ανθεκτικών ατόμων και φυλών, με σημαντικές εφαρμογές στην εκτροφή χοίρων και προβάτων.

Βιβλιογραφία

A

- Abbas, AB & Lichtman, AH. 2004.** Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. 2nd ed. W. B. Saunders Company.
- Abi Rached, L, McDermott, MF & Pontarotti, P. 1999.** The MHC Big Bang *Immunol Rev.* 167:33-45.
- Acevedo-Whitehouse, K & Cunningham, AA. 2006.** Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? *Trends Ecol Evol.* 21(8):433-8.
- Achour, A. 2001.** Major histocompatibility complex (MHC): interaction with peptides. Encyclopedia of Life Sciences, Mc Millan References Ltd, Grove's Dictionaries, Nature Publications.
- Aguado, B, Milner, CM & Campbell, RD. 1996.** Genes of the MHC class III region and the functions of the proteins they encode. *In: Browning M, McMichael A (eds) HLA and MHC: genes, molecules, and functions. Bios Oxford.* 39–76.
- Aguilar, A, Roemer, G, Debenham, S, Binns, M, Garcelon, D & Wayne, RK. 2004.** High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proc Natl Acad Sci USA* 9:3490–3394.
- A Mills, M, Francino, O & Sánchez, A. 1995.** Nested PCR allows the characterization of *TaqI* and *PstI* RFLPs in the second exon of the caprine MHC Class II DRB gene. *Vet Immunol Immunopathol.* 48: 313–321.
- Andersson, G. 1998.** Evolution of the human *HLA-DR* region. *Front Biosci.* 3:739-745.
- Andersson, L & Rask, L. 1988.** Characterization of the MHC class II region in cattle: The number of DQ genes varies between haplotypes. *Immunogenetics* 27: 110-120.
- Andersson, L & Mikko, S. 1995.** Generation of MHC class II diversity by intra- and intergenic recombination. *Immunol Rev.* 143:5–12.
- Ando, A & Chardon, P. 2006.** Gene organization and polymorphism of the swine major histocompatibility complex. *Anim Sci J.* 77:127–137.
- Aoki, K. 1980.** A criterion for the establishment of a stable polymorphism of higher order with an application to the evolution of polymorphism. *J Math Biol* 9:133–146.

- Apanius, V, Penn, D, Slev, PR, Ruff, LR & Potts, WK. 1997.** The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol.* 17:179–224.
- Apollonio, M, Randi, E & Toso, S. 1988.** The systematics of the wild boar (*Sus scrofa* L.) in Italy. *Boll Zoolog.* 3:213-221.
- Arrieta-Aguirre I, García-Etxebarria K, Jugo BM. 2006.** Optimization of the MhcOvar-DRB1 gene typing. *Tissue Antigens* 67:222-228.
- Avise, JC. 1994.** Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman & Hall.
- Axtner, J & Sommer, S. 2007.** Gene duplication, allelic diversity, selection processes and adaptive value of MHC class II DRB genes of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. *Immunogenetics* 5:417-26.

B

- Bak, EJ, Ishii, Y, Omatsu, T, Kyuwa, S, Hayasaka, I & Yoshikawa, Y. 2005.** Sequence analysis of the MHC class II DPB1 gene in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Int J Immunogenet.* 3:187-92.
- Bansfield, A. 1974.** Mammals of Canada. Toronto: University of Toronto Press.
- Barbisan, F, Savio, C, Bertorelle, G, Patarnello, T & Congiu, L. 2009.** Duplication polymorphism at MHC class II DRB1 locus in the wild boar (*Sus scrofa*). *Immunogenetics* 61(2):145-151.
- Bartl, S. 1998.** What sharks can tell us about the evolution of MHC genes. *Immunol Rev.* 166:317-331.
- Beck, K. 1984.** Coevolution: mathematical analysis of host-parasite interactions. *J Math Biol.* 19:63–77.
- Beck, S & Trowsdale, J. 2000.** The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 1:117–137.
- Beja-Pereira, A, Caramelli, D, Lalueza-Fox, C et al. 2006.** The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:8113–8118.

- Belkhir, K. 1999.** *GENETIX, logiciel sous Windows pour la génétique des populations, Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060.* Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- de Bellocq, JG, Suchentrunk, F, Baird, SJE & Schaschl, H. 2009.** Evolutionary history of an MHC gene in two leporid species: characterisation of Mhc-DQA in the European brown hare and comparison with the European rabbit. *Immunogenetics* 61: 131–144.
- Belov, K, Deakin, JE, Papenfuss, AT, Baker, ML, Melman, SD, Siddle, HV, Gouin, N, Goode, DL, Sargeant, TJ, Robinson, MD, Wakefield, MJ, Mahony, S, Cross, JG, Benos, PV, Samollow, PB, Speed, TP, Graves, JA & Miller, RD. 2006.** Reconstructing an Ancestral Mammalian Immune Supercomplex from a Marsupial Major Histocompatibility Complex. *PLOS Genetics* 4:317-328.
- Ben Slimen, H, Suchentrunk, F, Stamatis, C et al. 2008.** Population genetics of cape and brown hares (*Lepus capensis* and *L. europaeus*): a test of Petter's hypothesis of conspecificity. *Biochem Syst Ecol.* 36:22–39.
- Benacerraf, B. 1981.** Role of MHC gene products in immune regulation. *Science* 212:1229–1238.
- Bernatchez, L & Landry, C. 2003.** MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J Evol Biol.* 16: 363–377.
- Bingulac-Popovic, J, Figueroa, F, Sato, A, Talbot, WS, Johnson, SL, Gates, M, Postlethwait, JH & Klein, J. 1997.** Mapping of MHC class I and class II regions to different linkage groups in the Zebrafish, *Danio rerio*. *Immunogenetics* 46:129–134.
- Bodmer, WF. 1972.** Evolutionary significance of the HL-A system. *Nature* 237:139-145.
- Bökönyi, S. 1974.** History of Domestic Mammals in Central and Eastern Europe. Akademiai Kiado, Budapest.
- Bondinas, GP, Moustakas, AK & Papadopoulos, GK. 2007.** The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function. *Immunogenetics* 59:539–553.
- Bonino, N & Montenegro, A. 1997.** Reproduction of the European hare in Pantagonia, Argentina. *Acta Theriol.* 42(1): 47-54.
- Booth, W. 1988.** Reintroducing a political animal. *Science* 241:156–158.

- Borghans, JAM, Beltman, JB & De Boer, RJ. 2004.** MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics* 55:732–739.
- Bowen, L, Aldridge, BM, Gulland, F, Woo, J, Van Bonn, W, DeLong, R, Stott, JL & Johnson, ML. 2002.** Molecular characterization of expressed DQA and DQB genes in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics* 5:332-347.
- Broekhuizen, S & Maaskamp, F. 1980.** Behaviour of does and leverets of the European hare (*Lepus europaeus*) whilst nursing. *J Zool Lond.* 191:487-501.
- Brown, JL & Eklund, A. 1994.** Kin recognition and the major histocompatibility complex: an integrative review. *Am Nat.* 143:435–461.
- Budwole, B & Allen, RC. 1990.** Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis of DNA fragments. In: Mathew, C (ed) *Methods in molecular biology- molecular biology in medicine*, vol. 7. Humana, London.
- Burri, R, Hirzel, HN, Salamin, N, Roulin, A & Fumagalli, L. 2008.** Evolutionary patterns of MHC class II B in owls and their implications for the understanding of avian MHC evolution. *Mol Biol Evol.* 6:1180-1191.

C

- Caillol, M, Meunier, M, Mondain-Monval, M & Simon, P. 1988.** Seasonal variations in testis size, testosterone and LH basal levels, and pituitary response to luteinizing hormone releasing hormone in the brown hare, *Lepus europaeus*. *Can J Zool.* 67:1626-1630.
- Campbell, RD & Trowsdale, J. 1993.** Map of the human MHC. *Immunol Today.* 14: 349-352.
- Cannon, JP, Haire, RN, Rast, JP & Litman, GW. 2004.** The phylogenetic origins of the antigen-binding receptors and somatic diversification mechanisms. *Immunol Rev.* 200: 12–22.
- Cárdenas, C, Ortiz, M, Balbín, A, Villaveces, JL & Patarroyo, ME. 2005.** Allele effects in MHC-peptide interactions: a theoretical analysis of HLA-DRβ1*0101-HA and HLADRβ1*0401-HA complexes. *Biochem Biophys Res Commun.* 330:1162–1167.

- Cárdenas, C, Obregón, M, Balbín, A, Villaveces, JL & Patarroyo, ME. 2007.** Wave function analysis of MHC-peptide interactions. *J Mol Graph Model.* 25:605–615.
- Carrington, M, Nelson, GW, Martin, MP, Kissner, T, Vlahov, D, Goedert, JJ, Kaslow, R, Buchbinder, S, Hoots, K & O'Brien, SJ. 1999.** HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 283:1748-1752.
- Caughley, G & Gunn, A. 1996.** *Conservation Biology in Theory and Practice.* Blackwell Science, Cambridge, MA.
- Charlesworth, D. 2006.** Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions. *PLoS Genet.* 2:379-384.
- Chardon, P, Renard, C, Gaillard, CR & Vaiman, M. 2000.** The porcine major histocompatibility complex and paralogous regions: a review. *Genet Sel Evol.* 32:109–128.
- Chardon, P, Renard, C & Vaiman, M. 1999.** The major histocompatibility complex in swine. *Immunol Rev.* 167:179-192.
- Chen, K, Baxter, T, Muir, WM, Groenen, MA & Schook, LB. 2007.** Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (*Sus scrofa*). *Int J Biol Sci.* 3:153-165.
- Cheylan, G. 1991.** Patterns of Pleistocene turnover, current distribution and speciation among Mediterranean mammals. In: *Biogeography of Mediterranean Invasion* (eds Groves RH, Di Castri F), pp. 227–262. Cambridge University Press, Cambridge.
- Clarke, B & Kirby, DR. 1966.** Maintenance of histocompatibility complex polymorphisms. *Nature* 211:999–1000.
- Coico, R, Sunshine, G & Benjamini, E. 2003.** *Immunology, a short course.* 5th ed. New Jersey: John Wiley and Sons Inc.
- Comparative genome organization: First International Workshop. 1996.** Comparative genome organization of vertebrates. *Mamm Genome.* 7:717-734.
- Conant, S. 1988.** Saving endangered species by translocation. Are we tinkering with evolution? *BioScience* 38:254–257.

D

- Dean, AM & Thornton, JW. 2007.** Mechanistic approaches to the study of evolution: the functional synthesis. *Nat Rev Genet.* 8:675-688.
- De Boer, RJ, Borghans, JAM, van Boven, M, Keşmir, C & Weissing, FJ. 2004.** Heterozygote advantage fails to explain the high degree of polymorphism of the MHC. *Immunogenetics* 55:725–731.
- Dragg, A. 1974.** Mammals of Ontario. Waterloo, Ontario: Otter Press.
- Dongxiao, S & Yuan, Z. 2004.** Polymorphisms of the second exon of MHC-DRB gene in Chinese local sheep and goat. *Biochem Genet.* 42:385-390.
- Dukkipati, VS, Blair, HT, Garrick, DJ & Murray, A. 2006.** 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: structure and gene polymorphisms. *Genet Mol Res.* 5(4):581-608.

E

- Edwards, SV & Hedrick, PW. 1998.** Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. *Trends Ecol Evol.* 13:305–311.
- Eickbush, TH & Eickbush, DG. 2007.** Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175:477-85.
- van Eijk, MJ, Stewart-Haynes, JA & Lewin, HA. 1992.** Extensive polymorphism of the *BoLA-DRB3* gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim Genet.* 23: 483-496.
- Ellis, SA, Bontrop, RE, Antczak, DF, Ballingall, K, Davies, CJ, Kaufman, J, Kennedy, LJ, Robinson, J, Smith, DM, Stear, MJ, Stet, RJ, Waller, MJ, Walter, L & Marsh, SG. 2006.** ISAG/IUIS-VIC Comparative MHC Nomenclature Committee report, 2005. ISAG/IUIS-VIC Comparative MHC Nomenclature Committee. *Immunogenetics* 12:953-958.
- Ensminger, M. 1965.** The Stockman's Handbook. Danville, Illinois: The Interstate.
- Excoffier, L, Laval, G & Schneider, S. 2005.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolut Bioinform Online.* 1:47-50.

Excoffier, L, Smouse, PE & Quattro, JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.

F

Fabb, SA, Maddox, JF, Gogolin-Ewens, KJ, Baker, L et al. 1993. Isolation, characterization and evolution of ovine major histocompatibility complex class II DRA and DQA genes. *Anim Genet.* 24: 249-255.

Fain, MA, Zhao, T & Kindt, TJ. 2001. Improved typing procedure for the polymorphic single-copy RLA-DQA gene of the rabbit reveals a new allele. *Tissue Antigens* 57:332–338.

Fang, M & Andersson, L. 2006. Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication. *Proc Biol Sci.* 273:1803-1810.

Fang, M, Larson, G, Soares Ribeiro, H, Li, N & Andersson, L. 2009. Contrasting Mode of Evolution at a Coat Color Locus in Wild and Domestic Pigs. *PLoS Genetics* 5: e1000341.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Figueroa, F, Gunther, E & Klein, J. 1988. MHC polymorphism predating speciation. *Nature* 355:265–267.

Figueroa, F & Klein, J. 1987. Origins of H-2 polymorphism. In *H-2 Antigens. Genes, Molecules, Function*, ed. C David, pp. 61–76. New York: Plenum.

Flajnik, MF & Kasahara, M. 2001. Comparative genomics of the MHC: glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity* 15:351–362.

Flajnik, MF, Canel, C, Kramer, J & Kasahara, M. 1991. Which came first, MHC class I or class II ? *Immunogenetics* 33:295-300.

Flux, JEC & Angermann, R. 1990. "The hares and jackrabbits". In Chapman, J. A. and J. E. C. Flux, eds.. *Rabbits, hares, and pikas. Status survey and conservation action plan.* Gland, Switzerland: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 61–94.

- Freeman-Gallant, CR, Johnson, EM, Saponara, F & Stanger, M. 2002.** Variation at the major histocompatibility complex in savannah sparrows. *Mol Ecol.* 11:1125–1130.
- Fujita, K & Silver, J. 1991.** Single strand conformational polymorphism. *PCR Methods Appl.* 4:137-139.
- Furlong, RF & Yang, Z. 2008.** Diversifying and purifying selection in the peptide binding region of DRB in mammals. *J Mol Evol.* 4:384-394.
- Futuyma, DJ. 1995.** Εξελικτική Βιολογία. 2^η έκδοση: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. σελ. 275-313.

G

- Garrigan, D & Hedrick, PW. 2003.** Perspective: detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. *Evolution* 57:1707-1722.
- Gillespie, JH. 1991.** The causes of molecular evolution. New York: Oxford University Press.
- Giuffra, E, Kijas, JM, Amarger, V, Carlborg, O, Jeon, JT & Andersson, L. 2000.** The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154:1785-1791.
- Glavac, D & Dean, M. 1993.** Optimization of single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutation. *Hum Mutat.* 2:404-414.
- Gorer, PA. 1937.** The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *J Pathol Bacteriol.* 44:691–697.
- Gorer, PA, Lyman, S & Snell, GD. 1948.** Studies on the genetic and antigenic basis of tumour transplantation: linkage between a histocompatibility gene and “Fused” in mice. *Proc R Soc Lond.* 135:499–505.
- Goldsby, R, Kindt, T, Osborne, B & Kuby, J. 2003.** *Immunology.* 5th ed. New York: Freeman and Company.
- Goudet, J. 2001.** *FSTAT, A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices* (Version 2.9.3). Available at: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html>. Updated from Goudet 1995.

- Graur, D & Li, W-H. 2000.** Fundamentals of Molecular Evolution. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Griffith, B, Scott, JM, Carpenter, JW & Reed, C. 1989.** Translocations as a species conservation tool: status and strategy. *Science* 245:477–480.
- Grzimek, B. 1990.** Grzimek's Encyclopedia of Mammals. New York: McGraw-Hill.
- Gruen, JR & Weissman, SM. 1997.** Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* 90:4252–4265.
- Guillemot, F, Billault, A, Pourquie, O, Behar, G, Chausse, AM, Zoorob, R, Kreibich, G & Auffray, C. 1988.** A molecular map of the chicken major histocompatibility complex: the class II beta genes are closely linked to the class I genes and the nucleolar organizer. *EMBO J* 7:2775–2785.
- Gutierrez-Espeleta, GA, Kalinowski, ST, Boyce, WM & Hedrick, PW. 2000.** Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: implications for conservation. *Conserv Genet.* 1:3–15.
- Gustafson, AL, Tallmadge, RL, Ramlachan, N, Miller, D, Bird, H, Antczak, DF, Raudsepp, T, Chowdhary, BP & Skow, LC. 2003.** An ordered BAC contig map of the equine major histocompatibility complex. *Cytogenet Genome Res.* 102:189–195.
- Gyllensten, UB, Bergström, T, Josefsson, A, Sundvall, M, Savage, A, Blumer, ES, Giraldo, LH, Soto, LH & Watkins, DI. 1994.** The cotton-top tamarin revisited: MHC class I polymorphism of wild tamarins, and polymorphism and allelic diversity of the class II *DQA1*, *DQB*, and *DRB* loci. *Immunogenetics* 40: 167–176.
- Gyllensten, UB & Erlich, HA. 1989.** Ancient roots for polymorphism at the HLA-DQA locus in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9986–9990.

H

- Hall, E & Kelson, K. 1959.** Mammals of North America. New York: The Ronald Press Co.
- Harf, R & Sommer, S. 2005.** Association between major histocompatibility complex class II DRB alleles and parasite load in the hairy-footed gerbil, *Gerbillurus paeba*, in the southern Kalahari. *Mol Ecol.* 14:85-91.

- Hartl, DL & Clark, AG. 1989.** Principles of Population Genetics. 2 ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Hayashi, K. 1991.** PCR-SSCP: a simple and sensitive method for the detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 1:34-38.
- Hecker, J. 1983.** The Sheep as an Experimental Animal. London: Academic Press.
- Hedrick, PW. 2000.** Genetics of populations. 2nd ed. Sudbury, MA: Jones and Bartlett.
- Hedrick PW, Lee RN, Garrigan D. 2002.** Major histocompatibility complex variation in red wolves: evidence for common ancestry with coyotes and balancing selection. *Mol Ecol.* 10:1905-1913.
- Hedrick, PW, Gutierrez-Espeleta, GA & Lee, RN. 2001.** Founder effect in an island population of bighorn sheep. *Mol Ecol.* 10:851–857.
- Hedrick, PW & Kim, TJ. 2000.** Genetics of complex polymorphisms: parasites and maintenance of the major histocompatibility complex variation. In: *Evolutionary Genetics. From Molecules to Morphology* (eds. R. S. Singh & C. B. Krimbas), pp. 204-234. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hedrick, PW, Lee, RN & Parker, KM. 2000.** Major histocompatibility complex (MHC) variation in the endangered Mexican wolf and related canids. *Heredity* 85:617-624.
- Hedrick, PW, Parker, KM, Miller, EL & Miller, PS. 1999.** Major histocompatibility complex variation in the endangered Przewalski's horse. *Genetics* 152:1701–1710.
- Hedrick, PW. 1999.** Balancing selection and MHC. *Genetica* 104: 3207-3214.
- Hedrick, PW & Thompson G. 1988.** Maternal-Fetal interaction and the maintenance of HLA polymorphism. *Genetics* 112:205-212.
- Herrmann, BG & Frischauf, AM. 1987.** Isolation of genomic DNA. *Methods Enzymol.* 152: 180 -183.
- Herrmann, LM, Brown, WC, Lewis, GS & Knowles, DP. 2005.** Identification and phylogenetic analysis of 15 MHC class II DRB1 beta1 expressed alleles in a ewe-lamb flock. *Immunogenetics* 57:855-63.
- Hewitt, GM. 2000.** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405:907–913.

- Hickford, JG, Zhou, H, Slow, S & Fang, Q. 2004.** Diversity of the ovine DQA2 gene. *J Anim Sci.* 82: 1553-1563.
- Hill, AVS, Allsopp, CEM, Kwiatkowski, D, Anstey, NM, Twumasi, P, Rowe, PA, Bennet, S, Brewster, D, McMichael, AJ & Greenwood, BM. 1991.** Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria, *Nature* 352:595–600.
- Hill, RE & Hastie, ND. 1987.** Accelerated evolution in the reactive centre regions of serine protease inhibitors. *Nature* 326:96–99.
- Hiwatashi, T, Okabe, Y, Tsutsui, T, Hiramatsu, C, Melin, AD, Oota, H, Schaffner, CM, Aureli, F, Fedigan, LM, Innan, H & Kawamura, S. 2010.** An explicit signature of balancing selection for color-vision variation in new world monkeys. *Mol Biol Evol.* 27(2):453-464.
- Hood, L, Kronenberg, M & Hunkapiller, T. 1985.** T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell* 40:225-229.
- Hopf, A. 1979.** Pigs: Wild and Tame. Holiday House, NY.
- Howard, JC. 1987.** MHC organization of the rat: evolutionary considerations, pp. 397-411 in *Evolution and Vertebrate Immunity*, edited by G. Kelsoe and D. H. Schulze. University of Texas Press, Austin.
- Hudson, RR & Kaplan, NL. 1988.** The coalescent process in models with selection and recombination. *Genetics* 120:831-840.
- Hughes, AL & Nei, M. 1993.** Evolutionary relationships of the classes of major histocompatibility complex genes. *Immunogenetics* 37:337-346.
- Hughes, AL & Nei, M. 1998.** Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annu Rev Genet.* 32:415–35.
- Hughes, AL & Nei, M. 1989.** Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:958–962.
- Hughes, AL & Nei, M. 1988.** Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I locus reveals overdominant selection. *Nature* 335:167–170.
- Hughes, AL & Nei, M. 1993.** Evolutionary relationships of the classes of major histocompatibility complex genes. *Immunogenetics* 3:337-346.

Hughes, A, Yeager, M & Carrington, M. 1996. Peptide binding function and the paradox of HLA disease associations. *Immunol Cell Biol.* 74:444–448.

Hurley CK, Fernandez-Vina M, Middleton D et al. 2001. Chapter 2c: Class II HLA-typing: primers and probes. In: *IHWG Technical Manual Genomic Analysis of the Human MHC: DNA-based typing for HLA alleles and linked polymorphisms* (ed. International Histocompatibility Working Group). <http://www.ihwg.org/tmanual/2c.pdf>.

J

Jones G.F. 1998. Genetic aspects of domestication, common breeds and their origin. In: Rothschild M.F, Ruvinsky A, editors. *The genetics of the pig*. CAB International; Wellingford, Oxon:17–50.

Jordan, WC & Bruford, MW. 1998. New perspectives on mate choice and the MHC. *Heredity* 81: 239–245.

K

Kasahara, M. 1999. The chromosomal duplication model of the major histocompatibility complex. *Immunol Rev.* 167:17-32.

Kasahara, M. 1997. 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.

Kasapidis, P, Suchentrunk, F, Magoulas, A & Kotoulas, G. 2005. The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Mol Phylogen Evol.* 34:55–66.

Kaufman, J, Volk, H & Wallny, HJ. 1995. A “Minimal Essential MHC” and an “Unrecognized MHC”: two extremes in selection for polymorphism. *Immunol Rev.* 143:63–88.

- Kaufman, J, Skjoedt, K & Salomonsen, J. 1990.** The MHC Molecules of Nonmammalian Vertebrates. *Immunol Rev.* 113:83-117.
- Kaufman, J. 1988.** Vertebrates and the evolution of the major histocompatibility complex (MHC) class I and class II molecules. *Verh Dtsch Zool Ges.* 81:131 – 144.
- Kelley, J, Walter, L & Trowsdale, J. 2005.** Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics* 56: 683-695.
- Kijas, JHM, Wales, R, Törnsten, A, Chardon, P, Mollet, M & Andersson, L., 1998.** Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150:1177–1185.
- Kimura, M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16:111-120.
- Kjøglum, S, Larsen, S, Bakke, HG & Grimholt, U. 2006.** How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 21:431– 441.
- Kleiman, DG. 1989.** Reintroduction of captive mammals for conservation. *BioScience* 39:152–161.
- Klein, J, Sato, A & Nikolaidis, N. 2007.** MHC, TSP, and the Origin of Species: From Immunogenetics to Evolutionary Genetics. *Annu Rev Genet.* 41:281–304.
- Klein, J, Sato, A, Nagl, S & O’hUigin, C. 1998.** Molecular transspecies polymorphism. *Ann Rev Ecol Systemat.* 29, 1–21.
- Klein, J, & Sato, A. 1998.** Birth of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 47:199–209.
- Klein, J & O’hUigin, C. 1993.** Composite origin of major histocompatibility complex genes [Review]. *Curr Opin Genet Dev.* 3:923-930.
- Klein, J, Ono, H, Klein, D, & O’hUigin, C. 1993.** The accordion model of *Mhc* evolution. In: J. Gergely, M. Benczúr, A. Erdei, A. Falus, Gy. Füst, G. Medgyesi, Gy. Petrányi, and É. Rajnavölgyi (eds.): *Progress in Immunology (Vol VIII)*, Proceedings of the 8th International Congress of Immunology Budapest 1992, pp. 137–195, Springer, Budapest.

- Klein, J. 1986.** Natural History of the Major Histocompatibility Complex. *Wiley, New York*.
- Knapp, LA. 2005.** The ABCs of MHC. *Evol Anthropol.* 14:28-37.
- Konnai, S, Takeshima, SN, Tajima, S, Yin, SA, Okada, K, Onuma, M & Aida Y. 2003.** The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. *Microbiol Immunol.* 47:223–232.
- Kostia, S, Kantanen, J, Kolkkala, M & Varvio, SL. 1998.** Applicability of SSCP analysis for MHC genotyping: fingerprinting of Ovar-DRB1 exon 2 alleles from Finnish and Russian breeds. *Anim Genet.* 6:453-5.
- Koutsogiannouli, E A, Moutou, KA, Sarafidou, T, Stamatis, C & Mamuris Z. 2009.** Detection of hybrids between wild boars (*Sus scrofa scrofa*) and domestic pigs (*Sus scrofa f. domestica*) in Greece, using the PCR-RFLP method on melanocortin-1 receptor (MC1R) mutations. *Mamm Biol.* 75:69-73.
- Kumánovics, A, Takada, T & Lindahl, KF. 2003.** Genomic organization of the mammalian MHC. *Annu Rev Immunol.* 21:629–657.
- Kwok, WW, Kovats, S, Thurtle, P & Nepom, GT. 1993.** HLA-DQ allelic polymorphisms constrain patterns of class II heterodimer formation. *J Immunol.* 150:2263–2272.
- Kwok S, Kellogg DE, McKinney N et al. 1990.** Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.* 18:999–1005.

L

- Lawlor, DA, Zemmour, J, Ennis, PD & Parham, P. 1990.** Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Annu Rev Immunol.* 8:23-63.
- Lawlor, DA, Ward, FF, Ennis, PD, Jackson, AP & Parham, P. 1988.** HLA-A,-B polymorphisms predate the divergence of humans and chimpanzees. *Nature* 335:268–271.
- Laws, GM & Adams, SP. 1996.** Measurement of 8-OHdG in DNA by HPLC/ECD: The importance of DNA purity. *BioTechniques* 20: 36-38.

- LeGuern, C, Marche, PN & Kindt, TJ. 1985.** Molecular evidence for five distinct MHC class II alpha genes in the rabbit. *Immunogenetics* 22:141–148.
- Lewontin RC. 1974.** The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press: New York.
- Lewontin, RC, Ginzburg, LR & Tuljapurkar, SD. 1978.** Heterosis as an explanation for large amounts of genic polymorphism. *Genetics* 88:149–170.
- Lincoln, G. 1974.** Reproduction and March madness in the Brown hare, *Lepus europaeus*. *J Zool Lond.* 174:1-14.
- Lohm, J, Grahn, M, Langefors, A, Andersen, O, Storset, A & von Schantz, T. 2002.** Experimental evidence for major histocompatibility complex – allele-specific resistance to a bacterial infection. *Proc R Soc London Ser B-Biol Sci* 269: 2029–2033.
- vanLoon, D. 1979.** Small-Scale Pig Raising. Garden Way Publishing, Vermont.
- Lopez de Castro, JA, Strominger, JL, Strong, DM & Orr, HT. 1982.** Structure of crossreactive human histocompatibility antigens HLA-A28 and HLA-A2: possible implications for the generation of HLA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:3813–3817.
- Luetkemeier, ES, Malhi, RS, Beever, JE & Schook, LB. 2009.** Diversification of porcine MHC class II genes: evidence for selective advantage. *Immunogenetics* 2:119-29.
- Lukas, D & Vigilant, L. 2005.** Reply: Facts, faeces and setting standards for the study of MHC genes using noninvasive samples. *Mol Ecol.* 14:1601–1602.

M

- MacDonald, D. 1984.** Encyclopedia of Mammals. New York: Facts on File Publications.
- Mamuris, Z, Sfougaris, AI, Stamatis, C & Suchentrunk, F. 2002.** Assessment of genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations based on variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biochem Genet.* 40:323–338.

- Mamuris, Z, Sfougaris, AI & Stamatis, C. 2001.** Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. *Biologic Conserv.* 101:187–196.
- Martinsohn, JT, Sousa, AB, Guethlein, LA & Howard, JC. 1999.** The gene conversion hypothesis of MHC evolution: a review. *Immunogenetics* 50:168-200.
- Massei, G & Genov, P. 2000.** *Il Cinghiale*. Calderini Edagricole, Bologna.
- Massei, G & Toso, S. 1993.** Biologia e gestione del cinghiale. *INFS, Documenti Tecnici*, 5.
- Matsunaga, T & Rahman, A. 1998.** What brought the adaptive immune system to vertebrates? - The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunol Rev.* 166: 177-136.
- Mathee, CA, Van Vuuren, BJ, Bell, D & Robinson, TJ. 2004.** A molecular supermatrix of the rabbits and hares (Leporidae) allows for the identification of five intercontinental exchanges during the Miocene. *Syst Biol.* 53:433–447.
- Mayer, F & Brunner, A. 2007.** Non-neutral evolution of the major histocompatibility complex class II gene DRB1 in the sac-winged bat *Saccopteryx bilineata*. *Heredity* 3:257-264.
- McFarland, BJ & Beeson, C. 2002.** Binding interactions between peptides and proteins of the class II major histocompatibility complex. *Medicin Res Rev.* 22:168–203.
- Meyer, D & Thomson G. 2001.** How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. *Ann Hum Genet.* 65:1-26.
- Meyer-Lucht, Y & Sommer, S. 2005.** MHC diversity and the association to nematode parasitism in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*). *Mol Ecol.* 14:2233-2243. Blackwell Publishing, Ltd.
- MHC Sequencing Consortium. 1999.** Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature.* 401:921–923.
- Mikko, S, Spencer, M, Morris B et al. 1997.** A comparative analysis of *Mhc DRB3* polymorphism in the American bison (*Bison bison*). *J Hered.* 88:499–503.
- Miller, MM, Goto, RM, Bernot, A, Zoorob, R, Auffray, C, Bumstead, N, Briles, WE. 1994.** Two MHC class I and two MHC class II genes map to the chicken Rfp-Y system outside the B complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4397–4401.
- Milner, CM & Campbell, RD. 2001.** Genetic organization of the human MHC class III region. *Front Biosci.* 6:D914–D926.

- Mitchell-Olds, T, Willis, JH & Goldstein, DB. 2007.** Which evolutionary processes influence natural genetic variation for phenotypic traits? *Nat Rev Genet.* 8:845-856.
- Mona, S, Crestanello, B, Bankhead-Dronnet, S, Pecchioli, E, Ingrosso, S, D'Amelio, S, Rossi, L, Meneguz, PG & Bertorelle, G. 2008.** Disentangling the effects of recombination, selection, and demography on the genetic variation at a major histocompatibility complex class II gene in the alpine chamois. *Mol Ecol.* 18:4053-4067.
- Murray, BW, Michaud, R, Bradley, N & White, BN. 1999.** Allelic and haplotype variation of major histocompatibility complex class II *DRB1* and *DQB* loci in the St Lawrence beluga (*Delphinapterus leucas*). *Mol Ecol* 8:1127-1139.
- Murray, BW & White, BN. 1998.** Sequence variation at the major histocompatibility complex DRB loci in beluga (*Delphinapterus leucas*) and narwhal (*Monodon monoceros*) *Immunogenetics* 48: 242–252.
- Murphy, NR & Hellwig, RJ. 1996.** Improved nucleic acid organic extraction through use of a unique gel barrier matrix. *BioTechniques* 21: 934-939.
- Musolf, K, Meyer-Lucht, Y & Sommer, S. 2004.** Evolution of MHC-DRB class II polymorphism in the genus *Apodemus* and a comparison of DRB sequences within the family Muridae (Mammalia: Rodentia). *Immunogenetics* 56: 420–426.

N

- Nagaoka, Y, Kabeya, H, Onuma, M, Kasai, N, Okada, K & Aida Y. 1999.** Ovine MHC class II DRB1 alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma. *Cancer Res.* 59:975–981.
- Nei, M. 1972.** Genetic distance between populations. *Am Nat.* 106:283-292.
- Nei, M & Kumar, S. 2000.** Molecular evolution and phylogenetics. 1st ed. New York: Oxford University Press.
- Nei, M, Gu, X & Sitnikova, T. 1997.** Evolution by the birth- and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7799–7806.

- Nei, M & Hughes, AL. 1991a.** Polymorphism and evolution of the major histocompatibility complex loci in mammals. In: *Selander RK, Clark AG, Whittam TS (eds) Evolution at the molecular level. Sinauer, Sunderland, Mass: 222-247.*
- Nei, M & Hughes, AL. 1991b.** Polymorphism due to balancing selection at the major histocompatibility complex loci. In: *The Unity of Evolutionary Biology: Proc. IV Intl. Cong. System. Evol. Biol., (E. Dudley, ed.), Dioscorides Press, Portland, Oregon 2:878-889.*
- Nizetic, D, Figueroa, F, Dembic, Z, Nevo, E & Klein, J. 1987.** Major histocompatibility complex gene organization in the mole rat *Spalax ehrenbergi*: evidence for transfer of function between class II genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5828–5832.
- Nowak, R. 1991.** Walker's Mammals of the World, 5th ed. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press.

O

- O'Callaghan, CA & Bell, JI. 1998.** Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Immunol Rev.* 163:129–138.
- Ohta, T. 1991.** Role of diversifying selection and gene conversion in evolution of major histocompatibility complex loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6716-6720.
- Ohta, T. 1982.** Allelic and nonallelic homology of a supergene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:3251–54.
- van Oosterhout, C. 2009.** A new theory of MHC evolution: beyond selection on the immune genes. *Proc R Soc B.* 276:657–665.
- Oppelt, C, Wutzler, R & von Holst D. 2010.** Characterisation of MHC class II DRB genes in the northern tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Immunogenetics* 9:613-622.
- Orita, M, Suzuki, Y, Sekiya, T & Hayashi, K. 1989.** Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879.
- Otting, N, de Groot, NG, Doxiadis, GGM & Bontrop, RE. 2002.** Extensive Mhc-DQB variation in humans and non-human primate species. *Immunogenetics* 54:230–239.

- Ottova, E, Simkova, A, Martin, JF et al. 2005.** Evolution and trans-species polymorphism of MHC class IIb genes in cyprinid fish. *Fish Shellfish Immunol.* 18:199–222.
- Outteridge, PM, Andersson, L, Douch, PGC, Green, RS, et al. 1996.** The PCR typing of MHC-DRB genes in the sheep using primers for an intronic microsatellite: application to nematode parasite resistance. *Immunol Cell Biol.* 74: 330-336.

P

- Page, RDM & Holmes, EC. 1998.** Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach. Oxford, U.K: Blackwell Science.
- Parham, P. 1999.** Virtual reality in the MHC. *Immunol Rev.* 167: 5-15.
- Parham, P, Adams, EJ & Arnett, KL. 1995.** The origins of HLA-A,B,C polymorphism. [Review]. *Immunol Rev.* 143:141.
- Parham, P, Lawlor, DA, Lomen, CE & Ennis, PD. 1989.** Diversity and diversification of HLAA, B, C alleles. *J Immunol* 142:3937–3950.
- Paterson, S, Wilson, K & Pemberton, JM. 1998.** Major histocompatibility complex (MHC) variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 95:3714–3719.
- Penn, DJ. 2002.** The scent of genetic compatibility: sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology* 108: 1–21.
- Peterson, R. 1966.** The Mammals of Eastern Canada. Oxford University Press.
- Piertney, SB & Oliver, MK. 2006.** The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* 96:7–21.
- van der Poel, JJ, Groenen, MA, Dijkhof, RJ, Ruyter, D & Giphart, MJ. 1990.** The nucleotide sequence of the bovine MHC class II alpha genes: DRA, DOA, and DYA. *Immunogenetics* 31:29–36.

- Pokorny, I, Sharma, R, Goyal, SP, Mishra, S & Tiedemann, R. 2010.** MHC class I and MHC class II DRB gene variability in wild and captive Bengal tigers (*Panthera tigris tigris*). *Immunogenetics* 10:667-679.
- Poli, A, Nigro, M, Gallazi, D, Sironi, G & Lavazza, A. 1991.** Acute hepatitis in the european brown hare (*Lepus europaeus*) in Italy. *J Wildl Dis.* 27(4): 621-629.
- Porter, V. 1993.** Pigs - A Handbook to the Breeds of the World. Cornell University Press, NY.
- Potts, WK, Manning, CJ & Wakeland, EK. 1994.** The role of infectious disease, inbreeding and mating preferences in maintaining MHC genetic diversity: an experimental test. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 346 (1317):369-378.
- Potts, WK & Wakeland, EK. 1990.** Evolution of diversity at the major histocompatibility complex. *Trends Ecol Evol.* 5: 181–186.
- Poulton, EB. 1884.** Notes upon, or suggested by, the colours, markings and protective attitudes of certain lepidopterous larvae and pupae, and of a phytophagous hymenopterous larva. *Trans Ent Soc of London* 1884: 27–60.

R

- Rammensee, HG, Friede, T & Stevanovic, S. 1995.** MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41:178–228.
- Reche, PA & Reinherz, EL. 2003.** Sequence variability analysis of human class I and class II MHC molecules: functional and structural correlates of amino acid polymorphism. *J Mol Biol.* 331:623–641.
- Renard, C, Hart, E, Sehra, H, Beasley, H, Coggill, P, Howe, K, Harrow, J, Gilbert, J, Sims, S, Rogers, J, Ando, A, Shigenari, A, Shiina, T, Inoko, H, Chardon, P & Beck, S. 2006.** The genomic sequence and analysis of the swine major histocompatibility complex. *Genomics* 88:96-110.
- Rhymer, JM & Simberloff, D. 1996.** Extinction by hybridization and introgression. *Annu Revf Ecol System.* 27:83-109.
- Richman, AD, Herrera, LG, Nash, D & Schierup, HM. 2003.** Relative roles of mutation and recombination in generating allelic polymorphism at an MHC class II locus in *Peromyscus maniculatus*. *Genet Res.* 82:89–99.

- Richman, A. 2000.** Evolution of balanced genetic polymorphism. *Mol Ecol.* 9:1953–1963.
- Roberts, N, Kuzucuoglu, C & Karabiyikoglu, M. 1999.** The Latem Quaternary in the Eastern Mediterranean region: an introduction. *Quat Sci Rev.* 18:497–499.
- Roberts, SC. 2009.** Complexity and context of MHC-correlated mating preferences in wild populations. *Mol Ecol.* 15:3121-3123.
- Robinson, TJ & Matthee, CA. 2005.** Phylogeny and evolutionary origins of the Leporidae: a review of cytogenomics, molecular analyses and a supermatrix analysis. *Mammal Rev.* 35:231–247.

S

- Saiki, RK, Gelfand, DH, Stoffel, S, Scharf, SJ, Higuchi, R, Horn, GT, Mullis, KB & Erlich, HA. 1988.** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239:487- 491.
- Saitou, N & Nei, M. 1987.** the neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406-425.
- Saitou, N & Nei, M. 1986.** The number of nucleotides required to determine the branching order of three species, with special reference to the human-chimpanzee-gorilla divergence. *J Mol Evol.* 24:189-204.
- Satta, Y, O'huigin, C, Takahata, N & Klein, J. 1994.** Intensity of natural selection at the major histocompatibility complex loci. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:7184-7188.
- Scandura, M, Iacolina, L, Crestanello, B, Pecchioli, E, Di Benedetto, MF, Russo, V, Davoli, R, Apollonio, M & Bertorelle, G. 2008.** Ancient vs. recent processes as factors shaping the genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable? *Mol Ecol.* 7:1745-1762.
- Schad, J, Ganzhorn, JU & Sommer, S. 2005.** Parasite burden and constitution of major histocompatibility complex in the Malagasy mouse lemur, *Microcebus murinus*. *Evolution* 2:439-450.
- Schwaiger, FW, Maddox, J, Ballingall, K, Buitkamp, J, et al. 1996.** The ovine major histocompatibility complex. In: The major histocompatibility complex

- region of domestic animal species (Schook LB and Lamont SJ, eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA, 121-176.
- Schwaiger, FW, Weyers, E, Buitkamp, J, Ede, AJ, Crawford, A & Epplen, JT. 1994.** Interdependent *MHC-DRB* exon-plusintron evolution in artiodactyls. *Mol Biol Evol.* 11: 239–249.
- Scott, PC, Gogolin-Ewens, KJ, Adams, TE & Brandon, MR. 1991a.** Nucleotide sequence, polymorphism, and evolution of ovine MHC class II DQA genes. *Immunogenetics* 34: 69-79.
- Scott, PC, Maddox, JF, Gogolin-Ewens, KJ & Brandon, MR. 1991b.** The nucleotide sequence and evolution of ovine MHC class II B genes: DQB and DRB. *Immunogenetics* 34: 80-87.
- Scott, PC, Choi, CL & Brandon, MR. 1987.** Genetic organization of the ovine MHC class II region. *Immunogenetics* 25:116–122.
- Seddon, JM & Ellegren, H. 2002.** MHC class II genes in European wolves: a comparison with dogs. *Immunogenetics* 7:490-500.
- Seddon, JM & Baverstock, PR. 2000.** Evolutionary lineages of RT1.Ba in the Australian Rattus. *Mol Biol Evol.* 17:768–772.
- Sert, H, Suchentrunk, F & Erdogan, A. 2005.** Genetic diversity in brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) from Anatolia and differentiation among Anatolian and European populations. *Mammal Biol.* 70:171–186.
- Shiina, T, Shimizu, S, Hosomichi, K, Kohara, S, Watanabe, S, Hanzawa, K, Beck, S, Kulski, JK & Inoko, H. 2004.** Comparative genomic analysis of two avian (Quail and Chicken) MHC regions. *J Immunol.*172:6751–6763.
- Shiina, T, Shimizu, C, Oka, A, Teraoka, Y, Imanishi, T, Gojobori, T, Hanzawa, K, Watanabe, S & Inoko, H. 1999.** Gene organization of the quail major histocompatibility complex (MhcCoja) class I gene region. *Immunogenetics* 49:384–394.
- Siebold, C, Hansen, BE, Wyer, JR et al. 2004.** Crystal structure of HLA-DQ0602 that protects against type I diabetes and confers strong susceptibility to narcolepsy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:5380–5383.
- Sittisombut, N & Knight, KL. 1986.** Rabbit major histocompatibility complex. I. Isolation and characterization of three subregions of class II genes. *J Immunol.* 136:1871–1875.

- Slade, RW & McCallum, HI. 1992.** Overdominant vs. frequency-dependent selection at MHC loci. *Genetics* 132:861–864.
- Sneath, PHA & Sokal, RR. 1973.** Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, CA.
- Snell, GD. 1981.** Studies in histocompatibility. *Science* 213:172–178.
- Snell, GD. 1968.** The H-2 locus of the mouse: observations and speculations concerning its comparative genetics and its polymorphism. *Folia Biol.* 14:335–358.
- Snibson, KJ, Maddox, JF, Fabb, SA & Brandon, MR. 1998.** Allelic variation of ovine MHC class II DQA1 and DQA2 genes. *Anim Genet.* 29: 356–362.
- Stamatis, C, Suchentrunk, F, Moutou, KA et al. 2009.** Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia? *J Biogeogr.* 36:515–528.
- Stamatis, C, Suchentrunk, F, Sert, H, Triantaphyllidis, C & Mamuris, Z. 2007.** Genetic evidence for survival of released captive-bred brown hares *Lepus europaeus* during restocking operations in Greece. *Oryx* 41 :548–551.
- Stone, RT & Muggli-Cockett, NE. 1990.** Partial nucleotide sequence of a novel bovine major histocompatibility complex class II betachain gene, BoLA-DIB. *Anim Genet.* 21:353–360.
- Storer, P. 1992.** Miniature Pigs. Barron's Educational Series, Inc. NY.
- Storfer, A. 1998.** Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biol Conserv.* 87:173–180.
- Su, C & Nei, M. 1999.** Fifty-million-year-old polymorphism at an immunoglobulin variable region gene locus in the rabbit evolutionary lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9710–9715.
- Suchentrunk, F, Mamuris, Z, Sfougaris, AI & Stamatis, C. 2003.** Biochemical genetic variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from Greece. *Biochem Genet.* 41:127–140.
- Surridge, AK, van der Loo, W, Abrentes, J, Carneiro, M, Hewitt, GM & Esteves, PJ. 2008.** Diversity and evolutionary history of the MHC DQA gene in leporids. *Immunogenetics* 60:515–525.

T

- Taberlet, P, Fumagalli, L, Wust-Saucy, AG & Cosson, JF. 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molec Ecol.* 7:453–464.
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Takahata, N. 1993a.** Allelic genealogy and human evolution. *Mol Biol Evol.* 10:2–22.
- Takahata, N. 1993b.** Evolutionary genetics of human paleopopulations. In: *Mechanisms of Molecular Evolution* (eds Takahata N, Clarke AG), pp. 1–21. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takahata, N & Nei, M. 1990.** Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* 124:967–978.
- Takehima, SN & Aida, Y. 2006.** Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim Sci J.* 77: 138–150.
- Tennessen, JA. 2005.** Molecular evolution of animal antimicrobial peptides: widespread moderate positive selection. *J Evol Biol.* 18:1387–1394.
- Thio, CL, Carrington, M, Marti, D, Vlahov, D, Nelson, KE, Astemborski, J & Thomas, DL. 1999.** Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis.* 179:1004-1006.
- Thursz, MR, Thomas, HC, Greenwood, BM & Hill, AV. 1997.** Heterozygote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection [letter]. *Nat Genet.* 17:11
- Trachtenberg, E, Korber, B, Sollars, C, Kepler, TB, Hraber, PT, Hayes, E, Funkhouser, R, Fugate, M, Theiler, J, Hsu, YS, Kunstman, K, Wu, S, Phair, J, Erlich, H & Wolinsky, S. 2003.** Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat Med.* 9:928–935.
- Tregenza, T & Wedell, N. 2000.** Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. *Mol Ecol.* 9:1013–1027.
- Trowsdale, J & Powis, SH. 1992.** The MHC: relationship between linkage and function. *Curr Opin Genet Dev.* 2:492-497.

V

- Vernesi, C, Crestanello, B, Pecchioli, E, Tartari, D, Caramelli, D, Hauffe, H & Bertorelle, G. 2003.** The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): a microsatellite analysis. *Mol Ecol.* 3:585-595.
- Vilà, C, Seddon, J & Ellegren, H. 2005.** Genes of domestic mammals augmented by backcrossing with wild ancestors. *Trends Genet.* 21:214–218.
- Villadangos, JA. 2001.** Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol.* 38:329–346.

W

- Wagner, JL. 2003.** Molecular organization of the canine major histocompatibility complex. *J Hered.* 94:23–26
- Wakeland, EK, Boehme, S, She, JX, Lu, CC, McIndoe, RA, Cheng, I, Ye, Y & Potts, WK. 1990.** Ancestral polymorphisms of MHC class II genes: divergent allele advantage. *Immunol Res.* 9:115–122.
- van der Walt, JM, Nel, LH & Hoelzel, AR. 2001.** Characterization of major histocompatibility complex DRB diversity in the endemic South African antelope *Damaliscus pygargus*: a comparison in two subspecies with different demographic histories. *Mol Ecol.* 10:1679–1688.
- Walter, L, Hurt, P, Himmelbauer, H, Sudbrak, R & Günther, E. 2002.** Physical mapping of the major histocompatibility complex class II and class III regions of the rat. *Immunogenetics* 54:268–275.
- Wan, QH, Zeng, CJ, Ni, XW, Pan, HJ & Fang, SG. 2009.** Giant panda genomic data provide insight into the birth-and-death process of mammalian major histocompatibility complex class II genes. *PLoS One* 4(1):e4147.
- Wan, QH, Zhu, L, Wu, H & Fang, SG. 2006.** Major histocompatibility complex class II variation in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Mol Ecol.* 15:2441–2450.

- Weber, DS, Stewart, BS, Schienman, J & Lehman, N. 2004.** Major histocompatibility complex variation at three class II loci in the northern elephant seal. *Mol Ecol.* 13:711–718.
- Weir, BS & Cockerham, CC. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Wenink, P, Groen, A, Roelke-Parker, M & Prins, HHT. 1998.** African buffalo maintain high genetic diversity in the major histocompatibility complex in spite of historically known population bottlenecks. *Mol Ecol.* 7:1315–1322.
- Wheat, CW, Haag, CR, Marden, JH, Hanski, I & Frilander, MJ. 2010.** Nucleotide polymorphism at a gene (Pgi) under balancing selection in a butterfly metapopulation. *Mol Biol Evol.* 27(2):267-81.
- Wibbelt, G & Frölich, K. 2005.** Infectious diseases in European brown hare (*Lepus europaeus*). *Wildl Biol Pract.* 1:86–93.
- Williams, A, Peh, CA & Elliott, T. 2002.** The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens* 59:3–17.
- Wills, C. 1991.** Maintenance of multiallelic polymorphism at the MHC region. *Immunol Rev.* 124:165–220.
- Wright, H & Ballingall, KT. 1994.** Mapping and characterization of the DQ subregion of the ovine MHC. *Anim Genet.* 25:243-249.
- Wright, H, Ballingall, KT & Redmond, J. 1994.** The DY sub-region of the sheep MHC contains an A/B gene pair. *Immunogenetics* 40:230–234.

X

- Xie, T, Rowen, L, Aguado, B, Ahearn, ME, Madan, A, Qin, S, Campbell, RD & Hood L. 2003.** Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. *Genome Res.* 13:2621–2636.
- Xu, A, van Eijk, MJT, Park, C & Lewin, HA. 1993.** Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukaemia virus. *J Immunol.* 151:6977–6985.

Y

- Yamazaki, K, Boyse, EA, Mike, V, Thaler, HT & Mathieson, BJ, et al. 1976.** Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *J Exp Med.* 114:1324–35.
- Yeager, M & Hughes, A. 1999.** Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination and convergent evolution. *Immunol Rev.* 167:45-58.
- Yuhki, N, Beck, T, Stephens, RM, Nishigaki, Y, Newmann, K & O'Brien, SJ. 2003.** Comparative genome organization of human, murine, and feline MHC class II region. *Genome Res.* 13:1169–1179.

Z

- Zhang, J. 1999.** Performances of likelihood ratio tests of evolutionary hypotheses under inadequate substitution models. *Mol Biol Evol.* 16:868-875.
- Zhou, H & Hickford, JG. 2004.** Allelic polymorphism in the ovine DQA1 gene. *J Anim Sci.* 82: 8-16.
- Zhou, H & Hickford, JG. 2001.** Rapid communication: three new allelic sequences at the ovine MHC classII DQA1 locus. *J Anim Sci.* 79: 779-780.
- Zinkernagel, RM & Doherty PC. 1974.** Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lympholytic choriomeningitis. *Nature.* 251:547-548.