



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Μελέτη

«Προσδιορισμός των γονοτύπων του γονιδίου
PRNP που σχετίζεται με την Τρομώδη Νόσο σε
ελληνικές φυλές προβάτων»

Πέρος Θαρρενός-Χρήστος

2018

Λάρισα, 2018

«Προσδιορισμός των γονοτύπων του γονιδίου PRNP που
σχετίζεται με την Τρομώδη Νόσο σε ελληνικές φυλές
προβάτων»

«Determination of the genotypes of the PRNP gene associated
with the Scrapie Disease in Greek sheep breeds »

Διπλωματική μελέτη

Πέρος Θαρρενός-Χρήστος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

| | |
|-------------------------------------|--|
| ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ) | Επίκουρος καθηγήτρια Γενετικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |
| ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ | Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π) του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |
| ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ | Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη /Abstract

ΜΕΡΟΣ 1^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

| | |
|---|----|
| 1. Εισαγωγή στις Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες..... | 7 |
| 2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ | |
| 2.1 Φύση του μολυσματικού παράγοντα..... | 9 |
| 2.2 Στελέχη του μολυσματικού παράγοντα..... | 10 |
| 2.3 Τρόποι μετάδοσης του μολυσματικού παράγοντα..... | 10 |
| 2.4 Παθογένεια-Εξάπλωση και συσσώρευση της PrPSc..... | 11 |
| 3. ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ PrP ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΤΗΣ ΤΡΟΜΩΔΗ ΝΟΣΟΥ..... | 13 |
| 3.1 Φυσιολογικός ρόλος της PrPC..... | 13 |
| 3.2 Δομή της PrPC και η σχέση της με τον μολυσματικό παράγοντα..... | 14 |
| 3.3 Περιγραφή του μηχανισμού μετατροπής της PrPC σε PrPSc..... | 15 |
| 3.4 Αλληλεπίδραση PrPSc-PrPC και η σπουδαιότητα της για τον μηχανισμό της ασθένειας | 17 |
| 3.5 Θεραπευτικές προσεγγίσεις..... | 20 |
| 3.5.A Αντισώματα αντι-PrP..... | 20 |
| 3.5.B Μοριακοί συνοδοί..... | 20 |
| 3.5.Γ Χημικοί συνοδοί..... | 21 |
| 4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΗΣ PRP ΜΕ ΤΗΝ ΤΡΟΜΩΣΗ ΝΟΣΟ..... | 21 |
| 4.1 Εξήγηση της επίδρασης των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο..... | 22 |
| 4.2 Σημαντικότεροι πολυμορφισμοί και γονότυποι που σχετίζονται με την Τρομώδη Νόσο..... | 23 |
| 4.3 Γονότυποι της PrP και ευαισθησία στην Scrapie..... | 24 |
| 4.4 Μελέτες γονοτύπων σε ελληνικές φυλές προβάτων..... | 25 |
| 5. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΤΡΟΜΩΔΗ ΝΟΣΟ..... | 27 |
| 5.1 Ελληνικές φυλές που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία..... | 29 |
| 5.2 Σκοπός της εργασίας..... | 30 |

ΜΕΡΟΣ 2º: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

| | |
|--|----|
| 6. Απομόνωση DNA..... | 32 |
| 6.1 Πηγές Απομόνωσης..... | 32 |
| 7. Ηλεκτροφοριση σε πηκτωμα αγαροζης..... | 33 |
| 8. Ενίσχυση τμήματος DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης..... | 35 |
| 9. Ανάλυση SSCP..... | 38 |
| 10. Καθαρισμός DNA και Αλληλούχιση..... | 40 |

ΜΕΡΟΣ 3º: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

| | |
|--|----|
| 11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 42 |
| 11.1 Απομόνωση DNA από δείγματα αίματος προβάτων..... | 42 |
| 11.2 Ενίσχυση τμήματος DNA με PCR..... | 43 |
| 11.3 Ανάλυση SSCP..... | 44 |
| 11.4 Αλληλούχιση..... | 45 |
| 11.5 Γονότυποι και συχνότητες..... | 46 |
| 12. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 47 |
| BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 50 |

Περίληψη

Η νόσος Scrapie είναι μια θανατηφόρος μολυσματική ασθένεια των αιγοπροβάτων η οποία προκαλεί εκφυλισμό του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ο μολυσματικός παράγοντας της ασθένειας είναι μια ισομορφή της κυτταρικής prion πρωτεΐνης (PrP) με ασύνηθης διαμόρφωση. Στα πρόβατα οι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στα κωδικόνια 136, 154 και 171 του γονιδίου της πρωτεΐνης PrP (PRNP) έχουν συσχετιστεί άμεσα με ευαισθησία/ανθεκτικότητα στην Scrapie. Σύμφωνα με το πρόγραμμα National Scrapie Plan του Ηνωμένου Βασιλείου, καθιερώθηκε ένα σύστημα κατηγοριοποίησης των γονοτύπων σε πέντε ομάδες κινδύνου (τύπου 1 έως τύπου 5) βασισμένο στον βαθμό ευαισθησίας/ανθεκτικότητας που επιδεικνύει κάθε ένας από αυτούς. Συνολικά 78 υγιή πρόβατα ελέγχθηκαν από δύο ελληνικές φυλές , Μπούτσικα και Φρισάρτα, για τους συσχετιζόμενους με την scrapie γονοτύπους. Περίπου το 50% των ατόμων από κάθε φυλή έφερε ανθεκτικούς γονοτύπους.

Abstract

Scrapie is a lethal infectious disease of sheep and goats that causes degeneration of the central nervous system. The infectious agent of this disease is an isoform of the cellular prion protein (PrP) with an aberrant conformation. In sheep, polymorphisms at codons 136, 154 and 171 of the host gene that encodes PrP (PRNP) have been closely linked to susceptibility/resistance to scrapie. According to the UK's National Scrapie Plan, a classification system of five risk groups (types 1 to 5) has been established for these genotypes, based on the degree of resistance shown by each one of them. A total of 78 healthy sheep from two Greek sheep breeds (Boutsika and Frisarta) were analyzed for the scrapie-linked genotypes. Almost 50% of the individuals of each breed were found to carry resistance-linked genotypes.

ΜΕΡΟΣ 1ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΜΕΤΑΔΟΤΙΚΕΣ ΣΠΟΓΓΩΔΕΙΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΠΑΘΕΙΕΣ

Η νόσος Scrapie είναι μια θανατηφόρος, μεταδοτική, νευροεκφυλιστική ασθένεια των αιγοπροβάτων. Αποτελεί μέλος μιας ομάδας νοσημάτων γνωστών ως Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες [ΜΣΕ, Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs)] ή νόσοι Prion, οι οποίες εντοπίζονται τόσο στα ζώα όσο και στον ίδιο τον άνθρωπο. Έχουν πάρει το όνομα τους από τις χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που προκαλούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και παραπέμπουν σε εικόνα σπόγγου. Η τρομώδης νόσος του προβάτου (scrapie) είναι η πρώτη από τις ΜΣΕ που έγινε γνωστή. Η πρώτη αναφορά της νόσου έγινε το 1732 στη Μεγάλη Βρετανία. Έκτοτε η μετακίνηση μολυσμένων κοπαδιών, αρχικά σε άλλες χώρες εντός της Ευρώπης και στη συνέχεια σε άλλες ηπείρους, συντέλεσε στην εξάπλωση της ασθένειας σε παγκόσμιο κλίμακα (Αικατερινιάδου Λ. και συν. Ινστιτούτο κτηνιατρικών ερευνών Θεσσαλονίκης, 2005).

Οι μεγάλες περίοδοι επώασης είναι ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ΜΣΕ. Οι περίοδοι αυτές κυμαίνονται μεταξύ μερικών μηνών έως αρκετών ετών. Ο ελάχιστος εκτιμώμενος χρόνος εκδήλωσης για τις ΜΣΕ είναι 6-12 μήνες, ενώ στην περίπτωση της scrapie τα συμπτώματα της ασθένειας γίνονται εμφανή μετά από περίοδο 2 ετών (σε κάποιες περιπτώσεις και περισσότερο). Το γεγονός αυτό καθιστά φυσικά και δυσκολότερη την αντιμετώπιση της, κυρίως όσο αφορά το κομμάτι της εξάπλωσης της νόσου, καθ' ότι είναι πολύ πιθανόν σε έναν κατά τα άλλα φαινομενικά υγιή πληθυσμό ζώων να υπάρχουν αρκετά άτομα που να βρίσκονται σε κλινικά σιωπηλή φάση μεταδίδοντας την ασθένεια.

Πάρα όμως την παρατεταμένη περίοδο επώασης της ασθένειας, από την στιγμή που ένα άτομο γίνει συμπτωματικό η πρόοδος της νόσου είναι ραγδαία με αποτέλεσμα τον θάνατο του ζώου από ασιτία και λειψυδρία μέσα σε διάστημα μηνών ή ακόμα και μόλις λίγων εβδομάδων. Στις περισσότερες περιπτώσεις ΜΣΕ οι πρώτες ενδείξεις περιλαμβάνουν αλλαγές στη συμπεριφορά, τρέμουλο, νευρικότητα, αταξία και προοδευτικά απώλεια βάρους καθότι η νόσος στοχεύει στο ΚΝΣ. Ένα άλλο χαρακτηριστικό σύμπτωμα της Scrapie των προβάτων είναι ο έντονος κνησμός (scraping) (Εικ. 1) από το οποίο πήρε και το όνομά της η Τρομώδης Νόσος (TN) των προβάτων (Iowa State University, TSE: Review, 2016).



*Εικ.1 Κλινικά συμπτωματικό ζώο με χαρακτηριστικά σημάδια λόγω κνησμού.
(Αικατερινιάδου Α. 2005)*

Τα σημεία τα οποία κατέστησαν αρχικά τις ΜΣΕ και κατ' επέκταση την Scrapie τόσο ενδιαφέρον θέμα για μελέτη, αφορούν εν μέρη την επίδραση που έχουν στο γενικότερο εμπόριο καθώς και τις οικονομικές απώλειες στην κτηνοτροφία. Η τεκμηριωμένη διάγνωση της νόσου απαιτεί εξέταση του εγκεφάλου του ζώου για την ύπαρξη του μολυσματικού παράγοντα της ασθένειας με τη χρήση βιοχημικών και ιστοχημικών μεθόδων, κάτι το οποίο όμως μπορεί να γίνει μόνο μετά θάνατον. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως για την ανίχνευση των μολυσμένων ζώων μιας εκτροφής θα πρέπει να θανατωθούν όλα τα ζώα άνω 18 των μηνών ώστε να εξετασθεί ο εγκέφαλος.

Οι σοβαρές επιπτώσεις που έχουν επιφέρει οι ΜΣΕ των ζώων στην οικονομία τις τελευταίες δεκαετίες, δεν είναι το σημαντικότερο μέρος του προβλήματος. Η έξαρση της «νόσου των τρελών αγελάδων» στη Μεγάλη Βρετανία την διετία 1985-1986 πυροδότησε μια νέα σειρά μελετών. Σκοπός ήταν η ανακάλυψη τη προέλευσης της ΣΕΒ (Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών), η οποία ως τότε ήταν άγνωστη. Μέσα στο πλαίσιο των ερευνών θεωρήθηκε πως η ΣΕΒ μεταδόθηκε στα βοοειδή μέσω χορήγησης οστεοκρεατάλευρων που περιείχαν μολυσμένους ιστούς προβάτων. Παρά του ότι χρόνια αργότερα αποδείχθηκε πως κάτι τέτοιο δεν ίσχυε, εκείνη την περίοδο ήταν αρκετό για να κάνει την επιστημονική κοινότητα να αμφισβητήσει τον «φραγμό μετάδοσης» της ασθένειας που θεωρήθηκε πως υπάρχει μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Τελικά μια δεκαετία περίπου αργότερα, το 1997 οι M.E. Bruce et al ανέδειξαν μέσα από πειραματικά δεδομένα πως η νόσος Creutzfeldt-Jacob του ανθρώπου προέρχεται από τον μολυσματικό παράγοντα της ΣΕΒ των βοοειδών. Τα στοιχεία αυτά αυτόματα κατέστησαν την ΣΕΒ επικίνδυνη για τη δημόσια υγεία. (Iowa State University, TSE: Review, 2016). Έκτοτε η προσπάθεια

των κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης έχει ενταθεί για την πιο αποτελεσματική επιτήρηση του προβλήματος της Τρομώδης Νόσου εστιάζοντας κυρίως στην πρόληψή του.

2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ

2.1 Φύση του μολυσματικού παράγοντα

Για πολλά χρόνια ακόμα μετά την εμφάνιση των ΜΣΕ, ο αιτιολογικός τους παράγοντας δεν ήταν ακόμα γνωστός. Οι έρευνες για την ανεύρεση του οδηγούσαν σε ποικίλα αποτελέσματα, μεταξύ των οποίων κάποιες υποστήριζαν πως οι TN ίσως αποτελούν γενετικά προκαλούμενες ασθένειες (Parry, 1962). Παρά το ότι η εκδήλωση της νόσου περιλαμβάνει και γενετική συνιστώσα, ο μολυσματικός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για τη μετάδοση της νόσου είναι πρωτεϊνικής φύσεως, κάτι το οποίο ειπώθηκε για πρώτη φορά το 1967 από τους Griffith et al. και επιβεβαιώθηκε το 1982 από τον Stanley Prusiner. Ο μολυσματικός αυτός παράγοντας πήρε το όνομα PrP (Proteinaceous Infection Particle) ενώ συχνά χρησιμοποιείται και ο όρος “prions” (εξού και η ονομασία Prion diseases).

Η πρωτεΐνη prion παρουσιάζει διάφορες φυσικοχημικές και βιοχημικές ιδιότητες, οι οποίες συντέλεσαν και στην τελική απομόνωσή της. Είναι ανθεκτική στην επίδραση της υπερϊώδους ακτινοβολίας (Gibbs et al. 1978), στη θερμότητα (Bellinger-Kawahara et al. 1987) και στην εφαρμογή αποδιατακτικών μεθόδων, όπως απορρυπαντικά και ορισμένες πρωτεϊνάσες (Prusiner et al, 1981). Η απομόνωσή της έγινε από εγκεφάλους μολυσμένων κρικητών με τη χρήση πρωτεϊνάσης K (Proteinase K, PK) (Bolton et al, 1982) στην οποία παρουσιάζει επίσης ανθεκτικότητα.

Το καθοριστικό βήμα για την καλύτερη κατανόηση της ασθένειας έγινε με την ανακάλυψη πως ο μολυσματικός αυτός παράγοντας με μοριακό βάρος 27-30kDa (Bolton et al, 1982), προκύπτει από την πρωτεόλυση ενός μεγαλύτερου μορίου, της PrPSc, η οποία αποτελεί τροποποιημένη μορφή της ενδογενούς PrPC του οργανισμού (Barry et al, 1986). Εστιάζοντας στην PrPSc είμαστε σε θέση να προσδιορίσουμε σε πρώτη φάση καλύτερα τους τρόπους διάδοσης της ασθένειας αλλά και να ερμηνεύσουμε της παθογένεια της τόσο στα αρχικά όσο και στα όψιμα στάδια της.

2.2 Στελέχη του μολυσματικού παράγοντα

Οι μολυσματικοί παράγοντες που προκαλούν την Τρομάδη Νόσο των προβάτων παρουσιάζουν μια ποικιλία 20 διαφορετικών στελεχών (Bruce, 1993). Τα διαφορετικά στελέχη παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως η θερμοανθεκτικότητα και η ανθεκτικότητα στη χημική επεξεργασία, οι οποίες πιστεύεται ότι οφείλονται σε διαφορές στο μήκος, τη διαμόρφωση αλλά και το επίπεδο γλυκοζυλίωσης του μορίου του μολυσματικού παράγοντα στην περιοχή που είναι ανθεκτική στην πρωτεόλυση από την PK (Bessen και Marsh 1994, Telling et al.1996). Η διάκριση των στελεχών γίνεται με βάση τις παραλλαγές που παρατηρούνται στην εκδήλωση της ασθένειας όταν αυτή προκαλείται από διαφορετικά στελέχη. Οι παραλλαγές αυτές περιλαμβάνουν κυρίως διαφορετικούς χρόνους επώασης, διαφορετική κλινική εκδήλωση του νοσήματος αλλά και διαφορές στις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις (Bessen et al, 1996).

2.3 Τρόποι μετάδοσης του μολυσματικού παράγοντα

Η πεπτική οδός φαίνεται να είναι η πιο συνηθής οδός εισαγωγής του μολυσματικού παράγοντα εντός του οργανισμού. Σε αρκετές περιπτώσεις μετάδοσης της νόσου είχε προηγηθεί εκτροφή των νοσούντων ατόμων, με ιστούς μολυσμένων ζώων, όπως για παράδειγμα πολύ συχνά έχει καταγραφεί σε περιπτώσεις μετάδοσης της ΣΕΒ. Πώς όμως επιτυγχάνεται αυτό; Ποιοι είναι αυτοί οι ιστοί; Είναι αυτή η μόνη οδός;

Έρευνες έδειξαν πως στην περίπτωση της Scrapie, η πρωτεΐνη prion μπορεί να εντοπιστεί στο σάλιο, στο αίμα, στα ούρα όπως και στα περιττώματα, χωρίς όμως να είναι ακόμα ξεκάθαρο το κατά πόσο αυτές οι πηγές μπορούν να συμμετέχουν σημαντικά στη μετάδοση της ασθένειας. Μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης prion φέρει ο πλακούντας στα πρόβατα, ο οποίος μετά το πέρας του τοκετού αποκολλάται και αποβάλλεται στο περιβάλλον. Είναι λοιπόν πολύ πιθανό τα νεογνά να μολυνθούν λείχοντας αυτές τις μεμβράνες αλλά και υγρά τις γέννας. Το γάλα (όπως και το πρωτόγαλα) σε κάποιες περιπτώσεις μηρυκαστικών, φαίνεται να είναι επίσης μολυσματικό (Iowa State University, TSE: Review, 2016). Όλα αυτά τα στοιχεία

δίνουν μια πολύ ξεκάθαρη εικόνα στο τι συμβαίνει στις περιοχές διαμονής μολυσμένων κοπαδιών και των κινδύνων που εγκυμονεί η βοσκή στις περιοχές αυτές. Παράλληλα, η ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν σε ένα μεγάλο εύρος αποσυνθετικών συνθηκών αλλά και διαδικασιών (Gibbs 1978, Bellinger-Kawahara 1987, Prusiner 1981) δυσχεραίνει την προσπάθεια απολύμανσης τέτοιων περιοχών βοσκής.

Στην περίπτωση της Scrapie, στους τρόπους μετάδοσης της ασθένειας περιλαμβάνεται και η περιγεννητική μετάδοση, αν και πιο σπάνια (David B. Adams), ενώ παλαιότερα έχουν καταγραφεί περιπτώσεις μετάδοσης της μέσω μολυσμένων ιατρικών εργαλείων αλλά και μετάγγισης αίματος (TSE Review, Iowa University 2016).

2.4 Παθογένεια – Εξάπλωση και συσσώρευση της PrPSc

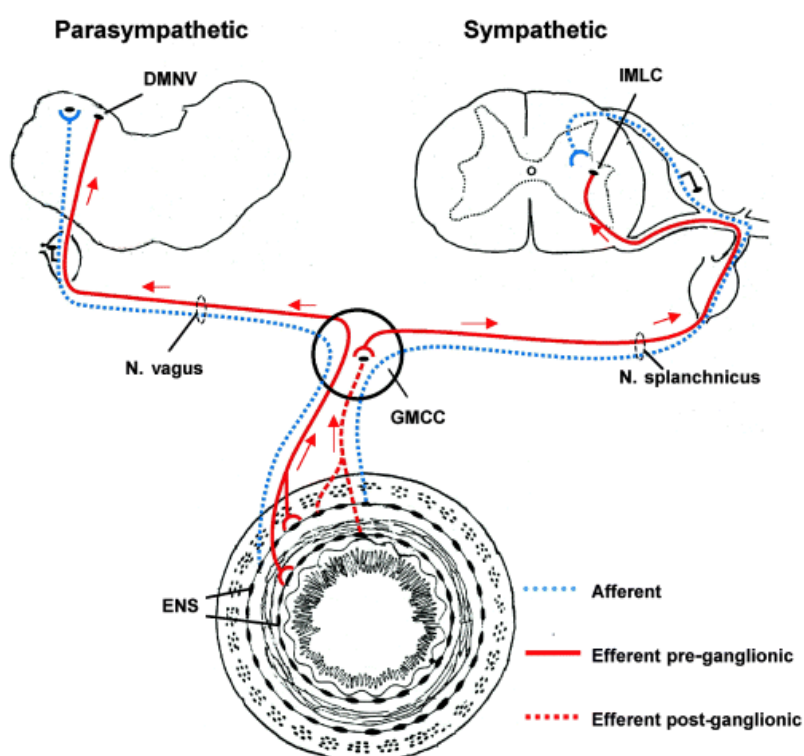
Τι συμβαίνει όμως μετά την εισαγωγή της μολυσματικής PrPSc στον οργανισμό; Ποιοι ιστοί επηρεάζονται;

Όταν η πρόσληψη του μολυσματικού παράγοντα έχει γίνει δια στοματικής οδού, υπάρχουν αποδείξεις πως τόσο το Εντερικό Νευρικό Σύστημα (ΕΝΣ) όσο και το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ) συμμετέχουν στην παθογένεια της ασθένειας. Συγκεκριμένα, αρκετές περιπτώσεις ζώων τα οποία μολύνθηκαν πειραματικά και ελέγχθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές για τον μολυσματικό παράγοντα αλλά και το πως αυτός κατανέμεται στους ιστούς, ανέδειξαν ένα μοτίβο το οποίο περιλαμβάνει την εξάπλωση του προς τον εγκέφαλο αλλά και τον νωτιαίο μυελό μέσω των κινητήριων νευρώνων που περιβάλλουν τον εντερικό σωλήνα (McBride, 2001).

Το 2002 ο Lucien Van Keulen, διεξήγαγε μια μελέτη μέσω της οποίας κατάφερε να κάνει μια λεπτομερή καταγραφή της πορείας που ακολουθεί ο μολυσματικός παράγοντας στον οργανισμό. Κατέληξε πως η παθογένειας της Τρομάδους Νόσου χωρίζεται σε τρεις διακριτές φάσεις:

1. Μόλυνση λεμφοειδών ιστών της πεπτικής οδού
2. Διάδοσή του μολυσματικού παράγοντα σε άλλους λεμφοειδείς αδένες πέραν αυτών της πεπτικής οδού
3. Εισβολή του παράγοντα στο Νευρικό Σύστημα

Η τρίτη και τελική φάση είναι γνωστή και ως νευρο-εισβολή και σηματοδοτεί την είσοδο και την πορεία του μολυσματικού παράγοντα στο νευρικό σύστημα, όπου και συσσωρεύεται υπό την μορφή ινιδίων. Στο στάδιο αυτό η PrP^{Sc} εξαπλώνεται με αφετηρία τις απολήξεις των παρασυμπαθητικών και συμπαθητικών κινητήριων νευρώνων που νευρώνουν το έντερο, φθάνοντας τελικά σε μια περιοχή στον προμήκη μύελο του εγκεφάλου, αλλά και στο θωρακικό τμήμα του νωτιαίου μυελού αντίστοιχα. Από εκεί η συσσώρευση και εξάπλωση θα συνεχίσει σε άλλες περιοχές του ΚΝΣ (Van Keulen et al, 2002).



Εικ. 2 Απεικόνιση της πορείας εξάπλωσης του μολυσματικού παράγοντα στο ΚΝΣ (Van Keulen L.J. et al, Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep, 2002).

Τα γεγονότα αυτά λαμβάνουν χώρα κατά της διάρκειας της περιόδου επώασης της νόσου και διαρκούν μέχρι το μέγιστο επίπεδο συσσώρευσης της PrPSc στο ΚΝΣ και τον εγκέφαλο. Το επόμενο στάδιο αποτελεί και την κλινική φάση η οποία χαρακτηρίζεται από εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας. Η μετάβαση όμως από την φάση επώασης/συσσώρευσης στην κλινική φάση, φαίνεται πως δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση της μολυσματικής PrPSc αλλά από τη συγκέντρωση της ενδογενούς PrPC (Sandberg, 2011).

3. ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ PrP ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΤΗΣ ΤΡΟΜΩΔΟΥΣ ΝΟΣΟΥ

Το πιο καθοριστικό σημείο για τη βαθύτερη κατανόηση της ασθένειας ήταν η ανάδειξη της σχέσης μεταξύ του μολυσματικού παράγοντα της PrPSc και της ενδογενούς πρωτεΐνης PrPC. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε τη βάση για να απαντηθούν σημαντικά ερωτήματα σχετικά με τον μηχανισμό της νόσου, τα κυριότερα εκ των οποίων αφορούν τη στόχευση του ΚΝΣ, την συσσώρευση της πρωτεΐνης, τα συμπτώματα, τον φραγμό μεταξύ των ειδών αλλά και την πιθανότητα γενετικής συνιστώσας στην εκδήλωση της ασθένειας. Στην πραγματικότητα η έρευνα έχει προχωρήσει σε τέτοιο σημείο που πλέον οι ερευνητές εξετάζουν ακόμα και πιθανές προσεγγίσεις για την θεραπεία της, κάτι που μέχρι πρότινος δεν αποτελούσε εφικτό στόχο.

3.1 Φυσιολογικός ρόλος της PrPC

Η κυτταρική prion είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία εκφράζεται σε μια ποικιλία διαφορετικών οργάνων και ιστών, παρουσιάζοντας υψηλά επίπεδα έκφρασης στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Παράγεται από το γονίδιο PRNP του οποίου η έκφραση ξεκινάει κατά την εμβρυογένεση, φθάνοντας στο μέγιστο επίπεδο έκφρασής του κατά την ενηλικίωση. Σε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένα ποντίκια στα οποία είχε αφαιρεθεί το γονίδιο PRNP, τα πειραματόζωα αυτά δεν

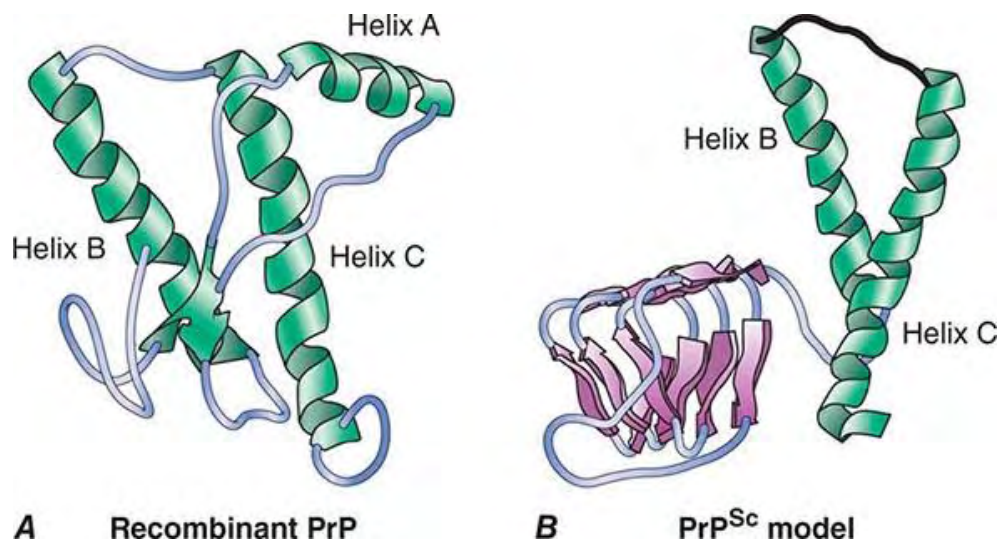
παρουσίασαν ανωμαλίες κατά την ανάπτυξη (Bueler, 1993). Αυτά τα δεδομένα αποκλείουν την πιθανότητα η πρωτεΐνη να έχει κάποια φυσιολογική λειτουργία η οποία να είναι ζωτικής σημασίας, ή ακόμα και αν έχει, τότε αντισταθμίζεται μέσω κάποιου άλλου μηχανισμού. Παρ' όλα αυτά η PrPC αποτελεί μια υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη των θηλαστικών, κάτι το οποίο υποδηλώνει πως τα πλεονεκτήματα που παρέχει η παρουσία της στον οργανισμό είναι αρκετά σημαντικά ώστε να αποτρέπουν την εξελικτική της εξάλειψη παρά την αποδεδειγμένη συμμετοχή στην εκδήλωση της Τρομάδους Νόσου (Wulf M.A, 2017). Οι κύριες λειτουργίες με τις οποίες έχει συνδεθεί η PrPC, είναι η συναπτική πλαστικότητα όπως και η αύξηση της συναπτικής αγωγιμότητας (γνωστή και ως μακροχρόνια ενδυνάμωση), οι οποίες συμβάλουν στον σχηματισμό συνάψεων, κυρίως στην περιοχή του ιππόκαμπου και κατ' επέκταση συμβάλλουν στις λειτουργίες της μάθησης και της μνήμης (Brown D.R, 2001). Παράλληλα η PrPC φαίνεται ότι είναι ικανή να εκπέμπει νευροπροστατευτικά σήματα (Chiarini L.B, 2002). Άλλες λειτουργίες στις οποίες φαίνεται πως έχει συμμετοχή είναι η ρύθμιση του κερκάδιου ρυθμού (Tobler 1, 1996) αλλά και η συμμετοχή στη ρύθμιση της κινητικής συμπεριφοράς των ατόμων (Bruno Lobao-Soares, 2007).

3.2 Δομή της PrPC και η σχέση της με τον μολυσματικό παράγοντα

Η μετάφραση του mRNA του γονιδίου PRNP οδηγεί στην σύνθεση μιας πρωτεΐνης με μήκος 253 αμινοξέων και μοριακό βάρος 32-35kDa, η οποία οδηγείται στο εσωτερικό του Ενδοπλασματικού Δικτύου (ΕΔ), όπου μετά από επεξεργασία αναδιπλώνεται σχηματίζοντας ένα σφαιρικό καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal) και μια εύκαμπτη, ευμετάβλητη αμινοτελική ουρά (N-terminal). Η καρβοξυτελική περιοχή αποτελείται από 3 α-έλικες, ένα β-πτυχωτό φύλλο και μια σηματοδοτική αλληλουχία για την καθήλωση της πρωτεΐνης στην μεμβράνη, ενώ η αμινοτελική ουρά περιλαμβάνει μια υδρόφοβη περιοχή και μια περιοχή 8 επαναλήψεων μιας αμινοξικής αλληλουχίας. (Atkinson J.C, 2015).

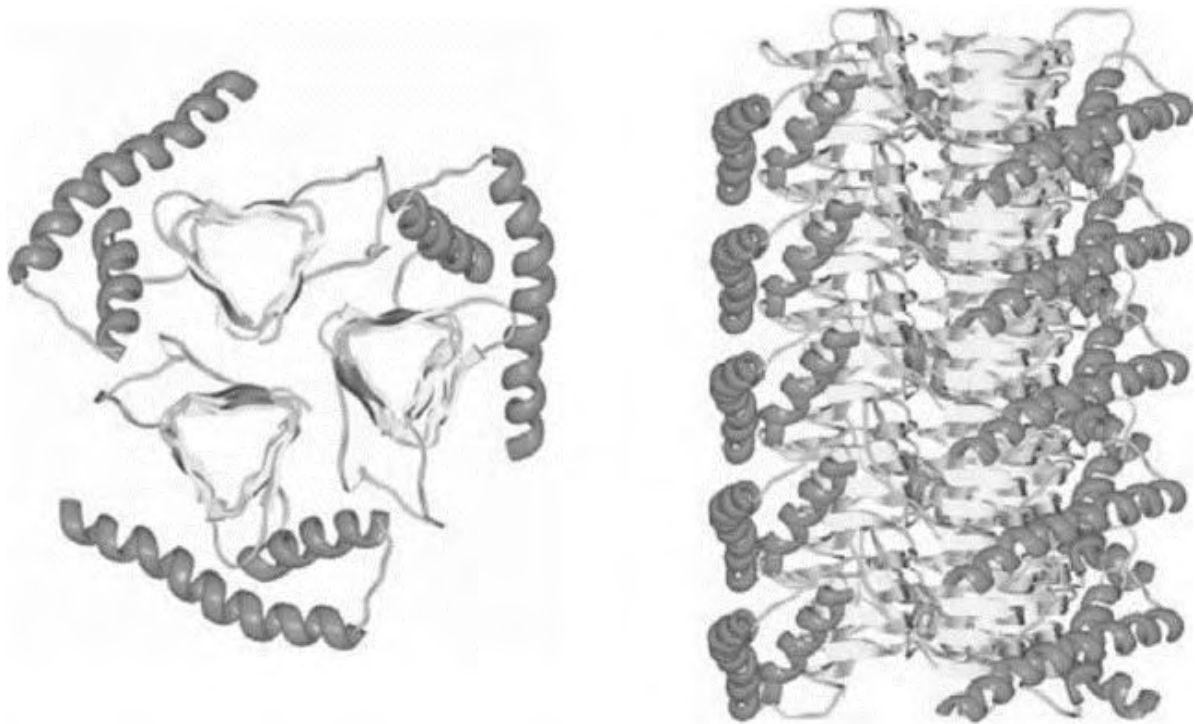
Η δομική ανάλυση έδειξε πως η μολυσματική PrP^{Sc} δε διαφέρει στην πρωτοταγή της δομή από αυτήν της ενδογενούς PrPC. Αυτό συμβαίνει διότι ο ίδιος ο αιτιολογικός παράγοντας της Τρομάδους Νόσου, η PrP^{Sc}, αποτελεί παράγωγο της

PrPC το οποίο προκύπτει μετά από μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Οι αλλαγές εντοπίζονται κυρίως στην ευμετάβλητη αμινοτελική περιοχή του μορίου, το μεγαλύτερο μέρος της οποίας λαμβάνει διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου. Επιπλέον, διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου λαμβάνει και η α-έλικα της καρβοξυτελικής περιοχής. Το αποτέλεσμα είναι υψηλότερη περιεκτικότητα του μορίου της PrP^{Sc} σε β-πτυχωτές περιοχές (43%) σε σχέση με την ενδογενή πρωτεΐνη (3%), αλλά και ένα μικρότερο ποσοστό α-ελίκων αντίστοιχα (30% από 42%). Οι αλλαγές αυτές στη διαμόρφωση του μορίου συνοδεύονται και από αλλαγές στις βιοχημικές και φυσικοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης. (Atkinson J.C, 2015).



Εικ. 3 Τρισδιάστατη απεικόνιση των PrPC (A) και PrP^{Sc} (B) (Brown Jr. R.H, Amyotrophic lateral Sclerosis and other Motor Neuron Diseases, 2015).

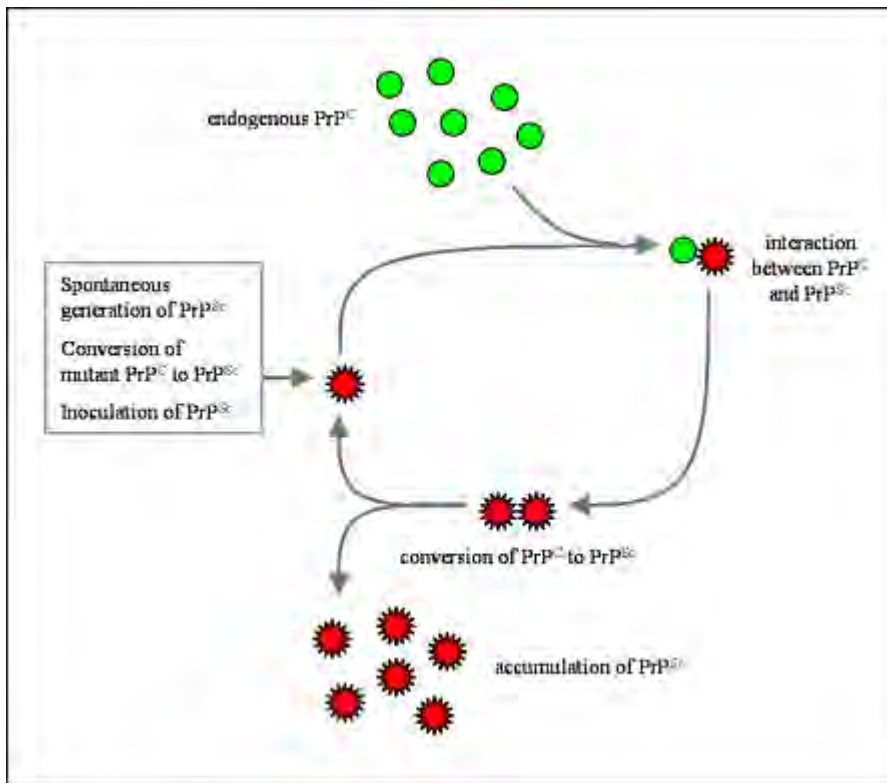
Η υψηλή περιεκτικότητα των μορίων της PrP^{Sc} σε β-πτυχωτές επιφάνειες, είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ικανότητά τους να συσσωρεύονται υπό την μορφή ινιδίων, γνωστών και ως ράβδοι prion (L. Kupfer και συν 2009). Παρά την γνώση που διαθέτουμε περί των δομικών αλλαγών που υφίσταται, η τελική διαμόρφωση που λαμβάνει το μονομερές της PrP^{Sc} στο χώρο δεν έχει καθοριστεί. Έως και σήμερα διάφορα προσεγγιστικά μοντέλα έχουν καταφέρει μόνο να αποτυπώσουν τη διαμόρφωση που λαμβάνουν τα μόρια της PrP^{Sc} κατά την φάση σύνδεσης τους, όταν αυτά αλληλεπιδρούν για τον σχηματισμό oligομερών και τελικώς ινιδίων, καθότι αυτή είναι και η μορφή υπό την οποία συνήθως απομονώνονται.



Εικ. 4 Μοντέλο τρισδιάστατης δομής της PrPSc: Οι β-πτυχωτές επιφάνειες αναδιπλώνονται σε β-έλικες. Τρία μόρια β-ελίκων αλληλοεπιδρούν δίνοντας τη βασική μονάδα (αριστερά) για το σχηματισμό των PrPSc-ινιδίων (δεξιά). (Govaerts C. Et al, 2004)

3.3 Περιγραφή του μηχανισμού μετατροπής της PrPC σε PrPSc

Η διαδικασία μετατροπής της κυτταρικής PrPC στη μολυσματική ισόμορφή της πυροδοτείται από την παρουσία του ίδιου του μολυσματικού μορίου PrPSc, το οποίο συνδέεται με την κυτταρική πρωτεΐνη σε ένα σύμπλοκο και λειτουργεί ως εκμαγείο-πρότυπο για την μετατροπή της (Pan K., Baldwin M., 1993). Μετά την επεξεργασία και την μετατροπή της, το σύμπλοκο αποτελούμενο πλέον από δύο μόρια PrPSc, λειτουργεί εκ νέου ως εκμαγείο για τα επόμενα μόρια PrPC, δημιουργώντας έτσι έναν καταρράκτη αντιδράσεων μετατροπής, οδηγώντας στην εξάπλωση και τη συσσώρευση της μολυσματικής PrPSc υπό την μορφή ινιδίων καθ'όλο το μήκος του ΚΝΣ όπου και εντοπίζονται οι ενδογενείς PrP πρωτεΐνες.



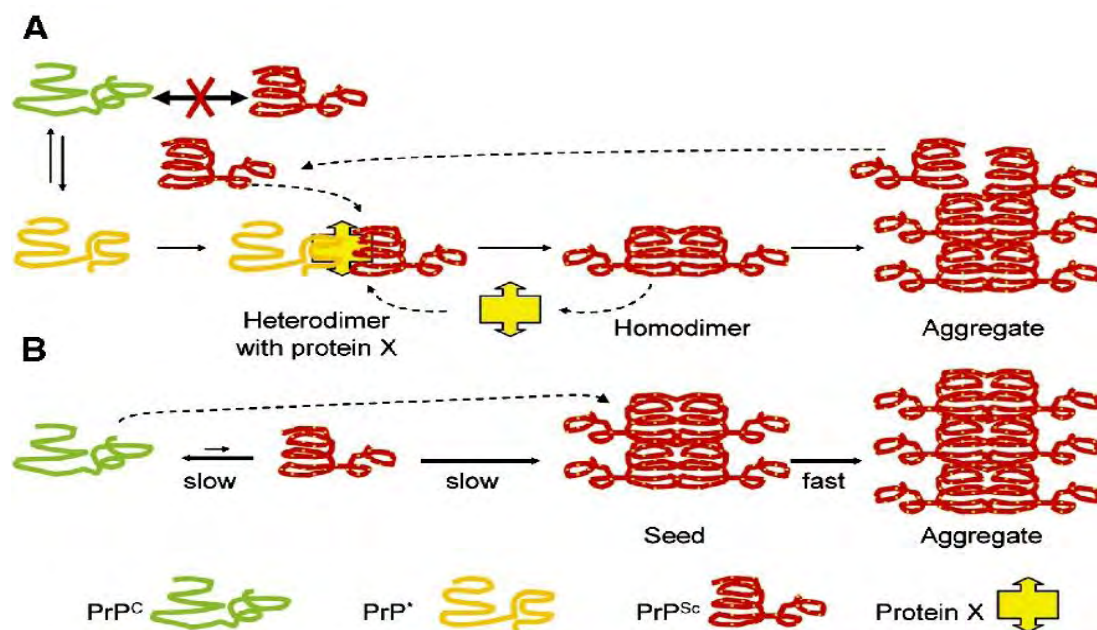
Εικ. 5 Βασικό μοντέλο μηχανισμού μετατροπής και εξάπλωσης της PrPSc (new wolrd encyclopedia, Article: Prions).

Η διαδικασία αυτή μπορεί να πυροδοτηθεί το ίδιο αποτελεσματικά ανεξάρτητα από την προέλευση της μολυσματικής PrPSc. Εκτός από την περίπτωση διαμόλυνσης από το περιβάλλον, η PrPSc είναι επίσης πιθανό να προέρχεται από αυθόρμητη μετατροπή της ενδογενούς πρωτεΐνης PrPC ή μέσω μετάλλαξης του γονιδίου σε τέτοια σημεία ώστε το πρωτεϊνικό παράγωγο να προδιαθέτει δομικά για την μετατροπή της στο γνωστό μολυσματικό παράγοντα. Μάλιστα αποδείχθηκε πως τελικά η προέλευση της Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών (Μεγάλη Βρετανία, 1985-1986) ήταν και αποτέλεσμα εξάπλωσης από βοοειδή που παρουσίασαν αυτόματα ΣΕΒ (McKintosh et al, 2003).

3.4 Αλληλεπίδραση PrPSc – PrPC και η σπουδαιότητα της για τον μηχανισμό της ασθένειας

Παρά το ότι ο μηχανισμός των ασθενειών prion εκ πρώτης όψεως δείχνει απλός στο σύνολο του, υπάρχουν επιμέρους σημεία τα οποία είναι κομβικά και καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την επιτυχία του και κατ' επέκταση την εκδήλωση της ασθένειας.

Στην πραγματικότητα, η αλληλεπίδραση μεταξύ PrP^{Sc} και PrP^C πραγματοποιείται παρουσία της Protein X, η οποία αποτελεί έναν ειδοειδικό συμπαράγοντα, άκρως απαραίτητο για την μετατροπή της PrP^C σε PrP^{Sc} (Telling G, 1994). Ο συμπαράγοντας αυτός προσδένεται σε μια περιοχή πρόσδεσης στο καρβοξυτελικό άκρο της κυτταρικής PrP, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που προηγείται της αλληλεπίδρασης PrP^{Sc}-PrP^C, το PrP^C/Protein X. Το σύμπλοκο αυτό πιθανόν έχει κάποια φυσιολογική σημασία για τον οργανισμό η οποία δεν έχει καθοριστεί έως σήμερα. Η αλληλεπίδραση της κυτταρικής prion με την Protein X, την υποχρεώνει να υιοθετήσει μια δομικά λιγότερο σταθερή διαμόρφωση. Αυτό καθιστά την PrP^C πιο επιδεκτική σε δομικές αλλαγές καθώς μειώνεται η ενέργεια που απαιτείται για τις αλλαγές αυτές. Το γεγονός αυτό ευνοεί ενεργειακά την μετατροπή της στη μολυσματική της ισομορφή. Στη συνέχεια η PrP^{Sc} αλληλοεπιδρά με την PrP^C για τον σχηματισμό ενός τριμερούς συμπλόκου PrP^{Sc} – PrP^C – Protein X το οποίο λειτουργεί ως εκμαγείο για τη μετατροπή του μορίου της PrP^C. Το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης θα δώσει PrP^{Sc}-PrP^{Sc} με ανακύκλωση της Protein X για την χρήση της στην μετατροπή επιπλέον μορίων πρωτεΐνης (Kaneko K. 1997). Αυτή η πιο λεπτομερής γνώση της διαδικασίας επέτρεψε στους ερευνητές να εστιάσουν στις παραμέτρους που πρέπει να πληρούνται σε κάθε περίπτωση:



Εικ.6. Α. Σχηματισμός ενδιάμεσης χαμηλής ενέργειας διαμόρφωση (κίτρινο) κατά την σύνδεση της με την Protein X ευνοεί την μετατροπή. Β. Επιτάχυνση της διαδικασίας μετά τον σχηματισμό μιας αρχικής ποσότητας PrP^{Sc} και συγκρότηση της στα αρχικά τμημάτων των ινιδίων, τα οποία αναφέρονται ως σπόροι (seeds). (WQ Zou, P. Gambetti 2005).

1. Η πρώτη παράμετρος η οποία θα πρέπει να πληρείται είναι δυνατότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ των τριών αυτών πρωτεϊνών έτσι ώστε να είναι εφικτός ο σχηματισμός του τριμερούς συμπλόκου. Αυτό προϋποθέτει αρχικά τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης protein X – PrPC, καθώς η Protein X παρουσιάζει προτίμηση στην PrPC του είδους στο οποίο ανήκει (μη-συμβατότητα έχει επιτευχθεί μόνο πειραματικά σε συγκεκριμένες περιπτώσεις διαγονιδιακών ζώων). Σημαντικότερη όμως είναι η σύνδεση μεταξύ PrPC – PrP^{Sc}. Όταν οι δύο ισομορφές της πρωτεΐνης prion παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές στην πρωτοταγή δομή τους η σύνδεσή τους είναι ασθενής ή δεν πραγματοποιείται, με αποτέλεσμα να μην εξαπλωθεί ο μολυσματικός παράγοντας. Κάτι τέτοιο όμως είναι πιθανό όταν η μολυσματική ισομορφή που εισέρχεται σε έναν οργανισμό προέρχεται από μη-συγγενικά είδη τα οποία παρουσιάζουν και μεγάλες διαφορές στην περιοχή του γονιδίου και κατ' επέκταση στην πρωτεΐνη της PrP (Telling G. 1994). Αυτό το γεγονός αποτελεί και την εξήγηση του φαινομένου του Φραγμού μετάδοσης της ασθένειας μεταξύ των διαφορετικών ειδών.
2. Η δεύτερη παράμετρος προβλέπει πως ο μηχανισμός θα πρέπει να είναι ικανός να πραγματοποιεί διαδοχικούς κύκλους μετατροπής της πρωτεΐνης με ταυτόχρονη ανακύκλωση της Protein X μετά από κάθε κύκλο (Kaneko K., 1997). Ως απόρροια αυτής της παραμέτρου συμπεραίνουμε πως οποιαδήποτε κατάσταση παρεμποδίζει τις πρωτεΐνες της αντίδρασης να τεθούν διαθέσιμες για μια σειρά διαδοχικών κύκλων μετατροπής ή παρεμποδίζει την επαναληψιμότητα του κύκλου, είναι κατασταλτική για το μηχανισμό εξάπλωσης του μολυσματικού παράγοντα συντελώντας στη μη εκδήλωση της ασθένειας.

Η γνώση για το είδος των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται κατά τον μηχανισμό εξάπλωσης της πρωτεΐνης prion και των παραμέτρων που πρέπει να πληρούνται για την επιτυχία του μηχανισμού, οδήγησαν στον εντοπισμό σημείων παρεμβολής στη διαδικασία και τελικώς στην ανάπτυξη προσεγγιστικών μεθόδων για τη θεραπεία και την πρόληψη της ασθένειας.

3.5 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

A. Αντισώματα αντι-PrP

Μια από τις πιο γνωστές προσεγγίσεις που έχουν προταθεί είναι η χρήση ειδικών αντισωμάτων αντι-PrP. Οι περιοριστικές παράμετροι του μηχανισμού εξάπλωσης της PrP^{Sc} υποδεικνύουν πως μόρια με την ικανότητα εξειδικευμένης πρόσδεσης σε κάποιο εκ των 2 μορίων PrP που λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία, δηλαδή είτε του PrP^C είτε αυτό της μολυσματικής PrP^{Sc}, έχουν και την ικανότητα να διακόψουν τον πολλαπλασιασμό της PrP^{Sc} εμποδίζοντας ακριβώς την αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Βάσει αυτού πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία δοκιμάστηκαν τμήματα ανασυνδυασμένων αντισωμάτων για την ικανότητα τους να καταστέλλουν την εξάπλωση της prion πρωτεΐνης σε καλλιέργεια κυττάρων νευροβλαστώματος ποντικού μολυσμένου με PrP^{Sc} (Hachiya N. et al, 2003). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως αντισώματα με την ικανότητα να προσδένονται στην PrP^C της κυτταρικής μεμβράνης σταθεροποιούν τη δομή της και παρουσιάζουν καταστολή της PrP^{Sc} με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

B. Μοριακοί συνοδοί

Οι μοριακοί συνοδοί είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που εντοπίζονται σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα. Συνδέονται με ένα ευρύ φάσμα πεπτιδίων και κύριος ρόλος τους είναι η συμμετοχή τους στο μηχανισμό αναδίπλωσης νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών είτε στην ορθή επαναδίπλωση πρωτεϊνών μετά από συνθήκες που έχουν οδηγήσει στην αποδιάταξη τους, αποτρέποντας πιθανές αρνητικές συνέπειες για τις λειτουργίες και βιωσιμότητα του κυττάρου. Από στέλεχος του *S. cerevisiae* έχει απομονωθεί μοριακός συνοδός με ικανότητα όχι απλά να καθοδηγεί την αναδίπλωση των πρωτεϊνών αλλά και με ικανότητα αναστροφής της διαδικασίας. Πειράματα έδειξαν πως η δράση αυτού του μοριακού συνοδού είναι ATP-εξαρτώμενη και δεν παρουσιάζει κάποια εξειδίκευση *in vitro*, ενώ βρέθηκε ικανός να αναστρέψει την αναδίπλωση της πρωτεΐνης prion, παρά την υψηλή της περιεκτικότητα σε β-πτυχωτές επιφάνειες. Η χρήση του λοιπόν μπορεί μελλοντικά να αποτελέσει μια νέα

θεραπευτική προσέγγιση για την Scrapie και τις ΜΣΕ εφόσον όμως επιτευχθεί η προσθήκη εξειδίκευσης στη διαδικασία (Hachiya N et al, 2003).

Γ. Χημικοί συνοδοί

In vitro έκθεση κυττάρων νευροβλαστώματος ποντικού μολυσμένου με scrapie σε αντιδρώντα με την ικανότητα να σταθεροποιούν τις πρωτεΐνες στη φυσική τους διαμόρφωση (πολυαμίνες, φθαλοκυανίνες, παράγωγα πορφυρίνης) μείωσαν τον ρυθμό αλλά και την έκταση του σχηματισμού PrPSc, ενώ κάποιες από αυτές τις ουσίες έχουν δυνατότητα καθαρισμού του δείγματος από τις prion πρωτεΐνες (Penegyres P, 2013).

Παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει για την ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής θεραπείας έναντι της τρομώδους νόσου δεν έχουν καταφέρει να βρουν εφαρμογή *in vivo*. Η αντιμετώπιση λοιπόν της νόσου προς το παρόν περιορίζεται στην πρόληψή της μέσω της δημιουργίας γενετικά ανθεκτικών πληθυσμών ενάντια στην εκδήλωση της ασθένειας, κάτι το οποίο έχει καταστεί δυνατό μέσω του εντοπισμού πολυμορφισμών στο γονίδιο της PrPC οι οποίοι σχετίζονται με αντοχή ευαισθησία στην νόσο (Kaneko K. et al. 1997).

4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΗΣ PRP ΜΕ ΤΗΝ ΤΡΟΜΩΔΗ ΝΟΣΟ

Η αναγνώριση των πολυμορφισμών του γονιδίου της πρωτεΐνης PrP των προβάτων που συσχετίζονται με ευαισθησία και αντοχή έναντι της Τρομώδη νόσου ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Ο πρώτος πολυμορφισμός που έγινε γνωστός ήταν αυτός του κωδικονίου 171 για αντικατάσταση του αμινοξέως της Γλουταμίνης (Q) με Αργινίνη (R), ενώ ακολούθησε ο πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 136 για τα αμινοξέα Αλανίνη (A) και Βαλίνη (V). Η συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών και της ανθεκτικότητας προέκυψε όταν μετά από διαμόλυνση καλλιεργούμενων κυττάρων νευροβλαστώματος με μολυσματικό παράγοντα της scrapie, οι κυτταρικές σειρές που έφεραν τον πολυμορφισμό Q171R φάνηκε να παρουσιάζουν αντίσταση στην εξάπλωση της scrapie στα κύτταρα αυτά (Kaneko K.

et al. 1997). Λίγα χρόνια αργότερα, το 2002, μια νέα ομάδα επιστημόνων επαναλαμβάνοντας το πείραμα *in vivo* μέσω της δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών, παρατήρησε πως άτομα που έφεραν τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό μολύνονταν σπανιότερα και σε αρκετά χαμηλότερο ποσοστό από την ασθένεια της scrapie, επιβεβαιώνοντας έτσι πως η έκφραση του εναλλακτικού αλληλομόρφου της PrP που έφερε τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό στην θέση 171 παρουσίαζε αντίσταση στην εξάπλωση της μολυσματικής prion και στην εκδήλωση της νόσου (Perrier V., Kaneko K, 2002). Έκτοτε ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει πραγματοποιηθεί με σκοπό την ταυτοποίηση αντίστοιχων πολυμορφισμών αλλά και τον προσδιορισμό της συνεισφοράς τους στην εκδήλωση της Scrapie.

4.1 Εξήγηση της επίδρασης των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο

Η γνώση που έχουμε αποκτήσει για τον μηχανισμό της ασθένειας μας επέτρεψε να υποθέσουμε πως οι πολυμορφισμοί που έχουν βρεθεί έως σήμερα και έχουν κάποια επίδραση στην εκδήλωση της Τρομάδης νόσου, επηρεάζουν πιθανότατα τις αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιεί το μόριο της ενδογενούς πρωτεΐνης με άλλους παράγοντες που λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία. Η πιο ενδελεχής μελέτη τόσο του γονιδίου όσο και της πρωτεΐνης της PrP διαφορετικών οργανισμών σε μοριακό επίπεδο επέτρεψε την επιβεβαίωση αυτής της αρχικής υπόθεσης.

Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεί η έρευνα που διεξήχθη από τους Kaneko K., Scott M. et al. Ανέλυσαν την περίπτωση ενός πολυμορφισμού της HuPrP (Human PrP) στο κωδικόνιο 219, όπου το 12% του συνολικού πληθυσμού της Ιαπωνίας φέρει στη θέση αυτή το αμινοξύ Λυσίνη (Lys) έναντι Γλουταμίνης (Glu). Έως και το 1997 που πραγματοποιήθηκε η έρευνα τους, καμία από τις 50 περιπτώσεις ατόμων που είχαν διαγνωστεί με την ασθένεια Creutzfeldt-Jakob (CJD) στην Ιαπωνία δεν έφεραν αυτό αλληλόμορφο, το οποίο και θεωρήθηκε αρνητικό επικρατές αλληλόμορφο για την εμφάνιση της ασθένειας. Η εκτίμηση αυτή επιβεβαιώθηκε και από τις περιπτώσεις ετερόζυγων ατόμων ως προς το αλληλόμορφο K219 (Λυσίνη). Σε μοριακό επίπεδο αποκάλυψαν πως η PrPC που παράγεται από το αλληλόμορφο αυτό φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για την Protein X. Η πρόσδεση μάλιστα είναι τόσο ισχυρή, σε σημείο που να αποτρέπεται η μετατροπή του PrPC σε PrPSc παρά τον σχηματισμό του τριμερούς συμπλόκου (PrPSc-PrPC-Protein

X) ενώ ταυτόχρονα, λόγω της ισχυρής σύνδεσης της Protein X με το μόριο της PrPC αποτρέπεται η ανακύκλωση του συμπαραγόνα καθιστώντας τον μη διαθέσιμο για την αλληλεπίδραση του με επιπλέον μόρια της πρωτεΐνης prion. Αυτό συμβαίνει διότι η θέση 219 στην αμινοξική αλληλουχία της PrP βρίσκεται πολύ κοντά στην περιοχή σύνδεσης της Protein X, επηρεάζοντας πολύ πιθανόν τη διαμόρφωση της περιοχής πρόσδεσης και κατ' επέκταση τη συγγένεια σύνδεσης των δύο.

Μέσω ενός αντίστοιχου μοριακού μηχανισμού θεωρείται ότι ο πολυμορφισμός Q171R των προβάτων αποτρέπει τον σχηματισμό και την εξάπλωση της scrapie (K.Kaneko 1997). Δεν είναι τυχαίο πως οι 15 από τους 43 ευρεθέντες πολυμορφισμούς στα πρόβατα, συμπεριλαμβανομένων και των τριών σημαντικότερων πολυμορφισμών για τις θέσεις 136, 154 και 171, έχουν εντοπιστεί στην καρβοξυτελική περιοχή του μορίου, κοντά στην περιοχή πρόσδεσης της Protein X με την PrPC (Baylis M., Goldman W, 2004).

4.2 Σημαντικότεροι πολυμορφισμοί και γονότυποι που σχετίζονται με την Τρομώδη Νόσο

Οι πολυμορφισμοί οι οποίοι έχουν συσχετιστεί άμεσα με ευαισθησία ή ανθεκτικότητα ενάντια της TN των προβάτων εντοπίζονται όπως έχει αναφερθεί, στα κωδικόνια:

- 136 για τα αμινοξέα Αλανίνη (A) – Βαλίνη (V) ή πιο σπάνια Αλανίνη – Θρεονίνη (T)
- 154 για τα αμινοξέα Αργινίνη (R) – Ιστιδίνη (H)
- 171 για τα αμινοξέα Γλουταμίνη (Q) – Αργινίνη (R) ή Γλουταμίνη (Q) – Ιστιδίνη(H)

Οι πολυμορφισμοί αυτοί αυτοί δίνουν πέντε πιθανά αλληλόμορφα/απλοτύπους, τα ARQ, ARR, ARH, AHQ και VRQ, σε καθένα από τα οποία το κάθε γράμμα δηλώνει το αμινοξύ που βρίσκεται στη θέση 136, 154 και 171 αντίστοιχα. Από τα πέντε αυτά αλληλόμορφα που έχουν γνωστή συσχέτιση με την ασθένεια, μόνο το ARQ έχει εντοπιστεί σε όλες τις φυλές προβάτων που έχουν εξεταστεί έως και σήμερα, γι αυτό συχνά αναφερόμαστε σε αυτό, ως το αλληλόμορφο φυσικού τύπου. Κάθε ένας από αυτούς του απλότυπους έχει συσχετιστεί με έναν διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας ή

αντοχής για την ασθένεια (M. Baylis και W. Goldmann, 2004). Θεωρητικά, οι απλότυποι που προκύπτουν από αυτά τα πέντε αλληλόμορφα είναι αρκετοί, ωστόσο μόνο 15 από αυτούς απαντώνται στην φύση και σχετίζονται με την ευαισθησία στο νόσημα (Goldmann, 2008). Οι 15 αυτοί γονότυποι παραθέτονται στον πίνακα 1 ως ζεύγη γραμμάτων, τα οποία αντιπροσωπεύουν τα αμινοξέα καθενός από τα προαναφερθέντα κωδικόνια 136,154 και 171 στα δύο αλληλόμορφα. Έτσι για παράδειγμα, ο γονότυπος ο οποίος προέρχεται από το ζεύγος αλληλομόρφων ARR και AHQ αναφέρεται εδώ ως ARR/AHQ και αντίστοιχα το ίδιο συμβαίνει και με όλους τους υπόλοιπους γονοτύπους.

Πίνακας 1. Πίνακας των 15 γονοτύπων που απαντώνται συχνότερα στη φύση.

| | | |
|---------|---------|---------|
| ARR/ARR | ARQ/AHQ | ARR/VRQ |
| ARR/AHQ | AHQ/ARH | AHQ/VRQ |
| ARR/ARQ | ARH/ARH | ARQ/VRQ |
| ARR/ARH | ARQ/ARH | ARH/VRQ |
| AHQ/AHQ | ARQ/ARQ | VRQ/VRQ |

4.3 Γονότυποι της PrP και ευαισθησία στη Scrapie

Ο βαθμός ευαισθησίας ή αντοχής στην ασθένεια με τον οποίο συσχετίζεται κάθε ένας από τους γονοτύπους έχει γίνει προσπάθεια να προσδιοριστεί μέσω ενός μεγάλου αριθμού ερευνών πάνω σε διαφορετικούς πληθυσμούς προβάτων ανά την υφήλιο. Τα αποτελέσματα από αυτές τις έρευνες υποδεικνύουν πως κανένας από τους ως τώρα γνωστούς γονοτύπους ή απλότυπους δεν συσχετίζεται με «απόλυτη» αντοχή ή ευαισθησία. Πρακτικά αυτό σημαίνει πως αν εκθέσουμε ένα άτομο συγκεκριμένου γονοτύπου σε μολυσματικό παράγοντα της scrapie, δεν θα είμαστε σε θέση εξ αρχής να προβλέψουμε αν το άτομο αυτό θα εκδηλώσει ή όχι τη νόσο. Αυτό συμβαίνει διότι οι ίδιοι γονότυποι ή απλότυποι δεν εμφανίζουν το ίδιο βαθμό ευαισθησίας ή αντοχής μεταξύ διαφορετικών φυλών αλλά ή έναντι διαφορετικών στελεχών του μολυσματικού παράγοντα. Για παράδειγμα στα πρόβατα της φυλής Cheviot οι γονότυποι ARQ/ARQ και ARR/VRQ φαίνεται να παρουσιάζονται ως ανθεκτικοί έναντι στην scrapie. Για τα πρόβατα της φυλής Texel όμως του Ηνωμένου Βασιλείου

και οι δύο αυτοί γονότυποι χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητοι (Baylis M, Goldmann, 2002).

Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα για κάποιες περιπτώσεις γονοτύπων ή και μεμονωμένων πολυμορφισμών παρουσιάζουν συνέπεια μεταξύ των διαφορετικών ερευνών επιτρέποντας έτσι τον χαρακτηρισμό τους ως «ανθεκτικούς» ή «επιδεκτικούς». Χαρακτηριστικά, ο γονότυπος VRQ/VRQ σχετίζεται με τα υψηλότερα ποσοστά ευαισθησίας, παρά την μικρή συχνότητα εμφάνισης του στον γενικό πληθυσμό (Goldman 2005). Η ομοζυγωτία για Γλουταμίνη στη θέση 171 (QQ) θεωρείται επίσης ότι καθιστά τα πρόβατα ευαίσθητα στην Τρομώδη νόσο με επικρατή τρόπο, ανεξαρτήτως των πολυμορφισμών που την συνοδεύουν στις θέσεις 136 και 154 (Billinis Ch. et al. 2004, Weastaway D. et al. 1994).

Αντίθετα ο γονότυπος ο οποίος είχε χαρακτηριστεί ως αυτός που προσδίδει απόλυτη ανθεκτικότητα έναντι της TN των προβάτων είναι ο ARR/ARR (Hunter N, 1997). Τα τελευταία 30 χρόνια αυτό έχει αμφισβητηθεί ελάχιστα, καθώς παρά τον τεράστιο αριθμό ελέγχων που έχουν πραγματοποιηθεί στην Ευρώπη αυτό το χρονικό διάστημα, οι περιπτώσεις προβάτων με TN που αντιστοιχούσαν σε ARR/ARR γονότυπο ήταν μόνο δύο (Groschup M. et al. 2007). Τέτοιες περιπτώσεις γονοτύπων έχουν καθιερωθεί ως «ανθεκτικοί» ή «ευαίσθητοι» λόγω του ότι φαίνεται να συσχετίζονται με τον ίδιο βαθμό ανοχής ή ευαισθησίας ανεξαρτήτως φυλής.

4.4 Μελέτες γονοτύπων σε ελληνικές φυλές προβάτων

Οι μεγαλύτερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ελληνικά κοπάδια έως και σήμερα, συμπεριλάμβαναν κυρίως πρόβατα φυλών με μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον, όπως αυτές των φυλών Χίου και Καραγκούνικου, οι οποίες αποτελούν τις κύριες γαλακτοπαραγωγικές φυλές στην χώρα μας.

Οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν στις φυλές αυτές για το γονίδιο της πρωτεΐνης prion σχηματίζουν επτά διαφορετικούς απλοτύπους: VRQ, ARQ, AHQ, TRQ, ARK, ARR και ARH. Οι απλότυποι αυτοί με τη σειρά τους συνδυάζονται δίνοντας εννιά διαφορετικούς γονότυπους, δύο εκ των οποίων βρέθηκαν για πρώτη φορά και είναι εξαιρετικά σπάνιοι, ο ARQ/ARK και ο ARQ/TRQ. Ο μικρός αριθμός των δειγμάτων που έφεραν αυτούς τους γονοτύπους δεν επιτρέπει την εξαγωγή

συμπερασμάτων για την συνεισφορά τους στην εκδήλωση της νόσου. Τα αποτελέσματα του γονοτυπικού ελέγχου σε υγιή πρόβατα αλλά και πρόβατα που έφεραν την ασθένεια, συμφώνησαν με προηγούμενες έρευνες που είχαν γίνει σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες, ως προς τον βαθμό ευαισθησίας των απλοτύπων ARR/ARR και VRQ/VRQ, οι οποίοι συνδέθηκαν και στην περίπτωση των ελληνικών φυλών με τον υψηλότερο βαθμό ανθεκτικότητας και ευαισθησίας αντίστοιχα. Ο απλότυπος ARQ/ARQ ο οποίος απαντάται περίπου στο 50% του συνόλου των ζώων που ελέγχθηκαν, χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα υψηλό βαθμό ευαισθησίας, όπως συμβαίνει με όλες τις περιπτώσεις γονοτύπων με ομοζυγωτία για γλουταμίνη στη θέση 171. Χαρακτηριστικό της ευαισθησίας που επιδεικνύει η ομοζυγωτία για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, είναι το γεγονός πως την έφεραν όλες οι περιπτώσεις ασθενών ζώων που ελέγχθηκαν (Billinis Ch. et al. 2003).

Μια αντίστοιχη μελέτη γονοτύπων έγινε σε σπάνιες ελληνικές φυλές (Κάτσικα, Καλλαρύτικο κ.α), με βάση το γεγονός πως καμία από τις περιπτώσεις μολυσμένων ζώων με Τρομάδη νόσο που βρέθηκαν στον ελληνικό χώρο δεν ανήκε στις φυλές αυτές. Έτσι ήταν απαραίτητο να καθοριστεί αν η ανθεκτικότητα που επιδεικνύουν τα πρόβατα των φυλών αυτών οφείλεται σε κάποιον από τους ως τώρα γνωστούς ανθεκτικούς γονότυπους ή σε νέους. Η μελέτη αυτή ήταν ιδιαίτερα σημαντική καθώς ουσιαστικά επιβεβαίωσε τον κανόνα και τα όσα γνωρίζαμε ως τότε. Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 2 τα πρόβατα που ανήκουν στις σπάνιες ελληνικές φυλές δεν παρουσιάζουν κανέναν από τους ως τώρα γνωστούς «ευαίσθητους» γονότυπους. Οι γονότυποι που ανήκουν στις ομάδες 4-5 είναι οι πιο ευαίσθητοι από αυτούς που παραθέτονται. Τα άτομα που αντιστοιχήθηκαν σε αυτές τις ομάδες ήταν ελάχιστα, ενώ χαρακτηριστικό πως δεν βρέθηκε κανένα άτομο με γονότυπο VRQ/VRQ. Αντιθέτως πάνω από το 70% του συνόλου των ζώων που ελέγχθηκαν έφεραν κάποιον από τους γνωστούς «ανθεκτικούς» γονότυπους (Ekateriniadou et al. 2007)

Πίνακας 2. Σύγκριση των γονοτυπικών συχνοτήτων από 14 σπάνιες ελληνικές φυλές προβάτων της βόρειας και κεντρικής Ελλάδας, αλλά και κάποιων νησιών

| NSP type | Genotype | Northern Greece | | | | | | | Central Greece | | | | Islands | | |
|----------|----------|-----------------|------|------|------|------|------|-------|----------------|------|------|-------|---------|-------|------|
| | | THR | CMD | KAT | KOZ | FLO | SAR | KAR | KAL | ARG | PIL | CIL | KIM | SKO | ZAK |
| 1 | ARR/ARR | 12.5 | 10.8 | 25.6 | | 33.3 | | 8.35 | 19.0 | 9.7 | 21.9 | 5.15 | 40.0 | 10.5 | 9.1 |
| | Total | 12.5 | 10.8 | 25.6 | | 33.3 | | 8.35 | 19.0 | 9.7 | 21.9 | 5.15 | 40.0 | 10.5 | 9.1 |
| 2 | ARR/ARQ | 29.2 | 23.2 | 20.5 | 50.0 | | 34.6 | 50.0 | 50.0 | 25.8 | 40.6 | 43.6 | 46.6 | 15.8 | 50.0 |
| | ARR/ARH | | 1.5 | 23.1 | | | 3.4 | | 21.4 | 16.1 | | 17.9 | | | |
| | ARR/AHQ | 8.3 | 1.5 | 2.6 | | 6.7 | | 8.35 | | | | | 6.7 | 15.8 | 9.1 |
| 3 | Total | 37.5 | 26.2 | 46.2 | 50.0 | 6.7 | 38.0 | 58.35 | 71.4 | 41.9 | 40.6 | 61.5 | 53.3 | 31.6 | 59.1 |
| | ARQ/ARQ | 50.0 | 50.8 | 12.8 | 50.0 | 33.3 | 37.9 | 33.3 | 4.8 | 41.9 | 31.3 | 28.2 | | 5.3 | 27.3 |
| | ARQ/ARH | | 1.5 | 5.1 | | | 10.3 | | 4.8 | 6.5 | | 5.15 | | | |
| | ARQ/AHQ | | 9.2 | 5.1 | | 20.0 | 13.8 | | | | 6.2 | | | 21.05 | 4.5 |
| | AHQ/ARH | | | 2.6 | | | | | | | | | | | |
| 4 | Total | 50.0 | 63.0 | 28.2 | 50.0 | 53.3 | 62.0 | 33.3 | 9.6 | 48.4 | 37.5 | 33.35 | 6.7 | 47.4 | 31.8 |
| | ARR/VRQ | | | | | | 6.7 | | | | | | | | |
| | Total | | | | | 6.7 | | | | | | | | | |
| | AHQ/VRQ | | | | | | | | | | | | | 10.5 | |
| | Total | | | | | | | | | | | | | 10.5 | |

NSP National Scrapie Plan (UK), THR Thrace, CMD Chios mainland, KAT Katsika, KOZ Kozani, FLO Florina, SAR Sarakatsaniko, KAR Karamaniko, KAL Kalaritiko, ARG Argos, PIL Pilio, CIL Chios island, KIM Kimi, SKO Skopelos, ZAK Zakynthos

Πληροφορίες σαν αυτές που παραθέτονται στις ενότητες 4.2 και 4.3, οι οποίες προκύπτουν από το σύνολο των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί ως σήμερα, μας έχουν επιτρέψει να κατηγοριοποιήσουμε τους ως τώρα γνωστούς γονοτύπους σε ομάδες ευαισθησίας/αντοχής, κάθε μια εκ των οποίων χαρακτηρίζεται από διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας για την ασθένεια, και συνεπώς διαφορετική πιθανότητα για τα άτομα που ανήκουν σε αυτές να την εκδηλώσουν.

5. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΤΡΟΜΩΔΗ ΝΟΣΟ

Η κατηγοριοποίηση των γονοτύπων έγινε στα πλαίσια του National Scrapie Plan (NSP), ενός κυβερνητικού προγράμματος στην Μεγάλη Βρετανία το οποίο ξεκίνησε το 2001 και ενθαρρύνει την πραγματοποίηση επιλεκτικών διασταυρώσεων μεταξύ γενετικώς ανθεκτικών ζώων. Η κατηγοριοποίηση των γονοτύπων σε ομάδες ανθεκτικότητας/ευαισθησίας επέτρεψε την προσεκτική επιλογή των ζώων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τις διασταυρώσεις. Τελικός στόχος του προγράμματος είναι η πρόληψη και καταπολέμηση της scrapie μέσω της δημιουργίας ανθεκτικών πληθυσμών έναντι της ασθένειας.

Πίνακας 3. Ομάδες ευαισθησίας/αντοχής (Scrapie-Genetics test, The Lincoln University Gene-Laboratory, 2011).

| | | |
|--|--|---|
| ARR/ARR | Most resistant to scrapie. | 1 |
| ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ | Resistant to scrapie, but will need careful selection when used for further breeding. | 2 |
| ARQ/ARH ARQ/AHQ AHQ/AHQ ARH/ARH AHQ/ARH ARQ/ARQ | Have little resistance to scrapie. | 3 |
| ARR/VRQ AHQ/VRQ | Susceptible to scrapie and should not be used for breeding. Exceptions to this rule exist. | 4 |
| ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ | Highly susceptible to scrapie and should not be used for breeding. | 5 |

Το 2003 αποφασίστηκε να πραγματοποιηθούν ανάλογα προγράμματα επιλεκτικών διασταυρώσεων, με σκοπό την αύξηση της συχνότητας του ανθεκτικού απλοτύπου ARR, και στις υπόλοιπες χώρες μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Η στρατηγική των επιλεκτικών διασταυρώσεων όμως για να είναι αποδοτική, δεν απαιτεί μόνο τα ζώα να είναι φορείς ανθεκτικών γονοτύπων, αλλά να φέρουν επίσης και μια σειρά από άλλα επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως είναι τα χαρακτηριστικά εμπορικής σημασίας (ποιότητα κρέατος, γαλακτοπαραγωγή κ.α) αλλά και η ικανότητα προσαρμογής στις περιβαλλοντικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής εκτροφής (Λουκία Αικατερινιάδου και συν, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης). Αυτό συνεπάγεται πως για την επιτυχή εφαρμογή του προγράμματος της δημιουργίας ανθεκτικών κτηνοτροφικών μονάδων, είναι απαραίτητο να προηγηθεί μια εκτεταμένη έρευνα στους τοπικούς πληθυσμούς προβάτων κάθε περιοχής, με σκοπό τον εντοπισμό των φυλών που συνδυάζουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

5.1 Ελληνικές φυλές που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία

Πρόβατα φυλής Φρισάρτα

Η φυλή Φρισάρτα είναι μία σύνθετη φυλή που διαμορφώθηκε την περίοδο 1960-1980. Είναι αποτέλεσμα της διασταύρωσης του τοπικού πληθυσμού προβάτων με κριούς της Φριςλανδικής φυλής. Το γενεαλογικό βιβλίο της φυλής καθιερώθηκε το 1999. Η φυλή έχει σταθεροποιηθεί και προσαρμόζεται άριστα στις ζώνες της Άρτας και της Πρέβεζας διότι είναι ευαίσθητη στις υψηλές θερμοκρασίες. Τα ζώα είναι μεγάλου μεγέθους και βόσκουν όλο το έτος, ενώ παίρνουν συμπληρωματική διατροφή. Το βάρος κυμαίνεται από 65 έως 80 κιλά για τα θηλυκά και από 70 έως 120 χλγ. για τα αρσενικά. Το χρώμα είναι λευκό. Το κεφάλι, και στα δύο φύλα, είναι μεγάλο και χωρίς κέρατα και τα ζώα είναι παχύ-ουρα. Η εποχή τοκετού κυμαίνεται από το Σεπτέμβριο μέχρι το Μάρτιο. Το ποσοστό πολυδυμίας είναι περίπου 1,7. Η φυλή χρησιμοποιείται για γαλακτοπαραγωγή, κρέας και μαλλί. Το γάλα χρησιμεύει στην παραγωγή τυριού και το μαλλί είναι άριστης ποιότητας. Τα αρνιά απογαλακτίζονται σε ηλικία 2 μηνών με βάρος 13,5 χλγ. (Αγροτικός Κτηνοτροφικός Συνεταιρισμός Δυτικής Ελλάδας, 2011)

Πρόβατα φυλής Μπούτσικο

Η φυλή Μπούτσικο αντιπροσωπεύει τα 5/6 των προβάτων που εκτρέφονται στην Ήπειρο, αλλά συναντάται και σε όλους τους ορεινούς όγκους της Στερεάς Ελλάδας, της Θεσσαλίας και, μερικώς, της Δυτικής Μακεδονίας. Πρόκειται για μικρόσωμο πρόβατο με λευκό χρωματισμό, που φέρει καστανέρυθρες ή μαύρες κηλίδες στο κεφάλι και στα άκρα. Κέρατα φέρουν συνήθως τα κριάρια. Είναι πρόβατο πολύ ανθεκτικό και τέλεια προσαρμοσμένο σε εδάφη με φτωχή βλάστηση. Το σωματικό βάρος των κριαριών ανέρχεται σε 40-45 χλγ. και εκείνο των προβατινών σε 32-36 χλγ. Η γαλακτοπαραγωγή κυμαίνεται στα 80-110 χλγ. ανά αρμεχτική περίοδο. Ο δείκτης πολυδυμίας είναι 1,10 και τα αρνιά φθάνουν τα 9,10 χλγ. σε ηλικία 30 ημερών (Ζυγογιάννης, 1999)

5.2 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η πραγματοποίηση γονοτυπικού ελέγχου σε έναν αριθμό ατόμων που ανήκουν στις δύο προαναφερθείσες φυλές προβάτων για τον προσδιορισμό των επικρατέστερων γονοτύπων σε κάθε μία από αυτές, αλλά και τον υπολογισμό των σχετικών συχνοτήτων τους, έτσι ώστε μελλοντικά οι πληροφορίες αυτές να μας βοηθήσουν να καθορίσουμε ποιοι είναι οι κατάλληλοι χειρισμοί για την εκτροφή και επιλεκτική διασταύρωση προβάτων που ανήκουν σε αυτές τις φυλές.

ΜΕΡΟΣ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

6.1 Πηγές Απομόνωσης

Το DNA είναι απαραίτητη πρώτη ύλη για τα περισσότερα πειράματα μοριακής βιολογίας. Συνεπώς, η απομόνωση του σε «καθαρή» μορφή αποτελεί και βασική προϋπόθεση για την επιτυχία όλων των περαιτέρω εφαρμογών.

Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής απομόνωσης DNA καθορίζεται από αρκετές παραμέτρους όπως το αρχικό υλικό (π.χ. κύτταρα, ιστός, αίμα), το είδος (π.χ. χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό, ιικό κ.τ.λ) και την ποιότητα του DNA που θέλουμε να απομονώσουμε.

Στους ανθρώπους η πιο συνηθισμένη πηγή DNA είναι τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος, από τα οποία απομονώνεται εύκολα γενετικό υλικό υψηλής ποιότητας αλλά και συγκέντρωσης.

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

6.3 Διαδικασία απομόνωσης

- ♦ Μεταφορά 0,5 ml δείγματος αίματος σε eppendorf των 2 ml
- ♦ Προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X SSC (stock 20X SSC περιλαμβάνει 3M χλωριούχου νατρίου και 300mM κιτρικού νατρίου) και ανάδευση σε vortex
- ♦ Φυγοκέντρωση για 3 min στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- ♦ Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη διαλυμάτων: 0,6 ml οξικό νάτριο 0,2 M, 50 μl SDS 10%, 15 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10 mg/ml)
- ♦ Επώαση στους 55 °C υπό ανάδευση για περίπου 2 h
- ♦ Προσθήκη στο eppendorf 1ml φαινόλης και ανάδευση σε vortex
- ♦ Φυγοκέντρωση για 10 min στις 13,000 rpm στους 4 °C

- ♦ Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα eppendorf
- ♦ Προσθήκη 1 ml χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (24/1) και ανάδευση σε vortex
- ♦ Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- ♦ Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα eppendorf
- ♦ Προσθήκη 1ml ισοπροπανόλης και επώαση για 20 min στους -20 °C
- ♦ Φυγοκέντρηση για 20 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- ♦ Αφαίρεση του υπερκειμένου (το DNA έχει κατακρημνιστεί) και προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70% (Χρησιμοποιούμε αιθανόλη για τον διαχωρισμό από τα εναπομείναντα κυτταρικά συστατικά. Στην αιθανόλη το DNA ξετυλίγεται και καθιζάνει αφήνοντας πίσω τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά. Σχηματισμός ινιδίων)
- ♦ Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- ♦ Απόρριψη του υπερκειμένου και επώαση στους 50 °C ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη
- ♦ Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 100 μl ddH₂O και αποθήκευση του δείγματος DNA στους -20 °C.

7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

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

Διαδικασία ηλεκτροφόρησης:

- Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος των μορίων του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Μεγαλύτερη συγκέντρωση αγαρόζης συνεπάγεται και μεγάλη διακριτική ικανότητα, λόγω μικρότερων πόρων.

Χρησιμοποιήσαμε πήκτωμα συγκέντρωσης 1,5%, η οποία είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA μέχρι και 5 kb.

Για τη δημιουργία του πηκτώματος αναμιγνύεται αγαρόζη σε σκόνη (0.8 γρ) με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x (40 mM Tris-acetate και 1 mM EDTA με περίπου pH 8.3) 50ml και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Στο σημείο αυτό προσθέτουμε 5 μl βρωμιούχου αιθιδίου (1 μl ανά 10ml μίγματος) για την χρώση του πηκτώματος. Στην συνέχεια το μίγμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο προστίθενται εξαρτήματα που μοιάζουν με χτένες για τη δημιουργία μικρών βοθρίων υποδοχής του δείγματος (πηγαδάκια). Όταν κρυώσει η αγαρόζη δημιουργεί το πήκτωμα καθώς οι δεσμοί υδρογόνου συνδέουν τα μόρια της αγαρόζης. Στη συνέχεια τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε προσθήκη Loading buffer 6X (Bromophenol blue 0,1%w/v, TBE 1X, glycerol 8.7%, ddH₂O) όγκου 6 μl σε κάθε δείγμα ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση.

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

δειγμάτων. Αυτό είναι εφικτό λόγω της χρήσης του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο προσδένεται στο DNA.

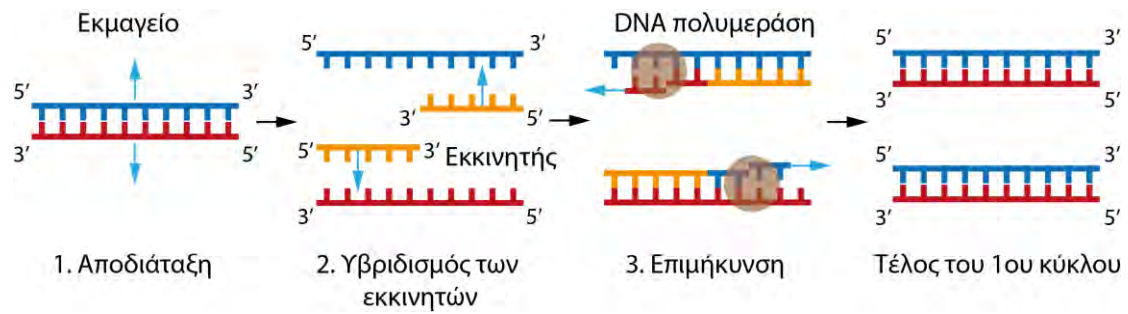
Η χρήση της ηλεκτροφόρησης μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε την ποσότητα του DNA που ομονώσαμε από κάθε δείγμα αλλά και να αξιολογήσουμε την ποιότητά του.

8. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ DNA ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction , PCR) είναι ίσως η ευρύτερη χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο.

Ανακαλύφθηκε το 1983 από το βιοχημικό Karry Mullis, που εργαζόταν σε μια εταιρεία βιοτεχνολογίας στην Καλιφόρνια. Για την ανακάλυψη αυτή τιμήθηκε 10 χρόνια αργότερα με το βραβείο Νόμπελ.

Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής PCR το επιθυμητό τμήμα DNA πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που μας επιτρέπει να το υποβάλλουμε σε περισσότερους χειρισμούς που μπορεί να είναι απαραίτητοι, όπως η ηλεκτροφόρηση , πέψη με ένζυμα περιορισμού, η αλληλούχιση κ.τ.λ.



Εικ.8 Απεικόνιση των σταδίων της PCR (Παπανικολάου Γ., Παλαιολόγου Δ., Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου, 2015)

Τα στάδια της PCR:

1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία $94^{\circ} - 95^{\circ} \text{C}$ για περίπου 30 sec. έως και ένα 1 min.
2. Υβριδισμός εκκινήτων: Με μείωση της θερμοκρασίας στους $55^{\circ} - 65^{\circ} \text{C}$ για περίπου 30sec έως 1 min οι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινήτες υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72°C , τη βέλτιστη θερμοκρασία της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινήτες εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλετίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται 25-35 φορές. Η PCR εκτελείται σε θερμικό κυκλοποιητή, συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες ταχύτατα και με ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την PCR φαίνονται στον πίνακα:

Πίνακας 4. Συστατικά της PCR

| Συστατικά Αντίδρασης | Ποσότητες |
|----------------------------|-------------|
| DNA εκμαγείο | 200ng |
| Ρυθμιστικό διαλ. 10X | 5μl |
| MgCl ₂ (50mM) | 2μl |
| dNTPs (10mM each) | 1μl |
| Εκκινητής FRW (50 pmol/ml) | 1μl |
| Εκκινητής RV (50 pmol/ml) | 1μl |
| Taq DNA πολυμεράση (5U/μl) | 0,2μl |
| ddH ₂ O | εώς τα 50μl |

Οι συνθήκες για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος:

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 4 min

Αποδιάταξη: 95° C για 40 sec

Υβριδοποίηση: 54° C για 40 sec 35 κύκλοι

Επιμήκυνση: 72° C για 40 sec

Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

Το τμήμα DNA που ενισχύσαμε ήταν τμήμα του εξωνίου 3 του γονιδίου PrP του προβάτου, μήκους περίπου 200 bp, το οποίο περιλαμβάνει τα 3 κωδικόνια (136, 154, 171) τα οποία έχουν συσχετιστεί με τη ευαισθησία ή την ανθεκτικότητα στην τρομώδη νόσο. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν:

Ovis-PRP3.FW: TGCAGCTGGAGCAGTGGTAG

Ovis-PRP3.RV: TGTGATGTTGACACAGTCATGC

9. ΑΝΑΛΥΣΗ SSCP

Η SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism) είναι μια ευρέως χρησιμοποιημένη μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων και γενετικών πολυμορφισμών, αρκετά ευαίσθητη ώστε να επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλάξεων σε επίπεδο νουκλεοτιδίου (SNPs : Single Nucleotide Polymorphisms). Η διαδικασία βασίζεται στο γεγονός πως κάθε μονόκλωνη αλυσίδα λαμβάνει μια συγκεκριμένη διαμόρφωση στο χώρο. Αλλαγές στην πρωτοταγή δομή, ακόμα και σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο θα προκαλέσουν αλλαγές και στη διαμόρφωση του μορίου, το οποίο κατ'επέκταση θα παρουσιάζει και διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση του σε ένα πήκτωμα ακρυλαμίδης. Συνεπώς μόρια με διαφορές στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία θα παρουσιάζουν και διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων μετά από ηλεκτροφόρηση.

Βήματα για την εκτέλεση της διαδικασίας:

1. Παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμίδης:

Για την παρασκευή ενός πηκτώματος με πολυακρυλαμίδης 12% χρειάστηκαν:

- ♦ 7.3 g Ακρυλαμίδη
- ♦ 0.2 g Bis-Ακρυλαμίδη (N,N'-Methylenebisacrylamide)
- ♦ 6 ml Γλυκερόλη 50%
- ♦ 3.2 ml TBE 10x (σύσταση: 89 mM Tris, 89 mM βορικά οξύ, 2 mM EDTA, pH ~8.3)

Το διάλυμα αυτό αναδεύεται και διηθείται, ενώ στην συνέχεια γίνεται προσθήκη νερού έως ο τελικός όγκος να φθάσει 60ml.

Στο διάλυμα προσθέτονται στην συνέχεια:

- ♦ 65 µl TEMED (Tetramethylethylenediamine)
- ♦ 400 µl APS 20% (Ammonium persulfate)

Το διάλυμα αναδεύεται εκ νέου προτού τοποθετηθεί σε κατάλληλο καλούπι

2. Προετοιμασία δειγμάτων:

Σε ένα eppendorf τοποθετήθηκαν:

- ♦ 6 μl προϊόντος PCR
- ♦ 10 μl Loading Buffer

Η αποδιάταξη των δειγμάτων έγινε σε μηχάνημα PCR (θερμικός κυκλοποιητής). Αμέσως μετά το πέρας της αποδιάταξης τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο ώστε να αποφευχθεί η αποδιάταξη των δύο κλώνων.

3. Ηλεκτροφόρηση:

Τα δείγματα φορτώθηκαν στα πηγαδάκια του πηκτώματος, ενώ συμπληρώθηκε επαρκής όγκος ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0.5x στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 20h.

4. Χρωματισμός πηκτώματος Πολυακρυλαμίδης μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης:

- ♦ Προσεκτική αφαίρεση του πηκτώματος από τη συσκευή και μεταφορά του σε μεμβράνη. Η μεμβράνη αυτή τοποθετείται σε κατάλληλο σκεύος και το σκεύος σε μηχάνημα ανάδευσης.
- ♦ Το πρώτο διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι διάλυμα οξικού οξέος: 400 ml νερού + 1ml οξικού για την πραγματοποίηση δύο διαδοχικών πλύσεων με αυτό (200ml x 2) διάρκειας 3 min η κάθε μία.
- ♦ Πλύση με διάλυμα AgNO₃ 200ml για 10min. Το διάλυμα παρασκευάστηκε με προσθήκη 1ml AgNO₃ σε 1L νερό.
- ♦ 2 πλύσεις με νερό

- ♦ Το τελευταίο διάλυμα που παρασκευάστηκε περιείχε: 3g NaOH, 0.01 g NaBH₄, 1 ml φορμαλδεΐδης και 200 ml H₂O. Μετά την προσθήκη αυτού του διαλύματος το πήκτωμα επώαστηκε υπό ανάδευση αρκετή ώρα ώστε να εμφανιστούν καθαρά τα πρότυπα των ζωνώσεων
- ♦ Μια τελευταία πλύση με νερό και αφαίρεση από το μηχάνημα ανάδευσης.

10. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Μετά την ηλεκτροφόρηση όλων των δειγμάτων με την μέθοδο SSCP, πραγματοποιήσαμε ομαδοποίηση των δειγμάτων βάσει των προτύπων ζώνωσης που εμφάνισαν και ένα δείγμα από κάθε ομάδα επιλέχθηκε για να σταλεί για αλληλούχιση σε εξωτερικό εργαστήριο.

Τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen) ώστε να απομακρυνθούν εκκινητές, διαλύματα, Ταq πολυμεράση κτλ, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την αλληλουχία.

Η τεχνική της αλληλούχισης σήμερα βασίζεται σε μια παραλλαγή της μεθόδου Sanger. Η αλληλούχιση γίνεται σε μια αντίδραση, όπου κάθε ένα από τα τέσσερα ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ή ddTTP) σημαίνεται με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική, οπότε και εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Έτσι με τη χρήση ενός ανιχνευτή laser, καταγράφεται ο φθορισμός και τελικά λαμβάνεται η αλληλουχία, με τη μορφή χρωματογραφήματος.

Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων της αλληλούχισης πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Η αλληλούχιση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια οι δυο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαράτιθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (Thompson et al, 1997) (ClustalX) για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή.

ΜΕΡΟΣ 3^ο

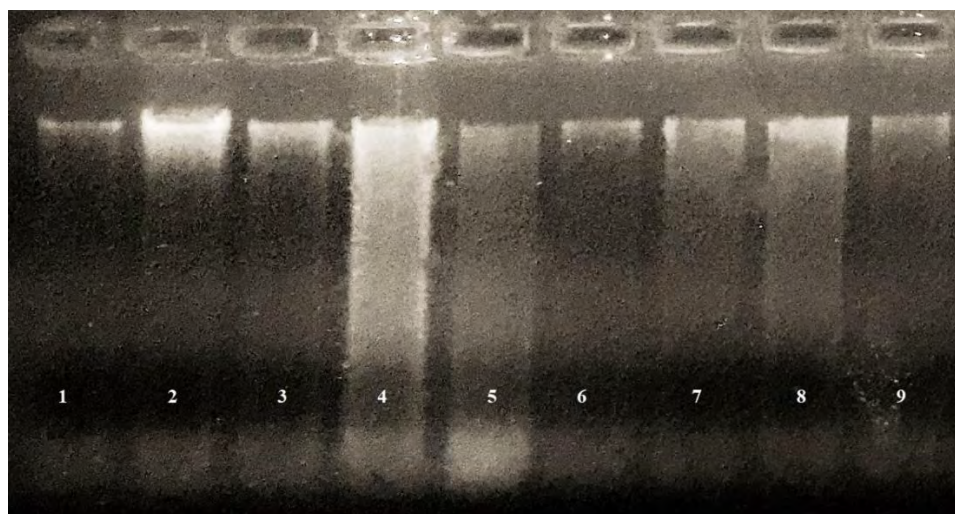
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

11.1 Απομόνωση DNA από δείγματα αίματος προβάτων

Η απομόνωση έγινε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο απομόνωσης που περιγράφεται στην ενότητα 6.3. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 100 δείγματα αίματος υγείων προβάτων ως προς την Τρομώδη νόσο (50 από κάθε φυλή). Η επιτυχία της διαδικασίας ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 1,5% (w/v). Η επιλογή της συγκεκριμένης πυκνότητας για το πήκτωμα, οφείλεται στο γεγονός πως δείγματα DNA από απομόνωση περιέχουν μεγάλο μοριακού βάρους μόρια DNA. Συνεπώς πήκτωμα μεγάλης πυκνότητας ίσως παρεμπόδιζε τους.

Η απεικόνιση των δειγμάτων μέσω της ηλεκτροφόρησης τους, μας επέτρεψε να προσδιορίσουμε τόσο την ποσότητα όσο και την ποιότητα του DNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα αίματος, δίνοντας μας την δυνατότητα να αξιολογήσουμε ποια από τα αρχικά δείγματα μπορούσαν να υποβληθούν σε περαιτέρω χειρισμούς.

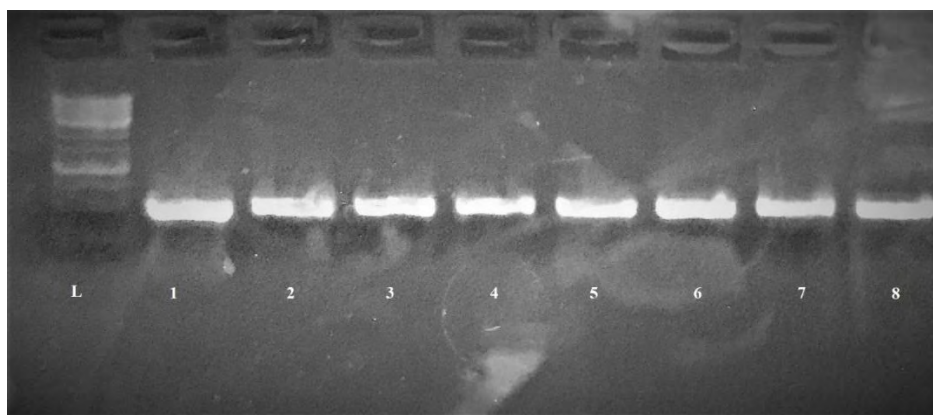


Εικ 8 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης 9 δειγμάτων γονιδιωματικού DNA που απομονώθηκε από αίμα προβάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%(w/v).

11.2 Ενίσχυση τμήματος DNA με PCR

Τα δείγματα DNA που επιλέχθηκαν ως κατάλληλα για περαιτέρω χειρισμούς υποβλήθηκαν στην συνέχεια σε PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, στοχεύουν και ενισχύουν ένα τμήμα του εξωνίου 3 του γονιδίου της πρωτεΐνης PrP (PRNP), το οποίο περιλαμβάνει τα κωδικόνια 136, 154 και 171.

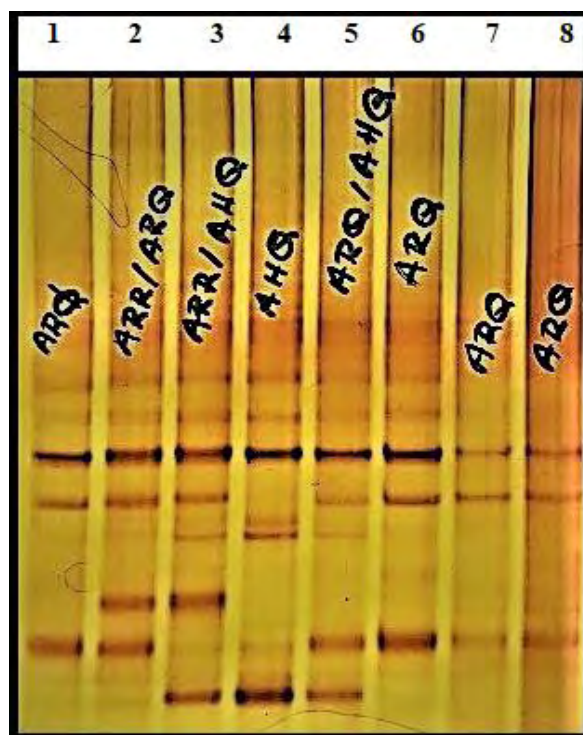
Η επιτυχία της διαδικασίας επαληθεύτηκε μέσω ηλεκτροφόρησης των προϊόντων σε πήκτωμα αгарόζης. Η πυκνότητα του πηκτώματος ήταν 2% (w/v), καθώς τα προϊόντα PCR είναι τμήματα DNA μήκους περίπου 200 bp. Για να αξιολογηθεί το μήκος των προϊόντων, χρησιμοποιήθηκε Ladder (L), δηλαδή μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους.



Εικ.9 Απεικόνιση των προϊόντων PCR που ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

11.3 Ανάλυση SSCP

Μετά την ενίσχυση του εξονίου 3 που φέρει τα τρία κωδικόνια 136, 154 και 171 με PCR, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση SSCP σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε στην ενότητα 9. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (12%) έγινε στα 220V για περίπου 22h.



Εικ.10 Ανάλυση SSCP. Τα δείγματα στα οποία αναγράφεται μόνο ένα αλληλόμορφο είναι ομόζυγα.

Άτομα διαφορετικού γονοτύπου παρουσιάζουν και διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, επιτρέποντας έτσι την αναγνώριση δειγμάτων με όμοιο και διαφορετικό γονότυπο. Στην εικόνα 10 για παράδειγμα, όπου παρουσιάζεται μια από τις αρκετές αναλύσεις SSCP που πραγματοποιήσαμε κατά την διάρκεια της μελέτης αυτής, φαίνεται χαρακτηριστικά πως τα δείγματα 1, 6, 7 και 8 παρουσιάζουν ίδιο πρότυπο ζώνωσεων και συνεπώς μπορούν να ομαδοποιηθούν, βάσει αυτού του κοινού πρότυπού τους.

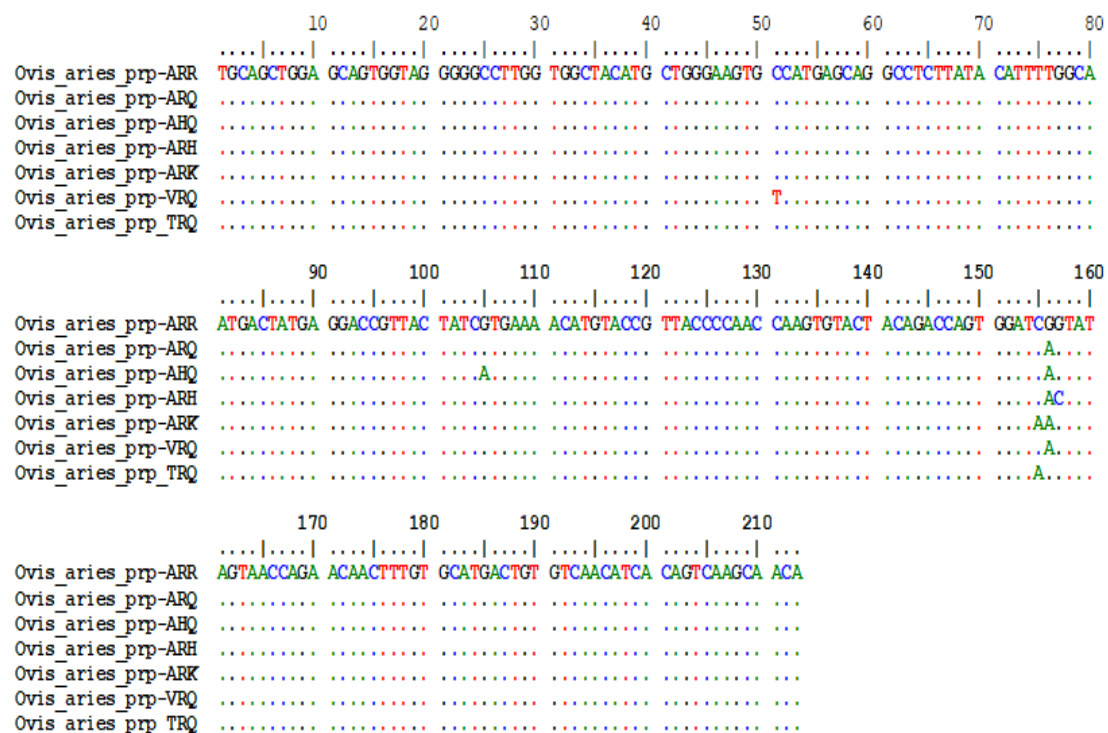
Πρακτικά για την εύρεση των γονοτύπων του συνόλου των δειγμάτων, πραγματοποιήσαμε με αντίστοιχο τρόπο ομαδοποίηση όλων των δειγμάτων με βάση τα όμοια πρότυπα ζώνωσεων που επιδείκνυαν, και στην συνέχεια ένα

αντιπροσωπευτικό δείγμα από κάθε ομάδα στάλθηκε σε εξωτερικό εργαστήριο για αλληλούχιση. Η αλληλούχιση των αντιπροσωπευτικών αυτών δειγμάτων, τα οποία ονομάσαμε «πρότυπα-δείγματα» , μας επέτρεψε στην συνέχεια να αντιστοιχίσουμε κάθε ομάδα δειγμάτων σε έναν πλέον γνωστό γονότυπο.

11.4 Αλληλούχιση

Για την μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης, χρησιμοποιήθηκαν και οι δυο εκκινητές. Τα χρωματογραφήματα που αντιστοιχούσαν σε κάθε δείγμα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το πρόγραμμα ClustalX. Από τα διαφορετικά πρότυπα SSCP, προέκυψαν συνολικά, επτά διαφορετικές αλληλουχίες. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες συγκρίθηκαν με τις καταχωρημένες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων NCBI, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST. Από την ανάλυση προέκυψαν επτά διαφορετικά αλληλόμορφα του γονιδίου PrP, τα ARR, ARQ, ARH, AHQ, ARK, VRQ, TRQ οποία παρουσιάζονται στην εικόνα 11.

Εικ. 11 Αλληλουχίες των επτά αλληλομόρφων. Παραθέτεται ολόκληρη η αλληλουχία του ARR και οι νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις που εντοπίζονται στα υπόλοιπα αλληλόμορφα σε σχέση με αυτό.



11.5 Γονότυποι και συχνότητες

Μετά τον προσδιορισμό των γονοτύπων στο σύνολο των δειγμάτων, κάναμε καταμέτρηση των περιπτώσεων στις οποίες εμφανίζεται ο κάθε γονότυπος και υπολογίσαμε την σχετική συχνότητα εμφάνισής τους στους δύο πληθυσμούς προβάτων. Παράλληλα, χρησιμοποιώντας δεδομένα από την κατηγοριοποίηση των ως τώρα ευρεθέντων γονοτύπων σε ομάδες ευαισθησίας/ανθεκτικότητας ή «risk groups» όπως περιγράφεται στις ενότητες 4.2 και 4.3 (Πίνακες 2 και 3), μπορέσαμε να κατατάξουμε και τα δικά μας δείγματα σε κάθε μια από αυτές τις κατηγορίες και δημιουργήσουμε έναν αντίστοιχο πίνακα με «ομάδες ρίσκου» συγκεκριμένα για τα άτομα των δύο αυτών πληθυσμών προβάτων. Οι γονότυποι TRQ/AHQ και ARQ/ARK είναι ευαίσθητοι γονότυποι, οι οποίοι όμως δεν αποδίδονται σε καμία από αυτές τις «ομάδες ρίσκου», καθώς παρουσιάζουν πολύ χαμηλές συχνότητες εμφάνισης σε παγκόσμια κλίμακα και συνεπώς δεν γνωρίζουμε την επίδραση που έχουν στην εκδήλωση της νόσου συγκριτικά με τους υπόλοιπους γονοτύπους του πίνακα. Συγκεκριμένα, όπως ήδη αναφέρθηκε στην ενότητα 4.3 οι γονότυποι TRQ/AHQ και ARQ/ARK βρέθηκαν για πρώτη φορά σε Ελληνικές φυλές και είναι εξαιρετικά σπάνιοι.

Πίνακας 5. Γονοτύποι που βρέθηκαν στους υπό μελέτη πληθυσμούς και συχνότητες εμφάνισης τους.

| Risk group | Γονοτυποι | Φρισάρτα | | Μπούτσικα | |
|------------------|-----------|----------|----------------|-----------|----------------|
| | | Άτομα | Σχ. Συχνότητες | Άτομα | Σχ. Συχνότητες |
| 1 | ARR/ARR | 3 | 7.6% | 4 | 10% |
| 2 | ARR/AHQ | 4 | 10% | 3 | 7.6% |
| | ARR/ARH | 6 | 15% | 3 | 7.6% |
| | ARR/ARQ | 6 | 15% | 7 | 18% |
| 3 | AHQ/AHQ | 0 | | 1 | 2.5% |
| 4 | ARQ/ARQ | 9 | 23% | 13 | 33% |
| | ARQ/AHQ | 9 | 23% | 3 | 7.6% |
| 5 | VRQ/ARQ | 1 | 2.5% | 0 | |
| Απροσδιόριστο | TRQ/AHQ | 0 | | 1 | 2.5% |
| | ARQ/ARK | 1 | 2.5% | 1 | 2.5% |
| Σύνολο δειγμάτων | | 39 | | 39 | |

12. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Μεταδοτική Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των προβάτων έχει αποτελέσει τις τελευταίες δεκαετίες, ένα από τα κύρια προβλήματα στον τομέα της κτηνοτροφίας, με επιπτώσεις τόσο οικονομικές αλλά και δυνητικά επικίνδυνες για τη δημόσια υγεία. Η ανάγκη για αντιμετώπιση της νόσου καθίσταται επιτακτική, κάτι το οποίο παρόλα αυτά είναι ιδιαίτερα δύσκολο, αν αναλογιστούμε πως η εκδήλωση της ασθένειας είναι πολυπαραγοντικό φαινόμενο. Η γνώση που έχουμε αποκομίσει μετά από χρόνια ερευνών, υποδεικνύει πως ο καλύτερος τρόπος για να αντιμετωπιστεί η Τρομώδης νόσος είναι μέσω πρόληψης. Είναι δεδομένο πως το σύνολο των αλληλομόρφων που έχει ανακαλυφθεί έως και σήμερα, στις διάφορες φυλές προβάτων που έχουν μελετηθεί, είναι ήδη αρκετά μεγάλο. Όμως διαφορετικοί πολυμορφισμοί χαρακτηρίζουν κάθε πληθυσμό, ενώ παράλληλα καινούργιοι πολυμορφισμοί ανακαλύπτονται συνεχώς διευρύνοντας την δεξαμενή των γνωστών αλληλομόρφων. Συνεπώς, το να προβλέψουμε το πως θα ανταποκριθούν οι διαφορετικοί πληθυσμοί προβάτων μετά την έκθεση τους στο ευρύ φάσμα μολυσματικών παραγόντων της scrapie γίνεται όλο και πιο δύσκολο. Η αντιμετώπιση λοιπόν της ασθένειας, απαιτεί την συνεχή ανανέωση και διεύρυνση της δικής μας γνώσης επάνω στο θέμα, κάτι το οποίο αποτέλεσε και αφορμή για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας.

Από τη γονοτυπική μελέτη που πραγματοποιήσαμε στα άτομα των δύο φυλών, Μπούτσικο και Φρισάρτα, προέκυψαν τα επτά αλληλόμορφα/απλότυποι που παρουσιάζονται στην ενότητα 11.4, δηλαδή τα ARR, ARQ, ARH, AHQ, ARK, VRQ, TRQ. Από αυτά, ξεκάθαρη συσχέτιση με ικανότητα ανθεκτικότητας μπορεί να αποδοθεί μόνο στο ARR (Hunter, 1997), ενώ τα υπόλοιπα ως επί το πλείστον έχουν συνδεθεί με ευαισθησία για την Τρομώδη Νόσο (Goldman, 2004). Εξαίρεση αποτελεί το ARH, του οποίου ο βαθμός ευαισθησίας/ανθεκτικότητας δεν είναι ξεκάθαρος και η κατηγοριοποίηση των γονοτύπων που το περιέχουν στις ομάδες ανθεκτικότητας/ευαισθησίας εξαρτάται από το αλληλόμορφο που το συνοδεύει. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 3, ο γονότυπος ARR/ARH ανήκει στην «ομάδα κινδύνου τύπου 2» η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό ανθεκτικότητας, ενώ αντίθετα ο γονότυπος VRQ/ARH ανήκει στην «ομάδα κινδύνου τύπου 5» που χαρακτηρίζεται από τον υψηλότερο βαθμό ευαισθησίας. Αυτό βέβαια ισχύει για όλους τους

προαναφερθέντες γονοτύπους, των οποίων το επίπεδο αντοχής/ευαισθησίας διαφέρει ανάλογα με τη σύσταση των αλληλομόρφων τους (Baylis, Goldman 2004).

Τα αποτελέσματα έδειξαν αρχικά μια ενδιαφέρουσα κατανομή «ευαίσθητων» και «ανθεκτικών» γονοτύπων στους δύο πληθυσμούς προβάτων. Συγκεκριμένα, και στις δύο φύλες οι γονότυποι που βρέθηκαν, ανήκαν ως επί το πλείστον είτε στις κατηγορίες 1 και 2 του πίνακα ομάδων ευαισθησίας/ανθεκτικότητας είτε στις ομάδες 4 και 5, με ισόποσο τρόπο. Χαρακτηριστικά, 19 άτομα από τη φυλή Φρισάρτα ανήκουν στις ομάδες υψηλότερης ανθεκτικότητας 1 και 2, ενώ τα υπόλοιπα 20 (από τα 39 συνολικά δείγματα) ανήκουν στις ομάδες αυξημένου κινδύνου 4 και 5. Στην περίπτωση της φυλής Μπούτσικο, οι τιμές αυτές είναι 17 και 22 άτομα αντίστοιχα. Φυσικά ο αριθμός των ατόμων που ελέγχθηκαν, δεν αποτελεί ένα στατιστικά αξιόπιστο δείγμα για να μπορέσουμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα για κάθε φυλή, καθώς οι μικρές αυτές διαφορές στις σχετικές συχνότητες κάθε γονοτύπου θα ήταν πολύ διαφορετικές σε μεγαλύτερη κλίμακα. Παρ' όλα αυτά το μοτίβο αυτό δεν είναι κάτι που μπορεί να αγνοηθεί.

Η περίπτωση ενός πληθυσμού προβάτων όπου τα μισά περίπου άτομα, όπως στην περίπτωση της φυλής Φρισάρτα φέρουν ανθεκτικούς γονοτύπους είναι ιδιαίτερα θετική κατάσταση από μόνη της. Όμως εαν εστιάσουμε στον κάθε γονότυπο ξεχωριστά, παρατηρούμε επιπλέον, ότι από τους γονοτύπους που ανήκουν στις ομάδες κινδύνου 4 - 5 και για τις δύο φύλες, το μεγαλύτερο μέρος των προβάτων φέρει τον γονότυπο ARQ/ARQ ή φέρει τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο ARQ, το οποίο όπως έχουμε προαναφέρει θεωρείται το «φυσικού τύπου» αλληλόμορφο και σε σχεδόν όλους τους πληθυσμούς προβάτων, συμπεριλαμβανομένων και ελληνικών φυλών, απαντάται με συχνότητα ίσως και μεγαλύτερη από 50% (Billinis Ch. et al 2004). Αυτό σημαίνει πως η παρουσία του αλληλομόρφου αυτού σε τόσο μεγάλο ποσοστό είναι αναμενόμενη. Από αυτήν την οπτική, μια φυλή της οποίας τα μισά άτομα είναι «φυσικού τύπου» και τα υπόλοιπα «ανθεκτικά» μπορεί να χαρακτηριστεί και ως ιδανική, συνυπολογίζοντας το ελάχιστο ποσοστό παρουσίας του αλληλομόρφου VRQ (ένα άτομο στο σύνολο το ατόμων που ελέγχθηκαν έφερε τον απλότυπο) που έχει συσχετιστεί με τον μεγαλύτερο βαθμό ευαισθησίας για την νόσο (Baylis, 2004).

Μπορούμε να συμπεράνουμε βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, πως οι δύο πληθυσμοί που ελέγχθηκαν κατά την έρευνα μας, μπορούν κάλλιστα να αποτελέσουν την βάση για την δημιουργία ανθεκτικών κτηνοτροφικών μονάδων έναντι στην τρομώδη νόσο, υπό την προϋπόθεση φυσικά ότι δεν θα αμεληθούν οι απαραίτητοι χειρισμοί από την μεριά των κτηνοτρόφων. Παράλληλα, αν τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιωθούν μελλοντικά και από κάποια μεγαλύτερης κλίμακας μελέτη και συνυπολογίζοντας την εμπορική αξία των δύο αυτών φυλών, τότε η εκτροφή προβάτων που θα ανήκουν σε αυτές θα αποτελέσει μια αξιόπιστη επιλογή για τους κτηνοτρόφους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Iowa State University Center for Food Security and Public Health. “Transmissible Spongiform Encephalopathies of Animals”. *Center for Food Security and Public Health Technical Factsheets* 137 (2016).
2. Αικατερινιάδου Λ., Μπελιμπασάκη Σ., Λυμπερόπουλος Α. “Διμιουργία κτηνοτροφικών μονάδων ανθεκτικών στην Τρομώδη νόσο των προβάτων. *Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης* (2005). 22-27.
3. Bruce M.E., Will R.G., Ironside J.W.W. et al. “Trasmissions to mice indicate that new variant CJD is caused by the BSE agent”. *Nature* 389 (1997): 498-501.
4. Parry H.B., “Scrapie: A transmissible and hereditary disease of sheep. *Heredity* 17 (1962): 75-105.
5. Griffith J.S. “Self-replication and scrapie”. *Nature* 215 (1967): 1043-1044.
6. Prusiner S.B. “Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie”. *Science* 216 (1982): 136-144.
7. Gibbs C.J., Gajdusek D.C., Latarjet R. “Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie”. *Proceedings of the National Academical Science of USA* 75 (1978): 6268-6270.
8. Bellingier-Kawahara C., Diener T.O., McKinley M.P., et al. “Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify or shear nucleic acids”. *Virology* 160 (1987): 271-274.
9. Barry R.A., Kent S.B., McKinley M.P., et al. “Scrapie and cellular prion proteins share polypeptide epitopes”. *Journal of infectious Diseases* 153 (1986) :848-154.
10. Bolton D.C., McKinley M.P., Prusiner S.B. “Identification of protein that purifies with the scrapie prion”. *Science* 218 (1982): 1309-1311.
11. Bruce M.E. “Scrapie strains variation and mutation”. *British Medical Bulletin* 49 (1993): 822-838.
12. Bessen R.A. and Marsh R.F. “Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathies in hamsters”. *Journal of General Virology* 73 (1992): 329-334.
13. Bessen R.A. “Neurodegenerative Prion Diseases”. *Science and Medicine* Sep/Oct (1996): 12-21.
14. Adams, D.B. “Prenatal Transmission of Scrapie in Sheep and Goats: A Case Study for Veterinary Public Health.” *Open Veterinary Journal* 6.3 (2016): 194–214.
15. McBride P.A., Schultz-Schaeffer J.W., Donaldson M. et al. “Early Spread of Scrapie from the Gastrointestinal Tract to the Central Nervous System Involves Autonomic Fibers of the Splanchnic and Vagus Nerves”. *Journal of Virology* 75 (2001): 9320-9327.
16. Van Keulen L.J.M., Vromans M.E.W. and Van Zijderveld, F. G. “Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep”. *APMIS* 110 (2002): 23–32.
17. Sandberg M.K., Al-Doujaily H., Sharps B. et al. “Prion propagation and toxicity occurs in two distinct mechanistic phases”. *Nature* 470 (2011): 540-542.

1. Bueler H, Aguzzi A., Sailer A. et al. "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie". *Cell* 73 (1993): 1339-1347.
2. Wulf M.A., Senatore A. and Aguzzi A. "The biological function of the cellular prion protein: an update". *BMC Biology* 15 (2017): 34.
3. Brown DR. "Prion and prejudice: normal protein and the synapse". *Trends in neuroscience* 24 (2001): 85-90.
4. Chiarini L.B., Freitas A.R., Zanata S.M. et al. "Cellular prion protein transduces neuroprotective signals". *The EMBO Journal* 21 (2002): 3317-3326.
5. Tobler I., Gaus E., Deboer T. et al. "Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein". *Nature* 380 (1996): 639-642.
6. Lobao-Soares B., Walz R., Carlotti Jr. C.G. et al. "Cellular prion protein regulates the motor behavior performance and anxiety-induced responses in genetically modified mice". *Behavioral Brain Research* 183 (2007): 87-94.
7. Atkinson C.J., Zhang K., Munn A.L., Wiegmanns A. et al. "Prion protein scrapie and the normal cellular prion protein". *Prion* 10 (2016): 63-82.
8. Brown Jr. R.H. "Amyotrophic Lateral Sclerosis and other Motor Neuron Diseases". *Harrison's Principles of Internal Medicine* Chapter 374.
9. Govaerts C., Wille H., Prusiner S.B. et al. "Evidence for assembly of prions with left-handed β -helices into trimmers". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101 (2004): 8342-8347.
10. Pan K.M., Baldwin M., Nguyen J. et al. "Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90 (1993): 10962-10966.
11. McKintosh E., Tabrizi S.J. and Collinge J. "Prion Diseases". *Journal of Virology* 9 (2003): 183-193.
12. Telling G.C., Scott M., Hsiao K.K. et al. "Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91 (1996): 9936-9940.
13. Kaneko K., Zulianello L., Scott M. et al. "Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94.19 (1997): 10069-10074.
14. Hachiya N.S., Sakasegawa Y. and Kaneko K. "Therapeutic Approaches in Prion Disease". *Journal of Health Science* 49.4 (2003): 267-272.
15. Penegyres P.K. and Armari E. "Therapies for human prion diseases". *American Journal of Neurodegenerative Disease* 2.3 (2013): 176-186.
16. Perrier V., Kaneko K., Safar J. et al. "Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99.20 (2002): 13079-13084.
17. Baylis M. and Goldmann W. "The genetics of scrapie in sheep and goats". *Current Molecular Medicine* 4 (2004): 385-396.
18. Goldman W. "PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies". *Veterinary research* 39 (2008): 30.

1. Baylis M., Goldmann W., Houston F. et al. "Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock". *The Journal of General Virology* 83.11 (2002): 2907-2914.
2. Goldmann, W., Baylis M., Chihota C. et al. "Frequencies of PrP gene haplotypes in British sheep flocks and the implications for breeding programmes". *Journal of Applied Microbiology* 98 (2005): 1294–1302.
3. Billinis Ch., Psychas V., Leontides L. et al. "Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece". *Journal of General Virology* 85 (2004): 547-554.
4. Westaway D., Zuliani V., Mirenda-Cooper C. et al. "Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie". *Genes and Development* 8 (1994): 959-969.
5. Hunter N., Goldmann W., Forster J.D. et al. "Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep". *The Veterinary Record* 141.6 (1997): 137-140.
6. Groschup M., Lacroux C., Buschmann A. et al. "Classic Scrapie in sheep with ARR/ARR Prion Genotype in Germany and France". *Emerging Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention* 13.8 (2007): 1201-1207.
7. Ekateriniadou L.V., Panagiotidis C. H., Terzis A. et al. "Genotyping for PrP gene polymorphisms in rare Greek breeds of sheep". *The Veterinary Record* 160 (2007): 194-105.
8. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F. et al. "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools". *Nucleic Acids Research* 25.24 (1997): 4876-4882.